

# ORGANIZAREA MEMBRANELOR CELULARE DE LA MOLECULE LA O STRUCTURĂ FUNCȚIONALĂ

## LIPIDELE MEMBRANARE

### Aspecte generale

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

Așa cum stipulează modelul în mozaic fluid al organizării membranelor, lipidele sunt structurate 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. Asadar, membranele celulare sunt structurate pe un bistrat lipidic bidimensional, asimetric și eterogen.

În cele ce urmează vom căuta să argumentăm aceste afirmații de ordin general, detaliind aspectele legate de eterogenitatea componentei lipidelor membranare, 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 structura și funcționalitatea membranei celulare se aplică și membranelor din interiorul celulelor, așa-numitele endomembrane, cele care structurează organele citoplasmaticе delimitate de membrane.

### Definiția lipidelor membranare

În problema definirii lipidelor membranare, nu ne propunem un enunț cu valabilitate absolută. Intenția este de a formula o definiție operatională 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).

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

1. De ce lipide?
2. Care dintre lipide?
3. De ce dispunere în bistrat?

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

### Descrierea lipidelor membranare și caracterizarea bistratului lipidic

*Lipidele componente ideale pentru structurarea membranelor (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 și caracterul lor amfipat induce proprietăți amfifile 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. Sunt molecule relative insolubile în medii apoase, prezentând tendința de asociere spontană, ceea ce conferă structurilor pe care le formează tenacitatea de a-și pastra integritatea, sau de a se reface rapid, atunci când sunt agresate mecanic. Tendința spontană de asociere implică un consum energetic minim, 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?”). Această complexitate chimică vom realiza că este exploatată fericit de celulă (vezi la “Rolul lipidelor membranare”). Dacă ar fi să punctăm pentru început avantajele ce rezultă în privința structurării membranelor, notăm ca defectele ce ar putea apărea în structura lor cât și în structurarea bistratului sunt ușor de acceptat și, ulterior, de corectat, fără a induce efecte biologice catastrofale (caracterul amfifil nu se pierde). Mai mult, modelarea lor structurală, după cum va reieși mai jos (vezi la “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.

#### *Clasificarea lipidelor membranare (Care dintre lipide?)*

Prin ceea ce vom include în răspunsul la întrebarea: “care dintre lipide?” vom substanția caracterul eterogen al structurii membranelor celulare.

Biochimia descrie o mare diversitate de clase de lipide. 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 (enumerarea este în funcție de abundența în care apar) în:

1. fosfolipide;
2. colesterol;
3. glicolipide.

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 polioliul din structură). Iată în aceasta primă clasificare a lipidelor membranare o prima 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 polioliul din structură în:

- (i) **fosfogliceride (glicerofosfatide)** – dacă polioliul este glicerină;
- (ii) **fosfosfingozide (sfingofosfatide)** – dacă polioliul este sfingozină (de fapt un aminodiol cu un lanț alifatic (aceasta înlocuiește unul dintre acizii grași din coada hidrofobă a fosfolipidelor rezultate, cel de al doilea fiind inserat printr-o legătura 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.

Structura de principiu a unui fosfoglicerid este reprezentată grafic, în mod intuitiv, în Fig. 1. Se observă că pe scheletul polialcoolului se află grefate pe de o parte două lanțuri alifaticе (acestea formând coada hidrofobă a lipidului membranar), iar pe de altă parte o moleculă (notată cu X) prin intermediul unei grupări fosfat (formând împreună partea esențială a capului hidrofil).

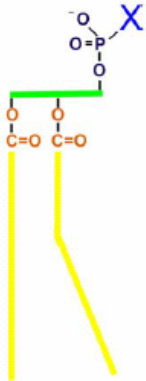


Fig. 1. Structura schematică, de principiu a unui fosfoglicerid. În verde este reprezentat miezul glicerolului; în galben sunt reprezentate lanțurile alifaticе ale acizilor grași; cu X, în albastru, este reprezentată partea variabilă din capul hidrofil.

În funcție de restul X din capul hidrofil, fosfogliceridele se împart în:

- (i) **fosfatidilcoline** (prescurtare PC), când X este colină;
- (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 hydrogen.

Echivalentul fosfatidilcolinelor pentru svingofosfolipidele membranare sunt svingomielinele (SM). De amintit aici și un fosfolipid în care două molecule de acid fosfatidic sunt condensate la hidroxilii laterali ai unei a treia molecule de glicerină, structurând cardiolipine, fosfolipide specifice membranei mitocondriale interne. Cât privește abundența sub care tipurile de fosfolipide apar în structura bistratului, PC, SM, PE și PS sunt majoritare, reprezentând fiecare între 20 și 25%. PI și PA reprezintă până la 1% fiecare; 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”).

Ne aflăm acum în situația de a putea argumenta și aspecte legate de dispunerea asimetrică a fosfolipidelor în membrane. Experimental s-a dovedit că PC și SM sunt preponderant distribuite în foița externă a bistratului, în timp ce PE, PS și PI sunt, după datele existente până în prezent, exclusiv în foița internă. Mai mult, apariția PS în foița externă a bistratului reprezintă o dovadă a intrării celulei într-un proces apoptotic. Colesterolul este în general egal distribuit între ambele foițe ale bistratului. Glicolipidele se află numai în foița externă a bistratului lipidic.

Idea eterogenității fosfolipidelor membranare este substanțiată 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 ( $C_{12}$ - $C_{24}$ ). La cei cu mai puțin de 12 atomi de carbon solubilitatea în apă a lipidelor pe care 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 hidrofobicitatea lipidelor, îngroașă bistratul reducând eficiența sub aspectul proprietăților de permeabilitate selectivă și îi reduce fluiditatea prin creșterea interacțiunilor la nivelul cozilor hidrofobe. Așadar din motive de eficiență în funcționare acizii grași evidențiați a structura lipidele membranare conțin între 12 și 24 de atomi de carbon. Ei pot fi acizi grași saturați sau nesaturați. În

cea ce privește poziționarea lor 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)  $C_{18:1}$ , 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.

