

PL ISSN 0324-833X

POLSKIE
TOWARZYSTWO
ANATOMICZNE

POLSKIE
TOWARZYSTWO
BIOLOGII
KOMÓRKI

TOM 22 1995

Suplement nr 5

Postępy Biologii Komórki

Redaktor Andrzej Klein

25-lecie IBM UJ

wybrane zagadnienia
z biochemii, biofizyki
i biologii komórki

<http://rcin.org.pl>

Kwartalnik Polskiego Towarzystwa Anatomicznego, Polskiego Towarzystwa Biologii Komórki, Polskiej Sieci UNESCO oraz Fundacji Biologii Komórki i Biologii Molekularnej wydawany z częściową pomocą finansową Komitetu Badań Naukowych.

Redaguje Kolegium:

Szczepan BILIŃSKI (*Instytut Zoologii UJ, 30-060 Kraków, ul. Ingardena 6*),
Jerzy KAWIAK (*Zakład Cytologii Klinicznej CMKP, 01-813 Warszawa, ul. Marymoncka 99*),
Maciej KAWALEC (*Zakład Cytologii Klinicznej CMKP, 01-813 Warszawa, ul. Marymoncka 99*),
Wincenty KILARSKI (*Instytut Zoologii UJ, 30-060 Kraków, ul. Ingardena 6*),
Jan MICHEJDA (*Zakład Bioenergetyki UAM, 61-701 Poznań, ul. Fredry 10*),
Maria OLSZEWSKA (*Zakład Cytologii i Cytochemii Roślin Instytutu Fizjologii i Cytologii UŁ, 90-237 Łódź, ul. Banacha 12/16*),
Maciej ZABEL (*Zakład Histologii AM, 50-368 Wrocław, ul. Chałubińskiego 6a*)

Rada Redakcyjna:

Zofia OSUCHOWSKA – przewodnicząca, Mieczysław CHORAŻY, Leszek CIECIURA, Antoni HORST, Aleksander KOJ, Włodzimierz KOROHODA, Leszek KUŹNICKI, Olgierd NARKIEWICZ, Aleksandra PRZEŁĘCKA, Aleksandra STOJAŁOWSKA, Lech WOJTCZAK

Adres Redakcji: Centrum Medyczne Kształcenia Podyplomowego, ul. Marymoncka 99, 01-813 Warszawa, tel. 340 344, fax 340 470.

Wszystkie prawa zastrzeżone ©. Kopiowanie części lub całości, bez uprzedniego pisemnego zezwolenia Fundacji Biologii Komórki i Biologii Molekularnej jest zabronione.

Oddano do składu w sierpniu 1995 r. Podpisano do druku we wrześniu 1995 r. Druk ukończono w październiku 1995 r. Skład: SCRIPT, Warszawa, Teligi 6/22, tel. 641 47 70. Druk: Paper & Tinta, Warszawa, Klaudyny 32, tel. 33 37 88.

WSTĘP

W dniach 9–14 maja 1995 roku odbyło się w Zakopanem XXIV Seminarium Instytutu Biologii Molekularnej UJ jako jedna z imprez związanych z obchodami 25-lecia istnienia Instytutu. Seminaria naukowe IBM odbywają się corocznie od powstania Instytutu w roku 1970 do dziś z wyjątkiem roku 1981 (stan wojenny). Z reguły mają charakter monotematyczny, profil naukowy określa organizator i akceptuje Rada Naukowa. Celem ostatniego spotkania była prezentacja osiągnięć naukowych poszczególnych zespołów badawczych Instytutu, stąd duże zróżnicowanie tematyczne i różna skala trudności prezentowanych referatów. W dniu otwarcia Seminarium odbyła się organizowana przez zespoły prof. A. Koja i doc. A. Dubina sesja międzynarodowa pt „Selected topics in molecular biology: cytokines and protease inhibitors”, w której wzięli udział zaproszeni goście z: Danii, Francji, Kanady, Niemiec, USA i Wielkiej Brytanii. Następne sesje poświęcone były wybranym zagadnieniom z biochemii, biofizyki, biologii komórki, mikrobiologii i immunologii referowanym przez pracowników Instytutu. W Seminarium uczestniczyło 68 osób, w tym dziewięcioro zaproszonych gości z kraju i z zagranicy. Podczas spotkania wygłoszono 63 referaty (13 w sesji międzynarodowej).

Przez wiele lat referaty wygłaszane podczas seminariów instytutowych publikowane były w *Zeszytach Naukowych Uniwersytetu Jagiellońskiego* w serii *Biologia Molekularna*. Od roku 1993 wybrane referaty seminaryjne publikowane są dzięki wydatnej pomocy i wsparciu finansowemu Fundacji Biologii Komórki i Biologii Molekularnej w formie artykułów przeglądowych w suplementach „Postępów Biologii Komórki”. Publikacje prezentowane w niniejszym suplemencie tylko częściowo odzwierciedlają zainteresowania naukowe i tematykę badawczą Instytutu. Przedstawienie pełnego zakresu zagadnień referowanych na Seminarium w Zakopanem było niemożliwe zarówno z powodu określonej objętości suplementu jak i ograniczonych możliwości czasowych kierowników poszczególnych zespołów badawczych.

Organizatorzy Seminarium składają serdeczne podziękowania za umożliwienie publikacji materiałów seminaryjnych w czasopiśmie „Postępy Biologii Komórki” oraz doc. A. Kordowiak i prof. prof. W. Korohodzie, J. Pryjmie, T. Sarnie, S. Więckowskiemu za bezpłatne recenzowanie publikowanych artykułów.

Za Komitet Organizacyjny XXIV Seminarium IBM UJ

Andrzej Klein

BIOSYNTeza FLAWIN I BIAŁKA WIĄZĄCE RYBOFLAWINĘ

FLAVINS BIOSYNTHESIS AND RIBOFLAVIN-BINDING PROTEINS

Zdzisław ŻAK

Zakład Biochemii Zwierząt, Instytut Biologii Molekularnej UJ, Kraków

Streszczenie: Człowiek i wyższe zwierzęta nie mają zdolności do syntezy izoaloksazyny, która jest komponentą flawin. Ta substancja jest dostarczana w diecie w postaci ryboflawiny. Substratem do syntezy ryboflawiny w mikroorganizmach jest GTP. Ryboflawina jest prekursorem nukleotydów flawinowych, które są koenzymami w dużej liczbie oksydoreduktaz. Reakcję tworzenia się mononukleotydu flawinowego (FMN) katalizuje flawokinaza przenosząc grupę fosforanową z ATP na ryboflawinę. Natomiast syntetaza FAD tworzy dwunukleotyd flawinoadeninowy (FAD).

Ryboflawina jest łatwo wydalana z organizmów zwierzęcych. Jest zatrzymywana w tkankach, w surowicy krwi i w jajach ptaków w postaci kompleksu z białkiem wiążącym ryboflawinę (RBP). Opisano własności strukturalne i chemiczne RBP z jaja kury.

Słowa kluczowe: białko wiążące ryboflawinę, RBP, flawokinaza, FAD-syntetaza, syntaza lumazyny, syntaza ryboflawiny.

Summary: Human and other higher animals are unable to synthesize the isoalloxazine component of flavins, so that they must obtain this substance from their diets in the form of riboflavin. The riboflavin is synthesised by microorganisms in a pathway that starts from GTP. It is a precursor of flavin nucleotides, which are utilized by large number of oxidoreductases. Transfer of the phosphorous group from ATP to riboflavin to form flavin mononucleotide (FMN) is catalysed by flavokinase, in the presence of FAD-synthetase flavin adenine dinucleotide is formed.

Riboflavin is a diffusible compound and is easily eliminated from the animal organism. It is retained in tissues, blood serum and avian eggs as a riboflavin-binding protein (RBP) complexes. The structural and chemical properties of hen egg RBP are described.

Key words: riboflavin-binding protein, flavokinase, RBP, FAD synthetase, lumasin synthase, riboflavin synthase

I. WSTĘP

Flawiny są w procesach biologicznych kluczowymi związkami o funkcji koenzymów w aktywności katalitycznej oksydoreduktaz. Występujący w cząsteczce flawiny trójpierścieniowy układ izoaloksazyny i jego własności oksydacyjno-redukcyjne umożliwiły ewolucję molekularną organizmów w okresie prebiotycznym. Stało się to możliwe gdy przemiana nukleotydów purynowych doprowadziła do powstania cząsteczek ryboflawiny i nukleotydów flawinowych. Sprzężenie przemiany nukleotydu guanidynowego z syntezą flawin utrzymało się w organizmach autotroficznych a wśród heterotrofów zanikło i dlatego dla zwierząt ryboflawina (witamina B₂) jako prekursor nukleotydów flawinowych jest czynnikiem egzogennym.

Utrata zdolności do syntezy ryboflawiny i innych rozpuszczalnych w wodzie witamin przez kręgowce spowodowała, że organizmy te musiały zabezpieczyć się przed utratą tych drobnocząsteczkowych egzogennych czynników. W przypadku ryboflawiny utrzymywanie jej w odpowiednim stężeniu jest uzależnione u kręgowców zarówno w rozwoju zarodkowym jak i u dorosłych organizmów od obecności swoiście wiążących ryboflawinę białek, pełniących funkcję magazynującą i transportującą. Zwierzęta jajorodne białka wiążące ryboflawinę gromadzą w strukturze zapasowej jaja w najbliższym otoczeniu w stosunku do zarodka. Samice ssaków w okresie ciąży mają w osoczu krwi zwiększoną zawartość białek swoiście wiążących ryboflawinę.

II. DEFICYT RYBOFLAWINY

Badania szczurów będących na diecie bez ryboflawiny wykazywały szybki ubytek nukleotydów flawinowych w wątrobie [35]. W ciągu 5 – 6 tygodni bezryboflawinowej diety w wątrobie szczura spada zawartość FAD do 29% a FMN do 5% stężenia normalnego. W konsekwencji w mitochondriach komórek wątroby zachodzi znaczne obniżenie utleniania NADH i z tym aktywności łańcucha oddechowego a w szczególności kompleksu I czyli dehydrogenazy NADH i II-dehydrogenazy bursztynianowej oraz fosforylacji oksydacyjnej. Metabolizm acylo-CoA kwasów tłuszczowych obniża się [9, 10]. Ten problem wiąże się z wydalaniem nie metabolizowanych kwasów dwukarboksylowych i koniugatów z glicyną. Ponadto obniża się aktywność peroksyzomalnych oksydaz flawinowych jak oksydazy L-aminokwasów i D-aminokwasów [10], przy zwiększonej aktywności peroksyzomalnej β -oksydacji. Właśnie utrata zdolności β -oksydacyjnej w mitochondriach prowadzi do wydalania 4, 6 i 8-węglowych kwasów jednokarboksylowych oraz dwukarboksylowych, w następstwie niewystarczającej oksydacji kwasów tłuszczowych o średniej długości łańcucha węglowodorowego i metabolizmu wielu aminokwasów apolarnych [9, 10]. Przy tym osła-

bieniu aktywności mitochondrialnego utleniania kwasów tłuszczowych pewnym wyrównywaniem metabolizmu jest zwiększona aktywność enzymów peroksyzomalnych.

U ludzi z miopatią, chorobę powoduje obniżenie metabolizmu tłuszczów. Ryboflawina jest niezbędna jako prekursor dwunukleotydu flawinoadeninowego będąc koenzymem dehydrogenazy acylo-CoA, flawoproteidu transportującego elektrony (ETF) i dehydrogenazy ETF. Brak FAD powoduje zmniejszenie utleniania kwasów tłuszczowych w procesie β -oksydacji [5, 28]. Z ostatnich badań [2, 5] wynika, że zarówno w aspekcie klinicznym jak i biochemicznym uzyskuje się znaczną poprawę po zastosowaniu terapii wysokimi dawkami ryboflawiny [2, 28].

III. BIOSYNTeza FLAWIN

Ryboflawina jako prekursor flawinowych koenzymów jest syntetyzowana przez organizmy autotroficzne i niektóre mikroorganizmy. Natomiast dla większości organizmów heterotroficznych jest substancją egzogenną. Substratem z którego powstaje ryboflawina jest GTP. Po wstępnej degradacji nukleotydu guanidynowego powstały 5-amino-6-ribitolamino-2,4-pirimidindion staje się prekursorem do syntezy rybitolumazyny. Związek ten jest prekursorem w biosyntezie ryboflawiny, a także przekazywaniem energii w procesie bioluminescencji [23]. Enzymatyczne przekształcanie ryboflawiny w nukleotydy jest uniwersalnym procesem biochemicznym.

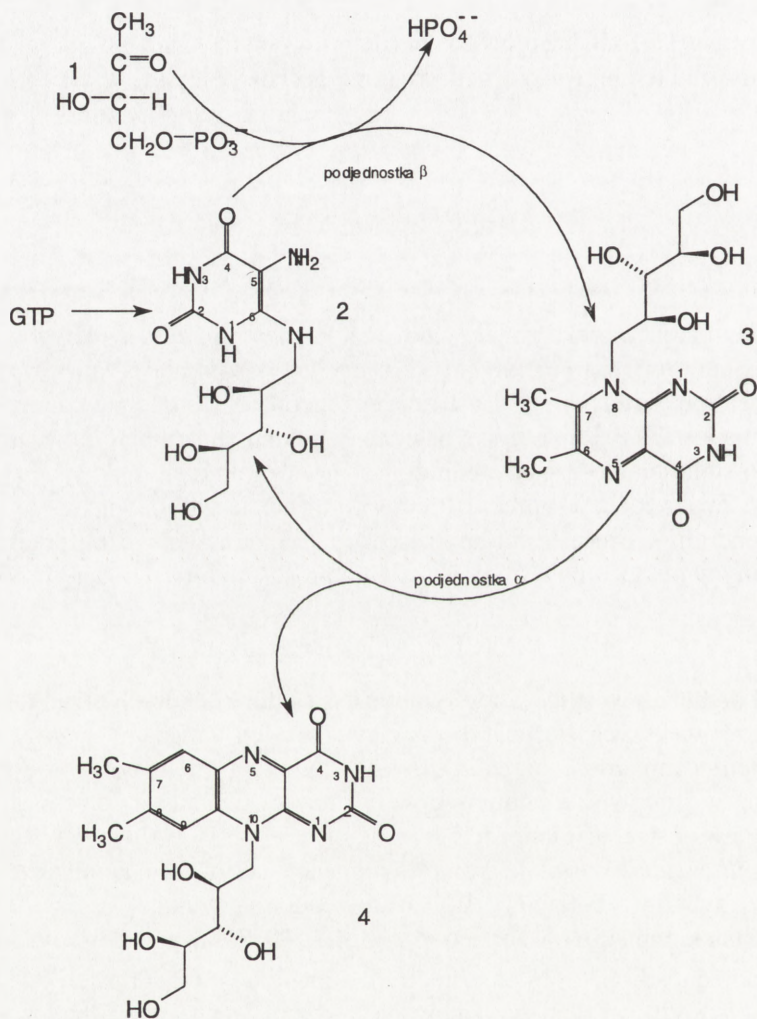
III-1. SYNTeza RYBOFLAWINY

Wśród organizmów żyjących w symbiozie są gatunki, których przemiana umożliwia syntezę większych stężeń ryboflawiny. Do nich zaliczamy grzyby z rodzaju *Eremothecium* (np. *Eremothecium asbyii*). Produkują one ryboflawinę podnosząc stężenie jej w środowisku wodnym powyżej rozpuszczalności, co prowadzi do wytrącania się w postaci krystalicznej.

U *Bacillus subtilis* istnieje kompleks mający aktywność katalityczną syntazy lumazyny i syntazy ryboflawiny. Wykazano regularną strukturę geometryczną dwudziestościanu kompleksu o wzorze $\alpha_3\beta_{60}$ [3, 4, 6, 20, 21]. Kapsydę dwudziestościanu budują podjednostki β , które otaczają tryplet białkowy podjednostek α [3]. Podjednostki β [7, 8, 20, 21, 22] wyizolowane z kompleksu syntazy lumazyny/syntazy ryboflawiny mają aktywność katalityczną syntazy lumazyny. Sekwencja reszt aminokwasowych centrum katalitycznego wykazała bardzo dużą homologię z syntazą lumazyny w *Escherichia coli* i *Photobacterium leiognathi*, w których lumazyna uczestniczy w procesie bioluminescencji [23]. Wykazano również homologię w genach

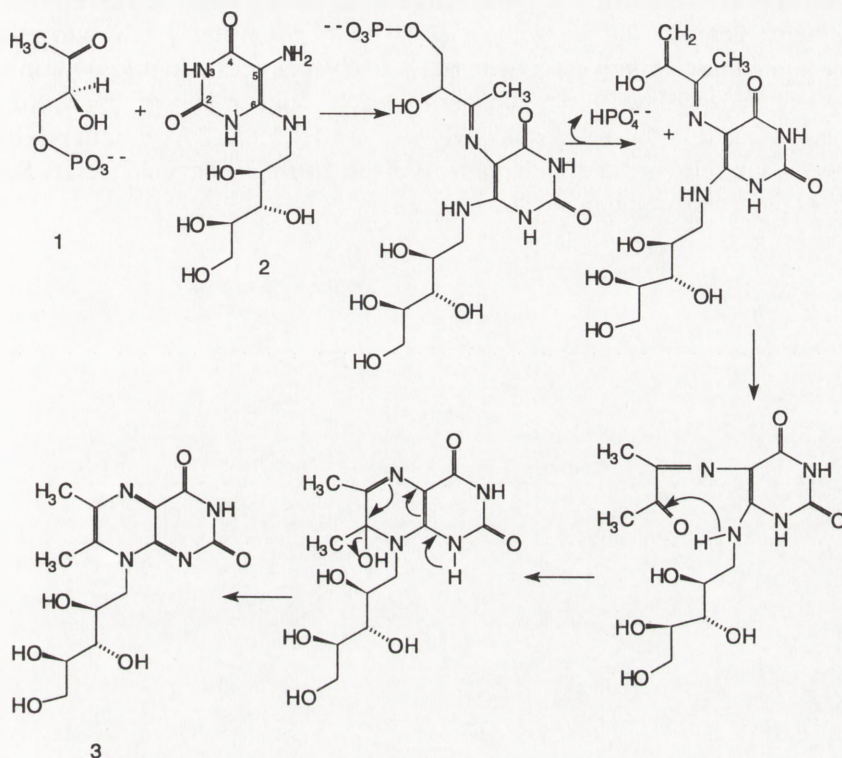
syntazy lumazyny tych bakterii. Natomiast podjednostki α [3, 6, 7] mają aktywność katalityczną syntazy ryboflawiny. Reakcje katalizowane przez kompleks syntaza lumazyny/syntaza ryboflawiny z *Bacillus subtilis* [21] są przedstawione na rys. 1.

Synteza lumazyny w mikroorganizmach rozpoczyna się od degradacji GTP, która prowadzi do powstania 5-amino-6-ribitylamino-2,4-pyrimidynodionu. Ten produkt degradacji GTP pod wpływem katalitycznej aktywności β -podjednostki kompleksu



Rys. 1. Reakcje katalizowane w kompleksie syntaza lumazyny/syntaza ryboflawiny [37]. 1. 3,4-dihydrokso-2-butanon-fosforan; 2. 5-amino-6-ribitylamino-2,4-pyrimidynodion; 3. 6,7-dimetyl-8-ribitylu-mazyna; 4. ryboflawina [21].

syntazy lumazyny/syntazy ryboflawiny jest przekształcany w 6,7-dimetyl,8-rybityl-lumazynę przez połączenie cztero-węglowego fragmentu 3,4-dihydroksy-2-butanon-4-fosforanu [37]. Volk i Bacher [36] zaproponowali następujący mechanizm biochemiczny tego procesu, który przedstawia rys. 2.



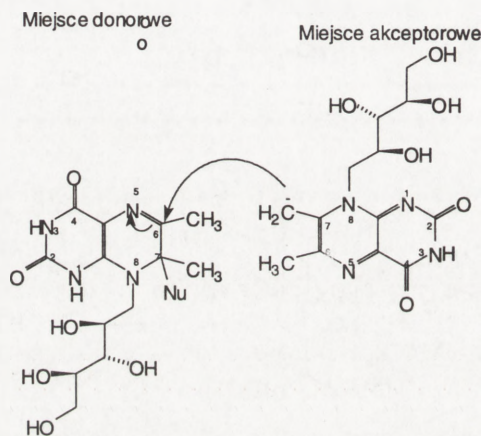
Rys. 2. Hipotetyczny mechanizm syntezy lumazyny. 1. fosforan 3,4-dihydroksy-2-butanonu 2. 5-amino-6-rybitylamino-2,4-pyrimidynodion; 3. 6,7-dimetyl-8-rybityllumazyna [21].

W pierwszym etapie zachodzi kondensacja 3,4-dihydroksy-2-butanon-4-fosforanu z grupą aminową 5-amino-6-rybitylamino-2,4-pyrimidynodionu. Defosforylacja tego połączenia przygotowuje syntezę pierścienia pyrazynowego. Zachodzi protonacja grupy karbonylowej doprowadzając do addycji zamykającej pierścień z powstaniem ugrupowania hydroksyloвого. W następstwie przegrupowań w utworzonym pierścieniu zachodzi odciążenie cząsteczki wody i aromatyzacja pierścienia pterynowego w rybityl-lumazynie.

Syntaza ryboflawiny (EC.2.5.1.9) z *Bacillus subtilis* [6, 7, 8, 22, 32] katalizuje bardzo ciekawą reakcję dysmutacji, w której dwie cząsteczki 6,7-dimetylo-8-(D-rybityl)-lumazyny tworzą cząsteczkę ryboflawiny i pirymidynodionu. Proces dysmutacji między dwoma cząsteczkami rybityl-lumazyny odbywa się w miejscu katalitycznym syntazy ryboflawiny. W miejscu katalitycznym syntazy ryboflawiny, jedna

cząsteczka lumazyny lokuje się w miejscu donorowym enzymu i będzie donorem czterowęglowego fragmentu (butenu) na korzyść drugiej cząsteczki rybityl-lumazyny zlokalizowanej w miejscu akceptorowym enzymu. Mechanizm tej reakcji [8] przebiega w następujących etapach:

1. Cząsteczka dimetylo ribitolo-lumazyny znajdująca się w miejscu akceptorowym syntazy ulega deprotonacji w grupie metylowej w położeniu 7 i w tym miejscu powstaje karboanion. Proton jest przenoszony do N-5 cząsteczki lumazyny w miejscu donorowym. Szczegółowe badania sugerują udział nukleofilnej grupy w enzymie i przypuszczalnie jest nią cząsteczka wody, grupa OH (2' lub 3') rybitolu rybityl-lumazyny znajdującej się w miejscu donorowym lub grupa OH enzymu (reszty Ser lub Thr). Przemiany tego etapu przedstawia rys. 3.

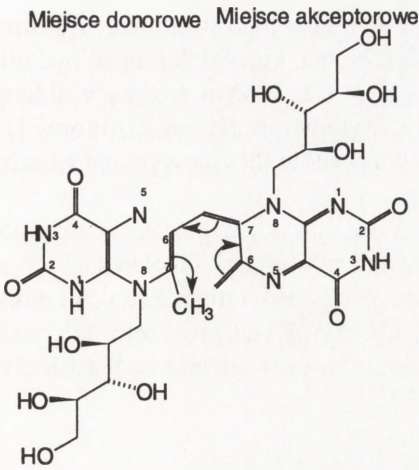


Rys. 3. Rozmieszczenie dwóch cząsteczek rybitol-lumazyny w centrum katalicznym syntazy ryboflawiny (α -podjednostki kompleksu syntaza lumazyny/syntaza ryboflawiny) [8].

2. W lumazynowym pierścieniu ulokowanym w miejscu donorowym enzymu po rozerwaniu wiązania między N-5 i C-6 zachodzi przekazanie reszty alkenowej, a utrata protonu z C-6 grupy metylowej lumazyny miejsca akceptorowego prowadzi do utworzenia przejściowego koniugatu połączonego strukturą trienową (rys. 4).

3. Zachodzi 3,3-sigma tropowe przegrupowanie układu trienowego w efekcie tworzy się sześciowęglowy pierścień (rys. 5). Aromatyzacja przez β -eliminację protonu grupy metylowej prowadzi do rozerwania wiązania C-7-N-8 i odłączenia się ryboflawiny z kompleksu trienowego miejsca akceptorowego, a miejsce donorowe opuszcza 2,4-pyrimidynodionu (rys. 6).

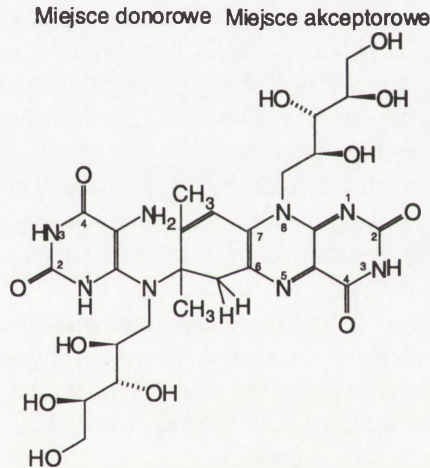
Cushman i współ. [7] dowodzą istnienia dwu stanów konformacyjnych syntazy ryboflawiny zbudowanej z trzech podjednostek. W każdej z tych trzech podjednostek są dwa miejsca wiązania lumazyny zwane akceptorowym i donorowym. Podjednostka enzymu ze zdolnością wiązania dwóch cząsteczek ribitol-lumazyny jest w konforma-



Rys. 4. Utworzenie przejściowego konjugatu z dwóch cząsteczek rybityl-lumazyny połączonych strukturą trienową [8].



Rys. 5. Proces aromatyzacji pierścienia toluenowego tworzącej się ryboflawiny i przygotowanie do rozerwania wiązania C-7-N-8 przed utworzeniem końcowych produktów[8].



Rys. 6. Końcowe produkty katalitycznej aktywności kompleksu syntaza lumazyny/syntaza ryboflawiny z *Bacillus subtilis* [8].

cji substratowej. Druga postać konformacji zwana produktową wykazuje małe powinowactwo do substratu a większe do produktu. Przejścia tych postaci odbywają się w trzech identycznych podjednostkach. Po uwolnieniu produktów następuje przejście danej podjednostki w konformację substratową, która wiąże dwie cząsteczki rybitol-lumazyny rozpoczynając następny cykl syntezy ryboflawiny.

U niektórych organizmów (np. grzybek *Schizophyllum commune*) [13] zachodzi enzymatyczne utlenianie łańcucha bocznego ryboflawiny i prowadzi do powstania

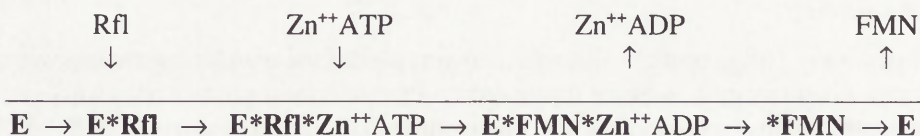
pochodnej zwanej schizoflawiną. Jest to aldehyd witaminy B₂ o strukturze: 7,8-dimetyl-10(2,3,4-trihydroksy-4-formylobutyl)-izoaloksazyna, który dalej może być utleniony do nieznanego do tej pory kwasu witaminy B₂. Enzym tworzący aldehyd witaminy B₂ katalizuje utlenianie 5'-hydroksylmetylu w ryboflawinie. Autorzy [13] sugerują, że jest to system regulacji syntezy nukleotydów flawinowych na zasadzie sprzężenia zwrotnego.

Witamina B₂ istnieje w komórkach organizmów żywych w postaci koenzymów o budowie nukleotydów FMN i FAD, które uczestniczą w procesach oksydacyjno-redukcyjnych w metabolizmie cukrów, aminokwasów, kwasów tłuszczowych i nukleotydów. Przekształcenie ryboflawiny w flawo-koenzymy jest procesem uniwersalnym i przebiega w komórkach wszystkich organizmów przy udziale swoistych cytozolowych enzymów.

III-2. FOSFORYLACJA RYBOFLAWINY

Pierwszym etapem w biosyntezie flawokoenzymów jest fosforylacja ryboflawiny do mononukleotydu flawinowego (FMN). Reakcję tą katalizuje flawokinaza, która jest 5'-fosfotransferazą ATP: ryboflawina (EC 2.7.1.26). Obecność flawokinazy wykazano w większości organizmów [24, 25] i enzym ten był izolowany z mikroorganizmów [26, 38], roślin [24] oraz z tkankach embrionów kurzych [39]. Ten cytozolowy enzym był oczyszczony z wątroby szczura [26] i wątroby zarodka kury [39] przy zastosowaniu chromatografii powinowactwa z unieruchomioną pochodną ryboflawiny w postaci N-10-flawinyl-agarozy.

W badaniach kinetycznych flawokinazy [42] zastosowano metodę hamowania kompetycyjnego wiązania substratów produktami reakcji. Wykazano, że FMN mocno hamuje tworzenie się kompleksu flawokinaza-ryboflawina a w dalszej konsekwencji utrudnia przyłączanie się drugiego substratu czyli Zn⁺⁺ATP. To sugeruje, że FMN hamuje wiązanie ryboflawiny do enzymu, a tym samym jest ona wiodącym substratem w reakcji katalizowanej przez flawokinazę z wątroby szczura. Kompetycyjne hamowanie wiązania ryboflawiny przez FMN i mieszane hamowanie wiązania Zn⁺⁺ATP przez Zn⁺⁺ADP wskazuje na mechanizm reakcji uporządkowanej bi bi (*ordered bi bi*), która przebiega następująco:



Pierwsza wiąże się ryboflawina do centrum katalitycznego flawokinazy [42] a następnie cząsteczka ATP z jonem Zn⁺⁺. Odłączanie się produktów reakcji rozpoczyna ADP, a na końcu uwalnia się FMN. Kompleks flawokinazy z Zn⁺⁺ATP jest bardziej stabilny w pH = 8,0 [42]. Ponadto stosunek molowy 1:1 jonów Zn⁺⁺ do ATP zapewnia

tworzenie się kompleksu flawokinazy z drugim substratem. Porównanie stężeń molowych w cytoplazmie sugeruje, że stężenie FMN nie jest czynnikiem wywołującym regulację na zasadzie sprzężenia zwrotnego.

W rozwoju zarodka kury wykazano [39] równoległy z wzrostem zarodka wzrost aktywności flawokinazy w wątrobie, mięśniu sercowym, jelicie i w ścianie woreczka żółtkowego, natomiast brak aktywności tego enzymu w błonie owodniowej oraz w płynie owodniowym i żółtku.

Flawokinaza [39] wyizolowana w stanie homogennym z wątrób 18 dniowych zarodków kurzych ma podobne własności do flawokinazy organizmów dorosłych. Optymalna aktywność przypada na pH alkaliczne roztworu w obecności jonów Zn^{++} . Aktywność katalityczna jest stabilizowana przez RBP z jaja kurzego [31]. Ponadto udowodniono, że ma miejsce swoiste oddziaływanie między flawokinazą zarodka kury a RBP z jaja kurzego, co przyczynia się do wzrostu aktywności katalitycznej enzymu i jego stabilności. Autorzy [31] sugerują, że omawiana interakcja między dwoma białkami może być jednym z ogniw w mechanizmie regulacji syntezy nukleotydów flawinowych.

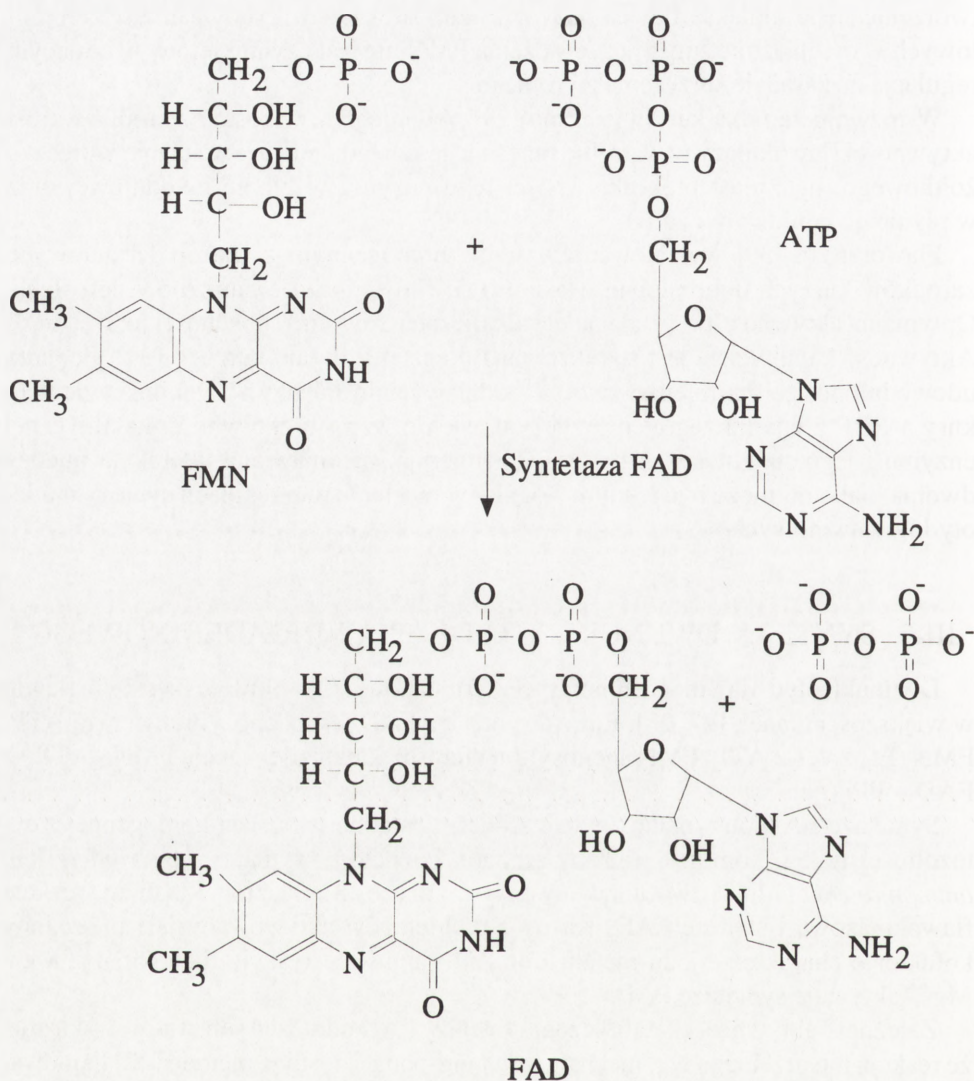
III-3. SYNTeza DWUNUKLEOTYDU FLAWINOADENINOWEGO.

Dwunukleotyd flawinoadeninowy (FAD) stanowi 70 – 90% wszystkich flawin w większości tkanek [27, 28]. Enzym syntetaza FAD jest adenozyłtransferazą ATP: FMN (EC 2.7.7.2. ATP: FMN adenosyltransferase), katalizuje reakcję $FMN + ATP \rightarrow FAD + PPi$ (rys. 7).

Syntetazę-FAD otrzymano z wielu źródeł, a ostatnio w postaci homogennej z cytozolowej frakcji komórek wątroby szczura. Ponadto otrzymano z *Brevibacterium ammoniagenes* [27,42] dwufunkcyjny enzym o masie 38 kDa, który katalizuje reakcję flawokinazową i syntezę FAD. Każdy z tych etapów aktywowany jest przez inny kofaktor o charakterze jonu metalu. Jon Zn^{++} aktywuje reakcję flawokinazy, a jon Mg^{++} aktywuje syntetazę FAD.

Zależność aktywności katalitycznej syntetazy FAD od stężeń substratów wskazuje, że reakcja nie przebiega wg. mechanizmu ping-pong. Stosując metodę [42] hamowania kompetycyjnego produktami reakcji wiązanie substratów do syntetazy FAD, wykazano że reakcja jest katalizowana jako wymiana uporządkowana dwusubstratowa (*ordered bi bi*) Z kinetycznych badań syntetazy FAD wynika, że przeniesienia nukleotydu adeninowego z ATP na FMN przedstawia się następująco:





Rys. 7. Enzymatyczna synteza FAD. Pod wpływem ATP: FMN adenozylo-transferazy zachodzi przeniesienie reszty fosfoadenozylowej z ATP na cząsteczkę FMN.

Wiodącym substratem jest ATP, który pierwszy wiąże się z centrum katalitycznym a drugim jest FMN. Powstały w reakcji katalitycznej obok FAD pirofosforan oddysocjowuje pierwszy a na końcu odłącza się cząsteczka FAD. Porównanie stężeń FAD w stosunku do wartości stałej hamowania K_i syntetazy stężeniem FAD wskazuje, że FAD jest modulatorem ujemnym w regulacji allosterycznej syntetazy FAD na zasadzie sprzężenia zwrotnego.

IV. BIAŁKA WIĄŻĄCE RYBOFLAWINĘ (RBP)

W białku jaja kurzego [29] oraz w żółtku jaja [40] znajduje się żółta glikoproteina, która swoiście wiąże ryboflawinę (RBP). Z obu składników jaja wyosobniono RBP, które ma masę 32 kDa i wiąże ryboflawinę w stosunku molowym, 1 : 1. Ryboflawina z połączenia RBP-ryboflawina uwalniana jest w roztworze o pH poniżej 4,00. Wielokrotnie słabiej RBP wiąże nukleotydy flawinowe [40, 41]. FMN jest wiązane 30 – 60 razy słabiej niż ryboflawina i zależy to zarówno od pH roztworu jak i jego siły jonowej [16, 34]

Żółtkowy RBP jest syntetyzowany przez wątrobę [38] i transportowany drogą krwi gdzie tworzy się kompleks z ryboflawiną, która w tej postaci jest deponowana w żółtku podczas rozwoju oocytu. Ten proces gromadzenia kompleksu RBP-ryboflawina w żółtku jaj ptaków oraz innych zwierząt jajorodnych jest uzależniony od wzrostu wydzielania estrogenów. Natomiast RBP wysycony ryboflawiną poniżej 50% i deponowany w białku jaja jest syntetyzowany w jajowodach. Badania strukturalne tych RBP są istotne w wyjaśnianiu mechanizmu pobierania białek żółtka z krwi do rozwijającego się oocytu. Białkowy i żółtkowy RBP jaja kurzego otrzymano w stanie homogennym i scharakteryzowano ich własności fizyko-chemiczne. Wyniki badań składu aminokwasowego [40] i sekwencji aminokwasów [12] wykazały bardzo duże podobieństwo tych dwu RBP. Sekwencja obu tych białek [12] jest taka sama z wyjątkiem C-końca i składu komponent cukrowych [12, 40]. Białkowy RBP mający 219 reszt aminokwasowych jest pojedynczym łańcuchem polipeptydowym, grupę C-końcową stanowi kwas piroglutaminowy (kwas pyrrolidyno-karboksyłowy). Komponenty oligosacharydowe są połączone z resztami asparaginowymi w położeniu 36 i 147.

Z sekwencji nukleotydów cDNA wykazano [19,38] istnienie peptydu sygnałowego od N-końca o następującej kolejności reszt aminokwasowych:

Met-Leu-Arg-Phe-Ala-Ile-Thr-Leu-Phe-Ala-Val-Ile-Thr-Phe-Ser-Thr-Cys-

C-koniec jest zakończony dwoma resztami argininy, które są odrywane w procesie posttranslacyjnej obróbki. Dojrzały RBP ma 9 mostków dwusiarczkowych co powoduje bardzo dużą odporność na denaturację [14].

Łączenie się ryboflawiny z RBP wywołuje wygaszanie fluorescencji ryboflawiny i reszt aromatycznych RBP. Stała wiązania ryboflawiny przez RBP wynosi 1,3 mM. Uwalnianie ryboflawiny z kompleksu RBP-ryboflawina zachodzi po zakwaszeniu roztworu poniżej punktu izoelektrycznego białka. W oparciu o własności spektralne i badania wpływu modyfikacji chemicznej reszt aminokwasowych w RBP wykazano, że jest istotna jedna z 9 reszt tyrozynowych i jeden z 6 tryptofanów. W utrzymaniu struktury miejsca wiązania ma znaczenie interakcja reszty argininy z grupami kwasowymi [1, 14, 15, 18]. W badaniach spektropolarymetrycznych [41] wykazano niewielkie zmiany w konformacji w RBP w zakresie wiązań peptydowych, reszt aromatycznych i otoczenia wiązania flawiny.

