

SPIS TREŚCI - CONTENTS

Tadeusz S a r n a - Udział tlenu singletowego i wolnych rodników w reakcjach fotouczulanych i zjawiskach fotodynamicznych	5
The role of singlet oxygen and free radicals in photosensitized reactions and photodynamic action	30
Krzysztof K o w a l s k i - Modelowanie matematyczne reakcji wiązania ligandów z receptorami w warunkach równowagi	31
Mathematical modelling of ligand - receptor binding at equilibrium conditions	58
Henryk W i t a s - Acylacja białek	59
Acylation of proteins	80
Jacek T w a r d o w s k i, Irena N o w a k - Struktura a funkcja enzymów	83
Structure and function of enzymes	102
Maria K o t e r, Ewa G r z e l i Ń s k a - Interpretacja widm znaczników spinowych stosowanych w badaniach płynności lipidów błon	103
Interpretation of spin labels spectra applied for the study of the lipid fluidity	122
Barbara W a c h o w i c z - Molekularne mechanizmy procesu aterogenezy	123
Molecular mechanisms of atherogenesis	134

Tadeusz Sarna

UDZIAŁ TLENU SINGLETOWEGO I WOLNYCH ROONIKÓW
W REAKCJACH FOTOU CZULANYCH
I ZJAWISKACH FOTODYNAMICZNYCH*

1. WPROWADZENIE

Reakcje fotouczulane (RF) to zespół zjawisk fotofizycznych i fotochemicznych, w których energia promieniowania, pochłonięta przez odpowiedni chromofor (uczulacz) jest wykorzystana do indukcji przemian chemicznych substratu. Przemiany substratu mogą polegać na jego utlenianiu, redukcji, izomeryzacji, przyłączaniu pewnych grup lub degradacji. Jeśli w RF bierze udział tlen cząsteczkowy, procesy takie nazywają się fotouczulanym utlenianiem (FU). Natomiast przez działanie fotodynamiczne (DF) rozumie się zespół procesów w układach biologicznych zapoczątkowany FU, który prowadzi do zaburzenia funkcji lub struktury tych układów. W przypadku komórek, DF może wywoływać mutacje lub śmierć. Efektywnymi uczulaczami jest wiele barwników, charakteryzujących się wysokim współczynnikiem molowym ekstynkcji w zakresie światła widzialnego i bliskiego ultrafioletu oraz znacznym prawdopodobieństwem przejść interkombinacyjnych. Ten ostatni warunek odgrywa zasadniczą rolę w przypadku procesów, które rozpoczynają się z niższego poziomu trypletowego uczulacza.

Do uczulaczy zaliczają się zarówno ksantyny, tiazyny, fenotiazyny, akrydyny, niesteroidowe leki przeciwzapalne, antybiotyki, antracykliny, związki tiofenowe, jak i barwniki endogenne występujące w organizmach zwierzęcych i roślinnych, np. protoporfiryna, retinal, chlorofil czy bilirubina [18, 23, 31, 35, 46, 48, 58].

W pewnych warunkach, barwniki endogenne są zdolne do wywołania zjawisk fotodynamicznych *in vivo*. Ma to miejsce u niektórych mutantów roślinnych, pozbawio-

* Artykuł opracowano na podstawie referatu wygłoszonego podczas Szkoły Zimowej Instytutu Biologii Molekularnej UJ „Molekularne podstawy zjawisk fotobiologicznych”, która odbyła się w lutym 1987 r. i była sponsorowana przez program RP.II.13.2.11.

nych naturalnych mechanizmów fotoochronnych, a nawet u ludzi, u których zaburzenia metabolizmu hemowego prowadzą do nadmiernej akumulacji porfiryn w skórze i wzrostu jej fotowrażliwości [38, 99]

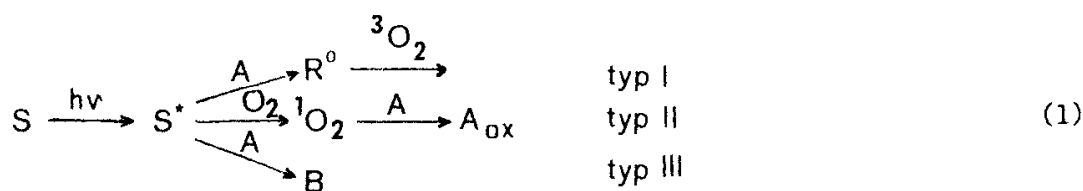
Działanie fotodynamiczne towarzyszy niekiedy chemoterapii. Znanym lekiem psychotropowym, takim jak chloropromazynie i chlorochinie przypisuje się działanie uboczne w przypadku długotrwałego ich podawania, przy czym efekty te nasilają się pod wpływem światła słonecznego [13, 38]

Zjawiska fotodynamiczne znalazły ostatnio zastosowanie w fototerapii nowotworów i innych schorzeń skóry. Metoda ta, zwana terapią fotodynamiczną (TFD), polega na lokalnym naświetlaniu aktywnym promieniowaniem chorego miejsca po uprzednim wprowadzeniu do układu uczulacza [19, 65]. Skuteczność jej zależy zarówno od stopnia wzbogacenia chorej tkanki w uczulacz, jak i od penetracji aktywnego promieniowania w obszarze schorzenia.

Do najczęściej stosowanych uczulaczy w TFD nowotworów zalicza się pochodne hematoporfiryny, które wykazują dobre właściwości absorpcyjne w obszarze widzialnym i znaczne powinowactwo do komórek nowotworowych, umożliwiające akumulację uczulacza w tkance, którą poddaje się TFD. Ze względu na właściwości optyczne tkanki ludzkiej, do szczególnie skutecznych uczulaczy *in vivo* powinny należeć pochodne chlorofili, bakteriochlorofili oraz ftalocyjaniny [12, 91], które pochłaniają światło w zakresie czerwieni i bliskiej podczerwieni

2. KLASYFIKACJA I OGÓLNA CHARAKTERYSTYKA PROCESÓW

Schemat reakcji fotouczulanych można przedstawić następująco [55]



gdzie:

S i S* - stan podstawowy i elektronowo wzbudzony uczulacza,

A - substrat reakcji fotouczulanych,

3O_2 i 1O_2 - stan podstawowy (trypletowy) i elektronowo wzbudzony (singletowy) tlenu cząsteczkowego,

R^o - rodnikowa forma substratu,

A_{ox} - produkt fotoutlenienia,

B - produkt reakcji fotouczulanej bez udziału tlenu.

Przy identycznym substracie produkty fotoutlenienia generowane w reakcji I najczęściej różnią się od produktu reakcji II. Do klasycznych przykładów należy fotoutlenienie cholesterolu jedynie oddziaływanie z tlenem singletowym prowadzi do powstania charakterystycznego 3β -hydroksy- 5α -cholest-6-ene-5hydronadtlenku [29, 54]

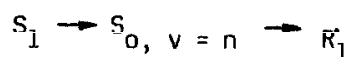
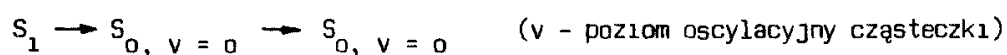
W reakcjach uczulanego fotoutlenienia, należących do typu I, produkt powstaje w wyniku oddziaływania rodnikowych form substratu ze stanem podstawowym tlenu cząsteczkowego. Formy rodnikowe substratu są generowane w reakcji substratu z wzbudzonym elektronowo uczulaczem.

W typie II RF energia wzbudzenia elektronowego uczulacza jest wykorzystana do aktywacji tlenu cząsteczkowego poprzez generowanie wysoce reaktywnych form tlenu singletowego. Udział typu I lub typu II reakcji w procesach FU zależy od wielu czynników: rodzaju uczulacza, stężenia tlenu w ośrodku, fazy, w której znajduje się uczulacz, tlen i substrat, czasu życia tlenu singletowego, odległości cząstek uczulacza i substratu oraz możliwości ich kompleksowania.

W RF typu III elektronowo wzbudzony uczulacz indukuje przeniesienie elektronu (lub wodoru) między cząsteczkami substratu i uczulacza lub przyłączenie uczulacza do substratu - wytworzenie adduktów. Ten ostatni proces zaobserwowano w przypadku indukowanego UV oddziaływania furokumaryn z tyminą lub cytozyną oraz z kwasami nukleinowymi *in vitro* [42, 93]. Postuluje się, że mutagenne i karcinogenne działanie psoralenu i pochodnych może być wynikiem podobnych procesów molekularnych *in vivo* [71, 90].

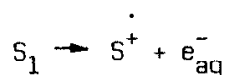
Promieniowanie pochłonięte przez uczulacz wzbudza jego cząsteczki, przenosząc elektrony walencyjne na wyższe poziomy energetyczne. Proces ten zachodzi w bardzo krótkim czasie, ok. 10^{-15} s. W wyniku termicznej relaksacji, cząsteczki elektronowo wzbudzone fazy ciekłej lub stałej osiągają bardzo szybko najniższy poziom oscylacyjny pierwszego stanu elektronowo wzbudzonego, którym jest zazwyczaj stan singletowy S_1 . Czas życia tego stanu jest rzędu pikosekund-nanosekund i zależy od efektywności 4 głównych procesów konkurencyjnych:

1. Emisja promieniowania w postaci fluorescencji $S_1 \rightarrow S_0 + h\nu_1$.
2. Wewnętrzne przenoszenie, czyli zamiana energii elektronowej w energię drgań oscylacyjnych. Prowadzi to do prostej dyssypacji cieplnej lub do dysocjacji rodnikowej:



Rodniki R_1^* mogą inicjować dalsze przemiany charakterystyczne dla reakcji typu I i III.

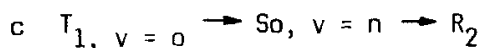
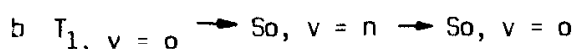
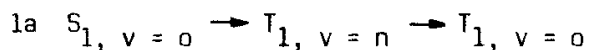
3. Fotojonizacja – proces, w którym tworzy się kationorodnik i uwodniony elektron



Procesy takie obserwowano, m.in., przy naświetlaniu UV wodnych roztworów indoli. Zapoczątkowują one reakcje typu I, ponieważ rodnikowa forma uczulacza, jak i uwodniony elektron mogą oddziaływać z tlenem cząsteczkowym tworząc rodniki nadtlenkowe i anion ponadtlenkowy

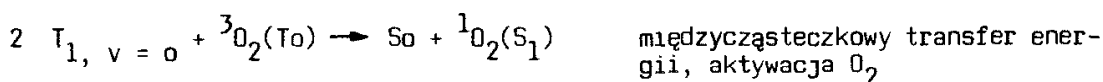
4. Interkombinacyjne przenoszenie związane ze zmianą spinu, prowadzi do wytworzenia wzbudzonego stanu trypletowego uczulacza, którego czas życia jest stosunkowo długi: mikrosekundy–milisekundy. Z uwagi na dłuższy czas życia tego stanu elektronowego prawdopodobieństwo wykorzystania energii wzbudzenia jest znacznie większe. Ponadto, stan trypletowy uczulacza umożliwia efektywny transfer energii na cząsteczki tlenu, które w stanie podstawowym są trypletami

Procesy te można sumarycznie przedstawić w sposób następujący



interkombinacyjne przenoszenie i wewnętrzne przenoszenie, dysypacja energii, produkcja rodników

Rodniki R_2 zapoczątkowują ciąg reakcji typu I lub III.



Tlen singletowy jest odpowiedzialny za reakcje typu II



Trypletowo wzbudzony substrat $A(T_1)$ może brać udział w wielu przemianach chemicznych

4 $T_1, v=0 \rightarrow S_0 + h\nu_2$ emisja promieniowania w postaci fosforescencji
Przejście to należy do silnie wzbronionych regułami wyboru i dlatego intensywność tej emisji jest zwykle bardzo mała.

3 FIZYKOCHEMICZNE WŁAŚCIWOŚCI TLENU SINGLETOWEGO

3.1 ASPEKT ENERGETYCZNY I CZASY ŻYCIA

Trzy najniżej leżące elektronowe poziomy energetyczne cząsteczki tlenu są oznaczone symbolami $^3\Sigma_g^-$, $^1\Delta_g$ i $^1\Sigma_g^+$. Różnica energii między tymi stanami wynosi $\Delta E(^1\Sigma_g^+, ^3\Sigma_g^-) = 1,6 \text{ eV}$ i $\Delta E(^1\Delta_g, ^3\Sigma_g^-) = 0,98 \text{ eV}$. Oznacza to, że odpowiednim przejściom towarzyszy emisja lub absorpcja promieniowania z zakresu bliskiej podczerwieni 1269 i 762 nm. Przejścia te są jednak silnie wzbronione regułami wyboru ($g \leftrightarrow g$, $+\leftrightarrow -$, $\Sigma \leftrightarrow \Delta$ i $1 \leftrightarrow 3$), co wydłuża samoistny czas życia tlenu singletowego do 45 min w przypadku stanu $^1\Delta_g$ [40]. Wyższe stężenie tlenu, jak również obecność innych cząsteczek (np. rozpuszczalnika) drastycznie skracają czas życia stanów wzbudzonych O_2 [69, 98].

W roztworach wodnych czas życia $^1\Sigma_g^+$ wynosi 10^{-10} s , zaś $^1\Delta_g$ kilka mikrosekund. Można więc przyjąć, że w większości procesów FU typu II istotną rolę odgrywa wyłącznie stan $^1\Delta_g$. Wydajność indukowanej cząsteczkami rozpuszczalnika bezpromienistej dezaktywacji 1O_2 zależy od dopasowania poziomów oscylacyjnych rozpuszczalnika z poziomami elektronowymi tlenu singletowego. Tym też tłumaczy się 10-krotne wydłużenie czasu życia tlenu singletowego w wodzie deuterowanej (w porównaniu z wodą „lekką”) [68].

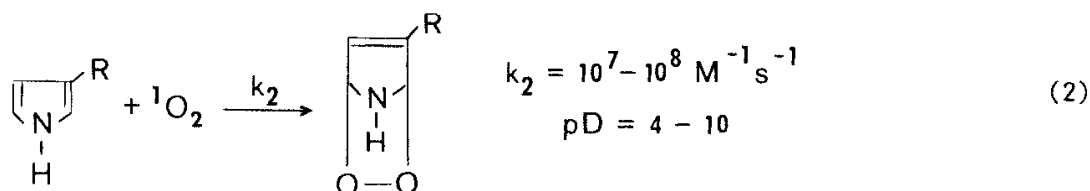
Efekt izotopowy stwierdzono we wszystkich przebadanych rozpuszczalnikach alkoholach, acetonie, chloroformie, acetonitrylu itd., w których cząsteczki zamiast wodoru miały podstawione atomy deuteru [66]. Najdłuższy, bo milisekundowy czas życia zaobserwowano w rozpuszczalnikach pozbawionych atomów wodoru i tlenu - dwusiarczku węgla i czterochloroku węgla [34].

Wzrost długości czasu życia 1O_2 w badanym układzie zwiększa prawdopodobieństwo reakcji tej aktywnej formy tlenu z substratem. Z tego też względu porównanie przebiegu fotoprocessów w rozpuszczalniku zawierającym atomy wodoru i deuteru bywa stosowane jako wygodny test diagnostyczny do identyfikacji udziału tlenu singletowego w RF [23].

3.2 REAKTYWNOŚĆ CHEMICZNA

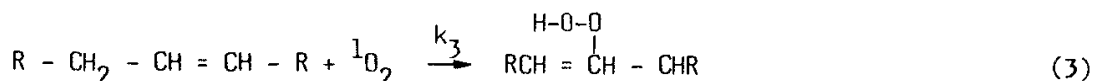
Chociaż tlen singletowy utlenia wiele cząsteczek organicznych, charakteryzuje się przy tym dość znaczną specyficznością oddziaływania i, praktycznie, nie reaguje z cząsteczkami o słabych właściwościach elektronowo-donorowych. Chemia tlenu singletowego została stosunkowo dobrze poznana i do najważniejszych reakcji 1O_2 można zaliczyć następujące procesy [22, 92]

a Reakcje addycji w układzie heterocyklicznym z wytworzeniem endonadtlenku
Typowym przykładem substratu takiej reakcji może być histydyna



Endonadtlenki z natury są nietrwałe i układ ten rozpada się wraz z wytworzeniem kwasu asparatowego, mocznika i innych produktów

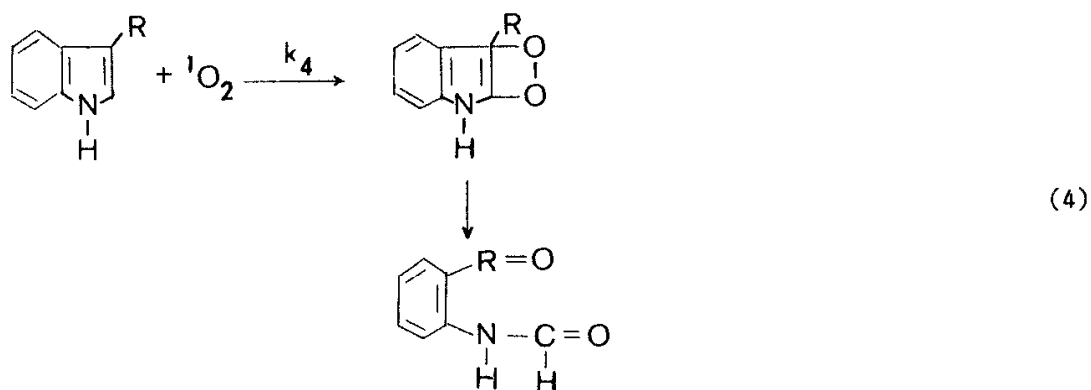
b Utlenianie olefin z wytworzeniem hydronadtlenków. Najważniejszym z biologicznego punktu widzenia substratem jest tutaj cholesterol i nienasycone kwasy tłuszczowe.



W przypadku cholesterolu stała szybkość reakcji jest stosunkowo niska i wynosi $10^5 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$

Wytworzenie podobnego hydronadtlenku w błonach może indukować łańcuchową reakcję autoutlenienia lipidowych składników błony i prowadzić do jej częściowej degradacji oraz utraty funkcji.

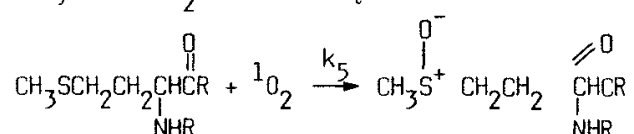
c Reakcje addycji do elektronowo-bogatych podwójnych wiązań, przykładem może być utlenianie tryptofanu



Produktami oddziaływania są m. in. N-formylokynurenina i 3 α -hydroksypyrroloindol, przy czym wydajność tworzenia tych produktów zależy od temperatury. N-formylokynurenina jest ważnym produktem fotoprzemian tryptofanu, a jej pojawienie w soczewce oka może mieć poważne następstwa patologiczne i prowadzić do indukowa-

nej zaćmy. W schorzeniu tym regularna struktura β -krystalliny, przezroczystego dla światła składnika soczewki oka, ulega zaburzeniu i zmiany te przypisuje się m.in. fotoindukowanym reakcjom tryptofanu [3, 60]. W procesach fotouczulanych mechanizm reakcji zależy od stężenia tryptofanu. Uważa się, że dla wysokich stężeń tego substratu ($> 10^{-3}$ M) przeważa typ I, czyli wolnorodnikowy.

d) Utlenianie związków siarczkowych do tlenków siarki, przykładem może być oddziaływanie $^1\text{O}_2$ z metioniną



$$k_5 = (1 - 2) \times 10^7 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1} \quad \text{dla } \text{pD} = 8,4$$

Oddziaływanie cysteiny z $^1\text{O}_2$ charakteryzuje się nieco wyższą stałą szybkości reakcji ($k = 3,7 \times 10^8 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$), zaś produktem jest cystyna. Ta reakcja z $^1\text{O}_2$ jest dość specyficzna, ponieważ typ I FU prowadzi do wytworzenia kwasu cysteinowego i nadtlenu wodoru. W przypadku metioniny reakcja rodnikowa powoduje jej dekarboksylację i dezaminację oraz wytworzenie metionalu.

Większość białek i enzymów jest podatna na uczulane fotoutlenienie. Podstawową tarczą w białkach są 3 reszty aminokwasowe: histydyna, metionina i tryptofan, które wykazują największą reaktywność z tlenem singletowym. Tyrozyna i cysteina również zaliczają się do miejsc targetowych w fotoutlenianiu białek. Jednak w tym przypadku za ich uszkodzenie odpowiedzialny jest raczej mechanizm rodnikowy. Wydajność kwantowa fotoutlenienia białek wynosi 10^{-3} , czyli jest 10-100 razy mniejsza niż wydajność kwantowa fotodestrukcji wrażliwych aminokwasów.

Do nielicznych wyjątków wśród enzymów należą dysmutaza ponadtlenkowa i peroksydaza chrzanu, które praktycznie nie ulegają inaktywacji w trakcie FU. Spekuluje się, że ta wyjątkowa fotostabilność jest następstwem specyficznej konformacji tych makromolekuł i obecności w ich centrach aktywnych paramagnetycznych jonów metali przejściowych. Jony te chronią układ przed następstwami fotoutleniania, zwiększając prawdopodobieństwo dezaktywacji stanów elektronowo wzbudzonych.

Do ważnych tarcz biologicznego fotoutlenienia zaliczają się również kwasy nukleinowe [92]. Wykazano, że wrażliwym miejscem w kwasach nukleinowych jest zasada guaninowa, której pierścień ulega utlenieniu najprawdopodobniej w wyniku oddziaływania z tlenem singletowym. Wydaje się, że pierwotnym produktem tej reakcji jest niestabilny endonadtlenek [22].

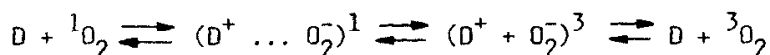
3.3 GASZENIE FIZYCZNE

Efektywny czas życia tlenu singletowego w roztworze zależy nie tylko od obecności substancji, z którymi 1O_2 może oddziaływać na drodze chemicznej, lecz również od obecności tzw. wygaszaczy. Częsteczki tych substancji przejmują energię wzbudzenia elektronowego od 1O_2 lub zwiększają prawdopodobieństwo jej dyssypacji. Najważniejszym przedstawicielem wygaszaczy 1O_2 jest β -karoten, którego stała szybkości gaszenia wynosi $3 \times 10^{10} \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$, czyli jest kontrolowana szybkością dyfuzji. Wykazano, że mechanizmem odpowiedzialnym za tak sprawne gaszenie tlenu singletowego jest przeniesienie energii ze stanu $^1g(O_2)$ na najniższy wzbudzony poziom trypletowy β -karotenu. Energia tego poziomu trypletowego musi więc być niższa niż 22 kcal/mol, co odpowiada energii najniższego poziomu singletowego tlenu. Podobny mechanizm gaszenia tlenu singletowego można postulować w przypadku biliwerdyny - prekursora bilirubiny, która jest końcowym produktem katabolizmu hemu u człowieka. Scharakteryzowany metodą laserowej fotolizy błyskowej wzbudzony stan trypletowy biliwerdyny jest odległy od poziomu podstawowego [55], tylko o 90 kJ/mol. Stała szybkości gaszenia 1O_2 przez biliwerdynę wynosi $3,3 \times 10^9 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ [66].

Warto podkreślić, że karotenoidy i biliwerdyna należą do czysto fizycznych wygaszaczy 1O_2 , stałe szybkości reakcji chemicznych tych cząsteczek z tlenem cząsteczkowym są niemierzalnie małe. Tłumaczy to wyjątkową efektywność β -karotenu w fotoprotekcji, ponieważ jedna cząsteczka tego barwnika może wielokrotnie dezaktywować tlen singletowy zanim ulegnie fotodestrukcji.

W badaniach *in vitro* wykazano, że naskórek myszy poddanych naświetlaniu UVB jest bardziej odporny na działanie promieniowania, jeśli dieta myszy zawierała karotenoidy. Zaobserwowany efekt fotoprotekcyjny przypisuje się właściwościom gaszącym karotenoidów, które akumulując się w naskórku zwierzęcia zapobiegają DF indukowanemu przez jakiś endogenny fotouczulacz [63].

Innym, fizycznym mechanizmem, który również prowadzi do efektywnego skrócenia czasu życia tlenu singletowego jest przeniesienie ładunku. Oddziaływanie to zachodzi między cząsteczką 1O_2 i cząsteczką donora, który posiada względny „nadmiar” elektronów [6].



Stała szybkości oddziaływania zależy od łatwości utlenienia donora i redukcji akceptora elektronu oraz energii wzbudzenia. Wiele substancji jest zdolnych do gaszenia 1O_2 poprzez tworzenie krótkotrwałych kompleksów z przeniesieniem ładunku. Do substancji tych można zaliczyć aminy, fenole, siarczki, kompleksy metali oraz

anionorodnik ponadtlenkowy. Niektóre z tych cząsteczek są zdolne zarówno do fizycznego gaszenia tlenu, jak i do reakcji chemicznej. Stałe szybkości wybranych, reprezentatywnych reakcji i gaszenia fizycznego tlenu singletowego podano w tabeli 1

Tabela 1

Stałe szybkości oddziaływania tlenu singletowego z wybranymi substancjami [66]

Substrat	k_R lub k_Q $M^{-1}s^{-1}$
Polieny $c = c_n$ $n = 9$	$1-3 \times 10^{10}$
Węglowodory aromatyczne	
pentacen	$4,2 \times 10^9$
tetracen	$1,2 \times 10^7$
antracen	$1,5 \times 10^5$
1,2,5,6 dwubenzantracen	1×10^4
Dimagnetyczne kompleksy niklu	$0,05-5,0 \times 10^9$
Paramagnetyczne kompleksy niklu	$0,01-1,0 \times 10^8$
Anionorodnik ponadtlenkowy	$1,3 \times 10^9$
Azydek sodowy	5×10^8
Związki heterocykliczne	
bilirubina	$2,5 \times 10^9$
chlorofil a	$7,3 \times 10^8$
1,3 dwufenyloizobenzofuran	$6,3 \times 10^8$
2,5 dwumetylofuran	$2,3 \times 10^8$
imidazol	7×10^7
furan	$1,1 \times 10^7$
histydyna	3×10^7
tryptofan	6×10^6
indol	8×10^5
Aminy alifatyczne	$0,01-5 \times 10^7$
Słarczki	$0,01-3 \times 10^7$

4. METODY DETEKCCJI 1O_2

Metody detekcji 1O_2 dzielimy na bezpośrednie i pośrednie, ze względu na rodzaj rejestrowanego parametru, oraz stacjonarne i impulsowe, ze względu na rozdzielczość czasową

Do bezpośrednich metod detekcji 1O_2 można zaliczyć jedynie pomiar charakterystycznej luminescencji tlenu singletowego przy 1268 nm, który odpowiada silnie wzbronionemu przejściu emisyjnemu $^1\Delta_g \rightarrow ^3\Sigma_g^- + h\nu_p$. Fosforencja ta zachodzi z bardzo małym prawdopodobieństwem i tylko jedna wzbudzona cząsteczka tlenu na milion emituje charakterystyczne promieniowanie w fazie ciekłej [49]. Stwarza to ogromne trudności metodyczne dla precyzyjnych pomiarów ilościowych wydajności kwantowych generowania 1O_2 , jego czasu życia i reaktywności w badanych układach. Istotnym postępowaniem w tej dziedzinie było wprowadzenie diod germanowych, które wykazują dużą fotoczułość w obszarze bliskiej podczerwieni i znaczną szybkość działania [40].

Luminescencję przy 1268 nm, w warunkach stacjonarnego generowania 1O_2 , towarzyszącą reakcjom fotouczulającym, badano w różnych rozpuszczalnikach. Jednak dopiero ostatnio wykazano możliwość dokładnych pomiarów natężenia i charakterystyki widmowej tej fosforencencji w roztworach wodnych [33]. Zaprezentowana dokładność i specyficzność metody stwarzają nadzieję na upowszechnienie tej techniki w badaniach procesów z udziałem tlenu singletowego w wielu laboratoriach fotochemicznych. Jedynym zarzutem, z jakim w obecnej wersji metoda ta może się spotkać, jest jej stosunkowo mała czułość dla jednoznacznej detekcji 1O_2 w warunkach stacjonarnych, konieczne jest generowanie znacznych strumieni tlenu singletowego ($10^{-3} M^{-1}s^{-1}$), co wymaga bardzo dużych intensywności światła aktywującego próbkę ($> 10^4 W \cdot m^{-2}$). Warunki takie raczej trudno zrealizować w badaniach fotobiologicznych bez niebezpieczeństwa niespecyficznego uszkodzenia tych układów.

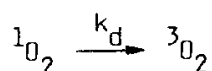
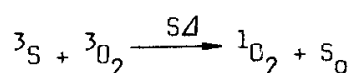
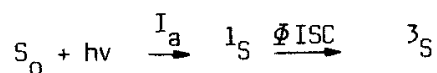
Badanie procesów rozdzielczych czasowo, niezbędne do jednoznacznego wyznaczenia czasów życia tlenu singletowego, jest możliwe jedynie przy zastosowaniu lasera impulsowego i odpowiednio czułego oraz szybkiego układu rejestracji sygnału. W praktyce stosuje się tu detektory z diodami germanowymi, chłodzonymi ciekłym azotem, i niskoszumne wzmacniacze szerokopasmowe o dużym współczynniku wzmocnienia sprzężone z szybkimi konwertorami analogowo-cyfrowymi, z których sygnał cyfrowy jest przekazywany do komputera w celu rejestracji i analizy. Pomimo znacznego postępu, badanie czasu życia 1O_2 tą metodą w roztworach wodnych jest bardzo trudne i niezbyt możliwe w układach biologicznych [31, 34, 41].

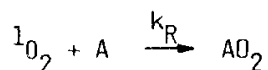
Do obiecujących, impulsowych metod pośredniej detekcji 1O_2 należy tzw. „rozdzielczo-czasowa soczewka termiczna”. Metoda ta znana od 20 lat w rejestracji stanów elektronowo wzbudzonych, które zanikają poprzez dyssypację termiczną, została zastosowana do detekcji 1O_2 dopiero w 1983 r. [27, 75, 79]. W najogólniejszych założeniach polega ona na pomiarze zmian strumienia mocy wiązki światła ciągłego, pochodzącego od lasera monitorującego (najczęściej He-Ne), indukowanych błyskami lasera wzbudzającego. Obydwie wiązki promieniowania - wzbudzającego i monitorującego - przechodzą współosiowo przez badany roztwór, w którym jest fotogenerowany 1O_2 . Chwilowa zmiana temperatury obszaru próbki, przez którą przecho-

dzi wiązka wzbudzająca, powoduje zmiany optycznego współczynnika załamania ośrodka, co z uwagi na niejednorodny poprzeczny rozkład mocy wiązki promieniowania jest równoważne z wytworzeniem chwilowej soczewki rozpraszającej. Czas trwania tej soczewki termicznej jest zdeterminowany czasem życia stanów elektronowo wzbudzonych cząstek ośrodka, generowanych na drodze wiązki wzbudzającej. W fotoreakcjach, gdzie generowany jest tlen singletowy, jedynymi stanami wzbudzonymi, które uczestniczą w chwilowym ogrzewaniu ośrodka, są S_1 i T_1 uczulacza oraz $^1\Delta_g$ tlenu cząsteczkowego. W metodzie tej uzyskuje się bardzo dobrą rozdzielczość czasową (10^{-2} - 10^{-7} s) przy stosunkowo dużej czułości detekcji stanów wzbudzonych. Pewnym ograniczeniem metody jest warunek całkowitej przezroczystości układu dla promieniowania monitorującego. Warunek ten może być trudny do spełnienia w przypadku niektórych obiektów biologicznych.

W 1972 r. Adams i Wilkinson opisali jako pierwsi zasadę rozdzielczej czasowo detekcji tlenu singletowego [1, 21]. Jest to metoda pośrednia, oparta na pomiarze zmian absorpcji wybranego akceptora tlenu singletowego (zwykle dwufenyloizobenzofuranu), jakie następują po krótkim (kilka-kilkadziesiąt nanosekund) błysku lasera. Długość fali promieniowania laserowego jest dobrana tak, aby promieniowanie to było efektywnie pochłaniane przez zastosowany uczulacz, a jednocześnie nie oddziaływało z akceptorem tlenu singletowego. Jeśli warunki eksperymentu są wybrane poprawnie, tzn. czas życia 1O_2 jest zdeterminowany relaksacją cząsteczek rozpuszczalnika, to analiza eksponencjalnego zaniku absorpcji akceptora, jako wynik reakcji z 1O_2 , umożliwia ocenę czasu życia tlenu singletowego w zastosowanym rozpuszczalniku i stałej szybkości oddziaływania z 1O_2 z akceptorem [23, 98].

Zaletami opisanej metody są duża czułość detekcji akceptora 1O_2 i względna prostota układu. Natomiast ograniczenia stosowalności metody wynikają z samej jej zasady, o szybkości oddziaływania 1O_2 z badaną substancją można wnioskować tylko pośrednio - poprzez jej wpływ na szybkość zaniku akceptora tlenu singletowego, czyli poprzez reakcję konkurencyjną. Ilościowe badania oddziaływania tlenu singletowego z substratem są możliwe również w warunkach stanu stacjonarnego. Najogólniej, analiza kinetyczna takiego procesu polega na pomiarze wydajności kwantowej tworzenia produktu fotoutlenienia w funkcji stężenia substratu [17, 23]





gdzie

I_a - intensywność promieniowania absorbowanego przez cząsteczki uczulacza,

Φ_{ISC} - wydajność kwantowa interkombinacyjnego przeniesienia uczulacza,

S - wydajność kwantowa przeniesienia energii z uczulacza na O_2 ,

k_d - stała szybkości dezaktywacji 1O_2 indukowanej rozpuszczalnikiem,

k_R - stała szybkości reakcji chemicznej substratu z 1O_2

Wydajność kwantowa produkcji 1O_2

$$\Phi = S_A \cdot \Phi_{ISC}$$

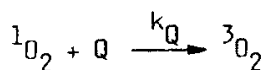
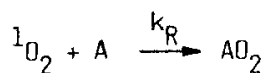
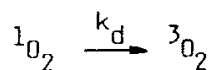
Wydajność kwantowa uczulanego fotoutlenienia substratu

$$\Phi_{AO_2} = \frac{\Phi_A k_R [A]}{k_d + k_R [A]}, \quad \frac{1}{\Phi_{AO_2}} = \frac{1}{\Phi_A} \left(1 + \frac{\beta}{[A]} \right)$$

$\beta = \frac{k_d}{k_R}$ - stosunek nachylenia prostej do wartości punktu przecięcia tej prostej z osią y

Linowy wykres $\Phi_{AO_2}^{-1} = f([A]^{-1})$ umożliwia wyznaczenie β , w identycznych warunkach można tą metodą wyznaczyć względne stałe szybkości reakcji 1O_2 z różnymi substratami

Często, wygodnym parametrem doświadczalnym w analizie uczulonego fotoutlenienia jest szybkość zmian stężenia tlenu cząsteczkowego w stanie podstawowym. Zanik O_2 , to wynik oddziaływania tlenu singletowego z substratem. Rozważa się przy tym następujące zależności [17, 85]:



gdzie

Q - wygaszacz tlenu singletowego,

k_Q - stała szybkości gaszenia 1O_2 .

Szybkość konsumpcji tlenu $-\frac{d(O_2)}{dt}$ można przedstawić następującym wyrażeniem, gdzie W jest szybkością generowania tlenu singletowego

$$-\frac{[dO_2]^{-1}}{dt} = \frac{1}{W} \cdot \left(1 + \frac{k_d + k_Q [Q]}{k_R [A]} \right)$$

Testem poprawności zastosowanej analizy jest liniowość zależności $-\frac{d[O_2]^{-1}}{dt}$ od stężenia wygaszacza $[Q]$ i odwrotności stężenia substratu $\frac{1}{[A]}$ fotoutleniania. Z punktu przecięcia prostej z osią rzędną można wyliczyć $\frac{k_d}{k_R}$, podczas gdy z nachylenia prostej stosunek $\frac{k_Q}{k_R}$.

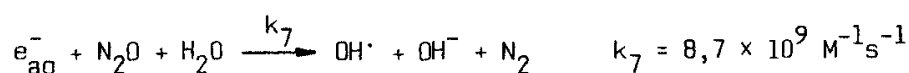
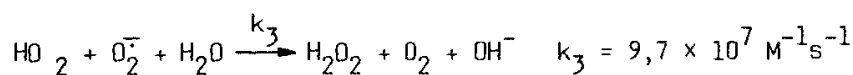
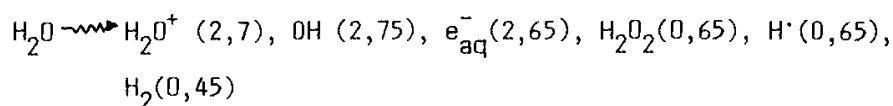
Zmiany stężenia tlenu w stanie podstawowym są bardzo ważnym parametrem doświadczalnym informującym o postępie reakcji fotoutleniania, ponieważ zarówno typ I, jak i II reakcji fotouczulonych prowadzą do konsumpcji tlenu w badanym układzie. W ostatnich latach do detekcji stężenia tlenu w roztworach z powodzeniem zastosowano tzw. oksymetrię ERP [81-85]. Jest to metoda pośrednia, w której parametry sygnału ERP odpowiednio dobranej sondy zależą od stężenia tlenu cząsteczkowego w roztworze. Zależność sygnału sondy, którą najczęściej jest znacznik spinowy, od $[^3O_2]$ są następstwem oddziaływań magnetycznych, tzw. wymiany spinowej. Oddziaływania te poszerzają samoistną szerokość linii sygnału ERP znacznika w stopniu zależnym od częstości zderzeń cząsteczek znacznika i tlenu. Przy stałym współczynniku dyfuzji O_2 w badanym układzie wielkość poszerzenia sygnału ERP sondy jest wprost proporcjonalna do stężenia tlenu w roztworze. O przydatności tej metody do badań fotochemicznych i fotobiologicznych decydują jej duża czułość detekcji zmian stężenia O_2 , wyjątkowo korzystne właściwości optyczne badanych próbek (droga optyczna 0,25 mm) i możliwość pomiaru próbek o małych objętościach rzędu kilkadziesiąt lub nawet kilku mikrolitrów [26].

