

2.1. Considerații generale asupra membranelor biologice (biomembranelor)

2.1.1. Definiția noțiunii de membrană celulară

Pentru ca o celulă să supraviețuiască și să-și desfășoare eficient activitatea trebuie să își asigure o independență relativă față de mediul înconjurător. Asta înseamnă că trebuie atât să-și protejeze structurile și echilibrele moleculare interne, cât să și fie capabilă să recepteze informații despre ce se întâmplă în jurul său, să le interpreteze și să își adapteze corespunzător comportamentul. Pentru rezolvarea acestor nevoi ale celulei trebuie să existe o componentă în organizarea celulei care să delimiteze și să protejeze celula de variațiile necontrolabile din mediu. Această componentă, acceptată intuitiv de multă vreme, a fost la început denumită **membrană plasmatică**. Noțiunea își are originea în lucrările lui **Wilhelm Friedrich Benedikt Hofmeister** (1824 – 1877) care, în 1867, a postulat că fiecare masă plasmatică este mărginită la suprafața exterioară de un strat subțire mai translucid, cu indice de refracție a luminii mai mare și cu densitate și tenacitate crescute. Hofmeister a numit această structură de mărginire ca "strat de piele" al protoplasmei (*Hautschicht*). Noțiunea de membrană plasmatică și caracterul său semipermeabil au început să fie menționate în manuale numai după studiile de osmolaritate ale botanistului, chimistului și farmacistului german **Wilhelm Friedrich Phillip Pfeffer** (1845 – 1920), respectiv de permeabilitate ale botanistului și geneticianului olandez **Hugo Marie de Vries** (1848 – 1935). O altă denumire sinonimă, sub care poate fi întâlnită ceea ce acum se numește membrană celulară este aceea de **plasmalemă**.

Am putea defini lapidar **membrana celulară** ca **acea ultrastructură, formată în principal din lipide polare și proteine, care separă, dar și unește celula cu mediul**. Se va vedea că pe măsură ce vom înainta în prezentarea organizării moleculare și a funcționării membranei celulare definiția se va încărca de semnificații. Este aici momentul să menționăm o convenție: vom numi ultrastructură în cursul acestui manual orice componentă supramoleculară din structurile vii, în acest context din celule, care nu poate fi observată la microscopul optic (a cărui putere de rezoluție este de $0,2\mu\text{m}$), ci doar la microscopul electronic. Așadar, convențional, în contextul biologiei celulare, numim ultrastructură orice element de organizare a celulelor, țesuturilor sau organelor care nu se poate observa decât la microscopul electronic, iar structură ceea ce se poate observa la microscopul optic. Membrana celulară și, în general, biomembranele, unde includem și endomembranele, au o grosime de $7\text{-}10\text{nm}$ ($0,007\text{-}0,01\mu\text{m}$), adică sunt de ~ 20 de ori mai subțiri decât o structură observabilă la microscopul optic.

O scurtă incursiune în istoria evoluției cunoștințelor despre organizarea moleculară a membranei celulare poate fi utilă formării gândirii științifice a tinerilor interesați să se îndrepte către cercetarea biomedicală.

2.1.2. Repere istorice în cunoașterea organizării membranei celulare

Prezența unei ultrastructuri care să învelească celula, pentru a o separa de mediu și a menține homeostazia internă, a fost intuită, așa cum am amintit mai sus, dinainte de a se cunoaște din ce este formată la nivel biochimic și cum este organizată pentru a îndeplini funcțiile de bază: separarea mediului intracelular de cel extracelular și permiterea interacțiunilor celulei cu mediul, fără de care nu ar fi posibilă supraviețuirea. Această intuire a reprezentat totodată o provocare pentru oamenii de știință din domeniu. După studiile de pionierat menționate mai sus, primul care a contribuit la obținerea unor informații utile în dezvoltarea

cunoștințelor despre natura (bio)chimică a membranei celulare a fost **Charles Ernest Overton**, care în 1899 [1] a raportat o serie de rezultate ce au arătat că permeabilitatea prin membrană a unor compuși chimici este cu atât mai ridicată cu cât solubilitatea lor în lipide este mai ridicată. Aceste rezultate au dus la ideea că lipidele sunt componente majore ale membranelor celulare. Experimentele au fost efectuate atât pe celule vegetale, cât și pe eritrocite, dovedindu-se că lipidele structurează membranele celulare indiferent de regnul căroră acestea aparțin. Acestei informații i s-au adăugat rezultatele studierii tipurilor de molecule din diverse organisme, care au dovedit că lipidele sunt de departe cele mai abundente molecule hidrofobe din sistemele celulare. Investigațiile asupra proprietăților fizice ale membranelor celulare au arătat că rezistența lor electrică sau capacitanța sunt în domeniile celor obținute în sisteme create prin folosirea lipidelor izolate.

Evidențierea de către **Irving Langmuir**¹ a faptului că lipidele amfifile întinse într-un film pe o suprafață apoasă se orientează cu capul polar către apă și cu părțile hidrofobe către aer, a reprezentat premiza unor experimente care au dus la aprofundarea cunoașterii modului de organizare a membranelor celulare. Aceasta pentru că, în 1925, medicul olandez **Evert Görter** (1881 – 1954) și asistentul său **Frank Grendel**, folosind tehnica lui Langmuir au descoperit că lipidele extrase din membrana eritocitară acoperă o suprafață dublă de monofilm, față de suprafața populației eritrocitare din care lipidele au fost extrase [2]. Ei au propus că lipidele sunt organizate în membranele celulare sub forma unui bistrat și pot fi considerați părinții actualului model de organizare a membranei celulare, pe care îl vom dezvolta și analiza detaliat ceva mai jos.

Următorul moment în înțelegerea organizării moleculare a membranei celulare a fost în 1935, când **James Frederic Danielli** (1911 – 1984) și **Hugh Davson** (1909 – 1996), ambii de la University College din Londra au stipulat că la nivelul membranelor trebuie să existe și proteine întrucât tensiunile superficiale de la suprafața unui bistrat lipidic sunt mult mai ridicate decât cele de la suprafața membranelor celulare. Adăugarea de proteine în mediul de formare a unui bistrat lipidic duce la scăderea tensiunilor superficiale. Pe baza acestor rezultate experimentale Danielli și Davson au propus *modelul „sandwich”* de organizare a membranei celulare conform căruia aceasta este formată dintr-un bistrat lipidic plasat între două straturi de proteine globulare.

Modelul Danielli-Davson a părut să fie confirmat de aspectul trilaminat evidențiat electrono-microscopic pentru membranele celulare (Fig. 2.1). Examinarea electrono-microscopică a membranelor într-o diversitate de celule și observația că toate arată la fel, l-a determinat pe **J. David Robertson** (1923 – 1995) să lanseze, în 1957, *modelul „unit membrane”*. Toate membranele se evidențiau ca două straturi (lamine) electrono-opace ce delimitau unul electrono-transparent. Modelul menținea ideea că membranele sunt alcătuite dintr-un bistrat lipidic plasat între două straturi proteice, iar observarea atentă sugera că proteinele din exterior sunt diferite de cele din interior [3].

Anii '60 – '70 ai secolului XX au reprezentat perioada unor dezvoltări care au dus în 1972 la elaborarea de către **Seymour Jonathan Singer** (n. 1924) și **Garth L. Nicolson** (n. 1943) a *modelului în mozaic fluid* de organizare a membranei celulare [4], model valabil și pentru endomembrane, adică pentru toate tipurile de biomembrane. Articolul care a introdus denumirea modelului a fost anticipat de o lucrare a celor doi, din noiembrie 1971, în care au definit principiile organizării moleculare a membranei celulare [5]. În conformitate cu acest model, formațiunea

¹ Irving Langmuir, chimist și fizician (1881 – 1957), a primit în 1932 Premiul Nobel în chimie pentru lucrările sale în chimia suprafețelor, așa cum a motivat juriul ("for his discoveries and investigations in surface chemistry").

de bază a unei membrane este un bistrat lipidic cu proprietăți fluide manifestate bidimensional, mozaicat cu proteine care fie sunt atașate de o parte sau de cealaltă a bistratului, fie sunt cufundate în acesta străbătându-l complet sau parțial.

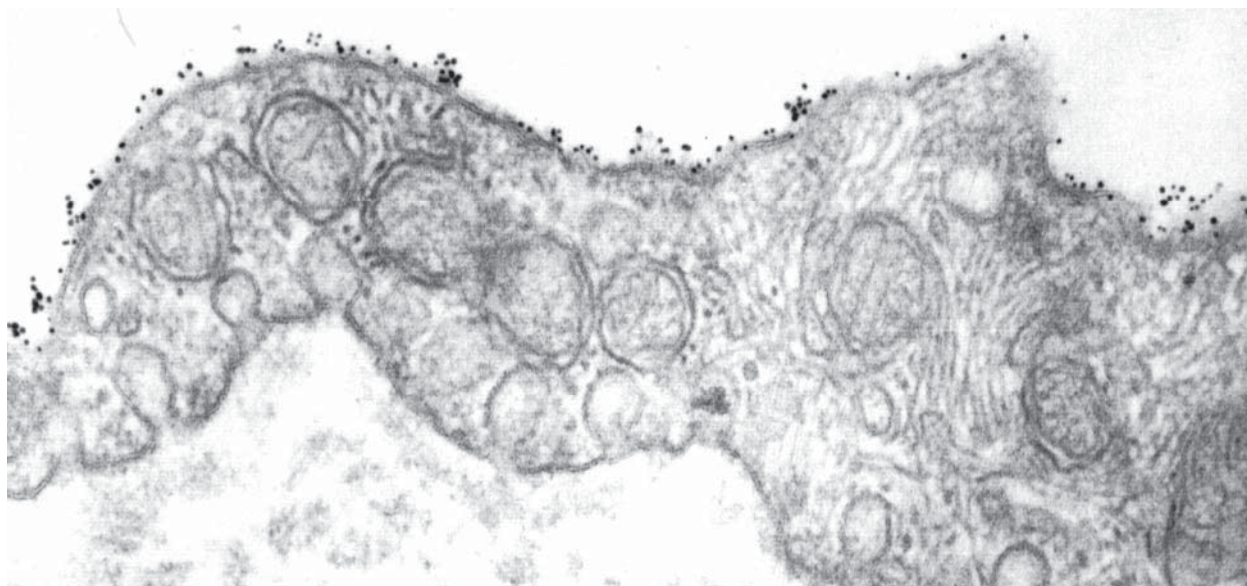


Fig. 2.1. Biomembranele (membranele celulare și endomembranele) se evidențiază în imaginile de microscopie electronică de transmisie ca ultrastructuri cu aspect trilaminat. Punctele negre de pe suprafața celulei reprezintă markeri electronodensși (aur coloidal cu diametrul de 5nm) pregătiți pentru evidențierea componentei glucidice a membranei. © Mircea Leabu, 2014.



Fig. 2.2. Imagine de microscopie electronică de transmisie pentru un preparat obținut prin tehnica de înghețare-fracturare. În jumătatea dreaptă a imaginii, unde fractura a trecut printre foițele bistratului lipidic al unei membrane celulare, se observă abundența de particule proteice care reprezintă proteine ce străbat complet structura lipidică de bază. (Imagine pusă cu amabilitate la dispoziție de Dr. Florea Lupu, University of Oklahoma Health Sciences Center.) © Florea Lupu, 2014.

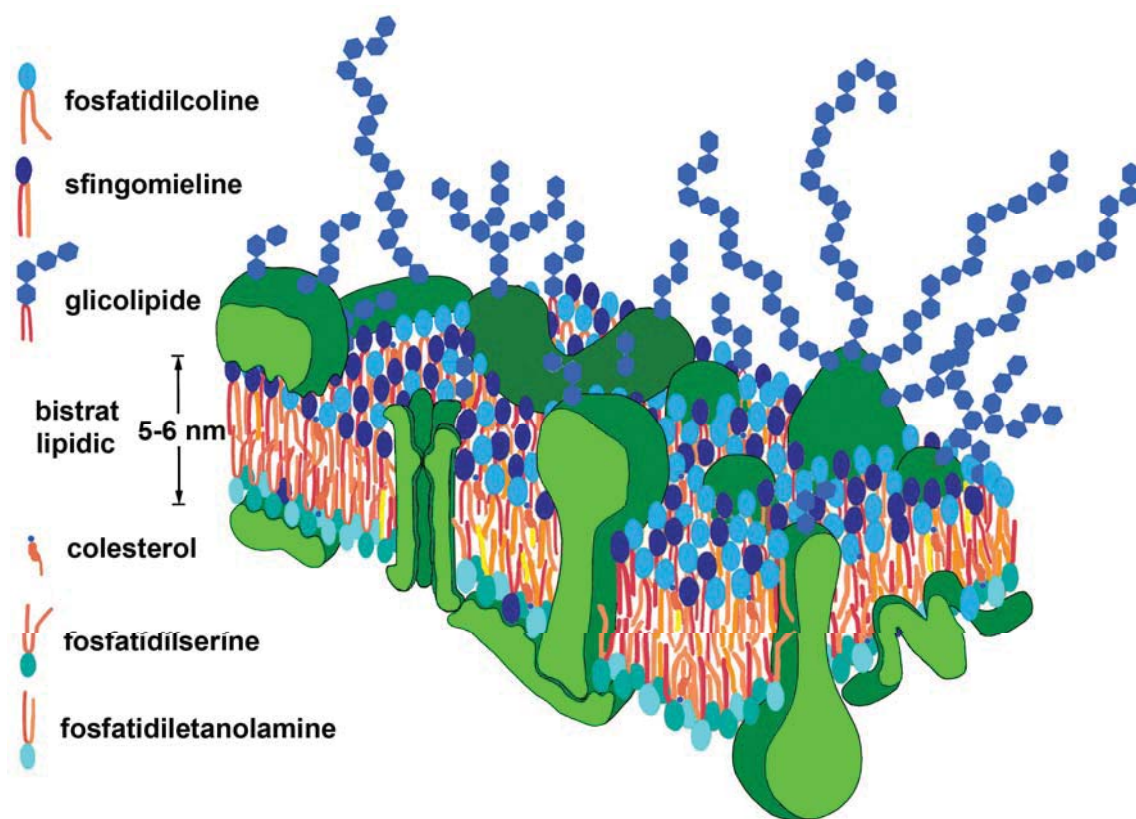


Fig. 2.3. O reprezentare la nivel molecular a organizării biomembranelor sub forma mozaicului fluid. Desenul sugerează diversitatea de componente (diferite lipide, variate proteine – în verde, multiple structuri glucidice – hexagoane albastre) care argumentează eterogenitatea organizării, ca și distribuția asimetrică a biomoleculelor la nivelul ultrastructurii. © Mircea Leabu, 2014.

Membranele, organizate în mozaic fluid (Fig. 2.3), se caracterizează prin eterogenitate compozițională (bazată pe o mare diversitate de tipuri de molecule ce intră în alcătuirea lor) și prin aranjare asimetrică (ce este conferită chiar de elementul de bază, bistratul lipidic, la nivelul căruia foița externă conține preponderent anumite tipuri de lipide, iar foița internă altele). Asimetria este sporită de proteinele ce completează organizarea membranelor, cele adsorbite pe fața externă fiind diferite de cele prezente pe fața internă, în timp ce proteinele cufundate în structura lipidică de bază expun porțiuni diferite ale lanțului polipeptidic de o parte sau de cealaltă a bistratului. Pe de altă parte, componenta glucidică a membranelor se găsește numai la suprafața acestora, crescând caracterul asimetric al organizării lor. În sfârșit, diversitatea de molecule care organizează membranele prezintă o permanentă dinamicitate, ceea ce le conferă un comportament fluid. Mai mult, mișcarea componentelor lipidice sau proteice se realizează aproape în exclusivitate în planul membranei, fără răsturnări spontane ale moleculelor care să permită trecerea lipidelor dintr-o foiță a bistratului în cealaltă, sau să permită proteinelor să treacă porțiunile expuse la exterior către interior, sau invers. Această mobilitate restricționată la mișcările în plan determină caracterul fluid manifestat bidimensional al membranelor. Toate aceste caracteristici, datorate comportamentului componentelor moleculare ale membranelor, se răsfrâng, într-un mod fericit, asupra funcționalității lor, așa cum se va vedea în detaliile de mai jos asupra organizării ultrastructurii care separă, dar și unește celula cu mediul înconjurător.

În ceea ce urmează ne propunem să abordăm organizarea moleculară și funcționarea membranei celulare parcurgând drumul de la molecule la o structură funcțională.

2.1.3. Compoziția chimică globală a membranei celulare

Pentru o abordare logică și angajarea în drumul pe care ni l-am propus, putem pleca de la ceea ce conține sub aspect chimic membrana celulară. În compoziția membranelor se află apă într-un procent de 20-30, restul de 70-80% fiind reziduu uscat. Cât privește compoziția acestui reziduu uscat, substanțele minerale sunt slab reprezentate (până la 1%), restul de 99% fiind substanțe organice, adică lipide 40-50%, proteine 50-60% și o componentă glucidică de până la 10%².

Compoziția chimică globală mai sus menționată poate părea contradictorie cunoștințelor noastre despre cantitatea de apă din sistemele biologice. Este corect, în sistemele biologice apa reprezintă aproximativ 70-80%, iar substanța uscată numai 20-30%. Care este logica acestei situații răsturnate? O putem înțelege plecând de la însăși definiția membranei celulare: ultrastructura care separă, dar și unește celula cu mediul.

Să dezvoltăm raționamentul. Ce caracter fizico-chimic are interiorul celular? Unul hidrofil. Apa este solventul biologic fără de care reacțiile biochimice care stau la baza proceselor celulare nu s-ar putea desfășura. Dar ce proprietăți fizico-chimice are mediul extracelular? Tot hidrofile. Așadar, membrana celulară trebuie să separe două medii hidrofile. Este de așteptat, în conformitate cu legile fizicii, ca o barieră eficientă între două medii hidrofile să aibă caracter hidrofob. Așa stând lucrurile, această ultrastructură cu caracter hidrofob trebuie să excludă masiv apa, de unde procentul redus de apă aflat la nivelul structurii membranelor. Așadar, soluția optimă s-a dovedit a fi o ultrastructură bazată pe lipide. Care sunt modalitățile de aranjare și rolurile lipidelor, proteinelor și componentei glucidice din organizarea moleculară a membranelor vom dezvolta în cele ce urmează, abordând pe rând aceste componente și având în minte, în permanență, modelul mozaicului fluid de organizare a ultrastructurii denumită membrană celulară.

Ceea ce mai putem menționa aici este faptul că așa cum se sugera din definiția noțiunii de membrană celulară aceasta trebuie să se comporte ca o barieră între mediile extracelular, respectiv intracelular, însă această barieră nu trebuie să fie una absolută ci selectivă, adică să permită interacțiunea celulei cu mediul. De aceea, putem afirma că membrana celulară trebuie să îndeplinească două mari categorii de funcții: **(i) funcție de barieră** (adică să nu permită trecerea întâmplătoare prin ea) și **(ii) funcție metabolică** (adică să asigure celulei schimburi de informație și de substanță cu mediul, în ambele sensuri: dinspre exterior spre interior și dinspre interior spre exterior).

Bibliografie selectivă

1. **Overton E.** (1899) Über die allgemeinen osmotischen Eigenschaften der Zelle, ihre vermutlichen Ursachen und ihre Bedeutung für die Physiologie. *Vierteljahrsschr. Naturforsch. Ges. Zürich* **44**: 88–114.
2. **Gortel E, Grendel F.** (1925) On bimolecular layers of lipoids on the chromocytes of the blood. *J Exp Med.* **41**, 439–443.
3. **Robertson JD.** (1957) New observations on the ultrastructure of the membranes of frog peripheral nerve fibers. *J Biophys Biochem Cytol.* **3**: 1043–8.
4. **Singer SJ, Nicolson GL.** (1972) The fluid mosaic model of the structure of cell membranes. *Science.* **175**: 720–31.

² Repartizarea procentelor între substanțele organice se raportează la totalul acestora; adică totalul lipide + proteine + glucide = 100%. Atragem atenția cititorilor că în toate situațiile în care se operează cu procente, acestea trebuie corect raportate la baza de referință.

5. **Singer SJ, Nicolson GL.** (1971) The structure and chemistry of mammalian cell membranes. *Am J Pathol.* **65**: 427-37.
6. **Steck TL, Weinstein RS, Straus JH, Wallach DF.** (1970) Inside-out red cell membrane vesicles: preparation and purification. *Science.* **168**: 255-7.
7. **Steck TL.** (1972) Selective solubilization of red blood cell membrane proteins with guanidine hydrochloride. *Biochim Biophys Acta.* **255**: 553-6.
8. **Steck TL.** (1974) The organization of proteins in the human red blood cell membrane. A review. *J Cell Biol.* **62**: 1-19.
9. **Marchesi SL, Steers E, Marchesi VT, Tillack TW.** (1970) Physical and chemical properties of a protein isolated from red cell membranes. *Biochemistry.* **9**: 50-7.
10. **Tillack TW, Marchesi SL, Marchesi VT, Steers E Jr.** (1970) A comparative study of spectrin: a protein isolated from red blood cell membranes. *Biochim Biophys Acta.* **200**: 125-31.
11. **Tillack TW, Marchesi VT.** (1970) Demonstration of the outer surface of freeze-etched red blood cell membranes. *J Cell Biol.* **45**: 649-53.
12. **Segrest JP, Jackson RL, Andrews EP, Marchesi VT.** (1971) Human erythrocyte membrane glycoprotein: a re-evaluation of the molecular weight as determined by SDS polyacrylamide gel electrophoresis. *Biochem Biophys Res Commun.* **44**: 390-5.
13. **Nicolson GL, Marchesi VT, Singer SJ.** (1971) The localization of spectrin on the inner surface of human red blood cell membranes by ferritin-conjugated antibodies. *J Cell Biol.* **51**: 265-72.
14. **Marchesi VT, Tillack TW, Jackson RL, Segrest JP, Scott RE.** (1972) Chemical characterization and surface orientation of the major glycoprotein of the human erythrocyte membrane. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **69**: 1445-9.
15. **Tillack TW, Scott RE, Marchesi VT.** (1972) The structure of erythrocyte membranes studied by freeze-etching. II. Localization of receptors for phytohemagglutinin and influenza virus to the intramembranous particles. *J Exp Med.* **135**: 1209-27.
16. **Segrest JP, Kahane I, Jackson RL, Marchesi VT.** (1973) Major glycoprotein of the human erythrocyte membrane: evidence for an amphipathic molecular structure. *Arch Biochem Biophys.* **155**: 167-83.

2.2. Lipidele membranare

2.2.1. Aspecte generale

Lipidele reprezintă 40-50% din materialul organic al membranelor. Sub aspect molecular ele constituie componenta biochimică de bază a membranelor celulare (raportul molecular lipide/proteine fiind de ~50/1).

Așa cum stipulează **modelul în mozaic fluid al organizării membranelor**, lipidele sunt organizate în membrane sub formă de bistrat, cu capetele hidrofile la exterior și cozile hidrofobe în interior, bistrat care prezintă proprietăți fluide, manifestate bidimensional. În bistrat lipidele au o distribuție (dispunere) asimetrică și sunt de o mare eterogenitate. Așadar, membranele celulare au la baza organizării lor un bistrat lipidic cu comportament fluid manifestat bidimensional, caracterizat prin asimetrie și eterogenitate.

În cele ce urmează vom căuta să argumentăm aceste afirmații de ordin general, detaliind aspectele legate de eterogenitatea lipidelor ce intră în componența membranelor, dispunerea lor asimetrică în cadrul bistratului și comportamentul lor fluid, manifestat bidimensional, cu scopul de a înțelege cum acestea asigură funcționarea membranelor. Informațiile se vor nuanța și ne vor ajuta să înțelegem mai bine cum operează membranele celulare, prin abordarea ulterioară a aspectelor legate de proteinele membranare ca și prin discutarea componentei glucidice a membranelor. De punctat că tot ce vom prezenta aici, în principiu, pentru organizarea și funcționalitatea membranei celulare se aplică și membranelor din interiorul celulelor, așa-numitele endomembrane, cele care structurează organele delimitate de membrane.

2.2.2. Definiția lipidelor membranare

În problema definirii lipidelor membranare, nu ne propunem un enunț cu valabilitate absolută. Intenția este de a formula o definiție operațională, pentru interesul nostru, astfel încât să avem aceeași percepție a noțiunii. Vom structura această definiție după modelul logic al definirii prin gen proxim și diferență(e) specifică(e)³.

³ Logica, știința care ne învață cum să gândim corect pe baza unor structurări raționale ale cunoștințelor, stabilește patru modalități de construcție a definițiilor pentru noțiuni (ființe, obiecte, fenomene). Aceste patru modalități conduc la patru tipuri de definiții care sunt: (i) **definițiile genetice (constructive)** prin care se indică modul în care a luat ființă noțiunea; (ii) **definițiile ostensive (demonstrative sau prin indicare)** prin care se enumeră câțiva dintre membrii (preferabil reprezentativi) clasei din care face parte noțiunea de definit; (iii) **definițiile enumerative** prin care se enumeră toți membrii clasei; (iv) **definițiile prin gen proxim și diferență(e) specifică(e)** prin care, mai întâi se stabilește o categorie mai largă de noțiuni căreia îi aparține și cea pe care dorim să o definim (genul proxim), după care se identifică și se enumeră atâtea caracteristici, specifice noțiunii pe care urmărim să o definim, câte sunt necesare pentru o extragere fără ambiguități din genul proxim și pentru definirea clară.

Pentru extinderea demersului intelectual al acestei note de subsol, să exemplificăm cu definiții pentru fiecare tip din cele patru.

În privința definițiilor genetice am putea propune una pentru ce este România și vom spune: România este o țară europeană formată printr-un proces îndelungat de unire a unor țări medievale mici, mai întâi a Moldovei cu Țara Românească, în a doua jumătate a secolului al XIX-lea, proces finalizat prin adăugarea Ardealului și Basarabiei la sfârșitul primului război mondial.

Ca exemplu de definiție ostensivă să încercăm aplicarea la Oceania, spunând: Oceania este o regiune de insule din Oceanul Pacific între care se află Papua Noua Guinee, Insulele Marshall, Samoa, Noua Zeelandă.

Definiția enumerativă o putem exemplifica pentru țările scandinave și vom putea spune: Țările scandinave sunt Norvegia, Suedia, Finlanda și Danemarca.

