

Membranele biologice

Distribuirea asimetrică a fosfolipidelor în membrane. Rolul transportorilor lipidelor membranare (LT).

Transportul membranal prin canale, transportori și ionofori.

Autor Simionică Eugeniu

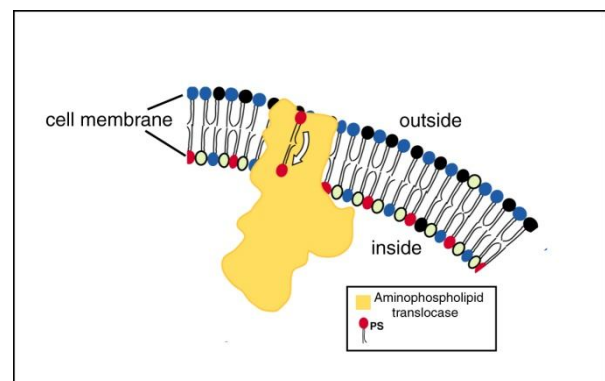
1. Distribuirea asimetrică a lipidelor și rolul transportorilor LT.

Este important de menționat că rolul acestor transportori este nu atât de a menține asimetria fosfolipidelor membranare, ci de a asigura răspunsul membranei la diferiți factori. Adică, însăși asimetria, este un efect, un rezultat al percepției sau răspunsului la diverși factori cu care contactează membrana.

Se disting cel puțin trei grupe de transportori LT: aminofosfolipid translocazele (flipazele), flopazele și fosfolipid scramblazele.

1.1 Aminofosfolipid translocazele (flipazele) . Prezintă o clasă de transportatori pentru lipide ATP-dependenți. Sunt specifice pentru fosfatidilserină și fosfatidiletanolamină, catalizând transportul lor din stratul exterior (extracelular) în stratul interior (citoplasmatic) al bistratului lipidic. Ele sunt responsabile de menținerea unei concentrații scăzute a acestor fosfolipide în stratul extacelular al bistratului lipidic.

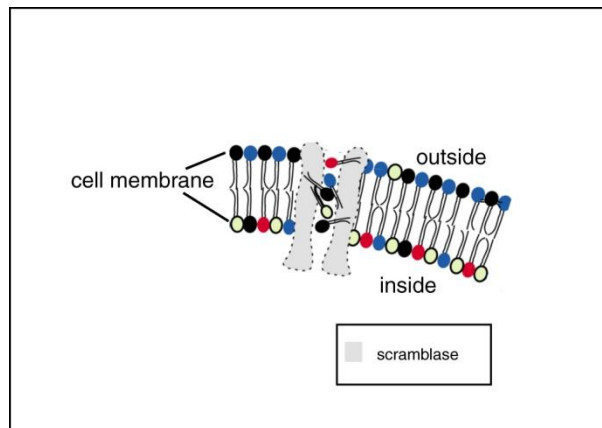
Funcționarea flipazei



1.2 Flopazele asigură transportul invers și nu sunt atât de specifice. Exemple: *multidrug resistance-associated proteins (MRP1)* poate funcționa ca flopază în eritrocite. În general proteinele MRP sunt responsabile de eliminarea din celule a compușilor conjugați cu glutatión, glucuronat și sulfat. De exemplu secreția glucuronid-bilirubinei din ficat în bilă. De asemenea sunt responsabile pentru rezistența la medicamente în unele cancere.

1.3 Fosfolipid scramblaza PLSR1 (phospholipid scramblase 1) facilitează amestecarea nespecifică bidirecțională a fosfolipidelor între ambele monostraturi lipidice ale membranei. Este stimulată de creșterea intracelulară a concentrației de Ca^{2+} . PLSR1 poate fi reversibil palmitolată-depalmitolată și mai conține un situs de fosforilare dependent de protein kinaza C, necesar pentru reglarea activității ei. Acest transportator mai are un rol important în coagulare și în recunoașterea de către sistemul reticuloendotelial al celulelor îmbătrânite supuse degradării. În ambele

cazuri această scramblază transportă fosfatidilserina din stratul intern în cel extern a bistratului lipidic, astfel are loc o expunere a fosfatidilserinei pe suprafața externă a membranei inițiind un răspuns.