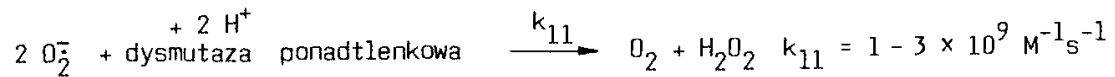
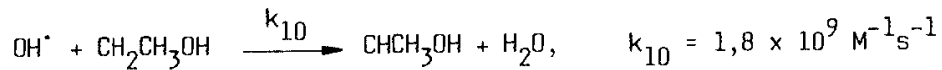
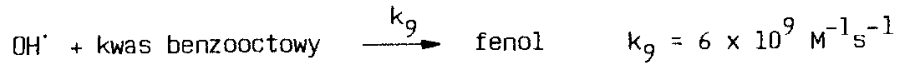
5. IDENTYFIKACJA MECHANIZMU FU

Ustalenie mechanizmu reakcji uczulonego fotoutleniania nie jest sprawą łatwą w złożonych układach heterogenicznych, takich jak komórki i tkanki. Należy bowiem pamiętać, że wykazanie obecności jakiegoś konkretnego stanu aktywnego nie przesądza jego udziału w głównym schemacie reakcji. Konieczny jest więc zarówno pomiar ilości generowanego indywiduum, jak i oznaczenie frakcji reakcji, która zachodzi z udziałem tego indywiduum. Niekiedy, dla jednoznacznego ustalenia typu reakcji fotouczulanej, porównuje się produkt takiej reakcji z produktem reakcji modelowych, w których zabezpiecza się warunki dla występowania jednego, ściśle zdefiniowanego indywiduum. Dla testowania roli tlenu singletowego w badanym fotopro-

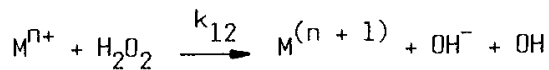
procesie stosuje się, jako metodę niezależną produkcji $^1\text{O}_2$, generatory gazowe, w których tlen singletowy powstaje w trakcie wyładowań mikrofalowych [74] lub podczas fotoaktywacji uczulacza związanego z odpowiednio wybraną żywicą jonowymienną [16]. Czas życia tlenu singletowego w fazie gazowej jest znacznie dłuższy niż w fazie ciekłej (20-50 ms), dlatego części cząsteczek $^1\text{O}_2$ udaje się przedostać do badanego roztworu i przereagować z substratem zanim ulegnie dezaktywacji. Stosując modyfikację tej metody O a h l i współprac. oceniali cytotoksyczność tlenu singletowego w przypadku różnych linii bakterii *Salmonella typhimurium* i *Escherichia coli* [16].

Rodniki ponadtlenkowe i hydroksylowe mogą być generowane w procesie radiolizy wody [7, 8]. W zależności od badanego układu i założeń eksperymentu radiolizę przeprowadza się w warunkach stacjonarnych, przy stosunkowo małych mocach promieniowania jonizującego, lub impulsowo, kiedy badana próbka absorbuje dawkę kilkudziesięciu Gy w czasie kilkudziesięciu nanosekund. Z uwagi na to, iż radioliza wody prowadzi do produkcji heterogenicznych pod względem oksydo-redukcyjnym rodników, konieczne jest zastosowanie odpowiednich zmiataaczy rodnikowych, tj. substancji, które oddziałują selektywnie z pierwotnymi produktami radiolizy wody [7, 24].





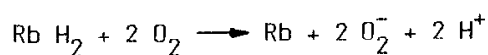
Na drodze chemicznej rodnik hydroksylowy może być produkowany w stechiometrycznych ilościach w reakcji typu Fentona [14]



Najczęściej stosowanym reagentem są kompleksy żelaza dwuwartościowego z EDTA lub DTPA. Stała szybkości rozkładu nadtlenu wodoru przez kompleks EDTA-Fe (II) jest stosunkowo mała i wynosi $k_{12} = 57 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$.

Umiarkowane stężenia rodnika ponadtlenkowego można uzyskiwać w reakcjach enzymatycznych, np. w układzie ksantyna/oksydaza ksantynowa [25]. Dla procesów, gdzie wymagane są duże stężenia O_2 , stosuje się układ KO_2 /DMSO [9].

Z uwagi na łatwość iotoredukcji flawin (w obecności odpowiedniego donora elektronów) i względnie szybkie reutlenienie tych związków tlenem cząsteczkowym, układ ten bywa czasem stosowany do generowania rodnika ponadtlenkowego



gdzie Rb, RbH_2 - ryboflawina utleniona, zredukowana,

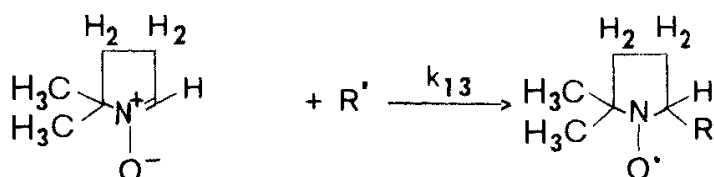
D, D_{ox} - donór e^- przed i po utlenieniu.

Efektywnymi donorami elektronów dla elektronowo wzbudzonej flawiny mogą być EDTA, metionina i NADH [64]

Identyfikacja aktywnych form uczestniczących w F_U jest możliwa niekiedy przy zastosowaniu odpowiednio dobranych wygaszaczy lub akceptorów tlenu singletowego oraz zmiataczy rodnikowych. Do najczęściej stosowanych wygaszaczy 1O_2 należą β -karoten, krocetyna (rozpuszczalna w wodzie pochodna karotenu), DABCO, tokoferol i azydek sodu. Założenia testu są dość proste: jeśli reakcja badana zachodzi z udziałem 1O_2 , to wprowadzenie jednego z wygaszaczy tlenu singletowego powinno obniżyć wydajność tej reakcji. Niepewność takiej procedury jest związana z faktem, iż nie ma absolutnie specyficznych wygaszaczy i akceptorów tlenu singletowego [23, 69].

To samo ograniczenie dotyczy rodników tlenowych. Wiele substancji o właściwościach elektronowo-donorowych jest podatnych na atak zarówno OH^\cdot , jak i $^1\text{O}_2$.

Jedną z najbardziej obiecujących metod detekcji i identyfikacji rodników tlenocentrycznych i węglocentrycznych jest metoda ERP - pułapkowania spinowego. Polega ona na wprowadzeniu do badanego układu diamagnetycznych cząsteczek typu „nitronów”, które w wyniku oddziaływania z krótkożyjącymi rodnikami tworzą stosunkowo trwałe rodniki nitroksylowe.



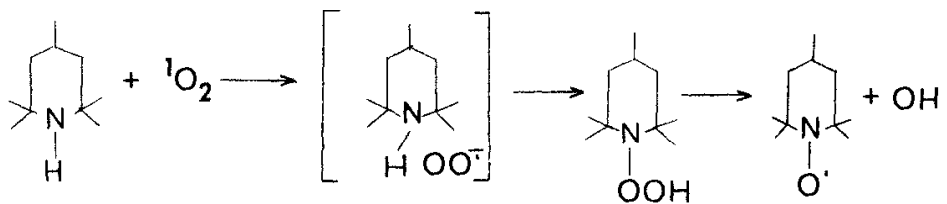
Parametry widma ERP rodnika nitroksylowego zależą od natury przyłączonego rodnika R, co umożliwia identyfikację tego rodnika. Stosowalność metody zależy od stałej szybkości pułapkowania rodników (k_{13}) i trwałości powstałego adduktu. Stosunkowo najłatwiej zastosować tę metodę do identyfikacji OH^\cdot i $e_{\text{aq}}^\cdot(\text{H}^\cdot)$, ponieważ k_{13} tych reakcji wynosi $(4,3 - 10) \times 10^9 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$, a powstały nitroksyl jest wystarczająco stabilny i posiada wyraźne, charakterystyczne widmo ERP [78].

Pułapkowanie spinowe okazało się bardzo przydatne do identyfikacji rodników węglocentrycznych, jakie powstają podczas fotolizy dopa i cysteinyl dopa - prekursorów melaniny [73]. Postuluje się, że wzmożona fotowrażliwość osobników rudych, zawierających we włosach i skórze feomelaninę może być związana ze względną fotolabilnością cysteinyl dopa, a zwłaszcza dwucysteinyl dopa - związków, które pojawiają się w trakcie syntezy tej odmiany pigmentu.

Fototoksyczne i fotoalergiczne reakcje, jakie czasami pojawiają się u pacjentów przy podawaniu niektórych leków z grupy fenotiazyn, próbowano już dawno tłumaczyć zjawiskami typu DF, jednak dokładny mechanizm tych reakcji pozostawał nieznan [39]. Ostatnio, w badaniach z zastosowaniem pułapkowania spinowego wykazano, że produktami fotolizy chlorpromazyny i jej pochodnych w środowisku beztlenowym są rodniki aryłowe powstające w wyniku oderwania atomu chloru [14]. Wydajność fotogenerowania tych rodników koreluje bezpośrednio z fototoksycznością badanych związków. W obecności tlenu są generowane natomiast rodniki nadtlenkowe. Autorzy postulują, że wysoka reaktywność rodników węglocentrycznych, które mogą odrywać atomy wodoru od różnych substratów, leży u podstaw fototoksyczności chlorpromazyny i pochodnych. Ponadto, nie wyklucza się udziału innych aktywnych produktów, ponieważ autorom omawianej pracy udało się również spułapować rodniki hydroksylowe.

Warto podkreślić, że OH^\cdot - najbardziej reaktywny ze wszystkich poznanych rodników - może powstawać w wielu procesach fotochemicznych oraz fotodynamicznych [96, 97]. Stosując pułapkowanie spinowe wykazano, że światło generuje rodniki hydroksylowe w melanie w obecności jonów żelaza [49].

Metodę „pułapkowania” tlenu singletowego z wytworzeniem długożyjących rodników nitroksylowych opisano w kilku pracach [74]. „Pułapkowanie” $^1\text{O}_2$ tylko pozornie przypomina pułapkowanie spinowe wolnych rodników. Należy pamiętać, że pomimo swej reaktywności tlenu w stanie singletowym nie jest wolnym rodnikiem (jest dwurodnikiem w stanie podstawowym, trypletowym). W metodzie tej rejestruje się intensywność sygnału ERP rodnika nitroksylowego, który pojawia się w wyniku oddziaływania $^1\text{O}_2$ z podstawowymi 2,2,6,6-tetrametylpiperydinami



Stałe szybkości oddziaływania $^1\text{O}_2$ z podstawionymi piperydinami mieszczą się w przedziale $10^5 - 10^8 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$. Jak wynika ze schematu rodniki nitroksylowe pojawiają się w wyniku reakcji wtórnych, w dodatku, procesowi temu towarzyszy generowanie rodnika hydroksylowego. Zaletą metody jest duża czułość detekcji $^1\text{O}_2$. Słabością jest jej niespecyficzność: piperydinę można utleniać wieloma czynnikami (np. H_2O_2) i generować rodniki nitroksylowe.

6. MOLEKULARNE TARCZE EFEKTÓW FOTODYNAMICZNYCH

Fotolabilność składników komórkowych, takich jak białka, enzymy, kwasy nukleinowe i lipidy błon była sprawdzona przez wielu badaczy. Celem tych doświadczeń było ustalenie najbardziej prawdopodobnej tarczy uczulanego fotoutlenienia i poznanie molekularnych mechanizmów prowadzących do uszkodzenia lub śmierci komórek. Należy jednak pamiętać, że wyniki takich badań nie mogą stanowić wystarczającej podstawy do określenia mechanizmu DF w przypadku ogólnym. Wynik DF zależy zarówno od reaktywności składników komórkowych z $^1\text{O}_2$ i stanami elektronowo wzbudzonymi uczulacza, jak również od lokalizacji uczulacza w komórce, lokalnego stężenia tlenu, obecności anty- i proutleniaczy oraz efektywności wielu komórkowych mechanizmów ochronnych [2, 5, 35, 36, 39, 52, 95].

6.1 BIAŁKA

W pracy opublikowanej w 1985 r. Straight i Spikes opisali przykłady kilkudziesięciu enzymów poddanych DF, indukowanych różnymi fotouczulaczami. Do najczęściej badanych enzymów można zaliczyć: lizozym, papainę, rybonu-

kleazę, dehydrogenazy, dekarboksylazy itd. Wśród białek nieenzymatycznych najczęściej wyników zebrano dla hemocyjaniny, ceruloplazminy, fibrynogenu, krystalliny i kollagenu [92]. Fotouczulane utlenianie białek powoduje utratę ich biologicznych funkcji. Fotouczulana inaktywacja enzymów wynika z destrukcji ważnych reszt aminokwasowych w miejscu aktywnym lub w bliskim otoczeniu miejsca aktywnego. Często, inaktywacja enzymów idzie w parze z destrukcją ich reszty histydylowej. Działanie fotodynamiczne niszczy właściwości antygenowe białek i pozbawia je zdolności do oddziaływania z antyciałem. Zwykle, szybkość fotodegradacji białek zwiększa się wraz ze wzrostem pH. Wynika to z dysocjacji protonowej reszt aminokwasowych, takich jak cysteina, histydyna i tyrozyna. Niekiedy, DF prowadzi do wytworzenia wiązań krzyżowych między cząsteczkami białka, białka i kwasu nukleinowego oraz białka i innych mniejszych cząsteczek. Efekt taki zaobserwowano, m.in., w przypadku naswietlania rozpuszczalnego kollagenu w obecności FMN jako uczulacza [31, 51, 87]. Wynikiem jest zwiększenie lepkości układu i wytworzenie termostabilnego zelu. Uczulane błękitem metylenowym fotoutlenianie ludzkiej hemoglobiny powoduje pojawienie się wiązań krzyżowych między podjednostkami tego białka. Wpływ azodyku sodu i O_2 na wydajność tego fotoprocessu świadczy o udziale tlenu singletowego [30].

6.2 KWASY NUKLEINOWE

Utrata aktywności biologicznej izolowanych kwasów nukleinowych, pod wpływem DF następuje najczęściej bez pęknięcia łańcucha polinukleotydowego i jest wynikiem fotoutlenianej destrukcji zasady guaninowej [67]. W badaniach *in situ* wykazano, że ciemne reakcje zachodzące po FU mogą prowadzić do kowalencyjnego sprzęgnięcia kwasu nukleinowego i białka [87].

Do najbardziej efektywnych fotouczulaczy kwasów nukleinowych należą dodatnio naładowane barwniki, które jonowo wiążą się z kwasami nukleinowymi, takie jak akrydyny, tiopyronina, błękit metylenowy, bromek etydyny i psoroleny [35, 92]. Uważa się, że silne wiązanie poprzez interkalację z zasadami podwójnej helisy kwasu nukleinowego preferuje typ I reakcji fotouczulanej. Pęknięcie nici DNA jako wynik DF zwykle przypisuje się reakcjom wolnorodnikowym.

Uczulane fotoutlenianie kwasów nukleinowych prowadzi do utraty zdolności zakaźnych wirusowego RNA (TMV) i DNA (bakteriofagu), utraty aktywności transformującej DNA, hamowania aktywności translacyjnej oraz do zmiany antygenowych właściwości kwasów nukleinowych.

W układach komórkowych kwasy nukleinowe są raczej mało prawdopodobnym celem DF. To prawdopodobieństwo zwiększa się jedynie w przypadku barwników o dużym powinowactwie do DNA, takich jak akrydyny czy furokumaryny. Badania porównawcze

letalności i mutagenności furokumaryn w przypadku bakterii (*E. coli*), komórek zwierzęcych (CHO) i ludzkich (fibroblasty skóry) wykazały, że toksyczność tych fotouczulaczy zmniejsza się w następującym porządku psoralen > 8-metoksypsoralen > 5-metoksypsoralen > angelicyna. Początkowo uważano, że psoraleny fotouczulają kwasy nukleinowe wyłącznie poprzez typ III reakcji, tj. bez udziału tlenu, z wytworzeniem mono- i dwufunkcyjnych adduktów z zasadami pirymidynowymi [90, 93]. W ostatnich latach zwrócono jednak uwagę na możliwość fotouczulania poprzez typ I, a nawet typ II reakcji. Badania z zastosowaniem laserowej fotolizy błyskowej wykazały korelację między wydajnością kwantową interkombinacyjnego przenoszenia monofunkcyjnych furokumaryn i ich zdolnością do generowania tlenu singletowego a biologiczną aktywnością zależną od tlenu w przypadku komórek drożdży [10, 11, 77, 89].

Dokładniejsze poznanie molekularnych mechanizmów działania furokumaryn w reakcjach fotouczulanych ma również znaczenie praktyczne z uwagi na ich stosowalność w fototerapii niektórych schorzeń skóry [71].

Rozważa się także specyficzne fotoutlenianie kwasów nukleinowych *in vivo* poprzez uczulanie endogennymi związkami, które absorbują promieniowanie z zakresu UVA ($\lambda > 320$ nm), czyli promieniowanie Słońca, docierające do powierzchni Ziemi. Do związków tych należą 2-tiouracyl i 4-tiourydyna, które indukują fotouczulone pękanie pojedynczych nici DNA [15, 72]. Podczas naświetlania komórek ludzkich promieniowaniem monochromatycznym (405 nm) zaobserwowano zwiększoną częstotliwość wiązań krzyżowych między DNA i białkiem [37]. Nie wiadomo dokładnie, jaki endogenny barwnik jest tutaj fotouczulaczem, do najbardziej prawdopodobnych fotouczulaczy tego procesu zalicza się flawiny.

6.3. SKŁADNIKI 8ŁDN KOMÓRKOWYCH

Ważną grupę biologicznych cząsteczek, które są podatne na FU, są lipidy [53, 95]. Do związków z tej grupy można zaliczyć zarówno nienasycone lipidy (kwasy tłuszczowe, trójglicerydy, fosfolipidy), jak również biocząsteczki rozpuszczalne w nienasyconych lipidach (cholesterol, wit. D, β -karoten, sterole, steroidy, tokoferole i prostaglandyny). Fotouczulone utlenianie nienasyconych kwasów tłuszczowych zachodzi w reakcjach typu I i typu II. W obu przypadkach powstają hydronadtlenki, jednak rozkład ich izomerów jest różny. W reakcjach z udziałem tlenu singletowego powstają w różnych ilościach izomery skonjugowanych i nieskonjugowanych hydronadtlenków, podczas gdy w reakcjach rodnikowych tworzą się jedynie izomery skonjugowanych hydronadtlenków.

Fosfolipidy i trójglicerydy ulegają działaniu fotodynamicznemu, przy czym produktem reakcji z udziałem $^1\text{O}_2$ jest mieszanina mono- i dwu-hydronadtlenków. Bardzo

charakterystyczne produkty FU obserwuje się w przypadku cholesterolu. Podczas gdy utlenianie tlenem singletowym prowadzi do wytworzenia głównie 5- α -hydronadtlenku, to w reakcji rodnikowego utleniania tworzy się para 7 α - i 7 β -hydronadtlenku. Te specyficzne produkty peroksydacji cholesterolu wykorzystuje się do identyfikacji mechanizmu fotoutlenienia membran zarówno w układach modelowych, jak i komórkowych [29, 54]. Peroksydacja lipidów prowadzi do destrukcji błon biologicznych i spekuluje się, że może być przyczyną fotouczulanej kancerogenezy [28].

W badaniach na komórkach z użyciem różnych fotouczulaczy wykazano, że jednym z ważnych efektów DF jest modyfikacja błon komórkowych i utrata ich funkcji. Do takich uczulaczy można zaliczyć związki hydrofobowe, które lokalizują się wybiórczo w błonach, np pochodne porfiryn, tiofeny, a nawet flawiny. Barwniki polarne także mogą powodować uszkodzenie błon cytoplazmatycznych i organeli subkomórkowych, o ile produkty FU zdążą przereagować ze składnikami błony zanim ulegną spontanicznej dezaktywacji lub zanikną w reakcjach konkurencyjnych.

Warto w tym miejscu zwrócić uwagę na fakt, iż krótkożyjący stan $^1\Delta_g$ tlenu cząsteczkowego jest zdolny do przebycia dość znacznej (w skali subkomórkowej) odległości zanim ulegnie dezaktywacji. Przyjmuje się, że na każdą mikrosekundę życia cząsteczka 1O_2 może przedyfundować w środowisku wodnym odległość 0,1 μm .

Duże zdolności do swobodnej penetracji w układzie komórkowym przypisuje się innemu, ważnemu produktowi aktywacji tlenu cząsteczkowego - anionorodnikowi ponadtlenkowemu. Indywidualnie to jest raczej mało reaktywne w środowisku wodnym, stałe szybkości oddziaływania z wieloma składnikami komórkowymi są znacznie niższe niż dla tlenu singletowego [8, 86]. Jednakże uważa się, że anionorodnik ponadtlenkowy może pośrednio generować niezwykle reaktywne rodniki hydroksylowe poprzez aktywację utlenionych jonów metali (Cu^{2+} , Fe^{3+}), które w zredukowanej formie rozkładają nadtlenek wodoru [4, 49].

Spontaniczna dysmutacja rodnika ponadtlenkowego zależy bardzo silnie od pH i właściwości protogennych ośrodka. Stałe szybkości dysmutacji O_2^- w środowisku wodnym (przy pH > 6) można aproksymować uproszczonym wzorem

$$k_{\text{obs}} = 6 \times 10^{12} [\text{H}^+] \text{M}^{-1}\text{s}^{-1}$$

Doczywiście w komórkach, które posiadają znaczne stężenie dysmutazy ponadtlenkowej, efektywny czas życia rodnika ponadtlenkowego będzie znacznie krótszy z uwagi na bardzo wydajny proces enzymatycznej dysmutacji ($k_{\text{SOD}} \sim 10^9 \text{M}^{-1}\text{s}^{-1}$).

7 ZAŁOŻENIA TERAPII FOTODYNAMICZNEJ

W opublikowanej w 1984 r. pracy jeden z pionierów fotodynamicznej terapii (TFD) nowotworowej D o u g h e r t y dokonał podsumowania wyników tej terapii opartego na mniej więcej 1400 opisanych przypadkach klinicznych w USA, Japonii, Chinach, Australii, Kanadzie, Włoszech i Francji [20].

Wśród nowotworów poddanych TFD z zastosowaniem „pochodnej hematoporfiryny” (Hpd) znalazły się rak skóry (m.in. metastazujący nowotwór piersi, czerniak złośliwy, mięsak Kaposiego i kilka odmian karcinomy), nowotwory płuc, gałki ocznej, pęcherza moczowego i in. Uzyskane wyniki – regresja nowotworu, przyhamowanie wzrostu czy całkowity jego zanik w niektórych przypadkach, usprawiedliwiają, w przeświadczeniu klinicystów i fotobiologów, rosnące zainteresowanie tą formą terapii nowotworowej

Mechanizm molekularny TFD polega na fotouczulonym utlenianiu ważnych składników komórkowych błon cytoplazmatycznych, organelli komórkowych i niektórych enzymów. Należy jednak podkreślić, że, jak dotąd, najważniejsza tarcza TFD nie została jednoznacznie ustalona [43, 65].

„Pochodna hematoporfiryny” to umowna nazwa fotouczulającego materiału, który uzyskuje się po katalizowanej kwasem acetylacji hematoporfiryny i następnie inkubacji w alkaliach. Analiza zawartości preparatu z użyciem wysokociśnieniowej chromatografii cieczowej wykazała, że Hpd zawiera ok. 50% monomerycznych związków, takich jak hematoporfiryna, hydroksyetylowinylodeuteroporfiryna i protoporfiryna [44, 45]. Pozostałość, to nierozdzielona chromatograficznie, hydrofobowa frakcja, którą pierwotnie nazwano DHE (od estry dwuhematoporfiryny) ale, która zawiera najpewniej oligomery o wyższej masie cząsteczkowej. Z badań wynika, że jedynie hydrofobowe, wysokocząsteczkowe frakcje Hpd wykazują zdolność akumulacji w tkance nowotworowej i aktywność fotouczulającą. Frakcje te charakteryzują się wysoką tendencją do agregacji w środowiskach polarnych. W formie zagregowanej frakcja ta ani nie fluoryzuje, ani nie posiada zdolności do generowania tlenu singletowego pod wpływem promieniowania widzialnego. Dopiero w rozpuszczalnikach organicznych następuje rozpad agregatów DHE i efektywna fotoprodukcja $^1\text{O}_2$. Wydaje się, że mechanizmem odpowiedzialnym za komórkową akumulację Hpd in vivo jest endocytoza. Postuluje się tu udział receptorów lipoproteinowych błony komórkowej z uwagi na wykazane powinowactwo DHE do białek lipidowych in vitro. Ponadto, stosując metodę mikrospektrofluorymetrii, M o r l i e r e i współpracownicy opisali ostatnio proces wprowadzenia dimerów porfiryny do pojedynczej komórki fibroblastów mysich po zastosowaniu lipoprotein z surowicy ludzkiej [47, 76].

Komórki nowotworowe nie posiadają wyższego aniżeli komórki normalne powinowactwa w stosunku do Hpd. Akumulacja tego fotouczulacza w guzie jest wynikiem właściwości samego guza przeciekających naczyń krwionośnych, słabo działającego

układu limfatycznego oczyszczania, obecności makrofagów, które umożliwiają zatrzymywanie agregatów w komórce, znacznego stężenia receptorów lipoproteinowych i obniżonego (w porównaniu z komórkami normalnymi) pH

W typowej terapii fotodynamicznej dawka Hpd wynosi zwykle 3-5 mg/kg wagi ciała pacjenta. Fotouczulacz jest podawany na 3-5 dni przed naświetlaniem. Najczęściej stosuje się światło czerwone (λ_{\max} 630 nm) pochodzące z lamp konwencjonalnych z zastosowaniem filtrów lub lasera barwnikowego pracującego w reżymie ciągłym albo impulsowym. Pomimo iż profiryny (włączając Hpd) pochłaniają światło w obszarze czerwonym ze znacznie mniejszą wydajnością niż w pasmie Sorreta, z uwagi na dużą penetrację światła długofalowego w tkance, wypadkowy efekt jest przy tym promieniowaniu optymalny.

Dawki światła zależą od rodzaju nowotworu, jego lokalizacji i stopnia upigmentowania tkanki. Najczęściej stosuje się 10-75 J/cm², chociaż opisane są przypadki, kiedy całkowita dawka przekraczała 1000 J/cm² [19]. W sytuacji dobrze zlokalizowanych, powierzchniowych guzów napromienianie ogranicza się do samego obszaru nowotworu, co minimalizuje prawdopodobieństwo uszkodzenia zdrowej, sąsiadującej z guzem tkanki.

Obiecującą strategię zwiększonej selektywności fotodynamicznej terapii opisali ostatnio Osieroff i współpracownicy [70]. Polega ona na zastosowaniu fotouczulaczy, które bardziej wybiórczo nagromadzają się w komórkach nowotworowych. Dwa podejścia metodyczne zostały zaprezentowane przez cytowanych autorów: tzw. fotoliza targetowana antyciałami i selektywna fotoliza komórek karcinomy. W pierwszej metodzie fotouczulacz o wybranych właściwościach optycznych wiąże się z monoklonalnymi antyciałami, które rozpoznają specyficzne antygeny komórek nowotworowych. W drugiej metodzie wykorzystuje się właściwości selektywnego nagromadzenia niektórych dodatnio naładowanych barwników, takich jak Rodomina 123 lub barwniki cjanowe we wnętrzu (głównie mitochondriach) komórek karcinomy. Nie wiadomo właściwie, dlaczego komórki karcinomy tak bardzo różnią się zdolnością akumulacji tych kationowych barwników w porównaniu z komórkami normalnymi. Spekuluje się, że być może wynika to z bardziej ujemnego potencjału membranowego komórek karcinomy.

Opisane metody selektywnej fotochemoterapii nowotworów zasługują na uwagę, ponieważ uzyskanie znacznego nagromadzenia fotouczulacza w komórkach nowotworowych umożliwiłoby uzyskanie fotouszkodzeń mikroskopijnie selektywnych. Sprawa ta ma szczególne znaczenie w przypadku rozsianych lub słabo zlokalizowanych nowotworów.

Maszynopis wpłynął do Redakcji 2 XII 1987

LITERATURA

- [1] Adams D. R., Wilkinson F., J. Chem. Soc., Faraday Trans II, 68, 586 (1972)
 [2] Amagasa J., Photochem Photobiol., 33, 943 (1981).

- [3] Andley U P, Chapman S F, Photochem Photobiol, 44, 67 (1986)
- [4] Aust S D, Morehouse L A, Thomas G F, J Free Radical in Biology and Medicine, 1, 3 (1985)
- [5] Bagchi B, Basu S, Photochem Photobiol, 29, 403 (1979)
- [6] Bellus D, [w] „Singlet oxygen, reactions with organic compounds and polymers” Eds B Rånby, J F Råbek, John Wiley and Sons, Chichester 1978, s 61
- [7] Bensasson R V, Land E J, Truscott T G, [w] „Flash photolysis and pulse radiolysis Contribution to the chemistry of biology and medicine”, Pergamon Press, Oxford 1983.
- [8] Bieliski B H J, [w] „Oxy radicals and their scavenger systems”, t 1 Eds G Cohen, R A Greenwald, Elsevier Biomedical, New York 1983, s 1
- [9] Bieliski B H J, Saito E, „Deuterium Isotope Effect on the Decay Kinetics of Perhydroxyl Radical”. J Phys Chem, 75, 2263 (1971).
- [10] Blan Q A, Grossweiner L I, Photochem Photobiol, 45, 177 (1987)
- [11] Bordin F, Conconi M T, Capozzi A, Photochem Photobiol, 46, 301 (1987)
- [12] Brasseur N, Ali H, Langlois R, Wagner J R, Rousseau J, van Lier J E, Photochem Photobiol, 45, 581 (1987)
- [13] Chignell C F, Motten A G, Buettner G R, Environmental Health Prospective, 64, 103 (1985)
- [14] Cohen G [w] „CRC handbook of methods for oxygen radical research” Ed R A Greenwald, CRC Press, Boca Raton 1985, s 55
- [15] Cunningham M L, Krinsky N I, Giovanazzi S M, Peak M J, J Free Radical Biol, Med, 1, 381 (1985)
- [16] Dahl T A, Midden W R, Hartman P E, Photochem, Photobiol 46, 345 (1987)
- [17] Davidson R S, Trethewey K R., J Chem Soc Perkin II, 167 (1977)
- [18] Delmelle M, Photochem Photobiol, 28, 357 (1978).
- [19] Dougherty T J, Photochem Photobiol, 45, 879 (1987)
- [20] Dougherty T J, [w] „Porphyrin localization and treatment of tumors” Eds. D R. Doiron, C J Comer, Alan Riss, New York 1984, s 41
- [21] Farmilo A., Wilkinson F, Photochem Photobiol, 1B, 447 (1973).
- [22] Foote C S, [w] „Porphyrin localization and treatment of tumors” Eds D R Doiron, C J Gomer, Alan R. Liss, New York 1984, s 3
- [23] Foote C S, [w] „Singlet oxygen”. Eds H H Wasserman, R W Hurray, Academic Press, New York 1979, s 139
- [24] Forhataziz - Ross A. B, [w] „Selected specific rates of reaction of transients from water in aqueous solution. III hydroxyl radical and perhydroxyl radical”, NSRDS US Department of Commerce 1977, s 49.
- [25] Fridovich I, [w] „CRC handbook of methods for oxygen radical research” Ed R A Greenwald, CRC Press, Boca Raton 1985, p 51
- [26] Francisz W., Lai C S, Hyde J S., Proc Natl. Acad Sci USA, 82, 411 (1985)
- [27] Fuke K, Ueda M, Itoh M., J. Am Chem Soc, 105, 1091 (1983)
- [28] Girotti A W, Photochem Photobiol., 38, 745 (1983)
- [29] Girotti A W, Bachowski G J, Jordan J. E., Lipids, 22, 401 (1987)
- [30] Girotti A. W., Lyman S., Deziel M. R, Photochem. Photobiol, 29, 1119 (1979)
- [31] Gorman A. A, Hamblett I, Rodgers M J, Photochem. Photobiol, 45, 215 (1987)

- [32] Hahn B S., Joshi P C, Kan L S, Wang S. Y., *Photochem. Photobiophys.*, 3, 113 (1981).
- [33] Hall R D, Chignell C. F., *Photochem. Photobiol.*, 45, 459 (1987)
- [34] Hurst J R., Schuster G. B., *J Am. Chem. Soc.*, 105, 5756 (1983)
- [35] Ito T, *Photochem. Photobiol*, 28, 493 (1978).
- [36] Ito T., *Photochem Photobiol*, 31, 565 (1980).
- [37] Ito A., Krinsky N I., Cunningham M. L., Peak M J, *Free Radical Biology and Medicine*, 3, 111 (1982).
- [38] Jose J. G., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 76, 469 (1979).
- [39] Kalyanaraman B., Feix J B., Sieber F., Thomas J. P, Girotti A W., *Proc Natl Acad Sci. USA*, 84, 2999 (1987)
- [40] Kasha M, [w:] „Singlet D₂”, t. 1 Ed. A. A. Frimer, CRC Press, Boca Raton 1985, s 1
- [41] Keene J. P., Kessel D., Land E. J., Redmond R. W, Truscott T G., *Photochem Photobiol.*, 43, 117 (1986).
- [42] Kelly J. M, Putten W J. M., Mc Connell D. J., *Photochem Photobiol.*, 45, 167 (1987).
- [43] Kessel D., *Photochem. Photobiol.*, 44, 489 (1986).
- [44] Kessel D., *Photophysics, Photochem Photobiol*, 39, 851 (1984).
- [45] Kessel D., Thomson P., Saatio K., Nantwi K. D., *Photochem. Photobiol.*, 45, 787 (1987).
- [46] Kochevar I, *Photochem Photobiol.*, 45, 891 (1987).
- [47] Kohen E., Reyftmann J P., Morliere P., Santus R, Kohen C., Mangel W F, Dubertret L., Hirschberg J. G., *Photochem. Photobiol*, 44, 471 (1986).
- [48] Koppenol W H, Butler J., *Adv. Free Radical Biology and Medicine*, 1, 91 (1985).
- [49] Korytowski W., Pilas B, Sarna T., Kalyanaraman B, *Photochem. Photobiol.*, 45, 185 (1987).
- [50] Krasnovsky Jr., A. A., *Photochem. Photobiol.*, 29, 29 (1979).
- [51] Krishna C M., Decarroz C., Wagner J. R., Cater J., Riesz R., *Photochem. Photobiol.*, 46, 175 (1987).
- [52] Lambert C. R., Reddi E., Spikes J. D, Rodgers M. A. J, Jori G., *Photochem. Photobiol*, 44, 595 (1986)
- [53] Lamola A A, [w:] „Research in photobiology”. Ed. A. Castellani, Plenum, New York 1977, s 215
- [54] Lamola A. A., Yamane T., Trozzolo A. M., *Science*, 179, 1131 (1973).
- [55] Land E. J., *Photochem. Photobiol.*, 29, 483 (1979).
- [56] Land E. J., Rushton F. A. P., Beddoes R. L., Bruce J M, Dawson S. C., Mills O S., *J. Chem. Soc. Chem. Commun.*, 22 (1982)
- [57] Laustriat G., *Biochemie*, 68, 771 (1986).
- [58] Li A. S. W., Chignell C F., Hall R D., *Photochem. Photobiol.*, 46, 379 (1987).
- [59] Lochman E. R., Michaler A., *Photochem. Photobiol.*, 29, 1199 (1979).
- [60] Mandal K., Bose S K., Chakrabarti B., *Photochem. Photobiol*, 43, 515 (1986).
- [61] Martin J. P., Logsdon N., *Photochem. Photobiol.*, 46, 45 (1987)
- [62] Matheson I. B. C., Rodgers M. A. J., *Photochem. Photobiol.*, 36, 1 (1982).
- [63] Mathews-Roth M. M., *Photochem. Photobiol.*, 43, 91 (1986).
- [64] Michelson A. M., [w:] „CRS handbook of methods for oxygen radical research”. Ed. R. A. Greenwald, CRC Press, Boca Raton 1985, s. 71.
- [65] Maan J., *Photochem. Photobiol.*, 43, 681 (1987).
- [66] Monroe B. M., [w:] „Singlet D₂”, t. 1 Ed A. A. Frimer, CRC Press, Boca Raton 1985, s. 177.

