

3.1. Considerații generale asupra funcționării biomembranelor

Deși, după cum am constatat în capitolul anterior, organizarea moleculară a biomembranelor se caracterizează prin mare diversitate de biocomponente, aflate într-o agitație permanentă, complexitatea acesteia nu complică, ci eficientizează funcționarea ultrastructurii care separă, dar și unește celula cu mediul. Ceea ce se complică este calea noastră de a elucidă mecanismele prin care membranele își îndeplinesc menirea. Totuși, pe măsură ce reușim să descifrăm ceea ce se întâmplă, din punct de vedere molecular, la nivelul biomembranelor ne dăm seama cât de important este faptul că ele sunt așa cum sunt.

Toate componentele membranare cooperează în asigurarea funcției ultrastructurii, iar colaborarea dintre biocomponentele ce o organizează asigură o combinatorie largă, ce permite celulei căi dintre cele mai diverse de a schimba substanțe și/sau de a comunica între ele, ori cu mediul extracelular. Complexitatea moleculară a membranelor se răsfrânge într-o complexitate funcțională care asigură, pe de o parte, investigarea a tot ceea ce se află împrejurul celulei (spațiul extracelular sau alte celule) și, pe de altă parte, declanșarea răspunsurilor celulare adecvate adaptării la mediul înconjurător. În toată această acțiune, caracteristicile organizării moleculare a membranei (eterogenitate, asimetrie, comportament de fluid bidimensional) capătă o deosebită importanță. Departe de a fi doar o structură eterogenă sumativă (elemente aruncate acolo, la grămadă), conținând o multitudine de tipuri de lipide/glicolipide și proteine/glicoproteine, membrana celulară se constituie ca un sistem biologic ce integrează marea diversitate de biomolecule exploatând-o în scopul rezolvării problemelor pe care le impun existența și supraviețuirea celulei în condițiile concrete ale mediului înconjurător. Așadar, prin toată discuția referitoare la funcționarea membranei ca sistem integrativ, cunoștințele referitoare la organizarea moleculară a acestei ultrastructuri vor sta la baza înțelegerii fenomenelor. Cum menirea membranei este aceea de a separa, dar a și uni celula cu mediul, aceste roluri implică asigurarea unui schimb de substanță și/sau informație cu exteriorul, riguros controlat. Asta înseamnă că biomembranele trebuie să îndeplinească rolul de barieră selectivă, în interesul adaptării și supraviețuirii celulelor.

Pentru o sistematizare a proceselor, vom include ceea ce ține de schimbul de substanțe dintre celulă și mediu într-o secțiune intitulată “**Transportul membranar**”, iar ceea ce ține de schimbul de informație sub titlul “**Semnalizarea celulară**”. Trebuie subliniat faptul că în realitate nu se poate face, de fapt, o separație între cele două tipuri de fenomene, ele coexistând și cooperând în realizarea eficientă a funcțiilor membranelor. Mai concret spus, transportul membranar este dependent (controlat și modulată) de fenomene de semnalizare celulară, iar semnalizarea celulară implică adesea fenomene de transport membranar.

Așadar, nimic din ceea ce se întâmplă la nivelul membranei nu poate fi scos din context (ca de altfel tot ce se întâmplă în celulă, în ansamblul său). Membrana asigură celulei informațiile necesare pentru supraviețuire și acțiune în funcție de ce se întâmplă în jurul său. Astfel, simultan, celula primește informații pe multiple căi, pe care le prelucrează și apoi, ținând cont de toate, răspunde printr-un comportament adecvat. Această capacitate a celulei de a primi și analiza informații multiple, culese prin diverse componente, din variate surse poate fi denumită în românește **diafonie** (termenul în engleză, folosit pentru a denumi aceste fenomene este „*cross-talk*”). Este vorba de interferențe între căile de semnalizare, care modulează reciproc efectele diverselor informații primite de celule și prin care se realizează răspunsul cel mai optim și cea mai adecvată comportare a celulelor în

contextul dat. Un exemplu de diafonie este cel ce determină motilitatea celulară, care se desfășoară sub acțiunea semnalelor primite prin factori de creștere, citokine sau chemokine, semnale care influențează activitatea integrinelor [1-5]. Astfel, pentru a decide să migreze dintr-un loc în altul în țesuturi, celulele utilizează informațiile primite prin receptori pentru diverși factori chemo-/cito-tactici, ca și prin integrine a căror interacțiune cu substratul (biocomponente din matricea extracelulară) și distribuție membranară sunt modulate și adaptate, pentru a favoriza complexe procese ce însoțesc mișcarea celulei. Analiza semnalelor ce vin de la receptori și integrine conduce la declanșarea unor reorganizări ale citoscheletului, cu efecte asupra morfologiei celulare și forțelor necesare deplasării. Mai mult, dincolo de semnificația fiziologică a ceea ce se întâmplă la nivelul membranei, procese patologice dintre cele mai diverse sunt însoțite de alterări ale acestor colaborări [5-7].

În cele ce urmează vom detalia mai întâi aspecte legate de transportul membranar, după care ne vom direcționa atenția asupra complexității proceselor de semnalizare celulară.

Bibliografie selectivă

1. **Ciobanasiu C, Faivre B, Le Clainche C.** (2013) Integrating actin dynamics, mechanotransduction and integrin activation: The multiple functions of actin binding proteins in focal adhesions. *Eur J Cell Biol.* **92**(10-11): 339-348. DOI: 10.1016/j.ejcb.2013.10.009.
2. **Sasaki AT, Firtel RA.** (2006) Regulation of chemotaxis by the orchestrated activation of Ras, PI3K, and TOR. *Eur J Cell Biol.* **85**(9-10): 873-895.
3. **Ayuso-Sacido A, Graham C, Greenfield JP, Boockvar JA.** (2006) The duality of epidermal growth factor receptor (EGFR) signaling and neural stem cell phenotype: cell enhancer or cell transformer? *Curr Stem Cell Res Ther.* **1**(3): 387-394.
4. **Leabu M, Uniyal S, Xie J, Xu YQ, Vladau C, Morris VL, Chan BM.** (2005) Integrin $\alpha 2 \beta 1$ modulates EGF stimulation of Rho GTPase-dependent morphological changes in adherent human rhabdomyosarcoma RD cells. *J Cell Physiol.* **202**, 754-766.
5. **Bershadsky A, Chausovsky A, Becker E, Lyubimova A, Geiger B.** (1996) Involvement of microtubules in the control of adhesion-dependent signal transduction. *Curr Biol.* **6**(10): 1279-1289.
6. **Miyazono K.** (2009) Transforming growth factor-beta signaling in epithelial-mesenchymal transition and progression of cancer. *Proc Jpn Acad Ser B Phys Biol Sci.* **85**(8): 314-323.
7. **Bierie B, Moses HL.** (2010) Transforming growth factor beta (TGF-beta) and inflammation in cancer. *Cytokine Growth Factor Rev.* **21**(1): 49-59. DOI: 10.1016/j.cytogfr.2009.11.008.

3.2. Transportul membranar

Prin transport membranar¹ înțelegem totalitatea proceselor prin care celula folosește componentele membranei pentru schimbul de substanță pe care îl efectuează cu mediul. În funcție de felul în care substanțele anorganice sau organice solubilizate ori unele materiale insolubile (cum ar fi bacterii, debriuri celulare etc.) pătrund în sau ies din celulă, adică în funcție de calea pe care substanțele/materialele o urmează în cursul schimbului dintre celulă și mediu, ca și de mecanismele implicate, transportul membranar poate fi clasificat în două categorii principale:

1. **Transport prin membrană**, atunci când substanțele străbat membrana (din exterior spre interior sau invers) fie direct printre lipidele bistratului, fie prin biostructuri specializate organizate de proteinele transmembranare;
2. **Transport cu membrană (transport vezicular)**, atunci când substanțele sunt introduse în celulă sau eliminate din aceasta prin intermediul unor vezicule delimitate de (endo)membrane care se desprind de membrana celulară sau fuzionează cu ea, pentru a efectua schimbul.

Transportul prin membrană este specific ionilor și moleculelor mici ($\varphi < 10\text{\AA}$; $M < 800\text{Da}$). Transportul cu membrană realizează schimbul de molecule mari ($\varphi > 10\text{\AA}$; $M > 800\text{Da}$), de macromolecule, respectiv de particule. Indiferent de sensul în care are loc schimbul (din exterior în celulă sau din celulă către exterior), această selectare rămâne valabilă între cele două tipuri de transport. De remarcat că parametrii referitori la gabaritul compușilor transportați sunt valori mediate și ar fi valabile la modul absolut doar pentru structuri sferice/globulare. În realitate, procesul de transport al moleculelor mici prin membrană depinde și de geometria acestora, molecule alungite, care depășesc 800Da , putând fi transportate **prin** membrană (spre exemplu prin joncțiunile comunicante; vezi în volumul al II-lea).

3.2.1. Transportul prin membrană

Fenomenele de transport prin membrană sunt de o mare diversitate, ceea ce impune, pentru o mai ușoară abordare și înțelegere, sistematizări pe mai multe niveluri. Calea cea mai utilă pentru sistematizare e reprezentată de clasificarea pe criterii din ce în ce mai de detaliu.

În funcție de necesarul de energie care se consumă pentru desfășurarea sa, transportul prin membrană se clasifică în următoarele două mari categorii (Fig. 3.1.):

1. **Transport pasiv**, care nu necesită consum energetic concomitent pentru trecerea de substanță prin membrană;
2. **Transport activ**, care necesită consum de energie în momentul trecerii prin membrană a substanței transportate.

Pe de altă parte, transportul prin membrană se poate face direct printre lipidele bistratului (ceea ce se mai numește difuziune simplă; Fig. 3.1, exemplul 1) sau prin structuri organizate de proteine (transport facilitat; Fig. 3.1, exemplele 2 și 3). Transportul prin membrană care necesită proteine specific organizate transmembranar se poate desfășura fie de la concentrație mare la concentrație mică, acesta numindu-se difuziune facilitată (Fig. 3.1, exemplul 2), fie de la concentrație mică spre concentrația mare, ceea ce necesită consum energetic (Fig. 3.1, exemplul 3), acesta numindu-se transport activ, tocmai pentru că necesită energie (în greaca

¹ Suntem nevoiți să facem specificația nuanțării în limba română a denumirilor: fenomenele de transport ce se petrec la nivelul membranelor le denumim global prin sintagma "transport membranar". Aceasta deoarece prima clasificare, legată de criteriul căii urmate de substanțele transportate și mecanismele implicate, aduce expresia "transport prin membrană", care ar putea fi confundată cu termenul general (într-un limbaj simplist), dar care are o definiție concretă ce respectă complexitatea de fenomene de transport de la nivelul membranelor.

veche *ἐνέργεια* înseamnă activitate). După această nuanțare a viziunii asupra complexității fenomenelor de transport prin membrană, vom detalia informațiile legate de acesta urmând clasificarea după criteriul consumului de energie. Așadar vom aborda mai întâi transportul pasiv, după care vom completa cunoștințele cu aspecte legate de transportul activ.

3.2.1.1. Transportul pasiv

Transportul pasiv mai este denumit și transport disipativ, deoarece implică difuziunea care reprezintă mișcarea de substanță de la concentrație mare la concentrație mică. În contextul discuției noastre, transportul pasiv disipează practic gradientele de concentrație aflate de o parte sau de alta a barierei pe care membranele o reprezintă; tocmai de aceea transportul pasiv nu necesită energie. Cum trebuie înțeles acest transport și cum îl putem sistematiza prin clasificări, pentru simplificarea înțelegerii?

Unele molecule mici (în limita de gabarit specificată mai sus) pot străbate membrana strecurându-se printre lipidele membranare (Fig. 3.1, exemplul 1). Acest lucru este ușor de înțeles dacă ne gândim că lipidele, așezate în bistrat, au mișcări de o mare diversitate și nu organizează o structură cu o compactitate rigidă, lăsând în permanență între ele spații de dimensiuni și geometrii variabile. În aceste spații, o serie de molecule mici se pot insinua (dacă dimensiunile le permit) și în felul acesta pot trece mai repede sau mai încet dintr-o parte în cealaltă a membranei. Acest tip de trecere se face fără a necesita consum concomitent de energie și este, de aceea, transport pasiv.

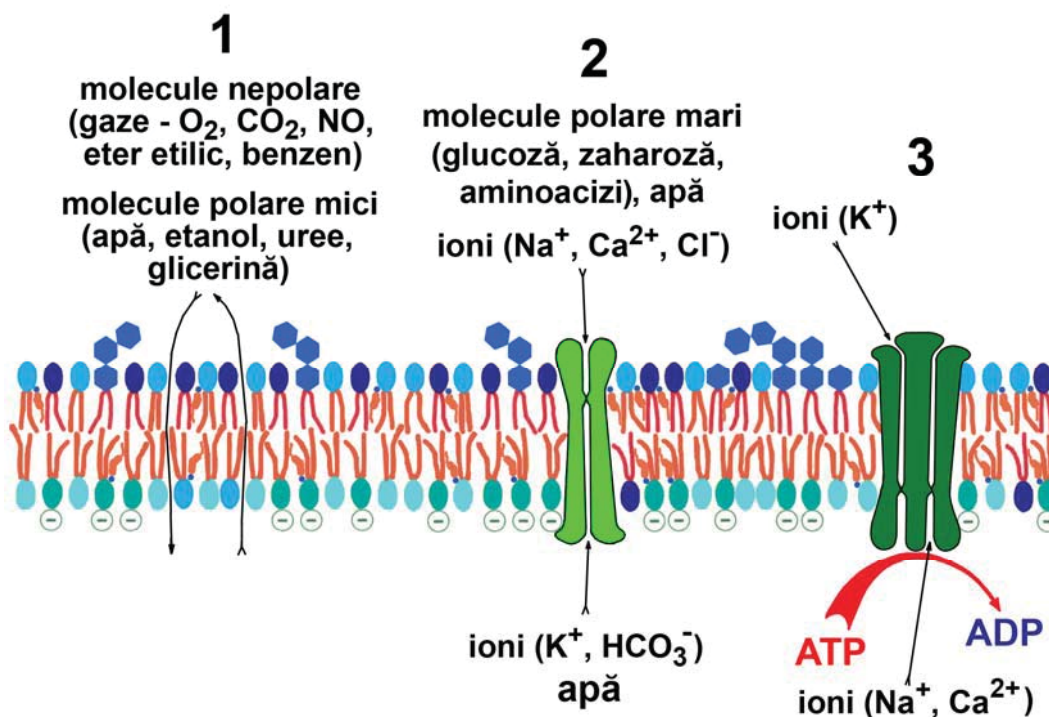


Fig. 3.1. Clasificări ale transportului prin membrană în termeni vizuali. Pozițiile 1 și 2 reprezintă situații de transport pasiv, adică difuziune simplă (1) care se desfășoară direct printre lipidele bistratului, respectiv difuziune facilitată (2) care se desfășoară prin structuri transmembranare organizate de proteine (transportori sau canale). Poziția 3 reprezintă transport activ, facilitat de asemenea de structuri transmembranare organizate de proteine specializate în a folosi energie pentru trecerea de substanțe dintr-o parte în alta a membranei, împotriva gradientelor de concentrație. Săgețile indică sensuri dependente de condițiile concrete în care fenomenele de transport se petrec. © Mircea Leabu, 2014.

Calea transportului pasiv printre moleculele lipidelor membranare poate fi urmată de moleculele nepolare sau hidrofobe (spre exemplu: molecule de gaze – O_2 , N_2 , CO_2 , NO , CO , eter etilic, benzen și asemănătoare), dar și de moleculele polare mici (cu masa moleculară sub 100Da; de exemplu: H_2O , etanolul, ureea, glicerina), care se pot strecura în și prin spațiile dintre lipide. Acest transport, care se desfășoară prin trecerea substanțelor printre lipidele membranare, este numit și **difuziune simplă**.

Pentru moleculele polare mari (cu greutatea moleculară între 100 și 800Da), cât și pentru ioni, transportul prin membrană se face numai cu implicarea unor proteine transmembranare ale căror domenii ce străbat bistratul organizează structuri specifice care se constituie drept căi de traversare a planului membranei pentru compușii transportați. Aceste proteine poartă denumirea de **transportori** (pentru molecule polare mari: glucoză, aminoacizi, nucleotide) sau **canale ionice** (firește, pentru ioni: H^+ , Na^+ , HCO_3^- , K^+ , Ca^{2+} , Cl^- , Mg^{2+}). Transportorii menționați precum și canalele ionice efectuează tot un transport pasiv (fără consum concomitent de energie), deoarece trecerea se face de la concentrație mare către concentrație mică. Transportul pasiv prin transportori sau prin canale ionice se numește și **difuziune facilitată**.

În funcție de numărul tipurilor de substanță transportate simultan, transportul facilitat (inclusiv difuziunea facilitată) poate fi clasificat în (Fig. 3.2): (i) **transport singular** numit și **transport uniport** (Fig. 3.2, exemplul 1), când este transportată o singură entitate (bio)chimică (ion sau moleculă) sau (ii) **transport cuplat**, numit și **co-transport**, când sunt transportate simultan (adică într-un singur ciclu) două sau mai multe entități (bio)chimice (ioni, molecule sau ioni și molecule). La rândul său, transportul cuplat se poate clasifica în două tipuri, în funcție de sensul în care sunt transportate diferitele substanțe. Când toate substanțele sunt transportate în același sens, transportul cuplat este numit **simport** (Fig. 3.2, exemplul 2). Dacă cel puțin una dintre substanțele transportate este purtată în sens opus celorlalte, co-transportul este numit **antiport** (Fig. 3.2, exemplul 3).

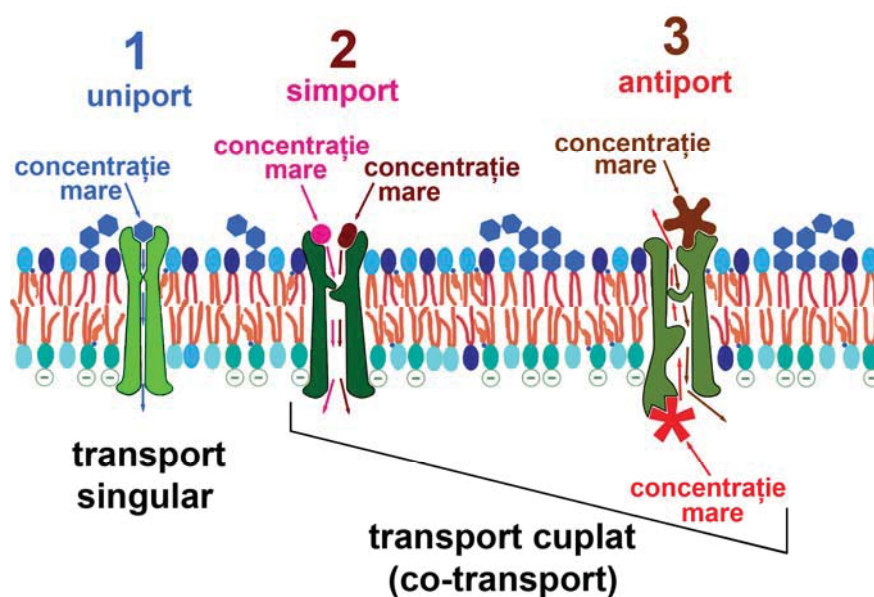


Fig. 3.2. Tipuri de transport pasiv prin membrană, facilitat de proteine (difuziune facilitată), definite în funcție de numărul de entități (bio)chimice transportate simultan (adică în decursul unui ciclu de transport). 1 – uniport; 2 – simport; 3 – antiport. Săgețile colorate indică, în parte, sensul de mișcare al fiecărei entități chimice transportate.

© Mircea Leabu, 2014.

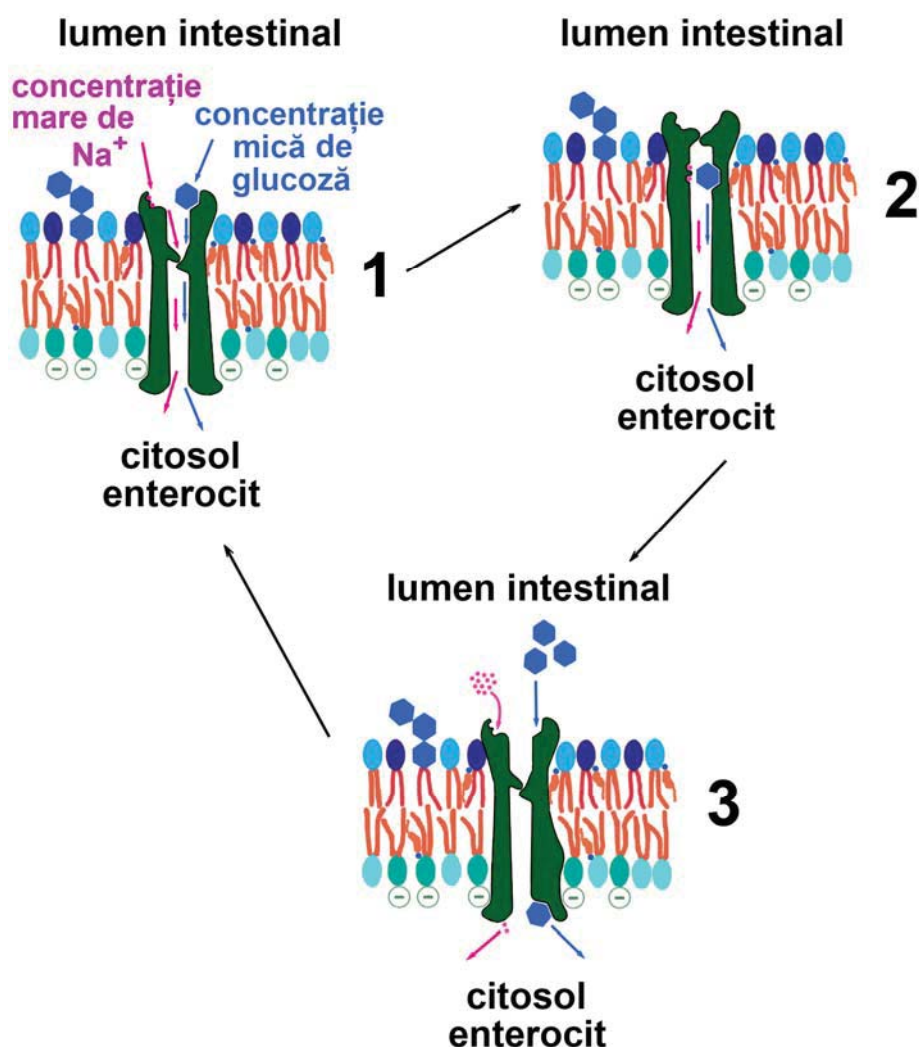


Fig. 3.3. Co-transportorul de glucoză și sodiu din membrana apicală a enterocitelor, ca exemplu de simport. Proteina transmembranară care structurează transportorul leagă doi ioni de sodiu (concentrație mare) și o moleculă de glucoză (concentrație mică) din lumenul intestinal (1). Legarea entităților transportate atrage modificări în conformația proteinei, cu trecerea ionilor și glucidului prin căile transmembranare de transport, organizate de proteină și cu asigurarea blocării trecerii altor elemente (2). Eliberarea compușilor transportați în citosol determină rearanjări în conformația transportorului cu refacerea, în ectodomeniu, a siturilor de legare a ionilor și glucozei (3), un nou ciclu de transport putând fi inițiat. © Mircea Leabu, 2014.