### *Structura de bistrat rezolvă dezideratul esențial al organizării membranei (De ce bistrat?)*

Vom încerca să precizăm aici câteva argumente logice pentru a răspunde acestei întrebări. Bistratul este cea mai simplă structurare 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 structura celor două medii hidrofile; cozile hidrofobe în interior, în adâncimea structurii, conferind rolul de barieră). Așadar este o structură 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 refacerea rapidă a acesteia chiar în cazul unor distrugerii datorate agresiunilor mecanice.

Structurarea 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.

### *Starea fizică a bistratului lipidic*

Discuția asupra stării fizice a bistratului lipidic își propune să ne dea o imagine intuitivă asupra efectelor structurii bistratului asupra funcționării membranelor. Bistratul lipidic este fluid, într-o continuă dinamică cu efect asupra inter-relațiilor dintre moleculele care îl compun, inter-relații care sunt într-o permanentă modificare. Fluiditatea bistratului lipidic este o rezultată 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 execută în raport cu propria lor structură (în raport cu propria lor axă), volumul ocupat de ele putând fi aproximat cu un cilindru al cărei bază are o suprafață de  $\sim 60 \text{ \AA}^2$  (rază de  $\sim 4.4 \text{ \AA}$ ) și cu înălțimea de  $\sim 30 \text{ \AA}$ . Aceste mișcări 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, capacitate care se răsfrânge asupra comportamentului întregii molecule prin cuplurile de forțe pe care le induc; rezultanta acestui zburcium 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, datorită împiedicărilor datorate prezenței celuilalt acid gras din structură, nu pot executa decât mișcări asemănătoare ștergătorului de parbriz; 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, mișcări ale lipidelor în planul membranei, în aceeași foiță a bistratului, unele printre altele; frecvența acestei mișcări este de  $10^7$  schimbări de direcție/s;
- Mișcări “flip-flop”, 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, ceea ce pare logic; există totuși o endomembrană la nivelul căreia mișcarea de “flip-flop” are loc frecvent și anume membrana reticulului endoplasmic (vezi la “Reticulul endoplasmic”).

Revenind la tema acestei secțiuni, să punctăm că absența practică a mișcărilor “flip-flop” explică bidimensionalitatea stării fluide a bistratului lipidic, structura de bază a membranelor celulare. Mișcările lipidelor se manifestă practic numai în cadrul aceluiași strat al bistratului. Deasemenea, frecvența extrem de redusă a mișcărilor “flip-flop” are ca efect menținerea distribuției asimetrice a moleculelor de lipide în cele două straturi, distribuție construită de celulă cu mare consum energetic odată cu biosinteza *de novo* a membranelor (vezi la “Reticulul endoplasmic”). 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 structura microdomenii bogate în sfingolipide, parte dintre ele glicolipide, colesterol și anumite proteine membranare. Aceste microdomenii sunt denumite “plute lipidice” (lipid rafts) și au deosebită importanță atât structurală (organizează structuri specializate ale membranei, cum ar fi caveolele), cât și metabolică ținând laolaltă molecule și macromolecule destinate a funcționa împreună în complexe supramoleculare. Pentru a înțelege mai bine structurarea microdomeniilor de membrană, să menționăm că lipidele nu sunt omogen amestecate nici în cadrul fiecărei foițe a bistratului ci se asociază pe baza unor considerente fizice. 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 plutelor lipidice și eterogenitatea lor susțin și nuanțează ideea de mosaic fluid a organizării membranelor. Plutele lipidice pot fi asemuite unor sloiuri de forme, dimensiuni și organizări 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 plutelor lipidice a fost evidențiată prin interpretarea rezultatelor diferitelor metode de obținere:

- diferiți detergenți neionici;
- sonicarea preparatelor de membrane și analizarea fracțiunii ușoare;
- analize imunocitochimice.

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

- 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); ≤30% pentru PC + PE, față de ~50% în restul membranei;
- lipidele specifice foței interne a bistratului (PS, PI) sunt slab reprezentate la nivelul plutele;
- în foța internă de la nivelul plutele, lipidele conțin preferențial acizi grași saturați (asta ar putea realiza necesarul de rigiditate corespunzător celei a foței externe, unde sfingolipidele sunt bogat reprezentate).

Anticipând, vom menționa aici că plutele lipidice se caracterizează și prin capacitatea de a aglomera anumite tipuri de proteine membranare.

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 membranelor 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. 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 structura bistratului. Fluiditatea membranei este direct proporțională cu procentul de acizi grași nesaturați din structura 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. 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 randul 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.

După cum vom vedea, fluiditatea membranelor este modulată și nuanțată și de celelalte componente ale membranelor proteinele și structurile glucidice.

### **Rolul lipidelor membranare**

După cum am arătat până acum, rezultă că fără bistrat lipidic nu pot exista membrane celulare. Acesta reprezintă componenta structurală de bază a lor, funcția structurală a lipidelor membranare organizate în bistrat fiind esențială. Bistratul lipidic

conferă membranei celulare rolul de barieră, această menire a lipidelor membranare fiind enunțată încă de la dovedirea prezenței lor în structura membranei.

Dar lipidele membranare nu se află acolo, nici pe departe, 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”.

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, metaboliții rezultați acționând ca mesageri secunzi și declanșând numeroase procese prin care celulele răspund semnalelor receptate. Există mai multe tipuri de fosfolipaze, care au proprietatea de a elibera diverse molecule din structura complexă a fosfolipidelor. Acestea sunt:

- (i) fosfolipaza A1, eliberează acidul gras din poziția 1 a glicerinei;
- (ii) fosfolipaza A2, detașază acidul gras din poziția 2 a glicerinei;
- (iii) fosfolipaza B, scoate ambii acizi grași din structura fosfolipidelor;
- (iv) fosfolipaza C, desface legătura dintre glicerină și fosfat;
- (v) fosfolipaza D, elimină restul hidrofil X cu eliberarea PA.