Funcționarea scramblazei

2. Transportul membranal prin canale și transportatori

Transportul membranal poate fi asigurat prin difuzie, canale sau transportatori. În prezent este stabilită structura fină și funcționarea numeroaselor canale și transportatori. Cunoașterea structurii este majoră pentru a înțelege funcționarea lor. Sa stabilit că multe canale și transportatori sunt cauza diferitor patologii (fibroza cistică, nefropatii, dereglări neurologice, rezistență la medicamente, senescență precoce etc.). Mulți transportatori au un rol deosebit în transportul diferitor medicamente.

2.1 Canalele membranare

Se disting două tipuri de canale: tip alfa și tip beta.

Canale de tip alfa - sunt proteine homo- sau hetero-oligomerice care conțin 2-22 de segmente transmembranare alfa-helicale. La canalele membranare de tip alfa fac parte:

- canalele voltaj-dependente specifice pentru ionii Na, K, Ca, Cl;
- aquaporinele
- canalele agonist sau ligand-dependente;
- canalele cAMP-dependente;

Unele canale pot facilita translocarea specifică a unor ioni anorganici, molecule organice mici (e.g. urea) sau proteine, atele sunt nespecifice. În dependență de țesut, există diferențe structural-funcționale între unul și același canal pentru una și aceeași substanță transportată. De exemplu, în organismul uman sau depistat peste 15 feluri de canale voltaj-dependente pentru ionii K^+ .

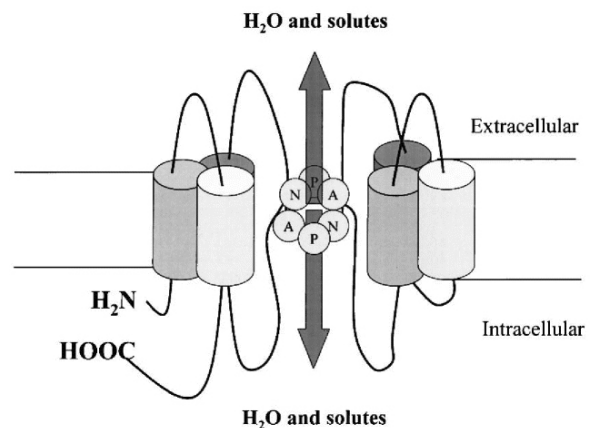
a) Canalele voltaj-dependente specifice pentru ionii Na, K, Ca, Cl.

Aceste canale sunt controlate de potențialul electric transmembranar, se deschid și închid foarte rapid, în milisecunde, și sunt responsabile de transmiterea semnalelor electrice în membrana neuronilor și altor celule excitabile. Fiecare canal constă din subunități glicoproteice specifice, homo- sau hetero-oligomerice. De exemplu, canalul pentru Ca^{2+} constă din subunitățile alfa1, alfa2, delta și beta. Toate canalele ionice conțin o subunitate majoră alfa care funcționează ca por pentru ioni, alte subunități non-alfa sunt accesorii cu rol în reglarea canalului.

b) Aquaporinele.

Aquaporinele (AQP) prezintă niște proteine mici, asamblate în membrană sub forma unor homotetrameri, fiecare monomer constă din 6 segmente transmembranare alfa-helicale. Aquaporinele sunt foarte hidrofobe, nu leagă apa dar permit ca ea ușor și selectiv să treacă prin membrana. Selectivitatea este datorată capacității segmentelor alfa transmembranare de a se contracta, formând un por cu diametrul de 0,28 nm, fapt care

limitează dimensiunile moleculelor ce pot să treacă.



În prezent se cunosc peste 10 aquaporine descrise structural. În dependență de structură și funcție se deosebesc două clase: AQP specifice doar pentru apă și aquagliceroporinele (AQGP) pentru apă și alte molecule mici. AQP sunt foarte importante în menținerea unui gradient pH membranar deoarece nu permit transportul ionului de hidroniu H_3O^+ . În organismul uman se conțin 10 aquaporine notate AQP0 – AQP9.

Rolul aquaporinelor este (unele din roluri):

- protecția osmotică, AQP1
- producerea lichidului cerebrospinal, AQP1
- sesizarea osmolarității, AQP4
- bilanțul fluid în lentile, AQP0
- concentrarea urinei, AQP1
- mediază activitatea hormonului vasopresina, AQP2
- reabsorbția apei în sânge, AQP3
- hidratarea alveolară, AQP1
- secrețiile fluide în bronhii, AQP4; trahee, AQP3
- producerea salivei AQP5

Pe lângă apă, unele aquaporine transportă CO_2 , glicerol, uree, purine, pirimidine, nucleozide și acizi monocarboxilici.

c) Canalele agonist sau ligand-dependente permit trecerea moleculelor specifice numai după legarea la acest canal a unei molecule speciale numite agonist sau ligand. Ca exemplu, poate servi legarea acetilcolinei(ligand) la receptorul nicotin-acetilcolinic care va funcționa ca canal ligand-dependent permițând trecerea selectivă în celulă doar a Na^+ .