Ca exemplu de transportor uniport, amintim **transportorul de glucoză** din membrana eritrocitară (GLUT1) [1]. Este o proteină multipas, cu masa moleculară de ~45kDa, având 12 treceri în α -helix prin planul membranei, la nivelul cărora, alături de aminoacizi hidrofobi, găsim și Ser, Thr, Asn și Gln, aminoacizi polari responsabili, în timpul procesului de transport, de interacțiunea cu molecula de glucoză pentru trecerea ei prin membrană. Ambele capete terminale ale lanțului polipeptidic sunt expuse în citosol. În membrana eritrocitară există peste 200 000 de molecule de transportor GLUT1 pentru o celulă. GLUT1 face parte dintr-o familie de transportori de glucoză cu 14 membri (GLUT1-14), toți cu câte 12 treceri în α -helix prin planul membranei și cu capetele N- și C-terminale în endodomeniu. Transportorii GLUT sunt întâlniți și în membranele altor tipuri de celule animale, nu numai în eritrocite sau în linia hematopoietică eritroidă [2-5]. În condiții bazale, în celulele musculare și în adipocite GLUT4 suferă un proces continuu, dar cu dinamică scăzută de reciclare între membrană și câteva compartimente intracelulare, cu numai 5% din totalitatea

moleculelor expuse în membrana celulară. După stimulare cu insulină, în 2-3 minute, celulele modifică echilibrul între cantitatea de GLUT4 aflată în compartimente intracelulare și cea expusă în membrană, care crește la 50% [5]. Aceste observații susțin afirmația făcută mai sus cum că transportul și semnalizarea sunt procese membranare ce se influențează reciproc.

Ca transportor simport (Fig. 3.3), merită amintit **co-transportorul de sodiu/glucoză** (SGLT1) din membrana apicală a enterocitelor (celulele absorbante din intestin) [6, 7]. De remarcat faptul că acest transportor folosește disiparea gradientului de Na^+ , pentru a prelua glucoza din lumenul intestinal în citosolul enterocitelor, împotriva gradientului de concentrație a glucidului. Un asemenea transport mai este numit și **transport activ secundar**, deoarece se bazează practic pe energia consumată anterior de celulă pentru menținerea gradientului de Na^+ (12mM în celulă, 145mM în exterior), ceea ce se realizează prin activitatea pompei de sodiu și potasiu, un antiport (vezi mai jos la **3.2.1.3. Transportul activ**). Asta înseamnă că glucoza, transportată împotriva gradientului de concentrație prin disiparea celui al sodiului, este eficient absorbită din lumenul intestinal către spațiul de sub epiteliu de unde este preluată în circulația sanguină. SGLT1 este proteină transmembranară multipas cu 14 treceri în α -helix prin planul membranei, dintre care trecerile 10-14 au fost dovedite ca structurând calea de trecere a glucozei. Ambele capete ale lanțului polipeptidic sunt în ectodomeniu. În bucla hidrofilă N-terminală SGLT1 este glicozilat, dar structurile glucidice nu sunt necesare activității biologice. Lanțul polipeptidic al SGLT1 are 664 de aminoacizi și o masă moleculară de ~73kDa. Un ciclu al mecanismului de transport co-transportă 2 ioni de sodiu și o moleculă de glucoză. În membranele latero-bazale ale enterocitelor se găsește un transportor uniport de glucoză (GLUT2) prin care glucoza introdusă în celulă de SGLT1 este transportată în spațiul subepitelial [7]. SGLT1 face parte dintr-o familie de co-transportori sodiu/glucoză ce conține peste 220 de membri în celulele eucariote și procariote, iar la om 11 membri [6]. Genele ce codifică cei 11 membri duc predictibil la proteine cu greutatea moleculară între 60 și 80kDa, conținând de la 580 până la 718 aminoacizi. Cu excepția a doi dintre membri, ceilalți realizează 14 treceri în α -helix prin planul membranei.

Ca exemplu de transport antiport, readucem în atenție **canalul de schimb anionic $\text{HCO}_3^-/\text{Cl}^-$** din membrana eritrocitară [8, 9], denumit simbolic prin banda 3, dar pentru care se folosește și abreviația AE1 (vezi detalii structurale la subcapitolul „**Proteine membranare**”, secțiunea „*Exemple de proteine membranare*”). Schimbul anionic (1:1) poate fi inversat în funcție de concentrațiile bicarbonatului în celulă, respectiv mediul extracelular. Proteine similare se întâlnesc și în alte tipuri de celule, iar familia acestora poartă denumirea de schimbători anionici (prescurtat AE, de la sintagma englezească *Anion Exchanger*). În celulele noneritroide au fost identificate AE2 și AE3 [10, 11]. Alături de controlul homeostaziei eritrocitare și tisulare a CO_2 , prin schimbul $\text{HCO}_3^-/\text{Cl}^-$, aceste canale acționează și în controlul și reglarea pH-ului celular și al sângelui [11]. Această activitate de reglare a pH-ului sângelui (respectiv urinei) se manifestă și la nivelul nefrocitelor, unde la schimbul pasiv $\text{HCO}_3^-/\text{Cl}^-$ se adaugă activitățile unui canal uniport de Cl^- , necesar menținerii homeostaziei intracelulare a anionului și ale unei pompe protonice, destinată eliminării H^+ rezultat din hidroliza acidului carbonic, obținut prin hidratarea CO_2 .

Un alt antiport, prezent în membrana celor mai multe celule excitabile sau secretoare [12], este **schimbătorul de $\text{Ca}^{2+}/\text{Na}^+$** , care efectuează tot un transport activ secundar, eliminând un ion Ca^{2+} prin introducerea a 3 ioni Na^+ . (De fapt sunt raportate valori diferite de ioni Na^+ schimbați cu un ion Ca^{2+} , astfel încât mai circumspect ar fi să spunem că stoichiometria antiportului este mai mult de 2 Na^+ , pentru 1 Ca^{2+} [13]). Familia de proteine transmembranare cu această funcție este

notată prescurtat cu NCX (de la *Natrium-Calcium eXchanger*), fiind identificați la mamifere trei membri: NCX1, NCX2 și NCX3. NCX1 se află în aproape toate țesuturile, dar este exprimat mai abundent în inimă, creier și rinichi [14]. NCX1 are 938 aminoacizi (110kDa, masă deductibilă din secvența de aminoacizi) și are 9 domenii transmembranare în α -helix [15]. Capătul amino terminal al lanțului polipeptidic se află la suprafața membranei, așadar NCX1 este proteină transmembranară tip I, iar între segmentele transmembranare 5 și 6 se structurează o buclă citosolică (adică pe fața internă a membranei) de 550 de aminoacizi (mai mult de jumătate din lungimea lanțului polipeptidic) esențială pentru reglarea activității canalului. Activitatea schimbătorului $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ este dependentă de concentrațiile extracelulară, respectiv citosolică ale cationilor schimbați, dar și de concentrația H^+ , a ATP și a fosfoinozitidelor bis-fosforilate [13]. În funcție de potențialul de membrană și de concentrațiile aflate de o parte sau de cealaltă a membranei pentru cationii transportați, schimbul poate fi inversat. De remarcat este faptul că în celula musculară cardiacă, unde contribuția de calciu citosolic necesar contracției se datorează masiv (~70%) eliberării din reticulul sarcoplasmic, iar numai în mică măsură (~30%) invaziei de calciu extracelular, eliminarea procentelor de Ca^{2+} din citosol, necesară procesului de relaxare se face în principal prin NCX și nu prin pompa de calciu sarcolemală (adică pompa de calciu din membrana celulei musculare). În cazul reintroducerii Ca^{2+} în reticulul sarcoplasmic, contribuția revine în exclusivitate pompei de calciu din membrana organitului [16]. De regulă NCX transportă de 10, 15 ori mai mult Ca^{2+} în afara celulei decât pompa membranară de calciu [14].

Transportul pasiv, oricum s-ar desfășura, se petrece în sensul de diminuare a gradientului de concentrație al componentei transportate. De aceea se mai numește și **transport disipativ**, **transport entropic** sau **transport la vale** (de la concentrație mare, la concentrație mică). Acest tip de transport se poate desfășura, teoretic, până când concentrația componentei transportate se egalizează de cele două părți ale membranei prin care se desfășoară. Această situație ipotetică nu se realizează în realitate, în cazul ionilor, datorită mecanismelor de control al activității canalelor.

Asupra acestor aspecte, legate de activitatea canalelor ionice membranare, se pot face comentarii suplimentare. Canalele nu sunt permanent deschise, iar celula poate controla/comanda funcționarea lor. În funcție de mecanismul prin care este controlat regimul de deschidere a lor, canalele ionice se pot împărți în trei categorii (Fig. 3.4):

1. **Canale ionice controlate** (operate) **electric** (prin voltaj), adică prin modificarea potențialului de membrană (Fig. 3.4, exemplul 1). Acestea sunt închise (Fig. 3.4, 1a) atunci când potențialul membranei este cel normal (adică 50 – 70mV, cu minus pe partea citosolică). Canalele controlate electric se deschid atunci când potențialul de repaus al membranei se modifică (Fig. 3.4, 1b).
2. **Canale ionice controlate** (operate) **chimic** (prin liganzi) (Fig. 3.4, exemplul 2), adică se deschid atunci când proteina, care formează structura transmembranară destinată transportului, leagă un compus chimic (ligandul) care schimbă conformația complexului (Fig. 3.4, 2b). Ligandul se poate lega în ectodomeniul proteinei care structurează canalul (sau al uneia dintre subunități, dacă este multimer) fiind ligand extracelular sau, pentru alte tipuri de canale, la endodomeniu (ligand intracelular sau citosolic).
3. **Canale ionice controlate mecanic**, adică a căror stare deschisă/închisă este dependentă de exercitarea unor tensiuni mecanice asupra membranei (Fig. 3.4, exemplul 3).

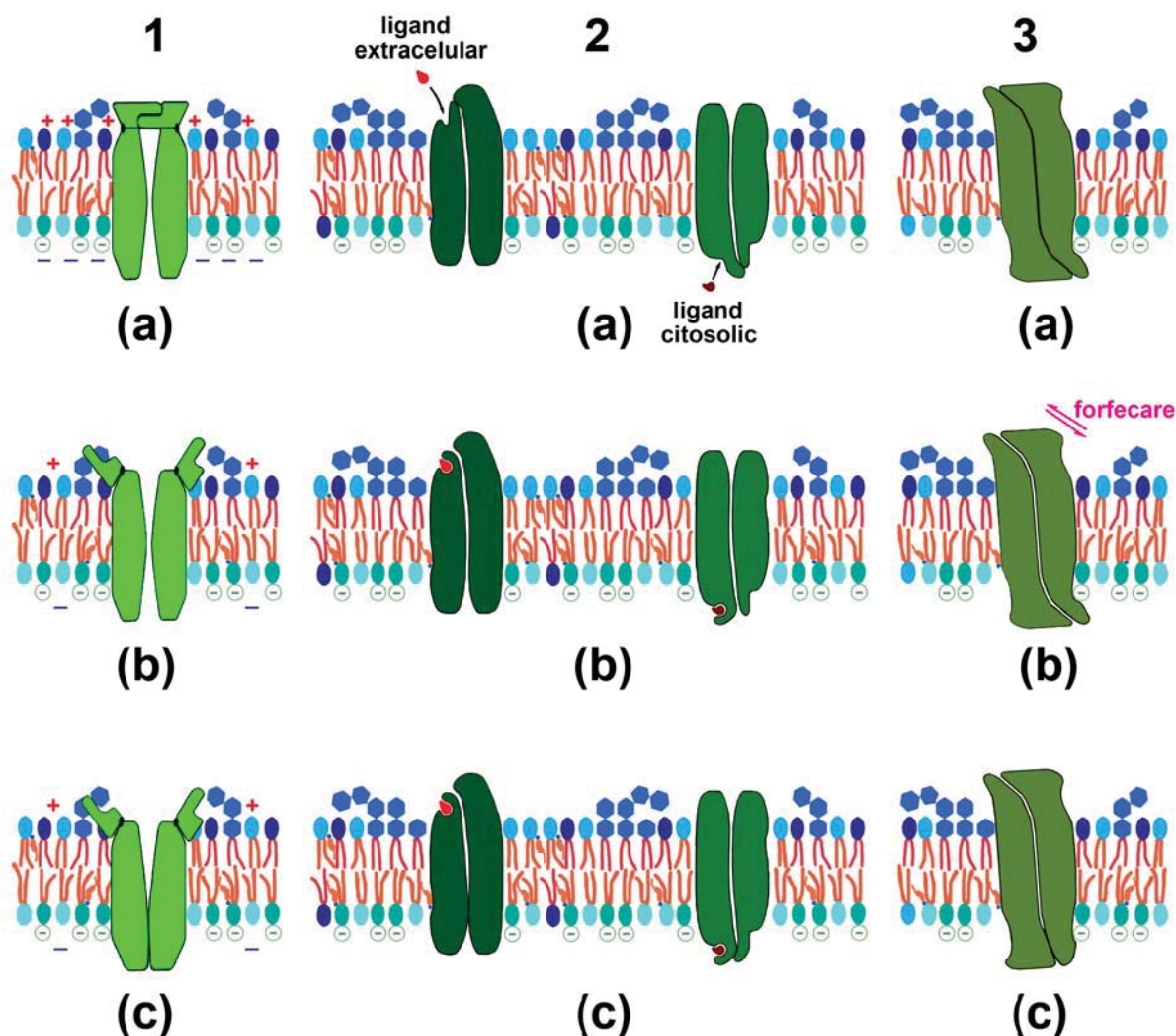


Fig. 3.4. Tipuri de canale ionice și stările lor. 1 – canal controlat electric: închis (a), în condiții de repaus (potențialul membranei normal); deschis (b), când potențialul membranei este modificat; inactiv (c), devenit refractar la persistența modificării potențialului membranei. 2 – canale controlate chimic (prin ligand): închis (a), în absența ligandului legat de complexul proteic transmembranar; deschis (b), ca urmare a legării ligandului; inactiv (c), în conformație închisă, deși ligandul este legat. Este evidențiat faptul că, pentru canalele comandate chimic, ligandul poate fi extracelular sau citosolic. 3 – canale controlate mecanic: închis (a), în absența tensiunii/stresului mecanic; deschis (b), atunci când se exercită o tensiune mecanică asupra membranei; inactiv (c), când deși stresul mecanic persistă, canalul adoptă conformație închisă, devenind refractar la stimul. Este reprezentat faptul că, la inactivare, închiderea se realizează (de regulă) în zona endodomeniului, ca urmare a schimbărilor citosolice locale în homeostazia ionilor transportați. © Mircea Leabu, 2014.

Trebuie menționat că activarea canalelor respectă un mecanism ciclic. Acesta asigură inactivarea lor chiar în condițiile care au determinat deschiderea (adică în condițiile persistenței stimulului), deoarece pot prezenta trei stări:

- starea închisă (Fig. 3.4, situațiile a), de repaus, în absența stimulului (modificarea potențialului, legarea ligandului sau tensiunea mecanică);
- starea deschisă, care permite trecerea ionilor, după apariția stimulului (Fig. 3.4, situațiile b);
- starea inactivă, închisă la prezența prelungită a stimulului (Fig. 3.4, situațiile c); aceasta înseamnă pentru cele trei tipuri de canale: (i) conformație închisă sub potențial de membrană modificat (altă conformație decât cea închisă de repaus), (ii) ocupat de ligand dar închis și (iii) închis în prezența tensiunii mecanice care a determinat deschiderea.

Această trecere într-o stare refractară a canalelor ionice asigură menținerea homeostaziei ionice intracelulare în condițiile de persistență a semnalelor, refacerea potențialului membranar, desprinderea ligandului și, eventual, metabolizarea sa, cu revenirea celulei la starea bazală, adică starea de neexcitație, astfel încât să devină sensibilă la o nouă stimulare. De remarcat că trecerea în stare refractară se petrece datorită modificărilor spațio-temporale în homeostazia ionică din citosolul subcortical (de regulă), ceea ce atrage schimbări de conformație a endodomeniilor transportorilor [17-19]. Aceste schimbări care induc inactivarea canalelor pot fi sau nu însoțite de modificări chimice ce se petrec asupra lanțului polipeptidic [20, 21].

Dintre cele trei tipuri de canale ionice, cele controlate mecanic (Fig. 3.4, exemplul 3) au fost ultimele descoperite și sunt și cele mai dificil de investigat, începând chiar cu stabilirea faptului că sunt controlate mecanic. Dificultățile se datorează următoarelor aspecte [22]:

- (i) celulele mecano-senzitive nu sunt numeroase în organism și sunt împrăștiate printre multe alte tipuri celulare, spre deosebire de celulele care conțin canale din celelalte tipuri;
- (ii) numărul de canale controlate mecanic în membranele celulelor mecano-senzitive este de câteva ordine de mărime mai scăzut decât numărul canalelor comandate electric sau chimic (de exemplu, eritrocitele au $1,2 \times 10^6$ molecule de banda 3, membrana celulelor cu bastonașe conține aproximativ 4×10^7 molecule de rodopsină, celulele olfactive în jur de $1,7 \times 10^7$ receptori olfactivi, în timp ce celulele păroase din organul lui Corti au între 50 și 100 de canale controlate mecanic);
- (iii) dovedirea proprietăților mecano-senzitive ale eventualilor candidați este dificilă cu tehnicile clasice.

În ciuda acestor dificultăți, interesul pentru studiul canalelor controlate mecanic este deosebit de actual, atâta timp cât dorim să cunoaștem mecanismele celulare și moleculare ale receptării, controlării și reglării presiunii sanguine, ale senzațiilor tactile, ale percepției sunetelor, gravitației și accelerației. Din ceea ce se cunoaște până în prezent, canalele controlate mecanic sunt împărțite în patru tipuri [22]: degenerine/canale epiteliale de sodiu (abreviere DEG/ENaC, de la **DEG**enerin/**E**pithelial **N**atrium **C**hannel), canale receptor tranzient de potențial (prescurtat canale TRP, de la **T**ransient **R**eceptor **P**otential), canale de potasiu cu doi pori (notate K_{2P}) și canale mecano-senzitive de conductanță mică (abreviat MscS, de la **M**echano**s**ensitive **c**hannel of **S**mall **c**onductance). O trăsătură comună a acestor canale controlate mecanic este aceea că generează semnale electrice foarte rapide, cu o latență de sub 1ms.

Suntem la un capitol destinat înțelegerii funcționării biomembranelor ca sisteme integrative, ceea ce înseamnă nu doar că toate tipurile de componente ce le organizează (lipide, proteine și componenta glucidică) participă la funcțiile membranelor, dar și că putem exemplifica modul în care cooperează elemente cu funcții variate în fenomene celulare complexe. Pentru înțelegerea faptului că evenimentele celulare nu se petrec individual, ci într-o permanentă cooperare și completare, ca și pentru conștientizarea faptului că celulele se comportă adecvat situațiilor în care sunt puse numai datorită acestei conlucrări a componentelor lor, inclusiv a componentelor membranare, putem exemplifica prin ceea ce se petrece la nivelul joncțiunilor neuro-musculare în momentul stimulării celulei musculare pentru contracție, de către sistemul nervos (Fig. 3.5). Este vorba aici de o cooperare eficientă între diferite tipuri de canale (în cazul acesta între canale comandate electric și canale comandate prin ligand).

