

De voordrachten, uitgesproken tijdens het symposium 'Biomembranen 50 jaar na Gorter en Grendel' leverden het materiaal voor deze uitgave.

Het symposium vond plaats op 12 december 1975 in Leiden, en werd georganiseerd door de Biologische Raad van de Koninklijke Nederlandse Akademie van Wetenschappen.

112506-01

biomembranen

50 JAAR NA GORTER EN GRENDEL

Redactie: prof. dr. H. L. Booij
prof. dr. W. Th. Daems



Centrum voor Landbouwpublikaties en Landbouwdocumentatie
Wageningen - 1976

BIBLIOTHEEK
112
LANDBOUWLOG. SCHOOL
WAGENINGEN

112506-01

ISBN 90 220 0618 2

Copyright: Pudoc, Centrum voor Landbouwpublicaties en Landbouwdocumentatie, Wageningen

Op de omslag: Model van de biomembraan opgebouwd uit de lipidedubbellaag en eiwitten, waaronder koolhydraatbevattende eiwitten.

Druk: Boek- en Offsetdrukkerij Verweij Wageningen B.V.

Inhoud

Vijftig jaar modellen van biomembranen

Prof. dr. H. L. Booij *Laboratorium voor Medische' Chemie, Sylvius Laboratoria der Rijksuniversiteit te Leiden* 7

Recent onderzoek aan modelsystemen

Dr. J. de Gier *Biochemisch Laboratorium, Rijksuniversiteit te Utrecht* 42

Lokalisatie en functie van membraaneiwitten

Dr. R. F. A. Zwaal *Biochemisch Laboratorium, Rijksuniversiteit te Utrecht* 62

Functionele morfologie van biomembranen

Prof. dr. W. Th. Daems *Laboratorium voor Electronenmicroscopie, Rijksuniversiteit te Leiden* 78

Biologische membranen als selectieve barrières

Prof. dr. E. J. Ariëns en A. M. Simonis *Faculteit der Geneeskunde, Katholieke Universiteit te Nijmegen* 88

Specifiek transport door biomembranen

Dr. J. van Steveninck *Laboratorium voor Medische Chemie, Sylvius Laboratoria der Rijksuniversiteit te Leiden* 122

Literatuur 151

Register 163

Vijftig jaar modellen van biomembranen

H. L. BOOR

Toen in 1925 Gorter en Grendel hun experimenten over de bouw van de wand van rode bloedlichaampjes publiceerden, ontging de fundamentele betekenis van de door hen gegeven hypothese de toenmalige biochemische wetenschap vrijwel geheel. Pas jaren later, toen vrij algemeen aanvaard werd dat levende cellen door een barrière omgeven zijn, is hun werk op de juiste wijze geschat. Zij waren de eersten die het celmembraan zagen als een dubbellaag van lipiden, waarbij de vetzuurstaarten naar elkaar toe gericht zijn en de polaire en geladen groepen in het water van het milieu of van de celinhoud steken.

Het symposium dat aan dit boek ten grondslag heeft gelegen, had tot doel de eerste publikatie van de dubbellaag van lipiden te herdenken, omdat zij in de afgelopen vijftig jaar een grote invloed gehad heeft op het onderzoek van de permeabiliteit van de levende cel. Het lijkt bijzonder interessant na te gaan hoe de tegenwoordige ideeën over de bouw van biomembranen zich uit het eenvoudige model van Gorter en Grendel ontwikkeld hebben.

Vijftig jaar geleden

Om een wetenschappelijke vondst op zijn waarde te kunnen schatten moet men proberen deze in zijn eigen tijd te plaatsen. Dat is een moeilijke opgave omdat men zich nauwelijks realiseert dat allerlei zaken die nu vanzelfsprekend lijken jaren geleden volstrekt onbekend waren. Een hypothese zoals deze door Gorter en Grendel opgesteld werd moet dus als het ware geprojecteerd worden op het wetenschappelijke klimaat van vijftig jaar geleden. Vandaar eerst een korte schets van de biochemie in het jaar 1925, gevolgd door een meer diepgaande analyse van het probleem van de permeabiliteit zoals dat omstreeks dat jaar gezien werd.

Voor ons is bijzonder belangwekkend dat – terwijl er reeds leer-

boeken over enzymologie bestonden – Mathews (1925) schrijft: 'These enzymes, which are probably organic bodies, but of which the exact composition is as yet unknown, . . .' Aangezien enzymen nog werkzaam zijn in zo lage concentraties dat de gewone eiwitreacties falen, meenden velen dat enzymen geen eiwitten konden zijn. Zij zouden van dezelfde natuur zijn als hun substraat, dus een koolhydraatsplitsend enzym moest ook een koolhydraat zijn. Toen dan ook een jaar later Sumner voor het eerst het enzym urease in kristallijne vorm kreeg waren er velen die meenden dat dit een artefact was, waarin het eigenlijke enzym als een 'verontreiniging' aanwezig was. Het is interessant te bedenken dat reeds jaren eerder Michaelis & Menten (1913) de basis gelegd hadden voor de enzymkinetica, terwijl over de bouw en de samenstelling van enzymen nog letterlijk niets bekend was.

In het volgende zullen wij zien dat gedurende lange jaren de rol van de eiwitten in biomembranen óf genegeerd óf in uiterst vage termen beschreven werd. Dat is niet zo verwonderlijk als wij zien dat de α -helix nog 25 jaar op zich zou laten wachten; ongeveer 5 jaar daarna (1955) voor de eerste maal de volgorde van de aminozuren in een eiwit bepaald zou worden en dat weer 5 jaar later de eerste inzichten in de driedimensionale structuur van eiwitten verworven werden.

De grote moeilijkheden die de vroege permeabiliteitstheoretici hadden bij de interpretatie van de opname van stoffen, waarbij de cel op de een of andere manier energie moet leveren, worden begrijpelijk als wij bedenken dat er na 1925 ten opzichte van het probleem van de biologische oxydatie nog jarenlang een felle strijd gestreden werd tussen aanhangers van tenminste drie op het eerste gezicht onverzoenlijke voorstellingen en dat de stof die op dit moment centraal staat in alle beschouwingen over biologische energie, het ATP, nog niet eens gevonden was, laat staan dat er iets over zijn rol vermoed zou worden. Voeg daarbij de in onze ogen uiterst gebrekkige technische uitrusting van de toenmalige laboratoria (zonder chromatografie, elektroforese, spectrofotometers, ultracentrifuges of elektronenmicroscopen) en het wordt iets gemakkelijker om het unieke experiment van Gorter en Grendel op zijn ware grootte te schatten.

Het permeabiliteitsprobleem tot 1925

Op de huidige lezer maakt de literatuur uit het eerste kwart van deze eeuw over het vraagstuk van de biologische permeabiliteit een zeer chaotische indruk. Men krijgt de indruk dat er bijna evenveel theorieën als auteurs zijn en dat het voor de meeste onderzoekers heel moeilijk leek te zijn de grote lijnen te onderscheiden. (Deze uitspraak is natuurlijk in zoverre niet eerlijk omdat wij geneigd zijn te toetsen aan de grote lijnen die wij op dit moment denken te zien. Waarschijnlijk wordt over vijftig jaar ten aanzien van ons wetenschappelijk onderzoek eenzelfde soort oordeel geveld.)

Het celmembraan De situatie in 1925 wordt gekenmerkt door het feit dat over het al of niet bestaan van een celmembraan (gezien als afscheiding tussen protoplasma en milieu) nog lang geen eenstemmigheid heerst. Bekend is weliswaar dat de inhoud van de cel grote verschillen vertoont met de samenstelling van het milieu (zo is bijvoorbeeld de kaliumconcentratie in de cel in het algemeen relatief hoog), maar dit gegeven vond twee totaal verschillende verklaringen. De eerste stelde dat het protoplasma een kolloïdchemisch systeem is, in thermodynamisch evenwicht met het milieu. De samenstellende kolloïden kunnen specifiek alle mogelijke stoffen die voor het leven van de cel nodig zijn uit het milieu adsorberen, zoals kaliumionen, suikers en aminozuren. In deze visie is een celmembraan een overbodige luxe.

De andere visie sluit aan bij de oude experimenten van Pfeffer, De Vries en anderen over de osmotische eigenschappen van levende cellen. Hieruit werd de conclusie getrokken dat de cellen omgeven zijn door een semi-permeabel membraan, dat voor vele stoffen niet doorgankelijk is. In deze theorie vormt het celmembraan een barrière, die, met behulp van door de cel geleverde energie, een toestand kan bestendigen die van een thermodynamisch evenwicht afwijkt. Dit is vergelijkbaar met een schip dat blijft drijven zolang de scheepshuid geen grote gaten vertoont en waarbij men met behulp van pompen kleine beetjes binnendringend water nog wel baas kan.

In de loop der jaren heeft de tweede zienswijze het pleit gewonnen. Het aantal argumenten in het voordeel van de membraantheorie is langzamerhand zo groot geworden, dat praktisch niemand meer twijfelt aan de idee dat cellen omgeven zijn door een barrière die celmembraan genoemd wordt (welke problemen dat weer opwerpt zal

later aan de orde komen). Een paar argumenten ten gunste van de membraantheorie wil ik hier vermelden. Er is nog nooit een kolloïd gevonden met een uitgesproken affiniteit voor kaliumionen boven andere ionen. Het metabolisme van de cel – in 1925 schijnbaar nog een eenvoudige zaak – bestaat bij de gratie van de wisselwerking van talloze stoffen met elkaar en met honderden enzymen. Voor dit samenspel is vrije diffusie binnen compartimenten van de cel een eerste noodzaak en dit kan niet gerealiseerd worden zonder een membraan dat verlies naar het milieu verhindert.

Vroege theorieën Omstreeks het jaar 1900 was de toestand – voorzover wij ons bepalen tot de ideeën over de permeabiliteit van celmembranen – nog zeer overzichtelijk. Er waren twee theorieën waarvan de oudste de *molekuulzeef-theorie* heet. Aan deze theorie lag het model ten grondslag dat door Pfeffer en anderen gebruikt was voor hun studie van het verschijnsel van de osmose, namelijk het neerslagmembraan, bijvoorbeeld gemaakt van koperferrocyanide. In feite is dit het eerste model van het celmembraan dat in deze voorstelling gezien wordt als een barrière met poriën. Deze theorie staat daarom ook wel bekend als de *poriëntheorie*. Grote molekulen kunnen er niet door; hoe kleiner het molekuul hoe vlotter de passage.

Hiertegenover stond de *lipoidtheorie*, die wij danken aan Overton (1895, 1899). Bij de osmotische studies was het al opgevallen dat sommige stoffen in hypertoonische oplossingen weliswaar krimpen van cellen (plasmolyse) tevoorschijn roepen, maar dat die cellen langzamerhand het oorspronkelijke volume weer terug krijgen. Als voorbeelden kunnen glycerine en ureum genoemd worden. De veronderstelling lag voor de hand dat het celmembraan ten opzichte van deze stoffen niet echt semi-permeabel is, maar dat zij langzaam maar zeker in de cel doordringen. Op grond van deze waarnemingen heeft Overton het penetratievermogen van een groot aantal verbindingen in plant- en diercellen vergeleken. De inhoud van de door hem opgestelde theorie kan als volgt samengevat worden. De levende cellen gedragen zich ten opzichte van de permeabiliteit voor opgeloste stoffen alsof zij omgeven zijn door een vetachtig (lipoid) membraan; stoffen die oplosbaar zijn in lipoiden dringen in de cel binnen, zijn zij dat niet dan worden zij buiten de cel gehouden. De graad van oplosbaarheid in lipoiden bepaalt de penetratiesnelheid door het celmembraan.

Tabel 1. Enkele van de meest voorkomende hydrofiele en hydrofobe atomen en atoomgroepen.

Hydrofiel	Hydrofoob
geladen groepen	methyl-,
carboxyl-	ethyl-,
hydroxyl-	e.a. alkylgroepen
aldehyde-	fenyl-,
carbonyl-	e.a. aromatische ringen
amino-	halogenen (Cl, Br, J)

Meestal gebruikt men als maat voor de oplosbaarheid in lipoiden de verdelingscoëfficiënt 'olie'/water, waarbij het woord 'olie' zeer ruim geïnterpreteerd moet worden (naast de oorspronkelijk gebruikte olijfolie worden ook gebruikt ether, benzeen, chloroform, octanol en allerlei mengsels waarin lecithine en cholesterol opgelost zijn). In modernere taal zeggen wij dat de oplosbaarheid in lipiden (en de passage door biomembranen) afhangt van de hydrofobie/hydrofilie-balans van molekulen. Sommige atoomgroepen verhogen deze balans – en dus de oplosbaarheid in lipiden en de penetratiesnelheid –, andere (de hydrofiele) hebben een tegenovergestelde werking (tabel 1).

Het is wel goed hier reeds op te merken dat noch de poriëtheorie noch de lipoidtheorie raad weet met de grotere molekulen die voor het leven beslist onmisbaar zijn zoals de suikers en de aminozuren. In de eerste theorie zijn zij te groot om vlot een celmembraan te kunnen passeren, in de tweede veel te weinig oplosbaar in de vetachtige barrière.

Variaties op deze thema's Na 1900 neemt de verwarring zienderogen toe. Er worden talrijke theorieën geponeerd die wij achteraf kunnen herkennen als variaties op de poriëtheorie en de lipoidtheorie of als pogingen om deze twee principes in een allesomvattende visie te combineren. Enkele oorzaken van het ontstaan van de onoverzichtelijke situatie in het jaar 1925 moeten hier vermeld worden.

Uit alle osmotische proeven met cellen komt naar voren dat water gemakkelijk celmembranen passeert. Alle auteurs uit die jaren waren het er over eens dat dit voor de lipoidtheorie een onoverkomelijke moeilijkheid betekent, immers water lost in olie niet op. Nathansohn (1904) wees er op dat lecithine in water opzwellt en 'dus' water kan

'laten passeren, terwijl dat met cholesterol niet het geval is. Hij komt tot een *mozaïektheorie* waarbij een deel van het membraan molekulen laat passeren die in lipiden (van het cholesteroltype) oplossen, terwijl een ander deel (van het lecithinetype) een molekuulzeef zou zijn. Wat betreft de samenstellende stoffen is dit nog een lipoidtheorie, maar er is een nieuw idee ingebracht dat tot op de huidige dag opgeld doet. Ook deze theorie komt in allerlei vormen voor; eerst denkt men aan twee soorten lipiden met verschillende eigenschappen, later aan een combinatie van lipiden en eiwitten in een mozaïek, waarin de eiwitten de rol van molekuulzeef spelen. Overigens zullen wij zien dat het oorspronkelijke probleem (de veronderstelling dat water een lipidenlaag niet kan passeren) in feite helemaal geen probleem is, omdat deze passage wel mogelijk wordt indien die lipidenlaag maar dun genoeg is.

Een enkel woord nog over de *adsorptietheorie*, een theorie die jaren lang naast de lipoidtheorie een onafhankelijk bestaan geleid heeft, maar later als een vorm van lipoidtheorie herkend is. J. Traube (1904) wees erop dat de penetratiesnelheid van stoffen in cellen niet alleen met de oplosbaarheid in lipiden, maar ook met de verlaging van de oppervlaktespanning water/lucht parallel gaat. Het verschijnsel zou dus ook door adsorptie aan lipiden van het celoppervlak verklaard kunnen worden. Dit is natuurlijk een schijnverklaring omdat adsorptie nog geen passage hoeft te betekenen.

Achteraf gezien is de theoretische verwarring, die tientallen jaren geduurd heeft, vooral te wijten aan het feit dat de meeste studies zich richtten op de penetratie van kleurstoffen. Dat lag inderdaad voor de hand omdat de organische kleurstoffen vrijwel de enige stoffen waren die met de toenmalige technieken vlot en kwantitatief te bepalen waren. Toch was de keuze om verschillende redenen bijzonder slecht, zoals wij op grond van onze huidige kennis kunnen vaststellen. In de eerste plaats speelt de lading van het celoppervlak een grote rol (negatieve kleurstoffen penetreren veel slechter dan 'positieve'). Kleurstoffen met een sterke lading - ook positieve - penetreren slecht of niet, de ongeladen molekulen wel. Daarom hangt de penetratiesnelheid mede af van de pH van het milieu en de dissociatieconstante van de kleurstof. Positieve kleurstoffen kunnen als molekuul penetreren en na dissociatie als ion gebonden worden aan de negatieve macromolekulen in de cel waardoor de concentratie in de cel een vertekend beeld geeft van de penetratiesnelheid. Tenslotte zijn er vele kleurstoffen die een geringe tot zeer sterke destructie van het celmembraan

veroorzaken.

Op grond van deze soort overwegingen kunnen wij het grootste deel van de in het eerste kwart van deze eeuw verdedigde theorieën vergeten en blijven er maar twee belangrijke principes over:

- Het membraan - of een deel daarvan - bestaat uit lipiden; molekulen die gemakkelijk in lipiden oplossen penetreren snel.
- Het membraan - of een deel ervan - is een molekuulzeef; hoe kleiner het molekuul, hoe sneller de penetratie.

Indertijd werd slechts door enkelen beseft dat geen van beide zienswijzen een verklaring kon geven voor het feit dat stoffen als suikers en aminozuren met grote snelheid opgenomen kunnen worden. Een van de weinigen die de draagwijdte van dit vraagstuk wel overzag was Höber (1924), die in zijn boek de volgende, zeer modern aandoende, opmerkingen plaatste:

'Die Zelle muss in ihrer Oberfläche Einrichtungen besitzen, um den Import und Export ihrer Bedarfs- und Abfallstoffe von sich aus zu regulieren. Daraus folgt wiederum, dass die Plasmahaut auch mehr sein muss, als eine einfache Lipoidhaut.'

Voortbordurend op dit thema stelt Höber dat de lipidtheorie een aanvulling behoeft. Min of meer in de zin van de mozaïektheorie van Nathanson ziet hij twee gedeeltes in het celmembraan. Het eerste deel is van lipidnatuur en dat is voor de *fysische permeabiliteit* verantwoordelijk. Daartussen bevinden zich stukken van het 'levende protoplasma' waar een reguleerbare of *fysiologische permeabiliteit* kenmerkend is en waar de noodzakelijke voedingsstoffen opgenomen worden.

Het is merkwaardig dat deze zienswijze, die in grote lijnen aardig aansluit bij de huidige opvattingen, indertijd zo'n geweldige weerstand ondervond. Speciaal Gellhorn (1929) bespreekt Höber's visie zeer laatdunkend. Wanneer wij ons herinneren dat in die dagen het vitalisme in bepaalde kringen hoogtij vierde, dan wordt deze aversie iets begrijpelijker. Men vreesde namelijk dat door het opplakken van het etiket 'fysiologisch' deze vorm van permeabiliteit tegelijk het odium zou krijgen 'met natuurwetenschappelijke methoden principieel onoplosbaar'. Blijkbaar werd het vitalisme indertijd als een serieuze bedreiging van de biologische wetenschap gezien. Op ons, voor wie het begrip vitalisme allang een dode letter geworden is, maakt deze controverse een wonderlijke indruk. Wel moeten wij beseffen dat de naweeën ervan nog jaren merkbaar bleven.

Structuurmodellen

Het experiment van Gorter en Grendel was een van de eerste pogingen om inlichtingen te krijgen over de bouw van een membraan langs directe weg, namelijk door een van de componenten uit een membraan te isoleren en aan deze stoffen metingen te doen. De studie was geïnspireerd door het werk aan monomoleculaire lagen zoals dit door Langmuir (1917) gestart was. Het werd waarschijnlijk gemaakt dat lipidemolekulen zich aan het oppervlak water/lucht zullen oriënteren met hun polaire (hydrofiele) atoomgroepen in het water en de apolaire (hydrofobe) groepen naar de lucht. Bij zijdelingse druk zullen de molekulen steeds dichter op elkaar gepakt worden. Zo kan een oppervlakte/druk-diagram worden opgesteld, dat inlichtingen kan geven over oriëntatie, vorm en afmetingen van de betrokken molekulen.

Gorter en Grendel gingen uit van het bloed van verschillende dieren (hond, schaap, konijn, cavia, geit en mens) en scheidde de erythrocyten van het plasma door centrifugeren en wassen met een fysiologische zoutoplossing. Daarna werd een bepaalde hoeveelheid erythrocyten met een groot volume aceton lange tijd geëxtraheerd, het extract drooggedampt en het residu opgenomen in benzene. Een kleine hoeveelheid werd op het wateroppervlak van een Langmuir-Adam-trog gebracht, waarna door samendrukking van de gevormde monomoleculaire laag het totale oppervlak van de geïsoleerde lipiden bepaald werd (zie het hoofdstuk van De Gier).

Daarnaast kon in een uitstrijkje het oppervlak per erythrocyt en met een telkamer het aantal erythrocyten gemeten worden, zodat ook het totale oppervlak van de gebruikte erythrocyten bekend werd. Hoewel er wat betreft de afmetingen van de erythrocyten van de onderzochte diersoorten grote verschillen bestaan, leverde de deling van het oppervlak van de uit de erythrocyt geïsoleerde lipiden door het oppervlak van de erythrocyt altijd een getal in de buurt van twee op. Dit gegeven, gecombineerd met de vondst van Langmuir dat lipiden altijd met hun polaire 'koppen' naar het water gericht zijn, leidde tot de conclusie dat erythrocyten bedekt zijn met een dubbellaag van lipiden, waarbij de apolaire 'staarten' naar elkaar toe en de 'koppen' naar het medium en naar de celinhoud gericht zijn (fig. 1).

Er is later op gewezen (Winkler & Bungenberg de Jong, 1940) dat het door Gorter en Grendel aangenomen oppervlak per erythrocyt ongeveer 50% te laag is. Aan de andere kant hebben talrijke onder-

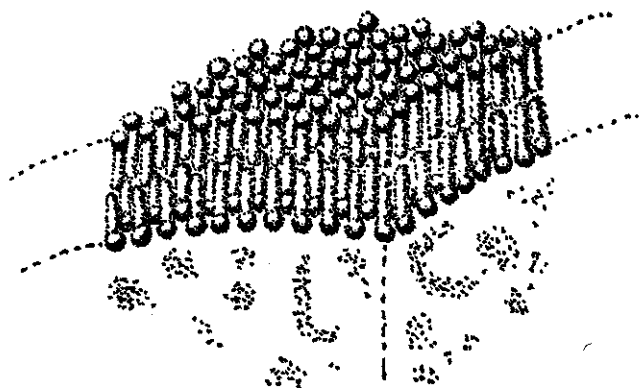


Fig. 1. Schets naar de ideeën van Gorter en Grendel. In deze en de volgende figuren worden de lipiden sterk vereenvoudigd weergegeven. Ook is terwille van de duidelijkheid de afstand tussen de koolwaterstofketens te groot weergegeven.

zoekingen over de extractie van lipiden laten zien dat aceton zeker niet in staat is de lipiden kwantitatief te extraheren. Bar et al. (1966) komen tot de conclusie dat deze twee fouten elkaar tendele opheffen en dat het gezochte getal tussen twee en één moet liggen. De grootte van het getal hangt sterk af van de interpretatie van de experimenten met de monomoleculaire laag van de geïsoleerde lipiden. Zoals wij later zullen zien doen huidige inzichten in het membraan van erythrocyten veronderstellen dat het getal kleiner dan twee is. Dus moeten wij zeggen dat de experimenten van Gorter en Grendel er op kunnen wijzen dat de lipiden in een groot deel van het membraan als dubbel-laag aanwezig zijn (zie verder het hoofdstuk van Zwaal).

Het werd hiervoor al vermeld; het model van Gorter en Grendel werd voorlopig niet opgemerkt. De aandacht bleef zich richten op modellen van het molekuulzeef-type. Veel werd gewerkt met membranen vervaardigd met behulp van kolloidium of van gelatine. Vooral de proeven met het eiwit gelatine trokken de belangstelling omdat men hoopte een membraan te vinden dat enige voorkeur zou vertonen voor oppervlakte-actieve (of wel in lipiden oplosbare) stoffen. Maar ook de uitvoerige proeven van Collander (1927) gaven te zien dat de penetratiesnelheid uitsluitend afhankelijk is van de afmeting van de molekulen. Pas wanneer dit soort membranen geïmpregneerd worden

met lipiden krijgen zij eigenschappen die meer lijken op die van celmembranen. Mede hierdoor wordt verklaard dat de belangstelling voor membranen van het molekuulzeef-type langzaam wegebde en de aandacht zich weer meer op de lipiden ging richten.

Het model van Danielli Omstreeks 1935 verschijnen er dan een aantal artikelen die een nieuw tijdperk inluiden. Danielli & Harvey (1935) bestudeerden de oorzaak van de zeer lage grensvlakspanning tussen oliedruppeltjes en protoplasma in eieren van de makreel. Aangezien de grensvlakspanning tussen de olie en een bufferoplossing veel hoger is concludeerden de auteurs dat de olie in het protoplasma bedekt wordt met eiwit, waardoor de grensvlakspanning sterk verlaagd wordt. In verband met de latere ontwikkeling in dit gebied is het interessant op te merken dat volgens hun proeven het eiwit aan het olie-oppervlak betrekkelijk snel denatureert, waarna de grensvlakspanning weer stijgt. In vivo zou deze denaturatie niet plaats vinden omdat het contact tussen de olie- en de waterfase plaats zou hebben via georiënteerde vetmolekulen waarvan de gehydrateerde koppen naar buiten steken.

In de volgende publikatie (Danielli & Davson, 1935) worden de consequenties hiervan voor het probleem van het celmembraan uitgewerkt. Zowel bij erythrocyten als bij gistcellen hadden Fricke (1925), McClendon (1926) en Fricke & Curtis (1934) aannemelijk gemaakt dat de cellen omgeven zijn door een dunne laag van materiaal dat ten opzichte van wisselstroom een grote weerstand vertoont. Het lag voor de hand aan lipiden te denken die volgens deze metingen in een unitot trimoleculaire dikte aanwezig zouden zijn. Aangezien cellen, voorzover toen gemeten, een lage grensvlakspanning hebben moet ook hier de lipidenlaag bedekt zijn met eiwit (fig. 2). Merk op dat in het oorspronkelijke model de dikte van de lipidenlaag nog niet vastgelegd is en dat met de bevindingen van Gorter en Grendel geen rekening gehouden werd. Verder blijkt later dat juist de lipiden die in celmembranen gevonden worden (de fosfolipiden) een lage grensvlakspanning hebben en dat dit argument hier dus ten onrechte gebruikt is.

Een tweetal artikelen (Schmitt et al., 1935; Schmidt, 1936) houdt zich bezig met de bouw van de myelineschede van zenuwen. Uit studies met gepolariseerd licht was al bekend dat zenuwen een hoge graad van moleculaire organisatie bezitten. In het eerste artikel wordt verslag gedaan van een onderzoek van zenuwen met röntgen-diffrac-

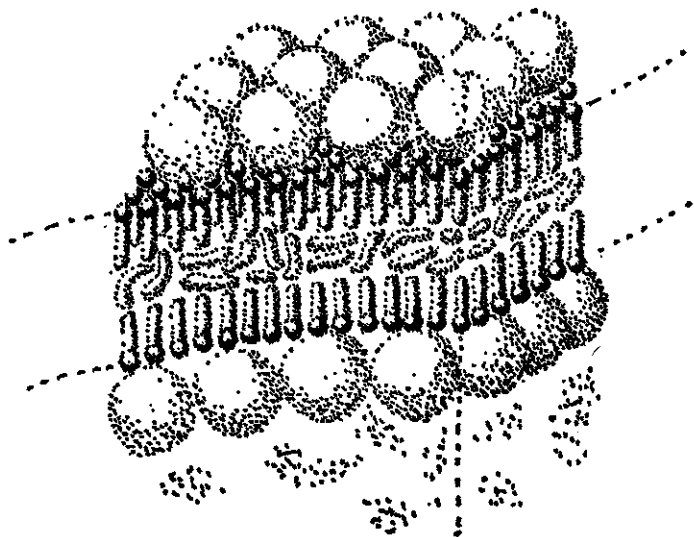


Fig. 2. Het eerste model van Danielli en Davson bevatte meer lipiden dan volgens het dubbellaag-principe nodig was (ook de tussenlaag bestaat uit lipiden). De eiwitten zijn in deze versie nog globulair.

tie; het tweede vervolgt de studies met gepolariseerd licht. In beide gevallen werd het onderzoek verricht met de intacte zenuw en met uit de zenuw geëxtraheerde lipiden. De conclusie is in beide gevallen dezelfde. De moleculaire organisatie moet toegeschreven worden aan vloeibare kristallen bestaande uit lipiden (met name fosfatiden en cholesterol). De lipidemolekulen staan loodrecht gericht op het vlak van de myelineschede. Daartussen bevinden zich eiwitmolekulen die juist in de lengterichting van de zenuwvezel gericht zijn. Deze opbouw doet dus sterk denken aan de voorstellingen van Gorter en Danielli.

In hetzelfde jaar publiceren Bungenberg de Jong & Bonner (1935) hun onderzoek over een kolloïdsysteem opgebouwd uit fosfatiden. Onder invloed van verschillende 'sensitizers' en na toevoeging van neutrale zouten kan een fosfatide-coacervaat ontstaan. Bij schudden van dit coacervaat met zijn evenwichtsvloeistof verschijnen hoogst merkwaardige coacervaatdruppels die dikwijls platte kanten vertonen. Aangevoerd werd dat deze platte kanten de begrenzing vormen van een soort vacuole, gevuld met evenwichtsvloeistof, maar door een

(microscopisch onzichtbare) film gescheiden van de rest van de evenwichtsvloeistof. Voor de eerste maal werden hier de 'black films', die later op grote schaal bestudeerd zouden worden, 'gezien'. De auteurs veronderstellen dat de film bestaat uit een dubbellaag van fosfatiden en ook zij wijzen op de overeenkomst met het celmembraan. Op grond van de sterke attractie tussen de positieve en negatieve groepen en de zwakke affiniteit tussen de koolwaterstofstaarten menen zij evenwel dat in deze dubbellaag (en in het celmembraan) de molekulen juist andersom staan dan Gorter en Grendel verondersteld hadden. Pas later beseftte men dat weliswaar de affiniteit tussen koolwaterstofketens en dergelijke apolaire atoomgroepen zwak is, maar dat zij uit het water gedreven worden doordat zij niet in de structuur van het water passen. Dit is de hydrofobe binding genoemd waarbij wel bedacht moet worden dat het woord 'binding' hier een andere achtergrond heeft dan in de begrippen colavente binding, Coulomb-binding, e.d. Achteraf gezien is de intuïtieve benadering van Gorter en Grendel beter geweest dan de op de toenmalige fysische chemie gebaseerde hypothese van Bungenberg de Jong.

Het model van Danielli heeft jarenlang de gedachten over permeabiliteit beheerst, ondanks het feit dat het zeer duidelijke tekortkomingen had. Het meest op de voorgrond tredende bezwaar is natuurlijk dat op geen enkele manier ingezien kan worden hoe de voor de cel noodzakelijke voedingsstoffen opgenomen kunnen worden. Daar staat vanzelfsprekend tegenover dat het een zeer goed beeld geeft van de barrièrefunctie van het celmembraan. Dat deze barrière gemakkelijk gepasseerd zal worden door molekulen die in lipiden oplossen valt direct uit het model af te lezen. De eerste opnamen van celmembranen en daarmee verwante structuren met de elektronenmicroscopie leken het gevormde beeld volledig te bevestigen. Met osmiumtetroxyde 'gekleurde' en gefixeerde preparaten gaven een afbeelding van het celmembraan als twee zwarte lijntjes met een ongekleurde zone er tussen. De moleculaire afmetingen klopten met het model, indien men aannam dat de koolwaterstofstaarten niet en de polaire groepen en de eiwitten aan de buitenkant wel met osmiumtetroxyde gereageerd hadden.

Deze fraaie overeenstemming kwam vooral te voorschijn bij het onderzoek van de myelineschede (zie bijvoorbeeld Fernández-Morán & Finean, 1957). Belangrijk is dat deze schede gevormd wordt door de Schwann-cel en dat de zwarting door osmiumtetroxyde afwisselend

sterk en zwak is. Aangezien de myelineschede verkregen wordt door afzetting van het celmembraan van de Schwann-cel in concentrische lagen, verschijnt hier voor het eerst een aanwijzing dat het celmembraan een asymmetrische opbouw heeft. De binnenzijde van het membraan is verschillend van de buitenkant.

De elektronenmicroscopie ontwikkelt zich intussen sinds de vijftiger jaren met grote snelheid. Niet alleen de buitenkant van de cel bleek een membraan te hebben dat in eerste instantie een structuur had die bij het Gorter-Danielli-schema paste. Ook in talrijke celorganellen werden membranen gevonden. Wij denken aan mitochondriën (met een binnen- en buitenmembraan), het endoplasmatische reticulum, het Golgi-apparaat, chloroplasten, e.d. Dit paste wonderwel bij de ideeën die op grond van biochemische studies over het metabolisme ontwikkeld waren. Het was namelijk bijna niet mogelijk zich in te denken dat alle enzymen en substraten in de cel elkaar door vrije diffusie bereiken konden. De regulering van het metabolisme in de cel vroeg a.h.w. om compartimenten. En als barrière tussen die compartimenten kwam een dubbellaag van lipiden weer het meest in aanmerking. Deze visie werd hartstochtelijk verdedigd door Robertson (1959). Volgens hem waren alle membranen van het Gorter-Daniellitype; in de cel onderling met elkaar verbonden en allemaal van dezelfde structuur. Dit idee is de historie ingegaan als de 'unit membrane' hypothese. Alle kritiek op zijn stelling werd door Robertson afgedaan met opmerkingen over fouten in de techniek of verkeerde interpretatie van de elektronenoptische beelden bij zijn tegenstanders (vergelijk het hoofdstuk van Daems).

De eiwitten komen in de aandacht Inderdaad bleef de kritiek hem in de zestiger jaren niet bespaard. Met de verfijning van de elektronenmicroscopie werd het steeds duidelijker dat de visie van Robertson wel simplistisch was. De membranen van de celorganellen vertoonden onderling grote verschillen. Aangezien niet verwacht kon worden dat deze verschillen uitsluitend aan de lipiden toegeschreven konden worden, richtte de belangstelling zich nu op een membraancomponent die tot dan toe sterk veronachtzaamd was, namelijk de eiwitten. Dit werd mede gestimuleerd doordat ook de eiwitchemie belangrijke vorderingen maakte. Met name over de driedimensionale structuur van eiwitten werden na 1960 steeds meer gegevens bekend. Daarnaast kreeg men de mogelijkheid om de volgorde van de aminozuren in

eiwitten te bepalen.

Elektronenmicroscopie van mitochondriën en van chloroplasten doet dan het vermoeden rijzen dat de membranen van deze celorganellen opgebouwd zijn uit kleine eenheden. Men begint zich af te vragen of de betrekkingen tussen het eiwit en de lipiden in biomembranen niet veel inniger zijn dan vermoed zou worden uit het oorspronkelijke model van Danielli. Men denkt dan bijvoorbeeld aan de lipoproteïnen uit het bloedserum, die over eigenschappen beschikken die men niet rechtstreeks uit die van de samenstellende delen kan afleiden.

Op grond van deze overwegingen komt o.a. Benson (1966) tot de slotsom dat het membraan in chloroplasten opgebouwd is uit kleine eenheden bestaande uit een lange peptideketen gecombineerd met lipiden (fig. 3). Zonder veel argumenten wordt deze zienswijze toepasselijk verklaard op alle biomembranen.

Intussen speelt zich bij de studie van de mitochondriën iets dergelijks af. Na de isolering van mitochondriën bleek reeds spoedig dat deze celonderdelen vele enzymen uit de citroenzuurcyclus bevatten. Volgens de school van Green (1967) vormen deze enzymen een functionele eenheid die op de een of andere manier aan mitochondriën als structurele eenheden gebonden is. Werden de mitochondriën oor-

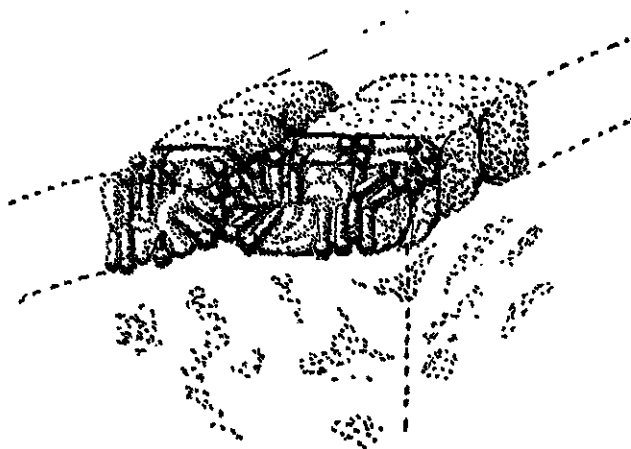


Fig. 3. Volgens Benson is er een intiem contact tussen een polypeptideketen en de lipiden. Het membraan is opgebouwd uit lipoproteïne-eenheden.

spronkelijk gezien als een soort gelklompjes, later bleek dat zij een ingewikkelde bouw hebben waarbij een tweetal membranen onderscheiden kunnen worden. Aan de binnenkant van het biomembraan, dat zich voortzet in de cristae van de mitochondriën bevinden zich talloze bolvormige knoppen die met steeltjes aan het membraan vastzitten. Hierin bevinden zich volgens Green vele enzymen die voor het functioneren van de mitochondriën van wezenlijk belang zijn (fig. 4).

Uitermate belangrijk is dat in dit concept georganiseerde enzymcomplexen op membranen als basis gebonden zijn. Hierdoor kan een ingewikkeld biochemisch mechanisme op efficiënte wijze verlopen; substraten en coënzymen hoeven slechts een korte diffusieweg af te leggen om het volgende enzym in een keten te bereiken. Voor ons is belangrijk dat het eigenlijke membraan in deze visie bestaat uit een aaneengesloten laag basisdeeltjes, waarin een eiwit (het zogenaamde structurele eiwit) een voorname rol speelt. In tegenstelling tot het Gorter-Danielli-model is nu de rol van het lipide tot bijna nul gereduceerd. Het mag de eventuele gaatjes opvullen die tussen de eiwitketens wellicht nog aanwezig zijn.

In zijn enthousiasme heeft Green dit model als basis aangenomen voor alle biomembranen. Uit de aard der zaak moet vooral het Gorter-Danielli-model het ontgelden als hij schrijft: 'The concept that a membrane system is nothing more than the integration of the repeating units and of their pattern of organization has helped to sweep aside the mumbo-jumbo of membrane lore.' Het spreekt vanzelf dat deze krachtige taal niet door iedereen geapprecieerd werd en dat een

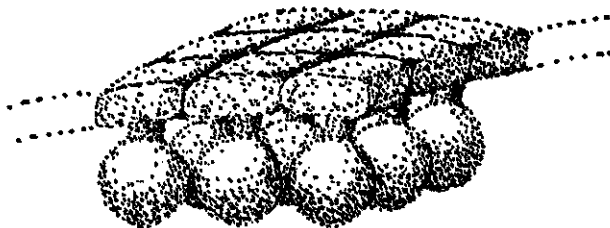


Fig. 4. Het binnenmembraan van mitochondriën bevat naar de ideeën van Green een grote hoeveelheid in complexen verenigde enzymen. Ook dit membraan is opgebouwd uit discrete eenheden, waarin de lipiden een ondergeschikte rol spelen. De aansluitende 'blokken' zijn lipoproteïnen (zie fig. 3); de 'bollen' bevatten vele enzymen.

licht gevoel van leedvermaak zich van enkelen meester maakte toen later bleek dat het structurele eiwit (volgens Green essentieel in de basis van het membraan) een artefact was, ontstaan door denaturatie van andere eiwitten bij de pogingen tot isolatie. Desondanks moet niet vergeten worden dat Green een uiterst belangrijke bijdrage tot het membraanprobleem geleverd heeft. Hij heeft immers de aandacht gevestigd op de mogelijkheid dat de biomembranen de basis konden zijn voor daarop of daarin aanwezige complexen van (samenwerkende) enzymen.

Zo zien wij omstreeks 1965 weer eens twee ver uiteenlopende opvattingen over de bouw van biomembranen; Robertson gelooft onverkort in de dubbellaag van lipiden en bij Green is de dubbellaag verdwenen en zijn eiwitten het enige wezenlijke bestanddeel van biomembranen.

Dan komt de elektronenmicroscopie met een nieuwe benadering van het vraagstuk met behulp van de methode van het vries-etsen. Tot nu toe werden alle objecten tot zeer dunne coupes gesneden. Bij de vriesets-methode wordt het object snel bij zeer lage temperatuur gebracht. Dan wordt het in bevroren toestand 'gesneden' wat in feite meer breken dan snijden is. Voor ons probleem is nu belangrijk dat ten aanzien van dit breken de zwakste plek van biomembranen het midden is. Zij hebben de neiging overlangs te splijten, waarbij de splijtvlakken dus bestaan uit de uiteinden van de koolwaterstofstaarten. Nog steeds in bevroren toestand laat men wat ijs verdampen. Dat gaat op sommige plekken goed (bijvoorbeeld als het breukvlak door de inhoud van een vacuole loopt), maar op andere plaatsen niet (speciaal wanneer het breukvlak midden door een dubbellaag van lipiden loopt, want dan is het oppervlak immers van koolwaterstofnatuur). Het aldus 'geëtste' oppervlak wordt met metaal bestoven om zo een afdruk ervan te krijgen.

Het zal duidelijk zijn dat, wanneer een biomembraan werkelijk opgebouwd zou zijn zoals het model van Gorter veronderstelt, het verkregen elektronenoptische beeld van het breukvlak een volkomen vlakke structuur zou vertonen. Het tegendeel bleek het geval te zijn. Alle onderzochte membranen bevatten in de lipidendubbellaag bolletjes (dikwijls met een diameter van ongeveer 8,5 nm) en alles wijst er op dat wij hier met eiwitten te maken hebben. Het aantal van deze bolletjes is nogal verschillend van membraan tot membraan en het hangt samen met de verhouding lipide/eiwit in de membranen. Ook

Tabel 2. Samenstelling van enkele biomembranen in %.

	Lipiden	Eiwit
myelineschede	80	20
erythrocytenmembraan	40	60
binnenmembraan mitochondriën	25	75

wat dat betreft komt die individualiteit van biomembranen naar voren zoals uit tabel 2 blijkt.

Belangrijk voor ons is dat het er op lijkt dat de eiwitten als aparte deeltjes in biomembranen aanwezig zijn. Voorstellingen van biomembranen als integraties van eenheden op lipoproteïnebasis (waarbij dus een polypeptideketen innig verstrengeld is met lipiden) krijgen na deze soort onderzoekingen een hoge mate van onwaarschijnlijkheid (fig. 3 en 4). Vandaar ook dat Green (1972) zijn oorspronkelijke model verlaat en een nieuwe visie ontwikkelt waarin dubbellen van lipiden afgewisseld worden door paren eiwitmolekulen, waarvan het ene naar buiten en het andere naar binnen uitsteekt en die midden in het membraan contact maken.

Hiermee zijn wij het heden zo dicht genaderd dat ik de bespreking van de huidige inzichten in zowel het lipidengedeelte als in de plaats van de eiwitten in biomembranen aan volgende sprekers moet overlaten. Het spreekt vanzelf dat de vondst van eiwitten in het lipiden-gedeelte van biomembranen de suggestie doet opkomen dat deze eiwitten wellicht iets te maken hebben met de specifieke opname van stoffen door de levende cel. Dat probleem komt in de volgende paragraaf ter sprake.

Naast de door het werk van Gorter en Grendel geïnspireerde 'denkmodellen' heeft deze studie ook geleid tot enkele 'werkmodellen' die in het hoofdstuk van De Gier bekeken zullen worden. In de eerste plaats denken wij dan aan monomoleculaire lagen van lipiden, die aan de wieg van het model gestaan hebben. Vele jaren later bleek het mogelijk om dubbellen van lipiden (met name fosfatiden) te maken tussen twee oplossingen in water, zodat men in staat was om permeatie van water, elektrisch geleidingsvermogen, e.d. te bestuderen. Tenslotte wordt nog gewezen op de 'liposomen', kunstmatig gemaakte deeltjes van concentrische dubbellen die kleine volumina vloeistof insluiten.

Transportmodellen

Intussen waren er sinds 1925 natuurlijk velen die zich niet stoorden aan de modellenbouwers. Het was wel interessant dat er modellen bedacht konden worden die zich gedroegen zoals volgens de lipoidtheorie verwacht kon worden, maar deze droegen toch weinig bij tot het wezenlijke probleem. En dat is natuurlijk: hoe neemt de levende cel die stoffen op die voor het leven van die cel noodzakelijk zijn? Met daaraan gekoppeld de vraag hoe de cel in staat is bij verschillende stoffen de dikwijls grote verschillen in concentratie tussen inhoud en milieu te handhaven. Dat bijvoorbeeld de kaliumconcentratie in de cel vrijwel altijd relatief hoog is ten opzichte van natrium betekent niet alleen dat de cel kaliumionen kan concentreren (wat energie moet kosten), maar ook dat de cel tussen kalium- en natriumionen onderscheid kan maken. Chemisch gesproken is dat geen eenvoudige opgave.

Het ligt voor de hand dat de omvang van deze problemen de krachten van de onderzoekers van 1925 ver te boven ging. Men beseftte dat de cel sommige stoffen kan concentreren en dat daarvoor energie nodig is. Dat verschillende hydrofiele molekulen door de cel opgenomen kunnen worden was voor velen aanleiding om de lipoidtheorie te verwerpen. Het zou nog tientallen jaren duren voor er serieus over gedacht kon worden om verband te leggen tussen de structuur van biomembranen en de door deze membranen verrichte functies. In feite staan deze pogingen nog altijd in de kinderschoenen. Natuurlijk zijn er wel ideeën geopperd om enig licht op de geschetste vraagstukken te werpen.

Transport door poriën Deze pogingen richten zich in eerste instantie op het probleem van de specificiteit van de opname. Zo werd het model van Danielli aangepast door te veronderstellen dat in de dubbellaag van lipiden eiwitketens een porie zouden vormen (Stein & Danielli, 1956, fig. 5). Een dergelijke porie zou, op basis van de afmeting, een bepaald molecuul of ion door kunnen laten. (Het spreekt van zelf dat met dit mechanisme van een opname tegen een concentratiegradiënt in geen sprake is.)

Het is, tussen haakjes, wel interessant om te wijzen op de verschillen tussen dit model en het oorspronkelijke voorstel van Danielli en Davson (fig. 2). Al in 1943 was een verandering in het model aan-

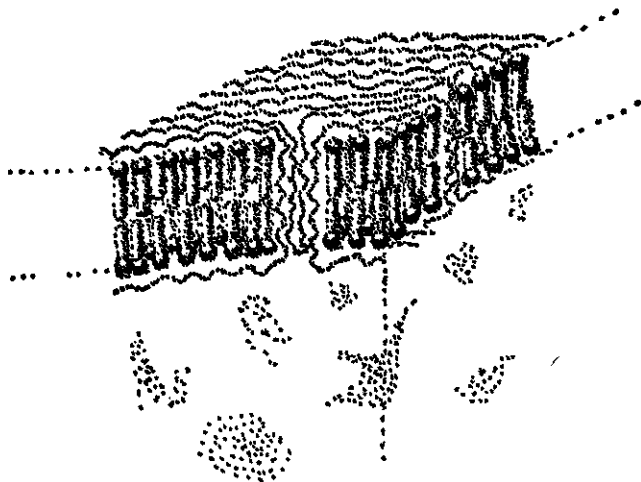


Fig. 5. In een later model van Danielli zijn de eiwitten ontrold en kunnen met eiwitten bedekte poriën voor transport van bepaalde hydrofiele stoffen zorgen.

gebracht. Onder invloed van röntgenstudies van eiwitten, die toentertijd uitsluitend aan fibrillaire eiwitten verricht werden, besloot men de oorspronkelijke globulaire eiwitten in het model te vervangen door ontrolde eiwitten. Deze lange ketens zouden, in tegenstelling tot de globulaire eiwitten, aan het membraan een zekere stevigheid verlenen (Davson & Danielli, 1943). Een ander opvallend verschil, afgezien van de poriën, is dat het centrum van het model nu een echte dubbellag is.

Langs een heel andere weg is het probleem benaderd door Lucy en Glauert (1964). De kolloïdchemische studies van lipide-achtig materiaal (zepen, fosfatiden, e.d.) hadden laten zien dat lipiden met geladen koppen in tenminste twee vormen in water kunnen voorkomen, namelijk als bolvormige micellen en als grote platte dubbellen. Verondersteld werd nu dat in biomembranen een fase-overgang van platte naar globulaire micellen kan plaatsvinden (fig. 6). De auteurs wijzen er op dat bij een dichte pakking van deze bollen poriën met een diameter van ongeveer 0,5 nm aanwezig zijn. Deze zouden voor de penetratie van bijvoorbeeld ionen van belang kunnen zijn.

Tegen het concept van de poriën zijn vele bezwaren ingebracht (zie bijvoorbeeld Booi, 1962). Tenslotte is een porie een gat in een bio-

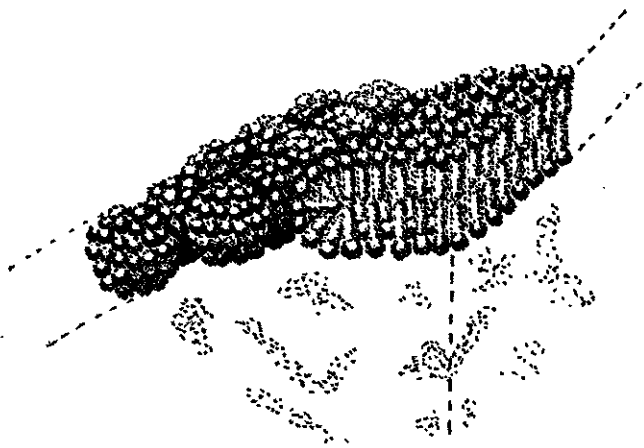


Fig. 6. Een heel ander principe is geïntroduceerd door Lucy. Hij veronderstelt een fase-overgang binnen het membraan van een platte dubbellaag in globulaire micellen.

membraan, waardoor molekulen en ionen net zo goed naar buiten als naar binnen kunnen gaan. De veronderstelling dat een biomembraan aanzienlijke aantallen poriën van verschillende diameter zou bevatten, waardoor molekulen van diverse afmetingen kunnen passeren, doet in ernstige mate afbreuk aan de waarneming dat deze membranen in eerste instantie als barrière moeten fungeren.

Wanneer al aan poriën gedacht wordt dan zouden deze in ieder geval zeer selectief moeten zijn, vermoedelijk afsluitbaar zijn of in samenwerking met een of ander energieleverend principe moeten zorgen voor een transport in één richting. In dat geval zou een porie als het ware een onderdeel van een pomp zijn. Voorwaarden van dit type kunnen ontleend worden aan de vele studies over de opname van suikers, aminozuren, ionen en andere stoffen, die op geen enkele wijze in de lipidtheorie of in de molekuulzeef-theorie passen.

De moeilijkheden liggen op een drietal gebieden: (1) de specificiteit, (2) de wetmatigheden van de opname en (3) de mogelijkheid van accumulatie. Zeer in het kort kan hierover het volgende gezegd worden (de problemen komen in het hoofdstuk van Van Steveninck uitvoeriger aan de orde).

Transport door 'carriers' Zowel studies met suikers (Le Fevre) als met aminozuren (Christensen) hebben aangetoond dat de opname van deze stoffen in zekere mate specifiek is. Het meest markante verschijnsel is wellicht dat de cel onderscheid maakt tussen stereo-isomeren; de L-vormen van aminozuren worden aanzienlijk sneller opgenomen dan de D-vormen. Dat betekent reeds dat het eenvoudige poriëndeel verlaten moet worden. Ook zien wij dat de specificiteit van celsoort tot celsoort wisselt. In bepaalde gevallen is de specificiteit van een opnamemechanisme zo groot dat slechts een enkele stof opgenomen wordt, in andere gevallen wordt aan een aantal op elkaar lijkende molekulen doorgang verleend. De overeenkomst met de bevindingen uit de enzymologie is frappant. Sommige enzymen zijn gericht op een enkel substraat, andere kunnen een breed scala van molekulen afbreken.

Die overeenkomst met enzymen wordt nog versterkt als wij de kinetika van deze opnameprocessen bekijken (zie bijvoorbeeld Wilbrandt & Rosenberg, 1961). De snelheid van opname is bijzonder veel hoger dan op grond van oplosbaarheid in lipiden en moleculair volume verwacht zou worden (voor passage van glucose door het erythrocytenmembraan is de schatting van het quotiënt van waargenomen en verwachte snelheid ongeveer 10 000). De snelheid van penetratie is niet recht evenredig met de concentratie, maar bereikt een plateau. Structuuranalogen van de permeërende stof kunnen de opname competitief remmen (daarnaast bestaat ook de mogelijkheid van niet-competitieve remming).

De suggestie ligt voor de hand: er moet zich in het membraan iets bevinden dat in staat is om een bepaald molekuul min of meer specifiek te binden, daarna tezamen met het molekuul het membraan te passeren en tenslotte weer – hetzij leeg, hetzij beladen – terug te keren naar het uitgangspunt. De stoffen waarvan verondersteld wordt dat zij voor dit vervoer aansprakelijk zijn hebben de naam 'carrier' gekregen. In het eenvoudigste geval – wanneer er door de cel geen energie geleverd wordt – zal tenslotte een evenwicht bereikt worden, waarbij aan weerskanten van het membraan dezelfde concentratie aanwezig zal zijn. Gezien de overeenkomst met enzymen kan men natuurlijk veronderstellen dat ook deze carriers wel eiwitten zullen zijn.