Pentru exemplificarea efectelor punctăm următoarele (detalii la subcapitolul “Semnalizarea transmembranară”):

(a) Fosfolipaza A2 poate elibera acidul arahidonic, care este precursor pentru patru clase de substanțe cu roluri dintre cele mai diverse, obținute prin complexe procese de metabolizare cu bagaje enzimatiche adecvate: 1. prostaglandine; 2. tromboxani; 3. prostaciline; 4. leucotriene. Primele trei rezultă pe calea ciclooxigenazei, cea de-a treia clasă pe calea lipooxigenazei.

(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. În această cascadă PI sunt inițial fosforilate pas cu pas la fosfoinozitolfosfați (PIP), sub acțiunea fosfatidilinozitol kinazei (PI kinaza), cu consum de ATP, apoi la dis-fosfoinozitolfosfați (PIP<sub>2</sub>), sub acțiunea PIP kinazei, deasemenea cu consum de ATP. Asupra fosfatidilinozitol-4,5-dis-fosfatului format acționează fosfolipaza C-β (o fosfolipază C specifică pentru fosfatidilinozitolii) cu eliberarea de IP<sub>3</sub> (inozitol-1,4,5-tris-fosfat) și diacilglicerol (DAG). IP<sub>3</sub> acționează ca mesager secund inducând creșterea Ca<sup>2+</sup> 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 proteinkinazei C).

Ca să rezumăm punctăm:

1. Lipidele membranare organizează structura de bază a biomembranelor, bistratul lipidic, structură cu proprietăți fluide, manifestate bidimensional și caracterizat atât prin eterogenitate compozițională, cât și prin asimetrie;
2. 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;
3. Departe de a avea numai un rol structural, lipidele membranare participă la funcția metabolică a membranei celulare în procese de semnalizare.

## PROTEINELE MEMBRANARE

### Aspecte generale

Modelul mozaic fluid de organizare a membranelor biologice ne arată că, alături de lipidele structurate 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 valori. De exemplu la nivelul tecii de mielină 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%. Putem enunța o regulă de principiu, care sugerează corespondența între raportul lipide/proteine dintr-o membrană și importanța funcțională a acesteia: (i) cu cât funcțiile metabolice ale unei membrane (sau porțiuni – ceea ce se definește ca microdomeniu, sau domeniu – dintr-o membrană) sunt mai accentuate, cu atât conținutul de proteine al acelei membrane este mai ridicat și (ii) cu cât rolul de barieră al unei membrane trebuie să se manifeste mai pregnant, cu atât conținutul în lipide este mai crescut.

### 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 două mari categorii:

1. Proteine **periferice**, sau **extrinseci**: acele proteine care se află atașate de o parte și de alta a bistratului lipidic, interacționând în principal cu capetele hidrofile ale lipidelor;
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, la numai doi ani după introducerea modelului mozaic fluid privind organizarea membranelor.

Proteinele periferice reprezintă, în general, ~25% din proteinele unei membrane, sunt extractibile 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 versantul (foița) bistratului lipidic căruia (căreia) îi sunt asociate se clasifică în (i) **ectoproteine** (proteine periferice asociate foiței externe a bistratului, așadar expuse la exteriorul membranei celulare sau pe fața luminală a membranelor organelor) și (ii) **endoproteine** (proteine periferice asociate foiței interne a bistratului, așadar expuse pe versantul citoplasmatic al membranelor și endomembranelor).

Au fost evidențiate atașări mai ferme ale proteinelor periferice la bistratul lipidic, prin conjugări (stabilirea de legături covalente) cu componente lipidice. Pentru unele ectoproteine a fost evidențiată o cuplare prin carboxilul terminal la gruparea amino a etanolaminei din capătul liber al structurii glucidice al glicofosfatidilinozitolilor. Fenomenul se numește *glipiare*. Partea lipidică rămâne în foița externă a bistratului și poartă numele de *ancoră glicofosfatidilinozitolică*. Nu sunt, deocamdată, clar elucidate funcțiile acestor proteine modificate prin glipiare.

Unele dintre endoproteine se pot asocia tranzitoriu și reversibil bistratului lipidic prin reacții de acilare (miristilare, palmitilare, farnesilare, geranil-geranilare etc.), radicalul

acil fiind cufundat în foița internă a bistratului, sau în toată grosimea bistratului. Aceste modificări reversibile sunt importante pentru exprimarea funcțiilor acestor proteine. Mai mult, unele dintre ele, cum ar fi proteinele G mici pot tranzita din starea de proteină citosolică, în starea de proteină periferică pentru exercitarea funcțiilor (vezi la semnalizarea celulară).

De menționat că atât proteinele membranare acilate, cât și cele gliolate au tendința de a se acumula în caveole, sau plute lipidice (microdomenii de membrană amintite mai sus, la lipidele membranare).

Proteinele integrale reprezintă, de regulă, ~75% din proteinele unei membrane, se pot extrage din structura bistratului lipidic prin folosirea de detergenți, 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 structurile expuse înafara bistratului lipidic). Proteinele integrale care traversează complet bistratul lipidic sunt denumite proteine **transmembranare**. Cele care sunt parțial cufundate în bistratul lipidic nu au primit o denumire specifică. Mai mult, acestea din urmă au fost considerate, până nu de mult, a fi practic inexistente. Se specula în favoarea acestei idei pe baza considerentelor structurale și termodinamice. Explicația era că nu putea fi adoptată de către aceste proteine o conformație care să asigure hidrofobicitate în porțiunea de pliure 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 membrane, sau microdomenii de genul plute lipidice (lipid rafts). Schimbarea atitudinii comunității științifice în privința acestei situații este un exemplu al dinamicii cunoașterii în biologia celulară și al modului rapid în care conceptele din acest domeniu pot evolua.