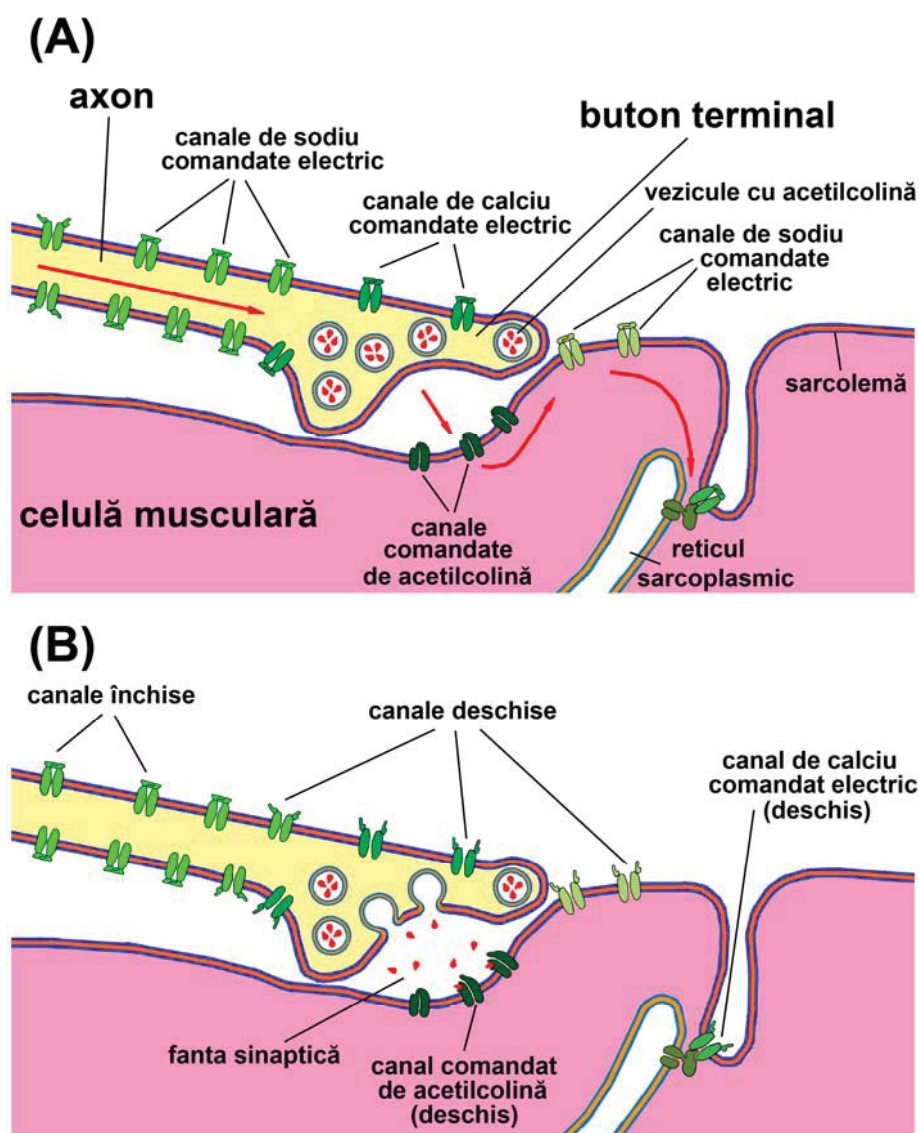


Fig. 3.5. Cooperarea diferitelor tipuri de canale la nivelul joncțiunii neuro-musculare. A. Joncțiunea aflată în repaus, deoarece impulsul nervos nu a ajuns la butonul terminal. Canalele de calciu controlate electric, care comandă exocitarea acetilcolinei, sunt închise. Săgețile roșii sugerează direcția de propagare a semnalului. **B.** Joncțiunea neuro-musculară activată. Stimularea nervoasă a ajuns la butonul terminal, canalele de calciu operate electric sunt deschise, iar creșterea concentrației de Ca^{2+} în citosolul de la nivelul butonului terminal determină secreția de acetilcolină. Acetilcolina secretată în fanta sinaptică se leagă de canalele de sodiu pe care le comandă, le deschide și determină, prin depolarizarea locală a membranei, activarea unor canale de sodiu comandate electric. În acest fel se extinde depolarizarea sarcolemei, ceea ce induce deschiderea unor canale de calciu comandate electric, iar calciul extracelular intrat în citosolul celulei musculare, duce și la afectarea canalelor de calciu de la nivelul reticulului sarcoplasmic, determinând eliberarea de calciu și crescând concentrația de Ca^{2+} în citosolul miocitului. Unele fenomene sunt mai complexe decât se prezintă în această figură. © Mircea Leabu, 2014.

Joncțiunea neuro-musculară, numită și sinapsă neuro-musculară, reprezintă o apozitie dintre membrana butonului terminal al unui axon și un microdomeniu al membranei celulei musculare. Între cele două membrane, aflate în apozitie la nivelul sinapsei, în spațiul numit fantă sinaptică, se creează un microclimat favorabil transmiterii de semnale între celula nervoasă și celula musculară. Ce se întâmplă la acest nivel, când un semnal nervos ajunge la butonul terminal al axonului? Propagarea semnalului nervos de-a lungul axonului se materializează prin depolarizarea membranei axonale secvențial, de-a lungul acestuia. Când semnalul,

deci depolarizarea membranei axonale, ajunge la butonul terminal, are loc deschiderea unor canale de Ca^{2+} operate electric. Deschiderea acestor canale permite ionilor de calciu din spațiul extracelular (unde concentrația este cu patru ordine de mărime mai ridicată, adică 10^{-3}M) să intre în citosolul de la nivelul butonului axonal (unde concentrația este mică, de ordinul 10^{-7}M). Creșterea concentrației de Ca^{2+} în butonul axonal induce secreția de acetilcolină (depozitată în vezicule de secreție de la nivelul butonului axonal) în fanta sinaptică. Acetilcolina secretată în fanta sinaptică se leagă de canalele de sodiu controlate chimic prezente în membrana sinaptică a celulei musculare pe care le deschide. Ionii Na^{+} pătrund în celula musculară depolarizând membrana acesteia la nivelul joncțiunii neuro-musculare. Depolarizarea membranei la nivelul sinapsei duce la deschiderea unor alte canale de Na^{+} comandate electric, extinzând modificarea potențialului membranei celulei musculare. Această depolarizare extinsă duce la deschiderea la nivelul membranei celulei musculare a unor canale de Ca^{2+} operate electric, ca și a unor canale de calciu din membrana reticulului sarcoplasmic. Pătrunderea Ca^{2+} (atât din exteriorul celulei, cât și din reticulul sarcoplasmic) în citosolul celulei musculare determină contracția celulei. Relaxarea celulei musculare presupune eliminarea ionilor de Ca^{2+} din citosol, prin acțiunea canalelor de schimb $\text{Na}^{+}/\text{Ca}^{2+}$ și a unor pompe de Ca^{2+} . După transmiterea semnalului, la nivelul fantei sinaptice acetilcolina este fie metabolizată la colină și acid acetic de o colinesterază, fie reintrodusă în vezicule de secreție, în butonul axonal prin endocitoză. Scăderea concentrației de acetilcolină în fanta sinaptică, alături de relaxarea celulei musculare prin scăderea concentrației citosolice de Ca^{2+} asigură pregătirea celulei pentru reluarea ciclului. Este evident, celulele fac toate aceste lucruri mult, mult mai repede decât descriem noi în cuvinte. (Din fericire!)

3.2.1.2. Transportul apei prin membrana celulară

Nu putem încheia aspectele legate de transportul pasiv prin membrane fără să vorbim despre transportul apei, solventul fiziologic. De acest transport depinde echilibrarea presiunilor coloidosmotice și supraviețuirea celulelor. *Trecerea apei printr-o membrană poartă denumirea de **osmoză***. Acesta este un termen util în biofizică, unde mecanismele care se ascund în spatele acestei treceri nu contează. În biologia celulară, însă, unde vrem să deslușim mecanismele care se petrec în celulă sau la nivelul diferitelor componente celulare (cum este acum membrana celulară) în toată diversitatea și complexitatea lor, termenul osmoză (chiar dacă nu trebuie ignorat) nu este deosebit de util. Mai degrabă poate crea confuzie, dacă nu este corect înțeles. Multă vreme s-a considerat că osmoza implică numai trecerea apei printre lipidele bistratului (intrarea apei în celulă sau părăsirea celulei de către moleculele polare, mici ale apei). Ei bine, prin membrana celulară apa trece atât prin difuziune simplă (adică printre lipidele bistratului), cât și prin difuziune facilitată, deoarece multe celule și-au produs complexe proteice transmembranare destinate transportului pasiv al apei. Aceste complexe proteice transmembranare, destinate transportului facilitat al apei prin membranele celulare, poartă denumirea de **aquaporine**.² Termenul osmoză implică trecerea apei prin biomembrane prin ambele mecanisme, cumulat. Rolul aquaporinelor este acela de a eficientiza trecerea apei prin membrane, astfel încât, pe de o parte, fenomenele fiziologice să se petreacă după o dinamică adecvată și, pe de altă parte, la apariția unor dezechilibre osmotice accidentale homeostazia celulară să nu sufere dramatic și să pună în pericol supraviețuirea.

² Proteinele care structurează aquaporine au fost pentru prima dată identificate în membrana eritrocitară, iar rolul lor a fost intuit de românul Gheorghe Benga. Studii consecutive referitoare la acești transportori ai apei prin membrane au fost efectuate ulterior de grupul lui Peter Agre, acesta primind, în 2003, Premiul Nobel pentru chimie cu următoarea motivație a juriului: "for the discovery of water channels".

Aquaporinele sunt proteine identificate în toate organismele (de la bacterii, la mamifere și în plante) și sunt ubicuitare în organismele multicelulare, fiind exprimate în diferite grade în toate tipurile de celule [23, 24]. La om au fost identificați cel puțin 13 membri ai familiei proteice a aquaporinelor [24], desemnate abreviat prin AQP_x (cu *x* începând de la 0, AQP0 fiind aquaporina din cristal, numită inițial proteina integrală majoră, abreviat MIP, de la **M**ajor **I**ntegral **P**rotein, de unde și tendința de a denumi astfel superfamilia de proteine căreia îi aparțin și aquaporinele). Identitatea moleculară a primei aquaporine (AQP1) a făcut obiectul articolului publicat de echipa lui Peter Agre în 1992. Agre și colaboratorii, microinjectând ovocite de *Xenopus laevis* cu ARNm al proteinei CHIP28, abundant exprimată în membrana eritocitară, au constatat o creștere semnificativă a permeabilității osmotice a apei [25]. Aquaporinele (Fig. 3.6) sunt proteine transmembranare cu masa moleculară de ~30kDa (masa moleculară predictibilă a monomerilor de aquaporine este între 26 și 34kDa), au șase treceri în α -helix prin bistratul lipidic (Fig. 3.6, notațiile TM1-TM6) și două segmente scurte, tot helicoidale, care străjuiesc vestibulele citoplasmatic (Fig. 3.6, notația B1), respectiv extracelular (Fig. 3.6, notația B2) ale canalului organizat de cele șase domenii transmembranare [25-27]. Capetele amino- și carboxi-terminale ale lanțului polipeptidic se află pe fața citosolică. În membrane, monomerii astfel organizați transmembranar se asociază câte patru formând homotetrameri. Fiecare monomer al complexului tetrameric reprezintă unități funcționale. Pentru AQP4 homotetramerii se asociază la un nivel superior în rețele octogonale prin interacțiuni ale unor motive (secvențe mici de aminoacizi) specifice din regiunea capetelor amino-terminale ale monomerilor.

Apa poate trece prin canalele aquaporinelor în ambele sensuri, depinzând de presiunile coloidosmotice existente de cele două părți ale membranei. Reglarea activității aquaporinelor și importanța acestora în controlul presiunilor coloidosmotice reprezintă teme științifice de interes în momentul de față [27, 28]. În prezent, cunoaștem că reglarea activității se face prin protonare, dar și prin fosforilare sau legare de alți cationi [27], fără ca mecanismele de control și reglare să fie deplin elucidate, alte modalități de reglare sugerate fiind în studiu. Exprimarea adecvată a aquaporinelor în celule este importantă pentru multe fenomene fiziologice: absorbția adecvată la nivelul căilor urinare pentru formarea urinei, semnalizare neuronală prin modularea transportului prin canale ionice, motilitate celulară prin asigurarea dinamicii lamelipodiilor, hidratarea pielii, proliferarea celulară, metabolismul lipidic (implicarea aquagliceroporinelor, aquaporine cu transport dual pentru apă și glicerină) [24]. Mai mult, deficiențe în exprimarea aquaporinelor pot induce sau însoți diverse patologii: cataractă, diabet insipid, edem cerebral, obezitate [23].

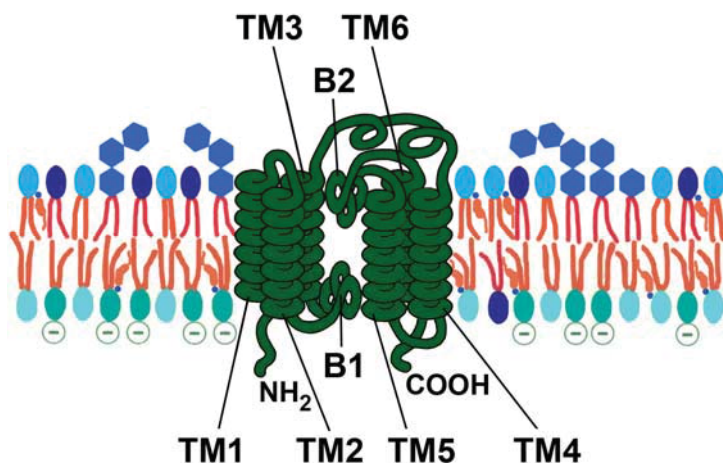


Fig. 3.6. Aranjarea lanțului polipeptidic al aquaporinelor în bistratul lipidic. Cele 6 domenii transmembranare (TM1-TM6) formează canalul de trecere a apei/glicerinei, iar cele două bucle, citosolică (B1), respectiv extracelulară (B2), asigură selectivitatea primară a complexului, străjuind vestibulele intern, respectiv extern ale căii de trecere. © Mircea Leabu, 2014.

3.2.1.3. Transportul activ

Până aici am detaliat aspecte legate de transportul în sensul diminuării concentrației componente/componentelor transportate, adică transportul pasiv sau entropic. Celulele au însă nevoie de transport de molecule mici și/sau ioni și împotriva gradientelor de concentrație existente la un moment dat sau existente permanent la nivelul membranelor. Pentru rezolvarea acestor nevoi, în membrane sunt organizate biostructuri proteice capabile să transporte molecule mici și ioni împotriva gradientului de concentrație al acestora, prin consum de energie provenită din scindarea unor molecule macroergice (de regulă ATP). Aceste structuri proteice membranare poartă denumirea de **pompe**. Transportul efectuat de ele se numește **transport activ**, **transport antientropic** sau **transport la deal**.

Ca exemplu de transport activ vom aborda **pompa de Na^+/K^+** , numită și **Na^+/K^+ -ATPază**³. Pompa este o structură complexă din punct de vedere biochimic [29], organizată ca un tetramer format din două subunități α , mari (care reprezintă unitatea catalitică și transportoare) și două subunități β , mici (glicoproteice, reglatoare, neimplicate direct în pomparea ionilor, dar necesare pentru împachetarea conformațională corectă a subunităților α în reticulul endoplasmic, în momentul biosintezei, asamblării în membrană și maturării). În unele organe, se alătură un al treilea tip de lanț polipeptidic, subunitatea γ (un polipeptid foarte mic, capabil să moduleze afinitatea pentru ionii transportați și pentru ATP). Toate cele trei tipuri de subunități sunt proteine transmembranare.

Subunitățile α (Fig. 3.7) sunt neglicozilate. Ele au o masă moleculară de ~110kDa (putând conține între 1014 și 1028 de aminoacizi), au 10 treceri în α -helix prin bistratul lipidic membranar (notate abreviat cu TM1 – TM10; în Fig. 3.7. sunt numerotate în ordine, cu cifrele 1-10), iar ambele capete amino- și carboxi-terminale ale lanțului polipeptidic se află în endodomeniu [29]. Există patru izoforme de subunități α : α_1 , care are un lanț polipeptidic format din 1024 aminoacizi, α_2 , cu 1021 aminoacizi, α_3 , cu doar 1014 aminoacizi și α_4 , cu cel mai lung lanț polipeptidic, conținând 1028 de aminoacizi [29, 30]. Domeniul extracelular este minor și format din două bucle mici, prima între domeniile transmembranare TM1 și TM2 (cam 12 aminoacizi, responsabilă de interacțiunea cu **ouabaina**, care inhibă activitatea pompei) și o a doua între TM7 și TM8 (în jur de 39 de aminoacizi). Celelalte bucle extracelulare sunt ne semnificative (câte 3-4 aminoacizi) în privința participării la organizarea domeniului extracelular al proteinei. Domeniul citosolic este abundent, fiind format din: (i) porțiunea N-terminală a subunității (primii 90-97 de aminoacizi ai lanțului polipeptidic), (ii) o buclă de lungime medie, între domeniile transmembranare TM2 și TM3 (formată din ~143 de aminoacizi), (iii) bucla mare formată de lanțul polipeptidic între TM4 și TM5 (are în jur de 439 de aminoacizi și conține atât acidul aspartic ce se fosforilează în ciclul de activitate a pompei, cât și situl de legare a ATP), (iv) alte două bucle semnificativ mai mici între TM6, TM7 (28 de aminoacizi) și între TM8, TM9 (27 de aminoacizi) și (v) capătul C-terminal, mic (format din ultimii 21 de aminoacizi ai lanțului polipeptidic) [31]. La nivelul acestui complex endodomeniu sunt prezente siturile de legare a sodiului (sunt legați simultan 3 ioni), care au mare afinitate pentru cation. Siturile de legare a ionului de sodiu sunt accesibile numai în starea în care pe endodomeniu, la nivelul buclei mari se află legat ATP. Starea în care subunitatea α prezintă legați concomitent ATP și cei trei ioni de sodiu reprezintă inițierea ciclului de pompare (vezi mai jos etapele mecanismului de pompare).

³ Pompa de sodiu a fost descoperită în 1950 de chimistul danez Jens Christian Skou, care 47 de ani mai târziu, în 1997, a fost distins cu Premiul Nobel în chimie cu următoarea motivație a juriului: "for the first discovery of an ion-transporting enzyme, Na^+/K^+ -ATPase". Denumirea de Na^+/K^+ -ATPază se datorează faptului că scindează enzimatic ATP pentru energia necesară transportului antientropic.

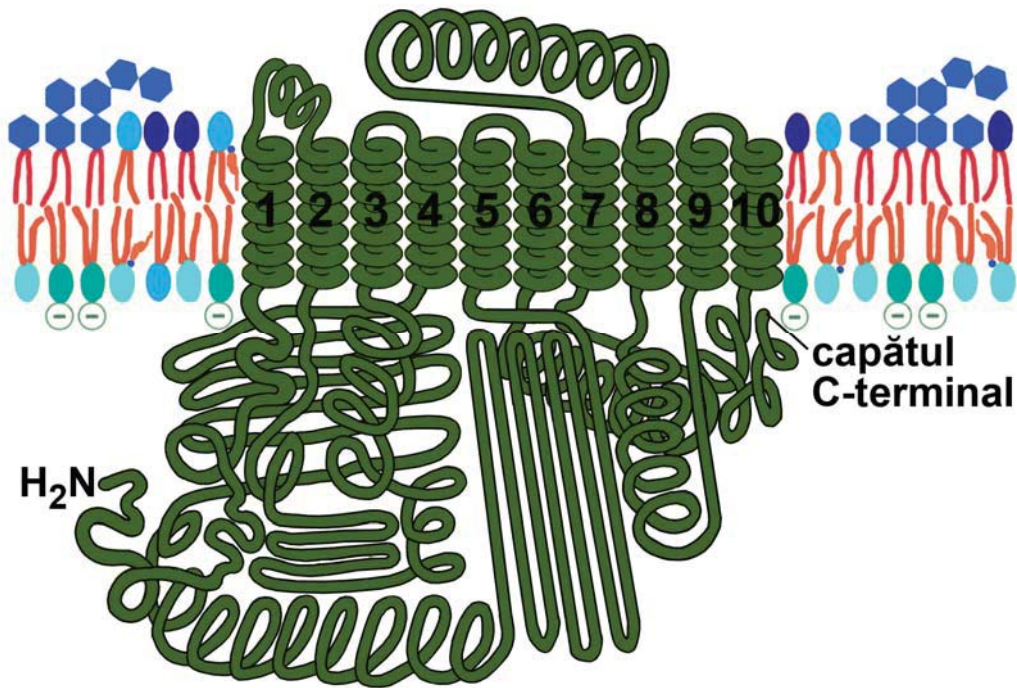


Fig. 3.7. Elementele din organizarea în membrană a domeniilor subunității α (subunitatea transportoare) a pompei de sodiu și potasiu. Cele 10 domenii transmembranare organizate în α-helix (TM) sunt numerotate, în ordine, de la 1 la 10. Se observă ectodomeniul slab reprezentat, format în principal de două bucle mici: prima între TM1 și TM2, iar a doua între TM7 și TM8. Endodomeniul este foarte bogat conținând capătul N-terminal al subunității, pe lungimea primilor 97 de aminoacizi ai proteinei, capătul C-terminal, relativ scurt (ultimii 21 de aminoacizi ai proteinei), două bucle mici între TM6 și TM7, respectiv TM8 și TM9, o buclă de lungime medie între TM2 și TM3 și bucla citosolică majoră, realizată de lanțul polipeptidic între TM4 și TM5, care conține situsul de legare a ATP și acidul aspartic ce se fosforilează în cursul ciclului de funcționare a pompei. © Mircea Leabu, 2014.

Rolul celorlalte subunități β (respectiv γ, când aceasta există) este destul de controversat, încă, deoarece și rezultatele experimentale sunt destul de diverse în semnificația lor.

Subunitatea β este glicoproteină transmembranară unipas, tip II cu un endodomeniu mic format dintr-o porțiune scurtă a capătului N-terminal și un ectodomeniu mare format din mai mult de jumătate din întregul lanț polipeptidic cu capătul C-terminal. Există trei izoforme de subunități β: β1, care are 304 aminoacizi și trei situri de posibilă N-glicozilare, β2 cu 290 de aminoacizi în structură și 4 până la 9 situri de glicozilare, depinzând de specie (4 la pasăre, 7 la șobolan, 8 la om, 9 la șoarece) și β3, având 279 de aminoacizi [29]. Nu se cunoaște dacă toate aceste posibile situri de glicozilare sunt utilizate ca atare, dar toate izoformele sunt, cu certitudine, mai puternic sau mai slab glicozilate. Deși inhibarea glicozilării cu tunicamicină nu blochează activitatea pompei și nici sensibilitatea acesteia la ouabaină, este totuși dovedită, pentru subunitățile β neglicozilate, afectarea echilibrului de asamblare αβ. Aceste rezultate experimentale sugerează rolul subunității β în corecta împachetare a subunității α în timpul biosintezei, la nivelul reticulului endoplasmic și formarea eficientă a complexelor proteice ale pompei [29]. O altă caracteristică structurală importantă a subunității β este capacitatea de a forma trei punți disulfidice în ectodomeniu. La șobolan aceste punți, ce asigură împachetarea corectă a subunității β1, se formează între Cys¹²⁵-Cys¹⁴⁸, Cys¹⁵⁸-Cys¹⁷⁴ și Cys²¹²-Cys²⁷⁵. Chiar dacă pozițiile relative ale cisteinelor implicate în formarea punților nu sunt conservate la izoformele β2 sau β3, punțile sunt prezente, ceea ce

sugerează importanța lor pentru o aranjare tridimensională corectă, funcțională. Desfacerea celor trei punți disulfidice cu agenți reducători duce la pierderea funcției pompei, iar o singură mutație punctiformă care elimină numai una dintre cisteinele în discuție împiedică asamblarea corectă a heteromerilor $\alpha\beta$ [32].

