

TRANSPORTUL ⁷⁵SE SELENOMETIONINEI PRIN MEMBRANELE CELULARE

I. Adsorbția pe proteine și membrane celulare

dr. I. Hirschfeld, A. László, Maria Făgărășan

Transferul substanțelor prin membranele celulare nu se supune în general legilor fizico-chimice ale difuziei. Pe baza unei serii de considerente (1, 2) — acumularea în celulă împotriva gradientului de concentrație, viteza de transfer relativ mai rapidă la concentrațiile mai mici, specificitatea, și competiția dintre diferitele substraturi — se admite că, majoritatea substanțelor hidrosolubile traversează membrana celulară, reacționând cu o proteină din membrană cu funcție vehiculatoare. Transportul este deci mediat, și poate fi pasiv (3) — de ex. difuzia prin schimb — sau activ (4), dacă necesită energie metabolică.

În cursul investigației proceselor de transport se ivesc totuși o serie de probleme legate de latura pur fizico-chimică a procesului. Astfel, adsorbția pe proteinele extra- și intracelulare, adsorbția pe membrane, efectul gradientelor de concentrație sînt tot atîți factori care influențează procesele fiziologice, respectiv constituie substratul proceselor active (5).

În lucrarea de față am investigat rolul concentrației în adsorbția aminoacizilor în cursul proceselor de transport pe trei modele: hematii intacte, hematii hemolizate și proteine serice

Material și metodă

O serie de diluții din hematii umane spălate au fost incubate cu metformină marcată cu L-⁷⁵Se-selenometionină (concentrație finală 2 mM) în tampon fosfat Krebs-Ringer (pH=7,4) la 37°C timp de 15 min. După centrifugare rapidă în tam-

pon rece și îndepărtarea supernatantului, activitatea celulară a fost măsurată într-un cristal cu puț (GAMMA), racordat la un numărător automat de particule (Numedit). După precipitarea proteinelor cu acid tricloracetic (concentrația finală 10%), și trei spălări consecutive, s-a determinat în aceleași condiții geometrice radioactivitatea legată de proteine. Diferența celor două măsurători corespunde cu cantitatea eluabilă a aminoacizilor adsorbiți.

Aceleași operațiuni au fost efectuate pe hematii în prealabil hemolizate cu apă distilată. În acest caz însă, incubarea a fost urmată de precipitarea proteinelor cu acid tricloracetic (concentrația finală 10%), centrifugare și decantare, determinându-se ulterior radioactivitatea precipitatului. După trei spălări cu acid tricloracetic s-a determinat radioactivitatea neeluabilă din hemolizat. O serie de diluții ale proteinelor serice au fost tratate în mod similar cu hemolizatul. S-au efectuat în general câte patru probe paralele.

Rezultate

1. Cantitatea aminoacidului legat este cea mai scăzută la hematiile intacte (tab. 1), la care în urma barierei de membrană, hemoglobina vine în contact cu o concentrație relativ scăzută de aminoacid. În cazul hemolizatului această cantitate crește (tab. 2), nefiind însă proporțională cu creșterea radioactivității mediului. Afinitatea cea mai mare pentru metionină se remarcă la proteinele serice (tab. 3).

Tabelul nr. 1.

Influența metioninei marcate în hematiile intacte, în funcție de concentrație celulară.

mg. celule	Activitatea adăugată	Activitatea intracelulară		Activitatea legată de proteine a aminoacidului		Activitatea eluabilă a aminoacidului	
		Total	1 mg	Total	1 mg	Total	1 mg
20	160.000	2500±230	125	700±40	35	1800	90
40	impulsuri	3600±114	90	1150±36	29	2450	81
60	pe minut	4400±114	73	1250±19	21	3150	52
80		5900±182	74	1550±52	19	4350	55

Tabelul nr. 2.

Adsorbția metioninei marcate pe hemolizate de diferite concentrații

mg hemolizat	Activitatea adăugată	Activitatea legată de proteine după precipitare		Activitatea legată de proteine după 3 spălări		Activitatea eluabilă	
		Total	1 mg	Total	1 mg	Total	1 mg
16	160.000	7800±182	490	3800±116	238	4000	250
32	impulsuri	8700±295	272	5300±245	165	3400	106
48	pe minut	9700±295	202	6300±317	131	3400	71
64		10800±230	169	7100±317	111	3700	58
80		11300±295	141	8000±182	100	3300	41

Tabelul nr. 3.

Adsorbția metioninei marcate pe proteine serice de diferite concentrații.

mg proteine	Activitatea adăugată	Activitatea legată de proteine după precipitare		Activitatea legată de proteine după 3 spălări		Activitatea eluabilă	
		Total	1 mg	Total	1 mg	Total	1 mg
13	160.000	12000±295	923	5200±164	400	6800	523
26	impulsuri	16000±182	615	8400±182	323	7600	292
52	pe minut	17500±182	335	10300±217	198	7200	138
78		19500±182	250	10700±182	137	8800	113
104		27000±230	230	11200±384	103	15800	152
130		31500±1350	242	11800±337	91	19700	151

2. În general, influxul specific al aminoacidului marcat — raportat la 1 mg de celule — scade, când concentrația celulară crește, tinzând spre o valoare limită. O regulă similară se remarcă și în cazul hemolizatului și al proteinelor serice.