Canale de tip beta sau porinele - sunt proteine ce conțin secvențe de beta-structuri transmembranare ce formează un cilindru cu diametrul de la 0.6 – 3 nm. Acest tip de canale sunt mai mult prezente în membrana externă mitocondrială, în membranele unor bacterii. Permit trecerea diferitor tipuri de molecule de la ioni anorganici până la proteine.

2.2 Transportorii membranari

Transportatorii membranari prezintă un grup de proteine transmembranare foarte diverse după structură, specificitate și funcții. TM au un grad foarte înalt de specificitate structurală și chiar stereospecificitate față de moleculele pe care le transportă. De exemplu transportorul pentru D-glucoza în eritrocite are o afinitate de 10 ori mai mică pentru D-galactoză și de 1000 ori mai mică pentru L-glucoză.

Se disting 4 etape în funcționarea transportorilor:

- a. Recunoașterea din mulțimea substanțelor dizolvate doar a moleculei specifice
- b. Legarea și translocarea moleculei specifice prin membrană
- c. Eliberarea moleculei în citosol
- d. Regenerarea transportorului la starea inițială

În dependență de necesitățile suplimentare pentru funcționarea transportorului, deosebim transportori ce funcționează pasiv, fără consum de energie și transportori care necesită energie pentru funcționare. Respectiv deosebim transport pasiv și transport activ. Ultimul poate fi primar și secundar.

2.2.1 Transportul pasiv

Transportorii ce asigură transportul pasiv prezintă molecule proteice ce conțin între 400-600 resturi de aminoacizi. Lanțurile lor polipeptidice formează de la 2 până la 24 secvențe transmembranare de tip alfa-helix. Transportorii pasivi transportă ioni anorganici, monozaharide, aminoacizi, diverși metaboliți ai ciclului Krebs și glicolizei.

Exemple de transportori pasivi pot fi:

- transportorii pentru glucoză GLUT1-GLUT5
- Transportorii ce asigură antiportul pasiv al anionilor de Cl^- și HCO_3^- în eritrocite și rinichi (proteine schimbătoare de anioni). Sunt importanți în ajustarea concentrației de HCO_3^- eritrocitar în sângele arterial și venos.
- Transportorii membranei mitocondriale interne: antiporterii pentru ADP și ATP; simporterii pentru fosfat și H^+ ; antiporterii glutamat-aspartat. Acești transportori sunt importanți în conservarea energiei și în metabolism.

2.2.2 Transportul activ

Transportorii activi catalizează translocarea moleculelor contra gradientului de concentrație cu consum de energie. Se deosebesc transportori activi primari și secundari, respectiv transport activ primar și secundar.

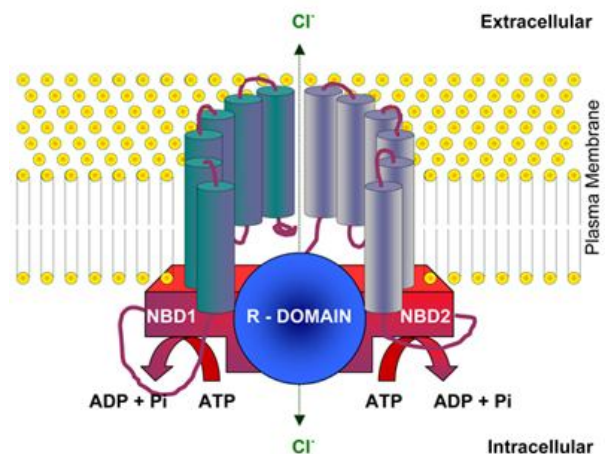
Transportori primar activi (PAT) necesită pentru funcționare ATP pe care îl scindează autofosforilându-se tranzitoriu, substratul transportat nu este fosforilat. Așa

tip de transportori se referă la ATPaze. Se disting trei familii de PAT care catalizează translocarea cationilor anorganici: transportatori de tip P, V și F.