Nu vom da exemplu de definiție prin gen proxim și diferență(e) specifică(e), deoarece folosim metoda în text la definirea lipidelor membranare, dar vom remarca faptul că toate celelalte tipuri de definiții se adresează, de regulă, unor inițiați (în istorie sau geografie pentru exemplele folosite), pe când tipul de definiție ce face subiectul acestei fraze este unul instructiv, care poate ajuta înțelegerea și unora mai puțin sau deloc inițiați. Definiția cu gen proxim și diferențe specifice este cel mai des utilizată în științe, dacă nu în exclusivitate. Prin acest tip de definiție se pot defini chiar și obișnuințele, despre care tot știința logicii ne spune că sunt greu de definit. Condiția este ca cel care definește să cunoască foarte bine ceea ce trebuie să definească. Pentru cei care sunt instruiți, acest tip de

Lipidele membranare reprezintă o categorie largă de substanțe organice relativ insolubile în apă, solubile în cei mai mulți solvenți organici, cu caracter amfifil, multe dintre ele fiind esteri ai unor alcooli polihidroxilici cu acizi grași (acizi carboxilici cu lanț alifatic liniar, adică o catenă liniară conținând mai mulți atomi de carbon).

Se observă că, din punct de vedere al structurii chimice, definiția este foarte cuprinzătoare sub aspectul speciilor moleculare pe care le poate include. Să nu uităm, însă, că interesul nostru este de natură biologică, așa că, privind din această perspectivă, mai multe întrebări pot frământa dorința de a pătrunde logic domeniul. Care ar fi acestea?

1. De ce lipide (în elementul de bază al organizării biomembranelor care este bistratul lipidic)?
2. Care dintre lipide (participă la organizarea membranelor)?
3. De ce (dispunere în) bistrat?

Să luăm pe rând aceste întrebări și să punctăm aspecte care să ne ajute în a găsi răspunsuri, cu răsfrângere asupra înțelegerii funcționalității membranelor.

2.2.3. Descrierea lipidelor membranare și caracterizarea bistratului lipidic

2.2.3.1. Lipidele sunt componente ideale pentru structurarea membranelor

Această secțiune își propune să răspundă la prima întrebare din cele de mai sus: de ce lipide? Caracterele fizico-chimice ale lipidelor le definesc drept molecule ideale pentru structurarea de membrane, a căror principală menire este aceea de a separa două compartimente apoase (interiorul celulelor de mediul înconjurător). De ce le definesc drept molecule ideale? Pentru că structura chimică și caracterul lor amfifil induce proprietăți amfipate arhitecturii pe care o organizează, partea hidrofobă putând crea o barieră, iar partea hidrofilă conferind capacitatea de a acomoda mediile apoase aflate de o parte și de cealaltă, adică interiorul, respectiv exteriorul celulei.

Lipidele sunt molecule mici cu posibilități mari de mobilitate, astfel încât structurile pe care le pot asambla nu sunt rigide (acest lucru reprezentând un avantaj pentru biomembrane). Sunt molecule relativ insolubile în medii apoase, prezentând tendința de asociere spontană, ceea ce conferă structurilor pe care le formează tenacitatea de a-și păstra integritatea sau de a se reface rapid, atunci când sunt agresate mecanic. Tendința spontană de asociere implică un consum energetic minim în păstrarea integrității bistratului, ceea ce reprezintă un avantaj în economia celulară. Deși sunt molecule mici, structura lor este deosebit de complexă (chiar numai rememorând definiția, dar și, cum se va vedea în cele ce urmează, când vom răspunde întrebării “Care dintre lipide?”). Vom vedea că această complexitate chimică este exploatată judicios de celulă (vezi la secțiunea despre rolul lipidelor membranare). Dacă ar fi să punctăm, pentru început, avantajele ce rezultă în privința structurării membranelor, notăm că defectele, ce ar putea apărea în structura chimică a lipidelor membranare sau în organizarea bistratului, sunt ușor de acceptat și, ulterior, de corectat, fără a induce efecte biologice catastrofale (caracterul amfifil nu se pierde). Mai mult, modelarea structurală a lipidelor, după cum va reieși mai jos (vezi la secțiunea despre rolul lipidelor membranare), care se face printr-un bagaj enzimatic adecvat, consistent și bine elaborat, folosește integrării celulei în contextul biologic în care se află și funcționează.

definiție este elocvent din punct de vedere formator, deoarece creează o imagine sugestivă pentru obiectul, noțiunea sau fenomenul care se definește.

2.2.3.2. Clasificarea lipidelor membranare

Prin ceea ce vom include în răspunsul la întrebarea: “care dintre lipide?” vom argumenta caracterul eterogen al organizării moleculare a membranelor celulare.

Biochimia descrie o mare diversitate de clase de lipide, grupate în două mari categorii: lipide complexe, caracterizate prin prezența în structura lor a acizilor grași (acilgliceroli, fosfogliceride, sfingolipide, ceruri) și lipide simple (steroizi, prostaglandine și terpene). Ne putem întreba, pe bună dreptate, dacă toate aceste clase de lipide pot fi întâlnite în structura membranelor celulare. Ei bine, răspunsul este: NU! În membranele celulare întâlnim numai trei tipuri de lipide pe care le putem clasifica, în funcție de structura lor chimică globală, în: (1) **fosfolipide**, (2) **colesterol** și (3) **glicolipide**.

Enumerarea este în funcție de abundența în care apar. Fosfolipidele reprezintă 70-75% dintre lipidele membrane, colesterolul 20-25%, iar glicolipidele 1-10%. O mențiune de făcut, în legătură cu glicolipidele din membranele celulelor animale, este aceea că ele sunt din clasa sfingolipidelor (vezi despre sfingolipide mai jos, la clasificarea în funcție de poliolul din structură). Iată, în această primă clasificare a lipidelor membranare, o primă dovadă a eterogenității lipidelor membranare.

Ideea de eterogenitate a lipidelor membranare sporește, însă, dacă ne-am propune să abordăm chiar și numai complexitatea tipurilor de lipide din clasa fosfolipidelor, cele mai bine reprezentate lipide din membranele celulare, sub aspectul abundenței. Acestea se pot clasifica, în funcție de poliolul din structură în:

- (i) **fosfogliceride (glicerofosfatide)** – dacă poliolul este glicerină (un triol);
- (ii) **fosfosfingozide (sfingofosfatide, sau simplu sfingozide)** – dacă poliolul este sfingozină, de fapt un aminodiol cu un lanț alifatic (acesta constituie unul din lanțurile alifactice ale cozii hidrofobe, cel de al doilea fiind un acid gras inserat printr-o legătură amidică la gruparea amino a sfingozinei).

Dar eterogenitatea fosfolipidelor membranare nu se termină aici. Ea se nuanțează prin analiza detaliilor referitoare la structura lor chimică. În cele ce urmează, vom discuta despre eterogenitatea structurală a fosfogliceridelor, dar menționăm că unele aspecte se extind și asupra sfingozidelor.

Structura de principiu a unui fosfoglicerid este reprezentată grafic, în mod intuitiv, în Fig. 2.4. Se observă că pe scheletul polialcoolului (glicerina) se află grefate pe de o parte (la hidroxilii din pozițiile 1 și 2) două lanțuri alifactice provenind de la acizii grași esterificați cu grupările hidroxil (acestea formând coada hidrofobă a lipidului membranar), iar, pe de altă parte (la hidroxilul din poziția 3), o moleculă, notată simbolic cu X (variabilă), atașată prin intermediul unei grupări fosfat, împreună formând partea esențială a capului hidrofil al fosfolipidului.

În funcție de compusul hidrofil, variabil X, fosfogliceridele se împart în:

- (i) **fosfatidilcoline** (prescurtare internațională **PC**, denumire uzuală **lecitină**), când X este colină (Fig. 2.5);
- (ii) **fosfatidiletanolamine (PE)**, X fiind etanolamină;
- (iii) **fosfatidilserine (PS)**, la care X este serină;
- (iv) **fosfatidilinozitol (PI)**, în care X este inozitol;
- (v) **acid fosfatidic (PA)**, cu X-ul fiind, simplu, un atom de hidrogen.

Fosfolipidele enumerate mai sus se află în diferite proporții în membranele diverselor celule, deși există date care le clasifică în anumite intervale de abundență, cum se va menționa puțin mai jos. Celula controlează aceste rapoarte între cantitatea de diferite fosfolipide în membrane în funcție de nevoile ei, în diferitele situații concrete în care se poate afla.

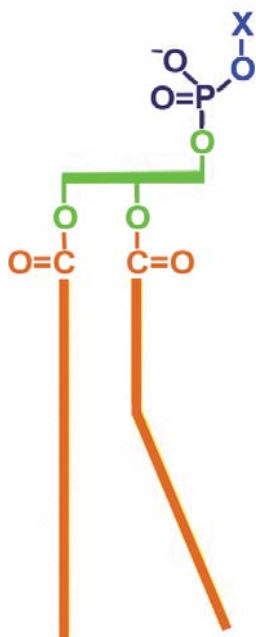


Fig. 2.4. Structura schematică, de principiu, a unui fosfoglicerid. În verde este reprezentat miezul glicerolului; în cafeniu sunt reprezentate lanțurile alifatiche ale acizilor grași; cu X, în albastru, este reprezentată partea variabilă din capul hidrofil.

Echivalentul fosfatidilcolinelor pentru sfingofosfolipidele membranare sunt **sfingomielinele (SM)**. De amintit aici (pentru sporirea ideii de eterogenitate a fosfolipidelor membranare) și două tipuri de fosfolipide "neuzuale": **1)** fosfolipidele în care două molecule de acid fosfatidic sunt condensate la hidroxilii laterali ai unei a treia molecule de glicerină, formând **cardiolipine (1,3-difosfatidil-gliceroli)**, fosfolipide specifice membranei mitocondriale interne; **2)** fosfolipidele echivalente fosfatidilcolinelor sau fosfatidiletanolaminelor, care în poziția 1 a glicerinei au eterificat un alcool gras nesaturat cu dubla legătură între C1 și C2, numite **plasmalogene** și reprezentând ~10% dintre fosfolipide în creier, mușchi, testicul, rinichi. De remarcat că în mușchiul cardiac nivelul plasmalogenelor ajunge la 50%, speculându-se că ar putea proteja miocardul față de efectul speciilor reactive de oxigen de tipul oxigenului singlet.

Cât privește abundența sub care tipurile de fosfolipide apar în organizarea bistratului, PC, SM, PE și PS sunt majoritare, reprezentând fiecare, în medie, dacă ar fi să calculăm considerând toate membranele despre care avem date, între 20 și 25%. PI și PA sunt fosfolipide mai slab reprezentate, însemnând până la 10-15% primul, respectiv 1-2% cel de-al doilea; în ciuda acestui fapt (sau poate tocmai de aceea) aceste două fosfolipide sunt implicate în procese celulare deosebit de importante (vezi la rolul lipidelor membranare). Dincolo de aceste valori medii, mai ușor de reținut, abundența fiecărui tip de fosfolipid în diversele biomembrane variază, însă, în limite destul de largi [1].

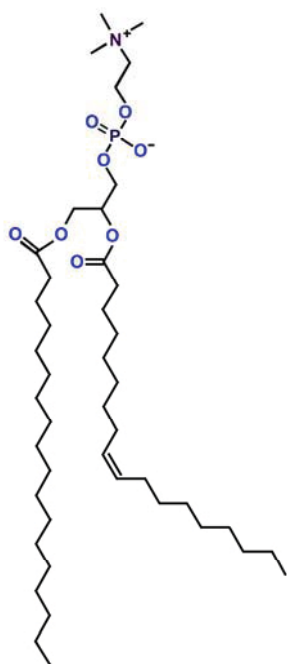


Fig. 2.5. Structura unei fosfatidilcoline (1-stearil-2-oleil-fosfatidil-colină). Lecitina, denumirea uzuală a acestui fosfoglicerid, vine de la cuvântul **λέκιθος (lekithos)**, care în limba greacă înseamnă gălbenuș de ou, întrucât acesta are un conținut foarte bogat în lecitină.

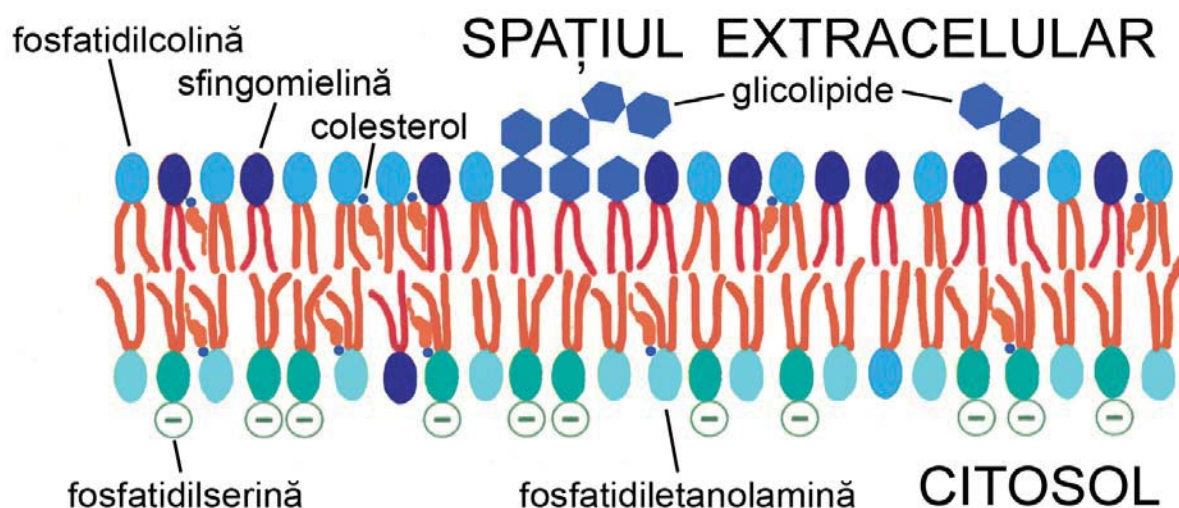


Fig. 2.6. Lipidele membranare în foilele bistratului. Este evidențiată diversitatea și distribuția diferențiată între cele două foile ale bistratului, inducând membranelor caracterul eterogen și asimetric.⁴ Această reprezentare simbolică a bistratului lipidic și tipurilor de lipide membranare va fi utilizată în figurile din carte ori de câte ori este nevoie. © Mircea Leabu, 2014.

După prime argumente referitoare la eterogenitatea lipidelor membranare, aduse până în acest moment, ne aflăm acum în situația de a putea puncta aspecte legate de dispunerea asimetrică a fosfolipidelor în biomembrane (Fig. 2.6). Experimental s-a dovedit că PC și SM sunt preponderent distribuite în foia externă a bistratului, în timp ce PE este preponderent distribuită în foia internă, iar PS și PI sunt, după datele existente până în prezent, aproape exclusiv în foia internă, în condiții normale [2]. Mai mult, apariția PS în foia externă a bistratului reprezintă o dovadă timpurie a intrării celulei într-un proces apoptotic [3-5]. De asemenea, activarea plachetelor sanguine este însoțită de apariția PS în foia externă a bistratului lipidic membranar [6]. Colesterolul este, în general, egal distribuit între ambele foile ale bistratului, deși anumite situații pot determina o redistribuire asimetrică a sa. Glicolipidele se află numai în foia externă a bistratului lipidic. De curând, distribuția asimetrică a fosfolipidelor bistratului lipidic membranar a început să fie investigată în contextul anumitor patologii [7, 8], afectarea ei fiind însoțită de defecte în funcționarea normală a celulelor.

Ideea eterogenității fosfolipidelor membranare este argumentată și de diversitatea tipurilor de acizi grași care intră în structura lor. Aceștia au un număr par de atomi de carbon cuprins între 12 și 24 (C_{12} - C_{24}), deși limitele valorilor menționate sunt controversate, în sensul că ar fi prea largi pentru cea inferioară și că ar fi mai precaut să considerăm cifra 14 ca adevărată. La acizii grași cu mai puțin de 12 atomi de carbon, solubilitatea în apă a lipidelor pe care aceștia le formează crește prea mult, ceea ce poate afecta integritatea bistratului și rolul de barieră al acestuia. Acizii grași cu mai mult de 24 de atomi de carbon în moleculă sporesc prea mult hidrofobitatea lipidelor și îngroașă bistratul reducând eficiența sub aspectul proprietăților de permeabilitate selectivă și îi reduc fluiditatea, prin creșterea interacțiunilor la nivelul coștilor hidrofobe. Așadar, din motive de eficiență în funcționarea membranelor acizii grași evidențiați a structura lipidele membranare conțin între 12(14) și 24 de atomi de carbon. Ei pot fi acizi grași saturați sau

⁴ Există între profesioniștii domeniului o convenție ca atunci când în desene, scheme sau imagini de microscopie electronică se prezintă porțiuni din membranele celulare spațiul extracelular să se așeze sus (către nord), iar citosolul jos (către sud). Vom respecta în carte această convenție.

nesaturați, cu catena hidrocarbonată neramificată. În ceea ce privește poziționarea acizilor grași în structura glicerofosfatidelor putem face următoarele afirmații:

1. În poziția 1 a glicerinei, de regulă, se află esterificat un acid gras saturat. Cei mai des întâlniți sunt (i) C_{14} , **acidul miristic**, (ii) C_{16} , **acidul palmitic** și (iii) C_{18} , **acidul stearic**. O ordine a frecvenței sub care apar ar fi: $C_{16} > C_{18} > C_{14}$.
2. În poziția 2 a glicerinei, de regulă, este esterificat un acid gras nesaturat. Cei mai des întâlniți sunt (i) $C_{18:1}$,⁵ **acidul oleic**, (ii) $C_{18:2}$, **acidul linoleic** și (iii) $C_{18:3}$, **acidul linolenic**. Trebuie să amintim aici, pentru rolul său deosebit de important (vezi “Rolul lipidelor membranare”), **acidul arahidonic** sau **acidul eicosatetraenoic** ($C_{20:4}$).

De menționat, în încheierea acestui comentariu, că acizii grași din sfingolipide sunt, de regulă, saturați.

Înainte de a trece la aspecte mai detaliate asupra organizării lipidelor la nivelul membranelor și cum aceasta se răsfrânge asupra comportamentului bistratului lipidic și funcționalității sale, merită de punctat, pentru o ultimă argumentare a amplei eterogenități a lipidelor membranare, faptul că, luând în considerare cele două poziții de esterificare și doar cei 20 de acizi grași mai des întâlniți, numărul diverselor entități moleculare din fiecare tip de fosfolipid (PC, PE, PS, PI, SM) poate atinge valoarea de 400. Bineînțeles că aceste valori teoretice nu se regăsesc în realitate dintr-o multitudine de motive de constrângere specifice sistemelor biologice.

2.2.3.3. Structura de bistrat rezolvă dezideratul esențial al organizării membranei

Vom încerca să precizăm aici câteva argumente logice pentru a răspunde întrebării „De ce bistrat?”. Bistratul este cea mai simplă formă de organizare a lipidelor care poate închide un volum mare de mediu hidrofil, spre a-l separa de un altul, tot hidrofil (capetele hidrofile la exterior, putând acomoda cele două medii hidrofile; cozile hidrofobe în interior, în adâncimea structurii, conferind rolul de barieră). Așadar, bistratul este o formă de organizare a lipidelor amfifile care poate corespunde dezideratelor celulelor de a fi separate de mediul înconjurător și de a-și menține într-o manieră eficientă homeostazia internă.

Asamblarea în bistrat se poate face spontan, fiind deci favorizată energetic, iar bistratul nu poate prezenta, din considerente termodinamice, capete libere. Acest lucru conferă membranelor tenacitate în păstrarea integrității structurale și capacitate de refacere rapidă chiar în cazul unor distrugerii datorate agresiunilor mecanice.

Organizarea sub formă de bistrat și dispunerea asimetrică a componentelor acestuia conferă proprietăți fizico-chimice diferite celor două fețe ale membranei; mai mult, asigură comportament independent celor două fețe ale membranei, dar și solidar, atunci când nevoile celulei o cer, aceasta având căile de a controla comportamentul (independent sau solidar) al componentelor membranare.

2.2.3.4. Starea fizică a bistratului lipidic

Discuția asupra stării fizice a bistratului lipidic își propune să ne dea o imagine intuitivă privind efectele comportamentului bistratului asupra funcționării

⁵ În simbolistica notărilor abreviate ale acizilor grași, prima cifră din indicele inferior reprezintă numărul de atomi de carbon din moleculă, „:” reprezintă simbolul pentru prezența dublelor legături, iar cifra a doua reprezintă numărul de duble legături din moleculă. În biochimie notațiile pot fi mult mai detaliate pentru indicarea suplimentară a poziției dublelor legături în lanțul alifatic, însă, în economia discuției noastre și în înțelegerea implicațiilor biologice, aceste detalii nu sunt semnificative. Totuși, variabilitatea poziționării dublelor legături în acizii grași nesaturați reprezintă un argument suplimentar al eterogenității lipidelor membranare (în special pentru fosfolipide).

membranelor. Bistratul lipidic este fluid, adică într-o continuă dinamică, aceasta având efect asupra interrelațiilor dintre moleculele care îl compun, interrelații care sunt într-o permanentă modificare. Fluiditatea bistratului lipidic este o rezultantă a diverselor posibilități de mișcare a lipidelor ce îl alcătuiesc. În ce constă această diversitate? Lipidele membranare pot executa următoarele tipuri de mișcări:

1. **Mișcări intramoleculare**, pe care lipidele le realizează în raport cu propria lor structură (în raport cu propria lor axă, în raport cu propria lor geometrie), spațiul ocupat de ele putând fi aproximat cu un cilindru având o bază cu suprafața de $\sim 60 \text{ \AA}^2$ (rază de $\sim 4.4 \text{ \AA}$) și o înălțime de $\sim 30 \text{ \AA}$. Aceste mișcări intramoleculare pot fi:

- De **rotație**, cu o frecvență de 10^9 rotații/s; aceste mișcări izvorăsc din capacitatea lanțurilor acizilor grași de a se roti în jurul legăturilor C-C, însoțită de vibrația atomilor de carbon angajați în legătură, iar aceste mișcări se răsfrâng asupra comportamentului întregii molecule, prin cuplurile de forțe pe care le induc; rezultanta acestui „zbucium” intern molecular este mișcarea de rotație a moleculei lipidice în ansamblu.
- De **flexie** a cozilor hidrofobe, cu o frecvență de 10^8 flexii/s; aceste mișcări trebuie înțelese tot ca rezultat al mișcărilor din interiorul moleculelor de lipid, la nivelul cozilor hidrofobe ale acizilor grași nesaturați, care, din cauza împiedicărilor datorate prezenței celui alt acid gras din structură, nu pot executa, de regulă, decât mișcări asemănătoare ștergătorului de parbriz, deși mobilitatea celui alt lanț, saturat, poate permite chiar rotații complete; efectul la nivelul întregii molecule este acela al mișcării de flexie a cozii.

2. **Mișcări intermoleculare**, care implică schimbarea poziției moleculelor de lipid unele în raport cu altele. Acestea pot fi:

- Mișcări de **translație (difuzie laterală)**, mișcări ale lipidelor în planul membranei, în aceeași foiță a bistratului, unele printre altele; dinamicitatea acestei mișcări este sugerată de frecvența schimbărilor de direcție, care este de 10^7 /s, distanța parcursă de un lipid în unitatea de timp neavând o semnificație biologică majoră. Trebuie menționat faptul că prezența colesterolului în bistrat determină o diminuare a mobilității laterale.
- Mișcări **“flip-flop”**, denumite astfel prin termenul importat din limba engleză, adică mișcări de trecere a lipidelor dintr-o foiță a bistratului în cealaltă; aceste mișcări presupun o răsturnare a moleculei în planul membranei, pentru a-și păstra capul hidrofil la exteriorul structurii, adică trecerea capului hidrofil prin porțiunea hidrofobă a membranei; frecvența acestor mișcări este foarte mică, practic nulă (dacă ar fi să riscăm o cifră, am putea spune că această mișcare ar putea avea loc o dată pe lună pentru fiecare moleculă individuală), ceea ce pare logic; există totuși o endomembrană la nivelul căreia mișcarea de “flip-flop” are loc frecvent și anume membrana reticulului endoplasmic (aspecte ce vor fi detaliate în capitolul “Biogeneza și traficul intracelular al membranelor” din volumul al II-lea al cărții).

Valorile pentru frecvențe, mai sus menționate, sunt rezultatul unor măsurători fizice pe bistraturi artificiale. În membranele celulare și în biomembrane, în general, mișcările lipidelor nu se supun legilor mișcării browniene, ci sunt mai reduse, fiind limitate de organizarea moleculară complexă și de ultrastructurile proteice corticale, aflate în spațiul citosolic de sub membrane [9].

Revenind la tema acestei secțiuni, să punctăm că absența practică a mișcărilor “flip-flop” explică bidimensionalitatea stării fluide a bistratului lipidic, elementul de bază din organizarea membranelor celulare. Mișcările lipidelor se manifestă practic numai în cadrul aceluiași strat al bistratului. De asemenea, frecvența extrem de redusă a mișcărilor “flip-flop” are ca efect menținerea distribuției asimetrice a

moleculelor de lipide între cele două straturi, distribuție construită de celulă cu mare consum energetic odată cu biogeneza *de novo* a membranelor (vezi la “Biogeneza membranelor” în volumul al II-lea). Manifestarea bidimensională a fluidității bistratului lipidic dă membranei celulare caracterul de structură cu **proprietăți mezomorfe**, proprietăți specifice cristalelor lichide. Acest comportament mezomorf este accentuat de capacitatea lipidelor de a organiza **microdomenii** bogate în sfingolipide (parte dintre ele glicolipide), colesterol și anumite proteine membranare. Aceste microdomenii sunt denumite “**plute lipidice**” (în englezește “**lipid rafts**”) și au deosebită importanță atât structurală (organizează ultrastructuri specializate ale membranei, cum ar fi **caveolele**), cât și metabolică ținând laolaltă molecule și macromolecule destinate a funcționa împreună în complexe supramoleculare [10]. Pentru a înțelege mai bine organizarea microdomeniilor de membrană, să menționăm că lipidele, așa cum nu sunt echilibrat repartizate între cele două foițe ale bistratului, nu sunt omogen amestecate nici în cadrul fiecărei foițe a bistratului, ci se asociază într-un mod neomogen pe baza unor considerente fizico-chimice. Plutele lipidice fie planare, fie invaginate sub forma caveolelor (numite vezicule plasmalemale în celula endotelială) se caracterizează printr-o fluiditate mai mică în comparație cu restul bistratului. Prezența plutele lipidice și eterogenitatea lor susțin și nuanțează ideea de organizare a membranelor ca un mozaic fluid. Plutele lipidice pot fi asemuite unor sloiuri de forme, dimensiuni și compoziție biochimică variate, ce plutesc în oceanul lipidic mai puțin specific organizat. Caveolele reprezintă o formă de plute lipidice, ce se dispun individual sau în ciorchini la nivelul membranei.