Badania fluorescencyjne z zastosowaniem wygaszaczy obojętnych i jonowych [11] wykazały, że niewiele reszt tryptofanu jest wyeksponowanych w kompleksie RBP-ryboflawina. Większa część reszt tryptofanu jest ukryta wewnątrz struktury cząsteczki białka. Wśród tych ukrytych głębiej reszt tryptofanu jedna jest zlokalizowana w miejscu wiązania ryboflawiny a inne prawdopodobnie uczestniczą w utrzymaniu struktury otoczenia[41]. Z badań wygaszania fluorescencji wynika sugestia o istnieniu istotnej reszty tryptofanu Trp54, która znajduje się w otoczeniu czterech mostków dwusiarczkowych: Cys5-Cys30 ; Cys24-Cys73 ; Cys33-Cys77 ; Cys57-Cys138. Te sugestie wymagają potwierdzenia w badaniach krystalograficznych RBP. Oba RBP są ufosforylowane. W białkowym RBP sześć lub siedem z pośród dziewięciu reszt seryny są zestyfikowane kwasem fosforowym.

Badania lokalizacji RBP [30] w rozwoju zarodkowym kury wykazały, że ryboflawina uwalnia się z kompleksu RBP-ryboflawina bez proteolitycznej degradacji RBP i pozbawiony ligandu RBP jest przemieszczany do płynu owodniowego. Mechanizm uwalniania ryboflawiny z kompleksu ryboflawina-RBP jest problemem otwartym.

Unieruchomione na podłożu chromatograficznym RBP jaja kurzego stosowane jest do rozdziału flawin [18]. Podobnie inne białka swoiście wiążąc witaminy grupy B są wykorzystywane w chromatografii powinowactwa dla badań analitycznych koenzymów i innych pochodnych witamin grupy B oraz w izolowaniu z materiału biologicznego ich metabolitów.

LITERATURA

- [1] AOYAMA TY, UCHIDA RI, KELLEY M, MARBLE K, HOFMAN JH. A novel disease with deficiency of mitochondrial very-long acyl-CoA dehydrogenase. *Biochem Biophys Res Commun* 1993; **191**: 1369–1372.
- [2] ARAK E, KOBAYASHI T, GOTO I, HASHINATO T. A riboflavin-responsive lipid storage myopathy due to multiple acyl-CoA dehydrogenase deficiency — an adult case. *J Neurol Sci* 1994; **126**: 202–205.
- [3] BACHER A, LADENSTEIN R. The lumazine synthase/riboflavin synthase complex of *Bacillus subtilis*. [w:] Chemistry and biochemistry of flavoproteins (Muller F, red.), 1990; **T-1**: 293–316, CRC, Press, Boca Raton.
- [4] BACHER A, WEINKAUF S, BACHMANN L, RITSERT K, BAUMEISTER W, HUBER R, LADENSTEIN R. Electron microscopy of decorated crystals for the determination of crystallographic rotation and translation parameters in large protein complexes. *J Mol Biol*, 1992; **225**: 1065–1073.
- [5] BEL RB, BROWNELL AKW, ROE CR, ENGEL AG, GOOGMAN SI, FRERMAN FE, SECUMBE DW, SNYDER FF. Electron transfer flavoprotein: ubiquinone oxidoreductase (ETF: QO) deficiency in an adult. *Neurology*, 1990; **40**: 1779–1782.
- [6] BROWN G. M, WILLIAMSON J. M, Riboflavin synthase *Adv Enzymol* 1982; **53**: 345–360.
- [7] CUSHMAN M, PATRICK DA, BACHER A, SCHENERING J. Studies on the mechanism of riboflavin synthase. *J Org Chem* 1991; **56**: 4603–4609.

- [8] CUSHMAN M, PATEL HH, SCHENRING J, BUCHER A. ^{19}F NMR studies on the mechanism of riboflavin synthase. Synthesis of 6-(trifluoromethyl)-7-oxo-8-(D-ribityl)-lumazine and 6-(trifluoromethyl)-7-methyl-8-(D-ribityl)lumazine. *J Org Chem*, 1992; **57**: 5630–5640.
- [9] DRAYE J-P, VEITCH K, VAMECQ J, VanHOOF F. Comparison of the metabolism of doleandioic acid *in vivo* in control, riboflavin-deficient and clofibrate-treated rats. *Eur J Biochem* 1988; **178**: 183–189.
- [10] FIEZA T, CHILDS RA. Carbohydrates as antigenic determinants of glycoproteins. *Biochem J* 1987; **245**: 1–11.
- [11] GUEVARA I, ŻAK Z. Fluorescence quenching in riboflavin-binding protein and its complex with riboflavin. *J Protein Chem* 1993; **12**: 179–185.
- [12] HAMAZUME Y, MEGA T, IKEUAKA T. Characterization of hen white- and yolk-riboflavin binding protein and amino acid sequence of egg white-riboflavin binding protein. *J Biochem* 1984; **95**: 1633–1644.
- [13] KEKELIDZE TN, EDMONDSON DE, McCORMICK DB. Flavin substrate specificity of the vitamin B₂-aldehyde-forming enzyme from *Schizophyllum commune*. *Arch Biochem Biophys* 1994; **315**: 100–103.
- [14] KOZIK A. Disulfide bonds in egg white riboflavin-binding protein chemical reduction studies. *Eur J Biochem* 1982; **121**: 395–400.
- [15] KOZIK A. Carbodiimide modification of carboxyl groups in egg white riboflavin-binding protein. *Biochim Biophys Acta*, 1982; **704**: 542–545.
- [16] KOZIK A. Białko wiążące ryboflawinę. *Post Biochem* 1985; **31**: 263–281.
- [17] KOZIK A, GUEVARA I, ŻAK Z. 1,2-Cyclohexanedione modification of arginine residues in egg-white riboflavin-binding protein. *Int J Biochem* 1988; **20**: 707–711.
- [18] KOZIK A, ŻAK Z. Flavin separation by affinity chromatography on immobilized egg white riboflavin-binding protein. *Anal Biochem* 1982; **121**: 224–226.
- [19] LACLAN IM, NIMPF J, WHITE III HB, SCHNEIDER WJ. Riboflavinuria in the rd-chicken. 5'-splice site mutation in the gene for riboflavin-binding protein. *J Biol Chem* 1993; **268**: 23222–23226.
- [20] LADENSTEIN R, MEYER B, HUBER R, LABISCHINSKI H, BARTELS K, BARTUNIK HD, BACHMANN L, LUDWIG HC, WILSON K, BACHER A. Heavy riboflavin synthase from *Bacillus subtilis*. Particle dimensions, crystal packing and molecular symmetry. *J Mol Biol* 1986; **187**: 87–100.
- [21] LADENSTEIN R, RITSERT K, HUBER R, RICHTER G, BACHER A. The lumazine synthase/riboflavin synthase complex of *Bacillus subtilis*. X-ray structure analysis of hollow reconstituted β -subunit capsids. *Eur J Biochem* 1994; **223**: 1007–1017.
- [22] LADENSTEIN R, SCHNEIDER M, HUBER R, BARTUNIK HD, WILSON K, SCHOTT K, BACHER A. Heavy riboflavin synthase from *Bacillus subtilis*. Crystal structure analysis of the icosahedral b60 capsid at 3.3 Å resolution. *J Mol Biol* 1988; **203**: 1045–1070.
- [23] LEE CY, MEIGHEN EA. The lux genes in *Photobacterium leiognathi* are closely linked with genes corresponding in sequence of riboflavin synthesis genes. *Biochem Biophys Res Commun* 1992; **186**: 690–697.
- [24] McCORMICK DB. The intracellular localization, partial purification, and properties of flavokinase from rat liver. *J Biol Chem* 1962; **237**: 959–962.
- [25] McCORMICK DB. Flavokinase activity of rat tissues and masking effect of phosphatases. *Proc Soc Exp Biol Med* 1961; **107**: 784–786.
- [26] MERRILL AH Jr, McCORMICK DB. Affinity chromatographic purification and properties of flavokinase (ATP: riboflavin 5'-phosphotransferase from rat liver. *J Biol Chem* 1980; **255**: 1335–1338.
- [27] MANSTEIN DJ, PAI EF. Purification and characterization of FAD synthetase from *Brevibacterium ammoniagenes*. *J Biol Chem* 1986; **261**: 16169–16173.

- [28] NAGAO M, TANAKA K. FAD-dependent regulation of transcription, translation, post-translation processing and post-processing stability of various mitochondrial acyl-CoA dehydrogenase and the electron transfer flavoprotein and the site of holoenzyme formation. *J Biol Chem* 1992; **267**: 17925–17932.
- [29] RHODES MB, BENNETT N, FEENEY RE. The flavoprotein-apoprotein system of egg white. *J Biol Chem* 1959; **234**: 2054–2060.
- [30] SŁOMCZYŃSKA M, ŻAK Z. Localization of riboflavin-binding protein (RBP) in the developing chick embryo. I. Properties of RBP from amniotic fluid. *Bull Pol Acad Sci Biol Sci* 1984; **32**: 81–88.
- [31] SŁOMCZYŃSKA M, ŻAK Z. The effect of riboflavin-binding protein (RBP) on flavokinase catalytic activity. *Comp Biochem Physiol* 1987; **87B**: 681–685.
- [32] SCHOTT K, KELLERMANN J, LOTTSPREICH F, BACHER A. Riboflavin synthase of *Bacillus subtilis*. Purification and amino acid sequences of the α subunit. *J Biol Chem* 1990; **265**: 4204–4209.
- [33] SCHOTT K, LANDENSTEIN R, KONIG A, BACHER A. The lumazine synthase/riboflavin synthase complex of *Bacillus subtilis*. Crystallization of reconstituted icosahedral β subunit capsids. *J Biol Chem* 1990; **265**: 12686–12689.
- [34] USHIJIMA H, OKAMURA H, NISHINA Y, SHIGA K. Effects of pH and ionic strength on the binding of egg white riboflavin binding protein with flavins. *J Biochem* 1989; **105**: 467–472.
- [35] VEITCH K, DRAYE J-P, VAMECQ J, CAUSEY AG, BARTLETT K, SHERRATT HSA, VanHOOF F. Altered acyl-CoA metabolism in riboflavin deficiency. *Biochim Biophys Acta* 1989; **1006**: 335–343.
- [36] VOLK R, BACHER A. Biosynthesis of riboflavin. The structure of four-carbon precursor. *J Am Chem Soc* 1988; **110**: 3651–3653.
- [37] VOLK R, BACHER A. Studies on the four-carbon precursor in the biosynthesis of riboflavin. Purification and properties of L-3,4-dihydroxy-2-butanone-4-phosphate synthase. *J Biol Chem* 1990; **265**: 19479–19485.
- [38] WHITE HB III, MERRILL AH Jr. Riboflavin-binding proteins. *Ann Rev Nutr* 1988; **8**: 279–288.
- [39] ŻAK Z, McCORMICK DB. Distribution and properties of flavokinase in the developing chick embryo. *Comp Biochem Physiol* 1982; **73B**: 341–345.
- [40] ŻAK Z, OSTROWSKI W. Preparation and properties of riboflavin flavoprotein of soluble fraction of egg yolk. *Acta Biochim Polon* 1963; **10**: 427–441.
- [41] ŻAK Z, OSTROWSKI W, STECZKO J, WEBER M, GIZLER M, MORAWIECKI A. Riboflavin carrier protein from egg yolk. Spectral and other properties observed upon binding flavin to apoprotein. *Acta Biochim Polon* 1972; **19**: 307–323.
- [42] YOMADA Y, MERRILL AH Jr, McCORMICK DB. Probable reaction mechanisms of flavokinase and FAD synthetase from rat liver. *Arch Biochem Biophys* 1990; **278**: 125–130.

Adres autora: 31-120 Kraków, Al. Mickiewicza 3.

**CUKRZYCA MODELOWA
JAKO NARZĘDZIE BADANIA ZMIAN
WYSTĘPUJĄCYCH W CUKRZYCY KLINICZNEJ.
PROSTAGLANDYNY I ZWIĄZKI WANADU
W NORMALIZACJI ZMIAN CUKRZYCOWYCH^{1,2}**

**THE MODEL DIABETES AS A TOOL OF INVESTIGATION
OF ALTERATIONS IN CLINICAL DIABETES.
PROSTAGLANDINS AND VANADATE DERIVATIVES
IN DIABETIC CHANGES NORMALIZATION**

**Anna M. KORDOWIAK, Piotr KAPUSTA, Robert TRZOS,
Kinga DZIEWOŃSKA**

Zakład Biochemii Zwierząt, Instytut Biologii Molekularnej UJ, Kraków

Streszczenie: W trzech rozdziałach przedstawiono krótką charakterystykę cukrzycy występującej u ludzi i badania wykonywane u zwierząt po wywołaniu tej choroby przez podanie streptozotocyny (SZ) lub aloksanu (A). Omówiono cytoprotekcyjne własności prostaglandyn i ich ochronny charakter wobec stwierdzonych uprzednio zmian aparatu Golgiego wątroby szczura w cukrzycy indukowanej streptozotocyną. Przedstawiono przegląd szkodliwego i pożytecznego działania wanadu na żywe organizmy wraz z własnymi wynikami dotyczącymi insulino-podobnego działania nowej pochodnej $\text{Na}_2[\text{VO}(\text{OX})_2] \cdot x\text{H}_2\text{O}$ na aktywność transferazy galaktozylowej wątroby szczura.

Słowa kluczowe: cukrzyca modelowa, streptozotocyna, hepatocyty kontrolne i patologiczne, prostaglandyny (PGs), wanad.

Summary: The short characteristics of human diabetes as well as model of this disease induced in animals by streptozotocin (SZ) or alloxan (A) injection are described. Cytoprotective activities of some prostaglandin derivatives and their protection against previously described alterations of rat liver Golgi

1 Część doświadczalna pracy dotycząca wiązania PGE_2 z hepatocytami finansowana częściowo przez KBN w ramach PB/0580/P2/94 w 1994 r. oraz PB 4.PO5A.110.08 na rok 1995/97.

2 Część doświadczalna pracy dotycząca oddziaływania nowej pochodnej wanadu na aparat Golgiego wątroby szczurów finansowana częściowo przez KBN PB/0581/P2/94 w 1994 r.

apparatus are described. Additionally short review of injurious and usefulness vanadate action on living organisms together with own results concerning insulin-like influence of new vanadate derivative $\text{Na}_2[\text{VO}(\text{OX})_2]\cdot x\text{H}_2\text{O}$ on rat liver Golgi apparatus galactosyltransferase activities are presented.

Key words: experimental diabetes, streptozotocin, control and pathological hepatocytes, prostaglandins (PGs), vanadium

1. WSTĘP

Cukrzyca należy do chorób społecznych, które wykazują tendencję wzrostową w populacji ludzkiej. Wzrasta również liczba zgonów spowodowanych tą chorobą w przeliczeniu na 100000 mieszkańców, w ciągu ostatnich 30 lat wskaźnik ten wzrósł czterokrotnie. Jakkolwiek pojęciem „cukrzyca” obejmuje się różne pod względem etiologii i klinicznego przebiegu choroby, można wyróżnić pewne wspólne ich cechy jak: wzrost poziomu cukru we krwi i w moczu, zaburzenia przemiany cukrowców i lipidów oraz metaboliczne skutki tych zaburzeń [68].

Najogólniej cukrzycę występującą u ludzi dzielimy na tzw cukrzycę pierwotną typu I (insulinozależna, IDDM = insulin dependent diabetes mellitus, z niedoborem insuliny, dawniej zwaną też cukrzycą typu młodzieńczego) cechującą się zupełną lub prawie zupełną utratą zdolności wydzielania insuliny przez komórki B trzustki. W tego typu cukrzycy stwierdza się genetyczną predyspozycję do jej rozwoju. Drugim typem cukrzycy pierwotnej jest cukrzyca typu II (cukrzyca insulinoniezależna, NIDDM = non insulin dependent diabetes mellitus), bardzo zróżnicowana etiologicznie i klinicznie, może być uwarunkowana genetycznie, żywieniem lub zaburzeniami komórkowej reaktywności na insulinę. Dalej przeprowadza się podział w obrębie typu ze względu na konstytucję fizyczną chorego (z otyłością lub bez), skutki stosowania diety lub środków hipoglikemizujących oraz ze względu na powikłania w obrębie innych tkanek, które powstają w okresie trwania cukrzycy (np. choroby tętnic, endokrynopatie, angiopatie, neuropatie, zespoły objawów dermatologicznych).

W zależności od typu cukrzycy stosuje się różne formy leczenia. W cukrzycy typu I stosuje się iniekcje odpowiedniego preparatu insuliny, w cukrzycy typu II leczenie insuliną może być konieczne tylko przejściowo (np. w przypadku operacji, ciąży, gorączki nietolerancji doustnych środków hipoglikemizujących) a zwykle stosuje się środki doustne obniżające poziom glukozy we krwi. W przypadku leczenia insuliną warunkiem skuteczności działania jest podanie jej dwa razy dziennie, przestrzeganie diety i higieniczny tryb życia (ruch, normalizacja masy ciała). Absolutnym przeciwwskazaniem leczenia insuliną jest uczulenie na ten hormon. Pojedyncza dawka insuliny o wydłużonym działaniu nie powinna przekraczać 40–48 U. W Polsce do lecznictwa dopuszczono 7 krajowych preparatów pochodzenia wołowego lub wieprzowego. Firmy zachodnie oferują szeroką gamę preparatów insuliny, w tym insulinę ludzką otrzymaną poprzez wymianę niektórych aminokwasów insuliny wieprzowej

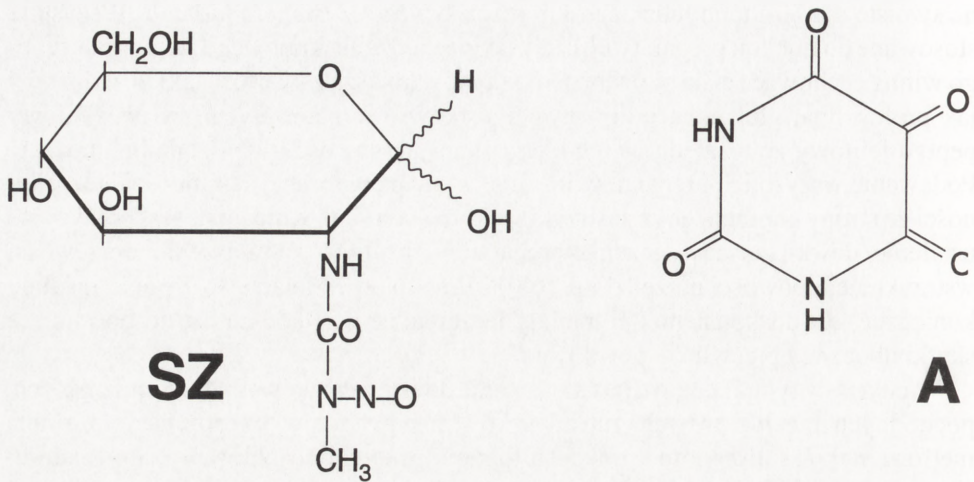
na swoiste dla hormonu ludzkiego lub przez syntezę w *Escherichia coli*. Wszystkie stosowane do iniekcji preparaty insuliny tak pochodzenia krajowego jak zagranicznego winna cechować ściśle określona, możliwie najniższa zawartość takich związków jak proinsulina, glukagon, polipeptyd trzustkowy, somatostatyna czy naczyniowy peptyd jelitowy ze względu na ich alergizującą aktywność i/lub działanie uboczne. Podawanie wszystkich preparatów insuliny wymaga ogromnej staranności i umiejętności ze strony chorego, gdyż zastrzyki wykonuje on sam. Konieczne jest precyzyjne ustalenie dawki, zasady łączenia preparatów insuliny, zmniejszenie urazowości wstrzyknięć, jałowości narzędzi itp. [68]. Mimo to po 74 latach stosowania insuliny konieczne jest doskonalenie tej metody leczenia, ze względu na często powstające skutki uboczne i przewlekłe powikłania.

W cukrzycy typu II celowe jest stosowanie doustnych leków hipoglikemizujących, pochodnych trzech głównych grup związków: 1) biguanidów (buformina, fenformina metformina), 2) sulfonilomocznika (sulfonamid, tolbutamid, chloropropamid, karbutamid i kilkanaście pochodnych tych związków), 3) pochodne pirymidyny, inhibitory α -glukozydaz w jelicie cienkim, mieszanki ziołowe. Stosowanie pochodnych grupy 1 może wywoływać nowe zaburzenia metabolizmu przy korzystnej regulacji poziomu cukru we krwi, toteż w niektórych krajach Europy i w USA wycofano je z aptek. Przy stosowaniu pochodnych grupy 2 możliwe jest wystąpienie śpiączki ketonowej lub niewrażliwość na pochodne sulfonilomocznika [68]. Aby zrozumieć podstawy działania w/w leków a także ułatwić poszukiwanie nowych związków przeciwdziałających tej chorobie, przede wszystkim hiperglikemii i glikozurii, należy poznać mechanizmy ich molekularnego oddziaływania.

Badania tego typu dotyczące metabolizmu na poziomie komórki i możliwości oddziaływania nań są możliwe wyłącznie na zwierzętach, u których wywołuje się cukrzycę modelową a następnie testuje skuteczność związków o charakterze ochronnym bądź normalizującym wywołane zmiany o charakterze cukrzycowym.

2. MODELE CUKRZYCY DOŚWIADCZALNEJ

Do wywołania u zwierząt zmian, które są charakterystyczne dla cukrzycy insulinozależnej, insulinoniezależnej lub wynikającej z obciążeń genetycznych u ludzi, czyli do wywołania „cukrzycy modelowej”, służą dwa związki: aloksan (A) i streptozotocyna (SZ). Wzory chemiczne obu pochodnych przedstawia rys 1. W większości badań biochemicznych używa się przede wszystkim streptozotocynę ze względu na jej mniejszą toksyczność, a zatem wyższą przeżywalność zwierząt po zabiegu, oraz lepszą zbieżność z patologicznymi zmianami stwierdzanymi u pacjentów z cukrzycą typu I oraz cukrzyca pochodzenia genetycznego [2, 3, 5, 18, 19, 30, 68]. Od czasu odkrycia streptozotocyny (1959 r.), jako antybiotyku o szerokim spektrum działania oraz aktywności przeciwnowotworowej, już w 1963 r. stwierdzono jej charakter



Rys 1. Wzory chemiczne streptozotocyny (2-dezoksy-2(3-metylo-3-nitrozomoczniko)-D-glukopiranoza) i aloksanu (2,4,5,6-tetraoksy-pyrimidyna). Oba związki służą do wywoływania cukrzycy doświadczalnej u zwierząt.

diabetogenny. Streptozotocyna indukuje zmiany morfologiczne, biochemiczne i fizjologiczne w różnych tkankach i narządach np. w wątrobie, nerkach, naczyniach krwionośnych, mięśniach, jelicie cienkim, działa immunosupresyjnie, jako czynnik endotoksyczny, wpływa na metabolizm hormonów sterydowych. Wywołuje zmianę aktywności niektórych enzymów związanych i niezwiązanych z przemianą cukrowców i lipidów w wątrobie i mięśniach, wykazuje aktywność proteolityczną w mięśniach, wpływa na hipertriglicerydemię, metabolizm kolagenu [2, 3] a przede wszystkim drastyczne obniżenie poziomu insuliny działając toksycznie na komórki B trzustki, co przypomina cukrzycę typu I [50] oraz cukrzycę pochodzenia genetycznego [74]. Streptozotocynę używa się do uzyskania cukrzycy modelowej u psów, królików, ryb, jagniąt, kotów, małą, szczurów, myszy, świnek morskich i chomików syryjskich [2]. Należy podkreślić, że szczury, myszy czy chomiki są b. dobrym modelem do uzyskania hiperglikemii po podaniu SZ, natomiast inne gatunki zwierząt np. świnki morskie czy króliki są bardziej odporne na jej działanie [2, 30].

Do badań normalizacji zmian wywołanych SZ użyto przede wszystkim insuliny. W pewnych przypadkach hormon ten działa normalizująco np. regulując aktywność pewnych enzymów w wątrobie [2] np. glukokinazy, heksokinazy, fosfofruktokinazy czy kinazy pirogronianowej (enzymy glikolityczne) oraz dehydrogenazy glukozo-6-fosforanu czy dehydrogenazy fosfoglukonianu (enzymy kluczowe cyklu pentozowego). Insulina jest również skuteczna w przywróceniu aktywności enzymów uczestniczących w przemianie tłuszczu takich jak liaza ATP-cytrynian, dehydrogenaza NADP-izocytrynian, lipaza triglicerydowa [2]. W innych przypadkach jej wpływ jest

znikomy [2, 34, 46]. Dlatego poszukiwania związków działających ochronnie lub leczniczo na zmiany powstające po SZ są prowadzone nadal.

Jakkolwiek obniżenie poziomu cukru we krwi i moczu stosowane jest najczęściej jako test działania badanego „leku”, nie wszystkie związki oddziałują w ten sposób. Część działa na takie objawy kliniczne jak poliuria i proteinuria, prawidłowe wydalenie z moczem sodu i potasu oraz ochrania hiperfiltrację w kłębuszkach nerkowych. Tak działa np dipirydamol [73]. Ze względu na powszechność testu oznaczania poziomu cukru we krwi, a także zawartości triglicerydów, insuliny immunoreaktywnej oraz cholesterolu najszerze zastosowanie znalazły pochodne wanadu podawane doustnie w formie płynnej [72].

Nasz udział w badaniach dotyczących oddziaływania SZ na komórki i organelle komórkowe wynikał z badań zespołu Sarneckiej-Keller, która w latach 1970-tych stwierdziła bardzo znaczne obniżenie ilości galaktozy we frakcji glikopeptydów i glikoprotein osocza ludzi chorych na cukrzycę insulinozależną oraz zwierząt z cukrzycą modelową. Teza, iż wynika to z obniżenia aktywności transferazy galaktozylowej, enzymu-znacznika aparatu Golgiego, gdzie zachodzi potranslacyjna modyfikacja części cukrowej glikoprotein i glikopeptydów osocza znalazła pełne potwierdzenie w naszych dalszych pracach [37, 59, 60]. Spadek aktywności tego enzymu u zwierząt z cukrzycą był wysoce istotny statystycznie w odniesieniu do zwierząt kontrolnych, podobnie jak wydajność izolowania frakcji błon Golgiego oraz zmiana morfologii tej organelli sugerująca upośledzenie sekrecji. Prace te stanowiły niewielki, ale istotny wkład do badań nad cukrzycą modelową, co więcej badania innych autorów potwierdziły swoistość stwierdzonych zmian dla transferazy galaktozylowej, czego nie zaobserwowano dla innych transferaz glikozylowych [11, 47, 69]. W dalszych badaniach stwierdziliśmy dodatkowo zmiany składu białkowego izolowanej frakcji błon Golgiego [40], zmianę składu fosfolipidów tej frakcji [32], (co również potwierdziły badania innych autorów [5, 24, 47, 69]). Ponadto zmiany tak składu błon jak oporności osmotycznej stwierdziliśmy w erytrocytach zwierzęcych i ludzkich pochodzących od pacjentów chorych na cukrzycę [39, 61–63]. Uzyskane przez nas w grupie zwierząt doświadczalnych wyniki dotyczące spadku aktywności transferazy galaktozylowej oraz upośledzenia morfologii aparatu Golgiego były dodatnio skorelowane z poziomem i składem cukrowej części glikoprotein osocza [46] i nie ulegały normalizacji przy podawaniu insuliny [34, 46]. Stwierdziliśmy ponadto, że zmiana funkcji i morfologii aparatu Golgiego w cukrzycy doświadczalnej jest swoista dla cukrzycy wywołanej podaniem streptozotocyny i nie występuje po podaniu aloksanu [41]. Szczegóły i odpowiednie porównania przedstawiono w artykułach przeglądowych [31, 35]. Przytoczone wyniki skłoniły nas do poszukiwania związku, który wykazywałby zapobiegające lub lecznicze działanie wobec wspomnianych wyżej zmian, gdyż jak wspomniano insulina, stosowana w leczeniu ludzi nie była skuteczna [46].

3. WPŁYW PROSTAGLANDYN JAKO ZWIĄZKÓW O DZIAŁANIU CYTOPROTEKCYJNYM

Prostaglandyny (PGs) jako jedne z pochodnych kwasu arachidonowego (AA) powstające pod wpływem działania cyklooksygenazy wykazują bardzo silne i różnorodne działanie biologiczne. Trudno obecnie znaleźć jednostkę chorobową, w której pozytywnie czy negatywnie nie działają te związki [5, 26, 44, 76]. Ich rola, fizjologiczno-biochemiczne i farmakologiczne działanie prostaglandyn (PGs) jest tematem wszechstronnie badanym przez specjalistów całego świata od około 70 lat i w części należy już do wiadomości podręcznikowych [np. 15, 26, 76]. Inne, nie do końca poznane aspekty działania PGs są publikowane w ilości kilkudziesięciu prac tygodniowo. Jedną z cech prostaglandyn są tzw. własności cytoprotekcyjne przy czym zależą one prócz typu PGs od rodzaju tkanki docelowej a nawet od ogólnej kondycji całego ustroju (wiek, płeć, norma lub patologia). Mechanizm cytoprotekcyjnego działania tych związków nie jest do końca poznany. Działają one na poziomie narządu, komórki, organelli komórkowych a nawet w układach *in vitro*. Przegląd literatury dotyczącej tego zagadnienia zebrano w oddzielnych artykułach [38, 44]. Pionierem badań nad cytoprotekcją był A. Robert a jego badania są nadal kontynuowane. Należy podkreślić, że własności cytoprotekcyjne wykazują przede wszystkim pochodne PGE₁, PGE₂, jej dimetylowa pochodna 16,16' dmPGE₂, PGF_{2a}, PGA₁, i PGI₂. Z wyjątkiem tej ostatniej, pochodne te należą do tzw. trwałych pochodnych eikozanoidów z długim okresem półtrwania, podczas gdy prostacyklina (PGI₂), nadtlenki prostaglandynowe PGG₂/PGH₂ oraz inna pochodna kwasu arachidonowego tromboxan A₁ (TXA₂) mają bardzo krótki okres półtrwania [76]. Tabela 1 jest zestawieniem wybranych z piśmiennictwa danych nt. trwałości najbardziej typowych PGs oraz dla porównania TXA₂.

Nasze doświadczenia dotyczyły wąskiego wycinka badań cytoprotekcyjnego działania prostaglandyn, niemniej uzyskane wyniki były bardzo obiecujące i sugerowały podjęcie dalszych badań. Wstępne wyniki wykazały, że trzykrotne podanie 16,16' dmPGE₂ (przed, równocześnie i po dawce streptozotocyny wywołującej cukrzycę modelową, skutecznie chroni przed wystąpieniem zmian patologicznych opisanych uprzednio [33, 34, 36]. Co więcej, stwierdziliśmy, że dwie pochodne PGs (16,16' dmPGE₂ oraz PGE₁) stymulują *in vitro* w stosunkowo długim czasie (do 8 lub 20 godz.) aktywność enzymu-znacznika aparatu Golgiego, tj. transferazy galaktozylowej, po wyizolowaniu frakcji tych błon [42, 43]. Wydawało się interesujące sprawdzić, jak będą wiązać jedną z pochodnych PGs tj. PGE₂ hepatocyty kontrolne i pochodzące od zwierząt z cukrzycą. Przegląd własności receptorów PGs w różnych komórkach, ze szczególnym uwzględnieniem hepatocytów przygotowany na podstawie publikowanych prac innych autorów [29, 38] wykazał nam, że jak dotąd brak porównania właściwości tych miejsc wiążących w hepatocytach kontrolnych i „cukrzycowych”. Wstępne badania nieswoistego wiązania PGE₂ przez hepatocyty wykazały niższą

Tabela 1. Trwałość niektórych pochodnych PGs (oraz dla porównania trombosanu TXA₂ w różnych warunkach doświadczalnych wyrażona okresem półtrwania T_{1/2}).

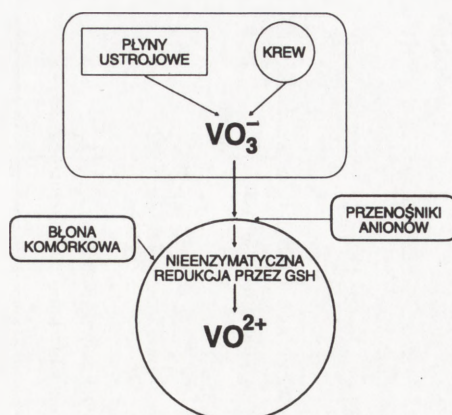
Rodzaj PGs	T _{1/2} /charakterystyka środowiska	Miejsce degradacji	Metabolity	Półmiennictwo
PGE ₁	Okolo 15 godz./roztwór wodny pH 7,2, 60°C Okolo 1 godz./hepatocyty w hodowli pierwotnej (dłużej nie badano) Okolo 1,24 min/hepatocyty w zawiesinie (5×10 ⁶ hepatocytów) Inkubacja do 3 godz. z pełną krwią nie powoduje utraty aktywności biologicznej. W tych samych warunkach PGA ₁ i PGA ₂ tracą 50% aktywności biologicznej po 30 min. Po iniekcji dożylniej PGE ₁ u ludzi 50% dawki izotopu wydalane z moczem po 5 godz.	szczurze hepatocyty w zawiesinie i hodowli pierwotnej	dinor-PGE ₁ tetranor-PGE ₁	20, 26, 48, 55
6-keto-PGE ₁	15 min/37°C, pH = 7,5 w tzw. kaskadzie modelowej	detektor 6 keto-PGE ₁		76
PGE ₂	Łatwo rozkłada się w pH < 3,0 oraz > 8,5 Okolo 1 godz./szczurze hepatocyty w hodowli pierwotnej Okolo 1,68 min/hepatocyty w zawiesinie (5×10 ⁶ hepatocytów) 40 min w perfundowanej wątrobie Znacznie ponad 2 godz. w medium wolnym od komórek w 37°C Ponad 6 godz./w tzw. kaskadzie modelowej	szczurze hepatocyty w zawiesinie, w hodowli pierwotnej, wątroba, płuca, nerki	dinor-PGE ₁ tetranor-PGE ₁ 15-keto-13,14-dihydro PGE ₂	20, 51, 55, 76
PGD ₂	Znacznie powyżej 2 godz./medium wolne od komórek 37°C Ok. 1 godz./szczurze hepatocyty w hodowli pierwotnej 20-40 min/perfundowana wątroba szczurza Ponad 6 godz./w tzw. kaskadzie modelowej	hepatocyty w hodowli pierwotnej i w zawiesinie, płuca	dinor-PGD ₂ tetranor-PGD ₁ dinor-PGD ₁	58, 71, 76
PGF _{2α}	Nietrwale w środowisku kwaśnym Znacznie dłużej niż 2 godz./medium wolne od komórek 37°C Okolo 1 godz./hepatocyty w hodowli pierwotnej Ponad 6 godz./w tzw. kaskadzie modelowej	hepatocyty w hodowli pierwotnej i w zawiesinie, płuca	dinor-PGF _{1α} tetranor-PGF _{2α} 6,15 diketo-13,14 dihydro PGF _{1α}	7, 26, 58
6-keto-PGF ₁	ponad 6 godz./w tzw. kaskadzie modelowej	swoisty detektor tej pochodnej		76
PGI ₂	5 min/w tzw. kaskadzie modelowej	swoisty detektor dla PGI ₂ , płuca, wątroba, nerki	6 keto PGF _{1α} 6,15 diketo-13,14 dihydro PGF _{1α}	76
PGG ₂ PGH ₂	Obie PGs 5 min TXA ₂ 30 sek	swoisty detektor, płuca	TXB ₂ , dinor-TXB ₂	76

wartość dla hepatocytów pochodzących od zwierząt cukrzycowych, jakkolwiek różnice te nie były statystycznie istotne. Dalsze oznaczenia s w o i s t e g o wiązania PGE_2 , wykazały wysoce istotne statystycznie obniżenie w porównaniu z kontrolą wiązania PGE_2 przez hepatocyty pochodzące od zwierząt z cukrzycą, zarówno w 4°C jak 37°C . Wyniki te są opracowywane i będą przedmiotem odrębnej publikacji. Dalsze badania będą dotyczyły możliwych do określenia w naszych warunkach parametrów kinetycznych oddziaływania PGE_2 – miejsce wiążące, a także wpływu PGs na metabolizm wewnątrzkomórkowy w cukrzycy modelowej i kontroli.

4. WANAD JAKO CZYNNIK NORMALIZUJĄCY KLINICZNE OBJAWY CUKRZYCY

Wanad występuje powszechnie w środowisku (w glebie i w wodzie), jego zawartość w różnych tkankach roślinnych i zwierzęcych wynosi od kilkunastu do kilkudziesięciu mikrogramów. Jest uważany za niezbędny pierwiastek śladowy w prawidłowym wzroście i rozwoju zwierząt i ludzi. Liczne prace doświadczalne ujmują różne aspekty jego wpływu na metabolizm komórkowy i oddziaływanie na różnym poziomie z aminokwasami, peptydami i białkami, w tym również z wielu enzymami oraz z pierwotnymi i wtórnymi przekaźnikami w komórce. Zestawieniem opisanych w literaturze w ciągu ostatnich lat pozytywnych i negatywnych oddziaływań wanadu na żywy organizm są tabele 2 i 3. Przedstawiają one również pochodne wanadu stosowane najczęściej w badaniu jego biologicznej aktywności. Akumulacja wanadu w organizmie zachodzi w nerkach, kościach i wątrobie [23], zbyt wysokie wychwytywanie wanadu przez organizm ludzki powoduje ostre i/lub chroniczne zatrucia zmuszające do stosowania związków chelatujących jako osłony antytoksycznej. Badania Hamady [22, 23] wykazały, że podanie pewnych związków chelatujących z VCl_3 , VOSO_4 , czy NaVO_3 przeciwdziała zarówno nadmiernemu wychwytywaniu tego pierwiastka, jak jego toksycznym efektem. Najbardziej skutecznym związkiem jest deferoksyamina, nieco gorzej działają EDTA, Tiron, oranż ksyleneolowa lub fenantrolina zasadowa. Efekt działania tych związków badano u szczurów, myszy i zarodków kurcząt. W organizmie wanad jest wiązany przez te same białka, które wiążą żelazo tj: ferrytynę, transferynę i laktoferynę [23]. We krwi i płynach ustrojowych wanad występuje głównie jako VO_3^- . Po przejściu do komórki ulega nieenzymatycznej redukcji przez zredukowany glutation do VO^{2+} [22, 23, 50, 70]. Schemat tego procesu przedstawia rys. 2.

Pochodne wanadu mogą między innymi działać podobnie jak insulina na komórki i tkanki zwierząt *in vivo* i *in vitro*. Jednym z pierwszych efektów działania jest normalizacja poziomu cukru we krwi, wg części autorów dawka wanadu potrzebna do uzyskania euglikemii zależy od początkowego poziomu cukru we krwi [8, 70]. Podobieństwo działań wanadu i insuliny nadal potwierdzają ukazujące się prace



Rys 2. Schemat występowania wanadu na różnych stopniach utlenienia we krwi i płynach ustrojowych oraz po przejściu do wnętrza komórki za pośrednictwem przeniósłników anionów i redukcję nieenzymatyczną przy udziale zredukowanej cząsteczki glutationu (GSH). Toksyczność wanadu zależy od stosowanej pochodnej tego metalu. Schemat przygotowano na podstawie piśmiennictwa [22, 23, 50, 52].

doświadczalne np. obie substancje zwiększają aktywność lipazy lipoproteinowej w gruczołach mleczych [17], mają podobne działanie w regulacji genu 33 [75]. W adipocytach i mięśni szkieletowym działanie wanadu przypomina aktywność insuliny pod względem wpływu na utlenianie glukozy, syntezy glikogenu, stymulacji wychwytywania heksoz, lipogenezy i hamowanie lipolizy [16, 17, 67, 72]. Wanad działa na gospodarkę węglowodanowo-lipidową a zatem na syntezę i aktywność niektórych enzymów [13, 27, 53, 64, 66, 67]. Opracowany przez nas na podstawie piśmiennictwa schemat różnych dróg działania wanadu w komórce jest nadal aktualny [72], jakkolwiek pojawiają się nowe aspekty wpływu wanadu np. przeciwny do insuliny efekt jego działania (szczególnie wyraźny w komórkach prawidłowych), lub też coraz powszechniej opisywane jego efekty toksyczne [6, 14, 45, 57]. Zestawienie stosowanych najczęściej w badaniach pochodnych wanadu umieszczono w tabelach 2 i 3 [8, 27, 45, 70, 72].