Referitor la asamblarea complexelor proteice ale Na^+, K^+ -ATPazei se cunoaște că subunitățile β au domeniul transmembrantar în apropierea domeniilor TM7 și TM10 ale subunității α și că mai interacționează cu bucla dintre TM7 și TM8 a ectodomeniului subunității catalitice [33]. Cât privește asamblarea subunității γ (la complexe de transport în care ea există), domeniul transmembrantar al acesteia se localizează într-un șanț dintre TM2, TM6 și TM9 al subunității α , dar interacționează și cu subunitatea β la nivelul ectodomeniului, respectiv cu endodomeniul subunității α la nivelul buclelor dintre domeniile transmembrantar TM6/TM7 și TM8/TM9 [33-35]. Toate aceste interacțiuni ce sunt nuanțate prin asocierile diferite dintre cele 4 izoforme de subunități α , trei izoforme de subunități β și șapte izoforme de subunități γ asigură modulări de mare finețe ale funcției pompei în diverse tipuri celulare [29, 33].

Cât privește structura biochimică a subunității γ , aceasta este o proteină transmembrantară unipas, tip I și au fost identificate 7 izoforme, cu mase moleculare între 8 și 14kDa [29, 33]. Toate aceste izoforme au fost dovedite a se asocia cu pompele de Na^+/K^+ [33], modulând activitatea acestora. Subunitatea γ se exprimă în special la nivelul rinichiului, având rol și în adaptarea, respectiv supraviețuirea celulelor în condiții hipertone [36].

Ce se cunoaște despre mecanismul de acțiune al Na^+, K^+ -ATPazei? Ciclul de pompare are 7 etape și duce la expulzarea a 3 ioni de Na^+ și introducerea a 2 ioni de K^+ în celulă, pe baza unor modificări de conformație între două forme: E1 cu acidul aspartic din situl catalitic nefosforilat și E2 cu acidul aspartic fosforilat [37]. Etapele ciclului de pompare sunt (Fig. 3.8):

1. Legarea ATP pe endodomeniul subunității α și expunerea siturilor de legare a ionilor Na^+ ;
2. Legarea a trei ioni Na^+ în porțiunea citosolică (endodomeniul) subunității α a pompei, pe situri de înaltă afinitate;
3. Fosforilarea unui aspartat prin scindarea ATP la ADP (consumul energetic necesar activității pompei), cu schimbarea conformației proteinei, ceea ce duce la conducerea celor trei ioni Na^+ în ectodomeniul subunității α , pe situri de interacțiune de joasă afinitate;
4. Disocierea și expulzarea în exterior a ionilor Na^+ și legarea pe ectodomeniul subunității α a doi ioni de K^+ , pe situri de mare afinitate expuse prin modificările de conformație ce se petrec în etapele 2 și 3;
5. Hidrolizarea aspartilfosfatului și schimbarea conformației subunității α , ceea ce atrage transferul ionilor K^+ în endodomeniu pe situri de joasă afinitate;
6. Eliberarea ionilor K^+ de pe endodomeniul subunității α , în citosol;
7. Încheierea ciclului prin refacerea sitului specific și legarea ATP, pentru refacerea conformației cu expunerea siturilor de mare afinitate pentru ionii Na^+ și pregătirea unui nou ciclu de pompare.

Pompa de Na^+/K^+ este electrogenică, adică prin eliminarea a 3 ioni de Na^+ și introducerea a numai 2 ioni K^+ , contribuie la realizarea și/sau menținerea potențialului membrantar. Se întâlnește în membranele tuturor celulelor animale. Importanța prezenței și activității sale poate fi probată și de faptul că adesea ea consumă jumătate din cantitatea celulară de ATP. Inhibarea activității ei prin ouabaină duce la incapacitatea celulară de a menține echilibrul Na^+/K^+ , cu afectarea potențialului membrantar și din asta rezultă complicații asupra fiziologiei celulare.

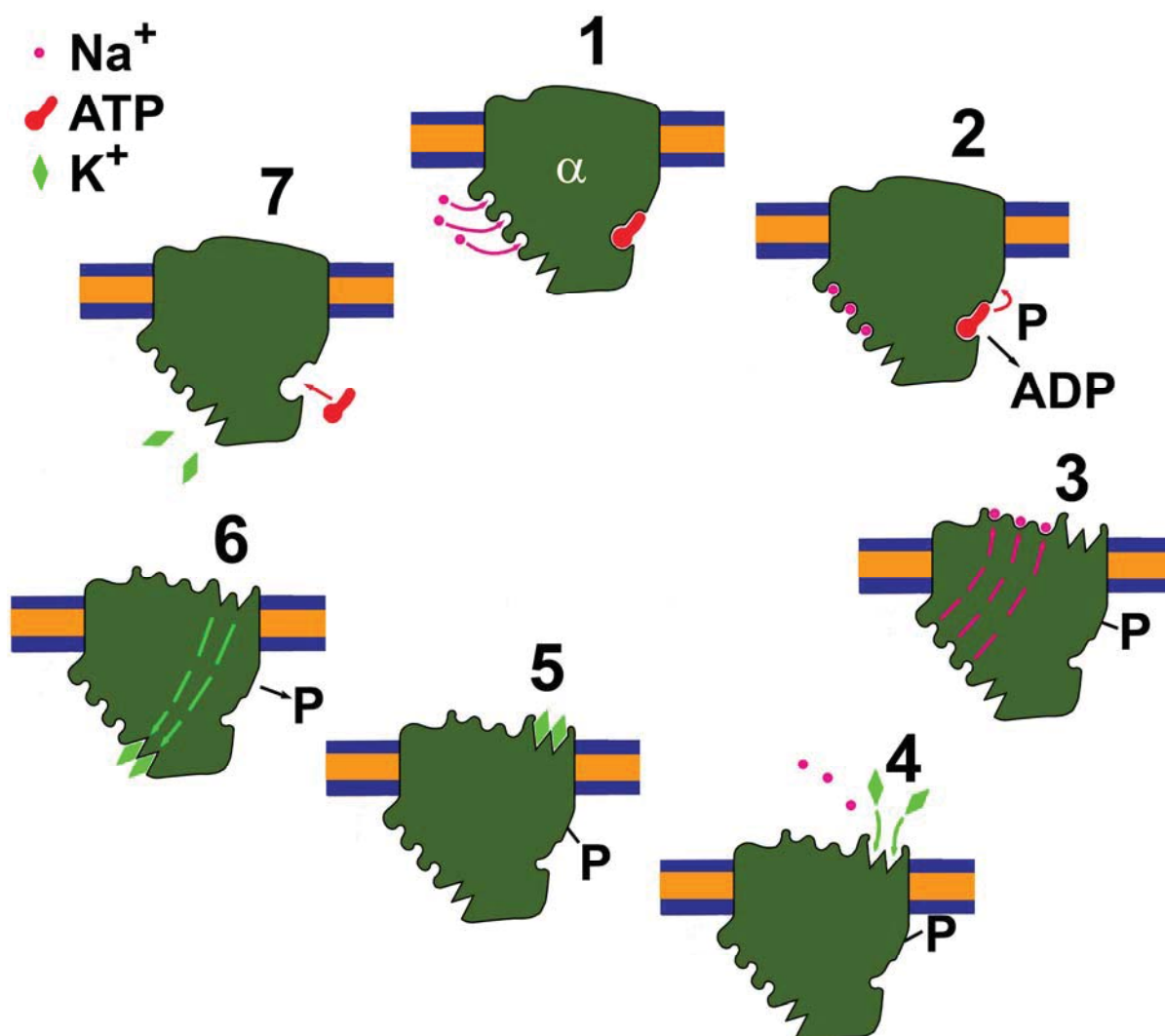


Fig. 3.8. Etapele unui ciclu funcțional pentru subunitatea α a pompei de sodiu și potasiu. În fazele 1, 2, 6 și 7 subunitatea α are conformații corespunzătoare formei E1, în timp ce în fazele 3, 4 și 5 conformațiile sunt pentru forma E2. Ciclul începe cu legarea celor trei ioni de sodiu pe siturile de mare afinitate din endodomeniu (1), ceea ce atrage lizarea ATP cu fosforilarea restului aspartat și eliberarea ADP (2); fosforilarea (P) acidului aspartic duce la modificări conformaționale ale subunității α , cu transferarea celor trei ioni de sodiu în ectodomeniul proteinei transmembranare, pe situri de joasă afinitate (3), de unde sunt expulzați cu expunerea siturilor de mare afinitate pentru ioni de potasiu (4); ectodomeniul leagă cei doi ioni de potasiu (5) ceea ce conduce la hidroliza aspartil-fosfatului, cu eliberarea de acid fosforic și schimbarea conformației, care favorizează transferul ionilor de potasiu pe situri de joasă afinitate din endodomeniu (6); eliberarea ionilor de potasiu în citosol duce la refacerea sitului de legare a ATP (7), iar legarea compusului macroergic pe endodomeniu reface siturile de mare afinitate pentru sodiu, ciclul putând reîncepe. © Mircea Leabu, 2014.

Pompa discutată mai sus face parte din **tipul P de ATPaze** (ATPaze de tip plasmalemal), alături de pompa protonică (H^+ -ATPază), pompa H^+/K^+ (H^+,K^+ -ATPază) și de pompa de calciu (Ca^{2+} -ATPază). P-ATPazele au aceeași structură catalitică și mecanisme asemănătoare celui descris pentru pompa de Na^+/K^+ .

La nivelul endomembranelor a fost evidențiat și **tipul V de ATPaze** (ATPaze de tip vacuolar), care pompează protoni în endozomi sau lizozomi. Organizarea acestora este mult mai elaborată, având nevoie de cel puțin 11 subunități ca să își îndeplinească funcția, ceea ce duce la formarea unor complexe proteice de ~1000kDa [38].

În sfârșit, menționăm că la nivelul celulelor eucariote mai există **tipul F de ATPaze** (cu F de la „*phosphorylation Factor*”), care sintetizează ATP folosind energia rezultată din disiparea unui gradient protonic existent la nivelul membranei

în care sunt organizate și **tipul E de ATPaze** (cu E de la „*Extracellular ATP*”), care sunt enzime ale suprafeței celulare cu rol în hidroliza diversilor nucleozid-trifosfați (inclusiv ATP) extracelulari, cu implicare în diferite fenomene de semnalizare și nu în transportul activ. V-ATPazele și F-ATPazele au similitudini de organizare (complexe proteice cu număr mare de subunități) și reprezintă, pe baza mecanismului de funcționare, ceea ce numim motoare moleculare [38, 39].

Pentru argumentare suplimentară a imaginii cooperărilor dintre diversitatea de componente ale membranei celulare prin funcțiile lor, la cele prezentate mai sus (Fig. 3.5) adăugăm prezentarea unor fenomene care se completează reciproc în interesul bunei funcționări a celulei, exemplificând colaborarea dintre diverși transportori la nivelul celulelor intestinale absorbante denumite enterocite (Fig. 3.9).

Enterocitele sunt celulele responsabile de preluarea din hrana digerată a compușilor biochimici utili rezultați (între alții glucoza). Aceste celule formează epiteliul simplu columnar care delimitează lumenul intestinal. Enterocitele sunt celule polarizate, adică celule ale căror membrane au organizare moleculară (cel puțin ca tipuri de proteine) diferită la nivelul lumenului intestinal (pol apical, unde suprafața membranei este mult sporită prin structurarea unor digitații numite microvili), față de zonele dinspre țesuturi (pol latero-bazal).

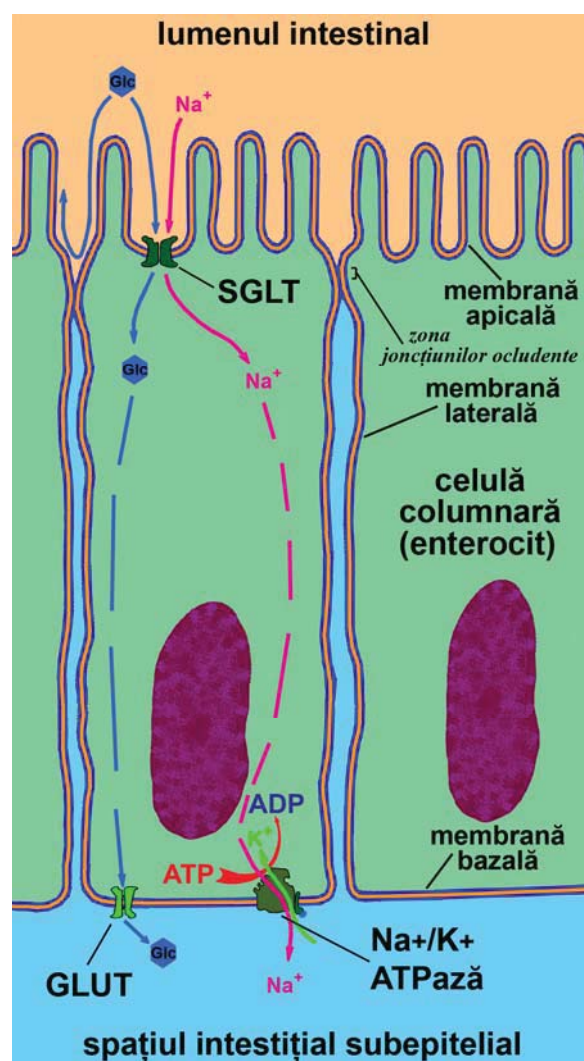


Fig. 3.9. Cooperarea proceselor de transport activ (transport activ secundar, respectiv transport activ primar) și pasiv la nivelul enterocitului. La nivelul membranei apicale se află transportorul simport pentru glucoză și sodiu (SGLT) care facilitează preluarea glucozei prin transport activ secundar pe baza disipării gradientului ionilor de sodiu. Glucoza, astfel introdusă în citosolul enterocitului, este eliminată în spațiul interstițial subepitelial, printr-un uniport de glucoză (GLUT) aflat în membrana latero-bazală, care efectuează transport pasiv (concentrația de glucoză absorbită din lumenul intestinal creează un gradient al monozaharidului, care este mai abundent în citosol, decât în spațiul bazal). Sodiul preluat din lumenul intestinal, aparent din considerente energetice impuse de activitatea antiportului SGLT, este eliminat activ din enterocit tot în spațiul subepitelial prin acțiunea pompei de sodiu și potasiu. Asta înseamnă că fenomenele asigură preluarea concomitentă a glucozei și sodiului din alimentație. **N.B.** Săgeata cu traiectorie întoarsă, îndreptată dinspre glucoză către zona joncțiunilor ocludente, semnifică faptul că pe acolo monozaharidul nu poate să treacă (ca de altfel nici alte substanțe, în afară de unii ioni, aceștia cu mari restricții). © Mircea Leabu, 2014.

Așadar, membrana apicală conține, cel puțin în parte, o serie de proteine care nu sunt localizate în membranele laterală, respectiv bazală, ca de altfel și reciproc (anumite proteine nu se găsesc decât în membranele latero-bazale). De menționat că celula controlează eficient această polarizare, chiar din momentul biogenezei acestor domenii de membrană (apical, respectiv latero-bazal) și este ajutată în menținerea acestui caracter polarizat prin joncțiunile ocludente pe care le organizează.

Care sunt procesele care cooperează în asigurarea funcției enterocitului în contextul exemplului nostru? La nivelul membranei apicale se află transportorul simport SGLT1, care introduce glucoza în citosolul enterocitului, alături de 2 ioni Na^+ prin mecanismul de transport activ secundar, prezentat anterior la secțiunea **3.2.1.1. Transportul pasiv**. Acest proces de transport are o parte bună (preluarea glucozei și sodiului din alimente), dar și una periculoasă (introducerea de Na^+ în exces în citosolul enterocitelor, ceea ce ar afecta potențialul membranelor). Glucoza, preluată prin activitatea SGLT1, este mai departe expulzată în spațiul subepitelial de transportorul uniport GLUT2 aflat în membrana latero-bazală, pentru a fi predată circulației sanguine și transportată acolo unde organismul are nevoie de ea. De excesul de Na^+ se ocupă pompa de Na^+/K^+ aflată tot în membrana latero-bazală a enterocitului, care eliminând 3 ioni de Na^+ din enterocit și introducând 2 ioni K^+ în celulă asigură menținerea homeostaziei ionice intracelulare, ca și potențialul membranelor în limite normale. Prin aceste cooperări ale transportorilor din membranele apicală, respectiv latero-bazală ale enterocitului se asigură preluarea glucozei din intestin chiar împotriva gradientului de concentrație, ceea ce conduce la creșterea concentrației de glucoză în citosolul enterocitului, creștere care asigură funcționarea transportorului pasiv GLUT2, deoarece concentrația glucozei în interstițiul peretelui intestinal este mai mică decât în enterocit, dar se asigură și menținerea homeostaziei Na^+ în enterocit, deoarece ceea ce introduce simportul SGLT1 este compensat de expulzarea efectuată de pompa Na^+/K^+ .

Încheiem discuțiile referitoare la transportul activ prin membrană, amintind de o clasă de transportori cu deosebită semnificație fiziologică și, mai larg, medicală, cunoscuți sub denumirea de **transportori ABC** (cu ABC de la **ATP-Binding Cassette**). Semnificația fiziologică și medicală a acestor transportori activi rezidă în faptul că induc rezistență multiplă la medicamente („multidrug-resistance”), fiind capabili să elimine din celule o multitudine de compuși cu utilitate terapeutică, indiferent de modul prin care aceștia pot pătrunde în celula țintă. Se găsesc atât la procariote, cât și la eucariote. La procariote, transportorii ABC permit adaptare și rezistență la antibiotice. La eucariote, menirea lor principală este aceea de a elimina substanțe inutile, toxice. De menționat că transportorii ABC sunt principalii responsabili de inducerea rezistenței celulelor canceroase la chimioterapie [40, 31].

Transportorii ABC sunt de o mare diversitate și au capacitatea de a transporta o mare varietate de substanțe plecând de la ioni, glucide, aminoacizi, vitamine, lipide, antibiotice și medicamente (inclusiv xenobiotice) și ajungând până la oligozaharide, oligopeptide sau chiar proteine cu masă moleculară mare [40-44]. În ciuda acestei mari diversități de tipuri, se păstrează câteva reguli în organizarea structurilor proteice transmembranare care reprezintă transportorii ABC. În funcție de modul în care sunt respectate aceste reguli, transportorii ABC se pot împărți în: (i) sisteme importatoare mici, la care fiecare element de organizare structurală este asigurat de un alt polipeptid; (ii) sisteme importatoare mari, la care organizarea implică două subunități proteice identice (homodimeri) sau diferite (heterodimeri); (iii) sisteme exportatoare organizate ca dimeri (numite și hemi-transportori, *half-transporter* în engleză) sau ca monomeri (numite și transportori întregi, *full-length transporter*) [38, 41]. La om sunt identificate aproape 50 de tipuri de transportori ABC [44].

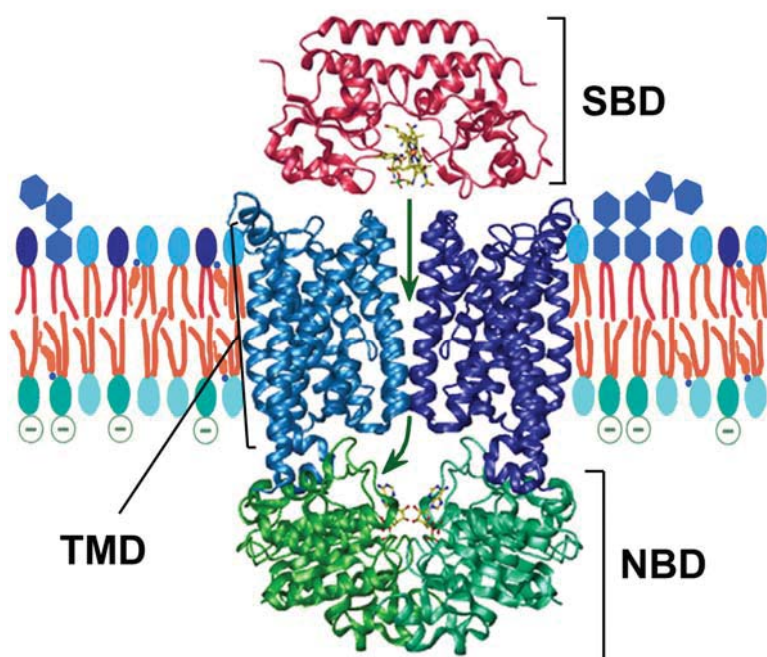


Fig. 3. 10. Organizarea pe domenii a transportorilor ABC. Este prezentată organizarea unui sistem importator mare, cu două subunități. Cele 12 domenii transmembranare (câte 6 pentru fiecare subunitate), notate TMD, asigură structurarea V-ului care, prin orientarea deschiderii către citosol, respectiv către suprafața membranei, asigură funcționalitatea transportorului. Orientarea deschiderii în V este dependentă de legarea ATP pe endodomeniile celor două subunități notate cu NBD. În opoziție cu ectodomeniile subunităților transportoare este prezentă unitatea de legare a solutului (SBD). Săgețile verzi, mediane din desenul complexului proteic, arată direcția de mișcare a moleculei transportate. © Mircea Leabu, 2014.

În încercarea de a înțelege cum funcționează transportorii ABC să detaliez, într-o oarecare măsură, modul cum sunt ei structurați și organizați la nivelul membranei (Fig. 3.10). Toate cele trei tipuri de sisteme de transportori ABC conțin **domenii transmembranare** (notate abreviat cu TMD, de la *TransMembrane Domains*) care realizează canalul prin care trece compusul transportat și **domenii de legare a nucleotidelor** (abreviat NBD, de la *Nucleotide-Binding Domains*), pe fața citosolică a membranei, cu rol în legarea și hidrolizarea catalitică a ATP. Alături de aceste domenii, sistemele importatoare mai conțin **domenii de legare a soluțiilor** transportați (abreviat SBD, de la *Solute-Binding Domains*), pe fața externă a membranei, cu rol în preluarea și transferarea compusului transportat către TMD [38]. Complexele proteice funcționale conțin două TMD miez, a căror asociere sub forma unui V răsturnat (adică având deschiderea către citosol) determină formarea canalului de transport a solutului și două NBD care leagă două molecule de ATP și le poziționează în vecinătate, dar antiparalel [38, 41].

De regulă, sistemele importatoare mici au fiecare dintre domeniile menționate formate din polipeptide independente ce se asociază conducând la formarea complexului funcțional [38, 41]. Sistemele importatoare mari și sistemele exportatoare sunt formate fie din două subunități (formând complexe homo- sau hetero-dimerice la hemi-transportori), fie dintr-o singură proteină (la transportorii întregi). La hemi-transportori cele două subunități structurează pe baza aceluiași lanț polipeptidic atât un TMD, cât și un NBD, iar la transportorii întregi se structurează în prima jumătate a lanțului polipeptidic un TMD și un NBD, iar în cea de-a doua jumătate a lanțului a doua pereche TMD, NBD. TMD miez respectă regula organizării cu 6 segmente transmembranare în α -helix, deși există și sisteme care au TMD format din numai 5 segmente transmembranare sau altele care au 10 segmente transmembranare pentru fiecare TMD [38]. La transportorii cu mai mult de 6 segmente transmembranare pe TMD există dovezi experimentale care sugerează rolul segmentelor suplimentare în reglarea și modularea funcției.