Eterogenitatea plutele lipidice a fost evidențiată prin interpretarea rezultatelor diferitelor metode de obținere sau de studiu:

- diverși detergenți neionici utilizați (duc la fracțiuni cu compoziție diferită);
- sonicarea preparatelor de membrane și analizarea fracțiunii ușoare (alte rezultate);
- analize imunocitochimice (diferite încărcături proteice la nivelul diverselor microdomenii reprezentate de plutele lipidice).

Deși rezultatele experimentale sunt, în anumite limite, variate, sugerând diversitatea compozițională a plutele lipidice, se pot extrage, totuși, câteva caracteristici generale [10]:

- colesterolul este de 3-5 ori mai abundent decât în restul membranei și reprezintă 33-50% din totalul lipidelor la acest nivel;
- sfingolipidele (SM și glicolipidele) sunt îmbogățite și reprezintă 30-35% dintre lipidele din plute;
- glicerofosfolipidele sunt sărac reprezentate (în comparație cu restul membranei); $\leq 30\%$ pentru PC + PE, față de $\sim 50\%$ în restul membranei;
- lipidele specifice foiței interne a bistratului (PS, PI) sunt slab reprezentate la nivelul plutele lipidice;
- în foița internă de la nivelul plutele, lipidele conțin preferențial acizi grași saturați (prin aceasta, s-ar putea realiza necesarul de rigiditate corespunzător celui al foiței externe, unde sfingolipidele, conținând acizi grași saturați, sunt bogat reprezentate).

Anticipând, vom menționa aici că plutele lipidice se caracterizează și prin capacitatea de a aglomera anumite tipuri de proteine membranare. Așadar, repetăm pentru reținerea mai atentă, organizarea lipidelor membranare în microdomenii accentuează aspectul de mozaic fluid al membranelor (ca niște sloiuri plutind în bistrat). Conceptul de plută lipidică este într-o continuă dezvoltare [11].

În ciuda acestor organizări eterogene, capacitatea lipidelor de a se mișca în cadrul bistratului este doar nuanțată pe întinsul suprafeței membranei și nu anulată.

Această capacitate de mișcare a lipidelor în cadrul membranei determină proprietatea numită **fluiditate**. Fluiditatea membranelor poate fi modulată (modificată, reglată) de mai mulți factori. Acești factori pot fi de natură fizică, sau chimică. Ca factori fizici amintim temperatura și presiunea. Fluiditatea membranelor este direct proporțională cu temperatura și invers proporțională cu presiunea. Efectivitatea acestor factori fizici în modularea fluidității membranare este însă limitată, după cum ușor ne putem da seama. Nici presiunea și nici temperatura nu pot varia în limite largi (ba dimpotrivă) în condiții fiziologice. Mult mai pregnant este efectul factorilor chimici în modularea fluidității membranei. Aceștia, în funcție de proveniență, se pot clasifica în **(i) factori chimici intrinseci** sau **(ii) factori chimici extrinseci**.

Factorii chimici intrinseci, pe care celula îi folosește în modularea fluidității membranei în funcție de necesități, sunt cantitatea de acizi grași nesaturați din structura fosfolipidelor sau a glicolipidelor și/sau cantitatea de colesterol din bistrat. Fluiditatea membranei este direct proporțională cu procentul de acizi grași nesaturați din structura chimică a lipidelor bistratului (crește cantitatea de acizi grași nesaturați, crește și fluiditatea), în timp ce creșterea procentului de colesterol duce la rigidizarea membranei (micșorarea fluidității). Așadar, fluiditatea membranei este invers proporțională cu cantitatea de colesterol din bistrat (Fig. 2.7). Cum trebuie înțelese sugestiv motivele acestor efecte ale colesterolului și acizilor grași nesaturați asupra fluidității membranei celulare? Descriptiv, geometria angulară a cozilor acizilor grași nesaturați are ca efect depărtarea spațială a lipidelor și micșorarea interacțiunilor între acestea atât la nivelul porțiunii hidrofobe, cât și al capetelor hidrofile. În ceea ce privește efectul colesterolului, din motive structurale (datorită geometriei spațiale), acesta sporește tăria interacțiunilor atât la nivelul cozilor hidrofobe, cât și al capetelor hidrofile, anulând efectul acizilor grași nesaturați

Factorii chimici extrinseci se clasifică la rândul lor în **(a) fiziologici** (hormoni sau mediatori chimici liposolubili), **(b) patologici** (metaboliți liposolubili ai unor agenți patogeni, substanțe chimice toxice, liposolubile) sau **(c) terapeutici** (medicamente liposolubile). Multe analgezice, ca și unele anestezice, fiind compuși liposolubili, acționează și prin modificarea fluidității membranelor neuronale. Dovezi experimentale recente dovedesc faptul că, alături de efectele datorate modificării fluidității membranare, anestezicele și/sau analgezicele acționează și prin modificările conformaționale induse la nivelul unor proteine transmembranare, afectându-le funcția.

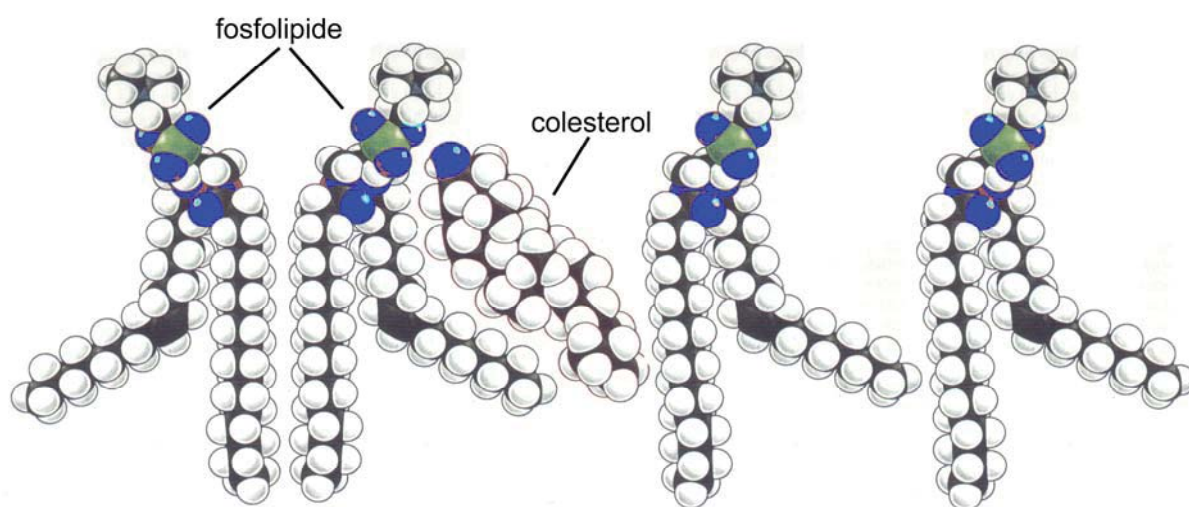


Fig. 2.7. Efectul rigidizant al colesterolului la nivelul bistratului. Datorită geometriei moleculare, colesterolul are abilitatea de a se insera în spațiile dintre fosfolipide sporind interacțiunile moleculare atât la nivelul capetelor hidrofile, cât și la nivelul cozilor hidrofobe. © Mircea Leabu, 2014.

După cum vom vedea, fluiditatea membranelor este modulată și nuanțată și de către celelalte componente ale membranelor: proteinele și structurile glucidice. Practic, dinamicitatea componentelor membranare, care asigură buna funcționare a lor și, prin aceasta, a întregii ultrastructuri, diferă de la un moment la altul în funcție de starea în care (macro)moleculele se află: independente sau în interrelație cu alte componente din membrana însăși sau din spațiile apropiate (citosolul cortical sau elemente din exterior).

2.2.4. Rolul lipidelor membranare

După cum am arătat până acum, rezultă că fără bistrat lipidic nu pot exista membrane celulare. Bistratul lipidic reprezintă componenta de bază a organizării membranelor, **funcția structurală** a lipidelor membranare organizate în bistrat fiind esențială. Dincolo de funcția structurală prin care oferă membranei cel mai bun element pentru organizare și funcționare, bistratul lipidic conferă membranei celulare rolul de barieră, această menire a lipidelor membranare fiind enunțată încă de la dovedirea prezenței lor în membrane. Dar lipidele nu se află, nici pe departe, în membrane numai din considerente structurale. Ele sunt implicate în importante **funcții metabolice**, acele funcții care unesc celula cu mediul înconjurător, o integrează pe aceasta în “ambianța biosocială”. Mai mult, echilibrul dintre diferitele tipuri de lipide din membrane influențează comportamentul normal al celulei, iar modificarea lui poate atrage deviații patologice. De aceea, lipidele membranare pot reprezenta ținte terapeutice [12].

Glicolipidele sunt implicate în fenomene de recunoaștere și semnalizare intercelulară (vezi la “Componenta glucidică a membranei”).

Detalii referitoare la rolurile metabolice ale lipidelor sunt cunoscute pentru fosfolipide. Acestea pot fi modificate de enzime specifice numite **fosfolipaze**. De regulă, aceste modificări se petrec ca urmare a unor procese de semnalizare, parte dintre metaboliții rezultați acționând ca **mesageri secundari** (vezi semnificația sintagmei la „Semnalizarea celulară”) și facilitează numeroase procese prin care celulele răspund semnalelor receptate.

Există mai multe tipuri de fosfolipaze, care au proprietatea de a elibera diverse molecule din complexa structură biochimică a fosfolipidelor (Fig. 2.8). Acestea sunt:⁶

- (i) **fosfolipaza A1** (prescurtare internațională **PLA1**, cu PL de la termenul englezesc *PhosphoLipase*), care eliberează acidul gras din poziția 1 a glicerinei;
- (ii) **fosfolipaza A2** (prescurtare internațională **PLA2**), care detașează acidul gras din poziția 2 a glicerinei, cu formare de **lizofosfatide**;
- (iii) **fosfolipaza B** (prescurtare internațională **PLB**), care poate scoate acizi grași din ambele poziții ale glicerolului din structura fosfolipidelor, completând de regulă activitatea PLA1 sau PLA2; acționează în general asupra lizofosfatidelor eliminând din bistrat fosfolipidul afectat;
- (iv) **fosfolipaza C**, care desface legătura dintre glicerină și fosfat, cu eliberarea **diacilglicerolilor (DAG)**, care rămân în bistrat și a unui compus hidrofil ce difuzează în citosol;
- (v) **fosfolipaza D**, care elimină restul hidrofil X, cu formarea PA la nivelul bistratului.

⁶ Recomandăm o modalitate mnemotehnică de a reține legătura dintre tipurile de fosfolipaze și rolul lor. Este ușor de remarcat că, plecând de la acizii grași legați la hidroxilii din pozițiile 1 și 2 ale glicerinei și mergând către compusul variabil din capul hidrofil al fosfolipidelor, fosfolipazele se numesc succesiv de la A la D în funcție de partea din moleculă pe care o taie: A1 pentru cele care scot acizii grași din poziția 1 (A de la acid și 1 poziția), A2 eliberează acidul gras din poziția 2, apoi B contribuie la eliminarea ambilor acizi grași, C taie legătura esterică dintre glicerină și fosfat, iar D desface numai partea variabilă din capul hidrofil.

Pentru exemplificarea efectelor celulare, datorate acțiunii fosfolipazelor, punctăm următoarele (vezi și subcapitolul “Semnalizarea celulară”):

- a) Fosfolipaza A2 poate elibera acidul arahidonic, care este precursor pentru patru clase de substanțe cu roluri dintre cele mai diverse: 1. **prostaglandine**; 2. **tromboxani**; 3. **prostaciline**; 4. **leucotriene**. Acești compuși sunt obținuți prin complexe procese de metabolizare a acidului arahidonic (cu bagaje enzimatice adecvate), după eliberarea sa din fosfolipidele care îl conțin. Primele trei tipuri rezultă pe calea **ciclo-oxigenazei**, cea de-a patra clasă pe calea **lipo-oxigenazei**. Toate aceste tipuri de metaboliți ai acidului arahidonic sunt eliberate din celulele care îi produc și au rol de molecule mesager în diferite procese de semnalizare celulară.
- b) Fosfatidilinozitolii sunt implicați în mecanisme de transmitere transmembranară și intracelulară a semnalelor. Când unele molecule semnal (liganzi) se leagă de receptorii specifici din membranele celulare, PI intră într-o secvență de reacții denumită **cascada fosfoinozitudelor** (Fig. 2.9).

În această cascadă PI sunt, pas cu pas, fosforilați inițial la fosfoinozitolfosfați (PIP), sub acțiunea fosfatidilinozitol kinazei⁷ (PI kinaza), cu consum de ATP, apoi la fosfatidilinozitol-bis-fosfați⁸ (PIP₂), sub acțiunea PIP kinazei, de asemenea cu consum de ATP. Asupra fosfatidilinozitol-4,5-bis-fosfatului format acționează **fosfolipaza C** (izoforme β și γ ale fosfolipazei C, specifice pentru fosfatidilinozitolii) cu eliberarea de **IP₃** (inozitol-1,4,5-tris-fosfat⁹) și **DAG**. IP₃ acționează ca mesager secund inducând creșterea Ca²⁺ în citosol și conducând la răspunsuri celulare rapide și de scurtă durată (exemplu, contracția musculară). La rândul său, DAG este implicat în declanșarea unor răspunsuri celulare mai lente și de lungă durată (exemplu, semnalizarea prin căile **protein-kinazei C**).

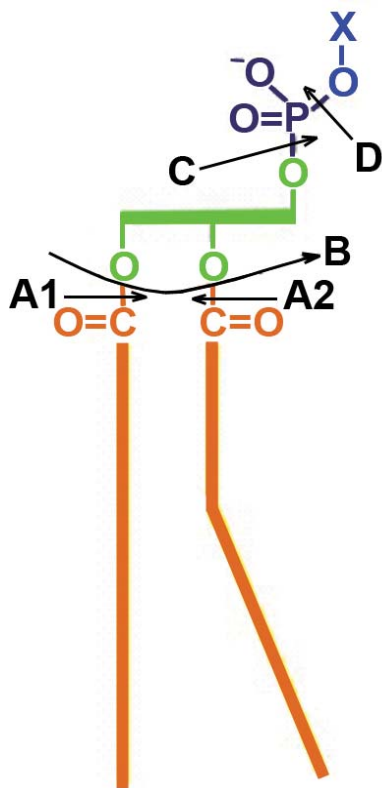


Fig. 2.8. Locurile specifice de acțiune pentru diferitele tipuri de fosfolipaze, la nivelul moleculelor de fosfolipide. A1 – fosfolipaza A1; A2 – fosfolipaza A2; B – fosfolipaza B; C – fosfolipaza C; D – fosfolipaza D.

⁷ Prin kinaze desemnăm acele enzime a căror activitate se soldează cu grefarea de fosfat pe diferite substraturi.

⁸ Atenție! În denumirea acestor metaboliți se folosesc particulele „bis”, respectiv „tris” și nu di sau tri, deoarece fiecare reziduu fosfat este inserat pe un alt hidroxil al inozitolului. Formele bi/di, respectiv tri se folosesc în denumirea compușilor în care fosfatul se leagă unul de altul (exemple: adenozin-difosfat, adenozin-trifosfat).

⁹ Vezi nota de subsol numărul 7.

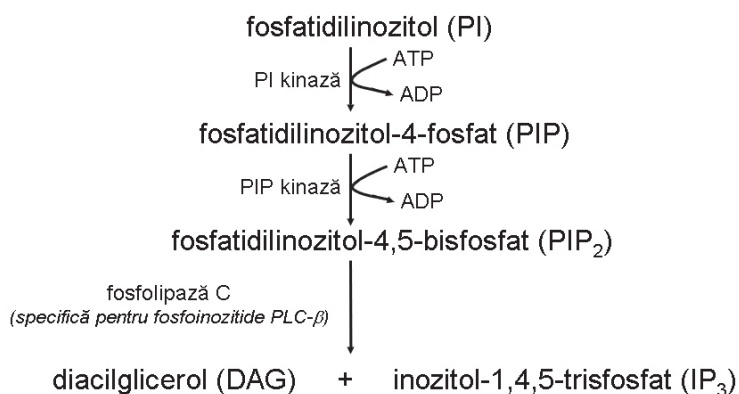


Fig. 2.9. Cascada fosfoinozotide-ilor. Acțiunea secvențială a fosfatidilinozitol-kinazelor duce la formarea PIP_2 . Ulterior fosfolipaza C- β , cea din exemplul figurii, cu specificitate pentru fosfatidil-inozitol, eliberează IP_3 și DAG, care sunt mesageri secunzi în anumite procese de semnalizare transmembranară.

Deși rolul colesterolului în procesele metabolice de la nivelul membranei a fost mai puțin investigat, studii recente au dovedit că el este implicat în interacțiuni cu proteine platformă/proteine adaptoare care au rol în formarea de complexe de semnalizare [13]. În felul acesta colesterolul contribuie la recrutarea acestor proteine platformă, ca endoproteine pe fața citosolică a membranei celulare, cu facilitarea funcției acestora de a pune în bună situație de acțiune proteine implicate în diferite procese de semnalizare și eficientizarea fenomenelor la care trebuie să participe partenerii asociați la nivelul platformei de semnalizare astfel formate.

Ca să rezumăm cele prezentate despre lipidele membranare punctăm:

1. Lipidele membranare organizează componenta de bază a biomembranelor, bistratul lipidic, element cu proprietăți fluide, manifestate bidimensional și caracterizat atât prin eterogenitate compozițională, cât și prin asimetrie;
2. Structura de bistrat lipidic este ideală pentru separarea eficientă, selectivă a două medii hidrofile (interiorul celular de mediul extern);
3. Prin componenta sa hidrofobă, mărginită pe ambele părți de suprafețe hidrophile care îl compatibilizează cu mediile apoase separate, bistratul lipidic asigură funcția de barieră a membranelor, fără a-i conferi caracter de barieră absolută, adică fără a împiedica selectivitatea acestei structuri în interacțiunea celulei cu mediul (schimbul de substanță și de informație);
4. Departe de a avea numai un rol structural, lipidele membranare participă la funcția metabolică a membranei celulare în procese de semnalizare, dar și prin posibilitățile de control a conformației proteinelor cufundate în bistrat, putându-le modula funcția.

Bibliografie selectivă

1. **Frega NG, Pacetti D, Boselli E.** (2012). Characterization of Phospholipid Molecular Species by Means of HPLC-Tandem Mass Spectrometry. In: „*Tandem Mass Spectrometry – Applications and Principles*”, editor Jeevan Prasain (ISBN: 978-953-51-0141-3). Rijeka: InTech Europe; 2012. pp. 637-672.
2. **Luckey M.** Membrane structural biology with biochemical and biophysical foundations. New York: Cambridge University Press, 2008. (Fig. 2.14, p.27).
3. **Han CZ, Ravichandran KS.** (2011) Metabolic connections during apoptotic cell engulfment. *Cell*. 147(7): 1442-1445. doi: 10.1016/j.cell.2011.12.006.
4. **Armstrong A, Ravichandran KS.** (2011) Phosphatidylserine receptors: what is the new RAGE? *EMBO Rep*. 12(4): 287-288. doi: 10.1038/embor.2011.41.
5. **Tung TT, Nagaosa K, Fujita Y, Kita A, Mori H, Okada R, Nonaka S, Nakanishi Y.** (2013) Phosphatidylserine recognition and induction of apoptotic cell clearance by Drosophila engulfment receptor Draper. *J Biochem*. 153(5): 483-491. doi: 10.1093/jb/mvt014.
6. **Fox JE.** (1996) Platelet activation: new aspects. *Haemostasis*. 26: 102-131.

7. **Zwaal RFA, Schroit AJ.** (1997) Pathophysiologic implications of membrane phospholipid asymmetry in blood cells. *Blood*. 89: 1121–1132.
8. **Kuypers FA.** (1998) Phospholipid asymmetry in health and disease. *Curr Opin Hematol*. 5: 122–131.
9. **Kusumi A, Fujiwara TK, Chadda R, Xie M, Tsunoyama TA, Kalay Z, Kasai RS, Suzuki KG.** (2012) Dynamic organizing principles of the plasma membrane that regulate signal transduction: commemorating the fortieth anniversary of Singer and Nicolson's fluid-mosaic model. *Annu Rev Cell Dev Biol*. **28**: 215-250. doi: 10.1146/annurev-cellbio-100809-151736.
10. **Pike LJ.** (2004) Lipid Rafts: Heterogeneity on the high seas. *Biochem. J*. **378**, 281-292.
11. **Sonnino S, Prinetti A.** (2013) Membrane domains and the "lipid raft" concept. *Curr Med Chem*. 20(1): 4-21.
12. **Escriba PV.** (2006) Membrane-lipid therapy: a new approach in molecular medicine. *Trends Mol Med*. **12**, 34-43.
13. **Sheng R, Chen Y, Yung Gee H, Stec E, Melowic HR, Blatner NR, Tun MP, Kim Y, Källberg M, Fujiwara TK, Hye Hong J, Pyo Kim K, Lu H, Kusumi A, Goo Lee M, Cho W.** (2012) Cholesterol modulates cell signaling and protein networking by specifically interacting with PDZ domain-containing scaffold proteins. *Nat Commun*. 3: 1249. doi: 10.1038/ncomms2221.

2.3. Proteinele membranare

2.3.1. Considerații generale asupra prezenței proteinelor în membrane

Modelul mozaicului fluid de organizare a membranelor biologice ne arată că, alături de lipidele așezate sub formă de bistrat, la construcția acestor componente celulare participă și proteinele. Raportul molecular între lipidele și proteinele ce alcătuiesc membranele celulare este în medie de aproximativ 50/1. Acest raport este ușor de înțeles ținând cont de faptul că, de regulă, compoziția sub aspectul masei de material organic la nivelul membranelor este de ~40% lipide și ~50% proteine, iar lipidele sunt molecule cu greutate moleculară mică, în timp ce proteinele sunt macromolecule.

Realitatea biologică este însă diversă, existând și excepții de la aceste procente. De exemplu, la nivelul tecii de mielină, unde funcția de barieră este esențială rolului membranei celulelor Schwann care formează învelișul din jurul axonului, procentul de masă pentru lipide este de ~80, iar cel al proteinelor de numai ~20. De evidențiat, pentru situația diametral opusă, compoziția de la nivelul membranei mitocondriale interne unde lipidele reprezintă ~20%, iar proteinele ~80%. Funcția metabolică a acestei membrane este deosebit de accentuată (vezi în capitolul volumului al II-lea, destinat membranei mitocondriale interne), chiar dacă ar fi să menționăm doar activitatea complexelor proteice implicate în transportul electronilor (lanțul transportor de electroni, numit și lanțul respirator), respectiv activitatea ATP-sintazei, complexul proteic care produce ATP. La nivelul membranei mitocondriale interne însă, este la fel de importantă și funcția de barieră. Poate de aceea aici se află cardiolipinele, fosfolipide deosebite, cu patru lanțuri alifatică în coada hidrofobă (patru acizi grași în moleculă), deci cu proprietăți amfifile a căror componentă hidrofobă este amplificată.

Comentariile de mai sus, asupra complexității realității biologice în privința raportului lipide/proteine în membrane, ne permit să enunțăm reguli de principiu care sugerează corespondența între acest raport și funcționalitatea membranei. Aceste reguli sunt:

- (i) cu cât funcțiile metabolice ale unei membrane (sau porțiuni – ceea ce se definesc drept microdomenii sau domenii – dintr-o membrană) sunt mai accentuate, cu atât conținutul de proteine al acelei membrane sau porțiuni de membrană este mai ridicat;
- (ii) cu cât rolul de barieră al unei membrane trebuie să se manifeste mai pregnant, cu atât conținutul în lipide este mai crescut.

În abordarea studiului proteinelor membranare plecăm de la ceea ce știm deja despre organizarea membranei, cu cele menționate despre caracteristicile fizico-chimice și comportamentul membranei, așa cum am văzut că sunt induse de însăși prezența lipidelor în elementul de bază, bistratul lipidic. Completarea cu proteine a organizării moleculare a membranelor celulare nu anulează, ci amplifică și/sau nuanțează eterogenitatea, asimetria și comportamentul de fluid bidimensional al structurii. Vom căuta să argumentăm, prin prezentarea aspectelor legate de prezența proteinelor în membrane, afirmația din fraza anterioară. Proteinele completează bistratul lipidic pentru definitivarea organizării biomembranelor, în toată grosimea, ca și pentru asigurarea funcționalității ultrastructurii.

Pentru argumentarea ideii de eterogenitate, vom utiliza aceeași strategie folosită la prezentarea eterogenității lipidelor membranare: discutarea diversității de tipuri de proteine din membrane prin clasificarea lor pe diverse criterii.

2.3.2. Clasificări ale proteinelor membranare

O primă clasificare a proteinelor membranare se face în funcție de poziția lor față de bistratul lipidic, care permite împărțirea acestora în două mari categorii:

1. Proteine **periferice** sau **extrinseci**: acele proteine care se află atașate de o parte sau de alta a bistratului lipidic, interacționând cu capetele hidrofile ale lipidelor (dar nu numai, după cum se va vedea din unele aspecte prezentate mai jos);
2. Proteine **integrale** sau **intrinseci**: acele proteine care sunt cufundate în bistratul lipidic străbatându-l complet sau parțial.

Evidențierea, descrierea și denumirea acestor două categorii de proteine membranare au fost făcute în deceniul opt al secolului XX de către Theodore L. Steck și colaboratorii săi [1] (la numai doi ani după introducerea modelului în mozaic fluid privind organizarea membranelor). Diversitatea de tipuri de proteine membranare este accentuată și de alte aspecte (Fig. 2.10).