W działaniu na niektóre enzymy np ATP-azy wanad V^{+5} jest silniejszym inhibitorem niż V^{+4} , lecz musi być stosowany w wyższych stężeniach (50–100 mM). Wanad V^{+4} działa słabiej, lecz w szerszym zakresie stężeń, w tym także w stężeniach fizjologicznych [27]. Jak przedstawiono na rys. 2, wanad jest redukowany po przejściu do wnętrza komórki [23, 50, 70], jednak inne doświadczenia nad połączonym działaniem wanadu i nadtlenu wodoru wykazują konieczność utlenienia wanadu na innych stopniach utlenienia do V^{+5} prowadzącego w efekcie kilku reakcji do zwiększenia aktywności kinazy tyrozynowej receptora insuliny poprzez hamowanie fosfotyrozynowej białek [64, 65].

Na pewno nie zawsze działanie wanadu przebiega drogą podobną do insuliny. Od dawna wiadomo, że insulina powoduje między innymi przemieszczenie z wnętrza komórki glikoprotein transportujących glukozę przez błonę komórkową [16]. Wana-

Tabela 2. Szkodliwe efekty działania wanadu na organizm.

Pochodne wanadu używane najczęściej w badaniach	Efekty działania wanadu	Piśmiennictwo
VCl ₃ (V ⁺³)	— u myszy i szczurów działa jako bardzo silny środek hemolityczny <i>in vitro</i> i <i>in vivo</i>	22
VOSO ₄ (V ⁺⁴)	— nagromadzenie wanadu w nerkach prowadzi do uszkodzenia tych narządów, V działa jako inhibitor Na ⁺ , K ⁺ - ATP-azy	22, 23
V ₂ O ₅ (V ⁺⁴)	— powoduje uszkodzenie błon przez peroksydację lipidów wskutek generowania wolnych rodników	23
Na ₂ [VO(OX) ₂] _x H ₂ O (V ⁺⁵)	— hamuje ruch chromosomów w kierunku wrzeciona mitotycznego. Nie wywołuje strukturalnych aberracji chromosomowych, zwiększa znacząco ich ilość	9, 52
NaVO ₃ (V ⁺⁵)	— związek toksyczny dla wrzeciona mitotycznego (limfocyty ludzkie)	52
NH ₄ VO ₃ (V ⁺⁵)	— Na ₃ VO ₄ (swoisty inhibitor białkowej fosfatazy tyrozynowej) indukuje morfologiczne transformacje oraz aberracje chromosomowe leukocytów ludzkich	52
Na ₃ VO ₄ (V ⁺⁵)	— podrażnienia i zranienia dróg oddechowych ludzi wdychających pył z pochodnymi wanadu	1
SVO ₅ (V ⁺⁵)	— w dużych stężeniach wanadu w wodzie do picia (ok. 3 mmol) zwiększona śmiertelność zwierząt z cukrzycą	52, 45
maltolowa pochodna V [8, 27, 70, 72]		

Tabela 3. Pożyteczne efekty działania wanadu na organizm. Średnie zapotrzebowanie dzienne 116 µg (dla różnych organizmów od kilkunastu do kilkudziesięciu µg przyjmowane z płynem i pokarmem, a wydane głównie z moczem).

Pochodne wanadu używane najczęściej w badaniach	Efekty działania wanadu	Piśmiennictwo
VCl ₃ (V ⁺³)	— niezbędny mikroelement dla prawidłowego rozwoju i wzrostu niektórych gatunków ptaków i ssaków (jego rola wymaga dalszych badań), a także przeżycia komórek w kulturach	25, 73
VOSO ₄ (V ⁺⁴)	— niezbędny dla pleśni, alg i bakterii	52
V ₂ O ₅ (V ⁺⁴)	— brak V powoduje deformację szkieletu, wzrost liczby poronień, opóźnienie wzrostu ciała, wzrost masy tarczycy	50
Na ₂ [VO(OX) ₂] _x H ₂ O (V ⁺⁴)	— wpływa na metabolizm glukozy (Glc), stymuluje wychwytywanie heksoz, w tym Glcss przez hepatocyty i adipocyty, powoduje wzmożenie glikolizy i syntezy glikogenu, stymuluje lipogenezę i hamuje lipolizę	23
NaVO ₃ (V ⁺⁵)	— obniża transport Glc w jelicie cienkim przez zależne od Na ⁺ przenośniki Glc (tak u zwierząt kontrolnych, jak i cukrzycowych)	50, 74
NH ₄ VO ₃ (V ⁺⁵)	— doustne podanie w cukrzycy modelowej u gryzoni działa normalizująco na jej kliniczne objawy	50
Na ₃ VO ₄ (V ⁺⁵)	— powoduje wzrost stężenia wolnego wapnia w cytoplazmie przez hamowanie aktywności ATP-az (Na ⁺ /K ⁺ i Ca ²⁺)	50, prześl. w 74
SVO ₅ (V ⁺⁵)	— bierze udział w regulacji metabolizmu, hamuje aktywność fosfolipazy (swoistej dla fosfatylo- indozotolu, białkowej fosfatazy fosfotyrozyny) i aktywuje białkową kinazę tyrozynową, reguluje syntezę białek P450, których poziom wzrasta w cukrzycy	10, 27
maltolowa pochodna V	— czynnik współdziałający z wtórnymi przekaznikami, czasem sam odgrywa rolę wtórnego przekaznika	10, 21, 74, 25

[8, 27, 70, 72]

dany nie są w stanie przywrócić normalnej aktywności transporterów glukozy (jednej z subpopulacji GLUT-4) ani powodować ich defosforylacji w komórkach tłuszczowych szczurów z cukrzycą SZ [4]. Sugeruje to istnienie alternatywnych dróg transportu cukrów do wnętrza komórki, które mogłyby być uruchamiane przez wanad. W prawidłowych limfocytach i monocytach szczurzych, pochodzących od zwierząt kontrolnych, wanad obniża zdolność wiązania insuliny przez jej receptor, raczej przez zmniejszenie ilości receptorów niż przez obniżenie powinowactwa do tego hormonu [49]. Znane jest oddziaływanie wanadanów na receptory asjaloglikoprotein w hepatocytach i „wymianę” ich formy aktywnej na nieaktywną w błonie plazmatycznej [54]. Jest możliwe, że indukowane przez wanad insulino-podobne efekty działania nie zawsze wiążą się lub zależą od receptorów insuliny. Droga oddziaływania wanadu może łączyć się z działaniem insuliny, z niektórymi szlakami metabolicznymi oddziaływania tego hormonu lub biec niezależnie od tych dróg metabolicznych. Sugeruje się, że wanad może oddziaływać na wtórne przekaźniki, czasem zaś sam być wtórnym przekaźnikiem sygnału hormonalnego [25].

Sądzi się również, że pewne efekty działania wanadu mogą być niezależne od siebie np. w adipocytach szczurzych lipogeneza i utlenianie glukozy zależą od cytozolowej kinazy tyrozynowej, czego nie potwierdzono w przypadku transportu glukozy i antylipolitycznego działania wanadu [67]. Wielu autorów stwierdza, że wanad stymuluje fosforylację reszt Tyr różnych białek komórkowych [6,12]. Brak jednak zgodności czy działanie to wiąże się wprost z stymulacją aktywności kinaz tyrozynowych [66, 67] czy też przez hamowanie aktywności fosfataz fosfotyrozyny [56]. Z aktywnością kinaz bądź z dodatkowym sposobem oddziaływania wanadu może być związane hamowanie przez ten pierwiastek aktywności Na^+ , K^+ -ATP-azy [22, 23, 47, 67], Ca^{2+} -ATP-azy [27] czy też H^+ ATP-azy [13], a także zależność od wapnia niektórych przynajmniej efektów działania wanadu [6,10, 53,57] Poza tym coraz więcej danych wskazuje, że działanie wanadu jest różne w różnych rodzajach komórek, co więcej w tych samych komórkach w zależności od ich stanu fizjologicznego działanie wanadu może być odmienne. Przykładowo niektórzy autorzy [6, 57] stwierdzają, że w hepatocytach kontrolnych efekty działania wanadu są inne niż działanie insuliny, zbliżone raczej do działania glukagonu czy wazopresyny. Ponadto, w dalszych badaniach nad wanadem konieczne jest sprawdzenie jego ubocznych, negatywnych skutków działania w organizmie, o czym pisze się coraz powszechniej.

Nasze zainteresowania wanadem wynikało ze zdolności tego pierwiastka do normalizowania klinicznych objawów cukrzycy doświadczalnej (wywołanej tak SZ jak aloksanem u myszy i szczurów) w bardzo krótkim czasie, tj. już po trzech dniach podawania w postaci roztworu do picia. Liczne prace dotyczące tego problemu pojawiły się w końcu lat siedemdziesiątych; próbą uporządkowania różnych, czasem sprzecznych z sobą doniesień na podstawie piśmiennictwa dotyczącego tego problemu jest jedna z naszych ostatnich prac przeglądowych [72]. Podjęliśmy również we współpracy z R. Grybosiem badania nad nową, syntetyzowaną przez niego, nie

stosowaną jeszcze w badaniach tego typu pochodną wanadu tj. $\text{Na}_2 [\text{VO}(\text{OX})_2] \times \text{H}_2\text{O}$ ze względu na jej dobrą rozpuszczalność i dużą trwałość w roztworach wodnych soli oraz buforach. Sprawdziliśmy wpływ tego związku na aktywność transferazy galaktozylowej enzymu-znacznika aparatu Golgiego wątroby szczura, jak również na najczęściej badane kliniczne parametry cukrzycy. Wyniki będą przedmiotem oddzielnej publikacji oryginalnej [45], można jednak stwierdzić, że nowo syntetyzowana pochodna, podobnie jak insulina w standardowych warunkach doświadczenia nie normalizowała aktywności badanego przez nas enzymu [28, 31, 40, 46].

PODZIĘKOWANIA

Autorzy dziękują Sławkowi Kordowiakowi Jr. za zaprojektowanie oraz wykonanie rysunków do tej pracy.

LITERATURA

- [1] AFSHARI CA, KODAMA S, BIVINS HM, WILLARD TB, FUJIKI H, BARRETT JC. Induction of neoplastic progression in Syrian Hamster embryo cells treated with protein phosphatase inhibitors *Canc Res* 1993; **55**: 1777–1782.
- [2] AGARWAL MK ed. „Streptozotocin: Fundamentals and therapy” Elsevier/North Holland Biomedical Press Amsterdam, New York, Oxford 1981.
- [3] AGARWAL MK. Streptozotocin; mechanism of action. *FEBS Lett* 1980; **120**: 1–3
- [4] BEGUM N, DRAZNIN B. Effect of streptozotocin-induced diabetes on GLUT-4 phosphorylation in rat adipocytes. *J Clin Invest* 1992; **90**: 1254–1266.
- [5] BEST L, MALAISSE WJ. Phospholipids and islet function *Diabetologia* 1983; **25**: 299–305.
- [6] BOSCH F, ARINO J, GOMEZ-FOIX AM, GUINOVART JJ. Glycogenolytic non insulin-like effects of vanadate on rat hepatocytes glycogen synthase and phosphorylase *J Biol Chem* 1987; **262**: 218–222.
- [7] BRASS EP, RUFF LI. Effect of clofibrate treatment on hepatic prostaglandin catabolism and action *J Pharmacol Exp Ther* 1991; **257**: 1034–1038.
- [8] CAM MC, PEDERSON RA, BROWNSEY RW, McNEIL JH. Long-term effectiveness of oral vanadyl sulphate in streptozotocin-diabetic rats. *Diabetologia* 1993; **36**: 218–224.
- [9] CANDE WZ, WOLNIAK SM. Chromosome movement in lysed mitotic cells is inhibited by vanadate *J Cell Biol* 1978; **79**: 573–580.
- [10] CANDURA SM, MANZO L, MARRACCINI P, COCCINI T, TONINI M. Investigation into vanadate -induced potentiation of smooth muscle contractility in the rabbit isolated ileum. *Life Sci* 1993; **54**: 237–244.
- [11] CHANG AY. Streptozotocin-induced alterations in enzyme activities in animals 111–124 w Streptozotocin: Fundamentals and Therapy. Agarwal (ed) Elsevier/North Holland Biomedical Press Amsterdam, New York, Oxford 1981.
- [12] CHAO W, LIU H, OLSON MS. Effect of orthovanadate on tyrosine phosphorylation of P 120 GTP-ase activating protein in rat liver macrophages (Kupffer cells). *Biochem Biophys Res Commun* 1993; **191**: 55–60.

- [13] CHATTERJEE D, NEFF L, CHAKRABORTY M, FABRICANT C, BARON R. Sensitivity to nitrate and other oxyanions further distinguishes to vanadate-sensitive osteoklast proton pump from other vacuolar H⁺ ATP-ases. *Biochemistry* 1993; **32**: 2808–2812.
- [14] COHEN MD, PARSONS E, SCHLESINGER RB, ZALIKOFF JT. Immunotoxicity of *in vitro* vanadium exposures: effects on interleukin 1, tumor necrosis factor a and prostaglandin E₂. Production WEHI-3 macrophages *Int J Immunopharmac* 1993; **15**: 437–446.
- [15] CURTIS-PRIOR PB. Prostaglandins. An introduction to their Biochemistry, Physiology and Pharmacology. North-Holland Publ. Comp., Amsterdam New York Oxford 1976.
- [16] CUSHMAN SW, WARDZALA LJ. Potential mechanism of insulin action on glucose transport in the isolated rat adipose cell (Apparent translocation of intracellular transport systems to the plasma membrane. *J Biol Chem* 1980; **255**: 4758–4762.
- [17] DA COSTA THM, WILLIAMSON DH. Effects of exogenous insulin or vanadate on disposal of triacylglycerols between mammary gland and adipose tissue in the lactating rat: insulin resistance in white adipose tissue *Biochem J* 1993; **290**: 557–561.
- [18] FAAS FH, CARTER WJ. Altered microsomal phospholipid composition in the streptozotocin diabetic rat. *Lipids* 1983; **18**: 339–342.
- [19] GANDA OP, ROSSINI AA, LIKE AA. Studies on streptozotocin diabetes. *Diabetes* 1976; **25**: 595–603.
- [20] GARRITY MJ, BRASS EP, ROBERTSON RP. Kinetics of prostaglandin E metabolism in isolated hepatocytes. *Biochim Biophys Acta* 1984; **796**: 136–141.
- [21] GOLDMAN R, ZOR U. Activation of macrophage PtdIns-PLC by phorbol ester and vanadate: involvement of reactive oxygen species and tyrosine phosphorylation. *Biochim Biophys Res Commun* 1994; **199**: 334–338.
- [22] HAMADA T. Vanadium induced hemolysis of vitamin E deficient erythrocytes in HEPES buffer. *Experientia* 1994; **50**: 49–53.
- [23] HAMADA T. A new experimental system of using fertile chick eggs to evaluate vanadium absorption and antidotal effectiveness to prevent vanadium uptake. *J Nutr Biochem* 1994; **5**: 382–388.
- [24] HANDLEY DA, CHIEN S, ARBEENY M. Ultrastructure of hepatic cholesterol crystals in the hypercholesterolemic-diabetic rat *Path Res Pract* 1983; **177**: 13–21.
- [25] HARMEL FG, SOLOMON SS, JESPERSEN AS, BLOTCKY A, RACK E, DUCKWORTH WC Alteration of tissue vanadium content in diabetes *Metabolism* 1993; **42**: 1503–1505.
- [26] HORTON EW. Prostaglandins. Springer-Verlag Berlin, Heidelberg, N. York 1972.
- [27] JANISZEWSKA G, LACHOWICZ L, JASKÓLSKI D, GROMADZIŃSKA E. Vanadium inhibition of human parietal lobe ATP-ases. *Int J Biochem* 1994; **26**: 551–553.
- [28] KACZMARSKI F, KORDOWIAK A, SARNECKA-KELLER M. Influence of insulin on galactosyltransferase activity and morphology of the liver Golgi apparatus in control and streptozotocin diabetic rats *Path Res Pract* 1981; **172**: 130–137.
- [29] KAPUSTA P, KORDOWIAK AM. Receptory eikozanoidów. *Post Biol Kom* 1995 — przesłano do Redakcji.
- [30] KARUNANAYAKE EH, HEARSE DJ, MELLOWS G. Streptozotocin: Its excretion and metabolism in the rat. *Diabetologia* 1976; **12**: 483–488.
- [31] KORDOWIAK A. Aktywność biochemiczna aparatu Golgiego wątroby szczura w cukrzycy doświadczalnej *Zeszyty naukowe UJ. Prace z Biol Molek* 1982; **9**: 93–102.
- [32] KORDOWIAK A. The phospholipid and cholesterol contents of the Golgi-rich membrane fraction from streptozotocin- or alloxan- diabetic rats and 6 h after streptozotocin rat livers *Bull Acad Pol Sci* 1984; **32**: 165–171.
- [33] KORDOWIAK AM. The streptozotocin-prostaglandin interaction in Golgi apparatus of rat. *Acta Biochim Polon* 1986; **33**: 253–259.

- [34] KORDOWIAK AM. Cytoprotective effect of 16,16' dimethylprostaglandin E₂ (dmPGE₂) on streptozotocin-induced alteration of Golgi-rich membrane fraction in comparison with morphology of rat liver Golgi apparatus in situ *Path Res Pract* 1986; **181**: 397–402.
- [35] KORDOWIAK AM. Aparat Golgiego II. Wpływ różnych substancji na strukturę i funkcję tej organeli. Zmiany aktywności biochemicznej oraz morfologii aparatu Golgiego w cukrzycy doświadczalnej. *Post Biol Kom* 1986; **13**: 462–475.
- [36] KORDOWIAK AM. The phospholipid contents in rat liver Golgi-rich membrane fractions and/or prostaglandin treatment. *Folia Histochem Cytobiol* 1986; **24**: 39–46.
- [37] KORDOWIAK A, KACZMARSKI F. Short term action of streptozotocin on biochemical activity and morphology of rat liver Golgi apparatus. *Folia Histochem Cytochem* 1980; **18**: 3–19.
- [38] KORDOWIAK AM, KAPUSTA P. Prostaglandyny (PGs) jako przykład niepeptydowego ligandu związanego przez swoiste receptory na powierzchni komórki *Post Biol Kom* 1992; **19**: 179–184.
- [39] KORDOWIAK A, MOLOCHKINA E. The phospholipid composition of erythrocyte ghosts in juvenile diabetes Preliminary report. *Bull Acad Pol Sci* 1980; **28**: 675–679.
- [40] KORDOWIAK A, SARNECKA-KELLER M. The protein patterns of Golgi-rich membrane preparations from the livers of control, insulin-treated and streptozotocin-diabetic rats. *Bull Acad Pol Sci* 1977; **25**: 205–209.
- [41] KORDOWIAK A, SARNECKA-KELLER M, KACZMARSKI F. Biochemical activity and morphology in the Golgi apparatus in alloxan diabetic rats. *Folia Histochem Cytochem* 1978; **16**: 89–96.
- [42] KORDOWIAK AM, STACHURA J, TOMECKI J, KAPUSTA P. The influence of PGE₁ and ethanol as PGE₁ solvent on the activity of galactosyltransferase of rat liver Golgi fractions — *in vitro* experiments. *J Physiol Pharmacol* 1993; **44**: 383–390.
- [43] KORDOWIAK AM, TOMECKI J, PROCYK K, KAPUSTA P. Prostaglandin E (dmPGE₂) action *in vitro* on the activity of rat liver Golgi apparatus galactosyltransferase. *Acta Biochim Polon* 1993; **40**: 1–5.
- [44] KORDOWIAK AM, TRZOS R. Cytoprotekcyjne działanie prostaglandyn na poziomie organu, komórki oraz w układach *in vitro*. *Post Biol Kom* 1994; **21**: 275–291.
- [45] KORDOWIAK AM, TRZOS R, GRYBOŚ R. Influence of oral administration of bis(oxalato)oxovanadate (IV) complex ion on liver Golgi galactosyltransferase activity in control and streptozotocin-diabetic rats. 1995 — przesłano do Redakcji.
- [46] KORDOWIAK A, TURZYNA B, KACZMARSKI F, SARNECKA-KELLER M. Comparison of rat plasma glycoprotein composition with biochemical activity and morphology of liver Golgi apparatus in streptozotocin diabetes treated with insulin. *Folia Histochem Cytochem* 1981; **19**: 179–186.
- [47] LACORD-BONNEAU M, MUH JP, GUTMAN N, DUBIERNARD L, WEIN J, BARDOS P. Glucosyl and galactosyl transferase activities of diabetic (db/db) and obese (ob/ob) mice kidneys. *Int J Biochem* 1983; **15**: 759–762.
- [48] LEE KC, DELUCA DP. Simultaneous determination of prostaglandins E₁, A₁ and B₁ by reversed-phase high-performance liquid chromatography for the kinetic studies of prostaglandin E₁ in solution. *J Chromatograph* 1991; **555**: 73–80.
- [49] LEVIN SR, AFTERGOOD DE, FANOUS E, WHITSON RH. Inhibition of insulin receptors by vanadium and ouabain *Life Sci* 1988; **42**: 1889–1896.
- [50] MADSEN KL, PORTER VM, FEDORAK RN. Oral vanadate reduces Na⁺-dependent glucose transport in rat small intestine. *Diabetes* 1993; **42**: 1126–1132.
- [51] MCRAE JR, DAY RP, METZ SA, HALTER JB, ENSINCK JW, ROBERTSON RP. Prostaglandin E₂ metabolite levels during diabetic ketoacidosis *Diabetes* 1985; **34**: 761–766.

- [52] MIGLIORE L, BOCCIARDI R, MACRIC C, LO JACONO F. Cytogenetic damage induced in human lymphocytes by four vanadium compounds and micronucleus analysis by fluorescence in situ hybridization with a centromeric probe. *Mutation Research* 1993; **319**: 205–213.
- [53] MITTAG TW, GUO W, TANIGUCHI T. Interaction of vanadate and iodate oxyanions with adenylyl cyclase of ciliary processes. *Biochem Pharmacol* 1993; **45**: 1311–1316.
- [54] OKA JA, WEIGEL PH. Vanadate modulates the activity of asialoglycoprotein receptors on isolated rat hepatocytes: active surface receptors are internalized and replaced by inactive receptors *Arch Biochem Biophys* 1991; **289**: 362–370.
- [55] OKUMURA T, NAKAYAMA R, SAGO T, SAITO K. Identification of prostaglandin E metabolites from primary cultures of rat hepatocytes. *Biochim Biophys Acta* 1985; **837**: 197–207.
- [56] RIJKSEN G, VOELLER MC, VAN ZOELLEN EJJ. The role of protein phosphatases in density-dependent growth control of normal rat kidney cells. *FEBS Lett* 1993; **322**: 83–87.
- [57] RODEN M, LIENER K, FURNSIUN C, PRSKAVEC M, NOVOTNY P, STEFFAN I, VIE-RHAPPER M, WALDHAUS LW. Non-insulin-like action of sodium ortho vanadate in the isolated, perfused liver of fed, non-diabetic rats. *Diabetologia* 1993; **36**: 602–607.
- [58] SAGO T, NAKAYAMA R, OKUMURA T, SAITO K. Metabolism of prostaglandin D₂ and F_{2a} in primary cultures of rat hepatocytes *Biochim Biophys Acta* 1986; **879**: 330–338.
- [59] SARNECKA-KELLER M, KACZMARSKI F, KORDOWIAK A. Morphology of Golgi apparatus in streptozotocin — diabetic rat liver *Path Res Pract* 1980; **168**: 126–133.
- [60] SARNECKA-KELLER M, KORDOWIAK A. The activity of Golgi membrane galactosyl transferase EC 2. 4. 1. 38 in the livers of streptozotocin diabetic rats. *Acta Biochim Polon* 1977; **24**: 179–185.
- [61] SARNECKA-KELLER M, KORDOWIAK A, CIBA T. Erythrocyte membrane cholesterol content in juvenile diabetes. Preliminary determination. *Acta Med Pol* 1980; **21**: 255–258.
- [62] SOSIN D, KORDOWIAK A, SARNECKA-KELLER M, CIBA T. Osmotic fragility of erythrocyte in insulin-dependent diabetes. *Acta Med Pol* 1982; **23**: 29–35.
- [63] SOSIN D, KORDOWIAK A, SARNECKA-KELLER M. Osmotic resistance of rat erythrocytes in hyperinsulinism and streptozotocin-diabetes as compared with cholesterol and sialic acid contents of erythrocyte ghosts *Horm Metab Research* 1984; **16**: 89–92.
- [64] SCHIEVEN GL, KIRIHARA JM, MYERS DE, LEDBATTER JA, UCKUN FM. Reactive oxygen intermediates active WF-B in a tyrosine kinase dependent mechanism and in combination with vanadate active the p 56 and p 59 tyrosine kinases in human lymphocytes. *Blood* 1993; **82**: 1212–1220.
- [65] SHANKAR RAVI HN, RAMASARMA T. Multiple reactions in vanadyl - V (IV) oxidation by H₂O₂. *Molec Cell Biochemistry* 1993; **129**: 9–29.
- [66] SHISHEVA A, SHECHTER Y. Mechanism of pervanadate stimulation and potentiation of insulin-activated glucose transport in rat adipocytes: dissociation from vanadate effect. *Endocrinol* 1993; **133**: 1562–1568.
- [67] SHISHEVA A, SHECHTER Y. Role of cytosolic tyrosine kinase in mediating insulin-like actions of vanadate in rat adipocytes. *J Biol Chem* 1993; **268**: 6463–6469.
- [68] TATOŃ J. *Diabetologia kliniczna* 1986. W-wa PZWL.
- [69] TEPPERMAN HM, DEWITT J, TEPPERMAN J. The effects of streptozotocin diabetes on the activities of rat liver glycosyltransferases. *Diabetes* 1983; **32**: 412–415.
- [70] THOMPSON KH, LEICHTER J, MC NEILL JH. Studies of vanadyl sulphate as a glucose-lowering agent in STZ-diabetic rats. *Biochem Biophys Res Commun* 1993; **197**: 1549–1555.
- [71] TRAN-THI TA, GYUFKO K, DECKER K. Fate of exogenous and endogenous prostaglandins D₂ and E₂ in the perfused rat liver. *Eicosanoids* 1991; **4**: 37–44.
- [72] TRZOS R, KORDOWIAK AM. Pochodne wanadu jako czynnik normalizujący kliniczne objawy cukrzycy. *Post Biol Kom* 1994; **21**: 293–302.

- [73] VALLON V, OSSWALD H. Dipyridamole prevents diabetes-induced alterations of kidney function in rats. *Naunyn-Schmiederberg's Arch Pharmacol* 1994; **349**: 217–222.
- [74] VERRECCHIA A, GUAITANI A. Insulin-mimetic effects of vanadate in preventing the increase of P450 A and P 450 IA subfamily proteins in streptozotocin-diabetic rats. *Acta Diabetol* 1993; **30**: 128–131.
- [75] WEINSTOCK RS, MESSINA JL. Vanadate and insulin stimulate gene 33-expression *Biochem Biophys Res Commun* 1992; **189**: 931–937.
- [76] Zaorska B (red) Prostaglandyny i inne eikozanoidy W-wa PZWL 1986.

Adres autora: 31-120 Kraków, al. Mickiewicza 3.

ODDZIAŁYWANIA KOMÓREK W SUBSTANCJI MIĘDZYKOMÓRKOWEJ

INTERACTIONS IN EXTRACELLULAR CELL MATRIX

Zofia PORWIT-BÓBR

Instytut Biologii Molekularnej UJ, Kraków

Streszczenie: Przedstawiono podstawowe informacje na temat rozpoznawania molekularnego w procesach, które prowadzą do odczynu zapalnego. W przypadku adhezji zapalnej struktury powierzchniowe, których ekspresja towarzyszy stanom zapalnym uczestniczą w interakcjach międzykomórkowych komórek układu obronnego. Poznanie rodziny cytokin, selektyn, integryn i ich ligandów pozwoliło na lepsze zrozumienie tych oddziaływań.

W ostatnim pięcioleciu opublikowano w naszym zespole konsekwencje działania wydzielanych pozakomórkowo enzymatycznych białek bakteryjnych *Staphylococcus aureus* i *Porphyromonas gingivalis*; proteinazy serynowej w atopowym zapaleniu skóry oraz gingipainy w paradentozie.

Składnik powierzchniowy mikroorganizmów rozpoznający adhezyjne cząsteczki substancji międzykomórkowej MSCRAMM (*microbial surface components recognizing adhesive matrix molecules*) u *Staphylococcus aureus* uczestniczy w inwazji, kolonizacji tkanek gospodarza przez drobnoustroj, a także w odpowiedzi odpornościowej. Otrzymano dane, że bakteryjne cząsteczki adhezyjne, gronkowcowa serynowa proteinaza V8, a także Arg-gingipaina i Lys-gingipaina mogą odgrywać ważną rolę w interakcjach komórkowych w procesach zapalnych.

Słowa kluczowe: substancja międzykomórkowa, adhezja zapalna, pozakomórkowe enzymy bakteryjne

Summary: Basic information concerning molecular recognition in bacterial infections is outlined. Inflammatory phase of infection induced by interactions of adhesive products of genes, expressed on surfaces of immune cells and its ligands are described. The knowledge about family of cytokines, selectins and integrins and its receptors help us to understand these interactions.

During the last five years the consequences of extracellular enzyme release from *Staphylococcus aureus* and *Porphyromonas gingivalis*, namely: serine proteinase in *atopic dermatitis* and gingipains in *periodontitis* were subject of our work.

Microbial surface components recognizing adhesive matrix molecules (MSCRAMM) of *S. aureus* participates in cell interactions during invasion, host tissue colonization, and immune response. Data were obtained that bacterial adhesive molecules and staphylococcal serine proteinase V8 and also, Arg-gingipain or Lys-gingipain can play important role in cell interactions during inflammation.

Key words: extracellular cell matrix, inflammatory adhesion, extracellular bacterial enzymes

Interakcje między komórkami w substancji międzykomórkowej (SM) wynikają z rozpoznawania ligand-receptor. Rozpoznawanie to wymaga ogromnej selektywności i specyficzności, polegającej na komplementarności węglowodanów i peptydów [14].

Na podstawie licznych badań stało się oczywiste, że SM jest wieloskładnikowym substratem dla powierzchniowych białek komórek układu odpornościowego organizmu. W przypadku adhezji zapalnej produkty genów uczestniczące w interakcjach międzykomórkowych: selektyny, intergryny i inne cząsteczki zostały w znacznym stopniu poznane. Otrzymano preparaty syntetyczne i inhibitory blokujące ich działanie, ale do wyjaśnienia pozostaje poznanie obszaru wiążącego cząsteczek adhezyjnych [4].

W adhezji zapalnej uczestniczą zależne od wapnia lektyny o własnościach selektywności typu C (Ca^{2+}) i strukturze domenowej [3]. W adhezji związanej z przenikaniem do śródbłonna naczyń włosowatych komórek, spełniającym określone funkcje w odpowiedzi odpornościowej mogą brać również selektyny L/Lam-1 [5].

Interakcja selektywności z ich ligandami na powierzchni leukocytów powoduje adhezję leukocytów do komórek śródbłonna i poprzedza ich przenikanie z i do wnętrza naczyń krwionośnych. E-selektyny/ELAM-1 pośredniczą w przemieszczaniu się neutrofilów i monocytów oraz niektórych limfocytów (pamięci). W przypadkach przechodzenia komórek przez ścianę naczyń rozpuszczalne selektyny E uzyskały nazwę krążących cząsteczek adhezyjnych, które mają podstawowe znaczenie w kierowaniu komórek do określonych miejsc zasiedlania (*homing*). Selektyny E występują w różnych formach glikozylowanych i różnią się m.cz. 107 – 115 kDa.

W początkowym stadium adhezji selektyny L zapoczątkowują opuszczenie naczyń przez neutrofile i monocyty [5]. Odpowiednie ligandy umożliwiają przejście przez wysoki śródbłonek naczyń, ponieważ mają na powierzchni cząstki z rodziny selektywności LEC-CAM. W adhezji zapalnej mobilizowane przez interleukinę 1 i czynnik nekrozy nowotworów selektyny E/ELAM 1 (115kD) czyli cząsteczki adhezyjne CAM-1 ulegają ekspresji na komórkach śródbłonna pod wpływem cytokin. Ligand E-selektywności występuje przejściowo na tych komórkach śródbłonkowych od 2–8 godz. po aktywacji zapalnej [2]. Selektyny P/GMP-140 są przechowywane w ziarnistościach płytek krwi, uwalniane z aktywowanych płytek oraz z śródbłonna i wiążą się z neutrofilami [3].

W następnym stadium adhezji zapalnej dochodzi do aktywacji integryn: LFA-1 i VLA-4.

Integryny występują na powierzchni różnych komórek układu odpornościowego. Jest to grupa białek zaliczana do nadrodziny immunoglobulinowej, ze względu na strukturę heterodimerową złożoną z podjednostek alfa i beta. Specyficzność ligandową integryn częściowo poznano. Jako cytoadhezyny ulegają ekspresji pod wpływem mediatorów zapalnych. Integryny aktywowane przez cytokinowe chemoatraktanty czyli chemokiny, np. IL-8, MPC-1 lub PAF, wywołują m.in. spłaszczenie komórki, ułatwiające diapedezę. Spłaszczenie na powierzchni śródbłonna jest wynikiem zmian konformacyjnych, które następują po związaniu LFA-1 z ligandem ICAM-1 i VLA-4 z VCAM-1.

Białka powierzchniowe bakterii zostały poznane dzięki rozwojowi genetyki molekularnej [8].

Zainteresowania Zakładu Mikrobiologii i Immunologii IBM UJ dotyczyły glikoprotein powierzchniowych, które ulegały ekspresji w organizmie w wyniku inwazji i zakażenia bakteryjnego lub procesu nowotworowego. Badania interakcji struktur powierzchniowych w odpowiedzi odpornościowej rozpoczęto od poznania modelu antygenów wirusów polyoma i grypy [6, 7]. Oczyszczone antygeny nowotworowe T, polyoma i antygeny HA (glikoproteinowej hemaglutyniny wirusa grypy), rozpoznawane w układzie syngenicznym w kontekście z MHC klasy I i II limfocytów T były przedmiotem licznych publikacji. Wykryto różnice, wynikające z modulacji struktury warstwy powierzchniowej błon komórkowych po ekspresji genów kodujących badane antygeny, w reakcjach grup cukrowych z konkanawaliną A i w kooperacjach limfocytów T-T, po stymulacji antygenowej (w testach nadwrażliwości typu późnego) [6].

W ostatnim pięcioleciu poznano w naszym zespole konsekwencje działania wydzielanych pozakomórkowo białek bakteryjnych, w tym proteinaz *Staphylococcus aureus* i *Porphyromonas gingivalis* [8, 11, 12].

Obecnie wiadomo, że MSCRAMM np. u gronkowca rozpoznaje fibronektynę, kolagen i wielocukry spokrewnione z heparyną w specyficznych reakcjach struktur wiążących ligandy, istotnych w inwazji, kolonizacji tkanek gospodarza przez drobnoustroj, a także w indukcji odpowiedzi odpornościowej [8].

Badania nad rolą pozakomórkowych enzymów bakteryjnych w interakcjach międzykomórkowych rozwijały się spontanicznie w dwóch zespołach Zakładu Mikrobiologii i Immunologii i miały zbliżony cel poznawczy: powiązanie patogenezы zakażeń z ostrą fazą zapalenia. Modulacje reakcji odpornościowych, głównie neutrofilów i interakcje enzymatyczne z immunoglobulinami i inhibitorami enzymów [11, 13], prowadzące do degradacji, zmian strukturalnych i funkcjonalnych tych białek dotyczyły dwóch istotnych, ale różnych i tylko częściowo poznanych zakażeń bakteryjnych: gronkowcowego, towarzyszącego atopowemu zapaleniu skóry [1] oraz infekcji bakteriami, wydzielającymi gingipainy w związku z paradentozą [12].

U chorych z atopowym zapaleniem skóry i zakażeniem *S. aureus* w pobranych płynach przesiękowych (*suction blister fluid*) stwierdzono obecność proteinazy serynowej. Poziom aktywności enzymu oznaczony wobec kazeiny i swoistego substratu Z-Phe-Leu-Glu-p.Na był wysoki i zależny od stopnia zakażenia.

Obecność w pobranych płynach skórnych proteiny serynowej V8, (a nie elastazy neutrofilowej) wskazuje na możliwość jej penetracji do ogniska zapalnego w przebiegu zakażenia oraz możliwość modyfikującego wpływu na inhibitor ostrej fazy zapalenia, alfa-1 antytrypsynę. Pobrane płyny przesiętkowe stymulowały nieznacznie migrację neutrofilów izolowanych z krwi obwodowej zdrowych dawców. Neutrofile krwi obwodowej pacjentów wyizolowane po przebyciu zakażenia gronkowcowego skóry, wykazywały obniżoną chemotaksję w stosunku do czynników zapalnych LTB4 i IL-8 oraz zmodyfikowanej proteiny gronkowcową inhibitora: alfa 1-antytrypsyny.

W odpowiedzi komórek odpornościowych nadal badany jest na poziomie molekularno-komórkowym mechanizm adhezji zapalnej pod wpływem enzymów wydzielanych z badanych mikroorganizmów i nie do końca poznanych dróg transdukcji sygnałów. Znaczenie modulacji wynikających z powstawania nowych struktur biologicznych np. zmodyfikowanych inhibitorów proteinaz i ich własności w komunikacjach międzykomórkowych jest mało poznane. Wiadomo jednak, że proteiny bakteryjne oprócz enzymatycznego działania wywołującego daleko idące konsekwencje immunologiczne (np. degradację immunoglobulin), często tworzą kompleksy z inhibitorami co może prowadzić do ich zmienionej struktury i funkcji [9, 10].

LITERATURA

- [1] BARAN K, POTEMPA J, TURZYNA B, TERNOWITZ T, PORWIT-BÓBR Z. Proteolytic and amidolytic activity in suction blister fluid from atopic dermatitis patients with severe *Staphylococcus aureus* infection. *Zbl Bakt Suppl* 1994; **26**: 292–294.
- [2] BUTCHER E. Leukocyte-endothelial cell recognition: three or more steps to specificity and diversity. *Cell* 1991; **67**: 1033–1036.
- [3] CUMMINGS RD, SMITH DF. The selectin family of carbohydrate-binding proteins: structure and importance of carbohydrate ligands for cell adhesion. *BioEssay* 1992; **12**: 849.
- [4] KIEDA C. Endogenous lectins in circulating cells and their glycosylated ligands: potential tools for adhesion-based therapy. *Post Biol Kom, Suppl* **3**: 1994: 187–196.
- [5] LASKY LA, SINGER MS, DOWBENKO D, IMAI Y, HENZEL WJ, GRIMLEY Ch, FENNIE Ch, GILLET N, WATSON SR, ROSEN SD. An endothelial ligand for L-selection is a novel mucin-like molecule. *Cell* 1992; **69**: 927–938.
- [6] OCHAŁEK T, BURZYŃSKI A, CADEL Z, CHEŁAP Z, PORWIT-BÓBR Z. Delayed hypersensitivity to polyoma and “self” antigens in syngeneic mice. *Neoplasma* 1987; **4**: 441–451.
- [7] OCHAŁEK T, PORWIT-BÓBR Z. Influenza virus hemagglutinin-binding T cells in delayed hypersensitivity induced in mice. *Acta Microbiol Pol* 1985; **34**: 155–158.
- [8] PATII JM, ALLAN BL, McGavin MJ, HOOK M. MSCRAMM-mediated adherence of microorganisms to host tissues. *Annu Rev Microbiol* 1994; **48**: 585–617.
- [9] PORWIT-BÓBR Z. Regulatory role of serine proteinases in the early and late cell immune response. *Zeszyty Naukowe UJ Prace z Biol Mol* 1990; **19**: 155–162.
- [10] PORWIT-BÓBR Z, OCHAŁEK T, PROKESOVA L, JOHN C, BARAN K, POTEMPA J. Effects of serine proteinase from *Staphylococcus aureus* V8 cells on con A stimulation of human lymphocytes. *Microbiol* 1989; **12**: 139–142.