Revenind la proteinele transmembranare, acestora li se definesc trei domenii structurale: (i) un **ectodomeniu** (porțiunea expusă pe versantul extern al membranei), (ii) un **endodomeniu** (porțiunea expusă pe versantul intern al membranei) și (iii) un **domeniul transmembranar** (porțiunea ce străbate bistratul lipidic). În ceea ce privește modul de organizare structurală a ecto- și endodomeniilor lanțurile proteice se pot împacheta, în aceste zone, atât în porțiuni de  $\alpha$ -helixuri cât și în  $\beta$ -pliuri, așa cum se întâmplă cu toate proteinele. Situația este oarecum diferită pentru domeniul transmembranar. Pentru acesta, până acum vreo zece ani a existat accepțiunea că nu poate fi structurat decât sub formă de  $\alpha$ -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 prin aceleași considerente de ordin structural și termodinamic. Între timp însă, au fost identificate proteine transmembranare care, la nivelul domeniului transmembranar, prezintă  $\beta$ -pliuri orientate în contrasens care se organizează asemenea doagelor unui butoiăș, astfel încât expun către bistrat zonele hidrofobe și ascund către interior structurile hidrofile. Asemenea proteine se întâlnesc, de exemplu, în membrana mitocondrială externă formând *porine*. Iată un alt exemplu de schimbare de atitudine, pe care evoluția cunoașterii realității biologice a impus-o.

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) și (ii) **multiplas** (mai multe treceri). Este lesne de înțeles că proteinele structurate ca  $\beta$ -pliuri la nivelul domeniului transmembranar

(porinele) nu pot fi unipas. În funcție de poziția 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 structurării lor, nuanțându-l. În același timp existența ecto- și endoproteinelor sporește asimetria structurală a organizării moleculare a membranelor, 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). Vom comenta ceva mai jos efectul și importanța acestor aspecte asupra funcționalității membranelor.

Primele și cele mai detaliate informații asupra proteinelor membranare au fost obținute din studiul membranelor eritrocitare. Motivația este simplă: materialul biologic este ușor de obținut, în cantitate suficientă; populația celulară omogenă este ușor de asigurat, membranele se obțin fără dificultate printr-un simplu șoc hipoton urmat de centrifugare, iar membranele obținute (numite și fantome eritrocitare) nu sunt impurificate cu endomembrane (membrane ale organelor celulare), inexistente în acest caz. 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, iar pe de altă parte se adsoarbe unitar pe lanțurile polipeptidice, conferindu-le o densitate de sarcină negativă unitară. În aceste condiții migrarea proteinelor se face numai în funcție de greutatea lor moleculară.

Rezultatele unei asemenea abordări pentru descrierea proteinelor membranei eritrocitare se înfățișază sub forma unui spectru de benzi proteice distribuite între 20 și 250 kD, benzi 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 pe care le avem referitor 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, numită *glicoforină*, prezentă din abundență în membrana eritrocitului, care migrează atipic (se dispune electroforetic undeva pe la 90kD, deși masa ei moleculară este de numai ~30kD). Este cea mai bine cunoscută proteină a membranei eritrocitare, sub aspectul structurii biochimice. Are 131 aminoacizi, cunoscându-i-se integral secvența; este proteină transmembranară unipas, tip I (capătul amino în ectodomeniu); ectodomeniul este mare și poartă, din câte știm în momentul de față, 16 lanțuri glucidice care practic dublează gabaritul acestei molecule (explicație pentru migrarea electroforetică atipică, densitatea de sarcină negativă pe unitatea de masă este mai mică decât în mod normal); endodomeniul este mic purtând capătul carboxil al lanțului polipeptidic; domeniul transmembranar este structurat în  $\alpha$ -helix și conține 26 de aminoacizi. Paradoxul este că, deși structural glicoforina pare a nu avea secrete, nu i se cunoaște funcția. Ciudățenia este cu atât mai mare cu cât există eritrocite din a căror membrană glicoforina lipsește fără ca funcționalitatea să le fie afectată.

O situație diametral opusă o reprezintă proteina *banda 3*, despre care avem mai puține informații structurale, dar a cărei funcție este clar stabilită: este proteina care structurează canalul anionic de schimb între bicarbonat ( $\text{HCO}_3^-$ ) și clorură ( $\text{Cl}^-$ ). Este proteină transmembranară, are masa moleculară de ~100kD (în jur de 930 aminoacizi) și cel puțin 13 treceri în  $\alpha$ -helix prin bistratul lipidic (cam 50kD din masa moleculară); endodomeniul este mare (~400 din aminoacizii care o formează, ~40kD) și poartă capătul amino (proteină transmembranară de tip II); ectodomeniul, mic, ~20 aminoacizi, poartă o mică încărcătură glucidică (se pare că doar 2 lanțuri) și reprezintă capătul carboxil al proteinei.

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 versantul intern al membranei (așadar o endoproteină) și reprezintă componenta de bază a ceea ce numim ***citoschelet asociat membranei***.

*Citoscheletul asociat membranei* este o rețea de endoproteine cu ochiuri și noduri, solidară membranei prin atașarea la endodomeniul unor proteine transmembranare. Grosimea acestei structuri membranare este de 5-10nm. Citoscheletul asociat membranei este solidar și cu citoscheletul celular (vezi acolo, în cursul de "Matrice citoplasmatică") fiind responsabil de menținerea și/sau modificarea formei celulelor, ca și de geometria membranei (de exemplu: forma biconcavă a eritrocitului, structurarea specializărilor de membrană cum ar fi microvili, stereocili, cili, flageli).