Wanneer er sprake is van accumulatie in de cel wordt het vraagstuk veel ingewikkelder. In het hoofdstuk van Van Steveninck zal dit probleem nader bekeken worden. Voor ons is van belang dat ook in

dat geval de aanwezigheid van carriers noodzakelijk is.

Het bestaan van carriers is dus afgeleid uit de karakteristieken van de opnameprocessen van in lipiden niet of nauwelijks oplosbare, maar voor de cel noodzakelijke stoffen. In zekere zin hebben zij nog een hypothetisch karakter; een definitieve isolering is nog niet gelukt. Ook ligt het voor de hand dat er op het gebied van het transport weinig modellen bestaan. Enkele eenvoudige benaderingen van de problemen kunnen hier niet onvermeld blijven.

Eenvoudige modellen van specifiek transport Het eerste geval ontleen wij aan Finkelstein & Cass (1968). Een dubbellaag van lipiden, gebracht tussen twee compartimenten die water bevatten, laat ionen niet passeren (en vertoont dus een hoge elektrische weerstand). Ook het jodide-ion gedraagt zich op deze wijze; het penetreert bijna niet. Toevoeging aan een KJ-oplossing van zeer kleine concentraties moleculair jodium (J_2), dat zelf geen invloed op de weerstand van de dubbellaag heeft, doet de weerstand drastisch dalen.

Het jodide-ion kan met medewerking van moleculair jodium blijkbaar wel passeren en de mate van passage is in hoge mate afhankelijk van de toegevoegde hoeveelheid moleculair jodium. De uitleg van dit fenomeen is dat jodium zich als een soort carrier ten opzichte van het jodide-ion gedraagt. Bij combinatie worden polyjodiden gevormd (een jodide-ion plus één of meer molekulen jodium). Van deze polyjodiden is de oplosbaarheid in lipiden veel groter, mede omdat de lading over een grotere massa verdeeld is. Zo kan dus een jodide-ion aan de ene kant van het membraan gepakt worden door een of meer jodiummolekulen; daarna wordt het door het membraan getransporteerd en aan de andere zijde weer losgelaten. Als men met thiosulfaat het weinige moleculaire jodium wegvangt keert de hoge elektrische weerstand van het membraan weer terug. Dit model vertoont een paar eigenschappen die de hypothetische carriers ook hebben: (1) het is een selectief proces, uitsluitend gericht op het jodide-ion en (2) een kleine hoeveelheid 'carrier' is in staat om een grote hoeveelheid jodide-ion te transporteren.

In de laatste jaren is er veel belangstelling ontstaan voor bepaalde antibiotica die in staat zijn om ionen te transporteren door biomembranen (zie ook het hoofdstuk van De Gier). Hun antibiotische werking berust er op dat zij met name kaliumionen uit de cel of uit celorganellen doen lekken. Hierdoor wordt de ionengradiënt inhoud/

milieu gestoord, wat voor de levensprocessen desastreus is. Gezien het feit dat de opname van ionen nog altijd in raadselen gehuld is, was het bijzonder interessant stoffen te leren kennen die in staat zijn ionen – in vele gevallen selectief – te transporteren door het lipidengedeelte van biomembranen. Tussen haakjes, er zijn ook kunstmatige 'kation-carriers' ontwikkeld, die, hoewel zij een totaal andere chemische bouw hebben, hetzelfde fenomeen vertonen.

Wat is het grote probleem bij de passage van ionen door een milieu dat uit lipiden bestaat? En hoe is de cel in staat tussen natrium- en kaliumionen onderscheid te maken? Een kaliumion is in water uitstekend oplosbaar. De watermolekulen zijn dipolen met een overschot positieve lading aan de kant van de waterstofatomen, terwijl de zuurstofatomen een lichte negatieve lading dragen. Om het sterk geladen kaliumion zal dus een gerichte binding van watermolekulen plaatsvinden; het is omhuld door water, ofwel gehydrateerd. Het komt dus in water nooit voor als het kale ion, maar als een deeltje van veel grotere afmeting. Hoewel het natriumion kleiner is zal het toch in water een groter deeltje vormen dan het gehydrateerde kaliumion. Dat komt doordat het kleinere geladen ion een grotere veldsterkte heeft en dus meer watermolekulen binden zal.

Om nu de permeatie van ionen door membranen te 'verklaren' waren er in principe twee mogelijkheden. Allereerst zou de passage plaats kunnen vinden door met water gevulde poriën. De cel zou dan tussen natrium en kalium kunnen onderscheiden omdat het eerste ion in gehydrateerde toestand groter is dan het tweede. Poriën van een bepaalde en zeer constante diameter kunnen dan één van de ionen doorlaten en het andere tegenhouden. Natuurlijk is de idee van met water gevulde poriën in verband met lekkageproblemen niet erg aantrekkelijk en ook is niet goed in te zien hoe dan een uitwisseling van ionen plaats zou moeten vinden.

De andere mogelijkheid is natuurlijk dat de ionen niet in gehydrateerde toestand maar 'kaal' passeren. Dat betekent dat zij zich uit het water als het ware moeten losrukken door verbreking van alle dipool-ion bindingen. Ook op deze basis zou een selectie plaats kunnen vinden, omdat immers het natriumion sterker aan water gebonden is. Het blijkt evenwel dat de energie die nodig zou zijn om deze ionen aan hun omstrengeling met watermolekulen te onttrekken zo hoog is dat ook deze mogelijkheid voor de cel afgesloten lijkt te zijn.

Zonder te willen suggereren dat alle cellen over ionenbindende

antibiotica beschikken, kan gesteld worden dat deze stoffen werken met een zeer bijzonder principe dat een uitweg biedt uit het hiervoor geschetste dilemma. De antibiotica in kwestie, bijvoorbeeld valinomycine, zijn ringvormige molekulen opgebouwd uit aminozuren (zij worden daarom wel macrocyclische antibiotica genoemd). Wanneer valinomycine aan mitochondriën wordt toegevoegd resulteert dit in een aanzienlijke kaliumlekkage. Ook in modelsystemen van lipiden-dubbellaagen zien wij hetzelfde fenomeen, met dien verstande dat de permeabiliteit voor kaliumionen ongeveer 300 maal zo hoog wordt als voor natriumionen. Deze selectiviteit hangt samen met de afmeting van de ring; bij andere macrocyclische antibiotica is de voorkeur gericht op andere kationen.

Het bijzondere van deze ringen is dat zij aan de buitenkant hydrofoob zijn, terwijl naar binnen gericht een aantal zuurstofatomen staan. Net als in water dragen deze atomen een geringe negatieve lading. Deze ring van zuurstofatomen vormt dus een milieu dat in zekere zin vergelijkbaar is met het water waarin het kaliumion zich bevindt. Het (kale) kaliumion kan dus zonder energieverlies 'overstappen' van het water in de ring van zuurstofatomen. Het totale complex (kaliumion in antibioticum) is dan aan de buitenkant zo hydrofoob dat het biomembranen en modellen daarvan gemakkelijk passeert. Ook hier is dus sprake van een model-carrier.

Een andere groep antibiotica (de gramicidinen) onderscheidt zich van de vorige groep doordat zij niet ringvormig zijn, zodat wij te maken hebben met lineaire polypeptiden (gramicidine A bijvoorbeeld is opgebouwd uit 15 aminozuren). Experimenten wijzen er op dat twee gramicidinmolekulen samen opgenomen worden in een dubbellaag van lipiden. Daarbij worden zij zodanig in elkaar gerold dat alle hydrofobe groepen naar buiten steken en een kanaal ontstaat dat de afstand van de dubbellaag overspant. Het kanaal heeft een vrije diameter van ongeveer 0,4 nm en is omzoomd door de zuurstofatomen van de aminozuren. Dat betekent dat voor een kaliumion de binnenwand van deze porie vergelijkbaar is met water en dat dit ion dit kanaal vlot kan passeren. Uit dit onderzoek valt een belangrijke les te trekken. Een dergelijk specifiek transport hoeft dus niet altijd verzorgd te worden door een bewegelijke carrier; ook het bestaan van specifieke poriën die uitsluitend bepaalde ionen doorlaten is mogelijk.

Deze ionentransporterende antibiotica (ook wel ionoforen genaamd) hebben ook nog een model opgeleverd, waarin de accumulatie van

ionen gedemonstreerd wordt. Het betreft hier het monensine; weer een lineair polypeptide, dat aan het ene einde van het molecuul een carboxylgroep draagt. Stel dat dit molecuul zich in een membraan bevindt, waarbij dit membraan twee oplossingen scheidt. Links bevinden zich natriumionen, rechts daarentegen waterstofionen. Arriveert het monensine (met ongeladen carboxylgroep) ter linkerzijde dan zal de carboxylgroep dissociëren en een natriumion aantrekken. Het molecuul rolt zich om dit ion heen en het complex kan zich naar de andere kant bewegen. Daar aangekomen wordt het natriumion door de overmaat waterstofionen verdrongen en het monensine keert terug met een waterstofion (dus met ongeladen carboxylgroep). Wanneer er nu links weinig natriumionen en rechts veel waterstofionen aanwezig zijn kan dit proces zo lang doorgaan tot de natriumconcentratie rechts veel hoger is dan links, m.a.w. er heeft een accumulatie van natriumionen plaatsgehad. De energie voor deze accumulatie is uit de aard der zaak geleverd door de waterstofionen-gradiënt. Dit is een aardig voorbeeld van gekoppeld transport, waarbij nog bedacht moet worden dat het metabolisme in de levende cel altijd een produktie van waterstofionen betekent.

Vormen van transport Al met al leren de waarnemingen over het transport van suikers, aminozuren en ionen dat de cel over een aantal specifieke mechanismen moet beschikken, die uit de aard der zaak in het celmembraan (of in andere biomembranen, bijvoorbeeld die van mitochondriën) gelokaliseerd moeten zijn. Chemische en elektronenmicroscopische onderzoeken doen veronderstellen dat zich in de lipidendubbellaag vele eiwitten bevinden, waarvan sommige zo groot zijn dat zij aan beide kanten buiten deze laag uitsteken. Het ligt voor de hand te veronderstellen (maar het is nog niet bewezen) dat wij hier niet te maken hebben met uniforme eiwitdeeltjes, maar met een bevolking van macromolekulen die met verschillende functies belast zijn. Zo worden biomembranen in de aan Wallach (1966) en Singer (1966) ontleende modellen gezien als 'vloeibare lipide/eiwit-mozaïeken' (fig. 7). Al naar de opgave die aan een bepaald biomembraan gesteld wordt zullen wij in de verhouding lipide/eiwit grote verschillen opmerken. Zo overheerst in de myelineschede van zenuwen, die een isolatorfunctie heeft, het lipide boven het eiwit. Aan de andere kant zijn de eiwitten in het binnenmembraan van mitochondriën zo talrijk dat zelfs de 'anatomie' van dit membraan niet te gronde gaat

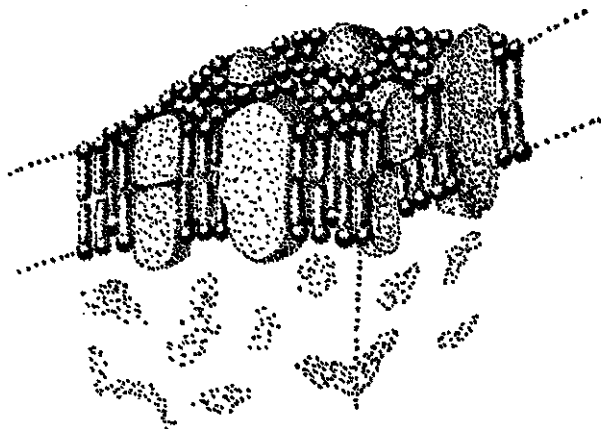


Fig. 7. In het voornamelijk aan het werk van Singer en Wallach ontleende model zijn in een vloeibare dubbellaag van lipiden eiwitten ingebouwd. Verschillende van deze eiwitten overspannen de dikte van de dubbellaag en maken zodoende contact zowel met het milieu binnen als met dat buiten het membraan.

als de lipiden geëxtraheerd worden.

Het zal niemand verbazen dat op het gebied van het transport van molekulen door biomembranen vele jaren een grote mate van verwarring geheerst heeft. Dit ging gepaard met het gebruik van verschillende slecht gedefinieerde begrippen. Dat werd mede veroorzaakt door het hanteren van criteria die experimenteel slecht toetsbaar zijn. Mede ter inleiding van de laatste twee hoofdstukken zal hier getracht worden enige orde in de chaos aan te brengen.

Lange tijd werd onderscheid gemaakt tussen *passief* en *actief* transport. Bij het laatste is energie nodig die door de cel geleverd wordt, bij het eerste niet. Volgens een primitieve redenering geldt dan: als door blokkering van het metabolisme het transport geremd wordt hebben wij te maken met actief transport, in het andere geval niet. Een vergelijking met de spier leert dat dit een heel slecht criterium is. Immers, wordt het metabolisme van de spier met mono-joodacetaat geremd, dan kan de spier nog enige tijd contraheren en daar is natuurlijk energie voor nodig die door de cel geleverd is. Het probleem is dat deze energie in alle mogelijke vormen opgeslagen kan worden. Ten aanzien van de permeabiliteit kan gezegd worden dat energie be-

schikbaar is in vele vormen, bijvoorbeeld het door de cel gemaakte energierijke fosfaat, een natriumgradiënt of een waterstofionengradiënt over een membraan en wellicht zelfs een conformatieverandering in het membraan.

Ook de beweging tegen een concentratiegradiënt in is geen goed criterium voor actief transport. In de eerste plaats kan de concentratie van sommige stoffen (wij denken aan kleurstoffen) in de cel hoog oplopen door binding aan bepaalde macromolekulen zonder dat hiervoor energie nodig is. Ook is het heel wel mogelijk dat een stof onder invloed van door de cel geleverde energie opgenomen wordt zonder dat dit tot concentratieverhoging leidt.

Het komt ons voor dat de vormen van permeabiliteit volgens een heel ander criterium onderscheiden moeten worden. In de eerste plaats is er een *passieve penetratie* (zie verder het hoofdstuk van Ariëns). Dan is de cel als geheel en het celmembraan passief ten opzichte van de penetrerende stof. Een voorbeeld: amyloalcohol zal in alle mogelijke cellen binnendringen omdat deze stof in het celmembraan kan oplossen. In de tweede plaats is er transport door het celmembraan heen met behulp van door de cel ontwikkelde mechanismen die een kleinere of grotere specificiteit vertonen. Dit willen wij *specifiek transport* noemen (zie verder het hoofdstuk van Van Steveninck). Daarvoor zijn transportmiddelen nodig die meestal als 'carrier' aangeduid worden. Dit woord carrier moet dan ruim geïnterpreteerd worden; zoals wij gezien hebben kan ook aan specifieke poriën gedacht worden. Sommigen prefereren dan ook het iets neutralere woord 'translocator'. In bepaalde gevallen zal dit specifieke transport plaatsvinden zonder dat dit aan de cel energie kost. In andere gevallen spendeert de cel energie, hetzij direct doordat energierijk fosfaat verbruikt wordt, hetzij dat deze energie eerst op de een of andere manier opgeslagen wordt (bijvoorbeeld als ionengradiënt).

Tenslotte mag niet onvermeld worden dat grotere deeltjes door de cel opgenomen kunnen worden zonder dat van een passage door het membraan sprake is. Wij doelen op de endocytose en daarmee verwante verschijnselen waarbij het membraan als geheel betrokken is. Zodat wij ten aanzien van de opname van stoffen door de cel tot de volgende onderscheiding komen:

A. *De stof passeert door het membraan heen.*

1. *Passieve penetratie* (het membraan en de cel zijn passief).
2. *Specifiek transport* (passage door middel van door de cel ontwikkelde mechanismen).
 - I. Het proces kost geen energie.
 - II. Het proces kost energie.

B. *De stof of het deeltje wordt door een kleiner of groter deel van het membraan omhuld (endocytose).*

Het is interessant waar te nemen dat wij na vijftig jaar omzwingingen teruggekeerd zijn bij Höber die al met nadruk stelde dat de cel over speciale mechanismen in het celmembraan moet beschikken om de nodige voedingsstoffen op te kunnen nemen. Zijn onderscheid in fysische en fysiologische permeabiliteit stemt in hoge mate overeen met onze categorieën passieve penetratie en specifiek transport.

Van model tot organel

Op een symposium van de New York Academy of Sciences (1972) over de structuur van membranen vroeg een van de deelnemers na een bespreking van het Singer-Wallach-model (fig. 7) zich af of de wetenschap na een lange en kronkelige weg van een kleine vijftig jaren teruggekeerd was op het punt van uitgang, namelijk de dubbellaag van Gorter en Grendel. Dat is natuurlijk maar zeer ten dele waar. In de eerste plaats werd deze hypothese in 1925 helemaal niet als punt van uitgang gezien. Er waren talrijke andere gezichtspunten en de zienswijze van Gorter en Grendel, die overigens alleen voor erythrocyten gold, is pas achteraf als punt van uitgang gekwalificeerd. Verder moest de rol van eiwitten op dat moment wel verwaarloosd worden omdat er over de structuur van eiwitten nauwelijks iets bekend was.

Weliswaar wordt in de laatste opvattingen over biomembranen aangenomen dat de dubbellaag ongeveer 75% van het oppervlak van de erythrocyt inneemt, maar een groot deel van de belangrijkste functies van dit biomembraan is juist geconcentreerd in het resterende deel.

Wat verwachten wij van een model? Allereerst dat het een aantal experimenten verklaart en in de tweede plaats dat het nieuwe experimenten suggereert. De dubbellaag van lipiden gaf een nog altijd zeer aannemelijke verklaring van de in de lipoidtheorie samengevatte oudere experimenten en heeft aan de andere kant de inspiratie tot talloze

nieuwe experimenten opgeleverd. Uit de aard der zaak moet toegegeven worden dat het model uitsluitend – maar dan ook zeer goed – een voorstelling geeft van een enkele functie van biomembranen, namelijk die van een selectieve barrière.

Nu hebben modellen de neiging een eigen leven te gaan leiden. Het feit dat met name het specifieke transport door membranen in eerste instantie niet met het model te verenigen was leidde tot, ach-eraf gezien, simplistische pogingen om – met behoud van het model – door kleine veranderingen een aanpassing te bereiken (fig. 5 en 6). De mislukking daarvan deed een felle reactie ontstaan; de lipiden-dubbellaag verdween vrijwel geheel van het toneel en de nadruk kwam op de eiwitten te liggen. In zekere zin terecht; specifiek transport vraagt om specifieke transportmiddelen en daarvoor zijn eiwitten veel geschikter dan lipiden. Zo komt men dus tot een model met lipoproteïne-eenheden (fig. 3 en 4).

Pogingen tot een synthese De laatste jaren laten dan een synthese tussen beide uitersten zien (fig. 7). In principe hebben wij in dit model te maken met een tweedimensionale vloeistof waarin zich eiwitten bevinden. Deze eiwitten moeten hydrofobe gedeelten hebben, waarmee zij contact met de lipiden hebben. De hydrofiele gedeelten steken boven of onder het lipidengedeelte uit in het water. Behalve deze intrinsieke eiwitten zullen zich boven en onder het biomembraan eiwitten bevinden (extrinsieke), die gemakkelijk verwijderbaar zijn. Het ligt voor de hand om de hypothese op te stellen dat enige van de intrinsieke eiwitten bij het specifieke transport van verschillende stoffen betrokken zullen zijn.

Aan de hand van het binnenmembraan van mitochondriën kunnen wij nagaan hoe ingewikkeld de bouw zal zijn. Wij kunnen hiervoor het schema van Green (fig. 4) gebruiken indien wij er van uitgaan dat de basis niet is opgebouwd uit lipoproteïne-eenheden, maar een structuur heeft zoals in fig. 7 is weergegeven (met dien verstande dat de hoeveelheid eiwit groot is ten opzichte van de hoeveelheid lipiden).

De mitochondriën zijn de krachtcentrales van de levende cel. Zij voorzien de cellen van de energiebron ATP doordat zij ADP met behulp van de oxydatieve fosforylering weer 'opladen' tot ATP. Bij dit proces is het binnenmembraan van het grootste belang. De situatie is ingewikkeld omdat allerlei verschillende enzymen zich bevinden, zowel in het buitenmembraan, in de ruimte tussen buiten- en binnen-

membraan, in het binnenmembraan als in de door dit membraan omsloten matrix. Het binnenmembraan omvat (met zijn knopvormige aanhangsels) tenminste zestig verschillende biologisch actieve eiwitten. In grote lijnen kan de samenhang tussen de structuur en functie als volgt omschreven worden. In de knopjes bevindt zich het systeem dat ADP in ATP kan omzetten, ondergebracht in een aantal (5-6) sub-eenheden. Opgemerkt moet worden dat het hele systeem op de een of andere manier in de basis verankerd wordt via het steeltje. Voor de vorming van ATP is natuurlijk energie nodig. Buiten de mitochondriën, in het cytoplasma, vindt de glycolyse plaats, waarvan het eindprodukt (pyruvaat) door de mitochondriën omgezet wordt in acetyl-CoA. Dit is de brandstof voor de citroenzuurcyclus waarvan de enzymen zich in de matrix van de mitochondriën bevinden. Dan komen de elektronen afkomstig uit de aan het substraat onttrokken waterstofatomen via een keten van elektronentransporterende enzymen bij de zuurstof terecht. Dit complex van enzymen bevindt zich in het basale deel van het binnenmembraan. Onverantwoordelijk kort samengevat: de oxydatie van het substraat komt neer op een productie van waterstofionen en een transport van elektronen naar zuurstof. Dit elektronentransport is de directe bron voor de fosforylering van ADP tot ATP (oxydatieve fosforylering). Hoe de koppeling van deze twee processen zich precies voltrekt is nog altijd niet bekend. Wel lijkt uitermate belangrijk dat er bij de overgang van rust naar activiteit sterke veranderingen plaatsvinden in het binnenmembraan-matrix-complex. De bron van deze verandering ligt in het binnenmembraan.

Wanneer wij dan nog weten dat zich in het binnenmembraan een aantal transportmechanismen bevinden (uitwisseling van ADP en ATP, transport van fosfaat, tussenprodukten van de citroenzuurcyclus, enz., enz.) dan zal duidelijk zijn dat de gegeven modellen (fig. 4 en 7) slechts zwakke afspiegelingen zijn van de werkelijke structuur. De biomembranen (die in verband met hun functie een uitgesproken asymmetrie hebben) moeten opgevat worden als celorganellen die zeer verschillende functies kunnen hebben en die ter vervulling van deze functies over een groter of kleiner aantal ingebouwde mechanismen beschikken. Uitersten lijken te zijn de relatief eenvoudige myelinschede en het buitengewoon complexe binnenmembraan van mitochondriën. Hoewel dit meestal niet zo bedoeld is, suggereren alle modellen een starheid die aan het dynamische karakter van biomembranen ernstig tekort doet.

De rol van de koolhydraten In de loop van de historie viel de aandacht eerst op de lipiden, waarna vele jaren later de eiwitten aan de beurt kwamen. Sinds enige jaren is er een derde groep van stoffen als component van biomembranen bijgekomen en wel de koolhydraten. Dit gebeurde mede in verband met een functie die tot nu toe niet aan de orde gesteld is en die speciaal bij meercellige organismen van het grootste belang is. Om de interacties tussen cellen goed te laten verlopen is het noodzakelijk dat cellen elkaar kunnen herkennen. Zo zullen leukocyten uit ons bloed vreemde deeltjes zoals bacteriën opnemen via het proces van de fagocytose (endocytose) maar daarvan zullen onze eigen erythrocyten niet het slachtoffer worden. Wanneer een deeltje als vreemd herkend is, zal het aan het celoppervlak gebonden worden, waarna het door het celmembraan omhuld en als vacuole in de cel opgenomen wordt. Daarna versmelten een of meer lysosomen (eveneens door membranen omgeven) met deze vacuole tot een fagosoosm. De door de lysosomen geleverde enzymen breken tenslotte het opgenomen deeltje af.

De mogelijkheid van de cel om extracellulair materiaal als eigen te herkennen zetelt in de buitenste lagen van het celoppervlak, de glycolyx (zie het hoofdstuk van Daems). Daarin moeten zich plekken met antigeenkarakter bevinden en in deze plekken spelen koolhydraten een grote rol (denk aan de bloedgroepen van erythrocyten). Uit dit, vooral voor de mogelijkheden van transplantatie uitermate belangrijke gebied, willen wij slechts een enkel voorbeeld lichten. Uit erythrocyten is één van de glycoproteïnen geïsoleerd (bevat MN-bloedgroepantigeen). Het bezit de koolhydraten die voor de antigene eigenschappen verantwoordelijk zijn en die zich aan de buitenkant van de erythrocyt bevinden. Het eiwitdeel kan in drie stukken onderscheiden worden. In de eerste plaats is er het gedeelte dat de koolhydraten draagt en dus naar buiten uitsteekt. Daarop volgt een reeks aminozuren waarvan de zijketens praktisch allemaal een sterk hydrofoob karakter hebben. Dit deel steekt dwars door het membraan; opgerold zodat de buitenkant geheel hydrofoob is. Tenslotte volgt weer een deel met veel meer hydrofiële aminozuren en dat bevindt zich uit de aard der zaak aan de binnenkant van het membraan van de erythrocyt. Een model moet dus ook met deze mogelijkheid rekening houden (fig. 8).

Het voorgaande demonstreert nog eens dat biomembranen zeer ingewikkelde bouwsels zijn, die zonder twijfel nauwe betrekkingen onderhouden met de buiten de eigenlijke barrière gelegen macromole-

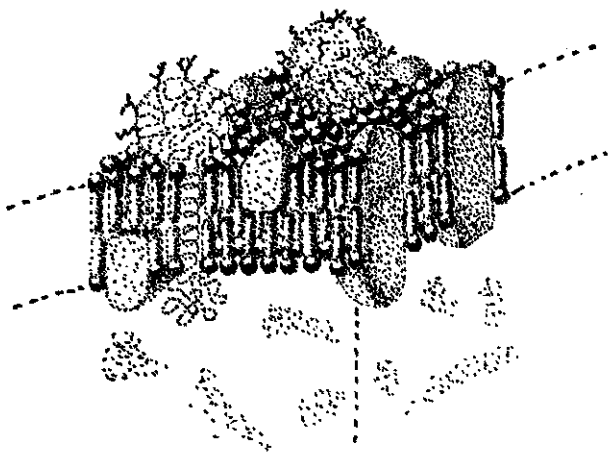


Fig. 8. Aan het model van fig. 7 moeten nog eiwitten met een 'signaal-functie' (antigenen) toegevoegd worden. Ook deze koolhydraatbevattende eiwitten kunnen in de dubbellaag verankerd zijn.

kulen. Fig. 8 toont hoe een stevige verankering met de dubbellaag mogelijk is. Er zijn gegronde redenen om aan te nemen dat ook aan de andere kant van het membraan betrekkingen bestaan waarvan de modellen geen rekenschap kunnen geven. Speciaal de zeer sterke bewegingen die celmembranen bij fagocytose vertonen (en die energie-consumerende processen zijn) geven aanleiding tot de suggestie dat daarbij contractiele fibrillen in het cytoplasma betrokken zijn. Mocht dit zo zijn dan zullen ook deze elementen ergens in de dubbellaag verankerd moeten zijn.

De afstand van de modellen tot het celorganel biomembraan is groot. Meestal is een model geschikt ter verklaring van een enkel fenomeen. De vooruitgang van de laatste vijftig jaar ligt vooral in het feit dat de moderne modellen (fig. 7 en 8) een algemeen stramien leveren waarin mechanismen voor zeer verschillende functies een plaats kunnen vinden. Daarbij moet men er zich voortdurend voor hoeden het model met de werkelijkheid te verwarren. Houdt men dit voor ogen dan is het construeren van modellen van groot belang, al zal dat belang, nu de werkelijkheid steeds dichter benaderd wordt, wel afnemen.

Het belang van modellen Ondanks alle kritiek die er in de loop der jaren op de 'modellenbouwerij' is geweest, moet wel beseft worden dat er van de modellen een grote stimulerende kracht kan uitgaan die tot nieuwe experimenten leidt. Zij vormen een soort denkpatroon waaraan men reeds bekende, maar nog onverklaarde, waarnemingen kan toetsen.

Ik zou dat tenslotte eens willen proberen te doen met een zeer oud, maar nog altijd onopgelost probleem. De inhalatie-anesthetica (narcotica), zoals lachgas, ether en chloroform werden veel langer dan een eeuw geleden in de chirurgische praktijk ingevoerd. In de loop der jaren werd het assortiment steeds verder uitgebreid, o.a. met allerlei koolstof-halogenen-verbindingen, zwavelhexafluoride, cyclopropan en het edelgas xenon. Het is chemisch gesproken een merkwaardig allegaartje stoffen, die ondanks hun chemische inertie (xenon!) sterke biologische effecten hebben. Omstreeks 1900 formuleerden Meyer en Overton een theorie over de werking van deze stoffen, die – met de door Ferguson gegeven uitwerking – nog altijd de beste beschrijving van de narcotische werking geeft. In het kort komt deze 'lipoidhypothese van narcose' op het volgende neer. (1) Alle chemisch niet-reactieve stoffen die in lipiden oplossen werken depressief. (2) De werking is het snelst en het sterkst in cellen die veel lipiden bevatten. (3) Het effect van een serie chemisch niet met elkaar verwante molekulen wordt groter als de verdelingscoëfficiënt lipide/water hoger is.

A priori is er geen enkele reden om te veronderstellen dat bij een bepaalde concentratie van een narcoticum de relatieve concentratie in de lipiden van verschillende organen, cellen en biomembranen verschillend zou zijn. Toch reageert blijkbaar het ene orgaan (zenuwstelsel) eerder, d.w.z. bij lagere concentratie dan het andere. Ook zien wij bij toenemende concentratie steeds meer effecten optreden (bewusteloosheid, wegvallen pijnreflexen, spierslapte). Aangezien de narcotica chemisch niet reageren en zich over lipiden gelijkmatig zullen verdelen moet dit betekenen dat de diverse lipiden-bevattende systemen een verschillende gevoeligheid hebben.

Terugkerende naar onze modellen zien wij dat de oudste modellen (fig. 1 en 2) heel weinig aanknopingspunten opleveren voor een verklaring. Het oplossen van een aanzienlijk aantal narcoticamolekulen tussen de hydrofobe staarten van de lipiden kan tot 'zwellings' van het membraan en daardoor tot verandering van de (passieve) permeabiliteit leiden. Dit moet dan voor alle biomembranen van het organisme

gelden. Deze permeabiliteitsverandering – lange tijd in verband gedacht met de werking van narcotica – lijkt mij een te algemeen fenomeen om het mechanisme van de narcose te kunnen verklaren.

De laatste modellen (fig. 7 en 8) geven veel betere mogelijkheden. Hier immers bevinden zich functionele eenheden in het lipidenmembraan. Wanneer wij de redelijke veronderstelling maken dat een aantal van deze functionele eiwitten tijdens een activiteitscyclus conformatieveranderingen ondergaan, dan ligt de suggestie voor de hand dat deze conformatieveranderingen in sommige gevallen gestoord kunnen worden als in het normale milieu (de lipiden) een aantal vreemde molekulen (de narcotica) opgelost zijn. De chemische aard van deze molekulen doet er dan niet veel toe; hun aanwezigheid is voldoende om een effect te bewerkstelligen. Sommige biomembranen zullen functionele eiwitten bevatten die veel gevoeliger zijn voor deze ingreep dan andere, hetgeen betekent dat bepaalde weefsels al door narcotica worden geremd in concentraties die op andere weefsels hoe genaamd geen invloed hebben.

Speculerend over de achtergrond van de narcose kan nog aan een andere mogelijkheid gedacht worden, die aansluit bij de opmerkingen over endo- en exocytose. Bij de impulsoverdracht van het zenuwstelsel door de synapsen worden boodschappermolekulen (neurotransmitters) in kleine pakketjes door exocytose buiten de ene zenuwcel gebracht om via de synapspleet door de receptoren van de volgende cel te worden ontvangen en herkend. De transmitters bevinden zich in talrijke door membranen omgeven blaasjes. Bij de prikkeloverdracht versmelt in eerste instantie het blaasjesmembraan met het presynaptische membraan, waarna door exocytose de inhoud van het blaasje naar buiten uitgestort wordt. Ook hier is natuurlijk herkenning voor de fusie van de twee membranen noodzakelijk. Aangezien deze herkenning van een zeer subtiële moleculaire afstemming van beide membranen op elkaar zal afhangen is het niet ondenkbaar dat door de aanwezigheid van narcotica in de lipidentlaag kleine verschuivingen in de moleculaire architectuur van een membraanoppervlak plaatsvinden, waardoor een niet-herkennen en dus een remming van de impulsoverdracht veroorzaakt wordt.

Met deze hypothese, die nauwelijks door enig experiment ondersteund wordt, maar die wellicht tot het opzetten van nieuwe proeven kan leiden wil ik alleen maar aantonen dat het overdenken van de potenties van modellen van biomembranen de moeite waard kan zijn.

Na deze historische inleiding is het wenselijk enkele woorden te wijden aan de opbouw van dit boek. Allereerst zal in het hoofdstuk van De Gier meer inhoud gegeven worden aan het begrip dubbellaag van lipiden. Daarbij zal blijken dat iedere membraan gekarakteriseerd wordt door een specifieke samenstelling. Hij zal ons laten zien welke bijdragen het moderne onderzoek van modellen op lipidenbasis tot het permeabiliteitsprobleem gegeven heeft. Hierbij sluit aan een verhandeling van de tweede belangrijke component van membranen, de eiwitten, door Zwaal. De lokalisatie in het membraan, de functie van deze eiwitten en de relatie tussen de membraaneiwitten en de lipiden vormen de onderwerpen van dit hoofdstuk.

De elektronenmicroscopie is weliswaar (nog) niet in staat de molekulen in biomembranen individueel te onderscheiden, maar deze tak van wetenschap heeft, zoals Daems in zijn hoofdstuk zal laten zien, bijzonder waardevolle gegevens opgeleverd over de algemene structuur en functie van biomembranen. Speciaal geldt dit voor bewegingen van deze celorganellen bij fenomenen zoals endocytose, exocytose en voor de vraagstukken van celfusies, waarbij de relaties tussen plasmamembraan (in engere zin) en daaronder gelegen filamenten enerzijds en de 'cell-coat' anderzijds van grote betekenis zijn.

De passage van kleine molekulen door biomembranen berust op twee volkomen verschillende mechanismen. Ten aanzien van vele molekulen fungeert het membraan als een selectieve barrière. Het al of niet penetreren door biomembranen hangt, zoals in het hoofdstuk van Ariëns en Simonis wordt duidelijk gemaakt, in eerste instantie af van de hydrofobie/hydrofilie-balans van deze molekulen. Ten behoeve van de opname van voor het leven noodzakelijk stoffen beschikt de cel over speciale mechanismen, die door de cel gesynthetiseerd worden en die wij met het woord 'carrier' aanduiden. Het hoofdstuk van Van Steveninck zal behandelen hoe deze carriers het specifieke transport verzorgen, waarbij dit transport dikwijls geschiedt tegen een concentratiegradiënt in met behulp van door de cel geleverde energie.

Recent onderzoek aan modelsystemen

J. DE GIER

De vele eigenschappen en functies die aan biologische grensvlakken worden toegeschreven, maken het vanzelfsprekend dat de samenstelling en architectuur van zo'n grensvlak in het algemeen buitengewoon complex is. Chemisch gezien kan de biomembraan getypeerd worden als een zeer groot lipoproteïne-complex, gecompleteerd met uitstekende suikerstaarten en gestabiliseerd door anorganische ionen. Analyses van de bouwstenen hebben laten zien, dat het complex is samengesteld uit vele tientallen, vaak zelfs honderdtallen verschillende lipide-, eiwit- en glycoproteïne-molekulen.

De membranen van de diverse cellen en celorganellen zijn betrokken bij sterk uiteenlopende functies die ieder specifieke eisen stellen aan de structuur. Ook uit chemische analyse van de samenstellende lipiden en eiwitten blijkt dat er sprake moet zijn van een grote heterogeniteit in opbouw. De bevestiging van het idee van Gorter & Grendel (1925) (zoals besproken in het hoofdstuk van Booij) heeft echter geleerd dat er naast grote verschillen één gemeenschappelijk element in de structuur te onderkennen valt: de ruggegraat van ieder biologisch membraan wordt gevormd door een dubbellaag van lipidemolekulen.

Uitgaande van zogenaamde structurele lipiden is het mogelijk gebleken eenvoudige experimentele modelsystemen te construeren die verrassend goede correlaties vertonen met veel belangrijke aspecten van biologische membranen. Dit betreft zowel de algemene barrière-eigenschappen van de grensvlakken als de specifieke effecten die bijvoorbeeld bepaalde antibiotica, ionoforen, ontkoppelaars, anaesthetica en antisera op membranen hebben. De bestudering van deze fenomenen aan de fysisch goed gedefinieerde modelsystemen, waarvan de chemische samenstelling systematisch kan worden gevarieerd, heeft geleid tot algemene permeabiliteitsregels en tot een beter begrip van het werkingsmechanisme van verschillende stoffen die op de mem-

braan inwerken.

Het is de bedoeling van dit hoofdstuk om de algemeen gebruikte experimentele modelsystemen te bespreken en de aard van het onderzoek op dit gebied met enkele concrete voorbeelden toe te lichten.

Membraanlipiden

Een algemeen kenmerk van de structurele lipiden is, dat in één molecuul een volledig hydrofoob gedeelte is gecombineerd met een sterk hydrofiële groep. Het uit de erythrocytenmembraan geïsoleerde globoside (fig. 1) is een typisch voorbeeld. Het hydrofobe gedeelte wordt gevormd door twee paraffinestaarten en met de aangehechte polaire suikergroep krijgt het molecuul een sterk amfipatisch karakter waardoor het als membraanbouwsteen geschikt is. Glycolipiden zijn een groep van membraanbouwstenen die door het sterk variërende karakter van de suikerrest en de antigene eigenschappen die hiermee geïsoleerd zijn in modelsystemen intensief bestudeerd worden (Inoue et al., 1971). In kwantitatief opzicht zijn de fosfolipiden in de meeste membranen echter veel belangrijker. De structuur van de fosfolipiden wordt geïllustreerd in fig. 2. In de glycerofosfatiden is glycerol veresterd met twee vetzuren en de derde OH-functie voor dit alcohol

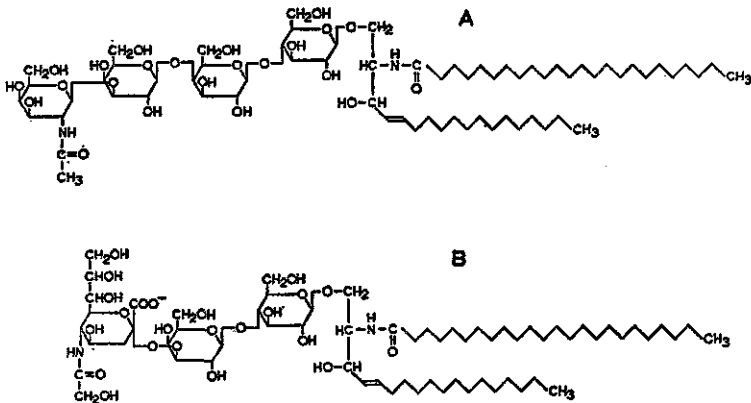


Fig. 1. Chemische structuur van glycolipiden. Globoside (A) is geïsoleerd uit de membranen van menselijke erythrocyten, haptoside (B) uit die van paarde-erythrocyten.

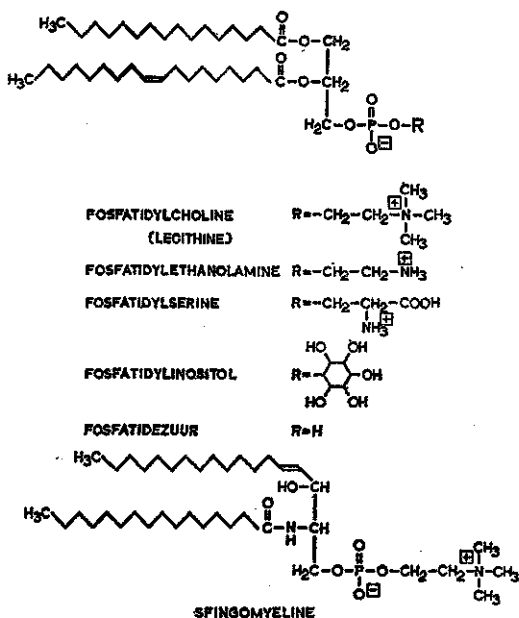


Fig. 2. Chemische structuur van fosfolipiden die veelvuldig als bouwstenen van biomembranen voorkomen.

draagt een fosfaatgroep met daaraan een variabele polaire groep R die de verschillende klassen van glycerofosfatiden karakteriseert. Het sfigomyeline heeft in plaats van glycerol het sfigosine dat zelf reeds een paraffinestaart draagt en waaraan een tweede hydrofobe keten via een peptidebinding is gekoppeld. De polaire groep van het sfigomyeline is volkomen identiek aan die van fosfatidylcholine (lecithine).

Wanneer de amfipatische lipiden in contact gebracht worden met water, ontstaan door hydratatie van de polaire groepen spontaan geordende structuren die röntgenanalytisch uitvoerig zijn onderzocht (Luzzatti & Tardieu, 1974). Een resultaat hiervan is bijvoorbeeld het in fig. 3 gegeven fasediagram van een lecithine-water-systeem. Bij lage waterconcentraties zijn er verschillende oriëntatiemogelijkheden. Interessant zijn de hexagonale fasen H_I en H_{II} . In aanwezigheid van heel weinig water vormen zich cilindres met een polaire kern die bij een kleine toename van het watergehalte overgaan in cilindres met

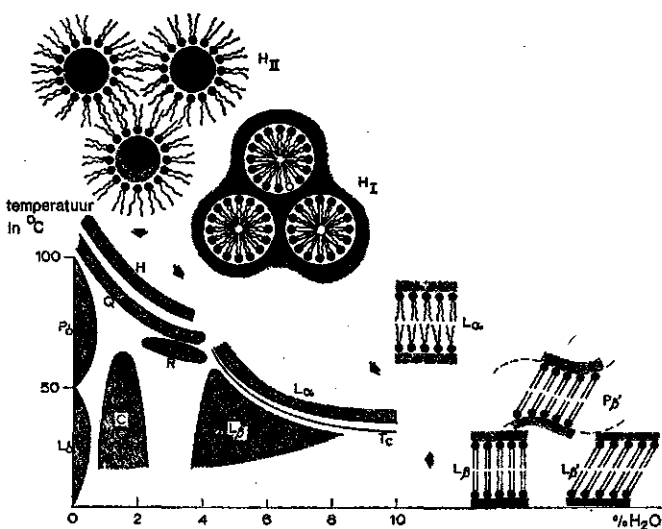


Fig. 3. Fasediagram van een lecithine-water-systeem zoals dit door röntgenanalytisch en vriesets-elektronenmicroscopisch onderzoek is vastgesteld. De oriëntaties van de lipidemolekulen in de belangrijkste fasen zijn in het diagram schematisch aangegeven.

een paraffinekern. Wanneer het watergehalte verder wordt opgevoerd ontstaan de lamellaire fasen. Boven een kritische overgangstemperatuur T_c vormt zich de L_α -fase, die met betrekking tot biologische membranen waarschijnlijk de meest relevante is. De lipidemolekulen zijn georiënteerd in een dubbellaag, maar de paraffinestaarten hebben grote bewegingsmogelijkheden en vormen dus een dunne laag van vloeibare paraffine. Wanneer de temperatuur verlaagd wordt tot beneden de overgangstemperatuur kristalliseren de paraffinestaarten. In deze zogenaamde gel-fase zijn een drietal variaties mogelijk. In de L_β -fase zijn de staarten loodrecht georiënteerd op het vlak van de dubbellaag, terwijl in de $L_{\beta'}$ -fase deze staarten een zekere hoek maken met dit vlak. Vriesets-elektronenmicroscopisch onderzoek (Verregaert et al., 1973) van lecithine-water-systemen heeft vaak een golfstructuur van de dubbellaag laten zien, de $P_{\beta'}$ -fase, waarin de molekulen steeds iets ten opzichte van elkaar zijn verschoven.

Met grote variaties in de begrenzende parameters geldt een fase-diagram zoals gegeven voor het lecithine in fig. 3 voor alle membraan-

lipiden. De algemene conclusie is, dat bij overmaat water dubbellaagstructuren spontaan gevormd worden. Een uitzondering vormen de fosfatidylethanolaminen die vaak in een hexagonale vorm persisteren. Ook lyso-fosfolipiden (fosfolipiden waarin één van de twee paraffinestaarten ontbreekt) vertonen een afwijkend gedrag omdat zij met overmaat water, evenals zepen, kleine sferische micellen vormen. In combinatie echter met andere lipiden laten ook molekulen fosfatidylethanolamine en lyso-lecithine zich gemakkelijk in de dubbellaagstructuur invoegen.

Uit het voorgaande mag blijken dat de membraanlipiden een groep vormen met veel algemene eigenschappen, toch moet benadrukt worden dat er ook grote verschillen zijn (Van Deenen, 1972). Lettend op het sterk wisselend karakter van de polaire groepen is het duidelijk dat de oppervlakte-eigenschappen van het dubbellaagsgrensvlak sterk kunnen variëren. Voorts vertonen ook de paraffinestaarten een grote variatie in lengte en in het aantal dubbele bindingen in de keten. Deze factoren zijn van groot belang voor de viscositeit in het hydrofobe deel van de dubbellaag en bepalen mede de temperatuur waarbij de vloeibare dubbellaag overgaat in de gelvorm. Uitvoerig analytisch onderzoek aan verschillende biologische membranen heeft geleerd dat membranen in het algemeen een zorgvuldig gecontroleerde lipidesamenstelling bezitten, die door extreme variaties in dieet niet of nauwelijks kan worden beïnvloed. Tussen membranen met verschillende functies bestaan vaak opvallende verschillen in het karakter van de polaire groepen en de paraffinestaarten van de samenstellende lipiden, maar membranen met dezelfde functie vertonen, ook bij vergelijking van verschillende diersoorten, vaak een grote overeenkomst. De voor de hand liggende conclusie kan dan ook zijn dat de chemische aard der lipiden in belangrijke mate bijdraagt tot de specifieke, voor de functie noodzakelijke eigenschappen. Onderzoek met behulp van modelsystemen heeft deze conclusie bevestigd en op diverse punten inzicht gegeven in de consequenties van de verschillen in de lipidesamenstelling.

Het monolaagsysteem

Wanneer een druppel van een lipideoplossing voorzichtig op een lucht-water-grensvlak wordt gebracht verdampst het oplosmiddel, terwijl de lipidemolekulen zich spreiden over het oppervlak en zich richten met de polaire groep in het water en de paraffinestaarten in de

lucht. In de – naar de ontdekker van de techniek genoemde – Langmuir-trog is dit oppervlak een rechthoek die aan drie zijden is begrensd door een vaste wand, terwijl de vierde wand gevormd wordt door een beweegbare barrière die de mogelijkheid schept om het oppervlak langzaam te reduceren. Bij het samendrukken van de gespreide lipiden ontstaat dan een oppervlaktedruk die gemeten kan worden als de zijwaartse druk tegen de beweegbare barrière. Deze oppervlaktedruk kan ook afgeleid worden uit de verandering van de oppervlaktespanning van het grensvlak. De relatie tussen oppervlak per molecuul en oppervlaktedruk die zo gevonden wordt geeft directe informatie over de pakking van de lipidemolekulen. In fig. 4 zijn oppervlaktedruk-curven gegeven voor de zuivere molecuulsoorten dioleoyllecithine en dipalmitoyllecithine. Het is duidelijk dat het onverzadigde lecithine bij iedere druk een groter oppervlak per molecuul inneemt dan het verzadigde lecithine. De curve van dipalmitoyllecithine laat bovendien zien dat ook in de monolaag een faseovergang mogelijk is. Bij een druk van ongeveer $80 \text{ mN} \cdot \text{m}^{-1}$ gaat de vloeibare monolaag over in een monolaag met starre ketens, hetgeen zich manifesteert in een grote verandering van het oppervlak per molecuul bij een geringe

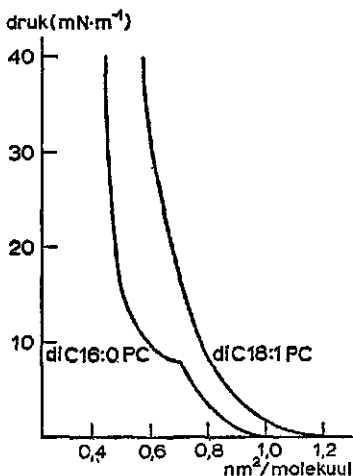


Fig. 4. Het verband tussen oppervlakte per molecuul en oppervlaktedruk voor dipalmitoyl (diC16:0PC) en dioleoyllecithine (diC18:1PC) gemeten bij 22°C .

18:0/18:0 18:0/18:1 18:1/18:1 16:0/18:2 18:2/18:2 16:0/18:3

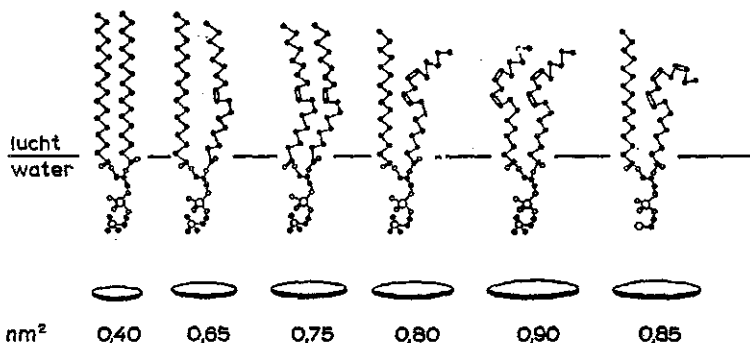


Fig. 5. Het oppervlak per molekuul van synthetische lecithinen, die verschillen in graad van onverzadigdheid, gemeten bij dezelfde temperatuur en oppervlaktedruk (22°C en $21\text{ mN} \cdot \text{m}^{-2}$).

verandering van de druk. Is de monolaag eenmaal in de vaste fase, dan is verdere samendrukbaarheid zeer beperkt.

De conclusie uit dit soort experimenten is, dat de pakkingsmogelijkheid voor verschillende lipiden belangrijk verschilt. De homologe reeks van lecithinen in fig. 5 illustreert dat in dit verband het sterk variabele aantal dubbele bindingen van grote betekenis is. Op dezelfde manier kan worden gedemonstreerd dat ook de ketenlengte en de grootte van de polaire groep factoren zijn die mede de grootte van het oppervlak bepalen dat door één lipidemolekuul wordt ingenomen. De verschillen in pakking die voortvloeien uit de verschillen in chemische samenstelling van de membraanbouwstenen vormen de basis voor het begrip van de grote verschillen die er in de barrière-eigenschappen van lipidedubbellen blijken te bestaan.

Liposomen

Als een membraanlipide, zoals lecithine, in contact gebracht wordt met een overmaat van een waterige elektrolytoplossing worden bij de dispersie van het lipide liposomen spontaan gevormd (Bangham et al., 1974). Liposomen zijn aggregaten bestaande uit concentrische lipidedubbellen waartussen een deel van de oplossing wordt ingesloten. Door ultrasonoon trillen kunnen de liposomen worden omge-

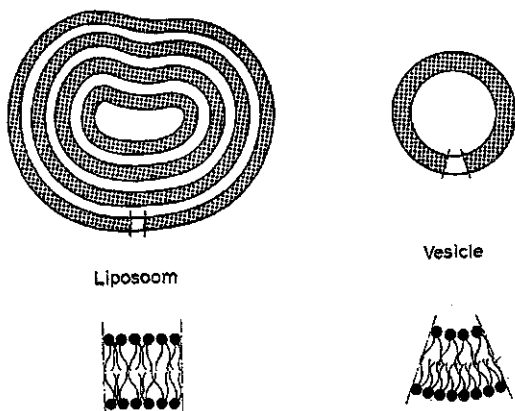


Fig. 6. Schematische voorstelling van een doorsnede van een liposoom (links) en een lipide-'vesicle' (rechts).

zet in kleine 'vesicles' met een diameter van enkele tientallen nanometers en die begrensd zijn door slechts één dubbellaag van lipiden (fig. 6).