- [11] POTEPA J, BARAN K, GÓRKA M, FEDAK D, TRAVIS J, PORWIT-BÓBR Z. *Staphylococcus aureus* proteinase as mediators of inflammatory reaction. *Zbl Bakt Suppl* 1991; **21**: 187–188.
- [12] POTEPA J, PIKE R, TRAVIS J. Unity among diversity: the multiple forms of trypsin-like activity present in various strains of *Porphyromonas gingivalis* are due to the presence of either Arg-gingipain or lys-gingipain. Praca oddana do druku.
- [13] PROKESOVA L, POTUZNIKOVA B, POTEPA J, ZIKAN J, RADL J, HACHOWA L, BARAN K, PORWIT-BÓBR Z, JOHN C. Cleavage of human immunoglobulins by serine proteinase from *Staphylococcus aureus*. *Immunol Letters* 1992; **31**: 259–266.
- [14] SHARON N, LIS H. Lectins as cell recognition molecules. *Science* 1989; **246**: 227–234.

Adres autora: 31-120 Kraków, Al. Mickiewicza 3.

WPŁYW KSZTAŁTU KOMÓREK NA WZROST, RÓŻNICOWANIE I PRZEŻYWALNOŚĆ KOMÓREK¹

THE INFLUENCE OF CELL SHAPE ON CELL GROWTH, DIFFERENTIATION AND SURVIVAL

Jarosław CZYŻ

Zakład Biologii Komórki, Instytut Biologii Molekularnej UJ, Kraków

Streszczenie: Zmiany kształtu i stopnia rozplaszczania komórek są jednym z czynników wpływających na wzrost, różnicowanie i przeżywalność komórek w hodowli in vitro. Zwiększenie stopnia rozplaszczania komórek powoduje zapoczątkowanie przez komórki wzrostu, natomiast zaokrąglenie komórek wywołuje ich różnicowanie i apoptozę. Coraz więcej faktów wskazuje na udział białek cytoszkieletu w procesach regulacji zachowania się komórek przez wpływ na kształt komórek. Cytoszkielet odgrywa rolę w rozmieszczeniu organelli komórkowych w cytoplazmie, w regulacji przebiegu procesów energetycznych, syntezy makromolekuł oraz procesów związanych z kaskadą wtórnych przekaźników. W artykule omówiono dane dotyczące wpływu oddziaływań komórek z podłożem, związanych z nimi zmian kształtu komórek i zmian w organizacji cytoszkieletu na wzrost i różnicowanie komórek.

Summary: Cell shape and degree of spreading influence the growth, differentiation and survival of the cells cultured in vitro. The increase in cell spreading leads to the initiation of cell proliferation, whereas cell rounding often results in cell differentiation and apoptosis. Numerous results suggest that cytoskeletal proteins can be involved in the processes of the regulation of cell physiology by cell shape. Cytoskeleton takes part in the regulation of the distribution of cytoplasmic organelles, energy metabolism, macromolecule synthesis, second messengers cascades etc. The available data concerning the role of cell-substratum interactions and cell shape changes in cell proliferation and differentiation, along with the role of cytoskeletal proteins in these processes have been reviewed in this article.

Słowa kluczowe: proliferacja, różnicowanie, kształt komórki, rozplaszczanie, transdukcja sygnału, cytoszkielet

Keywords: cell proliferation, cell differentiation, cell shape, spreading, signal transduction, cytoskeleton.

1 Praca finansowana w ramach grantu KBN 6P04C 120 08.

I. WSTĘP

Większość typów prawidłowych komórek zwierzęcych hodowanych *in vitro* podejmuje syntezę DNA i proliferację tylko po przyczepieniu się do podłoża. Zjawisko to określane jest jako zależność wzrostu od przyczepienia (ang. *anchorage dependence of growth*) [107]. Komórki wykazujące to zjawisko, hodowane w warunkach uniemożliwiających komórkom przyczepienie się do podłoża, np. w pożywkach płynnych, nie syntetyzują DNA i nie dzielą się, a wzrost komórek zostaje zatrzymany w fazie G1 cyklu komórkowego [62, 83]. Zależności wzrostu od przyczepienia się do podłoża nie wykazują m.in. komórki macierzyste szpiku kostnego. Interakcje komórek z podłożem prowadzą do zmian kształtu komórek z zaokrąglonego, obserwowanego u komórek w zawiesinie, na rozplaszczony, a także do zapoczątkowania przez komórki wzrostu. Ponieważ większość prawidłowych komórek zwierzęcych nie może migrować wzajemnie jedne po drugich [77], zwiększenie gęstości komórek w hodowli, które powoduje wzrost liczby kontaktów międzykomórkowych, prowadzi do zmniejszenia rozplaszczania komórek [18]. Skorelowany z tym jest spadek szybkości wzrostu komórek (kontaktowe zahamowanie wzrostu, ang. *contact inhibition of growth*) [65, 88]. Tak więc zarówno oderwanie komórek od podłoża jak i wzrost gęstości komórek w hodowli prowadzą do zmian kształtu komórek oraz do zmian szybkości wzrostu komórek. Sugeruje to, że zjawisko zależności wzrostu od przyczepienia się komórek do podłoża oraz zjawisko kontaktowego zahamowania wzrostu komórek mogą być przyczynowo związane ze zmianami ich kształtu.

Kształt komórek wpływa nie tylko na wzrost i proliferację lecz także na różnicowanie i ekspresję genów w komórkach. Zmniejszenie rozplaszczania niektórych typów komórek np. chondrocytów, keratynocytów i hepatocytów prowadzi do zahamowania proliferacji komórek, a także do zapoczątkowania przez komórki procesów różnicowania i ekspresji specyficznych tkankowo genów [33, 102, 110]. Z kolei komórki śródbłonkowe i nabłonkowe reagują na spadek stopnia rozplaszczania różnicowaniem, natomiast całkowite oderwanie komórek od podłoża wywołuje u tych komórek apoptozę [29]. Wskazuje to na istotną rolę kształtu komórek jako czynnika regulującego fizjologię i właściwości komórek w organizmie. Komórki nowotworowe, które zdolne są do wzrostu w zawiesinie cechują się obniżoną wrażliwością na zmiany ich kształtu. Oderwanie komórek nowotworowych od podłoża nie wywołuje zatrzymania wzrostu komórek [87].

W ostatnich latach opracowano szereg technik umożliwiających kontrolę kształtu i stopnia rozplaszczania komórek. Pozwoliło to na ilościowe badania wpływu kształtu komórek na wzrost i różnicowanie komórek. W artykule zebrane zostały fakty dotyczące roli kształtu komórek w procesach regulacji wzrostu i różnicowania komórek, oraz wynikające z nich wnioski na temat roli białek cytoszkieletu w regulacji zachowania komórek.

II. WPLYW CHEMICZNYCH I FIZYCZNYCH WŁAŚCIWOŚCI PODŁOŻA NA KSZTAŁT I SZYBKOŚĆ WZROSTU KOMÓREK

Castor [18] jako pierwszy zaobserwował zależność aktywności mitotycznej prawidłowych komórek zwierzęcych od ich kształtu. Wykazał, że wraz ze wzrostem gęstości komórek linii 1S1 w hodowli, spadał stopień rozplaszczania komórek. Ze zmianami kształtu komórek z rozplaszczanego na bardziej zokrąglony, skorelowany był spadek aktywności mitotycznej komórek mierzonej liczbą mitoz przypadających na jedną komórkę w danym okresie czasu. Zrobienie „rany” w pojedynczej warstwie (monolayerze) komórek powodowało rozpoczęcie migracji przez komórki znajdujące się na brzegu rany, wzrost ich rozplaszczania oraz aktywności mitotycznej. Na tej podstawie zasugerował, że stopień rozplaszczania komórek jest jednym z głównych czynników wpływających na szybkość wzrostu prawidłowych komórek zwierzęcych w hodowli *in vitro*.

Wyeliminowanie wpływu kontaktów międzykomórkowych na wzrost komórek umożliwiły doświadczenia oparte na hodowli komórek na włóknach waty szklanej, kulkach silikonowych i szklanych oraz na płytkach szklanych o określonych wymiarach [26, 71]. Większość komórek BHK 21 i 3T3 hodowanych na płytkach szklanych o wymiarach $110 \times 110 \mu\text{m}$ i większych zdolna była do wzrostu i tworzenia kolonii. Płytki takie umożliwiały pełne rozplaszczanie rosnących na nich komórek. Wraz ze spadkiem wielkości płytek spadała szybkość proliferacji komórek. Tylko 2% komórek hodowanych na płytkach o wymiarach $30 \times 30 \mu\text{m}$ podejmowało wzrost. Wykazano też, że procent komórek 3T3 i BHK 21 tworzących kolonie na włóknach waty szklanej był wprost proporcjonalny do długości włókien. Komórki hodowane na włóknach o długości do $40 \mu\text{m}$ (BHK 21) i $60 \mu\text{m}$ (3T3) były praktycznie niezdolne do podziałów i tworzenia kolonii. Wraz ze wzrostem długości włókien procent komórek tworzących kolonie rósł, osiągając swoje maksimum, gdy komórki hodowane były na włóknach o długości $200 - 250 \mu\text{m}$. Taka długość włókien umożliwiała komórkom pełne rozplaszczanie w kierunku osi długiej włókna. Podobne wyniki uzyskano hodując komórki na kulkach szklanych i silikonowych o różnej średnicy. Kulki szklane o średnicy $75 \mu\text{m}$ umożliwiały rosnącym na nich komórkom pełne rozplaszczanie i podziały. Przyczepienie się komórek do kulek o średnicy $5 \mu\text{m}$ nie pozwalało komórkom na rozplaszczanie. Komórki hodowane na tak małych kulkach nie dzieliły się [26, 71].

Opierając się m.in. na tych wynikach Folkman i Greenspan [26] zasugerowali, iż zjawisko zależności wzrostu komórek od przyczepienia się komórek do podłoża może wynikać z zależności wzrostu od stopnia rozplaszczania komórek. Interakcje komórek z podłożem prowadzą do zmian kształtu komórek, który z kolei może wpływać na wrażliwość komórek na działanie chemicznych czynników pobudzających wzrost.

Komórki hodowane na podłożu umożliwiającym rozplaszczanie reagują wzrostem na obecność czynników wzrostowych, podczas gdy zaokrąglenie komórek wywołuje spadek ich wrażliwości na stymulujące działanie tych czynników.

Pod koniec lat 70-tych w badaniach nad rolą kształtu komórek w procesach regulacji wzrostu komórek zaczęto stosować techniki oparte na zdolności niektórych substancji do wpływania na właściwości chemiczne podłoża do hodowli komórek. Folkman i Moscona [27] pokrywały naczynia różnymi stężeniami poli(hydroksyetylometakrylatu) (poliHEMA). Zaobserwowały one, że wraz ze wzrostem stężenia poliHEMA spadał stopień rozplaszczania komórek śródbłonkowych hodowanych na podłożu pokrytym tą substancją. Jednocześnie spadała intensywność wbudowywania przez komórki znakowanej trytem tymidyny oraz obniżał się procent jąder syntetyzujących DNA. Wyniki te autorzy uznali za potwierdzenie hipotezy o wpływie kształtu komórek na jej wrażliwość na działanie czynników wzrostowych. Autorzy zasugerowali również, że korelacja między stopniem rozplaszczania komórek, a aktywnością podziałową komórek może być wynikiem wpływu oddziaływań komórki z podłożem na strukturę wiązek filamentów aktynowych.

Ponten i Stolt [85] zaproponowali doświadczenia umożliwiające ścisłą kontrolę kształtu i stopnia rozplaszczania komórek. Polegała ona na hodowli komórek na wysepkach o podwyższonej adhezywności uzyskanych przez napylenie metalicznego palladu na nieadhezywną powierzchnię. Komórki hodowane na tak przygotowanych podłożach przyczepiały się tylko do miejsc gdzie napyłony był pallad, a kształt komórek determinowany był przez kształt i pole powierzchni wysepki. Metoda ta okazała się niezwykle przydatna w doświadczeniach dotyczących wpływu kształtu komórki na wzrost komórek. Wykorzystując tę technikę O'Neill i wsp. [81] wykazali, że procent komórek WME syntetyzujących DNA na wysepkach o powierzchni $500 \mu\text{m}^2$ był taki sam jak komórek pozostających w zawieszynie. Wraz ze wzrostem pola powierzchni wysepki, procent komórek syntetyzujących DNA rósł osiągając maksimum dla komórek hodowanych na wysepkach o powierzchni $5000 \mu\text{m}^2$.

Wpływ zmian kształtu komórek na aktywność wzrostową komórek badano również wykorzystując podłoża pokryte immobilizowanymi ligandami integryn. Ingber [46] hodując komórki śródbłonkowe na podłożu pokrytym fibronektyną wykazał, że wraz ze wzrostem stężenia immobilizowanej na podłożu fibronektyny rośnie stopień rozplaszczania komórek oraz intensywność syntezy DNA. Fibronektyna rozpuszczona w medium hodowlanym lub immobilizowana na kulkach szklanych nie stymuluje syntezy DNA. Wynika z tego, że fibronektyna i inne białka adhezji wpływały na wzrost komórek tylko wtedy, gdy oddziaływania między cząsteczkami białka a komórką prowadziły do zmian kształtu komórki. Hepatocyty, hodowane na podłożu pokrytym fibronektyną, są bardziej rozplaszczone i szybciej rosną, niż gdy są hodowane na podłożu pokrytym lamininą [94]. Podobnie zachowują się komórki fibroblastyczne. Niektóre typy komórek nabłonkowych rosną szybciej na podłożu pokrytym lamininą [104]. Czynnikiem określającym zachowanie się komórek na podłożach

pokrytych różnymi białkami adhezji mogą być więc właściwości białek receptorowych typu integryn obecnych na błonach komórkowych badanych komórek. Hepatocyty i fibroblasty posiadają receptory fibronektyn, a wykorzystane w doświadczeniach linie komórek nabłonkowych charakteryzują się obecnością receptorów laminin. Różnice w specyficzności receptorów wpływać mogą na stabilność miejsc kontaktu komórek z podłożem (kontaktów zogniskowanych, ang. *focal contacts*). Wyniki te wskazują na zaangażowanie cytoszkieletu w procesach regulacji wzrostu komórek, ponieważ kontakty zogniskowane stanowią punkty zaczepienia dla elementów kurczliwych cytoszkieletu (np. włókien naprężeniowych, ang. *stress fibers*) i odgrywają istotną rolę w organizacji cytoszkieletu [47].

III. WPLYW KSZTAŁTU KOMÓREK NA PROCESY RÓŻNICOWANIA KOMÓREK

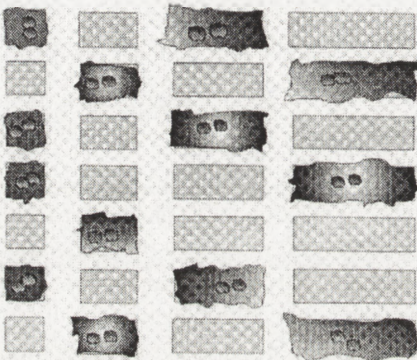
Wiele typów komórek, wśród nich chondrocyty, komórki nabłonkowe, śródbłonkowe, keratynocyty i in. podejmuje syntezę DNA i proliferację gdy są hodowane na podłożach umożliwiających adhezję i rozplaszczanie, natomiast zmiana warunków hodowli powodująca spadek rozplaszczania i zookrąglenie komórek wywołuje zatrzymanie wzrostu komórek i rozpoczęcie przez komórki procesów różnicowania.

Głowacki i wsp. [33] hodując chondrocyty na podłożach pokrytych różnymi stężeniami poliHEMA wykazali, że ekspresja przez komórki fenotypu zróżnicowanego jest ściśle skorelowana z kształtem komórek. Chondrocyty hodowane na podłożu pokrytym poliHEMA w dużym stężeniu przyczepiały się do podłoża, pozostawały jednak zaokrąglone. W tych warunkach komórki nie dzieliły się, syntetyzowały natomiast glikozaminoglikany, które są markerami różnicowania chondrocytów. Te same komórki hodowane na plastiku były silnie rozplaszczone i podejmowały syntezę DNA. Podobne wyniki uzyskano hodując chondrocyty w obecności fibronektyny [111]. Komórki hodowane na podłożach bakteriologicznych pokrytych fibronektyną traciły fenotyp zróżnicowany, rozplaszczaly się i rozpoczynały syntezę DNA. Wpływ fibronektyny na właściwości chondrocytów jest ściśle związany z kształtem komórek. Fibronektyna nie wywoływała wzrostu chondrocytów hodowanych w pożywce półpłynnej, która uniemożliwiała komórkom rozplaszczanie [3].

Badania zachowania hepatocytów i keratynocytów hodowanych na wysepkach o podwyższonej adhezywności potwierdziły rolę kształtu komórek w ekspresji fenotypu zróżnicowanej komórki. Pozwoliły one również wyeliminować wpływ oddziaływań międzykomórkowych jako ewentualnego czynnika wpływającego na ekspresję genów.

Osadzenie hepatocytów na wysepkach o powierzchni $1600 \mu\text{m}^2$ sprawiało, że tylko kilka procent komórek hodowanych w tych warunkach syntetyzowało DNA. Poziom sekrecji albuminy przez komórki, która jest jednym z markerów różnicowania hepatocytów, był względnie wysoki i wynosił ok 80 ng/1000 komórek/1 dzień. Wzrost

pola powierzchni wysepek o podwyższonej adhezywności powodował wzrost stopnia rozplaszczenia osadzanych na wysepkach komórek, spadek poziomu sekrecji albuminy oraz wzrost liczby komórek syntetyzujących DNA. Na standardowym podłożu, które nie ograniczało stopnia rozplaszczenia komórek, ok 60% hepatocytów syntetyzowało DNA, natomiast sekrecja albuminy stanowiła tylko ok. 30% wartości otrzymanej dla komórek hodowanych na najmniejszych wysepkach [102] (Rys. 1). Wyniki te potwierdzają wcześniejsze wnioski innych autorów dotyczące wpływu kształtu na właściwości hepatocytów [74].



Rys. 1. Komórki hodowane na wysepkach o podwyższonej adhezywności. Zmiany pola powierzchni wysepek powodują kontrolowane zmiany stopnia rozplaszczenia komórek. (według Singhvi i wsp. [102] zmienione)

Doświadczenia polegające na hodowli keratynocytów na wysepkach o podwyższonej adhezywności przyniosły bardzo podobne wyniki. Tylko 15% komórek hodowanych na wysepkach o powierzchni $400 \mu\text{m}^2$ syntetyzowało DNA, natomiast ok. 45% komórek hodowanych w tych warunkach syntetyzowało białko markerowe inwolukrynę. Wraz ze wzrostem pola powierzchni wysepek więcej hodowanych na nich komórek syntetyzowało DNA, a mniej komórek syntetyzowało inwolukrynę [110].

Wpływ kształtu komórek na procesy różnicowania obserwowano również dla komórek nabłonkowych i śródbłonkowych. Komórki nabłonkowe gruczołu piersiowego myszy podejmują syntezę kazeiny w odpowiedzi na spadek stopnia rozplaszczenia [24]. Ingber i Folkman [47] wykazali, że w zależności od stopnia rozplaszczenia komórki śródbłonkowe podejmują syntezę DNA, różnicowanie lub giną. Komórki śródbłonkowe hodowane na szalkach bakteriologicznych pokrytych fibronektyną w stężeniu poniżej 100 ng/cm^2 były zaokrąglone i po pewnym czasie ginęły. Wysokie stężenia fibronektyny immobilizowanej na podłożu (ponad 500 ng/cm^2) wywoływały natomiast rozplaszczenie i proliferację komórek. Komórki hodowane na podłożach pokrytych fibronektyną w stężeniu od 100 do 500 ng/cm^2 początkowo się rozplaszczają, jednak z czasem oddziaływania międzykomórkowe doprowadzały do odrywania się komórek od podłoża, tworzenia agregatów, zaprzestania wzrostu i rozpoczęcia procesów angiogenezy.

IV. WPŁYW MECHANICZNIE STYMULOWANYCH ZMIAN KSZTAŁTU KOMÓREK NA WZROST I EKSPRESJĘ GENÓW PRZEZ KOMÓRKI

Niektóre typy komórek zwierzęcych wrażliwe są na zmiany kształtu wywołane przez mechaniczne rozciąganie komórek. Reakcja komórek polegać może na przyspieszeniu wzrostu lub zmienionej ekspresji genów. W swojej pionierskiej pracy Curtis i Seehar [22] wykazali, że mechaniczne rozciąganie siatki nylonowej z rosnącymi na niej fibroblastami, wywołujące cykliczne zmiany kształtu komórek, powoduje wzrost liczby jąder syntetyzujących DNA oraz wzrost indeksu mitotycznego stymulowanych komórek. Indeks mitotyczny i procent jąder w fazie S cyklu komórkowego obliczony dla komórek rozciąganych cyklicznie z częstotliwością 0.25 do 1 Hz był dwukrotnie większy niż w hodowli kontrolnej.

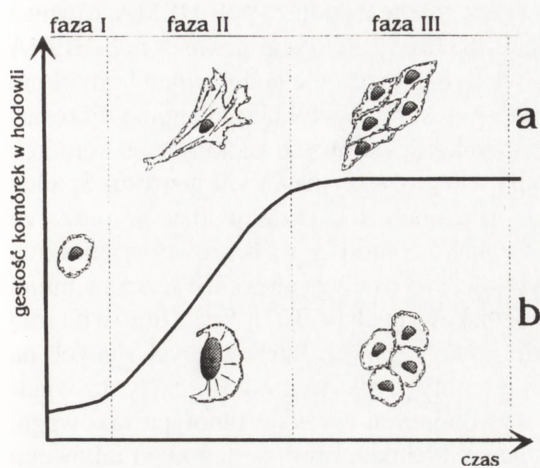
Inną metodą badania wpływu mechanicznej stymulacji komórek na proliferację i ekspresję genów jest hodowla komórek na elastycznych podłożach, które można deformować, zmieniając w ten sposób kształt rosnących na nich komórek. Przy użyciu tej metody wykazano, że także inne typy komórek, w tym komórki nabłonkowe [14], mięśniowe [112], osteoblasty [53, 78] są wrażliwe na mechaniczną stymulację. Komórki nabłonkowe reagowały na mechaniczne rozciąganie dwukrotnym wzrostem liczby jąder syntetyzujących DNA [14]. Ilościowe badania wpływu wielkości amplitudy zmian kształtu komórek na ich wzrost wykazały, że np. ludzkie osteoblasty najsilniej reagowały na rozciąganie o amplitudzie 1%. Większe amplitudy zmian kształtu komórek wywoływały mniejszą reakcję komórek [78].

Zmiany kształtu komórek powodowane przez mechaniczne rozciąganie komórek wpływać mogą na wzrost komórek poprzez wpływ na ekspresję genów. Komórki mięśni gładkich pod wpływem mechanicznej stymulacji wydzielają PDGF, który na drodze autokrynnej powoduje wzrost aktywności mitotycznej stymulowanych komórek [112]. Te same komórki pod wpływem mechanicznej stymulacji zwiększają syntezę kolagenu, hialuronianu i siarczanu chondroityny [66]. Mechaniczna stymulacja komórek śródbłonkowych i fibroblastów powoduje wzrost syntezy endoteliny-1 [75] oraz interleukiny 1b [101]. Mechanizm transdukcji sygnału mechanicznego na sygnał chemiczny nie został jak dotąd poznany. Zaproponowano, że w procesie tym mogą odgrywać rolę mechanowrażliwe kanały wapniowe, fosfolipaza C oraz cytoskielet aktynowy [23, 25, 53].

V. KORELACJA MIĘDZY ORGANIZACJĄ CYTOSZKIELETU A ZACHOWANIEM SIĘ KOMÓREK ZWIERZĘCYCH

A) WPŁYW ODDZIAŁYWAŃ KOMÓRKI Z PODŁOŻEM NA ORGANIZACJĘ CYTOSZKIELETU I ZACHOWANIE KOMÓREK

Przyczepienie i rozplaszczanie się komórek na podłożu powoduje reorganizację elementów cytoszkieletu: mikrotubul, mikrofilamentów i filamentów pośrednich [107]. Z punktu widzenia oddziaływań komórki z podłożem szczególnie ważna jest organizacja cytoszkieletu aktynowego. Komórki oddziałują z podłożem, na którym rosną za pośrednictwem receptorów typu integryn [45, 91]. Są to białka integralne, których część zewnątrzkomórkowa zdolna jest do interakcji z niektórymi typami białek adhezji (fibronektyny, lamininy). Oddziaływania między integrynami a ich ligandami prowadzą do zlepiania (ang. *clustering*) integryn i do formowania kontaktów zogniskowanych [15, 52]. Kontakty zogniskowane są związane z kompleksami białkowymi usytuowanymi po wewnętrznej (cytoplazmatycznej) stronie błony komórkowej. W ich skład, oprócz integryn, wchodzi kilkanaście rodzajów białek, m.in. winkulina, talina, a-aktynina, aktyna, paksylina, białka kapturkowe [15], niektóre białka regulacyjne (np. kinazy białkowe [1, 89] i białka G [38]). W kontaktach zogniskowanych łączy się cytoszkielet aktynowy komórki z błoną komórkową i macierzą zewnątrzkomórkową. Biorą one również udział w procesach organizacji cytoszkieletu aktynowego, w tym w formowaniu włókien naprężeniowych [32, 82]. Włókna naprężeniowe są to wiązki mikrofilamentów o właściwościach kurczliwych [64], w skład których wchodzi również miozyna, tropomiozyna, a-aktynina [93] i inne białka np. niektóre kinazy (PKC) [76]. Organizacja włókien naprężeniowych zależy od stabilności kontaktów komórek z podłożem. Odpowiedni stopień stabilności kontaktów zogniskowanych umożliwia skurcz izometryczny komórki, który jest niezbędny do formowania włókien naprężeniowych [59, 82, 103]. Zmiana właściwości chemicznych lub fizycznych podłoża powodująca spadek stabilności kontaktów komórki z podłożem, stopnia rozplaszczania i szybkości wzrostu komórek wywołuje również reorganizację cytoszkieletu i zanik włókien naprężeniowych [13, 44, 63, 73, 113]. Podobne zmiany organizacji cytoszkieletu uzyskiwano poprzez hodowlę komórek w „gęstych” hodowlach lub na wysepkach o podwyższonej adhezywności [8, 49, 50]. Stwierdzono, że wraz ze wzrostem gęstości komórek w hodowli spada liczba kontaktów zogniskowanych i włókien naprężeniowych w komórce [8, 54]. Jednocześnie zmniejsza się stopień rozplaszczania komórek, spada ich aktywność mitotyczna [18, 55] (Rys. 2), a w niektórych przypadkach komórki rozpoczynają procesy różnicowania. Podobnie komórki reagują na zmiany pola powierzchni wysp o podwyższonej adhezywności [49, 50]. Spadek pola powierzchni wysp powoduje spadek stopnia rozplaszczania rosnących na wyspach komórek, spadek liczby kontaktów zogniskowanych, obniżenie szybkości wzrostu i ekspresję genów specyficznych tkankowo



Rys. 2. Korelacja między gęstością komórek w hodowli, ich kształtem i organizacją cytoszkieletu aktynowego, a szybkością wzrostu komórek. W początkowej fazie hodowli, gdy komórki nie są rozplaszczone, a cytoszkielet aktynowy pozostaje zdeorganizowany, przyrost komórek w hodowli jest minimalny (faza I). Rozplaszczanie się komórek na podłożu, rozpoczęcie migracji i wykształcenie włókien naprężeniowych jest skorelowane ze wzrostem aktywności mitotycznej komórek (faza II). Wytworzenie zwartej warstwy komórek (*compact monolayer*) w hodowli powoduje spadek stopnia rozplaszczania komórek, zanik włókien naprężeniowych i zahamowanie proliferacji komórek (faza III). (a) fibroblasty; (b) komórki nabłonkowe.

[102, 110]. Także dezorganizacja cytoszkieletu aktynowego przez cytochalazynę D powoduje spadek szybkości wzrostu komórek [51]. Sugeruje to, iż zmiany organizacji cytoszkieletu mogą pośredniczyć w procesach regulacji właściwości komórek przez kształt komórek [10, 11].

Badania wpływu zmian właściwości mechanicznych podłoża, na którym rosły komórki, na organizację cytoszkieletu i wzrost komórek potwierdziły rolę skurczu izometrycznego komórki jako czynnika wpływającego na właściwości komórek [73]. Fibroblasty hodowane na żelach kolagenowych przyczepionych do podłoża, a więc sztywnych i niepodatnych na odkształcenia, zachowywały się podobnie jak komórki hodowane na tradycyjnych podłożach: rozplaszczaly się i podejmowały syntezę DNA. Oderwanie żelu od podłoża, które powodowało wzrost podatności żelu na odkształcenia, uniemożliwiało komórkom wykształcenie stanu skurczu izometrycznego. Prowadziło to do dezorganizacji cytoszkieletu, spadku aktywności mitotycznej rosnących na żelu komórek oraz do indukcji ekspresji specyficznych tkankowo genów. Podobnie zachowywały się komórki hodowane na żelach glikozyloagarozowych [41] i włóknach kolagenu [80]. Włókna grubsze były bardziej odporne na odkształcenia, przez co komórki hodowane na grubych włóknach były bardziej rozplaszczone i szybciej rosły niż komórki hodowane na cienkich włóknach.

Jedną z cech odróżniających komórki nowotworowe od komórek prawidłowych jest zdolność komórek nowotworowych do wzrostu w zawieszynie oraz do wzrostu wielowarstwowego [4, 30, 67]. Komórki te, w przeciwieństwie do komórek prawidłowych, dzielą się również wtedy, gdy nie są rozplaszczone na podłożu. Mogłoby to sugerować brak wrażliwości komórek nowotworowych na zmiany kształtu komórek. Badania lini komórek nowotworowych hodowanych na podłożach o różnej adhezyjności wykazały jednak, że w przypadku komórek nowotworowych spadek stopnia

rozpłaszczenia komórek, wywołowany przez pokrycie podłoża poli-HEMA, również powodował spadek szybkości proliferacji [87, 105]. Pokrycie podłoża poli-HEMA w stężeniu uniemożliwiającym jakiegokolwiek rozpłaszczenie hodowanym komórkom powodowało ok. 60 % spadek syntezy DNA w komórkach linii melanoma, fibrosarcoma, SV40 3T3. W odróżnieniu od komórek prawidłowych zaokrąglenie komórek nowotworowych nie prowadziło do całkowitego zatrzymania ich wzrostu. Spadek wrażliwości komórek nowotworowych na zmiany ich kształtu idzie w parze ze zmianami organizacji cytoszkieletu. Zwykle komórki nowotworowe są znacznie słabiej rozpłaszczone niż komórki prawidłowe, wytwarzają one także znacznie mniej włókien naprężeniowych i kontaktów zogniskowanych [4, 107]. Wskazuje to na rolę cytoszkieletu w procesach transformacji nowotworowej. Interesujących danych na temat wpływu cytoszkieletu na ekspresję fenotypu rakowego dostarczyły doświadczenia z wykorzystaniem czynników wywołujących rewersję fenotypu rakowego. Wykazano np., że cytochalazyna B i kolcemid hamują rewersję fenotypu rakowego komórek CHO-K1 wywołowaną przez analogi cAMP [86].

W ostatnich latach wykazano także, że białka cytoszkieletu mogą brać udział w zapoczątkowywaniu przez komórki procesów apoptozy. Apoptoza, czyli programowana śmierć komórek, jest ważnym mechanizmem utrzymującym pożądaną liczbę i lokalizację komórek w organizmie. Niektóre typy prawidłowych komórek zwierzęcych reaguje apoptozą na zmiany kształtu komórek z rozpłaszczonego na zaokrąglony [92]. Meredith i wsp. [72] oraz Frish i Francis [29] udowodnili, że oderwanie się komórek nabłonkowych i śródbłonkowych od podłoża w wyniku dodania do pożywki tripeptydu RGD, lub hodowla tych komórek w zawieszinie prowadzi do ich śmierci. Sugeruje to zaangażowanie integryn w procesach apoptozy. Transformacja komórek MDCK onkogenem v-src powoduje niewrażliwość tych komórek na apoptozę następującą po oderwaniu komórek od podłoża. Transfekcja nowotworowej linii CHO cDNA wirusa EIA powoduje utratę przez te komórki fenotypu rakowego oraz wzrost podatności komórek na apoptozę. Sugeruje to, że zanik wrażliwości komórek na apoptozę następującą w wyniku oderwania komórek od podłoża jest związany z utratą przez komórki wrażliwości na kształt [29].

B) MOŻLIWE MECHANIZMY KONTROLI WŁAŚCIWOŚCI KOMÓREK PRZEZ CYTOSZKIELET

W regulacji wzrostu komórek zaangażowane są, oprócz zewnątrzkomórkowych czynników chemicznych, czynniki determinujące kształt oraz właściwości mechaniczne komórek. Mechanizm wpływu kształtu i stopnia rozpłaszczenia komórek na właściwości komórek jest, jak się wydaje, związany ze zmianami organizacji cytoszkieletu następującymi m.in. pod wpływem interakcji między komórką a podłożem, na którym komórka rośnie. Zmiany te mogą wpływać na wiele procesów fizjologicznych zachodzących we wnętrzu komórki.

Architektura cytoszkieletu decyduje o organizacji cytoplazmy komórki. Białka cytoszkieletu zdolne są do interakcji z wieloma organellami, w tym z mitochondriami, lizosomami i retikulum endoplazmatycznym [57]. Mikrofilamenty odgrywają istotną rolę w koordynacji reakcji enzymatycznych poprzez mikrokompartamentację enzymów glikolitycznych [7, 21, 109]. Enzymy glikolityczne posiadają miejsca specyficznego wiązania z F-aktyną [19, 20, 42, 43]. Zmiany w organizacji cytoszkieletu wpływają również na procesy replikacji i transkrypcji DNA. Wiele faktów wskazuje na istnienie współzależności między organizacją cytoszkieletu, a strukturą i właściwościami jądra komórkowego. [47, 58, 86]. Oderwanie komórek od podłoża i dezorganizacja cytoszkieletu powodować może zmiany struktury chromatyny wpływające na przebieg procesów replikacji oraz transkrypcji DNA [84, 86]. Wpływ kształtu komórki i organizacji jej cytoszkieletu na procesy syntezy białek wynika ze zdolności rybosomów, mRNA i niektórych białek inicjujących translację do interakcji z F-aktyną [2, 31, 39, 56, 69, 99, 100].

Do interakcji z cytoszkieletem zdolne są także białka biorące udział w transmisji sygnału mitotycznego do jądra komórki [6, 17, 96]. Kontakty zogniskowane, które są miejscami łączącymi cytoszkielet komórki z podłożem zawierają wiele kinaz białkowych m.in. p125FAK [40, 95], fosfokinazę C-delta [1], białkowe produkty onkogenów np pp60src [89], białka G [38], zależne od jonów Ca^{++} proteazy [28]. W kontaktach zogniskowanych zlokalizowane jest białko odpowiedzialne za antyport Na^+/H^+ , które uczestniczy w procesach regulacji wewnątrzkomórkowego pH [34]. Stwierdzono ponadto zdolność niektórych izoform fosfokinazy C do łączenia się z mikrofilamentami [76].

Przyczepienie i rozpląszczenie się komórek na podłożu powoduje powstanie sygnałów o charakterze podobnym do sygnałów generowanych w komórce przez czynniki wzrostowe. Wynika to ze zdolności białek cytoszkieletu do samodzielnego wytwarzania sygnałów o charakterze chemicznym. Interakcje komórek z podłożem prowadzące do aktywacji integrzyn powodują m.in. fosforylację szeregu białek w kontaktach zogniskowanych [70, 90]. Wykazano, że fosforylacji ulega m.in.: pp125FAK [16, 35, 36, 60, 61], paksylina [16, 106], tenzyna [12], kortaktyna i ezryna [9]. Aktywacja integrzyn wywołuje także wzrost stężenia jonów wapnia [79], wzrost wewnątrzkomórkowego pH na skutek aktywacji antyportu Na^+/H^+ [48, 97, 98], wzrost aktywności fosfokinazy C [108] oraz ekspresję niektórych genów np. aktyny i innych białek cytoszkieletu, białek Fos, Jun, Ras i interleukin [5, 37, 54, 68].

PODSUMOWANIE

Dokładny mechanizm wpływu kształtu komórek na wzrost, różnicowanie i przeżywalność komórek w hodowli pozostaje nieznany. Wiele faktów sugeruje jednak, że w procesach regulacji zachowania komórek przez kształt komórek uczestniczyć może cytoszkielet komórki. Architektura cytoszkieletu zależy m.in. od stabilności miejsc kontaktu komórek z podłożem. Stanowią one punkty zaczepienia dla elementów kurczliwych cytoszkieletu (np. włókien naprężeniowych) i determinują zdolność komórki do tworzenia właściwej organizacji cytoszkieletu, która wpływa na przebieg wielu procesów fizjologicznych. Na przestrzeni ostatnich lat opisano wiele obserwacji wskazujących na wpływ cytoszkieletu na organizację cytoplazmy i rozmieszczenie organelli komórkowych. Cytoszkielet, szczególnie aktynowy, wpływa także na procesy glikolizy, ekspresji genów, syntezy białek oraz kaskady wtórnych przekazników. Fakty te pozwalają powiązać kształt i stopień rozpląszczenia komórki z zachowaniem komórki, w tym z jej aktywnością mitotyczną i różnicowaniem. Zależność przebiegu procesów metabolicznych oraz kaskad wtórnych przekazników od organizacji cytoszkieletu komórek może odpowiadać za zmiany reaktywności na czynniki wzrostowe komórek nie przyczepionych do podłoża. W wyniku tego, prawidłowe komórki zwierzęce hodowane w zawieszynie lub w „gęstych” hodowlach przestają się dzielić, a niektóre typy komórek hodowane w warunkach braku kontaktu z podłożem sztywnym rozpoczynają procesy różnicowania lub apoptozy.

Kształt komórek i organizacja cytoszkieletu jest jednym z podstawowych czynników regulujących wzrost, różnicowanie i przeżywalność komórek. Dalsze badania w tej dziedzinie mogą pomóc w wyjaśnieniu natury wielu procesów biologicznych ważnych podczas rozwoju zarodkowego, gojenia się ran i transformacji nowotworowej.

LITERATURA

- [1] BARRY ST, CRITCHLEY DR. The rhoA-dependent assembly of focal adhesions in Swiss 3T3 cells is associated with increased tyrosine phosphorylation and the recruitment of both pp125FAK and protein kinase C-delta to focal adhesions. *J Cell Sci* 1994; **107**: 2033–2045.
- [2] BASSEL GJ. High resolution distribution of mRNA within the cytoskeleton. *J Cell Biochem* 1993; **52**: 127–133.
- [3] BENYA PD, SHAFFER JD. Dedifferentiated chondrocytes reexpress the differentiated collagen phenotype when cultured in agarose gels. *Cell* 1982; **30**: 215–224.
- [4] BEN-ZE'EV A. The cytoskeleton in cancer cells. *Biochim Biophys Acta* 1985; **780**: 197–212.
- [5] BEN-ZE'EV A. The relationship between cytoplasmic organization, gene expression and morphogenesis. *TIBS* 1986; **11**: 478–481.
- [6] BEN ZE'EV A. Animal cell shape changes and gene expression. *BioEssays* 1991; **13**: 207–212.