Proteinele periferice reprezintă, în general, ~25% din polipeptidele unei membrane, se extrag cu soluții saline sau agenți chelatori, au caracter hidrofil (după extragere nu sunt asociate cu lipide) și își păstrează solubilitatea în apă. În funcție de foaia bistratului lipidic căreia îi sunt asociate, proteinele extrinseci se clasifică în **(i) ectoproteine** (proteine periferice asociate foaiei externe a bistratului, așadar expuse la exteriorul membranei celulare sau pe fața luminală a membranelor organelor) și **(ii) endoproteine** (proteine periferice asociate foaiei interne a bistratului, așadar expuse pe fața citoplasmatică a membranelor și endomembranelor).

Au fost evidențiate atașări mai ferme ale proteinelor periferice la bistratul lipidic, prin conjugări (stabilirea de legături covalente) cu componente lipidice.

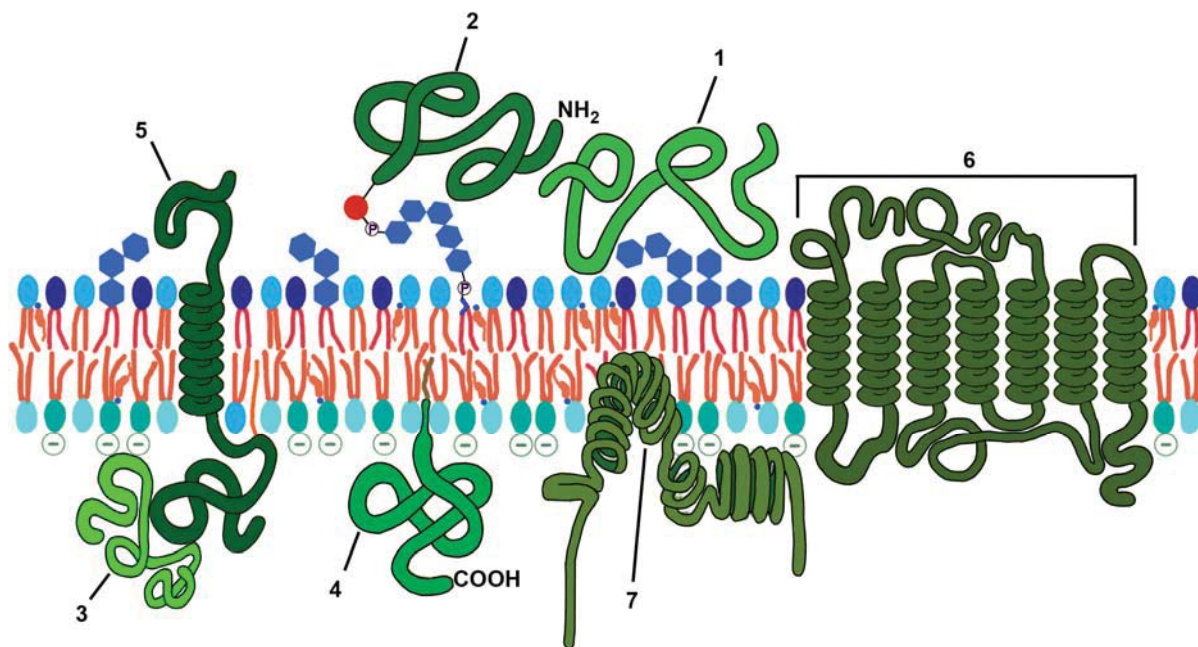


Fig. 2.10. Diversitatea de proteine membranare și exemplificarea clasificărilor acestora. 1 – proteină periferică, ectoproteină; 2 – ectoproteină ancorată prin glicofosfatidil-inozitol; 3 – proteină periferică, endoproteină; 4 – endoproteină acilată; 5 – proteină integrală, transmembranară unipas (prezintă și acilare); 6 – proteină transmembranară multipas; 7 – proteină integrală, parțial imersată în bistratul lipidic; fosfolipidele din foaia internă, cu sarcină negativă reprezintă fosfatidilserine. © Mircea Leabu, 2014.

Pe de o parte, pentru unele ectoproteine a fost evidențiată o cuplare prin carboxilul terminal la gruparea amino a etanolaminei din capătul liber al structurii glucidice a unor glicofosfatidilinozitol (Fig. 2.10, exemplul 2). Fenomenul se numește **glipiare** [2-4]. Partea lipidică rămâne în foița externă a bistratului și poartă numele de **ancoră glicofosfatidilinozitolică**. Funcțiile acestor proteine modificate prin glipiare sunt intens studiate. Există dovezi experimentale care confirmă rolul acestor modificări într-o multitudine de procese care se petrec la suprafața celulei, dar și intracelular. De exemplu, unele din moleculele de adeziune celulară sunt glipiate, unele proteine glipiate sunt implicate în procese imune, există ectoproteine cu rol enzimatic ancorate prin glipiare, proteine glipiate rețin la nivelul lor molecule din spațiul extracelular și contribuie la endocitoza lor și a fost evidențiată direcționarea ectoproteinelor ancorate la bistrat prin glipiare către domeniul apical al membranelor din celulele polarizate (celule ale epiteliilor monostratificate).

Pe de altă parte, unele dintre endoproteine se pot asocia tranzitoriu și reversibil bistratului lipidic prin reacții de acilare, cum ar fi miristilare, palmitilare, farnezilare, geranil-geranilare (Fig. 2.10, exemplul 4), radicalul acil fiind cufundat în foița internă a bistratului [2] (vezi CASETA 2.1). Aceste modificări reversibile sunt importante pentru exprimarea funcțiilor acestor proteine. Mai mult, unele dintre ele, cum ar fi proteinele G mici, numite și proteine G monomerice (vezi ce sunt acestea la „Semnalizarea celulară”) pot tranzita, pe baza acestor modificări, din starea de proteină citosolică în starea de proteină periferică pentru exercitarea funcțiilor (vezi, de asemenea, detalii la „Semnalizarea celulară”). Au fost evidențiate modificări prin acilare și pentru proteine transmembranare (Fig. 2.10, exemplul 5).

De menționat că atât proteinele membranare acilate, cât și cele glipiate au tendința de a se acumula în caveole sau la nivelul plutelor lipidice (microdomenii de membrană definite și discutate parțial, mai sus la secțiunea despre lipidele membranare). Acolo a fost anticipată informația că asemenea modificări ale proteinelor le fac candidate la acumularea în microdomenii de membrană de tipul plutelor lipidice.

CASETA 2.1. Ancorarea proteinelor membranare prin intermediul conjugărilor cu elemente lipidice (acilare)

Proteinele care își exercită funcția biologică exclusiv pe una din cele două fețe ale bistratului lipidic sunt adesea asociate mai ferm bistratului prin interacțiuni cu lipide din foița expusă fie mediului extracelular, fie celui intracelular. O serie de proteine intracelulare (endoproteine) cu rol în procese de semnalizare celulară se atașează, prin modificări covalente, la stratul lipidic dinspre fața citoplasmatică a membranei. Această asociere mai fermă se datorează legării covalente a unor funcțiuni chimice din proteine fie la catene ale acizilor grași, fie la grupări prenil (farnezil sau geranil-geranil). Astfel, au fost evidențiate următoarele modalități de atașare la bistratul lipidic a unor proteine hidrosolubile (după biosinteza lor în citosol), pe baza unor modificări covalente, post-traducere: (i) **miristilarea**, prin formarea unei legături amidice între gruparea amino-terminală aparținând unui rest de glicină de la capătul catenei polipeptidice și gruparea carboxil a acidului miristic; (ii) **palmitilare**, formarea unei legături tip tioester între un rest de cisteină din interiorul catenei polipeptidice și gruparea carboxil a acidului palmitic; (iii) **prenilare**, constând în formarea unei legături tioeter între un rest de cisteină (poziționat inițial în poziția a patra de la capătul carboxi-terminal și ulterior în poziție terminală, după fixarea de gruparea lipidică și clivarea celor trei aminocizi de la extremitatea catenei polipeptidice) și o grupare prenil (3-metil-2-buten-1-il). Deseori atașarea proteinei printr-o singură ancoră lipidică nu este suficient de fermă, fiind necesară fixarea suplimentară de o ancoră lipidică secundară. De exemplu, membrii familiei de proteine Ras (proteine G mici cu funcție GTP-azică, având rol în semnalizare) sunt recrutate la nivelul membranei plasmactice prin fixarea cu o grupare prenil combinată cu fixarea prin acidul palmitic. Prenilarea proteinelor este mediată de trei tipuri de enzime, respectiv farneziltransferaza și geranilgeraniltransferazele de tip I și II. În ultimii ani inhibitorii farneziltransferazei s-au dovedit candidați terapeutici importanți pentru tratamentul unor forme de cancer și al unor infecții cu paraziți aparținând genului *Plasmodium*, agentul infecțios al malariei, și genului *Trypanosoma* (specia *T. brucei*), agentul infecțios al „bolii somnului”.

Proteinele integrale (Fig. 2.10, exemplele 5-7) reprezintă, de regulă, ~75% din proteinele unei membrane, se pot extrage din structura bistratului lipidic prin folosirea de detergenți (adică după distrugerea integrității bistratului lipidic), după extragere rămân asociate cu lipide, sunt insolubile în apă (dializarea detergentului duce la precipitarea lor prin floculare) și au caracter amfifil (porțiunea hidrofobă fiind reprezentată de zona imersată în bistratul lipidic, porțiunea/porțiunile hidrofilă/hidrofile reprezentând domeniile lanțului polipeptidic expuse în afara bistratului lipidic). Proteinele integrale care traversează complet bistratul lipidic sunt denumite proteine **transmembranare** (Fig. 1.10, exemplele 5 și 6) și reprezintă cea mai mare parte a proteinelor intrinseci. Cele care sunt parțial cufundate în bistratul lipidic (Fig. 2.10, exemplul 7) nu au primit o denumire specifică. Mai mult, acestea din urmă au fost considerate până prin ultimul deceniu al secolului XX a fi practic inexistente. Se specula în favoarea acestei idei pe considerente structurale și termodinamice. Explicația era că nu putea fi adoptată de către aceste proteine o conformație care să asigure hidrofobicitate în porțiunea de pliere a lanțului polipeptidic în interiorul bistratului lipidic. În momentul de față sunt cel puțin două proteine integrale candidate la imersare parțială în bistratul lipidic al membranelor cărora le aparțin: **citocromul b_5** din membrana reticulului endoplasmic și **caveolina**, la nivelul membranelor celulelor ce pot structura caveole ca formațiuni specializate de membrană (de exemplu, celule musculare netede, celule endoteliale, enterocite etc.). Schimbarea atitudinii comunității științifice în privința acestei situații, după raportarea dovezilor experimentale legate de aranjamentul celor două proteine în membrane, este un exemplu al dinamicii cunoașterii în biologia celulară și al modului rapid în care conceptele pot evolua în acest domeniu.

Revenind la proteinele transmembranare, acestora li se definesc trei domenii structurale: **(i)** un **ectodomeniu**, numit și domeniu extern (porțiunea expusă pe fața externă a membranei), **(ii)** un **endodomeniu**, numit și domeniu citosolic (porțiunea expusă pe fața internă a membranei) și **(iii)** un **domeniu transmembranar** (porțiunea ce străbate bistratul lipidic). În ceea ce privește modul de organizare structurală a ecto- și endo-domeniilor, lanțurile proteice se pot împacheta combinat în aceste zone atât ca α -helixuri, cât și ca β -pliuri, așa cum se întâmplă cu toate proteinele. Situația este oarecum diferită pentru domeniul transmembranar. Pentru acesta, până prin deceniul 9 al secolului XX, a existat accepțiunea că nu poate fi structurat decât sub formă de α -helix, astfel încât să poată fi mascate către axul acestuia porțiunile hidrofile ale lanțului polipeptidic, iar la exteriorul său să fie expuse părțile hidrofobe, acomodabile cu hidrofobicitatea din profunzimea bistratului lipidic. Se justifica și în acest caz prin considerente de ordin structural și termodinamic. Între timp însă, au fost identificate proteine transmembranare care, la nivelul domeniului transmembranar, prezintă β -pliuri orientate în contrasens care se organizează asemenea doagelor unui butoiuș. În acest fel fiecare doagă (porțiune organizată în β -pliuri) expune către zonele hidrofobe ale bistratului suprafața hidrofobă și ascunde către interiorul butoiușului componentele hidrofile din structura lanțului polipeptidic. Asemenea proteine se întâlnesc, de exemplu, în membrana mitocondrială externă formând porine. Descifrarea structurii porinelor a reprezentat un alt exemplu de schimbare de atitudine pe care evoluția cunoașterii realității biologice a impus-o comunității științifice.

Proteinele transmembranare se pot clasifica și pe baza altor criterii. Astfel, în funcție de numărul de treceri ale lanțului polipeptidic prin planul membranei ele se împart în **(i) unipas** (o singură trecere; exemplul 5 în Fig. 2.10) și **(ii) multipas** (mai multe treceri; exemplul 6 în Fig. 2.10). Este lesne de înțeles că proteinele structurate ca β -pliuri la nivelul domeniului transmembranar (porinele) nu pot fi unipas.

În funcție de poziția față de bistrat a capătului amino al lanțului polipeptidic, proteinele transmembranare se clasifică în **(i)** proteine transmembranare de **tipul I** (când capătul amino se află în ectodomeniu) și **(ii)** proteine transmembranare de **tipul II** (când capătul amino se află în endodomeniu).

Toate aceste clasificări ne sugerează marea diversitate de proteine membranare, astfel încât este clar că prezența proteinelor în structura membranelor respectă caracterul eterogen al organizării acestora, nuanțându-l. În același timp, existența ecto- și endoproteinelor (fierec entități moleculare diferite, rezultat al unor fenomene diferite de biosinteză și asamblare; vezi la secțiunea „Biogeneza membranelor” din volumul al II-lea) sporește asimetria organizării moleculare a membranelor. Mai mult, asimetria membranelor este accentuată și de prezența proteinelor transmembranare cu ectodomeniul diferit de endodomeniu, ca și prin caracterul asimetric al organizării lanțului polipeptidic căruia îi putem asocia caracteristici vectoriale (origine, direcție, sens), chiar dacă similitudinea nu trebuie înțeleasă în sensul strict algebric. Originea unei proteine poate fi convențional atribuită capătului amino-terminal (cu acesta începe biosinteza proteinelor la nivelul ribozomilor), direcția nu este deloc una rectilinie, iar sensul este dinspre capătul amino-terminal spre capătul carboxi-terminal.

Vom comenta ceva mai jos efectul și importanța proprietăților eterogenitate și asimetrie (care sunt amplificate de prezența proteinelor), asupra funcționalității membranelor. De fapt, insistența noastră în prezentarea acestor caracteristici de organizare a biomembranelor (eterogenitate, asimetrie și comportament dinamic de fluid bidimensional) nu s-ar justifica dacă nu ar fi deosebit de importantă semnificația biologică a lor.

2.3.3. Exemple de proteine membranare

Primele și cele mai detaliate informații asupra proteinelor membranare au fost obținute din studiul membranelor eritrocitare [5]. Motivația este simplă și se bazează pe următoarele aspecte:

- (i)** materialul biologic este ușor de obținut în cantitate suficientă (eritrocitele reprezintă populația celulară majoritară din sânge);
- (ii)** omogenitatea populației celulare este ușor de asigurat (celelalte tipuri celulare reprezintă o masă mică, sunt mai ușoare, sedimentând deasupra eritrocitelor la centrifugare, sau doar în câmp gravitațional, iar eliminarea lor se poate face chiar cu pierderi de eritrocite, pentru siguranță în eliminarea impurificării preparatului final);
- (iii)** membranele se obțin fără dificultate printr-un simplu șoc hipoton urmat de centrifugare; membranele obținute (numite și fantome eritrocitare) nu sunt impurificate cu endomembrane (membrane ale organelor celulare), inexistente în hematii.

Proteinele membranelor astfel purificate au fost rezolvate prin electroforeză în gel de poliacrilamidă în prezență de dodecilsulfat de sodiu (SDS-PAGE). Avantajele acestui tip de electroforeză constau în faptul că detergentul (dodecilsulfatul de sodiu, numit și laurilsulfat de sodiu) pe de o parte eliberează toate proteinele (atât pe cele periferice, cât și pe cele integrale) din arhitectura membranei, solubilizându-le după dezorganizarea bistratului lipidic [6], iar pe de altă parte se adsoarbe unitar pe lanțurile polipeptidice, conferindu-le o densitate de sarcină negativă unitară. În aceste condiții migrarea proteinelor în câmp electric, prin mediul vâscos de poliacrilamidă, se face numai în funcție de greutatea lor moleculară.

Rezultatele unei asemenea abordări pentru descrierea proteinelor membranei eritrocitare se înfățișează sub forma unui spectru de benzi proteice distribuite între 20 și 250 kDa, care inițial au primit denumiri sub formă de cifre (banda 1, banda 2,

etc.), nuanțându-se cu, spre exemplu, banda 4.1, banda 4.2, acolo unde benzile apăreau ca dublete. Ulterior, unele dintre proteine au primit denumiri specifice. În momentul de față organizarea și funcționarea membranei eritrocitare poate fi discutată pe baza informațiilor disponibile referitoare la proteinele ei. Comentariile asupra proteinelor membranei eritrocitare ne vor ajuta să înțelegem mai aprofundat organizarea acestor macromolecule în arhitectura biomembranelor, care este în strânsă legătură cu funcționalitatea lor.

Vom începe cu o proteină, de fapt o glicoproteină (60% din masa moleculară a glicoconjugatului este reprezentat de încărcătura glucidică), numită **glicoforină** (etimologic însemnând purtătoare de glucide), prezentă din abundență în membrana eritrocitului, care migrează atipic (se dispune electroforetic undeva pe la 90kDa, deși masa ei moleculară este de numai ~30kDa). Există mai multe izoforme de glicoforină [7] identificate până în prezent: A, B, C, D și E. Izoforma glicoforină A a fost prima proteină a membranei eritrocitare cunoscută detaliat [8], sub aspectul structurii biochimice. Are 131 aminoacizi, cunoscându-i-se integral secvența; este proteină transmembranară unipas, tip I (capătul amino în ectodomeniu); domeniul expus la suprafața membranei este mare (70 de aminoacizi) și poartă 16 lanțuri glucidice (15 O-glicozidice și unul N-glicozidic), acestea dublând practic gabaritul acestei molecule (această organizare biochimică a glicoproteinei reprezintă o explicație pentru migrarea electroforetică atipică; practic densitatea de sarcină negativă pe unitatea de masă este mai mică decât în mod normal, detergentul SDS adsorbindu-se unitar numai pe lanțul polipeptidic, nu și pe structurile glucidice); endodomeniul este mic (39 de aminoacizi), purtând capătul carboxil al lanțului polipeptidic; domeniul transmembranar este structurat în α -helix și conține 22 de aminoacizi, care sunt identificați.

Paradoxul este că, deși structural glicoforina și-a dezvăluit repede secretele, funcția nu i se cunoaște încă exact. Totuși, pentru izoforma glicoforină C a fost dovedită o funcție structurală [9] (vezi mai jos la citoscheletul asociat membranei), iar pentru izoforma glicoforină A un rol de restabilire a funcției unei forme mutante a proteinei banda 3, prin interacțiunea dintre cele două [10]. Ciudățenia este cu atât mai mare cu cât există eritrocite (Ena⁻) din a căror membrană glicoforina lipsește, fără ca funcționalitatea să le fie afectată. Populațiile cu asemenea defecte de exprimare a glicoforinei sunt în zonele cu malarie endemică, iar exprimarea deficitară în glicoforină A reprezintă un mecanism de adaptare, parazitul *Plasmodium falciparum* invadând eritrocitele gazdă prin legarea la o structură glucidică purtată de această proteină transmembranară [11].

O situație diametral opusă o reprezintă proteina **banda 3**, cunoscută și ca **AE1** (de la numele în engleză, „**Anion Exchanger 1**”) [10], despre care informația asupra detaliilor structurale a evoluat mai anevoios, dar a cărei funcție a fost repede și clar stabilită: este proteina care structurează canalul anionic de schimb între bicarbonat (HCO_3^-) și clorură (Cl^-). Banda 3 este proteină transmembranară, are 911 aminoacizi în lanțul polipeptidic și o masă moleculară de ~100kDa. Partea N-terminală a proteinei (aminoacizii 1-359) intră în structurarea endodomeniului, asigurând interacțiuni cu alte proteine membranare. Domeniul transmembranar, la nivelul căruia se formează canalul de schimb anionic, are 12-14 treceri în α -helix prin bistratul lipidic (~50kDa din masa moleculară). La endodomeniul mare format în principal din capătul N-terminal se adaugă capătul C-terminal scurt (format din 33 aminoacizi) aflat tot spre citosol. Așadar, endodomeniul conține ~400 din aminoacizii care formează proteina, adică ~40kDa și poartă atât capătul N-terminal (proteină transmembranară de tip II), cât și capătul C-terminal. Ectodomeniul este mic, încărcătura glucidică este redusă (se pare că doar un lanț, cu o structură extrem de eterogenă [12]) și este reprezentat de bucle dintre porțiunile transmembranare. În porțiunea C-terminală banda 3 leagă anhidraza carbonică II, importantă pentru

funcția transportorului prin furnizarea anionului bicarbonat [13]. Au fost identificate forme mutante pentru proteina banda 3 care induc o serie de patologii specifice eritrocitelor [10], iar glicoforina A pare a fi de ajutor acestor forme mutante în restabilirea funcției de transport.

Cea de-a treia proteină pe care o amintim este **spectrina**, care, împreună cu celelalte două amintite mai sus, reprezintă peste 60% (procente de masă) din proteinele membranei eritrocitare. Spectrina este o proteină periferică situată pe fața internă a membranei (așadar o endoproteină) și reprezintă componenta de bază a ceea ce numim **citoschelet asociat membranei** sau simplu **citoschelet membranar** ori **citoscheletul membranei**.¹⁰

Citoscheletul membranei este o rețea de endoproteine cu ochiuri și noduri, solidară membranei prin atașarea la endodomeniul unor proteine transmembranare. Grosimea acestei ultrastructuri membranare este de 5-10nm. Citoscheletul membranei este solidar și cu organitul denumit citoschelet. Citoscheletul ca organit este reprezentat de filamente sau microtubuli distribuite în întreg volumul citosolic și este responsabil, între altele, de menținerea și/sau modificarea formei celulelor, ca și de geometria membranei. La unele tipuri celulare citoscheletul este implicat în organizarea specializărilor de membrană cum ar fi microvilii, stereocilii, cili, flagelii. De menționat că la eritrocit forma biconcavă și maleabilitatea acesteia se datorează în exclusivitate citoscheletului membranar.

Spuneam că spectrina este componenta de bază a citoscheletului asociat membranei. Ea este un heterodimer (Fig. 2.11, A) format dintr-o subunitate α (**α -spectrină**, 280kDa) și o subunitate β (**β -spectrină**, 246kDa). Ambele subunități sunt formate predominant din multiple unități repetitive de 106 aminoacizi: 22 pentru α -spectrină și 17 pentru β -spectrină [14]. Cele două subunități cu geometrie fibrilară se răsucesc ușor una în jurul alteia într-o structură elicoidală, formând bastonașe flexibile cu lungimea de ~100nm. Răsucirea este în contrasens (antiparalel), fiecare bastonaș având la capete gruparea amino-terminală a unei subunități și gruparea carboxi-terminală a celeilalte. Capătul conținând gruparea amino-terminală a subunității α și gruparea carboxi-terminală a subunității β este numit capul bastonașului, iar celălalt capăt este coada acestuia. Bastonașele au capacitatea de a interacționa câte două, cap la cap, formând tetrameri lungi de ~200nm (Fig. 2.11, B). Acești tetrameri formează laturile rețelei citoscheletului membranar. Capetele tetramerilor, ce reprezintă cozile bastonașelor de spectrină, au capacitatea de a se asocia, de regulă câte 5 sau 6, prin interacțiuni cu oligomeri de actină, formând nodurile rețelei, la nivelul cărora se găsesc și alte proteine care controlează dinamica interacțiunilor și, prin aceasta, dinamica citoscheletului membranar.

Așadar **actina** este o altă proteină ce participă la organizarea citoscheletului membranei, asigurând solidarizarea componentelor acestuia la nivelul nodurilor. În forma sa monomerică actina este o proteină globulară cu masa de ~43kDa și un diametru de ~5nm. La nivelul citoscheletului membranar formează fragmente mici, de 8-12 monomeri cu rolul de a asigura asocierea cozilor tetramerilor de spectrină în nodurile rețelei.

Tot în noduri se localizează o altă proteină periferică, **banda 4.1**, cu masa de ~80kDa și conformație globulară (diametrul ~6nm). Banda 4.1 interacționează dinamic, pe de o parte cu spectrina și actina în nodurile rețelei citoscheletale și, pe de altă parte, cu endodomeniul glicoforinei C, contribuind la atașarea citoscheletului pe

¹⁰ Atragem atenția că noțiunea de citoschelet se utilizează și pentru organitul nedelimitat de endomembrane format din filamente de actină, filamente intermediare și microtubuli. Așadar, facem apel la cititori să disjunga între sintagma citoschelet asociat membranei sau citochelet membranar și organitul numit citoschelet.

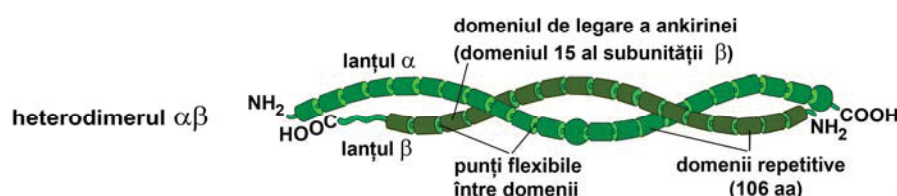
fața citosolică a membranei [10]. Rezultă de aici un rol structural pentru o izoformă a paradoxalei glicoforine.

Atașarea citoscheletului asociat la membrană este însă datorată în principal unei alte proteine globulare, **ankirina** (masa moleculară ~210kDa, diametrul ~9nm). Ankirina se leagă atât la subunitatea β a spectrinei, la cea de-a 15-a unitate repetitivă [13] (în treimea dinspre cap a heterodimerului), cât și la endodomeniul benzii 3, asigurând ancorarea rețelei citoscheletului membranar, prin intermediul laturilor ochiurilor acestuia.