Spuneam că spectrina este componenta de bază a citoscheletului asociat membranei. Ea este un heterodimer format dintr-o subunitate  $\alpha$  ( $\alpha$ -*spectrină*, ~240kD) și o subunitate  $\beta$  ( $\beta$ -*spectrină*, ~220kD). 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 contra-direcție (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  $\alpha$  și gruparea carboxi-terminală a subunității  $\beta$  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. Acești tetrameri formează laturile rețelei citoscheletului asociat membranei. Capetele tetramerilor, ce reprezintă cozile bastonașelor de spectrină, au capacitatea de a se asocia, de regulă câte 5 sau 6, prin interacțiuni cu filamente scurte de ***actină***, formând nodurile rețelei.

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

Tot în noduri se localizează o altă proteină periferică, ***banda 4.1***, cu masa de ~80kD 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 endodomeniile benzii 3, sau glicoforinei, contribuind la atașarea citoscheletului pe versantul intern al membranei. Rezultă de aici un rol structural pentru paradoxala glicoforină, dar acesta nu este esențial, neafectând funcțiile eritrocitelor care nu exprimă glicoforină.

Atașarea citoscheletului asociat membranei la aceasta este însă datorată în principal unei alte proteine globulare, *ankirina* (masa moleculară ~210kD, diametrul ~9nm), care se

leagă atât la subunitatea  $\beta$  a spectrinei cât și la endodomeniul benzii 3, asigurând ancorarea la membrană a citoscheletului asociat, la nivelul laturilor ochiurilor.

Pe scurt, citoscheletul asociat membranei este format din tetrameri de spectrină la nivelul laturilor 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 atașază suplimentar la endodomeniul benzii 3, sau al glicoforinei (o altă proteină transmembranară). Interacțiunile afine dintre elementele citoscheletului asociat membranei sunt într-o dinamică permanentă, astfel încât această structură nu este rigidă, ci într-o continuă modelare, care să satisfacă nevoile celulei.

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*).

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 acesteia. Mai mult, în ciuda complexității interacțiunilor pe care proteinele membranare le stabilesc între ele, sau (după cum veți constata în numeroase ocazii în parcurgerea cursurilor de biologie celulară) cu structuri intracelulare, ori din afara celulelor, ele sunt mobile mișcându-se în planul membranei.

*Mobilitatea proteinelor membranare* constă în *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 1  $\mu\text{m/s}$ . Lentoarea difuziei laterale a proteinelor nu trebuie înțeleasă numai prin diferențele de mărime între acestea și lipide, dar și prin interacțiunile pe care proteinele le stabilesc în mod dinamic între ele, sau cu alte structuri dinăuntru, sau dinafara celulei. Astfel aceiași proteină, în aceleași condiții de fluiditate a bistratului lipidic, se poate mișca mai repede, sau mai încet în funcție de situația ei funcțională de moment. 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 crează și își păstrează o compoziție proteică diferită la nivelul membranei apicale, față de cea de la nivelul membranei latero-bazale. Astfel proteinele de la nivelul membranei apicale (numită și membrană luminală) sunt împiedicate, prin structuri membranare speciale (vezi la joncțiunile membranare), să difuzeze către membrana latero-bazală și invers. Acest lucru contribuie la menținerea compoziției proteice diferite între cele două domenii membranare, asigurând funcțiile diferite ale lor.

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

Prime dovezi au fost aduse în 1970, 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*. În ce constau aceste observații. Limfocitele a căror suprafață era marcată inițial uniform cu anticorpi policlonali fluorescenți, prezentau, în timp, aglomerări în pete a fluorescenței, iar în cele din urmă, fluorescența se aduna în întregime la un pol, 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) în 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*”). Aceste experimente au permis și estimarea coeficienților de difuzie, așadar aprecierea cantitativă a mișcării proteinelor membranare. 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 ale membranei. În acest fel se pot măsura coeficienții de difuzie pentru proteine din orice tip de celulă.

### **Rolul proteinelor membranare**

Ca și în cazul lipidelor membranare, proteinele au atât **rol structural**, cât și **rol metabolic**.

O bună exemplificare asupra rolului structural al proteinelor membranare îl constituie comentariul aferent citoscheletului asociat membranei (vezi mai sus). Se poate adăuga rolul unor proteine transmembranare (*aderine, integrine*) în stabilirea joncțiunilor dintre celule, la nivelul țesuturilor, cât și dintre acestea și matricea extracelulară (proteine și/sau glicoproteine ce structurează diverse componente tisulare între celule). Rolul acestora este de a menține celulele într-o ordonare coerentă în structurarea țesuturilor, dar și de a permite acestora să schimbe informații pentru o integrare eficientă. 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 metabolic (vezi mai sus, ca exemplu, proteina banda 3 din membrana eritrocitară).

Detalii asupra rolurilor metabolice ale proteinelor membranare veți afla la cursurile de transport membranar și semnalizare celulară. Aici vom aminti, în linii generale, că rolurile metabolice ale proteinelor membranare se manifestă în ceea ce privește schimburile de informații și substanțe dintre celule, sau dintre acestea și mediu. Astfel proteinele membranare pot fi *receptori, transportori prin membrană* (canale ionice, pompe ionice, conexoni), 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, sau fuzionarea unor vezicule cu membrana celulară pentru a realiza procese denumite endocitoză, respectiv exocitoză; vezi la transport membranar). Proteinele membranare mai pot funcționa ca *enzime* (metaloproteinaze pentru componente de matrice extracelulară, fosfolipaze, kinaze,

fosfataze), sau ca proteine implicate în *semnalizare* (proteine platformă, sau schelă, proteine G).

În toate aceste funcții asimetria structurării membranei este deosebit de importantă. Astfel, receptorii, dar și proteinele de adeziune (aderinele și integrinele) prin asimetria lor structurală permit interacțiunea prin ectodomenii cu liganzii specifici, iar prin endodomenii asigură transmiterea informației către interiorul celulei și declanșarea unor procese celulare care se constituie în răspuns celular la semnalizările receptate. De remarcat că în transducția semnalelor (la receptori, sau integrine) un rol important revine domeniului transmembranar, care, prin capacitatea de a suferi rearanjări conformaționale, asigură transmiterea informației purtate de ligand și transmise prin interacțiunea cu receptorul, dinafara celulei în citoplasmă, unde este preluată, prelucrată și, de regulă, amplificată de participanții la diversele procese de semnalizare.