- [7] BEREITER-HAHN J. Involvement of microcompartmentation in the regulation of cell proliferation. In: Jones D (red.). Microcompartmentation. CRC Press Inc. Boca Raton 1988: 56–69.
- [8] BEREITER-HAHN J, KAJSTURA J. Scanning microfluorimetric measurement of TRITC-phalloidin labelled F-actin in culture cells: dependence of F-actin content on density of normal and transformed cells. *Histochemistry* 1988; **90**: 271–276.
- [9] BHATTACHARYA S, FU CZ, BHATTACHARYA J, GREENBERG S. Soluble ligands of the alpha(v)beta(3) integrin mediate enhanced tyrosine phosphorylation of multiple proteins in adherent bovine pulmonary artery endothelial cells. *J Biol Chem* 1995; **270**: 16781–16787.
- [10] BISSEL MJ, BARCELLOS-HOFF MH. The role of extracellular matrix on gene expression: Is structure a message? *J Cell Sci Suppl* 1987; **8**: 327–343.
- [11] BISSEL MJ, GLENN HALL H, PARRY G. How does the extracellular matrix direct gene expression? *J Theor Biol* 1982; **99**: 31–68.
- [12] BOCKHOLD SM, BURRIDGE K. Cell spreading on extracellular matrix proteins induces tyrosine phosphorylation of tensin. *J Biol Chem* 1993; **268**: 14565–14567.
- [13] BODO M, PEZZETTI F, BARONI T, CARINCI F, ARENA N, NICOLETTI I, BECCHETTI E. Hyaluronic acid modulates growth, morphology and cytoskeleton in embryonic chick skin fibroblasts. *Int J Dev Biol* 1993; **37**: 349–352.
- [14] BRUNETTE DM. Mechanical stretching increases the number of epithelial cells synthesizing DNA in culture. *J Cell Sci* 1984; **69**: 35–45.
- [15] BURRIDGE K, FATH K, KELLY T, NUCKOLLS G, TURNER C. Focal adhesions: Transmembrane junctions between the extracellular matrix and the cytoskeleton. *Ann Rev Cell Bio* 1988; **4**: 487–525.
- [16] BURRIDGE K, TURNER CE, ROMER LH. Tyrosine phosphorylation of paxillin and pp125FAK accompanies cell adhesion to extracellular matrix: a role in cytoskeletal assembly. *J Cell Biol* 1992; **119**: 893–903.
- [17] CARRAWAY KL, CARRAWAY CAC. Signaling, mitogenesis and the cytoskeleton: where the action is. *BioEssays* 1995; **17**: 171–175.
- [18] CASTOR LN. Contact regulation of cell division in an epithelial-like cell line. *J Cell Phys* 1968; **72**: 161–172.
- [19] CLARKE FM, MASTERS CJ. Interactions between muscle proteins and glycolytic enzymes. *Int J Bioch Bristol* 1976; **7**: 359–365.
- [20] CLARKE F, STEPHAN P, MORTON D, WEIDEMANN J. The role of actin and associated proteins in the organization of glycolytic enzymes. In: Actin. Remedios CG, Barden JA. Eds. Academic Press. New York 1983: 249–258.
- [21] CLEGG JS. On the internal environment of animal cells. [w] Jones D (ed.). Microcompartmentation. CRC Press Inc. Boca Raton 1988
- [22] CURTIS ASG, SEEHAR GM. The control of cell division by tension or diffusion. *Nature* 1978; **274**: 52–53.
- [23] DIAMOND SL, SACHS F, SIGURDSON WJ. Mechanically induced calcium mobilization in cultured endothelial cells is dependent on actin and phospholipase. *Arteriosclerosis and Thrombosis* 1994; **14**: 2000–2006.
- [24] EMERMAN JT, PITELKA DR. Maintenance and induction of morphological differentiation in dissociated mammary epithelium on floating collagen membranes. *In Vitro (Rockville)* 1977; **13**: 316–328.
- [25] ERDOS T, BUTLER-BROWNE GS, RAPPAPORT L. Mechanogenetic regulation of transcription. *Biochimie* 1991; **73**: 1219–1231.
- [26] FOLKMAN J, GREENSPAN HP. Influence of geometry on control of cell growth. *Biochim Biophys Acta* 1975; **417**: 211–236.
- [27] FOLKMAN J, MOSCONA A. Role of cell shape in growth control. *Nature* 1978; **273**: 345–349.

- [28] FOX JE, TAYLOR RG, TAFFAREL M, BOYLES JK, GOLL DE. Evidence that activation of platelet calpain is induced as consequence of binding of adhesive ligand to the integrin, glycoprotein IIb-IIIa. *J Cell Biol* 1993; **120**: 1501–1507.
- [29] FRISH SM, FRANCIS H. Disruption of epithelial cell-matrix interactions induces apoptosis. *J Cell Biol* 1994; **124**: 619–626.
- [30] FUKAZAWA H, MIZUNO S, UEHARA Y. A microplate assay for quantitation of anchorage-independent growth of transformed cells. *Anal Biochem* 1995; **228**: 83–90.
- [31] FULTON AB. Spatial organization of the synthesis of cytoskeletal components. *J Cell Biochem* 1993; **52**: 148–152.
- [32] GEIGER B, AVNUR Z, RINNERTHALER G, HINSSEN H, SMALL VJ. Microfilament organizing centers in areas of cell contact: cytoskeletal interactions during cell attachment and locomotion. *J Cell Biol* 1984; **99**: 83–91.
- [33] GLOWACKI J, TREPMAN E, FOLKMAN J. Cell shape and phenotypic expression in chondrocytes. *Proc Soc Exp Biol Med* 1983; **172**: 93–98.
- [34] GRINSTEIN S, WOODSIDE M, WADDELL TK, DOWNEY GP, ORLOWSKI J, POUYS-SEGUR J, WONG DCP, FOSKETT JL. Focal localization of the NHE-1 isoform of the Na⁺/H⁺ antiport: assessment of effects on intracellular pH. *The EMBO J* 1993; **12**: 5209–5218.
- [35] GUAN J-L, TREVITHICK JE, HYNES RO. Fibronectin/integrin interaction induces tyrosine phosphorylation of a 120-kDa protein. *Cell Reg* 1991; **2**: 951–964.
- [36] GUAN J-L, SHALLOWAY D. Regulation of focal adhesion-associated protein tyrosine kinase by both cellular adhesion and oncogenic transformation. *Nature* 1992; **358**: 690–692.
- [37] HANSEN LK, MOONEY DJ, VACANTI JP, INGBER DE. Integrin binding and cell spreading on extracellular matrix act at different points in the cell cycle to promote hepatocyte growth. *Mol Bio Cell* 1994; **5**: 967–975.
- [38] HANSEN CA, SCHROERING AG, CAREY DJ, ROBISHAW JD. Localization of a heterotrimeric G protein gamma subunit to focal adhesions and associated stress fibers. *J Cell Biol* 1994; **126**: 811–819.
- [39] HESKETH JE, PRYME IF. Interaction between mRNA, ribosomes and cytoskeleton. *Biochem J* 1991; **277**: 1–10.
- [40] HILDEBRAND JD, SCHALLER MD, PARSONS JT. Identification of sequences required for the efficient localization of the focal adhesion kinase, pp125FAK, to cellular focal adhesions. *J Cell Biol* 1993; **123**: 993–1005.
- [41] HOHN HP, STEIH U, DENKER HW. A novel artificial substrate for cell culture: effects of substrate flexibility/malleability on cell growth and morphology. *In Vitro Cell Dev Biol* 1995; **31**: 37–44.
- [42] HUMPREYS L, REID S, MASTERS C. Evidence for the spatial organization of the binding sites for substrates and for cytoskeletal proteins on the enzyme aldolase. *Int J Biochem* 1986; **18**: 7–13.
- [43] HUMPREYS L, REID S, MASTERS C. Studies of the topographical localization of the binding sites for substrate and for actin on the enzymes GAPDH and PHK. *Int J Biochem* 1986; **18**: 445–451.
- [44] HUNTER A, ARCHER CW, WALKER PS, BLUNN GW. Attachment and proliferation of osteoblasts and fibroblasts on biomaterials for orthopaedic use. *Biomaterials* 1995; **16**: 287–295.
- [45] HYNES RO. Integrins: versatility, modulation, and signaling in cell adhesion. *Cell* 1992; **69**: 11–25.
- [46] INGBER DE. Fibronectin controls capillary endothelial cell growth by modulating cell shape. *Proc Natl Acad Sci USA* 1990; **87**: 3579–3583.
- [47] INGBER DE, FOLKMAN J. Mechanochemical switching between growth and differentiation during fibroblast growth factor-stimulated angiogenesis in vitro: role of extracellular matrix. *J Cell Biol* 1989; **109**: 317–330.

- [48] INGBER DE, PRUSTY D, FRANGIONI JV, CRAGOE EJ, LECHENE C, SCHWARTZ MA. Control of intracellular pH and growth by fibronectin in capillary endothelial cells. *J Cell Biol* 1990; **110**: 1803–1811.
- [49] IRELAND GW, DOPPING-HEPENSTAL PJC, JORDAN PW, O'NEILL CH. Effect of patterned surfaces of adhesive islands on the shape, cytoskeleton, adhesion, and behaviour of swiss mouse 3T3 fibroblasts. *J Cell Sci Suppl* 1987; **8**: 19–33.
- [50] IRELAND GW, DOPPING-HEPENSTAL PJC, JORDAN PW, O'NEILL CH. Limitation of substratum size alters cytoskeletal organization and behaviour of swiss 3T3 fibroblasts. *Cell Bio Int Rep* 1989; **13**: 781–790.
- [51] IWIG M, CZESLICK E, MULLER A, GRUNER M, SPINDLER M, GLAESSER D. Growth regulation by cell shape alteration and organization of the cytoskeleton. *Eur J Cell Bio* 1995; **67**: 145–157.
- [52] IZZARD CS, LOCHNER LR. Cell-to-substrate contacts in living fibroblasts: An interference reflexion study with an evaluation of the technique. *J Cell Sci* 1976; **21**: 129–159.
- [53] JONES DB, BINGMANN D. How do osteoblasts respond to mechanical stimulation ?. *Cells and Materials* 1991; **1**: 329–340.
- [54] JULIANO RL, HASKILL S. Signal transduction from the extracellular matrix. *J Cell Biol* 1993; **120**: 577–585.
- [55] KAJSTURA J, BEREITER-HAHN J. Loss of focal contacts accompanies the density dependent inhibition of cell growth. *Cell Biol Int Rep* 1989; **13**: 377–383.
- [56] KIRKEEIDE E-K, PRYME IF, VEDELER A. Microfilaments and protein synthesis; effect of insulin. *Int J Biochem* 1993; **25**: 853–864.
- [57] KNULL HR, WALSH JL. Association of glycolytic enzymes with cytoskeleton. *Curr Top Cell Reg* 1992; **33**: 15–30.
- [58] KOLEGA J. Effects of mechanical tension on protrusive activity and microfilament and intermediate filament organization in an epidermal epithelium moving in culture. *J Cell Biol* 1986; **102**: 1400–1411.
- [59] KOLODNEY MS, WYSOLMERSKI RB. Isometric contraction by fibroblasts and endothelial cells in tissue culture: a quantitative study. *J Cell Biol* 1992; **117**: 73–82.
- [60] KORNBERG L, EARP HS, PARSONS JT, SCHALLER M, JULIANO RL. Cell adhesion or integrin clustering increases phosphorylation of a focal adhesion-associated tyrosine kinase. *J Biol Chem* 1992; **267**: 23439–23442.
- [61] KORNBERG LJ, EARP HS, TURNER CE, PROCKOP C, JULIANO RL. Signal transduction by integrins: increased protein tyrosine phosphorylation caused by clustering of beta 1 integrins. *Proc Natl Acad Sci USA* 1991; **88**: 8392–8396.
- [62] KOROHODA W. Interrelations of motile and metabolic activities. III. Semisynchronous growth of chicken embryo cells preincubated in suspension. *Folia Biol* 1972; **20**: 333–338.
- [63] KOROHODA W, KAJSTURA J. Demonstration of the significance of isometric contraction for the formation of stress fibers in chick embryo fibroblasts. *Folia Histochem Cytobio* 1982; **20**: 153–156.
- [64] KREIS T, BIRCHMEIER W. Stress fiber sarcomeres of fibroblasts are contractile. *Cell* 1980; **22**: 555–561.
- [65] LEE Y, McINTIRE LV, ZYGOURAKIS K. Analysis of endothelial cell locomotion: differential effects of motility and contact inhibition. *Biotech Bioeng* 1994; **43**: 622–634.
- [66] LEUNG DY, GLAGOV S, MATHEWS. Cyclic stretching stimulates synthesis of matrix components by arterial smooth muscle cells in vitro. *Science* 1976; **191**: 475–477.
- [67] LIN X, COSTA M. Transformation of human osteoblasts to anchorage-independent growth by insoluble nickel particles. *Env Health Persp* 1994; **102**: 289–292.
- [68] LIN TH, YUROCHKO A, KORNBERG L, MORRIS J, WALKER JJ, HASKILL S, JULIANO RL. The role of protein tyrosine phosphorylation in integrin-mediated gene induction in monocytes. *J Cell Biol* 1994; **126**: 1585–1593.

- [69] LUBYPHELPS K. Effect of cytoarchitecture on the transport and localization of protein synthetic machinery. *J Cell Biochem* 1993; **52**: 140–147.
- [70] MAHER PA, PASQUALE EB, WANG JYJ, SINGER SJ. Phosphotyrosine-containing proteins are concentrated in focal adhesions and intercellular junctions in normal cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 1985; **88**: 8392–8396.
- [71] MAROUDAS NG. Growth of fibroblasts on linear and planar anchorages of limiting dimensions. *Exp Cell Res* 1973; **81**: 104–110.
- [72] MEREDITH JE, FAZELL B, SCHWARTZ MA. The extracellular matrix as a cell survival factor. *Mol Bio Cell* 1993; **4**: 953–961.
- [73] MOCHITATE K, PAWELEK P, GRINNELL F. Stress relaxation of contracted collagen gels: disruption of actin filament bundles, release of cell surface fibronectin and down-regulation of DNA and protein synthesis. *Exp Cell Res* 1991; **193**: 198–207.
- [74] MOONEY DJ, HANSEN LK, VACANTI JP, LANGER R, INGBER DE. Switching from differentiation to growth in hepatocytes: control by extracellular matrix. *J Cell Phys* 1992; **151**: 497–505.
- [75] MORITA T, KURIHARA H, MAEMURA K, YOSHIZUMI M, NAGAIR, YAZAKI Y. Role of Ca^{2+} and protein kinase C in shear stress-induced actin depolymerization and endothelin 1 gene expression. *Circ Res* 1994; **75**: 630–636.
- [76] MURTI KG, KAUR K, GOORHA RM. Protein kinase C associates with intermediate filaments and stress fibers. *Exp Cell Res* 1992; **202**: 36–44.
- [77] NAGASAKI T, LIAO G, GUNDERSEN GG. Isolated plasma membranes induce the loss of oriented detyrosinated microtubules and other contact-like responses in migrating NRK cells. *J Cell Sci* 1994; **107**: 3413–3423.
- [78] NEIDLINGER-WILKE C, WILKE H-J, CLAES L. Cyclic stretching of human osteoblasts affects proliferation and metabolism: a new experimental method and its application. *J Orthopaedic Res* 1994; **12**: 70–78.
- [79] NG-SIKORSKI J, ANDERSSON R, PATARROYO M, ANDERSSON T. Calcium signaling capacity of the CD11b/CD18 integrin on human neutrophils. *Exp Cell Res* 1991; **195**: 504–508.
- [80] NISHIKAWA A, TAIRA T, YOSHIZATO K. In vitro maturation of collagen fibrils modulates spreading, DNA synthesis, and collagenolysis of epidermal cells and fibroblasts. *Exp Cell Res* 1987; **171**: 164–167.
- [81] O'NEILL C, JORDAN P, IRELAND G. Evidence for two distinct mechanisms of anchorage stimulation in freshly explanted and 3T3 Swiss mouse fibroblasts. *Cell* 1986; **44**: 489–496.
- [82] OPAS M. The transmission of forces between cells and their environment. [w] Bereiter-Hahn J, Anderson OR, Reif W-E [red]. *Cytomechanics*. Springer-Verlag. Berlin, Heidelberg 1987: 273–285.
- [83] OTSUKA H, MOSKOWITZ M. Arrest of 3T3 cells in G_1 phase in suspension culture. *J Cell Phys* 1975; **87**: 213–220.
- [84] PIENTA KJ, COFFEY DS. Nucleo-cytoskeletal interactions: evidence for physical connections between the nucleus and cell periphery and their alteration by transformation. *J Cell Biochem* 1992; **49**: 357–365.
- [85] PONTEN J, STOLT L. Proliferation control in cloned normal and malignant human cells. *Exp Cell Res* 1980; **129**: 367–375.
- [86] PUCK TT, KRYSTOSEK A. Role of cytoskeleton in genome regulation and cancer. *Int Rev Cyt* 1992; **132**: 75–108.
- [87] RAZ A, BEN-ZE'EV A. Growth control and cell spreading: differential response in preneoplastic and in metastatic cell variants. *Int J Canc* 1982; **29**: 711–715.
- [88] RIJKSEN G, VOLLEER MCW, VAN ZOELLEN EJJ. The role of protein tyrosine phosphatases in density-dependent growth control of normal rat kidney cells. *FEBS Letters* 1993; **322**: 83–87.
- [89] ROHRSCHEIDER LR. Adhesion plaques of Rous sarcoma virus-transformed cells contain the src gene product. *Proc Natl Acad Sci USA* 1980; **77**: 3514–3518.

- [90] ROMER LH, BURRIDGE K, TURNER CE. Signaling between the extracellular matrix and the cytoskeleton: tyrosine phosphorylation and focal contacts assembly. *Cold Spring Harbor Symp Quant Bio* 1992; **57**: 193–202.
- [91] RUOSLAHTI E, NOBLE NA, KAGAMI S, BORDER WA. Integrins. *Kidney Int* 1994; **45**: S17–S22.
- [92] RUOSLAHTI E, REED JC. Anchorage dependence, integrins, and apoptosis. *Cell* 1994; **77**: 477–488.
- [93] SANGER JW, SANGER JM, JOCKUSCH BM. Differences in the stress fibers between fibroblasts and epithelial cells. *J Cell Biol* 1983; **96**: 961–969.
- [94] SAWADA N, TOMOMURA A, SATTTLER CA, SATTTLER GL, KLEINMAN HK, PITOT HC. Effects of extracellular matrix components on the growth and differentiation of cultured rat hepatocytes. *In Vitro Cell & Dev Biol* 1987; **23**: 267–273.
- [95] SCHALLER MD, BORGMAN CA, COBB BS, VINES RR, REYNOLDS AB, PARSONS JT. pp125^{fak}, a structurally unique protein tyrosine kinase associated with focal adhesions. *Proc Natl Acad Sci USA* 1992; **89**: 5192–5196.
- [96] SCHUPPAN D, RUHL M. Matrix in signal transduction and growth factor modulation. *Brazilian J Med Biol Res* 1994; **27**: 2125–2141.
- [97] SCHWARTZ MA, BOTH G, LECHENE C. Effect of cell spreading on cytoplasmic pH in normal and transformed fibroblasts. *Proc Natl Acad Sci USA* 1989; **86**: 4525–4529.
- [98] SCHWARTZ MA, INGBER DE, LAWRENCE M, SPRINGER TA, LECHENE C. Multiple integrins share the ability to induce elevation of intracellular pH. *Exp Cell Res* 1991; **195**: 533–535.
- [99] SHESTAKOVA EA, MOTUZ LP, GAVRILOVA LP. Co-localization of components of the protein-synthesizing machinery with the cytoskeleton in G₀-arrested cells. *Cell Biol Int* 1993; **17**: 417–424.
- [100] SHESTAKOVA EA, MOTUZ LP, MININ AA, GAVRILOVA LP. Study of localization of the protein-synthesizing machinery along actin filament bundles. *Cell Biol Int* 1993; **17**: 409–416.
- [101] SHIMIZU N, YAMAGUCHI M, GOSEKI T, OZAWA Y, SAITO K, TAKIGUCHI H, IWASAWA T, ABIKO Y. Cyclic-tension force stimulates interleukin-1b production by human periodontal ligament cells. *J Periodont Res* 1994; **29**: 328–333.
- [102] SINGHVI R, KUMAR A, LOPEZ GP, STEPHANOPULOS GN, WANG DIC, WHITESIDES GM, INGBER DE. Engineering cell shape and function. *Science* 1994; **264**: 696–698.
- [103] SUGIMOTO K, FUJII S, YAMASHITA K. Expression of stress fibers in bullfrog mesothelial cells in response to tension. *Exp Cell Res* 1991; **196**: 353–361.
- [104] TERRANOVA VP, AUMAILLEY M, SULTAN LM, MARTIN GR, KLEINMAN HK. Regulation of cell attachment and cell number by fibronectin and laminin. *J Cell Phys* 1986; **127**: 473–479.
- [105] TUCKER RW, BUTTERFIELD CE, BUTTERFIELD J. Interaction of serum and cell spreading affects the growth of neoplastic and non-neoplastic fibroblasts. *J Supramol Struct* 1981; **15**: 29–40.
- [106] TURNER CE. Paxillin: a cytoskeletal target for tyrosine kinases. *BioEssays* 1994; **16**: 47–52.
- [107] VASILIEV JM. Spreading of non-transformed and transformed cells. *Biochim Biophys Acta* 1985; **780**: 21–65.
- [108] VUORI K, RUOSLAHTI E. Activation of protein kinase C precedes a5b1 integrin-mediated cell spreading on fibronectin. *J Biol Chem* 1993; **268**: 21459–21462.
- [109] WALSH TP, CLARKE FM, MASTERS CJ. Modification of the kinetic parameters of aldolase on binding to the actin-containing filaments of skeletal muscle. *Biochem J* 1977; **165**: 165–167.
- [110] WATT FM, JORDAN PW, O'NEILL CH. Cell shape controls terminal differentiation of human epidermal keratinocytes. *Proc Natl Acad Sci USA* 1988; **85**: 5576–5580.

- [111] WEST CM, LANZA R, ROSENBLOOM J, LOWE M, HOLTZER H, AVDALOVIC N. Fibronectin alters the phenotypic properties of cultured chick embryo chondroblasts. *Cell* 1979. **17**: 491–501.
- [112] WILSON E, MAI Q, SUDHIR K, WEISS RH, IVES HE. Mechanical strain induces growth of vascular smooth muscle cells via autocrine action of PDGF. *J Cell Biol* 1993. **123**: 741–747.
- [113] YAMAMOTO K, YAMAMOTO M, NOUMURA T. Disassembly of F-actin filaments in human endothelial cells cultured on type V collagen. *Exp Cell Res* 1992; **201**: 55–63.

Adres autora: 31-120 Kraków, Al. Mickiewicza 3.

BARIERA HYDROFOBOWA BŁON LIPIDOWYCH. WPLYW CHOLESTEROLU I NIENASYCONYCH ŁAŃCUCHÓW ALKILOWYCH LIPIDÓW NA TRANSPORT CZĄSTECZEK POLARNYCH

**HYDROPHOBIC BARRIER OF LIPID BILAYER MEMBRANES.
INFLUENCE OF CHOLESTEROL AND ALKYL CHAIN
UNSATURATION ON TRANSPORT OF POLAR MOLECULES.**

Anna WIŚNIEWSKA, Witold K. SUBCZYŃSKI

Zakład Biofizyki, Instytut Biologii Molekularnej UJ, Kraków

Streszczenie: W pracy przedstawiono najnowsze badania kształtu bariery hydrofobowej w poprzek lipidowej dwuwarstwy błon fosfatydylocholinowych. Badania te przeprowadzone były metodą elektro-nowego rezonansu paramagnetycznego (ERP) z wykorzystaniem lipidowych znaczników spinowych. Polarność wnętrza błony oraz kształt bariery hydrofobowej zależą od nienasyconości łańcuchów alkilowych lipidów, a także od obecności cholesterolu w błonie. Wyniki te dobrze korelują z otrzymanymi dawniej danymi o przepuszczalności błon dla cząsteczek polarnych (wody) oraz z otrzymanymi ostatnio wynikami dotyczącymi głębokości penetracji jonów metali ($\text{Fe}(\text{CN})_6^{3-}$) do wnętrza błony. Przedstawione są także krótko badania hydrofobowości dwuwarstwy lipidowej przeprowadzone wcześniej metodami: dyfrakcji neutronów, pomiaru pojemności i fluorescencji. Przedyskutowana jest ewentualna rola cholesterolu jako czynnika zapewniającego błonom komórkowym wysoką nieprzepuszczalność dla cząsteczek polarnych. Wskazano także na niezbędność uwzględniania lokalnej hydrofobowości wnętrza błony przy rozpatrywaniu reakcji chemicznych i procesów fizycznych w niej zachodzących.

Słowa kluczowe: błony modelowe, transport przez błony, bariera hydrofobowa, cholesterol

Summary: Recent studies on the shape of the hydrophobic barrier across phosphatidylcholine-cholesterol membranes are shown in the present work. ESR (electron spin resonance) spin-labeling method has been used in these experiments. Polarity of the membrane interior and the shape of the hydrophobic barrier depend on alkyl chain unsaturation and the presence of cholesterol in the membrane. These results correlate well with the permeability data for water and other polar molecules and with the recent results of the depth of metal ions ($\text{Fe}(\text{CN})_6^{3-}$) penetration into the membrane. Previous studies on hydrophobicity

of the lipid bilayer using other methods, such as: neutron diffraction, capacitance measurements, and fluorescence are briefly described. The possible role of cholesterol as a main factor which determines the cell membrane unpermeability to polar molecules has been discussed. It has been indicated that local hydrophobicity of the membrane interior must be taken into account while discussing chemical reactions and physical processes taking place in the membrane.

Key words: model membranes, transport across the membranes, hydrophobic barrier, cholesterol

I. WSTĘP

Jedną z podstawowych własności błony biologicznej jest to, że działa ona jako bariera dla polarnych i obdarzonych ładunkiem cząsteczek, takich jak woda i inne polarne rozpuszczalniki, a także jony, zapewniając równocześnie ich selektywny transport. Istnienie bariery wynika z hydrofobowego charakteru wnętrza dwuwarstwy lipidowej, podczas gdy za procesy selektywnego transportu polarnych cząsteczek odpowiedzialne są w głównej mierze wyspecjalizowane integralne białka błonowe [4]. Umożliwiają one przenikanie różnych substancji przez błonę na zasadzie biernej dyfuzji (tworząc kanały), dyfuzji wspomaganą (działając jako przenośniki) lub poprzez transport aktywny, katalizowany enzymatycznie (pompy). Białka transportujące są stosunkowo dobrze poznane [26, 28], natomiast znacznie mniej wiadomo o przepuszczalności samej dwuwarstwy lipidowej oraz o wytworzonej przez nią barierze hydrofobowej. Chociaż przepuszczalność błony modelowej dla danej substancji polarnej, np. wody jest znacznie mniejsza niż przepuszczalność błony komórkowej, zawierającej białka, to jednak substancja ta może przeniknąć przez dwuwarstwę lipidową [7]. Zrozumienie mechanizmu przenikania wody i jonów przez dwuwarstwę lipidową jest bardzo ważne ze względu na ich ogromne znaczenie zarówno dla procesów fizjologicznych zachodzących w komórce, jak i dla reakcji chemicznych zachodzących w samej błonie.

II. POMIARY TRANSPORTU CZĄSTECZEK POLARNYCH PRZEZ DWUWARSTWĘ LIPIDOWĄ

Szybkość przenikania wody przez dwuwarstwę lipidową zależy od struktury lipidów i obecności steroli. Dyfuzja przez dwuwarstwę jest najbardziej ogólnym mechanizmem transportu wody (ze współczynnikiem przepuszczalności błony w granicach $2-50 \times 10^{-4}$ cm/s [14]). Tak szybka dyfuzja zachodzi tylko powyżej temperatury przejścia fazowego lipidów (T_m) i dlatego żywe organizmy regulują skład lipidowy błon komórkowych utrzymując T_m lipidów błonowych ok. 10°C poniżej temperatury środowiska [14]. Badania przepuszczalności dwuwarstwy lipidowej dla

wody przeprowadzane były na różnych błonach modelowych; najczęściej na płaskich błonach lipidowych (PLM – *planar lipid membranes*) lub na liposomach (jedno- lub wielowarstwowych) [5].

Istnieją różne modele tłumaczące przepuszczalność dwuwarstwy lipidowej dla wody; dwa podstawowe to: model defektów przejściowych (*transient defects*) i model rozpuszczalności i dyfuzji (*solubility-diffusion*) [5]. Obydwa znajdują poparcie w licznych eksperymentach i zdają się pełnić ważną rolę w transporcie wody i innych cząsteczek polarnych przez błony. Jeżeli chodzi o pierwszy model, to Deamer i Brahmhall [7] wyliczyli, że energia potrzebna do przeniesienia jonu ze środowiska o wysokiej stałej dielektrycznej (woda) do środowiska o niskiej stałej dielektrycznej (dwuwarstwa lipidowa) jest bardzo duża (wynosi 40 kcal/mol). Defekty przejściowe, po raz pierwszy opisane przez Nagle i Scott'a [23], to małe przestrzenie między łańcuchami węglowodorowymi fosfolipidów pojawiające się na skutek fluktuacji termicznych, które umożliwiają cząsteczkom wody lub małym jonom wejście w obszar dwuwarstwy, a następnie przejście przez nią bez konieczności pokonania tej bariery energetycznej. Poparciem dla tego modelu są badania przeprowadzone m.in. przez Carruthers'a i Melchior'a [3], którzy wykazali, że przepuszczalność dwuwarstwy lipidowej dla wody jest największa w temperaturze przejścia fazowego lipidów, czyli wtedy, gdy w błonie istnieją równocześnie dwie fazy – faza żelu i faza ciekłokrystaliczna. Taki stan błony charakteryzuje się pewną niestabilnością, co zwiększa prawdopodobieństwo powstania defektów. Drugi model, powszechnie zaakceptowany, zakłada, że cząsteczka polarna rozpuszcza się w środowisku hydrofobowym, a następnie przenika przez błonę na zasadzie prostej dyfuzji [7]. Współczynniki przepuszczalności dla małych nieelektrolitów dobrze korelują z ich współczynnikami podziału między olej i wodę (reguła Overton'a [24]). Problem ten porusza także artykuł Subczyńskiego i wsp. [37]. Na podstawie pomiarów rozpuszczalności wody w ciekłych węglowodorach Finkelstein [11] oraz Reeves i Dowben [27] oszacowali współczynnik dyfuzji dla wody, a następnie jej strumień przez dwuwarstwę lipidową. Należy podkreślić, że obydwa przedstawione modele nie wykluczają się wzajemnie, możliwe jest, że większość wody przenika przez błonę na zasadzie prostej dyfuzji, ale również defekty przejściowe, pojawiające się na granicy faz lub na granicy lipid-białko, pozwalają na efektywniejsze przejście wody i rozpuszczalników polarnych przez barierę.

III. WPŁYW SKŁADU LIPIDOWEGO BŁON NA ICH PRZEPUSZCZALNOŚĆ DLA WODY

Przepuszczalność dwuwarstwy lipidowej dla wody i innych rozpuszczalników polarnych oraz dla jonów zależy od rodzaju lipidów wchodzących w skład dwuwar-

stwy, a głównie od obecności wiązań podwójnych w łańcuchach węglowodorowych fosfolipidów oraz od zawartości cholesterolu.

Pomiary przepuszczalności błon modelowych dla wody wykazały, że obecność wiązania podwójnego typu *cis* znacznie (1,2 – 3 razy) zmniejsza stopień penetracji wody przez dwuwarstwę lipidową [7, 21]. Podobny wpływ ma obecność wiązania podwójnego na przepuszczalność błony modelowej, sporządzonej z jednego rodzaju fosfolipidu, dla aminokwasów. Chakrabarti i Deamer [4] wykazali, że współczynniki przepuszczalności dla aminokwasów polarnych (glicyna, lizyna i seryna) są 3 - 4 razy wyższe w przypadku błon modelowych zbudowanych z lipidów o łańcuchach nasyconych (DMPC – dimirystynowa fosfatydylocholina) niż w przypadku błon zbudowanych z lipidów o łańcuchach nienasyconych (EYPC – lecytyna z żółtka jaja). Lipidy o łańcuchach nienasyconych stanowią również znacznie większą barierę dla transportu jonów niż lipidy o łańcuchach nasyconych [7]. Należy podkreślić, że opisane wyniki dotyczą błon modelowych i przeniesienie powyższych wniosków na błony biologiczne wymaga dużej ostrożności i dalszych badań na modelach bardziej przypominających skład błon biologicznych.

Dodanie cholesterolu do błon modelowych zbudowanych z lipidów o łańcuchach nasyconych zmniejsza ich przepuszczalność dla wody 3 – 9 razy [3, 22], a do błon zbudowanych z lipidów o łańcuchach nienasyconych: 1,6 – 3,9 razy [10, 21]. Liczne badania wykazują, że cholesterol nie tylko zmniejsza przepuszczalność błon dla wody, ale równocześnie ogranicza ruchliwość łańcuchów węglowodorowych i zmniejsza ilość wody w domenie węglowodorowej [14]. Cholesterol ogranicza przepuszczalność błon liposomów również dla innych substancji polarnych, w tym askorbinianu [31] i aminokwasów [30].

IV. BARIERA HYDROFOBOWA WYTWORZONA PRZEZ DWUWARSTWĘ LIPIDOWĄ

Podczas gdy stosunkowo dużo było pomiarów przepuszczalności dwuwarstwy lipidowej dla różnych substancji polarnych, znacznie mniej uwagi poświęcono badaniom kształtu bariery hydrofobowej wytworzonej przez tę dwuwarstwę. Kształt tej bariery jest ważnym czynnikiem określającym transport cząsteczek polarnych przez błonę [15], transport lateralny cząsteczek niepolarnych wewnątrz błony [33], a także wpływającym na przebieg pewnych reakcji chemicznych w błonie [18]. Hydrofobowość błony określona jest głównie przez rozkład cząsteczek wody w dwuwarstwie lipidowej, w rejonie głów polarnych i w warstwie łańcuchów węglowodorowych, gdyż odwodnienie likwiduje gradient polarności w błonach liposomów [13].

Badania gradientu polarności w błonach prowadzono za pomocą następujących czterech metod:

1. Technika dyfrakcji neutronów, charakteryzująca się dobrą rozdzielczością (4,5 Å), dostarcza bezpośredniej informacji o głębokości penetracji cząsteczek wody do wnętrza dwuwarstwy lipidowej [1, 41]. Jednak bezwzględna ilość wnikającej wody jest trudna do wyznaczenia z uwagi na to, że nie można z wyników dyfrakcji określić „zerowego poziomu” rozkładu wody. Poza tym technika dyfrakcji neutronów nie pozwala na wyznaczenie małych różnic w zawartości wody w węglowodorowym rejonie błony. Trzeba podkreślić, że całkowita zawartość wody w próbce wynosiła zaledwie 10% wagowych, a pomiary dokonywane były dla błon w fazie żelu.

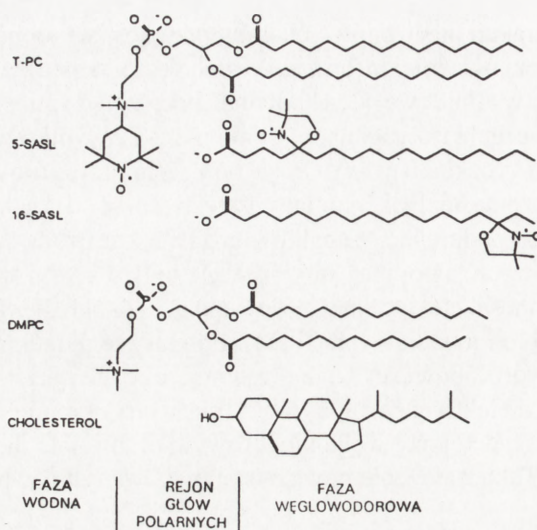
2. Pomiary pojemności elektrycznej stosowano w celu określenia bariery hydrofobowej dla płaskich błon modelowych (PLM). Pomiary te jednak nie charakteryzują dokładnie profilu hydrofobowości gdyż przyjmują one, że bariera jest prostokątna, czyli, że własności dielektryczne błony (stężenie wody) zmieniają się gwałtownie w jednym miejscu i że w rejonie węglowodorowym błony stała dielektryczna już się nie zmienia [9, 32]. Takie założenie może być prawdziwe tylko w pewnych szczególnych przypadkach.

3. Metody fluorescencyjne stosujące sondy fluorescencyjne umieszczone na różnej głębokości w błonie pozwalają śledzić cząsteczki wody przez pomiar skrócenia czasu życia fluorescencji oraz przesunięcia widma fluorescencji pod wpływem zmiany polarności otoczenia sondy [6, 17, 20]. Wadą tej metody jest zbyt duża wielkość cząsteczki fluoroforu, co może ujemnie wpływać na przestrzenną rozdzielczość.

4. Metoda elektronowego rezonansu paramagnetycznego (ERP) wykorzystuje znaczniki spinowe, w których wolnorodnikowy fragment nitroksylowy, odpowiedzialny za sygnał ERP, zlokalizowany jest w różnych pozycjach wzdłuż łańcucha węglowodorowego kwasu stearynowego lub fosfolipidu, czyli na różnych głębokościach w błonie [12, 13, 20, 38]. Metoda ta jest oparta na zależności gęstości niesparowanego elektronu na jądrze azotu od polarności środowiska. Rozpuszczalniki polarne zwiększają gęstość niesparowanego elektronu na jądrze azotu i wpływają przez to na oddziaływanie nadsubtelne między niesparowanym elektronem a spinem jądra azotu. W efekcie zwiększa się zarówno izotropowa stała oddziaływania nadsubtelnego (oznaczana symbolem A_0) jak i składowa z tensora oddziaływania nadsubtelnego (oznaczana przez A_z). W 1974 roku Griffith [13], posługując się tą metodą i używając A_z jako wygodnego parametru eksperymentalnego, mierzono wprost z widm ERP zamrożonej zawiesiny liposomów, po raz pierwszy wyznaczył kształt bariery hydrofobowej w lipidach błon mikrosomów i błon mielinowych.

V. WPŁYW SKŁADU LIPIDOWEGO BŁON NA KSZTAŁT BARIERY HYDROFOBOWEJ

Uznając metodę ERP za możliwie najlepiej nadającą się do pomiaru zmian hydrofobowości błon lipidowych, Subczyński i wsp. [38] podjęli systematyczne badania

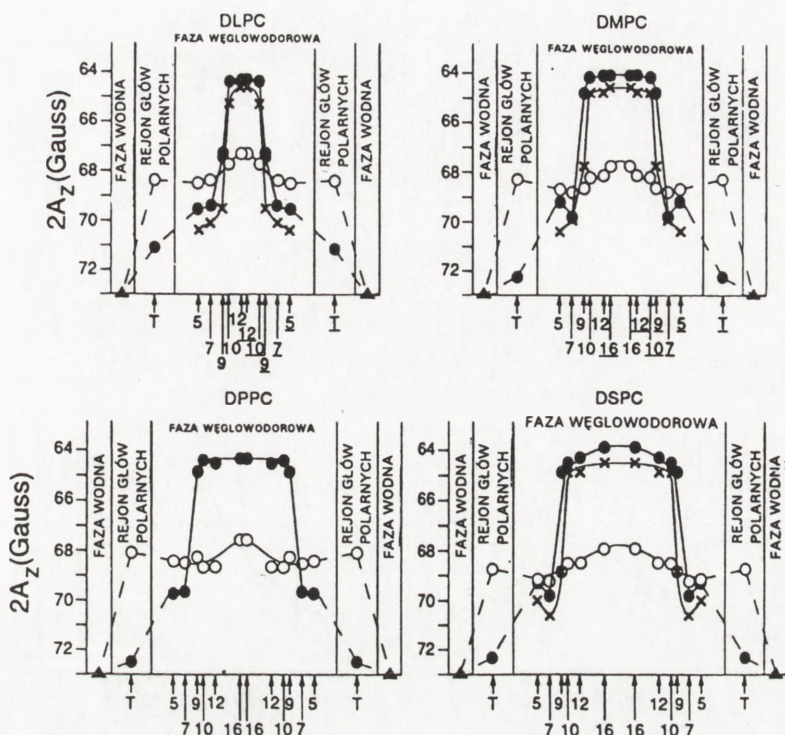


Rysunek 1. Schematyczny przekrój przez błonę z DMPC ze wskazaniem przybliżonej lokalizacji cholesterolu i znaczników spinowych.

hydrofobowości wnętrza różnych błon modelowych i uzyskali profile hydrofobowości dla błon fosfatydylocholinowych o różnej grubości, zbudowanych z lipidów o nasyconych lub nienasyconych łańcuchach alkilowych, w obecności lub bez cholesterolu. W badaniach wybrano spektralny parametr $2A_z$, który silnie zależy od polarności otoczenia znacznika. Wartości $2A_z$ mierzone były z widm ERP znaczników spinowych n-SASL (znaczniki na bazie kwasu stearynowego; n oznacza odpowiednią pozycję nitroksylowego fragmentu w łańcuchu węglowodorowym: 5, 7, 9, 10, 12 lub 16) oraz znacznika T-PC (Tempol-owa pochodna dipalmitynowej fosfatydylocholi-ny), którego fragment wolnorodnikowy lokuje się w rejonie grup polarnych błony. Przybliżona lokalizacja tych znaczników spinowych w błonie z DMPC zawierającej cholesterol przedstawiona jest schematycznie na rys.1.