Pe scurt, citoscheletul membranei (Fig. 2.12) este format din tetrameri de spectrină ce organizează laturile ochiurilor rețelei, unde prin intermediul ankirinei se leagă de banda 3 (proteină transmembranară) și din mici filamente de actină care leagă cozile tetramerilor de spectrină la nivelul nodurilor rețelei, unde, prin intermedierea benzii 4.1, rețeaua se atașează suplimentar la endodomeniul benzii 3, sau al glicoforinei. Interacțiunile de afinitate dintre elementele citoscheletului asociat membranei sunt într-o dinamică permanentă, astfel încât această ultrastructură nu este rigidă, ci într-o continuă modelare care să satisfacă nevoile celulei. În acest fel eritrocitul își modelează forma pentru a putea să treacă prin cele mai subțiri capilare (diametrul acestor capilare este de 5 μ m, în timp ce diametrul unui eritrocit este de 7-8 μ m). În timpul străbaterii acestor capilare eritrocitul capătă o formă concav-convexă (ca o meduză) și astfel se strecoară, cu membrana foarte aproape de cea a celulei endoteliale din peretele vasului de sânge, favorizându-se schimbul de gaze.

Citoscheletul asociat membranei nu este doar o caracteristică a membranei eritrocitare. El se găsește în toate celulele și este structurat asemănător, chiar dacă unele dintre componente au fost denumite diferit (spre exemplu echivalenta spectrinei în celulele nervoase este numită **fodrină**). Repetăm, dacă la eritrocit această ultrastructură este singura responsabilă de forma celulei, ca și de maleabilitatea acesteia, deoarece este un element dinamic în permanentă reconstrucție, la celelalte celule pentru asigurarea formei, citoscheletul asociat membranei este în interrelație cu organitul denumit citoschelet.

(A)



(B)

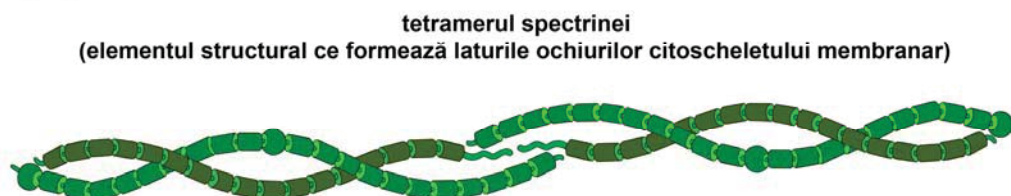


Fig. 2.11. Structurarea și organizarea spectrinei. (A) Ambele subunități α și β sunt formate din domenii repetitive de câte 106 aminoacizi și se răsucesc, antiparalel una în jurul alteia, formând un bastonaș de 100nm. (B) Heterodimerii $\alpha\beta$ se leagă cap-cap formând tetrameri lungi de 200nm. © Mircea Leabu, 2014.

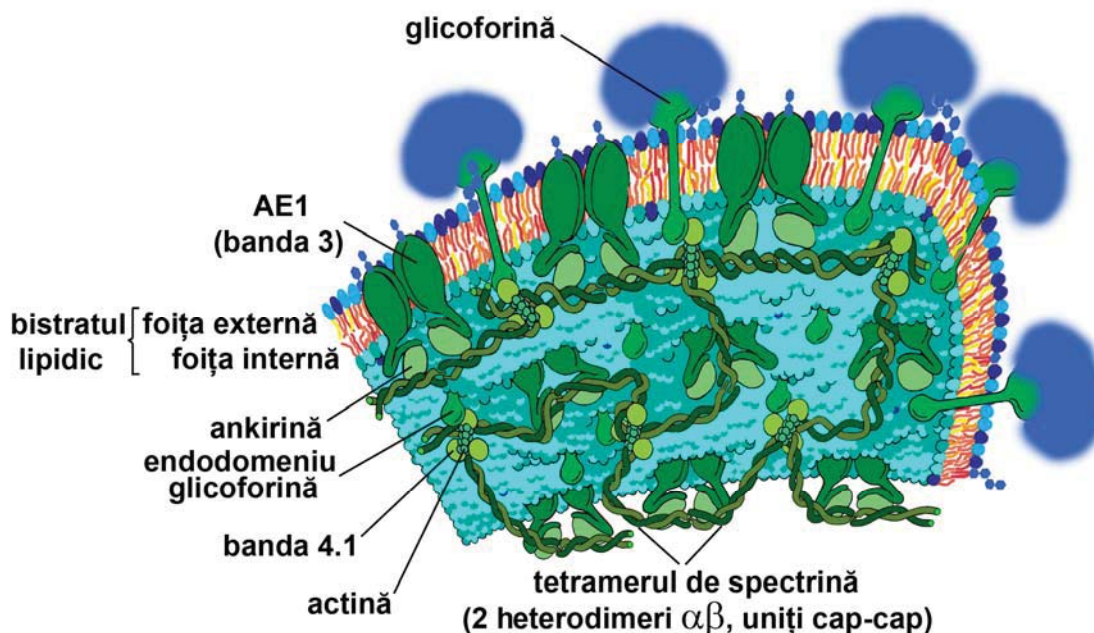


Fig. 2. 12. Organizarea citoscheletului membranar, ca o rețea dinamică de endoproteine cu ochiuri și noduri. Tetramerii spectrinei formează laturile ochiurilor, la nivelul cărora ultrastructura se atașează prin ankirină la banda 3 (canalul de schimb anionic), proteină transmembranară multipas, prin aceste interacțiuni rețeaua solidarizându-se membranei. Nodurile se formează prin atașarea multiplă a tetramerilor de spectrină la nivelul cozilor heterodimerilor $\alpha\beta$, iar interacțiunile acestora sunt întărite prin participarea oligomerilor de actină și a proteinei benzii 4.1. Banda 4.1 atașează suplimentar citoscheletul membranar la ultrastructură, interacționând cu domeniul citosolic al glicoforinei (încărcătura glucidică bogată a glicoforinei este reprezentată prin norul albastru de deasupra ectodomeniului proteinei). Traseele contorsionate ale tetramerilor de spectrină sugerează maleabilitatea ultrastructurii și se datorează punților flexibile pe care monomerii α , respectiv β le organizează între unitățile repetitive de tip spectrinic. © Mircea Leabu, 2014.

Revenind la metodologia electroforetică de studiere a proteinelor membranare, aceasta a fost dezvoltată, prin combinare cu extragerea și atașarea proteinelor – rezolvate prin SDS-PAGE – pe membrane adsorbante (din nitroceluloză sau poli-difluorură de viniliden). Extragerea proteinelor din gelul de electroforeză se realizează tot sub acțiunea câmpului electric aplicat unui sandviș format de gelul obținut după migrarea și rezolvarea proteinelor pe baza greutateilor lor moleculare și membrana adsorbantă, iar procesul este numit transfer electroforetic. Tehnica se finalizează cu o etapă de imunodetecție a diferitelor specii proteice prin folosirea de anticorpi, printr-o metodă indirectă (anticorpi primari, direcționați specific împotriva unei anumite proteine, urmați de anticorpi secundari, anti-specia sursă a anticorpilor primari, cuplați, de regulă, cu peroxidază de hrean, pentru reacția de vizualizare prin chemiluminiscență amplificată). Prin această dezvoltare pot fi investigate proteine membranare fără a mai fi nevoie de izolarea inițială a unor fracțiuni pure de membrană. Singurul aspect ce trebuie cunoscut anterior este localizarea membranară a proteinei investigate. Pentru exemplificarea tehnicii (denumită în literatura de specialitate, fără o semnificație semantică, „**western blot**”) arătăm variația exprimării unor integrine în culturi celulare obținute din celule musculare netede din peretele de trompă uterină (Fig. 2.13). Tehnica este deosebit de utilă în studiul efectelor anumitor condiții experimentale asupra exprimării proteinelor studiate, ca și în studii de activare a unor proteine în diferite procese celulare, dacă există anticorpi specifici pentru domeniile proteinei care suferă modificări ca urmare a activării.

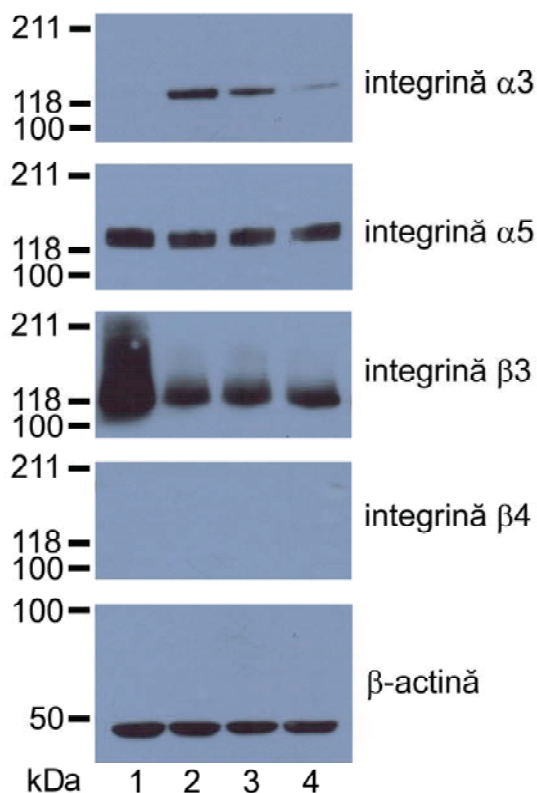


Fig. 2.13. Investigare prin „western blot” a variației exprimării unor diverse subunități de integrine în celule musculare netede din trompă uterină, la diferite pasaje obținute după inițierea unei culturi primare. 1 – pasajul 2; 2 – pasajul 4; 3 – pasajul 6; 4 – pasajul 8. Cifrele din partea stângă a imaginii reprezintă masele moleculare ale standardelor. Evidențierea β -actinei ne ajută să dovedim încărcarea proteică identică a probelor supuse electroforezei. © Mircea Leabu, 2014.

Investigările funcționale și de distribuire/redistribuire ale proteinelor membranare se pot realiza prin alte tehnici de studiere a celulelor. Microscopia de fluorescență reprezintă o asemenea modalitate de studiu într-o multitudine de modelări experimentale (Fig. 2. 14 și Fig. 2. 15).

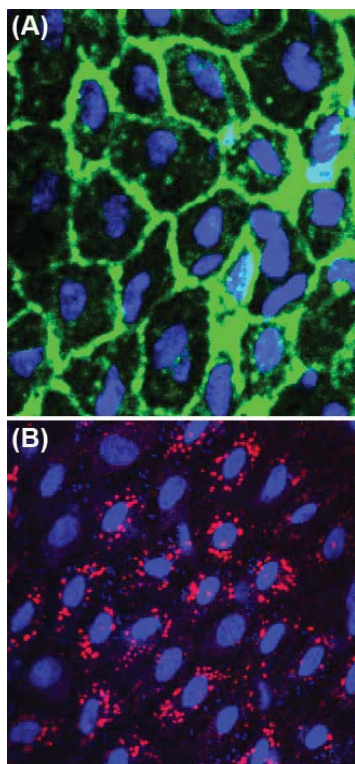


Fig. 2.14. Proteine membranare identificate prin imunofluorescență. (A) Proteina CD31 (abreviație de la *Cluster of Differentiation 31*), cunoscută și ca PECAM-1 (de la *Platelet Endothelial Cell Adhesion Molecule 1*) este uniform distribuită pe suprafața celulelor. (B) Conexina, o proteină ce formează joncțiuni comunicante (acestea organizându-se ca microdomenii de membrană) are o distribuție în pete în membrana celulară. (Imagini puse la dispoziție, cu amabilitate de Dr. Florea Lupu, University of Oklahoma Health Sciences Center.) © Florea Lupu, 2014.

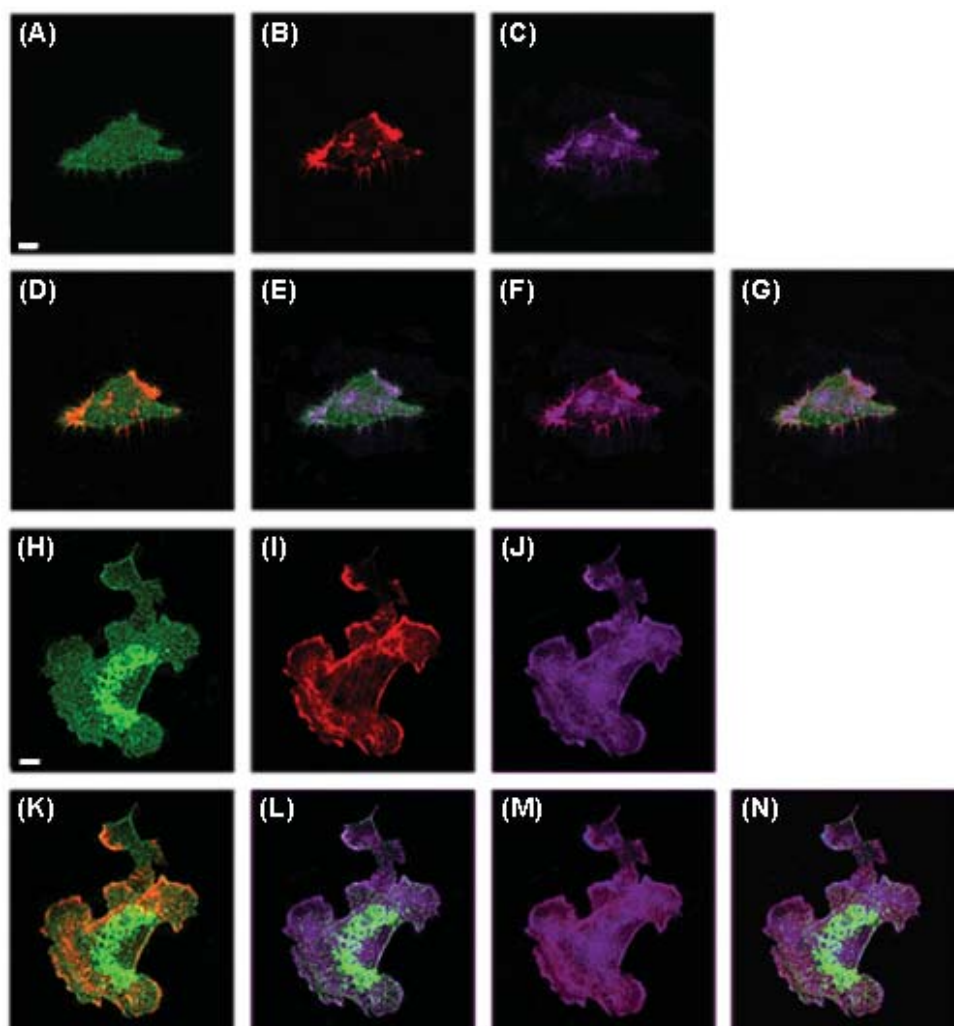


Fig. 1.15. Evidențieri prin microscopie de fluorescență a organizării și reorganizării unor proteine membranare și a citoscheletului actinic la celule în repaus (A-G), respectiv după stimulare cu factor de creștere epidermal, abreviat EGF, (H-N). În verde, este prezentată distribuția integrinei $\alpha 2 \beta 1$ (care se leagă de collagen) înainte (A), respectiv după stimularea celulară (H). Se observă că pe celulele în repaus integrina este distribuită uniform în pete mici, iar după expunere la EGF există o redistribuire cu aglomerarea semnificativă a proteinei la nivelul corpului celular, în timp ce la nivelul lamelipodiilor, extinse datorită stimulării celulei, se păstrează o distribuție în pete mici. În roșu, este reprezentată situația citoscheletului actinic. Acesta este distribuit preponderent cortical în celulele aflate în metabolism bazal (B), în timp ce după stimulare, alături de o mai accentuată organizare corticală, se formează fibre de stres și o rețea de filamente de actină la nivelul lamelipodiilor (I). În magenta, este evidențiat receptorul pentru EGF care se distribuie respectând citoscheletul actinic în celulele aflate în repaus (C) și se expune amplu pe suprafața membranară a celulei stimulate (J). În imaginile D-G se prezintă suprapunerile organizării la celula în repaus a diferitelor componente investigate pentru identificarea eventualelor co-localizări: integrina și actina (D), receptorul pentru EGF și integrina (E), receptorul pentru EGF și actina (F) sau pentru toate proteinele evidențiate (G). Aceleași posibile co-localizări pot fi urmărite pentru celulele stimulate în imaginile K-N: integrina și actina (K), receptorul pentru EGF și integrina (L), receptorul pentru EGF și actina (M) sau în cazul tuturor proteinelor studiate (N). Celulele supuse modelului experimental au fost atașate pe suprafețe de cultură acoperite cu collagen tip I. © Mircea Leabu, 2014.

Din cele discutate până aici rezultă că proteinele contribuie la caracteristicile structurale conferite membranelor de bistratul lipidic, nuanțându-le. Astfel, proteinele sporesc eterogenitatea compoziției membranelor ca și asimetria structurală a acestora.

Totuși, în ciuda complexității interacțiunilor pe care proteinele membranare le stabilesc între ele, cu lipidele membranare, sau (după cum veți constata în numeroase ocazii prin parcurgerea și însușirea informațiilor de biologie celulară a biomembranelor) cu elemente moleculare complexe intracelulare, ori din afara celulelor, aceste componente responsabile de funcțiile metabolice sunt mobile, mișcându-se în planul membranei. Punctând aspecte legate de dinamica proteinelor membranare, vom putea înțelege posibilitatea redistribuției lor în funcție de starea în care celulele se află (Fig. 2.16). Mai mult, reorganizările și redistribuirea elementelor biochimice la nivelul membranei permit celulei să își adapteze comportamentul la nevoile impuse de condițiile de mediu sau de propriile necesități.

2.3.4. Mobilitatea proteinelor membranare

Dinamicitatea proteinelor membranare se bazează pe două tipuri de mișcări: **mișcări de rotație** și **mișcări de translație**.

Mișcarea de rotație a proteinelor membranare în jurul propriei axe, denumită și **difuzie rotațională**, este de cel puțin 1000 de ori mai lentă decât a lipidelor. Este lesne de înțeles acest lucru gândindu-ne la diferențele de gabarit între lipide și proteine.

Mișcarea de translație, denumită și **difuzie laterală**, este și ea mult mai lentă decât a lipidelor, fiind în medie de 1μm/s. Lentoarea difuziei laterale a proteinelor nu trebuie înțeleasă numai prin diferențele de mărime între acestea și lipide, ci și prin interacțiunile pe care proteinele le stabilesc în mod dinamic între ele sau cu alte structuri dinăuntrul sau din afara celulei. Astfel aceeași proteină, în aceleași condiții de fluiditate a bistratului lipidic, se poate mișca mai repede sau mai încet în dependență de starea funcțională, de moment a ei (interacționează sau nu cu alte componente membranare, celulare sau extracelulare). Pe de altă parte, migrarea laterală a proteinelor membranare poate fi limitată, din considerente impuse de nevoile funcționale ale celulelor, numai la anumite domenii ale membranei. De exemplu, celulele polarizate ale epiteliilor unistratificate își creează și își păstrează o compoziție proteică diferită la nivelul membranei apicale, față de cea de la nivelul membranei latero-bazale; asta deoarece cele două domenii diferite ale membranei celulare au funcții diferite. Mai mult, mișcarea proteinelor membranare este limitată și din cauza îngrădirilor pe care le impun organizarea citoscheletului membranal și a filamentelor de actină din citoscheletul cortical. Au fost descrise trei niveluri ierarhice de îngrădire a mobilității proteinelor pe distanțe între 2 și 300nm, numite domenii de mezoscală: domeniul dinamicii complexelor proteice (3-10nm), domeniul plutelor lipidice (2-20nm) și domeniul compartimentării prin citoscheletul membranal/actina organizată cortical [15]. Toate aceste aspecte nuanțează dinamica proteinelor membranare într-un mod care se răsfrânge asupra funcțiilor, iar lipidele nu par a scăpa de împiedicări similare de libertate, chiar dacă rigoarea supunerii acestora nivelelor de restricții menționate este mai puțin rigidă.

Dovezile experimentale asupra translației proteinelor (difuziei laterale a proteinelor) în planul membranei au venit din observații colaterale, nu neapărat din experimente imaginate și conduse special pentru investigarea acesteia.

Prime dovezi au fost aduse în 1970 [16], când se urmărea obținerea de celule hibride între om și șoarece (așa-numiții heterocarioni). Pentru a se monitoriza fuziunea celulelor și obținerea heterocarionilor, cele două tipuri de celule au fost marcate cu anticorpi specifici, ce purtau fluorescențe de culori diferite. În celula hibridă s-a observat că fluorescențele inițial localizate separat, s-au amestecat după 40 de minute, distribuindu-se uniform în membrana heterocarionului. Această observație a fost explicată prin capacitatea proteinelor membranare de a difuza în planul membranelor cărora le aparțin.

Alte dovezi au venit din observațiile asupra fenomenelor de “**patching** / **capping**” pe care le-am putea denumi în românește **pătare (maculare)** / **calotare**, observate chiar la microscopul electronic în experimente corespunzător conduse [17]. Iată în ce constau aceste observații. Limfocitele, a căror suprafață era marcată inițial uniform cu anticorpi policlonali marcați cu feritină [17] sau cu fluorocromi [18], prezentau în timp aglomerări în pete, iar în cele din urmă feritina sau fluorescența se adunau în întregime polar, sub forma unei tichii (calote sferice). Explicația acestei realități experimentale nu putea fi dată decât acceptând că proteinele, distribuite inițial uniform în planul membranei, pot difuza lateral liber, iar ambivalența și caracterul policlonal al anticorpilor folosiți, prin legări încrucișate, contribuiau la unirea partenerilor de reacție în complexe din ce în ce mai mari, sfârșind prin formarea unui complex singular.

Al treilea tip de experimente, de această dată destinate studiului difuziei laterale a moleculelor individuale de rodopsină (cromoproteină cu fluorescență intrinsecă) din membranele discurilor celulelor cu bastonașe din retină, sunt cele care studiază refacerea fluorescenței după foto-stingere denumită prescurtat FRAP (de la “**Fluorescence Recovery After Photobleaching**”). Asemenea experimente au permis și estimarea coeficienților de difuziune, așadar aprecierea cantitativă a mișcării proteinelor membranare [19]. Ele se pot realiza și pentru proteine care nu sunt fluorescente de la sine, după ce acestea au fost marcate cu fluorocromi. Pe scurt, aceste experimente constau în stingerea fluorescenței unei zone micronice din membrană, prin acțiunea unui fascicul de lumină intens și puternic focalizat (de obicei rază laser) și în urmărirea refacerii fluorescenței în acea zonă, datorită difuziei moleculelor fluorescente din celelalte zone, neafectate (nestinse) ale membranei. În acest fel se pot măsura coeficienți de difuziune pentru proteine membranare din orice tip de celulă.

2.3.5. Rolul proteinelor membranare

Ca și în cazul lipidelor membranare, proteinele au atât **rol structural**, cât și **rol metabolic**. Este evident că atâta timp cât proteinele integrale sunt cufundate în bistratul lipidic rolul lor în organizarea membranei ca ultrastructură celulară (rolul structural) este unul intrinsec. Prezența proteinelor în bistrat nu trebuie să afecteze funcția de barieră selectivă conferită de însuși elementul de bază din organizarea membranelor. O bună exemplificare asupra rolului structural al proteinelor membranare îl constituie comentariul aferent citoscheletului membranar (vezi mai sus). Se poate adăuga rolul unor proteine transmembranare numite **caderine** în stabilirea joncțiunilor dintre celule, la nivelul țesuturilor sau a celor numite **integrine** (vezi CASETA 2.2) implicate, de regulă, în interacțiunea celulelor cu componente ale matricei extracelulare (proteine și/sau glicoproteine ce structurează diverse componente tisulare între celule). Rolul structural, al unor asemenea proteine transmembranare, este acela de a menține celulele într-o ordonare coerentă în organizarea țesuturilor, dar și de a permite acestora să schimbe informații pentru o integrare eficientă, iar schimbul de informații transcede funcția structurală; așadar atât caderinele, cât și integrinele au și funcții metabolice (vezi în capitolul 3, la subcapitolul “Semnalizarea celulară”). Asta înseamnă că nu se poate face o delimitare între cele două tipuri de funcții (lucru valabil și pentru lipide de altfel). Aceleași entități moleculare pot avea atât rol structural, cât și rol metabolic (vezi mai sus, ca exemplu, proteina banda 3 din membrana eritrocitară). Așa stau lucrurile și pentru integrine, respectiv caderine care au atât un important rol structural (atașarea celulelor la substrat sau unele de altele), cât și rol în culegerea de informații legate de ambianța în care celulele se găsesc, ceea ce le implică în declanșarea de procese celulare menite să creeze răspunsuri specifice condițiilor concrete din mediu.

CASETA 2.2. Integrinele și rolul lor. Integrinele sunt glicoproteine transmembranare, structurate ca heterodimeri (fiecare subunitate – α sau β – fiind o proteină unipas, de tipul I), cu rol în aderarea celulelor la matricea extracelulară și în transmiterea de informații legate de caracteristicile fizico-chimice ale structurilor macromoleculare din mediul extracelular. Există, identificate în momentul de față, 18 subunități α și 8 subunități β , care, prin diverse combinații, formează (după informațiile de care dispunem în acest moment) 24 de tipuri distincte de integrine. Acești heterodimeri diferiți au specificități diverse, atât sub aspectul partenerului de interacțiune din matricea extracelulară pe care îl leagă, cât și sub aspectul afinităților față de aceștia. Altfel spus, chiar dacă specificitatea integrinelor este un parametru degenerat (mai multe proteine de matrice se pot lega de aceeași integrină și mai multe integrine pot lega aceeași proteină de matrice), afinitatea acestor interacțiuni este diferită, iar semnalele pe care celula le primește după angajarea integrinelor în interacțiunile specifice sunt, de asemenea, diferite. Dacă rolul structural al integrinelor este relativ bine caracterizat, rolul metabolic al lor (procesele de semnalizare pe care le declanșează) este departe de a fi cu claritate elucidat, deși nu este contestat de nimeni în comunitatea științifică. Integrinele sunt implicate în controlul unor procese celulare ca diferențierea, moartea celulară programată, motilitatea. Toate aceste procese sunt importante atât în organizarea normală a țesuturilor și organelor, cât și în patologii dintre cele mai diverse. În aceste aspecte de biologie normală sau patologie celulară, integrinele cooperează cel puțin cu receptori pentru factori de creștere. Căile de semnalizare ce sunt inițiate de integrine se intersectează cu cele inițiate de receptori pentru factori de creștere [20], nuanțând într-o plajă largă capacitățile celulelor de a răspunde factorilor externi și asigurând o multitudine de posibilități de adaptare.