Evenals biologische cellen gedragen de multilaagliposomen zich als osmometers met een selectief permeabel membraan. Wanneer de liposomen in een elektrolytoplossing zijn gemaakt en de zoutconcentratie van de oplossing na de vorming wordt verlaagd, blijken de liposomen door opname van water te zwellen, zoals volgens de osmotische wetten voor een selectief permeabele osmometercel verwacht mag worden (Bangham et al., 1967). Hieruit kan de conclusie worden getrokken, dat de zuivere lipidedubbellaag evenals de biologische membraan goed permeabel is voor water, maar praktisch impermeabel voor elektrolyt. Behalve voor water is de dubbellaag ook permeabel voor kleine polaire molekulen, zoals glycol, glycerol en erythritol. Dit blijkt uit het feit dat liposomen waarin een elektrolytoplossing is ingesloten, osmotisch zwellen wanneer ze gesuspendeerd worden in isotone oplossingen van deze polaire stoffen (De Gier et al., 1971). Fig. 7 laat zien dat glycol al beneden een temperatuur van 10 °C de dubbellaag van dioleoyllecithine snel kan penetreren, terwijl glycerol meer moeite heeft en het nog grotere erythritolmolekuul de dubbellaag alleen bij hogere temperatuur penetreert. Hieruit volgt dat de permeabiliteit voor polaire molekulen snel afneemt als het molekuul

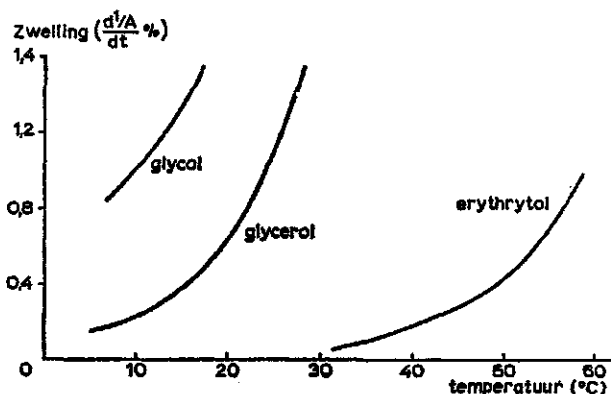


Fig. 7. Vergelijking van de permeabiliteit van liposomen voor respectievelijk glycol, glycerol en erythritol als functie van de temperatuur. De liposomen werden gemaakt van dioleoyllecithine in 50 mM KCl. Kleine monsters van deze liposoomdispersie werden gebracht in isotone oplossingen (100 mM) van de niet-elektrolyten. Onder omstandigheden waarbij het niet-elektrolyt de dubbellaagen kan penetreren, wordt het osmotisch evenwicht verstoord en gaat de liposoom zwellen. Deze zwelling kan optisch worden gevolgd als een verandering van de absorptie (A). Op experimentele gronden kan worden aangenomen dat er een lineair verband bestaat tussen d^4A/dt en de permeabiliteit van het niet-elektrolyt (Bangham et al., 1967).

in grootte toeneemt. In een isotone oplossing van glucose is het volume van de liposomale osmometer praktisch stabiel en alleen met gevoeligere methoden, die bijvoorbeeld gebruik maken van radioactieve isotopen, kan aangetoond worden dat er nog een zeer geringe doorlaatbaarheid bestaat voor glucose. In tegenstelling tot de sterk apolaire molekulen penetreren stoffen met een hydrofoob karakter de membraan veel gemakkelijker. Het transport van apolaire stoffen laat zich echter moeilijk demonstreren. In lage concentratie associëren deze molekulen zich sterk met de lipidemembraan en in hogere concentraties verstoren zij de dubbellaagstructuur. Interessant is het echter om in dit verband te letten op het reeds in het hoofdstuk van Booy besproken valinomycine; een antibioticum dat een 'carrier-functie' kan vervullen voor kaliumionen. Het valinomycine is opgebouwd uit 12 amino- en hydroxyzuren die in een ringstructuur zijn gekoppeld en wel zodanig dat de polaire groepen naar binnen zijn gericht en de buitenkant een sterk hydrofoob karakter heeft. Met een kalium-

ion vormt het valinomycine op specifieke en reversibele wijze een complex waarbij het kaliumion in het polaire centrum wordt gebonden en naar buiten wordt afgeschermd door de hydrofobe mantel. Het blijkt nu dat een zeer kleine hoeveelheid valinomycine in de liposomale dubbellaag een grote kalium-permeabiliteit kan induceren. Hieruit volgt dat het complex ondanks het feit dat dit geheel een moleculairgewicht van 1000 verre te boven gaat, de hydrofobe barrière van de dubbellaag zeer makkelijk kan penetreren (Blok et al., 1974).

Liposoomexperimenten geven ook de mogelijkheid om de doorlaatbaarheid van verschillende lipidedubbellagen met elkaar te vergelijken. Het experiment, waarvan de resultaten zijn gegeven in fig. 8, laat zien dat de permeabiliteit enorm toeneemt als het aantal dubbele bindingen in de paraffineketens toeneemt (De Gier et al., 1971). Dit feit is geheel in overeenstemming met wat verwacht mag worden op basis van de minder efficiënte pakking van de sterker onverzadigde molekulen zoals deze op de monolaag werd gemeten. Ook van het valinomycine-geïnduceerde iontransport is gebleken dat het in sterke mate afhankelijk is van de graad van onverzadigdheid. Uitvoerig kinetisch onderzoek heeft aangetoond, dat dit primair het gevolg is van de grotere beweeglijkheid die de carrier in de meer onverzadigde membraan heeft (Blok et al., 1974).

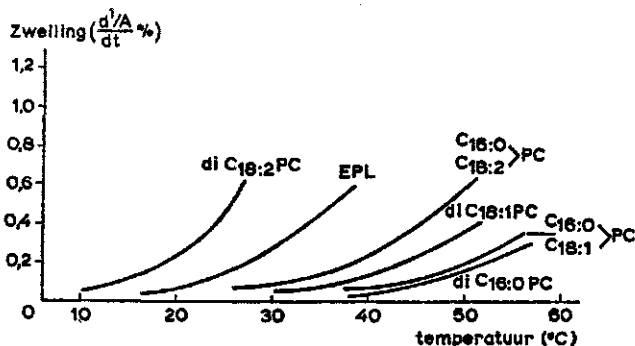


Fig. 8. Vergelijking van de erythritolpermeabiliteit van verschillende liposoomsystemen gemaakt van synthetische lecithinen die in graad van onverzadigheid verschillen en van een soya-lecithine (EPL) dat ca. 70% linolzuur (18:2) bevat.

De relevantie van dit soort experimenten met betrekking tot biologische membranen is o.a. gebleken uit experimenten met *Acholeplasma laidlawii* (McElhaney et al., 1973; Van der Neut-Kok et al., 1974). Door toevoegingen van vetzuren aan het groeimedium kan het onverzadigd karakter van de membraanlipiden van deze primitieve cellen belangrijk worden gevarieerd. Permeabiliteitsmetingen, verricht aan de cellen met variërende lipidesamenstelling en aan liposomen die werden gemaakt van de uit de cellen geëxtraheerde lipiden, vertoonden een goede onderlinge correlatie en voerden tot dezelfde conclusies als die werden afgeleid uit de experimenten met zuivere lecithinen. Een toenemende onverzadigdheid verhoogt dus de permeabiliteit.

Ook ten aanzien van de ketenlengte is een dergelijk rationeel verband gevonden. Als de ketenlengte afneemt, dat wil zeggen als de interactie tussen de ketens minder wordt, neemt de permeabiliteit toe. Interessant is dat er bij verkorten van de keten een abrupte overgang is waarbij de lipidedubbellaag zijn barrièrefunctie voor elektrolyten gaat verliezen (Mandersloot et al., 1975). Terwijl een dubbellaag van lecithineliposomen met vetzuurstaarten van 14 koolstofatomen nog een efficiënte barrière is voor kaliumionen, is een dubbellaag met staarten van 12 koolstofatomen zeer goed permeabel voor deze ionen. Deze kritische grens verschuift naar een langere ketenlengte als andere destabiliserende factoren een rol gaan spelen. Destabilisatie wordt bijvoorbeeld bewerkstelligd als de polaire groepen een netto negatieve lading krijgen of wanneer lyso-fosfolipiden in de dubbellaag worden ingebouwd. Opmerkelijk is verder dat de dubbellaag in het algemeen een sterk verhoogde permeabiliteit te zien geeft bij de kritische temperatuur waarbij de vloeibare dubbellaag in de gelvorm overgaat (Blok et al., 1975).

Deze toestanden van sterk verhoogde permeabiliteit zijn zeer intrigerend als we bedenken dat de lokale concentratie aan lyso-fosfolipiden in de membraan in principe variabel is door de aanwezigheid van fosfolipasen in de natuurlijke membraan (Van den Bosch, 1974). Verder is ook de temperatuur van de faseovergang manipuleerbaar, o.a. door middel van tweewaardige ionen en lipide-eiwit-interacties (Van Dijck et al., 1975; Papahadjopoulos et al., 1975). In hoeverre deze mogelijkheden ook door de natuur worden benut en een rol spelen bij plotselinge permeabiliteitsveranderingen, zoals bij depolarisatieverschijnselen, is een zaak die verder onderzoek behoeft.

De besproken experimenten laten zien dat het liposoomsysteem erg geschikt is voor kwalitatief en vergelijkend onderzoek. Een nadeel is echter dat het buitenoppervlak van het multilaagsysteem slechts bij benadering te meten is. Dientengevolge zijn de waarden voor de permeabiliteitscoëfficiënten moeilijk te kwantificeren. Daarom heeft veel van het recente onderzoek zich gericht op de lipide-vesicles die ontstaan als multilaagliposomen ultrasoon worden getrild. In deze structuren correspondeert het buitenoppervlak met de totale hoeveelheid lipide en is een benadering van het totale oppervlak mogelijk (vergelijk Bangham et al., 1974).

Zwarte films

Een tweede experimenteel systeem dat veelvuldig gebruikt wordt voor de bestudering van dubbellen is de 'black film'-techniek (Ti Tien, 1974). De apparatuur bestaat uit een meetcel met twee compartimenten, gescheiden door een tussenschot waarin een kleine opening ter grootte van ongeveer een vierkante millimeter. Onder gunstige omstandigheden kunnen lipidemolekules in deze opening een film vormen met de karakteristieken van een lipidedubbellaag (fig. 9). Omdat

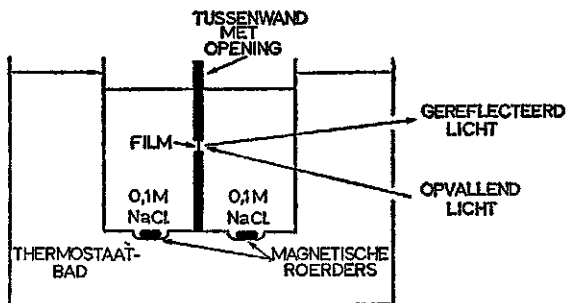


Fig. 9. Meetopstelling voor de 'black film'-techniek. In de opening van het tussenschot, dat de twee met elektrolytoplossing gevulde compartimenten scheidt, wordt een druppel van een geschikte lipideoplossing gebracht. Een diffusieproces leidt tot verdunning van dit grensvlak en uiteindelijk tot de vorming van de dubbellaag. Opvallend licht wordt gereflecteerd door de voor- en de achterzijde van de film. Door interferentieverschijnselen kan het verdunningsproces als een kleurig schouwspel worden gevolgd. Nadert de film de dikte van de dubbellaag dan treedt uitdoving op en wordt het beeld zwart.

in ieder compartiment een elektrode kan worden gebracht, leent dit systeem zich uitstekend voor elektrische metingen. De weerstand van de dubbellaag geeft directe informatie over de permeatie van ionen. De zwarte-filmtechniek is dan ook met veel succes gebruikt voor de bestudering van ionoforen, zoals valinomycine en gramicidine, die de ionenpermeabiliteit van de membraan sterk verhogen (Eisenman et al., 1973).

Valinomycine veroorzaakt bij aanwezigheid van kaliumionen een verhoging van de geleidbaarheid van de zwarte film. Dit kan worden verklaard als de vorming van een geladen carrierion-complex dat onder invloed van de aangelegde spanning door de hydrofobe barrière diffundeert. Gramicidine geeft eveneens een verhoging van de geleidbaarheid, maar bij lage concentratie en constante spanning over de membraan fluctueert de stroomsterkte in discrete stappen. Dit heeft geleid tot de interpretatie dat gramicidine polaire kanalen vormt die zich kunnen openen en sluiten. In discussies over dit onderwerp is gesteld dat het gramicidine een helixgewonden peptide is met een polaire kern, waardoor het een bouwelement wordt voor een ionengeleidend kanaal. Molekuulmodellen hebben laten zien, dat voor een doorlopend kanaal dat de dubbellaag geheel doorboort, twee molekulen gramicidine boven elkaar geplaatst moeten worden. Voor het ionentransport is dimeervorming voor het ionofoor daarom essentieel. Door dissociatie van het dimeer wordt het elektrisch transport via ionen door het kanaal weer onmogelijk, hetgeen een goede verklaring geeft voor de fluctuerende stroomsterkte (Hladky et al., 1974).

Het voordeel van de zwarte film boven het liposoomsysteem is dat het oppervlak van de membraan bekend is. Nadelen zijn echter de moeilijk te interpreteren randeffecten en het feit dat steeds een onbekende hoeveelheid van het oplosmiddel in de dubbellaag achterblijft. Voorts is in de praktijk gebleken dat slechts met bepaalde lipide-mengsels stabiele films verkregen worden.

Cholesterol

Sterolen komen alleen in onveresterde vorm en in sterk wisselende concentraties in biomembranen voor. Intracellulaire membranen bevatten in het algemeen weinig sterol, maar in de begrenzendende celmembranen is het gehalte vaak hoog en nadert de molekuulverhouding sterol:fosfolipide in bepaalde gevallen de waarde 1. Op deze regel

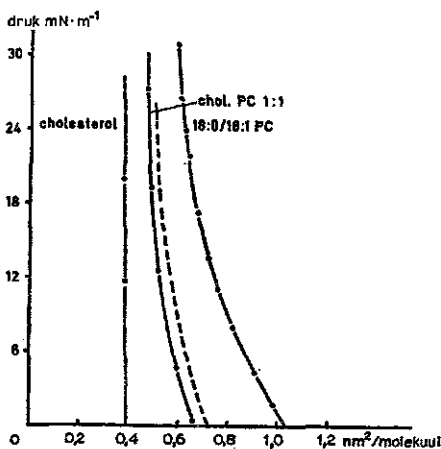


Fig. 10. Oppervlaktedruk-curven van stearyl-oleoyl lecithine, cholesterol en van een equimoleculair mengsel van deze membraanbouwstenen. De gestippelde lijn geeft het berekende gemiddelde van de curven van de zuivere componenten.

zijn ook uitzonderingen, want in bacteriële membranen bijvoorbeeld komt in het geheel geen sterol voor.

De sterolmolekulen voegen zich gemakkelijk in de dubbellaag van de membraan en kunnen specifieke interacties aangaan met lipide-molekulen, waardoor het karakter van het grensvlak in belangrijke mate wordt beïnvloed (Phillips, 1972). De eerste gegevens over een interactie tussen cholesterol en bijvoorbeeld lecithine kwamen uit onderzoek van gemengde monolagen. Een voorbeeld is gegeven in fig. 10, die de druk-oppervlakte-curven toont van cholesterol, dioleoyllecithine en van een equimoleculair mengsel van deze membraanbouwstenen. Uit dit experiment blijkt, dat in de gemengde film het gemiddeld oppervlak per molekuul duidelijk minder is dan het rekenkundig gemiddelde van de oppervlakten van de molekulen in de films van de zuivere componenten. De conclusie die uit dit condenserend effect getrokken kan worden is, dat door onderlinge interactie de pakking van de molekulen veel hechter is. De consequentie van deze dichtere pakking uit zich ook in het permeabiliteitsgedrag van de dubbellaagsystemen. In fig. 11a is dit gedemonstreerd voor liposomen gemaakt van palmitoyllecithine met en zonder cholesterol. Het

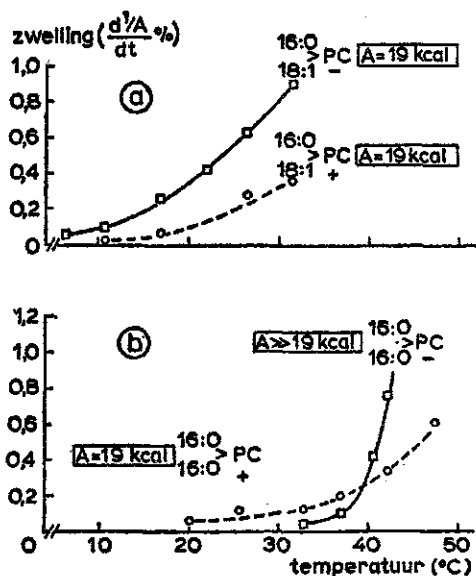


Fig. 11. Effect van cholesterol op de permeabiliteit van de lipidedubbel- laag voor glycerol in lipoomsystemen van respectievelijk palmitoyl-oleoyl lecithine (a) en dipalmitoyl lecithine (b). De getrokken lijn geeft de permeabiliteit van de zuivere lipidedubbel- laag, de gestippelde lijn van de dub- bellaag waarin 30% cholesterol is geïntroduceerd. De waarde A in de figuur geeft de activeringsenergie die uit de temperatuur afhankelijkheid kan worden berekend.

experiment toont een zeer duidelijke reductie in de glycerolpermeabi- liteit als gevolg van het invoeren van het cholesterol (De Gier et al., 1968).

De interactie tussen het sterol en lecithine is van zeer specifieke aard. Vergelijkend onderzoek met structuuranaloga heeft laten zien dat voor een goede interactie tussen cholesterol en lecithine in het sterolmolekuul de paraffinestaart, de vlakke ringstructuur en de OH- groep essentieel zijn (Demel et al., 1972). Zo is bijvoorbeeld gebleken dat epicholesterol, met een 3α -OH-groep in plaats van de 3β -OH- groep maar overigens identiek aan cholesterol, in de gemengde mono- laag geen condensatie-effect te zien geeft en het permeabiliteitsgedrag van de liposomale dubbellaag nauwelijks beïnvloedt. Ook de aard van de vetzuurstaarten van het lecithine blijkt van belang. De sterkste

effecten, zowel in de monolaag als in de dubbellaag zijn te zien met molekulen die één verzadigd en één mono-onverzadigd vetzuur dragen. Zeer zwakke interacties werden gevonden met fosfolipiden die twee poly-onverzadigde paraffinestaarten bezitten. Interessant is de interactie met fosfolipiden zoals dipalmitoyllecithine waarvan de dubbellenen in het fysiologisch belangrijke temperatuurgebied een overgang van de vloeibare naar de gelfase vertonen (De Gier et al., 1969). Uit het zwegedrag van de liposomen als functie van de temperatuur (fig. 11b) kan worden afgeleid, dat de doorlaatbaarheid voor glycerol van de zuivere fosfolipidedubbellaag zeer snel afneemt en praktisch nihil wordt als de membraan overgaat in de gelfase. Wordt cholesterol in de dubbellaag ingevoerd, dan zien we dat het sterol de permeabiliteit in het temperatuurgebied boven de overgangstemperatuur belangrijk reduceert, maar dat bij een lagere temperatuur een langzaam afnemende permeabiliteit blijft gehandhaafd. De verklaring van dit verschijnsel is, dat door de aanwezigheid van cholesterol de overgang naar de gelfase onmogelijk wordt. Dit wordt bevestigd door calorimetrisch onderzoek van het betreffende liposoomsysteem dat laat zien dat de duidelijke enthalpieverandering – die de coöperatieve overgang van de vloeibare naar de gelvorm karakteriseert – langzaam verdwijnt als steeds meer cholesterol in de dubbellaag wordt ingevoerd. Ook recente NMR-metingen¹, die gegevens verschaffen over de microviscositeit in de dubbellaag, bevestigen dit en laten zien dat het cholesterol de hydrofobe kern van de dubbellaag brengt in een soort intermediaire toestand van hoge viscositeit (Darke et al., 1972). De conclusie is daarom dat lipidemembranen die veel cholesterol bevatten in het algemeen slecht permeabel zijn en tevens dat deze geringe permeabiliteit geen abrupte veranderingen ondergaat bij temperatuurvariaties.

Werkingsmechanisme van polyeenantibiotica

Een groep van stoffen die in relatie tot modelsystemen ruime belangstelling hebben gekregen zijn de polyeenantibiotica (Kinsky, 1970). Deze verbindingen zijn gekarakteriseerd door een groot ringsysteem waarin een hydrofoob gedeelte van geconjugeerde dubbele bindingen

1. NMR = nucleair magnetische resonantie.

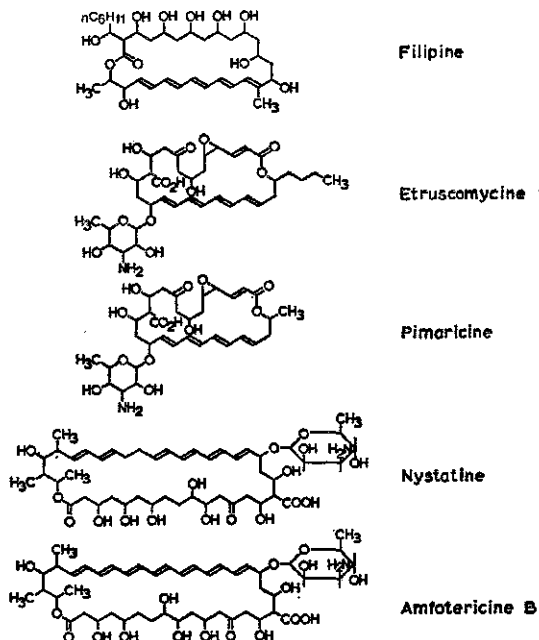


Fig. 12. Chemische structuur van verschillende polyeenantibiotica.

valt te herkennen maar ook een polair gedeelte met veel OH-groepen (fig. 12). Deze groep van stoffen dankt de antibiotische activiteit aan een directe inwerking op bepaalde biomembranen, waardoor grote veranderingen in permeabiliteit ontstaan.

In hun werking zijn de polyeenantibiotica erg selectief. Ze werken bijvoorbeeld bijzonder effectief in op schimmels, terwijl bacteriën totaal ongevoelig zijn. Om de membraan kwetsbaar te doen zijn voor de polyeenantibiotica is het nodig dat in die membraan sterol aanwezig is. Dit is duidelijk gebleken uit experimenten met cellen van *Acholeplasma laidlawii* in combinatie met proeven aan de verschillende modelsystemen. *Acholeplasma*-cellen gegroeid in afwezigheid van sterolen zijn ongevoelig voor deze antibiotica, terwijl cellen gegroeid in een sterolbevattend medium onder invloed van een kleine hoeveelheid van het polyeen grote lek van de celinhoud vertonen.

Bijzonder goed onderzocht is de verhoogde permeabiliteit die te-

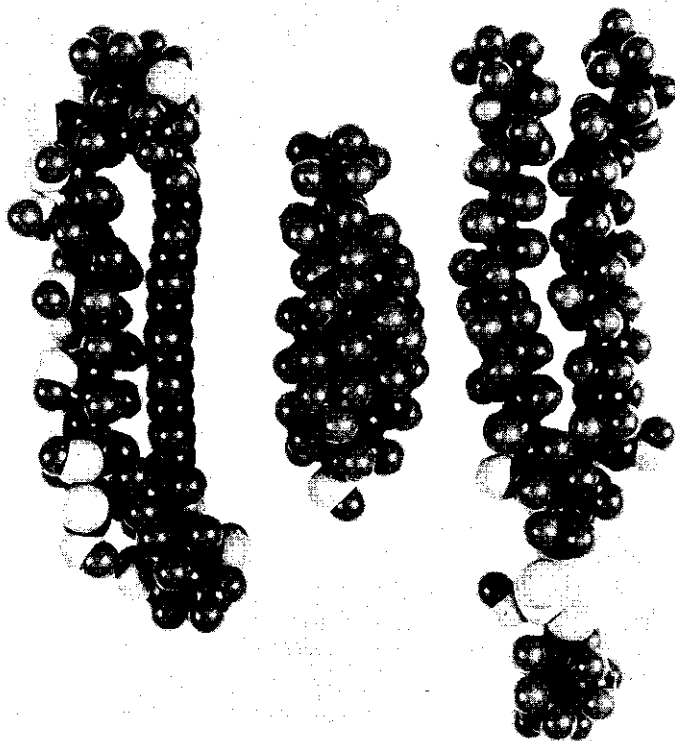


Fig. 13. Ruimtelijke molekuulmodellen van respectievelijk amfotericine B, cholesterol en lecithine.

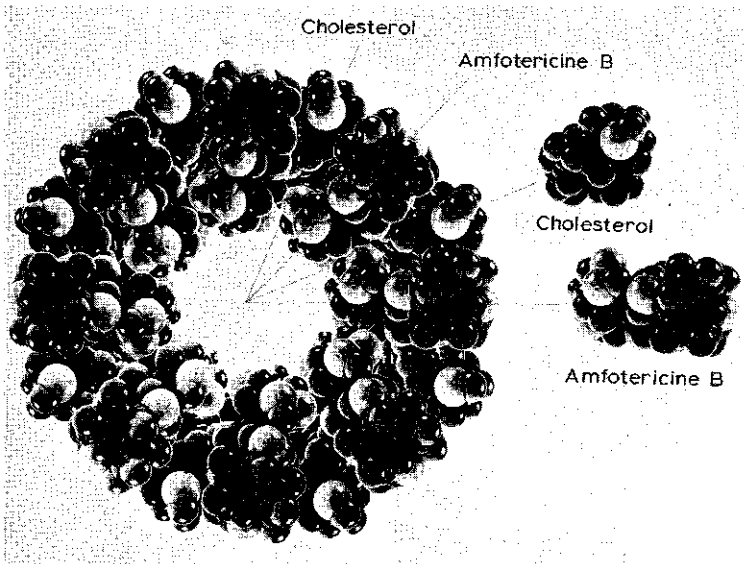


Fig. 14. Bovenaanzicht van een cilindervormige complex gevormd door 8 molekulen amfotericine en 8 molekulen cholesterol.

weeggebracht wordt door het amfotericine B. Onderzoek aan de levende cellen maar ook aan zwarte films en liposomen heeft laten zien dat dit antibioticum in cholesterolbevattende membranen een verhoging van de permeabiliteit veroorzaakt die echter scherp begrensd is door de grootte van het permeërende molecuul. Alle polaire niet-elektrolyten kleiner dan glucose kunnen zeer goed permeëren, maar de grotere molekulen voelen het effect van het antibioticum niet. Voorts kunnen kaliumionen de behandelde membraan gemakkelijk passeren maar het grensvlak blijkt impermeabel voor bijvoorbeeld calciumionen. Deze experimenten hebben geleid tot de conclusie dat polaire poriën worden gevormd met een diameter van ongeveer 0,8 nm. Zulke poriën worden ook geïnduceerd in een liposomaal membraan gemaakt van cholesterol en lecithine. Uit dit gegeven kan geconcludeerd worden, dat de poriën ontstaan door een complexvorming van amfotericine B met het cholesterol, eventueel gestabiliseerd door de lecithinemolekulen. De complexvorming van de antibiotica met sterolen is uitvoerig bestudeerd door gebruik te maken van een karakteristieke verschuiving van het u.v.-spectrum van de polyenen. Hieruit is bijvoorbeeld gebleken dat de stoichiometrie in de complexen steeds ongeveer één molecuul cholesterol is op één molecuul polyeen. Fig. 13 toont de ruimtelijke molecuulmodellen van amfotericine B, cholesterol en distearoyllecithine. De lengte van het dubbelebindingensysteem in het polyeenantibioticum is ongeveer even lang als het cholesterolmolecuul. Door het sterolmolecuul tegen deze hydrofobe zijde van het polyeen te plaatsen vormt zich een segmentvormig complex waarin apolaire en polaire interactie maximaal lijken. Acht van deze segmenten vormen gemakkelijk een cylinder waarin de OH-groepen naar het centrum zijn gericht. Fig. 14 toont het bovenaanzicht van zo'n cylinder die men zich, in een monolaag van lipiden geplaatst, aan de buitenzijde gestabiliseerd kan denken door de parafinestaarten van de fosfolipidemolekulen. In de interpretatie van De Kruyff & Demel (1974) vormen twee van deze cylinders boven elkaar in de dubbellaag van de membraan de polaire porie met een diameter van 0,8 nm, die het door amfotericine B geïnduceerde permeabiliteitsgedrag nauwkeurig verklaart (fig. 15).

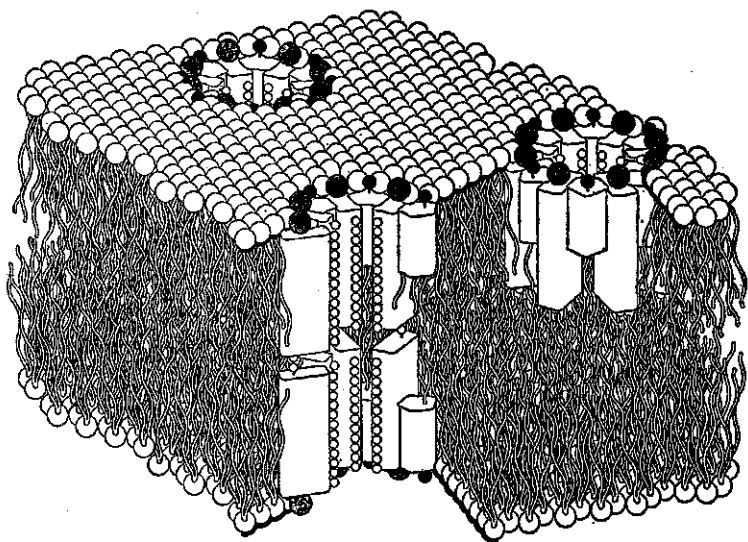


Fig. 15. Schema van een dubbellaagstructuur waarin poriën gevormd door twee boven elkaar geplaatste cylindercomplexen van amfotericine B en cholesterol.

Perspectief

De onderwerpen die in dit hoofdstuk ter sprake kwamen, kunnen als representatief gezien worden voor het praktisch onderzoek aan membraanmodelsystemen in het afgelopen decennium. Hierbij moet wel bedacht worden, dat er niet is gestreefd naar volledigheid en dit verslag kan zonder twijfel worden aangevuld met vele andere interessante onderzoeken waarin lipidemodelsystemen een centrale rol hebben gespeeld. Nog steeds groeit het aantal membraanactieve stoffen die in hun interactie met de membraanlipiden worden onderzocht en in een aantal gevallen leidt dit tot een bevredigende verklaring van het werkingsmechanisme. Het is echter een duidelijke zaak dat de zuivere lipidedubbellaag slechts een deel van de membraanaspecten kan vertegenwoordigen. Indien men ook in de toekomst zinvol met modelsystemen wil blijven werken, is het noodzakelijk dat gekarakteriseerde membraaneiwitten in de lipidematrix worden ingebouwd. Het onderzoek van lipide-eiwit-interacties krijgt recentelijk dan ook steeds meer

aandacht. Gebleken is dat het monolaagsysteem ook in deze problematiek belangrijke informatie kan verschaffen. Met deze techniek zijn bijvoorbeeld uitvoerig de interacties bestudeerd tussen lipiden en eiwitten die uit myelinemembranen geïsoleerd worden. De vorming van de interactie kon nauwkeurig gevolgd worden omdat de penetratie in de monolaag een verhoging van de oppervlaktedruk tot gevolg heeft. Voorts kon uit de beperkte proteolytische invloed die trypsine op het aan de monolaag gebonden eiwit bleek te hebben worden afgeleid welk gedeelte van het eiwit in de hydrofobe sfeer van het lipide was doorgedrongen en daardoor onbereikbaar was geworden voor het proteolytisch enzym (Demel et al., 1974). De modelsystemen zijn dus belangrijk gereedschap voor het onderzoek van de vraag welke lipiden met specifieke segmenten van eiwitmolekulen in interactie kunnen treden. De probleemstelling reikt echter verder.

Immers, in de biomembraan hebben de eiwitten zeer specifieke functies. Met name kan bijvoorbeeld gedacht worden aan de energieafhankelijke transportprocessen. Voor het verkrijgen van inzicht is het niet alleen nodig dat het verantwoordelijk eiwit wordt geïsoleerd en in de lipidematrix wordt ingebouwd, maar ook dat dit op zodanig specifieke wijze gebeurt dat de transportfunctie wordt hersteld. De voorlopige resultaten in dit opzicht zijn echter veelbelovend. Het is reeds langer bekend dat ATPase-complexen uit membranen bij isolatie hun enzymatische activiteit verliezen, maar dat het vermogen om ATP te splitsen kan worden gereconstitueerd door recombinatie met geschikte lipiden. Recente onderzoeken hebben echter laten zien dat bij reconstitutie met lipide-vesicles ook het vermogen tot natrium- en kaliumtransport (Goldin & Tong, 1974) of calciumtransport (Racker et al., 1975) kan worden hersteld. In deze voorlopige experimenten is het eiwit en het lipide nog onvoldoende gekarakteriseerd om enige interpretatie op moleculair niveau mogelijk te maken, maar ze houden wel de belofte in dat modelsystemen bij het membraanonderzoek ook in de toekomst een belangrijke rol zullen spelen.

Lokalisatie en functie van membraaneiwwitten

R. F. A. ZWAAL

Door het beschikbaar komen van meer verfijnde extractiemethoden enerzijds en de toepassing van geavanceerde technieken anderzijds is het onderzoek naar membraaneiwwitten gedurende de laatste 10 jaar in een stroomversnelling geraakt. Voor die tijd waren de ideeën over membraaneiwwitten eigenlijk voornamelijk gebaseerd op het membraanmodel van Danielli & Davson (1935), dat door Robertson (1959) werd overgenomen en uitgebreid in die zin dat alle membranen op een dergelijke wijze zouden zijn opgebouwd. In principe dacht men aan een eiwitlaag welke een interactie aanging met de polaire groepen aan beide zijden van de door Gorter en Grendel in 1925 gepostuleerde lipidendubbellaag (fig. 1).

Om een aantal redenen is dit concept, althans wanneer men het van de 'eiwitkant' benadert, niet erg bevredigend gebleken. Zo dacht men aanvankelijk dat eiwwitten in de β -conformatie (vouwbladstructuur) geschikt zouden zijn om de lipidendubbellaag te bedekken, maar door toepassing van moderne optische methoden (zoals circulair dichroïsme) aan het eind van de zestiger jaren bleek dat deze structuur bij membraaneiwwitten vrijwel niet voorkomt. Een laag van globulaire

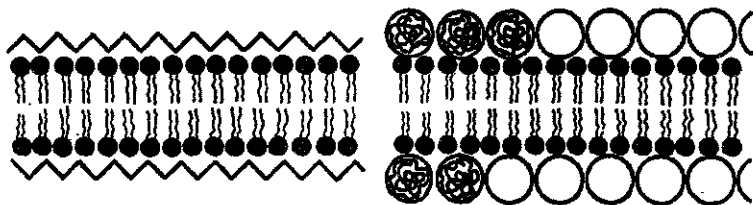


Fig. 1. Twee voorbeelden van een 'unit membrane'-model. De membraaneiwwitten worden, hetzij in de β -conformatie (vouwbladstructuur, links) of als globulaire eiwwitten (rechts), voorgesteld als een laag aan weerszijde van de lipidendubbellaag.

eiwitten aan beide zijden van de lipidendubbellaag zou weliswaar in overeenstemming te brengen zijn met het gevonden relatief hoge α -helix-gehalte (spiraalstructuur), maar desondanks worden alleen polaire interacties van eiwitten met lipiden verondersteld. Daarbij begon ongeveer 10 jaar geleden juist de mening post te vatten dat apolaire wisselwerkingen tussen hydrofobe stukken van membraaneiwitten en de vetzuurstaarten van de fosfolipiden bij de hele functionele structuuropbouw van biologische membranen een belangrijke rol spelen. Hoewel de eerste elektronenmicroscopische opnamen van met osmiumtetroxyde gefixeerde membranen het 'unit-membrane'-concept van Robertson leken te bevestigen, blijkt dit model juist niet in overeenstemming te zijn met elektronenmicroscopische opnamen van membraan-breukvlakken verkregen met behulp van het vries-etsen. Op de breukvlakken zijn partikeltjes zichtbaar die zeer waarschijnlijk membraan-penetrerende eiwitten voorstellen. Met behulp van deze eiwitten zouden de specifieke transporteigenschappen (met name door eiwit gekataliseerd transport) van membranen veel beter zijn te verklaren dan wanneer men aanneemt dat de lipidendubbellaag in het geheel niet door eiwitten wordt onderbroken. Hoewel dat impliciet misschien niet hun bedoeling was, kan men in het membraanmodel van Danielli en Davson overlans in het midden van de lipidendubbellaag zich gemakkelijk een vlak van symmetrie denken, terwijl juist de asymmetrische opbouw van het membraan gedurende de laatste tijd in steeds grotere mate wordt onderkend.

Een en ander heeft ertoe geleid dat men zich het membraan als een vloeibaar mozaïk van eiwitten en lipiden ging voorstellen (Singer & Nicolson, 1972). Voor wat de eiwitten betreft is het voornaamste verschil ten opzichte van het membraanmodel van Robertson dat, naast de zogenaamde extrinsieke eiwitten die zich alleen aan de buitenkant van de lipidendubbellaag bevinden, er ook eiwitten zijn die penetreren in de dubbellaag, en zelfs dwars door het membraan heen kunnen steken (fig. 2). De mate van penetratie van deze zogenaamde intrinsieke membraaneiwitten zal natuurlijk sterk afhangen van de aminozuurvolgorde van de betreffende eiwitten. Die stukken van het eiwitmolekuul die aan de buitenkant zitten, zullen een overwegend hydrofiel karakter moeten hebben om zich aan de waterige omstandigheden aan beiden zijden van het membraan te kunnen aanpassen. Het gedeelte van de eiwitstructuur dat in de lipidendubbellaag doordringt (en deze als het ware onderbreekt) zal vele hydrofobe amino-

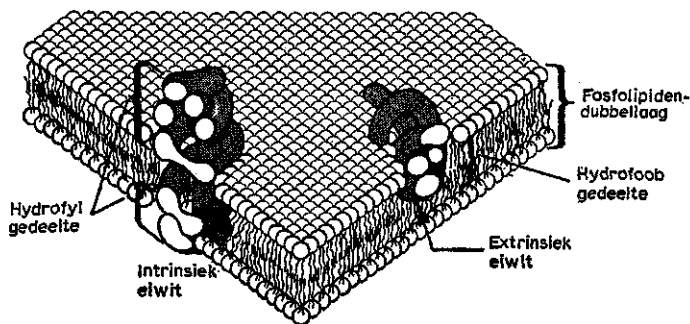


Fig. 2. Membraan als vloeibaar mozaïk van eiwitten en lipiden. Extrinsiek eiwit bevindt zich aan één zijde van het membraan en penetreert niet of nauwelijks in de lipidendubbellaag. Intrinsiek eiwit penetreert wel in het hydrofobe gedeelte van de lipidendubbellaag en kan zelfs dwars door het membraan heensteken.

zuren moeten bevatten teneinde een thermodynamisch stabiele interactie met de apolaire vetzuurstaarten van de lipiden aan te kunnen gaan. Daarmee zijn deze eiwitten eigenlijk in het membraan verankerd terwijl toch sterke laterale bewegingen van zowel lipiden als eiwitten mogelijk zijn, zodat het membraan meer het karakter krijgt van een tweedimensionale vloeistof. Bovendien is dit model niet langer symmetrisch, hetgeen misschien toch niet zo verrassend is omdat de omstandigheden binnenin de cel duidelijk afwijken van die daarbuiten.

Lokalisatie van membraaneiwwitten

Het zal duidelijk zijn dat het toekennen van een specifieke functie aan membraaneiwwitten vereenvoudigd wordt als de lokalisatie van het betreffende eiwit in het membraan bekend is. Om vast te stellen aan welke kant van het membraan de eiwitten zich bevinden, zijn speciale technieken ontworpen die tot nu toe hoofdzakelijk op erythrocytmembranen zijn toegepast. Bij één van deze technieken wordt gebruik gemaakt van membraanimpermeabele groepspecifieke reagentia die in het algemeen van een radioactief merkteken worden voorzien. Veelal gebruikt men hiervoor aromatische sulfonaten, zoals het di-isothiocyanostilbeen-disulfonaat (DIDS) (Cabantchik & Rothstein, 1974), die een voorkeur hebben voor een reactie met aminogroepen in het membraan en die door hun sterk negatief karakter niet of nauwelijks in

staat zijn om de membraanbarrière te passeren (fig. 3).

Wanneer men intacte cellen aan de inwerking van deze reagentia blootstelt, kunnen alleen membraancomponenten die aan de buitenkant zitten radioactief worden gemerkt. Een controle op de eventuele permeabiliteit van deze verbindingen heeft men door vast te stellen of cytoplasmatische eiwitten (zoals hemoglobine van erythrocyten) ook reageren. Als dit gebeurt is het reagens voor lokalisatiedoeleinden in principe ongeschikt (fig. 4). Als men – in tegenstelling tot intacte cel-

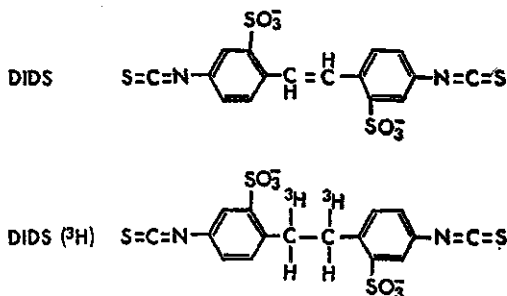


Fig. 3. Chemische structuur van het membraanimpermeabel reagens 4,4'-diisothiocyano-2,2'-stilbeendisulfaat (DIDS) en het hieruit door tritiering verkregen radioactieve derivaat: 4,4'-diisothiocyano 2,2'-dtritiiostilbeendisulfaat (DIDS (^3H)).

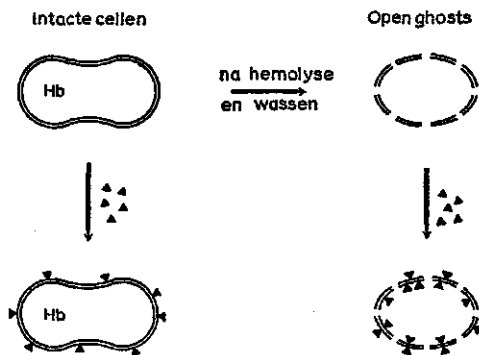


Fig. 4. Reactie van resp. intacte erythrocyten en de door hemolyse verkregen membraanfractie ('open ghosts') met een membraanimpermeabel reagens (\blacktriangle). Met intacte cellen kan in principe alleen de buitenkant van het membraan reageren, terwijl met 'open ghosts' beide zijden van het membraan aan de inwerking van het reagens worden blootgesteld.

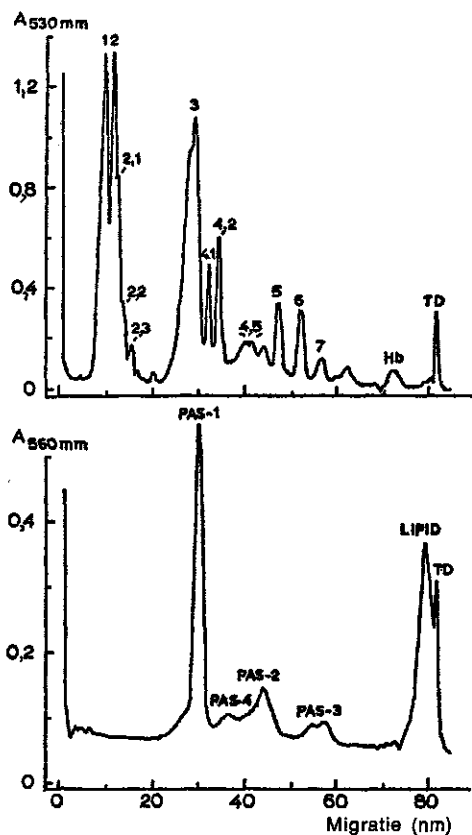


Fig. 5. Elektroforetische scheiding in polyacrylamide-gels van membraan-eiwitten van menselijke erythrocyten. De elektroforese vindt plaats in aanwezigheid van natriumdodecylsulfaat waardoor alle eiwitten in min of meer gelijke mate negatief geladen worden. De eigenlijke scheiding wordt bepaald door de mate van weerstand die de eiwitten in de gelmatrix onder vinden, zodat het hierbij in principe om een scheiding naar schijnbaar moleculairgewicht gaat.

Boven: Bepaling van de optische dichtheid na kleuring van de gel met Coomassie Blue.

Onder: Bepaling van de optische dichtheid na kleuring m.b.v. de Perjoodaat-Schiff-methode (PAS), waarbij de glycoproteïnen (die moeilijk met Coomassie Blue kleuren) zichtbaar gemaakt kunnen worden.

Nummering van de eiwitbanden is naar afnemend schijnbaar moleculairgewicht. TD = laagmoleculaire kleurstof die het front van de elektroforese aangeeft. Hb = hemoglobine.

len – de veelal door verlaging van de osmolariteit verkregen membraanfractie met deze reagentia laat reageren, zullen de membraancomponenten aan beide zijden radioactief gemerkt worden, aangezien de permeabiliteitsbarrière van deze zogenaamde ‘open ghosts’ is opgeheven. Door de eiwitten vervolgens te isoleren en elektroforetisch te scheiden (fig. 5) kan men vast stellen welke eiwitten bij de verschillende behandelingen radioactief zijn geworden, waarbij men dan een drietal mogelijke lokalisaties kan onderscheiden (zie b.v. Steck, 1974). Zo zijn er eiwitten die uitsluitend aan de buitenkant van de erythrocytenmembraan voorkomen (zoals het acetylcholine-esterase) terwijl anderzijds een relatief groot aantal eiwitten zich aan de cytoplasmatische zijde van het membraan bevindt. Van een paar eiwitten is gebleken dat ze aan beide zijden van het membraan met groep-specifieke reagentia kunnen reageren. Door deze eiwitten met proteolytische enzymen te behandelen en vervolgens de daardoor ontstane peptiden chromatografisch en elektroforetisch te scheiden (‘peptide mapping’), heeft men kunnen aantonen dat het gedeelte van het molecuul dat aan de buitenkant van de cel reageert, verschillend is van het stuk dat aan de binnenkant reageert. Dit betekent dat deze eiwitten dwars door de lipidendubbellaag heen steken, met dien verstande dat twee totaal verschillende uiteinden van het eiwitmolecuul aan weerszijden van het membraan uitsteken.

Op dezelfde wijze als met membraanimpermeabele reagentia, kan men ook proteolytische enzymen als ‘gereedschap’ gebruiken. Door

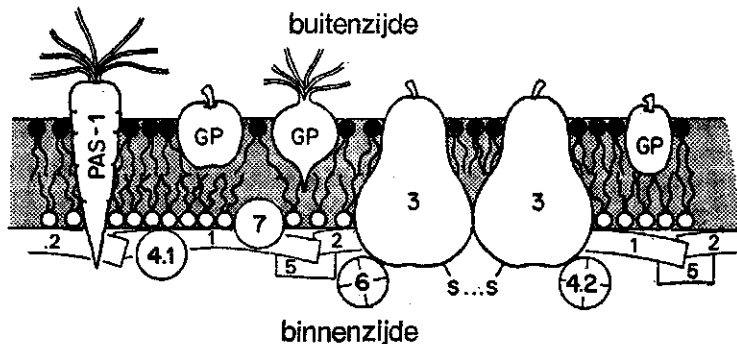


Fig. 6. Schematische topografische dwarsdoorsnede van de menselijke erythrocytenmembraan. Nummering van de eiwitten komt overeen met die van fig. 5 (GP = glycoproteïne).

naast elkaar intacte cellen en 'open ghosts' met proteolytische enzymen te incuberen kan men nagaan welke membraaneiwitten bij deze behandeling worden afgebroken. De verkregen resultaten zijn volledig vergelijkbaar met de asymmetrische eiwitverdeling die gevonden wordt bij gebruikmaking van niet-permeabele reagentia (Zwaal et al., 1973).

In principe wordt dezelfde strategie gevolgd om de verdeling van de fosfolipiden over de dubbellaag te bepalen. In plaats van proteolytische enzymen worden dan lipolytische enzymen (fosfolipases) gebruikt, waarbij men nagaat welke fosfolipiden alleen aan de buitenkant (dus met intacte cellen) hydrolyseerbaar zijn, en welke lipiden men aan beide zijden van het membraan (dus met 'open ghosts') kan afbreken. Op deze wijze is aangetoond dat in erythrocytenmembranen de neutrale, cholinehoudende fosfolipiden voornamelijk aan de buitenkant zitten, terwijl de meer geladen fosfolipiden voor het merendeel aan de binnenkant van het membraan zijn gelokaliseerd (Verkleij et al., 1973; Zwaal et al., 1975). Een essentiële voorwaarde bij enzymatische behandeling van intacte cellen is dat geen hemolyse mag optreden; d.w.z. de permeabiliteitsbarrière (tenminste voor grote molekulen zoals eiwitten) blijft intact, zodat alleen membraancomponenten aan de buitenkant door de enzymen kunnen worden afgebroken.

Met behulp van deze lokalisatietechnieken kan men - zij het provisorisch en verre van volledig - een topografische dwarsdoorsnede van de erythrocytenmembraan construeren (fig. 6). In principe bestaat de basisstructuur uit een asymmetrische dubbellaag van fosfolipiden waarin zich naar alle waarschijnlijkheid vrijwel alle cholesterol bevindt. Deze dubbellaag wordt onderbroken door tenminste twee (maar waarschijnlijk meer) glycoproteïnen, n.l. het glycoforine (PAS-1) en de zogenaamde component-3. Afgezien van een paar membraangebonden enzymen is de buitenkant verder relatief arm aan eiwit, omdat de meeste membraaneiwitten zich aan de cytoplasmatische zijde van het membraan bevinden, gebonden door over het algemeen reversibele polaire interacties. Hoewel het erythrocytenmembraan beschouwd wordt als een eenvoudig voorbeeld van een biologisch membraan, heeft het er alle schijn van dat een dergelijke asymmetrische opbouw vrij algemeen bij andere plasmamembranen voorkomt.

Functie van membraaneiwwitten

De asymmetrische verdeling van de membraaneiwwitten moet een weerspiegeling zijn van hun functie. Sommige enzymen aan de buitenkant van het membraan dienen mogelijk meer de behoefte van het organisme zelf dan van de eigenlijke cel waaraan ze zijn gebonden. Zo kan bijvoorbeeld het acetylcholine-esterase eventueel in plasma circulerend neurotransmitter (acetylcholine) afbreken zonder dat de noodzakelijkheid bestaat dat dit eerst door het membraan heen moet worden getransporteerd. Aan de andere kant staan de enzymen aan de binnenzijde van het membraan waarschijnlijk meer in dienst van de cel zelf, zoals de glycolytische enzymen die door omzetting van naar binnen getransporteerd glucose de hele energievoorziening van de cel en dus de handhaving van de status quo waarborgen.

Voor de niet-katalytische membraaneiwwitten ligt het toekennen van een specifieke functie wat moeilijker. De hoogmoleculaire eiwwitten (spectrines 1 en 2) aan de binnenkant zouden, eventueel in samenwerking met andere eiwwitten, een structurele rol kunnen vervullen, in die zin dat ze een matrix vormen welke de gemakkelijk deformeerbare vloeibare lipidendubbellaag ondersteunt om weerstand te bieden aan extern op de cel uitgeoefende krachten ten gevolge van bijvoorbeeld de bloedsomloop.

Eiwwitten die dwars door het membraan heen steken zijn logische kandidaten voor een transportfunctie. Het is al lang bekend dat blokkering van aminogroepen door reacties tussen groepspecifieke reagentia en intacte cellen een remming van het anionentransport veroorzaakt. In tegenstelling tot andere aromatische sulfonaten, is het aminogroep-blokkerende reagens DIDS alleen in staat om met eiwit-component-3 aan de buitenkant van de cel te reageren. Mogelijk door sterische hindering of door sterke ladingsrepulsie vindt vrijwel geen reactie plaats met het glycoforine, dat aan de buitenkant van de cel een veel hoger gehalte aan oligosacchariden draagt. In de oligosacchariden komt tevens vrijwel al het sterk negatief geladen sialinezuur voor. Door toenemende inbouw van DIDS in component-3, tijdens de reactie van DIDS met intacte erythrocyten, treedt uiteindelijk een volledige blokkering van het anionentransport op. Het heeft er dan ook alle schijn van dat dit eiwit, dat zelf overigens geen bekende enzymatische activiteit bezit, vanwege zijn membraandoorkruisende ligging bijzonder geschikt is om als een soort van anionentunnel te fun-

geren (Cabantchick & Rothstein, 1974).

Dit anionentransport is van essentieel belang voor de cel zelf, omdat het gepaard gaat met de opname en afgifte van kooldioxyde en zuurstof. Het kooldioxyde, ontstaan in de weefselcellen, diffundeert naar het plasma en wordt direct na opname door de erythrocyt door koolzuuranhydrase in bicarbonaat en protonen omgezet. De bicarbonaationen wisselen ten dele uit met chloride-ionen die in het plasma aanwezig zijn, terwijl de protonen worden weggevangen door het kaliumzout van hemoglobine. Bij uitwisseling van koolzuur met zuurstof in de longen wordt de volgorde van dit anionentransport omgekeerd. Dat hiervan een – mede voor de cel essentiële – bufferende werking uitgaat behoeft geen betoog.