Jako modele błon o różnej grubości, zbudowanych z lipidów o łańcuchach nasyconych zastosowano błony fosfatydylocholinowe z DLPC (dilaurynowa fosfatydylocholina – 12 atomów węgla w łańcuchu), DMPC (dimirystynowa fosfatydylocholina – 14 atomów węgla), DPPC (dipalmitynowa fosfatydylocholina – 16 atomów węgla) i DSPC (distearynowa fosfatydylocholina – 18 atomów węgla). Rys.2 przedstawia profile hydrofobowości wyznaczone dla tych błon. Profil hydrofobowości jest tu rozumiany jako zależność parametru $2A_z$ od przybliżonej pozycji znacznika spinowego w błonie, wyrażonej poprzez odpowiedni numer atomu węgla w łańcuchu węglowodorowym. Wyższe wartości parametru $2A_z$ świadczą o większej polarności, czyli o wyższym stężeniu wody w otoczeniu znacznika. W tym celu oś Y na rys. 2 i 3 została odwrócona aby wyraźniej odzwierciedlić kształt bariery hydrofobowej.

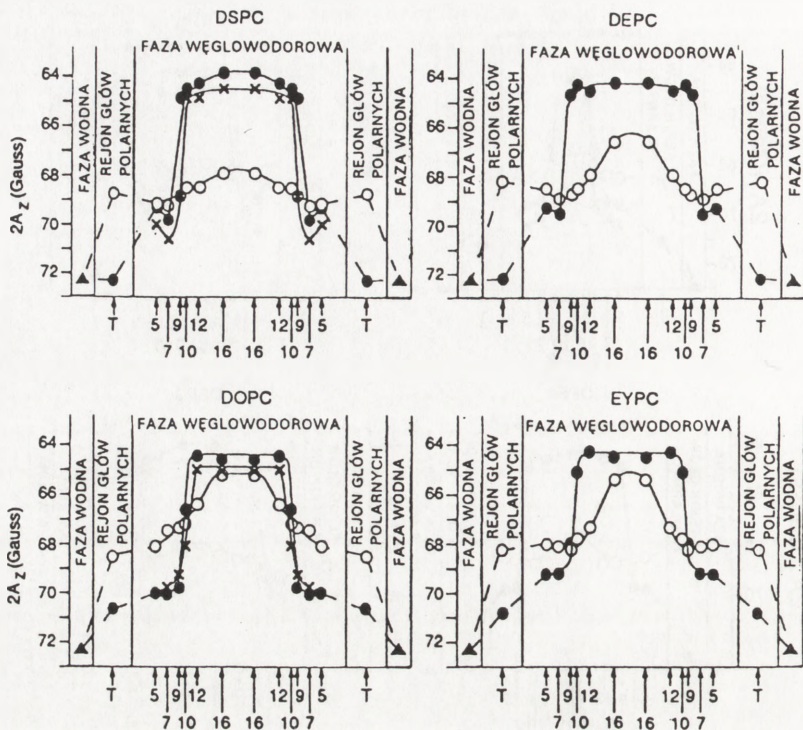
Przedstawione profile hydrofobowości wskazują jednoznacznie, że hydrofobowość zwiększa się stopniowo w kierunku wnętrza błony, osiągając maksimum w jej



Rysunek 2. Profile hydrofobowości (zależność $2A_z$ od położenia znacznika w błonie) dla czterech błon fosfatydylocholinowych zbudowanych z lipidów o łańcuchach nasyconych (DLPC, DMPC, DPPC, DSPC) zawierających 0% mol (o), 30% mol (•) i 50% mol (x) cholesterolu. Spadek wartości $2A_z$ wskazuje na wzrost hydrofobowości. Przybliżone pozycje wolnorodnikowych fragmentów znaczników spinowych zaznaczone są strzałkami. Podkreślenia dla DLPC i DMPC oznaczają, że znaczniki te wbudowane są w prawą połowę dwuwarstwy lipidowej (cząsteczki znaczników są dłuższe niż fosfolipidy, w które zostały wbudowane). T – oznacza znacznik T-PC.

centrum. Jednak błony fosfatydylocholinowe zbudowane z lipidów o nasyconych łańcuchach, niezależnie od grubości, nie charakteryzują się tak dużą hydrofobowością jakiej można było oczekiwać. Nie stanowią zatem znaczącej bariery dla wody. Hydrofobowość wnętrza takich błon można porównać z hydrofobowością propanolu lub oktanolu.

Cholesterol dodany do modelowych błon fosfatydylocholinowych zmienia w zasadniczy sposób ich hydrofobowość. Wpływa on na profile hydrofobowości wszystkich badanych błon, zwiększając polarność rejonu głów polarnych fosfolipidów i obszaru łańcuchów węglowodorowych błony, aż do głębokości siódmego atomu węgla oraz znacznie zwiększając hydrofobowość węglowodorowego wnętrza błony, począwszy od dziewiątego atomu węgla. Hydrofobowość wnętrza błony porównywalna jest wtedy z hydrofobowością heksanu. Potwierdzeniem dla tych wyników są dane uzyskane poprzednio przy użyciu znaczników fluorescencyjnych. Kusumi i wsp.



Rysunek 3. Profile hydrofobowości dla błon zbudowanych z lipidów o łańcuchach nienasyconych (DEPC, DOPC, EYPC) zawierających 0, 30 lub 50% mol cholesterolu, porównane z profilem dla DSPC. Spadek wartości $2A_z$ oznacza wzrost hydrofobowości. Oznaczenia i symbole jak na rys.2.

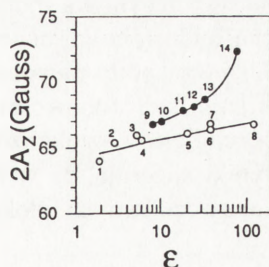
[20] wykazali wzrost dostępności wody do rejonu głów polarnych błony w obecności cholesterolu. Efekt ten jest wywołany najprawdopodobniej rozsunieniem głów polarnych fosfolipidów przez cząsteczki cholesterolu i wprowadzeniem defektów upakowania w rejonie gdzie sztywna część cząsteczki cholesterolu sąsiaduje z łańcuchami alkilowymi fosfolipidów. Powstałe w wyniku tego niedopasowania przestrzennego wolne obszary mogą być zajmowane przez cząsteczki wody [25].

Rys.3 przedstawia profile hydrofobowości wyznaczone dla trzech błon modelowych zbudowanych z lipidów o nienasyconych łańcuchach alkilowych: DOPC (dioleinowa fosfatydylocholina – 18 atomów węgla, z jednym wiązaniem podwójnym typu *cis* w pozycji C9-C10), DEPC (dielaidynowa fosfatydylocholina - 18 atomów węgla, z jednym wiązaniem podwójnym typu *trans* w pozycji C9-C10) i EYPC (lecytyna z żółtka jaja, będąca mieszaniną fosfolipidów z łańcuchami o różnych długościach i różnym stopniu nienasyconości). Dodatkowo rys. 3 przedstawia profile wyznaczone dla błony z DSPC o tej samej liczbie atomów węgla w łańcuchu co DOPC i DEPC. Z profili tych wynika, że obecność wiązania podwójnego w łańcuchu fosfolipidowym błony znacznie zmienia kształt bariery hydrofobowej, zwiększając hydrofobowość we wszystkich rejonach błony, przy czym efekt wiązania typu *cis* jest

silniejszy niż efekt wiązania typu *trans*. Wynika to z faktu, że łańcuch alkilowy posiadający wiązanie podwójne typu *trans* jest bardziej podobny do łańcucha w pełni nasyconego, gdyż nie posiada sztywnego zagięcia tak jak łańcuch alkilowy z wiązaniem podwójnym typu *cis*. Potwierdzeniem tych wyników może być fakt, że węglowodory nasycone znane są jako bardziej higroskopijne niż nienasycone. Również Hiff i Kevan [16] wykazali w swych eksperymentach, przeprowadzonych metodą echa spinowego, że dostępność wody do nitroksylowych fragmentów znaczników SASL zależy od nienasyconości łańcuchów alkilowych lipidów i zmniejsza się w kierunku: DLPC — DPPC \approx DEPC N \gg DOPC.

Gdy do błon zbudowanych z lipidów o nienasyconych łańcuchach dodany jest cholesterol, podobnie jak w przypadku błon z lipidów o łańcuchach nasyconych obserwuje się wzrost hydrofobowości w centrum błony, oraz spadek w rejonie przy powierzchni i aż do głębokości dziewiątego atomu węgla. Wzrost hydrofobowości wewnątrz błony jest tu jednak względnie mniejszy, ponieważ już same błony z lipidów o łańcuchach nienasyconych, nie zawierające cholesterolu, charakteryzują się wyższą hydrofobowością. Wzrost polarności w rejonie 5-7 atomu węgla jest natomiast znaczny, gdyż błona z DOPC jest w tym rejonie pod nieobecność cholesterolu bardziej hydrofobowa niż błona z DSPC. Obserwowany wzrost polarności wydaje się być spowodowany, podobnie jak w przypadku omówionych poprzednio błon z lipidów o łańcuchach nasyconych, defektami upakowania, pojawiającymi się w błonie w momencie wprowadzenia do niej sztywnej, płaskiej, czteropierścieniowej struktury, jaką jest cząsteczka cholesterolu. Utworzona wolna przestrzeń może być penetrowana przez cząsteczki wody. Tendencja formowania takich defektów może być większa w błonach z DOPC z uwagi na niedopasowanie steryczne pomiędzy sztywną częścią cząsteczki cholesterolu i sztywną strukturą wiązania podwójnego typu *cis* w pozycji C9-C10, powodującą zgięcie łańcucha oleinowego o 30° [35, 36].

Przedstawione na rys. 2 i 3 profile hydrofobowości zawierają spektralny parametr $2A_z$, który zmienia się znacznie z polarnością lokalnego otoczenia wolnorodnikowego fragmentu znacznika spinowego. Rys.4 przedstawia zależność wartości spektralnego parametru $2A_z$ od stałej dielektrycznej rozpuszczalnika, w którym rozpuszczony był znacznik spinowy. W ten sposób przez porównanie wartości $2A_z$ hydrofobowość na danej głębokości w błonie może być odniesiona do hydrofobowości rozpuszczalnika organicznego. Z rys.4 widać, że punkty otrzymane dla rozpuszczalników, które



Rys. 4. Wykres zależności parametru $2A_z$ od stałej dielektrycznej rozpuszczalnika w temperaturze pokojowej. Kolejne numery oznaczają następujące rozpuszczalniki:

- 1) heksan, 2) dipropylamina, 3) N-butylamina, 4) octan etylu, 5) formamid dimetylu, 6) acetonitryl, 8) metylo-propionamid, 9) 1-dekanol, 10) 1-oktanol, 11) 2-propanol, 12) etanol, 13) metanol, 14) woda.

mogą tworzyć wiązania wodorowe z grupą N-O znacznika układają się wzdłuż jednej krzywej, natomiast dla rozpuszczalników, które takiego wiązania wytworzyć nie mogą, wzdłuż drugiej. W powyższych rozważaniach hydrofobowość wnętrza błony porównywano z hydrofobowością rozpuszczalników tworzących wiązania wodorowe (górną krzywa na rys. 4), oprócz rejonu o najwyższej lokalnej hydrofobowości. Związane jest to z tym, że właśnie obecność wody w błonie wywiera zasadniczy wpływ na wartość $2A_z$. Rys. 4 stanowi więc dobre odniesienie, które przez porównanie ze znanymi rozpuszczalnikami pozwala lepiej określić zmiany lokalnej hydrofobowości wnętrza błony.

Z uzyskanych profili hydrofobowości wynika, że błony modelowe zbudowane z lipidów o nasyconych łańcuchach nie stanowią znacznej bariery dla transportu wody. Stają się one barierą dopiero wtedy, gdy wprowadzi się do nich wiązanie podwójne lub cholesterol. Cholesterol w sposób znaczący zmienia kształt bariery hydrofobowej błon, zarówno zbudowanych z lipidów o łańcuchach nasyconych, jak i tych posiadających w łańcuchach fosfolipidowych wiązanie podwójne typu *cis* lub *trans*. W obecności cholesterolu bariera hydrofobowości uzyskuje trapezoidalny kształt, z ostrym przejściem w obrębie jednego—dwóch atomów węgla, w rejonie C7 – C12 (w zależności od rodzaju błony). Rejon głów polarnych błony oraz rejon hydrofobowy w pobliżu powierzchni błony stają się w obecności cholesterolu bardziej dostępne dla cząsteczek wody, podczas gdy rejon centralny błony charakteryzuje się zwiększoną hydrofobowością.

Otrzymane profile hydrofobowości będące odzwierciedleniem stopnia penetracji wody w głąb błon modelowych dobrze korelują z przytoczonymi w pierwszej części artykułu danymi o przepuszczalności dwuwarstwy lipidowej dla małych cząsteczek polarnych.

VI. ZNACZENIE CHOLESTEROLU

Oprócz badań nad przepuszczalnością błon dla małych cząsteczek polarnych prowadzono też pomiary współczynnika transportu (iloczynu lokalnego stężenia i lokalnego współczynnika dyfuzji) małych cząsteczek niepolarnych, takich jak tlen, tlenek azotu lub kompleks miedzi (CuKTSM_2) w błonach fosfatydylocholinowych zawierających cholesterol [34, 35, 36, 39]. Zwiększenie współczynnika transportu tych hydrofobowych cząsteczek koreluje ze zwiększoną hydrofobowością błony, czyli zmniejszoną penetracją wody. Profile współczynnika transportu niepolarnych cząsteczek praktycznie całkowicie pokrywają się z profilami hydrofobowości [38]. Bariera dla transportu tlenu w poprzek błony zawierającej cholesterol zlokalizowana jest w rejonie głów polarnych [34, 36]. Otrzymane wyniki sugerują, że w błonie istnieją dwie różne bariery: jedna hydrofobowa dla cząsteczek polarnych, zlokalizo-

wana wewnątrz błony, i druga dla cząsteczek niepolarnych, będąca barierą sztywności, zlokalizowana blisko powierzchni błony.

W plazmolemie, błonie otaczającej komórki zwierzęce, stężenie cholesterolu jest wysokie (do 50% mol), podczas gdy w większości błon wewnątrzkomórkowych jest ono znacznie niższe [40]. Rola cholesterolu w błonie plazmatycznej nie jest do końca wyjaśniona. Sugerowano, że mieszanina nasyconych i nienasyconych łańcuchów węglowodorowych z cholesterolem stanowić może bufor płynności dla białkowych składników błony [19, 20]. Te własności buforowe mogą być jednak zapewnione już przez samą mieszaninę fosfolipidów. Otrzymane przez Subczyńskiego i wsp. [38] profile hydrofobowości, oraz profile współczynników transportu cząsteczek niepolarnych [34, 36] pozwalają przypuszczać, że cholesterol pełni inną swoistą funkcję w błonie plazmatycznej. Błona ta stanowi barierę oddzielającą komórkę od środowiska zewnętrznego i w związku z tym musi blokować nieswoisty transport małych cząsteczek polarnych i niepolarnych w obu kierunkach. Cholesterol zdaje się być związkiem dobrze spełniającym taką funkcję, modyfikującym własności lipidowej dwuwarstwy w odpowiednim kierunku. Zwiększa on zarówno zlokalizowaną w środku barierę hydrofobowości dla cząsteczek polarnych, jak i zlokalizowaną w obszarze przypowierzchniowym błony barierę sztywności dla cząsteczek niepolarnych. Zapewnia to małej liczbie białkowych kanałów i pomp prawidłową regulację stężenia związków niskocząsteczkowych wewnątrz komórki.

VII. PODSUMOWANIE

Przedstawione w artykule badania wpływu składu lipidowego błon na kształt bariery hydrofobowej są ważne nie tylko ze względu na zrozumienie mechanizmów regulacji transportu cząsteczek polarnych i niepolarnych przez błony i wewnątrz błon, ale także z uwagi na zachodzące w błonie reakcje chemiczne. Wiele z nich może zależeć od polarności lokalnego otoczenia reagujących grup [18] lub od obecności jonów metali, które są zaangażowane w procesie peroksydacji lipidów [8]. Jak pokazano [38], cholesterol modyfikuje penetrację jonów $\text{Fe}(\text{CN})_6^{3-}$ do wnętrza błony zwiększając ją znacznie do głębokości ósmego atomu węgla w łańcuchu węglowodorowym. Hydrofobowość wpływa także na rozpuszczalność w błonie małych niepolarnych cząsteczek takich jak tlen czy tlenek azotu [34, 36, 39], które zaangażowane są bezpośrednio w procesie peroksydacji lipidów [2, 29]. Wydaje się więc, że lokalna hydrofobowość wnętrza dwuwarstwy lipidowej powinna być brana pod uwagę przy badaniu reakcji chemicznych zachodzących wewnątrz błony.

LITERATURA

- [1] BLECHNER SL, SKITA V, RHODES DG. Structure of polymerizable lipid bilayers: water profile of a diacetylenic lipid bilayer using elastic neutron scattering. *Biochim Biophys Acta* 1990; **1022**: 291–295.
- [2] CADENAS E. Mechanism of oxygen activation and reactive oxygen species detoxification. [w] Ahmad S. [red] *Oxidative Stress and Antioxidant Defences in Biology*. New York: Chapman and Hall 1995: 1–61.
- [3] CARRUTHERS A, MELCHIOR DL. Studies of the relationship between bilayer water permeability and bilayer physical state. *Biochemistry* 1983; **22**: 5797–5807.
- [4] CHAKRABARTI AC, DEAMER DW. Permeability of lipid bilayers to amino acids and phosphate. *Biochim Biophys Acta* 1992; **1111**: 171–177.
- [5] CHAKRABARTI AC. Permeability of membranes to amino acids and modified amino acids: Mechanisms involved in translocation. *Amino Acids* 1994; **6**: 213–229.
- [6] CHAPLIN DB, KLEINFELD AM. Interaction of fluorescence quenchers with the n-(9-anthroxyloxy)fatty acid membrane probes. *Biochim Biophys Acta* 1983; **731**: 465–474.
- [7] DEAMER DW, BRAMHALL J. Permeability of lipid bilayers to water and ionic solutes. *Chem Phys Lipids* 1986; **40**: 167–188.
- [8] ERNSTER L. Lipid peroxidation in biological membranes: mechanisms and implications. [w] Yagi K. [red.] *Active Oxygens, Lipid Peroxidations, and Antioxidants*. Japan Scientific Societies Press, Tokyo CRC Press, Boca Raton 1993: 1–38.
- [9] FETTIPLACE R, HAYDON DA, ANDREWS DM. The thickness, composition and structure of some lipid bilayers and natural membranes. *J Membr Biol* 1971; **5**: 277–296.
- [10] FINKELSTEIN A. Water and nonelectrolyte permeability of lipid bilayer membranes. *J Gen Phys* 1976; **68**: 127–135.
- [11] FINKELSTEIN A. Water movement through lipid bilayers, pores, and plasma membranes. New York, Wiley 1987.
- [12] GE M, FREED JH. An electron spin resonance study of interaction between gramicidin A' and phosphatidylcholine bilayers. *Biophys J* 1993; **65**: 2106–2123.
- [13] GRIFFITH OH, DEHLINGER PJ, VAN SP. Shape of the hydrophobic barrier of phospholipid bilayers (Evidence for water penetration in biological membranes) *J Membr Biol* 1974; **15**: 159–192.
- [14] HAINES TH. Water transport across biological membranes. *FEBS Letters* 1994; **346**: 115–122.
- [15] HALL JM, MEAD CA, SZABO G. A barrier model for current flow in lipid bilayer membranes. *J Membr Biol* 1973; **11**: 75–97.
- [16] HIFF T, KEVAN L. Electron spin echo modulation studies of doxyl-stearic acid spin probes in frozen vesicles: interaction of the spin probe with D₂O and effects of cholesterol addition. *J Phys Chem* 1989; **93**: 1572–1575.
- [17] HO C, STUBBS CD. Hydration at the membrane protein-lipid interface. *Biophys J* 1992; **63**: 897–902.
- [18] KORYTOWSKI W, BACHOWSKI GJ, GIROTTI AW. Photoperoxidation of cholesterol in homogeneous solution, isolated membranes, and cells: comparison of the 5- and 6-hydroperoxides as indicators of singlet oxygen intermediacy. *Photochem Photobiol* 1992; **56**: 1–8.
- [19] KUSUMI A, TSUDA M, AKINO T, OHNISHI S, TERAYAMA Y. Protein-phospholipid-cholesterol interaction in the photolysis of invertebrate rhodopsin. *Biochemistry* 1983; **22**: 1165–1170.
- [20] KUSUMI A, SUBCZYŃSKI WK, PASENKIEWICZ-GIERULA M, HYDE JS, MERKLE H. Spin-label studies on phosphatidylcholine-cholesterol membranes: effects of alkyl chain length and unsaturation in the fluid phase. *Biochim Biophys Acta* 1986; **854**: 307–317.

- [21] LAZRAC T, MILON A, WOLFF G, ALBRECHT AM, MIEHE M, OURISSON G, NAKATANI Y. Comparison of the effects of inserted C-40 and C-50 terminally dihydroxylated carotenoids on the mechanical properties of various phospholipid vesicles. *Biochim Biophys Acta* 1987; **1903**: 132–141.
- [22] MILON A, LAZRAC T, ALBRECHT AM, WOLFF G, WEILL G, OURISSON G, NAKATANI Y. Osmotic swelling of unilamellar vesicles by the stopped-flow light scattering method. *Biochim Biophys Acta* 1986; **859**: 1–9.
- [23] NAGLE JF, SCOTT HL Jr. Lateral compressibility of lipid mono- and bilayers theory of membrane permeability. *Biochim Biophys Acta* 1978; **513**: 236–243.
- [24] OVERTON E. Ueber die allgemeinen osmotischen Eigenschaften der Zelle, ihre vermutlichen Ursachen und ihre Bedeutung für die Physiologie. *Vierteljahrsschr Naturforsch Ges Zuerich* 1899; **44**: 88–135.
- [25] PASENKIEWICZ-GIERULA M, SUBCZYNSKI WK, KUSUMI A. Influence of phospholipid unsaturation on the cholesterol distribution in membranes. *Biochimie* 1991; **73**: 1311–1316.
- [26] PETTY HR. Molecular Biology of Membranes. Structure and Function. New York and London, Plenum Press 1993.
- [27] REEVES JB, DOWBEN J. Water permeability of phospholipid vesicles. *J Membr Biol* 1970; **3**: 123–141.
- [28] RIBERA AB, SPIZERA NC. Developmental regulation of potassium channels and the impact on neuronal differentiation. [w] Narahashi T. [red] Ion Channels. 3., New York and London, Plenum Press 1992: 1–38.
- [29] RUBBO H, RADIR, TRUJILLO M, TELLERIR, KALYANARAMAN B, BARNES S, KIRK M, FREEMAN BA. Nitric oxide regulation of superoxide and peroxide-dependent lipid peroxidation. Formation of novel nitrogen-containing oxidized lipid derivatives. *J Biol Chem* 1994; **269**: 26066–26075.
- [30] SADA E, KATOH S, TERASHIMA M, KAWAHARA H, KATOH M. Effects of surface charges and cholesterol content on amino acids permeabilities of small unilamellar vesicles. *J Pharm Sci* 1990; **97**: 232–235.
- [31] SCHREIER-MUCILLO S, MARSH D, SMITH ICP. Monitoring the permeability profile of lipid membranes with spin probes. *Arch Biochem Biophys* 1976; **172**: 1–11.
- [32] SIMON SA, McINTOSH TJ, LATORRE R. Influence of cholesterol on water penetration into bilayers. *Science* 1982; **216**: 65–67.
- [33] SKULACHEV VP. Power transmission along biological membranes. *J Membr Biol* 1990; **114**: 97–112.
- [34] SUBCZYNSKI WK, HYDE JS, KUSUMI A. Oxygen permeability of phosphatidylcholine-cholesterol membranes. *Proc Natl Acad Sci USA* 1989; **86**: 4474–4478.
- [35] SUBCZYNSKI WK, ANTHOLINE WE, HYDE JS, KUSUMI A. Microimmiscibility and three-dimensional dynamic structures of phosphatidylcholine-cholesterol membranes: translational diffusion of a copper complex in the membrane. *Biochemistry* 1990; **29**: 7936–7945.
- [36] SUBCZYNSKI WK, HYDE JS, KUSUMI A. Effects of alkyl chain unsaturation and cholesterol intercalation on oxygen transport in membranes: a pulsed ESR spin labeling study. *Biochemistry* 1991; **30**: 8578–8590.
- [37] SUBCZYNSKI WK, HOPWOOD LE, HYDE JS. Is the mammalian cell plasma membrane a barrier to oxygen transport? *J Gen Physiol* 1992; **100**: 1–19.
- [38] SUBCZYNSKI WK, WISNIEWSKA A, YIN J-J, HYDE JS, KUSUMI A. Hydrophobic barriers of lipid bilayer membranes formed by reduction of water penetration by alkyl chain unsaturation and cholesterol. *Biochemistry* 1994; **33**: 7670–7681.
- [39] SUBCZYNSKI WK, LOMNICKA M, HYDE JS. Permeability of nitric oxide through lipid bilayer membranes. *Free Radical Research* (w druku).
- [40] TROTTER PJ, VOELKER DR. Lipid transport processes in eucaryotic cells. *Biochim Biophys Acta* 1994; **1213**: 241–262.

[41] ZACCAI G, BLASIE JK, SCHOENBORN BP. Neutron diffraction studies on the location of water in lecithin bilayer model membranes. *Proc Natl Acad Sci USA* 1975; **72**: 376–380.

Adres autora: 31-120 Kraków, Al. Mickiewicza 3.

ZASTOSOWANIE METODY PODWÓJNEGO REZONANSU ELEKTRONOWO-JĄDROWEGO (ENDOR) DO BADANIA STRUKTURY METALOENZYMÓW

APPLICATION OF ELECTRON NUCLEAR DOUBLE RESONANCE
(ENDOR) TECHNIQUE TO STUDIES OF METALLOENZYMES

Ryszard J. GURBIEL

Instytut Biologii Molekularnej UJ, Kraków

Streszczenie: Metoda podwójnego rezonansu elektronowo-jądrowego (ENDOR)¹ polega na detekcji przejść pomiędzy poziomami jądrowymi poprzez rejestrację zmian natężenia sygnału EPR. Umożliwia ona rejestrację oddziaływań nadsztywnych, a w sprzyjających warunkach, również oddziaływań kwadrupolowych, zbyt słabych aby mogły być rejestrowane w klasycznym doświadczeniu EPR. Wysoka czułość i zdolność rozdzielcza widm ENDOR, oraz możliwość prowadzenia badań próbek polikrystalicznych sprawiły, że metoda ta okazała się szczególnie przydatna w badaniach struktury metaloenzymów. W niniejszej pracy przedstawione zostały ogólne informacje dotyczące metody oraz zasady analizy widm ENDOR

Słowa kluczowe: ENDOR, metaloenzymy

Summary: Electron-Nuclear Double Resonance (ENDOR) technique can be described as a method of detection nuclear transitions by monitoring the EPR signal intensity. It allows to record hyperfine and — in some cases — quadrupolar couplings too weak to be detected in EPR experiment. ENDOR combines spectral resolution of NMR with sensitivity of EPR. The method allows to study polycrystalline samples what makes it very useful in studying the structure of metalloproteins. The review presents the principles of ENDOR spectroscopy and its applications to metalloenzymes.

Keywords: ENDOR, metalloenzymes

1 Stosowane skróty: ENDOR (Electron Nuclear Double Resonance) — podwójny rezonans elektronowo-jądrowy, NMR (Nuclear Magnetic Resonance) - magnetyczny rezonans jądrowy, EPR (Electron Paramagnetic Resonance) — elektronowy rezonans paramagnetyczny, PDO — dioksygenaza ftalanowa wyizolowana z *Pseudomonas cepacia*, BCl — mitochondrialne białko Rieske (cytochrom bc1) wyizolowane z *Rhodobacter capsulatus*.

WSTĘP

W metodzie podwójnego rezonansu elekronowo-jądrowego (ENDOR) badana próbka poddawana jest równoczesnemu działaniu dwóch pól elektromagnetycznych: mikrofal, które powodują zmiany orientacji spinu elektronowego, oraz zmiennych w czasie fal radiowych, które indukują zmiany orientacji spinów jądrowych. Informacje o częstotliwościach przejść jądrowych zachodzących w obrębie centrum paramagnetycznego uzyskiwane są poprzez rejestrację zmian w natężeniu sygnału EPR. Metoda ta wykorzystywana jest do wyznaczenia tensora oddziaływania nadsubtelnego i/lub kwadrupolowego badanego centrum paramagnetycznego. Podstawową zaletą metody podwójnego rezonansu jest wysoka zdolność rozdzielcza. ENDOR umożliwia wyznaczenie stałych oddziaływania nadsubtelnego znacznie mniejszych niż rejestrowane w klasycznym eksperymencie EPR. Drugą zaletą tej metody jest jej selektywność. Sygnał ENDOR pochodzi tylko od jąder oddziałujących z danym centrum paramagnetycznym. Dlatego możliwe jest na przykład badanie sygnału ^{57}Fe pojedynczego jądra wybranego z grupy wielu jąder tworzących kompleks metalobiałkowy. Trzecią ważną zaletą jest fakt, że metoda ENDOR jest niespecyficzna i stosunkowo łatwo można zarejestrować widmo ENDOR każdego jądra o niezerowym spinie. Jeśli więc jesteśmy w stanie dokonać znakowania izotopowego badanego białka, to teoretycznie i praktycznie jesteśmy w stanie scharakteryzować każdy atom oddziaływający z centrum paramagnetycznym. W szczególności badane były sygnały ENDOR pochodzące od jąder $^1,^2\text{H}$, ^{13}C , $^{14,^{15}}\text{N}$, ^{17}O , ^{33}S , ^{57}Fe , $^{63,^{65}}\text{Cu}$, $^{95,^{97}}\text{Mo}$ wchodzących w skład badanego kompleksu metalobiałkowego, związanego ligandu, czy też substratu.

Większość doświadczeń z metalobiałkami jest prowadzona na próbkach polikrystalicznych, co zazwyczaj utrudnia dokładną analizę widma. W przypadku próbek, których widmo EPR charakteryzowane jest przez anizotropowy tensor g możliwe jest wyselekcjonowanie sygnałów ENDOR pochodzących od cząsteczek o ściśle określonej orientacji. Oznacza to, że w takim przypadku możliwe jest wyznaczenie kompletnego tensora oddziaływania nadsubtelnego w próbce polikrystalicznej.

Wprawdzie metoda ENDOR była znana już kilkadziesiąt lat, ale dopiero od kilkunastu lat jest stosowana z powodzeniem do badania struktury i funkcji metaloenzymów. Potwierdza to rosnąca wciąż liczba publikacji, w tym również artykułów przeglądowych poświęconych tej technice [13, 15, 19], jak również gwałtowny rozwój technik impulsowych opartych na metodzie podwójnego rezonansu [23].

Celem niniejszego opracowania jest przedstawienie podstawowych informacji na temat metody oraz zaprezentowanie na przykładzie badań białek Rieske, w jaki sposób zastosowanie nowoczesnych metod rejestracji i analizy widm ENDOR przyniosły nowe jakościowo wyniki w badaniach struktury metaloenzymów.

CO TO JEST ENDOR

W doświadczeniu ENDOR badana próbka umieszczona jest w zewnętrznym polu magnetycznym B_0 i poddana działaniu dwóch pól elektromagnetycznych: mikrofal i fal radiowych (UKF). Częstotliwość mikrofal i natężenie pola magnetycznego są ustalone w taki sposób, aby doprowadzić układ do stanu rezonansu (klasyczne doświadczenie EPR). Częstotliwość fal radiowych zmieniana jest w szerokim zakresie pokrywającym częstotliwości przejść jądrowych badanego układu. W doświadczeniu ENDOR częstotliwości poszczególnych przejść jądrowych rejestrowane są jako zmiany natężenia sygnału EPR. Istnieją trzy mechanizmy prowadzące do powstawania sygnału ENDOR i w literaturze rozróżnia się również trzy typy sygnałów ENDOR: lokalny, matrycowy i odległy. W przypadku zastosowania metody ENDOR do badania metaloenzymów ignorujemy sygnały odległego i matrycowego ENDORu i analizujemy tylko lokalny ENDOR, tzn. takie linie dla których wielkość rozszczepienia jest większa od szerokości widmowej poszczególnych składowych [1, 8]. Jądra które dają przyczynek do mierzalnego sygnału lokalnego ENDORu mogą być częścią składową samego centrum aktywnego metaloenzymu (np. ^{57}Fe , czy ^{57}S klastru żelazowo-siarkowego), lub elementem endogennych ligandów (np. atomy azotu pierścienia imidazolowego histydyny). Jądra te mogą być również związane z egzogennymi ligandami lub związanym substratem.

CZĘSTOTLIWOŚCI REZONANSOWE

Rozważmy najprostszy układ $S = 1/2$, $I = 1/2$. Jeżeli taki układ umieścimy w polu magnetycznym, to jego poziomy energetyczne zostaną rozszczepione na cztery podpoziomy. Energia przejść pomiędzy poziomami jądrowych jest taka sama dla $m_S = 1/2$ i dla $m_S = -1/2$. Oddziaływanie momentów magnetycznych elektronu i jądra powoduje dodatkowe przesunięcie tych poziomów. Oznacza to, że energie przejść pomiędzy poziomami jądrowymi dla $m_S = 1/2$ są różne od energii przejść dla $m_S = -1/2$. Energie tych przejść rejestrowane są w doświadczeniu ENDOR. Możemy zatem powiedzieć, że w wyniku oddziaływania elektronu z jądrem otrzymujemy rozszczepienie linii ENDOR. Efekt oddziaływania nadsubtelnego można przyrównać do oddziaływania spinu jądrowego z dodatkowym polem magnetycznym, które może być skierowane równoległe, lub antyrównoległe w stosunku do zewnętrznego pola magnetycznego. To dodatkowe pole magnetyczne będzie się dodawało lub odejmowało od zewnętrznego pola magnetycznego, zwiększając lub zmniejszając energie przejść jądrowych. Jeśli oznaczymy natężenie zewnętrznego pola magnetycznego przez B_0 , a natężenie pola magnetycznego związanego z oddziaływaniem nadsubtel-

nym przez B_{HF} , to dla jądra o spinie $I = 1/2$ częstotliwości przejść ENDOR opisane są wzorem

$$h\nu_{\pm} = g_N \beta_N B_{\pm} = g_N \beta_N |B_0 \pm B_{HF}| = h \left| \nu_L \pm \frac{A_{HF}}{2} \right| \quad (1)$$

Występująca we wzorze (1) wielkość ν_L nosi nazwę częstotliwości Larmora i jest charakterystyczna dla danego typu jądra. Wielkość ta zmienia się liniowo wraz z natężeniem zewnętrznego pola magnetycznego. Stała A_{HF} charakteryzuje dane oddziaływanie i nie zależy od wartości przyłożonego pola magnetycznego. W przypadku jąder wodoru i fluoru częstotliwość Larmora jest znacznie większa od obserwowanych oddziaływań nadsubtelnych, $2\nu_H > A$. Sygnał ENDOR wodoru będzie więc dubлетem, którego środek symetrii odpowiada częstotliwości larmorowskiej protonu, a różnica częstotliwości obu przejść („odległość pomiędzy liniami”) jest równa stałej oddziaływania A . W przypadku pozostałych jąder występujących w układach biologicznych stała oddziaływania jest znacznie większa od częstotliwości larmorowskiej jądra i rejestrowany dublet składa się z dwóch linii o środku symetrii odpowiadającej wartości $1/2 A$ i oddalonych od siebie o 2ν .

Jądro o spinie $I \geq 1$ posiada oprócz momentu magnetycznego również moment kwadrupolowy, który oddziałuje z gradientem pola elektrycznego generowanego przez otoczenie [1, 2]. Jeżeli oddziaływanie kwadrupolowe jest dostatecznie silne, to spowoduje to dodatkowe rozszczepienie linii ν_{\pm} na $2I$ linii składowych, o częstotliwościach opisanych w pierwszym przybliżeniu wzorem:

$$\nu_{\pm}(m) = \left| \frac{A}{2} \pm \nu + \frac{3P}{2}(2m - 1) \right| \quad I \geq m \geq 1 - I \quad (2)$$

We wzorze tym P oznacza stałą sprzężenia kwadrupolowego. Sprzężenie kwadrupolowe dostarcza istotnych informacji dotyczących wiązań w obszarze centrum aktywnego [3, 22]. Rozszczepienie to jest zbyt małe, aby mogło być rejestrowane w tradycyjnym doświadczeniu EPR nawet w przypadkach, gdy rejestrowane jest widmo z rozdzieloną strukturą nadsubtelną.

METODY REJESTRACJI WIDM ENDOR

W doświadczeniach przeprowadzanych metodą fali ciągłej stosowane są dwa sposoby detekcji sygnału ENDOR. Najczęściej odpowiedź ENDOR stanowi zmiana natężenia sygnału absorpcji EPR rejestrowanego w niemodulowanym polu magnetycznym powodowana przemiataniem częstotliwości radiowej. Odpowiedź układu rejestrowana jest w postaci pierwszej pochodnej absorpcji, $dI/d\nu_{rf}$. Taki system de-

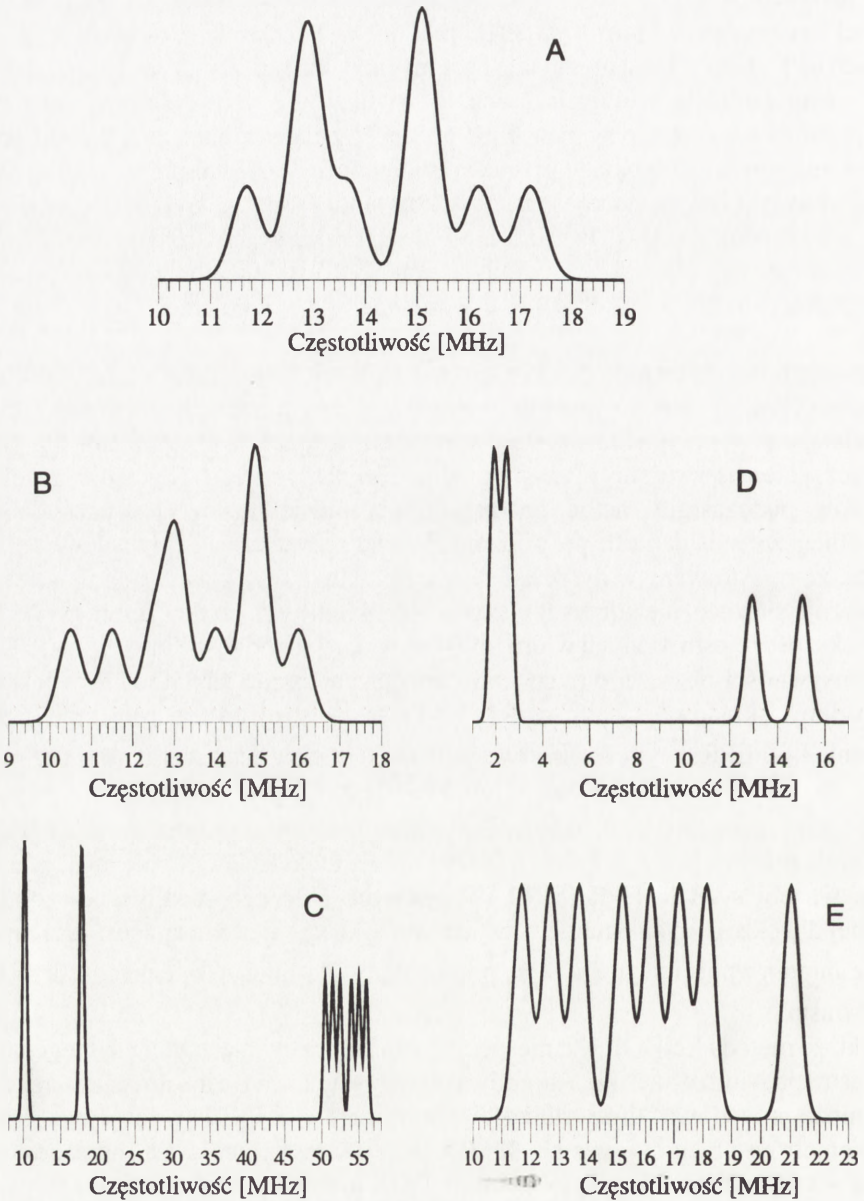
tekcji wykorzystywany jest na przykład w spektrometrach produkowanych przez firmę Bruker, Inc.