- [67] Nieuwint A. W. H., Aubry J. M., Arwert F., Kortbeek H., Herzberg S., Joenje H., Free Radical Res Commun., 1, 1 (1985)
- [68] Nilsson R., Kearns D. R., Photochem. Photobiol., 17, 65 (1973)
- [69] Ogryzlo E. A., [w] „Singlet oxygen, reactions with organic compounds and polymers” Eds B. Rånby, J. F. Råbek, John Wiley and Sons, Chichester 1978, s. 17
- [70] Oseroff A. R., Ara G., Ohnoha D., Aprille J., Bommer J. C., Yarmush M. L., Foley J., Cincotta L., Photochem Photobiol., 46, 83 (1987)
- [71] Pathak M. A., Krämer D. M., Fitzpatrick T. B., [w:] „Sunlight and man”. Ed M. A. Pathak in University of Tokyo Press 1974, s. 335
- [72] Peak J. G., Peak M. J., Foote C. S., Photochem Photobiol., 44, 111 (1986)
- [73] Pilas B., Felix C. C., Sarna T., Kalyanaraman B., Photochem Photobiol., 44, 689 (1986)
- [74] Rabek J. F., [w] „Singlet O_2 ”, t. 4 Ed A. A. Frimer, CRC Press, Boca Raton 1985, s. 1
- [75] Redmond R. W., Heihof K., Braslavsky S. E., Truscott T. G., Photochem Photobiol., 45, 209 (1987)
- [76] Reyftmann J. P., Kohen E., Morliere P., Santus R., Kohen C., Mangel W. F., Dubertret L., Hirschberg J. G., Photochem Photobiol., 44, 461 (1986)
- [77] Ronfard-Haret J. C., Averbeck D., Bensasson R. V., Bisagni E., Land E. J., Maron J., Photochem Photobiol., 45, 235 (1987).
- [78] Rosen G. M., Finkelstein E., Adv Free Radical Biology and Medicine, 1, 345 (1985)
- [79] Rossbroich G., Garcia N. A., Braslavsky S. E., J Photochem, 31, 37 (1985)
- [80] Ruth G., Schwartz S., Stephenson B., Science, 198, 199 (1977)
- [81] Sarna T., Zagad. Biof Współcz, 12, 119 (1987).
- [82] Sarna T., Dulęba A., Korytowski W., Swartz H. M., Arch Biochem. Biophys, 200, 140 (1980)
- [83] Sarna T., Menon I. A., Sealy R. C., Photochem Photobiol 42, 529 (1985)
- [84] Sarna T., Pilas B., Land E. J., Truscott T. G., Biochim Biophys Acta, 883, 162 (1986)
- [85] Sarna T., Sealy R. C., Photochem Photobiol, 39, 69 (1984)
- [86] Sawyer D. T., Roberts J. L., Calderwood T. S., Tsuchigata T., Stamp J. J., [w] „Oxy radicals and their scavenger systems”, t. 1 Eds G. Cohen, R. A. Greenwald, Elsevier Biomedical, New York 1983, s. 8
- [87] Schiavon O., Veronese F. H., Photochem Photobiol., 43, 243 (1986)
- [88] Sealy R. C., Sarna T., Wanner E. J., Reszka K., Photochem Photobiol, 40, 453 (1984)
- [89] Singh H., Vadasz J. A., Photochem Photobiol., 28, 539 (1978).
- [90] Song P. S., Tapley Jr, K. J., Photochem Photobiol 29, 1177 (1979)
- [91] Spikes J. D., Photochem Photobiol., 43, 691 (1986)
- [92] Straight R. C., Spikes J. D., [w] „Singlet O_2 ”, t. 4 Ed A. A. Frimer, CRC Press, Boca Raton 1985, s. 91.
- [93] Straub K., Kanne D., Hearst J. E., Rapport H., J Am Chem. Soc, 103, 2347 (1981)
- [94] Torinuki W., Miura T., Seiji M., B. J. Dermatology, 102, 17 (1980).

- [95] Valenzeno D. P., Photochem Photobiol., 46, 147 (1987).
- [96] Van Steveninck J., Dubbelman T.M.A.R., Verwijh H [w:] „Advances in experimental medicine and biology. Porphyrin photosensitization”, t 160. Eds. D. Kessel, T. Dougherty, New York 1981, s. 227.
- [97] Van Steveninck J., Tijssen K, Boegheim J.P.J, Van der Zee J., Dubbelman T.M.A.R., Photochem. Photobiol., 44, 711 (1986).
- [98] Wilkinson F., [w:] „Singlet oxygen, reactions with organic compounds and polymers”. Eds. B. Rånby, J. F. Råbek, John Wiley and Sons, Chichester 1978, s. 27.
- [99] Wintrobe M. M., [w:] „Clinical hematology” Eds Lea and Febiger, Philadelphia 1974, s. 1021

Tadeusz Sarna

THE ROLE OF SINGLET OXYGEN AND FREE RADICALS
IN PHOTOSENSITIZED REACTIONS AND PHOTODYNAMIC ACTION

S u m m a r y

Three types of photosensitized reactions (PR) that can occur in biological systems are discussed in this review paper.

Type I and type II of PR are oxygen-dependent processes that involve free radicals and singlet molecular oxygen, respectively. Type III of PR does not depend on oxygen and leads to free radical and/or molecular adduct formation. Physicochemical properties of singlet O_2 , hydroxyl radical and superoxide anion are summarized and methods for detection and characterization of these reactive species are described. Photosusceptibility of nucleic acids, proteins and lipids, as possible biological targets in photodynamic action, is discussed. Molecular basis for photodynamic therapy -- a new, photobiological method for cancer treatment is also outlined.

Doc. dr hab. TADEUSZ SARNA
Zakład Biofizyki
Instytut Biologii Molekularnej
im. Jana Zurzyckiego
Uniwersytetu Jagiellońskiego
al. Mickiewicza 3
31-120 Kraków

Krzysztof Kowalski

MODELOWANIE MATEMATYCZNE REAKCJI WIĄZANIA LIGANDÓW
Z RECEPTORAMI W WARUNKACH RÓWNOWAGI

1. WSTĘP

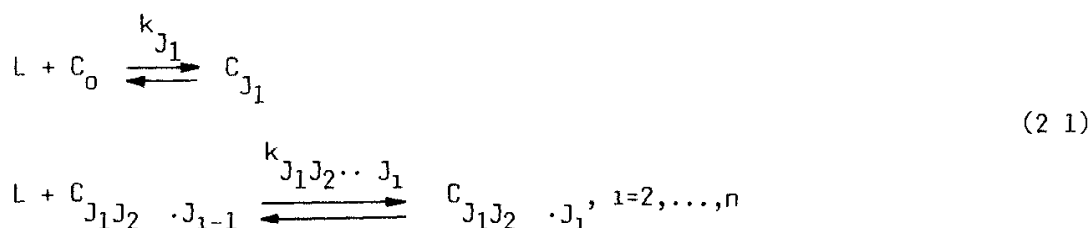
Trudno przecenić rolę, jaką pełnią reakcje ligandów z makrocząsteczkami, a zwłaszcza białkami w przebiegu znakomitej większości procesów fizjologicznych. Można zaryzykować twierdzenie, że praktycznie wszystkie zjawiska biologiczne są związane z takimi właśnie reakcjami. Zrozumiałe jest więc zainteresowanie modelowaniem matematycznym reakcji typu ligand-receptor, tym bardziej że powstałe niedawno nowe techniki eksperymentalne pozwalają na dokładniejsze śledzenie takich reakcji. Użycie modelu matematycznego dla interpretacji danych empirycznych wiązania ligandów z receptorami pozwala w wielu przypadkach wyznaczyć takie ważne charakterystyki, jak liczba receptorów znajdujących się na cząsteczce białka nośnikowego, liczba klas receptorów czy też stopień powinowactwa ligandu do receptora, może również rozstrzygnąć o istnieniu oddziaływań między miejscami wiążącymi.

Celem tej pracy jest omówienie podstawowych modeli matematycznych reakcji wiązania ligandów z receptorami w warunkach równowagi. Koncentrujemy się przy tym na dyskusji reakcji wiązania homogenicznego ligandu z cząsteczkami białka nośnikowego, które nie ulegają znacznym zmianom konformacyjnym oraz nie rozpadają się pod wpływem przyłączonych ligandów. Nie rozpatrujemy więc przypadku, gdy z białkiem wiążą się ligandy różnego rodzaju, nie badamy reakcji transportu lub reakcji typu enzym-substrat ani też nie bierzemy pod uwagę modeli analogicznych do modelu Monoda-Wymana-Changeux (MWC), w którym białko nośnikowe składa się z protomerów, mogących znajdować się w 2 stanach konformacyjnych. Zwięzłe omówienie tych zagadnień można znaleźć w monografii [2].

Szczególną wagę przywiązuje się w tej pracy do ścisłości matematycznej przedstawianych twierdzeń. Odbiór zaprezentowanych tutaj treści nie wymaga jednak władania wyrafinowanym aparatem matematycznym.

2 OGÓLNY MODEL WIĄZANIA LIGANDÓW Z RECEPTORAMI

Niech L oznacza ligand, C_0 - cząsteczkę białka. Załóżmy dalej, że na cząsteczce białka znajduje się n receptorów, ponumerujemy je od 1 do n i oznaczymy przez $C_{J_1 J_2 \dots J_1}$ kompleks białka z i związanymi ligandami $i = 1, \dots, n$ powstały przez zajęcie miejsca wiążącego J_1 w pierwszym kroku reakcji, miejsca J_2 w drugim kroku itd., gdzie $1 \leq J_r \leq n$ oraz $J_r \neq J_s$, gdy $r \neq s$, wówczas najbardziej ogólny model wiązania cząstek ligandu L z receptorami jest reprezentowany przez następujący ciąg reakcji



gdzie $k_{J_1 J_2 \dots J_r}$, $r = 1, 2, \dots, n$ oznacza stałą asocjacji kompleksu $C_{J_1 J_2 \dots J_r}$.

Zauważmy, że model opisany równaniami (2.1) jest w istocie modelem z pamięcią. Rzeczywiście, rozróżniamy kompleksy $C_{J_1 J_2 \dots J_i} \stackrel{1}{=} C_{\sigma(J_1) \sigma(J_2) \dots \sigma(J_i)}$, $i = 1, \dots, n$, gdzie σ jest dowolną permutacją zbioru $\{J_1, J_2, \dots, J_i\}$ nie będącą tożsamością. Innymi słowy, rozróżniamy kompleksy mające różną historię powstania.

Rozważmy reakcje (2.1) w stanie równowagi. Ciąg równań opisujących stan równowagi reakcji (2.1) ma następującą postać (w pracy tej oznaczamy zarówno cząsteczki, jak i ich stężenia tym samym symbolem)

$$k_{J_1} L C_0 = C_{J_1} \quad (2.2a)$$

$$k_{J_1 J_2 \dots J_i} L C_{J_1 J_2 \dots J_{i-1}} = C_{J_1 J_2 \dots J_i}, \quad i = 2, \dots, n \quad (2.2b)$$

Zauważmy, że (2.2b) jest w istocie ciągiem równań rekurencyjnych. Rozwiązanie równań (2.2a), (2.2b) jest dane następującym wzorem.

$$C_{J_1 J_2 \dots J_i} = C_0 \left(\prod_{s=1}^i k_{J_1 J_2 \dots J_s} \right) L^i, \quad i = 1, \dots, n \quad (2.3)$$

W eksperymentach badających wiązanie ligandów z receptorami mierzone jest oprócz stężenia L swobodnego ligandu, stężenie L_b związanego ligandu, równe.

$$L_b = \sum_{i=1}^n L^i \sum_{J_1 J_2 \dots J_i} C_{J_1 J_2 \dots J_i} \quad (2.4)$$

oraz całkowite stężenie C_{00} cząsteczek białka nośnikowego

$$C_{00} = C_0 + \sum_{i=1}^n \sum_{J_1 J_2 \dots J_i} C_{J_1 J_2 \dots J_i} \quad (2.5)$$

Dzieląc stronami (2.4) przez (2.5) i uwzględniając (2.3) otrzymujemy równanie opisujące związek między stężeniami związanego i swobodnego ligandu

$$\nu = \frac{\sum_{i=1}^n \sum_{J_1 J_2 \dots J_i} \left(\prod_{s=1}^i k_{J_1 J_2 \dots J_s} \right) L^i}{1 + \sum_{i=1}^n \sum_{J_1 J_2 \dots J_i} \left(\prod_{s=1}^i k_{J_1 J_2 \dots J_s} \right) L^i} \quad (2.6)$$

gdzie $\nu = \frac{L_b}{C_{00}}$ jest tzw. stopniem nasycenia określającym średnią liczbę ligandów przywiązanych do indywidualnej cząsteczki białka nośnikowego, oczywiście $0 \leq \nu \leq n$

Równanie (2.6) jest podstawowym równaniem reakcji wiązania ligandów z receptorami. Wszystkie fakty omawiane w tej pracy są konsekwencjami tego równania

Model (2.1) opisywany jest dużą liczbą parametrów. Liczba m_n stałych asocjacji $k_{J_1 J_2 \dots J_i}$, $i = 1, \dots, n$ występujących w (2.1) jest równa

$$m_n = \sum_{i=1}^n V_1^n = \sum_{i=1}^n \prod_{j=1}^i (n - j + 1) \quad (2.7)$$

gdzie V_1^n oznacza liczbę wariacji z n elementów po i .

Dla przykładu $m_2 = 4$, $m_3 = 15$, $m_4 = 64$ itd. Nawet, jeżeli umówimy się, że nie rozpatrujemy modelu z pamięcią i utożsamimy kompleksy mające zajęte te same miejsca wiążące (warunek ten uwzględnimy, jeżeli zażądamy w (2.1), by $J_1 < J_2 < \dots < J_i$), wówczas i tak liczba m'_n niezależnych stałych asocjacji $k_{J_1 J_2 \dots J_i}$ rośnie wykładniczo z liczbą n miejsc wiążących. Łatwo bowiem pokazać, że m'_n jest równe

$$m'_n = 2^n - 1 \quad (2.8)$$

Rzeczywiście, kompleksy z różnymi zajętymi miejscami wiążącymi mogą być reprezentowane przez n -elementowe ciągi zer i jedynek, gdzie jedynka (zero) oznacza, że miejsce jest zajęte (wolne). Jak wiadomo liczba n -elementowych ciągów z 2 elementów jest równa 2^n , stąd wykluczając przypadek ciągu samych zer (wszystkie miejsca wolne) otrzymujemy (2.8)

Widzimy, że model (2.1) jest zbyt skomplikowany, by mógł być stosowany w praktyce. Dlatego też zostały wprowadzone prostsze modele, będące szczególnymi przypadkami (2.1). Modele te zostały omówione w następujących rozdziałach.

3. MODEL A D A I R A

Rozważmy model (2.1). Pierwszy realistyczny model wiązania ligandów z receptorami, będący szczególnym przypadkiem modelu ogólnego (2.1), zaproponowany już w 1925 r. przez Adaira [1], postuluje utożsamianie kompleksów, mających taką samą liczbę przyłączonych ligandów, wtedy

$$C_{J_1 J_2 \dots J_s} = C_1, \quad 1 \leq J_s \leq n, \quad s = 1, \dots, 1 \quad (3.1)$$

$$k_{J_1 J_2 \dots J_1} = K_1, \quad 1 = 1, \dots, n \quad (3.2)$$

i ciąg reakcji (2.1) redukuje się do



Abstrakcyjny kompleks C_1 jest nazywany często „makrostanem” będącym sumą „mikrostanów” reprezentowanych przez konfiguracje $C_{J_1 J_2 \dots J_1}$. Analogicznie stałe asocjacji K_1 są nazywane stałymi makroskopowymi w odróżnieniu od mikroskopowych stałych $k_{J_1 J_2 \dots J_1}$. Nietrudno znaleźć związek między stałymi makroskopowymi i mikroskopowymi. Rzeczywiście, stężenie C_1 kompleksów z przywiązanymi 1-ligandami jest równe

$$C_1 = \sum_{J_1 J_2 \dots J_1} C_{J_1 J_2 \dots J_1} \quad (3.4)$$

Z kolei równowagi reakcji (3.3) mają następującą postać

$$K_1 L C_{1-1} = C_1, \quad 1 = 1, \dots, n \quad (3.5)$$

Podstawiając (3.4) do (3.5) i uwzględniając (2.3) otrzymujemy

$$K_1 = \sum_{J_1} k_{J_1} \quad (3.6a)$$

$$K_1 = \frac{\sum_{J_1 J_2 \dots J_s} \prod_{s=1}^1 k_{J_1 J_2 \dots J_s}}{\sum_{J_1 J_2 \dots J_{s-1}} \prod_{s=1}^{s-1} k_{J_1 J_2 \dots J_s}}, \quad s = 2, \dots, n \quad (3.6b)$$

Łatwo pokazać, że związki (3.6a), (3.6b) mogą być zapisane w następujący sposób

$$\prod_{s=1}^1 K_s = \sum_{J_1 J_2 \dots J_r} \prod_{r=1}^1 k_{J_1 J_2 \dots J_r} \quad (3.7)$$

Podstawiając (3.7) do równania (2.6) otrzymujemy równanie opisujące związek między stężeniami związanego i swobodnego ligandu w modelu Adaira

$$\nu = \frac{\sum_{j=1}^n \left(\prod_{j=1}^1 K_j \right) L^j}{1 + \sum_{j=1}^n \left(\prod_{j=1}^1 K_j \right) L^j} \quad (3.8)$$

Zastanawiające jest słabe rozpowszechnienie modelu Adaira (nazywany jest on również równowagowym modelem etapowym [10]) wśród biochemików, zwłaszcza jeśli uwzględnimy jego 60-letnią historię oraz fakt, że model ten jest, jak dotąd, jedynym modelem uwzględniającym oddziaływające miejsca wiążące

Sporządzenie wykresu ν w funkcji L umożliwia wyznaczenie liczby n receptorów znajdujących się na cząsteczce białka. Rzeczywiście, z (3.8) łatwo wynika, że

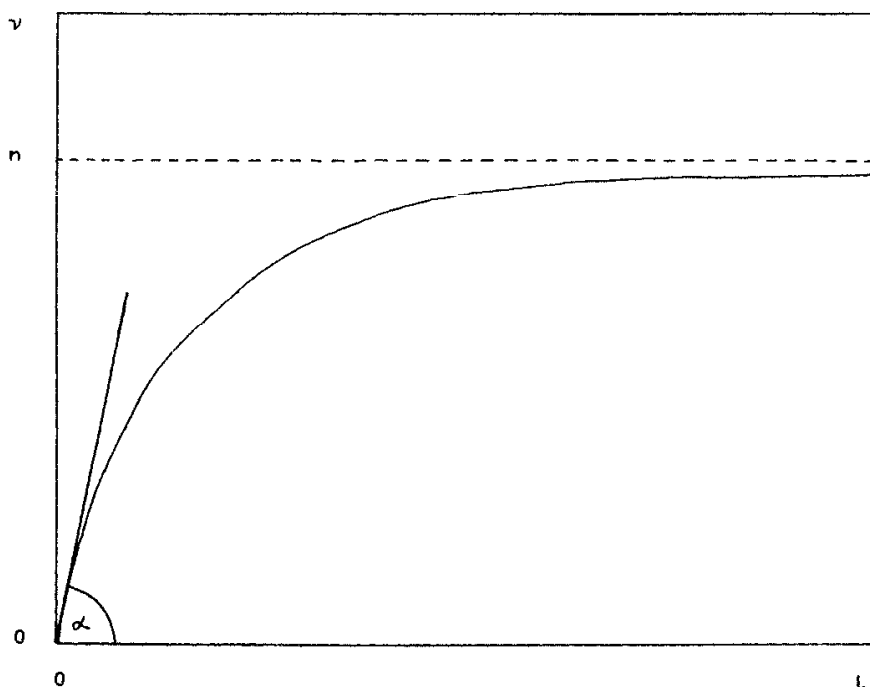
$$\lim_{L \rightarrow \infty} \nu(L) = n \quad (3.9)$$

czyli wykres ν w funkcji L ma plateau $\nu = n$

Ponadto znajomość współczynnika kierunkowego stycznej do wykresu funkcji $\nu(L)$ w początku układu współrzędnych, $L = 0$, $\nu = 0$ umożliwia wyznaczenie stałej asocjacji K_1 kompleksu C_1 białka z przyłączonym jednym ligandem, mamy bowiem

$$\left. \frac{d\nu}{dL} \right|_{L=0} = K_1 \quad (3.10)$$

Powyzsze spostrzezenia są zawarte na rys. 1. Przedstawiono na nim wykres funkcji wklęsłej (w pracy tej, zgodnie z konwencją przyjętą w polskim piśmiennictwie matematycznym, nazywamy funkcję f wypukłą (wklęsłą), gdy $f'' \geq 0$ ($f'' \leq 0$)). W ogólnym



Rys 1 Zależność stopnia nasycenia ν od stężenia niezwiązanego ligandu L w modelu Adaira. Tangens kąta α jest dany przez $\operatorname{tg} \alpha = K_1$

nym przypadku jednak przebieg funkcji $\nu(L)$ danej wzorem (3.8) nie jest znany. Wiemy jedynie, że funkcja ta jest rosnąca. Rzeczywiście, pochodna $\frac{d\nu}{dL}$ jest równa

$$\frac{d\nu}{dL} = \frac{1}{L} \frac{\sum_{i=1}^n i^2 a_i \left(1 + \sum_{i=1}^n a_i\right) - \left(\sum_{i=1}^n i a_i\right)^2}{\left(1 + \sum_{i=1}^n a_i\right)^2} \quad (3.11)$$

gdzie $a_i = \left(\prod_{j=1}^i K_j\right) L^i$, $i = 1, \dots, n$.

Biorąc pod uwagę następującą nierówność, którą łatwo udowodnić indukcyjnie

$$\sum_{i=1}^n i^2 a_i \sum_{i=1}^n a_i - \left(\sum_{i=1}^n i a_i\right)^2 \geq 0, \quad a_i > 0, \quad i = 1, \dots, n \quad (3.12)$$

stwierdzamy, że $\frac{d\nu}{dL} > 0$ c.b.d.o.

Ponieważ funkcja $v(L)$ jest monotoniczna, stąd jedynymi charakterystycznymi punktami umożliwiającymi wyznaczenie pozostałych wielkości związanych z procesem wiązania ligandów, jak stałe asocjacji K_2, K_3, \dots, K_n , mogą być ewentualne punkty przegięcia funkcji $v(L)$. Niestety, już w przypadku cząsteczki białka z dwoma receptorami ($n = 2$) badanie tych punktów prowadzi do równania trzeciego stopnia, zaś otrzymane związki są skomplikowane i niewygodne w praktycznych obliczeniach.

Reasumując, postać (3.8) zależności między stężeniami związanego i swobodnego ligandu umożliwia graficzne wyznaczenie liczby miejsc wiążących n i stałej asocjacji K_1 , jest natomiast niewygodna przy wyznaczaniu pozostałych wielkości charakteryzujących proces wiązania ligandów z receptorami. Z tego też względu często jest uzasadnione wprowadzenie tzw. zmiennych Scatcharda $\frac{v}{L}$, v zamiast zmiennych v, L . Wykres funkcji $\frac{v}{L}(v)$ jest nazywany zwykle wykresem Scatcharda. Może to prowadzić do nieporozumień, ponieważ istnieje również model wiązania ligandów z receptorami, nazywany modelem Scatcharda (model ten jest dyskutowany w rozdz. 4). Oczywiście wykres Scatcharda można analizować w obrębie modeli różnych od modelu Scatcharda, jak np. w przypadku omawianego modelu Adaira. Wadą zmiennych Scatcharda jest operowanie wielkościami będącymi funkcjami mierzonych wielkości, jak $\frac{v}{L}$, co powoduje kumulację błędów.

Rozpatrzmy równanie (3.8). Wprowadźmy zmienne Scatcharda $y = \frac{v}{L}$, $x = v$, wówczas (3.8) przyjmuje następującą postać

$$y^n + \sum_{i=1}^n (x - 1)x^{i-1}y^{n-i} \prod_{j=1}^i K_j = 0 \quad (3.13)$$

Widzimy, że y jest w ogólności uwikłaną funkcją x . Co więcej, ponieważ (3.13) jest równaniem n -tego stopnia ze względu na y , stąd w myśl teorii Galois [12] wszystkie próby jawnego wyznaczenia zależności $y(x)$ są dla $n > 4$ beznadziejne.

Znajomość wykresu funkcji $y(x)$ umożliwia wyznaczenie liczby miejsc wiążących n oraz stałych asocjacji K_1, K_2 oraz K_n . Rzeczywiście, współrzędne punktów przecięcia wykresu funkcji $y(x)$ z osiami rzędnymi i odciętych są odpowiednio równe

$$x = 0, \quad y = K_1 \quad (3.14)$$

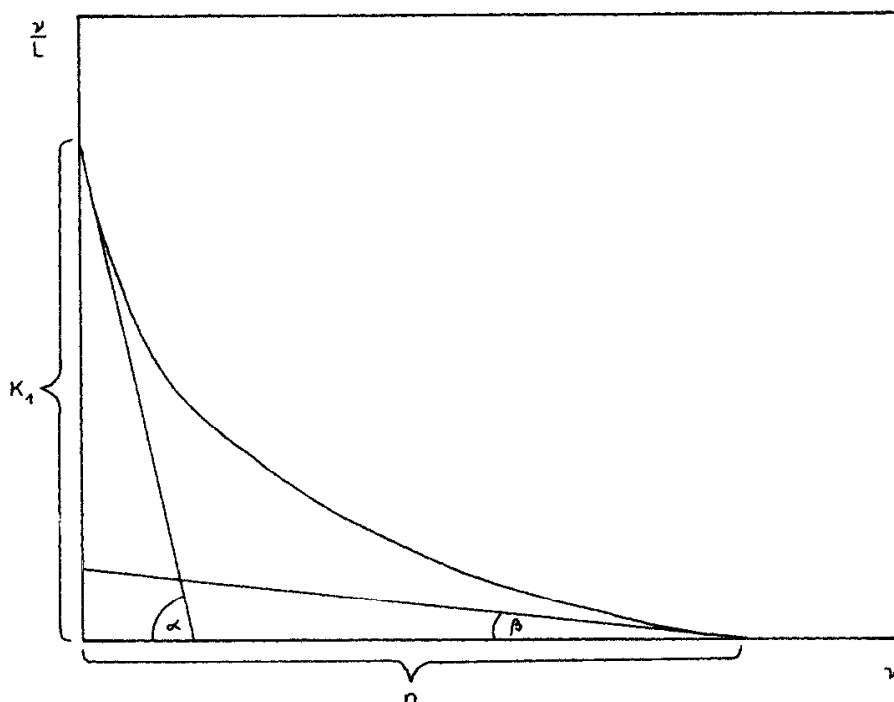
$$x = n, \quad y = 0 \quad (3.15)$$

Ponadto współczynniki kierunkowe stycznych do wykresu funkcji $y(x)$ w punktach przecięcia z osiami współrzędnych są dane następującymi wzorami

$$\left. \frac{dy}{dx} \right|_{x=0} = 2K_2 - K_1 \quad (3.16)$$

$$\frac{dy}{dx}\Big|_{x=n} = -nK_n \quad (3.17)$$

Biorąc pod uwagę zależności (3.14)–(3.17) widzimy, że dla przypadku liczby receptorów $n \leq 3$ możemy wyznaczyć graficznie wszystkie wielkości charakteryzujące wiązanie



Rys. 2. Wykres Scatcharda w przypadku modelu Adaira. Tangensy kątów α i β są dane przez $\operatorname{tg}\alpha = K_1 - 2K_2$, $\operatorname{tg}\beta = nK_n$

Zależności (3.14)–(3.17) zostały zaprezentowane na rys. 2. Na rysunku tym przedstawiono krzywą wypukłą. W ogólnym przypadku jednak przebieg funkcji $\frac{v}{L}(v)$ nie jest znany

Przykład

Rozpatrzmy przypadek cząsteczki białka z dwoma różnymi receptorami. Ciąg reakcji (3.3) redukuje się wtedy do

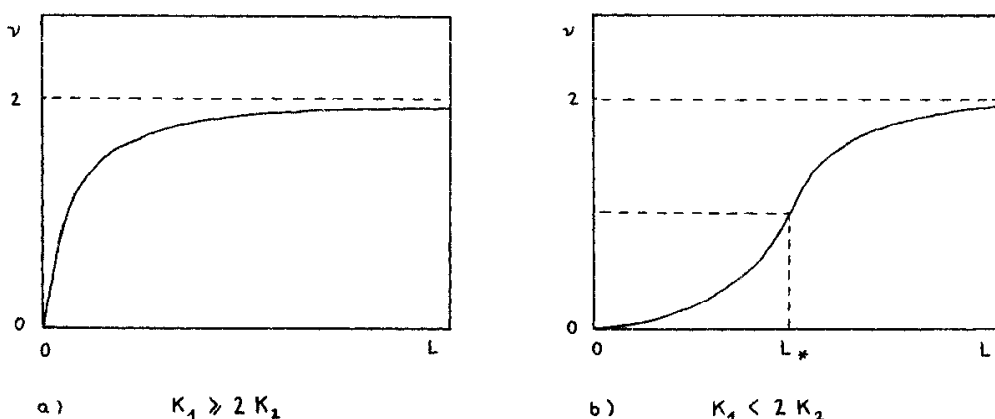


Zależność $\nu(L)$ wyraża się natomiast następującym wzorem

$$\nu = \frac{K_1 L + 2 K_1 K_2 L^2}{1 + K_1 L + K_1 K_2 L^2} \quad (3.19)$$

gdzie K_1, K_2 są stałymi asocjacji kompleksu C_1 i C_2 .

Przebieg funkcji (3.19) został przedstawiony na rys. 3.



Rys. 3. Wykres zależności współczynnika nasycenia ν od stężenia L wolnego ligandu w przypadku dwóch miejsc wiążących (model A d a i r a)

Badanie drugiej pochodnej funkcji (3.19) prowadzi do równania trzeciego stopnia. Odcięta L_* punktu przegięcia funkcji $\nu(L)$ (rys. 3b, $K_1 < 2 K_2$) jest równa

$$L_* = \frac{2}{K_1} \left[\sqrt{4 - \frac{K_1}{K_2} \cos \frac{1}{3} \varphi} - 1 \right] \quad (3.20)$$

gdzie $\varphi = \pi - \arccos \sqrt{1 - \frac{K_1}{4K_2}}$

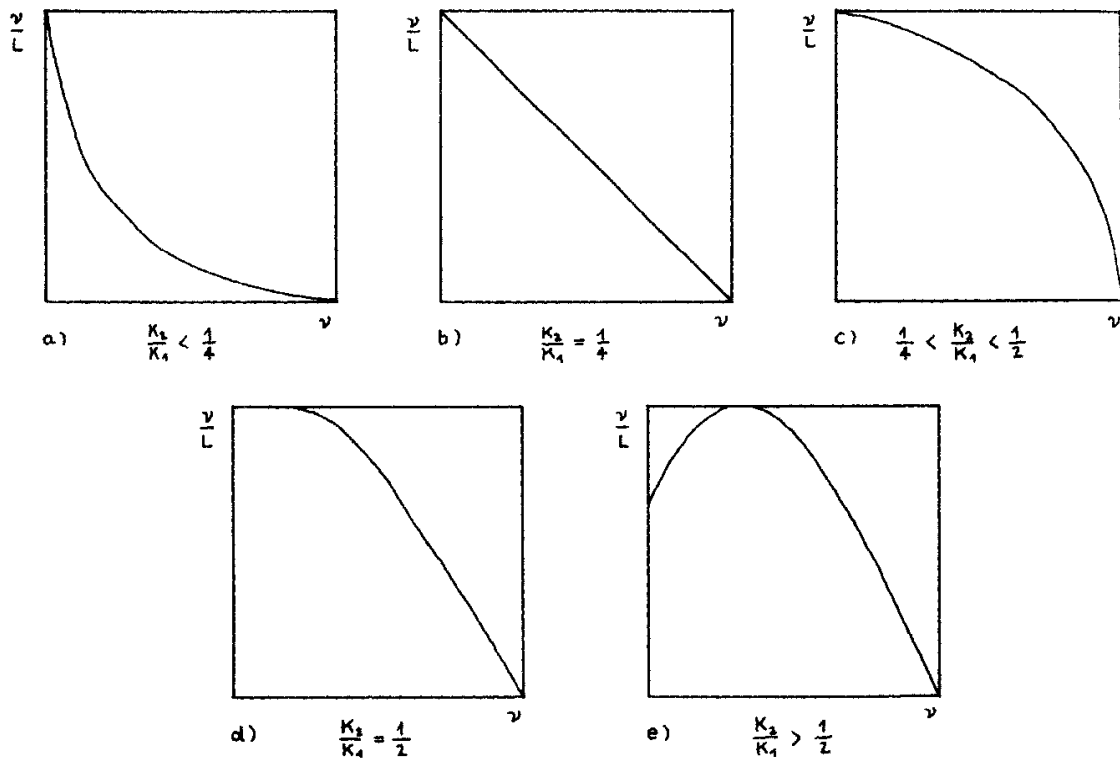
Widzimy, że badanie punktów przegięcia funkcji $\nu(L)$ nie jest najprostszą drogą do wyznaczenia parametrów wiązania.

Przejdźmy teraz do dyskusji zależności związanego i swobodnego ligandu w zmiennych S c a t c h a r d a.

Jawna zależność funkcyjna $\frac{\nu}{L}(\nu)$ dla reakcji (3.18) wyliczona za pomocą równania (3.13) ma następującą postać

$$\frac{\nu}{L} = \frac{K_1}{2} \left[1 - \nu + \sqrt{\left(1 - 4 \frac{K_2}{K_1}\right) (\nu - 1)^2 + 4 \frac{K_2}{K_1}} \right] \quad (3.21)$$

Przebieg funkcji $\frac{\nu}{L}(\nu)$ w zależności od wartości stałych asocjacji K_1, K_2 został przedstawiony na rys. 4. Współrzędne maksimum funkcji przedstawionej na rys. 4e (przypadek $\frac{K_2}{K_1} > \frac{1}{2}$) są równe



Rys 4. Wykres S c a t c h a r d a w przypadku dwóch miejsc wiążących (model A d a i r a)

$$v_{\max} = 1 - \sqrt{\frac{K_1}{4K_2 - K_1}} \quad (3.22a)$$

$$\left(\frac{v}{L}\right)_{\max} = 2 K_2 \sqrt{\frac{K_1}{4K_2 - K_1}} \quad (3.22b)$$

Z układu równań (3.22a), (3.22b) możemy wyznaczyć obie stałe asocjacji:

$$K_1 = \frac{2 \left(\frac{v}{L}\right)_{\max} (1 - v_{\max})}{(1 - v_{\max})^2 + 1} \quad (3.23a)$$

$$K_2 = \frac{\left(\frac{v}{L}\right)_{\max}}{2(1 - v_{\max})} \quad (3.23b)$$

Równania (3.23a), (3.23b) stanowią dogodną podstawę do graficznego wyznaczania stałych asocjacji K_1 , K_2 w przypadku, gdy wykres S c a t c h a r d a posiada maksimum.

Zwróćmy uwagę, że tylko w przypadku (b) zależność $\frac{v}{L}$ (v) jest prostoliniowa. Faktu krzywoliniowości wykresu S c a t c h a r d a zdaje się nie uwzględniać wielu badaczy, którzy w praktycznych wyliczeniach każdą zależność, nawet ewidentnie krzywoliniową, usiłują opisać za pomocą linii prostej.

Zbadamy teraz, kiedy zależność $\frac{v}{L}$ (v) dana równaniem (3.8) redukuje się do zależności prostoliniowej.

Załóżmy, że wszystkie miejsca wiążące są jednakowe i nie oddziałują (znaczy to, że przyłączenie ligandu do jednego z miejsc wiążących nie zmienia własności pozostałych miejsc wiążących), wtedy stałe szybkości powstawania i rozpadu kompleksu C_1 z i przyłączonymi ligandami są równe

$$r_1 = \frac{n - i + 1}{n} r_1 \quad (3.24a)$$

$$r_{-1} = i r_{-1}, \quad i = 2, \dots, n \quad (3.24b)$$

gdzie n jest liczbą receptorów znajdujących się na cząsteczce białka nośnikowego oraz r_1 , r_{-1} są stałymi szybkości powstawania i rozpadu kompleksu C_1 białka z przyłączonym jednym ligandem.

Rzeczywiście, cząstka ligandu ma $n - i + 1$ możliwości przyłączenia do kompleksu C_{i-1} , $i = 2, \dots, n$ i utworzenia kompleksu C_1 , przy n ilości sposobów przyłączenia do cząsteczki białka C_0 i utworzenia kompleksu C_1 (pamiętamy, że w modelu A d a i r a utożsamiamy kompleksy z przyłączoną jednakową liczbą ligandów), stąd prawdopodobieństwo przyłączenia ligandu do kompleksu C_{i-1} , $i = 2, \dots, n$ jest $\frac{n}{n - i + 1}$ razy mniejsze od prawdopodobieństwa przyłączenia ligandu do cząsteczki białka C_0 , skąd wynika wzór (3.24a)

Analogicznie kompleks C_1 , $i = 2, \dots, n$ ma i możliwości rozpadu przy jedynej drodze rozpadu kompleksu C_1 , czyli prawdopodobieństwo rozpadu kompleksu C_1 , $i = 2, \dots, n$ jest i -krotnie większe niż prawdopodobieństwo rozpadu kompleksu C_1 , skąd wynika wzór (3.24b).