De hoge kaliumionen-concentratie die nodig is binnenin de cel (als kaliumzout van hemoglobine maar ook bijvoorbeeld als cofactor van pyruvaatkinasé) wordt door een ander eiwit gekatalyseerd transportproces in stand gehouden: de natrium-kalium geactiveerde adenosine-trifosfatase (Na/K-ATPase). Hiervan zijn, in tegenstelling tot de paar honderdduizend kopieën per cel van het eiwitcomponent-3, slechts een paar honderd stuks per cel aanwezig. Dit transportsysteem, dat uit verscheidene eiwitten is opgebouwd, zal op de één of andere wijze dwars door het membraan heen steken (fig. 7). Hierbij valt op dat het systeem sterk asymmetrisch in het membraan is ingebouwd. Per

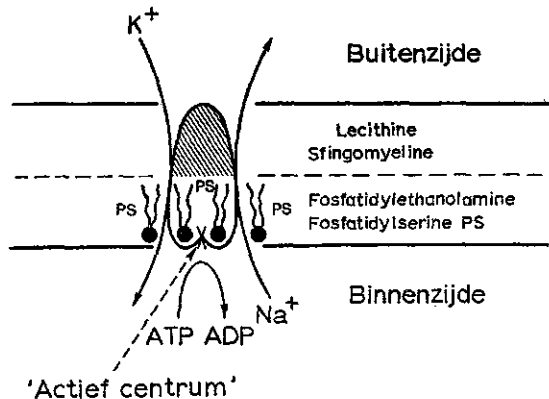


Fig. 7. Schematische voorstelling van de asymmetrische ligging van het transport-ATPase-systeem in de erythrocytenmembraan.

molekuul ATP worden twee kaliumionen naar binnen en drie natriumionen naar buiten gepompt, tegen de concentratiegradiënt in. De natrium- en kaliumionen kunnen de ATPase alleen activeren als natriumionen aan de binnenzijde en kaliumionen aan de buitenzijde van het membraan zitten; d.w.z. aan die zijde van waar ze worden getransporteerd (Whittam, 1967). De asymmetrische opbouw blijkt ook uit het feit dat remming van het transport kan plaatsvinden door interactie van ouabaine aan de buitenkant van het membraan, terwijl juist het actief centrum van het enzym-ATPase aan de binnenkant van het membraan is gelokaliseerd.

De pogingen tot zuivering van de Na/K-ATPase gaan vaak met verregaande inactivering gepaard. Dit lijkt de hypothese te bevestigen dat de tertiaire structuur van een intrinsiek membraaneiwit een verandering kan ondergaan als het uit het membraan in wateroplosbare vorm wordt geïsoleerd, waarbij de functionele eigenschappen door verandering van de 'micro-omgeving' verloren kunnen gaan. Een dergelijke lipideafhankelijkheid van een membraaneiwit treedt bij de Na/K-ATPase sterk naar voren. Door geïsoleerde membranen van erythrocyten met verschillende zuivere lipolytische enzymen te behandelen is gebleken dat negatief geladen fosfolipiden in het algemeen, en fosfatidylserine in het bijzonder, nodig zijn voor het manifesteren van ATPase-activiteit (Roelofsen & Van Deenen, 1973). In het kort komt het hierop neer, dat omzetting van fosfatidylserine uiteindelijk gepaard gaat met volledige inactivering van de ATPase-activiteit, terwijl toevoeging van fosfatidylserine leidt tot een herstel van de enzymatische activiteit. De lokalisatie van zowel het actief centrum van de Na/K-ATPase als het fosfatidylserine aan de binnenkant van het membraan lijkt in dit opzicht meer dan toevallig.

Van de structuur van beide zojuistgenoemde transportsystemen is tot op heden zeer weinig bekend. Anders ligt dit voor het eveneens dwars door het membraan heen stekende glycoforine, dat voor zover men weet geen specifieke transportfunctie vervult. Het glycoforine is geïsoleerd en gezuiverd, en recentelijk is de volledige aminozuurvolgorde van dit molekuul opgehelderd (Tomita & Marchesi, 1975; fig. 8). Het is niet alleen de eerste keer dat de aminozuurvolgorde van een typisch membraaneiwit is bepaald, maar de sequentie laat ook zien dat dit eiwit buitengewoon geschikt is om dwars door de lipiden-dubbellaaag heen te steken.

Aan de N-eindstandige kant van het molekuul bevinden zich vele

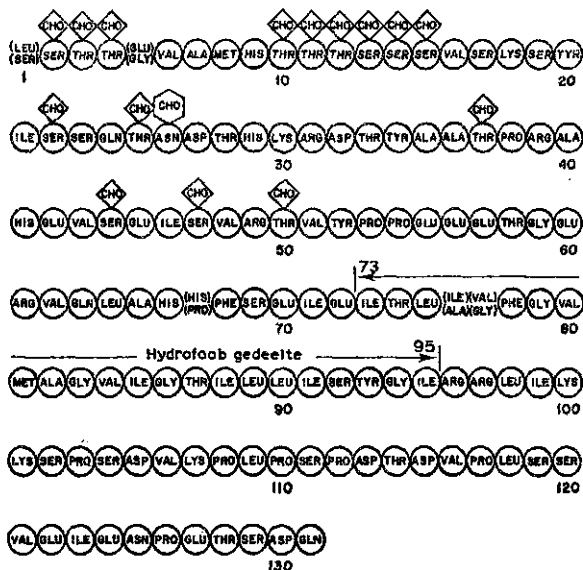


Fig. 8. Primaire structuur van het glycoforine. Met hydrofoob gedeelte wordt een stuk van 23 hoofdzakelijk apolaire aminozuren aangegeven dat zeer waarschijnlijk verantwoordelijk is voor de doorkruising van de lipiden-dubbellaag. CHO = veelal vertakte oligosaccharidenketens. (Naar Tomati & Marchesi, 1975.)

hydroxylaminozuren (serine en treonine) waaraan de eigenlijke anti-gene groepen – de oligosacchariden – middels een glycosidebinding zijn gekoppeld. Dit stuk van het molekuul steekt aan de buitenkant van het membraan uit, omdat het kan worden afgesplitst wanneer intacte erythrocyten met proteolytische enzymen worden behandeld. Het opvallendste aspect van het C-eindstandige stuk van het molekuul dat aan de cytoplasmatische zijde van het membraan zit, is het relatief hoge gehalte aan proline, en waar proline in de aminozuursequentie voorkomt treedt een storing op in de regelmatige tertiaire structuur (knikvorming). Het is vooralsnog onbekend wat deze opeenhoping van proline aan de binnenkant van het membraan te betekenen heeft.

De structuur van het stuk in het glycoforine van isoleucine (nr. 73) tot en met isoleucine (nr. 95) is zeer interessant. Vrijwel zonder uitzondering is dit stuk opgebouwd uit hydrofobe aminozuren, die zich gemakkelijk lenen voor een apolaire interactie met de vetzuren van

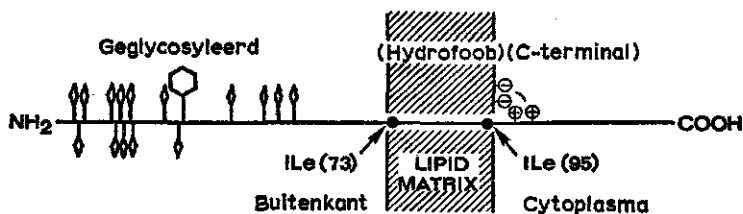


Fig. 9. Schematische voorstelling van de transmembraan-oriëntatie van glycoforine. Het geglycosyleerde gedeelte van het molekuul steekt aan de buitenkant van de cel uit en bevat vrijwel alle sialinezuur van de cel.

de fosfolipiden. Wanneer dit stuk van 23 aminozuren bijvoorbeeld gespiraliseerd zou zijn in een α -helix is het ongeveer 3,5 nm lang en dat zou juist voldoende zijn om het hydrofoob gedeelte van de lipiden-dubbellaag te overspannen. Daarmee is het eiwit a.h.w. stevig in het membraan verankerd. Direct na het apolaire stuk in de richting van de C-eindstandige kant bevindt zich een accumulatie van 4 positieve ladingen (2 arginines en 2 lysines), die mogelijkwijs een elektrostatische interactie aangaan met negatief geladen fosfolipiden, zoals het fosfatidylserine dat eveneens aan de binnenzijde van het membraan zit (fig. 9).

De oligosacchariden die aan het naar buiten stekend gedeelte van het glycoforine zijn gekoppeld, zijn meestal vertakt en bevatten gemiddeld 4 tot 8 verschillende suikers, waaronder fucose, mannose, galactose, galactosamine, glucosamine en sialinezuur. De volgorde en samenstelling van de suikers is waarschijnlijk bepalend voor de antigene eigenschappen van het celoppervlak, zoals de MN-bloedgroepen-activiteit. Het sialinezuur, dat altijd eindstandig aan de oligosacchariden is gebonden, draagt een vrij sterk negatieve carboxylgroep (pK 2,6) en zorgt voor een negatieve oppervlaktelading van de cel, die agglutinatie zonder meer moet verhinderen. De aanwezigheid van sialinezuur is tevens voorwaarde voor de receptoreigenschappen van glycoforine met betrekking tot de binding van influenza-virus of het viraal hemagglutinine. Het influenza-virus dringt weliswaar niet in de erythrocyt zelf binnen, maar benut deze waarschijnlijk als 'transport-middel' in de bloedbaan. Wanneer intacte erythrocyten met neuraminidase worden geïncubeerd, worden specifiek vrijwel alle sialinezuurgroepen van de glycoforine gebonden oligosacchariden afgesplitst, waarbij tegelijkertijd de receptorfunctie voor influenza-virus wordt

verstoord. De cellen zijn dan a.h.w tegen het virus gestabiliseerd.

Membraanpenetrerende glycoproteïnen zijn waarschijnlijk een wijd verbreid verschijnsel bij zowel cellen met als zonder kern. Zo zijn minstens drie plasmamembraan-penetrerende glycoproteïnen aangetroffen in het eveneens kernloze bloedplaatje. Mogelijk ontbreekt één van deze glycoproteïnen in het plasmamembraan van bloedplaatjes van patiënten met de ziekte van Glanzmann, waarvan het voornaamste kenmerk bestaat uit een remming van de trombocytengregatie, hetgeen zich uit in een vertraagde bloedstolling (Weiss, 1975). Recentelijk is grote belangstelling ontstaan voor een glycoproteïne (MW 250 000) dat dwars door het plasmamembraan van kernhoudende fibroblasten heen steekt. Dit eiwit blijkt afwezig te zijn bij een aantal viraal-getransformeerde fibroblasten, hetgeen suggereert dat dit eiwit een rol zou kunnen spelen bij de controle van de celvermeerdering (Bretscher & Raff, 1975).

Membraanpenetrerende eiwitten en het lipidendubbellaag-concept

Eiwitten die dwars door het membraan heen steken zullen de lipiden-dubbellaag onderbreken en dit heeft consequenties ten aanzien van het uitgangspunt van Gorter en Grendel. Op de experimentele aanpak waarop zij het probleem van de 'lipidenkant' hebben benaderd, kunnen enige aanmerkingen worden gemaakt. In principe kunnen drie experimentele onnauwkeurigheden worden onderkend:

1. de lipiden werden verkregen door acetonextractie van erythrocyten, waarbij slechts een gedeelte van de lipiden kan worden geëxtraheerd,
2. de grootte van het erythrocytenoppervlak is door Gorter en Grendel te laag geschat en
3. de bepaling van het lipidenoppervlak m.b.v. de Langmuir-trog werd uitgevoerd bij de eerst meetbare (maar vrijwel zeker veel te lage) oppervlaktedruk van enkele tientallen $\text{mN} \cdot \text{m}^{-1}$ ($1 \text{ dyne} = 10^{-5} \text{ N}$). Het zal duidelijk zijn dat – hoewel de eerste twee fouten elkaar grotendeels opheffen – meting van het lipidenoppervlak bij hogere druk leidt tot een verhouding van monolaagoppervlak tot celoppervlak welke kleiner is dan 2, of wel tot de conclusie dat lang niet voldoende lipide aanwezig is om de erythrocyt geheel van een lipidendubbellaag te voorzien.

Tot voor kort was er weinig experimentele basis om te besluiten welke oppervlaktedruk van een monolaag (of welk oppervlak per mo-

lekuul) het beste de situatie van de lipiden in intacte erythrocytenmembranen nabootst. Recentelijk is echter gebleken dat door de werking van verscheidene zuivere lipolytische enzymen (fosfolipases) op intacte erythrocyten te vergelijken met die op monomoleculaire lagen van fosfolipiden, de zijdelingse oppervlaktedruk van de lipiden in het natieve membraan kan worden afgeleid. Deze schatting is gebaseerd op de waarneming dat een onderscheid kan worden gemaakt tussen een groep fosfolipases die wel, en een groep die niet op intacte menselijke erythrocyten inwerkt (Zwaal et al., 1975). Hierbij is gebleken dat die enzymen welke niet op intacte cellen werken ook niet in staat zijn een monolaag van fosfolipiden, gespreid boven een aanvangsdruk van $310 \text{ mN} \cdot \text{m}^{-1}$, af te breken (fig. 10). Daartegenover staat dat die fosfolipases die wel hydrolyse van fosfolipiden in intacte erythrocyten teweeg kunnen brengen, monolagen van deze lipiden met een zijdelingse druk van tenminste $340 \text{ mN} \cdot \text{m}^{-1}$ nog kunnen afbreken (Demel et al., 1975). Hoewel andere verklaringen mogelijk zijn, lijkt het aannemelijk dat de mate van zijdelingse compressie van de lipiden in intacte erythrocytenmembranen overeenkomt met die van een monolaag gespreid bij een druk van $320\text{--}330 \text{ mN} \cdot \text{m}^{-1}$. Bar et al. (1966) herhaalden de experimenten van Gorter en Grendel op een meer correcte wijze waarbij tevens de zijdelingse oppervlaktedruk van de

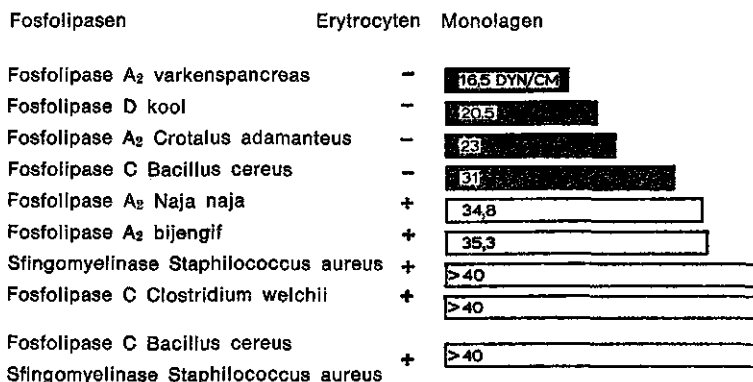


Fig. 10. De werking van verscheidene zuivere fosfolipases op erythrocyten en op monolagen van cholinehoudende fosfolipiden (lecithine + sfingomyeline). De getalwaarde geeft de maximale monolaagdruk aan tot waar het enzym nog werkzaam is ($1 \text{ dyn/cm} = 10 \text{ mN} \cdot \text{m}^{-1}$).

monolaag werd gevarieerd. Hun experimenten laten zien dat de verhouding monolaagoppervlak tot celoppervlak bij $320\text{--}330 \text{ mN} \cdot \text{m}^{-1}$ ongeveer 1,5 is, hetgeen zou impliceren dat er juist voldoende lipide aanwezig is om 75% van de menselijke erythrocytenmembraan van een lipidendubbellaag te voorzien (fig. 11).

De vraagstelling of de resterende 25% kan worden ingenomen door het dwarsoppervlak van membraanpenetrender eiwitten lijkt alleszins gerechtvaardigd. Deze eiwitten zijn geïdentificeerd met de membraanpartikel-tjes, zichtbaar op de membraanbreukvlakken zoals deze worden bestudeerd m.b.v. de elektronenmicroscopische vries-ets-techniek. Een grove schatting leert dat er ongeveer 6×10^5 van deze partikel-tjes per cel voorkomen, met een gemiddeld oppervlak van circa 50 nm^2 . Dit betekent dat het totale partikeloppervlak per cel ongeveer $30 \mu\text{m}^2$ bedraagt, hetgeen bij een totale celoppervlakte van $130\text{--}140 \mu\text{m}^2$ ongeveer 20–25% uitmaakt. Hoewel deze schatting natuurlijk vrij onnauwkeurig is, is zij desalniettemin in goede overeenstemming

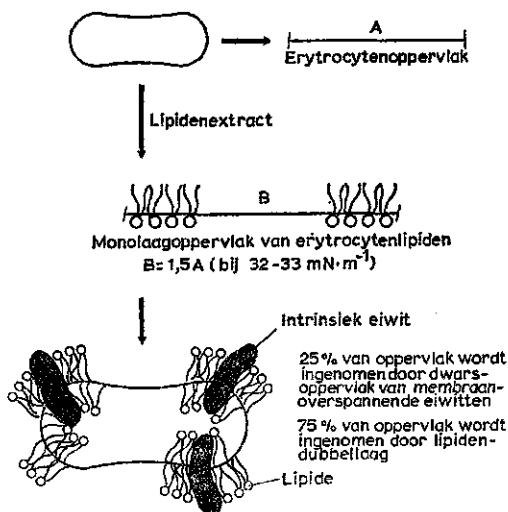


Fig. 11. Experiment van Gorter en Grendel, uitgevoerd bij een oppervlaktedruk van de monolaag van $320\text{--}330 \text{ mN} \cdot \text{m}^{-1}$. Daar de grootte van het monolaagoppervlak ca. 1,5 maal het erythrocytenoppervlak bedraagt, kan 'slechts' 75% van het membraan door een lipidendubbellaag worden ingenomen. Het resterende gedeelte wordt waarschijnlijk bezet door membraanpenetrender eiwitten, zoals glycoforine en eiwitcomponent-3.

met de schatting van de grootte van het oppervlak van de lipiden-dubbellaag. De bedoeling van voorgaand rekensommetje is niets anders dan een speculatie over hoe het experiment door Gorter en Grendel zou kunnen zijn gemodificeerd (door keuze van een hogere oppervlaktedruk van hun monolaag), als zij van het bestaan van membraanpenetrerende eiwitten hadden geweten.

Besluit

Samenvattend kan gesteld worden dat het erythrocytenmembraan in principe kan worden opgevat als een dubbellaag van fosfolipiden en cholesterol, onderbroken door membraanpenetrerende eiwitten. Het is echter twijfelachtig of een dergelijk relatief eenvoudig membraan-concept algemene geldigheid bezit, gezien de vaak veel complexere opbouw van de meeste andere celmembranen.

Functionele morfologie van biomembranen¹

W. TH. DAEMS

Morfologisch onderzoek heeft een belangrijke invloed gehad op de opvattingen over de structuur en functie van biomembranen. Hierbij speelde voornamelijk de elektronenmicroscop een rol: immers alleen dit instrument heeft een voldoende hoog oplossend vermogen om structuurdetails van biomembranen te ontrafelen (Daems, 1974a). Achteraf gezien is het wellicht een ongelukkige omstandigheid geweest dat in de begintijd van het elektronenmicroscopisch onderzoek van biologisch materiaal osmium tetroxide het meest gebruikte fixatief was (Malhotra & van Harreveld, 1968). Als gevolg van de osmiumfixatie tonen immers *alle* biomembranen een drielagige structuur met een vrijwel identieke verschijningsvorm. Ondanks het feit dat met andere fixatieven, zoals kaliumpermanganaat, enigszins andere beelden werden verkregen, leidden de met osmiumtetroxide verkregen gegevens tot het introduceren van de term 'unit membrane' (Robertson, 1959).

Hoewel misschien niet zo bedoeld, heeft het invoeren van deze term in zeker opzicht geleid tot de opvatting dat alle biomembranen identiek waren. Als gevolg daarvan ontstond een celbeeld (zie Robertson, 1962) dat in veel opzichten een karikatuur vormt van hetgeen thans bekend is over het organisatiepatroon van de cel (fig. 1). Alle membranen werden verondersteld met elkaar samen te hangen: van het bestaan van afzonderlijke celorganellen was nauwelijks sprake. De plasmamembraan en de membranen van mitochondria, endoplasmatisch reticulum, Golgi-apparaat en kern-envelop waren continu en omsloten een doorlopende ruimte. Dit celbeeld heeft lang standgehouden; zelfs in een zeer recent en uiterst lezenswaardig overzicht over

1. Een deel van de afbeeldingen is ontleend aan het werk van P. Brederoo (fig. 10, 15, 16, 19), J. J. Emeis (fig. 11-14) en L. A. Ginsel (fig. 21). De afbeeldingen zijn te vinden tussen p. 84 en 85.

biomembranen (Weismann & Claiborne, 1975) wordt nog een celschema getoond waarin het endoplasmatisch reticulum in directe verbinding staat met de plasmamembraan.

Een principieel ander celbeeld werd door De Duve (1969) geformuleerd, waarbij benadrukt werd dat in de dierlijke cel, naast andere, een tweetal hoofdcompartimenten moeten worden onderscheiden: de endoplasmatische ruimte en de exoplasmatische ruimte (zie Daems, 1974b) (fig. 2). Tot de endoplasmatische ruimte behoren o.a. het endoplasmatisch reticulum en de kern-envelop; tot de exoplasmatische o.a. fagosomen, secreetkorrels en, in zekere zin, de extracellulaire ruimte. De membranen die de organellen van beide hoofdcompartimenten begrenzen zijn morfologisch en chemisch te onderscheiden: die van de endoplasmatische ruimte hebben een dikte van ca. 6 nm en bevatten veel eiwit, die van de exoplasmatische ruimte zijn dikker (10 nm) (fig. 3), hebben een hogere lipide/eiwit-verhouding en bevatten meer cholesterol (Trump, 1975). De verschillende onderdelen van een hoofdcompartiment kunnen tijdelijke verbindingen met elkaar aangaan: lysosomen met fagosomen, sekreetkorrels met het celoppervlak, blaasjes van het ruw endoplasmatisch reticulum met elementen in het Golgi-gebied. Buiten het eigen compartiment zijn geen verbindingen met andere celorganellen mogelijk. De beide ruimten staan met elkaar in verbinding middels het Golgi-gebied (fig. 4), een sluis die slechts transport naar één richting toestaat: van de endoplasmatische ruimte naar de exoplasmatische ruimte. Dit transport vindt plaats met behoud van het afgesloten karakter van ieder der compartimenten. Overigens moet hierbij worden aangetekend dat deze alom aanvaarde opvatting m.b.t. het intracellulaire transport zeer recent door Rothman (1975) scherp werd aangevallen.

De plasmamembraan in engere zin

Het moderne celbeeld is in zeker opzicht eenvoudiger geworden: de verschillende celorganellen kunnen een plaats toegewezen krijgen in ieder der beide hoofdcompartimenten van de cel. Anderzijds is het celbeeld complexer geworden: de 'unit membrane' bestaat niet: biomembranen verschillen niet alleen van celtype tot celtype, maar ook van organel tot organel. Zelfs kan een membraan van plaats tot plaats sterk verschillen. Met name geldt dit wanneer de membranen niet gezien worden als chemisch analyseerbare en definieerbare structuren

maar als functionele eenheden van de cel, als celorganellen.

Beperken wij ons tot de plasmamembraan. Het inzicht breekt door dat het niet juist is de plasmamembraan te zien als een eenvoudige begrenzing tussen de cel en haar omgeving, een opvatting die haar grond goeddeels vindt in het feit dat vele onderzoeken zijn verricht aan erythrocyten. De keuze van dit onderzoekobject is begrijpelijk: voor biochemisch onderzoek moet men de beschikking hebben over een relatief grote hoeveelheid materiaal in een zo zuiver mogelijke vorm. Vooral omdat het laatste moeilijk was te verwezenlijken in de kernhoudende cellen, die immers naast de plasmamembranen een grote verscheidenheid van cytoplasmacompartimenten begrenzende membranen bevatten (fig. 4), viel de keuze op erythrocyten waar contaminatie met membranen van andere cellen of celorganellen zonder moeite te vermijden was (fig. 5, 6).

De keuze van de erythrocyt als bron voor het onderzoek van plasmamembranen was echter van celbiologisch standpunt uit gezien enigszins betreurenswaardig. Immers, de erythrocyt mist een aantal zeer wezenlijke kenmerken van andere, in veel opzichten meer actieve, celtypen: vorming van een weefselverband met andere cellen, endocytose, exocytose, vorming van celcontacten, etc. Met andere woorden, van de veelheid van functies die talrijke andere celtypen tonen bezit de erythrocyt slechts een gering deel en het gevaar is niet denkbeeldig dat op basis van het onderzoek aan erythrocyten opnieuw een te vereenvoudigd beeld van de werkelijkheid wordt opgebouwd.

Dit kan bijvoorbeeld geïllustreerd worden aan de beweeglijkheid van de membraaneiwitten van de erythrocyt in vergelijking tot die van andere celtypen. Het in erythrocyten aan de cytoplasmatische zijde van de membraan gelegen eiwit spectrine immobiliseert direct of indirect de door de membraan penetrerende eiwitten. In tegenstelling tot kernhoudende cellen waar de membraaneiwitten in het vlak van de membraan beweeglijk zijn (Singer & Nicolson, 1972) zijn de membraaneiwitten bij de intacte erythrocyt aan hun plaats gebonden (Bretscher & Raff, 1975). Overigens zijn in geïsoleerde erythrocyten membranen waaruit het spectrine verwijderd is deze eiwitten wél beweeglijk.

De plasmamembraan in ruimere zin

Uitgangspunt van beschouwingen over de structuur en de functie van biomembranen dient het gegeven te zijn dat in de meeste celtypen de

plasmamembraan vele functies vervult, van passief transport tot endocytose of exocytose. Voor het vervullen van deze verscheidenheid van functies zijn mede structuren verantwoordelijk welke gelegen zijn buiten de plasmamembraan in engere zin.

Van deze opvatting getuigt de terminologie van Weiss (1969) die spreekt over de 'cell periphery', van Edelman (1974) die wijst op het 'cell surface membrane complex', en van Revell & Ito (1967) die over de 'greater membrane' spreken. In alle gevallen bedoelen de auteurs dat er sprake is van een samenspel tussen de plasmamembraan als 'biomembraan in engere zin' en de aan de buitenzijde daarvan gelegen laag koolhydratenbevattende macromolekulen (zoals glycoproteïnen, glycolipiden en/of mucopolysacchariden) die, min of meer vast verankerd aan de membraan, de functionele betekenis van de plasmamembraan mede bepalen. Maar zelfs wanneer de aanwezigheid van zo'n 'cell coat' (Rambourg & Leblond, 1967) of glycocalyx (Bennett, 1963) in de beschouwingen wordt betrokken, wordt nog aan het totale beeld van de plasmamembraan tekort gedaan. Duidelijk blijkt immers uit functionele, morfologische en bio- of cytochemische analyses dat de plasmamembraan niet zelf contractiel is, doch zijn beweeglijkheid ontleent aan een contractiel apparaat, dat aan de cytoplasma-zijde van de 'biomembraan in engere zin' gelegen is. Vast staat dat aan de cytoplasmatische zijde de plasmamembraan samenhangt met een systeem van contractiele eiwitten die de beweeglijkheid van het celoppervlak bepalen in processen van celbeweging, celdeling, endocytose, etc.

Elders in dit boek is aan de morfologie van de plasmamembraan als lipidendubbellaag met eiwitten al in ruime mate aandacht geschonken. Hier zal, op grond van voorgaande overwegingen, aandacht worden geschonken aan de plasmamembraan in haar samenhang enerzijds met de glycocalyx, anderzijds met de contractiele elementen in het cytoplasma.

Het meest volledig komen deze aspecten van de 'plasmamembraan in ruimere zin' tot uiting in het fenomeen van de endocytose: het opnemen van extracellulair materiaal door een cel, een eerste stap in een reeks van gebeurtenissen die tenslotte zullen leiden tot de afbraak van het opgenomen materiaal in het lysosomale apparaat (Daems, 1974b).

We stellen ons daarbij de volgende vragen:

- in welke fasen verloopt dat endocytoseproces en in welke mate zijn de verschillende onderdelen van de membraan in ruimere zin daarbij

betrokken,

– op welke wijze zijn de glycocalyx en het contractiele apparaat van de cel morfologisch en cytochemisch te karakteriseren,

– hoe hangen de glycocalyx en het contractiele apparaat met de plasmamembraan samen.

De verschillende fasen waarin het endocytoseproces te onderscheiden valt zijn:

1. Hechting van het op te nemen materiaal aan de cel, hierbij is de *glycocalyx* betrokken (fig. 11).

2. Veranderingen in de *plasmamembraan* die hierdoor veroorzaakt zijn en die een belangrijke inducerende rol spelen bij 3.

3. Invaginatie van de plasmamembraan (met *glycocalyx*) en afsnoering van het geïnvagineerde deel, een proces waarin het *contractiele* apparaat van de cel zowel de effector is, als richting geeft.

Het endocytoseproces, het hierop volgende transport van fagosomen binnen de cel, de fusie van de fagosomen met lysosomen en de afbraak van het opgenomen materiaal werden uitvoerig besproken in Daems (1974b). In het volgende zullen de *glycocalyx* en het contractiele apparaat van de cel beschreven worden.

De glycocalyx

Hoewel het vast staat dat alle cellen van het dierlijk organisme over een *glycocalyx* beschikken, is de morfologie daarvan sterk afhankelijk van het betrokken celtype (Ito, 1974).

Het duidelijkst toont zich de *glycocalyx* op het oppervlak van amoeben (Stockem, 1976) en op de microvilli van de epitheelcellen van de dunne darm, waar zij verschijnt als een filamenteuze zone gelegen op de plasmamembraan (fig. 7, 8).

Opmerkelijk is het, dat in andere cellen de *glycocalyx* niet alleen veel minder uitgesproken is, maar zelfs ogenschijnlijk afwezig kan zijn. Onder meer geldt dit voor de cellen die een belangrijke rol spelen bij de endocytose van lichaamsvreemd materiaal. Hoewel men zou verwachten dat deze cellen over een uitgesproken *glycocalyx* zouden beschikken, is dit, wanneer althans geen speciale preparatieve maatregelen getroffen zijn, bijvoorbeeld niet het geval bij macrofagen (fig. 4). Deze cellen, die bij hogere dieren door het gehele organisme voorkomen, zijn belangrijke elementen in de verwerking van voor het organisme schadelijk materiaal.

In het morfologisch onderzoek toont de macrofaag zijn glycocalyx slechts wanneer in preparatieve zin bepaalde voorzorgsmaatregelen zijn getroffen (Brederoo & Daems, 1972; Wisse, 1974; Erneis & Wisse, 1975). Onder die omstandigheden is een beeld zichtbaar dat enigszins te vergelijken valt met dat van de darmepitheelcellen: een op de plasmamembraan gelegen, ca. 65 nm dikke laag (fig. 10 en 13), waarin zich fijne draden bevinden.

Het lag voor de hand dat getracht zou worden om de chemische aard van deze glycocalyx vast te stellen. Hoewel een dergelijk onderzoek in principe ook biochemisch is aan te pakken (Cook & Stoddart, 1973) zijn de moeilijkheden die zich daarbij voordoen aanzienlijk. Veelal is karakterisering van de glycocalyx derhalve benaderd vanuit de cytochemische hoek (Rambourg, 1971), onder meer met behulp van de elektronenmicroscop. Om van dit laatste twee voorbeelden te geven: zowel Alcian Blue als Ruthenium rood, uit de lichtmicroscopische cytochemie bekend als kleurstoffen voor zure mucopolysacchariden en glycoproteïnen, zijn bruikbaar als kleurmiddel voor het aantonen van glycocalyxmateriaal. Uit elektronenmicroscopisch onderzoek blijkt inderdaad dat in beide gevallen hechting aan het celoppervlak optreedt (fig. 9 en 12). Voor het beantwoorden van de vraag naar de chemische bouw van de glycocalyx is echter het combineren van de resultaten van verscheidene cytochemische kleuringen noodzakelijk. Hierbij wordt veel gebruik gemaakt van 'kleuringen' met zilverproteïnaat en zilvermethenamine (fig. 8), en met kolloïdaal ijzer (Rambourg, 1971). Een andere, zeer selectieve 'kleuring' van de glycocalyx is die waarbij gebruik wordt gemaakt van de affiniteit van bepaalde lectinen (zoals concanavaleïne A) voor suikergroepen in de glycocalyx. Voor het cytochemisch aantonen van suikers-bevattende macromolekulen op het oppervlak van de cel wordt aan de gebonden concanavaleïne A-molekulen het enzym peroxidase gehecht (fig. 14). Deze zeer gevoelige methode, geïntroduceerd door Bernhard & Avrameas (1971), vindt thans zeer uitgebreide toepassing.

Een belangrijke waarneming was dat bij macrofagen de ca. 65 nm dikke glycocalyx met een deel van deze methoden niet gekleurd werd, maar slechts een ca. 15 nm dikke laag tegen de plasmamembraan (fig. 9, 12 en 14). Deze waarneming leidde tot de conclusie dat de glycocalyx van macrofagen uit twee lagen moet bestaan, een 50 nm dikke buitenlaag, die gemakkelijk van het celoppervlak te verwijderen is, en een 15 nm dikke binnenlaag, die vast aan het celoppervlak ge-

hecht is en overeenkomt met de glycocalyx op het oppervlak van andere cellen (Emeis, 1976). Dat de 65 nm dikke glycocalyx geen kunstprodukt is kan worden afgeleid uit het vóórkomen van deze zone in instulpingen van het celoppervlak en om recent door de cel opgenomen materiaal (Wisse, 1974). Dat deze glycocalyx niet altijd op het hele oppervlak van de cel voorkomt, volgt echter uit twee andere waarnemingen. Ten eerste is in het geval van de z.g. 'bristle-coated vesicles' – een o.a. in macrofagen veel voorkomend type endocytose-mechanisme – wél een 'dunne' glycocalyx aantoonbaar (fig. 10, inzet), doch is de 'dikke' glycocalyx in deze, slechts 100 nm in diameter metende blaasjes afwezig. In de tweede plaats kunnen cytoplasmadelen die betrokken zijn bij de fagocytose van grotere deeltjes de dikke cell coat missen (fig. 15), terwijl daar wél de dunne glycocalyx aanwezig is (Brederoo & Daems, 1972; Emeis, 1976). Deze waarnemingen tonen dat de glycocalyx van macrofagen ongelijkmatig over het gehele celoppervlak kan voorkomen, en dat de aanwezigheid kan samenhangen met de functionele toestand van het celoppervlak. Ook op het oppervlak van andere cellen is een non-random verdeling van glycocalyx-achtig materiaal aangetoond.

Een andere, zeer verfijnde methode om de heterogeniteit van aan het oppervlak van de cel gelegen groepen aan te tonen, is die waarbij gebruik wordt gemaakt van specifieke anti-lichamen waaraan een enzym, een radio-actieve merker (I^{125} bijvoorbeeld), of een macromolekuul als ferritine gekoppeld is (Unanue, 1974). Veel inzicht is op deze wijze verkregen over de, door Singer en medewerkers reeds voorspelde, beweeglijkheid van aan het celoppervlak gelegen eiwitmolekulen (Bretscher & Raff, 1975).

Tenslotte kan vastgesteld worden dat – hoezeer verschillend ook in chemische samenstelling en verschijningsvorm – alle cellen een glycocalyx bezitten. In dit verband zij vermeld dat er een duidelijke relatie bestaat tussen een glycocalyx zoals hiervoor beschreven en op de plasmamembraan voorkomende receptormolekulen. Veel onderzoek is verricht over de aanwezigheid van specifieke receptormolekulen die bindingen aangaan met eiwitten, virussen, etc. Vast staat dat bij de functie van deze receptoren koolhydraat-bevattende macromolekulen betrokken zijn (Ashwell & Morsell, 1974). Zoals met behulp van voor fluorescentiemicroscopie of elektronenmicroscopie gemerkte anti-lichamen is aangetoond, geldt dit ondermeer voor immunologische karakteristieken van cellen (Kraemer, 1971), waaronder de bloed-

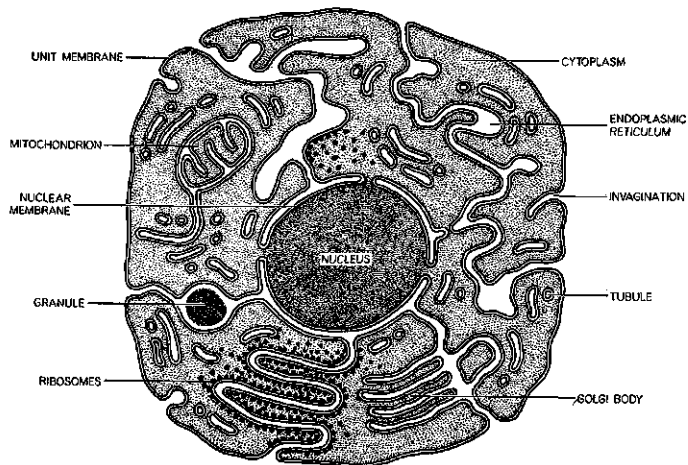


Fig. 1. De schematische voorstelling van een cel volgens Robertson (1962).

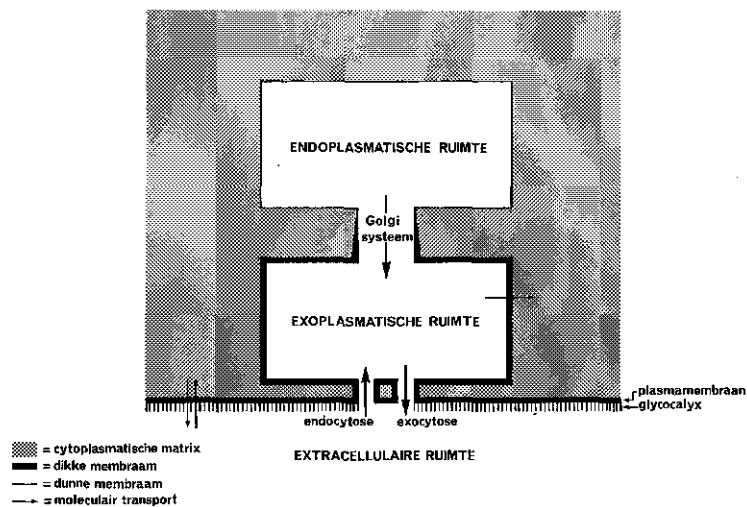


Fig. 2. Schematische voorstelling van de verdeling van de cel in een endoplasmatische ruimte en een exoplasmatische ruimte (volgens De Duve, 1969). De membranen van de endoplasmatische ruimte hebben een relatief geringe dikte (zie ook fig. 3), in tegenstelling tot de dikke membranen van de exoplasmatische ruimte. (Naar Jacques, 1969.)



Fig. 3. Deel van een, tot de exoplasmatische ruimte behorend lysosoom (Ly) met de karakteristieke 'dikke' membraan (→), en de daarmee vergeleken 'dunnere' membranen (▶) van het mitochondrion (mit). Vergroting 195 000 ×.

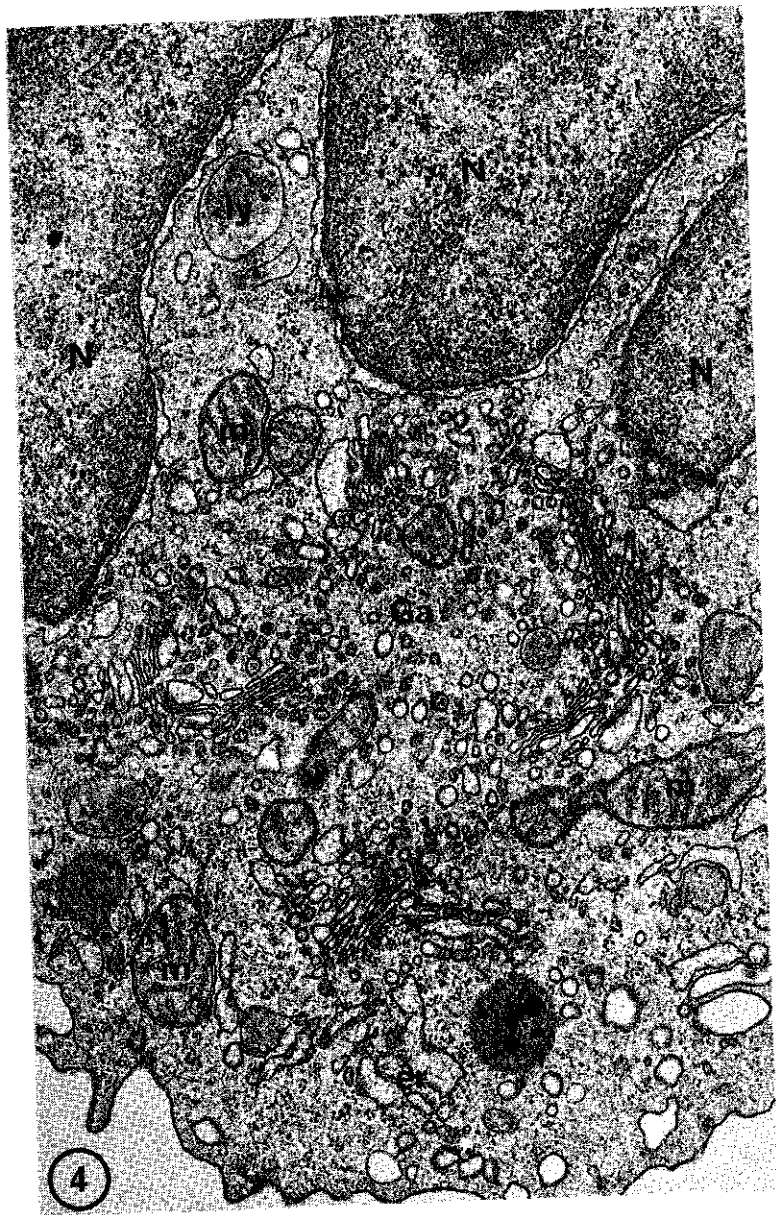
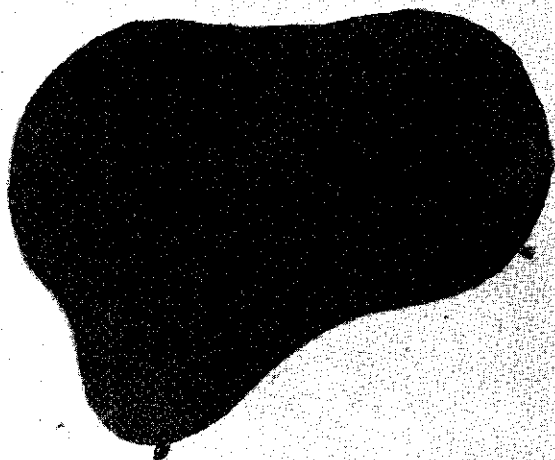
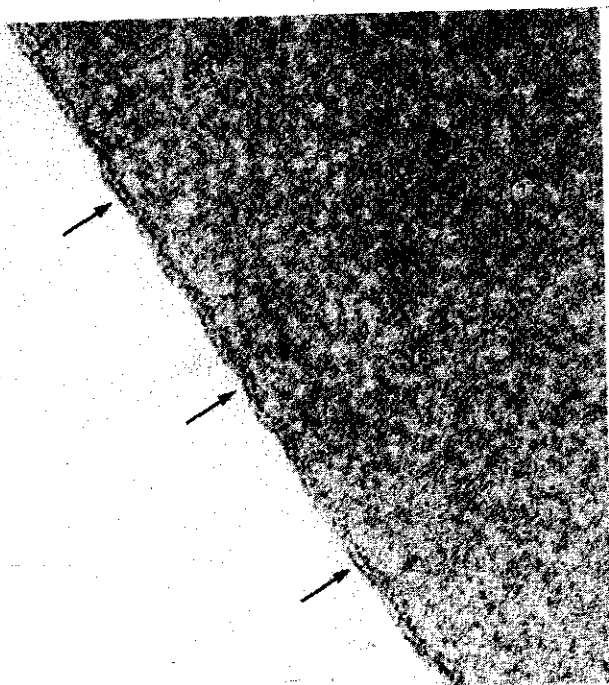


Fig. 4. Deel van een macrofaag uit de buikholte van een cavia: de cel bevat naast de kernlobben (N) de gebruikelijke celorganellen: mitochondria (m), elementen van het endoplasmatisch reticulum (er), het Golgi-gebied (Ga) en lysosomen (ly). Vergroting 30 000 ×.



5



6

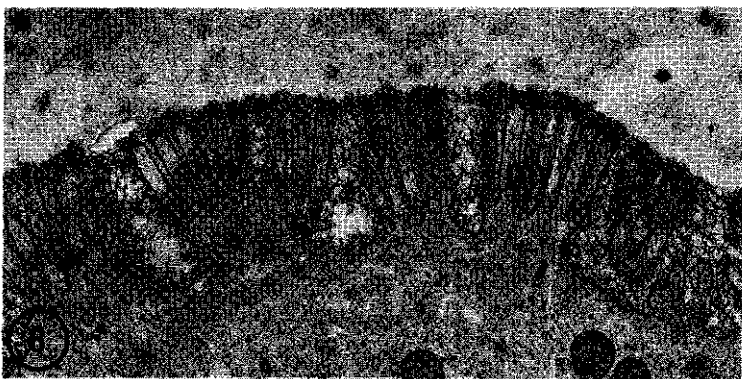
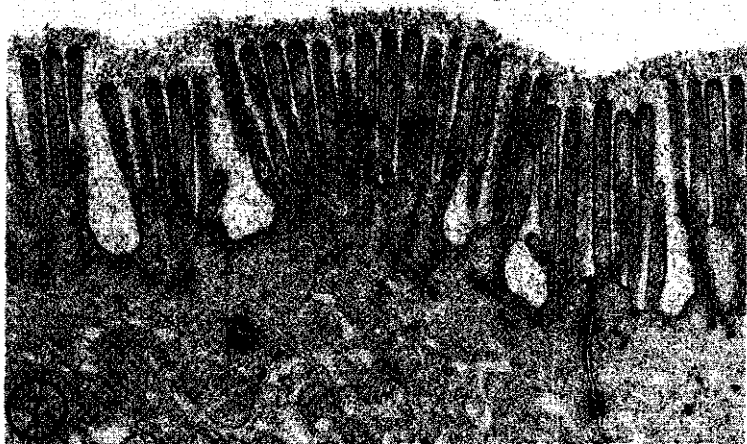


Fig. 5. Erythrocyt. Vergroting 10 000 \times .

Fig. 6. Hogere vergroting van een deel van de in fig. 5 getoonde erythrocyt. De plasmamembraan toont de karakteristieke drielaagige bouw (\rightarrow), in het cytoplasma ontbreken de voor kernhoudende cellen karakteristieke celorganellen (vergelijk met fig. 4). Vergroting 195 000 \times .

Fig. 7. Apicale deel van een epitheelcel van de dunne darm. De microvilli (mv) zijn met een dikke glycocalyx bedekt. Vergroting 20 000 \times .

Fig. 8. Apicale deel van een epitheelcel van de dunne darm, gekleurd met zilvermethenamine. De glycoproteïnen in de glycocalyx zijn door hun affiniteit voor het zilver donker gekleurd. Vergroting 15 000 \times .

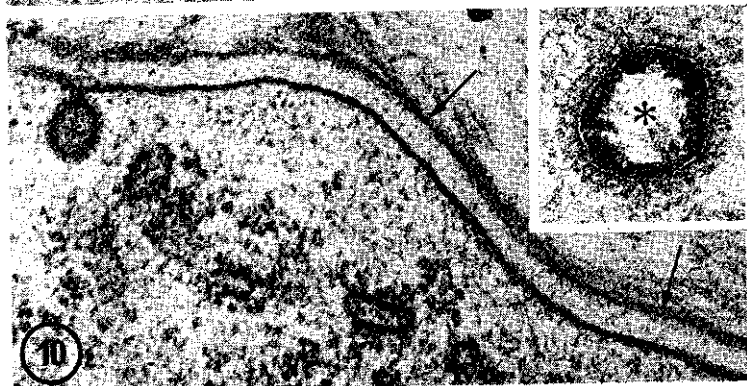
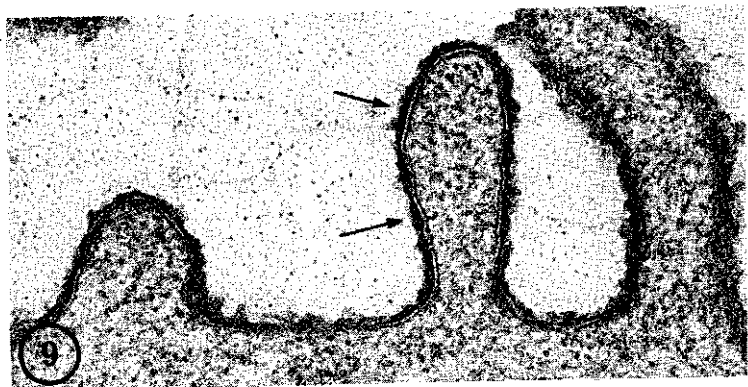


Fig. 9. Deel van het oppervlak van een macrofaag, gekleurd met ruthenium rood. Op de buitenzijde van de drielaagige plasmamembraan is, door de binding met ruthenium rood, een in vergelijking met fig. 10, relatief dunne laag donker gekleurd materiaal (→) aanwezig. Vergroting 110 000 ×.

Fig. 10. Deel van het oppervlak van een macrofaag waarop, door een zorgvuldige prepareertechniek, de dikke glycocalyx aanwezig is gebleven (→). Linksboven is een z.g. 'coated vesicle' aanwezig () waarvan de diameter maar nauwelijks groter is dan de dikte van de glycocalyx. De inzet toont een dergelijke coated vesicle bij hogere vergroting en na kleuring van de cel met ruthenium rood: evenals in fig. 9 is in deze structuur slechts een laag dunner dan de dikke glycocalyx aanwezig. Vergroting 63 000 ×. Vergroting inzet 130 000 ×.*

Fig. 11. Deel van het oppervlak van een macrofaag uit de lever van een rat na intraveneuze toediening van zilverkolloïd. Duidelijk is de hechting van zilverdeeltjes aan het oppervlak van de dikke glycocalyx zichtbaar. Vergroting 63 000 ×.

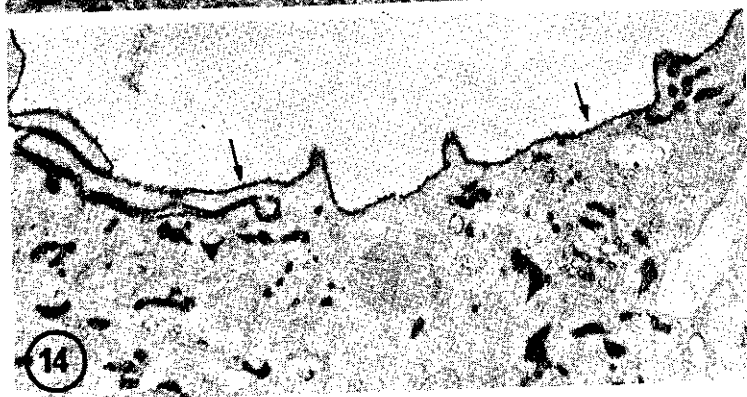
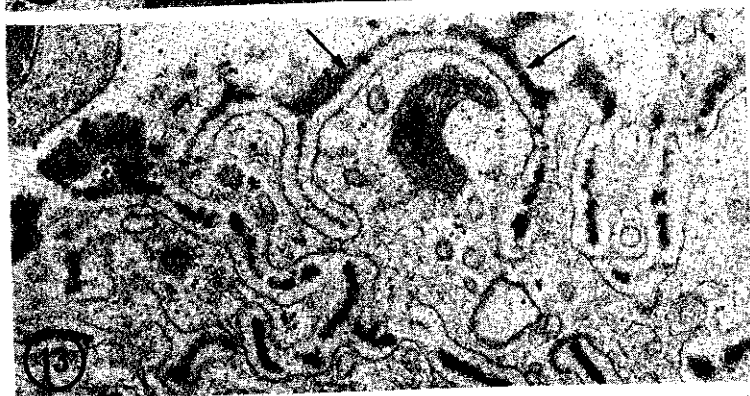
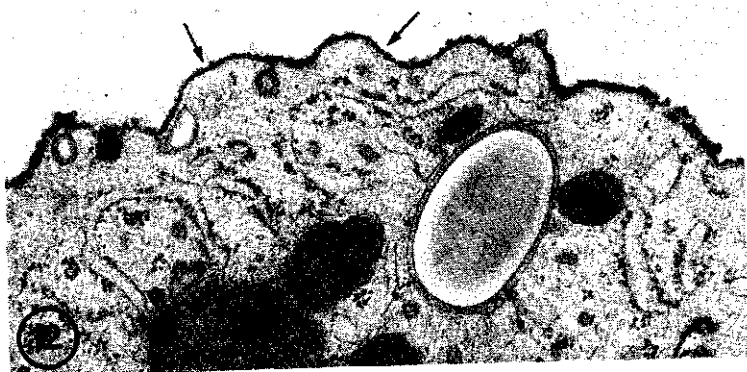


Fig. 12. Deel van het oppervlak van een macrofaag uit de rattelever na kleuring met Alcian Blue. Ook hier is de laag gekleurd materiaal (→) dunner dan de dikke glycocalyx (vergelijk met fig. 13; zie ook fig. 9 en 10). Vergroting 30 000 ×.

Fig. 13. Deel van het oppervlak van een macrofaag uit de rattelever waarop door 'bescherming' met Alcian Blue, ditmaal door perfusie aan de lever toegediend, de dikke glycocalyx (→) behouden is gebleven. Vergroting 30 000 ×.

Fig. 14. Deel van het oppervlak van een macrofaag uit de rattelever, na kleuring met door peroxidase gemerkte concanavaline A. Op het celoppervlak is een donkere laag zichtbaar (→) die de plaats van het concanavaline aangeeft. Het donker gekleurde materiaal in het cytoplasma is het gevolg van de endogene peroxidase-activiteit van de cel. Vergroting 20 000 ×.