În general, atât pentru caderine, cât și pentru integrine se poate afirma că ele determină celula să se comporte diferențiat în funcție de statusul lor: un anumit comportament, atunci când sunt angrenate în interacțiuni cu alte celule, respectiv componente ale matricei celulare și un alt fel de comportament, atunci când sunt detașate din astfel de interacțiuni, iar gradele lor de libertate sporesc.

Detalii asupra rolurilor metabolice ale proteinelor membranare sunt prezentate în subcapitolele privind transportul membranar și semnalizarea celulară. Aici vom aminti, doar în linii generale, că rolurile metabolice ale proteinelor membranare se manifestă în ceea ce privește schimburile de substanță și informații dintre celule sau dintre acestea și mediu. Astfel, proteinele membranare pot fi **receptori** (pentru hormoni, factori de creștere, citokine, chemokine), **transportori prin membrană** (canale ionice, pompe ionice, conexoni, porine) sau **transportori cu membrană** (clatrină, caveolină: proteine ce structurează învelișuri ale unor microdomenii din membrană pentru a permite invaginarea acestora și detașarea sub formă de vezicule, realizând procese denumite generic endocitoză; alte proteine asigură fuzionarea unor vezicule cu membrana celulară, facilitând fenomenul de secreție prin exocitoză; vezi amănunte la transportul membranar).

Proteinele membranare mai pot funcționa ca **enzime** (metaloproteinaze pentru componente de matrice extracelulară, fosfolipaze – vezi diversitatea acestora, mai sus, la secțiunea despre rolul lipidelor membranare, kinaze, fosfataze) sau ca proteine implicate în **semnalizare** (de exemplu, proteine platformă/schelă, numite și proteine adaptoare sau proteine G). Detalii asupra mecanismelor prin care aceste proteine membranare își realizează funcțiile veți găsi (și trebuie folosite într-o discuție profesionistă despre această componentă moleculară a membranei) pe parcursul însușirii tuturor celorlalte informații despre celulă.

În toate aceste funcții asimetria structurării membranei este deosebit de importantă. Astfel, receptori, dar și proteinele de adeziune (caderinele și integrinele) prin asimetria lor structurală permit prin ectodomenii interacțiunea cu liganzii specifici, iar prin endodomenii asigură transmiterea informației către interiorul celulei și declanșarea unor procese celulare care se constituie în răspuns celular la semnalele receptate. De remarcat că în transmiterea semnalelor prin receptori sau integrine un rol important revine domeniului transmembranar al acestor proteine

integrale. Domeniile transmembranare au capacitatea de a suferi rearanjări conformaționale, induse de legarea ligandului. Aceste rearanjări conformaționale asigură transmiterea, din afara celulei în citoplasmă, a informației purtate de ligand și predate prin interacțiunea cu receptorul specific. Fenomenul de transmitere a informației din afara celulei în citoplasmă este denumit și transducție a semnalului. Informația, ajunsă la nivelul endodomeniului receptorului, este preluată, prelucrată și, de regulă, amplificată de participanții la diversele procese de semnalizare (mesageri secunzi și/sau efectori intracelulari, care vor fi definiți la secțiunea legată de semnalizarea celulară). De menționat aici că efectele asupra conformației domeniilor transmembranare sunt dependente și de aspectele legate de parametrul fizic fluiditate a membranei, detaliat mai sus, în secțiunea privitoare la starea fizică a bistratului lipidic.

În rezumat, proteinele membranare sporesc eterogenitatea compozițională și asimetria membranelor și modulează proprietățile fluide ale acestora, adică accentuează și modelează caracteristicile induse de bistratul lipidic. Altfel spus, proteinele membranare cooperează cu lipidele atât în structurarea membranei cât și în perfectarea funcționalității acesteia, prin rolul lor metabolic, cel care asigură integrarea celulei cu mediul. În exercitarea rolurilor lor metabolice, proteinele membranare pot antrena atât lipidele membranare, cât și componente citosolice sau extracelulare.

Bibliografie selectivă

1. **Steck TL.** (1974) The organization of proteins in the human red blood cell membrane. A review. *J Cell Biol.* **62**: 1-19.
2. **Schultz AM, Henderson LE, Oroszlan S.** (1988) Fatty acylation of proteins. *Annu Rev Cell Biol.* **4**: 611-647.
3. **Rodriguez-Boulon E, Powell SK.** (1992) Polarity of epithelial and neuronal cells. *Annu Rev Cell Biol.* **8**: 395-427.
4. **Spiro RG.** (2002) Protein glycosylation: nature, distribution, enzymatic formation, and disease implications of glycopeptide bonds. *Glycobiology.* **12**: 43R-56R.
5. **Marchesi VT, Furthmayr H, Tomita M.** (1976) The red cell membrane. *Annu Rev Biochem.* **45**: 667-98.
6. **Helenius A, Simons K.** (1975) Solubilization of membranes by detergents. *Biochim Biophys Acta.* **415**: 29-79.
7. **Chasis JA, Mohandas N.** (1992) Red blood cell glycophorins. *Blood.* **80**: 1869-1879.
8. **Tayyab S, Qasim MA.** (1988) Biochemistry and roles of glycophorin A. *Biochem Educ.* **16**: 63-66.
9. **Takakuwa Y.** (2001) Regulation of red cell membrane protein interactions: implications for red cell function. *Curr Opin Hematol.* **8**: 80-84.
10. **Williamson RC, Toye AM.** (2008) Glycophorin A: band 3 aid. *Blood Cells Mol Dis.* **41**: 35-43.
11. **Orlandi PA, Klotz FW, Haynes JD.** (1992) A malaria invasion receptor, the 175-kilodalton erythrocyte binding antigen of Plasmodium falciparum recognizes the terminal Neu5Ac(alpha2-3)Gal-sequences of glycophorin A. *J Cell Biol.* **116**: 901-909.
12. **Drickamer LK.** (1978) Orientation of the band 3 polypeptide from human erythrocyte membranes. Identification of NH₂-terminal sequence and site of carbohydrate attachment. *J Biol Chem.* **253**: 7242-7248.
13. **Vince JW, Reithmeier RA.** (1998) Carbonic anhydrase II binds to the carboxyl terminus of human band 3, the erythrocyte C₁-/HCO₃⁻ exchanger. *J Biol Chem.* **273**: 28430-28437.
14. **Kennedy SP, Warren SL, Forget BG, Morrow JS.** (1991) Ankyrin binds to the 15th repetitive unit of erythroid and nonerythroid beta-spectrin. *J Cell Biol.* **115**: 267-277.
15. **Kusumi A, Fujiwara TK, Chadda R, Xie M, Tsunoyama TA, Kalay Z, Kasai RS, Suzuki KG.** (2012) Dynamic organizing principles of the plasma membrane that regulate signal transduction: commemorating the fortieth anniversary of Singer and Nicolson's fluid-mosaic model. *Annu Rev Cell Dev Biol.* **28**: 215-250. doi: 10.1146/annurev-cellbio-100809-151736.

16. **Frye LD, Edidin M.** (1970) The rapid intermixing of cell surface antigens after formation of mouse-human heterokaryons. *J Cell Sci.* **7**: 319-335.
17. **de Petris S, Raff MC.** (1973) Normal distribution, patching and capping of lymphocyte surface immunoglobulin studied by electron microscopy. *Nat New Biol.* **241**(113): 257-259.
18. **Schreiner GF, Unanue ER.** (1975) The modulation of spontaneous and anti-Ig-stimulated motility of lymphocytes by cyclic nucleotides and adrenergic and cholinergic agents. *J Immunol.* **114**(2 pt 2): 802-808.
19. **Wey CL, Cone RA, Edidin MA.** (1981) Lateral diffusion of rhodopsin in photoreceptor cells measured by fluorescence photobleaching and recovery. *Biophys J.* **33**(2): 225-232.
20. **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.

2.4. Componenta glucidică a membranei

În afară de lipide și proteine, în organizarea moleculară a membranelor se întâlnesc și glucide. În ceea ce urmează vom folosi termenul de componentă glucidică a membranelor și nu de glucide membranare, pentru a fi, prin exprimare, mai aproape de realitatea biologică. Motivația acestei preferințe este dată de faptul că, în membranele celulare (ca și în endomembrane) glucidele nu se găsesc ca entități individuale, ci sunt grefate pe un purtător lipidic sau proteic, ca structuri în principal oligozaharidice, dar și polizaharidice. Componentele biochimice complexe formate din glucide și lipide sau din glucide și proteine poartă denumirea generică de **glicoconjugate**. Părțile glucidice ale glicoconjugatelor sunt dispuse întotdeauna pe fața externă a membranelor celulare, formând ceea ce denumim **glicocalix**. Încă de la început, în baza afirmației anterioare și rememorând faptul că pe fața internă a membranelor se află citoscheletul asociat, putem puncta faptul că prezența acestor două (ultra)structuri sporește asimetria membranelor. În cele ce urmează, abordând aspecte generale referitoare la prezența glucidelor în organizarea membranelor, vom adânci argumentarea nu numai pentru caracterul asimetric al structurării acestora, dar și pentru eterogenitatea compozițională a lor, respectiv pentru efectele asupra comportamentului fluid manifestat bidimensional.

2.4.1. Definiția glicocalixului și organizarea lui moleculară

Glicocalixul reprezintă învelișul glucidic al celulelor, constituit din structuri oligozaharidice sau polizaharidice inserate pe lipide ale foiței externe a bistratului sau pe proteine (adică pe ectoproteine, respectiv pe ectodomeniile proteinelor transmembranare). În privința modului de organizare a componentei glucidice a membranelor punctăm că glicolipidele poartă doar structuri oligozaharidice, în timp ce proteinele pot purta atât structuri oligozaharidice, cât și polizaharidice.

Din punctul de vedere al structurii biochimice globale, trei sunt componentele membranare ce participă la structurarea glicocalixului prin părțile glucidice din compoziția lor: **glicolipidele**, **glicoproteinele** și **proteoglicanii**. Toate cele trei categorii de componente sunt denumite generic, repetăm, **glicoconjugate**. Grosimea glicocalixului este, în medie, între 20 și 50nm, variind de la un tip de celulă la altul, dar și pentru aceeași celulă de la un domeniu membranar la altul (spre exemplu la celulele epiteliiilor unistratificate între polul apical și cel latero-bazal). Sunt însă raportări de grosimi ale glicocalixului ce pot ajunge până la 200 și chiar 2000nm [1]. O regulă pe care o aplicăm în înțelegerea grosimii glicocalixului este că acesta are o grosime cu atât mai mare, cu cât celulele sunt mai puțin implicate în interacțiuni cu alte celule sau cu substrate din matricea extracelulară. Aplicând această regulă vom intui că glicocalixul cel mai gros îl prezintă celulele sanguine. Pe de altă parte, la celulele epiteliiilor monostratificate, polul apical are un glicocalix mai abundent, față de polul latero-bazal. La celulele epiteliiilor în monostrat definim două **domenii membranare**¹¹: **domeniul apical**, situat la polul orientat către cavitățile pe care aceste epitelii le căpтуșesc (polul apical al celulei), respectiv **domeniul latero-bazal**, situat către spațiile dintre membranele a două celule învecinate ale epiteliiului și, respectiv, către **membrana bazală**, element al matricei extracelulare prin care aceste epitelii se atașează de structurile tisulare (polul latero-bazal al celulei). Mai mult, acolo unde mediul din cavitatea căpтуșită de celulele epiteliale monostratificate este puternic agresiv (de exemplu în stomac, sau în intestin), glicocalixul este îngroșat de secreții glicoproteice de tip mucinic (vezi, mai

¹¹ Atragem atenția a nu se face confuzie între noțiunea de domeniu membranar și cea de microdomeniu de membrană.

jos, prin ce se caracterizează glicoproteinele de tip mucinic, numite mai scurt mucine, din mucusul diferitelor structuri).

În cele ce urmează vom discuta aspectele cu caracter general legate de organizarea glicocalixului. În privința argumentării pentru participarea componentei glucidice la sporirea eterogenității biochimice a membranei, nu vom proceda la metoda clasificării structurilor zaharidice din glicocalix. Ar fi o muncă greu de dus la bun sfârșit, întrucât complexitatea și diversitatea structurală a lanțurilor oligozaharidice de la nivelul acestui înveliș glucidic al celulelor face abordarea detaliilor dificilă, dar și ineficientă și fără justificare în raport cu scopul nostru: cunoașterea organizării membranei la nivel molecular, pentru a înțelege funcționarea ei ca un sistem integrat. Această modificare a modalității de abordare nu va afecta cu nimic înțelegerea organizării acestei componente moleculare a membranelor și a rolului ei, ci doar va simplifica transmiterea cunoștințelor în toată diversitatea lor.

În structurarea glicocalixului nu participă toate monozaharidele existente în natură. Numai șapte intră, de regulă, în alcătuirea lanțurilor oligozaharidice ale glicolipidelor și glicoproteinelor. Acestea sunt, într-o ordine lipsită de o anumită semnificație: **glucoza** (Glc), **galactoza** (Gal), **manoza** (Man), **fucoza** (Fuc), **N-acetil-glucozamina** (GlcNAc), **N-acetil-galactozamina** (GalNAc) și **acizii sialici** (SA). Spunem acizi sialici (la plural) și nu folosim singularul deoarece ne referim la o clasă de glucide ce derivă din structura de bază a acidului neuraminic (Fig. 2.16), un glucid cu 9 atomi de carbon în moleculă, cel din poziția 1 aflându-se într-o grupare carboxil (de unde și numele de acid). De la acidul neuraminic derivă primii reprezentanți a două serii: **acidul N-acetil-neuraminic** (NANA), cel mai răspândit și **acidul N-glicolil-neuraminic**. Dar diversitatea acizilor sialici nu se oprește aici, deoarece reprezentanții de bază pot fi O-acetilați la hidroxilii de la carbonii 4, 7, 8 și/sau 9. Ținând cont că pot fi mono-, di- sau, mai rar, chiar tri-acetilați ne facem o idee mai exactă asupra diversității entităților moleculare incluse sub numele de clasă acizi sialici. Speciile tetra-acetilate nu se întâlnesc în glicocalix și este lesne să raționăm de ce: sunt componente deosebit de hidrofobe și nu pot fi acomodate acolo, într-o formațiune ultrastructurală prin excelență hidrofilă. Această diversitate enormă de tipuri de acizi sialici se constituie, iată, ca o primă argumentare a eterogenității structurilor glucidice ale glicocalixului.

În afară de cele șapte monozaharide menționate, în proteoglicani întâlnim și **xiloza** (monozaharidul prin care se poate lega structura glucidică de o serină din partea proteică), precum și **acizi uronici** (acid glucuronic și acid iduronic).

Dacă ar fi să ne referim la detalii fizico-chimice care caracterizează monozaharidele menționate, putem afirma că numai Fuc este din seria L, toate celelalte aparținând seriei D.

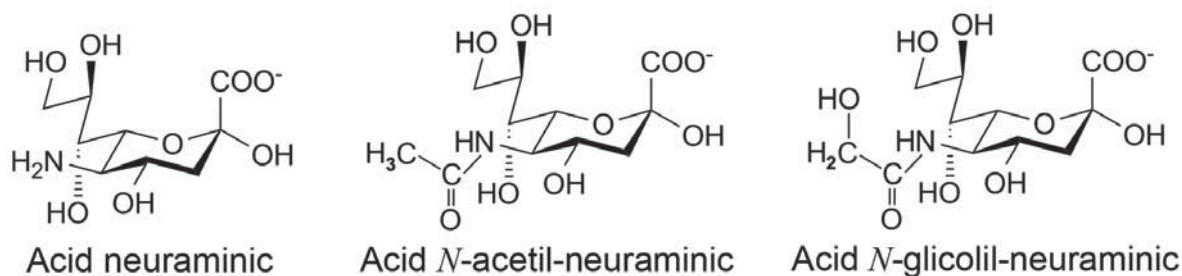


Fig. 2.16. Structurile de bază ale seriilor de acizi sialici. Acidul neuraminic nu a fost identificat ca atare în componenta glucidică a biomembranelor, ci doar derivații *N*-acetil- și *N*-glicolil- ai săi.

Prin enumerarea monozaharidelor ce participă la structurarea lanțurilor oligo- sau poli-zaharidice ce organizează glicocalixul accentuăm ideea de eterogenitate structurală a membranelor celulare și, în general, a biomembranelor. Dar lucrurile nu se opresc doar la acest nivel. Pentru argumentarea caracterului eterogen al structurării membranelor (indus de lipide, apoi amplificat de proteine, dar și de structurile glucidice) trebuie să subliniem că înșiruirea glucidelor în lanțurile oligozaharidice nu este aceeași, diferind între glicolipide și glicoproteine, diferind între diversele glicolipide, diferind între diversele glicoproteine. Mai mult, legarea monozaharidelor între ele se poate face în mai multe moduri, întrucât există mai multe grupări hidroxil disponibile. E drept că nu toate din aceste posibilități sunt utilizate de celule. Diversitatea de posibilități teoretice este limitată de tipurile de **glicoziltransferaze** (numele generic pentru enzimele care biosintetizează structuri glucidice în celule) pe care o anumită celulă le are în reticulul endoplasmic și în complexul Golgi, organitele unde structurile glucidice din glicolipide, glicoproteine, sau proteoglicani sunt biosintetizate. Glicoziltransferazele sunt enzime cu stereospecificitate foarte ridicată, astfel încât legarea, pas cu pas, a glucidelor unul de altul în structurile oligozaharidice, din glicolipide și glicoproteine, nu este întâmplătoare.

Între glicolipide, glicoproteine și proteoglicani există însemnate diferențe structurale la nivelul componentei glucidice.

Glicolipidele, care constituie ~10% dintre lipidele membranare, conțin un singur lanț oligozaharidic, de regulă neramificat. Lanțurile glucidice din glicolipide conțin, în general, mai puține monozaharide (rar peste 13-15). Pentru a avea o imagine corectă a organizării spațiale a lanțurilor, vom menționa că acestea nu au traiect liniar ci sunt “contorsionate”, tocmai datorită orientării grupărilor hidroxil utilizate la lungirea oligomerului glucidic (rezultat al stereospecificității glicoziltransferazelor).

Glicoproteinele conțin uzual mai multe lanțuri oligozaharidice grefate pe lanțul polipeptidic. Inserarea se poate face la **azotul amidic al unei asparagine** aflate întotdeauna într-o secvență consens (vezi la secțiunea despre biogeneza membranelor, în volumul al II-lea) sau la **hidroxilul** dintr-o **serină** ori dintr-o **treonină**. În primul caz structurile glucidice se numesc **N-glicozidice**, în cel de-al doilea **O-glicozidice**. Structurile O-glicozidice (legate la serină sau treonină) sunt abundente în glicoproteinele de tip mucinic. De aceea aceste tipuri de oligozaharide din proteine sunt denumite și structuri mucinice. Structurile N-glicozidice conțin Man, cele O-glicozidice nu. Lanțurile oligozaharidice ale glicoproteinelor sunt ramificate. Ramificarea se face după principiul dihotomic (adică din fiecare punct de ramificare pleacă numai două ramuri). De regulă, din câte se cunoaște până în prezent, există unul sau două puncte de ramificare, astfel încât fiecare structură oligozaharidică din glicoproteine poate fi biantenară sau triantenară. Structurile oligozaharidice ale glicoproteinelor conțin, de regulă, un număr semnificativ mai mare de monozaharide, în comparație cu cele ale glicolipidelor.

Privind succesiunea monozaharidelor în lanțurile oligozaharidice din glicolipide și glicoproteine, se pot face următoarele afirmații cu caracter de regulă: (i) glucoza, atunci când se află, nu se găsește niciodată în poziție terminală a lanțului; (ii) acizii sialici, atunci când se află (și de regulă se află), se găsesc întotdeauna în poziția terminală a lanțului. Regula nu este încălcată nici atunci când o moleculă de acid sialic se află subterminal. Aceasta înseamnă că lanțurile se pot termina cu acizi sialici legați unul de altul. Un aspect cu semnificație biologică (vezi mai jos la secțiunea despre rolul glicocalixului) ce trebuie punctat aici este faptul că, de regulă, structurile glucidice din glicolipide și glicoproteine se termină cu elemente purtătoare de sarcină negativă (dacă nu cu acid sialic, cum se întâmplă cel mai adesea, atunci cu un glucid care suferă o sulfatare la unul dintre hidroxili).

Deși proteoglicanii sunt mai slab reprezentați la nivelul membranelor celulare, ceea ce a determinat și evidențierea mai târzie a prezenței lor în glicocalix, contribuția acestora la structurarea componentei glucidice a membranelor nu poate fi neglijată, din cel puțin două motive. În primul rând încărcătura lor glucidică depășește cu mult componenta proteică (90-95% de masă glucide, 5-10% maxim proteină în structura proteoglicanilor, în timp ce în glicoproteine raportul masic glucide/proteine este subunitar) și, în al doilea rând, structurile glucidice (polizaharidice) sunt cele mai lungi dintre toate cele întâlnite la nivelul glicocalixului. Diferențele de organizare la nivel chimic dintre glicoproteine și proteoglicani îndreptătesc biochimistii să le considere două tipuri diferite de glicoconjugate, deși ambele au în structură lanț polipeptidic și glucide. Lanțurile polizaharidice ale proteoglicanilor poartă denumirea de **glicozaminoglicani**. Glicozaminoglicanii sunt structuri polizaharidice neramificate, formate din unități dizaharidice repetitive alcătuite dintr-un zahar sau aminozaahar și un acid uronic (acid glucuronic sau iduronic). Excepția de la această descriere de principiu a compoziției moleculare o prezintă keratan-sulfatii în care unitățile dizaharidice repetitive conțin Gal (un zahar) și GlcNAc (derivat de aminozaahar). De subliniat și în acest context, puternica încărcătură negativă a proteoglicanilor provenită atât de la acizii uronici conținuți, cât și de la sulfatările pe care le pot conține zaharurile sau aminozaaharurile prezente în moleculele glicozaminoglicanilor. Această puternică încărcătură negativă se răsfrânge asupra caracteristicilor fizice ale suprafeței celulare. Toate celulele din organism poartă o sarcină negativă netă pe suprafața lor, iar aceasta se datorează, în principal, structurilor glucidice din glicocalix.

2.4.2. Metodologia de studiu a glicocalixului

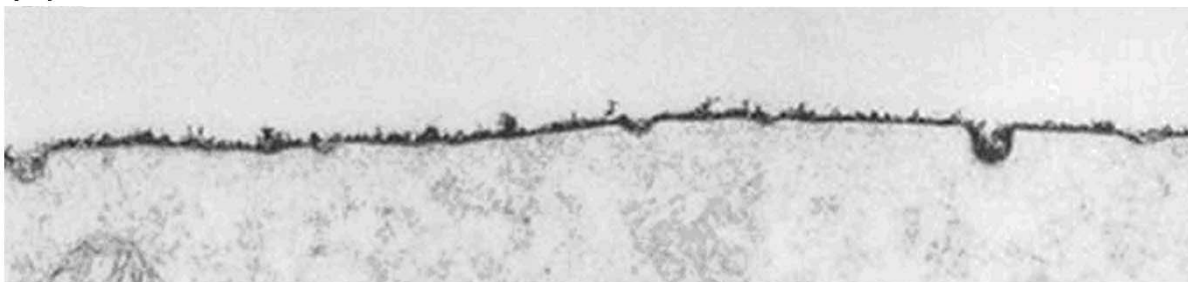
Prezența glicocalixului la suprafața celulelor a fost evidențiată la microscopul electronic prin metode de **citochimie ultrastructurală** atât nespecifice (adică metode care evidențiază structura, fără a aduce indicii referitoare la compoziția ei biochimică), cât și specifice (metode care permit descrierea, cel puțin parțială, a biochimiei structurii).

Ca un prim exemplu de metodă nespecifică amintim folosirea **roșului de ruteniu** (Fig. 2. 18, A). Acest compus interacționează cu sarcinile negative de la nivelul glicocalixului impregnându-i grosimea cu nucleii grei ai ruteniului și conferind structurii electrono-opacitate. Putem caracteriza prin această metodă glicocalixul sub aspectul grosimii sale și al densității lanțurilor glucidice care îl formează.

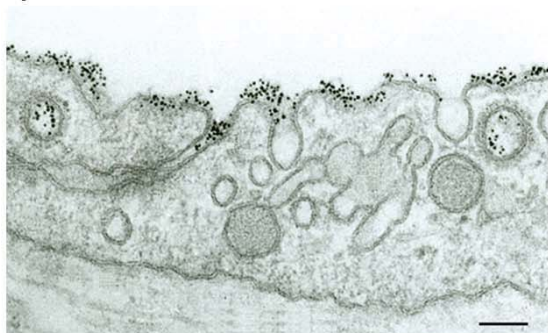
O altă modalitate nespecifică de a evidenția glicocalixul este aceea de a vizualiza densitatea de sarcini negative de la suprafața celulelor, prin folosirea de trasori electrono-denși purtători de sarcini pozitive. Acest lucru se poate face cu proteine cationizate (care la pH fiziologic poartă sarcină netă pozitivă) adsorbite pe particule de aur coloidal (Fig. 2. 17, B și C). Caracterul particulat al trasorilor electrono-opaci cu aur coloidal permite evidențierea mai multor aspecte legate de organizarea învelișului exterior al membranelor, cum ar fi: abundența de elemente purtătoare de sarcini negative, distribuția lor pe diverse microdomenii de membrană, dar și grosimea ultrastructurii purtătoare a sarcinilor negative. În ciuda acestor detalii, metodele cu roșu de ruteniu și cu trasori electrono-denși cationizați rămân nespecifice, deoarece nu se adresează tipurilor de elemente biochimice care determină marcările. Știm acum că ele sunt componente glucidice purtătoare de funcțiuni negative (grupări carboxil sau grupări sulfat esterificate pe hidroxili ai glucidelor).

Ca metodă specifică pentru studiul glicocalixului prezentăm **citochimia ultrastructurală cu lectine** [2, 3].