Z równań (3.24a) i (3.24b) wynika, że stała asocjacji kompleksu C_1 , $i = 2, \dots, n$ jest dana następującym wzorem

$$K_1 = \frac{r_1}{r_{-1}} = \frac{n - i + 1}{ni} K_1, \quad i = 2, \dots, n \quad (3.25)$$

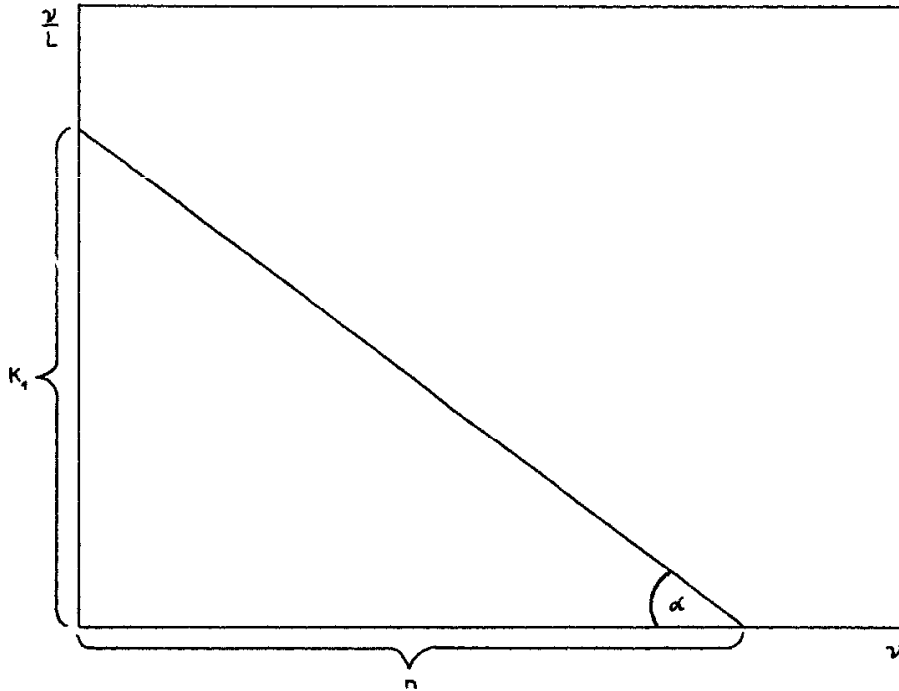
gdzie $K_1 = \frac{r_1}{r_{-1}}$ jest stałą asocjacji kompleksu C_1

Widzimy, że w przypadku identycznych i nieoddziałujących receptorów znajomość parametrów K_1 , n umożliwia wobec (3.25) wyznaczenie wszystkich pozostałych wielkości charakteryzujących proces wiązania (pokażemy dalej, że parametry te mogą być łatwo wyznaczone graficznie)

Podstawiając (3.25) do (3.8) i korzystając z wzoru dwumiennego Newtona otrzymujemy

$$\frac{\nu}{L} = K_1 - \frac{K_1}{n} \nu \quad (3.26)$$

Zależność $\frac{\nu}{L}$ od ν jest więc prostoliniowa tylko wtedy, gdy receptory są jednakowe i nie oddziałują. Wszystkie znane autorowi dowody prostoliniowości wykresu funkcji $\frac{\nu}{L}(\nu)$ w przypadku identycznych i niezależnych miejsc wiążących rozpatrywanych w modelu A d a i r a, powołują się na model S c a t c h a r d a (model ten został omówiony w następnym rozdziale), co nie wydaje się zbyt fortunnym rozwiązaniem. Przedstawiony wyżej dowód wykorzystuje jedynie wewnętrzne charakterystyki modelu A d a i r a.



Rys. 5. Wykres Scatterarda w przypadku identycznych i nieoddziałujących receptorów (model A d a i r a). Tangens kąta α jest równy $\text{tg}\alpha = K_1/n$.

Wykres funkcji $\frac{\nu}{L}(\nu)$ danej wzorem (3.26) został przedstawiony na rys. 5. Widzimy, że stanowi on dogodną podstawę do graficznego wyznaczenia stałej asocjacji K_1 oraz liczby miejsc wiążących n .

Powróćmy do równania (3.25). Czynniki

$$F_{n,1} = \frac{n-1+1}{1} \quad (3.27)$$

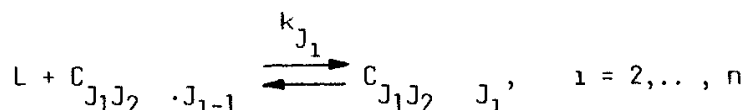
występujący w (3.25) jest nazywany czynnikiem statystycznym. Czynnikiem ten określa trwałość kompleksu C_1 wynikającą nie tyle z własności samych miejsc wiążących, co z samego faktu, że powstał on w wyniku przyłączenia 1-cząsteczek ligandu do cząsteczki białka nośnikowego. Czynnikiem statystycznym jest bowiem równy stosunkowi ilości sposobów, na które może powstać kompleks C_1 do ilości sposobów, na które może się on rozpaść. Innymi słowy, czynnik (3.27) jest prototypem stałej asocjacji kompleksu C_1 ze względu na statystykę liczby obsadzonych receptorów.

4 MODEL SCATCHARDA

Rozważmy model ogólny (2.1). Zaproponowany w 1949 r. przez Scatcharda model [13], będący szczególnym przypadkiem (2.1), ogranicza się do opisu wiązania ligandów z nieoddziałującymi receptorami. Ponieważ z definicji, miejsca wiążące nie oddziałują wtedy, kiedy przyłączenie ligandu do dowolnego miejsca wiążącego nie zmienia własności pozostałych miejsc wiążących, stąd wynika warunek

$$k_{J_1 J_2 \dots J_1} = k_{J_1}, \quad i = 1, \dots, n \quad (4.1)$$

i ciąg reakcji (2.1) redukuje się do



Zauważmy, że stała k_{J_1} charakteryzuje jedynie miejsce wiążące, do którego przyłącza się ligand, dlatego też reakcje (4.2) są równoważne następującemu ciągowi reakcji



gdzie R_i oznacza i -ty receptor, $i = 1, \dots, n$ oraz C_i kompleks i -tego receptora z ligandem.

Innymi słowy, w przypadku braku oddziaływania między receptorami możemy zapomnieć, że receptory są umieszczone na jakiejś cząsteczce białka i rozpatrywać reakcję ligand-receptor zamiast reakcji ligand-cząsteczka białka z receptorami.

Podstawiając (4.1) do (2.6) i biorąc pod uwagę oczywisty fakt, że w przypad-

ku braku oddziaływania między miejscami wiążącymi utożsamiamy kompleksy mające zajęte te same miejsca wiążące (model S c a t c h a r d a jest modelem „bez pamięci”), otrzymujemy równanie opisujące zależność funkcyjną między stężeniami związanego i swobodnego ligandu w modelu S c a t c h a r d a:

$$v = \frac{\sum_{i=1}^n \left(\sum_{J_1 < J_2 < \dots < J_i} \prod_{s=1}^i k_{J_s} \right) L^i}{1 + \sum_{i=1}^n \left(\sum_{J_1 < J_2 < \dots < J_i} \prod_{s=1}^i k_{J_s} \right) L^i} \quad (4.4)$$

Uwzględniając dość oczywiste związki

$$\prod_{i=1}^n (1 + k_i L) = 1 + \sum_{i=1}^n \left(\sum_{J_1 < J_2 < \dots < J_i} \prod_{s=1}^i k_{J_s} \right) L^i \quad (4.5a)$$

$$\frac{d}{dL} \prod_{i=1}^n (1 + k_i L) = \sum_{i=1}^n k_i \prod_{j \neq i} (1 + k_j L) \quad (4.5b)$$

łatwo pokazać, że równanie (4.4) można zapisać w następujący równoważny sposób:

$$v = \sum_{i=1}^n \frac{k_i L}{1 + k_i L} \quad (4.6)$$

Z drugiej strony równanie (4.6) może być wyprowadzone z równań opisujących stan równowagi reakcji (4.3).

Założmy teraz, że na cząsteczce białka nośnikowego, wśród całkowitej liczby n receptorów znajduje się n_1 miejsc wiążących typu 1, $i = 1, \dots, m$, wówczas przeindeksowując odpowiednio stałe k_i , $i = 1, \dots, n$ występujące w (4.6) możemy zapisać związek między stężeniami związanego i wolnego ligandu w następującej, najbardziej rozpowszechnionej postaci

$$v = \sum_{i=1}^m \frac{n_i k_i L}{1 + k_i L} \quad (4.7)$$

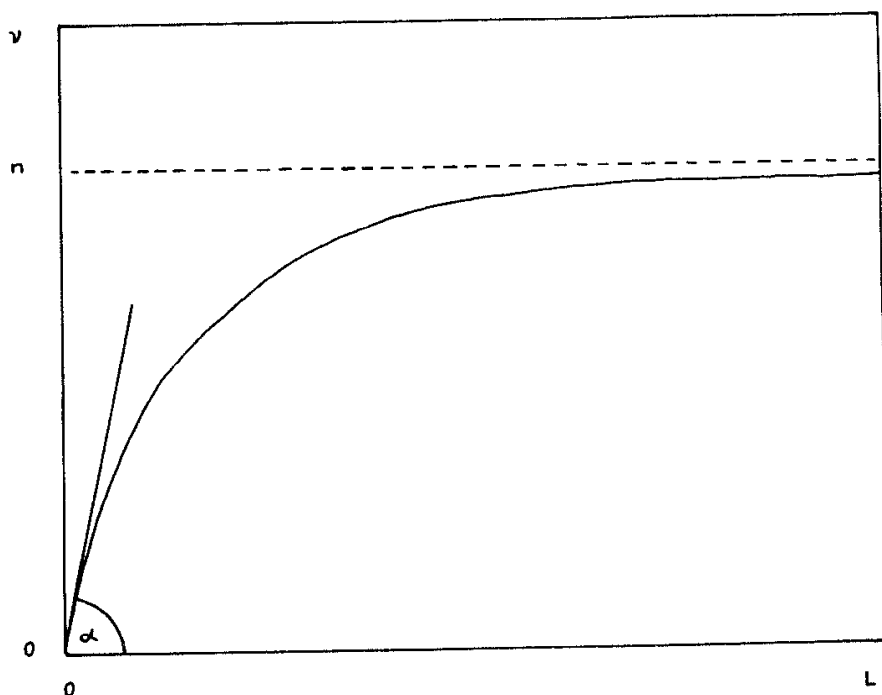
gdzie $\sum_{i=1}^m n_i = n$

Znajomość wykresu funkcji (4.7) $\nu(L)$ umożliwia wyznaczenie liczby n receptorów, umiejscowionych na cząsteczce białka nośnikowego, rzeczywiście, ma miejsce związek

$$\lim_{L \rightarrow \infty} \nu(L) = \sum_{i=1}^m n_i = n \quad (4.8)$$

Innymi słowy, wykres funkcji $\nu(L)$ posiada plateau $\nu = n$. Dodatkowej informacji dostarcza znajomość stycznej do wykresu ν w funkcji L w punkcie $L = 0$, mamy bowiem

$$\left. \frac{d\nu}{dL} \right|_{L=0} = \sum_{i=1}^m n_i k_i \quad (4.9)$$



Rys 6 Wykres stopnia nasycenia ν w funkcji stężenia swobodnego ligandu (model

S c a t c h a r d a). Tangens kąta α jest równy $\text{tg}\alpha = \sum_{i=1}^m n_i k_i$

Powyższe spostrzeżenia zostały zebrane na rys. 6. Przy sporządzaniu tego rysunku uwzględniono łatwy do stwierdzenia fakt, iż ν jest rosnącą i wklęsłą funkcją L . Zauważmy, że z faktu wklęsłości funkcji $\nu(L)$ w przypadku nieoddziałujących miejsc wiążących wynika odwrotne twierdzenie, w myśl którego istnienie punk-

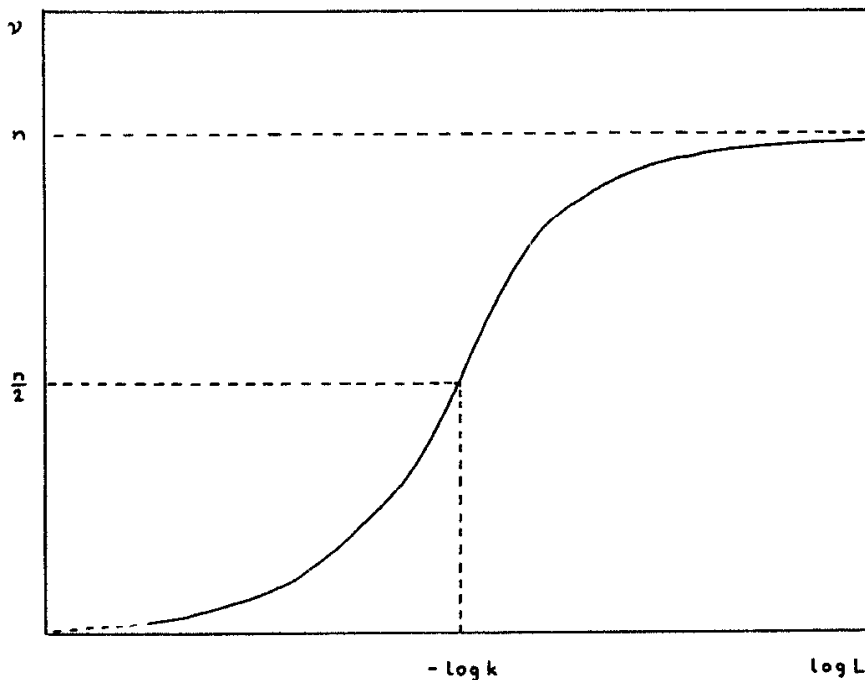
tów przegięcia wykresu funkcji $\nu(L)$ (w przypadku modelu uwzględniających efekty allosteryczne, jak np. modelu Adair'a) implikuje istnienie oddziaływań między miejscami wiążącymi

Rozważmy teraz dokładniej przypadek jednej klasy niezależnych miejsc wiążących, kiedy to z wykresu 6 można wyznaczyć wszystkie wielkości charakteryzujące proces wiązania. Równanie (4.7) redukuje się wtedy do

$$\nu = \frac{n k L}{1 + k L} \quad (4.10)$$

gdzie n jest liczbą identycznych i niezależnych receptorów znajdujących się na cząsteczce białka nośnikowego o mikroskopowej stałej asocjacji k

Z (4.10) łatwo wynika, że wykres ν w funkcji $\log L$ ma postać krzywej sigmoidealnej. Krzywa ta została zobrazowana na rys. 7



Rys. 7. Wykres zależności stopnia nasycenia w funkcji logarytmu stężenia wolnego ligandu w przypadku identycznych i nieoddziałujących miejsc wiążących (model S c a t c h a r d a)

Widzimy, że z plateau i punktu przegięcia wykresu ν w funkcji L w skali logarytmicznej możemy wyznaczyć liczbę miejsc wiążących n oraz mikroskopową stałą asocjacji k . Wykres z rys. 7 został wprowadzony po raz pierwszy przez Klotz'a [8], dlatego też często jest nazywany jego imieniem. Dyskusję przydatności wykresu Klotz'a w badaniach eksperymentalnych można znaleźć w [4, 7]

Rozpatrzmy teraz równanie (4.7) w zmiennych S c a t c h a r d a $\frac{\nu}{L}$, ν

W wyniku wprowadzenia zmiennych $y = \frac{v}{L}$, $x = \nu$, równanie (4.7) przybiera następującą postać

$$\sum_{i=1}^m \frac{n_i k_i}{y + k_i x} = 1 \quad (4.11)$$

Widzimy, że analogicznie, jak w modelu Adaira y jest w ogólności uwikłaną funkcją x .

Znajomość wykresu funkcji $y(x)$ umożliwia wyznaczenie liczby n receptorów oraz pewnej liniowej kombinacji stałych asocjacji k_i , $i = 1, \dots, m$. Rzeczywiście, współrzędne punktów przecięcia wykresu funkcji $y(x)$ z osiami odciętych i rzędnych są odpowiednio równe

$$x = n, \quad y = 0 \quad (4.12)$$

$$x = 0, \quad y = \sum_{i=1}^m n_i k_i \quad (4.13)$$

Dodatkowej informacji o stałych wiązania dostarcza znajomość współczynników kierunkowych stycznych do wykresu funkcji $y(x)$ w punktach przecięcia (4.12), (4.13) z osiami współrzędnych. Mamy bowiem.

$$\left. \frac{dy}{dx} \right|_{x=n} = - \frac{n}{\sum_{i=1}^m \frac{n_i}{k_i}} \quad (4.14)$$

$$\left. \frac{dy}{dx} \right|_{x=0} = - \frac{\sum_{i=1}^m n_i k_i^2}{\sum_{i=1}^m n_i k_i} \quad (4.15)$$

Równania (4.12)-(4.15) charakteryzują zachowanie wykresu Scatcharda w punktach przecięcia z osiami współrzędnych. Łatwo ponadto stwierdzić, że y jest malejącą funkcją x . Rzeczywiście, obliczając pochodną funkcji uwikłanej $y(x)$ łatwo otrzymujemy

$$y'(x) = - \frac{\sum_{i=1}^m \frac{n_1 k_1^2}{(y + k_1 x)^2}}{\sum_{i=1}^m \frac{n_1 k_1}{(y + k_1 x)^2}} < 0 \quad (4.16)$$

Trudniejszym zagadnieniem jest natomiast dowód wypukłości funkcji $y(x)$ (zwykle twierdzi się, że $y(x)$ jest funkcją wypukłą bez przedstawienia dowodu).

D o w ó d

Przez odpowiednie grupowanie wyrazów możemy zapisać drugą pochodną funkcji $y(x)$ w następującej postaci

$$y'' = \frac{2}{\left(\sum_{i=1}^m a_1\right)^3} \left[\sum_{i=1}^m a_1 k_1 \left(\sum_{i=1}^m a_1 k_1 \sum_{i=1}^m b_1 - \sum_{i=1}^m a_1 \sum_{i=1}^m b_1 k_1 \right) + \right. \\ \left. + \sum_{i=1}^m a_1 \left(\sum_{i=1}^m a_1 \sum_{i=1}^m b_1 k_1^2 - \sum_{i=1}^m a_1 k_1 \sum_{i=1}^m b_1 k_1 \right) \right] \quad (4.17)$$

$$\text{gdzie } a_1 = \frac{n_1 k_1}{(y + k_1 x)^2}, \quad b_1 = \frac{n_1 k_1}{(y + k_1 x)^3}$$

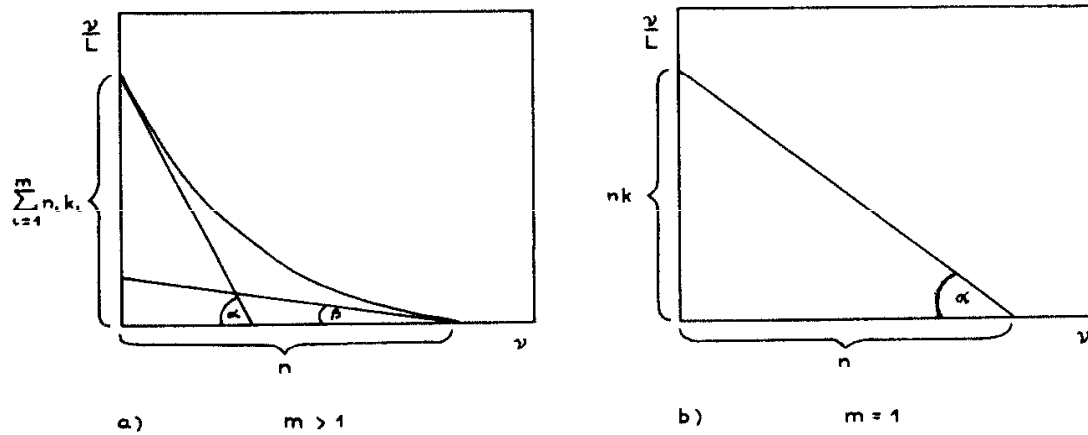
Dalej, za pomocą zasady indukcji zupełnej dowodzimy, że wyrażenia znajdujące się w nawiasach okrągłych są nieujemne, stąd otrzymujemy w końcu

$$y'' \geq 0 \quad \text{c.b.d.o.} \quad (4.18)$$

Nietrudno zauważyć, że znak równości w (4.18) jest osiągnięty dla $m = 1$ (jedna klasa miejsc wiążących). Oczywiście $y(x)$ jest wtedy funkcją prostoliniową. Widzimy, że powodem nieliniowości wykresu *S c a t c h a r d a* ($\frac{v}{L}$ w funkcji v) w przypadku nieoddziałujących receptorów jest mnogość klas miejsc wiążących. Z drugiej strony fakt wypukłości tego wykresu w przypadku nieoddziałujących miejsc wiążących pociąga za sobą twierdzenie odwrotne, w myśl którego wklęsłość wykresu *S c a t c h a r d a* implikuje istnienie oddziaływań między miejscami wiążącymi.

Założenie homogeniczności ligandu, o którym wspomnieliśmy we wprowadzeniu, jest niezwykle istotne dla powyższych rozważań. Okazuje się bowiem, że wykres

S c a t c h a r d a może być wklęsły również w przypadku nieoddziałujących i identycznych receptorów, o ile ligand jest heterogeniczny [11] Dyskusję eksperymentalnych artefaktów prowadzących do wklęsłego wykresu S c a t c h a r d a można znaleźć w [3]



Rys 8. Wykres S c a t c h a r d a w przypadku modelu S c a t c h a r d a. Tangensy kątów α, β z rys a) są równe $\text{tg} \alpha = \frac{\sum_{i=1}^m n_i k_i^2}{\sum_{i=1}^m n_i k_i}$, $\text{tg} \beta = \frac{n}{\sum_{i=1}^m \frac{n_i}{k_i}}$

Tangens kąta α z rys. b) jest równy $\text{tg} \alpha = k$

Zależności (4 12)-(4 16), (4 18) zostały zobrazowane na rys. 8

Rozważmy dokładniej przypadek jednej klasy nieoddziałujących miejsc wiążących ($m = 1$), kiedy to wykres S c a t c h a r d a przedstawia linię prostą zobrazowaną na rys 8b Równanie tej prostej ma następującą postać:

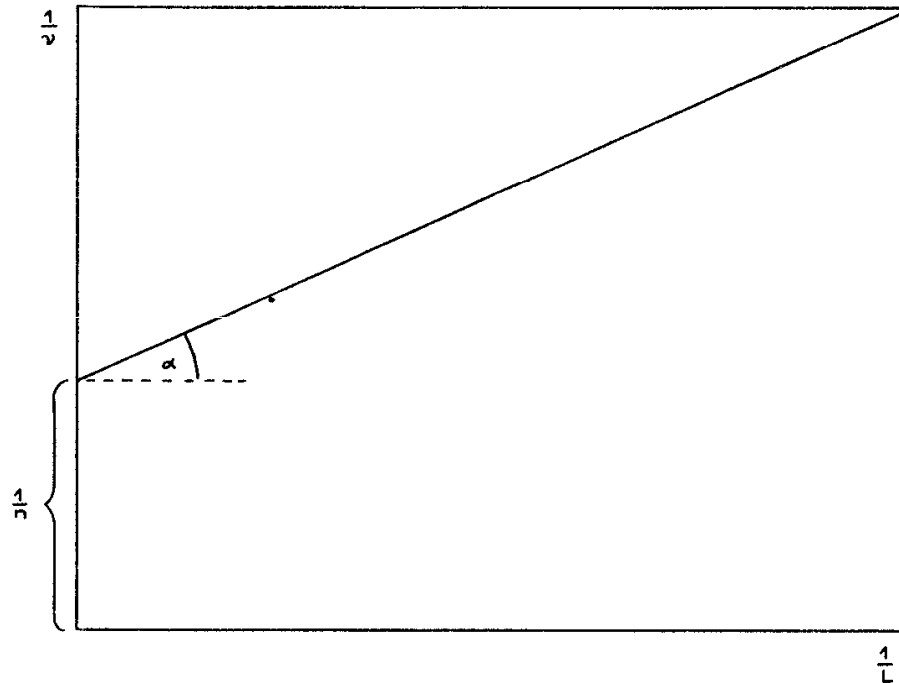
$$\frac{\nu}{L} = nk - k\nu \tag{4 19}$$

Równanie (4.19) jest często nazywane równaniem S c a t c h a r d a. Przez przegrupowanie wyrazów łatwo otrzymujemy z (4 19) tzw. równanie Hughesa-Klotza

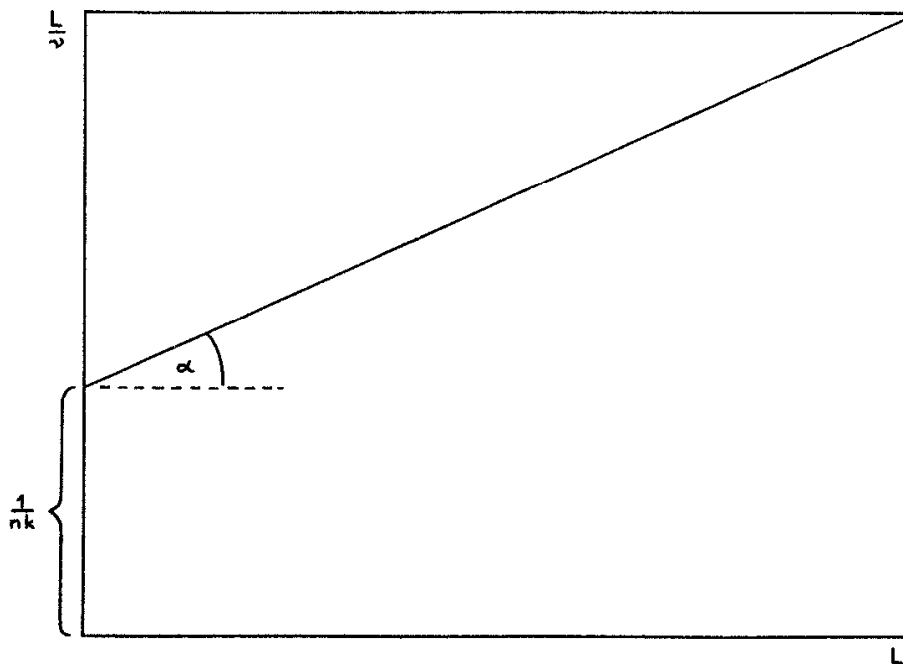
$$\frac{1}{\nu} = \frac{1}{n} + \frac{1}{nk} \frac{1}{L} \tag{4.20}$$

Widzimy, że wykres zależności $\frac{1}{\nu}$ od $\frac{1}{L}$ jest linią prostą o współczynniku kierunkowym $\frac{1}{nk}$ i rzędnej punktu przecięcia z osią $\frac{1}{\nu}$ równą $\frac{1}{n}$, co zostało przedstawione na rys 9 Mnożąc obie strony (4 20) przez L otrzymujemy jeszcze inną prostoliniową parametryzację wykresu S c a t c h a r d a w przypadku identycznych i niezależnych receptorów:

$$\frac{L}{\nu} = \frac{1}{nk} + \frac{1}{n} L \tag{4.21}$$



Rys. 9 Wykres zależności odwrotności współczynnika nasycenia od odwrotności stężenia wolnego ligandu w przypadku identycznych i niezależnych miejsc wiążących (model S c a t c h a r d a). Tangens kąta α jest równy $\text{tg } \alpha = 1/nk$



Rys. 10. Wykres ilorazu stężenia wolnego ligandu i stopnia powinowactwa w funkcji stężenia wolnego ligandu w przypadku identycznych i nieoddziałujących receptorów (model S c a t c h a r d a). Tangens kąta α jest równy $\text{tg } \alpha = 1/nk$

Wykres prostej zadanej wzorem (4 21) został przedstawiony na rys 10 Szczegółową dyskusję modelu S c a t c h a r d a w zmiennych $\frac{1}{v}$ w funkcji $\frac{1}{L}$ oraz zmiennych $\frac{L}{v}$ w funkcji L można znaleźć w [9]

P r z y k ł a d

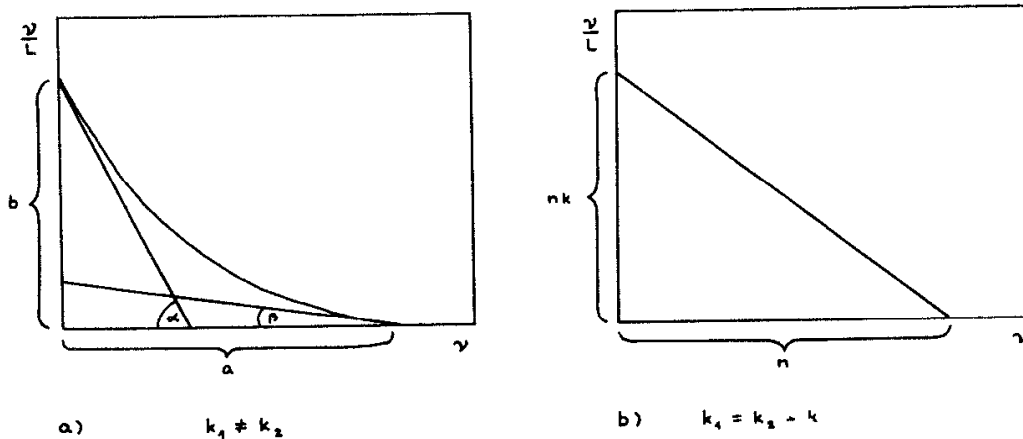
Rozważmy przypadek 2 klas miejsc wiążących Ciąg reakcji (4 3) redukuje się wtedy do



Jawna zależność $\frac{v}{L}$ od v wyliczona z (4 11) ma następującą postać

$$\frac{v}{L} = \frac{k_1 + k_2}{2} \left[\frac{n_1 k_1 + n_2 k_2}{k_1 + k_2} - v + \sqrt{\left(v - \frac{n_1 k_1 + n_2 k_2}{k_1 + k_2} \right)^2 + \frac{4 k_1 k_2}{(k_1 + k_2)^2} (n - v) v} \right] \tag{4 23}$$

gdzie k_1 jest stałą asocjacji kompleksu C_1 , $i = 1, 2$ oraz n_1 oznacza liczbę receptorów znajdujących się na cząsteczce białka nośnikowego, tworzących kompleks C_1 , $i = 1, 2$, $n = n_1 + n_2$ jest całkowitą liczbą miejsc wiążących



Rys 11 Wykres S c a t c h a r d a w przypadku dwóch klas nieoddziałujących miejsc wiążących Znajomość parametrów a, b, α, β pozwala na wyznaczenie wszystkich wielkości charakteryzujących proces wiązania (patrz równania (4.25), (4.26))

Wykres funkcji (4 23) został przedstawiony na rys 11 Parametry a, b, α, β występujące na rys. 11a są zadane następującymi równaniami (patrz (4 12)-(4 15))

$$n_1 + n_2 = a \tag{4 24a}$$

$$n_1 k_1 + n_2 k_2 = b \quad (4.24b)$$

$$n_1 k_1^2 + n_2 k_2^2 = b \operatorname{tg} \alpha \quad (4.24c)$$

$$\frac{n_1}{k_1} + \frac{n_2}{k_2} = \frac{a}{\operatorname{tg} \beta} \quad (4.24d)$$

Zatrzymamy się teraz na przypadku $k_1 \neq k_2$ (przypadek $k_1 = k_2$ pojedynczej klasy miejsc wiążących jest trywialny). Rozwiązanie nieliniowego układu (4.24a)-(4.24d) może być zapisane w następującej postaci:

$$k_1 = \frac{u + \sqrt{u^2 - 4v}}{2}, \quad n_1 = \frac{2b - a(u - \sqrt{u^2 - 4v})}{2\sqrt{u^2 - 4v}} \quad (4.25a)$$

$$k_2 = \frac{u - \sqrt{u^2 - 4v}}{2}, \quad n_2 = \frac{a(u + \sqrt{u^2 - 4v}) - 2b}{2\sqrt{u^2 - 4v}} \quad (4.25b)$$

gdzie:

$$u = \frac{b(\operatorname{tg} \alpha - \operatorname{tg} \beta)}{b - a \operatorname{tg} \beta} \quad (4.26a)$$

$$v = \frac{b \operatorname{tg} \beta}{a} \frac{a \operatorname{tg} \alpha - b}{b - a \operatorname{tg} \beta} \quad (4.26b)$$

Widzimy, że w przypadku 2 klas miejsc wiążących znajomość parametrów a , b , α , β , które otrzymujemy z wykresu *Scatcharda* (rys. 11a), pozwala na wyznaczenie wszystkich wielkości charakteryzujących proces wiązania.

Rozpatrzmy na koniec związki zachodzące między modelem *Scatcharda* i modelem *Adaira* (oczywiście wtedy, kiedy ten ostatni jest zastosowany do opisu nieodziałujących receptorów). Z porównania (3.8) z (4.4) lub bezpośrednio z (3.6) i (4.1) otrzymujemy zależności między makroskopowymi stałymi asocjacji modelu *Adaira* i mikroskopowymi stałymi modelu *Scatcharda*

$$K_1 = \sum_{i=1}^n k_i$$

$$K_i = \frac{\sum_{j_1 < j_2 < \dots < j_i} \prod_{s=1}^i k_{j_s}}{\sum_{j_1 < j_2 < \dots < j_{i-1}} \prod_{s=1}^{i-1} k_{j_s}}, \quad i = 2, \dots, n \quad (4.27a)$$

$$\prod_{s=1}^1 k_s = \sum_{J_1 < J_2 < \dots < J_1} \prod_{r=1}^1 k_{J_r} \quad (4.27b)$$

Jeżeli miejsca wiążące są identyczne, wówczas łatwo pokazać, że związki (4.27a) i (4.27b) redukują się do:

$$K_1 = \frac{n-1+1}{1} k, \quad i = 1, \dots, n \quad (4.28a)$$

$$\prod_{j=1}^1 K_j = \binom{n}{1} k^1 \quad (4.28b)$$

Z drugiej strony (4.28a) wynika bezpośrednio z (3.25) oraz porównania równań (3.26) i (4.19).

Rozważmy teraz równanie (3.8) opisujące zależność między stężeniami związanego i swobodnego ligandu w modelu Adaira. Nietrudno zauważyć, że (3.8) można zapisać w następujący sposób [6]

$$v(L) = L \frac{d}{dL} \ln P_n(L) \quad (4.29)$$

gdzie.

$$P_n(L) = 1 + \sum_{i=1}^n \left(\prod_{j=1}^i K_j \right) L^i \quad (4.30)$$

Rozkładając wielomian n-tego stopnia $P_n(L)$ na czynniki za pomocą jego n pierwiastków $L_{*1}, i = 1, \dots, n$.

$$P_n(L) = c_n \prod_{i=1}^n (L - L_{*1}) \quad (4.31)$$

gdzie.

$$c_n = \prod_{i=1}^n K_1$$

i podstawiając (4.31) do (4.29) otrzymujemy.

$$v(L) = \sum_{i=1}^n \frac{L}{L - L_{*1}} \quad (4.32)$$

Okazuje się więc, że związek (3.8) między stężeniami związanego i swobodnego ligandu w modelu Adaira może być wyrażony w równoważnej postaci (4.32). Porównując (4.32) z (4.6) (rozpatrujemy nieoddziałujące miejsca wiążące) stwierdzamy, że model Scatcharda odpowiada przypadkowi, w którym wielomian $P_n(L)$ posiada n ujemnych, rzeczywistych pierwiastków równych

$$L_{*i} = -\frac{1}{K_i}, \quad i = 1, \dots, n \quad (4.33)$$

Równania (4.27) można rozpatrywać jako warunki zapewniające istnienie takich pierwiastków

Na ogół jednak podobieństwo między (4.32) i (4.6) nosi czysto formalny charakter, model Scatcharda nie jest przecież równoważny modelowi Adaira. Wielomian (4.30) nie ma oczywiście dodatnich pierwiastków rzeczywistych (ma dodatnie współczynniki), może mieć on natomiast pierwiastki zespolone (autorzy [5] usiłują uprawomocnić zespolone stałe wiązania faktem zależności stałej asocjacji charakteryzującej dane miejsce wiążące od stanu sąsiednich miejsc w przypadku istnienia oddziaływań między receptorami). Ponieważ model Scatcharda przestaje obowiązywać w przypadku istnienia oddziaływań między miejscami wiążącymi (model Adaira funkcjonuje i w tym przypadku), stąd wynika, że istnienie pierwiastków zespolonych, wśród pierwiastków wielomianu (4.30), implikuje zachodzenie allosterycznych efektów w procesie wiązania ligandów z receptorami.

5. IDENTYFIKACJA ODDZIAŁUJĄCYCH MIEJSC WIĄZĄCYCH

Rozważmy wielomian (4.30). Pokazaliśmy już, że jeżeli w układzie nie ma oddziaływań między miejscami wiążącymi, wówczas wszystkie pierwiastki wielomianu (4.30) są rzeczywiste. Znajdziemy teraz warunki, jakie muszą spełniać stałe asocjacji K_i , $i = 1, \dots, n$, aby w układzie zachodziły, bądź nie zachodziły oddziaływania między receptorami. Wykorzystamy w tym celu następujące twierdzenie będące szczególnym przypadkiem twierdzenia Newtona [15].