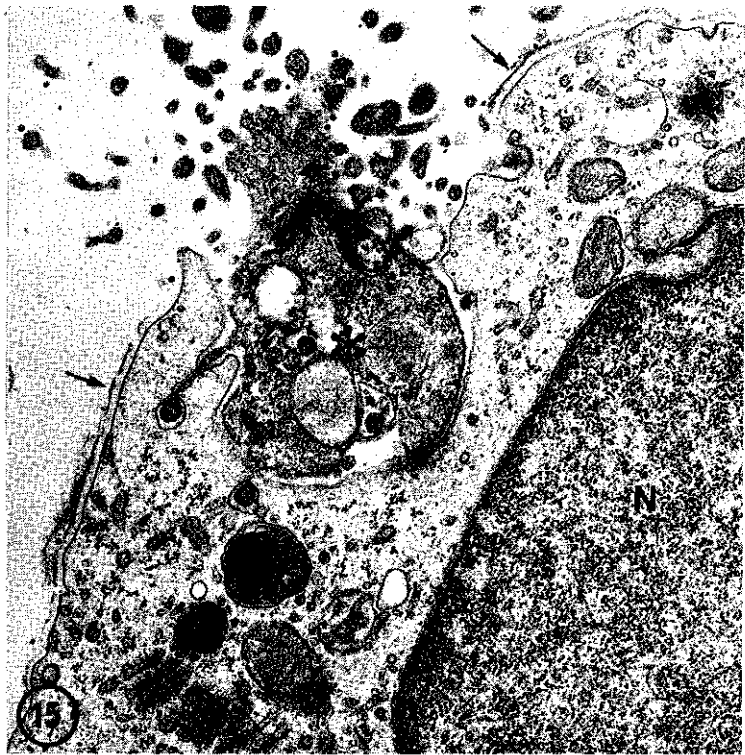
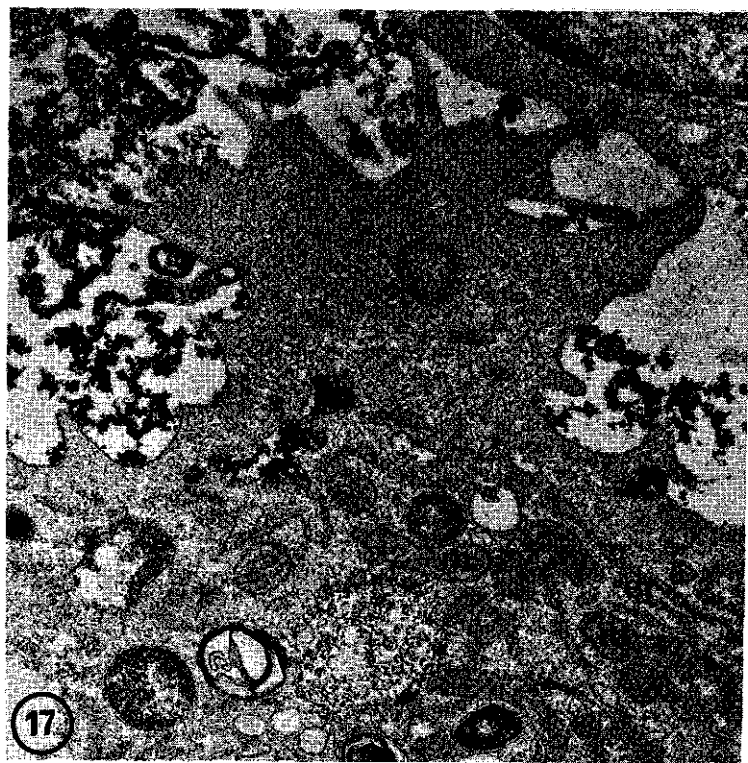
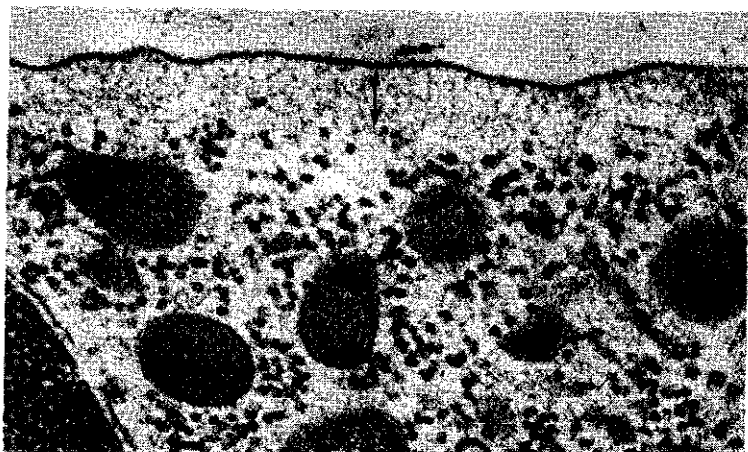


Fig. 15. Deel van een macrofaag uit de buikholte van een cavia, gefixeerd tijdens het fagocyteren van celdebris (*). Hoewel op het bij het fagocytoseproces betrokken deel van het celoppervlak een dikke glycocalyx niet zichtbaar is, is deze elders duidelijk aanwezig (→). Vergroting 25 000 ×. (Uit Brederoo & Daems, 1972.)

Fig. 16. Deel van het oppervlak van een granulocyt. Direct onder de plasmamembraan is een zone zichtbaar waarin zich fijn filamenteus materiaal bevindt (←→). Het cytoplasma bevat, naast kleine donker gekleurde glycogeenkorrels, een aantal lysosomen (ly). Vergroting 60 000 ×.

Fig. 17. Deel van een macrofaag uit de buikholte van een cavia, gefixeerd tijdens endocyteren van ijzerdextran. Opvallend is, dat in de uitstulping van het cytoplasma (*), waarin zich fijn filamenteus materiaal bevindt, celorganellen als mitochondria en endoplasmatisch reticulum ontbreken, hoewel zij elders in het cytoplasma wel aanwezig zijn. Vergroting 20 000 ×.



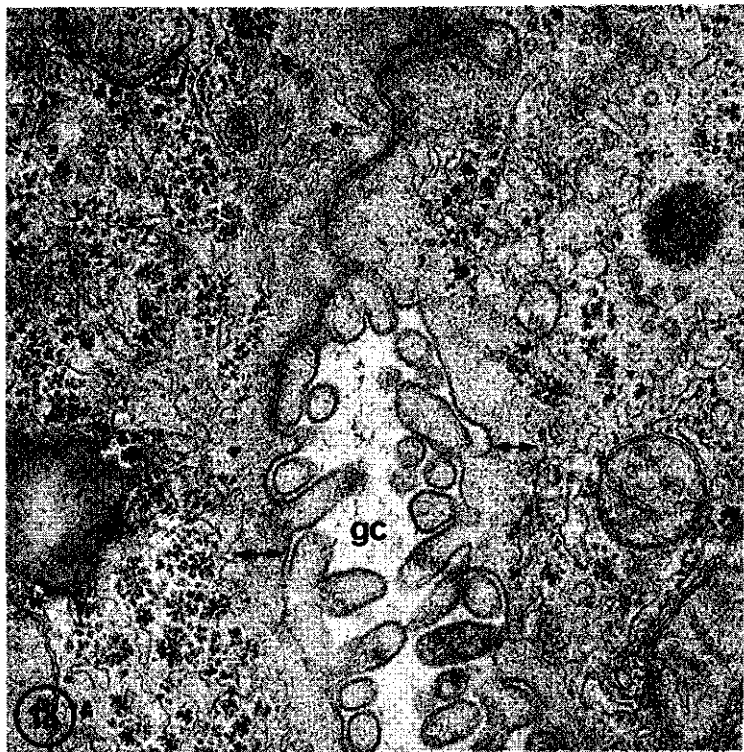


Fig. 16. Deel van twee teerveeën waariussen zich een galcapillair bevindt (gc). Direct onder de plasmamembranen is een organel-vrije zone aanwezig (\longleftrightarrow). Het fijn filamenteus materiaal in dit gebied zou door haar contractiele eigenschappen verantwoordelijk zijn voor wisselingen in de diameter van de galcapillair (Oda et al., 1974). Vergroting 40 000 \times .



Fig. 19. Deel van het cytoplasma van een granulocyt na fagocytose van een bacterie. Het hierbij gevormde fagosoom () is omgeven door een organelvrije zone waarin zich fijne filamenten bevinden die een hechting suggereren aan de plasmamembraan (->). Vergroting 72 000 \times .*

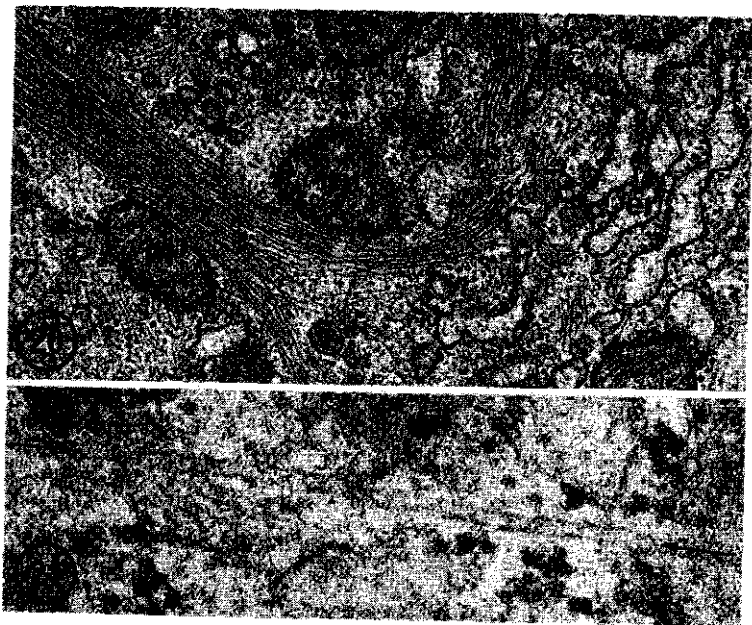


Fig. 20. Deel van het cytoplasma van een macrofaag. Naast de mitochondria (m) en het endoplasmatisch reticulum (er), toont de afbeelding een bundel filamenten (fil) die van het filamenteuze materiaal getoond in afbeelding 16 t/m 19 afwijken door hun grotere diameter (ca. 10 nm). Vergroting 35 000 \times .

Fig. 21. Deel van een microtubulus (\rightarrow). Duidelijk is de holle, buisvormige structuur zichtbaar. Vergroting 80 000 \times .

groepfactoren van erythrocyten.

Terzijde moet opgemerkt worden dat het voor onze beschouwing van belang is dat de binding met receptormolekulen aanleiding geeft tot een verhoogde doorlaatbaarheid van de plasmamembraan voor ionen. Voorts zij vermeld dat belangrijke verschillen in het gedrag van tumorcellen en normale cellen berusten op veranderingen van het celoppervlak (Berlin et al., 1975).

Het contractiele apparaat

Het cytoplasma van vele cellen toont direct onder de plasmamembraan een smalle zone waarin geen celorganellen voorkomen (fig. 16 en 18). In deze zone blijkt een netwerk van fijne, ca. 6 nm dikke, microfilamenten zonder gerichte oriëntatie voor te komen (Wessels et al., 1973). Uit experimenten met meromyosine (een kunstmatig door proteolytische afbraak verkregen produkt van het voor spiercontractie mede verantwoordelijke myosine; Burridge & Phillips, 1975) en uit cytochemisch onderzoek met fluorescerende antilichamen tegen actine (Bretscher & Raff, 1975) is gebleken dat deze microfilamenten chemisch verwant zijn aan actine (Allison, 1973).

Interessant is het om te volgen wat er in het cytoplasma gebeurt nadat contact is gemaakt tussen op te nemen deeltjes en het celoppervlak. De filamenteuze zone onder het celoppervlak verbreedt zich (fig. 17) en in de meeste gevallen ontwikkelen zich uitsulpingen van het oppervlak die het op te nemen materiaal omhullen. Van belang is om vast te stellen dat deze z.g. pseudopodiën geen celorganellen bevatten, doch morfologisch gekarakteriseerd zijn door het vóórkomen van dezelfde microfilamenten die zich ook onder het rustende celoppervlak bevinden. Vervolgens kunnen in bepaalde gevallen dikkere filamenten zichtbaar worden, die dan een hechting suggereren aan de plasmamembraan (fig. 19). De conclusie ligt voor de hand: in deze gevallen vormt zich een contractiel apparaat dat het celoppervlak, dat contact heeft gemaakt met het te endocyteren materiaal, naar binnen trekt. Hoewel de hechting van deze filamenten aan de plasmamembraan nooit met zekerheid is aangetoond (Burridge & Phillips, 1975) zijn de morfologische beelden toch zeer suggestief (fig. 19). Steun voor de opvatting dat het netwerk van filamenten inderdaad een contractiele functie heeft, vergelijkbaar met het in de spieren voorkomende actine/myosine-systeem, kan worden ontleend aan

het eerdergenoemde onderzoek waarin is aangetoond dat zich actine bevindt in het filamenteuze materiaal dat onder het celoppervlak is gelegen. De aanwezigheid van myosine is echter slechts zelden met zekerheid vastgesteld (Allison, 1973).

Aangenomen wordt (Allison, 1973) dat in een volgende fase van het opnameproces, als gevolg van hechting van materiaal, depolarisatie van de plasmamembraan optreedt, waardoor de plasmamembraan een veranderd patroon van doorlaatbaarheid, met name voor natriumionen toont en als gevolg daarvan calciumionen uit cytoplasmatische blaasjes (glad endoplasmatisch reticulum?) vrijkomen. De actine bevattende microfilamenten zouden door de calciumionen tot contractie gebracht worden en verantwoordelijk zijn voor de tot endocytose (en exocytose) leidende bewegingen van het celoppervlak. Experimenten waarbij calciumionen, via microsonden of ionoforen (Foreman et al., 1973) in het cytoplasma gebracht, leiden tot endo- of exocytose steunen de door Allison (1973) en Stockum (1976) aangenomen rol van calcium bij deze processen. Hoewel in het algemeen wordt aangenomen dat er inderdaad sprake is van naar binnen trekken van materiaal, hebben Stockem en medewerkers aangetoond dat dit bij amoeben niet het geval is. Er treedt slechts verankering van de hechtingplaats op, waarna het exoplasma in tegengestelde richting uitstulpt (Stockem, 1976). In het verdere verloop van het proces vindt dan afsnoering plaats van delen van het aldus ontstane kanaaltje. Bij fagocytose lijkt zich een vergelijkbaar mechanisme voor te doen.

De relatie tussen de zojuist beschreven microfilamenten en de processen waaraan bewegingen van het celoppervlak ten grondslag liggen, kan bestudeerd worden met behulp van remmingsproeven met cytochalasine B (Carter, 1972). Aangetoond is dat het contractiele systeem van microfilamenten voor deze stof bijzonder gevoelig is. Toediening van cytochalasine remt de fagocytose-activiteit van macrofagen volledig. Interessant is dat de pinocytose-activiteit ongewijzigd blijft (Allison, 1973), een waarneming die in overeenstemming is met de opvatting dat deze beide vormen van endocytose fundamenteel verschillend zijn (Daems, 1974b). Ook wordt, als gevolg van de toediening van cytochalasine B, een door antigenen en eventueel concanavale A geïntroduceerde verplaatsing van receptoren en liganden aan het oppervlak van lymfocyten, de z.g. 'capping', geremd. Dit verleent steun aan de opvatting dat de beweeglijkheid van de membraaneiwitten die bij de capping betrokken zijn, berust op de activiteit van

het onder de membraan gelegen contractiele apparaat (Shields, 1975).

De rol van de microtubuli (fig. 21) en dikkere cytoplasmatische filamenten (fig. 20) bij deze processen is niet geheel duidelijk. Ten aanzien van de, 24 nm in diameter metende, microtubuli (voor recente overzichtartikelen zie Hepler & Palevitch, 1974; Bardelle, 1975) is de opvatting dat deze uitsluitend als skelet voor de cel zouden functioneren, goeddeels verlaten (Porter, 1973). Niettemin doet verstoring van de microtubuli door colchicine, dat zich aan het eiwit tubuline bindt, de oorspronkelijke vorm van cellen teloorgaan. (Tubuline is het eiwit waaruit de microtubuli zijn opgebouwd.) Deze verstoring is duidelijk zichtbaar bij cellen met een uitgesproken polariteit in hun cytoplasmatische organisatiepatroon, zoals fibroblasten (Allison, 1973) en leverparenchymcellen (Drochmans et al., 1975). Ook het karakteristieke bewegingspatroon van cellen wordt door colchicine verstoord.

Talrijke onderzoeken (Borgers & De Brabander, 1975) wijzen erop dat verstoring van de microtubuli ook processen als secretie en exocytose remt. Waarschijnlijk hebben de microtubuli in dit verband meer te maken met het transport naar het celoppervlak toe dan met het 'uitsluizen' van het materiaal door de cel. Inderdaad is aangetoond (Porter, 1973) dat microtubuli een richtinggevende rol spelen bij de intracellulaire verplaatsing van materiaal en op deze wijze wellicht ook het patroon van endo- en exocytose kunnen beïnvloeden (zie Ghadially, 1975). Ook is een directe relatie tussen microtubuli en de plasmamembraan in de zin van een hechting nooit waargenomen, zodat een eventuele betrokkenheid ervan bij de beweeglijkheid van membraaneiwwitten indirect moet zijn. Dit zou dan het geval kunnen zijn via het verlies van een dirigerende functie door de verstoring van het organisatiepatroon van de cel, of via het microfilamenten-systeem.

Conclusie

Voor de functie van de plasmamembraan zijn de ermee samenhangende glycocalyx en het contractiele apparaat van minstens evenveel belang als de membraan zelf. In verband hiermee zou het aanbeveling verdienen een begrip te gaan hanteren als 'de plasmamembraan in ruimere zin'.

Biologische membranen als selectieve barrières

E. J. ARIËNS EN A. M. SIMONIS

De basis van het leven wordt gevormd door een geïntegreerd complex van biochemische processen. Een ongestoord verloop van deze processen is slechts mogelijk in een milieu dat van de omgeving, het externe milieu, afgeschermd is. De uitwisseling tussen levende materie en het externe milieu is selectief; de basis voor deze selectiviteit ligt in de biologische membranen die de biomaterie omgeven. Enerzijds functioneren deze als selectieve barrières en anderzijds spelen zij een actieve rol bij de uitwisseling tussen het organisme – eencellige of meercellige wezens – en zijn externe milieu. Deze afgrenzing tussen het levende en het niet-levende is zo wezenlijk, dat leven zonder membranen als onmogelijk beschouwd kan worden. De reproductie gebaseerd op genetische informatie die verankerd ligt in het DNA en op de daaraan via mRNA gekoppelde eiwitsynthese, is slechts mogelijk binnen de door membranen afgeschermd ruimte.

Membranen als begrenzing van de vloeistofcompartimenten in biologische systemen

Bij eencelligen wordt het externe milieu in de regel gevormd door een waterige fase, oorspronkelijk de oerzee. Bij de hoger ontwikkelde, in het bijzonder de op het land levende dieren, is de situatie complexer. De lichaamscellen daarvan worden omgeven door een in het organisme opgenomen 'binnenzee', het extracellulaire vocht. Dit vocht vertoont qua samenstelling een zekere gelijkenis met zeewater. Men spreekt in dit verband van het 'milieu interne' van het organisme. Dit heeft op zijn beurt uitwisseling met het externe milieu van het organisme, goeddeels de atmosfeer, maar ook een vloeibare component. Deze bestaat in hoofdzaak uit de vloeistof in het darmlumen en de in de nieren gevormde urine die worden aangeduid als de extramurale vloeistofcompartimenten. Het intracellulaire vocht en het extracellu-

laire vocht vormen samen de intramurale compartimenten.

Lagere, in het water levende meercellige dieren, die via een groot deel van hun buitenoppervlak in uitwisseling (opname en afgifte) staan met hun externe milieu, hebben weinig behoefte aan een afzonderlijk, gesloten circulatiesysteem. Wél bestaat er een open kanalenstelsel waarvan de inhoud een geheel vormt met het weefselvocht. Bij de verdere ontwikkeling in de evolutie, waarbij een steeds kleiner gedeelte van het buitenoppervlak van het organisme bij de uitwisseling met de extramurale vloeistof betrokken is, en waarbij bij het aan land gaan de extramurale vloeistofcompartimenten tot slechts enkele liters darminhoud en urine beperkt worden, ontstond behoefte aan een afzonderlijk circulatiesysteem binnen het extracellulaire vloeistofcompartiment.

Bij de zoogdieren (fig. 1) beperkt zich de uitwisseling tussen intramurale en extramurale vloeistof tot het epitheel van de darmwand en van de nierlichaampjes (nefronen), resp. betrokken bij de resorptie en bij de excretie. De selectieve barrières gevormd door de epithelia die in deze orgaansystemen de extramurale en intramurale vloeistofcompartimenten scheiden, hebben een belangrijke functie bij de handhaving van de gewenste samenstelling van het 'milieu interne', en dus van de homeostasis. Er is daarbij sprake van een transcellulair transport. De barrières bestaan uit één laag van dicht aaneengesloten cellen.

Bij de begrenzing tussen het intracellulaire en het extracellulaire (interstitiële) vocht vormt de enkelvoudige celmembraan de selectieve barrière. Transport door diffusie via deze enkelvoudige celmembraan vertoont veel gelijkenis met het transcellulaire transport door de epitheelcel, waarbij de celmembraan tweemaal (d.w.z. de cel in en de cel uit) gepasseerd moet worden. Bij de begrenzing tussen plasma en interstitiële vloeistof, welke bestaat uit de wand van de capillairen in het weefsel, en de begrenzing tussen plasma en voorurine in de glomerulus (extramuraal vocht, fig. 1), welke bestaat uit de wand van de glomerulaire capillairen, is slechts sprake van ultrafiltratie. De genoemde capillairwand is een barrière met betrekkelijk wijde poriën tussen de cellen, welke alleen grote macromolekulen tegenhoudt. Interstitieel vocht, plasmavoort (zonder eiwitten) en glomerulair filtraat (voorurine) zijn dan ook in samenstelling nauw verwant.

Ten aanzien van de samenstelling van de plasmavloeistof en zo van het interstitiële vocht hebben in het bijzonder uitwisselingsprocessen die zich afspelen aan het epitheel van de niertubuli een regulerende

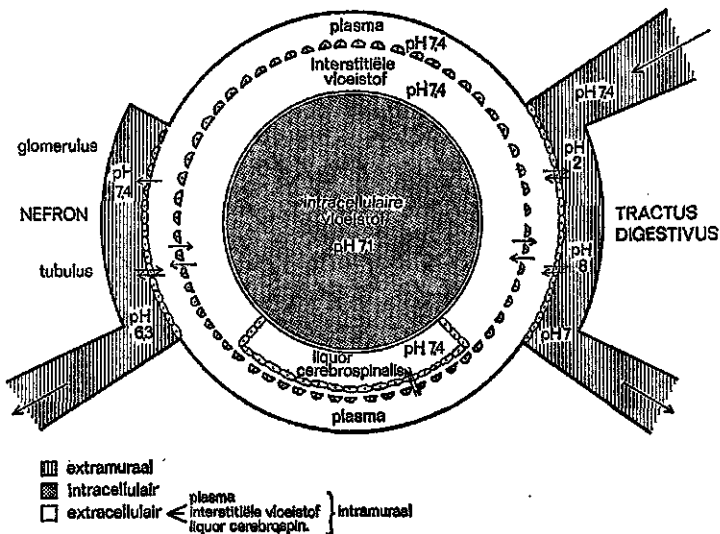


Fig. 1. Schematische weergave van de belangrijkste vloeistofcompartimenten in het organisme van zoogdieren en de membraanbarrières die deze compartimenten scheiden. De pH van de extramurale vloeistofcompartimenten (de inhoud van het maag-darmkanaal (tractus digestivus) en de inhoud van de urinewegen) verschilt aanzienlijk van die in de intramurale vloeistofcompartimenten. De belangrijkste barrières zijn de buitenmembraan van de cel, zoals bekend een lipidendubbellaag, en de membranen die opgebouwd zijn uit dichtgepakte cellen, zoals het epitheel van de tractus digestivus en dat van de nierbuisjes (tubuli). Passage via deze membranen met een dichte celpakking betekent praktisch altijd passage via de cel, dus via de celmembranen. Dit geldt ook voor de barrière die de liquor cerebrospinalis (de hersenvloeistof) en het daarin gelokaliseerde centrale zenuwstelsel omgeeft. De uitwisseling tussen plasma en weefselvloeistof (interstitiële vloeistof) en de vorming van voorurine in de glomerulus berusten op ultrafiltratie via de capillairwand, waarin de celpakking minder dicht is, zodat passage tussen de cellen mogelijk is.

taak. Deze uitwisselingsprocessen resulteren uiteindelijk in een selectieve uitscheiding en bepalen dus ook de samenstelling van de urine. De uitwisseling aan het epitheel van de darmwand betreft vooral een selectieve opname. Afzonderlijke vermelding verdient de bloed-hersenbarrière, een extra beveiliging die wordt aangetroffen rondom het centrale zenuwstelsel. Deze barrière vertoont voor zijn passieve doorlaatbaarheid veel verwantschap met de epitheelmembranen tussen de intra- en extramurale vloeistofcompartimenten (fig. 1).

Selectiviteit in de doorlaatbaarheid

Bij de bespreking van biologische membranen als selectieve barrière dient aandacht besteed te worden aan:

1. de barrières gevormd door de celmembraan en door de epithelia, die bepalend zijn voor de uitwisseling tussen extracellulair en intracellulair vocht, resp. voor de uitwisseling tussen extracellulair vocht en extramuraal vloeistofcompartimenten;
2. de eenvoudigere barrières die betrokken zijn bij de ultrafiltratieprocessen aan de capillairwand.

De doorlaatbaarheid van de celmembraan Voor een goed begrip van de doorlaatbaarheid van de celmembraan voor verschillende stoffen dienen we iets nader in te gaan op de bouw ervan. De buitenmembraan van de cel is opgebouwd uit een lipidendubbellaag. Deze is aan beide zijden bedekt met eiwitten die deels in de lipidelaag doórdringen en deels de lipidelaag in zijn geheel doordringen. Daar waar op één plaats meer eiwitmolekulen de lipidendubbellaag doordringen vormen deze een porie. Deze is met water gevuld en aan de binnenzijde in hoofdzaak begrensd door de polaire groepen van de betrokken eiwitten; de apolair groepen van deze eiwitten zijn in interactie met de lipiden van de dubbellaag (zie fig. 3a). De doorlaatbaarheid van de celmembraan voor kleine wateroplosbare molekulen (b.v. ureum) en ionen (o.a. natrium en kalium), die hun weg vinden via de poriën, en voor vetoplosbare molekulen, die hun weg vinden via de lipidendubbellaag, is op basis van deze opbouw verklaarbaar. De ondoorlaatbaarheid van de membraan voor wat grotere sterk wateroplosbare organische molekulen en voor macromolekulen zoals eiwitten, en de selectiviteit in de doorlaatbaarheid voor ionen met verschillende ladingen en doorsnee van het gehydrateerde ion (ion plus watermantel) worden verklaarbaar door de afmetingen van de poriën en de lading van de polaire groepen van de eiwitten die de poriewand vormen. Voor de doorlaatbaarheid voor de vetoplosbare stoffen is de lipidendubbellaag bepalend. Deze passage kan bij benadering beschreven worden als een verdeling van de stoffen tussen water en olie.

In een dubbellaag opgebouwd uit eenvoudige vetzuurmolekulen zijn deze molekulen nogal beweeglijk, zodat inderdaad welhaast sprake is van een simpele olie-achtige fase. De lipide fase van de celmembraan

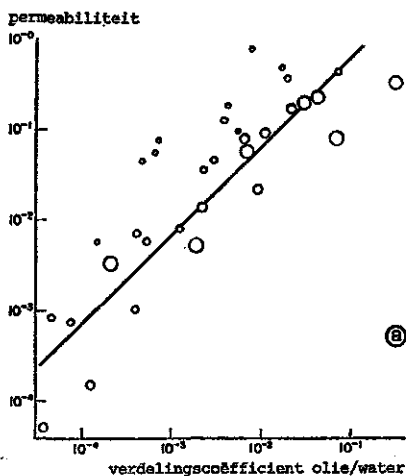


Fig. 2a. De permeabiliteit als functie van de verdelingscoëfficiënt olie/water, gemeten aan de snelheid van penetratie van verschillende non-elektrolyten in de cellen van *Chara ceratophylla*. De diameter van de cirkels geven een maat voor de doorsnee van de onderzochte molekulen. De permeabiliteit is uitgedrukt in mol/cm² per uur per mol/liter. (Naar R. Colander, 1937. *Trans. Faraday Soc.* 33: 985.)

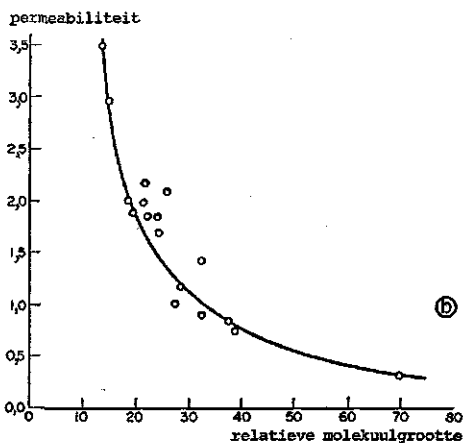


Fig. 2b. De permeabiliteit als functie van de molekuulgrootte, getest aan *Beggiatoa* (een zwavelbacterie). De permeabiliteit is uitgedrukt als $10^4 \times$ de concentratie in mol/liter, waarbij plasmolyse van de micro-organismen optreedt. (Naar R. A. Nystrom, 1973.)

bestaat echter uit meer complexe lipiden, o.a. fosfatiden zoals lecithine, die aan hun polaire zijde een complex systeem van geladen groepen dragen. Door interactie tussen deze groepen ontstaat aan de oppervlakken van de dubbellaag een soort netwerk waardoor de beweeglijkheid van de lipide molekulen afneemt. Dit oppervlakkige ladingssysteem bevordert op zijn beurt de binding van eiwitten aan de oppervlakken van de dubbellaag. Deze binding van eiwit leidt tot een verdere fixatie en verminderde bewegingsvrijheid van de lipide molekulen. Grote delen van de lipidendubbellaag krijgen hierdoor een min of meer kristallijn karakter, hetgeen nog bevordert wordt door de aanwezigheid van de vlakke cholesterolmolekulen in de membraan. De membraan krijgt daardoor tot op zekere hoogte het karakter van een fijnmazige zeef met een zekere spreiding in de maaswijdte. Naarmate de lipidemolekulen minder beweeglijk zijn zal naast de vetoplosbaarheid ook de afmeting van het diffunderende molekuul bij het diffusieproces een belangrijkere rol spelen. Voor de passagesnelheid zijn dus niet alleen vetoplosbaarheid of verdelingscoëfficiënt, maar ook de afmetingen van het molekuul van speciale betekenis (fig. 2a en 2b). Hoewel binnen- en buitenzijde van de celmembraan verschillen, blijkt toch dat er voor wat betreft de passage van stoffen op basis van diffusieprocessen geen duidelijke voorkeursrichting bestaat. Ook bij de passage van stoffen via de epithelia die de wand bekleden van de maag-darmtractus en van de niertubuli zijn de eigenschappen van de celmembraan, de lipidendubbellaag dus, van betekenis voor de passage op basis van diffusieprocessen. Van een speciale voorkeursrichting is ook hier geen sprake. Dit ligt uit de aard der zaak geheel anders bij de passage op basis van 'carriergebonden' transport. Deze bijdrage zal zich beperken tot passage op basis van vrije diffusie.

De doorlaatbaarheid van de capillairwand De barrière gevormd door het endotheel van de capillairen gedraagt zich als een ultrafilter. De plasmaeiwitten blijven daardoor in hun distributie beperkt tot het intravasculaire compartiment. Andere, ook relatief grote organische molekulen worden doorgelaten, tenzij ze aan eiwit geadsorbeerd zijn. Ook kleinere organische molekulen blijven dus, voor zover ze aan plasmaeiwitten gebonden worden, bij hun distributie beperkt tot het intravasculaire vloeistofcompartiment. Bij deze eiwitbinding is vooral het albumine, dat in hoge concentratie in het plasma voorkomt, betrokken. Het bindt vooral organische molekulen welke behalve een

geladen zure of basische groep een vrij grote hydrofobe, dus lipofiele groep dragen. De interstitiële vloeistof is zeer arm aan eiwit.

Modulatie van de doorlaatbaarheid van de celmembraan en van de permeatie van stoffen

De betekenis van de membranen als selectieve barrières komt duidelijk tot uiting bij de bespreking van:

– Veranderingen in de doorlaatbaarheid van de celmembraan onder invloed van bepaalde stoffen, welke kunnen zijn:

1. veranderingen in de doorlaatbaarheid van de poriën;
 2. veranderingen in de doorlaatbaarheid van de lipidendubbellaag.
- Veranderingen van de permeatie van stoffen door aanpassing in de chemische eigenschappen. Ook hierbij doen zich twee situaties voor:
3. de synthetische aanpassing van de eigenschappen in het kader van ontwikkeling van nieuwe biologische stoffen, o.a. nieuwe geneesmiddelen, voedseladditiva, pesticiden, etc.;
 4. de biologische aanpassing van de eigenschappen van lichaamsvreemde stoffen, zoals die plaatsvindt op basis van biochemische omzettingen binnen het organisme, die in de regel gericht zijn op een elimineren van deze stoffen.

Deze beide benaderingen kunnen tot oogmerk hebben:

– Aanpassing van de eigenschappen dusdanig dat de distributie beperkt wordt, dus de permeatie door de celmembraan belemmerd wordt;

– Aanpassing van de eigenschappen van de stoffen dusdanig dat de permeatie van de celmembraan bevorderd wordt.

Deze vier aspecten zullen in de volgende paragrafen worden behandeld.

Veranderingen in de doorlaatbaarheid van de poriën

Uit de elektrofysiologie is bekend dat de doorlaatbaarheid van de celmembraan voor natrium- en kaliumionen in sterke mate kan veranderen. Dit gebeurt o.a. tijdens de depolarisatie, een verschijnsel dat zich voordoet bij de prikkeloverdracht tussen verschillende neuronen, dus in de synapsen, en tussen neuronen en effectorcellen, bijvoorbeeld aan de myoneurale eindplaat. Daarbij speelt acetylcholine als neurotransmitter een belangrijke rol. Acetylcholine, dat aan de presynap-

tische zenuwuiteinden opgeborgen is in kleine blaasjes, komt bij zenuwprickeling door exocytose vrij. Via de synapsspleet diffundeert het naar de moleculaire aangrijpingspunten voor acetylcholine, de cholinerge receptoren (die aan het buitenoppervlak van de cel gelokaliseerd blijken te zijn), waarmee het een interactie aangaat. Door deze interactie verandert de doorlaatbaarheid van de celmembraan ter plaatse. De daardoor verhoogde flux van Na^+ en K^+ gaat gepaard met een vermindering van de membraanpotentiala, die op zich de permeabiliteit voor de betrokken ionen weer verder doet toenemen totdat een volledige depolarisatie is bereikt. De verplaatsing van Na^+ de cel in en van K^+ de cel uit berust hierbij op een passieve diffusie via de poriën. Herstel van de oorspronkelijke verhoudingen vindt plaats door een actief transport van Na^+ de cel uit, waarbij de 'natriumpomp' een rol speelt.

De neurotransmitter acetylcholine en de permeatie van ionen De initiëring van het depolarisatieproces door de neurotransmitter acetylcholine, waarbij dus de eigenschappen van de voor ionen doorgankelijke membraanporiën veranderen, is als volgt voor te stellen. De receptoreiwitmolekulen in de poriewand kunnen in twee toestanden, de C(closed)- en de O(open)-conformatie, voorkomen. Tussen beide vormen bestaat een dynamisch evenwicht. In de rusttoestand is het merendeel van de poriën ondoorlaatbaar voor Na^+ ; het receptoreiwit in de poriewand bevindt zich dan in hoofdzaak in de C-conformatie ($\text{C/O} \gg 1$). Fig. 3a geeft een en ander schematisch weer.

De neurotransmitter acetylcholine treedt in interactie met zijn specifieke receptoren die gelokaliseerd zijn op de receptoreiwitten die de porie begrenzen en wel aan de buitenzijde van de cel. Het onderscheid tussen receptor ('receptor site') en receptoreiwit is analoog aan dat tussen de 'active site' op een enzym en het enzymeiwit als zodanig. De interactie van het acetylcholinemolekuul met zijn 'receptor site', waarvoor een zekere complementariteit in vorm en ladingsverdeling tussen beide vereist is, leidt tot het vastleggen (stabiliseren) van de conformatie van het receptoreiwit in de O-conformatie. Daarbij keert de verhouding van C/O om. Een en ander is schematisch weergegeven in fig. 3b. De verandering in de afmetingen en de ladingsverdeling van de porie leidt tot een verhoogde doorgankelijkheid voor Na^+ , of meer algemeen gezegd, tot een verandering in de selectieve doorgankelijkheid van de porie voor ionen. Er stroomt Na^+ de cel in.

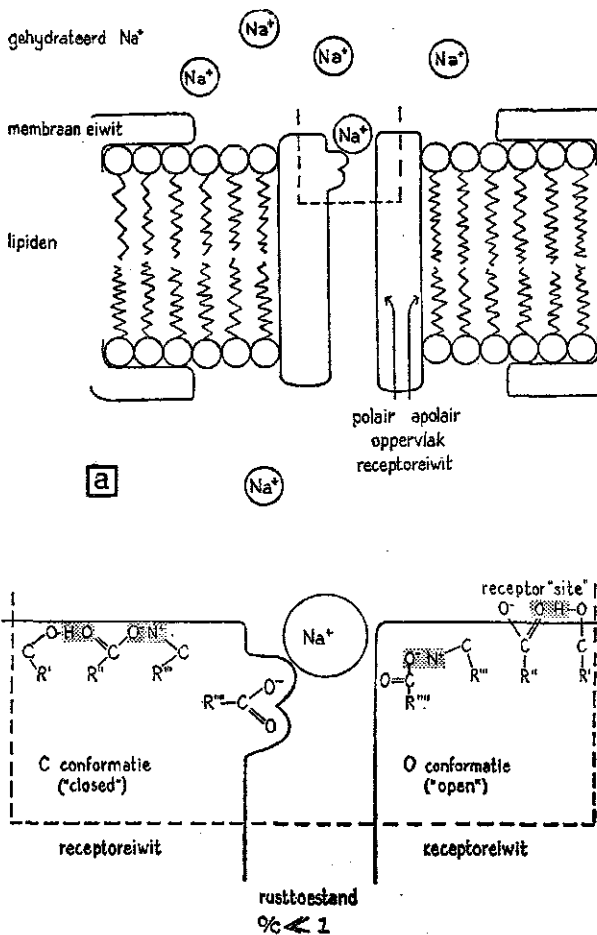
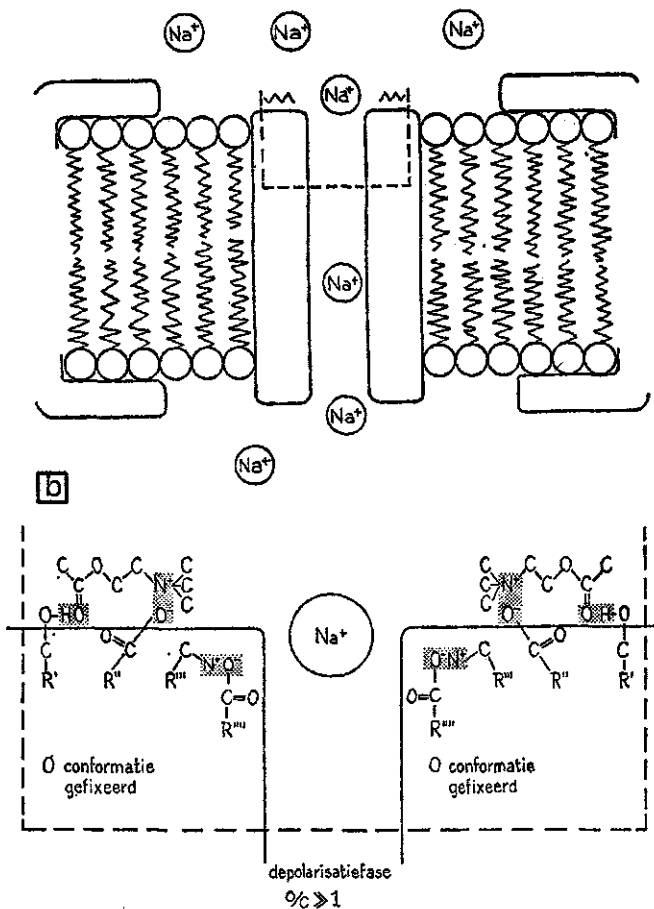


Fig. 3. Schematische weergave van een door receptoreiwitmolekulen begrensdde porie in een lipidenmembraan.

a. Boven: De porie is niet doorgankelijk voor Na^+ doordat receptoreiwitten in de C(closed)-conformatie voorkomen. Onder: Weergave van detail - het receptoreiwit in de C(closed)- en in de O(open)-conformatie.

b. Boven: Onder invloed van acetylcholine worden de receptoreiwitten in de O(open)-conformatie gehouden, zodat de porie doorgankelijk is voor Na^+ . Onder: Weergave van detail - het vastleggen van het receptoreiwit in de O(open)-conformatie onder invloed van acetylcholine. In de O-conformatie is op het receptoreiwit een 'receptor site' voor acetylcholine aanwezig.



Deze ionenverplaatsing geeft aanleiding tot een vermindering van de membraanpotential, de depolarisatie.

Pogingen tot het isoleren en bestuderen van geïsoleerde receptor-proteïnen verkeren in een ver gevorderd stadium. De verkregen informatie sluit goed aan bij het hier geschetste model.

Aan acetylcholine chemisch nauw verwante verbindingen kunnen de depolariserende werking van de moederstof nabootsen. Men spreekt dan van cholinerge stoffen of cholinomimetica. Zo kennen we

ook anticholinerge stoffen of cholinolytica. Dit zijn stoffen die voldoende aan acetylcholine verwant zijn om de plaats ervan over te nemen, maar die er dusdanig van verschillen dat ze niet de functie ervan kunnen overnemen. Zij hebben wel een affiniteit voor de cholinerge receptoren maar geen 'intrinsieke activiteit' op deze receptoren. Deze relatie is vergelijkbaar met die bekend van bijvoorbeeld vitaminen en antivitaminen, of metaboliëten en antimetaboliëten. De genoemde anticholinerge stoffen, zoals atropine en curare, gedragen zich als competitieve antagonisten van cholinerge stoffen, inclusief acetylcholine. De anticholinerge stoffen versperren acetylcholine als het ware de toegang tot de cholinerge receptoren en fixeren zo het receptoreiwit in de C-conformatie, de porie in de gesloten toestand en de membraan in de rusttoestand voor wat betreft de permeabiliteit voor Na^+ en K^+ . Atropine beperkt zich daarbij tot de cholinerge prikkeloverdracht aan de parasymphatische zenuwuiteinden (o.a. de nervus vagus) en curare, een spierverslapper, tot de cholinerge prikkeloverdracht aan de myoneurale eindplaat (de motorische zenuwuiteinden). Dit wijst erop dat, hoewel de cholinerge 'receptor sites' in beide gevallen nauw verwant zijn, de membranen waarin ze zijn ingebed toch voldoende verschillen om een zekere selectiviteit te krijgen met betrekking tot de blokkerende stoffen. Deze laatste zijn grote molekulen (zie fig. 4) die weliswaar de toegang tot de cholinerge receptor blokkeren, maar zich goeddeels door middel van hun hydrofobe fenyl-ringsystemen hechten op meer lipofiele bindingsplaatsen in de membraan, direct grenzend aan de sterk hydrofiele cholinerge 'receptor site'.

De informatie die bij de prikkeloverdracht wordt overgedragen, is vervat in een frequentiemodulatie, d.w.z. dat er een reeks van prikkels van gelijke sterkte wordt doorgegeven waarbij de snelheid van opeenvolging varieert. Daarbij zijn hoge frequenties in het geding, tot 200 à 300 pulsen per seconde. Dit betekent dat telkens na afgifte van acetylcholine en activering van de receptoren deze weer snel vrijgemaakt moeten worden. Na depolarisatie moet immers de membraanpotentialaal weer hersteld worden om de postsynaptische membraan ontvankelijk te maken voor een volgende prikkel. Acetylcholine moet dan ook bijzonder snel geëlimineerd worden, hetgeen mogelijk is doordat in de synapspleet het enzym acetylcholine-esterase aanwezig is. Acetylcholine-esterase-remmers, dus stoffen die dit enzym blokkeren, kunnen begrijpelijkerwijs de prikkeloverdracht stagneren

met alle gevolgen van dien. De werking van de organische fosfaten, bekend als zenuwgassen en insecticiden, berust op een dergelijke blokkade.

Op de hier genoemde anticholinerge stoffen en acetylcholine-esterase-remmers wordt, in verband met de resorptie, het transport binnen het organisme en de uitscheiding van stoffen, waarbij passage van lipofiele membranen in het geding is, later nog ingegaan.

Het antidiuretisch hormoon en de permeatie van water In dit verband kan ook gewezen worden op de sterke toename van de permeabiliteit voor water (niet voor ionen) onder invloed van ADH (antidiuretisch hormoon) van de normaliter voor water vrijwel ondoorlaatbare epitheelmembranen die de verzamelbuizen in de nier bekleden. De osmotische gradiënt tussen enerzijds de hypotone urine en anderzijds de ter plaatse sterk hypertone weefselvloeistof drijft dan water uit de verzamelbuizen terug de weefsels in onder vermindering van het volume (anti-diurese) van de nu hypertoon wordende urine. ADH speelt zo een belangrijke rol bij de regulatie van de osmolariteit van de lichaamsvochten.

Elektronenmicroscopische waarnemingen aan de celmembranen van het urineblaasepitheel van de pad leren dat de granules (eiwitmolekulen) die in de voor water ondoorlaatbare toestand van de membranen los van elkaar ronddrijven, onder invloed van ADH aggregeren tot plekken met een dicht geordende pakking (fig. 4). Dit proces laat zich begrijpen uit een verandering in de conformatie en daarmee ladingsverdeling van de eiwitten in die zin, dat de apolaire, lipofiele groepen zich naar het binnenste van het eiwit keren en de polaire groepen meer aan het oppervlak van het eiwitmolekuul komen. De normaal vrij sterke lipofilie aan het oppervlak van de eiwitten, die bevorderlijk is voor het afzonderlijk blijven ervan in de lipofiele membraan, zou dan overgaan in een hydrofilie. Deze bevordert het aggregeren van de eiwitten waarbij dan tevens hydrofiele poriën ontstaan. Deze blijken voldoende groot te zijn om water, maar ongeschikt om ionen uit de lichaamsvloeistof door te laten. ADH bewerkstelligt als het ware de vorming van een voor water doorgankelijke zeef en daarmee een selectieve permeabiliteit van de membraan voor water.

Veranderingen in de doorlaatbaarheid van de lipidendubbellaag

De eigenschappen van de lipidenlaag die de doorlaatbaarheid voor verschillende stoffen bepalen, zullen zich uiteraard wijzigen indien zich in de membraan sterk lipofiele stoffen ophopen. Dit is bijvoorbeeld het geval met de narcotica (anesthetica), zoals ether, halothaan en cyclopropan. Het zijn stoffen die de permeabiliteit van de lipidendubbellaag voor voor de celfunctie essentiële molekulen dusdanig wijzigen dat een algemene depressie in de celactiviteit optreedt. Zij hebben dan ook niet alleen een depressieve werking op het centrale zenuwstelsel, maar ook op bijvoorbeeld eencellige micro-organismen. Uit tabel 1 en 2 blijkt, dat hoewel de voor het bewerkstelligen van narcose benodigde concentratie van stof tot stof sterk verschilt, de met deze concentratie corresponderende evenwichtsconcentratie in olie praktisch constant is. Dit betekent dat bij een zekere mate van verzadiging van de lipidendubbellaag in de membraan het narcotisch effect intreedt. Er bestaat tussen de narcotische stoffen nauwelijks enig verband in chemische structuur. Ook is er praktisch geen verschil in werkzaamheid tussen optische isomeren. Wat ze gemeenschappelijk hebben is een zekere vetoplosbaarheid. Dit duidt op een werking waaraan geen interactie met specifieke receptoren ten grondslag ligt. Voor stoffen waarvan de werking gebaseerd is op een interactie met specifieke receptoren, bijvoorbeeld voor de reeds genoemde cholinerge stoffen en anticholinerge stoffen, bestaat er een duidelijke

Tabel 1. De concentratie in water van verschillende narcotisch werkende stoffen, getest op kikkervisjes, de daarmee samenhangende verdelingscoëfficiënt (oleylalcohol/water), en de overeenkomstige evenwichtsconcentratie van de stoffen in olie. (Naar K. H. Meyer & H. Hemmi, 1935. Biochem. Z. 277: 39.)

	Concentratie in water (M)	Verdelingscoëff. oleylalc./water	Corresponderende concentratie in olie (M)
Ethanol	0,33	0,10	0,033
n-Butanol	0,03	0,65	0,020
Valeramide	0,07	0,30	0,021
Benzamide	0,013	2,50	0,033
Salicylamide	0,0033	5,90	0,021
Fenobarbital	0,008	5,90	0,048
o-Nitroaniline	0,0025	14,0	0,035

Tabel 2. De concentratie van gasvormige narcotisch werkende stoffen, getest op de muis, en de overeenkomstige evenwichtsconcentratie van de stoffen in olijfolie. (Naar K. H. Meyer, 1937. Trans. Faraday Soc. 33: 1062.)

	Concentratie in lucht (vol.%)	Corresponderende evenwichts- concentratie in olijfolie (M)
Methaan	370	0,08
Lachgas	100	0,06
Acetyleen	65	0,05
Ethylchloride	5	0,07
Ether	3,4	0,09
Methylal	2,8	0,08
Tetrachloorkoolstof	0,6	0,07
Chloroform	0,5	—

samenhang tussen structuur en werking en in de regel ook een groot verschil in werkzaamheid van de optische isomeren van één stof.

Ook het vergroten van de doorlaatbaarheid van celmembranen voor stoffen behoort tot de mogelijkheden. Zo wordt b.v. de opname van vetoplosbare lichaamsvreemde stoffen door vissen, welke plaatsvindt via de kieuwen, aanzienlijk versneld in aanwezigheid van oppervlakte-actieve stoffen zoals dioctylsulfosuccinaat. Reeds in concentraties van 0,003% versnelt deze stof de opname van b.v. barbituraten. Dit gegeven is van bijzondere betekenis bij het bepalen van de schadelijkheid van chemische verontreinigingen in water voor daarin levende organismen. De verontreinigde oppervlaktewateren bevatten praktisch altijd ook oppervlakte-actieve stoffen (detergentia) afkomstig van huishoudelijk en industrieel gebruik.

Chemische aanpassing van de permeatie van stoffen

Zoals reeds aangegeven, kan onderscheid gemaakt worden tussen veranderingen die leiden tot een beperking of verhindering van de passage van organische stoffen door de membranen én veranderingen die gericht zijn op een bevorderen van deze passage. Aangezien de lipofilie van de stoffen van doorslaggevende betekenis is voor de passage, ligt het voor de hand dat de passage beperkt kan worden door in de stoffen groepen in te voeren die in sterke mate de wateroplosbaarheid vergroten, dus vooral geïoniseerde groepen. Om de passage

te bevorderen ligt invoering van groepen die de vetoplosbaarheid vergroten, in de lijn. Dit laatste kan ook bereikt worden via het maskeren van hydrofiele groepen.

Chemische aanpassing gericht op een beperking van de distributie

Voor allerlei, niet bijzonder kleine organische molekulen belemmert een hoge wateroplosbaarheid – meestal gebaseerd op de aanwezigheid van een geïoniseerde, dus geladen groep – de diffusie door de celmembraan. Dit heeft consequenties voor de resorptie vanuit de darmtractus, het passeren van de bloed-hersenbarrière, het binnendringen in de cellen en de terugresorptie vanuit de voorurine in de tubuli.

Indien een stof door penetratie in bepaalde compartimenten, bijvoorbeeld in het centrale zenuwstelsel, daar aanleiding geeft tot ongewenste effecten, kunnen door invoering van een sterk geïoniseerde groep in het molekuul dergelijke effecten geëlimineerd worden. Fig. 5 laat zien hoe invoering van een quaternaire ammoniumgroep in een tertiaire base – in dit geval een antihistaminicum met een sterk slaapverwekkende werking – het binnendringen in het centrale zenuwstelsel onmogelijk maakt. Hierdoor wordt de storende bijwerking geëlimineerd terwijl de antihistamine-werking gehandhaafd blijft ook na het quaternair maken van de verbinding. Ook atropine, een tertiaire base met anticholinerge werking heeft in hoge doseringen ernstige bijwerkingen op het centrale zenuwstelsel en wel in de vorm van psychosen. Wil men nu met anticholinergica de maagzuursecretie en de maagperistaltiek remmen, dan maakt men bij voorkeur gebruik van quaternaire analogen van atropine; de anticholinerge werking blijft gehandhaafd maar de penetratie in het centrale zenuwstelsel is onmogelijk geworden. Wel dient men er rekening mee te houden, dat quaternaire ammoniumbasen vanuit de darmtractus slecht geresorbeerd worden aangezien ze de lipofiele darmepitheelbarrière slechts met moeite kunnen passeren.

In dit verband kan ook het gebruik van curare, een quaternaire ammoniumbase, als pijlgift door de inboorlingen van Afrika en Zuid-Amerika genoemd worden. Bij de jacht worden met behulp van gifpijlen hoge doseringen curare ingebracht om te voorkomen dat het prooidier het oerwoud invlucht alvorens de spiervlamende werking tot uiting komt. Het dier sterft korte tijd na aangeschoten te zijn aan een verlamming van de ademhalingsspieren. Uiteraard rijst nu de vraag hoe de jager het aandurft om zijn vergiftigde buit op te eten.