În rezumat, proteinele membranare sporesc eterogenitatea și asimetria compozițională ale 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.

## COMPONENTA GLUCIDICĂ A MEMBRANEI

În afară de lipide și proteine, în structurarea 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 (macro)moleculare individuale, ci sunt grefate pe un purtător lipidic, sau proteic, ca structuri oligozaharidice, mai rar polizaharidice. Ele sunt dispuse întotdeauna pe versantul extern al membranelor celulare formând ceea ce denumim glicocalix.

### **Definiția glicocalixului**

Glicocalixul reprezintă învelișul glucidic al celulelor, constituit din structuri oligozaharidice inserate pe lipide, sau proteine.

Din punct de vedere al structurii biochimice globale, trei sunt componentele membranare ce participă la structurarea glicocalixului: glicolipidele, glicoproteinele și proteoglicanii. Grosimea glicocalixului este, în medie, între 20 și 50nm, variind de la un tip de celulă, la altul, dar și pentru aceiași celulă de la un domeniu membranar, la altul (spre exemplu la celulele epiteliilor unistratificate între polul apical și cel latero-bazal). 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 epiteliilor monostratificate, polul apical are un glicocalix mai abundent, față de polul latero-bazal.

În cele ce urmează vom discuta aspectele cu caracter general legate de organizarea glicocalixului, întrucât complexitatea și diversitatea structurală a lanțurilor oligozaharidice de la nivelul acestui înveliș glucidic al celulelor face abordarea detaliilor inefficientă și fără justificare în raport cu scopul nostru. Această modalitate de tratare nu

va afecta cu nimic înțelegerea organizării acestei componente structurale a membranelor și a rolului ei.

În structura glicocalixului nu participă toate monozaharidele existente în natură. Numai nouă intră în alcătuirea lanțurilor oligozaharidice ale glicolipidelor și glicoproteinelor, dintre care șapte mai abundent. Acestea sunt, într-o ordine lipsită de o anumită semnificație: glucoza (Glc), galactoza (Gal), manoză (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 baza a acidului neuraminic, 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 acesta 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 chiar tri-acetilați ne facem o idee mai exactă asupra diversității entităților moleculare incluse în clasa acizilor sialici.

În afară de cele șapte tipuri de monozaharide amintite în proteoglicani întâlnim și xiloza (monozaharidul prin care se leagă structura glucidică de o serină din partea proteică), ca și acizi uronici (acid glucuronic și acid iduronic).

Dintre monozaharidele menționate numai Fuc este din seria L, toate celelalte aparținând seriei D.

Din enumerarea monozaharidelor ce participă la structurarea lanțurilor oligo- sau polizaharidice ce organizează glicocalixul ne facem o primă idee asupra eterogenității structurale a acestuia. Dar lucrurile nu se opresc doar la acest nivel. Pentru substanțierea caracterului eterogen al structurării membranelor (indus de lipide și amplificat de proteine) trebuie să subliniem că înșiruirea glucidelor în lanțurile oligozaharidice nu este aceeași diferind între glicolipide și glicoproteine, diferind între divesele 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 aceste posibilități sunt utilizate de celule. Acestea sunt limitate de tipurile de glicoziltransferaze (enzimele ce acționează în biosinteza structurilor glucidice) pe care o anumită celulă le are în reticulul endoplasmic și în complexul Golgi, organitele unde oligo(poli)zaharidele din glicolipide, glicoproteine, sau proteoglicani sunt produse. Aceste enzime sunt stereospecifice, astfel că legarea pas cu pas a glucidelor unul de altul nu este întâmplătoare.

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

Glicolipidele, care constituie 10% (procente moleculare) 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 "Reticulul endoplasmic"), 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. 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 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 participă, 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.

Deși proteoglicanii sunt slab reprezentați la nivelul membranelor celulare, contribuția lor la structurarea glicocalixului 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) și, în al doilea rând, structurile glucidice sunt cele mai lungi dintre toate cele întâlnite la nivelul glicocalixului. Lanțurile polizaharidice ale proteoglicanilor poartă denumirea de ***glicozaminoglicani***. Glicozaminoglicanii sunt structuri polizaharidice neramificate, formate din unități dizaharidice repetitive alcătuite dintr-un zahar, sau aminozahar 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 aminozahar). Trebuie să subliniăm puternica încărcătură negativă a proteoglicanilor provenită atât de la acizii uronici conținuți cât și de la grupările sulfat (esterificate la diferiți hidroxili) pe care le pot conține zaharurile, sau amino zaharurile prezente în moleculele glicozaminoglicanilor.

### **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 exemplu de metodă nespecifică amintim folosirea roșului de ruteniu. Acest compus interacționează cu sarcinile negative de la nivelul glicocalixului impregnând grosimea acestuia cu nucleii grei ai ruteniului și conferind structurii electrono-opacitate. Putem caracteriza prin această metodă glicocalixul sub aspectul grosimii sale și a densității lanțurilor glucidice care îl formează.

Ca metodă specifică prezentăm citochimia ultrastructurală cu lectine. Lectinele 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). Lectinele mai sunt cunoscute și sub denumirea de aglutinine deoarece, prin capacitatea 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 și extrase din plante; 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 “Rolul glicocalixului”).