T w i e r d z e n i e

Niech $f_n(x) = \sum_{i=0}^n a_i x^{n-i}$ będzie wielomianem rzeczywistym. Warunkiem koniecznym na to, by wszystkie pierwiastki wielomianu $f_n(x)$ były rzeczywiste jest, aby

$$\frac{1}{i+1} - \frac{n-i}{n-i+1} a_i^2 - a_{i-1} a_{i+1} \geq 0, \quad i = 1, 2, \dots, n-1 \quad (5.1)$$

Warunki (5.1) często są nazywane warunkami Eulera. Zastosujemy teraz powyższe twierdzenie dla przypadku wielomianu (4.30). Warunki Eulera przyjmują wtedy następującą postać

$$\frac{K_{i+1}}{K_1} \leq \frac{1}{1+i} \frac{n-i}{n-i+1}, \quad i = 1, \dots, n-1 \quad (5.2)$$

Widzimy, że jeżeli w układzie nie ma oddziaływań między receptorami, wówczas zachodzi warunek (5.2). Uwzględniając równanie (3.25) stwierdzamy, że znak równości w (5.2) jest osiągany w przypadku identycznych i nieoddziałujących miejsc wiążących

Z drugiej strony, jeżeli istnieje przynajmniej jeden indeks $i \in \{1, 2, \dots, n-1\}$, taki, że

$$\frac{K_{i+1}}{K_1} > \frac{1}{1+i} \frac{n-i}{n-i+1} \quad (5.3)$$

wówczas w układzie zachodzą oddziaływania między miejscami wiążącymi.

Podkreślimy raz jeszcze, że nierówność (5.2) jest jedynie warunkiem koniecznym braku oddziaływań między receptorami, warunkiem dostatecznym jest natomiast tylko w przypadku osiągnięcia znaku równości w (5.2). Innymi słowy, może zaistnieć sytuacja, w której spełniony jest warunek.

$$\frac{K_{i+1}}{K_1} < \frac{1}{1+i} \frac{n-i}{n-i+1}, \quad i = 1, \dots, n-1 \quad (5.4)$$

lecz miejsca wiążące oddziałują między sobą. O miejscach takich mówimy wtedy, że wykazują ujemną kooperację.

Założmy teraz, że nierówność (5.3) jest prawdziwa dla każdego indeksu $i \in \{1, \dots, n-1\}$, wtedy oczywiście miejsca wiążące oddziałują i mówimy, że istnieje między nimi dodatnia kooperacja. O miejscach wiążących takich, że dla pewnych indeksów i prawdziwy jest związek (5.2) dla innych zaś (5.3) mówimy, że wykazują kooperację mieszaną.

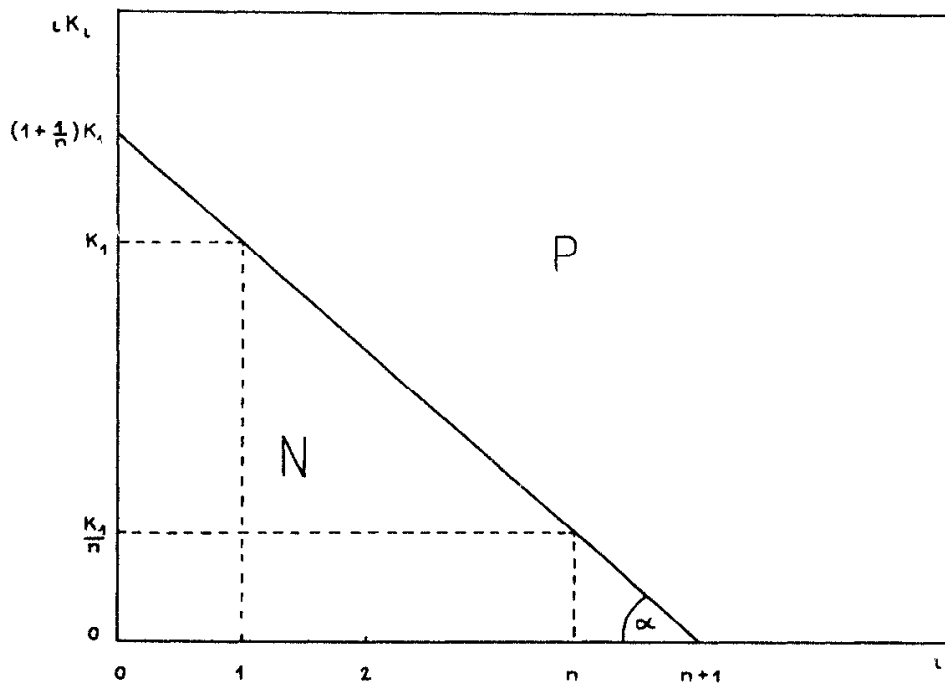
W celu wyjaśnienia pochodzenia nazw dodatnia i ujemna kooperacja rozpatrzmy przypadek identycznych i nieoddziałujących miejsc wiążących. Z równania (4.28a) wynika, że mikroskopowa stała asocjacji jest wtedy równa:

$$k = \frac{1}{n-i+1} K_1, \quad i = 1, \dots, n \quad (5.5)$$

Założmy teraz, że receptory oddziałują tak, że przyłączanie cząsteczek ligandu do cząsteczki białka nośnikowego powoduje sukcesywny wzrost (spadek) stałych

asocjacji dla kolejnych etapów reakcji wiązania, wtedy k jest funkcją etapu reakcji $k - k(i)$ oraz z nierówności $k(i+1) > k(i)$ ($k(i+1) < k(i)$) otrzymujemy warunki (5.3) ((5.4)) dodatniej (ujemnej) kooperacji

Nierówności (5.2)-(5.4) można zobrazować na tzw. wykresie powinowactwa Klotza [10], gdzie zmienną zależną jest K_1 oraz zmienną niezależną jest indeks $i, i = 1, \dots, n$ stałej asocjacji K_1 (rys. 12). Z równania (3.25) wynika natomiast, że w przypadku identycznych i nieoddziałujących receptorów (wtedy osiągnięty jest znak równości w (5.2)) punkty wykresu Klotza należą do prostej o współczynniku kierunkowym $-\frac{K_1}{n}$ i wyrazie wolnym $\frac{n+1}{n} K_1$. Nietrudno pokazać, że jeżeli punkty wykresu Klotza leżą nad tą prostą, wówczas zachodzi warunek (5.3) (dodatnia kooperacja), podczas gdy punkty spełniające (5.4) znajdują się poniżej tej prostej (ujemna kooperacja albo mnogość klas nieoddziałujących receptorów)



Rys 12 Współrzędne wykresu powinowactwa Klotza. Linia prosta odpowiada identycznym i niezależnym miejscom wiążącym, gdzie tangens kąta α jest równy $\tan \alpha = K_1/n$. Obszar P odpowiada dodatniej kooperacji, natomiast obszar N – kooperacji ujemnej lub mnogości klas nieoddziałujących receptorów

Inna reprezentacja graficzna związków (5.3), (5.4) znajduje odzwierciedlenie w często cytowanym twierdzeniu, nie popartym zresztą jakimkolwiek dowodem, że wypukłość (wklęsłość) wykresu Scatcharda ($\frac{v}{L}$ w funkcji v) implikuje istnienie ujemnej kooperacji (dodatniej kooperacji) między miejscami wiążącymi. Przypominamy w tym miejscu raz jeszcze, że ujemnej kooperacji nie można odróżnić

od przypadku mnogości nieoddziałujących miejsc wiążących. Autorowi nie jest znany żaden dowód konieczności i wystarczalności spełnienia związków (5.3) ((5.4)) dla wklęsłości (wypukłości) wykresu Scatcharda. Istniejące spekulacje dotyczące związku dodatniej i ujemnej kooperacji z wklęsłością czy wypukłością wykresu Scatcharda są oparte na podejściu polegającym na wprowadzeniu w obrębie modelu Scatcharda stałych asocjacji zależnych od stężenia związanego ligandu [14]. Dla przykładu równanie (4.19) zapisuje się wtedy w następującej postaci

$$\frac{v}{L} = nk(v) - k(v)v \quad (5.6)$$

gdzie $k(v) = k_0 e^{\varphi(v)}$, $\varphi(0) = 0$

W prezentowanym formalizmie mówimy, że między miejscami wiążącymi zachodzi dodatnia (ujemna) kooperacja, jeżeli $k(v)$, a stąd $\varphi(v)$ jest funkcją rosnącą (malejącą).

A oto przykład twierdzenia usiłującego powiązać kooperację miejsc wiążących z kształtem wykresu Scatcharda

Twierdzenie [2]

Jeżeli $\varphi(v)$ jest funkcją malejącą (rosnącą), wówczas wykres Scatcharda jest wypukły (wklęsły).

Powyższe twierdzenie jest jednak, jak nietrudno zauważyć, błędne. Rzeczywiście, oznaczmy jak zwykle $\frac{v}{L} = y$, $v = x$, wówczas (5.6) można zapisać w następującej postaci

$$y(x) = k_0(n - x)e^{\varphi(x)} \quad (5.7)$$

skąd wynika następujący warunek wypukłości funkcji $y(x)$

$$-2\varphi'(x) + (n - x)(\varphi''(x) + (\varphi'(x))^2) \geq 0, \quad 0 \leq x \leq n \quad (5.8)$$

Z (5.8) wynika, że malenie funkcji $\varphi(x)$ nie jest warunkiem wystarczającym wypukłości funkcji $y(x)$ (byłby warunkiem wystarczającym, gdyby ponadto funkcja $\varphi(x)$ była wypukła). Jako kontrprzykład może służyć funkcja $\varphi(x) = -x^3$. Podstawiając tę funkcję do (5.8) i kładąc $x = \frac{1}{2}$, $n = 2$ stwierdzamy, że lewa strona (5.8) jest ujemna. Analogicznie można przedstawić funkcje rosnące $\varphi(x)$ takie, że funkcja $y(x)$ nie jest wklęsła.

Reasumując, brak jest jak dotąd dowodu związku między rodzajem kooperacji miejsc wiążących a kształtem wykresu Scatcharda.

Maszynopis wpłynął do Redakcji 9 VI 1986

LITERATURA

- [1] Adair G S, J Biol Chem, 63, 529 (1925)
[2] Cantor C R, Schimme I P R, "Biophysical chemistry", III -
"The behaviour of biological macromolecules". Ed. W H. Freeman, San Francisco
1980
[3] Chamness G C, Mc Guire W L, Steroids, 26, 53B (1975)
[4] Feldman H A, J Biol Chem, 258, 12865 (1983).
[5] Fletcher J E, Spector A A, Mol Pharmacol, 13, 387
(1977)
[6] Fletcher J E, Spector A A, Ashbrook J D, Bio-
chemistry, 9, 4580 (1970)
[7] Klotz I M., J Biol Chem., 259, 10060 (1984).
[8] Klotz I M, Science, 217, 1247 (1982)
[9] Klotz I M, Hunston D L, Biochemistry, 10, 3065 (1971).
[10] Klotz I M, Hunston D L, J Biol Chem, 250, 3001 (1975).
[11] Mendel C M, Licko V, Kane J P, J Biol Chem, 260, 3451
(1985)
[12] Mostowski A, Stark M, "Algebra wyższa", cz 3, PWN, Warsza-
szawa 1967
[13] Scatchard G, Ann NY Acad Sci, 51, 660 (1949).
[14] Tanford C, "Physical chemistry of macromolecules" Ed. J Wiley, New
York 1961
[15] Turowicz A., "Geometria zer wielomianów", PWN, Warszawa 1967.

Krzysztof Kowalski

MATHEMATICAL MODELLING OF LIGAND - RECEPTOR
BINDING AT EQUILIBRIUM CONDITIONS

S u m m a r y

In this work, the basic mathematical models for ligand-receptor binding are revisited. The special attention is given to mathematical aspects of such the models

Dr KRZYSZTOF KOWALSKI
Zakład Biofizyki
Instytut Fizjologii i Biochemii
Akademii Medycznej w Łodzi
ul Lindleya 3
90-131 Łódź

Henryk Witas

ACYLACJA BIAŁEK*

1 WSTĘP

Różnorodność strukturalna obserwowana wśród łańcuchów polipeptydowych jest wynikiem nie tylko różnej i charakterystycznej dla każdego z nich sekwencji aminokwasów, ale może być również uwarunkowana modyfikacjami zarówno kotranslacyjnymi, jak i posttranslacyjnymi. Przyłączenie do łańcucha polipeptydowego różnych cząsteczek, a także proteolityczne odłączenie fragmentu preproteiny to najczęściej spotykane modyfikacje. Glikozylacja, szczególnie białek błonowych, wydaje się być najbardziej rozpowszechnionym, posttranslacyjnym sposobem różnicowania białek komórkowych, rzutującym zarówno na przestrzenne, jak i funkcjonalne ich cechy. Obecnie uważa się, że a c y l a c j a, jako jeszcze jeden z mechanizmów modyfikacji łańcuchów polipeptydowych, jest równie rozpowszechniona jak i glikozylacja. Duża różnorodność białek podlegających procesowi acylacji (acyloproteiny wirusów otoczkowych i bezotoczkowych, bakterii, grzybów, bezkręgowców i kręgowców) świadczy o konserwatywnym charakterze tego procesu. W niniejszej pracy przedstawiono w układzie ewolucyjnym, dotychczas poznane białka zmodyfikowane kowalencyjnie cząsteczkami długich kwasów tłuszczowych, występujące w różnych organizmach jak również w komórkach różnego pochodzenia.

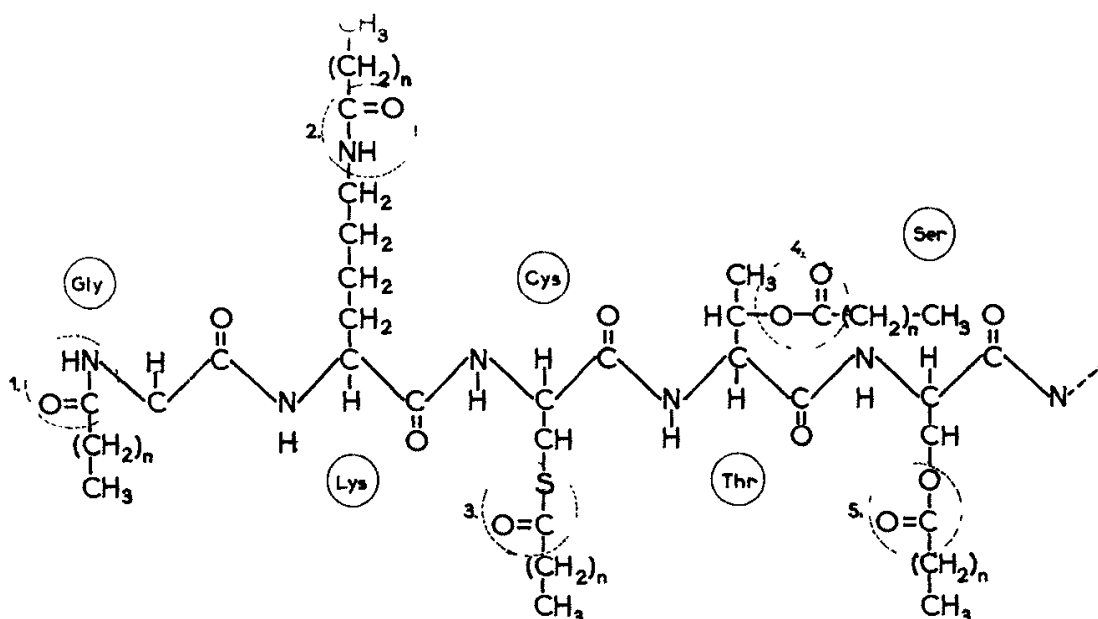
2 IDENTYFIKACJA ACYLOPROTEIN

Nazwę a c y l o p r o t e i n a użył po raz pierwszy S c h m i d t [125]. Odróżnienie związanych kowalencyjnie kwasów tłuszczowych od kwasów pochodzenia fosfolipidowego wymagało ustalenia wspólnych cech charakteryzujących acyloproteiny. Obecnie przyjmuje się, że połączenie kowalencyjne białko-kwas tłuszczowy spełnia następujące warunki:

*Praca została wykonana w ramach tematu C P B R 11 7.14.2 1

- 1) jest odporne na działanie detergentów, np. SDS na zimno i na gorąco [89, 122],
- 2) jest odporne na ekstrakcję rozpuszczalnikami organicznymi, takimi jak chloroform, metanol, eter i in. [114, 129];
- 3) jest odporne na działanie enzymów proteolitycznych, których działanie powoduje uwolnienie acylowanych peptydów [89, 114, 120, 125],
- 4) uwolnienie estrowo związanych reszt acylowych następuje np. w obecności słabych zasad lub hydroksyloaminy w środowisku wodnym lub metanolowym.

Na rys. 1 przedstawiono opisane dotychczas połączenia kwasów tłuszczowych z łańcuchem polipeptydowym



Rys. 1. Typy kowalencyjnych połączeń kwasów tłuszczowych z łańcuchem polipeptydowym
1, 2 - wiązanie amidowe, 3 - wiązanie tioestrowe, 4, 5 - wiązanie estrowe

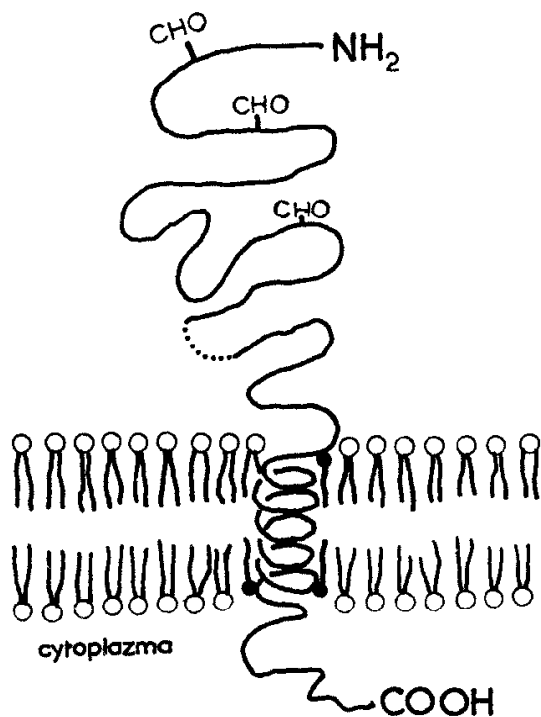
3. ACYLOWANE BIAŁKA WIRUSÓW OTOCZKOWYCH I BEZOTOCZKOWYCH

Wśród wirusów wyróżnia się odrębną grupę, której przedstawiciele mają zdolność wytwarzania otoczek (np. wirus zapalenia jamy ustnej). Charakterystyczne dla otoczek glikoproteiny (spikes), pośredniczą w procesie interakcji między wirionem a błoną komórkową gospodarza [117]. Wykazano, że cząsteczki glikoprotein otoczkowych, takich jak G, E1 czy E2, posiadają przyłączone kowalencyjnie długie kwasy tłuszczowe [127, 129]. Ilościowa analiza stopnia acylacji pozwoliła ustalić obecność np. 5-6 moli kwasów na mol E2 lub 1-2 moli kwasów na mol E1 [129]. Okazało

się, że przyłączanie kwasów tłuszczowych do glikoprotein otoczkowych może być przeprowadzane przez komórki gospodarza należące nie tylko do kręgowców (ssaki, ptaki), ale również do bezkręgowców (owady) [126]. Jakkolwiek nie przebadano wszystkich znanych wirusów pod względem obecności acylowanych glikoprotein otoczkowych, to jednak stwierdzono, że

- zdolność do wiązania reszt acylowych posiadają zarówno DNA, jak i RNA wirusy należące do różnych grup taksonomicznych, zarówno onkogenne, jak i nieonkogenne,
- proces acylacji nie jest uzależniony od typu komórki gospodarza,
- proces jest specyficzny, bowiem zachodzi ze ściśle określonymi glikoproteinami, (nie tylko wirusowymi)

Dotychczasowe badania pozwoliły ustalić, że reszty acylowe są zlokalizowane w rejonie kontaktu glikoproteiny z dwuwarstwą lipidową bądź w jej bezpośrednim sąsiedztwie [123] (rys 2)



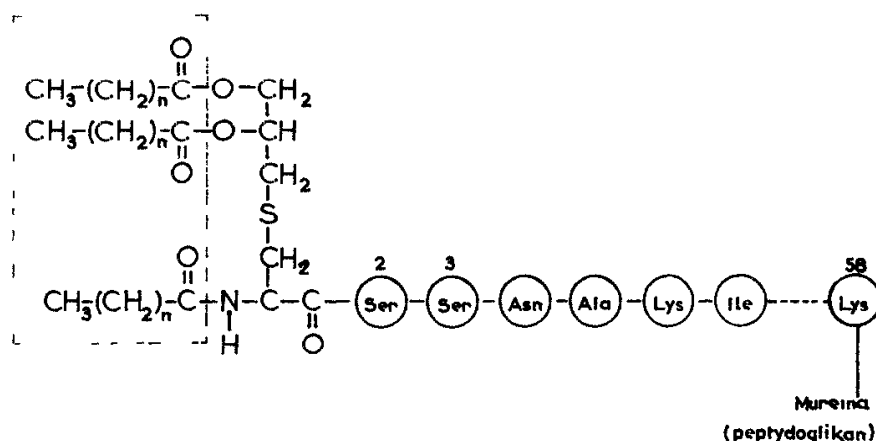
Rys. 2. Przypuszczalna lokalizacja reszt acylowych w cząsteczce glikoproteiny otoczki wirusów

Ostatnio opisano również występowanie reszt acylowych bezpośrednio związanych z białkami kapsydowymi bezotoczkowych wirusów z rodziny picornaviridae [28]. U przedstawicieli wszystkich rodzajów wykazano specyficzne wiązanie kwasu mirystynowego wyłącznie z białkiem VP4 i jego prekursorem VP0. Reszta acylowa tworzy wiązanie amidowe z N-końcową glicyną polipeptydu, podobnie jak ma to miejsce w przypadku większości białek mirystylowanych. Stwierdzono, że kwas ten stanowi integralną

część podjednostki kapsydowej, warunkując formowanie kapsydu i stabilizując utworzoną już strukturę. Odgrywa to istotną rolę w początkowych stadiach infekcji i kontroluje oddziaływanie kapsyd-błona [28].

4 ACYLOPROTEINY BŁONY BAKTERYJNEJ

Po raz pierwszy obecność reszt acylowych związanych z białkiem opisali Braun i Rhen [51] w 1973 r., przedstawiając budowę proteolipidu zewnętrznej błony *Escherichia coli*. Lipoproteina ta o masie cząsteczkowej 7×10^3 daltonów charakteryzuje się dużą zawartością struktury α -helikalnej i składa się z 58 aminokwasów. W skład cząsteczki lipoproteiny nie wchodzi histydyna, tryptofan, glicyna, prolina i fenyloalanina [20]. Poznano jej sekwencję aminokwasową [19], a także sekwencję nukleotydów w DNA kodującym [94] i odpowiednim mRNA [95]. Stwierdzono obecność 3 reszt acylowych wchodzących w skład omawianej lipoproteiny [51] (rys. 3).



Rys. 3 Budowa lipoproteiny bakteryjnej

Jedna z reszt acylowych jest bezpośrednio związana z grupą aminową N-terminalnej cysteiny. Dwie pozostałe są połączone wiązaniami estrowymi z glicerolem, który z kolei jest związany tioestrowo trzecią grupą hydroksylową z tą samą resztą cysteiny. W skład estrowo związanych kwasów wchodzi więcej niż 50% palmitynianu, 30% jednonienasyconych reszt acylowych i pewna ilość kwasów cyklicznych. Wśród amidowo związanych kwasów obok palmitynianu (65%) i jednonienasyconych reszt acylowych (więcej niż 20%) nie występują kwasy cykliczne. Liczba cząsteczek lipoproteiny sięgająca 7×10^5 kopii na komórkę, stawia ten związek wśród najliczniej występujących w komórce *Escherichia coli*, przy czym 1/3 populacji cząsteczek jest związana z peptydoglikanem (mureiną) [62]. Zarówno amidowe, jak i estrowe połączenie reszt acylowych wydaje się być modyfikacją posttranslacyjną prekursorowego polipeptydu, zawierającego o 20 aminokwasów więcej od strony N-końca porównując z

uformowaną już lipoproteina [63, 78] Ten dodatkowy fragment jest uważany za sekwencję sygnałową, kierującą cząsteczkę do błony zewnętrznej

Sugeruje się, że proteolityczna modyfikacja cząsteczki prelipoproteiny występuje w błonie cytoplazmatycznej, w określonych miejscach kontaktujących się z błoną zewnętrzną [170]

Przyłączenie glicerolu do grupy sulfhydrylowej rozpoczyna modyfikację lipoproteiny, po czym następuje acylacja pozostałych grup hydroksylowych kwasami tłuszczowymi, których źródłem są fosfolipidy. One także są źródłem kwasów związanych amidowo [78]

Cząsteczki lipoproteiny oddziałując z porynami z jednej, a z peptydoglikanem z drugiej strony warunkują formowanie kanałów transportu biernego. Trzy cząsteczki poryn, bogate w strukturę α , stanowią silnie hydrofobowe wnętrza kanału dyfuzyjnego. Każda z tych 3 cząsteczek jest stabilizowana przez kompleks 3 skreconych cząsteczek lipoproteiny, z których tylko jedna jest połączona C-terminalną lizyną z resztą kwasu diaminopimelinowego. Tak więc, lipoproteina stabilizuje kanał, łącząc go kowalencyjnie z peptydoglikanem z jednej strony a swym hydrofobowym końcem, bogatym w kwasy tłuszczowe, zanurzonym w dwuwarstwie lipidowej błony zewnętrznej z drugiej strony. Od strony zewnętrznej błony strukturę stabilizuje lipid A [50, 54]

Opisano również białka innych bakterii, podobne w swej strukturze do lipoproteiny z *Escherichia coli* przedstawionej powyżej. Należą do nich białko błony zewnętrznej *Pseudomonas aeruginosa* [91] posiadające lipidy związane w podobny sposób jak wyżej, penicylinaza *Bacillus licheniformis*, β -laktamazy *Bacillus aureus* i *Staphylococcus aureus* [96]

Badanie białek *Mycoplasma capricolum*, przedstawiciela prokariota nie posiadającego ściany peptydoglikanowej, którego rozwój jest uzależniony od obecności cholesterolu i kwasów tłuszczowych w podłożu, wykazało obecność 25 spośród 50 białek błonowych, które są zdolne do przyłączenia znakowanego palmitynianu lub oleinianu [32]. Wśród tych 25 białek tylko 6 przyłączało kwas nienasycony, co świadczy o selektywności procesu acylacji. Co więcej, wykazano wpływ czynnika wzrostowego, jakim jest cholesterol, na stopień acylacji, szczególnie kwasami tłuszczowymi nienasyconymi. Wydaje się, że źródłem reszt acylowych, podobnie jak to opisano powyżej, są fosfolipidy [32, 35]

Acholeplasma laidlawii, bakteria nie posiadająca ściany peptydoglikanowej, wykazuje obecność ok. 20 z 50 białek błonowych w postaci acylowanej [34, 97], podobnie jak *Mycoplasma capricolum* [32, 35]. Wydaje się, że błony komórkowe mikroorganizmów, u których nie występuje ściana komórkowa, są wielokrotnie bogatsze w białka acylowane w porównaniu z bakteriami, u których ściana komórkowa występuje (np. gram-ujemnymi, jak *Escherichia coli* czy gram-dodatnimi, jak *Bacillus*

aureus, *Bacillus licheniformis* czy *Staphylococcus aureus* [92, 96] Na podstawie składu aminokwasowego określono hydrofobowość białek błonowych, przy czym otrzymano wartości zadziwiająco niskie dla acyloprotein występujących u przedstawicielu wymienionych grup bakterii w porównaniu z białkami nieacylowanymi [97]

Integralne białka błonowe posiadające silnie hydrofobowe rejony nie są acylowane w przeciwieństwie do pozostałych białek błonowych, które w większości są silnie hydrofilowe i acylowane. Sugeruje to, że acylowane odcinki białek błonowych stanowią rejony hydrofobowe, dzięki którym hydrofilowy łańcuch polipeptydowy może być wbudowany i zakotwiczony w dwuwarstwie lipidowej. Znacznie większa zawartość acyloprotein w błonach organizmów nie posiadających ścian komórkowych wskazuje na ich udział w utrzymaniu elastyczności, a jednocześnie silnej struktury błony komórkowej [97]

5 ACYLOPROTEINY GRZYBÓW

W komórkach mutantów wydzielniczych *Saccharomyces cerevisiae* stwierdzono obecność białek acylowanych długimi kwasami tłuszczowymi [165]. Podobnie jak w przypadku bakterii stwierdzono, że acyloproteiny *Saccharomyces cerevisiae* należą do frakcji białek związanych z błonami, chociaż nie są białkami integralnymi błon komórkowych Dotychczas zidentyfikowano 4 takie białka, spośród których 3 są N-glikoproteinami, a 1 O-glikoproteiną. Produkty ekspresji genów RAS1 i RAS2 są palmitylowane na C-terminalnej cysteinie [43].

Stosowano 4 następujące mutanty wydzielnicze (sec) drożdży [165]

- 1) z zablokowaną penetracją powstających polipeptydów do światła siateczki śródplazmatycznej,
- 2) z zablokowanym transportem z siateczki do aparatu Golgiego,
- 3) z zablokowanym tworzeniem pęcherzyków wydzielniczych w aparacie Golgiego oraz
- 4) z zablokowanym transportem pęcherzyków do błony komórkowej

Stwierdzono, że proces acylacji występuje w siateczce śródplazmatycznej przed rozpoczęciem glikozylacji łańcuchów polipeptydowych w diktiosomach aparatu Golgiego [37, 130]. Fakt, że acylacja jest procesem niezależnym od glikozylacji, potwierdzono stosując antybiotyk hamujący N-glikozylację i nie mający wpływu na proces acylacji. Oprócz białek palmitylowanych stwierdzono w komórkach *Saccharomyces cerevisiae* obecność białek mirystylowanych. Wykazano również obecność enzymu przenoszącego specyficzną resztę kwasu mirystylowego na N-terminalną glicynę [158].

6 ACYLOPROTEINY PIERWOTNIAKÓW

Do pierwotniaków, u których w błonach komorkowych znaleziono białka z przyłączonymi resztami długich kwasów tłuszczowych, należą *Leishmania donovani*, *Trypanosoma brucei* i *Plasmodium falciparum*. We wszystkich przypadkach cząsteczki kwasów tłuszczowych są przyłączone za pośrednictwem glicerolu jako jego 1,2-diacyl pochodne białkowe [39, 48, 49]

7 ACYLOPROTEINY BEZKRĘGOWCÓW

Wśród wyższych bezkręgowców po raz pierwszy stwierdzono obecność acylowanych białek w komórkach zarodków jeżowców [18]. Tylko jedno z ok. 20 okazało się być białkiem cytoplazmatycznym. Odłączenie w obecności metanolowego-NaOH od polipeptydu reszt acylowych wskazuje na wiązanie estrowe, natomiast działanie β -merkaptetanu na tioestrowe z cysteiną. Nie wyklucza się jednak udziału treoniny, seryny i tyrozyny jako aminokwasów biorących bezpośredni udział w wytwarzaniu wiązania estrowego.

Ciekawą z punktu widzenia funkcji acyloprotein jest zmiana stopnia acylacji białek w okresie między zapłodnieniem a pierwszymi fazami gastrulacji zarodka. Wykryto gwałtowny, liniowy wzrost stopnia acylacji wraz ze zmianą stadium rozwojowego zarodka. W czasie trwania gastrulacji szybkość acylacji białka się zmniejsza, osiągając stałą wartość w fazie pluteusa. Jednocześnie potwierdzono brak zależności czasowej między acylacją i glikozylacją. Podczas pierwszych stadiów rozwojowych zarodka, synteza N-glikoprotein jest bowiem minimalna [27, 58, 131]. Konsekwencją gwałtownego wzrostu stopnia acylacji białek w czasie trwania poszczególnych stadiów rozwojowych jeżowca jest zwiększenie hydrofobowości acylowanych białek, co może odgrywać rolę w procesie oddziaływania międzykomorkowego (np. migracje komórek), a także w procesie wytwarzania połączeń między komórkami.

8. ACYLOWANE SKŁADNIKI MIELINY

Spośród nieglikozylowanych białek wchodzących w skład kompleksów mielinowych znane są przynajmniej 2 polipeptydy tworzące połączenia z resztami długich kwasów tłuszczowych. Jednym z nich jest opisany po raz pierwszy przez F o l c h a i L e e s a w 1951 r. proteolipid centralnego układu nerwowego (PLP-proteolipid protein) [41, 135]. Drugim jest składnik nerwu kulszowego, którego budowę przedstawił A g r a w a l w 1983 r. [4].

Pierwszy z wymienionych polipeptydów, rozpuszczalny w mieszaninie chloroform-metanol, stanowi ok. 50% wszystkich składników mieliny centralnego układu nerwo-

wego [38] Uważa się, że odpowiada on za utrzymanie struktury i funkcji mieliny [154] Polipeptyd ten jest cząsteczką silnie hydrofobową zawierającą prawie 70% aminokwasów apolarnych lub hydrofobowych [44] Składa się z 277 aminokwasów tworzących 1 krótki i 4 długie odcinki hydrofobowe połączone odcinkami hydrofilowymi [154] Jego jedyną modyfikacją postranslacyjną jest acylacja Kwas tłuszczowy jest związany estrowo z treoniną w pozycji 198 (jeden z odcinków hydrofilowych) w stosunku molowym 1 : 1 [44, 93, 81, 154, 155]. Skład kwasów tłuszczowych związanych z białkiem przedstawia się następująco 77% palmitynianu, 17% oleinianu oraz 6% stearynianu [13] Proteolipid jako integralny składnik mieliny wydaje się być silnie związany z lipidami, szczególnie fosfolipidami, a wśród nich z fosfatydyloseryną [42] Boggs i współprac [17] zasugerowali możliwość połączenia 15 cząsteczek fosfatydyloseryny z 1 cząsteczką proteolipidu, przy czym hydrofilowa część fosfolipidu jest elektrostatycznie związana z dodatnio naładowanymi grupami w łańcuchu polipeptydowym Fakt, że te ostatnie są niesymetrycznie rozłożone w łańcuchu polipeptydowym, sugeruje ich niesymetryczny rozkład w błonie mielinowej Badania spektroskopowe acylowanych i deacylowanych form proteolipidów w środowisku wodnym ustaliły istotny wpływ związanych kowalencyjnie reszt acylowych na przestrzenną postać białka Biorąc to pod uwagę oraz obecność kowalencyjnie związanych kwasów tłuszczowych może mieć znaczenie dla utrzymania lameralnej struktury mieliny [14]

Mielina izolowana z obwodowego układu nerwowego (np z nerwu kulszowego) jest zbudowana z 5 podjednostek polipeptydowych, oznaczonych jako P0, V, X, P1 i P2 [4] Pierwszy z wymienionych polipeptydów, podobnie jak proteolipid mieliny ośrodkowego układu nerwowego, stanowi ok 55% wszystkich białek błonowych [47], charakteryzując się nieco większą masą cząsteczkową - $29,5 \times 10^3$ daltonów [40, 169] W przeciwieństwie do PLP stwierdzono liczne modyfikacje polipeptydu P0, takie jak glikozylacja [116], fosforylacja [46], sulfonylacja [90], a także acylacja długimi kwasami tłuszczowymi [4] Wśród tych kwasów przeważał palmitynian (56%) Stwierdzono również obecność stearynianu (16%), oleinianu (5%) oraz niewielkich ilości kwasu linolenowego

Podobnie jak w przypadku PLP ośrodkowego układu nerwowego, obecność związanych kowalencyjnie lipidów w cząsteczce P0, przynajmniej częściowo jest odpowiedzialna za ich nierozpuszczalność w rozpuszczalnikach wodnych [64] Fizykochemiczne właściwości omawianych białek, będące efektem acylacji we wczesnych stadiach różnicowania i mielinacji, sugerują możliwość ich udziału w procesie organizacji i upakowania błony mielinowej [4]

Źródłem reszt kwasów tłuszczowych w procesie acylacji białek mieliny okazały się być odpowiednie acylo-CoA [15], a nie fosfolipidy, jak to obserwowano w przypadku lipoprotein bakteryjnych [78, 170] i acyloprotein *Mycoplasma capricolum* [32, 35]

9 RODOPSYNA

Rodopsyna jest glikoproteiną występującą w błonie zewnętrznych segmentów pręcików, fotorecepcyjnych organelli kręgowców, wyspecjalizowanych w absorpcji światła [98]. Wśród licznych modyfikacji cząsteczki rodopsyny, takich jak acetylacja [163], glikozylacja [82] i fosforylacja [74] znajduje się opisana ostatnio acylacja długimi kwasami tłuszczowymi [100]. Okazało się, że rodopsyna włącza znakowany trytem palmitynian, a proces ten nie jest hamowany przez cykloheksimid, co wskazuje na posttranslacyjny jego charakter [100]. W tym sensie rodopsyna przypomina większość acyloprotein kręgowców [162]. W skład kwasów tłuszczowych związanych z cząsteczką rodopsyny wchodzi 83% palmitynianu, 7% stearynianu i 6% oleinianu [99]. Miejsce przyłączenia kwasów nie jest jeszcze precyzyjnie ustalone. Sugeruje się, że acylacja rodopsyny może zachodzić w siateczce śródplazmatycznej komórek fotorecepcyjnych oraz w wewnętrznym, jak i zewnętrznym segmencie pręcików [100, 166]. Rodopsyna jest jedynym, jak dotychczas białkiem, którego acylacja jest określana jako proces nieenzymatyczny. Nie udało się, jak dotąd, oddzielić enzymu od akceptora [99]. Stosując hydroksyloaminę, alkalia oraz β -merkaptoetanol stwierdzono, że wiązanie między rodopsyną i kwasem tłuszczowym jest wiązaniem estrowym występującym w ilości 1 lub 2 na mol białka [99, 100, 151].