Men zou kunnen vrezen dat hem kort na de maaltijd hetzelfde lot als zijn prooi beschoren zou zijn. Dit is echter niet het geval en wel op grond van het feit dat curare een quaternaire ammoniumbase is. Het is dus voor vrijwel 100% gefoniseerd, kan daardoor de lipofiele barrière van het darmepitheel niet passeren en dus niet opgenomen worden. Tabel 3 en tabel 4 laten zien hoe de mate van resorptie van verschillende organische verbindingen vanuit de maag-darmtractus gecorreleerd is met de vetoplosbaarheid, resp. verdelingscoëfficiënt.

Aangezien het epitheel van de maag-darmtractus fungeert als een

Tabel 3. De relatie tussen de resorptiesnelheid in de maag (gemiddelde van 5 dieren, ratten \pm S.D.) en de vetoplosbaarheid van een reeks carbatmen: R.O.CO.NH.CH₃. (Naar J. B. Houston e.a., 1975. J. Pharmacol. exp. Ther. 195: 67.)

R	Concentratie (mM) in 0,1 N HCl	Resorptiesnelheid (snelheidsconstante/min) · 10 ²	Schijnbare verdelingscoëfficiënt (octanol/buffer)
Methyl	10	0,76 ± 0,051	0,88
Propyl	10	0,99 ± 0,101	8,9
Fenyl	5	1,01 ± 0,092	17,4
Pentyl	5	1,41 ± 0,110	91
α-Naftyyl	1	1,28 ± 0,117	230
(3,4,5)Trimethylfenyl	1	1,32 ± 0,103	460

Tabel 4. De relatie tussen de mate van resorptie in het colon (rat) en de vetoplosbaarheid van een reeks barbituraten. (Naar L. S. Schanker, 1959. J. Pharmacol. exp. Ther. 126: 283.)

	Resorptie (%)	Verdelingscoëfficiënt chloroform/water
Barbital	12	0,7
Aprobarbital	17	4,9
Fenobarbital	20	4,8
Butalbital	23	10,5
Butobarbital	24	11,7
Cyclobarbital	24	13,9
Pentobarbital	30	28,0
Secobarbital	40	50,7

voor sterk hydrofiele, dus o.a. geïoniseerde stoffen, praktisch ondoorlaatbare lipofiele barrière, worden door introductie van sterk geïoniseerde sulfonzuurgroepen in azokleurstoffen veilige levensmiddelenkleurstoffen verkregen. Azokleurstoffen als zodanig zijn vaak zeer toxisch en werken o.a. carcinogeen. Men denke in dit verband aan de door het beruchte botergeel veroorzaakte leverkanker. De door invoering van de sulfonzuurgroepen beveiligde kleurstoffen worden nauwelijks geresorbeerd. Voorzover geresorbeerd blijven ze in hun distributie vrijwel uitsluitend beperkt tot het extracellulaire compartiment (een carcinogene werking komt intracellulair tot stand) en worden ze vlot met de urine uitgescheiden. Vermeldenswaard is nog dat de micro-organismen in de darmflora minder kritisch zijn in het opnemen van de zure azokleurstoffen. Door reductie van de azogroepen zetten ze de kleurstoffen om in kleinere molekulen. Een voordeel is dat daarbij de kleur verloren gaat, zodat de excreta niet delen in de 'eye appeal' die kunstmatig aan de gebruikte voedingsmiddelen werd gegeven. Consequentie van een en ander is wel dat in een azokleurstof die bijvoorbeeld opgebouwd is uit drie basiseenheden (door middel van 2 reduceerbare azobindingen) elke eenheid voorzien moet zijn van een dergelijke geïoniseerde, de distributie beperkende groep. Zo dit niet het geval is behoudt de kleurstof zijn potentiële toxiciteit (fig. 6).

Dat ook de celmembraan als zodanig voor geïoniseerde verbindingen een barrière oplevert demonstreert fig. 7. Van organische fosfaten, irreversibele remmers van het enzym acetylcholine-esterase, en wel van een tertiaire base en van een quaternaire ammoniumbase, werd de werking vergeleken. Na behandeling van zenuwweefsel met de tertiaire base blijkt de kleurreactie op het werkzame enzym uit te blijven, zowel in de intra- als in de extracellulaire ruimte. Bij gebruik van de quaternaire ammoniumbase blijft de reactie uit in de extracellulaire ruimte, maar het enzym intracellulair blijft actief. Quaternaire organische fosfaten worden in de oogheelkunde gebruikt om een sterke pupilvernaauwing tot stand te brengen. Het effect berust daarbij op een versterking van de cholinerge parasymphatische innervering van de musculus sphincter pupillae. Het voordeel van deze acetylcholine-esterase-remmers is dat zij in hun distributie zeer beperkt zijn zodat zij bij applicatie in het oog geen andere dan lokale effecten teweegbrengen. Uiteraard zijn ze ongeschikt als insecticiden aangezien ze onvoldoende penetratievermogen hebben. De voor dat

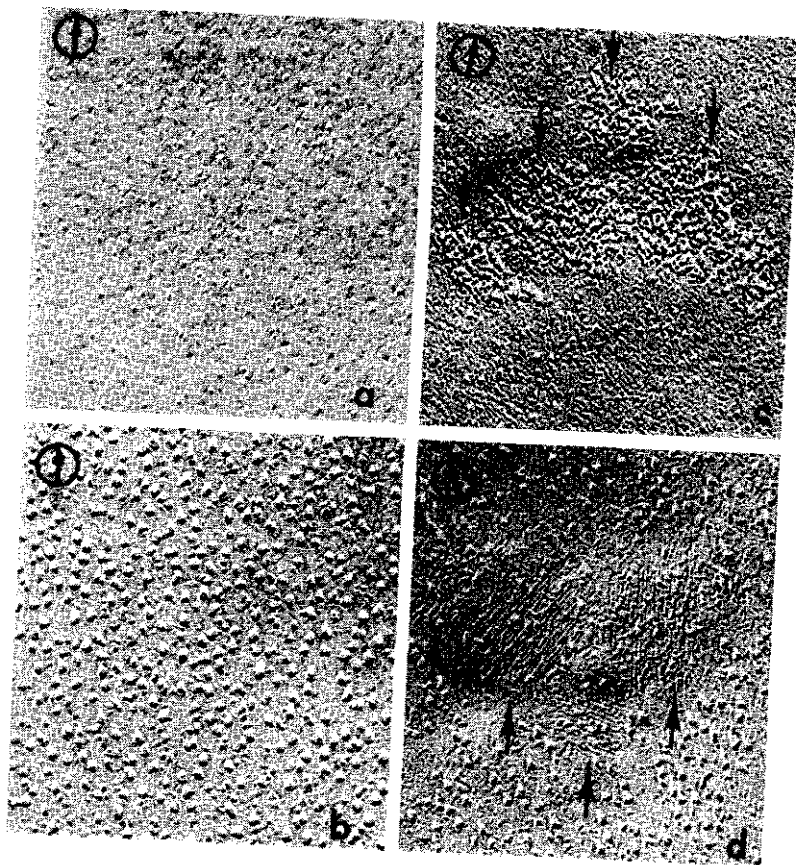
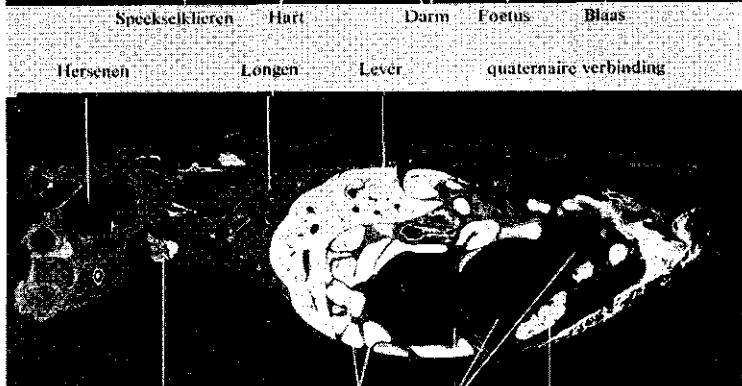
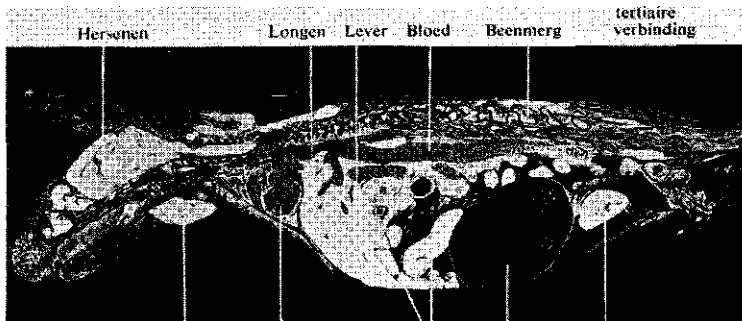
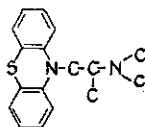


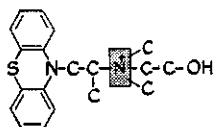
Fig. 4. Elektronenmicroscopische opnamen van de lumenzijde van het blaasepithelmembraan (pad), verkregen door een vriestechneik, waarbij de dubbellaag splijt. De foto's presenteren de splijtvlakken: a en c voor de celzijde en b en d voor de lumenzijde; a en b controle en c en d na blootstellen van de blaas aan antidiuretisch hormoon (ADH). Merk op: Onder invloed van ADH vindt systematische samenballing (aggregatie) van de granules (eiwitmolekulen) plaats. (Naar W. A. Kachadorian, J. B. Wade & V. A. DiScala, 1975, Science N.Y. 190: 67.)



Speekselklieren
Darm
Foetussen
Placenta



promethazine
 sterk sedatief



Aprobit
 geen effect op Centrale Zenuwstelsel

Fig. 5. Een vergelijking van de verdeling van twee antihistaminica, namelijk het tertiaire promethazine (boven) en het quaternaire Aprobit® (onder) beide gemerkt met ³⁵S, na intraveneuze injectie bij de muis. Van het tertiaire amine komen hoge concentraties in hersenweefsel voor, terwijl de quaternaire verbinding niet in het centrale zenuwstelsel kan doordringen. (Naar E. Hansson & G. Schmitterlöw, 1961. Arch. int. Pharmacodyn. Ther. 131: 309.)

doel gebruikte sterk lipofiele organische fosfaten en de eraan verwante 'Nervengase' (chemische wapens) strekken hun toxiciteit uit tot de functie van het centrale zenuwstelsel. Ze zijn dusdanig vetoplosbaar, dat ze ook de huid, eveneens een barrière voor hydrofiele stoffen, gemakkelijk passeren.

In het voorgaande is besproken hoe van de barrièrefunctie van biologische membranen gebruik gemaakt kan worden bij het omzeilen van schadelijke werkingen van stoffen. Wanneer het daarentegen de bedoeling is stoffen, bijvoorbeeld geneesmiddelen, in het organisme te laten penetreren leveren deze barrières problemen op bij toediening van geneesmiddelen met tamelijk hoge wateroplosbaarheid, resp. een lage verdelingscoëfficiënt (verdeling olie/water of ether/water).

Chemische aanpassing gericht op een bevorderen van de distributie

Voor het omzeilen van de verschillende biologische membraanbarrières bestaan verschillende kunstgrepen. Het meest recht toe recht aan is het gebruik van de injectienaald, waarmee men desgewenst zelfs stoffen direct in de liquor cerebros spinalis (het hersenvocht) kan brengen. In dit kader zal echter speciaal aandacht besteed worden aan de verschillende chemische kunstgrepen waardoor stoffen in een voor penetratie van lipofiele membranen meer geschikte vorm gebracht kunnen worden. In de regel betekent dit een aanpassing van de eigenschappen in een meer lipofiele richting – een verhoging van de vetoplosbaarheid dus.

De principes die daarbij worden toegepast berusten op uitschakelen van polaire, in het bijzonder geladen groepen door complexvorming of chemische maskering, bijvoorbeeld:

1. aanpassen van de ionisatiegraad,
2. vormen van ionenparen,
3. vormen van chelaten,
4. insluiten in ionoforen,
5. chemisch maskeren onder covalente binding.

In de volgende secties worden deze principes toegelicht.

Aanpassen van de ionisatiegraad Voor zwakke zuren en zwakke basen is de mate van ionisatie, en daarmee het vermogen tot penetreren van lipide membranen, sterk afhankelijk van de pH. Genoemde stoffen kunnen alleen in de niet-geïoniseerde vorm passeren; de geïoniseerde, geladen vorm wordt niet doorgelaten. De samenhang tus-

sen pH en de mate van ionisatie ligt vast in de pK_a -waarde van de stof en kan worden weergegeven door de vergelijking van Henderson en Hasselbalch.

$$pH = pK_a + \log \frac{[\text{geïoniseerde vorm}]}{[\text{niet-geïoniseerde vorm}]} \quad (\text{voor zuren})$$

$$pH = pK_a + \log \frac{[\text{niet-geïoniseerde vorm}]}{[\text{geïoniseerde vorm}]} \quad (\text{voor basen})$$

De pK_a -waarde is gelijk aan de pH waarbij 50% van de stof in de geïoniseerde vorm aanwezig is. De mate van ionisatie, afhankelijk van de pK_a - en de pH-waarden, heeft zijn invloed op de snelheid van passage van de stof via de membraan, en, bij pH-verschillen aan weerszijden van de membraan ook op de uiteindelijke evenwichtsconcentraties van de stof aan beide zijden van de membraan. In het algemeen is verandering van de pH van de intramurale lichaamsvloei-stoffen slechts binnen enge grenzen toelaatbaar: grotere afwijkingen zijn niet verenigbaar met een normaal verloop van de fysiologische processen. Voor de extramurale vloeistofcompartimenten, dus de inhoud van de maag-darmtractus en de urine, zijn pH-variëaties over een ruimer traject mogelijk. Normaliter is de pH van het maagzuur laag, en aan de maagwand in de orde van pH 2. Bij gebruik van maagzuurneutraliserende middelen (antacida) worden aanzienlijk hogere pH-waarden bereikt. De snelheid van resorptie van zwakke zuren vanuit de maag wordt door het gebruik van antacida verminderd; immers de ionisatie van deze zwakke zuren wordt dan bevorderd. Daarentegen neemt de snelheid van resorptie van zwakke basen, die bij hogere pH-waarden minder geïoniseerd zijn, toe (tabel 5).

Ook de pH van de urine, normaliter circa 5 tot 6, kan onder invloed van alkaliserende stoffen, zoals natriumbicarbonaat (zuiveringszout), en ook van andere geneesmiddelen sterk gewijzigd worden. De terugresorptie van bijvoorbeeld geneesmiddelen vanuit de voorurine (het ultrafiltraat gevormd in de glomerulus) via de wand van de tubuli van het nefron is dan ook sterk afhankelijk van de pH van de urine en uiteraard van de pK_a -waarde van de betrokken stoffen. Bij alkalisieren van de urine zullen zwakke zuren meer gedissocieerd, dus meer geïoniseerd zijn. Dit betekent dat de mogelijkheid tot terugresorptie beperkt wordt en zodoende de uitscheiding met de urine versneld wordt. Dit komt bijvoorbeeld tot uiting bij combinatie van salicylzuur-

preparaten (Aspirine®) met natriumbicarbonaat. De terugresorptie van zwakke basen daarentegen zal door alkaliseren van de urine versterkt worden; er vindt dan een soort recycling plaats (fig. 8).

Aan de hand van enkele situaties vanuit de praktijk laat zich dit nader toelichten. Bij wielrenners werden, ook bij gebruik van niet-

Tabel 5. Resorptie van zuren en basen in de maag (rat) bij pH 1 en pH 8. (Naar B. B. Brodie & C. A. M. Hogben, 1957. J. Pharm. Pharmacol. 9: 345.)

	pK_a	Resorptie bij pH 1 (%)	Resorptie bij pH 8 (%)
Zuren			
5-Sulfosalicylzuur	sterk	0	0
5-Nitrosalicylzuur	2,3	52	16
Salicylzuur	3,0	61	13
Thiopental	7,6	46	34
Basen			
Aniline	4,6	6	56
p-Toluidine	5,3	0	47
Kinine	8,4	0	18
Dextrorfan	9,2	0	16

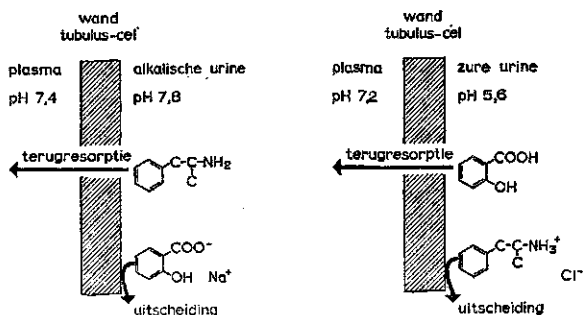


Fig. 8. De invloed van de pH op de passage van zwakke zuren en zwakke basen via membranen, in dit geval de wand van de nierbuisjes (tubuluswand). In de geïoniseerde vorm kunnen de organische molekulen de membraan niet passeren, in de niet-geïoniseerde vorm wel, zodat de pH van de urine door zijn invloed op de mate van ionisatie sterke invloed heeft op de mate van passieve terugresorptie, en zo op de snelheid van uitscheiding van de betrokken stoffen met de urine.

excessieve doseringen van amfetamine als doping, onverwachte ernstige verwardheidstoestanden (psychotische reacties) waargenomen zoals die voorkomen bij sterke overdosering met amfetamine. De betrokken wielrenners bleken naast enkele over de dag verdeelde doseringen amfetamine ook natriumbicarbonaat gebruikt te hebben. Deze laatste stof wordt gebruikt om het melkzuur te neutraliseren dat tijdens de sprint door de spieren massaal aan het bloed afgegeven wordt. De melkzuurvorming en de daarmee samenhangende pH-veranderingen in het plasma spelen namelijk een belangrijke rol bij de acute fysieke vermoeidheidsverschijnselen. De wekaminen nemen het gevoel van vermoeidheid weg bij langdurige, meer op het uithoudingsvermogen gebaseerde inspanning. Het alkaliserende natriumbicarbonaat doet echter ook de pH van de urine stijgen. Het gevolg is een versterkte terugresorptie van amfetamine (zie fig. 8) en, bij herhaald gebruik van doses amfetamine, een ophoping ervan in het organisme tot toxische concentraties. Bij lage pH van de urine is de uitscheiding ervan veel sneller dan normaal, terwijl bij hoge pH van de urine er vrijwel geen uitscheiding is. De idee dat ten gevolge van deze sterk verminderde uitscheiding in de urine ook de dopingcontrole – die zoals bekend, gebaseerd is op het aantonen van de stof in de urine – bemoeilijkt wordt, gaat bij de huidige hoogst gevoelige analysemethoden niet meer op.

Ook op geheel andere gebieden blijkt de invloed van de pH op de passage van zwakke zuren en basen via biologische membranen, bijvoorbeeld op de opnamesnelheid van stoffen via de kieuwen bij vissen (zie fig. 9).

De hier beschreven invloed van de pH op de passage van stoffen via biologische membranen heeft belangrijke consequenties. De werking van geneesmiddelen kan aanzienlijk versterkt of verzwakt worden door gebruik ervan naast stoffen die de pH van de urine wijzigen. Zo treedt een sterke verhoging van die pH op bij gebruik van maagtabletten die natriumbicarbonaat bevatten – zuurbindende middelen – en een verlaging van de pH van de urine bij gebruik van hoge doseringen vitamine C (ascorbinezuur), een zuur dat grotendeels snel en onveranderd in de urine wordt uitgescheiden. Ook bij het onderzoek naar de toelaatbaarheid van pesticiden en andere het milieu, met name het water, verontreinigende stoffen, aan de hand van toxiciteitsonderzoek aan waterdieren – van watervlo tot vis – dient met een sterke invloed van de pH in het milieu rekening gehouden te worden.

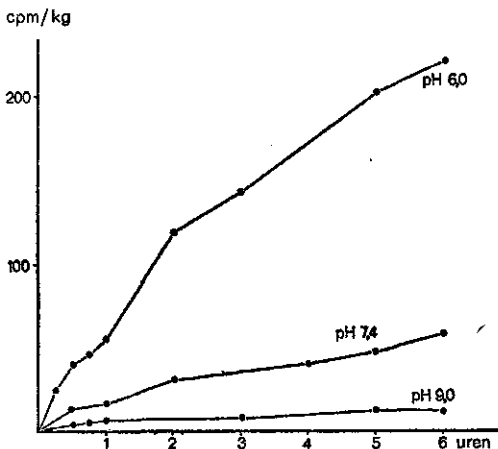


Fig. 9. Opname van een radioactief gemerkt pesticide gericht tegen de lamprei, namelijk 3-trifluoromethyl-4-nitrofenol (TFM- ^3H), 1 mg/l, door de regenboogforel, als functie van de pH in het water. De opname van de zwak zure stof neemt toe bij lage pH (geringe ionisatie van de stof) en neemt af bij hoge pH (sterke ionisatie van de stof) in het milieu. (cpm = counts per minute, tellen per minuut) (Naar J. B. Hunn & J. L. Allen, 1974. *Annu. Rev. Pharmacol.* 14: 47.)

In principe zal transport door een membraan slechts plaatsvinden wanneer er een concentratiegradiënt voor de betrokken stof bestaat; in wezen is dan sprake van transport 'berg-af'. Onder speciale omstandigheden echter is ook passieve diffusie tegen een concentratiegradiënt in mogelijk. Het eenvoudigste voorbeeld is het transport van zwakke zuren of zwakke basen op basis van pH-verschillen aan beide zijden van de membraan. Stel dat een zwakke base wordt ingebracht aan die zijde van de membraan, waar de pH hoog is. De concentratiegradiënt voor de stof in de niet-geïoniseerde vorm bepaalt de richting van het transport. Doordat aan de zijde van de membraan met de lagere pH de niet-geïoniseerde vorm wordt omgezet in de geïoniseerde vorm, blijft de concentratiegradiënt voor de niet-geïoniseerde vorm gehandhaafd, ook wanneer de concentratie van de stof in zijn geheel (dus geïoniseerd plus niet-geïoniseerd) aan de zure zijde oploopt boven die aan de andere zijde. In feite levert hier de H^+ -concentratiegradiënt, het pH-verschil aan beide zijden dus, de energie voor het transport van de zwakke base 'berg-op'. Fig. 10 geeft een en ander

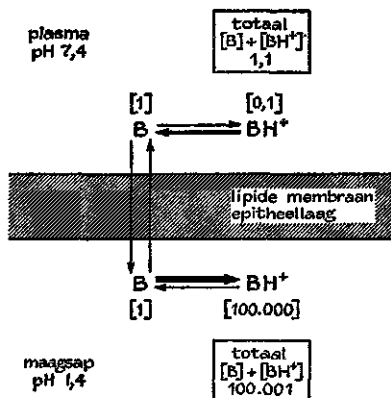


Fig. 10. Verdeling van een zwakke base in de evenwichtstoestand bij een pH-verschil in compartimenten die gescheiden zijn door een lipide membraan. De zwakke base B (pK_a 6,4) hoopt zich op in het compartiment met de lage pH. Dit is een voorbeeld van transport op basis van vrije diffusie tegen een concentratiegradiënt in.

schematisch weer. Na het toedienen per injectie van een zwakke base, bijvoorbeeld morfine, verschijnt de stof in relatief hoge concentratie (circa 40 maal de plasmaconcentratie) in het zure maagsap waar zij in sterke mate geïoniseerd is. Bij transport met de maaginhoud naar de dunne darm wordt in het daar heersende alkalische milieu de ionisatie van de base weer teruggedrongen en vindt resorptie, dus passage naar het plasma plaats. Dit leidt tot wat genoemd wordt de 'gastro-enterale kringloop'. Spoeling van de maag met een zure vloeistof werd wel toegepast voor het versneld elimineren van morfine bij vergiftigingsgevallen.

Op basis van wijziging in de pH in de door biologische membranen gescheiden vloeistofcompartimenten is het dus mogelijk het transport via de membraan en de verdeling van de stof aan beide zijden van de membraan te beïnvloeden. Bij de ontwikkeling van nieuwe biologisch actieve stoffen – een onderdeel van de farmacochemie – kan bij de keuze van de te synthetiseren stoffen uiteraard gestreefd worden naar verbindingen met voor bepaalde doelstellingen optimale pK_a -waarden.

Vormen van ionenparen Terugdringing van de ionisatie van zwakke zuren betekent een associatie van het negatieve zuur-ion en het posi-

tieve H-ion. Naar buiten toe gedraagt het niet-gedissoceerde molecuul zich als ongeladen, terwijl ook de oorspronkelijk om de ionen aanwezige watermantel verdwijnt. Tot op zekere hoogte hiermee vergelijkbaar is de vorming van 'ionenparen'. Door interactie tussen een positief en een negatief geladen molecuul ontstaat een ongeladen produkt, dat mede als gevolg van de afstoting van het hydratatie water meer lipofiel is. Ionenpaarvorming kan zich voordoen tussen bijvoorbeeld organische quaternaire ammoniumbasen en chloride-ionen. De aldus gevormde produkten zijn goed oplosbaar in relatief polaire lipofiele media, bijvoorbeeld chloroform. Ook de lipofiele fase van de celmembraan is niet extreem lipofiel maar heeft een betrekkelijk polair karakter, o.a. door aanwezigheid van cholesterol. Ze is daardoor voor 'ionenparen' doorgankelijk. Ionenparen gevormd uit organische anionen en organische kationen kunnen zeer sterk lipofiel zijn en zijn dan in water niet of nauwelijks meer oplosbaar. Bij de overigens geringe resorptie van quaternaire ammoniumbasen via het darmepitheel is waarschijnlijk ook sprake van ionenpaarvorming tussen de basen en galzuren.

Vormen van chelaten Het vormen van chelaten met behulp van chelaatvormers is een andere mogelijkheid tot verhoging van de vetoplosbaarheid van metaalionen. Chelaatvormers zijn verbindingen met twee of meer geïoniseerde of polaire groepen, de liganden, waarmee ze meerwaardige metaalionen kunnen binden; daarbij verliest het in het chelaat gevangen ion zijn oorspronkelijke eigenschappen (fig. 11). Kwikionen (Hg^{2+}) kunnen vanwege hun lading vrijwel niet door de lipidenlaag van de biologische membranen dringen. Ook de poriën laten nauwelijks passage toe. Het uit kwik en de chelaatvormer dimercaprol (British Anti-Lewisite - BAL) gevormde chelaat is niet geladen en betrekkelijk lipofiel. Zoals te verwachten, bevordert dimercaprol dan ook in hoge mate de penetratie van het kwik als chelaat in het centrale zenuwstelsel. Dit levert geen grote problemen op, aangezien in het chelaat het kwik zijn toxische eigenschappen verloren heeft. Het is echter niet alleen de bedoeling dat de als antidotum gebruikte chelaatvormer het kwik inactiveert, maar ook dat het, waar mogelijk, de uitscheiding ervan bevordert. Bij de bestrijding van vergiftigingen met zware metalen gebruikt men dan ook bij voorkeur chelaatvormers waarin polaire groepen (b.v. COO-groepen) ook na de vorming van het chelaat beschikbaar blijven en zo de wateroplosbaarheid er-

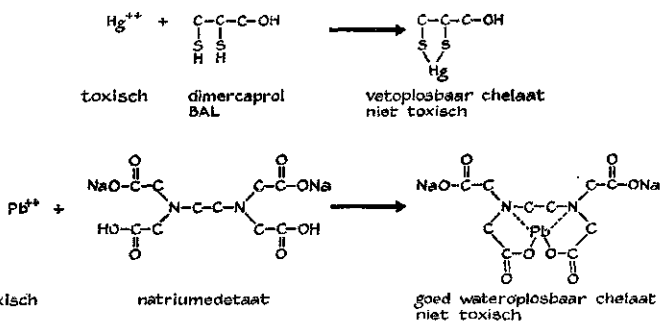


Fig. 11. Twee typen van chelaatvormers: dimercaprol leidt tot de vorming van een vetoplosbaar chelaat, b.v. met kwik; natriumedetaat leidt tot de vorming van een goed wateroplosbaar chelaat, b.v. met Pb.

van handhaven. De hoge wateroplosbaarheid van het chelaat verhindert dan namelijk de penetratie in het centrale zenuwstelsel en in de cel en bevordert de uitscheiding via de nier. Een daarvoor geschikte chelaatvormer is het dinatriumzout van ethyleendiaminetetra-acetaat (EDTA), het natriumedetaat (fig. 11). Door zijn vermogen om lood-ionen te binden vindt het toepassing als tegengifft bij loodvergiftiging. De ontwikkeling van geschikte chelaatvormers voor speciale toepassingen vormt een van de gebieden van actie voor de farmacochemici.

Insluiten in ionoforen Het maskeren van de eigenschappen van ionen kan ook plaatsvinden door vorming van complexen met behulp van ionoforen. Dit zijn meestal ringvormige organische molekulen met naar de binnenzijde gekeerde polaire groepen en naar de buitenzijde gekeerde lipofiele groepen. Binnen de ring is plaats voor opname van ionen, die daar door de polaire groepen gebonden worden. Naar buiten toe manifesteert het aldus ingenestelde ion zich niet meer als zodanig: het ionkarakter gaat verloren. De ionoforen blijven ook na opname van het ion lipofiel. Afhankelijk van de afmeting van de innestelingsruimte binnen de ionoforen vertonen deze een zekere selectiviteit die samenhangt met de afmetingen van de betrokken ionen doorgaans in de gedehydrateerde vorm, dus zonder watermantel. Bij het carrier-gebonden transport van gefoniseerde organische zuren en basen, speelt, maar dan uitsluitend in de celmembranen, waarschijnlijk ook de vorming van complexen zoals ionenparen, chelaten en ion-

ionoforencomplexen een rol. De carrier-molekulen maken daarbij deel uit van de membraan.

Chemisch maskeren onder covalente binding Terwijl er in de voorgaande secties sprake was van eenvoudige complexvorming gericht op het maskeren van geladen groepen, is hier sprake van maskering van geladen en in het algemeen polaire groepen door vorming van een nieuwe chemische verbinding, de 'transportvorm'. Na opname in het organisme moet uit de transportvorm de oorspronkelijke werkzame verbinding weer vrijgemaakt worden door afsplitsing van de maskerende groep. Een dergelijke transportvorm kan men verkrijgen door bijvoorbeeld maskering van carboxylgroepen, die als zodanig door hun ionkarakter penetratie belemmeren, onder vorming van esters. Na penetratie van de barrière, bijvoorbeeld het epitheel van de darmwand, moet dan onder invloed van plasma- of leveresterasen de oorspronkelijke verbinding, het zuur, weer vrijgemaakt worden. Dit principe is veelvuldig toegepast, zowel ten aanzien van farmaca als ten aanzien van andere bioactieve stoffen, zoals insecticiden, fungiciden en onkruidverdelgers. Een sprekend voorbeeld leveren de penicillines. Door wijziging in de chemische structuur van penicilline G – een van de natuurlijke penicillines – is het gelukt stoffen te ontwikkelen met

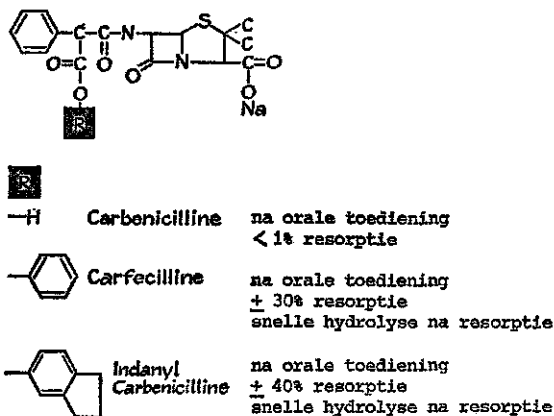


Fig. 12. Carbenicilline, een sterk wateroplosbaar penicillinederivaat en twee meer vetoplosbare derivaten (transportvormen). Na maskeren van een van beide carboxylgroepen verbetert de resorptie na orale toediening aanzienlijk. (Naar L. D. Thrupp, 1974. *Annu. Rev. Pharmacol.* 14: 435.)

een aanzienlijk breder werkingspectrum ten aanzien van ziekteverwekkers. De nieuwe penicillines, ampicilline en carbenicilline, onderscheiden zich van het oorspronkelijke penicilline door een tweede polaire groep. In ampicilline is dit een aminegroep en in carbenicilline een extra carboxylgroep. Terwijl de penicillines vanwege hun zure karakter op zich al matig vanuit de darmtractus geresorbeerd worden, is de resorptie van ampicilline en carbenicilline minimaal. Door op geschikte wijze, door de vorming van bepaalde esters een carboxylgroep te maskeren, zijn derivaten verkregen die na orale toediening redelijk geresorbeerd worden en waaruit na resorptie, deels door plasma-esterasen, deels door leveresterasen, de werkzame verbinding snel vrijkomt. Fig. 12 licht een en ander toe voor het carbenicilline.

Biologische aanpassing van de permeatie van stoffen

Een van de problemen waarvoor op het land levende dieren gesteld zijn, vormt de eliminatie van vetoplosbare lichaamsvreemde stoffen (vetoplosbare xenobiotica) die met de voeding via de wand van de maag-darmtractus het lichaam binnendringen. In het water levende dieren staan in uitwisseling met een vrijwel onbeperkt extramuraal vloeistofcompartiment, het omgevende water. Bij vissen geschiedt die uitwisseling goeddeels via de kieuwen, bij kikkers via de huid. Voor deze dieren levert de uitscheiding van lipofiele stoffen in de regel geen problemen op, ook al is de verdelingscoëfficiënt gunstig ten aanzien van de lipofiele fase binnen het organisme zelf.

Geheel anders ligt de verhouding voor landdieren. Deze beschikken voor de excretie van stoffen slechts over een extramuraal compartiment met een volume dat gelijk is aan de hoeveelheid per dag geproduceerde urine (voor de mens $1-1\frac{1}{2}$ liter). De fractie van een lipofiele stof die met een dergelijk klein volume water geëlimineerd kan worden is naar verhouding zeer gering. Landdieren zijn dan ook in staat om door middel van metabole omzettingprocessen lipofiele xenobiotica door invoering van meer hydrofiele groepen om te zetten in hydrofiele verbindingen. Op deze wijze is ook met het beperkte extramuraal compartiment toch een redelijk snelle eliminatie mogelijk.

Het hydrofiel maken verloopt in de regel in twee stappen: eerst worden door oxydatie polaire groepen ingevoerd, zoals fenolische OH-groepen of carboxylgroepen, en daarna worden deze gekoppeld

met sterk wateroplosbare lichaamseigen molekulen, zoals glucuron-
zuur, sulfaat en glycine. De aldus verkregen koppelingsprodukten zijn
sterk hydrofiel zodat terugresorptie ervan vanuit de voorurine via de
tubuluswand onmogelijk is. Daarbij komt nog dat de zo verkregen
zure stoffen ook geaccepteerd worden door de systemen in de tubu-
luswand die betrokken zijn bij de carrier-gebonden uitscheiding van
stoffen uit het organisme naar de urine. Door het achterwege blijven
van de terugresorptie is de ultrafiltratie dus voor 100% effectief, ter-
wijl daarnaast nog een extra component door carrier-gebonden uit-
scheiding in het geding is. In dit geval introduceert het organisme zelf
in de betrokken stoffen distributie-beperkende en daarmee eliminatie-
bevorderende groepen. De hoge wateroplosbaarheid van de gevormde
stofwisselingsprodukten verhindert ook het binnendringen in de cel
en het passeren van de bloed-hersenbarrière. Hierdoor wordt tevens
het optreden van ongewenste effecten door deze metabolieten beperkt.
Een en ander is schematisch samengevat in fig. 13 en fig. 14.

Interessant in dit verband is dat het vermogen tot het langs bio-
chemische weg hydrofiel, en daarmee 'nierrijp' maken van lichaamsvreemde
stoffen zich in de lijn van de evolutie pas duidelijk ontwik-
kelt bij de overgang van waterdier naar landdier (tabel 6).

De hier geschetste introductie van sterk hydrofiel groepen door
'biologische moleculaire manipulatie' die gericht is op de eliminatie

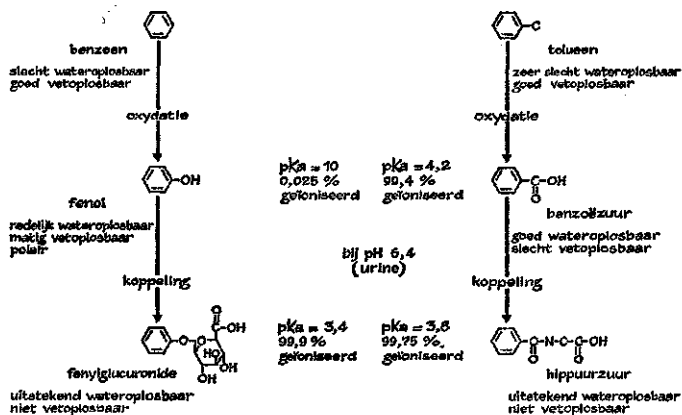


Fig. 13. Het hydrofiel - 'nierrijp' - maken van lichaamsvreemde stoffen (xenobiotica) langs biochemische weg.

Tabel 6. Evolutie en biochemische omzetting van lichaamsvreemde stoffen. Gegevens in $\mu\text{mol/g}$ lever/uur bij overeenkomstige lichaamstemperatuur: 42°C bij vogels, 37°C bij zoogdieren en 25°C bij koudbloedige dieren.

	N-Demethylering (aminofenazon)	p-Hydroxylering (aniline)	Glucuronidering (p-nitrofenol)
Hamster (<i>Mesocricetus auratus</i>)	23	2,8	—
Muis (<i>Mus musculus</i>)	19	5,8	21
Rat (<i>Rattus norvegicus</i>)	15	1,3	46
Kip (<i>Gallus gallus gallus</i>)	10,1	11,0	—
Duif (<i>Columba livia</i>)	26,3	3,74	85
Hagedis (<i>Lacerta viridis</i>)	4,12	1,88	8,9
Kikker (<i>Rana esculenta</i>)	1,61	1,09	1,26
Karper (<i>Cyprinus carpio</i>)	0,86	0,33	2,68
Regenboogforel (<i>Salmo irideus</i>)	1,10	0,35	1,72
Paling (<i>Anguilla anguilla</i>)	2,05	0,39	1,32

De barrièrefunctie van de ultrafiltrerende membraan aan de capillairwand

Nadat in het voorgaande de barrièrefunctie van de celmembraan en de op basis van een dichte celpakking opgebouwde membranen besproken zijn, dient nog kort ingegaan te worden op de membraan die gevormd wordt door het epitheel van de capillairwand (fig. 1). Dit werkt, zoals gezegd, als een ultrafilter dat macromolekulen tegenhoudt. Twee aspecten verdienen hierbij bijzondere aandacht, namelijk:

1. de invloed van de molekuulgrootte op de passage via de capillairwand;
2. de invloed van de binding aan plasma-eiwitten van kleine molekulen op de passage daarvan via de capillairwand.

De invloed van de molekuulgrootte Zoals reeds is aangegeven, worden bij de uitwisseling tussen bloedplasma en weefselvocht (interstitiële vloeistof) de plasma-eiwitten door de membraan in de capillairwand tegengehouden. Ze zijn dus in hun distributie beperkt tot het circulerende volume. De snelheid waarmee macromolekulen uit het plasmacompartiment weglekken, hetzij naar het extracellulaire vocht in de weefsels, hetzij in het kapsel van de nierlichaampjes (de glomerulus) naar de voorurine, wordt bepaald door de afmeting van de molekulen. Het weer opvullen van het vaatstelsel door middel van infusievloeistoffen (zoals na ernstig bloedverlies) heeft slechts zin, indien de ingebrachte vloeistof langere tijd in het vaatstelsel blijft. Om dit te bereiken worden aan de infusievloeistof macromolekulen toegevoegd, bijvoorbeeld grote polysacchariden, in de vorm van dextranen. Deze binden door hun kolloïd-osmotische karakter water en handhaven zodoende het vloeistofvolume in het circulatiesysteem, waarin ze gedurende langere tijd gevangen blijven.

De invloed van de binding aan plasma-eiwitten Wil men het volume van het circulerende bloedplasma bepalen, dan kan zulks gebeuren door een stof intravasaal in te spuiten die zich in zijn verdeling tot het circulatiesysteem beperkt. Men gebruikt daarvoor kleurstoffen die zich in sterke mate hechten aan plasma-eiwitten, zoals Evans blue. Uit de ingebrachte hoeveelheid kleurstof en de plasmaconcentratie die daarmee bereikt wordt kan dan op eenvoudige wijze het plasma-volume berekend worden.

Het plasma-albumine heeft door zijn hoge concentratie een grote capaciteit voor het binden van stoffen. Daarnaast kan het ook een grote variëteit van stoffen binden. Globaal kan men daarbij uitgaan van drie typen bindingsplaatsen voor betrekkelijk lipofiele stoffen: voor neutrale, voor zure en voor basische stoffen. Zodoende kan een grote verscheidenheid van zuren en basische stoffen, met name geneesmiddelen en ook lichaamseigen stoffen, aan albumine gebonden worden. Het albumine kan daardoor beschouwd worden als een soort (circulerende) parkeerplaats voor allerlei stoffen die enerzijds het vermogen hebben om in de cellen door te dringen, en anderzijds minder geschikt zijn om snel met de urine te worden uitgescheiden. De stoffen worden door binding aan het albumine als het ware tijdelijk onschadelijk gemaakt. Alleen de vrije concentratie van de stoffen in het plasma is bepalend voor de concentratie in de weefsels en daarmee

voor de eventuele werking daar.

Het feit dat bepaalde stoffen (b.v. zwakke zuren) bij hun binding aan albumine aangewezen zijn op één bepaald type bindingsplaatsen houdt in, dat tussen dergelijke stoffen onderling competitie voor de bindingsplaatsen en zodoende verdringing kan plaatsvinden. Zo is het mogelijk dat bij een patiënt de bloedstolling-verminderende werking van bepaalde anticoagulantia (zwak zure cumarinederivaten) aanzienlijk toeneemt door gebruik van pijnstillende middelen (analgetica) met eveneens een zwak zuur en lipofiel karakter, zoals fenylobutazon (Butazolidin®). Dit komt omdat het anticoagulans door het analgeticum van het plasma-albumine verdrongen wordt en dan uit het circulatiesysteem kan ontsnappen naar de weefsels waar het zijn werking ontplooit. Dit type van interacties tussen geneesmiddelen met in wezen volslagen verschillende werkingstypen ligt mede ten grondslag aan de 'onverwachte' complicaties die zich kunnen voordoen bij ondeskundig gelijktijdig gebruik van verschillende geneesmiddelen. Op eenvoudige wijze demonstreert figuur 15 een dergelijk fenomeen aan de hand van de binding van een antibacterieel middel (een sulfonamide) aan albumine. De voor de remming van de bacteriële groei benodigde vloeistofconcentratie van het sulfonamide is hoger in aanwezigheid van albumine en in verhouding het sterkst voor sulfonamiden met een hoge vetoplosbaarheid en daarmee een sterke eiwitbinding. Sulfonamiden zijn zwak zure stoffen. Toevoeging van het analgeticum fenylobutazon versterkt de antibacteriële werking van het sulfaethylthiadiazol aanzienlijk, hoewel het analgeticum op zich geen anti-infectieuze werking heeft. In dit geval is het de membraan rondom de bacterie die werkt als ultrafilter: het eiwit en daarmee het aan eiwit gebonden middel wordt niet doorgelaten, maar het antibacteriële middel vrij in oplossing wel.

In dit verband is het nuttig erop te wijzen, dat wanneer van geneesmiddelen concentratieverschillen gevonden worden tussen plasma en het hersenvocht, deze kunnen berusten op verschillende barrières. Voor sterk hydrofiele stoffen is dit meestal de bloed-hersenbarrière met zijn lipofiele karakter, voor meer lipofiele stoffen met hun vaak sterke eiwitbinding is het in de regel het ultrafilter aan de vaatwand. In het laatste geval is de concentratie in het plasma aanzienlijk hoger dan die in het interstitiële vocht. Verdringing van de plasma-eiwitten zal tot een verhoging van de concentratie van de stof in het interstitiële vocht en ook in het hersenvocht leiden. Dit is onder andere het

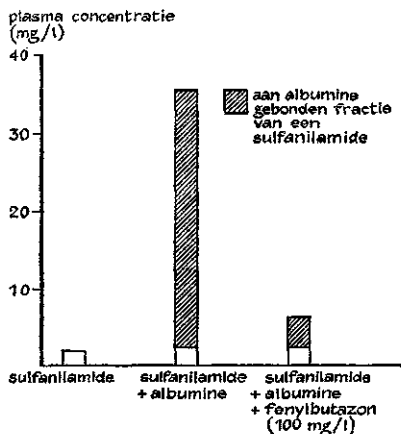


Fig. 15. De plasmaconcentratie van een sulfanilamide (sulfaethylthiadiazol) die nodig is voor 50% groeiremming van micro-organismen. In aanwezigheid van albumine is een aanzienlijk hogere concentratie van het sulfanilamide nodig. De daarbij beschikbare concentratie van het vrije, niet-gebonden sulfanilamide is vrijwel gelijk aan die welke nodig is in afwezigheid van albumine. Fenylbutazon verlaagt de in aanwezigheid van eiwit benodigde concentratie van het sulfanilamide aanzienlijk, en wel door verdringing ervan van het albumine. De vrije, niet-gebonden concentratie is ook nu weer bepalend voor de werking. (Naar H. H. Anton, 1960. *J. Pharmacol. exp. Ther.* 149: 3.)

geval voor bepaalde betrekkelijk lipofiele sulfonamiden en psychofarmaca. In die gevallen dat de bloed-hersensbarrière in het spel is – het betreft dan in de regel goed wateroplosbare stoffen en daarom stoffen met een slechts geringe binding aan plasma-eiwit – zal de concentratie in plasma ongeveer gelijk zijn aan die in het interstitiële vocht, maar die in de hersenvloeistof aanzienlijk lager. Dergelijke verhoudingen doen zich onder andere voor bij quaternaire ammoniumverbindingen zoals curare en bepaalde sterk basische antihypertensiva zoals de guanethidinederivaten.

Besluit

De verschillende typen van membranen in biologische systemen spelen door hun selectieve barrièrefunctie een wezenlijke rol bij het handhaven van de homeostasis in het organisme en zo bij het veilig

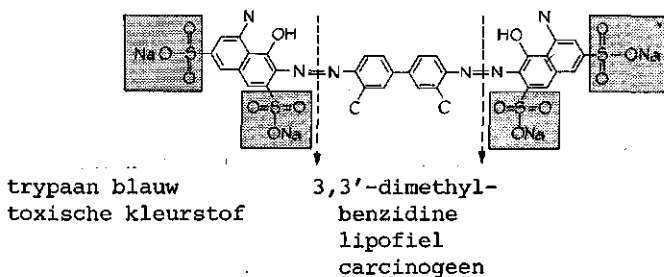
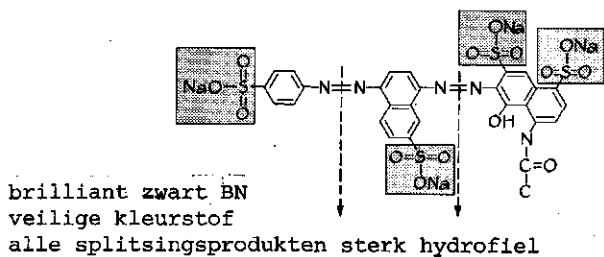


Fig. 6. De reductie van azokleurstoffen onder invloed van de darmflora en de consequentie daarvan voor de toxiciteit. Door de juiste plaatsing van de sterk geïoniseerde sulfonzuurgroepen is brilliant zwart een veilige kleurstof voor toepassing in levensmiddelen. Trypaan blauw levert bij reductie een niet door hydrofiële groepen beveiligd toxisch aromatisch amine.

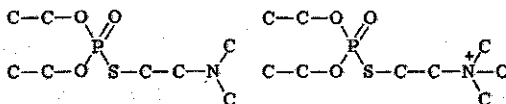
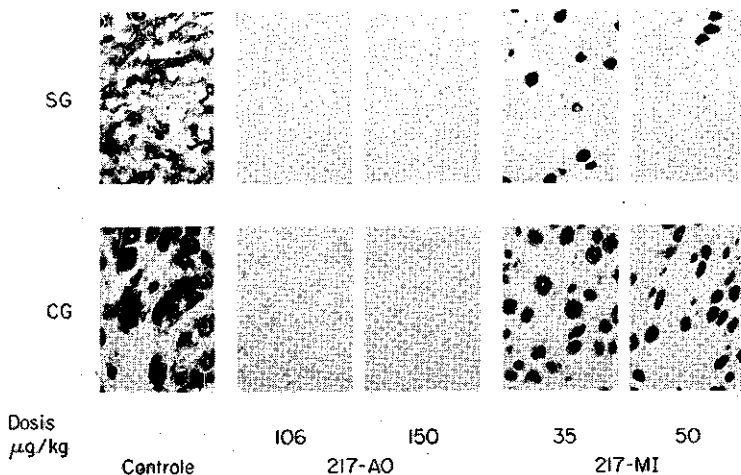


Fig. 7. De distributie van organische fosfaten gedemonstreerd in histologische preparaten van het ganglion stellatum (SG) en ganglion ciliare (CG). De tertiaire base 217-AO is vetoplosbaar en inactieveert het enzym acetylcholine-esterase zodoende zowel binnen als buiten de cellen. De quaternaire ammoniumbase 217-MI kan als gevolg van de sterke ionisatie de celmembraan niet passeren en beperkt zich zodoende in zijn werking tot het extracellulaire acetylcholine-esterase. De aanwezigheid van het vrije, niet-geïnactiveerde enzym verraadt zich door de zwarte kleuring in het preparaat. (Naar R. J. McIsaac & G. B. Koelle, 1959. *J. Pharmacol. exp. Ther.* 126: 9.)

stellen van het verloop van verschillende fysiologische en biochemische processen.

Inzicht in de betekenis van de membranen voor de opname, distributie en uitscheiding van lichaamsvreemde stoffen is wezenlijk voor de biologische wetenschappen in het algemeen en in het bijzonder voor de ontwikkeling van veilige geneesmiddelen en de beveiliging van het leven in ons met chemicaliën te rijk voorziene milieu – twee nauw verwante problemen.

Specifiek transport door biomembranen

J. VAN STEVENINCK

Terwijl de membraan enerzijds een afsluitende functie vervult waardoor een constante samenstelling van het cytoplasma gewaarborgd wordt, moet gelijktijdig een snelle passage van sommige stoffen door deze membraan mogelijk zijn. Het gaat hierbij in eerste instantie om de opname van stoffen die de cel nodig heeft voor haar metabolisme en om de afgifte van afvalprodukten van de stofwisseling. Er zijn evenwel ook talloze transportprocessen via membranen bekend waarbij het om andere fysiologisch belangrijke substanties gaat.

Een biomembraan kan aan deze, ogenschijnlijk tegengestelde eisen slechts voldoen, als in een min of meer ondoorlaatbare basisstructuur systemen zijn ingebouwd die de permeabiliteit voor bepaalde, fysiologisch belangrijke bouwstoffen mogelijk maken. Voor deze vorm van permeabiliteit gebruiken wij de term: specifiek transport. Dit specifiek transport speelt meestal geen rol van betekenis bij de afgifte van afvalprodukten van de stofwisseling. De chemische structuur van de meeste afvalprodukten is dusdanig, dat zij de cel kunnen verlaten via aspecifiek transport, zoals beschreven in het vorige hoofdstuk. Het specifiek transport is wel zeer belangrijk bij de opname van bouwstoffen.

Een speciale plaats nemen in dit verband de intermediaire metabolieten in. Het zou voor de cel zeer inefficiënt zijn, wanneer deze metabolieten de cytoplasmatische membraan makkelijk zouden kunnen passeren. Deze metabolieten hebben een chemische structuur die aspecifiek transport vrijwel onmogelijk maakt, terwijl er in de cytoplasmatische membraan ook geen specifieke transportsystemen voor deze verbindingen worden aangetroffen. Zoals later besproken zal worden, bestaan er in sommige membranen van celorganellen wel specifieke transportsystemen voor dit soort metabolieten. Deze transportsystemen spelen een rol bij de regulatie van het metabolisme van de cel.

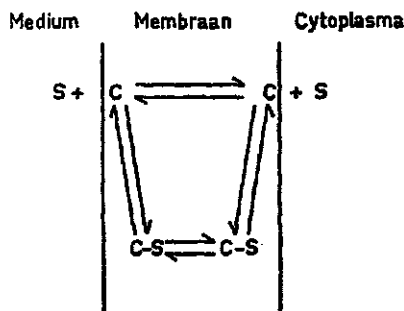


Fig. 1. Schematische voorstelling van transport via een mobiele carrier. Dit schema geeft aan dat zowel de vrije carrier (C) als het carrier-substraat-complex (C-S) door de membraan kunnen bewegen.

In veel gevallen van specifiek transport is het noodzakelijk dat het getransporteerde substraat in de cel een hogere concentratie bereikt dan in het omringende milieu. Aan deze eis moet bijvoorbeeld worden voldaan om sommige enzymatische processen, waarvan de voortgang afhankelijk is van de substraatconcentratie, met voldoende snelheid te doen verlopen.