(A)



(B)



(C)

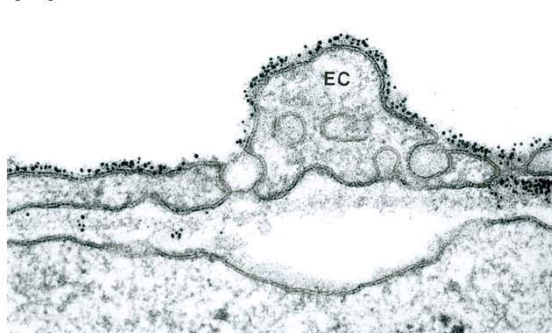


Fig. 2. 17. Identificarea nespecifică a glicocalixului de la suprafața celulelor pe baza încărcării negative pe care o poartă multe din glucidele componente. **A.** Decorarea suprafeței celulare cu roșu de ruteniu. **B, C.** Evidențierea încărcării negative a suprafeței luminale a celulelor endoteliale din capilarele creierului (B), respectiv pancreasului endocrin (C) cu ajutorul albuminei serice bovine cationizate, adsorbită pe aur coloidal de 10nm. Calitatea preparatelor ne permite să evidențiem limpede și aspectul trilaminat al membranelor în microscopia electronică de transmisie standard. (Imagini puse la dispoziție, cu amabilitate, de Dr. Nicolae Ghinea, Département Recherche Translationnelle, Institute Curie, Paris.) © Nicolae Ghinea și Mircea Leabu, 2014.

Lectinele¹² sunt proteine sau glicoproteine ce leagă specific structuri glucidice, au cel puțin două situri de legare identice și nu sunt de origine imună (adică nu sunt anticorpi împotriva unor epitopi ce conțin glucide). Pentru fiecare lectină există un monozaharid determinant al specificității, dar ambianța moleculară în care acesta se află este, de asemenea importantă. Lectinele mai sunt cunoscute și sub denumirea de aglutinine deoarece, mulțumită capacității lor de a interacționa cu structurile glucidice, cât și datorită faptului că prezintă cel puțin două situri identice de legare, pot aglutina celulele sanguine. Lectinele au fost inițial identificate în plante și extrase din acestea (de regulă din semințe). Ulterior, activități de tip lectinic au fost evidențiate și în organismele animale, fiind implicate într-o multitudine de procese celulare (vezi câteva exemplificări, mai jos, la secțiunea referitoare la rolul glicocalixului).

În citochima ultrastructurală lectinele pot fi folosite după cuplare cu **trasori electrono-opaci (feritină, peroxidază de hrean, hempeptizi, aur coloidal)**, în tehnici directe sau sub formă nativă, în tehnici indirecte (în sandwich), metode în doi pași. La primul pas, suprafața celulelor este incubată cu lectina aflată în exces în soluția folosită, pentru saturarea interacțiunilor de afinitate. Excesul de molecule de lectină este apoi îndepărtat, rămânând numai cele atașate specific de componente glucidice ale membranei (prin unul din siturile de legare), care sunt vizualizate, în pasul al doilea al metodei, prin legarea de glicoproteine corespunzătoare, cuplate cu trasori electrono-opaci. Tehnicile indirecte, în doi pași, pentru citochimia ultrastructurală cu lectine exploatează existența celor două situri identice de legare

¹² Atragem atenția a nu se confunda termenul lectină cu cel de lecitină (nume generic pentru fosfatidilcoline).

ale uneltei de investigare. Glicoproteinele marcate cu trasorul electrono-opac se fixează pe siturile de interacțiune ale lectinelor rămase disponibile, după legarea cu unul din situri la componentele glicocalixului. Avantajul acestor metode este că lectinele sunt folosite cu capacitățile de legare (afinitatea și specificitatea) nealterate. Afinitatea și specificitatea acestor unelte de studiu pot fi afectate în cazul folosirii unor conjugate lectină-trasor electrono-opac, din cauza reacțiilor chimice petrecute în timpul cuplării sau posibilelor împiedicări sterice care pot apărea în conjugat.

A fost folosită o mare gamă de lectine pentru caracterizarea parțială a glicocalixului diverselor tipuri de celule (Fig. 2. 18). Amintim aici pe cele mai des utilizate, cu glucidul determinant al specificității lor.

Concanavalina A (ConA), o lectină din *Concanavalia ensiformis*, care leagă α -Man dintr-un miez trimanozidic al structurilor N-glicozidice sau α -Glc aflată în poziție terminală. Rezultă că la nivelul glicocalixului ConA nu se leagă de Glc, aceasta nefiind situată în poziție terminală (Fig. 2.18, A și E).

Lectina I din *Ulex europaeus* (UEA I),¹³ care recunoaște α -Fuc aflată în poziție terminală a lanțului oligozaharidic.

Lectina din *Dolichos biflorus* (DBA) interacționează cu structuri ce conțin α -GalNAc legată de o altă GalNAc.

O altă lectină ce leagă α -GalNAc, însă inserată pe o Gal, este cea din *Helix pomatia* (HPA).

Pentru β -Gal sunt folosite lectina din arahide (PNA) și/sau lectina I din *Ricinus communis* (RCA I). Specificitățile celor două lectine sunt însă diferite. PNA (Fig. 2.18, D) se leagă exclusiv de Gal aflată în poziție terminală, în timp ce RCA I (Fig. 2.18, C și G) poate recunoaște și Gal aflată în poziție subterminală, dacă acidul sialic terminal este inserat la hidroxilul de la carbonul șase al acesteia. Mai mult, ambianța în care galactoza terminală se află în cadrul secvenței glucidice este diferită pentru ce leagă PNA, față de ce leagă RCA I. Așadar specificitățile celor două lectine sunt nuanțate.

Au fost folosite două lectine și pentru evidențierea citochimică a acizilor sialici. Acestea sunt lectina din germenii de grâu (WGA) și lectina din *Limulus polyphemus* (LPA). WGA (Fig. 2.18, B și F) recunoaște acidul N-acetil-neuraminic-4-O-acetil, dar și β -GlcNAc. LPA se leagă de acizi sialici atât din categoria celor N-acetilați, cât și din categoria celor N-glicolilați.

Nuanțările din specificitățile acestor lectine sunt bine cunoscute sub aspectul secvențelor în care trebuie să se afle glucidul determinant al specificității. Utilizarea lor aduce astfel informații nu numai asupra prezenței și abundenței tipurilor de glucide din compoziția glicocalixului, dar și în ceea ce privește caracterizarea parțială a structurilor oligozaharidice, a secvențelor acestora. Cu cât spectrul lectinelor folosite este mai larg, cu atât imaginea asupra glicocalixului este mai detaliată. În plus, combinarea acestor metode cu folosirea **exo-** sau **endo-glicozidazelor**, pentru degradarea specifică secvențială sau globală a lanțurilor glucidice, completează fericit caracterizarea citochimică a glicocalixului. Trebuie însă menționat că informațiile complete asupra structurilor glucidice ale glicocalixului le aduc tot metodele biochimice, prin care putem segrega între glicolipide, glicoproteine și proteoglicani, putem izola și caracteriza entitățile moleculare. Mai mult, subtilele implicații ale structurilor glucidice din glicocalix asupra funcționării membranelor se vor putea descifra numai prin folosirea metodelor de manipulare genetică asupra enzimelor care elaborează lanțurile glucidice ale suprafețelor membranare. Acestea sunt provocări ale timpurilor (nu prea îndepărtate) ce vor să vină în cercetarea de biologie celulară și moleculară.

¹³ În toate abreviațiile care urmează pentru lectine, "A" vine de la termenul aglutinină. Toate abreviațiile sunt cele folosite internațional.

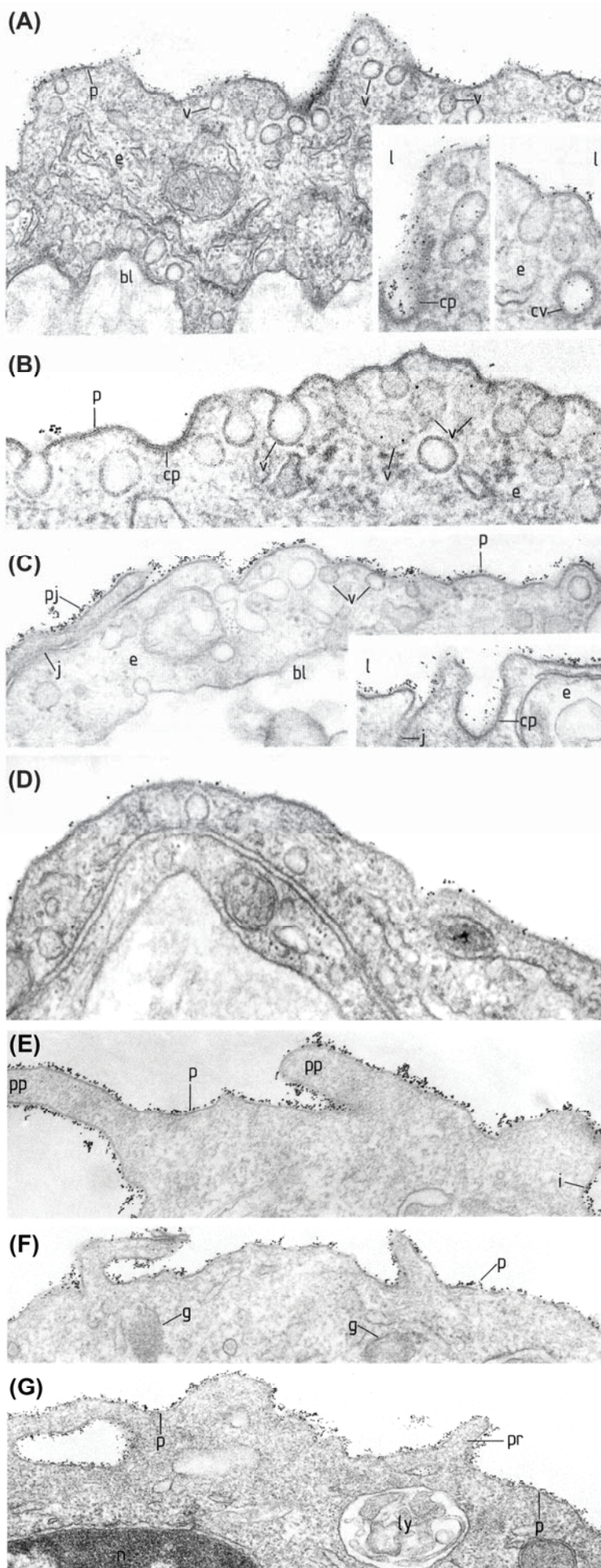


Fig. 2.18. Caracterizarea glicocalixului pentru celule endoteliale (A-D), respectiv monocite sanguine (E-G), prin citochimie ultrastructurală cu lectine, utilizând tehnici indirecte. Trăsorii electrono-opaci reprezintă aur coloidal de 5nm, adsorbit cu glicoproteine corespunzătoare specificității lectinelor utilizate. Observăm că structurile *N*-glicozidice, evidențiate cu ConA sunt abundente și uniform distribuite pe suprafața endotelului (A) și a monocitelor (E), dar în număr mai mare pe celulele sanguine. Acizii sialici identificați de WGA sunt slab reprezentați pe suprafața luminală a celulelor endoteliale (B), dar abundenți la suprafața monocitelor (F). Structurile glucidice recunoscute de RCA I sunt abundente atât pe suprafața endotelului (C), cât și pe cea a monocitelor circulante (G). Comparând legarea abundentă a RCA I pe suprafața luminală a celulelor endoteliale (C), cu legarea relativ săracă a PNA (D), deducem că la suprafața endotelului avem abundență de galactoză ce poartă la hidroxilul carbonului șase acid sialic și sărăcie de structuri oligozaharidice terminate în galactoză. © Mircea Leabu, 2014.

Așadar, speranța în ceea ce privește rezolvarea problemei caracterizării glicocalixului și în general a biologiei glucidelor celulare, sub aspectul funcțiilor lor, o reprezintă biologia moleculară prin capacitatea de a identifica și modela bagajul enzimatic celular implicat.

Pentru a integra informațiile structurale prezentate mai sus, cu scopul de a înțelege organizarea spațială a glicocalixului, putem rezuma că acest înveliș celular trebuie perceput ca o lizieră, ca un lăstăriș din ce în ce mai des pe măsură ce pătrundem de la exteriorul structurii către bistratul lipidic. El se caracterizează prin eterogenitate compozițională și de organizare, sporind asimetria membranelor, deoarece este prezent numai pe versantul extern. Această organizare a sugerat și primele idei asupra funcțiilor glicocalixului.

2.4.3. Rolul glicocalixului

Prin asemănare cu rolul protector al părții glucidice din glicoproteine împotriva acțiunii proteazelor, se poate afirma că glicocalixul protejează structura membranei celulare împotriva agresiunilor fizico-(bio)chimice. Lucrul acesta nu este departe de realitatea biologică. Modul în care glicocalixul este organizat, conferă membranei rezistență mecanică, controlând accesul oricăror factori de agresiune către straturile profunde ale ultrastructurii, deci către bistratul lipidic și către componentele proteice ale acesteia. Rolul acesta este cu atât mai important cu cât prezența factorilor agresivi este mai mare. Aceasta este o motivație pentru care celulele sanguine sau polii apicali ai celulelor epiteliale dispuse în monostrat au glicocalixul abundent. Mai mult, în anumite situații în care agresiunile pot fi mai accentuate, membranele sunt protejate de secreții glicoproteice abundente (de exemplu în mucoasele gastrice și intestinale).

Dar glicocalixul nu este, nici pe departe, important numai pentru acest aspect. Prin componentele acide din structura lor (acizii sialici, acizii uronici, grupările sulfat), lanțurile oligo-/poli-zaharidice ale glicocalixului participă la asigurarea sarcinii negative a suprafeței celulare. Încărcătura negativă a suprafeței celulare, o caracteristică general valabilă tuturor celulelor, face ca interacțiunile dintre acestea să nu se poată realiza decât sub control celular, în zone (microdomenii) ale membranelor înalt specializate în realizarea acestei funcții. În aceste zone, se formează ceea ce numim joncțiuni celulare (vezi în volumul al II-lea, la subcapitolul despre joncțiunile celulare), structuri specializate ale membranelor cu organizări și funcții diverse. Stabilirea joncțiunilor celulare are la bază fenomene de recunoaștere celulară în care sunt implicate și componente glucidice ale membranelor. Participarea structurilor glucidice (de regulă prin glucidul terminal) în fenomenele de recunoaștere celulară reprezintă o explicație pentru care glucoza nu se găsește în poziție terminală; glucoza este glucidul aflat liber în umorile organismelor și ar competiționa structurile glucidice ale glicocalixului în interacțiunile pe care ar trebui să le stabilească în diferitele procese de recunoaștere, interferând cu funcțiile acestora și împiedicând celula să le controleze eficient.

Așadar, componentele structurale ale glicocalixului (componentele glucidice ale membranelor) sunt implicate în fenomene de recunoaștere celulară, cu rol în organizarea de țesuturi și organe, atât prin interacțiuni ale celulelor între ele, cât și prin aderarea acestora la substrate extracelulare (la componente ale matricei extracelulare). Se formează astfel ultrastructuri cu caracter permanent sau cu existență de lungă durată. În ciuda caracterului lor permanent sau de lungă durată, aceste elemente ultrastructurale de la nivelul membranelor nu trebuie înțelese ca rigide și imuabile. Ele sunt într-o permanentă dinamică, răspunzând nevoilor celulei în ceea ce privește amploarea lor, capacitatea de a se forma și desface în diferite zone ale membranelor celulare sau capacitatea de a implica în momente diferite componente moleculare diverse, pentru a-și nuanța funcția. Caracterul permanent

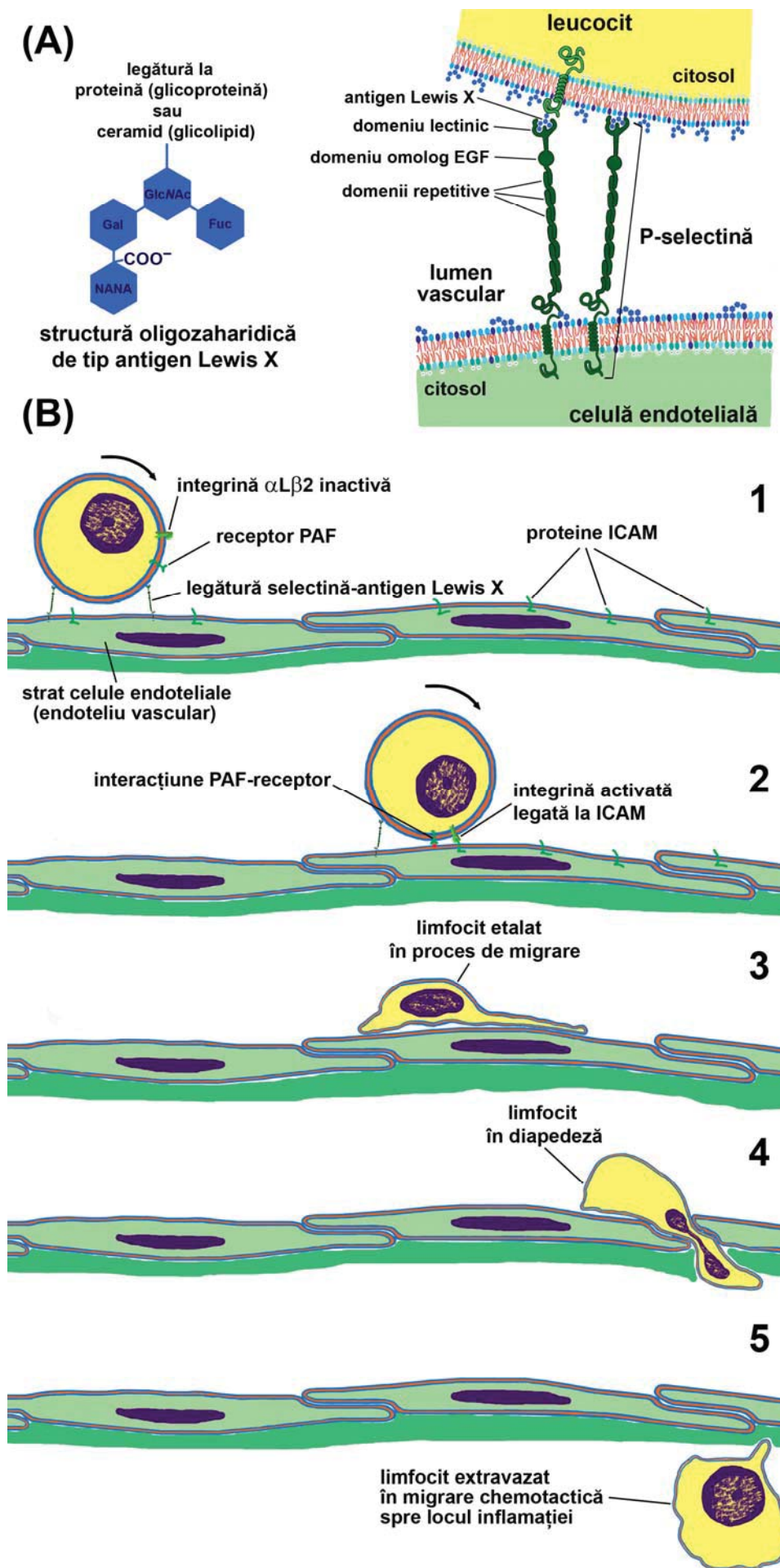
sau de lungă durată al existenței lor trebuie înțeles în sensul că întotdeauna celulele prezintă asemenea ultrastructuri necesare organizării țesuturilor.

Aspectele menționate mai sus ne pot da o semnificație biologică a faptului că toate celulele din organism poartă la suprafață o sarcină negativă netă. Această realitate face imposibilă interacțiunea și agregarea nespecifică (doar pe baza unor posibile interacțiuni electrostatice) a celulelor. Ca să înțelegem și mai pregnant importanța acestei încărcături electrice a suprafeței celulelor, să ne gândim ce s-ar întâmpla dacă în sânge unele celule ar purta sarcină electrică de suprafață pozitivă, iar altele negativă. Celulele ar agrega nespecific, iar circulația sanguină ar fi blocată, apărând fenomene de embolie; organismul nu ar putea supraviețui.

Există fenomene fiziologice care se desfășoară pe baza unor modificări ale structurilor glucidice ale suprafeței celulare. De exemplu, eritrocitele de mamifer după desialilarea structurilor din glicocalix sunt eliminate din circulație la nivelul ficatului și splinei [4]. Pierderea de acid sialic din poziția terminală a structurilor glucidice din glicocalix reprezintă semnal de îmbătrânire a acestor celule. De asemenea, plachetele sanguine desialilate își micșorează timpul de viață în circulație și determină sporirea trombocitopoiezei [5]. Eliminarea din circulație a celulelor cu structurile glucidice desialilate implică receptori cu activitate lectinică îndreptată împotriva galactozei ajunsă în poziție terminală, receptori aflați în membrana și expuși la suprafața celulelor cu rol de macrofage din organele curățitoare. Fenomenele de recunoaștere celulară sunt implicate și în procese biologice în care interacțiunile dintre celulele participante sunt temporare și tranzitorii. Exemplificăm prin (i) ceea ce se întâmplă la **extravazarea leucocitelor** în zonele de inflamare tisulară și (ii) prin implicarea structurilor glucidice în procesul de **fertilizare**.

(i) **Extravazarea celulelor sanguine** (leucocitelor) are loc printr-un proces al cărui efect este trecerea lor printre celulele endoteliale, din fluxul sanguin în țesuturi, fenomen denumit **diapedeză**. Diapedeza se produce sub acțiunea unei varietăți de stimuli, care depind de și diferențiază procesele biologice ce duc la extravazarea diferitelor tipuri de celule sanguine [6-8]. Recrutarea leucocitelor aflate marginal în fluxul sanguin din vasele de sânge aflate la nivelul zonelor inflamatorii, implică structurile glucidice ale glicocalixului acestora (Fig. 2.19, A). Este vorba de interacțiunea dintre o proteină membranară cu activitatea de tip lectină (proteină care apare tranzitoriu la suprafața celulei endoteliale) și o structură glucidică din glicocalixul leucocitelor antrenate de fluxul sanguin în capilarele din zonele inflamatorii. Cum se petrec, în linii mari, fenomenele (Fig. 2.19) descriem în cele ce urmează, încercând să punctăm elementele esențiale ale fenomenelor.

Fig. 2. 19. Fenomenele celulare și moleculare care se petrec în cursul extravazării limfocitelor în zonele inflamatorii. Procesul este inițiat de interacțiuni care implică glicocalixul limfocitului și anume a unor structuri oligozaharidice numite antigene Lewis X (A), care sunt purtate atât de proteine (glicoproteine), cât și de lipide (glicolipide). Aceste oligozaharide sunt legate de selectine expuse la suprafața celulelor endoteliale activate din zonele inflamatorii (A și B-1). Aceste interacțiuni, de joasă afinitate, încetinesc limfocitele marginale și le determină o rostogolire la suprafața luminală a endoteliului. Evenimentul facilitează interacțiunea unui receptor specific cu factorul de activare plachetară (PAF), care este produs de celulele endoteliale sub acțiunea stimulilor eliberați de procesul inflamator (B-2). Interacțiunea receptorului cu PAF stimulează limfocitul, prin aceasta rezultând activarea integrinei $\alpha\text{L}\beta 2$, care se leagă de partenerul expus constitutiv la suprafața celulelor endoteliale și anume cu molecule de adeziune celulară din familia imunoglobulinelor (ICAM), determinând o atașare mai fermă a limfocitului la endoteliu (B-2). Interacțiunile integrină-ICAM, de înaltă afinitate, induc etalarea limfocitului la suprafața endoteliului și migrarea activă (sub control celular), către zone joncționale dintre două celule endoteliale (B-3), pe unde declanșează procesul de diapedeză (B-4). După extravazare, limfocitul își continuă migrarea către locul inflamației pentru a-și îndeplini rolul (B-5). © Mircea Leabu, 2014.



Procesele inflamatorii duc la eliberarea de stimuli care acționează asupra unor receptori din membranele celulelor endoteliale, conducând la expunerea pe suprafața luminală a acestora (în ariile inflamate) a unor glicoproteine cu activitate lectinică, denumite **P-selectine**. P-selectinele, care fac parte din **familia selectinelor**, nu se află permanent la suprafața endoteliului, în condiții de repaus ele fiind stocate în membrana unor structuri veziculare din interiorul celulelor endoteliale. Expunerea tranzitorie a P-selectinelor la suprafața membranelor apicale ale celulelor endoteliale se face numai ca rezultat al stimulilor eliberați în procesele inflamatorii, stimuli care activează celulele ce căptușesc peretele vasului sanguin. P-selectinele au parteneri de acțiune expuși permanent pe suprafața limfocitelor și anume structuri glucidice din glicocalixul acestora, numite **antigene sialilate Lewis-X** (Fig. 2.19, A). Interacțiunile dintre P-selectine și leucocite, care au loc în zonele inflamatorii, sunt de joasă afinitate, făcându-se și desfăcându-se, asigurând dinamica unui proces de rostogolire a leucocitelor pe suprafața endoteliului și încetinindu-le deplasarea. Simultan cu expunerea P-selectinelor la suprafața endoteliului, celulele endoteliale, activate de stimulii eliberați în procesele inflamatorii, expun **factorul de activare plachetară** (PAF)¹⁴, un compus de natură fosfolipidică, produs prin fenomene de metabolizare a fosfatidilcolinelor.