Funkcja fizjologiczna acylacji cząsteczki rodopsyny może być związana przynajmniej z dwoma procesami: procesem połączenia z błoną komórkową pęcherzyków transportujących rodopsynę oraz ze zmianami w obrębie cząsteczki rodopsyny w odpowiedzi na bodziec świetlny (acylacja i deacylacja cząsteczki). Przypuszcza się, że zmiana przestrzennej struktury cząsteczki rodopsyny może mieć wpływ na proteolizę C-końcowego peptydu rodopsyny. W ciemności cząsteczka rodopsyny jest bardziej oporna na proteolizę [76]. Zmiany konformacyjne mogą też mieć wpływ na fosforylację C-końcowego regionu cząsteczki [52] oraz zależne od światła przyłączenie białek aktywujących fosfodiesterazę cGMP [75].

10 ACYLOPROTEINY BŁON KOMÓRKOWYCH KOMÓREK KRWI

Wykazano, że niektóre białka błon plazmatycznych ludzkich erytrocytów wiążą kwasy tłuszczowe, zarówno nasycone jak i nienasycone [8, 9, 89]. Ustalono w nich obecność 29% stearynianu, 18% palmitynianu, 24% arachidonianu i 14% oleinianu związanych kowalencyjnie. Kwasy $C_{18:2}$, $C_{22:6}$, $C_{24:0}$, $C_{24:1}$ i $C_{26:0}$ występują w ilościach śladowych. Szczegółowe badania pozwoliły stwierdzić, że najwięcej znakowanego palmitynianu wiąże się z białkiem błonowym erytrocytów słabobarwiącym się w żelu poliakryloamidowym wędrującym między pasmem 4,2 i 5. Oprócz tego białka inne wyznaczone w mniejszym stopniu występują w obrębie pasm 1, 2, 3, 4,1, 4,2, 5, i 6. Białka o największych masach cząsteczkowych (pasmo 1 i 2) wiązały największe ilości znakowanego stearynianu. Acylo-CoA znakował ok. 20-krotnie wydajniej niż

kwasy nieaktywowane, a błony erytrocytarne znakowały się słabiej niż całe erytrocyty

Leukocyty cechujące się intensywniejszym procesem syntezy białka w porównaniu z bezjądrowymi erytrocytami osiągają wysycenie białek błonowych kwasami tłuszczowymi w czasie o połowę krótszym niż te ostatnie (45 min)

Pierwszą ze zidentyfikowanych acyloprotein komórek krwi był receptor transferyny odpowiedzialny za odłączanie od niej żelaza [66]. Stanowi on główne białko powierzchniowe błon dojrzewających komórek i syntetyzujących hemoglobinę retikulocytów [107]. Dojrzałe erytrocyty tracące zdolność wiązania żelaza [66, 107, 157], uwalniają do środowiska receptor białkowy w postaci pęcherzyków [108]. Oprócz stwierdzonej wcześniej fosforylacji receptora [67], na miejsce również jego acylacja, zarówno w komórkach hodowanych [103, 104], jak i w wyizolowanych błonach komórkowych [3]. Wydaje się, że kwas tłuszczowy jest związany tu tiostrowo z cysteiną zlokalizowaną w błonowym regionie receptora [103, 104]. Po raz pierwszy obserwowano tu cykliczne przyłączanie i odłączanie reszty acylowej do łańcucha polipeptydowego. Proces acylacji miałby miejsce w dowolnym czasie po zsyntetyzowaniu receptora, a deacylacja odbywałaby się z większą szybkością niż w wyniku samej degradacji receptora [103]. Wiadomo, że białko receptorowe po przyłączeniu żelaza na powierzchni komórki przemieszcza się do jej wnętrza, a po oddysocjowaniu żelaza w lizosomach wraca na powierzchnię błony komórkowej [21,36]. Sugeruje się, że acylacja receptora transferyny umożliwia, bądź ułatwia jego poruszanie się w błonie [103]. Miejscem acylacji byłaby powierzchnia wewnętrzna błony cytoplazmatycznej [153], a nie, jak to sugerowano wcześniej, jej wnętrze [103].

Cykliczność acylacji obserwowano również w przypadku ankyryny [153], należącej do grupy białek cytoszkieletu cytoplazmatycznej strony błony erytrocytarnej [10]. Co więcej, stwierdzono obecność przynajmniej 2 populacji cząsteczek ankyryny lub też 2 miejsc wiążących w cząsteczce [152]. Możliwość odłączenia i przyłączenia reszt acylowych długo po zakończeniu syntezy polipeptydu wskazuje na dostępność miejsc wiążących dla kwasów tłuszczowych. Świadczy to o powierzchniowej lokalizacji kwasów, co z kolei umożliwia kontakt acyloproteiny z dwuwarstwą lipidową. Tak więc obecność kwasów stwarza możliwość okresowego zakotwiczenia ankyryny w błonie komórkowej [10]. Acylowana ankyryna poprzez zwiększone oddziaływanie z lipidami może wpływać nie tylko na lokalny skład lipidowy, ale także na geometrię białek cytoszkieletu, a nawet organizację białek integralnych w błonie [152].

Kolejną acyloproteiną błonową, o podobnym charakterze, okazało się być białko receptorowe insuliny [55]. To dimeryczne białko wyizolowane z ludzkich limfocytów o masie podjednostek $\alpha = 135$ tys. i $\beta = 95$ tys. daltonów może przyłączać zarówno mirystynian (obydwie podjednostki), jak i palmitynian (tylko podjednostki β) [57].

Białkiem zasługującym na uwagę obok typowych acyloprotein jest acetylocholi-

noesteraza błony erythrocytarnej [115] W cząsteczce tego enzymu kwasy tłuszczowe są związane z glicerolem, który poprzez etanoloaminę łączy się z C-końcem polipeptydu. Zwiększona w ten sposób hydrofobowość rejonu C-końca cząsteczki umożliwia jego zakotwiczenie w dwuwarstwie lipidowej [115]

11. ACYLOPROTEINY FIBROBLASTÓW

Populacja cząsteczek fibronektyny dzieli się co najmniej na 2 główne subpopulacje - osoczową i komórkową. Subpopulację komórkową stanowią cząsteczki związane z obszarem okołojądrowym, cząsteczki zlokalizowane w cytoplazmie oraz cząsteczki związane z błoną plazmatyczną [109]. Obecność kowalencyjnie związanych kwasów tłuszczowych [79] wykazano tylko w przypadku fibronektyny trypsynoopornej, która stanowi ok. 30% [171] fibronektyny komórkowej. Ponieważ główną część fibronektyny całkowitej stanowią cząsteczki związane z błoną, a także cząsteczki prekursorowe, sugeruje się, że funkcją reszt acylowych jest zakotwiczenie cząsteczek białka oddziałującego z cytoszkieletem w błonie.

Podobnie, połączenie pęczków mikrofilamentów z błoną komórkową, w którym pośredniczy winkulina [1, 56] jest uzależnione od obecności reszt acylowych związanych z tym białkiem [22, 69]. Doświadczenia wykonane na zarodkach kurzych zainfekowanych temperaturozależnym mutantem wirusa mięsaka Rousa, pozwoliły ustalić, brak zależności procesu acylacji od temperatury [22], podobnie jak w przypadku innych acyloprotein [23, 150] Wykazano natomiast zależność między szybkością acylacji i stanem zainfekowanej komórki. W czasie transformacji ilość przyłączonych do winkuliny kwasów tłuszczowych jest mniejsza o 2/3 w porównaniu z cząsteczkami komórek nietransformujących [22]. Sugestywne wydaje się być przypuszczenie, że funkcjonowanie winkuliny modulowane jest obecnością reszt acylowych. Cząsteczki winkuliny z różną ilością przyłączonych kwasów tłuszczowych mogą w różny sposób wpływać na asocjację filamentów z błoną, a tym samym np. na kształt komórki.

12. ACYLOPROTEINY ZWIĄZANE Z LIPOPROTEINAMI OSOCZA

Lipoproteiny osoczowe są rozpuszczalnymi w wodzie wieloskładnikowymi kompleksami transportującymi tłuszcze we krwi [141]. Kompleksy te składają się z lipidów obojętnych, stanowiących rdzeń, i z otaczających go lipidów polarnych oraz specyficznych białek [135]. Dominująca wśród tych białek apolipoproteina A-1, pojawiająca się jako pierwotny produkt ekspresji genu, jest modyfikowana proteolitycznie [80] i glikozylowana [105]. Niedawno stwierdzono również acylację tego typowego białka wydzielniczego [60]. Wykazano specyficzność procesu potwierdzoną zużyciem tylko nasyconych reszt acylowych ze środowiska. Wstępnie ocenia się,

ze lipoproteiny, takie jak E, A-II, A-IV, B-100, C-II i C-III są również acylowane, chociaż w znacznie mniejszym stopniu [60] Zwiększenie hydrofobowości cząsteczek apolipoprotein może wpływać na

- ich transport wewnątrzkomórkowy,
- interakcję z innymi składnikami kompleksu lipoproteinowego lub
- ich wymianę między różnymi lipoproteinami

13 ACYLOPROTEINY ZWIĄZANE Z ANTYGENAMI

W regulacji odporności immunologicznej biorą udział, m in., antygeny będące produktem ekspresji genów głównego kompleksu zgodności tkankowej - MHC (krótkie ramię chromosomu 6) Antygeny drugiej z dwu klas (u człowieka HLA-D) wykazujące wysokiego stopnia polimorfizm są eksponowane na powierzchni komórek, takich jak limfocyty B, makrofagi, neutrofile i in Po wewnętrznej stronie błony komórkowej antygeny te są związane z łańcuchami polipeptydowymi nie wykazującymi zmienności [68]. Ilość tych niepolimorficznych łańcuchów zwiększa się po potraktowaniu komórek interferonem [73] lub różnymi czynnikami hamującymi proliferację [113] Koniec aminowy polipeptydu jest eksponowany po stronie cytoplazmatycznej błony komórkowej [29], a krótki, hydrofobowy odcinek do niego przylegający jest związany z błoną [156] Do opisanych potstranslacyjnych modyfikacji polipeptydu należą N-glikozylacja, O-glikozylacja i sialylacja [30, 85, 118]. Wykazano również obecność w antygenie związanych kowalencyjnie cząsteczek kwasów tłuszczowych połączonych z jedyną cysteiną zlokalizowaną w hydrofobowym odcinku błonowym białka [70, 72] Zablockowanie wolnej grupy -SH resztą acylową hamuje tworzenie homodimeru, podobnie jak w przypadku receptora transferyny [103]. Podobną modyfikację opisano też dla nie wykazujących zmienności łańcuchów antygenowych myszy [71], a także dla antygenowego łańcucha ciężkiego [70, 72] Połączenie łańcucha o małej zmienności i ciężkiego łańcucha antygeny ma miejsce tuż po ich zsyntetyzowaniu [77]. Modyfikacja obydwóch łańcuchów resztami acylowymi występuje podczas transportu do błony komórkowej Kierowanie łańcuchów do błony wydaje się być jedną z możliwych funkcji, jaką spełniają przyłączone reszty acylowe. Po osiągnięciu błony, kompleks antygen-łańcuch o małej zmienności dysocjuje, przy czym tylko pierwszy z nich pojawia się na powierzchni błony [2]

14. ACYLOPROTEINY ŚLUZU

Śluz jest chemicznie niejednorodną substancją wydzielaną przez różne układy tkankowe (co stanowi o różnicach w jego charakterystyce). Wśród wielu jego różnorodnych funkcji fizjologicznych znajduje się m.in. ochrona i nawilżanie powierz-

chni wydzielających, a także transport substancji [6, 7, 25, 84, 144]. W skład śluzu wchodzi wysokocząsteczkowe glikoproteiny - mucyny (1-10%), woda (95%), sole (1%) (których skład jest zbliżony do soli osocza), niewielkie ilości glicerolipidów, kwasów nukleinowych i białek (albumina osocza, IgA ze składnikiem wydzielniczym).

Składnikiem odpowiedzialnym za lepkość i elastyczność śluzu są mucyny, których skład cząsteczkowy jest charakterystyczny, wyróżniając je spośród innych glikoprotein. Te silnie glikozylowane makromolekuły zawierają 70-80% węglowodanów w stosunku wagowym występujących w postaci rozgałęzionych łańcuchów liczących od kilku do kilkunastu reszt cukrów prostych. Wśród nich występują N-acetylogalaktozamina, N-acetyloglukozamina, galaktoza, fukoza i kwasy sialowe. Nieobecne są natomiast glukoza, mannoza i kwasy uronowe. Łącuchy cukrowe są połączone z białkiem poprzez grupę hydroksylową treoniny lub seryny stanowiących ok. 40% wszystkich aminokwasów. Zgodnie z przyjętym modelem cząsteczki mucyny [6, 7] w jej skład wchodzi nieglikozylowana, centralna podjednostka o masie 7×10^4 daltonów, wiążąca poprzez mostki dwusiarczkowe 4 silnie glikozylowane łańcuchy boczne o masie od 3×10^5 do 5×10^5 daltonów. Poza obecnością cukrów stwierdzono także kowalencyjnie związane kwasy tłuszczowe, przy czym sugeruje się ich obecność w części nieglikozylowanej cząsteczki mucyny żółdkowej [139, 140], a także mucyny występującej w ślinie [137, 141, 142]. Wykazano obecność 6 moli kwasów na mol białka (2×10^6 daltonów). Stwierdzono występowanie zarówno nasyconych (77%), jak i nienasyconych reszt acylowych. Palmitynian, stearynian i oleinian są głównymi składnikami lipidowymi mucyn. Około 15% stanowią inne kwasy, np. $C_{16:1}$, $C_{20:2}$, $C_{22:0}$ i $C_{24:0}$. Wrażliwość wiązań kwasów z białkiem na działanie słabych alkaliów i hydroksyloaminy wskazuje na estrowy typ tych połączeń [142, 147]. Większe wysycenie kwasami tłuszczowymi podjednostkowej formy glikoproteiny w porównaniu z formą polimeryczną sugeruje, że proces acylacji występuje przed wytworzeniem ostatecznego kształtu cząsteczek [146, 147]. Równocześnie stwierdzono, co jest wielce zaskakujące, możliwość modyfikacji podjednostek tuż po rozpoczęciu syntezy łańcucha polipeptydowego [148]. Wcześniej już opisano kotranslacyjną modyfikację białek resztami acylowymi, ale tylko kwasem mirystynowym i tylko N-koncowej glicyny. Obecność reszt acylowych w cząsteczkach mucyn wpływa na ilość zasocjowanych z nimi lipidów [137, 143, 145], na podatność proteolityczną [136, 137], lepkość [145] oraz na przepuszczalność śluzu dla jonów [119].

15. WEWNĄTRZKOMÓRKOWA ORGANIZACJA PROCESU ACYLACJI

Pierwsza publikacja omawiająca wewnątrzkomórkową lokalizację procesu acylacji pojawiła się w 1980 r. [130]. Jako miejsce acylacji białek zaproponowano aparat

Golgiego, a proces ten miał być niezależny od glikozylacji, metylacji czy fosforylacji. Wkrótce potem otrzymano wyniki potwierdzające tę hipotezę [37, 112]. Zaproponowano również możliwość wystąpienia procesu acylacji w obrębie błon siateczki śródplazmatycznej [11]. Wykrycie donorów grup acylowych nastąpiło znacznie więcej trudności aniżeli znalezienie ich akceptorów. Wspomniano wcześniej, że bakteryjne acyloproteiny korzystają z reszt acylowych związanych w fosfolipidach [33, 78]. Badanie szybkości przeniesienia grup acylowych do fosfolipidów i na cząsteczki białek w komórkach eukariotycznych pozwoliło ustalić, że kompleks kwas tłuszczowy-CoA jest najefektywniejszym dawcą reszt kwasowych w procesie acylacji białek [124]. W związku z powyższym sugerowano specyficzność procesu acylacji, w którym obok dawcy i biorcy reszt acylowych uczestniczą enzymy określane jako acylotransferazy [11]. Po raz pierwszy aktywność acylotransferazową stwierdzono w komórkach BHK (baby hamster kidney) związanej z frakcją mikrosomalną. Aktywności takiej nie wykazuje frakcja cytoplazmatyczna [11]. Enzym ten jest integralnym białkiem błonowym, na co wskazuje możliwość jego ekstrakcji z błony dopiero w obecności wysokich stężeń soli. Enzymy o podobnej aktywności stwierdzono także w komórkach śluzówki jelita grubego [83, 138] oraz w komórkach wydzielniczych ślinianek podszczękowych i podjęzykowych [142]. Wymienione enzymy badano na podstawie ich zdolności do włączania palmitynianu, przy czym żaden z nich nie został wyizolowany i oczyszczony. Opisano również enzym przyłączający mirystynian do białek w komórkach drożdży [158, 159] i w szczurzych komórkach mięśniowych [159]. Oczyszczona acylotransferaza włączająca mirystynian jest peryferycznym białkiem błonowym lub polisomowym wymagającym lekko zasadowego pH i obecności histydyny. Jest on monomerym o masie cząsteczkowej 55×10^3 daltonów. O aktywności tego wysoce specyficznego enzymu decydują skład i długość peptydowego akceptora [161].

Pojawiły się też publikacje sugerujące odmienny mechanizm acylacji od przedstawionego. Nie oddzielono aktywności acylotransferazowej od akceptora w procesie acylacji rodopsyny [99] i mieliny [16]. W tym ostatnim przypadku wykazano, że cząsteczka PLP jest jednocześnie enzymem i akceptorem.

Otychczas ukazała się tylko jedna praca, której wyniki wskazują na obecność enzymu odłączającego resztę acylową od polipeptydu [12]. Enzym ten zidentyfikowano w komórkach wątroby szczura, cielej nerkę, ludzkiej śluzówki i nazwano acyloesterazą. Białko enzymatyczne nie zostało jednak wyizolowane, niemniej wiadomo, że jest ono zlokalizowane w błonach mikrosomalnych. Jego aktywność zależy od temperatury i pH (niska temperatura i niskie pH zmniejszają aktywność), a także od obecności detergentów. Stwierdzono, że oczyszczony enzym nie posiada aktywności acylotransferazy.

16. SPECYFICZNOŚĆ PROCESU ACYLACJI BIAŁEK

Pierwotnie uważano, że acylacja dotyczy wyłącznie białek związanych z błonami. Okazało się jednak, że proces ten jest raczej związany z funkcją, jaką pełni polipeptyd niż z jego lokalizacją cytoplazmatyczną czy błonową. Większość doniesień sugeruje posttranslacyjny charakter procesu acylacji, chociaż pojawiły się publikacje donoszące o kotranslacyjnym charakterze modyfikacji. Obecnie do badania acylacji są stosowane 2 rodzaje kwasów, tj. palmitynian i mirystynian. Pierwszy z nich - palmitynian tworzy wiązanie estrowe z seryną i treoniną oraz tioestrowe z cysteiną. Są także nieliczne doniesienia o palmitynianie połączonym amidowo [61]. Białka palmitylowane są związane z błonami. Wśród nich występują polipeptydy nieglikozylowane [86, 167] (np. ankyryna [152] i p21^{ras} [134]) glikoproteiny eksponowane na powierzchni błon (acyloproteiny wirusów, receptor transferyny, antygeny głównego kompleksu zgodności tkankowej, fibronektyna błonowa [70, 86, 102, 104, 127, 167]). Jak wspomniano, proces acylacji jest zlokalizowany głównie na obszarze aparatu Golgiego i błon siateczki śródplazmatycznej, przy czym akceptorami reszt acylowych w tym obszarze byłyby białka zewnętrzne błony. Natomiast nieglikozylowane polipeptydy syntetyzowane na wolnych polisomach są modyfikowane kwasami tuż przed lub zaraz po włączeniu ich po wewnętrznej stronie błony, jak to ma miejsce w przypadku wspomnianej ankyryny [152] i p21^{ras} [134]. Ostatnio sugeruje się obecność acylotransferazy również w błonach komórkowych, prawdopodobnie po ich wewnętrznej stronie [167].

Spośród przebadanych akceptorów mirystynianu najbardziej rozpowszechnionym jest N-końcowa glicyna. Receptor acetylocholinowy jest dotychczas jedynym polipeptydem, w którym kwas ten jest połączony z ϵ -aminową grupą lizyny [101]. Ani słabe alkalia, ani hydroksyloamina nie uwalniają tak związanych kwasów. Lokalizacja tych acyloprotein nie jest ograniczona wyłącznie do błon lub cytoplazmy. Proces przyłączania mirystynianu zachodzi natomiast wyłącznie w czasie syntezy łańcucha polipeptydowego lub tuż po jej zakończeniu [86, 102]. Świadczy o tym zupełne zahamowanie mirystylacji w obecności cykloheksimidu. Spośród mirystyloprotein żadna nie jest glikozylowanym i transbłonowym polipeptydem. Zaliczamy do nich: katalityczną podjednostkę cAMP - zależnej kinazy białkowej [26], p15 - błonowe białko białaczki ssaków [59, 132, 133], kalcyneurynę b - białko o aktywności fosfatazy [5], reduktazę NADH-cytochrom b₅ 106, p⁵⁶ - I specyficzne białko z komórek LASTRA [164] oraz p60 - transformujące białko mięsaka Rousa wykazujące aktywność tyrozyno-specyficznej kinazy białkowej [24].

17. BIOLOGICZNE ZNACZENIE PROCESU ACYLACJI

Śledząc historie odkrycia poszczególnych rodzajów modyfikacji łańcuchów polipeptydowych, takich jak fosforylacja, metylacja czy glikozylacja należy stwierdzić, że wyjaśnienie roli tak modyfikowanych białek było (i jest) wielce utrudnione [45, 53]. Już ponad 35 lat temu F o l c h i L e e s [41] opisali po raz pierwszy białko wchodzące w skład mieliny wyizolowanej z mózgu, które z powodu silnych właściwości hydrofobowych nie ekstrahowało się rozpuszczalnikami organicznymi. Od tego czasu wykryto wiele białek, połączonych kowalencyjnie z lipidami, w szczególności zaś z długimi kwasami tłuszczowymi. Przy czym zdecydowaną ich większość wykryto (i opisano) w ciągu ostatnich 8 lat. Ewolucyjnie konserwatywny charakter procesu acylacji białek wydaje się być dowodem na istotne znaczenie biologiczne tej modyfikacji. Jednocześnie określoną funkcję biologiczną kowalencyjnie związanych kwasów tłuszczowych ustalono tylko w przypadku nielicznych spośród acyloprotein, których przykłady przedstawiono powyżej. Obecnie wydaje się niemożliwe wskazanie jednej lub nawet kilku funkcji, jakie być może spełniają związane z białkiem reszty acylowe. Biorąc pod uwagę różną długość przyłączanych kwasów tłuszczowych, funkcjonalną i strukturalną różnorodność akceptorów białkowych oraz typy wiązań między kwasami i białkiem, a także wysoką specyficzność acylotransferaz należy raczej spodziewać się biologicznej wielofunkcyjności.

W wielu przypadkach sugeruje się za S c h m i d t i n [129], że zwiększona lokalnie obecnością reszty acylowej hydrofobowość cząsteczki acyloprotein jest po części odpowiedzialna za jej interakcję z błoną. Biorąc pod uwagę skład aminokwasowy acyloprotein błonowych są wśród nich silnie hydrofobowe, takie, jak PLP mieliny [166], lipoproteina błony bakteryjnej [20] czy też polipeptydy (np. ligatyna), w skład których nie wchodzi aminokwasy hydrofobowe [65]. Możliwość interakcji acyloprotein z błoną została potwierdzona na podstawie wielu obserwacji. I tak włączanie immunoglobulin w błony liposomów jest możliwe dopiero po acylacji tych cząsteczek [61], a syntetyzowane na rybosomach cytoplazmatycznych niektóre białka transformujące są acylowane przed wbudowaniem ich do błony [88, 111]. Wykazano również interakcję między związanymi z wirusowym białkiem G resztami acylowymi i lipidami liposomów [111].

Nie można przyjmować, że rola kowalencyjnie związanych kwasów tłuszczowych jako czynnika mocującego białka w błonie jest jedyna. Między innymi stwierdzono wpływ reszt acylowych na oddziaływania typu białko-białko i białko-lipid poprzez ich udział w procesie formowania struktury przestrzennej i orientacji polipeptydu [101]. Wstrzymanie ceruleniną acylacji wirusowego białka G hamowało proces składowania wirionów i ich uwalniania przez komórkę gospodarza [121]. Deacylacja powierzchniowych glikoprotein wirusa grypy zmniejsza jego wirulencję i zdolność do hemolizowania krwinek [128], co sugeruje udział acyli w procesie fuzji wirio-

nów z komórką gospodarza. Okazało się, że reszty acylowe związane z niektórymi białkami transformującymi mogą służyć do umocowania w błonie także białek cytozolowych [31, 59, 134]. Przyłączenie kwasu do białka cytozolowego może warunkować jego asocjację z błoną, a także sortowanie i kierowanie do błony. Białka z grupy p21^{ras}, w których cysteina znajdująca się blisko C-końca jest palmitylowana [134], po deacylacji tracą jednocześnie zdolność do asocjowania z wewnętrzną stroną błony i transformacji komórek [168]. Mirystylowane białka transformujące, takie jak p60^{src}, zachowują się podobnie [31, 110]. Rola kowalencyjnie związanych reszt acylowych w selektywnym kierowaniu białek w stronę błony została potwierdzona badaniami Pellmana i współprac [110]. Skonstruowali oni gen, w którym pierwszy odcinek nukleotydowy odpowiadał sekwencji pierwszych 14 aminokwasów p60^{ras}. Pozostały skład nukleotydów odpowiadał innemu białku. W wyniku translacji otrzymano typowy polipeptyd fuzyjny połączony z błoną i posiadający N-końcowo związany mirystynian.

Stwierdzono także występowanie białek, których acylowanie i deacylowanie przebiega w sposób cykliczny. Zaliczane do nich są receptor transferyny [3, 57, 103, 104], rodopsyna [99, 100, 166], ankryna [152, 153] i białko p21^{N-ras} [87].

Wiele jeszcze cząsteczek białkowych nie zostało przebadanych pod względem wartości związanych kowalencyjnie kwasów tłuszczowych. Nie wyjaśniono także ich funkcji. Wspomniana cykliczna acylacja warunkująca zakotwiczenie białka w błonie bądź jego uwolnienie, mogłaby mieć ogromne znaczenie w procesie kontroli aktywności enzymów błonowych. Ponadto pozostają do wyjaśnienia szczegóły mechanizmu acylacji, specyficzność działania enzymów z punktu widzenia akceptora białkowego [159] i przyłączanego kwasu tłuszczowego, a także mechanizmy selekcji i kierowania białek przez reszty acylowe do błony.

Autor dziękuje Pani prof. dr hab. Wandzie Leyko za wiele cennych uwag podczas przygotowywania pracy do druku.

Maszynopis wpłynął do Redakcji 4 V 1988

LITERATURA

- [1] Abercrombie M., Heaysman J. E. M., Pegrum S. M., *Exp. Cell Res.*, **67**, 359 (1971).
- [2] Accolla R. S., Carrata G., Buchegger F., Carrel S., Mach J.-P., *J. Immunol.*, **134**, 3265 (1985).
- [3] Adam M., Rodriguez A., Turbide C., Lyarrick J., Meighen E., Johnstone R. M., *J. Biol. Chem.*, **259**, 15460 (1984).
- [4] Agrawal H. C., Schmidt R. E., Agrawal D. J., *J. Biol. Chem.*, **258**, 6556 (1983).
- [5] Aitiken A. P., Cohen S., Santikarn S., Williams D. H., Calder A. G., Smith A., Klee C. B., *FEBS Lett.*, **150**, 314 (1982).

- [6] Allen A, "Physiology of gastrointestinal tract". Ed. L R Johnston, Raven Press, New York 1981, s 617
- [7] Allen A, Bell A., Mantle M., Pearson J P, "Mucus in health and disease - II", Eds E. N. Chantler, J. S. Elder, M Elstein, Plenum Press, New York 1982, s 115.
- [8] Antoku Y., Sakai T., Goto I., Iwashita H., Kuroiwa Y, Exp. Neurol., 87, 206 (1985).
- [9] Antoku Y., Sakai T., Goto I., Miyoshino S, Iwashita H., Kuroiwas Y., Neurology, 35, 1512 (1985)
- [10] Bennet V, Annu Rev. Biochem, 54, 273 (1985).
- [11] Berger M., Schmidt M. F. G., FEBS Lett, 187, 289 (1985).
- [12] Berger M., Schmidt M. F. G., J Biol Chem, 261, 14912 (1986)
- [13] Bizzozero O A, Dominguez D., Pasquini J. M., Soto E. F., J. Neurosci. Res, 14, 197 (1985)
- [14] Bizzozero O. A., Lees M. 8., Biochemistry, 25, 6762 (1986)
- [15] Bizzozero O. A., Lees M. 8, J Neurochem., 46, 630 (1986)
- [16] Bizzozero O. A., McGarry J F, Lees M. 8., J. Biol Chem, 262, 13550 (1987).
- [17] Bogggs J M., Wood D. D., Moscarello M. A., Papahadjopoulos D., Biochemistry, 16, 2325 (1977).
- [18] Bolanowski M A., Earles B. J, Lennarz W. J., J Biol. Chem., 259, 4934 (1984).
- [19] Braun V., Bosch V, Eur J. Biochem, 28, 51 (1972)
- [20] Braun V., Roterling H, Ohns J D., Hagenmaier H Eur. J Biochem, 70, 601 (1976).
- [21] Brown M. S, Anderson R G., Goldstein J. L., Cell 32, 663 (1983).
- [22] Burn P., Burger M. M., Science, 235, 476 (1987).
- [23] Buss J. E., Kamps M P., Sefton B. M, Moll. Cell Biol., 4 2697 (1984).
- [24] Buss J. R., Sefton B M., J. Virol., 5, 7 (1985).
- [25] Carlstedt I., Sheehan J. K., "Oral interfacial reactions of bone, soft tissue and saliva". Eds P.-O. Glantz, S. A. Leach, T Ericson IRC Press Limited, Oxford 1985, 1, 97.
- [26] Carr S. A., Biemann M, Shoji S., Parmelee D. C. Titani K., Proc Natl. Acad. Sci USA, 79, 339 (1982)
- [27] Carson D. D., Lennarz W. J., J. Biol. Chem., 156, 4679 (1981)
- [28] Chow M., Newman J. F. E., Filman D., Hoglie J. M., Rowlands D. J., Brown F., Nature, 327, 482 (1987).
- [29] Claesson L., Larchammar D., Rask L, Peteron A., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 80, 7395 (1983).
- [30] Claesson L., Peterson P. A., Biochemistry, 22, 3206 (1983)
- [31] Cross F R., Garber E. A, Pellman D., Hanafusa H Moll. Cell Biol, 4, 1834 (1984).
- [32] Dahl C. E., Dahl J. S., J. Biol. Chem., 258, 11814 (1983)
- [33] Dahl C. E., Dahl J. S, J. Biol Chem., 259, 10771 (1984).
- [34] Dahl C. E., Sacktor N C, Dahl J. S, J. Bacteriol., 162, 445 (1985).
- [35] Dahl J. S., Dahl C. E., Fed. Proc., 42, 1720 (1983).
- [36] Dautry-Varsat A., Ciechanover A., Lodisch H. F Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 80, 2258 (1983).
- [37] Dunphy W. G., Fries E., Urbani L. J., Rothman J. E., Proc Natl. Acad. Sci. USA, 78, 7453 (1981).
- [38] Eng L. E., Chao R. C, Gersil B., Pratt D, Tavaststjerna M. G., Biochemistry, 7, 4455 (1968).
- [39] Etges R., Bouvier J., Bordier C., The EMBO J. 5, 597 (1986).
- [40] Everly J. L., Brady R. D., Quarles R. H., J. Neurochemistry 21, 329 (1973).

- [41] Folch-Pi J., Lees M., J Biol Chem, 191, 807 (1951).
- [42] Folch-Pi J., Stoffyn P J., Ann. NY Acad Sci USA, 195, 86 (1972)
- [43] Fujijama A., Tamanoi F., Proc Natl Acad Sci USA, 83, 1266 (1986)
- [44] Gagnon J., Finch P R., Wood O. D., Moscarello M A., Biochemistry, 10, 4756 (1971)
- [45] Gibson R., Schlesinger S., Kornfeld S., Trends Biochem. Sci., 5, 290 (1980).
- [46] Gilbert W. R., Garwood M. M., Agrawal D., Schmidt R e., Agrawal H., Neurochem Res, 7, 1495 (1982)
- [47] Greenfield S., Brostoff S., Eylar E H., Morell P., Neurochemistry, 20, 1207 (1973)
- [48] Halder K., Ferguson M A. J., Cross G A M., J Biol Chem, 260, 4969 (1985).
- [49] Hambrey P N., Forsberg C M., Mellors A., J Biol. Chem., 261, 3232 (1986)
- [50] Hancock R. E W., Reeves P., J. Bacteriol., 127, 98 (1976)
- [51] Hantke K., Braun V., Eur J. Biochem, 34, 284 (1973)
- [52] Hargrave P., Fong S.-L., McDowell J. H., Mas M. I., Curtis D. R., Wang J. K., Juszczyk R., Smith D P., Neurochem Int, 1, 231 (1980)
- [53] Hasilik A., Trends Biochem Sci., 5, 237 (1980)
- [54] Havekes L M., Lugtenberg B. J J., Hoekstra W. P M., Mol Gen Genet, 190, 1 (1976)
- [55] Head J A., Collier E., Watkinson A., J. Biol Chem, 262, 954 (1987).
- [56] Heath J. P., Dunn G A., J. Cell Sci, 29, 197 (1978).
- [57] Hedo J. A., Collier C., Watkinson A., J. Biol. Chem. 262, 954 (1987).
- [58] Heifetz A., Lennarz W J., J. Biol. Chem, 254, 6119 (1979)
- [59] Henderson L E., Krutzsch H C., Groszlan S., Proc Natl. Acad Sci USA, 80, 339 (1983)
- [60] Hoeg J. M., Meng M S., Ronan R., Fairwell T., Brewer H B., J. Biol. Chem., 261, 3911 (1986).
- [61] Huang A., Huang L., Konhel S. J., J. Biol. Chem., 255, 8014 (1980)
- [62] Inouye M., Shaw J., Shen C., J. Biol Chem, 247, 8154 (1972).
- [63] Inouye S., Wang S., Sekizawa J., Halegoya S., Inouye M., Proc. Natl Acad Sci USA, 74, 1004 (1977).
- [64] Isaque A., Roomi M. W., Szymanska I., Kowalski S., Eylar E H., Can. J Biochem., 58, 913 (1980)
- [65] Jakoi E R., Ross P. E., Ping Ting-Beal H., Kaufman B., Vanaman T. C., J. Biol. Chem., 262, 1300 (1987).
- [66] Jandl J. H., Katz J H., J Clin. Invest, 42, 314 (1963).
- [67] Johnstone R. M., Adam A., Turbide C., Larrick J., Can. J Biochem Cell Biol., 62, 927 (1984).
- [68] Jones P. P., Murphy O. B., Hewgill D., McDevitt H. O., Immunochemistry, 16, 51 (1978).
- [69] Kallie S., Wigglesworth N. M., FEBS Lett, 213, 428 (1987).
- [70] Kaufman J F., Krangel M. S., Strominger J L., J. Biol. Chem., 259, 7230 (1984).
- [71] Koch N., Hpmmerring G. J., Biochemistry, 24, 6185 (1985).
- [72] Koch N., Hpmmerring G. J., J. Biol Chem., 261, 3434 (1986)
- [73] Koch N., Wong G. H. W., Schrader J W., J Immunol., 132, 1361 (1984).
- [74] Kuhn H., Biochemistry, 17, 4387 (1978).
- [75] Kuhn H., Methods Enzymol., 81, 556 (1982).
- [76] Kuhn H., Mommertz O., Hargrave P. A., Biochim. Biophys Acta, 679, 95 (1982).