Cum funcționează aceste complexe transmembranare în procesul de transport? Mecanismul de acțiune presupune modificări ciclice ale conformației și

poziției relative a celor două TMD datorate hidrolizei ATP legat la nivelul NBD [38, 41]. Etapele ciclului de transport pentru sistemele importatoare sunt:

1. Legarea și acostarea la nivelul complexului transportor a solutului, prin SBD;
2. Legarea ATP la NBD și adoptarea conformației acestor domenii care să plaseze în poziție antiparalelă cele două molecule de nucleotid;
3. Modificarea poziției TMD și inversarea deschiderii V către suprafața membranei, datorită interacțiunilor de la nivelul NBD ocupate de ATP;
4. Avansarea solutului în profunzimea deschiderii V a celor două TMD;
5. Hidrolizarea ATP cu eliberarea de pe NBD a ADP rezultat și inversarea deschiderii V a TMD cu eliberarea solutului în citosol, ceea ce readuce conformația complexului la cea inițială, capabilă să intre într-un ciclu nou.

Ciclul de acțiune pentru sistemele exportatoare are un număr mai mic de etape:

1. Intrarea solutului în adâncitura V a TMD;
2. Legarea ATP pe endodomenii și interacțiunea dintre cele două NBD pentru așezarea antiparalelă a moleculelor de nucleotid;
3. Modificarea poziției TMD cu inversarea deschiderii V și eliberarea solutului în spațiul extracelular;
4. Hidrolizarea ATP și inversarea deschiderii V, cu formarea conformației inițiale a complexului transportor.

În cele mai bine de trei decenii de când au fost identificați, transportorii ABC au reprezentat biostructuri membranare pentru care interesul științific a fost în permanentă creștere. Suntem departe de a cunoaște suficiente detalii legate de funcționarea acestora, care să ne permită să îi exploatăm eficient în medicină. Transportorii ABC rămân mai departe structuri ale membranei celulare de mare și acut interes pentru ceea ce numim medicină translațională, adică acele cercetări din bio-medicină care să ducă la o cât mai eficientă aplicare a rezultatelor în clinică.

3.2.3. Transportul cu membrană

Transportul cu membrană este dependent fie de capacitatea unor microdomenii membranare de a se invagina sub forma unor vezicule, urmată de desprinderea (fisionarea) membranei lor de cea la nivelul căreia se formează și introducerea în celulă a substanțelor captate în volumul veziculei, fie de capacitatea endomembranelor veziculelor/vacuolelor de secreție de a fuziona cu membrana celulară și eliberarea în spațiul extracelular a substanțelor din interior. Transportul cu membrană permite celulelor să facă schimb de substanță cu exteriorul, ca și transportul prin membrană detaliat în subcapitolul anterior, dar folosind mecanisme diferite, care implică nu doar proteinele membranare, ci microdomenii membranare (adică porțiuni de membrană ce solidarizează structural și funcțional anumite lipide/glicolipide și anumite proteine/glicoproteine cu scopul de a le facilita funcționarea împreună).

În funcție de sensul în care se efectuează, transportul cu membrană se împarte în trei tipuri:

1. **Endocitoză**, atunci când componentele transportate sunt preluate din exterior și introduse în celulă;
2. **Exocitoză**, prin care se elimină componente din interiorul celulelor în afara lor;
3. **Transcitoză**, care este specifică celulelor ce organizează epiteliile unistratificate și presupune preluarea de substanțe din exteriorul celulei pe una din fețele epiteliului (la polul apical, adică din lumenul delimitat de epiteliu, sau la polul latero-bazal, adică din spațiul interstițial subepitelial), transportarea lor dintr-o

parte în cealaltă a celulei epiteliale și eliminarea materialului transportat trans-epitelial în exteriorul celulei, pe cealaltă față a epitelului.

3.2.3.1. Endocitoza

Procese de preluare de substanță de către celulă din spațiul extracelular se pot clasifica în funcție de caracteristicile fizico-chimice ale materialelor endocitate sau în funcție de mecanismele prin care se desfășoară.

În funcție de caracteristicile materialelor preluate de celulă, endocitoza se împarte în două categorii:

1. **Fagocitoză** (de la termenii grecești **φάγω** – a mânca + **κυτός** – vas, recipient, celulă + **ωσις** – sufix pentru proces, fenomen), atunci când sunt endocitate materiale particulare (de exemplu bacterii, fragmente celulare, virusuri), adică celula mănâncă.
2. **Pinocitoză** (de la termenii grecești **πίνω** – a bea + **κυτός** – vas, recipient, celulă + **ωσις** – sufix pentru proces, fenomen), când sunt endocitate substanțe solubilizate în fluidul extracelular, adică celula bea.

Diferența între cele două tipuri de endocitoză nu constă numai în tipul de material transportat în celulă, ci și în mecanismele prin care acestea se desfășoară, chiar dacă nu mecanismele au reprezentat criteriul pentru clasificare.

Fagocitoza a fost descrisă cu mai bine de un secol în urmă de Ilia Ilici Mechnikov⁴ în 1882, iar denumirea ei a apărut pentru prima dată într-un articol al acestuia din 1884. O scurtă istorie a evoluției cunoștințelor despre fagocitoză este prezentată într-un relativ recent articol de sinteză [45]. Subtilitățile fenomenului de fagocitoză sunt departe de a fi pe deplin elucidate. Ceea ce se întâmplă de regulă, chiar dacă există variații ale mecanismelor, pare a fi general valabil (Fig. 3. 11). Deși fenomenele care se petrec în timpul proceselor de fagocitoză sunt complexe și deosebit de bine controlate de celulă, ele se pot sistematiza prin câteva considerații de principiu. Procesul presupune capacitatea membranei celulei fagocitare de a recunoaște particula de endocitat, prin proteine membranare destinate, ceea ce declanșează fenomene care implică atât alte componente ale membranei, cât și elemente din citosol. Fagocitoza presupune extinderea de **pseudopode** (prelungiri citoplasmice delimitate de domenii de membrană a căror dinamică este controlată de rearanjări ale citoscheletului de actină) de-a lungul particulei care urmează să fie endocitată. În acest proces rolul filamentelor de actină este acela de a antrena, din interiorul celulei, membrana pentru formarea prelungirilor care învâluie particula de endocitat prin formarea a ceea ce se numește **cupă fagocitară** sau **cupă de fagocitare**.

La nivelul membranei sunt implicați receptorii de fagocitare care se atașează de componente de pe suprafața particulei care urmează a fi endocitată, componente care se numesc **opsonine**. De regulă aceste componente sunt anticorpi care recunosc proteine ale suprafeței structurii fagocitate. Această decorare a particulelor fagocitate cu anticorpi poartă denumirea de **opsonizare**. În momentul în care particula fagocitată este complet îmbrăcată de prelungirile celulei care fagocitează, membrana fuzionează și particula este inclusă într-o vacuolă, în interiorul celulei fagocitante. Vacuola poartă denumirea de endozom, în general, sau fagozom în cazul particular al fagocitozei. Fagozomul fuzionează ulterior cu lizozomul, componenta fagocitată este digerată, iar elementele biochimice rezultate sunt utilizate de celula fagocitară. De menționat că organismul este dispus și la „pierderi”; în căile aeriene, macrofage tisulare migrează în spațiile echivalente exteriorului organismului, curățând sacii alveolari și traiectele respiratorii de materialele insolubile și sunt expectorate.

⁴ Ilia Ilici Mechnikov este laureat al Premiului Nobel în fiziologie sau medicină în 1908, premiul fiind împărțit cu Paul Ehrlich. Motivația juriului a fost: „in recognition of their work on immunity”.

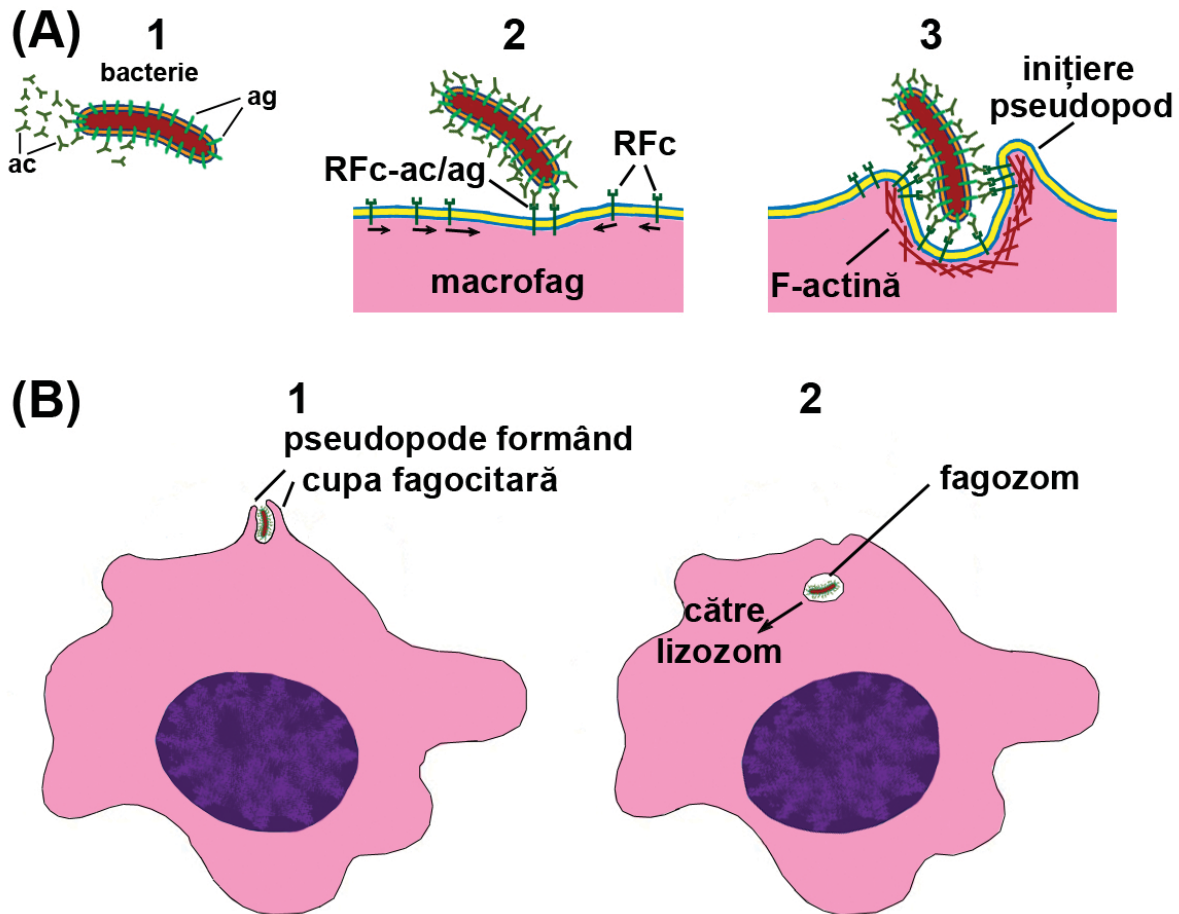


Fig. 3. 11. Evenimente celulare ce se petrec în fenomenul de fagocitare a unei bacterii. A. Detalii moleculare asupra inițierii fenomenului: 1 – Fenomenul de opsonizare se petrece prin legarea de anticorpi (ac) de proteine expuse la suprafața bacteriei (ag), ducând la învelirea ei în domenii Fc cu receptori pe suprafața macrofagelor. 2 – Bacteria opsonizată este recunoscută de macrofage, prin receptori pentru Fc (RFc), fiind fixată pe suprafața celulelor destinate să curețe organismul de invadatori. După primele interacțiuni, alți RFc sunt mobilizați către locul de fixare a bacteriei pentru a spori interacțiunile. 3 – Prin interacțiunile dintre RFc și opsoninele de la suprafața bacteriei, începe emiterea prelungirilor citoplasmatiche (pseudopode) ale macrofagului cu inițierea formării cupei de fagocitare, la care participă filamente de actină prin dinamicitatea lor. **B.** Continuarea procesului în contextul întregii celule. 1 – Procesele inițiate conform celor prezentate detaliat continuă cu definitivarea formării cupei fagocitare în care este înglobată bacteria. 2 – În final, prelungirile citoplasmei ajung să conflueze, iar bacteria este internalizată într-o structură delimitată de membrană numită fagozom, care este direcționată către lizozomi, unde are loc degradarea tuturor materialelor care formează celula procariotă, iar compușii de bază (aminoacizi, glucide, nucleotide etc.) eliberați prin digestie sunt folosiți de celula fagocitară pentru propriul metabolism. © Mircea Leabu, 2014.

Fenomenele prezentate mai sus succint, principal sunt în realitate mult mai complexe. Ele implică pe de o parte fluidizarea membranelor pentru facilitarea relocării receptorilor la opsonine (adică la imunoglobuline, prin legarea la domeniile Fc ale acestora), ca și depolarizări ale membranelor prin activarea unor canale de calciu care modifică tranzitoriu potențialul de membrană pentru receptori (canale sensibile la o multitudine de stimuli [46]), alături de activări de kinaze pentru fosfoinozotide [47, 48]. Toate aceste componente se implică în facilitarea formării cupei de fagocitoză și realizarea procesului de endocitare a bacteriilor. Fagocitoza este un fenomen specific proceselor vitale de apărare/curățare a țesuturilor de materiale insolubile periculoase (de exemplu în procese imune anti-bacteriene) sau de prisos (în cazul curățării corpurilor apoptotici). Cum ceea ce este fagocitat ajunge să

fie degradat în lizozomi și refolosit de celulă, putem spune că fagocitoza este o exprimare în lumea vie a legii conservării materiei: "În natură nimic nu se pierde, nimic nu se creează, totul se transformă", învățată la chimie, în contextul legii conservării masei, lege datorată lui Antoine-Laurent de Lavoisier care a postulat-o în cartea sa *Traité élémentaire de chimie*, publicată în 1789, dar anticipată de Mihail Vasilievici Lomonosov care, într-o scrisoare către Leonhard Euler din 5 iulie 1748, a stipulat: "Orice schimbare în natură are loc astfel încât atâta cât se ia dintr-un corp, atâta se adaugă altuia. Astfel, dacă o cantitate de materie descrește într-un loc, ea crește altundeva."

Fagocitoza este un fenomen specific unor anumite tipuri de celule din organism cum sunt macrofagele, dar și polimorfonuclearelor, numite și microfage. De menționat că pentru moartea celulară programată, corpii apoptotici care se formează declanșează procesul de fagocitoză la celulele din jur, fără ca acestea să fie neapărat macrofage profesionale, ducând la o curățare a țesutului, fără a se produce inflamații [49, 50]. Deși fenomenele care se petrec sunt principal asemănătoare, la nivel molecular există diferențe semnificative [51]. Atragerea macrofagelor, respectiv activarea pentru fagocitoză a celulelor înconjurătoare (neprofesionale în fagocitoză) este determinată de factori chemotactici eliberați de celulele intrate în apoptoză (de exemplu lizofosfatidilcolinele sau sfingozin 1-fosfatul, derivat al echivalentului acidului fosfatidic din categoria sfingolipidelor, care rămâne fără acidul gras amidat). Fagocitoza propriu-zisă (formarea cupei fagocitare) este declanșată de prezența la suprafața corpurilor apoptotici a fosfatidilserinelor, "flopate"⁵ din foița internă a bistratului lipidic membranar în momentele de inițiere a apoptozei și care acționează ca semnale denumite sugestiv (chiar metaforic) "mănâncă-mă". Aceasta în linii mari, deoarece și în acest caz al fagocitării corpurilor apoptotici mecanismele sunt mai complexe și implică participarea și a altor componente membranare care sunt exprimate de celula curățitoare în momentele esențiale.

Pinocitoza, adică endocitoza de compuși macromoleculari solubili, pare a fi mult mai diversă din punctul de vedere al mecanismelor prin care se realizează. De aceea, se definesc mai multe tipuri de pinocitoză, pe baza mecanismelor prin care se efectuează.

O primă formă este **pinocitoza constitutivă**. Aceasta presupune preluarea în vezicule de endocitoză a unor volume de lichid extracelular, cu tot ce conține acesta solubilizat, printr-un proces ce se desfășoară de la sine, continuu, asemenea unui act reflex, cum ar fi respirația organismului. Evident, printr-un asemenea proces, cantitățile de substanțe endocitate sunt proporționale cu concentrațiile în care acestea se află în mediul extracelular. Referitor la intensitatea cu care se desfășoară pinocitoza constitutivă, putem să gândim că aceasta poate fi modulată de celulă în conformitate cu nevoile ei concrete, fără a exista în momentul de față dovezi experimentale în această direcție și fără să se schimbe caracterul ei constitutiv, dacă această modulare a frecvenței s-ar întâmpla.

O a doua formă este **pinocitoza mediată de receptori**, numită mai uzual **endocitoză mediată de receptori**, cum vom face și noi pe mai departe. Termenul a fost introdus în 1976 de Joseph L. Goldstein și Michael S. Brown,⁶ preocupați de metabolizarea LDL (lipoproteinelor de densitate joasă; prescurtarea vine de la termenul englezesc *Low Density Lipoprotein*) și rolul acestor lipoproteine în controlul și modularea colesterolemiei și în ateroscleroză [52]. Ei au descris

⁵ Așa cum la răsturnarea fosfolipidelor în membrană, cu trecerea dintr-o foiță a bistratului în cealaltă, am preluat termenul din limba engleză "flip-flop" fără ezitare, aici, numim "flopate" trecerea fosfatidil-serinelor din foița internă (unde este localizată în condiții normale) în cea externă a bistratului. Nu există nici o temere de confuzie, deoarece aceste cuvinte nu există în limba română, dar nici alte cuvinte care să definească succint și sugestiv procesele nu avem în lexic. Așadar, considerăm justificate aceste preluări de termeni.

⁶ Joseph L. Goldstein și Michael S. Brown sunt laureați ai Premiului Nobel pentru fiziologie sau medicină în 1985, iar motivația juriului a fost: „for their discoveries concerning the regulation of cholesterol metabolism”.

preluarea LDL prin endocitoză mediată de receptori de către fibroblaste [53, 54]. Prin acest proces sunt internalizate de către celulă proteine (liganzi) care mai întâi sunt recunoscute și legate de receptori specifici expuși la suprafața membranei (Fig. 3. 12).

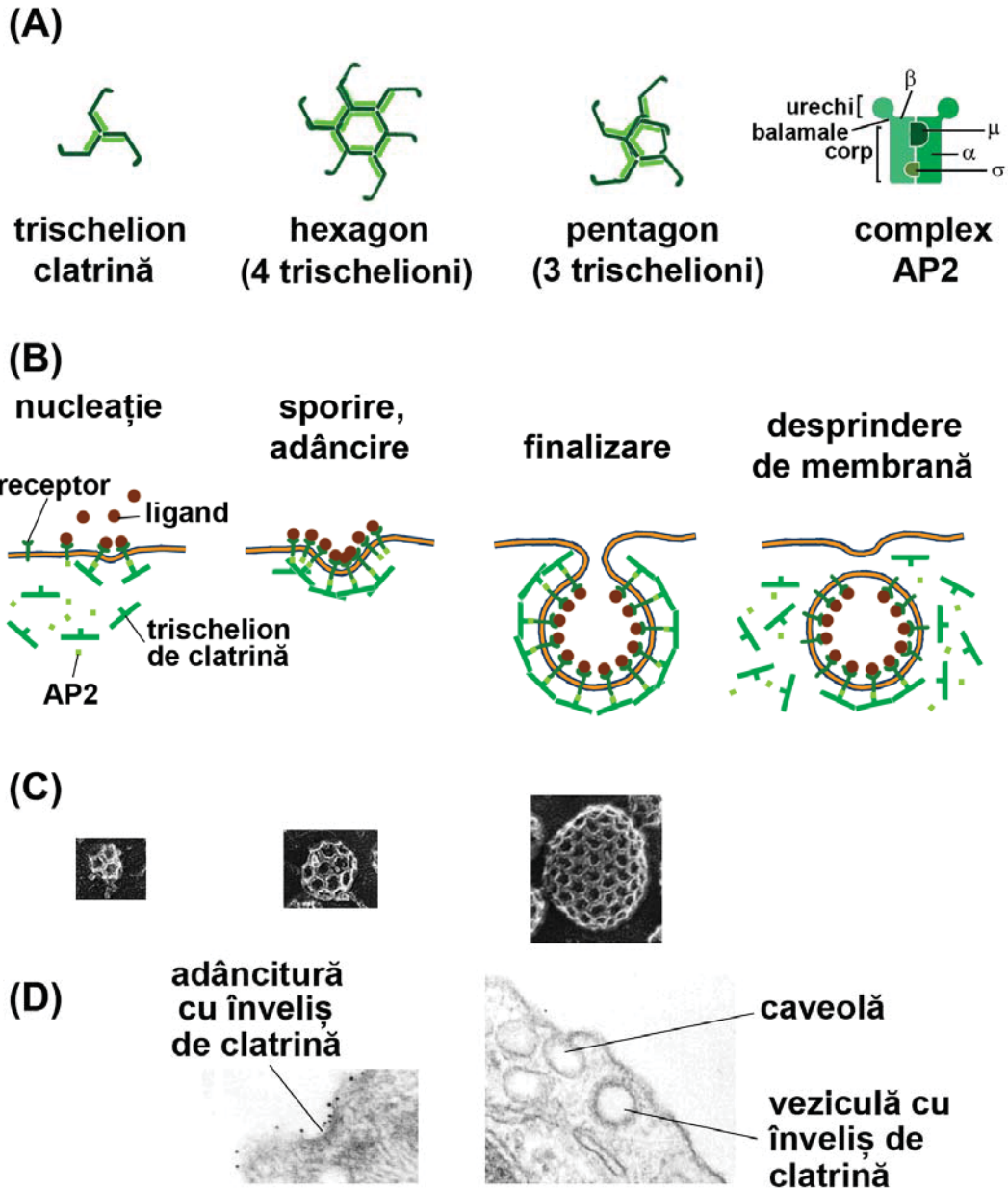


Fig. 3. 12. Endocitoza mediată de receptori: mecanism și ultrastructură. **A.** Unitatea de clatrină (un heterodimer) conține un lanț greu (subunitatea mare), reprezentat în verde închis și un lanț ușor (subunitatea mică), în verde deschis. Heterodimerii clatrinei se asociază în trischelioni care, prin interacțiuni reciproce, pot forma ochiuri hexagonale sau pentagonale, prin jocul dintre acestea realizându-se cușca de clatrină a unei vezicule de endocitoză mediată de receptori. Asocierea trischelionilor la endodomeniile receptorilor ce internalizează liganzii se face prin intermediul unor proteine adaptoare (AP), în cazul prezentat AP2. **B.** Dinamica procesului de endocitoză mediată de receptori. După interacțiunea cu liganzii, receptorii sunt adunați în structuri cu înveliș de clatrină de la nivelul membranei, având loc un fenomen de nucleație. Zona de nucleație se constituie ca microdomeniu care concentrează receptorii purtători de liganzi, conducând la sporirea ariei acoperite cu clatrină și la adâncirea porțiunii de membrană din ce în ce mai puternic, datorită organizării cuștii de clatrină. În final, porțiunea de membrană capătă o formă sferică, se desprinde de membrană și își pierde învelișul de clatrină (aceasta și proteinele adaptoare reciclându-se). Vezicula fără clatrină se transformă în endozom timpuriu. **C.** Imagini de microscopie electronică de transmisie, tehnica de înghețare-fracturare-sublimare, așezate sugestiv în relație cu evenimentele prezentate în B, prin care se evidențiază creșterea cuștii de clatrină. **D.** Imagini ale structurilor cu înveliș de clatrină, așa cum se pot vedea în microscopie electronică de transmisie, tehnica standard. © Mircea Leabu, 2014.