In de meeste modellen voor specifiek transport stelt men zich voor dat er een reversibele binding optreedt tussen de te transporteren stof (het substraat) en een specifiek molecuul in de membraan, dat doorgaans aangeduid wordt met de term 'carrier'. Deze carrier zou door lokalisatieverandering binnen de membraan het substraat van de ene zijde van de membraan naar de andere zijde transporteren (fig. 1). Dit concept zullen wij in het nu volgende aanhouden, waarbij opgemerkt dient te worden dat het voor de beschouwingen niet essentieel is of de carrier inderdaad een mobiel molecuul, dan wel een immobiel molecuul of zelfs een porie met zeer specifieke eigenschappen zou blijken te zijn (Jung, 1975). Langs thermodynamische weg kan namelijk worden aangetoond dat een immobiele carrier en een specifieke porie precies dezelfde transporteigenschappen kunnen bezitten als de hypothetische, macromoleculaire, mobiele carrier.

Eenvoudig carrier-transport

Het eenvoudigste geval van carrier-transport laat zich als volgt omschrijven. Aan één zijde van de membraan bevindt zich een te trans-

porteren substraat. Dit substraat heeft een zekere affiniteit (K_m) voor de carrier en er zal een binding tussen deze twee molekulen optreden volgens de wet van de massawerking:

$$K_m = \frac{[S][C]}{[C-S]}$$

Na verplaatsing van het carrier-substraat-complex (C-S) door de membraan zal, opnieuw volgens de wet van de massawerking, het substraat aan de andere zijde van de membraan kunnen dissociëren van de carrier. Zolang aan deze zijde van de membraan de substraat-concentratie zeer laag is, zal de carrier vaker als vrije carrier dan als carrier-substraat-complex terugkeren naar de eerste zijde van de membraan, zodat een netto verplaatsing van substraatmolekulen optreedt. De snelheid van dit proces kan theoretisch worden afgeleid uit de wet van de massawerking, uitgaande van de veronderstelling dat de verplaatsing van het carrier-substraat-complex door de membraansubstantie de snelheidbepalende factor is van het gehele proces. Verder moet men aannemen (op goede gronden) dat het aantal carrier-molekulen relatief gering, en ten opzichte van het aantal substraatmolekulen verwaarloosbaar is. De transportsnelheid is dan gelijk aan:

$$v = DC_t \left(\frac{[S_1]}{[S_1] + K_m} - \frac{[S_2]}{[S_2] + K_m} \right) \quad \text{of:} \quad (1)$$

$$v = V_m \left(\frac{[S_1]}{[S_1] + K_m} - \frac{[S_2]}{[S_2] + K_m} \right) \quad (2)$$

waarbij

K_m = de Michaelis-constante van het carrier-substraat-complex,

V_m = de maximale transportsnelheid, C_t = de totale carrier-concentratie,

D = de permeabiliteits-constante van het carrier-substraat-complex,

$[S_1]$ = de substraatconcentratie aan de buitenzijde van de membraan,

$[S_2]$ = de substraatconcentratie in het cytoplasma (Rosenberg & Wilbrandt, 1955).

Na zeer korte tijd is $[S_2]$ verwaarloosbaar klein en kan deze formule dus vereenvoudigd worden tot:

$$v = \frac{V_m[S_1]}{[S_1] + K_m} \quad (3)$$

De sterke verwantschap tussen deze formule en de bekende for-

mule van Michaelis en Menten voor enzymatische reacties valt op en is eenvoudig verklaarbaar. Zowel de carrier als het enzym komen in het systeem voor in een zeer lage concentratie. Bovendien is de werking van de carrier direct vergelijkbaar met die van een enzymmolekuul, met dit verschil dat het effect een translokatie van het substraatmolekuul is, in plaats van een chemische verandering.

Na langere tijd is $[S_2]$ niet meer verwaarloosbaar. De netto transportsnelheid zal dan in de loop van de tijd steeds kleiner worden door het groter worden van de term $[S_2]/([S_2] + K_m)$, in tegenstelling tot wat men ziet bij enzymreacties. Zolang het produkt van een enzymreactie verder chemisch wordt omgezet (hetgeen zeer frequent het geval is) blijft de reactiesnelheid hier lange tijd constant.

Kenmerken van eenvoudig carrier-transport

De typische kenmerken van het eenvoudige carrier-transport laten zich deels uit het voorgaande afleiden. Andere kenmerken werden duidelijk bij detailstudies onder steeds wisselende experimentele omstandigheden. De belangrijkste kenmerken zullen in deze paragraaf besproken worden.

Verzadiging van het transport De relatie tussen de initiële opnamesnelheid (bij verwaarloosbaar kleine $[S_2]$) en de concentratie van de op te nemen stof wordt gekenmerkt door een verzadigingsverschijnsel. Bij voldoende hoge $[S]$ is de initiële opnamesnelheid onafhankelijk van de substraatconcentratie. Formule (2) kan dan namelijk vereenvoudigd worden tot $v = V_m$. Dit verschijnsel staat bekend onder de naam: nulde-orde-kinetiek (fig. 2).

Specificiteit De carrier vertoont een specificiteit voor het te transporteren substraat. Evenals bij enzymen is deze specificiteit soms zeer sterk, soms ook minder sterk uitgesproken. Zo kan bijvoorbeeld bij de meeste vertebraten de carrier in de celmembraan van de erythrocyt die glucose transporteert, eveneens mannose, galactose, arabinose en sorbose, maar niet fructose door de membraan vervoeren (Wilbrandt, 1961). Een hoge mate van specificiteit vertonen vele carriers ten opzichte van sterische isomeren, zoals bij koolhydraten en aminozuren. Het bestuderen van deze specificiteiten kan vaak gegevens opleveren betreffende de interactie tussen de carrier en het substraatmolekuul.

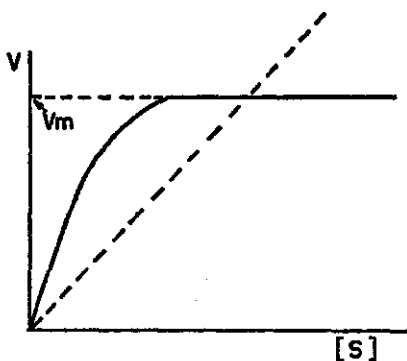


Fig. 2. De relatie tussen de transportsnelheid (V) en de substraatconcentratie ($[S]$) bij eenvoudig carrier-transport. De stippellijn geeft de relatie tussen opnamesnelheid en substraatconcentratie, zoals die verwacht moet worden bij een gewone diffusie. (Voor verklaring van V_m wordt verwezen naar de tekst.)

Men kan bijvoorbeeld vaststellen, welke groepen bij een reeks substraatanalogen beslist aanwezig moeten zijn om een binding aan de carrier mogelijk te maken. Het is dan aannemelijk dat de binding aan het carriermolekuul zal plaatsvinden via één of meer van deze groepen. Ook is het langs deze weg soms aantoonbaar dat het substitueren van een zijketen op een plaats in het substraatmolekuul, die voor de binding zelf niet noodzakelijk is, de binding onmogelijk maakt door sterische factoren.

Competitie tussen substraten Wanneer twee of meer verwante substraten (S en R) door de zelfde carrier getransporteerd kunnen worden, zal tussen deze substraten een competitie waargenomen worden, vergelijkbaar met de competitieve remming bij enzymreacties. De transportkinetiek voor het substraat S wordt dan weergegeven door de relatie:

$$v_s = V_m \left(\frac{S_1'}{S_1' + R_1' + 1} - \frac{S_2'}{S_2' + R_2' + 1} \right) \quad (4)$$

waarin

v_s = de transportsnelheid van S ,

V_m = de maximale transportsnelheid van S ,

$$S_1' = [S_1]/K_{cS}, \quad S_2' = [S_2]/K_{cS},$$

$$R_1' = [R_1]/K_{cR}, \quad R_2' = [R_2]/K_{cR},$$

K_{cS} = de Michaelis-constante van het carrier-S-complex,

K_{cR} = de Michaelis-constante van het carrier-R-complex (Wilbrandt en Rosenberg, 1961).

Voor v_r kan een soortgelijke formule worden opgesteld. Het resultaat zal altijd zijn dat S en R beide worden getransporteerd, maar elk met een geringere snelheid dan wanneer het betreffende substraat alleen (in de zelfde concentratie) aanwezig geweest zou zijn.

Wanneer een micro-organisme verschillende koolhydraten kan gebruiken als koolstof- en energiebron, dan doet zich vaak het verschijnsel van 'diauxie' voor. Dat wil zeggen dat wanneer twee van zulke koolhydraten in het medium aanwezig zijn, wordt waargenomen dat één substraat eerst vrijwel volledig wordt verbruikt, voordat de andere suiker opgenomen en metabool omgezet gaat worden. Deze diauxie kan vaak gedeeltelijk verklaard worden via het transport. Wanneer beide koolhydraten namelijk getransporteerd worden via een gemeenschappelijke carrier en als bovendien de Michaelis-constanten voor de beide substraten ver uit elkaar liggen, dan zal het transport van het substraat met de grootste affiniteit voor de carrier slechts in geringe mate geremd worden. Het transport van het substraat met de kleinste affiniteit zal echter in hoge mate geremd worden. Dit tweede substraat zal pas met redelijke snelheid getransporteerd kunnen worden wanneer het eerste substraat grotendeels is verbruikt. Eén en ander kan kwantitatief worden berekend uit formule (4), wanneer de transportparameters bekend zijn.

Enzymatische processen binnen de cel kunnen echter ook een bijdrage geven tot het optreden van diauxie. Elk geval van diauxie zal dus apart geanalyseerd moeten worden om tot een volledige verklaring te komen.

Niet-competitieve remming Een niet-competitieve remming kan optreden wanneer functioneel belangrijke groepen van de carrier gemodificeerd worden. Zo blijken bijvoorbeeld veel carriers gevoelig te zijn voor uranylzouten en voor stoffen die met SH-groepen kunnen reageren. Daarnaast zijn voorbeelden bekend van zeer specifieke remmingen van één bepaald transportsysteem door één bepaalde remstof. Hiervan zullen later enige voorbeelden genoemd worden. Ook het bestuderen van deze niet-competitieve remmingen is van groot belang

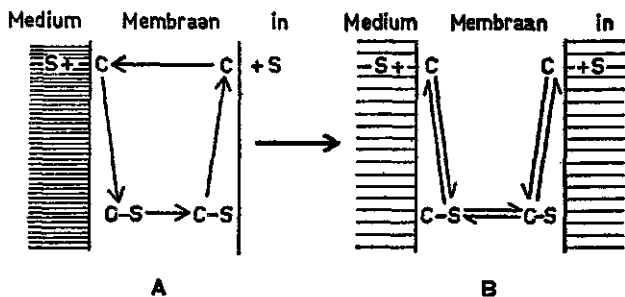


Fig. 3. Schematische voorstelling van carrier-transport, A: kort na toevoegen van het substraat aan het medium; B: na bereiken van een dynamisch evenwicht. De pijlen geven de meest voorkomende carrier-verplaatsingen binnen de membraan weer, onder de verschillende omstandigheden. (C = carrier, S = substraat.)

gebleken voor het verkrijgen van meer inzicht in de aard van de carrier en de carrier-substraatinteractie.

Evenwichtinstelling Er komt na verloop van tijd een dynamisch evenwicht tot stand, namelijk zodra de substraatconcentraties aan beide zijden van de membraan gelijk zijn. Onder die omstandigheden zullen er per tijdseenheid evenveel molekulen de cel in, als de cel uit getransporteerd worden (fig. 3). Dit is direct af te leiden uit de formules (1) en (2): $v = 0$, wanneer $[S_1] = [S_2]$.

Bij hoge substraatconcentraties kan het bereiken van dit evenwicht zeer lang duren, ook als de initiële transportsnelheid groot is. Als namelijk $[S_1]$ zeer veel groter is dan K_m zal zich vrij snel in de cel een substraatconcentratie $[S_2]$ kunnen opbouwen, waarbij $S_1 > S_2 \gg K_m$. Hoewel er dan dus nog lang geen evenwicht bestaat, blijkt uit de formules (1) en (2) dat de netto transportsnelheid v toch reeds een zeer lage waarde heeft bereikt. Zowel de opname als de afgifte vertonen dan het verzadigingsverschijnsel, hoewel $S_1 > S_2$.

Afwezigheid van energiebehoefte Voor dit eenvoudige carrier-transport is geen energie nodig, aangezien het substraat zich beweegt in de richting van zijn concentratiegradiënt, zoals bij een eenvoudige diffusie. Het blijkt dan ook vaak mogelijk te zijn, het metabole apparaat van de cel geheel stil te leggen met specifieke remstoffen, zonder

dat het carrier-transport hierdoor wordt beïnvloed. Gezien de mogelijkheid van niet-competitieve remming van het carrier-transport moet men rekening houden met een mogelijke beïnvloeding van de carrier door de gebruikte remstof: men zou anders tot verkeerde conclusies kunnen komen.

Genetische controle De carriertransport-systemen staan onder genetische controle, zoals bij studies met micro-organismen duidelijk blijkt. Bij veel giststammen bijvoorbeeld wordt in hoofdzaak glucose gebruikt als energie- en koolstofbron. Deze giststammen kunnen maltose niet metabool omzetten en bovendien niet transporteren. Wanneer de cellen echter gedurende langere tijd geïncubeerd worden in een voedingsmedium dat maltose bevat als enige koolstofbron, dan vormen de cellen door inductie zowel een transportsysteem voor maltose, als ook het enzym α -glucosidase. Na deze inductie kan maltose wel als koolstof- en energiebron door de cellen gebruikt worden.

Belangrijker voor de bestudering van transportprocessen is het feit, dat veel mutanten van micro-organismen geïsoleerd en gekweekt kunnen worden, die bepaalde, normaliter wel aanwezige transportprocessen niet vertonen. Vooral bij de bestudering van de ingewikkelder transportsystemen die later zullen worden besproken, bleken deze mutanten van grote waarde te zijn voor het verkrijgen van een beter inzicht in de zich afspelende processen.

Men kan a priori vermoeden dat ook bij de mens aangeboren, erfelijke ziekten zullen voorkomen, waarbij de pathogenese berust op een genetisch bepaald defect in een fysiologisch belangrijk transportsysteem. Dit blijkt inderdaad het geval te zijn. Als voorbeeld kan genoemd worden de 'glucose-galactose malabsorption', waarbij de ziekteverschijnselen blijken te berusten op een sterk verminderde opname van glucose en galactose vanuit de darm, en op een verminderde opname van glucose vanuit de niertubuli. Alles wijst er op, dat hier sprake is van een genetisch defect van het transportsysteem voor suikers in de darm en de nier, zonder dat andere weefsels zijn aangetast. Dit laatste is niet zo verwonderlijk, aangezien bekend is dat in de darm en de nier het koolhydraattransport-systeem anders is geconstrueerd als in de andere weefsels van het lichaam (Meeuwisse, 1970).

In feite hebben alle tot nu toe beschreven erfelijke ziekten die berusten op een transportdefect betrekking op darm- of niertransport. Genoemd kunnen nog worden de renale glucosurie, renale rachitis,

de ziekte van Hartnup en een reeks andere erfelijke ziekten die berusten op een aminozuurtransport-stoornis (Crawhall, 1972). Het kan op toeval berusten dat genetisch bepaalde transportdefecten in andere organen nog niet zijn gevonden. Het is echter ook mogelijk dat zulke defecten geen overlevingskansen bieden voor het getroffen individu.

Counter-transport Wanneer twee substraten aanwezig zijn die door de zelfde carrier getransporteerd kunnen worden kan zich het verschijnsel van counter-transport voordoen. Dit verschijnsel laat zich het eenvoudigst als volgt omschrijven. Aan een cel wordt een transporteerbaar substraat S toegevoegd. Men wacht tot zich een dynamisch evenwicht heeft ingesteld, waarbij $[S_1] = [S_2]$. Nu wordt een tweede substraat R in een relatief hoge concentratie toegevoegd. Als dit tweede substraat met de zelfde carrier getransporteerd kan worden, zal aan de buitenzijde van de membraan een competitie tussen S en R voor deze carrier ontstaan. Het substraat R zal naar binnen gaan, waardoor de hoeveelheid S die per tijdseenheid wordt getransporteerd als gevolg van de competitie geringer wordt. Zolang de concentratie van R binnen de cel nog zeer klein is, zal aan de binnenzijde van de membraan geen, of slechts een zeer geringe competitie bestaan ten aanzien van S. De hoeveelheid S die per tijdseenheid naar buiten gaat zal daarom in het begin vrijwel onveranderd blijven. Het gevolg is een netto transport van S naar buiten, tegen de concentratiegradiënt in, en een netto transport van R naar binnen, in de richting van zijn concentratiegradiënt.

Deze gang van zaken kan ook afgeleid worden uit formule (4). Uitgaande van de situatie $[R_1] = [R_2] = 0$ en $[S_1] = [S_2] \neq 0$, dus $v_s = 0$, wordt R aan de buitenzijde van de cel toegevoegd. Nu heeft $[R_1]$, dus ook R_1' , een bepaalde, positieve waarde, terwijl R_2' eerst nul en even later zeer klein is. De tweede term van het rechter lid van formule (4) zal dus groter zijn dan de eerste, zodat v_s een negatieve waarde krijgt. Dit betekent een netto transport van S naar buiten, dus counter-transport.

Na langere tijd zal zich meestal weer een nieuw evenwicht instellen waarbij $[R_1] = [R_2]$ en $[S_1] = [S_2]$. Het counter-transport is dus van voorbijgaande aard, tenzij er een dynamisch evenwicht ontstaat waarbij $[R_1]$ steeds groter blijft dan $[R_2]$. Dit is bijvoorbeeld het geval wanneer het substraat R in de cel metabool wordt omgezet in andere verbindingen, die geen affiniteit bezitten voor de carrier.

Het is bij dit soort experimenten niet noodzakelijk dat S en R verschillende substraten zijn. Het is ook mogelijk dat S bijvoorbeeld de radioactief gemerkte vorm van R is. Op deze wijze wordt, als gevolg van counter-transport, het meeste radioactief gemerkte substraat uit de cellen verwijderd, na toevoeging van een overmaat niet-radioactief gemerkt substraat aan het medium.

Antiport-systemen

Bepaalde transportverschijnselen die vaak optreden in de membraan van celorganellen en een belangrijke rol spelen in de metabole regulatie mechanismen van de cel doen sterk denken aan counter-transport. In de membraan van mitochondriën komt bijvoorbeeld een carrier-systeem voor dat voor elk molecuul ADP dat het mitochondrion ingaat, één molecuul ATP naar buiten verplaatst. De fysiologische betekenis van deze translokator is duidelijk wanneer men bedenkt dat de ATP-synthese plaatsvindt binnen de mitochondriën, terwijl de omzetting van ATP in ADP grotendeels gebeurt buiten dit celorganel. Deze vorm van carrier-transport wordt ook wel aangeduid met de term: antiport. Soortgelijke transportsystemen spelen een rol bij de regulatie van de NADH-concentratie in het cytoplasma. NADH zelf kan de membraan van het mitochondrion niet passeren, maar langs

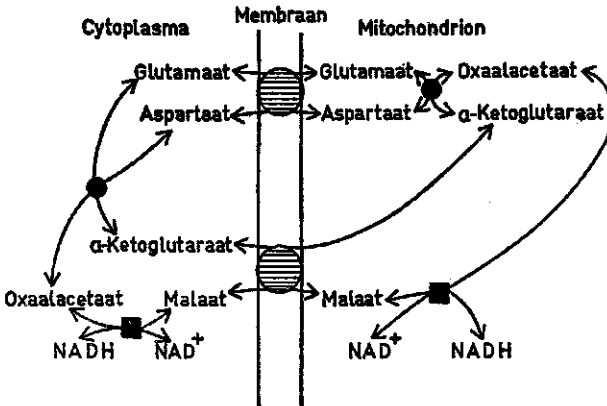


Fig. 4. Schematische weergave van de malaat-aspartaat-shuttle over de membraan van het mitochondrion. ■: malaat-dehydrogenase; ●: aspartaat-transaminase.

indirecte weg is er een nauwkeurige regulering van de NAD^+ - en NADH -concentraties binnen de mitochondriën en in het cytoplasma mogelijk. Als voorbeeld kan genoemd worden de zogenaamde malaat-aspartaat-shuttle, waarbij twee carriers in de membraan van het mitochondrion betrokken zijn, die elk een één op één uitwisseling van substraat-anionen mogelijk maken. De ene carrier verzorgt een uitwisseling van glutamaat tegen aspartaat, de andere van α -ketoglutaaraat tegen malaat. Deze twee uitwisselingen kunnen in beide richtingen plaatsvinden. Het systeem is schematisch weergegeven in fig. 4. Wanneer in het cytoplasma veel NADH geoxideerd wordt (via de enzymatische omzetting van oxaal-acetaat in malaat), dan zal malaat via één van de carriers uitgewisseld worden tegen α -ketoglutaaraat uit de mitochondriën. Het α -ketoglutaaraat wordt in het cytoplasma omgezet tot glutamaat, terwijl het malaat in de mitochondria wordt omgezet tot aspartaat, onder de vorming van NADH . Het gevormde aspartaat wordt uitgewisseld tegen glutamaat, waarna de cyclus verder kan verlopen. Wanneer in het cytoplasma daarentegen een sterke reductie van NAD^+ tot NADH plaatsvindt, werkt het malaat-aspartaat-shuttle-systeem in de tegenovergestelde richting, omdat de concentratieverhoudingen van de substraat-anionen dan precies omgekeerd komen te liggen.

In de membraan van de mitochondriën blijken een aantal van dit soort carrier-systemen te bestaan die een één op één uitwisseling van substraat-anionen kunnen verzorgen (Brouwer et al., 1973). Een aantal van deze carrieruitwisseling-systemen is weergegeven in fig. 5. Het lijkt zeer waarschijnlijk dat deze translokators, die tijdens het functioneren geen energie verbruiken, een belangrijke rol spelen bij de regulatie van het metabolisme van de cel.

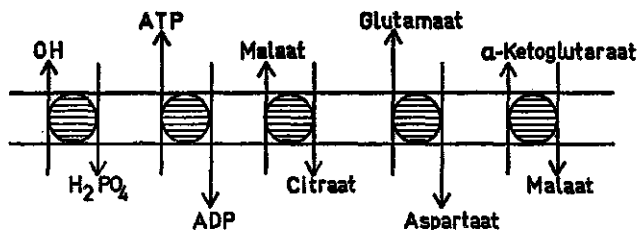


Fig. 5. Enkele belangrijke anion-antiport-carriers in de membraan van het mitochondrion. Deze uitwisseling kan in beide richtingen verlopen, afhankelijk van de concentratiegradiënten van de betreffende metabolieten.

Complicerende factoren

Bij de tot nu toe besproken kinetiek van het carrier-transport is er van uitgegaan dat de carrier zich op één of andere manier heen en weer beweegt tussen de twee zijden van de membraan, waarbij het voor de mobiliteit niet van belang zou zijn of de carrier in de vrije vorm, dan wel beladen met een substraatmolekuul is. Deze simplificatie is niet altijd gerechtvaardigd. Er zijn voor sommige carrier-systemen aanwijzingen, dat de bewegingssnelheden van de vrije carrier en van het carrier-substraat-complex verschillend zijn. Als de carrier meer dan één molekuulsoort kan transporteren, kan de bewegingssnelheid van het complex ook nog afhangen van de aard van het gebonden substraat. De kinetiek van het carrier-transport wordt hierdoor veel gecompliceerder, zoals o.a. is uiteengezet door Kotyk (1967). Met behulp van de door deze auteur uitgewerkte kinetische analyses kan men de verhouding van de bewegingssnelheden van de vrije en de beladen carrier experimenteel vaststellen.

Het lijkt aannemelijk, dat deze situatie zich in de praktijk vrij vaak zal voordoen. De beweeglijkheid van een molekuul, dus ook van een carrier, in de visceuze massa van de membraan zal zeker medebepaald worden door allerlei sterische factoren. Het is hierbij niet essentieel of het carrier-molekuul zich werkelijk verplaatst, of alleen een oriëntatie verandering ondergaat. Een conformatieverandering binnen het carrier-molekuul zal dan dus invloed kunnen hebben op die beweeglijkheid. Met verschillende technieken is aangetoond dat sommige, bij het transport betrokken eiwitmolekulen inderdaad een conformatieverandering ondergaan als gevolg van substraatbinding (Parsons & Hogg, 1974).

Hoewel dit nog niet in detail is bestudeerd, is het zeer wel denkbaar dat met name bij antiport systemen de vrije carrier zich niet, of zeer moeilijk door de membraan kan verplaatsen. Dit zou een strikte één-op-één-uitwisseling van substraatanionen waarborgen, zonder netto transport in één van beide richtingen.

Verder is er van uitgegaan dat de dissociatieconstante K_m van het carrier-substraat-complex aan beide zijden van het membraan gelijk is. Als dit niet het geval zou zijn, zou dit leiden tot een evenwichts-situatie waarbij de substraatconcentraties aan beide zijden van de membraan niet gelijk zijn. Dit volgt direct uit de formules (1) en (2):

wanneer de waarden van K_m in de beide termen niet gelijk zijn, zal v gelijk aan nul worden bij een concentratieverhouding waarbij $S_1 \neq S_2$.

Dit speelt duidelijk een rol bij die transporten waarbij een koppeling aanwezig is met energieleverende systemen. Echter ook zonder een dergelijke koppeling kan een asymmetrische substraatverdeling tot stand komen op grond van verschillende dissociatieconstanten aan beide zijden van de membraan. Hierop zal later teruggekomen worden. Eerst zullen wij nu echter aandacht besteden aan die transport systemen waarbij een koppeling met energieleverende systemen aanwezig is.

Energiekoppeling

Om een stof te verplaatsen tegen zijn concentratiegradiënt in is energie nodig:

$$\Delta G = RT \ln \frac{C_2}{C_1} + ZF\Delta\psi \quad (5)$$

waarin

ΔG = de verandering van de vrije energie van het systeem,

Z = het aantal ladingen per getransporteerd molecuul,

F = de Faraday-constante,

$\Delta\psi$ = de elektrische potentiaal over de membraan,

C_1 en C_2 = de substraatconcentraties aan beide zijden van het membraan.

Voor ongeladen molekulen is uiteraard de tweede term van het rechter lid gelijk aan nul.

Om dus tot een aanzienlijke accumulatie van een substraat in de cel te komen, zal energie aan het transportsysteem moeten worden toegevoegd. Overigens zal blijken dat niet bij elk transportsysteem waaraan energie wordt toegevoegd, een transport tegen de concentratiegradiënt in wordt waargenomen.

Bij deze transportsystemen moeten twee fundamentele regels in de beschouwingen worden betrokken, die altijd opgaan wanneer in de levende cel een energie koppeling tot stand wordt gebracht. De eerste regel luidt, dat als een energie-leverend proces in de cel gekoppeld is aan een energie-verbruikend proces, deze twee processen een gemeenschappelijke intermediair moeten bezitten. De tweede regel omhelst dat de levende cel in eerste instantie chemische energie levert en verbruikt, meestal in de vorm van ATP of een andere energierijke fos-

faatverbinding.

Deze twee grondregels zullen wij nu verder beschouwen aan de hand van een aantal voorbeelden van energie-gekoppeld carrier-transport. Er zal daarbij niet worden gestreefd naar een zo volledig mogelijke opsomming van alle tot nu toe bekende energie-gekoppelde transportsystemen. Het is in dit kader belangrijker om de nadruk te leggen op de verschillende manieren waarop de energiekoppeling door de cel tot stand kan worden gebracht en op de manier waarop de geïnvesteerde energie door de cel benut wordt.

Membraan-(Na⁺ + K⁺)-ATPase Binnen de cellen van de meeste vertebraten bestaat een hoge kaliumionen- en een lage natriumionen-concentratie, terwijl de concentratie verhouding in het omringende weefselvocht precies omgekeerd is. De energie die nodig is voor het opbouwen en handhaven van deze concentratiegradiënten wordt geleverd via een, in de membraan gelokaliseerd, ATP-afbrekend systeem, de zogenaamde membraan-(Na⁺ + K⁺)-ATPase. De chemische energie die vrijkomt bij de hydrolyse van ATP tot ADP en orthofosfaat, wordt gebruikt voor het gelijktijdig transport van natriumionen naar buiten en kaliumionen naar binnen. Wat zich afspeelt op moleculair niveau, wordt weergegeven in fig. 6.

De carrier kan aan de binnenzijde van de membraan natriumionen en aan de buitenzijde kaliumionen binden. Deze binding vindt plaats in willekeurige volgorde: voor het goed functioneren van het systeem blijkt het niet van belang te zijn welk ion het eerst gebonden wordt. Dit betekent overigens dat de afmetingen van het totale systeem de dikte van de lipidendubbellaag moeten overtreffen. Na de ionbinding wordt het complex vervolgens met behulp van ATP gefosforyleerd. Voor deze stap zijn ook magnesiumionen nodig. Deze fosforylering veroorzaakt een gecompliceerde verandering in de ruimtelijke orde-

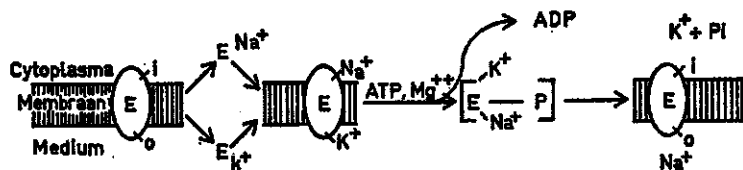


Fig. 6. Schematische weergave van de bouw en werking van het membraan-(Na⁺ + K⁺)-ATPase systeem. (Naar Whittam & Chipperfield, 1973.)

ning van het complex. De natriumbindingsplaats (en daarmee het gebonden natriumion) verschuift van de binnenzijde naar de buitenzijde van de membraan, terwijl de kaliumbindingsplaats een omgekeerde lokalisatieverandering ondergaat. In een complexe, nog niet geheel opgehelderde reactie wordt het complex nu weer gedefosforyleerd, waarbij de affiniteit van de kation-bindingsplaatsen bovendien veel geringer wordt, zodat de natrium- en kaliumionen dissociëren van het complex. Door de voorafgaande verandering in de ruimtelijke ordening vindt deze dissociatie echter plaats aan de andere zijde van de membraan als waar de ionen oorspronkelijk gebonden werden. Het hele systeem komt nu weer terug in de oorspronkelijke ruimtelijke ordening.

Bij dit systeem is het dus duidelijk dat de mobiliteit van de carrier niet gezien kan worden als een soort diffusie door de membraan-substantie. Het systeem, dat gelijktijdig in direct contact staat zowel met het cytoplasma als met het omringende medium, volbrengt zijn transportfunctie door een ruimtelijke heroriëntatie, die cyclisch verloopt door energiekoppeling via ATP.

De membraan-(Na⁺ + K⁺)-ATPase wordt selectief sterk geremd door ouabaine. Het bestuderen van deze remming in al zijn facetten heeft veel bijgedragen tot een beter begrip van de functie van dit fysiologisch belangrijke transportsysteem. De kwalitatief en kwantitatief analoge invloed van ouabaine op de ATP-splitsende werking en op het kationtransport is zelfs een belangrijke sleutel geweest voor het vaststellen van de transportfunctie van deze ATPase.

Uit fig. 6 blijkt dat de energie die nodig is voor het opbouwen van de kalium- en natriumgradiënten geleverd wordt door het metabolisme van de cel, waarbij ATP zelf optreedt als gemeenschappelijke intermediair tussen de energie-leverende en de energie-verbruikende reactie. De ATP is slechts dan bruikbaar voor het systeem, wanneer het aangeboden wordt aan de binnenzijde van de membraan. Ook dit demonstreert de hoge mate van ordening die binnen het systeem bestaat. De membraan zelf is ondoorlaatbaar voor ATP.

Het fosfotransferase-systeem De accumulatie van sommige suikers in bacteriën verloopt via het door Roseman en medewerkers beschreven fosfotransferase systeem (zie bijvoorbeeld Simoni et al., 1973). Als gemeenschappelijke intermediair tussen de energie-leverende en energie-verbruikende reacties treedt hier niet ATP, maar fosfo-enol-

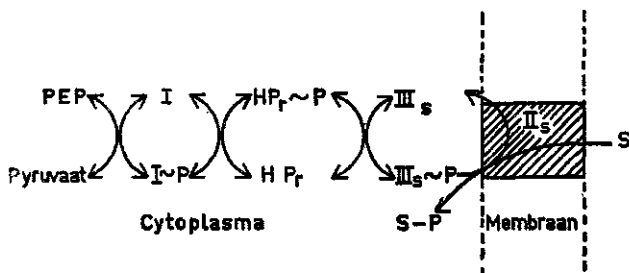


Fig. 7. Het fosfotransferase-systeem voor koolhydraattransport in bacteriën. (De gebruikte symbolen worden in de tekst verklaard.)

pyruvaat op. Bij dit transportproces zijn een aantal cytoplasmatische, en één membraan-gebonden eiwit betrokken, volgens het schema gegeven in fig. 7.

Enzym I wordt gefosforyleerd door fosfo-enolpyruvaat (PEP), terwijl het gefosforyleerde enzym I op zijn beurt de fosfaatgroep overdraagt aan HPr, een warmtestabiel cytoplasmatisch eiwit. Dit proces is in twee opzichten merkwaardig. In de eerste plaats is dit het eerst beschreven voorbeeld van de fosforylering van een eiwit, waarbij fosfo-enolpyruvaat optreedt als fosfaatdonor. De tweede merkwaardige bevinding is, dat het HPr-molekuul, dat een moleculair gewicht heeft van slechts 9400, gefosforyleerd wordt aan de imidazolring van een histidineresidu.

Vervolgens wordt de fosfaatgroep via enzym III_s en enzym II_s overgedragen op de te transporteren suiker, die dan als gefosforyleerd derivaat vrijkomt in het cytoplasma.

In de bacteriële membraan bevinden zich verscheidene soorten enzym II, elk specifiek voor een bepaalde suiker. Een zelfde specificiteit geldt ten aanzien van enzym III: voor de fosforylering van elke suiker via zijn specifieke enzym II komt een specifiek enzym III in de cel voor.

Wanneer in een bepaalde mutant één soort enzym II of enzym III niet gevormd wordt, kan de betreffende mutant één bepaalde suiker niet transporteren. Dit soort mutanten is gevonden en uitvoerig bestudeerd. Een dergelijke specificiteit bestaat, zoals we gezien hebben, niet ten aanzien van de cytoplasmatische factoren enzym I en HPr: deze zijn identiek voor de verschillende transportsystemen die deze

energiekoppeling bezitten. Als een mutant één van deze componenten mist zal een reeks suikers niet getransporteerd kunnen worden. Deze mutanten groeien niet of zeer slecht indien een suiker die getransporteerd wordt via dit fosfotransferase-systeem als enige koolstof- en energiebron in het medium aanwezig is. Dergelijke mutanten zijn o.a. beschreven door Hengstenberg et al. (1969).

Het is duidelijk dat deze gecompliceerde constructie van het systeem een controle van het transport inhoudt. In de eerste plaats is het transport van elke suiker afzonderlijk afhankelijk van cellulair fosfoenolpyruvaat. De concentratie van deze verbinding in het cytoplasma zal dus invloed kunnen uitoefenen op de transportsnelheid. Als verscheidene suikers in het medium aanwezig zijn zal het transport van elk van deze suikers afhankelijk zijn van fosfoenolpyruvaat, enzym I en HPr. Hoewel elk van de suikers uiteindelijk getransporteerd wordt via een eigen, specifiek enzym II zal er tussen deze suikers toch een competitie voor transport kunnen optreden. Deze competitie speelt zich echter in dit geval niet af op het niveau van competitie voor een gemeenschappelijke carrier, maar op het niveau van competitie voor de energiekoppeling via de gemeenschappelijke factoren enzym I en HPr. De kinetiek bij deze vorm van competitie wordt dan ook niet weergegeven door formule (4). Een goede analyse van deze kinetiek, waarbij vooral de affiniteiten van de verschillende enzymen III voor de fosfaatgroep van het HPr een rol spelen, is nog niet uitgewerkt.

Een belangrijk fenomeen valt bij dit fosfotransferase-systeem direct op. Hoewel een koppeling met energieleverende reacties via fosfoenolpyruvaat aanwezig is, treedt hier geen transport van het substraat op tegen een concentratiegradiënt in. Wat zich in de cel ophoopt is niet de vrije suiker, zoals aanwezig in het omringende medium, maar de gefosforyleerde vorm van deze suiker. Het transportsysteem levert uiteindelijk wel een zeer steile concentratiegradiënt op, namelijk van suiker-fosfaat, waarvan de concentratie in het medium nul of verwaarloosbaar is. Of er ook voor de vrije suiker een concentratiegradiënt zal ontstaan, hangt af van wat er verder in de cel gebeurt. Wordt het suiker-fosfaat voor een zeker gedeelte gedefosforyleerd, dan kan dit inderdaad het geval zijn. Deze concentratiegradiënt wordt dan echter niet door het transportproces, maar door secundaire reacties in de cel bewerkstelligd.

Als wij dit systeem tenslotte beschouwen vanuit een energie-econo-

misch gezichtspunt dan moet geconstateerd worden dat het systeem zeer efficiënt is. Voor de noodzakelijke accumulatie van de suiker in de cel is energie nodig, die geleverd wordt door een energierijke fosfaatverbinding: fosfo-enolpyruvaat. Als het nu gaat om een metaboliseerbare suiker, dan is de eerste stap die nodig is voor de katabole omzetting een fosforylering van het molecuul, hetgeen normaliter ten koste gaat van de hydrolyse van een ATP-molecuul. In dit systeem worden beide stappen gecombineerd: de hydrolyse van fosfo-enolpyruvaat, die de intracellulaire accumulatie mogelijk maakt, verzorgt ook de initiële fosforylering van het substraat. Bij metaboliseerbare suikers kost het transport dus in feite geen extra energie.

Suikertransport in gist Een soortgelijke transportgebonden fosforylering van suikers treedt op in sommige giststammen (Jaspers & Van Steveninck, 1975). Eén van de beste aanwijzingen hiervoor vindt men in isotooppuls-proeven. Hierbij incubeert men de cellen eerst enige tijd met een bepaalde suiker, bijvoorbeeld 2-deoxy-D-glucose. Deze suiker wordt in de gistcel niet metabool afgebroken, wat als voordeel heeft dat de experimentele resultaten beter interpreteerbaar zijn dan bij gebruik van bijvoorbeeld glucose. Er ontstaat een evenwichtssituatie, waarbij in de cel zowel vrije als gefosforyleerde 2-deoxy-D-glucose aangetoond kunnen worden. Aangezien de vrije suiker in de cel een aanzienlijk hogere concentratie bereikt dan de suiker in het medium, moet hier weer sprake zijn van een energie-gekoppeld proces. Dit blijkt ook uit het feit, dat uitschakeling van het metabolisme leidt tot een zeer sterke remming van het transport. Na instelling van een evenwicht voegt men een chemisch verwaarloosbare hoeveelheid, met ^{14}C -gemerkte 2-deoxy-D-glucose aan het medium toe. Het blijkt dan, dat de radioactiviteit eerst sterk stijgt in de intracellulaire 2-deoxy-D-glucose-6-fosfaat-fractie, en pas daarna in de intracellulaire vrije 2-deoxy-D-glucose fractie (fig. 8). Dit is alleen verklaarbaar als de getransporteerde suiker, die nu met ^{14}C gemerkt is, aan de binnenzijde van de membraan vrijkomt als 2-deoxy-D-glucose-6-fosfaat (zoals bij het fosfotransferase-systeem), om daarna in het cytoplasma gedeeltelijk gedefosforyleerd te worden.

Hoewel dit transportsysteem nog niet in detail bekend is, zijn er duidelijke aanwijzingen dat de koppeling met energieleverende processen hier plaatsvindt via energierijk, anorganisch polyfosfaat, dat gelokaliseerd is buiten de cytoplasmatische membraan (Van Steveninck

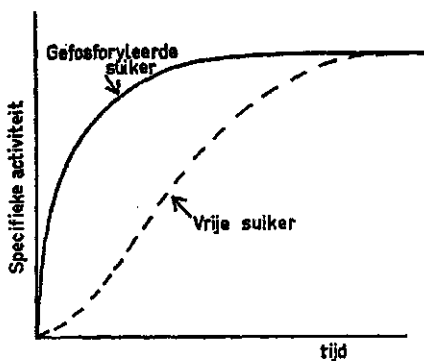


Fig. 8. Het verloop van de specifieke activiteit in de intracellulaire fracties van 2-deoxy-D-glucose-6-fosfaat en vrije 2-deoxy-D-glucose, na toevoegen van een puls dosis ^{14}C -gemarkeerde suiker aan het medium.

& Booij, 1964). Deze veronderstelling was oorspronkelijk gebaseerd op een reeks waarnemingen die alleen op basis van deze hypothese verklaarbaar waren. Latere waarnemingen bevestigden deze hypothese. De perifere lokalisatie van hoogmoleculair polyfosfaat werd bevestigd via verschillende experimentele benaderingen (Weimberg & Orton, 1965; Souza, 1967a, b; Kulaev, 1975). De fosforylering van suikers met polyfosfaat als fosfaatdonor via het enzym polyfosfaat-glucokinase werd beschreven door Szymona (1962) en Szymona & Ostrowsky (1964). Tenslotte werd de directe rol van polyfosfaat en een fosfotransferase bij het transport van glucose in *Neurospora crassa* vastgesteld door Umnov et al. (1975).

Een belangrijk aspect bij dit transportsysteem is dus het gebruik van anorganisch polyfosfaat als energiebron, hetgeen niet eerder gevonden was. Er zijn aanwijzingen dat het polyfosfaat-systeem fylogenetisch ouder is dan het ATP-systeem (Kulaev, 1975). Dit zou theoretisch relevant kunnen blijken te zijn in de evolutieeler.

Hier moet tenslotte opgemerkt worden, dat er ook andere transportsystemen voor suikers in gist voorkomen. Er bestaan energiegekoppelde systemen waarbij de koppeling op een andere, nog niet bekende manier plaatsvindt. Verder worden in sommige gisten veel suikers via eenvoudige, niet-energie-gekoppelde carrier-systemen opgenomen.

Indirecte energiekoppeling

Wij zijn nu genaderd tot een groep van transportprocessen die gekenmerkt worden door een accumulatie tegen een concentratiegradiënt in, maar waar het principe van de gemeenschappelijke intermediair bij de energiekoppeling op het eerste gezicht niet lijkt op te gaan. Bij deze systemen is sprake van een indirecte energiekoppeling. Dit principe zal nu besproken worden aan de hand van enkele goed bestudeerde voorbeelden.

Suikertransport in de darm Het langst bekende voorbeeld in deze groep is dat van suikertransport in de darm. Suikertransport vanuit het lumen van de darm is afhankelijk van de aanwezigheid van natriumionen (fig. 9). Er is hier sprake van een co-transport(=symport)-carrier, die slechts dan functioneert wanneer zowel een suikermolecuul als een natriumion aan de carrier gebonden zijn. De suikerconcentratie in de cel wordt veel hoger dan die in het darmlumen. De natriumconcentratie in de cel is echter veel lager dan de natriumconcentratie in het darmlumen. Dit wordt veroorzaakt door de aanwezigheid van een energiegekoppelde natriumcarrier in de celmembran die van het darmlumen af is gekeerd. Deze carrier transporteert natriumionen uit de cel, tegen een concentratiegradiënt in, ten koste van ATP-hydrolyse. Deze zogenaamde elektrogene natriumpomp kan dus weer beschouwd worden als een energiegekoppelde carrier, waarbij de energielevering plaatsvindt via ATP als gemeenschappelijke intermediair.

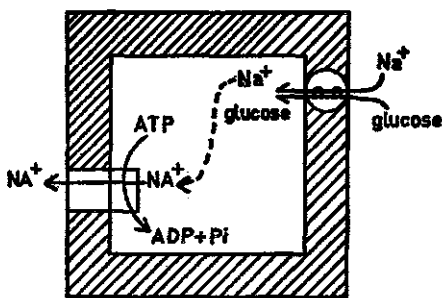


Fig. 9. De glucose- Na^+ -cotransport-carrier en de elektrogene natriumpomp in darmepitheel-cellen. (Voor nadere verklaring wordt verwezen naar de tekst.)

De energie die nodig is voor het transport van de suiker tegen een concentratiegradiënt in, wordt geleverd door de omgekeerde concentratiegradiënt van natriumionen. Het transport van natriumionen vanuit het lumen naar de cel verloopt van hoge naar lage concentratie. Dit proces alleen zou een afname van de vrije energie van het systeem geven. Hierdoor wordt, energetisch gezien, de gelijktijdige verplaatsing van de suiker tegen de concentratiegradiënt in mogelijk. Dit laatste proces alleen zou immers een toename van de vrije energie van het systeem veroorzaken. Energetisch compenseren de natrium- en suikerverplaatsing via de cotransport-carrier elkaar op deze wijze.

Uiteindelijk is het suikertransport, energetisch gezien, geheel afhankelijk van de door ATP gedreven elektrogene natriumpomp aan de andere zijde van de cel: het is immers deze pomp die de lage natriumconcentratie in de cel op de langere duur handhaaft (Eichholz et al., 1969; Caspary et al., 1969; Crane, 1974). Het symportsysteem zelf is niet direct gekoppeld aan energieleverende metabole processen. Toch zou men kunnen verdedigen dat de cotransport-carrier zelf tenslotte optreedt als gemeenschappelijke intermediair tussen energie-leverende en energie-verbruikende reacties.

Dit indirect gekoppelde transportsysteem vertoont nog een belangrijke bijzonderheid. Behalve glucose worden nog verschillende andere suikers via deze carrier uit het darmlumen opgenomen. In het voorafgaande is al ter sprake gekomen, dat de bewegingssnelheid van het carrier-substraat-complex afhankelijk kan zijn van de aard van het gebonden substraat. Bij deze carrier doet zich hiervan een extreem voorbeeld voor. Hoewel 6-deoxy-L-galactose aan de carrier gebonden wordt met grote affiniteit, wordt dit carrier-substraat-complex in het geheel niet door de membraan getransporteerd (Caspary et al., 1969). Vermoed wordt, dat de carrier of het carrier-substraat-complex normaliter een conformatieverandering moet ondergaan, alvorens door de membraan te kunnen bewegen. Na de vorming van het carrier-6-deoxy-L-galactose-complex zou deze noodzakelijke conformatie verandering niet kunnen optreden, als gevolg van sterische factoren (fig. 10). Hier is een duidelijke gelijkenis aanwezig met de binding van sommige zogenaamde substraat-analogen aan enzymmolekulen.

Amino zuurtransport In vele cellen blijkt amino zuurtransport plaats te vinden via een amino zuur-natrium symport-systeem, analoog met

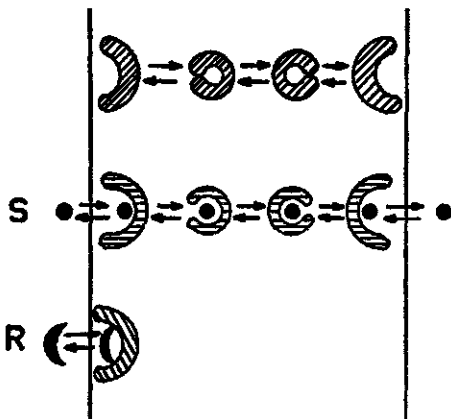


Fig. 10. Schematische voorstelling van substraatbinding en conformatieverandering van de carrier bij transport. De vrije carrier en het carrier-S-complex kunnen een translokatie ondergaan, het carrier-R-complex daarentegen niet.

het hiervoor beschreven suikertransportsysteem in de darmwand. De specificiteit van de aminozuur-transportsystemen verschilt nogal van celyte tot celyte. Vaak vindt men vijf verschillende carrier-systemen, namelijk (1) voor kleine neutrale aminozuren, (2) voor grote neutrale aminozuren, (3) voor basische aminozuren, (4) voor zure aminozuren en (5) een aparte carrier voor proline. Dit heeft er toe geleid dat het aminozuurtransport vaak gebruikt is als object voor de bestudering van carrier-specificiteit en carrier-substraat-interactie.

Het is veelvuldig waargenomen dat bij aminozuuropname kaliumionen zich in tegengestelde richting door de membraan bewegen, in de richting van hun concentratiegradiënt. Theoretisch zou deze kalium-antiport energie kunnen leveren voor de opname van aminozuren, en deze mogelijkheid is in vele publikaties overwogen. Afdoende experimenteel bewijs dat de kaliumgradiënt daadwerkelijk energie levert voor aminozuurtransport is nooit gevonden. Het lijkt waarschijnlijk dat in de meeste gevallen de energiekoppeling tot stand komt via natriumsymport.

Chemi-osmotische koppeling Uit recente onderzoeken is gebleken dat indirecte koppelingen van dit soort vaak voorkomen, o.a. bij

het transport van vele suikers in bacteriën tegen een concentratiegradiënt in. De energieleverende gradiënt wordt hierbij volgens de chemiosmotische theorie van Mitchell gevormd door protonen (Mitchell, 1961). Deze protonengradiënten spelen een belangrijke rol zowel bij mitochondriën als bij bacteriën.

Bij de respiratie worden niet alleen elektronen overgedragen via de membraangebonden cytochroomketen, maar worden gelijktijdig ook protonen verplaatst naar buiten de cel, respectievelijk het mitochondrion (fig. 11). De membraan komt hierdoor in een 'geënergetiseerde' toestand (in schema's meestal aangegeven als ∞) waarbij de energietisering Δp uitgedrukt kan worden met de formule:

$$\Delta p = \Delta \Psi - Z \Delta p H, \quad (6)$$

waarin $\Delta \Psi$ = de door de protonen verplaatsing ontstane membraan-

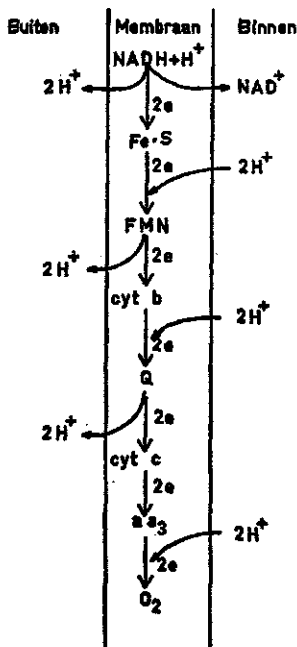


Fig. 11. Het mechanisme van protonenverplaatsing volgens de chemiosmotische koppelingstheorie. FeS = ijzer-zwavel eiwit; FMN = flavine mononucleotide; Q = coënzym Q; e = elektron.

potentiaal (de laagste pH buiten de membraan), en $Z = 2,3 \text{ RT/F}$.

Deze energie kan op verschillende manieren gebruikt worden door de cel. In de eerste plaats wordt zo de synthese van ATP mogelijk met behulp van een in de membraan gelokaliseerde ATPase (fig. 12). Deze ATPase bezit geheel andere eigenschappen als de eerder besproken membraan- $(\text{Na}^+ + \text{K}^+)\text{-ATPase}$. Aan dit enzymcomplex worden orthofosfaat en ADP gebonden. Via onttrekking van OH^- aan het orthofosfaat en van H^+ aan het ADP-molekuul komt een koppeling tot ATP tot stand. De onttrokken OH^- verplaatst zich naar buiten, de aan ADP onttrokken H^+ naar binnen, in beide gevallen onder de vorming van H_2O .

Het netto resultaat van deze reacties is equivalent aan de synthese van ATP uit ADP + orthofosfaat aan de binnenzijde, gekoppeld aan het transport van protonen van buiten naar binnen, in de richting van de concentratiegradiënt. Dit fenomeen werd experimenteel dan ook als zodanig gevonden, en zo geïnterpreteerd. Pas bij gedetailleerde bestudering bleek, dat van een reëel transport van protonen door de membraan tijdens de ATP-vorming geen sprake is, zoals valt af te lezen uit fig. 12.

De reactieketen blijkt in sommige (misschien zelfs alle) gevallen omkeerbaar te zijn: hydrolyse van ATP tot ADP + orthofosfaat leidt dan tot het uitstoten van protonen, via deze zelfde membraan-

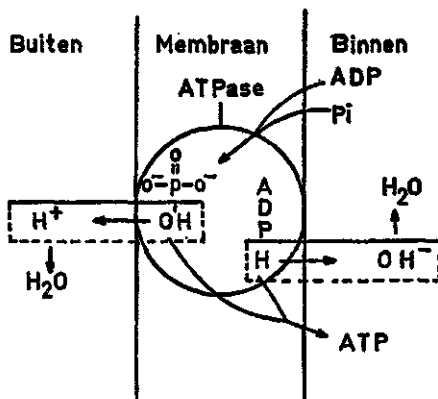


Fig. 12. ATP-vorming via membraan-ATPase, waarbij een protonengradiënt over de membraan de hiervoor benodigde energie levert.

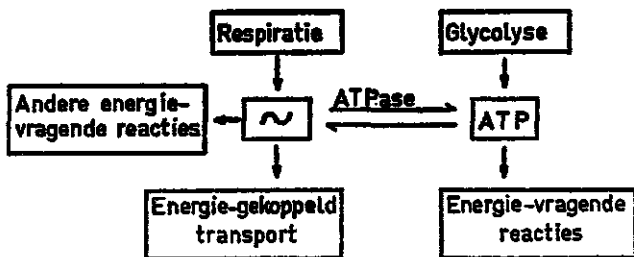


Fig. 13. Schematische voorstelling van het chemi-osmotische mechanisme. \sim stelt de geënergetiseerde toestand van de membraan voor, die ontstaat door de protonengradiënt.

ATPase. Dit is vooral belangrijk wanneer de protonengradiënt gebruikt wordt door de cel voor andere energieverbruikende processen, met name onder anaërobe omstandigheden. Anaëroob zal zich immers, door afwezigheid van respiratie, geen protonengradiënt kunnen opbouwen op de zojuist beschreven wijze. Wel kan de cel dan ATP synthetiseren via de glycolyse. Deze ATP kan dan, via de membraan-ATPase, gebruikt worden voor de opbouw van een protonengradiënt.