W niskotemperaturowych ($T \leq 4,2$ K) badaniach metalobiałek bardzo często wygodniej jest zastosować inny tryb detekcji, który wykorzystuje stosowaną w spektrometrach EPR standardową modulację pola magnetycznego. Związane to jest z faktem, że w temperaturach helowych znacznie wydłuża się czas relaksacji elektronu. W przypadku nasyconego sygnału EPR obecność pola modulującego powoduje występowanie zjawiska szybkiego przejścia adiabaticznego. W takim przypadku zanika sygnał absorpcji i można zarejestrować tylko sygnał dyspersji. Sygnał ten, zarejestrowany przy modulacji 100 kHz, ma kształt identyczny z sygnałem *absorpcji EPR* jaki otrzymuje się przy detekcji bez modulacji pola. Wszystkie widma ENDOR prezentowane poniżej zostały zarejestrowane w warunkach szybkiego przejścia adiabaticznego.

Opisane powyżej metody detekcji sygnału EPR nie były dotychczas porównywane ilościowo. Wydaje się, że metoda opierająca się na modulacji częstotliwości jest wygodniejsza w przypadku pomiarów w temperaturach wyższych niż 4K (kiedy zazwyczaj nie obserwujemy zjawiska przejścia adiabaticznego) i do badania wolnych rodników, podczas gdy metoda modulacji pola magnetycznego jest zdecydowanie korzystniejsza w badaniach prowadzonych w temperaturach helowych. Wynika to z faktu, że rejestrowany w dyspersji sygnał szybkiego przejścia jest silniejszy i charakteryzuje się znacznie korzystniejszym stosunkiem sygnału do szumu.

Większość rejestrowanych widm ENDOR wykazuje mniejsze lub większe różnice w intensywności poszczególnych linii tworzących pasmo ENDOR. W większości przypadków składowe v_+ i v_- widma ENDOR rejestrowane są jako zmniejszenie natężenia linii EPR, z tym że obserwowany efekt jest bardziej wyraźny w przypadku linii v_+ , tzn. linie v_- mają większą amplitudę. Efekt różnic w intensywności sygnałów v_+ i v_- jest szczególnie widoczny w przypadku pomiarów prowadzonych w paśmie Q. Istnieją również prace, w których obserwowany efekt ENDOR polegał na wzroście intensywności sygnału EPR [5, 8]. W pewnych układach możliwa jest sytuacja, w której dla określonych parametrów pomiaru linia v_+ rejestrowana jest jako zmniejszenie intensywności sygnału EPR, podczas gdy dla linii v_- intensywność sygnału EPR wrasta.

Fakt, że metoda ENDOR jest niespecyficzna i umożliwia w trakcie jednego pomiaru rejestrację widm wszystkich atomów oddziaływających z centrum paramagnetycznym może powodować duże trudności w ich interpretacji. Zdecydowana większość spektrometrów pracuje w paśmie X (9,5 GHz). Częstotliwość Larmora protonów, przy $g \approx 2$ wynosi ok. 14 MHz i widmo ENDOR protonów bardzo często pokrywa się z liniami pochodzącymi od innych jąder (^{14}N , ^{17}O , ^{57}Fe). Przypadek taki przedstawiony jest na rys. 1A, który przedstawia teoretyczne (symulowane) widmo ENDOR układu zawierającego jądro ^{14}N o stałej sprzężenia $A^N = 28$ MHz i trzy protony



Rys. 1: Teoretyczne (symulowane) widmo ENDOR azotu o stałej sprzężenia $A^N = 28$ MHz i trzech protonów o stałych sprzężenia A^H 6 MHz. (A) pasmo X (9,5 GHz); (B) pasmo X, ale częstotliwość 8,7 GHz; (C) pasmo Q (35 GHz); (D) pasmo X, symulowane widma ^2H zamiast ^1H ; (E) pasmo X, symulowane widma ^{15}N zamiast ^{14}N .

o stałych sprzężenia $A^H < 6$ MHz. Widmo to zostało wyliczone dla częstotliwości 9,5 GHz. Jest to przypadek drastyczny, w którym $A^N \approx 2v^H$ i środki symetrii dubletów pochodzących od wodoru i azotu nakrywają się. Nawet w sytuacji, kiedy natężenia poszczególnych linii są takie same, interpretacja widma jest praktycznie niemożliwa.

Istnieją dwa sposoby pokonania tego problemu. Jeden z nich wykorzystuje fakt, że tylko częstotliwość larmorowska danego jądra zmienia się wraz z natężeniem pola magnetycznego. Zarejestrowanie widma przy dwóch różnych częstotliwościach mikrofal, tzn. przy dwóch natężeniach pola magnetycznego, może w pewnych przypadkach doprowadzić do rozdzielenia widm wodoru i azotu (por. [12]). Przykład takiego częściowego rozdzielenia linii przedstawiony jest na rys. 1B, na którym przedstawiono widmo tego samego układu, ale obliczone dla częstotliwości 8,7 GHz. Najczęściej jednak zakres częstotliwości pracy klustronu jest zbyt mały, aby nastąpiło całkowite rozdzielenie widm. Jedynym rozwiązaniem byłoby wtedy przeprowadzenie pomiarów w spektrometrze pracującym w innym paśmie mikrofal. Dla pasma Q i $g \approx 2$ częstotliwość larmorowska protonów wynosi ponad 50 MHz i widmo ENDOR protonów jest całkowicie oddzielone od widm pozostałych atomów. Przykład całkowitego rozdzielenia widm wodoru i azotu przedstawiony zostało na rys. 1C, gdzie wysymulowano widmo tego samego układu dla częstotliwości mikrofal 35 GHz.

Drugi sposób rozdzielenia widm związanych z różnymi pierwiastkami polega na znakowaniu izotopowym próbki. Zamiana danego izotopu pierwiastka na inny (na przykład $^1\text{H} \rightarrow ^2\text{H}$, lub $^{14}\text{N} \rightarrow ^{15}\text{N}$ powoduje zmiany zarówno częstotliwości larmorowskiej, jak i stałej oddziaływania nadształnego zgodnie ze wzorami:

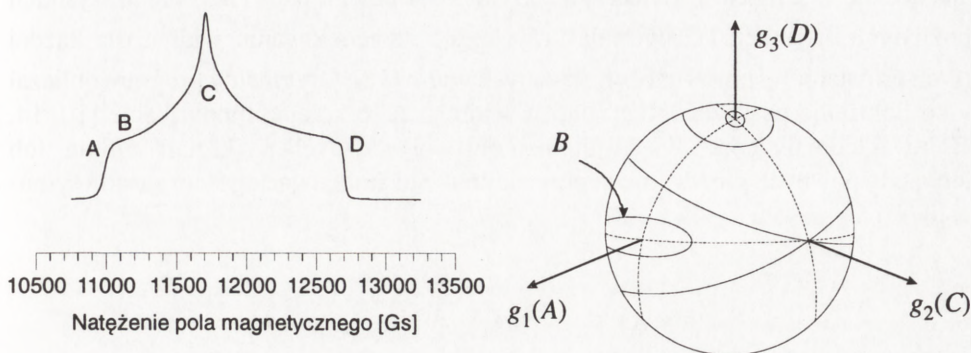
$$\frac{\nu_L(^1\text{H})}{\nu_L(^2\text{H})} = \frac{A(^1\text{H})}{A(^2\text{H})} = 6,51$$

$$\frac{\nu_L(^{15}\text{N})}{\nu_L(^{14}\text{N})} = \frac{A(^{15}\text{N})}{A(^{14}\text{N})} = -1,40$$
(3)

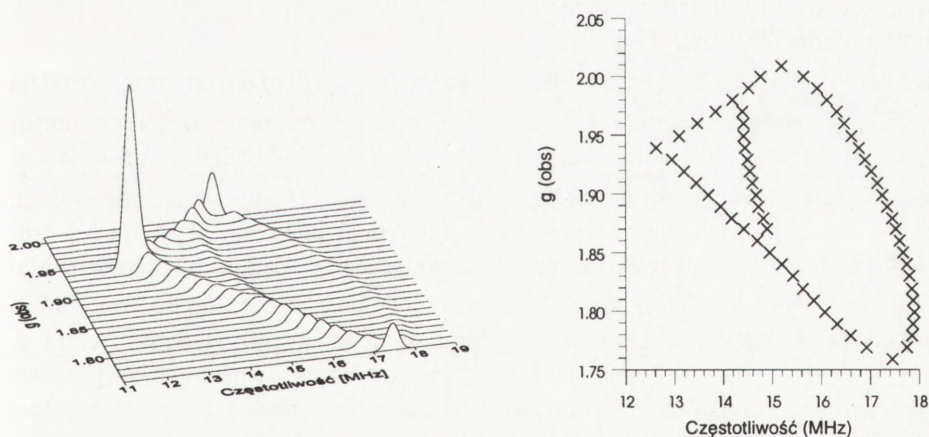
W przypadku atomów wodoru zastąpienie wszystkich atomów izotopem ^2H powoduje rozseparowanie widma protonów od widma azotu (rys. 1D), natomiast zastąpienie wszystkich atomów azotu izotopem ^{15}N ułatwia interpretację widma, ale niekoniecznie powoduje rozdzielenie tych sygnałów (rys. 1E). Znakowanie badanych metaloenzymów izotopem ^{15}N przynosi jeszcze dodatkową korzyść w postaci wyeliminowania efektów oddziaływania kwadrupolowego, które mogą występować w przypadku jąder ^{14}N ($I = 1$). Wszystkie widma przedstawione na rys. 1 generowane były dla $g = g_{\text{max}}$, więc przedstawiały praktycznie widmo pojedynczego kryształu. W większości przypadków widma ENDOR są jeszcze bardziej skomplikowane z uwagi na konieczność badania próbek polikrystalicznych.

SYMULACJA WIDM ENDOR PRÓBEK POLIKRYSTALICZNYCH

Przez wiele lat problemem nie do pokonania przy analizie widm ENDOR metaloenzymów był fakt, że rejestrowany sygnał pochodzi od próbki polikrystalicznej i w związku z tym zawiera składowe pochodzące od cząstek o dowolnym orientacji względem zewnętrznego pola magnetycznego. Analiza takiego widma umożliwia podanie przybliżonej wartości stałej oddziaływania nadsubtelnego, ale nie mówi nic o wzajemnym położeniu tensorów \mathbf{g} i \mathbf{A} . Pierwsze próby uzyskania z takiego widma dokładnych informacji o tensorze \mathbf{A} przeprowadzili Rist i Hyde [21]. Zauważyli oni, że widmo ENDOR zarejestrowane dla ekstremalnych wartości współczynnika g pochodzi od cząsteczek o ściśle określonej orientacji względem zewnętrznego pola magnetycznego, tzn. takiej orientacji dla której kierunek pola pokrywa się z kierunkiem składowych g_1 lub g_3 . W każdym z tych przypadków można założyć, że otrzymane widmo jest takie samo jak widmo pojedynczego kryształu. Otrzymujemy więc dwie dokładne wartości współczynnika A dla dwóch ściśle określonych orientacji. W roku 1984 Hoffman i wsp. zaproponowali model [16], który umożliwił po raz pierwszy symulację widm ENDOR metaloenzymów. Idea, która nosi w literaturze wyboru orientacji (ang. *orientation selection*) przedstawiona została schematycznie na rys. 2. Zamiast tradycyjnego układu odniesienia związanego z kierunkiem zewnętrznego pola magnetycznego i określaniem położenia cząsteczki względem tego pola przechodzimy do układu odniesienia związanego z badaną cząsteczką i zdefiniowanego przez tensor \mathbf{g} . Zbiór wszystkich możliwych kierunków zewnętrznego pola magnetycznego względem cząsteczki tworzy kulę narysowaną po prawej stronie. Pozycja A w widmie EPR odpowiada kierunkowi pola magnetycznego równoległego do g_1 , a pozycja D — kierunkowi pola równoległemu do g_3 . W obu tych przypadkach wzajemne położenie cząsteczki i zewnętrznego pola magnetycznego jest zdefiniowane w sposób jednoznaczny i zarejestrowane w tych punktach widmo ENDOR możemy traktować jak widmo pojedynczego kryształu. Dla wszystkich innych wartości B_{obs} zarejestrowane widmo ENDOR nie jest związane tylko z jedną orientacją pola magnetycznego, ale ze wszystkimi orientacjami dla których spełniony jest warunek $g(\theta, \varphi) = g_{\text{obs}}$. Oznacza to, że każde zarejestrowane widmo ENDOR związane jest ze ściśle określonym zbiorem kierunków pola magnetycznego. Zbiór tych punktów tworzy na powierzchni kuli krzywe zamknięte. Jeżeli wartość g_{obs} jest bliska wartości g_1 lub g_3 , to możliwych jest tylko kilka orientacji pola magnetycznego i odpowiadająca im krzywa obejmuje niewielką powierzchnię (krzywa B). Im bardziej zadana wartość g_{obs} różni się od wartości ekstremalnych, tym większa liczba kierunków (cząsteczek) daje przyczynek do widma ENDOR. W sytuacji przedstawionej na rysunku, dla $g_{\text{obs}} = g_2$ możliwe są wszystkie kierunki wyznaczone przez dwie prze-



Rys. 2 : (A) Widmo EPR hydratazy nitrylowej jako przykład układu opisanego przez rombowy tensor g . Na rysunku zaznaczono wartości pola magnetycznego związane z wartościami głównymi tensora. (B) Zaznaczone na powierzchni kuli krzywe o stałej wartości współczynnika g . W przypadku punktów A (g_1) i D (g_3) krzywe zredukowane są do jednego punktu. Warunek $g = g_2$ spełniony jest zarówno w punkcie C, jak i na obydwu krzywych przecinających się w tym punkcie.



Rys. 3: (A) Przykładowy zestaw widm ENDOR. Widma zostały symulowane przy założeniu rombowego tensora g i rombowego tensora A obróconego względem g o 30° . Na rysunku przedstawiono tylko część widm oznaczanych zwyczajowo ν_+ . (B) Wykres $\nu_+ = f(g)$, przygotowany dla widm przedstawionych na rysunku 3A.

cinające się w punkcie $g_2(C)$ krzywe. Symulacja polega na wyliczeniu wszystkich możliwych orientacji leżących na krzywej s_g , wygenerowaniu widma dla każdej z tych orientacji i zsumowaniu otrzymanych widm [16]. Oryginalny program obliczał tylko położenie poszczególnych linii w widmie. Jego kolejne modyfikacje [10, 14, 17] uwzględniały coraz więcej elementów wpływających na kształt widma, lub dotyczyły pewnych szczególnych przypadków, nie zmieniając ogólnej zasady symulacji.

ANALIZA WIDM ENDOR

W procesie analizy widm zakładamy, że znana jest w przybliżeniu struktura kompleksu, tzn. wiadomo jakie pojedyncze jądro oddziałuje z centrum paramagnetycznym a naszym zadaniem jest wyznaczenie wartości głównych tensora A i jego orientacji względem tensora g . Proces rozpoczyna się od rejestracji widm ENDOR dla szeregu wartości pola magnetycznego B ze szczególnym uwzględnieniem widm rejestrowanych dla pól odpowiadających ekstremalnym wartościom współczynnika g . Zarejestrowane widma przedstawia się najczęściej w postaci wykresu przedstawiającym częstotliwość linii rezonansowych w funkcji współczynnika g : $\nu = f(g)$, lub (w przypadku widm 1H) $\frac{1}{2}A_{\pm} = f(g)$.

Przykładowy zestaw widm ENDOR oraz wykres $\nu_+ = f(g)$ przedstawiony został na rys. 3. Są to widma układu o spinie $I = \frac{1}{2}$, opisanego przez rombony tensor $g_{1,2,3} = (2,01, 1,94, 1,76)$ i rombony tensor $A_{1,2,3} = (18, 14, 24 \text{ MHz})$. Tensor A jest obrócony o kąt 30 względem tensora g . Po lewej stronie zestawione zostały widma, jakie mogłyby być otrzymane w wymyślnym doświadczeniu, a po prawej stronie wykres $\nu_+ = f(g)$. W przypadku, gdy zgromadzono dostateczną liczbę widm ENDOR, analiza wykresu umożliwia wyznaczenie wszystkich trzech wartości głównych tensora A , oraz oszacowanie orientacji tego tensora względem tensora g . Wartości te mogą być następnie wykorzystane jako dane wejściowe w procesie symulacji, w którym parametry widm ENDOR dopasowywane są tak, aby wszystkie linie w widmach teoretycznych (symulowanych) odpowiadały poszczególnym składowym widm doświadczalnych. Proces symulacji widm ENDOR umożliwia również wyznaczenie parametrów tensora oddziaływania kwadrupolowego. Możliwe to jest tylko w przypadku bardzo wąskich linii składowych. Proces analizy jest przy tym znacznie mniej skomplikowany, jeżeli możliwe jest wykonanie pomiarów dla dwóch izotopów atomu, z których jeden posiada spin $I = \frac{1}{2}$.

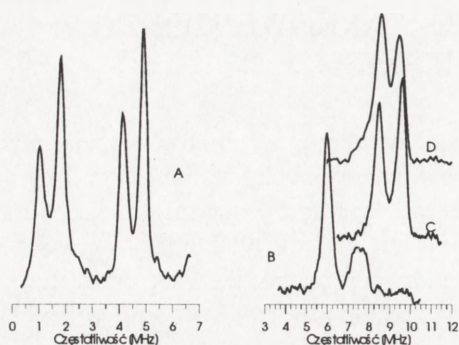
Zastosowanie opisanej powyżej metody symulacji widm ENDOR, wykorzystanie specyficznie znakowanych metaloenzymów oraz zastosowanie w pomiarach różnych częstotliwości mikrofal przedstawione zostanie na przykładzie analizy struktury kompleksów żelazowo-siarkowych występujących w tzw. białkach Rieske.

KOMPLEKSY ŻELAZOWO-SIARKOWE [2FE-2S] TYPU RIESKE

Żelazowo-siarkowe kompleksy Rieskego występują w białkach związanych z transdukcją energii oraz w grupie enzymów bakteryjnych katalizujących oksydacyjną degradację aromatycznych związków węgla. Między innymi umiejscowione jest w błonie mitochondrialnej (cytochrom bc_1) lub w błonie tylakoidów w chloroplastach (cytochrom b_6f). Białko zostało po raz pierwszy zidentyfikowane przez Rieskego [20], który stwierdził, że tak widma optyczne jak i widmo EPR tego kompleksu różni się w istotny sposób od widm ferrodoksyn, które też zawierają kompleksy [2Fe-2S]. W 1984 grupie Fee udało się wyizolować z *Thermus thermophilus* stabilne białko Rieske [7]. Jednocześnie w kilku ośrodkach wykazano, że bakteryjne dioksygenazy zawierają kompleksy żelazowo-siarkowe, których własności spektroskopowe są identyczne z własnościami białek Rieske. W tej grupie metaloenzymów kompleks [2Fe-2S] pośredniczy w procesie transportu elektronu pomiędzy innym kompleksem żelazowo-siarkowym, a mononuklearnym jodem Fe^{2+} znajdującym się w centrum aktywnym enzymu.

Pierwszy model struktury kompleksu żelazowo-siarkowego [7] sugerował, że dwa jony żelaza kompleksu posiadają jako ligandy cztery atomy siarki (2 mostki siarkowe i 2 siarki cystein) oraz dwa atomy inne niż siarka. W postaci zredukowanej te dwa ostatnie ligandy są koordynowane przez atom żelazawy. Analiza wartości współczynników g w białkach Rieske również wskazywała na obecność ligandów bardziej elektroujemnych niż siarka. Widma ENDOR i ESE białek Rieske izolowanych z *Thermus thermophilus* oraz kompleksów [2Fe-2S] oksydazy ftalanowej izolowanych z *Pseudomonas cepacia* [4, 24], wykazały, że przynajmniej jednym z tych ligandów jest atom azotu.

W celu dokładnego wyznaczenia struktury przeprowadzono serie badań na specyficznym wyznakowanych dioksygenazach wyizolowanych z *P. cepacia* (PDO) [9], a następnie powtórzono część z tych badań na mitochondrialnym białku Rieske wyizolowanym z *Rhodobacter capsulatus* (BC1) [11]. W pierwszym rzędzie analizowano widma ENDOR enzymu wyznakowanego globalnie izotopem ^{15}N o spinie $I = 1/2$, który teoretycznie daje mniej skomplikowane widmo. Zarejestrowane przy $g_{obs} = g_2$ widmo ENDOR składa się z dwóch par linii oddalonych od siebie o $\Delta\nu = 2\nu_L(^{15}N)$ (rys. 4), co świadczy o tym, że zarejestrowane linie związane są z atomem (lub atomami) azotu. Intensywność sygnału ENDOR jest wprawdzie w tych warunkach największa, ale widmo azotu może ulec dodatkowemu rozszczepieniu wywołanemu anizotropią współczynnika A . W celu rozstrzygnięcia czy sygnał pochodzi od jednego lub dwóch atomów azotu wykonano pomiary przy ekstremalnych wartościach g_{obs} , dla których widmo ENDOR próbek proszkowych jest porównywalne z widmem pojedynczego kryształu. W widmie zarejestrowanym przy $g_{obs} = g_1$



Rys. 4: (A) Widmo ^{15}N azotu kompleksu $[2\text{Fe-2S}]$ PDO zarejestrowane w paśmie X przy $g_{\text{obs}} = g_2$; (B)–(D) widma znakowanych kompleksów PDO zarejestrowanych w paśmie Q przy $g_{\text{obs}} = g_{\text{max}}$: (B) próbka kontrolna, zawierająca tylko ^{14}N ; (C) próbka zawierająca tylko ^{15}N , (D) próbka zawierająca ^{15}N tylko w pozycji δ pierścienia imidazolowego histydyny.

Porównanie tych widm wykazało, że widma próbek (a) i (b) są identyczne, co dowodzi że zarejestrowane sygnały ENDOR pochodzą od dwóch magnetycznie różnych atomów azotu histydyny [9]. Analiza wartości stałej sprzężenia nadsubtelnego wskazuje wyraźnie, że nie mogą to być dwa atomy azotu znajdujące się w jednym pierścieniu imidazolowym, a zatem analizowany kompleks żelazowo-siarkowy posiada dwie histydyny jako swoje ligandy. Teza ta znalazła swoje potwierdzenie doświadczalne, gdy zarejestrowano widma ENDOR kompleksu, w którym tylko atomy azotu w pozycji δ pierścienia imidazolowego zastąpiono izotopem ^{15}N . Widmo to jest jakościowo identyczne z widmem kompleksu znakowanego całkowicie izotopem ^{15}N (rys. 4).

Wykorzystanie do badań spektrometru pracującego w paśmie 35 GHz pozwoliło na całkowite rozdzielenie widm azotu i wodoru i wyznaczenie kompletnych tensorów oddziaływania nadsubtelnego azotu, a na tej podstawie na zaproponowanie bardziej szczegółowej struktury kompleksu. W tym celu należało zarejestrować widma ENDOR kompleksu dla szeregu wartości g_{obs} a następnie zastosować opisaną powyżej procedurę analizy widm ENDOR. Procedura była trzystopniowa. W pierwszej kolejności analizowano widma ^{15}N PDO i wyznaczono tensory oddziaływania nadsubtelnego. W drugim etapie prac wyliczono na podstawie równania (3) jakie powinny być wartości tensora **A** dla izotopu ^{14}N przy założeniu, że nie obserwujemy oddziaływania kwadrupolowego, i porównanie wysymulowanych widm z widmami doświadczalnymi. Analiza różnic pozwoliła na wyznaczenie wartości głównych tensora oddziaływania kwadrupolowego, jak również bardziej precyzyjne wyznaczenie kątów Eulera definiujących położenie tensora **A** względem tensora **g**. W kolejnym etapie prac przeprowadzono identyczne pomiary z znakowanym izotopem ^{15}N

również obserwujemy dwie linie, co dowodzi że zarejestrowane widmo pochodzi od dwóch magnetycznie różnych atomów azotu. Najbardziej logicznym wydawało się stwierdzenie, że atomy azotu pochodzą z pierścieni imidazolowych histydyny. W tym celu przeprowadzono serie doświadczeń na specyficznym wyznakowanych białkach w których:

- wszystkie atomy azotu zastąpiono izotopem ^{15}N ,
- tylko atomy azotu w pierścieniu imidazolowym zastąpiono izotopem ^{15}N ,
- izotopem ^{15}N zastąpiono atomy nie wbudowane w pierścień imidazolowy.

kompleksu BC1 i wyznaczono wartości tensora A dla tego enzymu. Porównanie tensorów wyznaczonych dla PDO i BC1 miało na celu stwierdzenie, czy istnieją istotne różnice w strukturze kompleksu żelazowo-siarkowego w obu tych klasach metaloenzymów. Wyniki tych prac zostały podsumowane w Tabeli 1.

Tabela 1. Tensory oddziaływania nadsubtelnego atomów ¹⁵N histydyny w kompleksach [2Fe2S] białek Rieske

	PDO ^a		PDO ^b		BC1 ^c	
	N1	N2	N1	N2	N1	N2
Wartości główne	4,6	6,4	5,4	6,3	5,2	6,0
	5,4	7,0	5,5	6,7	5,8	6,5
	8,1	9,8	8,4	10,2	8,5	9,6
Kąty Eulera						
α	0	0	0	0	0	0
β	35	50	38	45	35	45
γ	0	0	d	d	d	d

Wartości główne tensorów P, wyliczone dla izotopu ¹⁴N w PDO wynoszą: [0,85, 0,45, -1,3] MHz i [0,80, 0,35, -1,15] MHz

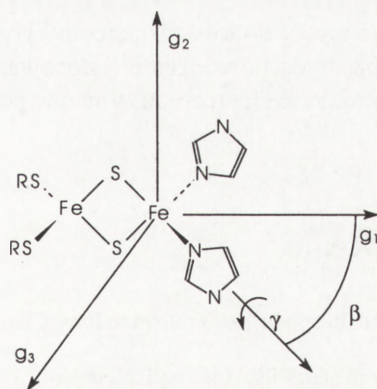
^a Gurbiel i wsp. 1989

^b wartości uzyskane przy zastosowaniu poprawionej procedury symulacji (dane nieopubl.)

^c Gurbiel i wsp. 1991

^d Ustalenie wartości g nie jest możliwe na podstawie analizy tylko widm ¹⁵N-ENDOR

Okazało się, że zarówno wartości główne tensorów oddziaływania nadsubtelnego, jak i kąty Eulera są w przypadku obu ligandów azotowych bardzo podobne. Na tej podstawie zaproponowano model centrum aktywnego odnoszący się zarówno do białek Rieske jak i do tzw. białek podobnych (ang. *Rieske-like proteins*). Hipotetyczna



Rys. 5: Proponowany model geometryczny kompleksu żelazowo-siarkowego w białkach Rieske.

struktura kompleksu przedstawiona została na rys. 5. Cztery ligandy białkowe (dwie histydyny i dwie cysteiny) oraz obydwa jony żelaza leżą w płaszczyźnie g_1 - g_3 , przy czym jeden z kierunków głównych tensora, g_1 lub g_3 , pokrywa się z wektorem Fe-Fe. Analiza widm ⁵⁷Fe (dane nieopublikowane) wskazuje, że oś wiązania Fe-Fe pokrywa się z kierunkiem składowej g_1 . Obydwa atomy azotu są koordynowane przez jon żelazawy, a kąt pomiędzy wiązaniami N-Fe-N wynosi ok. 90°. Obydwa pierścienie imidazolowe leżą w zasadzie w płaszczyźnie NFeN (kąt

skręcenia $\gamma \approx 0$). Porównanie wartości szerokości linii widmowych użytych w procesie symulacji sugerowało, że jeden z pierścieni imidazolowych (oznaczony w symulacjach jako nr 2) charakteryzuje się zdecydowanie większą ruchliwością.

UWAGI KOŃCOWE

Metoda ENDOR należy do jednych z bardziej wyrafinowanych metod badania struktury metalobiałek. Dotyczy to zarówno precyzji otrzymywanych wyników, jak i wymagań dotyczących aparatury. Zdecydowana większość badanych kompleksów charakteryzuje się tak krótkimi czasami relaksacji, że niezbędne jest przeprowadzanie pomiarów w temperaturach helowych. W celu rozseparowania sygnałów wodorów od sygnałów pochodzących od innych atomów konieczne jest zastosowanie albo innego pasma mikrofal (tzn. drugiego spektrometru), lub stosowanie metod impulsowych [6]. Analiza oddziaływań innych atomów z centrum paramagnetycznym badanego kompleksu może wymagać znakowania izotopowego. Dotyczy to z oczywistych przyczyn atomów tlenu, siarki, czy żelaza, ale w pewnych przypadkach również wodoru i azotu. W wielu przypadkach wymagane jest na przykład znakowanie tylko wybranych atomów (grup) w cząsteczce, co może być bardzo kosztowne. Jeżeli jednak uda nam się pokonać te trudności, to metoda ENDOR okazuje się nieocenioną w badaniach struktury, a w wybranych przypadkach również funkcji metaloenzymów. Umożliwia ona otrzymanie sygnału nawet niewielkiej ilości materiału. Jednym z godnych uwagi wyników jest rejestracja sygnału próbki o objętości ok. 20 μl , zawierającej jony miedzi o stężeniu ok. 20 μM [12]. Drugim bardzo ważnym czynnikiem umożliwiającym precyzyjną analizę stałych oddziaływania nadsubtelnego i kwadrupolowego jest wysoka zdolność rozdzielcza metody, która w tradycyjnym doświadczeniu ENDOR (fali ciągłej) jest z reguły rzędu kilkuset kHz, a w przypadku doświadczeniach impulsowych może dochodzić nawet do kilkudziesięciu kHz [18]. Bardzo ważnym jest również fakt, że metoda może być z powodzeniem stosowana do badania struktury metaloenzymów, których nie udało się jeszcze otrzymać w postaci pojedynczych kryształów.

LITERATURA

- [1] ABRAGAM A, BLEANEY B. *Electron Paramagnetic Resonance of Transition Ions*. Clarendon Press, Oxford 1977.
- [2] ATHERTON NM. *Principles of Electron Spin Resonance*. Ellis Horwood, New York 1993.
- [3] BROWN TG, HOFFMAN BM. ^{14}N , ^1H , and metal ENDOR of single crystal Ag(II)(TPP) and Cu(II)(TPP) . *Mol Phys* 1980; **39**: 1073–1109.

- [4] CLINE JF, HOFFMAN BM, MIMS WB, LAHAIE E, BALLOU DP, FEE JA. Evidence for N Coordination to Fe in the [2Fe-2S] Clusters of *Thermus* Rieske Protein and Phthalate Dioxygenase from *Pseudomonas*. *J Biol Chem* 1985; **260**(6): 3251–3254.
- [5] DE BEER R, VAN ORMONDT D, VAN AST MA, BANEN R, DUINE JA, FRANK J (1979). ESR and ENDOR at 9 and 35 GHz on a powder of the enzyme methanol dehydrogenase from *Hyphomicrobium* X. *J Chem Phys* 1979; **70**(10): 4491–4495.
- [6] DOAN PE, FAN C, DAVOUST CE, HOFFMAN BM. A Simple Method for Hyperfine Selective Heteronuclear Pulsed ENDOR via Proton Suppression. *J Magn Reson* 1991; **95**: 196–200.
- [7] FEE JA, FINDLING KL, YOSHIDA T, HILLE R, TARR GE, HEARSHEN DO, DUNHAM WR, DAY EP, KENT TA, MUNCK E. Purification and Characterization of the Rieske Iron-Sulfur Protein from *Thermus thermophilus*. Evidence for a [2Fe-2S] cluster having non-cysteine ligands. *J Biol Chem* 1984; **259**(1): 124–133.
- [8] FEHER, G. Electron Spin Resonance Experiments on Donors in Silicon. I. Electronic Structure of Donors by the Electron Nuclear Double Resonance Technique. *Phys Rev* 1959; **114**(5): 1219–1244.
- [9] GURBIEL RJ, BATIE CJ, SIVARAJA M, TRUE AE, FEE JA, HOFFMAN BM, BALLOU DP. Electron-Nuclear Double Resonance Spectroscopy of ^{15}N -Enriched Phthalate Dioxygenase from *Pseudomonas cepacia* Proves That Two Histidines Are coordinated to the [2Fe-2S] Rieske-Type Clusters. *Biochemistry* 1989; **28**(11): 4861–4871.
- [10] GURBIEL RJ, FANN Y-C, SURERUS KK, WERST MM, MUSSER SM, DOAN PE, CHAN SI, FEE JA, HOFFMAN BM. Detection of Two Histidyl Ligands to Cu_A of Cytochrome Oxidase by 35 GHz Endor: $^{14,15}\text{N}$ and $^{63,65}\text{Cu}$ ENDOR Studies of the Cu_A Site in Bovine Heart Cytochrome aa_3 and Cytochromes caa_3 and baa_3 from *Thermus thermophilus*. *J Am Chem Soc* 1993; **115**(23): 10888–10894.
- [11] GURBIEL RJ, OHNISHI T, ROBERTSON DE, DALDAL F, HOFFMAN BM. Q-Band ENDOR Spectra of the Rieske Protein from *Rhodobactor capsulatus* Ubiquinol-Cytochrome c Oxidoreductase Show Two Histidines Coordinated to the [2Fe-2S] Cluster. *Biochemistry* 1991; **30**(49): 11579–11584
- [12] GURBIEL RJ, PEOPLES R, DOAN PE, CLINE JF, McCracken J, PEISACH J, HOFFMAN BM, VALENTINE JS. ENDOR and ESEEM Investigation of $\text{Ag}_2\text{Cu}^{II}_2$ Bovine Superoxide Dismutase. *Inorg Chem* 1993; **32**(9): 1813–1819.
- [13] HOFFMAN BM, DEROSE VJ, DOAN PE, GURBIEL RJ, HOUSEMAN ALP, TELSER J. Metalloenzyme Active-Site Structure and Function through Multifrequency CW and Pulsed ENDOR. [w] Berliner LJ, and Reuben J [red.] Biological Magnetic Resonance, vol. 13: EMR of Paramagnetic Molecules, Plenum Press, New York and London 1993: 151–218.
- [14] HOFFMAN BM, GURBIEL RJ. Polycrystalline ENDOR Patterns from Centers with Axial EPR Spectra. General Formulas and Simple Analytic Expressions for Deriving Geometric Information from Dipolar Couplings. *J Magn Reson* 1989; **82**: 309–317.
- [15] HOFFMAN BM, GURBIEL RJ, WERST MM, SIVARAJA M. Electron Nuclear Double Resonance (ENDOR) of Metalloenzymes. [w] Hoff AJ [red.] Advanced EPR. Applications in Biology and Biochemistry. Elsevier, Amsterdam 1989: 541–591
- [16] HOFFMAN BM, MARTINSEN J, VENTERS RA. General Theory of Polycrystalline ENDOR Patterns. g and Hyperfine Tensors of Arbitrary Symmetry and Relative Orientation. *J Magn Reson* 1984; **59**: 110–123.
- [17] HOFFMAN BM, VENTERS RA, MARTINSEN J. General Theory of Polycrystalline ENDOR Patterns: Effects of Finite EPR and ENDOR Component Linewidths. *J Magn Reson* 1985; **62**: 537–542.
- [18] JIN H, TURNER IM, NELSON MJ, GURBIEL RJ, DOAN PE, HOFFMAN BM. The Coordination Sphere of the Ferric Ion in Nitrile Hydratase. *J Am Chem Soc* 1993; **115**: 5290–5291.

- [19] LOWE DJ. ENDOR and EPR of Metalloproteins. *Prog Biophys Molec Biol* 1992; **57**: 1–22.
- [20] RIESKE JS, MACLENNAN DH, COLEMAN R. Isolation and Properties of an Iron-Protein from the (Reduced Coenzyme Q) - Cytochrome C Reductase Complex of the Respiratory Chain. *Biochem Biophys Res Commun.* 1964; **15**: 338–344.
- [21] RIST GH, HYDE JS, VANNGARD T. Electron-Nuclear Double Resonance of a Protein That Contains Copper: Evidence for Nitrogen Coordination to Cu(II) in Stellacyanin. *Proc Natl Acad Sci USA* 1970; **67**: 79–86.
- [22] SCHOLES CP, LAPIDOT A, MASCARENHAS R, INUBUSHI T, ISAACSON RA, FEHER G. Electron Nuclear Double Resonance (ENDOR) from Heme and Histidine Nitrogens in Single Crystals of Aquometmyoglobin. *J Am Chem Soc* 1982; **104**: 2724–2735.
- [23] SCHWEIGER A. Pulsed Electron Spin Resonance Spectroscopy: Basic Principles, Techniques, and Examples of Applications. *Angew Chem Int Ed Engl* 1991; **30**: 265–292.
- [24] TELSNER J, HOFFMAN BM, LOBRUTTO R, OHNISHI T, TSAI Ah-L, SIMPKIN D, PALMER G. Evidence for N coordination to Fe in the [2Fe-2S] center in yeast mitochondrial complex III. *FEBS Lett* 1984; **214**: 117–121.

Adres autora: 31-344 Kraków, ul. Ojcowska 18^B
e-mail: rjg@mol.uj.edu.pl

FUNKCJA I MECHANIZM DZIAŁANIA PLASTOCHINONU W BŁONACH FOTOSYNTETYCZNYCH¹

FUNCTION AND MECHANISM OF ACTION OF PLASTOQUINONE IN PHOTOSYNTHETIC MEMBRANES

Jerzy KRUK, Kazimierz STRZAŁKA

Zakład Fizjologii i Biochemii Roślin, Instytut Biologii Molekularnej UJ, Kraków

Streszczenie: W pracy przedstawiono udział plastochinonu-9 i jego formy zredukowanej w fotosyntetycznym transporcie elektronów, lokalizację obu jego form w błonach, możliwość tworzenia kompleksów charge-transfer przez te związki, ich wpływ na strukturę molekularną błon i ich własności antyutleniające w układach modelowych.

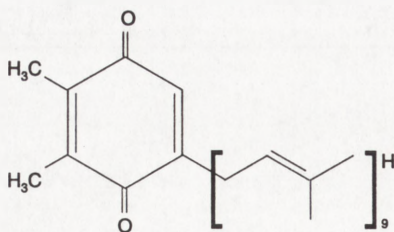
Słowa kluczowe: plastochinon, plastochinol, fotosynteza, antyutleniacze, błony

Summary: The function of plastoquinone-9 and its reduced form in the photosynthetic electron transport is presented, as well as the localization of both its forms in the membranes, possibility of the formation of charge-transfer complexes by these compounds, their influence on the molecular structure of the membranes and their antioxidant properties in model systems.