- **Tipul P** sunt fosforilați și defosforilați în timpul transportului ionilor de Na, K, Ca. Se cunosc peste 300 de membri.
- **Tipul V** (V de la vacuolă) prezintă pompe de H⁺, responsabili pentru acidificarea conținutului lizozomal, endozomal, veziculelor Golgi și secretorii.
- **Tipul F** sunt prezenți în membranele mitocondrii, cloroplastelor și bacteriilor. Participă în translocarea H⁺ cu consum de ATP.

La PAT de asemenea face parte o superfamilie de transportori numiți **ABC (ATP-binding cassette)** care la fel scindează ATP pentru a transporta. Se cunosc câteva zeci de familii ABC. Structural ei se caracterizează prin prezența unui domeniu transmembranar și un domeniu citozolic de legare a ATP numit **ATP cassette**. Genomul uman conține cel puțin 49 de gene ce codifică diferiți reprezentanți. Transportorii ABC catalizează influxul sau efluxul diferitor fosfolipide, Acil-CoA cu catenă lungă, sărurile acizilor biliari, colesterolul, peptide. Acești transportori au un rol medical foarte important. Mulți dintre ei sunt implicați în transportul selectiv a diferitor compuși exogeni, toxine și medicamente. Unii ABC transportori sunt responsabili de fenomenul rezistenței la medicamente, în special chimioterapice. De exemplu, proteinele asociate cu rezistența la medicamente **MRP (multidrug resistance associated proteins)**, o subfamilie de ABC transportori, care în mod normal sunt responsabile de eliminarea din celule a compușilor conjugați cu glutatation, glucuronat și sulfat, secreția glucuronid-bilirubinei din ficat în bilă. Un ABC transportor important este așa numitul **receptor pentru sulfoniluree** care funcționează în reglarea secreției insulinei indusă de glucoză.

Alt ABC transportor, diferit de ceilalți reprezentanți, este **CFTR (cystic fibrosis transmembrane conductance regulator)** care funcționează ca un reglator și canal pentru ionii de Cl⁻. Deleția restului de fenilalanină F508 din acest transportor a fost depistată la 70% din pacienții cu fibroză cistică.

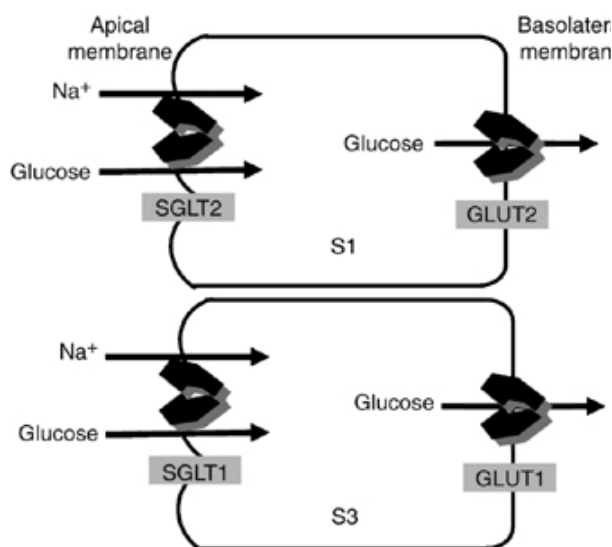


Alte defecte în transportorii ABC sunt implicate în maladia Tangier, retinită, anemie sideroblastică, coleastăz intrahepatică familială, ankilosis spondylitis, diabetul zaharat insulino-dependent.

Transportori secundar activi (SAT) nu necesită direct ATP pentru funcționare. La acest tip de transportori fac parte **transportorii Na⁺ - dependenți (SSAT, sodium-dependent secondary active transporters)**. La această familie de transportori fac parte peste 400 de reprezentanți. SAT asigură transportul monozaharidelor, aminoacizilor, ionilor și altor micromolecule prin simport cu Na⁺. SAT folosesc ca sursă energetică gradientul electrochimic creat de Na⁺; ulterior excesul de Na⁺ acumulat intracelular este pompat de către Na⁺/K⁺-ATPază, de unde și denumirea de transportori secundar activi. SAT folosesc energia ATP indirect, deoarece ATP este folosit doar pentru menținerea gradientului Na⁺ și nu pentru fosforilarea sau activarea transportorului.

Ca exemple de SSAT pot servi cotransportorul pentru glucoză **SGLT (sodium/glucose cotransporter)** și cotransportorul pentru aminoacizi **SAAT (sodium/amino acid cotransporter)**.