- [77] Kvist S, Wiman K., Cleasson L, Peterson P A, Dobrestein B, *Cell*, 29, 61 (1982)
- [78] Lai J S., Phlbrick W M., Wu H C, *J Biol Chem*, 255, 5384 (1980).
- [79] Lange-Mutschler J, *FEBS Lett*, 201, 210 (1986)
- [80] Law S W., Brewer H. B, *Proc Natl. Acad Sci. USA*, 81, 66 (1984)
- [81] Lees M B, Sakura J D., Sapirstein V S., Curtolo W, *Biochim Biophys Acta*, 559, 209 (1979).
- [82] Liang C-J, Yamashita K, Muelienberg C G, Shichi H, Kobata A, *J. Biol. Chem*, 254, 6414 (1979).
- [83] Liau Y H, Slomiany B. L, Slomiany A, Piasek A, Palmer D, Rosenthal W S, *Digestion*, 32, 57 (1985).
- [84] Litt M, "Mucus and mucosa", CIBA Foundation Symposium 109, Pitman, London 1984, s. 196
- [85] Machamer C. E, Cresswell P, *Proc Natl Acad Sci USA*, 81, 1287 (1984).
- [86] Magee A I, Courtneidge S. A, *The EMBD J*, 4, 1137 (1985)
- [87] Magee A I, Gutierrez L., McKay I. A., Marshall C J, Hall A., *Embo J.*, 6, 3353 (1987)
- [88] Magee A J, Schlesinger M J, *Biochim Biophys Acta*, 694, 279 (1982).
- [89] Marinetti G V, Cattieu K, *Biochim. Biophys Acta*, 685, 109 (1982).
- [90] Matthieu J M, Everly J H, Brady R D, Quarles R H., *Biochim Biophys Acta*, 392, 167 (1975)
- [91] Mizuno T., *J. Biochem. Tokyo*, 86, 991 (1979)
- [92] Mizushima S, *Mol. Cell Biochem*, 60, 5 (1984)
- [93] Moscarello M A., Gangon J., Wood D. D, Anthony J, Epand R M, *Biochemistry*, 12, 3402 (1973).
- [94] Nakamura K, Inouye M, *Cell*, 18, 1109 (1979)
- [95] Nakamura K, Pirtle R M, Takeishi K, Inouye M, *J. Biol. Chem.*, 255, 210 (1980)
- [96] Nielsen J. B K, Lampen J O., *J Biol Chem*, 257, 4490 (1982).
- [97] Nyström S, Johanson K-E., Wieslander A., *Eur J Biochem.*, 156, 85 (1986)
- [98] O'Brien P J., "Receptors and recognition" Eds P Cuattrecasas, M. E Greaves, t. 6, Chapman and Hall, London 1978, s. 109
- [99] O'Brien P J., St Jules R S., Reddy T. S, Bazan N G., Zatz M, *J. Biol. Chem.*, 262, 5210 (1987).
- [100] O'Brien P. J., Zatz M., *J. Biol. Chem.*, 259, 5054 (1984).
- [101] Olson E N, Glaser L., Merlie J. P., *J. Biol. Chem*, 258, 5364 (1984).
- [102] Olson E N, Spizz G, *J Biol Chem*, 261, 2458 (1986)
- [103] Omary M. B., Trowbridge I S, *J Biol Chem.*, 256, 12888 (1981).
- [104] Omary M B, Trowbridge I. S, *J Biol Chem*, 256, 4715 (1981).
- [105] Osborne J C., Brewer H B., *Adv. Prot Chem.*, 31, 253 (1977).
- [106] Ozols J., Carr S A., Strittmatter P, *J Biol. Chem.*, 259, 13349 (1984).
- [107] Pan B. T., Blostein R, Johnstone R M., *Biochem. J*, 210, 37 (1983).
- [108] Pan B T., Johnstone R. M., *Cell*, 33, 967 (1983).
- [109] Pearlstein E, Gold L. I, Garcia Pardo A, *Moll Cell. Biochem*, 29, 103 (1980)
- [110] Pellman D, Garber E. A., Cross F. R, Hanafusa H., *Nature*, 314, 374 (1985).
- [111] Petri W. A., Pal A., Barenholz I., Wagner R R., *J. Biol. Chem.* 256, 2625 (1981).

- [112] Quinn P, Griffiths G, Warren G, J Cell Biol, 96, 851 (1983).
- [113] Rahmsdorf H. J, Koch N, Mallick U, Herrlich P, The EMBO J, 6, 811 (1983).
- [114] Rice C M, Bell J R, Munkapilliar M W., Strauss J M, J Mol Biol, 154, 355 (1982)
- [115] Roberts W L, Rosenberry T L, Biochem Biophys Res, Comm., 133, 621 (1985)
- [116] Roomi M W., Ishaque A, Khan N R., Eylar E H., Biochim Biophys Acta, 536, 112 (1987)
- [117] Rott R., Klein H-D, "Cell surface reviews" Eds G Poste, G L Micholson, t 2, North Holland, Amsterdam 1977, s 47
- [118] Rudd C E, Bodmer J G, Bodmer W. F, Crumpton M J, J Biol Chem, 260, 1927 (1985)
- [119] Sarosiek J, Slomiany A, Takegi A, Slomiany B L, Biochem Biophys Res. Comm., 118, 523 (1984)
- [120] Schlesinger M J, Ann Rev Biochem, 50, 193 (1981)
- [121] Schlesinger M J, Mafler C., J. Biol Chem., 257, 9887 (1982)
- [122] Schlesinger M J, Magee A J, Biophys J, 37, 126 (1982)
- [123] Schmidt M F G, Curr. Top. Microbiol Immunol, 102, 101 (1983)
- [124] Schmidt M. F G, The EMBO J, 3, 2295 (1984).
- [125] Schmidt M F G, Trends Biochem Sci, 7, 322 (1982)
- [126] Schmidt M F G, Virology, 116, 327 (1982)
- [127] Schmidt M F G, Bracha M, Schlesinger M J Proc, Natl Acad Sci USA, 76, 1678 (1979)
- [128] Schmidt M F G, Lambrecht B., J Gen Virol, 66, 2635 (1985)
- [129] Schmidt M F G, Schlesinger M J., Cell, 17, 813 (1979)
- [130] Schmidt M. F G, Schlesinger M J, J Biol Chem, 255, 3334 (1980)
- [131] Schneider E G, Nguyen H T, Lennarz W J, J Biol Chem, 253, 2348 (1978)
- [132] Schultz A. M, Oroszlan S, J. Virol, 46, 355 (1983)
- [133] Schultz A. M, Oroszlan S, Virology, 133, 431 (1981)
- [134] Sefton B M, Trowbridge I S, Cooper J. A, Scolnick E M, Cell, 31, 465 (1982)
- [135] Shen B W, Scanu A. M, Kezdy F. J, Proc Natl Acad Sci USA, 74, 837 (1977)
- [136] Slomiany A., Jozwiak Z, Takegi A., Slomiany B L, Arch Biochem Biophys, 229, 560 (1984)
- [137] Slomiany A, Liau Y H, Carter S R., Newman L. J, Slomiany B L, Biochem Biophys Res Comm, 132, 299 (1985)
- [138] Slomiany A, Liau Y H, Takegi A, Laszewicz W, Slomiany B L, J Biol Chem, 259, 13304 (1984)
- [139] Slomiany A, Slomiany B L, Witas H, Aono M, Newman L J, Biochem Biophys Res Comm 113, 286 (1983)
- [140] Slomiany A., Witas H., Aono M, Slomiany B. L, J Biol Chem., 258, 8535 (1983)
- [141] Slomiany B L, Jozwiak Z, Slomiany A., Takegia A, Mandel I D., IRCS Med. Sci, 11, 765 (1983)
- [142] Slomiany B. L, Liau Y H, Carter S R., Zielinski J, Slomiany A, Archs Oral Biol., 31, 463 (1986).
- [143] Slomiany B L, Murthy V L. N., Carter S R, Slomiany A., Digestion, 34, 275 (1986)
- [144] Slomiany B L, Murthy V L N, Slomiany A, Progr. Lipid Res., 24, 311 (1985).
- [145] Slomiany B L., Murthy V. L. N., Slomiany A., Zielinski J, Mandel I D, Biochim Biophys. Acta, 882, 18 (1986)

- [146] Slomiany B L, Murthy V. L N., Takegi A., Tsukada H., Kosmala M, Slomiany A., Arch Biochem. Biophys., 242, 402 (1985)
- [147] Slomiany B L, Takegi A, Liau Y. H, Jozwiak Z., Slomiany A, J Biol. Chem., 259, 11997 (1984)
- [148] Slomiany B L., Tsukada H., Slomiany A., Biochem Biophys. Res. Comm, 141, 387 (1986)
- [149] Smith L C, Pownall H. J., Gotto A M., Ann Rev Biochem, 47, 751 (1978).
- [150] Soric J., Gordon J A., Science, 230, 563 (1985).
- [151] St Jules R. S, O'Brien P J, Exp. Eye Res, 43, 929 (1986)
- [152] Staufenbiel M, Moll. Cell Biol., 7, 2981 (1987).
- [153] Staufenbiel M., Lazarides E, Proc Natl Acad. Sci, 83, 318 (1986).
- [154] Stoffel W., Hillen H, Giersiefen H., Proc Natl Acad. Sci USA, 81, 5012 (1984)
- [155] Stoffel W., Hillen H., Schroeder W., Deutzman R., Hoppe-Seyler Zs Z Physiol Chem, 364, 1455 (1983).
- [156] Strubin M., Mach B., Long E. O, The EMBO J 3, 869 (1984).
- [157] Sutherland R, Delia C., Schneider R., Newman R, Kemshead J, Greaves M. Proc Natl Acad Sci USA, 78, 4515 (1981).
- [158] Towler D, Glaser L., Proc. Natl. Acad Sci. USA, 83, 2812 (1986).
- [159] Towler D A., Adams S. P., Eubanks S R, Towery D. S, Jackson-Machelski E., Glaser L., Gordon J I, Proc. Natl. Acad. Sci, 87, (1987).
- [160] Towler D. A., Eubanks S. R, Towery E S, Adams S P., Glaser R, J Biol. Chem., 262, 1030 (1987)
- [161] Towler D. A., Glaser L., Biochemistry, 25, 878 (1986)
- [162] Townsend L. E, Agrawal D., Benjamins J A, Agrawal H. C., J. Biol Chem., 257, 9745 (1982).
- [163] Tsunashawa S., Narita K., Shichi H., Biochim Biophys. Acta, 624, 218 (1980).
- [164] Voronova A. F., Buss J. E., Patschinsky T., Hunter T, Sefton B. M., Mol. Cell Biol, 4, 2705 (1984).
- [165] Wen D., Schlesinger M. J, Moll. Cell Biol, 4, 688 (1984).
- [166] Wetzel M. G, O'Brien P. J., Exp. Eye Res., 43, 941 (1986).
- [167] Wilcox C A, Olson E. N., Biochemistry, 26, 1029 (1987).
- [168] Willumsen B. M, Christensen A., Hubbert N. L, Papageorge A. G., Lowy D. R, Nature, 310, 583 (1984)
- [169] Wood J. G, Dawson R. M. C, J. Neurochemistry, 21, 717 (1973).
- [170] Wu H C, Lin J. J. C, Chattopadhyay P K, Kanazawa H., Ann. NY Acad Sci, 343, 368 (1980).
- [171] Yamada K. M, J. Cell. Biol., 78, 520 (1978).

Henryk Witas

ACYLATION OF PROTEINS

Summary

Recently it was found a number of proteins from enveloped viruses as well as from bacteria, plant and animal cells to contain small amount of bound lipids. The lipids are represented mainly by long-chain fatty acids which appear to be linked covalently with the protein. The ester bond is believed to occur as a main one between fatty acid, the most frequently palmitate, and OH group of hydroxy-amino acid or SH group of cysteine of polypeptides localized in the membranes. The amide bond is the second type found between nonglycosylated polypeptides mainly their

their N-glycine and myristate. The Golgi apparatus, intracellular membranes or rough endoplasmic reticulum are suggested to be among possible regions of polypeptide acylation. Also cellular membrane as a place of acyltransferase action is not excluded. First attempt of isolation and specificity characterization was made. It is not known the precise biological role of acylation process. However, suggestions appeared that acylation could be involved in recognition process, intracellular transport of membrane proteins, insertion and anchorage of them to the membrane or transport of secretory proteins.

Dr HENRYK WITAS
Katedra Biofizyki
Uniwersytetu Łódzkiego
ul. Banacha 12/16
90-237 Łódź

Jacek Twardowski, Irena Nowak

STRUKTURA A FUNKCJA ENZYMÓW*

1 WSTĘP

Enzymy stanowią bardzo dużą i wyspecjalizowaną klasę białek. Wytwarzane przez żywe organizmy katalizują zachodzące w nich reakcje chemiczne. W stosunku do zwykłych katalizatorów chemicznych działają znacznie efektywniej. Klasycznym przykładem jest katalityczne działanie platyny na nadtlenek wodoru H_2O_2 , które zwiększa szybkość reakcji o 20 tys. razy w stosunku do reakcji spontanicznej, podczas gdy katalaza zwiększa szybkość tej reakcji o 300 tys. mln razy [21].

Enzym w układzie biologicznym bierze udział w katalizowaniu reakcji chemicznych i regulowaniu procesów kinetycznych. Pierwsza z tych funkcji jest związana z obecnością centrum aktywnego, stabilizowanego przez pozostałą część białka. Druga funkcja ma bardziej złożony charakter i jest związana zarówno z syntezą, modyfikacją i degradacją białka, wpływem środowiska, jak i działaniem aktywatorów i inhibitorów na dojrzałą formę enzymu. Z tym ostatnim zagadnieniem wiąże się aspekt czynności enzymu, nazwany przez Kornberga „towarzyskim” [43], związany m.in. z tworzeniem się kompleksów enzymów z innymi składnikami komórki. Właściwości enzymów i możliwości ich zmian są wynikiem selektywnej labilności struktury białka i jej wpływu na wyróżnione już w 1895 r. przez Fischera miejsce, zwane centrum aktywnym. Jego historyczna już dziś hipoteza działania enzymu na substrat, zwana hipotezą „klucza do zamka” (lock-key theory), została w 1958 r. zastąpiona teorią Koshlana wzbudzonego dopasowania enzymu do substratu (induced-fit theory) [44, 45]. Jeśli uwzględnić jeszcze możliwość zmian konformacyjnych zachodzących w białku, zwanych efektami allosterycznymi, które zmieniają katalityczne właściwości enzymów, zaczyna się rysować wzajemny związek między strukturą i funkcją tych białek [55]. Kluczem do tego związku są modele opisujące mechanizmy zmian konformacyjnych na podstawie oddziaływania kooperacyjnego [99].

*Pracę przygotowano w ramach problemu PR-II-13 i wygłoszono na Szkole Naukowej pt. „Spektroskopowe i strukturalne badania układów o podstawowym znaczeniu dla biologii i medycyny”. (1. Struktura a funkcja układów biologicznych, Ustroń 1986).

L i n d e r s t r o m - L a n g w 1959 r. wyróżnił 4 poziomy organizacji strukturalnej białek [51]:

- strukturę pierwszorzędową, czyli kolejność aminokwasów w łańcuchu;
- strukturę drugorzędową, czyli wzajemne ułożenie wiązań peptydowych łączących poszczególne rodniki aminoacylowe w łańcuchy;
- strukturę trzeciorzędową określającą przestrzenny kształt łańcucha polipeptydowego uwarunkowany oddziaływaniem grup funkcyjnych tworzących go aminokwasów;
- strukturę czwartorzędową określającą budowę podjednostkową cząsteczki białka. Obecnie do tego podziału można dodać następujące stopnie zorganizowania [82]
- nadstrukturę drugorzędową (super secondary structure) określającą preferowane pod względem fizycznym agregaty struktury drugorzędowej;
- strukturę domenową, odnoszącą się do części białka, które formują funkcyjnie oddzielne obszary w białku.

Właściwości enzymów są ściśle związane z ich strukturą. Rozważmy, jaki związek z daną funkcją białka mają różne elementy jego struktury i stopień ich zorganizowania.

2. STRUKTURA PIERWSZORZĘDOWA

Sekwencja aminokwasów w łańcuchu polipeptydowym jest bezpośrednim odzwierciedleniem zapisu informacji genetycznej w DNA i determinuje przestrzenne ukształtowanie całej cząsteczki. Jest ono również zależne od składu chemicznego środowiska w którym zachodzi formowanie białka i od oddziaływań z innymi biomolekułami, np. enzymami czy błonami zaangażowanymi w ten proces [29]. Wiadomo, że aminokwasy Ala, Leu, Met, His, Glu, Gln, Lys, Cys preferują tworzenie struktury helikalnej, a Val, Ile, Phe, Trp, Tyr, Thr - struktury typu β [29, 49], natomiast inne aminokwasy zaburzają te struktury lub są wobec nich obojętne. Ich zachowanie jest szczególnie badane w procesach rozfałdowania i refałdowania struktur białek [1, 71]

Zwykle polarne reszty aminokwasowe znajdują się na powierzchni globuli białka, a reszty apolarne w jej wnętrzu. W wielu przypadkach reguła ta nie jest spełniona. Tam, gdzie położenie danego aminokwasu jest inne niż faworyzowane z punktu widzenia termodynamiki, powstają w cząsteczce lokalne naprężenia. Skryte w hydrofobowym wnętrzu grupy polarne wykazują silniejsze właściwości elektrostatyczne niż gdyby były w środowisku wodnym. Wynika z tego ich duży wpływ na stabilizację przestrzennej struktury białka, np. wtedy gdy wiązanie wodorowe jest chronione przez bezwodne otoczenie. Apolarne łańcuchy boczne aminokwasów, leżące na powierzchni białka, dążą do kontaktu z innymi molekułami znajdującymi się w roztworze, a mającymi właściwości hydrofobowe. Stanowi to podłoże dla jednej z najważniejszych funkcji białek - zdolności rozpoznawania dwoistych dla niego ligandów [23].

Obecność mostków disiarczkowych powstających między dwiema resztami cysteiny stabilizuje białko, co ma szczególne znaczenie dla dużych struktur molekularnych [94]. Mogą one brać udział w samym procesie katalizy enzymatycznej [25, 53, 63, 93], a czasem stabilizują oddziaływania między kompleksami, np. białko-białko błonowe [4].

3. BIOSYNTeza BIAŁKA A JEGO STRUKTURA PIERWSZORZĘDOWA

Stwierdzono, że w wielu przypadkach zsyntezowany łańcuch polipeptydowy jest dłuższy niż ten, który występuje w dojrzałej formie enzymu. Takie prekursorzy enzymów były obserwowane zarówno dla przeciwciał [7], białek sekrecyjnych [8], białek błonowych [52, 77], jak i hydrolaz lizosomowych [85, 92]. Dla hydrolaz lizosomowych, podobnie jak dla białek sekrecyjnych, stwierdzono występowanie silnie hydrofobowego fragmentu łańcucha złożonego z 10-30 aminokwasów, który najdłużej po kilku minutach był odcinany od reszty łańcucha przez peptydazę sygnałową [24, 74]. W jego składzie znaleziono 8 reszt leucyny, metioninę i 2 proliny [47, 74]. Sekwencja sygnałowa dla pre-pro-katepsyny D jest następująca: MXLXXLILLXLXLLXXPXXX, gdzie M oznacza metioninę, L - leucynę, P - prolinę, X - nieznaną aminokwas [24]. W katalitycznej funkcji enzymu sekwencja sygnałowa nie odgrywa żadnej roli. Jest ona odcinana od białka w czasie jego formowania. Niemniej jednak ten odcinek spełnia ważną funkcję w samej biosyntezie białka. Odcinek „pre” białka zwiększa powinowactwo rybosomu i dołączonej do niego cząstki SRP (signal recognition particle) do błony retikulum endoplazmatycznego, gdzie jako N-końcowy fragment łańcucha polipeptydowego jest wprowadzony do światła błon, a za nim reszta białka. W tab. 1 podano przykłady białek, dla których sekwencja sygnałowa „pre” jest zaangażowana w kontranslacyjny wbudowanie białek do organelli komórkowych. Już w tym momencie może być ustalony dalszy los tego białka [72]. Na przykład, sekwencja sygnałowa decyduje o wbudowaniu cytochromu P 450 w błonę retikulum endoplazmatycznego lub o przechodzeniu przez tę błonę neuraminidazy [2, 9].

Dalsza część łańcucha polipeptydowego zawiera kolejny fragment, który nosi nazwę „pro-białka”, a jego masa molekularna, np. dla hydrolaz lizosomowych wynosi od kilku kDa do kilkunastu kDa. Dla tej grupy enzymów czas życia takiego prekursora oznaczony dla hodowli komórkowej fibroblastów wynosił 1-5 h [33], choć w jednym przypadku karboksypeptydazy Y z drożdży - 6 min. Stwierdzono, że odcinek „pro” dla kilku hydrolaz lizosomowych jest w wielu miejscach taki sam, co przedstawiono na rys. 1 [wg 24].

- Odcinkowi „pro” w białkach enzymatycznych przypisuje się następującą funkcję
- wpływ na formowanie struktur wyższych rzędów tych białek;
 - sterowanie aktywnością enzymów,

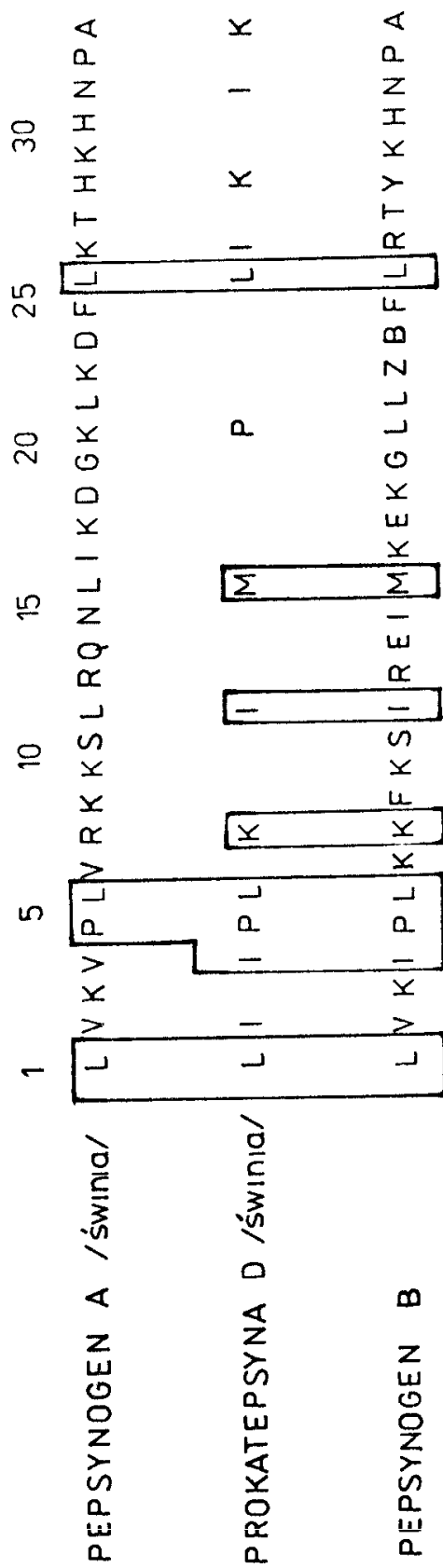
T a b e l a 1

Mechanizmy kierowania białek do organelli wg [72]

Przeznaczenie białka	Pierwszy rodzaj sygnału	Drugi rodzaj sygnału
Białka wydzielnicze	sekwencja sygnałowa	brak
Integralne glikoproteiny błon ER, aparatu Golgiego, lizosomów, peroksysomów	sekwencja sygnałowa?	?
Białka błony komórkowej	sekwencja sygnałowa	?
Hydrolazy lizosomowe	sekwencja sygnałowa	mannoza-6-P
Białka mitochondrialne (błona wewnętrzna lub zewnętrzna)	prekursor polipeptydowy lub sekwencje wewnętrzne	?
Białka światła ER i aparatu Golgiego	sekwencja sygnałowa?	?

- oddziaływanie z receptorami błon i rola w transporcie enzymu przez układy błon komórkowych.

Rola każdego fragmentu polipeptydowego, a w szczególności odcinka „pro” w formowaniu struktury białka jest oczywista, gdyż wszystkie oddziaływania bliskiego i dalekiego zasięgu oraz wzgledy steryczne zachodzące między resztami aminokwasowymi w sposób równocenny formują tę przestrzenną strukturę. Tylko w przypadku niektórych enzymów o stosunkowo prostej budowie, odcięcie łańcucha polipeptydowego nie zmienia ich aktywności. Do tej grupy można zaliczyć pepsynę, hydrolazę fosfopirogranianową, papainę czy rybonukleazę [42]. Na przykład, proteoliza 109 aminokwasów z obecnych 185 w papainie nie pozbawia jej aktywności katalitycznej. Dla rybonukleazy podobny efekt uzyskuje się po odcięciu 3 aminokwasów z 124. Natomiast hormony polipeptydowe zawierające odcinek „pro” nie posiadają żadnej aktywności lub bardzo małą [22]. Wiele z proenzymów posiada aktywność, np. kilka hydrolaz lizosomowych z drożdży, pro- β -heksozaminidaza [32], pro- α -iduronidaza [57] izolowane z fibroblastów po odcięciu sekwencji „pro” stają się nieaktywne. Nieaktywne są również prekursorzy arylsulfatazy, β -glukuronidazy i β -galaktozydazy. Obok regulacji aktywności enzymów, sekwencji „pro” przypisuje się rolę w procesie transportu wewnątrzkomórkowego. Neufeld i współprac. [10, 59] badając transport nowo zsyntezowanych hydrolaz lizosomowych i zachodzące w tym



Rys. 1. Skład aminokwasowy sekwencji sygnałowej dla pepsynogenu A, prokatepsyny D i pepsynogenu B

czasie ich modyfikacje uznali, że sekwencje „pro” wraz ze składnikiem cukrowym tych glikoprotein oddziałują z receptorami białon i są odpowiedzialne za ukierunkowanie tego procesu. Ponadto część oligosacharydowa glikoprotein może modyfikować przestrzenną strukturę i właściwości enzymów oraz pełnić rolę ochronną przed proteazami [86, 90, 92]

4. STRUKTURA DRUGORZĘDOWA

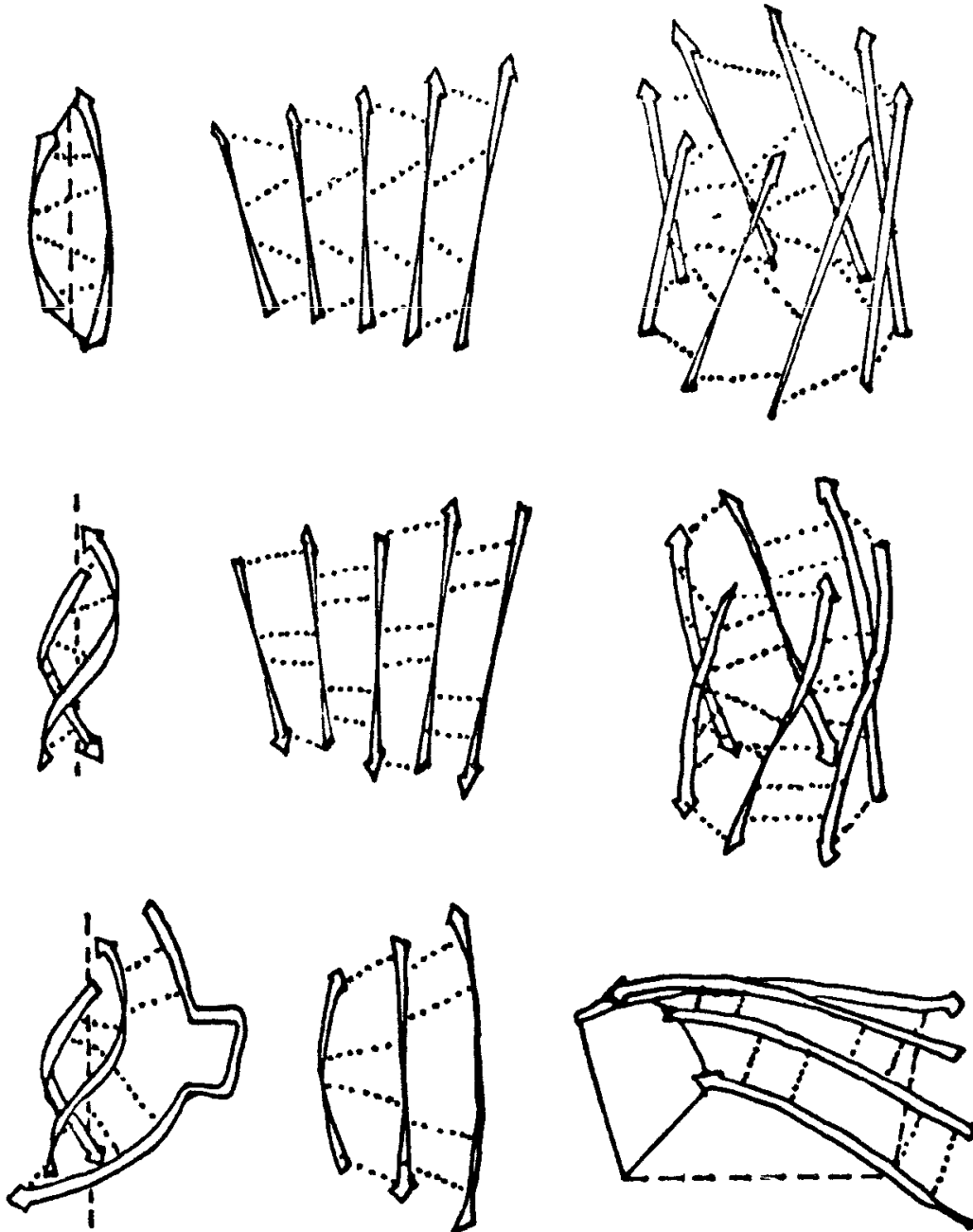
Struktura drugorzędowa białek określa położenie przestrzenne wiązań peptydowych łączących poszczególne aminokwasy w łańcuchy polipeptydowe. Spektroskopia oscylacyjna opierając się na wynikach badań rentgenograficznych [50, 97] rozróżnia 6 rodzajów struktur drugorzędowych [91]:

- helikalną z podwójnym wiązaniem wodorowym,
- helikalną z pojedynczym wiązaniem wodorowym,
- równoległą β ,
- antyrównoległą β
- β -zwrotną (β -turn),
- nieuporządkowaną

Struktura helikalna jest stosunkowo trwała. Stwierdzono jej obecność w prawie wszystkich białkach globularnych, jak i włóknistych, takich jak α -keratyna czy paramiozyna [20]. Struktury helikalne charakteryzują się pewną elastycznością zależną od otoczenia. Jeśli to otoczenie ma charakter hydrofobowy (np. białka w błonie), stabilność struktury helikalnej rośnie. W tym przypadku wiązania wodorowe między aminokwasami nie konkurują z otoczeniem, następuje to w miarę wzrostu polarności otoczenia. Struktura helikalna z podwójnym wiązaniem wodorowym jest trwalsza niż struktura z pojedynczym wiązaniem wodorowym.

Pauling i Corey [62] postulowali istnienie obok struktury helikalnej struktur β równoległej i antyrównoległej. Występują one w białkach globularnych średnio w 15% [15] i mają długość ok. 20-25 Å, co odpowiada przeciętnemu wymiarowi domeny. Pauling [62] uważał, że struktury β są płaskie. Tak jest faktycznie dla niektórych białek, np. dla reduktazy glutationu, ale w większości przypadków są one skrecone [14]. Skreślenie płaszczyzny, w której leżą struktury β , jest wynikiem optymalizacji oddziaływań energetycznych, które w ten sposób usztywniają białko [60]. Szczegółowe rozważania nad konformacyjnymi i geometrycznymi właściwościami różnych struktur β przeprowadzili Salemme i Wetherford [78-80]. Na rys. 2 przedstawiono opisane przez nich różne wzajemne sposoby zorganizowania odcinków o strukturze β w białkach. Stwierdzili oni, że antyrównoległa struktura β posiada znaczną giętkość konformacyjną w obrębie ograniczeń narzuconych przez oddziaływania steryczne łańcucha. Taka sama giętkość konformacyjna nie występuje dla równoległej struktury β . Różnica ener-

główną charakterystyką struktury helikalnej i β wynosi ok. 20-30 kJ/mol na korzyść struktury β



Rys. 2. Przykłady nadstruktur drugorzędowych ułożonych ze struktur β

Struktury zwrotne. Poszukiwanie struktur β -zwrotnych, przewidywanych już w 1958 r. przez R. Schwayzera i C. M. Varkatachalarna, w białkach wykazało, że są one bardzo częste i stanowią ok. 1/4 struktur występujących w danym białku [15,

16, 84]. W białkach globularnych ilość takich struktur „T” jest liniowo zależna od liczby reszt aminokwasowych „R” [73].

$$T = 0,125R + 2,28$$

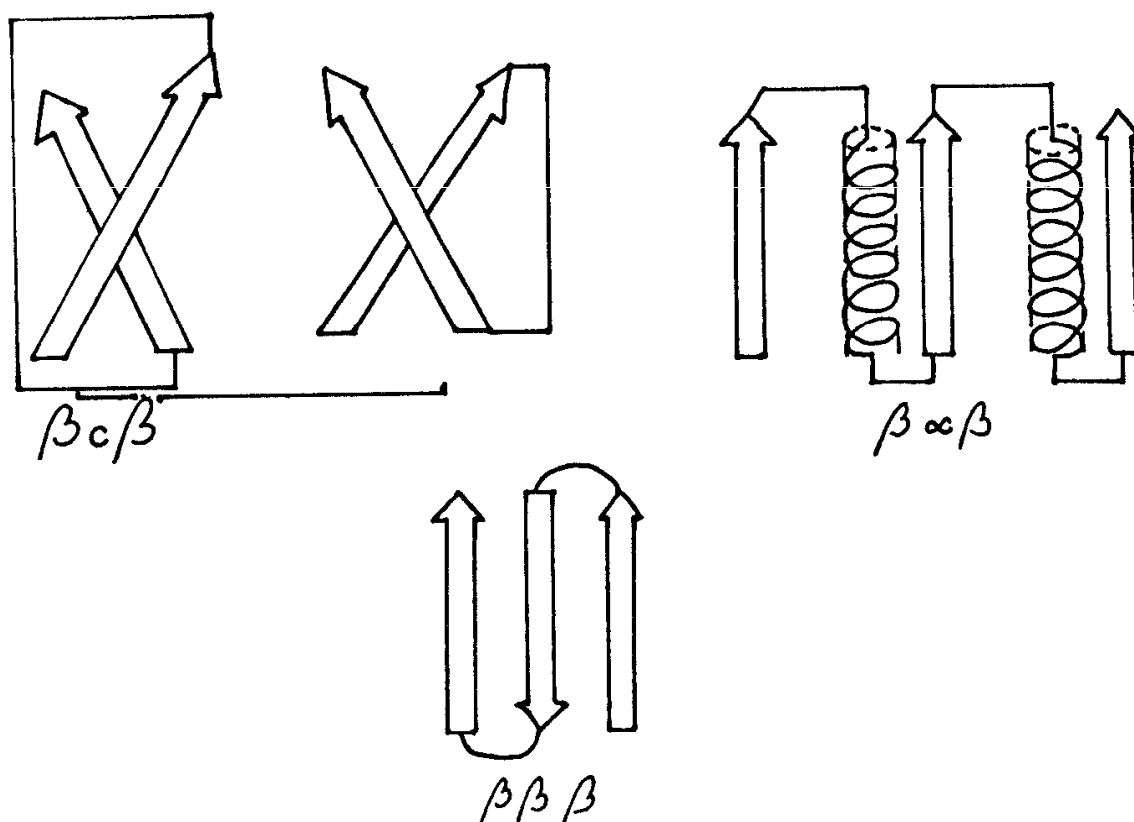
W składzie takiej struktury występują często reszty glicynowe lub prolinowe, np. Pro - 93, Pro - 114 dla rybonukleazy [98], Pro - 163 w subtilizynie [81], Pro - 116 w nukleazie ze *Staphylococcus* [12] oraz kwas asparaginowy, seryna, treonina i tyrozyna. W procesie formowania białka struktury te odgrywają rolę pasywną, gdyż nie są zbyt stabilne i odporne na niekowalentne siły zginające łańcuch. Wiadomo, że struktury te są silnie solwatowane [13, 18] na powierzchni, a w środku mają charakter hydrofobowy [18]. Dla zbadanych przez P. Kuntza w 1972 r. 7 białek globularnych na 130 takich struktur tylko 7 znajdowało się wewnątrz białka [84]. Czasem w białkach występują także struktury γ -zwrotne [84]. Te struktury umożliwiają sfałdowanie łańcucha polipeptydowego, by mógł wytworzyć ścisłe kontakty między przylegającymi do siebie fragmentami odcinków helikalnych i struktur β . Umożliwia to optymalne zbliżenie do siebie tych łańcuchów tak, aby odległość atomów tworzących wiązanie wodorowe była zbliżona do wartości $2,05 \text{ \AA}$, kiedy jest ono najsilniejsze.

5 NADSTRUKTURA DRUGORZĘDOWA

Łańcuchy polipeptydowe o różnych strukturach drugorzędowych układają się w przestrzeni i optymalizując wzajemne oddziaływania tworzą charakterystyczne segmenty, tzw. nadstrukturę drugorzędową. Jest ona częścią lub tworzy w całości jądro hydrofobowe. Już w 1953 r. Crick [18] opisał sposób, w jaki mogą się układać 2 struktury helikalne tworząc helikalny splot (coiled - coil helix), powtarzalny co 140 \AA . Obecność takich struktur została wykazana w α -keratynie, tropomiozynie [87], paramiozynie, meromiozynie oraz częściowo występuje w białkach, takich jak: bakteriorodopsyna, hemoerytryna, białko wirusa TMV i in. Takie układanie się łańcuchów helikalnych jest preferowane energetycznie, a oddziałujące ze sobą struktury helikalne są stabilizowane przez międzyłańcuchowe oddziaływania hydrofobowe lub polarne odpowiednio zorientowanych reszt aminokwasowych. W kolagenie tworzy się struktura superhelikalna będąca splotem 3 lewoskrętnie nałożonych na siebie łańcuchów helikalnych. Optymalizacja oddziaływań międzyłańcuchowych prowadzi także do powstania innych struktur, zwanych $\beta \times \beta$ -segmentami ($\beta \times \beta$ units) [58, 66]. Składają się one ze struktur przedzielonych strukturą $\alpha - \beta \alpha \beta$ (Rossman fold), strukturą $\beta - \beta \beta \beta$ lub strukturą nieuporządkowaną $\beta \alpha \beta$ ($\beta \text{ coil } \beta$) (rys. 3).