În citochima ultrastructurală lectinele pot fi folosite sub formă nativă, sau cuplate la trasori electrono-opaci (feritină, peroxidază de hrean, hemeptizi – derivați de proteoliză controlată ai citocromului c, aur coloidal; vezi și informațiile de la lucrările practice asupra membranei celulare). Folosirea în formă nativă a lectinelor implică utilizarea unor metode în doi pași, numite metode în “sandwich”. La primul pas suprafața celulelor este incubată cu lectina aflată în exces în soluția folosită. Excesul este apoi îndepărtat, iar lectinele rămase, atașate specific de componente glucidice ale membranei prin unul din situsurile de legare, sunt vizualizate, în pasul al doilea, prin legarea de glicoproteine corespunzătoare, cuplate cu trasori electrono-opaci (prin legarea la situsurile de interacțiune rămase disponibile). 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, datorită reacțiilor chimice petrecute în timpul cuplării, sau posibilelor împiedicări sterice care pot apare în conjugat.

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

Concanavalina A (ConA), o lectină din *Concanavalia ensiformis*, care leagă  $\alpha$ -Man din structura de miez trimanozidic prezentă în structurile *N*-glicozidice, sau  $\alpha$ -Glc aflată în poziție terminală. Rezultă că la nivelul glicocalixului ConA nu se leagă de Glc aceasta nefiind situată în poziție terminală.

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

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

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

Pentru  $\beta$ -Gal sunt folosite lectina din arahide (PNA) și/sau lectina I din *Ricinus communis* (RCA I). Specificitățile celor două lectine sunt însă diferite. PNA se leagă exclusiv de Gal aflată în poziție terminală, în timp ce RCA I poate recunoaște (alături de Gal din poziție terminală) 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 galactoză terminală se află în cadrul secvenței glucidice este diferită. Așadar specificitățile celor două lectine sunt nuanțate.

Au fost folosite două lectine și pentru evidențierea citochimică a acizilor sialici. Acestea sunt lectina din germeni de grâu (WGA) și lectina din *Limulus polyphemus* (LPA). Prima recunoaște acidul sialic *N*-4-*O*-diacetilat, dar și  $\beta$ -GlcNAc. Cea de a doua 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. Speranța în ceea ce privește rezolvarea problemei caracterizării glicocalixului și în general a biologiei glucidelor celulare 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 exterior 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.

### **Rolul glicocalixului**

Prin asemănare cu rolul protector al părții glucidice din glicoproteine împotriva acțiunii proteazelor, se poate afirma că glicocalixul protejază structura membranei celulare împotriva agresiunilor fizico-(bio)chimice. Lucrul acesta nu este departe de realitatea biologică. Modul în care el este structurat, conferă membranei rezistență mecanică, controlând accesul către straturile profunde ale sale, deci către bistratul lipidic și către componentele proteice ale acesteia. Rolul acesta este cu atât mai important cu cât accesibilitatea 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 (mucinice) abundente, cum se întâmplă, 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 sarcina negativă 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 acolo), 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.

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 structuri cu caracter permanent, sau cu existență de lungă durată. În ciuda caracterului lor permanent sau de lungă durată, aceste structuri nu trebuie înțelese ca rigide. Ele sunt într-o permanentă dinamică, răspunzând nevoilor celulei în ceea ce privește amploarea lor, sau capacitatea de a se forma și desface în diferite zone ale

membranelor celulare. Caracterul permanent sau de lungă durată al existenței lor trebuie astfel înțeles în sensul că întotdeauna celulele prezintă asemenea structuri necesare organizării țesuturilor.

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 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. Recrutarea leucocitelor aflate marginal în fluxul sanguin din vasele de sânge ale zonelor inflamatorii, implică structurile glucidice ale glicocalixului acestora. 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, ele fiind stocate în membrana unor structuri veziculare din interiorul celulelor endoteliale și expuse tranzitoriu numai ca rezultat al acțiunii stimulilor eliberați în procesele inflamatorii. P-selectinele au parteneri de acțiune expuși permanent pe suprafața limfocitelor și anume structuri glucidice din glicocalixul acestora, numite **antigene sialilate Lewis-x**. Interacțiunile dintre P-selectine și leucocite 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 exocitează factorul de activare plachetară (PAF), un compus de natură fosfolipidică. Cele ce urmează descriu fenomenele ce se petrec în cazul particular al extravazării limfocitelor T. Prin legarea de receptorii de pe suprafața limfocitelor, PAF activează prin mecanisme de semnalizare dependente de **RhoGTP-aze** (vezi la semnalizarea celulară) **integrina  $\alpha\text{L}\beta\text{2}$** . Integrinele sunt proteine transmembranare cu rol în adeziunea celulară, au afinitate ridicată și sunt structurați ca heterodimeri  $\alpha\beta$ . Au specificitate pentru proteine ale matricei extracelulare, sau pentru proteine transmembranare expuse pe suprafața unor celule partenere. Integrina  $\alpha\text{L}\beta\text{2}$  activată se leagă la **molecule de adeziune celulară** (CAM) din superfamilia imunoglobulinelor ICAM-1 și ICAM-2, expuse constitutiv (permanent) la suprafața celulelor endoteliale. Interacțiunile integrină  $\alpha\text{L}\beta\text{2}$ -ICAM duc la atașarea fermă a limfocitelor la endoteliu, la oprirea lor din mișcarea de rostogolire în care fluxul sanguin le antrenează, la etalarea și migrarea lor pe suprafața celulelor endoteliale până în zonele jonționale dintre acestea. Ajunse aici limfocitele se insinuiază printre două celule endoteliale părăsind lumenul vasului și trecând în țesut pentru a-și face treaba în zona tisulară inflamată. Cum limfocitele desfac jonționile strânse dintre celulele endoteliale, fără a afecta integritatea funcțională a endoteliului (separarea strictă a spațiului luminal de cel tisular), este încă un aspect în studiu.

Fenomene similare se petrec și la extravazarea monocitelor. În acest caz integrina implicată este  $\alpha\text{M}\beta\text{2}$ .