După ce receptorul interacționează cu ligandul, complexe receptor-ligand sunt adunate în adâncituri ale membranei tapetate pe fața internă cu un complex de endoproteine a cărui componentă de bază este **clatrina** [55]. Clatrina este un heterodimer cu un lanț greu și un lanț ușor, fiind capabilă să se autoasocieze în structuri ternare numite trischelioni (Fig. 3.12, A).

Microdomeniile adâncite ale membranei învelite cu clatrină sunt denumite **structuri cu înveliș** (în engleză, „**coated pits**”). Acestea se formează permanent, aglomerând fie receptorii în așteptarea liganzilor, fie complexe ligand-receptor, după formare. Pe măsură ce receptorii expuși la suprafața celulelor sau complexe receptor-ligand se aglomerează în microdomeniul corespunzător al membranei, iar învelișul de clatrină se formează, adâncitura membranei crește până la definitivarea formei sale sferice și desprinderea de membrana la nivelul căreia s-a format, sub forma unei **vezicule cu înveliș**. Rolul clatrinei este acela de a aglomera complexe ligand-receptor în zona membranară destinată endocitării (pentru unii dintre receptori), de a controla adâncirea microdomeniului membranar, care devine structură cu înveliș și de a definitiva formarea veziculei cu înveliș. Acest rol are la bază capacitatea clatrinei de a se asambla în trischelioni [56, 57], care mai departe pot forma ochiuri hexagonale și pentagonale într-o geometrie asemănătoare petecelor mingii de fotbal, care duc la formarea veziculei. Formarea trischelionilor și înrețelarea acestora se realizează prin participarea unor molecule proteice ajutătoare, numite **proteine adaptoare**, prescurtat **AP** (de la numele englezesc *Adaptor Protein*). Proteinele adaptoare sunt complexe heterotetramerice formate din două subunități mari (α și β de ~100kDa) și două subunități mai mici (μ și σ , de ~50kDa, respectiv ~19kDa). Au fost identificate patru tipuri de AP, notate de la AP1 la AP4. Subunitățile sunt notate la rândul lor cu $\alpha 1 - \alpha 4$, $\beta 1 - \beta 4$, $\mu 1 - \mu 4$, respectiv $\sigma 1 - \sigma 4$. Maleabilitatea complexelor AP este conferită de organizarea lor, având un corp cu două urechi și elemente balama care le conexează (Fig. 3.12, A). Învelișul de clatrină al veziculelor de endocitoză mediată de receptor se dezassemblează imediat după desprinderea veziculei de membrana celulară, iar structura membranară devine **endozom timpuriu**. La nivelul endozomului au loc diverse fenomene de sortare a ceea ce a fost internalizat pentru a fi direcționat, diferențiat, mai departe. Una dintre căile de direcționare o reprezintă calea lizozomală, prin fuzionarea cu organitul preexistent în celulă.

Analizând dinamica procesului de endocitoză mediată de receptori, deducem că acest tip de transport cu membrană este unul care se caracterizează prin concentrarea componentei endocitate, ceea ce o deosebește de pinocitoza constitutivă. Ligandul este introdus în celulă la o concentrație mai mare decât cea în care el se află în mediu. Această caracteristică se datorează faptului că, înainte de a fi endocitat, ligandul este acumulat și concentrat la nivelul structurii cu înveliș prin complexe receptor-ligand. Endocitoza mediată de receptori a fost descrisă pentru unele lipoproteine plasmatiche, pentru transferină sau pentru unii factori de creștere. Destinația materialului endocitat prin medierea receptorilor este diferită, fenomenele de sortare de la nivelul endozomilor timpurii fiind esențiale în destinul materialului endocitat. LDL se eliberează în endozom, sub acțiunea pH-ului acid și este direcționat către lizozomi, în timp ce receptorul este reciclat la suprafața celulei pentru un nou ciclu de endocitoză. Sub acțiunea aceluiași mediu acid din endozom, transferina pierde fierul, iar eliberarea ionului metalic face proteina să rămână atașată de receptor, ca apotransferină. Întoarsă ca apotransferină la suprafața celulei, unde găsește un pH neutru, se desprinde de receptor pentru a reintra într-un nou ciclu de transport al fierului. Reciclarea receptorului la LDL și a complexului receptor-transferină se face prin intrarea lor în apendice tubulare ale endozomilor timpurii. Procesele de aglomerare și sortare din endocitoza mediată de receptori sunt riguros reglate de celulă. În aceste fenomene de reglare participă și ubiquitina (vezi și

CASETA 3.2) care conjugă receptorii prin ceea ce se numește mono-ubiquitinilare sau multi-ubiquitinilare (mai multe ubiquitine atașate în poziții diferite ale lanțului polipeptidic), acestea fiind diferite de fenomenul de poli-ubiquitinilare a proteinelor citosolice care urmează să fie degradate în proteazomi (organite nedelimitate de endomembrane specializate în degradarea proteinelor citosolice nefuncționale). Merită reținute aceste funcții diferite ale ubiquitinei în celulă bazate pe mecanisme diferențiate sensibil.

Relativ recent a fost evidențiată și o a treia formă de pinocitoză, tot mediată de receptori, dar pentru molecule mici. Acest proces de transport membranar a fost denumit **potocitoză** (de la termenii grecești $\pi\omicron\tau\omicron$ – a bea + $\kappa\upsilon\tau\omicron\varsigma$ – vas, recipient, celulă + $\omega\omicron\iota\varsigma$ – sufix pentru proces, fenomen). Ca și pinocitoza constitutivă, potocitoza se efectuează prin intermediul caveolelor, invaginări ale membranei organizate prin implicarea caveolinei (Fig. 3.13). Potocitoza a fost evidențiată prima dată pentru acidul folic și denumită astfel în 1992 de Richard G. W. Anderson [58, 59]. Procesul de potocitoză, după legarea moleculelor mici la receptori (ectoproteine cu ancoră glicofosfatidilinozitolică [60]) și sechestrarea lor în caveole, pentru a fi astfel transportate, permite trecerea liganzilor direct în citoplasmă prin anumite canale din membrana caveolară. Aceste canale se deschid în momentul în care caveolele își închid comunicarea cu exteriorul. În momentul de față, Anderson și alți cercetători care studiază funcțiile caveolelor încearcă să extindă procesul de potocitoză la toate fenomenele de transport care sunt efectuate de caveole prin evitarea căii către lizozom [61].

Există în prezent o preocupare susținută pentru înțelegerea la nivel molecular a diverselor forme de pinocitoză ceea ce a condus la o clasificare a lor în **endocitoză dependentă de clatrină** și **endocitoză independentă de clatrină** (ceea ce înseamnă o diferențiere la nivelul mecanismelor ce erau incluse în pinocitoza constitutivă) [62, 63]. La rândul ei endocitoza independentă de clatrină poate fi **endocitoză dependentă de caveolină** sau **endocitoză independentă de caveolină**, dar dependentă de alte tipuri de proteine care să asigure invaginarea și desprinderea veziculelor de membrană. Dacă majoritatea tipurilor de endocitoză sunt efectuate de structuri veziculare, au fost evidențiate și procese de endocitoză ce implică invaginări membranare sub forma de structuri tubulare [62, 63].

Departate de a fi doar o cale de a prelua materie din spațiul extracelular, endocitoza este un fenomen care permite celulei să controleze funcțiile membranei, prin modularea componentelor acesteia [62, 64].

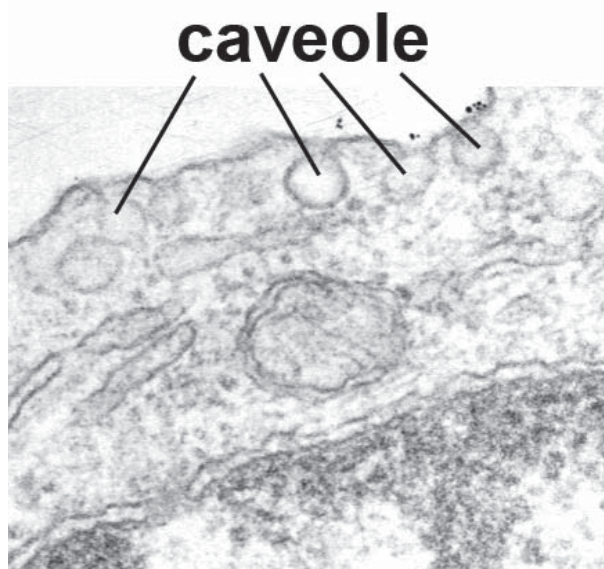


Fig. 3.13. Aspectul caveolelor în imagini de microscopie electronică de transmisie. Fără investigații specifice nu se pot face diferențieri între caveolele implicate în pinocitoză constitutivă, potocitoză sau transcitoză (există dovezi experimentale cum că procesele pot implica aceleași caveole, cu sortarea și direcționarea ulterioară, în endozomi). © Mircea Leabu, 2014.

Prin endocitoză, celula poate ascunde componente ale organizării membranei, permițând reciclarea acestora în funcție de nevoile celulei sau le poate elimina temporar degradându-le, pentru a le biosintetiza din nou și expune la suprafața celulei atunci când este cazul [65]. Așa se întâmplă cu o mare parte dintre componentele implicate în semnalizarea celulară (vezi mai jos), iar această realitate este un alt exemplu de cooperare între fenomenele ce definesc cele două mari roluri ale membranei: schimbul de substanță (transportul membranal) și schimbul de informație (semnalizarea celulară). Endozomii care se formează după desprinderea de membrană a structurilor de endocitoză asigură sortări ale componentelor endocitate și chiar sunt implicați în continuarea proceselor de semnalizare [66].

3.2.3.2. Exocitoza

Procesul prin care celula elimină substanțe produse în diverse procese celulare (inclusiv biosinteze de compuși destinați secreției) și acumulate temporar în structuri delimitate de endomembrane numite vezicule sau vacuole de secreție poartă numele de exocitoză. Exocitoza este ultimul pas al unui proces celular complex, care implică în cascadă mai multe organite (ribozomi, reticul endoplasmatic, aparat Golgi, sistem endozomal), proces numit secreție celulară. (Despre procesul de secreție celulară vom vorbi în volumul al II-lea, la capitolul "Biogeneza și traficul intracelular al membranelor"). Din punctul de vedere al mecanismelor prin care este controlată, exocitoza poate fi constitutivă sau semnalizată. Aceasta înseamnă că, pe de o parte, unele produse destinate secreției sunt eliminate din celulă pe măsură ce se formează veziculele secretorii și acestea ajung la membrana celulară unde are loc fuzionarea membranelor și secreția, prin procese constitutive, care se desfășoară de la sine. Pe de altă parte, anumite componente produse în celulă sunt acumulate și stocate în zone juxtamembranare, până când celula primește un semnal care comandă secreția lor. Această exocitoză semnalizată este dependentă de creșterea concentrației de Ca^{2+} din citoplasmă în zona de stocare a veziculelor de secreție [67]. Mecanismul exocitozei (Fig. 3.14) presupune următoarele etape [68, 69]:

1. **Transportul veziculelor** (în engleză „*vesicle trafficking*”) de secreție din locul de formare în locul de stocare din apropierea membranei la nivelul căreia se face secreția. Acest transport este efectuat de așa-numitele motoare moleculare (izoforme de miozină pentru transportul pe calea filamentelor de actină, sau dyneină ori kinezină pentru transportul pe calea microtubulilor);
2. **Ancorarea veziculelor** (în engleză „*vesicle tethering*”) prin factori de ancorare de natură proteică la o distanță de ~25nm de membrana celulară;
3. **Acostarea veziculelor** (în engleză „*vesicle docking*”) la membrana celulară, adică aducerea acestora la o distanță de 5 – 10nm (cât grosimea unei membrane) între cele două membrane (celulară, respectiv veziculară);
4. **Capacitarea veziculelor** (în engleză „*vesicle priming*”) care presupune o serie de evenimente legate de rearanjările dependente de ATP și de Ca^{2+} ale proteinelor și lipidelor membranei veziculare, rearanjări necesare efectuării ultimei etape. (În exocitoza constitutivă această etapă se pare că nu există.);
5. **Fuzionarea veziculelor** cu membrana celulară și expulzarea produșilor de secreție [70]. Fuzionarea este realizată de niște proteine numite abreviat **SNARE** (de la “**S**oluble **N**-ethylmaleimide-sensitive **A**ttachment protein **R**Eceptor”) care sunt **v**-SNARE (în membrana veziculelor) și **t**-SNARE (în membrana țintă, cu **t** de la englezescul **t**arget). Trebuie menționat faptul că interacțiunile bazate pe complementaritatea v-SNARE/t-SNARE sunt importante și pentru fenomenele care se petrec în etapele anterioare.

Ce se întâmplă cu membranele veziculelor de secreție pare a depinde de tipul de exocitoză. La exocitoza constitutivă este acceptat că membranele poartă, de

regulă, componente noi pentru membrana celulară, astfel încât acestea migrează în planul membranei țintă [71]. La exocitoza semnalizată (mai în detaliu investigată), veziculele reintră în citosol fiind reciclate.

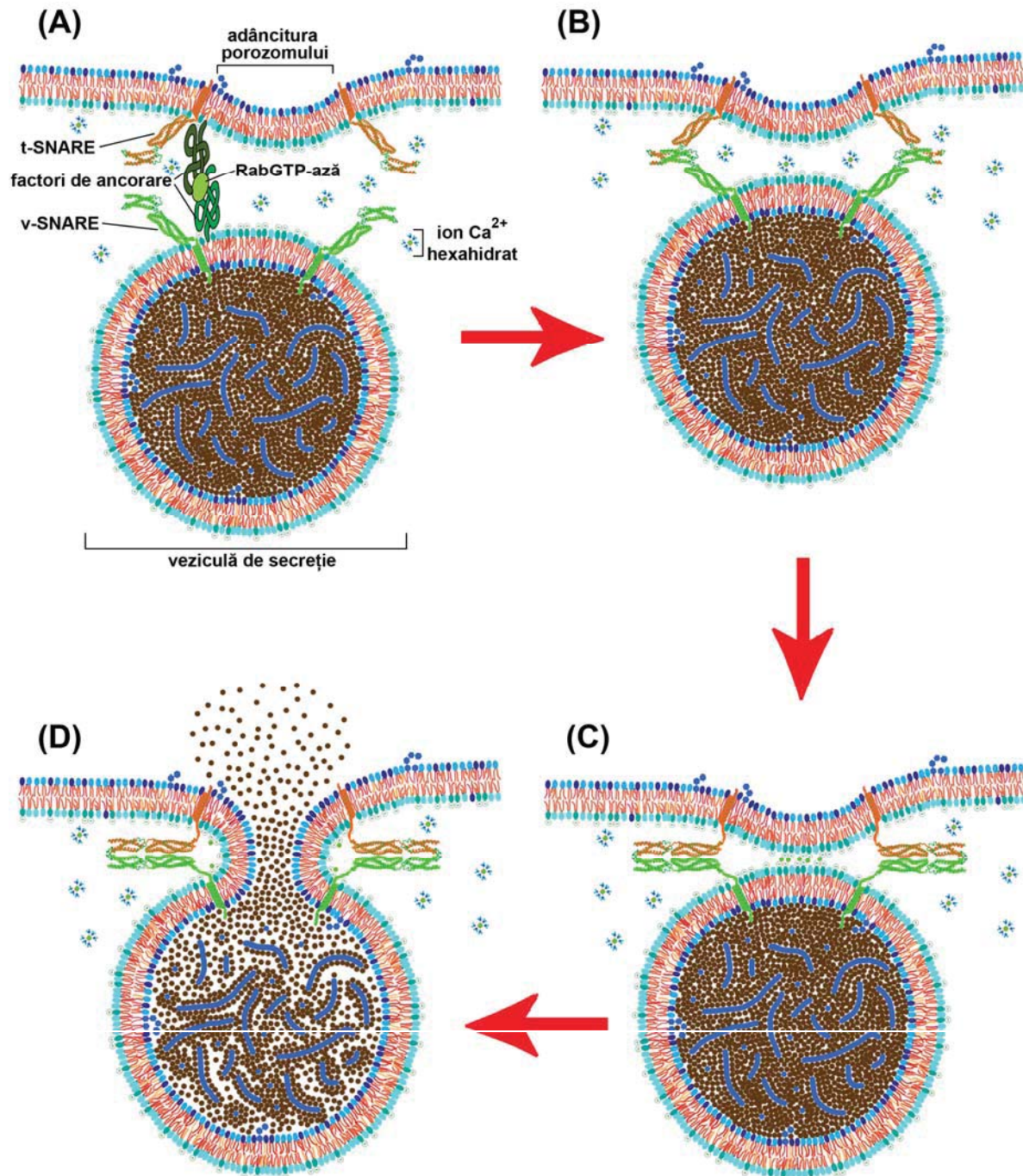


Fig. 3.14. Desfășurarea procesului de exocitoză. A. În prima fază, după ce vezicula de secreție a fost direcționată către membrana pe unde se face exocitoza, are loc ancorarea la microdomeniul specific. Acest fenomen este facilitat de niște proteine numite factori de ancorare, care sunt controlate de proteine G mici (sunt definite la secțiunea despre semnalizarea celulară). B. Etapa următoare implică interacțiunile dintre partenerii veziculari și cei ai membranei țintă (v-SNARE și t-SNARE), realizându-se acostarea. C. Interacțiunile dintre v-SNARE și t-SNARE induc capacitatea membranei veziculare în vederea deschiderii la nivelul porozomului, proces complex ce implică ioni de calciu dehidratați. D. Deschiderea veziculei este însoțită de expulzarea parțială a materialului de exocitat, după care vezicula se reînchide revenind în citosol, proces care nu este prezentat în imagine. Structurile albastre din interiorul veziculei de secreție reprezintă componenta care contribuie la o bună compactare a materialului de secreție. În anumite celule, această funcție de compactare revine unor proteoglicani intraveziculari. Săgețile roșii indică avansarea procesului. © Mircea Leabu, 2014.