- **SGLT** asigură transportul D-glucozei utilizând gradientul ionilor de sodiu. În natură se întâlnesc peste 35 de membri SGLT, dintre care 4 în organismul uman. Structural toți SGLT conțin 13 segmente transmembranare alfa-helicale, cu excepția SGLT1 uman care are 14 segmente. SGLT pot cataliza uniportul Na⁺ și apei în lipsa glucozei.



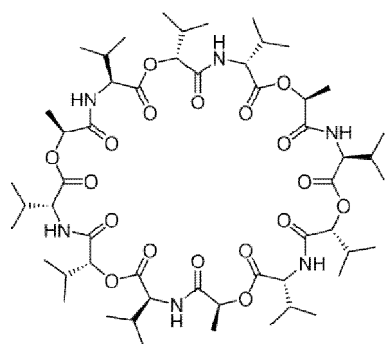
Funcționarea SGLT în celulele tuburilor proximale renale

- **SAAT** asigură transportul aminoacizilor și este localizat în membranele enterocitelor. Se cunosc în jur de 7 SAAT pentru diferite clase de aminoacizi.

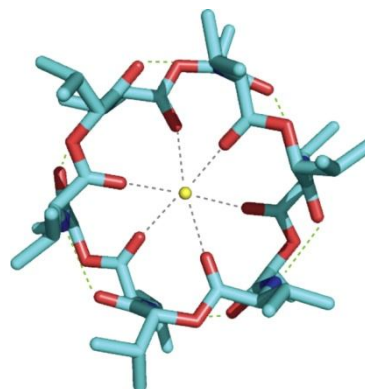
2.3 Ionoforii

Prezintă un grup de substanțe liposolubile sintetizate și excretate de către bacterii, care în membranele altor celule au rolul de a transloca ioni anorganici. Ionoforii sunt membrii unui tip special de canale sintetizate non-ribozomal. Se disting două subgrupe principale:

a.) **Ionofori mobili** - leagă ionul și împreună trec prin membrană. Exemplu de ionofor mobil poate servi **valinomicina**, care are afinitate pentru K^+ de 1000 ori mai mare decât pentru Na^+ .

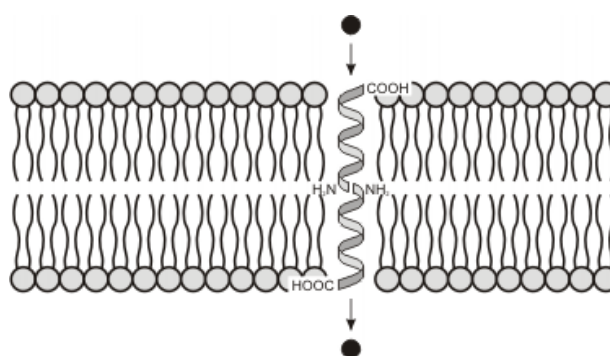


Structura valinomicinei



Valinomicina legată cu K^+

b.) **Ionofori-canale** - formează canale. De exemplu, **gramicidina A** - un peptid din 15 AA care în membranele biologice capătă conformația de beta-helix dimerizându-se cu formarea unui canal cu diametrul de 0,5 nm. Acest canal permite trecerea apei și a cationilor monovalenți dar nu a anionilor.



Dimerul Gramicidinei A localizat în membrană

Pe lângă rolul lor de a transporta, ionoforii posedă și activitate antibiotică deregând echilibrul ionic intracelular. De asemenea ei prezintă un obiect de cercetare în studiarea experimentală a mecanismului de translocare a ionilor în membranele biologice.

2.4 Toxine generatoare de pori (por-toxine)

prezintă o clasă largă (72 familii) de peptide și proteine, majoritatea sintetizate de bacterii, dar unele sunt produse și de celulele mamiferelor. Toxinele secretate formează pori transmembranari în alte celule. Porii creați permit fluxul necontrolat a ionilor și micromoleculelor prin membrană generând efectul toxic. Un exemplu de por-toxine pot servi unele defensine. **Defensinele** sunt oligopeptide de 18-45 aminoacizi. Sunt produse și secretate de către celulele sistemului imun și de majoritatea celulelor epiteliale. Ele își manifestă efectul toxic prin crearea unor pori în membranele microorganismelor patogene. Ca rezultat are loc efluxul ionilor și substanțelor nutritive importante din celula bacteriană provocând moartea ei.