(ii) Fertilizarea este procesul prin care spermatozoidul fuzionează cu ovocitul. Pentru realizarea acestui proces, spermatozoizii trebuie să ajungă în tractul reproducător feminin, unde suferă un fenomen de **capacitare** ce durează, la om, 5-6 ore. Capacitarea constă în modificări ale compoziției lipidice și glicoproteice a suprafeței capului

spermatozoidului, ca și în creșterea metabolismului și motilității acestuia. Mecanismele acestor transformări structurale și funcționale nu sunt cunoscute încă în detaliu. Ele sunt declanșate de pătrunderea anionului bicarbonat printr-un canal specific din membrana spermatozoidului și activarea unei adenilat ciclaze. Spermatozoidul astfel capacitat poate traversa stratul celulelor foliculare ce înconjoară ovocitul, pentru a ajunge la **zona pelucida**, un înveliș glicoproteic al ovocitului, format din trei glicoproteine denumite ZP1, ZP2 și ZP3. Ajuns aici, el se lega de structuri *O*-glicozidice ale ZP3, printr-o componentă a membranei zonei acrozomale, care prezintă, după toate probabilitățile, activitate galactozil-transferazică. Zona pelucida acționează ca o barieră ce conferă specificitate de specie fertilizării, astfel încât aceasta nu se poate realiza între elemente ale unor specii diferite. Eliminarea zonei pelucida a ovocitului permite fertilizarea elementelor aparținând unor specii diferite, însă zigoții hibridi astfel obținuți nu sunt viabili, nu se dezvoltă. Interacțiunea descrisă mai sus între spermatozoid și ZP3, declanșază 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 pelucida 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 pelucida 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. Fertilizarea se sfârșește cu ceea ce se numește **reacția corticală** a ovocitului, care împiedică polispermia, adică fuziunea mai multor spermatozoizi cu ovocitul. Aceasta conferă protecția secundară (de lungă durată) împotriva polispermiei. O blocare primară (de scurtă durată) a polispermiei are loc pe baza depolarizării rapide a membranei ovocitului în momentul fuziunii cu spermatozoidul. Reacția corticală constă în activarea, în momentul fuziunii ovocit-spermatozoid, a unei căi de semnalizare prin fosfoinozotide (fosfatidilinozitol) care are ca efect creșterea concentrației  $Ca^{2+}$  în citosolul ovocitului și exocitarea conținutului enzimatic al granulelor corticale ale acestuia. Enzimele eliberate prin reacția corticală modifică biochimic structura zonei pelucida, prin clivarea ZP2 și degradarea componentei glucidice a ZP3. Aceste modificări asigură rezistența zonei pelucida la legarea altor spermatozoizi. Așadar două dintre evenimentele esențiale ale procesului de fertilizare (reacția acrozomală a spermatozoidului și reacția corticală a ovocitului) implică participarea directă a unor structuri glucidice.

Pe fenomene de recunoaștere celulară care implică structurile glucidice ale glicocalixului se bazează și compatibilitățile de grup sanguin ale sistemului ABO. Purtătoarele antigenelor de grup sanguin sunt glicolipidele aflate în membranele celulelor sanguine. Lanțurile glucidice responsabile au următoarele structuri:

Grupa O:  $Fuc\alpha 1 \rightarrow 2Gal\beta 1 \rightarrow 4Glc\ NAc \rightarrow \dots$

Grupa A:  $Fuc\alpha 1 \rightarrow 2Gal\beta 1 \rightarrow 4Glc\ NAc \rightarrow \dots$   
 $\uparrow \alpha 1 \rightarrow 3$   
 GalNAc

Grupa B:  $Fuc\alpha 1 \rightarrow 2Gal\beta 1 \rightarrow 4Glc\ NAc \rightarrow \dots$   
 $\uparrow \alpha 1 \rightarrow 3$   
 Gal

Grupa AB poartă în amestec ambele antigene ale grupelor A și B. Bineînțeles că apartenența la una dintre grupe este dependentă de tipul de glicoziltransferaze disponibile, ca urmare a exprimării genelor corespunzătoare.

Structurile glucidice sunt necesare, dar nu neapărat suficiente funcționării receptorilor din membranele celulare. Cea mai mare parte a receptorilor 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, în momentul de față, afirma cu certitudine că structura glucidică este implicată în structurarea 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.

În concluzie se poate spune despre componenta glucidică a membranelor celulare că nuanțează, uneori într-o manieră de mare subtilitate, funcționarea acestei structuri celulare.

## **CONSIDERAȚII FINALE ASUPRA ORGANIZĂRII MOLECULARE A MEMBRANELOR CELULARE**

Organizarea membranelor celulare (ca și a endomembranelor) are la bază un bistrat lipidic eterogen, asimetric și cu proprietăți fluide manifestate bidimensional. Aceștia i se adaugă proteine care îi conferă caracterul unui mosaic (proteine plutind pe, sau cufundate într-o mare lipidică).

Modelul mozaicului fluid pentru organizarea biomembranelor a fost completat prin evidențierea și descrierea unor structuri adiacente: citoscheletul asociat membranei (structură aflată pe versantul intern al membranelor) și glicocalixul (structură expusă pe versantul extern al membranelor, alcătuită din lanțuri oligo-(poli-)zaharidice din compoziția glicolipidelor, glicoproteinelor și proteoglicanilor din membrană).

Atât proteinele 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 mozaic fluid sub aspect structural, 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) 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.

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

**N.B.** Pentru iconografia aferentă, prezentați-vă la curs și consultați manualele:

1. **MOLECULAR BIOLOGY OF THE CELL**, autori: B. Alberts, D. Bray, J. Lewis, M. Raff, K. Roberts, J.D. Watson, Garland Publishing Inc., New York & London, 1989 (ediția a II-a), 1994 (ediția a III-a), 2002 (ediția a IV-a), și
2. **MOLECULAR CELL BIOLOGY**, autori: H. Lodish, A. Berk, S.L. Zipursky, P. Matsudaira, D. Baltimore, J. Darnell, W.H. Freeman and Company, New York, 2000 (ediția a IV-a)