Key words: plastoquinone, plastoquinol, photosynthesis, antioxidants, membranes

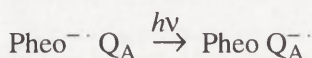
Chinony prenylowe są związkami lipidowymi występującymi u wszystkich żywych organizmów. Ich znaczenie związane jest z udziałem w układach transportujących elektrony u bakterii, w mitochondriach i chloroplastach. Wśród roślinnych chinonów prenylowych najbardziej znany i występujący w największych ilościach jest plastochinon-9 (PQ-9, PQ-A, PQ). Jego występowanie u roślin ogranicza się do chloroplastów, gdzie zlokalizowany jest głównie w błonach tylakoidów, uczestnicząc w fotosyntetycznym transporcie elektronów [25]. Oprócz tylakoidów, PQ-9 zidenty-

¹ Praca finansowana w ramach grantu KBN 6 P04A 049 08.

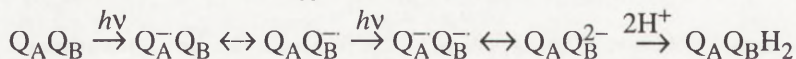


plastochinon-9

fikowany został również w otoczce chloroplastu, gdzie zachodzi jego biosynteza [19] oraz w plastoglobulach [18], które są miejscem zapasowym dla lipidów prenylowych. Cząsteczki PQ-9 wykazują heterogenność rozmieszczenia i funkcji w błonach tylakoidów. Część z nich występuje w formie związanej z białkami jako pierwotny (Q_A) [26] i wtórny (Q_B) [17] akceptor elektronów fotoukładu II (PSII), oraz w formie wolnej (pula PQ) [31], w warstwie lipidowej błony. PQ-9 wyizolowano również jako składnik cytochromu b_6-f [9], gdzie następuje utlenianie zredukowanego PQ-9 w miejscu zwanym Q_z . Cząsteczki puli PQ występują w stanie równowagi formy utlenionej i zredukowanej, plastochinolu (PQH_2-9). Q_A jest cząsteczką PQ-9 nie ulegającą ekstrakcji heksanem, silnie związaną z białkiem D-2 (34 kDa) [6], która funkcjonuje jako jednoelektronowy akceptor. Po przejściu elektronu z feofityny przechodzi on w stabilny anionowy semichinon, który nie ulega redukcji poza stan Q_A^- :



Q_B , wtórny akceptor PSII jest słabo związany (wrażliwy na ekstrakcję heksanem) z polipeptydem 32 kDa (białko wiążące Q_B , białko D-1). Pośredniczy on w transporcie elektronów między Q_A i cząsteczkami puli PQ:



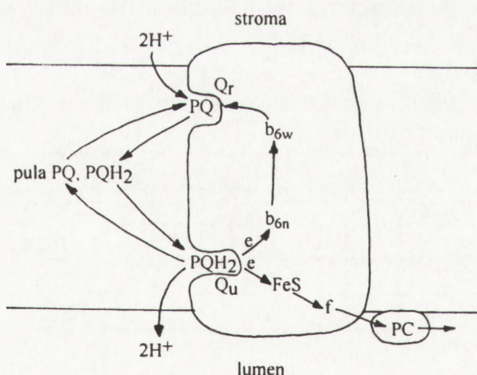
Po dwuelektronowej redukcji i pobraniu dwóch protonów przechodzi w całkowicie zredukowaną cząsteczkę PQ ($Q_B H_2$) i następnie jest uwalniany z miejsca Q_B w białku do matryks lipidowego i zastąpiony następną cząsteczką z puli PQ. Chociaż Q_B jest zredukowany przez jednoelektronowe, semichinonowe stadia pośrednie, jest on zwany dwuelektronową bramką ponieważ wymiana plastochinonu z pulą PQ zachodzi tylko w stanie pełnego utlenienia bądź zredukowania. Miejsce Q_B jest miejscem działania wielu herbicydów (DCMU, atrazyna) [5] i HCO_3^- (efekt dwuwęglanowy) [6]. Cząsteczki Q_A i Q_B są połączone wzajemnie oddziaływaniem z żelazem niehemowym (Fe^{2+}) w formie kompleksu $Q_A\text{-Fe-}Q_B$ [27, 32]. Miejsce Q_B jest prawdopodobnie zlokalizowane blisko zewnętrznej strony (stromy) błony tylakoidu.

Q_z jest cząsteczką PQ-9 luźno związaną z kompleksem cytochromowym b_6-f i pozostaje w równowadze z cząsteczkami plastochinonu puli, podobnie jak Q_B [33]. Cząsteczka plastochinolu puli ulega utlenieniu w miejscu Q_z , blisko wewnętrznej

strony błony tylakoidu, w wyniku czego protony z PQH_2 -9 są uwalniane do wnętrza tylakoidu a elektrony są przenoszone na centrum Rieskiego (kompleks Fe-S) w kompleksie cytochrom b_6 -f [1]. Miejsce Q_z jest miejscem działania niektórych inhibitorów transportu elektronów, m. in. DBMIB i DNP-BNT [24].

Plastochinon związany z białkiem w tylakoidach występuje w ilości podobnej do innych białkowych przenośników elektronów [9, 30], natomiast PQ puli w ilości 7-8 razy większej niż inne składniki transportu elektronów [24]. Zatem cząsteczki puli PQ mogą łączyć ze sobą kilka fotoukładów II z kilkoma fotoukładami I, stanowiąc „bufor elektronowy” i punkt łącznikowy fotoukładów. PQ puli występując w wewnętrznej, płynnej, węglowodorowej warstwie błony wykazuje wysoką ruchliwość lateralną oraz poprzeczną [7, 20]. Cząsteczki puli PQ ulegają redukcji przez PSII po zewnętrznej stronie błony gdzie pobierają protony i przenoszą je na stronę wewnętrzną gdzie są utleniane przez cytochrom b_6 -f i uwalniają protony do wnętrza tylakoidu. Funkcjonują one zatem jako pompa protonowa w poprzek błony i przenośnik elektronów między przestrzennie oddzielnymi kompleksami PSII i cytochrom b_6 -f [20, 31]. Cząsteczki PQ-9, razem z cytochromem b_6 -f są również składnikami cyklu Q [4].

Mechanizm działania cyklu Q nie został do tej pory zadowalająco wyjaśniony. Jak się przyjmuje, efektem jego działania jest zwiększenie liczby protonów przetransportowanych w poprzek błony w stosunku do liczby elektronów przepływających pomiędzy PS II i PS I. Schemat działania cyklu Q można przedstawić w sposób następujący. Kompleks cytochromowy b_6 -f posiada dwa miejsca wiążące chinony, określane jako Q_u (miejsce utleniania plastichinolu) i Q_r (miejsce redukcji plastochinolu), które położone są odpowiednio przy wewnętrznej i zewnętrznej powierzchni błony tylakoidu (rys. 1). Jeden z elektronów pochodzący z utlenienia cząsteczki



Rys. 1. Schemat działania cyklu Q. Q_u — miejsce utleniania plastochinolu; Q_r — miejsce redukcji plastochinolu; FeS — centrum żelazowo-siarkowe Rieskiego; f — cytochrom f; b_{6n} - niskopotencjałowy hem cytochromu b_6 ; b_{6w} — wysokopotencjałowy hem cytochromu b_6 ; PC — plastocyjanina.

plastochinolu w miejscu Q_u zostaje przekazany do centrum FeS Rieskiego, a następnie na cytochrom f i plastocyjaninę i dalej do centrum reakcji PS I. Jednocześnie z przekazaniem elektronu uwalniane są do wnętrza tylakoidu dwa protony. Natomiast

pozostała w miejscu Q_u forma semichinonowa PQ redukuje niskopotencjałowy hemocytochromu b_6 , (b_{6n}), skąd elektron przekazywany jest na wysokopotencjałową formę hemu (b_{6w}) i z kolei redukuje plastochinon w miejscu Q_r . Po redukcji dwoma elektronami, czyli po dwóch obrotach cyklu Q plastochinon w miejscu Q_r przyłącza dwa protony pochodzące ze środowiska stromy, i jest uwalniany do puli PQ jako PQH_2 . Również po utlenieniu plastochinolu w miejscu Q_u cząsteczka PQ uwalniana jest do matriks lipidowego błony. Jak się przyjmuje, cykl Q odgrywa istotną rolę w cyklicznym transporcie elektronów [3].

Pomimo licznych badań, mechanizm działania PQ-9 na poziomie molekularnym nie został zadowalająco wyjaśniony. Nieliczne badania, przeprowadzone głównie na układach modelowych i dotyczące w większości ubichinonu-10 [7, 20], spełniającego analogiczną funkcję do PQ-9 w mitochondriach, sugerują, że cząsteczki PQ-9 są głównie zlokalizowane względnie głęboko w hydrofobowej części błony lipidowej, blisko jej środkowej warstwy jednak z możliwością penetracji warstw bliższych powierzchni błony gdzie zachodzą procesy oksydacyjno-redukcyjne cząsteczek PQ-9. Ze względu na długość cząsteczek PQ-9, odpowiadającą grubości błony, najbardziej prawdopodobne wydaje się być ich ułożenie równoległe do powierzchni błony. Takie ułożenie i lokalizacja cząsteczek PQ-9 zapewniałaby im swobodną dyfuzję lateralną w błonach. Jednak faktycznym przenośnikiem wodoru w tylakoidach jest zredukowany PQ-9, plastochinol-9, którego lokalizacja i ruchliwość w błonach, w porównaniu z PQ-9 nie została do tej pory wystarczająco zbadana.

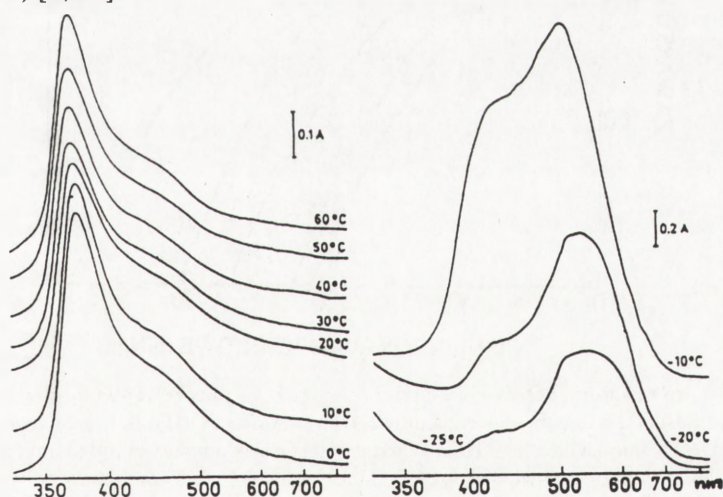
Pewnych informacji co do względnej polarności i ewentualnych różnic w lokalizacji w błonach PQ-9 i PQH_2 -9 dostarczają pomiary rozpuszczalności tych dwóch związków w heksanie, który w przybliżeniu odpowiada polarnością warstwie hydrofobowej błony i w acetonie będącym odpowiednikiem warstwy przypowierzchniowej błon (Tabela 1) [10].

Tabela 1. Rozpuszczalność PQ-9 i PQH_2 -9 w heksanie i acetonie w -30°C i 22°C (mg/ml); ∞ — nieograniczona rozpuszczalność [10].

rozpuszczalnik	PQ-9		PQH_2 -9	
	-30°C	22°C	-30°C	22°C
heksan (h)	9,77	∞	0,24	10,8
aceton (a)	7,14	105,5	72,8	∞
a/h	0,73	<1	303	wysoki

W przypadku PQ-9, jego rozpuszczalność w obu rozpuszczalnikach jest podobnego rzędu, natomiast PQH_2 -9 posiada znacznie wyższe powinowactwo do fazy polarnej (aceton). Powyższe różnice sugerują, że PQ-9 w błonach może równomiernie rozmieszczać się w warstwie hydrofobowej i bliższej powierzchni błony, natomiast PQH_2 -9 lokalizowałby się głównie w warstwie przypowierzchniowej. W powyższej pracy stwierdzono również, że rozpuszczalność PQH_2 -9 w heksanie (22°C) wzrastała ze

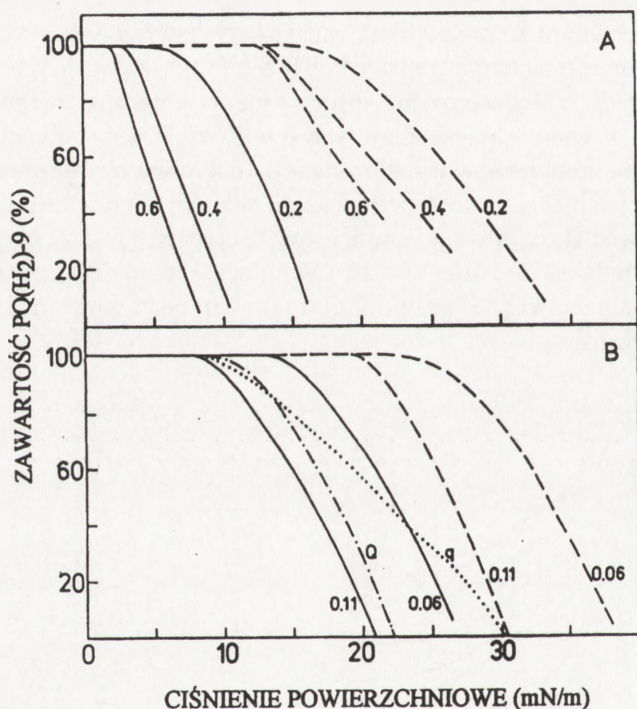
wzrostem stężenia (ok. 1,5 razy), szczególnie w zakresie niskich, fizjologicznych stężeń PQ-9. Cząsteczki PQH₂-9 posiadające tendencję do umiejscawiania się w warstwach bliższych powierzchni błony, aby przedyfundować na przeciwną stronę błony, gdzie ulegają *in vivo* reoksydacji, musiałyby pokonać barierę hydrofobową wnętrza błony co byłoby trudne ze względów termodynamicznych. Czynnikiem ułatwiającym pokonanie tej bariery mogłyby być oddziaływanie z cząsteczkami PQ-9, zwiększające rozpuszczalność PQH₂-9 w warstwie hydrofobowej i poprzez to jego dyfuzję. Podłożem powyższych zmian rozpuszczalności PQH₂-9 może być tworzenie kompleksów „charge-transfer” (z przeniesieniem ładunku) pomiędzy tymi dwoma związkami, co wykazano w różnych rozpuszczalnikach organicznych [8], nienasyconych kwasach tłuszczowych [14] i odwodnionej lecytynie dipalmitynowej [15], a więc w układach, które mogą w pewnym stopniu symulować układy naturalne. Przykładowe widma absorpcyjne kompleksu charge-transfer PQH₂-9 z PQ-9 w kwasie linolowym przedstawiono na rys. 2. Widoczne pasma absorpcyjne (tzw. pasma charge-transfer) występujące tylko w widmie mieszaniny tych dwóch związków są cechą charakterystyczną tego typu kompleksów [5]. Obecność dwóch pasm charge-transfer na rys. 2, których proporcje i maksima absorpcji ulegają zmianom temperaturowym przypisuje się obecności dwóch konformacji kompleksów, w których płaszczyzny pierścieni obu składników kompleksu są zorientowane równolegle do siebie a ich podstawniki są ułożone bądź naprzeciwlegle (pasma krótkofalowe), bądź naprzemianlegle (pasma długofalowe) [8, 14].



Rys. 2. Widma kompleksu charge-transfer PQ-9 (55.1 mM) z PQH₂-9 (53.3 mM) w kwasie linolowym w różnych temperaturach [14].

Dodatkowych informacji dotyczących rozmieszczenia chinonów prenylowych w płaszczyźnie poprzecznej błon, w zależności od ich względnego stężenia w błonach modelowych można uzyskać stosując technikę monowarstw. W metodzie tej nano-

si się na określoną powierzchnię wody odpowiednią ilość cząsteczek substancji lipidowej, a następnie przy pomocy przesuwalnej bariery zmniejsza się jednostajnie pole tej powierzchni mierząc równocześnie ciśnienie powierzchniowe jakie wywiera na ścianki naczynia monowarstwa badanego lipidu. Technika tą można badać pojedyncze związki jak również mieszaniny. Analizy wyników pomiarów uzyskanych tą techniką dla mieszanin PQ-9 — MGDG i PQH₂-9 — MGDG dostarczyła informacji o procentowej zawartości tych związków w warstwie interfazowej (monowarstwa-woda) w zależności od ciśnienia powierzchniowego i procentowej zawartości PQ(H₂)-9 w monowarstwie [16] (rys. 3). Przy zwiększaniu ciśnienia powierzchniowego, od jego pewnej wartości następuje spadek zawartości PQ(H₂)-9 w monowar-



Rys. 3. Procentowa zawartość PQ-9 (—), PQH₂-9 (---) i PQ-9 plus PQH₂-9 (- · -) w monowarstwie MGDG w zależności od ciśnienia powierzchniowego i zawartości PQ(H₂)-9. Liczby oznaczają ułamek molowy PQ(H₂)-9 w mieszaninie z MGDG. W mieszaninie trójskładnikowej (Q) ułamki molowe PQ-9, PQH₂-9 i MGDG wynoszą odpowiednio 0,055, 0,055 i 0,89; q (·····) oznacza teoretyczny przebieg krzywej Q [16].

stwie połączony z wypychaniem tych związków do rejonów hydrofobowych monowarstwy, odpowiadających wewnętrznej strefie błony modelowej. Zarówno dla PQ-9 jak i PQH₂-9 daje się zauważyć zależność, że im mniejsza zawartość badanego związku w monowarstwie tym wyższe ciśnienia powierzchniowe wymagane są do jego usunięcia z granicy interfazy monowarstwa-woda. Ponadto PQH₂-9, jako bar-

dziej polarny, wymaga znacznie wyższych ciśnień aby był usunięty w tym samym stopniu co PQ-9 (dla tego samego stężenia wyjściowego). Powyższe dane wskazują, że dla naturalnych zawartości PQH₂-9 (ok. 1 mol%) [2] i ciśnień powierzchniowych (30-40 mN/m [28]) większość PQH₂-9 lokalizowałaby się przy powierzchni błony podczas gdy większość cząsteczek PQ-9 znajdowałaby się w warstwie wewnętrznej dwuwarstwy lipidowej. Ponadto porównanie krzywej teoretycznej dla mieszaniny trójskładnikowej PQ-9 — PQH₂-9 — MGDG z krzywą doświadczalną wskazuje, że zawartość PQH₂-9 w okolicach powierzchniowych monowarstwy maleje pod wpływem obecności formy utlenionej, co świadczy o oddziaływaniu tych dwóch związków w monowarstwie i pośrednio o możliwości udziału w tym procesie kompleksów charge-transfer między PQ-9 i PQH₂-9.

Tabela 2. Procentowa zawartość PQH₂-9 w fazie polarnej błon liposomów z lecytyny jaja (EYL) i lecytyny dwupalmitynowej (DPL) przy różnych stosunkach molowych fosfolipid/PQH₂-9 (10, 50, 100) [13].

Medium	Zawartość PQH ₂ -9 (%)
DPL 10	7
DPL 50	30
DPL 100	39
EYL 10	4
EYL 50	33
EYL 100	44

Chinony prenylowe wykazują fluorescencję własną w ultrafiolecie, przy czym wydajność tego procesu zależy od polarności ośrodka [13]. Własność ta pozwala na ocenienie rozmieszczenia poprzecznego chinonów prenylowych w błonach modelowych. Zawartość PQH₂-9 w warstwie polarnej liposomów zbudowanych z lecytyny z jaja i lecytyny dipalmitynowej zamieszczono w Tabeli 2. Jak widać z tabeli względna zawartość PQH₂-9 w fazie polarnej rośnie ze zmniejszającą się zawartością chinolu w liposomach. Wyniki te są zgodne z danymi uzyskanymi z badań na monowarstwach [16]. Mała zawartość PQH₂-9 w fazie polarnej zaobserwowana dla największego jego stężenia (10mol%) związana jest prawdopodobnie z agregacją tego związku w błonach.

Zredukowana oraz utleniona forma PQ-9 wpływają w różnym stopniu na uporządkowanie łańcuchów lipidowych błon liposomów mierzone przez anizotropię fluorescencji sond fluorescencyjnych, difenyl-heksatrienu (DPH) i trimetylamono-difenyl-heksatrienu (TMA-DPH). Pierwsza z tych sond lokalizuje się w warstwie hydrofobowej błony a druga bliżej powierzchni błony. Wzrost zawartości PQ-9 w liposomach, w granicach 1 – 10 mol%, powodował stopniowy wzrost uporządkowania łańcuchów lipidowych w obszarze mierzonym przez DPH jak również w nieco mniejszym stopniu w rejonie lokalizacji TMA-DPH. Natomiast wpływ PQH₂-9 na anizotropię obu

sond fluorescencyjnych był wyraźnie mniejszy niż w przypadku PQ-9 [29]. Efekt ten jest o tyle ciekawy, że PQH₂-9 który dla tego samego stężenia wyjściowego w błonie co PQ-9 powinien występować w większej ilości w fazie polarnej (rejon TMA-DPH), wywiera mniejszy wpływ na uporządkowanie łańcuchów lipidowych błony. Jeszcze większe różnice w zaburzeniu uporządkowania lipidów błon pomiędzy utlenioną a zredukowaną formą obserwowano w przypadku ubichinonów, szczególnie z krótkim łańcuchem bocznym [29].

Tabela 3. Pseudo-pierwszorzędowe stałe szybkości reakcji PQH₂-3 i PQH₂-9 z DPPH w różnych rozpuszczalnikach względem stałej dla α -tokoferolu w acetonie ($k = 6,64 \times 10^{-3} \text{ s}^{-1}$) [12].

	heksan	metanol	aceton	octan etylu
α -tokoferol	11,4	6,2	1,0	1,0
PQH ₂ -3	13,8	6,7	0,8	1,1
PQH ₂ -9	13,2	13,1	0,8	1,1

Wykazano również, że PQH₂-9 posiada własności antyutleniające zarówno w rozpuszczalnikach jak też w błonach modelowych. Stałe szybkości reakcji PQH₂-3 i PQH₂-9 ze stabilnym wolnym rodnikiem 1,1-difenyl-2-pikryl-hydrazyl (DPPH), w rozpuszczalnikach o różnej polarności, w porównaniu z klasycznym antyutleniaczem, α -tokoferolem pokazane są w Tabeli 3. Jak widać oba plastoquinole wykazują podobną lub nawet nieco większą aktywność niż α -tokoferol w badanej reakcji. PQH₂-9 wbudowany w błony liposomów zbudowanych z lecytyny jajowej ulegał szybszemu utlenianiu niż α -tokoferol pod wpływem rodników hydroksylovych generowanych w czasie sonikacji liposomów [12], co świadczy o jego większej reaktywności wobec tych rodników. W reakcji analogów plastoquinolu, trimetylohydrochinonu (TMQH₂) i γ -tokoferylochinolu (γ -TQH₂), związków o analogicznej do PQH₂-9 budowie głowy polarnej, z syntetycznym podstawionym rodnikiem fenoksylovym, stałe szybkości reakcji tych związków w porównaniu do α -tokoferolu w rozpuszczalnikach organicznych wynosiły dla TMQH₂: 1,68 (etanol), 1,53 (eter dwuetylowy), 2,38 (benzen), a dla γ -TQH₂: 2,85 (etanol), 2,53 (eter), 2,26 (benzen) i 3,92 (heksan) [23]. Dane te wskazują na większą aktywność głowy PQH₂-9 niż α -tokoferolu w badanej reakcji. W reakcji z rodnikiem α -tokoferoksylovym w etanolu, czyli reakcji regeneracji α -tokoferolu, powyższe związki wykazywały także dość znaczną aktywność, nawet wyższą niż ubichinol-10; TMQH₂ — 1,33 razy a γ -TQH₂ — 1,58 razy [22]. Powyższe związki wykazywały również zdolność wygaszania tlenu singletowego i wynosiła ona w etanolu, w porównaniu do α -tokoferolu, dla TMQH₂ — 0,56 i dla γ -TQH₂ — 0,57 [21]. W reakcji hamowania peroksydacji lipidów indukowanej układem Fe²⁺-H₂O₂, PQH₂-9 wykazywał podobny stopień aktywności jak α -tokoferol, natomiast w fazie inicjacji powyższej reakcji, znacznie większa część PQH₂-9 niż α -tokoferolu ulegała utlenieniu pod wpływem rodników hydroksylovych produ-

kowanych w tej fazie peroksydacji [11]. Dane te wskazują, że cząsteczki plastochinolu mogą stanowić istotny element mechanizmów obronnych przed fotoutlenianiem.

Z przedstawionych powyżej informacji na temat funkcji i mechanizmu działania plastochinonu wynika, że jego rola w błonach fotosyntetycznych nie ogranicza się jedynie do transportu elektronów i protonów. Związek ten wpływa modyfikująco na własności fizyczne błon oraz stanowi (po redukcji do plastochinolu) efektywny czynnik antyutleniający.

LITERATURA

- [1] BOUGES-BOCQUET B. The electrogenic loop in green algae and higher plants: carriers involved, relation to the plastoquinone pool, coupling to the transfer chain. Trumpower BL [red.] *Function of Quinones in Energy Conserving Systems*. Academic Press, New York 1982: 409–423.
- [2] CHAPMAN DJ, BARBER J. Analysis of plastoquinone-9 in appressed and non-appressed thylakoid membrane regions. *Biochim Biophys Acta* 1986; **850**: 170–172.
- [3] CRAMER WA, BLACK MT, WIGER WR, GIRVIN ME. Structure and function of photosynthetic cytochrome b-c₁ and b₆-f complexes. [w] Barber J [red.] *The Light Reactions*. Elsevier, Amsterdam 1987: 447–493.
- [4] CRAMER WA, KNAFF DB. *Energy Transduction in Biological Membranes*. Springer Verlag, New York 1991.
- [5] FOSTER R. *Organic Charge-transfer Complexes*. Academic Press, New York 1969.
- [6] GOVINDJEE, WASIELEWSKI MR. Photosystem II: from a femtosecond to a milisecond. [w] *Photosynthesis*. Alan R. Liss, Inc. 1989: 71–103.
- [7] HAUSKA G, HURT E. Pool function behavior and mobility of isoprenoid quinones. [w] Trumpower BL [red.] *Function of Quinones in Energy Conserving Systems*. Academic Press, New York 1982: 87–110.
- [8] HURT E, HAUSKA G. Involvement of plastoquinone bound within the isolated cytochrome b₆-f complex from chloroplasts in oxidant induced reduction of cytochrome b₆. *Biochem Biophys Acta* 1982; **682**: 466–472.
- [9] KRUK J. Charge-transfer-complexes of plastoquinone and α -tocopherol quinone in vitro. *Biophys Chem* 1988; **30**: 143–149.
- [10] KRUK J. Physicochemical properties of charge-transfer complexes of plastoquinone and α -tocopherol quinone, and their possible role in vivo. *Biophys Chem* 1988; **32**: 51–56.
- [11] KRUK J, JEMIOŁA-RZEMIŃSKA M, STRZAŁKA K, w przygotowaniu.
- [12] KRUK J, SCHMID GH, STRZAŁKA K. Antioxidant properties of plastoquinol and other biological prenylquinols in liposomes and solution. *Free Rad Res* 1994; **21**: 409–416.
- [13] KRUK J, STRZAŁKA K, LEBLANC RM. Fluorescence properties of plastoquinol, ubiquinol and α -tocopherol quinol in solution and liposome membranes. *J Photochem Photobiol* 1993; **19**: 33–38.
- [14] KRUK J, STRZAŁKA K. Charge-transfer-complexes of plastoquinone and α -tocopherol quinone in unsaturated fatty acids and temperature dependences of their absorption spectra. *Chem Phys Lipids* 1991; **58**: 27–33.
- [15] KRUK J, STRZAŁKA K. Charge-transfer-complexes of plastoquinone and α -tocopherol quinone in phosphatidylcholine and octadecane. *Chem Phys Lipids* 1994; **70**: 199–204.

- [16] KRUK J, STRZAŁKA K, LEBLANC RM. Monolayer study of plastoquinones, α -tocopherol quinone, their hydroquinone forms and their interaction with monogalactosyldiacylglycerol. Charge-transfer complexes in a mixed monolayer. *Biochim Biophys Acta* 1992; **1112**: 19–26.
- [17] KYLE DJ. The 32 000 dalton Q_B protein of photosystem II. *Photochem Photobiol* 1985; **41**: 107–116.
- [18] LICHTENTHALER HK. Localization and functional concentrations of lipoquinones in chloroplasts. *Progr Photosynth Res* 1969; **1**: 304–314.
- [19] LICHTENTHALER HK, PRENZEL U, DOUCE R., JOYARD J. Localization of prenylquinones in the envelope of spinach chloroplasts. *Biochim Biophys Acta* 1981; **641**: 99–105.
- [20] MILLNER PA, BARBER J. Plastoquinone as a mobile redox carrier in the photosynthetic membrane. *FEBS Lett* 1984; **169**: 1–6.
- [21] MUKAI K, ITOH S, DAIFUKU K, MORIMOTO H, INOUE K. Kinetic study of the quenching reaction of singlet oxygen by biological hydroquinones and related compounds. *Biochim Biophys Acta* 1993; **1183**: 323–326.
- [22] MUKAI K, ITOH S, MORIMOTO H. Stopped-flow kinetic study of vitamin E regeneration reaction with biological hydroquinones (reduced forms of ubiquinone, vitamin K, and tocopherolquinone) in solution. *J Biol Chem* 1992; **267**: 22277–22281.
- [23] MUKAI K, MORIMOTO H, KIKUCHI S, NAGAOKA S. Kinetic study of free-radical-scavenging action of biological hydroquinones (reduced forms of ubiquinone, vitamin K and tocopherol quinone) in solution. *Biochim Biophys Acta* 1993; **1157**: 313–317.
- [24] OETTMEIER W, JOHANNINGMEIER U, TREBST A. Inhibitors of plastoquinone function as tools for identification of its binding proteins in chloroplasts. [w] Trumpower BL [red.] *Function of Quinones in Energy Conserving Systems*. Academic Press, New York 1982: 425–441.
- [25] RICH PR, MOSS DA. The reactions of quinones in higher plant photosynthesis. [w] Barber J [red] *The Light Reactions*. Elsevier, Amsterdam 1987: 421–445.
- [26] RUTHERFORD AW, ZIMMERMAN IL. A new EPR signal attributed to the primary plastosemiquinone acceptor in photosystem II. *Biochim Biophys Acta* 1984; **767**: 168–175.
- [27] RUTHERFORD AW, ZIMMERMAN IL, MATHIS P. EPR of PSII interactions. [w] Sybesma, C [red.] *Advances in Photosynthesis Research*, vol. 1. Nijhoff/Junk Publ., The Hague 1984: 445–448.
- [28] SALESEE C, DUCHARME D, LEBLANC RM, BOUCHER F. Estimation of disk membrane lateral pressure and molecular area of rhodopsin by the measurement of its orientation at the nitrogen-water interface from an ellipsometric study. *Biochemistry* 1990; **29**: 4567–4575.
- [29] SKOWRONEK M, JEMIOŁA-RZEMIŃSKA M, KRUK J, STRZAŁKA K. *Biochim Biophys Acta*, wysłana do druku.
- [30] TABATA K, ITOH S, YAMAMOTO Y, OKAYAMA S, NISHIMURA M. Two plastoquinone A molecules are required for photosystem II activity: analysis in hexane-extracted photosystem II particles. *Plant Cell Physiol* 1985; **26**: 855–863.
- [31] TIEMAN R, RENGER G, GRÄBER G, WITT HT. The plastoquinone pool as possible hydrogen pump in photosynthesis. *Biochim Biophys Acta* 1979; **546**: 498–519.
- [32] TREBST A. The topology of the plastoquinone and herbicide binding peptides of photosystem II in the thylakoid membrane. *Z Naturforsch* 1986; **41c**: 240–245.
- [33] VELTHYUS BR. The function of plastoquinone in electron transfer. [w] Trumpower BL [red.] *Function of Quinones in Energy Conserving Systems*. Academic Press, New York 1982: 401–408.

INFORMACJE DLA AUTORÓW

POSTĘPY BIOLOGII KOMÓRKI drukują artykuły przeglądowe z zakresu najnowszych osiągnięć biologii komórki, nie publikowane dotąd w innych wydawnictwach. Autorzy odpowiadają za ścisłość podawanych informacji. Obowiązuje terminologia zgodna z polskim mianownictwem biochemicznym, histologicznym, anatomicznym i embriologicznym. Artykuły drukowane w POSTĘPACH BIOLOGII KOMÓRKI nie mogą być bez zgody redakcji publikowane w innych periodykach.

POSTĘPY BIOLOGII KOMÓRKI zamieszczają:

1. Artykuły przeglądowe nie przekraczające 20 stron maszynopisu i do 100 pozycji bibliograficznych w zasadzie z ostatnich 5 lat (do 10% pozycji bibliograficznych starszych).

2. Doniesienia z ostatniej chwili na 3–5 stronach maszynopisu z kilkoma pozycjami bibliograficznymi ostatniego roku (licząc od daty wysłania do redakcji).

3. Listy do redakcji (do 1 strony maszynopisu).

Tekst pracy i załączniki należy przesyłać w dwóch egzemplarzach na adres redakcji w Warszawie bądź jednego z Redaktorów (adresy na 2 str. okładki). Maszynopis powinien być pisany jednostronnie na papierze formatu A4 z podwójną interlinią i marginesem 4 cm po lewej stronie. Strony powinny być kolejno numerowane. Nadesłanie tekstu pracy, poprawionego po recenzjach, na dyskietce przyspieszy publikację.

Pierwsza strona nie numerowana przeznaczona jest dla redakcji i powinna zawierać: imiona i nazwiska autorów oraz ich tytuły naukowe, adresy w pracy i domowy wraz z telefonem, tytuł pracy w języku polskim i angielskim oraz liczbę stron maszynopisu, liczbę tabel i rysunków. Na pierwszej (numerowanej) stronie należy podać kolejno tytuł pracy w języku polskim i angielskim, imiona (w pełnym brzmieniu) i nazwiska autorów, nazwę zakładu naukowego, nazwisko i adres autora prowadzącego korespondencję, informację o dofinansowaniu pracy oraz skrót tytułu (do 40 znaków). Następna strona powinna zawierać w języku polskim i angielskim streszczenie (do 150 słów) oraz słowa kluczowe – 3 do 10 słów zgodnych z terminami w Medical Subject Headings (Index Medicus), o ile są tam zawarte. W tytule i streszczeniu można stosować jedynie powszechnie przyjęte skróty, np. DNA. Tekst artykułu należy rozpocząć od nowej strony. W tekście nie zamieszczać tabel, schematów lub rysunków, a jedynie zaznaczyć ołówkiem na marginesie ich lokalizację (np. tab. 1, rys. 1 itp.). Dla przejrzystości tekst można podzielić na tytułowane i numerowane rozdziały oraz podrozdziały. Od nowej strony należy podać spis literatury. Skróty nazw czasopism podawać należy według Index Medicus (listy czasopism publikowane są corocznie w numerze styczniowym). Powołanie w tekście następuje przez podanie kolejnego numeru pozycji w spisie literatury w nawiasie kwadratowym (np. [5]). Spis literatury należy zestawić alfabetycznie według następującego wzoru:

[1] HNİLICA LS, McLURE ME, SPELTZBERG TC. Histone biosynthesis and the cell cycle. [w] Philips MP, Schwartz E [red.] Histone and Nucleohistones. London, New York: Philips, Plenum Press 1977: 60–64.

[2] SACHSENMAJER W, REMY V, PLATTNER R. Initiation of synchronous mitosis in *Physarium polycephalum*. *Exptl Cell Res* 1980; 2: 41–48.

Tabele, opisy schematów i rysunków powinny być załączone na oddzielnych stronach. Schematy i rysunki muszą być wykonane w postaci nadającej się do reprodukcji. Fotografie powinny być kontrastowe i wykonane na błyszczącym papierze. Wymiary poszczególnych rysunków, schematów i fotografii nie mogą przekraczać 125 × 180 mm lub ich połowy. Jeżeli załączniki są zapożyczone z innych źródeł, należy podać, skąd zostały zaczerpnięte i dołączyć zgodę autora i wydawnictwa na reprodukcję, jeżeli materiały te zamieszcza się w niezmięnionej formie. Wszystkie załączniki muszą być opatrzone na odwrocie nazwiskiem pierwszego autora i oznaczeniem góry i dołu ilustracji. Stosowane jednostki miar muszą być zgodne z układem SI.

Redakcja zastrzega sobie prawo dokonywania skrótów uzgodnionych z autorem. Autor zobowiązany jest do wykonania korekty autorskiej i zwrócenia jej w ciągu 3 dni. Koszty, spowodowane większymi zmianami tekstu wprowadzanymi w korekcie poza poprawkami błędów drukarskich, ponosi autor. Autorzy otrzymują bezpłatnie 1 egz. zeszytu PBK z opublikowaną pracą, a ponadto mogą zamówić odbitki odpłatnie.

Redakcja prosi o propozycję do 5 osób (nazwisko, imię, adres, fax), które byłyby odpowiednimi recenzentami maszynopisu, nie powinny jednak być aktualnymi współpracownikami ani pracownikami instytucji, w której pracuje autor. Redakcja prosi także głównego Autora o dołączenie do maszynopisu podpisanej odpowiedzi na następujące pytania:

Dołączono 2 kopie maszynopisu,
tabel i rycin.

Treść pracy nie była uprzednio publikowana i nie została
tak **nie** wysłana do innej redakcji. **tak** **nie**

Wszyscy Autorzy znają i akceptują pracę. **tak** **nie** Dołączono kopię pracy na dyskietce z podaniem nazwy

Jest zgoda osób, których informacje niepubli-
kowane są zamieszczone w tekście artykułu **tak** **nie** pliku i użytego programu edycyjnego z komputera IBM **tak** **nie**

Wyrażam zgodę na to, że artykuł po przyjęciu do druku w „Postęпах Biologii Komórki” przechodzi na własność Fun-
dacji Biologii Komórki i Biologii Molekularnej i jego reprodukcja wymaga zgody. **tak** **nie**

data **podpis**

TREŚĆ

WSTĘP	1
ŻAK Z.: Biosynteza flawin i białka wiążące ryboflawinę	3
KORDOWIAK A. M., KAPUSTA P., TRZOS R., DZIEWOŃSKA K.: Cukrzyca modelowa jako narzędzie badania zmian występujących w cukrzycy klinicznej. Prostaglandyny i związki wanadu w normalizacji zmian cukrzycowych	17
PORWIT-BÓBR Z.: Oddziaływania komórek w substancji międzykomórkowej	35
CZYŻ J.: Wpływ kształtu komórek na wzrost, różnicowanie i przeżywalność komórek	41
WIŚNIEWSKA A., SUBCZYŃSKI W. K.: Bariera hydrofobowa błon lipidowych. Wpływ cholesterolu i nienasyconych łańcuchów alkilowych lipidów na transport cząsteczek polarnych	59
GURBIEL R. J.: Zastosowanie metody podwójnego rezonansu elektronowo-jądrowego (ENDOR) do badania struktury metaloenzymów	73
KRUK J., STRZAŁKA K.: Funkcja i mechanizm działania plastochinonu w błonach fotosyntetycznych	89

Warunki prenumeraty kwartalnika
POSTĘPY BIOLOGII KOMÓRKI

Prenumerata na rok 1996

Redakcja przyjmuje opłatę prenumeraty za rok 1996 na konto:

FUNDACJA BIOLOGII KOMÓRKI I BIOLOGII MOLEKULARNEJ, ul. Marymoncka 99, 01-813 Warszawa; Bank Polska Kasa Opieki S. A., IV O/Warszawa 501132-40006576-2701-3-1110.

Cena prenumeraty rocznika (4 zeszyty + ew. 2 suplementy) na rok 1996:

dla instytucji (bibliotek) wynosi 40 zł,

a dla odbiorców indywidualnych 16 zł.

Subscription orders for POSTĘPY BIOLOGII KOMÓRKI for 1996 should be placed at local press distributors or directly at Editorial Board of POSTĘPY BIOLOGII KOMÓRKI, Marymoncka str. 99, 01-813 Warszawa/Poland, account No:

FUNDACJA BIOLOGII KOMÓRKI I BIOLOGII MOLEKULARNEJ, ul. Marymoncka 99, 01-813 Warszawa; Bank Polska Kasa Opieki S. A., IV O/Warszawa 501132-40006576-2701-3-1110.

Price per year 20 US dollars.

Indeks 369705