3. Proporția cea mai mare de aminoacizi liberi, eluabili, se remarcă la hematiile intacte (71%). În hemolizat și în proteinele serice această proporție este mai mică, între 30—60%.

4. Adsorbția metioninei pe hemoglobină și pe porțiunile de membrană se influențează reciproc. Astfel, incubind hemolizatului sau membranele izolate (prin ultracentrifugare la 40.000 t/m timp de o oră) în condiții cu totul identice, se remarcă un efect inhibitor puternic al hemoglobinei asupra adsorbției metioninei pe porțiunile de membrană (tab. 4). Se poate presupune adsorbția hemoglobinei pe suprafața membranelor care împiedică astfel, adsorbția aminoacizilor pe membrane.

Tabelul nr. 4.

Influența reciprocă a hemoglobinei și a porțiunilor de membrană asupra adsorbției metioninei marcate.

	Activitatea legată de proteine după precipitare	Activitatea legată de proteine după 3 spălări	Activitatea eluabilă
Fracția de membrană incubată după izolare	4500±82	1600±142	2900
Hemoglobina incubată după izolare	12500±670	8000±82	4500
Fracția de membrană izolată după incubare	600±33	350±39	250
Hemoglobina izolată după incubare	11500±520	7900±295	3600

Discuții

În cazul celulelor intacte, procesele de adsorbție sînt cu mult mai reduse, atît la nivelul membranelor, cît și pe moleculele proteice, probabil în urma structurării proteinelor în aceste celule. Acest fapt permite o circulație mai liberă a aminoacizilor, cu repercusiuni favorabile asupra metabolizării acestor substanțe.

Influxul în celulele intacte devine independent de concentrația celulară în jurul unei valori de 3—4 g celule/100 ml. În investigarea transportului prin membranele celulare, se utilizează de obicei o concentrație celulară similară (6).

Adsorbția neeluabilă atît de pronunțată a aminoacizilor este probabil consecința denaturării proteinelor în cursul precipitării cu acid tricloracetic. Într-adevăr, atît datele din literatură (7, 8) cît și experiențele proprii au arătat că, în urma preincubării diferitelor celule cu metionină marcată, cea mai mare parte a aminoacidului, exceptînd cîteva procente care se includ în proteinele celulare, poate fi recuperată din interiorul celulelor prin procesul de eflux. Legăturile dintre proteine și metionină nu sînt de tip disulfidic, întrucît abia 10—15% din aminoacizii legați pot fi eliberați prin sulfitoliză (9). Acestui proces de adsorbție îi revine un rol mai ales în condițiile izolării proteinelor sau a deproteinizării în cursul unor dozări în laboratorul clinic.

În general, aminoacizii adsorbiți reversibil pe proteinele serice sau pe hemoglobină pot avea un rol în vehicularea sanguină a aminoacizilor, ele fiind eliberate paralel cu consumul tisular și scăderea concentrației lor serice.

Proteinele mobile din jurul membranei pot influența adsorbția aminoacizilor, și ca atare și transportul lor prin membrană.

Rezultatele obținute cu membranele incubate izolat și în prezența hemoglobinei pledează pentru veridicitatea acestui proces. Astfel, proteinele extracelulare și intracelulare pot avea un efect regulator asupra transportului transmembranos al aminoacizilor. În anumite condiții, proteinele pot bloca, iar în altele pot media transferul aminoacizilor spre membrane. Intervenția unor substanțe în transport — hormoni sau vitamine — ar putea fi explicate prin acțiunea lor directă asupra proceselor din membrană sau prin dirijarea unor proteine pe suprafața membranei. Sînt în curs o serie de investigații pe modele celulare, privind analiza acestor efecte.

Sosit la redacție: 13 iunie 1969.

Bibliografie

1. HOKIN L. E., HOKIN M. R.: Ann. Rev. Biochem. (1963), 32, 553; 2. ROTHSTEIN A.: V-th Internaț. Congres Biochem. Moscow 1961, Symp. II. 174; 3. GILLESPIE E.: Biochim. Biophys. Acta (1967), 135, 1016; 4. ALBERS R. W.: Ann. Rev. Biochem. (1967), 36, 727; 5. NETTER H.: Theoretische Biochemie, Springer-Verlag Berlin. 1959, 668; 6. JOHNSTONE R. M., SCHOLEFIELD P. G.: Biochim. Biophys. Acta (1965), 94, 130; 7. OXENDER D. J., CHRISTENSEN H. N.: J. Biol. Chem. (1963), 238, 3686; 8. WINTER CH. G., CHRISTENSEN H. N.: J. Biol. Chem. (1964), 239, 872; 9. HABEED A.F.S.A.: Biochim. Biophys. Acta (1966), 115, 440.