Cele ce urmează descriu fenomenele ce se petrec în cazul particular al extravazării limfocitelor T (Fig. 2.19, B). Prin legarea de receptori de pe suprafața limfocitelor, PAF activează **integrina $\alpha L\beta 2$** , prin mecanisme de semnalizare dependente de **RhoGTP-aze** (din familia proteinelor G mici, vezi la semnalizarea celulară). Integrinele sunt compuși glicoproteici transmembranari cu rol în adeziunea celulară, au afinitate ridicată și sunt structurate ca heterodimeri $\alpha\beta$. Au specificitate pentru proteine ale matricei extracelulare sau pentru proteine transmembranare expuse pe suprafața unor celule partenere. În starea inactivă, domeniul extracelular al integrinelor este pliat (precum lama unui briceag în teacă), iar după activare ectodomeniul se extinde la lungimi de 20nm (atingând zonele superficiale ale glicocalixului și făcând siturile de interacțiune accesibile), putând astfel interacționa cu partenerii specifici. Integrina $\alpha L\beta 2$ activată se leagă la **molecule de adeziune celulară** (CAM) din superfamilia imunoglobulinelor ICAM-1 și ICAM-2, expuse constitutiv la suprafața celulelor endoteliale. Interacțiunile integrină $\alpha L\beta 2$ -ICAM duc la atașarea fermă a limfocitelor la suprafața endoteliului și la oprirea lor din mișcarea în care fluxul sanguin le antrenează. Totodată are loc etalarea și migrarea activă a lor pe suprafața celulelor endoteliale până în zonele joncționale dintre acestea. Ajunse aici, limfocitele se insinuează printre două celule endoteliale părăsind lumenul vasului și trecând în țesut pentru a-și îndeplini menirea în zona tisulară inflamată.

Fenomene similare se petrec și la extravazarea monocitelor (Fig. 2.20). În acest caz integrina implicată este $\alpha M\beta 2$. Aceste fenomene de extravazare nu se petrec numai în cazul afecțiunilor inflamatorii, ci și în alte situații patologice, cum ar fi în procesul de aterogeneză, când monocitele circulante pătrund în intima arterelor unde încearcă să curețe peretele vaselor de depunerile lipidice nefiziologice, devenind celule spumoase [2, 3].

În general, orice celulă sanguină imunocompetentă trece, prin asemenea fenomene, din circulația sângelui în țesuturi, pentru a se achita de sarcinile de apărare a organismului, atunci când este cazul. Așa se explică de ce studiul acestor fenomene a reprezentat o provocare științifică, atât pentru fiziologia, cât și pentru patologia celulară.

¹⁴ PAF rezultă din derivați alchilați ai fosfatidilcolinei (alcool gras în loc de acid gras la hidroxilul 1 al glicerinei), după acțiunea fosfolipazei A2 și acetilarea hidroxilului 2 astfel eliberat din legătura esterică inițială. Altfel spus, PAF este 1-alkil-2-acetil-3-fosfocolino-glicerol.

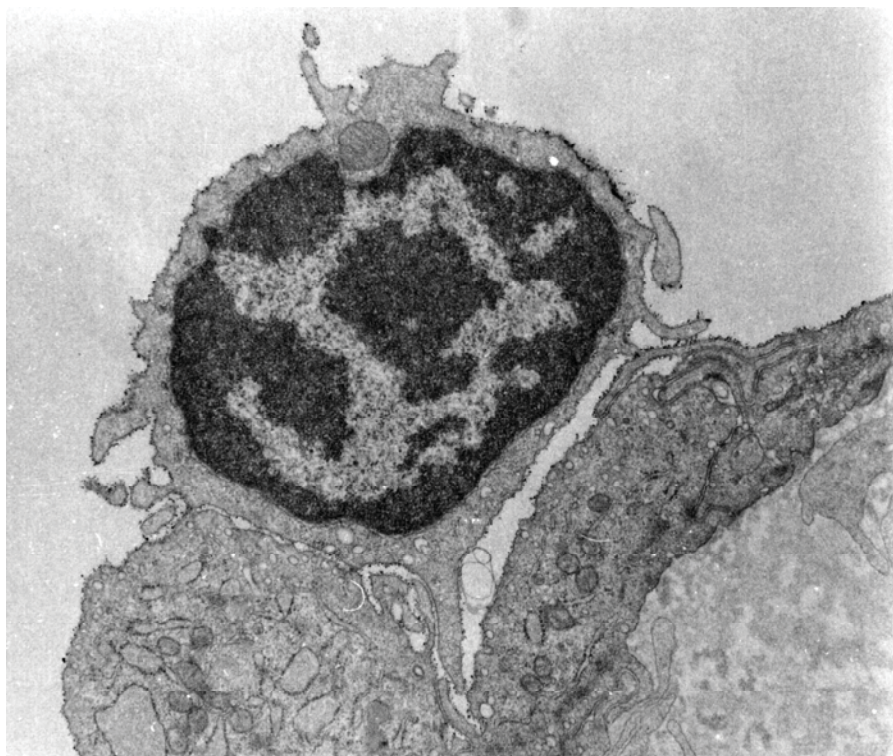


Fig. 2.20. Monocit circulant surprins la nivelul unei zone joncționale dintre două celule endoteliale, pregătit să inițieze un proces de diapedeză. Suprafața ambelor tipuri celulare este marcată pentru evidențierea structurilor glucidice N-glicozidice (manozele au legat ConA, care ulterior a fost marcată cu o glicoproteină adecvată, adsorbită pe aur coloidal de 5nm). © Mircea Leabu, 2014.

(ii) **Fertilizarea** este procesul prin care **spermatozoidul fuzionează cu ovocitul** [9-11]. Pentru realizarea acestui proces, spermatozoizii trebuie să ajungă în tractul reproducător feminin, unde suferă un fenomen de **capacitare**, ce durează 5-6 ore la om. Capacitarea constă în modificări ale compoziției lipidice și glicoproteice a suprafeței capului spermatozoidului, ca și în creșterea metabolismului și motilității celulare a acestuia. Mecanismele acestor transformări structurale și funcționale nu sunt cunoscute încă în detaliu. Ele sunt declanșate de pătrunderea anionului bicarbonat prin membrana spermatozoidului și activarea unei adenilatciclaze. Spermatozoidul astfel capacitat poate traversa **stratul celulelor foliculare** ce înconjoară ovocitul, pentru a ajunge la **zona pellucida**, un înveliș glicoproteic al ovocitului, format din trei glicoproteine denumite ZP1, ZP2 și ZP3. Ajuns aici, el se leagă de structuri O-glicozidice ale ZP3, prin componente ale membranei **zonei acrozomale**. **Zona pellucida** acționează ca o barieră ce conferă specificitate de specie fertilizării, astfel încât aceasta nu se poate realiza între celule ale unor specii diferite. Acest lucru a fost evidențiat prin faptul că eliminarea zonei pellucida a ovocitului permite fertilizarea elementelor aparținând unor specii diferite. Zigoții hibridi astfel obținuți nu sunt însă viabili. Interacțiunea descrisă mai sus între spermatozoid și ZP3, declanșează ceea ce se numește **reacție acrozomală**. Aceasta constă în eliberarea prin exocitoză a conținutului vacuolei acrozomale, ca urmare a unui complex proces de semnalizare, indus de legarea spermatozoidului la **zona pellucida** și care are ca efect creșterea concentrației Ca^{2+} în citosolul spermatozoidului. Enzimele eliberate ca urmare a reacției acrozomale (proteaze și hialuronidaze) degradează local **zona pellucida** permițând spermatozoidului să o penetreze ca să ajungă la membrana ovocitului de care se leagă și cu care fuzionează. Fuziunea are la bază activitatea unei proteine de fuziune din membrana spermatozoidului expusă ca urmare a modificărilor induse de reacția acrozomală.

medicale ale eventualelor ignorări a grupelor sanguine, responsabilitatea (pentru dramaticele fenomene care se pot produce) o poartă doar câte un monozaharid (Gal, respectiv GalNAc) legat în aceeași poziție a unei structuri de bază.

În încheierea prezentării aspectelor legate de rolul componentei glucidice a (bio)membranelor, nu putem să nu facem câteva referiri și la receptorii celulari. Structurile glucidice sunt necesare, dar nu neapărat suficiente funcționării receptorilor din membranele celulare. Cea mai mare parte dintre **receptorii suprafețelor celulare**, evidențiați până în prezent, **sunt glicoproteine**. Pentru unii dintre ei eliminarea componentei glucidice nu afectează esențial capacitatea de legare a liganzilor, pentru alții da. Pentru cei care își pierd afinitatea față de liganzi, nu se poate afirma cu certitudine că structura glucidică este implicată în formarea locului de legare. Mai degrabă se speculează că ar fi vorba de modificări conformaționale induse de pierderea componentei glucidice, modificări ce ar avea ca efect distrugerea geometriei sitului de legare.

Componentele glucidice ale suprafeței celulare reprezintă interes deosebit pentru înțelegerea atât a fiziologiei, cât și a patologiei celulare. De exemplu, acizii sialici terminali din glicocalixul limfocitelor T sunt implicați în aproape toate fenomenele ce țin de destinul și funcțiile celulei. Supraviețuirea celulară însoțită de fenomenele de maturare, diferențiere, motilitate și moartea celulară sunt dependente de acizii sialici și de interacțiunile acestora cu proteine cu activități lectinice, îndreptate către aceste glucide terminale [12]. Modificări în glicozilarea suprafeței celulare însoțesc diferite patologii, cum ar fi în cazul celulelor canceroase, cu implicații asupra progresiei tumorale și metastazării [13].

Implicarea glicocalixului în fiziologia și patologia celulară a făcut ca acesta să fie considerat țintă terapeutică în tratamentele multor boli [1, 14-17], ca și în modularea unor fenomene celulare dintre cele mai diverse [18, 19].

În concluzie, se poate spune despre componenta glucidică a membranelor că nuanțează, uneori într-o manieră de mare subtilitate, funcționarea acestei ultrastructuri care separă, dar și unește celula cu mediul.

Bibliografie selectivă

1. **Becker BF, Chappell D, Bruegger D, Annecke T, Jacob M.** (2010) Therapeutic strategies targeting the endothelial glycocalyx: acute deficits, but great potential. *Cardiovasc Res.* **87**: 300-310.
2. **Leabu M, Ghinea N, Muresan V, Colceag J, Hasu M, Simionescu N.** (1987) Cell surface chemistry of arterial endothelium and blood monocytes in the normolipidemic rabbit. *J Submicrosc Cytol.* **19**: 193-208.
3. **Ghinea N, Leabu M, Hasu M, Muresan V, Colceag J, Simionescu N.** (1987) Prelesional events in atherogenesis. Changes induced by hypercholesterolemia in the cell surface chemistry of arterial endothelium and blood monocytes, in rabbit. *J Submicrosc Cytol.* **19**: 209-227.
4. **Aminoff D, Bell WC, VorderBruegge WG.** (1978) Cell surface carbohydrate recognition and the viability of erythrocytes in circulation. *Prog Clin Biol Res.* **23**: 569-581.
5. **Karpatkin S, Shulman S.** (1980) Asialo platelets enhance thrombopoiesis. *Trans Assoc Am Physicians.* **93**: 244-250.
6. **Hynes RO, Lander AD.** (1992) Contact and adhesive specificities in the associations, migrations, and targeting of cells and axons. *Cell.* **68**: 303-322.
7. **Ebnet K, Vestweber D.** (1999) Molecular mechanisms that control leukocyte extravasation: the selectins and the chemokines. *Histochem Cell Biol.* **112**: 1-23.
8. **van Buul JD, Hordijk PL.** (2004) Signaling in leukocyte transendothelial migration. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* **24**: 824-833.
9. **Wassarman PM, Jovine L, Litscher ES.** (2001) A profile of fertilization in mammals. *Nat Cell Biol.* **3**: E59-E64.
10. **Wassarman PM, Jovine L, Qi H, Williams Z, Darie C, Litscher ES.** (2005) Recent aspects of mammalian fertilization research. *Mol Cell Endocrinol.* **234**: 95-103.
11. **Wassarman PM, Litscher ES.** (2008) Mammalian fertilization: the egg's multifunctional zona pellucida. *Int J Dev Biol.* **52**: 665-676.

12. **Bi S, Baum LG.** (2009) Sialic acids in T cell development and function. *Biochim Biophys Acta.* **1790**: 1599-1610.
13. **Dafik L, d'Alarcao M, Kumar K.** (2010) Modulation of cellular adhesion by glycoengineering. *J Med Chem.* **53**: 4277-4284.
14. **Drake-Holland AJ, Noble MI.** (2009) The important new drug target in cardiovascular medicine – the vascular glycocalyx. *Cardiovasc Hematol Disord Drug Targets.* **9**: 118-123.
15. **Du J, Yarema KJ.** (2010) Carbohydrate engineered cells for regenerative medicine. *Adv Drug Deliv Rev.* **62**: 671–682.
16. **Schwardt O, Kelm S, Ernst B.** (2013) SIGLEC-4 (MAG) Antagonists: From the Natural Carbohydrate Epitope to Glycomimetics. *Top Curr Chem.* Nov 26. [Epub ahead of print] DOI: 10.1007/128_2013_498
17. **Suzuki O, Abe M.** (2013) Recent progress and new perspectives in lymphoma glycobiology. *Fukushima J Med Sci.* **59**(1): 1-14.
18. **Ryan JM, Rice GE, Mitchell MD.** (2013) The role of gangliosides in brain development and the potential benefits of perinatal supplementation. *Nutr Res.* **33**(11): 877-887. DOI: 10.1016/j.nutres.2013.07.021.
19. **Pshezhetsky AV, Ashmarina LI.** (2013) Desialylation of surface receptors as a new dimension in cell signaling. *Biochemistry (Mosc).* **78**(7): 736-745. DOI: 10.1134/S0006297913070067.

2.5. Considerații finale asupra organizării moleculare a membranelor celulare

2.5.1. Modelul în mozaic fluid este încă actual și adaptabil

Organizarea membranelor celulare (ca și a endomembranelor) are la bază un bistrat lipidic eterogen, asimetric, cu proprietăți fluide manifestate bidimensional. Acestuia i se adaugă proteine care îi conferă caracterul unui mozaic (proteine plutind pe sau cufundate în marea lipidică ce formează bistratul). O asemenea organizare a fost denumită în mozaic fluid, după modelul introdus în 1972, de Singer și Nicolson.

Modelul mozaicului fluid pentru organizarea biomembranelor a fost completat prin evidențierea și descrierea unor structuri adiacente: citoscheletul asociat membranei (ultrastructură aflată pe fața internă a membranelor) și glicocalixul (ultrastructură expusă pe fața externă a membranelor, alcătuită din lanțuri oligo-/poli-zaharidice din compoziția glicolipidelor, glicoproteinelor și proteoglicanilor din membrană). Aceste elemente adiacente susțin asimetria organizării membranelor. Așadar, atât proteinele ce intră în organizarea lor, cât și componenta glucidică a membranelor nu diminuează, ci accentuează și nuanțează caracterul eterogen, asimetric și de fluid bidimensional al structurării membranelor celulare.

Tot în completarea modelului în mozaic fluid sub aspect ultrastructural, dar și funcțional au fost definite noțiunile de domenii și/sau microdomenii de membrană. Acestea sunt regiuni mai extinse (domeniile) sau mai reduse (microdomeniile) din suprafața membranelor a căror compoziție este diferită de a altor zone. Compozițiile diferite ale domeniilor de membrană (apical *versus* latero-bazal) sunt riguros controlate și păstrate de celulă. Compoziția și existența microdomeniilor (caveole, plute lipidice, structuri cu înveliș de clatrină și altele pe care le veți întâlni pe măsură ce vom avansa în cunoașterea celulei) au o dinamică mai accentuată, răspunzând nevoilor în continuă schimbare ale celulelor, nevoi impuse de considerente interne ale celulei sau de stimuli externi la care celulele trebuie să răspundă.

De fapt, tot ce a însemnat dezvoltarea cunoașterii legate de organizarea și funcționarea biomembranelor, după elaborarea modelului în mozaic fluid, nu a contrazis, ci a dovedit valabilitatea celor stipulate de Singer și Nicolson, în 1972 [1-3]. Orice nouă informație, care a fost adăugată cunoștințelor despre modul în care biomembranele sunt organizate și despre cum se comportă biocomponentele la nivelul acestora pe considerente fizice, chimice și biologice, a contribuit la rafinarea modelului [4], deși uneori el este superficial prezentat în manuale [5]. Este însă datorită celor care inițiază în cunoașterea biomembranelor pe noii veniți să prezinte modelul de așa manieră încât orice confuzie să fie eliminată, iar mintea să rămână deschisă noutăților. Modelul mozaicului fluid asupra organizării biomembranelor are o capacitate de adaptare nelimitată.

Componentele membranelor fie ele lipide, proteine, componente glucidice au atât roluri structurale, cât și metabolice. Această dualitate a rolurilor este valabilă, pe de o parte, pentru clasele de componente biochimice ale membranelor și, pe de altă parte, pentru entități moleculare (aceeași moleculă poate îndeplini atât funcții structurale cât și metabolice).

În ciuda acestei organizări moleculare complexe (puternic eterogenă și asimetrică), sau mai degrabă tocmai datorită ei, biomembranele acționează/trebuie să acționeze ca sisteme integrative. Detalii asupra funcționării biomembranelor ca atare se vor prezenta, în primul rând, la secțiunile legate de transportul membranal și de semnalizarea celulară. Aspecte legate de comportamentul biomembranelor ca sisteme integrative sunt valabile și în legătură cu alte biomembrane, cu precădere cele care delimitează o serie de organite celulare, numite endomembrane.

În sfârșit, nu putem termina prezentarea organizării moleculare a membranelor fără a puncta câteva lucruri legate de semnificația biologică a caracteristicilor fizico-chimice ale organizării biomembranelor (eterogenitate, asimetrie și fluiditate manifestată bidimensional) cu răsfrângere asupra comportamentului lor.

2.5.2. Semnificația biologică a modului de organizare moleculară a membranelor

În toate informațiile utilizate până acum pentru înțelegerea modului de organizare a membranelor am ținut permanent seama de modelul mozaicului fluid introdus de Singer și Nicolson, în 1972. Am parcurs o multitudine de aspecte legate de: a) diversitatea de componente moleculare de la nivelul membranelor (ceea ce induce eterogenitate compozițională), b) distribuția inegală și/sau aranjamentul diferențiat al componentelor între cele două fețe ale membranei (ce conferă asimetrie ultrastructurii) și c) dinamicitatea componentelor la nivelul membranelor care, însă, implică numai mișcări pe două direcții (definită ca fluiditate bidimensională). Toate aceste detalii nu le-am discutat nici de dragul (bio)chimiei, nici de dragul (bio)fizicii la care am făcut apel, ci pentru că aceste caracteristici fizico-chimice de organizare și de comportament al componentelor – eterogenitate, asimetrie, fluiditate manifestată bidimensional – au semnificații biologice, adică se răsfrâng și sunt exploatate în mod fericit în ceea ce membrana trebuie să facă în interesul celulei, adică să o separe de, dar să o și unească cu mediul. Să luăm pe rând aceste caracteristici și să încercăm să extragem elementele esențiale referitoare la semnificația biologică a realității lor, altfel spus să înțelegem de ce este important că (bio)membranele sunt organizate așa cum sunt, sau, dacă vreți, ce s-ar întâmpla dacă nu ar fi așa, deoarece, din punct de vedere logic, în acest fel trebuie să operăm pentru extragerea semnificației a ceva.

De ce este important faptul că în membrana celulară avem o diversitate uriașă (putem spune fără temere) de componente biochimice? Altfel spus, la ce folosește celulei această compoziție eterogenă? Să nu ne sfiim aici să facem o comparație cu ce putem percepe referitor la capacitatea unui grup de oameni de a realiza lucruri complexe. Pentru aceasta este necesar ca în acel grup de oameni să se afle persoane cu capacități, înclinații, talente, abilități diferite, corespunzătoare nevoilor impuse de complexitatea problemelor ce trebuie rezolvate. Lucrurile nu stau altfel nici în contextul membranei și al complexității de fenomene prin care aceasta își realizează menirea: separarea interiorului celular de mediu, dar și conectarea celulei cu ceea ce se află în afara ei cu scopul determinării unui comportament adecvat, pentru asigurarea supraviețuirii sale și a „angrenajului” (citește țesutului) din care face parte. Așadar: multitudinea de biocomponente asigură multitudinea de posibilități de acțiune, adică diversitatea de funcții. Există o corelație directă între complexitatea de funcții pe care membrana unei celule trebuie să o asigure și diversitatea de biocomponente de la nivelul acesteia. Cu alte cuvinte, ca să operăm cu termeni învățați la matematică, dependența dintre complexitatea de funcții a membranei unei celule și diversitatea componentelor din organizarea acesteia (adică gradul de eterogenitate biochimică a acelei membrane) este una de proporționalitate directă. Această regulă odată stabilită și înțeleasă în semnificația ei biologică ne determină să putem deduce că organizarea la nivelul biocomponentelor membranelor a două celule diferite este diferită, chiar dacă se respectă principiul organizării în mozaic fluid, necesitatea prezenței lipidelor amfifile, aranjate sub formă de bistrat, la care se adaugă proteine și o componentă glucidică orientată spre exterior. Dincolo de respectarea acestor aspecte generale, tipurile de lipide sau proporțiile dintre acestea diferă, există bagaje de entități moleculare proteice diferite (chiar dacă unele dintre proteine se pot găsi într-o mare diversitate de tipuri de

membrane), iar structurile glucidice diferă cel puțin în anumite limite care fac membranele să difere sub aspectul biocomponentelor.

Cum se răsfrânge aranjarea asimetrică a biocomponentelor membranei asupra intereselor celulei? Adică, ce putem spune despre semnificația biologică a asimetriei membranelor? Faptul că cele două fețe ale membranelor expun elemente biochimice diferite, adică asigură proprietăți fizico-chimice diferite celor două suprafețe (cea expusă la exterior, respectiv cea expusă către interiorul celulei) permite desfășurarea de fenomene diferite de o parte sau de cealaltă a acestei ultrastructuri. Mai mult, celula are mecanisme prin care poate permite acestor fenomene diferite să se desfășoare independent sau să se coreleze, în funcție de nevoile ei de supraviețuire și funcționare „ireproșabilă”. Altfel spus, celula poate rămâne mai mult sau mai puțin indiferentă la ce se petrece în exteriorul ei, dar poate să și fie deosebit de sensibilă la ce se află sau se petrece în afara ei pe baza informațiilor pe care le primește, le analizează și le ia în considerație.

Pentru înțelegerea semnificației biologice a fluidității bidimensionale a membranei revin la exemplul utilizat la începutul acestei secțiuni (cel legat de abilitatea unui grup de oameni de a rezolva probleme complexe), dar vom extinde exemplul la ce se întâmplă într-o instituție. De fapt încercăm aici să răspundem la întrebarea: de ce este important că în membrană biocomponentele sunt într-o permanentă mișcare? Să nu uităm că această mișcare permanentă a componentelor individuale prezintă grade de libertate mai mari sau mai mici, în funcție de condițiile concrete în care celula se poate afla. Mai întâi să punctăm de ce este important că mișcările au loc în doar două dimensiuni, adică în numai două direcții, corespunzătoare mișcării planare (adică bidimensionale). Această mișcare bidimensională asigură menținerea asimetriei din organizarea membranei, iar semnificația biologică a acestui aranjament asimetric am punctat-o deja în paragraful precedent. Dincolo de faptul că această mișcare este bidimensională, ea este importantă pentru celulă chiar prin faptul că există. Ne întoarcem la exemplul invocat, chiar dacă poate părea banal; îl considerăm sugestiv. Pentru ca oamenii unui grup să realizeze activități practice ei trebuie să fie aduși în același loc. Pentru asta trebuie să se deplaseze de acasă la instituția unde lucrează și să își facă treaba cât durează programul de lucru. Asta trebuie să se întâmple și cu biocomponentele (molecule, macromolecule) dintr-o membrană. Ele trebuie să se poată mișca pentru a se întâlni ca să își facă, împreună, treaba. Spunem că ele organizează microdomenii (echivalentul unor secții sau departamente într-o instituție). Numai că pentru buna funcționare a instituției secțiile sau departamentele nu sunt total independente, ele trebuie să interacționeze, deci trebuie să existe persoane care să se miște dintr-un loc în altul, iar uneori este nevoie să se creeze grupuri interdepartamentale pentru rezolvarea unor probleme. Asta se întâmplă și în membrană: microdomeniile sunt dinamice; elementele din unele se pot mișca și intra în componența altor microdomenii pentru a se implica în altceva în interesul bunei funcționări a întregului (membrana, respectiv, mai departe, celula). Așadar, semnificația biologică a faptului că, în membrană, componentele biochimice sunt într-o permanentă mișcare este aceea că permite acestora să se asocieze într-o diversitate de modalități, pentru a îndeplini o multitudine de activități. Mai mult, în membrane aceași componentă poate induce efecte multiple prin rolul său care se poate manifesta diferențiat, în funcție de partenerii de interacțiune cu care se întâlnește temporar, pe perioade mai lungi sau mai scurte de timp.

Cred că acum putem spune, în sfârșit, că avem suficiente informații care să ne permită să credem că am înțeles principial membrana celulară (cum este organizată și de ce este astfel organizată) și ne putem detașa ca să o privim cu înțelepciune și să putem aplica această înțelegere de principiu la orice situație particulară am întâlni. Această poziție va fi utilă în abordarea aspectelor care urmează, legate de

aprofundarea cunoștințelor despre membrane, adică aspectele ce ne vor ajuta să înțelegem mai bine cum funcționează membranele ca sisteme integrative. De fapt, se vor aborda aspectele legate de mecanismele prin care membrana conectează celula la mediu, nefiind o barieră absolută. Fenomenele prin care membrana celulară realizează această conectare a celulei cu mediul sunt de două tipuri: fenomene de transport membranar și fenomene de semnalizare.

Bibliografie selectivă

1. **Morange M.** (2013) What history tells us XXX. The emergence of the fluid mosaic model of membranes. *J Biosci.* **38**(1): 3-7.
2. **Nicolson GL.** (2013) The Fluid-Mosaic Model of Membrane Structure: Still relevant to understanding the structure, function and dynamics of biological membranes after more than 40 years. *Biochim Biophys Acta*. Nov 1. pii: S0005-2736(13)00393-3. DOI: 10.1016/j.bbamem.2013.10.019. [Epub ahead of print]
3. **Bagatolli LA, Mouritsen OG.** (2013) Is the fluid mosaic (and the accompanying raft hypothesis) a suitable model to describe fundamental features of biological membranes? What may be missing? *Front Plant Sci.* Nov 13; 4: 457.
4. **Nicolson GL.** (2013) Update of the 1972 Singer-Nicolson Fluid-Mosaic Model of Membrane Structure. *Discoveries.* **1**(1): e3. DOI: 10.15190/d.2013.3
5. **Leabu M.** (2013) The still valid fluid mosaic model for molecular organization of biomembranes. Accumulating data confirm it. *Discoveries.* **1**(1): e7. DOI: 10.15190/d.2013.7