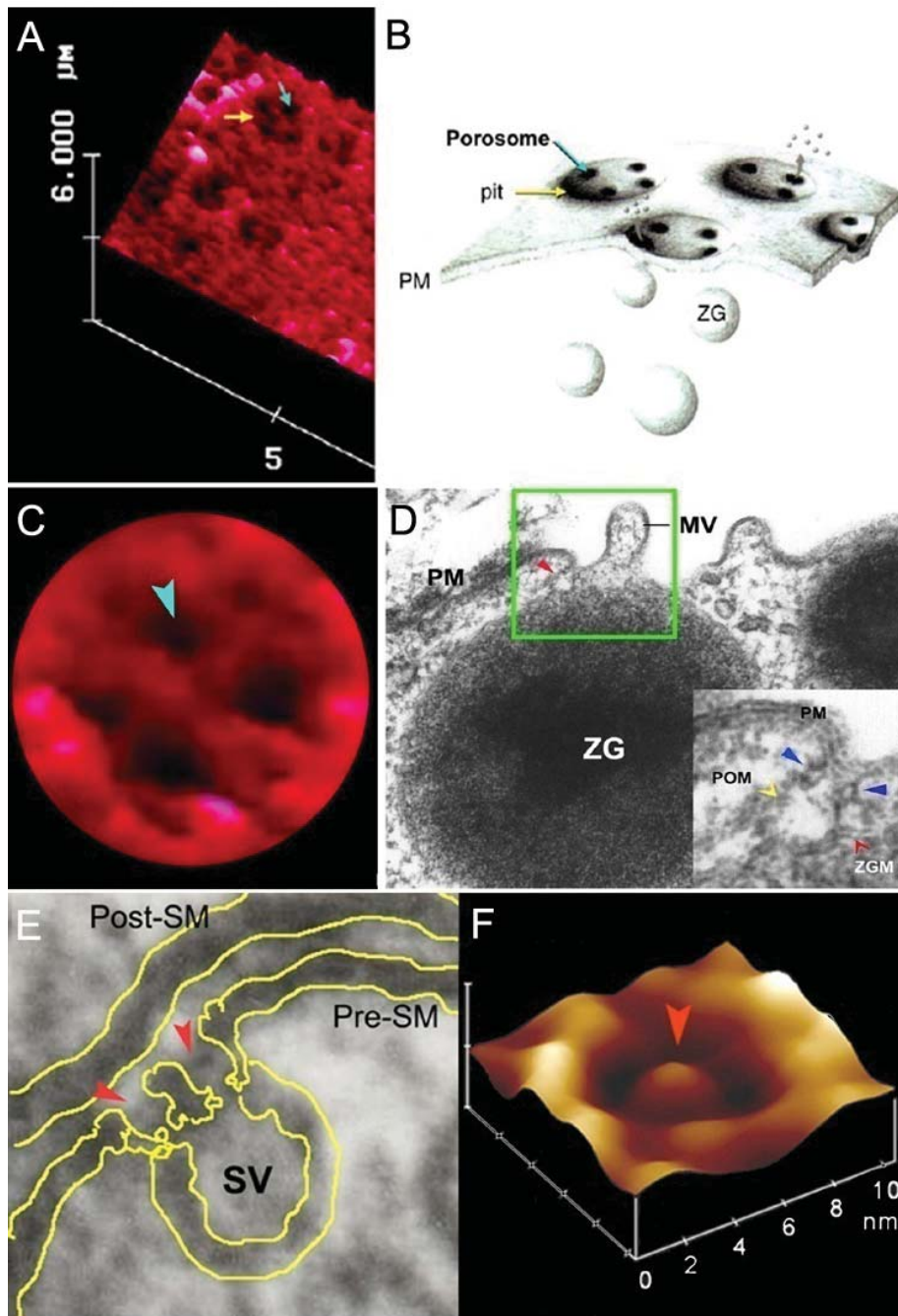


Fig. 3. 15. Porozomi în celulele pancreasului exocrin (A, C, D) și în neuroni (E, F). **A.** Imagine de microscopie de forță atomică (AFM) de la polul apical al unei celule acinare pancreatice vii, care evidențiază prezența adânciturii (săgeata galbenă) cu porozomi la nivelul ei (săgeata bleu-gri). **B.** Desen schematic reprezentând adâncituri și cupe ale porozomilor, la care granule de zimogen (ZG), vezicule secretorii din celulele pancreasului exocrin, acostează și fuzionează tranzitoriu pentru a elibera enzime digestive din celulă. **C.** Micrografie

AFM cu patru porozomi (unul indicat prin cap de săgeată, bleu-gri). Porozomii din membranele celulelor pancreasului exocrin variază în dimensiuni (între 100 și 180nm diametru). **D.** Aspectul în microscopie electronică de transmisie al unui porozom din membrana apicală (PM) a unei celule acinare pancreatice. Este indicată membrana cu porozom (POM, cap de săgeată, în galben) asociat membranei unei vezicule secretorii (ZGM). În insert, structura inelară (capete de săgeată, albastru) care formează gâtul complexului porozomal. **E.** Imagine de microscopie electronică a unui porozom neuronal (capetele de săgeată, în roșu), asociate unei vezicule sinaptice (SV) din membrana presinaptică (Pre-SM) dintr-o terminație nervoasă; abreviația Post-SM din imagine indică membrana postsinaptică. Este de observat o plombă centrală în complexul porozomal. **F.** O imagine tridimensională AFM a unui porozom neuronal din membrana presinaptică într-o celulă viabilă. Plomba centrală este evidentă (cap de săgeată, în roșu). Porozomul neuronal este cu un ordin de mărime mai mic (10-12nm diametru) față de cel prezent în membrana celulelor pancreasului exocrin (100-180nm diametru). (Imaginile au fost puse la dispoziție, cu generozitate, de Dr. Bahnu Jena, George E. Palade University Professor, Department of Physiology, Wayne State University School of Medicine and Director, NanoBioScience Institute, Detroit, Michigan, USA. Figura reprezintă imagini compozite publicate anterior în: Proc Natl Acad Sci USA. **94**: 316-321 (1997); Biophys J. **85**: 2035-2043 (2003); Cell Biol Int. **28**: 699-708 (2004); J Microscopy. **232**: 106-111 (2008). ©Bhanu Jena)

În prezent există un mare interes pentru înțelegerea momentului final al exocitozei, procesul de fuzionare a veziculelor secretorii cu membrana. Se pare că fuzionarea (cel puțin în unele tipuri de celule) se face la nivelul unor structuri preexistente în membrana țintă, structuri care favorizează deschiderea veziculelor și care au fost denumite **porozomi** [72-76], de unii autori, în timp ce alții optează pentru sintagma **pori de fuziune** [77], care se formează în momentul interacțiunii intime a celor două membrane, cea a veziculei, cu cea țintă. Indiferent de cum ar fi denumite structurile care favorizează și facilitează fuzionarea veziculelor cu membrana celulară și expulzarea materialului de secretat, fenomenul de exocitoză se petrece principial la fel, așa cum a fost prezentat mai sus (Fig. 3. 14).

Porozomii (Fig. 3.14 și Fig. 3.15) sunt complexe supramoleculare, lipido-proteice, de la nivelul membranei, având formă de cupă. La aceste complexe veziculele de secreție acostează tranzitoriu pentru a fuziona cu membrana și a expulza o parte din conținut, proces ce poate fi asemănat cu o erupție vulcanică. Vezicula se reînchide și revine, parțial golită, în citosol. Determinarea organizării moleculare și a dinamicii porozomilor la rezoluție nanometrică și în timp real (adică pe celule vii), izolarea lor, stabilirea compoziției (atât proteine, cât și lipide), ca și reconstituirea funcțională a lor în bistraturi lipidice artificiale sunt etape experimentale care au fost realizate și acestea recomandă porozomii ca porți universale de secreție în celulele specializate în acest fenomen.

Bhanu Jena, descoperitorul porozomului și cel care a propus denumirea, trece dincolo de disputa porozom sau por de fuziune (dispută pe care pare a o considera caducă) și propune un posibil mecanism de acțiune a acestei nanostructuri prezente în membrana celulelor specializate în secreție. Prin acest mecanism, la baza porozomului, în momentul eliberării materialului secretat, se formează porul de fuziune între membrana veziculei acostate și membrana celulei (vezi și legenda Fig. 3.15, d). Așadar, porozomii, care preexistă în membrana țintă acționează prin deschiderea unui por de fuziune. Mecanismul propus, nu numai că explică fenomenele membranare care se petrec în procesul de exocitoză, dar este și o pledoarie care ne arată că biologicul folosește la un nivel superior legile chimiei și fizicii, exploatându-le în interesul fenomenelor ce constituie viul. Ceea ce se întâmplă la nivelul porozomului, de exemplu crearea acelei tensiuni mecanice care contribuie la formarea porului de fuziune, vine să demonstreze odată în plus că membrana integrează participarea componentelor biochimice în fenomenele complexe pe care trebuie să le asigure celulei, folosind toate posibilitățile chimice și fizice cu scopul găsirii celor mai bune soluții pentru a face bine ceea ce are de făcut și pentru a supraviețui ea și angrenajul din care face parte. Această capacitate integrativă este valabilă pentru celulă în ansamblul ei. Se vorbește deja în biologia celulară despre "ambianța socială" a celulelor sau de integrare în contextul social al celulelor, iar pentru toate acestea celulele au la suprafața lor biocomponente care le ajută să fie "buni membri ai societății", prin organizare de elemente specializate în asemenea funcții (de exemplu joncțiuni celulare, pe care le vom aborda în volumul al II-lea al cărții, domenii sau microdomenii specializate ale membranelor).

După ce am prezentat fenomenele de transport cu membrană prin care celulele preiau, pentru propriile nevoi, substanțe din exterior (endocitoză) sau elimină în exterior substanțe pentru a se "comporta corect" față de structura biologică în care sunt angrenate sau chiar față de întreg organismul (exocitoză), este timpul să abordăm și un comportament "altruist" al celulelor, care implică transport cu membrană, adică procesul de transcitoză, prin care celulele mută dintr-o parte în alta substanțe (între spații pe care trebuie să le separe), pentru a le favoriza ajungerea la locurile unde este nevoie de ele.

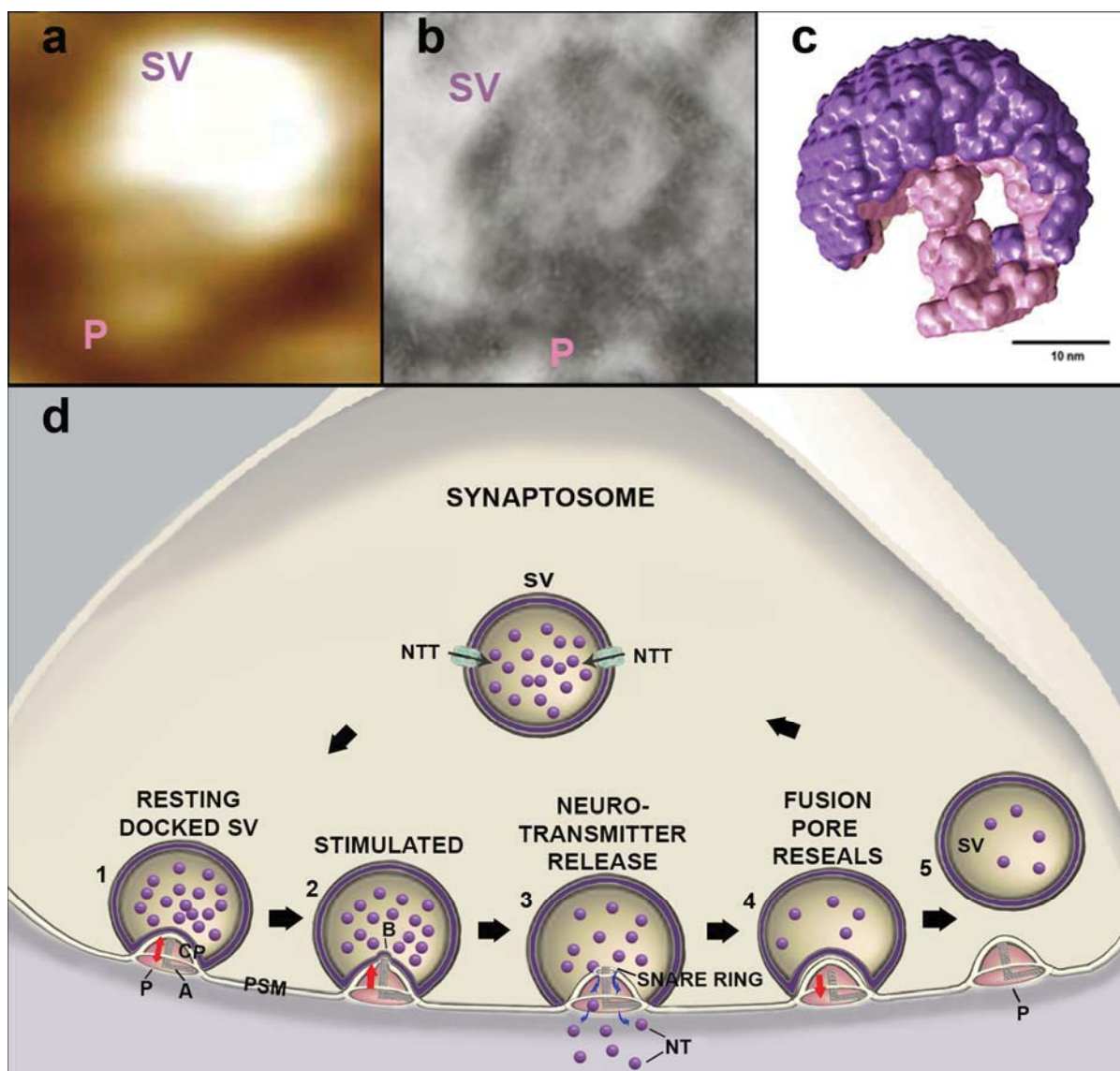


Fig. 3.15. Vezicule de secreție acostate la complexele porozomului în membrana presinaptică a unei terminații nervoase. a. Imagine AFM a unei vezicule sinaptice (SV), obținută în suspensie, acostată la complexul în formă de cupă al porozomului (P), pe fața citosolică a membranei presinaptice. De observat diametrul de 35nm al SV acostată la complexul porozomului de 15nm. b. Imagine de microscopie electronică (EM) evidențiind asemănător o SV de 35nm acostată la porozomul de 15nm din membrana presinaptică. De notat plomba centrală a porozomului, ce se poate evidenția și prin EM. c. Confirmarea celor observate prin AFM și EM referitor la organizarea porozomului, prin tehnica împrăștierii la unghi mic a razelor X, în soluție (SAXS), care a permis reconstrucția tridimensională a unei vezicule sinaptice (în violet) acostată la complexul porozomului cu formă de cupă (în roz) din membrana presinaptică a unor sinaptozomi izolați. De remarcat că toate tehnicile (AFM, EM și SAXS) duc la rezultate similare referitor la acostarea și interacțiunea veziculei sinaptice cu complexul porozomului, în neuroni. d. Desen care sistematizează un posibil mecanism al implicării porozomului (P) în acostarea veziculelor sinaptice la membrana presinaptică (PSM) și eliberarea neurotransmițătorului. Mecanismul implică cinci etape: 1. Veziculă acostată la complexul porozomului. De notat brațul (A) al plombei centrale (CP) care permite mișcarea verticală a acesteia, pe direcția indicată de săgeata roșie cu două capete. Când baza plombei centrale (B) este împinsă către interiorul veziculei, ca urmare a stimulării, se formează o mică ridicătură cu dimensiuni apropiate de diametrul bazei plombei (aproximativ 3-4nm diametru). În consecință, membrana de la baza porozomului, care formează ridicătura de 3-4nm, este supusă unei mari tensiuni conducând la o strânsă apropiere și contact cu foaia citosolică a membranei veziculare, ceea ce favorizează interacțiunile v-SNARE/t-SNARE după geometria unui inel sau rozete ducând la fuziunea membranelor, cu formarea unui por de fuziune și eliberarea neurotransmițătorului (prezentat în etapa notată cu 3 în figură). 4. Ulterior, prin retragerea plombei porozomale în poziția de repaus, tensiunea dispare și are loc reînchiderea porului format tranzitoriu. 5. Vezicula implicată în proces se desprinde de porozom și este recirculată, fiind reîncărcată prin intermediul transportorilor de neurotransmițător

3.2.3.3. Transcitoza

Deși privită simplist ar părea o însumare a endocitozei și exocitozei, lucrurile nu sunt așa. Transcitoza este un proces al cărui mecanism, chiar dacă neelucidat în momentul de față, este departe de a însemna o endocitoză urmată de o exocitoză. Termenul a fost introdus de Nicolae Simionescu în 1979 [78] privitor la trecerea prin celulele endoteliale de macromolecule dinspre plasmă către țesut și invers, prin structuri delimitate de membrane, numite la început, pentru celulele endoteliale vezicule plasmalemale, ulterior fiind numite caveole în cazul tuturor tipurilor celulare.

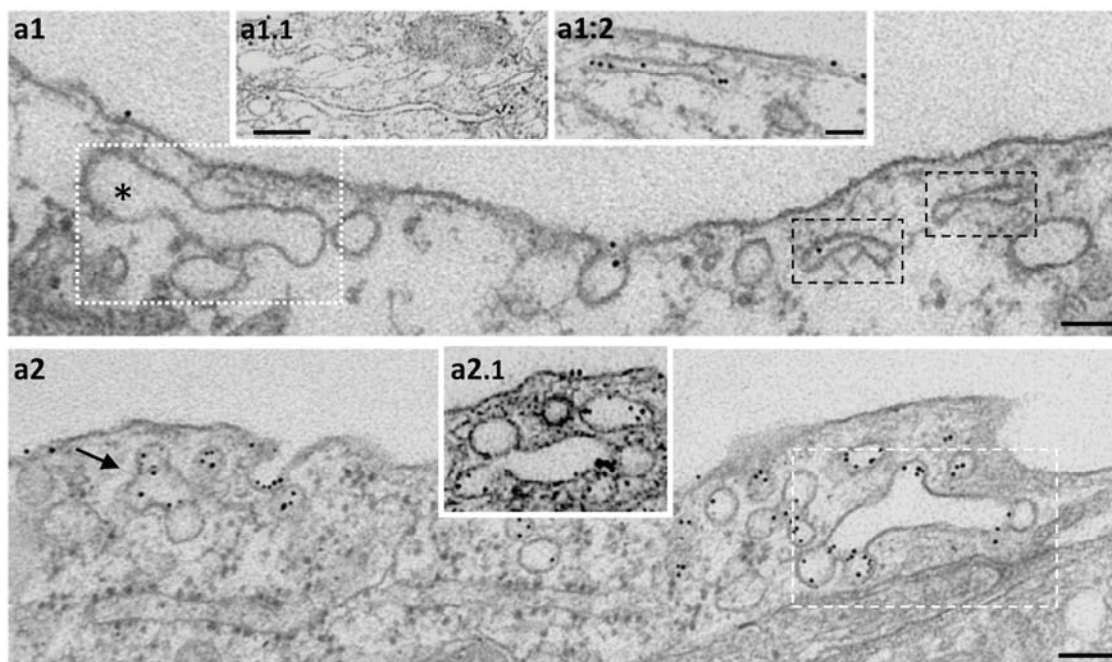


Fig. 3.16. Modificările în procesul fisiunii membranare atrag creșterea ultrastructurilor neconvenționale de endocitoză/transcitoză, în celulele endoteliale din plămânul de șoarece care exprimă un domeniu (SH3A) al intersecției-1s. **a1.** Ultrastructura endoteliului este afectată de modelarea experimentală a exprimării domeniului intersecției-1s, astfel încât alături de caveole, componentele normale, apar unele elemente neconvenționale de transport cu membrană: invaginări cu structuri cu înveliș de clatrină (asterisc în caseta delimitată de linia punctată albă), sau structuri tubulare (casetele punctate în negru), conținând componenta de transportat (albumină serică marcată cu aur coloidal). Elementele tubulare sunt mai bine evidențiate în inserturile a1.1 și a1.2. **a2.** Alte forme de structuri neconvenționale datorate aceleiași modulări a proteinei exprimate de celulele endoteliale. Este vorba de ciorchini de caveole mari, nefirești (săgeata neagră și caseta delimitată de linie punctată albă, respectiv insertul a2.1), conținând același compus transportat marcat cu aur coloidal. Bare dimensionale: 200 nm (a1.1); 100 nm (a1 și a2); 50 nm (a1.2). *Imagini de microscopie electronică de transmisie puse cu amabilitate la dispoziție de Dr. Sanda Predescu, Department of Pharmacology/Pulmonary and Critical Care Medicine, Rush University Medical Center, Chicago, Illinois. © 2012. Dan N. Predescu et al. [81], articol cu acces liber, sub licența Creative Commons Attribution.*

(Continuare legendă Fig. 3.15)

(NTT) din membrana SV, pentru a fi gata în efectuarea unui nou ciclu de exocitoză (acostare, fuzionare, expulzare de neurotransmițător). (Imaginile au fost realizate și puse la dispoziție, cu generozitate, de Dr. Bhanu Jena, George E. Palade University Professor, Department of Physiology, Wayne State University School of Medicine and Director, NanoBioScience Institute, Detroit, Michigan, USA. Figura reprezintă imagini compozite publicate anterior în: Cell Biol Int. 28:699-708 (2004) și Micron. 56:37-43 (2014). ©Bhanu Jena)

Transcitoza este un proces specific celulelor ce formează epiteliile simple (monostratificate). Celulele endoteliale de la nivelul capilarelor sunt exemplul clasic de celule care efectuează transcitoză [79-81]. Studiul mecanismelor transcitozei la nivelul endoteliului reprezintă un domeniu de mare interes atât pentru cunoașterea fenomenului normal, cât și în vederea modulării sale, inclusiv pentru scopuri terapeutice. Există modalități de afectare a procesului de transcitoză prin exprimarea selectivă de proteine celulare care pot interfera cu fenomenele membranare care însoțesc transcitoza și contribuie la formarea unor structuri de transport nefirești (Fig. 3.16).

Procesul transcitozei se petrece și la nivelul altor epiteliilor cum ar fi epiteliul absorbant intestinal. Hepatocitele efectuează și ele transcitoză pentru dimeri/polimeri de IgA de la polul sanguin la polul biliar, unde sunt eliberați cu o componentă secretorie, ectodomeniul receptorului implicat în transcitoză [82]. Imunoglobulina A astfel eliminată ajunge în bilă și mai departe în tubul digestiv unde au loc prime activități de apărare imună legate de alimentație. Exemplul transportului trans-hepatocit al dimerilor de IgA reprezintă după toate dovezile o **transcitoză mediată de receptori** [83]. De altfel, transportul prin transcitoză al unor polimeri imunoglobulinici pare a fi o proprietate a tuturor epiteliilor simple ce căpтуșesc organe cavitare, cu rol în inițierea apărării imune încă din aceste spații, echivalente topologic cu exteriorul organismului. Spre exemplu, acest tip de transcitoză a fost dovedit și pentru epiteliul uterin [84].

Celor interesați de noutățile referitoare la transcitoză sub aspectul diversității epiteliilor la nivelul cărora se petrece și asupra mecanismelor prin care se produce, le recomandăm un relativ recent articol de sinteză scris de Pamela Tuma și Ann L. Hubbard, de la Johns Hopkins University, Baltimore [85]. În acest articol se va vedea că, deși transcitoza a fost definită ca proces specific celulelor epiteliale simple, ea se petrece și în sisteme neepiteliale. De interes este și articolul de sinteză redactat de Aleksandr Treyer și Anne Müsch, de la Albert Einstein College of Medicine, Department of Developmental and Molecular Biology, Bronx, New York, prezentând detalii legate de anumite procese de transcitoză (unele surprinzătoare) în hepatocite [86], cu referire la unele implicații patologice.

3.2.4. Considerații finale asupra transportului membranelor

Celula nu poate supraviețui dacă nu schimbă substanțe cu mediul: preluarea de produși utili metabolismului său și eliminarea de compuși inutili, care ar putea deveni toxici, sau de compuși destinați cooperării cu alte celule din organism (compuși destinați secreției). Cum substanțele care trebuie să ajungă în celulă, ca și cele care trebuie să o părăsească, sunt de o mare diversitate (unele lipofile, altele hidrofile, iar între acestea din urmă putem vorbi de substanțe purtătoare de sarcină sau nu, ca și de molecule mici sau macromolecule), este firesc să înțelegem că la nivelul membranei se petrec mecanisme specifice, pentru a facilita celulei preluarea sau eliminarea acestei mari diversități de compuși.

Așadar, o diversitate de tipuri de compuși de transportat (iar dacă ar fi să ne gândim la diversitatea de entități chimice de transportat, aceasta este și mai mare, adică avem mai multe specii ionice, mai multe specii de molecule polare, mai multe proteine etc.) atrage, fără doar și poate, o diversitate de fenomene responsabile de transportul membranelor. Cum avem de-a face cu o mare diversitate de fenomene de apropiat, de înțeles și, eventual, de însușit, cea mai comodă modalitate de a acoperi realizarea țelului este clasificarea lor pe diverse criterii. Acest lucru l-am și făcut în acest subcapitol legat de transportul membranelor. Astfel, există fenomene de transport prin membrană, în care substanțele transportate străbat planul membranei și există fenomene de transport cu membrană, prin care substanțele transportate sunt introduse în sau expulzate din celulă prin structuri delimitate de membrane.