Dit enzymcomplex kan specifiek geremd worden door dicyclohexylcarbodiimide. De bestudering van deze remming en van mutanten met een genetisch defect van de membraan-ATPase heeft vele waardevolle gegevens opgeleverd.

De geënergetiseerde toestand van de membraan kan ook gebruikt worden voor een gelijktijdig transport van protonen en suikers via een cotransport-carrier, zoals bij veel bacteriën gebeurt. Ook hier kan de suiker getransporteerd worden tegen een steile concentratiegradiënt in (Harold, 1974). Het systeem is schematisch weergegeven in fig. 13.

Deze theorie wordt gestaafd door vele experimentele waarnemingen. Illustratief is de werking van de zogenaamde ont koppelaars (zoals 2,4-dinitrophenol en carbonylcyanide-fenylhydrazones), die de membraan doorlaatbaar maken voor protonen. Onder invloed van zulke ont koppelaars verdwijnt dus de protonengradiënt. Zoals verwacht moet worden op grond van de chemi-osmotische theorie verdwijnt dan de respiratiegebonden ATP-synthese (waaraan de ont koppelaars hun naam ontleen) en het transport van vele suikers tegen een concentratiegradiënt in.

Dit systeem staat op het ogenblik sterk in de belangstelling en het valt dan ook te verwachten dat een verdere detaillering van de gebeurtenissen op moleculair niveau in de naaste toekomst gestalte zal krijgen.

Regulatie van specifiek transport

De snelheid van specifiek transport kan langs verschillende wegen beïnvloed en gereguleerd worden. Zo bestaat er in vele cellen een metabole regulatie van de opname van suikers, die min of meer vergelijkbaar is met de allosterische remming van enzymactiviteit. Als voorbeeld kan genoemd worden de opname van suikers in *Aspergillus nidulans*. Hoewel het mechanisme op moleculair niveau nog niet precies bekend is, staat vast dat de opname van suikers door deze cel geremd wordt door acetyl-coenzym A, het eindproduct van de glycolyse (Romano & Kornberg, 1969).

Bij micro-organismen treft men verder repressie en derepressie van de synthese van carrier-systemen aan als regulatiemechanisme (Schneider & Wiley, 1971).

In het dierlijke organisme kent men verder hormonale regulatie van specifiek transport. Ook hier geldt, dat het mechanisme in de meeste gevallen nog niet precies bekend is. Als voorbeeld kan genoemd worden de stimulering van glucosetransport in verschillende cellen door insuline. Dank zij o.a. de studies van Cuatrecasas en medewerkers worden steeds meer details van dit regulatiemechanisme bekend (Cuatrecasas, 1972; Chang & Cuatrecasas, 1974; Chang et al., 1974).

Actief en passief transport

Zoals ook in het hoofdstuk van Booij is vermeld, is het onjuist om, zoals men veelvuldig aantreft in de literatuur, te spreken van actief en passief transport. Onder passief transport wordt dan verstaan de permeatie op basis van vrije diffusie door de membraan, alsmede het eenvoudige carrier-transport, zoals beschreven in het begin van dit hoofdstuk. Actief transport wordt door verschillende auteurs verschillend gedefinieerd. Soms wordt het omschreven als transport tegen een concentratiegradiënt van het substraat in. Anderen omschrijven het als transport waarbij een koppeling bestaat tussen het carrier-systeem

en een energie-leverend systeem. Vaak worden ook beide criteria opgenomen in de definitie van actief transport.

Uit het voorafgaande zal duidelijk zijn, dat het onderscheid op grond van dit soort definities vaak op grote moeilijkheden stuit. Om enkele voorbeelden te noemen: bij het eenvoudige carrier-transport hebben wij het verschijnsel van counter-transport leren kennen. Hoewel hier één van de substraten duidelijk tegen een concentratiegradiënt in getransporteerd wordt, heeft nooit iemand dit als actief transport geassocieerd. Er zijn verder systemen bekend in gistcellen, die zowel een eenvoudig carrier-transport, als ook een energie-gekoppeld transport van suikers kunnen bewerkstelligen. Het onderscheid tussen actief en passief transport doet hier gekunsteld aan.

Bij het fosfotransferase-systeem is zonder twijfel een energiekoppeling aanwezig. Het substraat zelf wordt echter niet tegen een concentratiegradiënt in getransporteerd, aangezien het tijdens het transport wordt veranderd. Of dit nu actief of passief transport genoemd zou moeten worden, hangt volledig af van de gehanteerde definities. Ook bij indirect gekoppelde transportsystemen, zoals het suikertransport in de darm, is het niet duidelijk of dit tot het actieve dan wel het passieve transport gerekend zou moeten worden. Men zou hier zelfs kunnen spreken van een gecombineerd passief transport van natriumionen en actief transport van de suiker, samen in één totaal proces.

Het lijkt daarom beter, de termen actief en passief transport niet meer te gebruiken. Een onderscheid tussen specifiek en aspecifiek transport is van meer fundamentele betekenis dan het onderscheid tussen actief en passief transport, hoe men deze dan ook definieert. Het verschil tussen vrije diffusie en eenvoudig carrier-transport is namelijk van meer principiële aard dan het wel of niet aanwezig zijn van een koppeling van het carrier-systeem met een energie-leverende reactie, of het wel of niet getransporteerd worden van het substraat tegen een concentratiegradiënt in. Het specifiek transport kan dan voorlopig onderverdeeld worden in energetisch niet gekoppeld, indirect gekoppeld en direct gekoppeld, als basis voor een nieuw indelingsschema.

Transport als vectoriële reactie

Transport kan in het algemeen beschouwd worden als een proces met een bepaalde richting, dus als een vectoriële reactie. Dit in tegenstel-

ling met gewone chemische reacties die scalair zijn. Nu kan een vectoriële reactie op theoretische gronden alleen dan verlopen, als de reactie plaatsvindt in een anisotroop medium, of wanneer de reactie gekoppeld is aan een ander vectorieel proces. Dit betekent dat bijvoorbeeld direct energie-gekoppelde transportprocessen tegen een concentratiegradiënt in, een anisotroop medium, dus een asymmetrische membraan impliceren.

Zo is een asymmetrische opbouw van de membraan vereist om de protonenverplaatsing tijdens elektronenoverdracht volgens de chemiosmotische theorie te kunnen verklaren (fig. 11). Dit proces is alleen denkbaar wanneer de verschillende eiwitten die bij dit proces betrokken zijn, in een nauwkeurig gedefinieerde, asymmetrische ordening gerangschikt zijn. Meer in het algemeen is trouwens reeds aangetoond, dat biomembranen asymmetrisch gebouwd zijn zowel met betrekking tot de eiwitten als ook tot de lipiden die deel uitmaken van deze structuur.

De vraag doet zich voor, of een asymmetrische opbouw van de membraan alleen, dus zonder dat een koppeling met een energieleverend proces aanwezig is, zou kunnen leiden tot een dynamisch evenwicht, met verschillende concentraties van een substraat aan beide zijden van de membraan. Het is gebleken dat dit inderdaad het geval kan zijn: bij sommige transportprocessen die niet energetisch gekoppeld zijn, ontstaat een 'steady state', waarbij de substraatconcentraties aan beide zijden van de membraan in geringe, maar significant mate ongelijk zijn (De Bruijne & Van Steveninck, 1970; Schultz, 1971).

Deze situatie lijkt op het eerste gezicht in strijd te zijn met de tweede hoofdwet van de thermodynamica. De benodigde energie voor het creëren van deze situatie kan echter geleverd worden door een asymmetrische membraanopbouw. Dit kan vergeleken worden met de toestand die zich voordoet wanneer een sterk geladen macromolekuul aanwezig is in een zoutoplossing. Er ontstaat dan een zogenaamde diffuse dubbellaag, waarbij rondom het macromolekuul de concentratie van de tegengesteld geladen ionen groter is, met daarbuiten een zone waarin de concentratie van de gelijk geladen ionen juist groter is. De ionen van het zout zijn dus ten opzichte van elkaar verplaatst door de aanwezigheid van het geladen macromolekuul (fig. 14). Het macromolekuul moet dus een bepaalde, in deze situatie bruikbare, energieinhoud bezitten. Dit is in overeenstemming met de werkelijk-

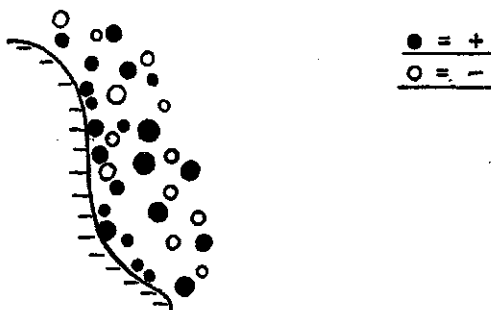


Fig. 14. De diffuse dubbellaag van kationen rondom een negatief geladen macromolekuul.

heid. Bij de synthese van een dergelijk macromolekuul moeten een groot aantal gelijk geladen groepen dicht bij elkaar worden gebracht. Hierbij neemt de vrije energie toe, en zal dus exogene energie moeten worden geïnvesteerd. Die vrije energie zal afnemen, als het macromolekuul in de zoutoplossing wordt gebracht. Dit is, zoals bekend, ook één van de oorzaken van de 'energie-rijkdom' van een molekuul als ATP. Ook in dit geval geldt, dat de vrije energie groot is door het samenbrengen van een groot aantal negatieve ladingen in één molekuul en dat de vrije energie afneemt bij aanwezigheid van bijvoorbeeld magnesiumzouten.

Een zelfde redenering geldt voor biomembranen. Bij de biosynthese wordt de informatie gebruikt die aanwezig is in het genetisch apparaat van de cel. Volgens de informatietheorie kan men deze informatie uitdrukken in energieëenheden (bits). Bij het vertalen van deze informatie in de opbouw van de membraan tot een complexe structuur wordt veel chemische energie verbruikt. Deze energie vinden wij o.a. terug in een afname van de entropie van het systeem. In het geval van biomembranen zouden wij van structuurenergie kunnen spreken, die op deze wijze wordt geaccumuleerd. Het wordt hierdoor duidelijk dat de energie-inhoud van de membraan mede een rol kan spelen bij processen zoals al dan niet energie-gekoppeld carrier-transport. Het is mede daarom, dat bij specifieke transportprocessen de bestudering van functie en structuur van de biomembraan nauw met elkaar samenhangen.

Vijftig jaar modellen van biomembranen (H. L. Booij)

- Bar, R. S., D. W. Deamer & D. G. Cornwell, 1966. Surface area of human erythrocyte lipids: Reinvestigation of experiments on plasma membrane. *Science, N.Y.* 153: 1010-1012.
- Benson, A. A., 1966. On orientation of lipids in chloroplast and cell membranes. *J. Am. Oil Chem. Soc.* 43: 265-270.
- * Booij, H. L., 1962. Colloid chemistry of living membranes. In: Conference on permeability. Tjeenk Willink, Zwolle, p. 1-31.
- Branton, D. & R. B. Park, 1968. Papers on biological membrane structure. Little, Brown and Company, Boston.
- Bungenberg de Jong, H. G. & J. Bonner, 1935. Phosphatide autocomplex coacervates as ionic systems and their relation to the protoplasmic membrane. *Protoplasma* 24: 198-218.
- Christensen, H. N., 1962. Biological transport. Benjamin, New York.
- Collander, R., 1928. Einige Permeabilitätsversuche mit Gelatinemembranen. *Protoplasma* 3: 213-222.
- Danielli, J. F. & H. Davson, 1935. A contribution to the theory of permeability of thin films. *J. Cell. Physiol.* 5: 495-508.
- Danielli, J. F. & E. N. Harvey, 1935. The tension at the surface of mackerel egg oil, with remarks on the nature of the cell surface. *J. Cell. Physiol.* 5: 483-494.
- Davson, H. & J. F. Danielli, 1943. The permeability of natural membranes. University Press, Cambridge.
- * Dowben, R. M. (Ed.), 1969. Biological membranes. Little, Brown and Company, Boston.
- Ferguson, J., 1939. The use of chemical potentials as indices of toxicity. *Proc. Roy. Soc., B* 127: 387-404.
- Fernández-Morán, H. & J. B. Finean, 1957. Electron microscope and low-angle X-ray diffraction studies of the nerve myelin sheath. *J. Cell. Biol.* 3: 725-748.
- Fèvre, P. G. Le, 1955. Active transport through animal cell membranes. *Protoplasmatologia* 8, 7a: 1-123.

1. De met * aangegeven referenties geven een algemeen overzicht.

- Finkelstein, A. & A. Cass, 1968. Permeability and electrical properties of thin lipid membranes. *J. gen. Physiol.* 52: 145 S-172 S.
- Gellhorn, E., 1929. Das Permeabilitätsproblem. Julius Springer, Berlin.
- Gorter, E. & F. Grendel, 1925. On bimolecular layers of lipoids on the chromocytes of the blood. *J. exp. Med.* 41: 439-443.
- Green, D. E. (Ed.), 1972. Membrane structure and its biological applications (symposium). *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 195.
- * Green, D. E. & R. F. Goldberger, 1967. Molecular insights into the living process. Academic Press, New York, London.
- Höber, R., 1924. Physikalische Chemie der Zelle und der Gewebe, 5te Auflage, Wilhelm Engelmann, Leipzig.
- Lenard, J. & S. J. Singer, 1966. Protein conformation in cell membrane preparations as studied by optical rotatory dispersion and circular dichroism. *Proc. natn. Acad. Sci. U.S.A.* 56: 1828-1835.
- * Lockwood, A. P. M., 1971. The membranes of animal cells. Edward Arnold, London.
- Lucy, J. A. & A. M. Glauert, 1964. Structure and assembly of macromolecular lipid complexes of globular micelles. *J. molec. Biol.* 8: 727-748.
- Matthews, A. P., 1925. Physiological Chemistry, 4th edition. Bailliere, Tindall and Cox, London.
- Meyer, H. H., 1899. Zur Theorie der Alkohalnarkose. *Arch. exp. Path. Pharmak.* 42: 109-118.
- Nathanson, A., 1904. Über die Regulation der Aufnahme anorganischer Salze durch die Knollen van Dahlia. *Jb. wiss. Bot.* 39: 607-644.
- Overton, E., 1895. Über die osmotischen Eigenschaften der lebenden Pflanzen und Tierzellen. *Vjschr. naturforsch. Ges. Zürich* 40: 159-201.
- Overton, E., 1899. Über die allgemeinen osmotischen Eigenschaften der Zellen, ihre vermutlichen Ursachen und ihre Bedeutung für die Physiologie. *Vjschr. naturforsch. Ges. Zürich* 44: 88-135.
- Overton, E., 1901. Studien über Narkose. Jena.
- Pfeffer, W., 1877. Osmotische Untersuchungen: Studien zur Zellmechanik. Leipzig.
- Robertson, J. D., 1959. The ultrastructure of cell membranes and their derivatives. *Symp. Biochem.* 16: 3-43.
- Schmidt, W. J., 1936. Doppelbrechung und Feinbau der Markscheide der Nervenfasern. *Z. Zellforsch. mikrosk. Anat.* 23: 657-676.
- Schmitt, F. O., R. S. Bear & G. L. Clark, 1935. X-ray diffraction studies on nerve. *Radiology* 25: 131-151.
- Segrest, J. P. & L. D. Kohn, 1974. Protein-lipid interactions of the membranepenetrating MN-glycoprotein from the human erythrocyte. In: H. Peeters (Ed.): Protides of the biological fluids, Pergamon Press, Oxford, New York, Toronto, Sydney, Braunschweig, p. 181-189.
- * Singer, S. J. & G. L. Nicolson, 1972. The fluid mosaic model of the structure of cell membranes. *Science, N.Y.* 175: 720-731.
- * Stein, W. D., 1967. The movement of molecules across cell membranes. Academic Press, New York and London.

- Stein, W. D. & J. F. Danielli, 1956. Structure and function in red cell permeability. *Discuss. Faraday Soc.* 21: 238-251.
- * Tien, H. T., 1974. Bilayer lipid membranes (BLM). Marcel Dekker, Inc., New York.
- Traube, J., 1904. Oberflächendruck und seine Bedeutung im Organismus. *Pflügers Arch. ges. Physiol.* 105: 559-572.
- Vries, H. de, 1871. Sur la perméabilité du protoplasme de betteraves rouges. *Arch. néerl. Sci. exactes et natur.* 6: 117-126.
- * Wallach, D. F. H., 1972. The plasma membrane: dynamic perspectives, genetics and pathology. The English Universities Press Ltd., London, Springer Verlag, New York, Heidelberg, Berlin.
- Wallach, D. F. H. & P. H. Zahler, 1966. Protein conformations in cellular membranes. *Proc. natn. Acad. Sci. U.S.* 56: 1552-1559.
- Wilbrandt, W. & T. Rosenberg, 1961. The concept of carrier transport and its corollaries in pharmacology. *Pharmacol. Rev.* 13: 109-183.
- Winkler, K. C. & H. G. Bungenberg de Jong, 1940. Structure of the erythrocytemembrane. *Archiv. néerl. Physiol.* 25: 431-508.

Recent onderzoek aan modelsystemen (J. de Gier)

- Bangham, A. D., J. de Gier & G. D. Greville, 1967. Osmotic properties and water permeability of phospholipid liquid crystals. *Chem. Phys. Lipids* 1: 225-246.
- Bangham, A. D., M. W. Hill & N. G. A. Miller, 1974. Preparation and use of liposomes as models of biological membranes. In: E. D. Korn (Ed.): *Methods in membrane biology*, vol. 1. Plenum Press, p. 1-68.
- Blok, M. C., J. de Gier & L. L. M. van Deenen, 1974. Some factors affecting the valinomycin induced leak from liposomes. *Biochim. biophys. Acta* 367: 210-224.
- Blok, M. C., J. de Gier & L. L. M. van Deenen, 1974. Kinetics of valinomycin induced potassium ion leak from liposomes with potassium thiocyanate enclosed. *Biochim. biophys. Acta* 367: 210-224.
- Blok, M. C., E. C. M. van der Neut-Kok, L. L. M. van Deenen & J. de Gier, 1975. The effect of chain length and lipid phase transitions on the selective permeability properties of liposomes. *Biochim. biophys. Acta* 406: 187-196.
- Bosch, H. van den, 1974. Phosphoglyceride metabolism. *A. Rev. Biochem.* 43: 243-277.
- Darke, A., E. G. Finer, A. G. Flook & M. C. Phillips, 1972. NMR study of lecithin-cholesterol interactions. *J. molec. Biol.* 63: 265-279.
- Deenen, L. L. M. van, 1972. Phospholipide: 'Beziehungen zwischen ihr Chemischen Struktur und Biomembranen'. *Naturwissenschaften* 59: 485-491.

- Demel, R. A., K. R. Bruckdorfer & L. L. M. van Deenen, 1972. The effect of sterol structure on the permeability of liposomes to glucose, glycerol and Rb^+ . *Biochim. biophys. Acta* 255: 321-330.
- Demel, R. A., Y. London, W. S. M. Geurts van Kessel & L. L. M. van Deenen, 1974. Interaction of lipids and proteins of the myelin membrane. In: L. Bolis, K. Block, S. E. Luria & F. Lynen (Ed.): Comparative biochemistry and physiology of transport. North-Holland Publishing Company, Amsterdam.
- Dijck, P. W. M. van, P. H. J. Th. Ververgaert, A. J. Verkley, L. L. M. van Deenen & J. de Gier, 1975. Influence of Ca^{2+} and Mg^{2+} on the thermotropic behaviour and permeability properties of liposomes prepared from dimyristoyl phosphatidylglycerol and mixture of dimyristoyl phosphatidylglycerol and dimyristoyl phosphatidyl choline. *Biochim. biophys. Acta* 406: 465-478.
- Eisenman, G., G. Szabo, S. G. A. McLaughlin & S. M. Ciani, 1973. Molecular basis for the action of macrocyclic carriers on passive ionic translocation across lipid bilayer membranes. *Bioenergetics* 4: 93-148.
- Gier, J. de, R. A. Demel & L. L. M. van Deenen, 1968. Evaluation of some properties of membrane lipids in model systems. In: Surface-active lipids in foods. Monograph No. 32, Society of Chemical Industry, London, p. 39-49.
- Gier, J. de, J. G. Mandersloot & L. L. M. van Deenen, 1969. The role of cholesterol in lipid membranes. *Biochim. biophys. Acta* 173: 143-145.
- Gier, J. de, J. G. Mandersloot, J. V. Hupkes, R. N. McElhaney & W. P. van Beek, 1971. On the mechanism of non-electrolyte permeation through lipid bilayers and through biomembranes. *Biochim. biophys. Acta* 233: 610-618.
- Goldin, S. M. & S. W. Tong, 1974. Reconstitution of active transport catalyzed by the purified sodium and potassium ion-stimulated adenosine triphosphatase from canine renal medulla. *J. biol. Chem.* 249: 5907-5915.
- Gorter, E. & F. Grendel, 1925. On bimolecular layers of lipoids on the chromocytes of the blood. *J. exp. Med.* 41: 439-443.
- Hladky, S. B., L. G. M. Gordon & D. A. Haydon, 1974. Molecular mechanisms of ion transport in lipid membranes. *A. Rev. phys. Chem.* 25: 11-38.
- Inoue, K., T. Kataoka & S. C. Kinsky, 1971. Comparative responses of liposomes prepared with different ceramide antigens to antibody and complement. *Biochemistry* 10: 2574-2581.
- Kinsky, S. C., 1970. Antibiotic interaction with model membranes. *A. Rev. Pharmac.* 10: 119-142.
- Kruyff, B. de & R. A. Demel, 1974. Polyene antibiotic-sterol interactions in membranes of *Acholeplasma laidlawii* cells and lecithin liposomes. III. Molecular structure of the polyene antibiotic cholesterol complexes. *Biochim. biophys. Acta* 339: 57-70.

- Luzzati, V. & A. Tardieu, 1974. Lipid phases: Structure and structural transitions. *A. Rev. phys. Chem.* 25: 79-94.
- McElhaney, R. N., J. de Gier & E. C. M. van der Neut-Kok, 1973. The effect of alterations in fatty acid composition and cholesterol content on the non-electrolyte permeability of *Acholeplasma laidlawii* B cells and derived liposomes. *Biochim. biophys. Acta* 298: 500-512.
- Mandersloot, J. G., F. C. Reman, L. L. M. van Deenen & J. de Gier, 1975. Barrier properties of lecithin/lysolecithin mixtures. *Biochim. biophys. Acta* 382: 22-26.
- Neut-Kok, E. C. M. van der, J. de Gier, E. J. Middelbeek & L. L. M. Deenen, 1999. Valinomycin-induced potassium and rubidium permeability of intact cells of *Acholeplasma laidlawii* B. *Biochim. biophys. Acta* 332: 97-103.
- Papahadjopoulos, D., M. Moscarello, E. H. Eylar & T. Isac, 1975. Effects of proteins on thermotropic phase transitions of phospholipid membranes. *Biochim. biophys. Acta* 401: 317-335.
- Phillips, M. C., 1972. The physical state of phospholipids and cholesterol in monolayers, bilayers and membranes. In: J. F. Danielli, M. D. Rosenberg & D. A. Cadenhead (Ed.): Progress in surface and membrane science, vol. 5. Academic Press, New York, p. 139-221.
- Racker, E., T. F. Chien & A. Kondrath, 1975. A cholate dilution procedure for the reconstitution of the Ca^{++} pump ^{32}P -ATP exchange and oxidative phosphorylation. *FEBS Letters* 57: 14-18.
- Ti Tien, H., 1974. Bilayer lipid membranes (BLM). Marcel Dekker inc., New York.
- Ververgaert, P. H. J. Th., A. J. Verkley, P. F. Elbers & L. L. M. van Deenen, 1973. Analysis of the crystallization process in lecithin liposomes: a freeze-etch study. *Biochim. biophys. Acta* 311: 320-329.

Lokalisatie en functie van membraaneiwitten (R. F. A. Zwaal)

- Bar, R. S., D. W. Deamer & D. G. Cornwell, 1966. Surface area of human erythrocyte lipids: Reinvestigation of experiments on plasma membrane. *Science, N.Y.* 153: 1010-1012.
- * Bretscher, M. S. & M. C. Raff, 1975. Mammalian plasma membranes. *Nature, Lond.* 258: 43-49.
- Cabantchik, Z. I. & A. Rothstein, 1974. Membrane proteins related to anion permeability of human red blood cells. *J. Membrane Biol.* 15: 207-248.
- Danielli, J. F. & H. Davson, 1935. A contribution to the theory of permeability of thin films. *J. cell. comp. Physiol.* 5: 495-508.
- Demel, R. A., W. S. M. Geurts van Kessel, R. F. A. Zwaal, B. Roelofsens & L. L. M. van Deenen, 1975. Relation between various phospholipase actions on human red cell membranes and the interfacial phospholipid pressure in monolayers. *Biochim. biophys. Acta* 406: 97-107.

- Gorter, E. & F. Grendel, 1925. On bimolecular layers of lipoids on the chromocytes of the blood. *J. exp. Med.* 41: 439-443.
- Robertson, J. D., 1959. The ultrastructure of cell membranes and their derivatives. *Symp. Biochem. Soc.* 16: 3-43.
- Roelofsen, B. & L. L. M. van Deenen, 1973. Lipid requirement of membrane-bound ATPase. Studies on human erythrocyte ghosts. *Eur. J. Biochem.* 40: 245-257.
- * Singer, S. J. & G. L. Nicolson, 1972. The fluid-mosaic model of the structure of cell membranes. *Science, N.Y.* 175: 720-731.
- * Steck, T. L., 1974. The organization of proteins in the human red blood cell membrane. A review. *J. Cell Biol.* 62: 1-20.
- Tomita, M. & V. T. Marchesi, 1975. Amino-acid sequence and oligosaccharide attachment sites of human erythrocyte glycophorin. *Proc. natn. Acad. Sci. U.S.A.* 72: 2964-2968.
- Verkleij, A. J., R. F. A. Zwaal, B. Roelofsen, P. Comfurius, D. Kastelijn & L. L. M. van Deenen, 1973. The asymmetric distribution of phospholipids in the human red cell membrane. A combined study using phospholipases and freeze-etch electron microscopy. *Biochim. biophys. Acta* 323: 178-193.
- Weiss, H. J., 1975. Platelet physiology and abnormalities of platelet function. *New Engl. J. Med.* 293: 531-541, 580-588.
- Whittam, R., 1967. The molecular mechanism of active transport. In: G. C. Quarton, T. Melnechuk, F. O. Schmitt (Eds): *The neurosciences*. Rockefeller Institute, New York, p. 313-325.
- * Zwaal, R. F. A., B. Roelofsen & C. M. Colley, 1973. Localization of red cell membrane constituents. *Biochim. biophys. Acta* 300: 159-182.
- Zwaal, R. F. A., B. Roelofsen, P. Comfurius & L. L. M. van Deenen, 1975. Organization of phospholipids in human red cell membranes as detected by the action of various purified phospholipases. *Biochim. biophys. Acta* 406: 83-96.

Functionele morfologie van biomembranen (W. Th. Daems)

- * Allison, A. C., 1973. The role of microfilaments and microtubules in cell movement, endocytosis and exocytosis. In: *Locomotion of tissue cells*. Ciba Foundation Symposium 14. Elsevier, Excerpta Medica, North-Holland, Ass. Sci. Publ., Amsterdam/London/New York. p. 109-148.
- Ashwell, G. & A. C. Morsell, 1974. The role of surface carbohydrates in the hepatic recognition and transport of circulating glycoproteins. *Adv. Enzymol.* 41: 99-128.
- * Bardelle, C. F., 1973. Struktur, Biochemie und Funktion der Mikrotubuli. *Cytobiol.* 7: 442-488.
- Bennett, H. S., 1963. Morphological aspects of extracellular polysaccharides. *J. Histochem. Cytochem.* 11: 14-23.

- Berlin, R. D., J. M. Oliver, T. E. Ukena & H. H. Yin, 1975. The cell surface. *New Engl. J. Med.* 292: 515-520.
- Bernhard, W. & S. Avrameas, 1971. Ultrastructural visualization of cellular carbohydrate components by means of concanavalin A. *Expl Cell Res.* 64: 232-236.
- * Borgers, M. & M. de Brabander (Eds.), 1975. Microtubules and microtubule inhibitors. North-Holland Publ. Comp., Amsterdam.
- Brederoo, P. & W. Th. Daems, 1972. Cell coat, worm-like structures, and labyrinths in guinea pig resident and exudate peritoneal macrophages, as demonstrated by an abbreviated fixation procedure for electron microscopy. *Z. Zellforsch. mikrosk.* 126: 135-156.
- * Bretscher, R. F. & M. C. Raff, 1975. Mammalian plasma membranes. *Nature, Lond.* 258: 43-49.
- Burridge, K. & J. H. Phillips, 1975. Association of actin and myosin with secretory granule membranes. *Nature, Lond.* 254: 526-529.
- Carter, S. B., 1972. The cytochalasins as research tools in cytology. *Endeavour* 31: 77-82.
- * Cook, G. W. M. & R. W. Stoddart, 1973. Surface carbohydrates of the eukaryotic cell. Academic Press, London/New York.
- Daems, W. Th., 1974a. Electronenmicroscopie, principes en toepassingen. In: M. van der Ploeg & W. Th. Daems (Eds): *Methoden van medisch-biologisch onderzoek. Deel 2: Celbiologische methoden.* Universitaire Pers, Leiden. p. 96-112.
- Daems, W. Th., 1974b. Opnameprocessen en grensvlakken. In: P. van Duijn, W. Th. Daems, C. J. H. van den Broek, R. J. P. Aalpol & D. van der Mei (Eds): *Celbiologie. Symposium Ontwikkelingen in de Celbiologie.* Biologische Raad van de Koninklijke Nederlandse Akademie van Wetenschappen, oktober 1973, Amsterdam. Pudoc, Centrum voor Landbouwpublicaties en Landbouwdocumentatie, Wageningen. p. 148-177.
- Drochmans, P., J. C. Wanson & R. Mosselmans, 1975. Isolation and sub-fractionation on Ficoll gradients of adult rat hepatocytes. *J. biophys. biochem. Cytol.* 66: 1-22.
- Duve, C. de, 1969. The lysosome in retrospect. In: J. T. Dingle & H. B. Fell (Eds): *Lysosomes in biology and pathology, Vol. I.* Noord-Hollandse Uitg. Mij. p. 3-43.
- Edelman, G. M., 1974. A perspective of cell surface structure and function. In: B. D. Kahan & R. A. Reisfeld (Eds): *The cell surface.* Plenum Press, New York/London. p. 245-270.
- Emeis, J. J., 1976. Cell coat of rat liver Kupffer cells. Ultrastructural histochemistry. *J. Reticuloend. Soc.*
- Emeis, J. J. & E. Wisse, 1975. On the cell coat of rat liver Kupffer cells. In: R. van Furth (Ed.): *Mononuclear phagocytes in immunity, infection and pathology.* Proc. 2nd Conf. on Mononuclear Phagocytes, Leiden, September 1973. Blackwell Sci. Publ., Oxford/London/Edinburgh/Melbourne. p. 315-325.

- Foreman, J. C., J. L. Mongar & B. D. Gromperts, 1973. Calcium ionophores and movement of calcium ions following the physiological stimulus to a secretory process. *Nature, Lond.* 245: 249-251.
- Ghadially, F. N., 1975. Ultrastructural pathology of the cell. Butterworths, London/Boston.
- * Hepler, P. K. & B. A. Palevitch, 1974. Microtubules and microfilaments. *A. Rev. Pl. Physiol.* 25: 309-362.
- Ito, S., 1974. Form and function of the glycocalyx on free cell surfaces. *Phil. Trans. R. Soc. London B* 268: 55-66.
- Jacques, P. J., 1969. Lysosomes and homeostatic regulators. In: G. W. Wolsten-Holme & J. Knight (Eds): Ciba Symposium on 'Homeostatic regulators'. Churchill Ltd., London. p. 180.
- * Kraemer, P. M., 1971. Complex carbohydrates of animal cells: biochemistry and physiology of the cell periphery. In: (L. A. Manson), Biomembranes. Plenum Press, New York. Vol. I. p. 67-190.
- Malhotra, S. K. & A. van Harreveld, 1968. Molecular organization of the membranes of cells and cellular organelles. In: E. C. Bittar & N. Bittar (Eds): The biological basis of medicine. Vol. I. Academic Press, New York. p. 3-68.
- Oda, M., V. M. Price, M. M. Fisher & M. J. Philips, 1974. Ultrastructure of bile canaliculi with special reference to the surface coat and pericanalicular web. *Lab. Invest.* 31: 314-323.
- * Porter, K. R., 1973. Microtubules in intracellular locomotion. In: Locomotion of tissue cells. Ciba Foundation Symposium 14. Elsevier, Excerpta Medica, North-Holland Ass. Sci. Publ., Amsterdam/London/New York. p. 149-169.
- * Rambourg, A., 1971. Morphological and histochemical aspects of glycoproteins at the surface of animal cells. *Int. Rev. Cytol.* 31: 57-114.
- Rambourg, A. & C. P. Leblond, 1967. Electron microscope observations on the carbohydrate-rich cell coat present at the surface of cells in the rat. *J. biophys. biochem. Cytol.* 32: 27-53.
- Revel, J. P. & S. Ito, 1967. The surface components of cells. In: B. D. Davis & L. Warren (Eds): The specificity of cell surfaces. Prentice Hall, New Jersey. p. 211-234.
- Robertson, J. D., 1959. The ultrastructure of cell membranes and their derivatives. *Biochem. Soc. Symp.* 16: 3.
- Robertson, J. D., 1962. The membrane of the living cell. *Scient. Am.* 206: 65-72.
- Rothman, S. S., 1975. Protein transport by the pancreas. *Science, N.Y.* 190: 747-753.
- Shields, R., 1975. Microtubules and membrane topography. *Nature, Lond.* 256: 257-258.
- * Singer, S. J. & G. L. Nicholson, 1972. The fluid mosaic model of the structure of cell membranes. *Science, N.Y.* 175: 720-731.
- Stockem, W., 1976. Endocytosis. In: G. A. Jamieson & D. M. Robinson (Eds): Mammalian cell membrane. Vol. 5.

- * Trump, B. F., 1975. The network of intracellular membranes. In: L. Weissmann & R. Claiborne (Eds): Cell membranes. Biochemistry, cell biology and pathology. H.P. Publ. Co. Inc., New York. p. 123-134.
- Unanue, E. R., 1974. Cellular events following binding of antigen to lymphocytes. *Am. J. Pathol.* 77: 2-20.
- Weiss, L., 1969. The cell periphery. *Int. Rev. Cytol.* 26: 63-105.
- * Weissmann, G. & R. Claiborne (Eds), 1975. Cell membranes. Biochemistry, cell biology and pathology. H.P. Publ. Co. Inc., New York.
- Wessels, N. K., B. S. Spooner & M. A. Luduena, 1973. Surface movements, microfilaments and cell locomotion. In: Locomotion of tissue cells. Ciba Foundation Symposium 14. Elsevier, Excerpta Medica, North-Holland Ass. Sci. Publ., Amsterdam/London/New York. p. 53-82.
- Wisse, E., 1974. Observations in the fine structure and peroxidase cytochemistry of normal rat liver Kupffer cells. *J. Ultrastruct. Res.* 46: 393-426.

Biologische membranen als selectieve barrières

(E. J. Ariëns en A. M. Simonis)

- Ariëns, E. J., 1964. Molecular pharmacology, Vol. I. The mode of action of biologically active compounds. Academic Press, New York/London, p. 3-109.
- Ariëns, E. J., 1971. Drug design, Vol. I (p. 2-263) and Vol. II (p. 2-117). Academic Press, New York/London.
- Ariëns, E. J. & A. M. Simonis, 1973. Inleiding in de algemene toxicologie. Stafleu's wetenschappelijke uitgeversmaatschappij B.V., Leiden, p. 45-87.
- Ariëns, E. J. & A. M. Simonis, 1975. Algemene principes van de farmacologie. In: W. Lammers, F. A. Nelemans & P. Siderius (Eds): Algemene farmacotherapie. Stafleu's wetenschappelijke uitgeversmaatschappij B.V., Leiden, p. 1-31.
- Bailar, J. C., 1971. Some coordination compounds in biochemistry. *Am. Scient.* 59: 586-592.
- Bernards, J. A. & L. N. Bouman, 1974. Fysiologie van de mens. Oosthoek's Uitgeversmaatschappij, Utrecht, p. 25-39.
- Binns, T. B., 1964. Absorption and distribution of drugs. E. & S. Livingstone Ltd., Edinburgh/London, p. 1-257.
- Brodie, B. B. & C. A. M. Hogben, 1957. Some physico-chemical factors in drug action. *J. Pharm. Pharmacol.* 9: 345-379.
- Chapman, D., 1975. Physical studies of phospholipids and biological membranes. In: K. Colbow (Ed.): On the physics of biological membranes. Department of Physics, Simon Fraser University, p. 3-111.
- Christensen, H. N., 1975. Biological transport. W. A. Benjamin, Inc., London/Amsterdam/Don Mills, Ontario/Sydney/Tokyo, p. 1-211.

- Christensen, J. J., J. O. Hill & R. M. Izatt, 1971. Ion binding by synthetic macrocyclic compounds. *Science, N.Y.* 174: 459-467.
- Frank, S. G., 1975. Inclusion compounds. *J. pharm. Sci.* 64: 1585-1601.
- Kachadorian, W. A., J. B. Wade & V. A. DiScala, 1975. Vasopressin: induced structural change in toad bladder luminal membrane. *Science, N.Y.* 190: 67-69.
- Northcote, D. H., 1968. Structure and function of membranes: Introduction. *Br. med. Bull.* 24: 99-179.
- Nystrom, R. A., 1973. Membrane physiology. Prentice-Hall, Inc., Englewood Cliffs/New Jersey, p. 63-75.
- Schanker, L. S., 1964. Physiological transport of drugs. *Adv. Pharmacol.* 1: 71-106.
- Shamoo, A. E., 1975. Carriers and channels in biological systems. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 264: 1-485.
- Smyth, D. H., 1967. Intestinal absorption. *Br. med. Bull.* 23: 205-285.
- Stein, W. & W. Lieb, 1974. How molecules pass through membranes. *New Scientist* 61: 77-79.
- Zijlstra, W. G., J. R. Brunsting, F. ten Hoor, G. A. Mook & P. Rispens, 1973. Fysiologie van het interne milieu. Van Gorcum en Camp B.V., Assen, p. 13-28.

Specifiek transport door biomembranen (J. van Steveninck)

- Brouwer, A., G. G. Smits, J. Tas, A. J. Meijer & J. M. Tager, 1973. Substrate anion transport in mitochondria. *Biochimie* 55: 717-725.
- Bruijne, A. W. de & J. van Steveninck, 1970. Asymmetry of the yeast cell membrane with respect to influx and efflux of dimethylsulfoxide. *Biochim. biophys. Acta* 211: 555-564.
- Caspary, W. F., N. R. Stevenson & R. K. Crane, 1969. Evidence for an intermediate step in carrier-mediated sugar translocation across the brush border membrane of hamster intestine. *Biochim. biophys. Acta* 193: 168-178.
- Chang, K. J. & P. Cuatrecasas, 1974. Adenosine triphosphate-dependent inhibition of insulin-stimulated glucose transport in fat cells. *J. biol. Chem.* 249: 3170-3180.
- Chang, K. J., N. A. Marcus & P. Cuatrecasas, 1974. Cyclic adenosine monophosphate-dependent phosphorylation of specific fat cell membrane proteins by an endogenous membrane-bound protein kinase. *J. biol. Chem.* 249: 6854-6865.
- Crane, R. K., 1974. Intestinal absorption of glucose. In: D. H. Smyth (Ed.): Biomembranes, vol. 4A, Intestinal absorption. Plenum Press, London, p. 541-553.

- Crawhall, J. C., 1972. Human hereditary disorders of membrane transport. In: L. Bolis, R. D. Keynes & W. Wilbrandt (Eds): Role of membranes in secretory processes. North-Holland Publ. Comp., Amsterdam, p. 142-150.
- Cuatrecasas, P., 1972. Properties of the insulin receptor isolated from liver and fat cell membranes. *J. biol. Chem.* 247: 1980-1991.
- Eichholz, A., K. E. Howell & R. K. Crane, 1969. Studies on the organization of the brush border in intestinal epithelial cells. *Biochim. biophys. Acta* 193: 179-192.
- Harold, F. M., 1974. Chemiosmotic interpretation of active transport in bacteria. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 227: 297-311.
- Hengstenberg, W., W. K. Penberthy, K. L. Hill & M. L. Morse, 1969. Phosphotransferase system of *Staphylococcus aureus*. *J. Bact.* 99: 383-388.
- Jaspers, H. T. A. & J. van Steveninck, 1975. Transport-associated phosphorylation of 2-deoxy-D-glucose in *Saccharomyces fragilis*. *Biochim. biophys. Acta* 406: 370-385.
- Jung, C. Y., 1975. Carrier-mediated glucose transport across human red cell membranes. In: D. MacN. Surgenor (Ed.): The red blood cell, 2nd ed., Academic Press, New York, p. 705-751.
- Kotyk, A., 1967. Mobility of the free and of the loaded monosaccharide carrier in *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochim. biophys. Acta* 135: 112-119.
- Kulaev, I. S., 1975. Biochemistry of inorganic polyphosphates. *Rev. Physiol. Biochem. Pharmacol.* 73: 131-158.
- Meeuwisse, G. W., 1970. Glucose-galactose malabsorption. *Scand. J. clin. Lab. Invest.* 25: 145-149.
- Mitchell, P., 1961. Coupling of phosphorylation to electron and hydrogen transfer by a chemiosmotic type of mechanism. *Nature, Lond.* 191: 144-148.
- Parsons, R. G. & R. W. Hogg, 1974. Crystallization and characterization of the L-arabinose-binding protein of *E. coli* B/r. *J. biol. Chem.* 249: 3602-3607.
- Romano, A. H. & H. L. Kornberg, 1969. Regulation of sugar uptake by *Aspergillus nidulans*. *Proc. R. Soc. B* 173: 475-490.
- Rosenberg, Th. & W. Wilbrandt, 1955. The kinetics of membrane transports involving chemical reactions. *Expl. Cell Res.* 9: 49-67.
- Schneider, R. P. & W. R. Wiley, 1971. Regulation of sugar transport in *Neurospora crassa*. *J. Bact.* 106: 487-492.
- Schultz, J. S., 1971. Passive asymmetric transport through biological membranes. *Biophys. J.* 11: 924-943.
- Simoni, R. D., T. Nakazawa, J. B. Hays & S. Roseman, 1973. Isolation and characterization of the lactose phosphotransferase system in *Staphylococcus aureus*. *J. biol. Chem.* 248: 932-940.
- Souzu, H., 1967a. Decomposition of polyphosphate in yeast cells by freeze thawing. *Archs Biochem. Biophys.* 120: 338-343.

- Souzu, H., 1967b. Location of polyphosphate and polyphosphatase in yeast cells and damage to the protoplasmic membrane of cells by freeze-thawing. *Archs Biochem. Biophys.* 120: 344-351.
- Steveninck, J. van & H. L. Booij, 1964. The role of polyphosphates in the transport mechanism of glucose in yeast. *J. Gen. Physiol.* 48: 43-60.
- Szymona, 1962. Purification and properties of the new hexokinase utilizing inorganic polyphosphate. *Acta biochim. pol.* 9: 165-181.
- Szymona, M. & W. Ostrowsky, 1964. Inorganic polyphosphate glucokinase of *Mycobacterium phlei*. *Biochim. biophys. Acta* 85: 283-295.
- Umnov, A. M., A. G. Steblyak, N. S. Umnova, S. E. Mansurova & I. S. Kulaev, 1975. Studies on the possible physiological role of the system high polymeric polyphosphates - polyphosphatases in *Neurospora crassa*. *Microbiology (USSR)* 44: 414-421.
- Weimberg, R. & W. L. Orton, 1965. Synthesis and breakdown of the polyphosphate fraction and acid phosphomonoesterase of *Saccharomyces mellis* and their location in the cell. *J. Bact.* 89: 740-747.
- Whittam, R. & A. R. Chipperfield, 1975. The reaction mechanism of the sodium pump. *Biochim. biophys. Acta* 415: 149-171.
- Wilbrandt, W., 1961. Zuckertransporte. In: *Biochemie des aktiven Transports*. Springer-Verlag, Berlin, p. 112-136.
- Wilbrandt, W. & Th. Rosenberg, 1961. The concept of carrier transport and its corollaries in pharmacology. *Pharmac. Rev.* 13: 109-183.

Register

- acetylcholine 95 e.v.
acetylcholine-esterase 67, 69,
95 e.v.
acetylcholine-esterase-remmers 98,
104
Acholeplasma laidlawii 52
actine 85
adsorptietheorie 12
albumine 93, 118
Alcian Blue 83
amfetamine 108
aminozuurtransport 142
anionentransport 69
antibiotica 28
anticide 106
antidiuretisch hormoon 99
antigenen 38, 72
anti-lichamen 84
antiport-systemen 131 e.v.
asymmetrisch membraan 67 e.v.,
149
ATPase 70, 135, 145
azo-kleurstoffen 104
- barrièrefunctie 9, 18, 88, 117
, selectiviteit bij - 91
biomembraan
- als celorganel 34
, samenstelling van - 23
'black films' 18, 53 (zie ook
zwarte films)
bloedgroepen 37, 73
bloed-hersen-barrière 90, 102, 115,
120
bloedplaatje 74
bloedstolling 74
'bristle-coated vesicles' 84
- calciumionen 86
capillairwand 93, 117
- 'capping' 86
carbenicilline 114
'carrier' 27, 93, 112, 123 e.v., 148
carrier-substraat-complex 124
celcontacten 80
'cell coat' 81
celmembraan 9 (zie ook
biomembraan, membraan en
plasmamembraan)
, doorlaatbaarheid van - 91
celoppervlak, bewegingen van - 86
centraal zenuwstelsel 90, 100 e.v.,
111 e.v.
chelaatvormers 111
chelaten 105, 111
chemi-osmotische koppeling 143
colchicine 87
compartimenten, intramurale - 89
competitie 126, 138
component-3, eiwit- 68 e.v.
concanavale A 83
concentratiegradiënt 128, 130, 134,
138, 147
contractiel apparaat 85
co-transport 141, 146
counter-transport 130
covalente binding 105, 113
curare 98, 102
cytochalasine B 86
- detergentia 101
'diauxie' 127
dicyclohexylcarbodiimide 146
diffusie 89, 93, 148
dynamisch evenwicht 128
- eiwit-component-3 68 e.v.
eiwitten
, binding aan - 93, 118 e.v.
, extrinsieke - 63

- , functie van - 69 e.v.
- , globulaire - 62
- , intrinsieke - 63, 71
- , membraanpenetrenderende - 63, 74
- in membranen 16, 19, 35, 62 e.v.
- elektrogene natriumpomp 141
- endocytose 33, 37, 80, 81, 84 e.v.
- endoplasmatisch reticulum 78
- endoplasmatische ruimte 79
- energiekoppeling 134
 - , indirecte - 141 e.v.
- enzymen
 - , glycolytische - 69
 - , proteolytische - 67, 72
- epicholesterol 56
- erythrocyt 14, 64, 68, 74, 80, 85
- evenwicht 128
- exocytose 40, 80, 86 e.v.
- exoplasma 86
- exoplasmatische ruimte 79
- externe milieu 88
- extrinsieke eiwitten 63

- fagocytose 37, 84, 86
- fagosomen 79
- fasediagram 44
- fase-overgang 25, 45
- ferritine 84
- fibroblasten 74
- filamenten 87
- fosfatiden 17, 25 (zie ook fosfolipiden, lipiden)
- fosfatidylcholine 44
- fosfatidylserine 71, 73
- fosfo-enol-pyruvaat 136
- fosfolipases 68, 75
- fosfolipiden 43
- fosfotransferase-systeem 136

- 'geënergetiseerde' toestand 144
- gelatinemembraan 15
- gel-fase 45
- gemeenschappelijke intermediair 134, 136, 141

- genetische controle 129
- 'glucose-galactose-malabsorption' 129
- glycocalyx 37, 81 e.v.
- glycoforine 68, 69 e.v.
- glycolipiden 43, 81
- glycoproteïnen 37, 74, 81, 83
- Golgi-apparaat 78
- gramicidinen 30, 54

- α -helix bij eiwit 63, 73
- hemagglutinine 73
- hemoglobine 65
- hemolyse 68
- hydrofilie 115
- hydrofobie/hydrofilie-balans 11, 91

- influenza-virus 73
- insecticiden 99, 104
- intrinsieke eiwitten 63, 71
- ionenparen 105, 110
- ionisatiegraad 105
- ionoforen 30, 86, 105, 112

- kern 78
- kolloïdaal ijzer 83
- koolhydraten in membranen 37
- koolzuuranhydrase 70

- Langmuir-trog 14, 47, 74
- lecithine 44
- lichaamsvreemde stoffen 94, 101, 114
- lipide-eiwit-interactie 60, 71
- lipiden 14, 43
- lipidendubbellaag 62, 74 e.v., 90 e.v.
- lipide-vesicles 53
- lipofilie 93, 100, 103, 111, 118 e.v.
- lipoidtheorie 10
- liposomen 48 e.v.
- lyso-fosfolipiden 46
- lysosomen 79

- macrofagen 82
- malaat-aspartaat-shuttle 132
- membraan, asymmetrie van - 67 e.v., 149
- membraaneiwwitten 62
 - , functie van - 69 e.v.
 - , intrinsieke - 71
 - , lipide-afhankelijkheid bij - 71
- membraanpartikeltjes 76
- membraanpenetrenderende eiwwitten 63, 74
- membraanpotentiaal 95 e.v.
- meromyosine 85
- micellen 25, 46
- Michaelis-constante 124
- microfilamenten 85 e.v.
- microtubuli 87
- microvilli 82
- 'milieu interne' 88
- mitochondriën 20, 35, 78
- model
 - van Benson 20
 - van Danielli 16, 24
 - van Danielli en Davson 62
 - van Gorter en Grendel 15, 74
 - van Green 21
 - van Lucy 25
 - van Robertson 19, 62, 78
 - , transport- 24 e.v.
- modelsystemen 42
- molekuulgrootte 92, 118
- molekuulzeef-theorie 10
- monensine 31
- monolaag 46, 74
- mozaïektheorie 12, 31, 63
- mucopolysacchariden 81, 83
- mutanten 129, 146
- myelineschede 16, 18

- narcose 39
- narcotica 100 e.v.
- natriumpomp, elektrogene - 141
- neuraminidase 73
- neurotransmitter 40, 95

- oligosacchariden 69, 72 e.v.
- ontkoppelaars 146
- oppervlaktedruk van lipiden 14, 75
- ouabaine 71, 136
- overgangstemperatuur 45

- penetratie, passieve - 33
- 'peptide mapping' 67
- permeabiliteit
 - , fysiologische - 13, 34
 - , fysische - 13, 34
- permeabiliteitsconstante 124
- peroxidase 83
- pH 106 e.v.
- pinocytose 86
- pK_a 106 e.v.
- plasmaeiwwitten, binding aan - 93, 118 e.v.
- plasmamembraan 78 e.v., 85 (zie ook biomembraan, celmembraan en membraan)
- plasmolyse 10
- polyenantibiotica 57
- polyfosfaat 139
- poriën 25, 29, 91 e.v., 94 e.v.
- poriëntheorie 10
- pseudopodiën 85
- pyruvaatkinase 70

- quaternaire ammoniumbase 102 e.v., 111, 120

- receptoreiwit 95 e.v.
- 'receptor site' 95 e.v.
- regenboogforel 109, 117
- regulatie 147
- remming
 - , acetylcholine-esterase- 98, 104
 - , competitieve - 126
 - , niet-competitieve - 127
- renale glucosurie 129
- renale rachitis 129
- Ruthenium rood 83

- secretie 87
 secreetkorrels 79
 sequestratie
 , chemische - 116
 , fysische - 116
 sialinezuur 69, 73
 specificiteit 125
 spectrine 69, 80
 spiraalstructuur, eiwit- 63
 structuurmodellen 14 e.v.
 substraatanalogen 126, 142
 suikertransport 139, 141
 sulfonamiden 119
 symport 141
- tertiaire base 104
 translocator 33
 translokatie 125
 transport
 , actief - 32, 147
 , aminozuur- 142
 , aspecifiek - 122
 , carrier- 27, 93, 112, 123, 148
 , passief - 32, 147
 - door poriën 24
 , specifiek - 28, 33, 122
 , suiker- 139, 141
 - als vectoriële reactie 148
 , vormen van - 31 e.v.
 transportgebonden fosforylering
 139
- transportmodellen 24 e.v.
 transportsnelheid, maximale - 124
 transportvorm 113
 tubuline 87
 tumorcellen 85
- ultrafiltratie 90 e.v., 115 e.v.
 'unit membrane' 19, 62, 78
- valinomycine 30, 50, 54
 verdelingscoëfficiënt 11, 92 e.v.,
 100, 103, 114
 verzadiging 125
 vetoplosbaarheid 93, 100, 103
 vloeistofcompartimenten
 , extramuraal - 88 e.v., 106, 114
 , intramuraal - 89 e.v.
 vouwbladstructuur, eiwit- 62
 vries-etsen 22, 63, 76
- xenobiotica 114
- ziekte van Hartnup 130
 zilvermethenamine 83
 zilverproteïnaat 83
 zwarte films 53 (zie ook
 'black films')