Fiecare dintre aceste două mari tipuri de fenomene de transport membranar include, la rândul său, multiple variante în funcție de caracteristicile fizico-chimice ale substanțelor transportate.

Între substanțele care pot realiza transport prin membrană, unele difuzează relativ nestingherite prin bistrat (substanțele liposolubile, dar și substanțe polare cu mase moleculare sub 100Da), difuzând dinspre spațiul cu concentrație mare (fie el citosol, fie exteriorul celular) către spațiul cu concentrație mică, ceea ce se numește transport prin difuziune simplă.

Ionii și moleculele polare mai mari (până în 800Da) au nevoie la trecerea prin planul membranei de proteine ce organizează căi transmembranare de străbatere, iar aceste elemente de transport sunt numite canale pentru ioni și transportori pentru celelalte tipuri de molecule polare mici (adică glucide, aminoacizi, nucleotide etc). Ca și la difuziunea simplă, și în acest caz, motorul transportului îl reprezintă diferențele de concentrație în care acești compuși se află de o parte, respectiv de cealaltă a membranei. Deoarece transportul necesită proteine organizate transmembranar, aceste modalități de transport prin membrană poartă denumirea de difuziune facilitată. Termenul difuziune, ca și în fizică, are semnificația de mișcare de la concentrație mare la concentrație mică, iar asta se face fără consum de energie. În aceste situații vorbim de transport pasiv, formă de transport corespunzătoare unei clasificări făcute în funcție de energetica procesului. Când fenomenul de transport necesită consum de energie, avem de-a face cu ceea ce numim transport activ. Nevoia de consum de energie apare atunci când prin membrană trebuie să fie transportate componente împotriva gradientului de concentrație. Dacă energia necesară trecerii substanței prin membrană se consumă concomitent cu realizarea transportului, atunci acesta este denumit transport activ primar, iar dacă energia a fost consumată anterior transportării compusului de interes pentru celulă, vorbim de transport activ secundar.

Fenomenele de transport prin membrană se pot clasifica și în funcție de numărul de tipuri de substanțe transportate într-un ciclu al fenomenului. Dacă se transportă un singur compus odată, atunci transportul este singular sau uniport. Dacă simultan sunt transportate cel puțin două tipuri de substanțe atunci vorbim de transport cuplat sau co-transport. În sfârșit, fenomenele de co-transport se clasifică la rândul lor în funcție de sensul în care se mișcă substanțele ce trec simultan prin membrană, prin aceeași formațiune proteică transmembranară. Dacă toate substanțele transportate în cadrul unui ciclu de activitate trec prin membrană în același sens, transportul este simport. Dacă cel puțin un compus transportat se mișcă în sens opus celui/lalt/celorlalți, atunci vorbim de transport antiport.

Toate fenomenele de transport prin membrană, identificate până în prezent, se pot asocia diferitelor categorii definite prin diversele tipuri de clasificări, menite să ușureze cunoașterea și înțelegerea.

Prin diversitatea de tipuri de transport cu membrană, celulele, pe de o parte, își completează nevoile de substanțe și/sau curăță organismul și îl apără de "intruși" (cum se întâmplă prin procesele imune) sau de materiale rezultate din procese fiziologice (apoptoză) sau patologice (resturi de celule necrozate), dar contribuie, pe de altă parte și la buna organizare și/sau funcționare ale țesuturilor, respectiv organismului în ansamblul său. Pentru aceste scopuri, celulele și-au dezvoltat o multitudine de tipuri de fenomene endocitotice prin care își asigură capacitatea de a prelua diverse componente macromoleculare (pinocitoza, potocitoză, endocitoză mediată de receptori) sau materiale insolubile, cum ar fi bacterii, debriuri celulare (fagocitoză). Mai mult, dincolo de grija pentru sine și responsabilitatea pentru menținerea curată a organismului, implicarea unora dintre celule (cele care organizează epiteliile monostratificate ce căptușesc organe cavitare) în menținerea bunei funcționări a țesuturilor și a organismului în ansamblul său a necesitat

instituirea unor procese de transport de substanță dintr-o parte în alta a spațiilor pe care le separă, transcelular. Aceste procese care pot fi dependente sau nu de unii receptori poartă denumirea de transcitoză, care poate fi uneori transcitoză mediată de receptori.

În sfârșit, desfășurarea normală a tuturor acestor procese de transport membranar (prin membrană, respectiv cu membrană) contribuie la starea de sănătate a organismului. Multe patologii pot fi însoțite sau determinate de dereglări în desfășurarea fenomenelor de transport membranar și, de aici, rezultă interesul și justificarea acestuia pentru cunoașterea în detaliu a proceselor și pentru găsirea de soluții în vederea utilizării terapeutice a lor. De multă vreme sunt cunoscute modalități terapeutice care exploatează modularea funcției canalelor ionice sau a pompelor (de exemplu în cardiologie). Dar nici fenomenele de transport cu membrană nu sunt de ignorat. Există modelări experimentale din care rezultă că pinocitoza și transcitoza pot fi exploatate în interes terapeutic [87].

Bibliografie selectivă

1. **Montel-Hagen A, Sitbon M, Taylor N.** (2009) Erythroid glucose transporters. *Curr Opin Hematol.* **16**: 165-172.
2. **Uldry M, Thorens B.** (2004) The SLC2 family of facilitated hexose and polyol transporters. *Pflugers Arch.* **447**: 480-489.
3. **Hou JC, Pessin JE.** (2007) Ins (endocytosis) and outs (exocytosis) of GLUT4 trafficking. *Curr Opin Cell Biol.* **19**: 466-473.
4. **Cheeseman C.** (2008) GLUT7: a new intestinal facilitated hexose transporter. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* **295**: E238-E241.
5. **Mavros Y, Simar D, Singh MA.** (2009) Glucose Transporter-4 expression in monocytes: a systematic review. *Diabetes Res Clin Pract.* **84**: 123-131.
6. **Wright EM, Turk E.** (2004) The sodium/glucose cotransport family SLC5. *Pflugers Arch.* **447**: 510-518.
7. **Wright EM, Hirayama BA, Loo DF.** (2007) Active sugar transport in health and disease. *J Intern Med.* **261**: 32-43.
8. **Williamson RC, Toye AM.** (2008) Glycophorin A: Band 3 aid. *Blood Cells Mol Dis.* **41**: 35-43.
9. **Satchwell TJ, Shoemark DK, Sessions RB, Toye AM.** (2009) Protein 4.2: a complex linker. *Blood Cells Mol Dis.* **42**: 201-210.
10. **Alper SL.** (1991) The band 3-related anion exchanger (AE) gene family. *Annu Rev Physiol.* **53**: 549-564.
11. **Jay DG.** (1996) Role of band 3 in homeostasis and cell shape. *Cell.* **86**: 853-854.
12. **Barzilai A, Rahamimoff H.** (1987) Stoichiometry of the sodium-calcium exchanger in nerve terminals. *Biochemistry.* **26**: 6113-6118.
13. **DiPolo R, Beaugé L.** (2006) Sodium/calcium exchanger: influence of metabolic regulation on ion carrier interactions. *Physiol Rev.* **86**: 155-203.
14. **Yang YC, Fann MJ, Chang WH, Tai LH, Jiang JH, Kao LS.** (2010) Regulation of sodium-calcium exchanger activity by creatine kinase under energy-compromised conditions. *J Biol Chem.* **285**(36): 28275-28285. doi: 10.1074/jbc.M110.141424.
15. **Ren X, Nicoll DA, Philipson KD.** (2006) Helix packing of the cardiac Na⁺-Ca²⁺ exchanger: proximity of transmembrane segments 1, 2, and 6. *J Biol Chem.* **281**: 22808-22814.
16. **Bers DM.** (2000) Calcium fluxes involved in control of cardiac myocyte contraction. *Circ Res.* **87**: 275-281.
17. **Engbers JD, Anderson D, Zamponi GW, Turner RW.** (2013) Signal processing by T-type calcium channel interactions in the cerebellum. *Front Cell Neurosci.* **7**: 230. DOI: 10.3389/fncel.2013.00230.
18. **Van Petegem F, Lobo PA, Ahern CA.** (2012) Seeing the forest through the trees: towards a unified view on physiological calcium regulation of voltage-gated sodium channels. *Biophys J.* **103**(11): 2243-2251. DOI: 10.1016/j.bpj.2012.10.020.
19. **Catterall WA.** (2012) Voltage-gated sodium channels at 60: structure, function and pathophysiology. *J Physiol.* **590**(Pt 11): 2577-2589. DOI: 10.1113/jphysiol.2011.224204.
20. **Li WG, Xu TL.** (2012) Emerging approaches to probing ion channel structure and function. *Neurosci Bull.* **28**(4): 351-374. DOI: 10.1007/s12264-012-1248-0.

21. **Findlay I.** (2004) Physiological modulation of inactivation in L-type Ca²⁺ channels: one switch. *J Physiol.* **554**(Pt 2): 275-283.
22. **Arnadóttir J, Chalfie M.** (2010) Eukaryotic mechanosensitive channels. *Annu Rev Biophys.* **39**: 111-137.
23. **Zeidel ML.** (2012) Water homeostasis: evolutionary medicine. *Trans Am Clin Climatol Assoc.* **123**: 93-105.
24. **Verkman AS.** (2011) Aquaporins at a glance. *J Cell Sci.* **124**: 2107-2112.
25. **Preston GM, Carroll TP, Guggino WB, Agre P.** (1992) Appearance of water channels in *Xenopus* oocytes expressing red cell CHIP28 protein. *Science.* **256**(5055): 385-387.
26. **Verkman AS, Mitra AK.** (2000) Structure and function of aquaporin water channels. *Am J Physiol Renal Physiol.* **278**(1): F13-28.
27. **Perez Di Giorgio J, Soto G, Alleva K, Jozefkiewicz C, Amodeo G, Muschietti JP, Ayub ND.** (2014) Prediction of Aquaporin Function by Integrating Evolutionary and Functional Analyses. *J Membr Biol.* **247**(2): 107-25. DOI: 10.1007/s00232-013-9618-8.
28. **Day RE, Kitchen P, Owen DS, Bland C, Marshall L, Conner AC, Bill RM, Conner MT.** Human aquaporins: Regulators of transcellular water flow. *Biochim Biophys Acta.* 2013 Sep 30. pii: S0304-4165(13)00435-2. doi: 10.1016/j.bbagen.2013.09.033. [Epub ahead of print] Accesibil la: <http://dx.doi.org/10.1016/j.bbagen.2013.09.033> (vizualizat în 21 decembrie 2013).
29. **Blanco G, Mercer RW.** (1998) Isozymes of the Na-K-ATPase: heterogeneity in structure, diversity in function. *Am J Physiol.* **275**(5 Pt 2): F633-F650.
30. **Blanco G.** (2005) Na,K-ATPase subunit heterogeneity as a mechanism for tissue-specific ion regulation. *Semin Nephrol.* **25**: 292-303.
31. **Axelsen KB, Palmgren MG.** (1998) Evolution of substrate specificities in the P-type ATPase superfamily. *J Mol Evol.* **46**: 84-101.
32. **Beggah AT, Jaunin P, Geering K.** (1997) Role of glycosylation and disulfide bond formation in the b subunit in the folding and functional expression of Na,K-ATPase. *J Biol Chem.* **272**: 10318-10326.
33. **Geering K.** (2008) Functional roles of Na,K-ATPase subunits. *Curr Opin Nephrol Hypertens.* **17**: 526-532.
34. **Füzesi M, Gottschalk KE, Lindzen M, Shainskaya A, Küster B, Garty H, Karlisch SJ.** (2005) Covalent cross-links between the gamma subunit (FXD2) and alpha and beta subunits of Na,K-ATPase: modeling the alpha-gamma interaction. *J Biol Chem.* **280**: 18291-18301.
35. **Lindzen M, Gottschalk KE, Füzesi M, Garty H, Karlisch SJ.** (2006) Structural interactions between FXD proteins and Na⁺,K⁺-ATPase: alpha/beta/FXD subunit stoichiometry and cross-linking. *J Biol Chem.* **281**: 5947-5955.
36. **Berl T.** (2009) How do kidney cells adapt to survive in hypertonic inner medulla? *Trans Am Clin Climatol Assoc.* **120**: 389-401.
37. **Faller LD.** (2008) Mechanistic studies of sodium pump. *Arch Biochem Biophys.* **476**: 12-21.
38. **Nelson N, Perzov N, Cohen A, Hagai K, Padler V, Nelson H.** (2000) The cellular biology of proton-motive force generation by V-ATPases. *J Exp Biol.* **203**(Pt 1): 89-95.
39. **Nakanishi-Matsui M, Sekiya M, Nakamoto RK, Futai M.** (2010) The mechanism of rotating proton pumping ATPases. *Biochim Biophys Acta.* **1797**: 1343-1352.
40. **Biemans-Oldenhinkel E, Doeven MK, Poolman B.** (2006) ABC transporter architecture and regulatory roles of accessory domains. *FEBS Lett.* **580**: 1023-1035.
41. **Oldham ML, Davidson AL, Chen J.** (2008) Structural insights into ABC transporter mechanism. *Curr Opin Struct Biol.* **18**: 726-733.
42. **Huang Y, Sadée W.** (2006) Membrane transporters and channels in chemoresistance and -sensitivity of tumor cells. *Cancer Lett.* **239**: 168-182.
43. **Oostendorp RL, Beijnen JH, Schellens JH.** (2009) The biological and clinical role of drug transporters at the intestinal barrier. *Cancer Treat Rev.* **35**: 137-147.
44. **Nagao K, Kimura Y, Mastuo M, Ueda K.** (2010) Lipid outward translocation by ABC proteins. *FEBS Lett.* **584**: 2717-2723.
45. **Tissières P, Pugin J.** (2009) The role of MD-2 in the opsonophagocytosis of Gram-negative bacteria. *Curr Opin Infect Dis.* **22**: 286-291.
46. **Yin J, Kuebler WM.** (2010) Mechanotransduction by TRP channels: general concepts and specific role in the vasculature. *Cell Biochem Biophys.* **56**(1): 1-18. doi: 10.1007/s12013-009-9067-2.
47. **Koyasu S.** (2010) Vanilloid flavor for a good appetite? *Nat Immunol.* **11**(3): 187-189. doi: 10.1038/nio310-187.
48. **Link TM, Park U, Vonakis BM, Raben DM, Soloski MJ, Caterina MJ.** (2010) TRPV2 has a pivotal role in macrophage particle binding and phagocytosis. *Nat Immunol.* **11**(3): 232-239. doi: 10.1038/ni.1842.

49. **de Almeida CJ, Linden R.** (2005) Phagocytosis of apoptotic cells: a matter of balance. *Cell Mol Life Sci.* **62**: 1532-1546.
50. **Elliott MR, Ravichandran KS.** (2010) Clearance of apoptotic cells: implications in health and disease. *J Cell Biol.* **189**: 1059-1070.
51. **Han CZ, Ravichandran KS.** (2011) Metabolic connections during apoptotic cell engulfment. *Cell.* **147**(7): 1442-1445. doi: 10.1016/j.cell.2011.12.006.
52. **Goldstein JL, Basu SK, Brunschede GY, Brown MS.** (1976) Release of low density lipoprotein from its cell surface receptor by sulfated glycosaminoglycans. *Cell.* **7**: 85-95.
53. **Goldstein JL, Brown MS.** (1976) The LDL pathway in human fibroblasts: a receptor-mediated mechanism for the regulation of cholesterol metabolism. *Curr Top Cell Regul.* **11**: 147-181.
54. **Brown MS, Ho YK, Goldstein JL.** (1976) The low-density lipoprotein pathway in human fibroblasts: relation between cell surface receptor binding and endocytosis of low-density lipoprotein. *Ann N Y Acad Sci.* **275**: 244-257.
55. **Pearse BM.** (1976) Clathrin: a unique protein associated with intracellular transfer of membrane by coated vesicles. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **73**: 1255-1259.
56. **Ungewickell E.** (1983) Biochemical and immunological studies on clathrin light chains and their binding sites on clathrin triskelions. *EMBO J.* **2**: 1401-1408.
57. **Popova NV, Deyev IE, Petrenko AG.** (2013) Clathrin-mediated endocytosis and adaptor proteins. *Acta Naturae.* **5**(3): 62-73.
58. **Anderson RG, Kamen BA, Rothberg KG, Lacey SW.** (1992) Potocytosis: sequestration and transport of small molecules by caveolae. *Science.* **255**: 410-411.
59. **Matsue H, Rothberg KG, Takashima A, Kamen BA, Anderson RG, Lacey SW.** (1992) Folate receptor allows cells to grow in low concentrations of 5-methyltetrahydrofolate. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **89**: 6006-6009.
60. **Anderson RGW.** (1998) The caveolae membrane system. *Annu Rev Biochem.* **67**: 199-225.
61. **Mineo C, Anderson RG.** (2001) Potocytosis. Robert Feulgen Lecture. *Histochem Cell Biol.* **116**: 109-118.
62. **Doherty GJ, McMahon HT.** (2009) Mechanisms of endocytosis. *Annu Rev Biochem.* **78**: 857-902.
63. **Hansen CG, Nichols BJ.** (2009) Molecular mechanisms of clathrin-independent endocytosis. *J Cell Sci.* **122**(Pt 11): 1713-1721.
64. **Grant BD, Donaldson JG.** (2009) Pathways and mechanisms of endocytic recycling. *Nat Rev Mol Cell Biol.* **10**: 597-608.
65. **Masilamani M, Peruzzi G, Borrego F, Coligan JE.** (2009) Endocytosis and intracellular trafficking of human natural killer cell receptors. *Traffic.* **10**: 1735-1744.
66. **Murphy JE, Padilla BE, Hasdemir B, Cottrell GS, Bunnett NW.** (2009) Endosomes: a legitimate platform for the signaling train. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **106**: 17615-17622.
67. **Barclay JW, Morgan A, Burgoyne RD.** (2005) Calcium-dependent regulation of exocytosis. *Cell Calcium.* **38**: 343-353.
68. **Mayer A.** (2002) Membrane fusion in eukaryotic cells. *Annu Rev Cell Dev Biol.* **18**: 289-314.
69. **Verhage M, Sørensen JB.** (2008) Vesicle docking in regulated exocytosis. *Traffic.* **9**: 1414-1424.
70. **Leabu M.** (2006) Membrane fusion in cells: molecular machinery and mechanisms. *J Cell Mol Med.* **10**: 423-427.
71. **Morgan A.** (1995) Exocytosis. *Essays Biochem.* **30**: 77-95.
72. **Jena BP.** (2012) Porosome: the secretory portal. *Exp Biol Med (Maywood).* **237**(7): 748-57. DOI: 10.1258/ebm.2012.012110.
73. **Jena BP.** (2009) Functional organization of the porosome complex and associated structures facilitating cellular secretion. *Physiology (Bethesda).* **24**: 367-376. doi: 10.1152/physiol.00021.2009.
74. **Jena BP.** (2008) Porosome: the universal molecular machinery for cell secretion. *Mol Cells.* **26**: 517-529.
75. **Jena BP.** (2004) Discovery of the Porosome: revealing the molecular mechanism of secretion and membrane fusion in cells. *J Cell Mol Med.* **8**: 1-21.
76. **Jena BP.** (2003) Fusion pore or porosome: structure and dynamics. *J Endocrinol.* **176**(2):169-174.
77. **Vardjan N, Jorgacevski J, Zorec R.** (2013) Fusion pores, SNAREs, and exocytosis. *Neuroscientist.* **19**(2): 160-174. DOI: 10.1177/1073858412461691.
78. **Simionescu N.** (1979) The microvascular endothelium. Segmental differentiation, transcytosis: selective distribution of anionic sites. În „*Advances in Inflammation Research*”. Editată de Gerald Weissmann, Bengt Samuelsson și Rodolfo Paoletti. Raven Press, New York, 1979, vol. I, pp. 61-70.
79. **Predescu SA, Predescu DN, Malik AB.** (2007) Molecular determinants of endothelial transcytosis and their role in endothelial permeability. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol.* **293**(4): L823-L842.

80. **Predescu SA, Predescu DN, Palade GE.** (1997) Plasmalemmal vesicles function as transcytotic carriers for small proteins in the continuous endothelium. *Am J Physiol.* **272**(2 Pt 2): H937-H949.
81. **Predescu DN, Neamu R, Bardita C, Wang M, Predescu SA.** (2012) Impaired caveolae function and upregulation of alternative endocytic pathways induced by experimental modulation of intersectin-1s expression in mouse lung endothelium. *Biochem Res Int.* 2012:672705. DOI: 10.1155/2012/672705.
82. **Solari R, Schaerer E, Tallichet C, Braiterman LT, Hubbard AL, Kraehenbuhl JP.** (1989) Cellular location of the cleavage event of the polymeric immunoglobulin receptor and fate of its anchoring domain in the rat hepatocyte. *Biochem J.* **257**(3): 759-768.
83. **Geuze HJ, Slot JW, Strous GJ, Peppard J, von Figura K, Hasilik A, Schwartz AL.** (1984) Intracellular receptor sorting during endocytosis: comparative immunoelectron microscopy of multiple receptors in rat liver. *Cell.* **37**: 195-204.
84. **Richardson JM, Kaushic C, Wira CR.** (1995) Polymeric immunoglobulin (Ig) receptor production and IgA transcytosis in polarized primary cultures of mature rat uterine epithelial cells. *Biol Reprod.* **53**: 488-498.
85. **Tuma PL, Hubbard AL.** (2003) Transcytosis: crossing cellular barriers. *Physiol Rev.* **83**: 871-932.
86. **Treyer A, Müsch A.** (2013) Hepatocyte polarity. *Compr Physiol.* **3**(1): 243-287. DOI: 10.1002/cphy.c120009.
87. **In J, Lukyanenko V, Foulke-Abel J, Hubbard AL, Delannoy M, Hansen AM, Kaper JB, Boisen N, Nataro JP, Zhu C, Boedeker EC, Girón JA, Kovbasnjuk O.** (2013) Serine protease EspP from enterohemorrhagic *Escherichia Coli* is sufficient to induce shiga toxin macropinocytosis in intestinal epithelium. *PLoS One.* **8**(7): e69196. DOI: 10.1371/journal.pone.0069196.