W wielu białkach obserwuje się bardziej złożone segmenty typu $\beta \alpha \beta \alpha \beta$, jak

np. w kinazie adenylowej [B3], dehydrogenazie gliceraldehydo-3-fosforanu z *Bacillus Stearotherophilus* [5], fosforylaze glikogenu [27] i enzymach glikolitycznych [6]. Główną funkcją tych wszystkich struktur jest usztywnienie domen.



Rys. 3. Przykłady nadstruktur drugorzędowych $\beta \times \beta$

6. STRUKTURA DOMENOWA

Badania elektronowych map gęstości struktury białek metodą dyfrakcji promieni X czy metodami spektroskopowymi kalorymetrycznymi i innymi pozwoliły wyróżnić pewne części białek, zwane domenami. Ich obecność jest ściśle związana z funkcją białek [30, 39]. Istnieje 5 rodzajów struktur domenowych [39] zawierających.

- 1) przeważnie struktury β , np. w rubredoksynie, papainie;
- 2) prawie tylko struktury helikalne, np. w hemoglobinie i mioglobinie;
- 3) struktury helikalne i β rozdzielone wzdłuż łańcucha polipeptydowego, np. w cytochromie b_5 i rybonukleazie;

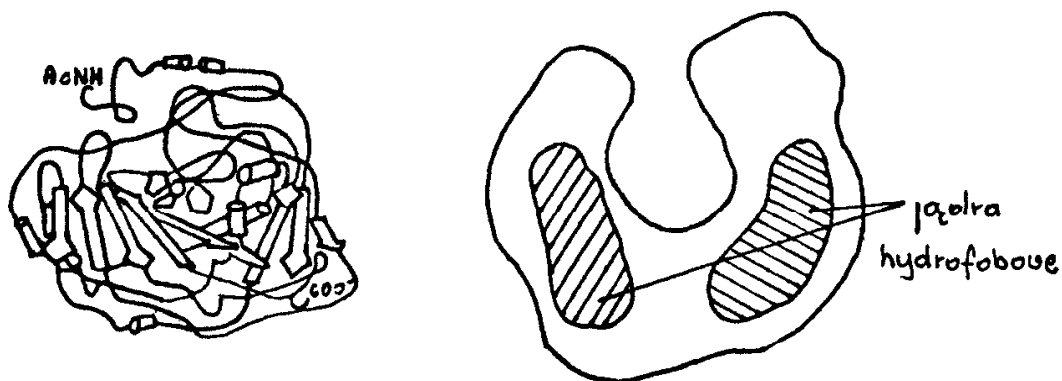
4) struktury helikalne i β mające tendencję do zmieniania się wzdłuż łańcucha polipeptydowego, np w dehydrogerazie mleczanowej i alkoholowej oraz rodona-
zie,

5) nie zawierających struktur α i β , np w ferredoksynie, fosfolipazie

7. STRUKTURA TRZECIO- I CZWARTORZĘDOWA

Ustalenie przestrzennych kształtów łańcucha polipeptydowego uwarunkowanych oddziaływaniem między poszczególnymi grupami funkcyjnymi tworzących go aminokwasów nazywa się ustaleniem trzeciorzędowej struktury białka. W skład czynnej biologicznie molekuly białka może wchodzić więcej niż jeden łańcuch polipeptydowy. Określenie podjednostkowej budowy białek daje znajomość jego struktury czwartorzędowej.

Formowanie białka jest opisywane dwoma modelami: 1) nukleacji i wzrostu, podanym przez R. L. Baldwin'a w 1972 r., i 2) dyfuzji - kolizji, podanym przez M. Karplusa w 1976 r. Badania rentgenograficzne wielu białek wykazały, że białka globularne posiadają jedno lub więcej jąder hydrofobowych. Są one złożone



Rys. 4. Schematyczne przedstawienie jąder hydrofobowych w białkach

z gęsto upakowanych aminokwasów hydrofobowych w ok. 70% z resztą aminokwasów polarnych. Gęstość takiego jądra jest równoważna gęstości upakowania atomów w kryształach. Obecność dwóch lub więcej jąder hydrofobowych jest związana ze strukturą domenową, co pokazano na rys. 4. Obszary objęte tymi jądrami usztywniają te części białka, które mogą się przemieszczać względem siebie, np. podczas procesu katalizy, deformując jednocześnie pozostałe obszary. Te ostatnie mogą być porównane „zawiasami” lub „elastycznymi przegubami”. W hydrofobowych jądrach znajduje się minimalna liczba (ok. 10) molekuł H_2O (np. w lizozymie 3 molekuly, podczas gdy

w jego centrum aktywnym 15) głównie tworzących mostki między zawartymi tam także resztami aminokwasów polarnych. Tego typu wiązania jeszcze bardziej usztywniają tę część białka.

7.1 EFEKT ALLOSTERYCZNY

Pewne molekuly mają zdolność wiązania się z enzymem poza jego centrum aktywnym, nie ulegając przy tym żadnej przemianie chemicznej. Związanie takiej substancji może wywołać zmiany konformacji w enzymie, wpływając tym samym na zmiany jego aktywności katalitycznej. To z kolei może zmienić strukturę czwartorzędową białka, np. zmieniając asocjację protomerów w oligomerycznym białku. Efekty te nazywamy efektami allosterycznymi, a wywołujące je substancje efektami allosterycznymi [55]. Efektor wiążąc się z enzymem w miejscu zwanym centrum allosterycznym może wpływać na katalityczną czynność enzymu w następujący sposób:

- zmieniając powinowactwo enzymu do substratu,
- aktywując lub hamując enzym, bez zmiany powinowactwa enzymu lub substratu.

W przypadku enzymów allosterycznych efektor może być sam substrat. Bardzo często zdarza się, że związanie substratu przez pierwszy protomer zmienia sposób oddziaływań między nim a pozostałymi protomerami takiego enzymu, jak również wpływa na wiązanie substratu przez inne protomery. Model MWC (nazwa pochodzi od nazwisk autorów - Monod, Wyman, Changeux) [56] przyjmuje, że oddziaływania między protomerami po przyłączeniu efektora do jednego z nich mają charakter pozytywny (przyciągający), tzn., że związanie efektora przez jeden z protomerów ułatwia takie wiązanie następnym. Natomiast według innego modelu AKNF (nazwa pochodzi od nazwisk autorów - Adair, Koshland, Nemethy, Filmer) [46] istnieje możliwość oddziaływań zarówno pozytywnych między protomerami, jak i negatywnych. Model AKNF zakłada także, że zmiany konformacyjne w obrębie oligomeru następują w kolejnych protomerach w ściśle określonej sekwencji [31].

Monod i współprac. [56] stwierdzili również, że enzym podlegający regulacji allosterycznej jest oligomerem i istnieje w 2 stanach konformacyjnych R (relaxed) i T (tensed). Enzym w stanie R wiąże substrat silniej niż w stanie T. Przejście oligomeru ze stanu R do T nie zmienia jego symetrii.

Przykładem enzymu podlegającego allosterycznemu mechanizmowi regulacji jest kinaza glicerolowa. Kinaza glicerolowa z *E. coli* jest tetrametrem mającym jedno centrum aktywne i jedno miejsce allosteryczne na każdą podjednostkę [89]. Efektorem allosterycznym dla tego enzymu jest fruktozo-1,6 difosforan (FBP). Mechanizm zjawisk allosterycznych dla kinazy glicerolowej wyjaśnili DeRiel i Paulus [68-70]. Według tego modelu tetramer ulega spontanicznej dysocjacji do form

dimerycznych; obie te formy dimer i tetramer posiadają całkowitą aktywność katalityczną, ale tylko tetramer jest w stanie wiązać FBP, co powoduje inaktywację enzymu. W tym przypadku inhibitor allosteryczny stabilizuje nieaktywną konformację enzymu indukując jej powstanie w tetrametrze.

Opisany mechanizm spełnia funkcję regulacyjną w układzie biologicznym.

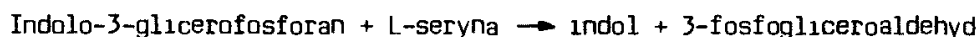
7.2. AGREGATY BIAŁEK GLOBULARNYCH

Łączenie się białkowych protomerów prowadzi do utworzenia złożonych struktur białkowych, w których rola protomeru może być podobna do roli domen w pojedynczym protomerze. Różnica między domeną i agregatem polega głównie na tym, że w agregacie mamy co najmniej 2 łańcuchy polipeptydowe, a w domenie może być 1. Na przykład, domeny jednego łańcucha w rodanazie zachowują się podobnie jak podjednostki dimeru [3]. Innym przykładem tworzenia się agregatów są białka płaszcza wirusów polio [36], które powstają z jednego łańcucha polipeptydowego, który jest cięty przez proteazy, związany i tworzy agregaty. Agregaty enzymatyczne składają się zazwyczaj z 2 protomerów, np. dehydrogenaza alkoholowa, fosforylaza lub z 4, np. dehydrogenaza gliceraldehydo-3-fosforanu, dehydrogenaza mleczanowa i kinaza pirogronianowa.

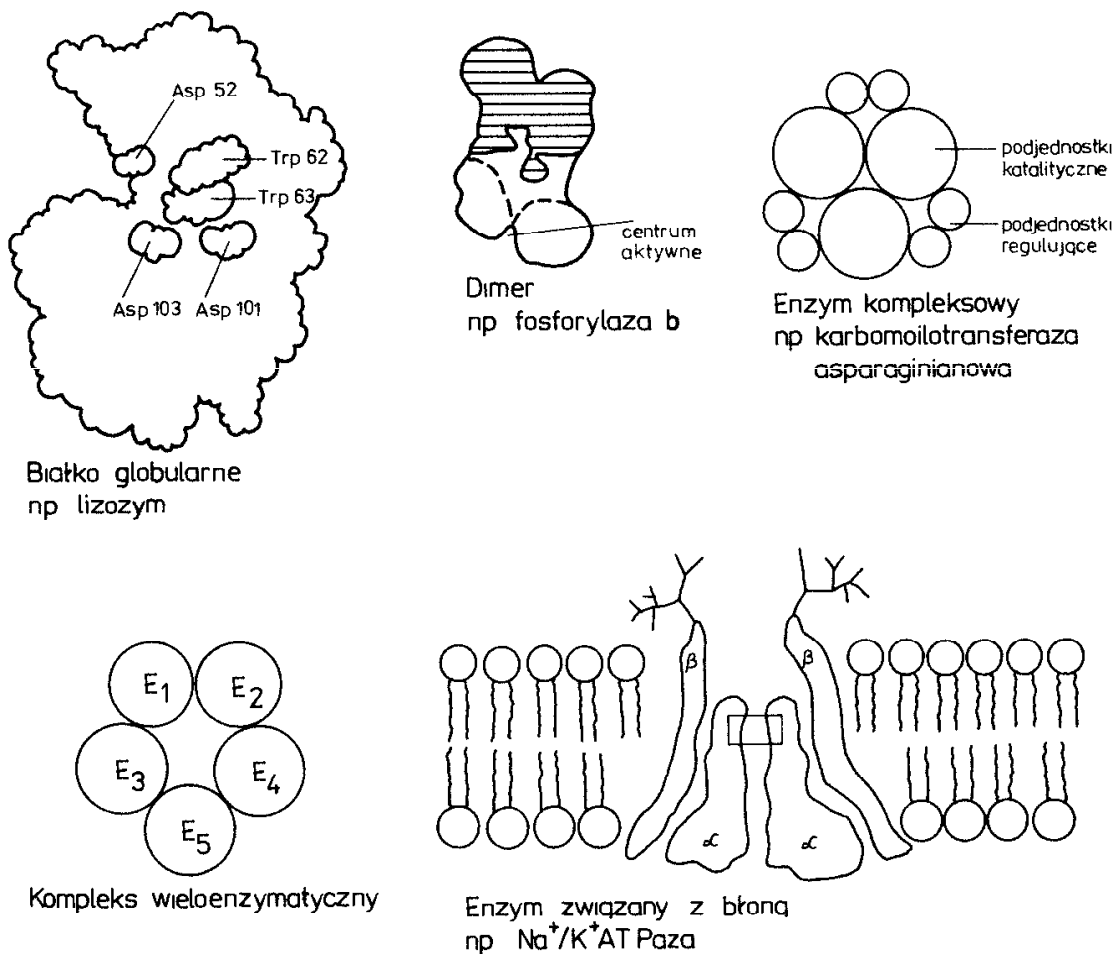
7.3. STAŁE KOMPLEKSY WIELOENZYMATYCZNE

Pod pojęciem „stałe kompleksy enzymatyczne” należy rozumieć takie kompleksy, które można izolować jako całość i które nie rozpadają się na poszczególne składniki podczas preparatyki biochemicznej. Należy je odróżnić od tzw. „luźnych” kompleksów enzymatycznych, których nie można wyizolować w ich aktywnej katalitycznie całości [28]. Typy układów enzymatycznych - rys. 5.

Omówmy zależności strukturalno-funkcjonalne w kompleksach enzymatycznych na przykładzie syntazy tryptofanowej. Syntaza tryptofanowa katalizuje syntezę tryptofanu z L-seryny i indolo-3-glicerofosforanu. Jest to jeden z prostszych kompleksów wieloenzymatycznych składających się z podjednostek $\alpha_2 \beta_2$. Po elucji z kolumny DEAE-celulozy gradientem NaCl enzym rozpada się na monomeryczne podjednostki α i dimeryczną β_2 [17], którą można rozszczepić do monomeru dopiero 4M mocznikiem [35]. Oddzielone podjednostki posiadają aktywność katalityczną i uczestniczą w pośrednich etapach biosyntezy L-tryptofanu [54]:



W obecności kompleksu $\alpha_2 \beta_2$ i kofaktora, fosforanu pirydoksalu szybkość tych reakcji wzrasta o ok. 30-100 razy [34, 40]. Tak więc w warunkach fizjologicznych kompleks syntazy tryptofanowej występuje w formie zasocjowanej.



Rys. 5. Schematyczne przedstawienie poziomów organizacji strukturalnej enzymów

Jakie są funkcjonalne następstwa tworzenia kompleksu $\alpha_2 \beta_2$ syntazy tryptofanowej?

Wspomniano już, że wydajność katalityczna tego enzymu znacznie wzrasta, gdy występuje w postaci kompleksu $\alpha_2 \beta_2$. K i r s c h n e r i współprac. [40, 95] wysunęli hipotezę, że ten aktywujący efekt był wynikiem stabilizacji aktywnych konformacji. Okazało się, że izomeryzacja składników $\alpha_1 \beta_2$ wpływała na formowanie się kompleksu [26, 41]. Ponadto stwierdzono, że wiązanie fosforanu prydoksalu do apoenzymu β_2 zachodzi według modelu allosterycznego [56]. Ostatnie badania kalometryczne wykazały ujemną zmianę entalpii formowania kompleksu $\alpha_2 \beta_2$, która była 2 razy większa z udziałem podjednostki β_2 zawierającej fosforan prydoksalu niż z podjednostką β_2 pozbawioną grupy prostetycznej [96].

Jeszcze innym przykładem różnic w aktywności enzymatycznej między podjednostkami a kompleksem podjednostek syntazy tryptofanowej jest hamowanie aktywności dezaminazy serynowej. Enzym β_2 może katalizować oksydacyjną dezaminację seryny [48].

Pomimo że mechanizm reakcji katalitycznej z udziałem syntazy tryptofanowej nie został ostatecznie wyjaśniony, powyższe dane wykazują istnienie strukturalno-funkcjonalnych zależności między podjednostkami α i β_2 syntazy tryptofanowej.

7.4. AKTYWNOŚĆ ENZYMATYCZNA A STRUKTURA CZWARTORZĘDOWA BIAŁKA

Czy struktura czwartorzędowa jest istotna dla katalitycznej aktywności enzymów, tzn. czy struktura prawidłowo zwiniętych, ale niezasocjowanych protomerów dostatecznie przypomina strukturę zasocjowanych pod względem aktywności enzymatycznej?

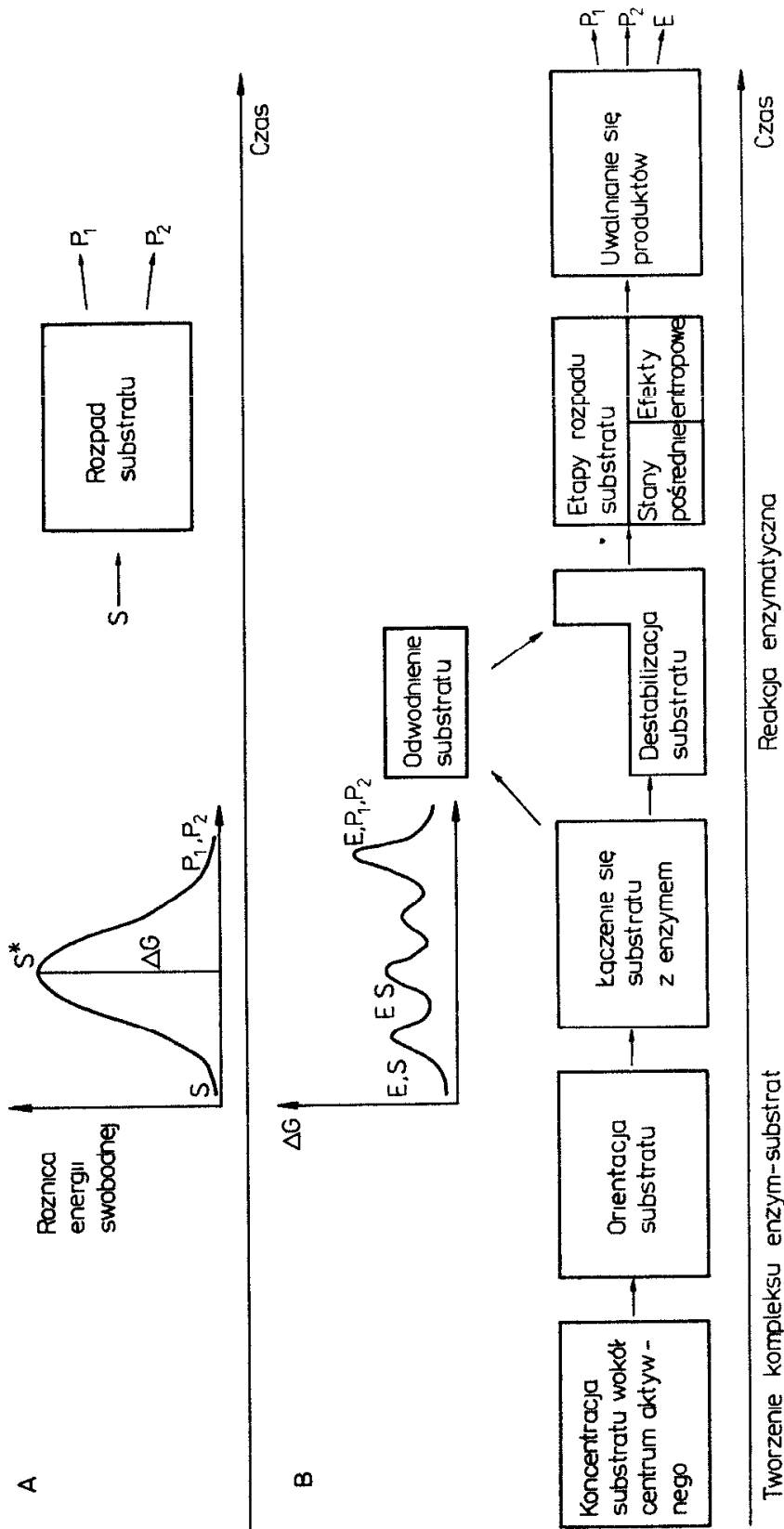
Eksperymenty z przywracaniem aktywności odwracalnie zdenaturowanym enzymom oligomerycznym, wykazały, że odzysk aktywności może być reakcją I rzędu, jeśli protomery są katalitycznie czynne, lecz wyższego rzędu jeśli są nieaktywne i ich asocjacja jest niezbędna do odzyskania przez zdysocjowany oligomer aktywności. Badania eksperymentalne wykazały, że odzysk aktywności następuje bardzo często na drodze sigmoidalnej, tzn., że oddzielne protomery enzymów są nieaktywne lub mniej aktywne niż w obrębie oligomeru. Według takiego schematu zachowuje się dehydrogenaza mleczanowa z serca [76], tetrameryczna dehydrogenaza gliceraldehydo-3-fosforanu [75] i dimeryczna mitochondrialna dehydrogenaza jabłczanowa [37]. Badania tryptofanazy z *E. coli* [65] wykazały, że enzym ten może być łatwo zdysocjowany do nieaktywnych dimerów przez różne aniony. Kinetyka reaktywacji wykazuje wyraźnie, że aktywność tryptofanazy dotyczy tylko stanu tetramerycznego. Przypuszczalnie interakcja dimer-dimer prowadzi do przyjęcia przez enzym aktywnej konformacji [64]. Zupełnie inna sytuacja istnieje w kinazie kreatynowej z mięśni królika, która normalnie jest dimerem i nie wymaga oligomeryzacji do uzyskania całkowitej aktywności [28].

Centra aktywne enzymów. Reakcja enzymatyczna składa się z szeregu etapów przedstawionych na rys. 6. Widać na nim także zmianę charakteru energii swobodnej, opisującej ten proces w stosunku do reakcji spontanicznej. Jenks [38] różnił 3 najważniejsze etapy procesu katalitycznego:

- 1) wzbudzone dopasowanie,
- 2) destabilizacja substratu,
- 3) efekty entropowe.

Na rys. 6 jest ich więcej. Ponadto przedstawione wykresy dla zmian energii swobodnej tych procesów są bardzo uproszczone. W rzeczywistości należałoby przedstawić trójwymiarowe schematy dróg katalizowanej reakcji, uwzględniającej produkty pośrednie (MAR - Maps of Alternative Routes) [42].

Szybkość reakcji enzymatycznej zachodzącej w obecności enzymu zwiększa się o 10^8 - 10^{20} razy w stosunku do szybkości reakcji spontanicznej bez udziału kataliza-



Rys. 6. Etapy reakcji enzymatycznej

tora Na ten znaczny wzrost przebiegu energii swobodnej aktywacji reakcji ΔG zachodzi poprzez obniżenie entalpii aktywacji ΔH lub poprzez podwyższenie entropii aktywacji ΔS

$$\Delta G = \Delta H - T\Delta S$$

Okazuje się, że wokół centrum aktywnego koncentracja enzymu może zwiększyć się 10^8 razy [38, 88], co jest związane z podwyższeniem entropii aktywacji. Efekt ten jest związany z charakterem centrum aktywnego enzymu i jego otoczeniem. Dla silnie hydrofobowego centrum aktywnego otoczonego polarną powierzchnią enzymu i polarnym rozpuszczalnikiem, hydrofobowy substrat jest tym, czym pszczoła dla miodu (czarna dziura dla materii, biegun ziemi dla igły magnetycznej) Następnie molekuly substratu znajdujące się w bezpośrednim otoczeniu centrum aktywnego podlegają oddziaływaniom orientującym je w optymalnej pozycji do utworzenia wiązań z enzymem [61]. Ten etap procesu można łatwo przedstawić na przykładzie centrum aktywnego lizozymu, które jest szczeliną mającą z jednej strony silnie hydrofobowy charakter, a z drugiej obecność m.in. molekuly wody nadaje mu polarny charakter Podczas tego, co nazywa się wzbudzonym dopasowaniem enzymu i substratu, zachodzą istotne zmiany w obu tych molekułach. Wzbudzona obecnością substratu molekula zwiększa swoje powinowactwo do niego i silniej stara się go ze sobą związać. Zachodzi tu wzbudzanie substratu, które np. może być związane z odwodnieniem tej molekuly, np. w dekarboksylazie pirogronianowej. Gdy silnie hydrofobowe centrum aktywne wchłania substrat, molekuly polarne wody są eliminowane z jego otoczenia, co jest przyczyną destabilizacji tej molekuly. Te lub podobne zmiany zachodzące w centrum aktywnym są możliwe dzięki takiej budowie tego miejsca w białku, by miało ono zwiększoną labilność konformacyjną Dowody na taką właściwość tego obszaru uzyskano m.in. po termicznej denaturacji enzymów Na przykład, proces denaturacji w lizozymie zaczyna się od zmian reszty Glu-3 (jonizacja) w słabo alkalicznym pH [84] Valee i Williams nazwali to miejsce „powierzchnią żywioną” obrazującą tę selektywną labilność Orbitale elektronowe substratu są modyfikowane i dopasowywane do orbitali reszt aminokwasowych bezpośrednio zaangażowanych w reakcję chemiczną. Destabilizacja substratu przyspiesza przebieg reakcji enzymatycznej o 10^4 - 10^5 razy.

Szybkość katalizy dekarboksylacji w roztworze zachodzącej w obecności dekarboksylazy pirogronianowej zwiększa się 50 tys. razy [11]. Z działaniem centrum aktywnego może być związana reszta zasadowa i kwasowa, która przyspiesza szybkość reakcji 1000 razy. Takie zjawisko występuje m.in. w α -chymotrypsynie.

Upakowanie aminokwasów w centrum aktywnym jest niskie w przeciwieństwie do jądra hydrofobowego [19]. Mały stopień upakowania umożliwia labilizację struktury przestrzennej, tak niezbędną do możliwości zmian konformacyjnych zachodzących podczas reakcji katalitycznej.

Reasumując, struktura enzymów jest kompromisem między sztywnością białka (czytaj odpornością na denaturację) i labilnością (czytaj możliwością jego działania).

Maszynopis wpłynął do Redakcji 2 XII 1987

LITERATURA

- [1] Baldwin R L., Creighton T. E., „Protein folding” Ed R Jaenicke, Elsevier North Holland Biomed Press, Amsterdam 1980, s 217-260
- [2] Bar-Nun S, Kreibich G, Adesnik M, Alterman L., Negishi M., Sabatini D D., Proc. Nat. Acad. Sci., 77, 965-969 (1980)
- [3] Bergsma J., Hol I., Jansonius J. N., Kalk K H., Ploegman J. H., Smit D. G., J. Mol Biol., 98, 637-643 (1975).
- [4] Bhadi S., Knuferman H., Schmidt-Ulrich R, Fischer H, Wallach D. F, Biochim. Biochim. Biophys. Acta, 363, 39-53 (1974)
- [5] Biesecker G., Harris J. I., Thierry J. C., Walker J. E., Wonacoot A. J., Nature, 266, 328-333 (1977)
- [6] Blake C. C. F., Biochem., 11, 37-79 (1975)
- [7] Blobel G, Dobberstein B, J. Cell Biol., 67, 835-851 (1975).
- [8] Blobel G., Walter P, Chang C N., Goldman B., Ericksson A. H., Lingappa V R, Symp Soc. Esp Biol., 33, 9-36 (1979).
- [9] Block J., Air G. M., Laver W. G., Ward C W, Lilley G. G., Woods E. F, Roxburg C M., Inglis A. S, Virology, 119, 109-121 (1982).
- [10] Brown J. A., Swank R. T., J. Biol. Chem., 258, 15323-15328 (1983)
- [11] Bruice T. C. B., The Enzymes, 2, 217-279 (1970).
- [12] Cahn R. S., Ingold C. K., Prelog V, Experientia, 12, 81-94 (1956).
- [13] Carter C W., Kraut J., Freer S T., Xoung N., Alden R. A., Bartsch R. G., J Biol Mol, 249, 4212-4225 (1974).
- [14] Chothia C., J. Mol. Biol, 75, 295-302 (1973)
- [15] Chou P. Y., Jasman G. D., Biochemistry, 13, 729-740 (1974).
- [16] Crawford J. L., Lipscomb W. N., Schellman C. G, Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 70, 528-542 (1973).
- [17] Crawford J. P, Yanofsky C., Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 44, 1161-1170 (1958).
- [18] Crick F. H. C., Acta Crystallogr., 6, 689-697 (1953).
- [19] Crosby J., Stone R., Lienhard G. E., J Am. Chem. Soc., 92, 2891-2900 (1953).
- [20] Dickerson R. E., „X-ray analysis and protein structure”, [w.] „The proteins”. Ed. H. Neurath, t. 2, Academic Press, New York 1984, s. 663-778.
- [21] Dixon M., Webb E. C. [w.] „Enzymes”, wyd 2, 1964.
- [22] Doeherty K., Steiner D., Annu. Rev Physiol., 44, 625-638 (1982).
- [23] „Encyklopedia fizyki współczesnej”, PWN, Warszawa 1983.
- [24] Ericksson A. H., Conner G. E, Blobel G, J. Biol. Chem. (1981).
- [25] Ernest M. J., Kim K. H, J. Biol. Chem., 249, 5011-5018 (1974).
- [26] Faeder E. J., Hammes G. G, Biochemistry, 9, 4043-4045 (1970)
- [27] Fletterick R. I., Sygusch J., Semple H., Madson N. B., J. Biol. Chem, 251, 6142-6146 (1976).

- [28] Friedrich P., [w] „Supramolecular enzyme organization”, Pergamon Press, Oxford, Akademiai Kiado, Budapest 1984, s 46-49
- [29] Gałat A., Zagad. Biof. Współcz., 10, 115-150 (1985).
- [30] Goldberg M E., J Mol. Biol., 46, 441-446 (1969).
- [31] Hammes G. G., Wu Ch. W., Science, 172, 1205-1211 (1971).
- [32] Hasilik A., Tanner W., Eur J. Biochem., 35, 599-608 (1978).
- [33] Work T. S., Work E. (Eds.), „Laboratory techniques in biochemistry and molecular biology”, Vol. 4. North-Holland Publishing Company - Amsterdam-Oxford, American Elsevier Publishing Co. Inc. - New York 1976.
- [34] Hatanaka M., White E. A., Horibata K., Crawford J P., Arch Biochem Biophys., 96, 596-606 (1962).
- [35] Hathaway G M., Kida S., Crawford J. P., Biochemistry, 8, 989-997 (1969).
- [36] Jacobson M F., Baltimore O., Proc Nat. Acad. Sci. USA, 61, 77-84 (1969).
- [37] Jaenicke R., Rudolph R., Heider J., Biochem., 18, 1217-1222 (1979).
- [38] Jenks W. P., Adv Enzymol., 43, 220-410 (1975).
- [39] Kirschner K., Bisswanger H., Annu Rev. Biochem., 45, 143-166.
- [40] Kirschner K., Weischet W., Wiskocil R. L., [w:] „Protein-ligand interaction”. Eds H. Sund, G. Bauer, Walter de Gruyter, Berlin 1975, s. 27-44.
- [41] Kirschner K., Wiskocil R., [w:] „Protein-protein interactions” Eds R Jaenicke, E Helmreich, Springer, New York 1972, s. 245-268.
- [42] Kleczkowski A., „Elementy enzymologii”, red. J. Witwicki, W. Ardel, PWN, Warszawa 1984, s. 63
- [43] Kornberg A., „Nucleic acid-protein interactions” Eds. D. Ribbons i in, t. 2, North Holland, Amsterdam 1971, s. 3-24.
- [44] Koshland D. E. Jr, Adv. Enzymol, 22, 45-97 (1960).
- [45] Koshland D. E. Jr, Proc Nat. Acad. Sci. USA, 44, 98-105 (1958).
- [46] Koshland D. E., Nemethy G., Filmer V. D. Biochemistry, 5, 365-385 (1966).
- [47] Kreil G., Annu Rev. Biochem., 50, 317-348 (1981)
- [48] Kumagai H., Miles E. W., Biochem. Biophys. Res. Commun., 44, 1271-1278 (1971).
- [49] Levitt M., Biochemistry, 18, 4277-4285 (1978).
- [50] Levitt M., Greer J., J. Mol. Biol., 114, 181-298 (1979).
- [51] Linderström-Lang K V., Scheilman J. A., „Protein structure and enzyme activity”, [w:] „The enzymes”. Ed. P. D.” Boyer, t. 1, wyd 2, Academic Press, New York 1959, s. 443-510.
- [52] Lodish H F., Braell W A., Schwartz A. L., Strous G. J., Zilberstein A., Int. Rev. Cytol. Suppl., 12, 247-307 (1981).
- [53] Lorenzo F. de, Fuchs S., Anfinsen C. B., Biochemistry, 5, 3961-3965 (1966)
- [54] Miles E. W., Adv. Enzymol., 49, 127-189 (1979).
- [55] Monod J., Changeux J. P., Jacob F. J., J. Mol. Biol., 6, 306-329 (1963).
- [56] Monod J., Wyman J, Changeux J P. J., J. Mol. Biol., 12, 88-118 (1965).
- [57] Myerowitz R., Neufeld E. F., J. Biol. Chem., 256, 3044-3048 (1981)
- [58] Nagano K., J. Mol. Biol., 109, 235-250 (1977).
- [59] Neufeld E. F., „The harvey lectures”. Ser. 75, The Harvey Soc. of N.Y. Acad. Press New York 1981, s. 41-61.
- [60] Otto F., „Tensile structure”, MIT Press. Cambridge Mass. 1969.
- [61] Page M. J., Jencks W. P., Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 68, 1678-1683 (1971).
- [62] Pauling R., Corey R. B., Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 37, 729-740 (1951).

- [63] Poutremoli S., Horecker B. L., [w:] „The enzymes”. Ed. P.D. Boyer, wyd. 3, Academic Press, New York 1976, s. 611-646.
- [64] Rainbaud O., Goldberg M. E., Eur. J. Biochem., 73, 591-599 (1977).
- [65] Rainbaud O., Goldberg M. E., J. Biol. Chem., 251, 2820-2824 (1976)
- [66] Rao S. T., Rossman M. G., J. Mol. Biol., 76, 241-256 (1973)
- [67] Richards F. M., J. Mol. Biol., 82, 1-14 (1974)
- [68] Riel J. K. de, Paulus H., Biochem, 17, 5134-5140 (1978)
- [69] Riel J. K. de, Paulus H., Biochem, 17, 5141-5145 (1978).
- [70] Riel J. K. de, Paulus H., Biochem., 17, 5146-5150 (1978).
- [71] Robson B., Garnier J., „Introduction to protein and protein engineering”, Elsevier Excerpta Medica (in press).
- [72] Rodriguez-Boulan E., Misek D. E., Vega de Salas, Salas P. J. J., Bard E., „Current topics in membrane and transport”, t. 24, cz. 6, Protein sorting in the secretory pathway, Academic Press Inc., 1985, s. 252-280.
- [73] Rose G. D., Wetlauffer D. W., Nature, 268, 769-770 (1977).
- [74] Rosenfeld M. C., Kreibich G., Popov D., Kato K., Sabatini D. D., J. Cell Biol., 93, 135-143 (1982).
- [75] Rudolph R., Heider J., Jaenicke R., Eur. J. Biochem, 81, 563-570.
- [76] Rudolph R., Heider J., Westhof E., Jaenicke R., Biochem., 16, 3384-3390.
- [77] Sabatini D. D., Kreibich G., Morimoto T., Adesnik M., J. Cell. Biol., 92, 1-22 (1982).
- [78] Salemme F. R., Mol. Biol., 146, 143-156 (1981).
- [79] Salemme F. R., Weatherford D. W., Mol. Biol., 146, 101-117 (1981).
- [80] Salemme F. R., Weatherford D. W., Mol. Biol., 146, 119-141 (1981),
- [81] Schubert-Wright C., Alden R. A., Kraut I., Nature, 221, 235-242 (1969).
- [82] Schultz G. E., Schirmer R. H., [w:] „Principles of protein structure”, Springer-Verlag, Heidelberg 1978, s. 66-84
- [83] Schultz G. E., Schirmer R. H., Sackenheim W., Pai B. F., Nature, 253, 120-124 (1974).
- [84] Siemion I., „Biostereochemia”, PWN, Warszawa 1985.
- [85] Skudlarek M. D., Novak M. K., Schwank R. T., [w] „Lasosomes in biology and pathology”. Eds. J.T. Dingle, 1 in., Elsevier Sci. Publ. Co. Amsterdam 1984, s. 17-42.
- [86] Sly W. S., Stahl P., „Transport of macromolecules in cellular systems”. Ed. S.C. Silverstein, Dahlem Konferenzen, Berden 1978, s. 229-244.
- [87] Stone D., Sodek J., Johnson P., Smillie B., Proc. 9th FEBS Meeting (Budapest), 31, 125-136 (1975).
- [88] Storm D. R., Koshland J. R., J. Am. Chem. Soc., 94, 5805-5814 (1972).
- [89] Thorner J. W., Paulus H., J Biol. Chem., 246, 3885-3894 (1971).
- [90] Twardowski J., Biochim. Biophys. Acta, 578, 116-124 (1979).
- [91] Twardowski J., Anzenbacher P., „Spektroskopia Ramana w podczerwieni w biologii” (w druku).
- [92] Twardowski J., Nowak I. Zagad. Biof. Współcz., 13, z. 1, 61-80 (1980).
- [93] Uiams Jr., [w:] „The enzymes”. Ed. P. D. Boyer, wyd. 3, Academic Press, New York 1976, s. 89-173.
- [94] Wall J. S., J. Agr. Food Chem., 19, 619-625 (1971).
- [95] Weischet W., Kirschnér K., Eur. J. Biochem., 65, 375-385 (1976).
- [96] Wiesinger H., Bartholmes P., Hinz H. J., Biochemistry, 18, 1979-1984 (1979)

-
- [97] Williams R. W., Dunker A. K., J. Mol. Biol., 152, 783-813 (1981).
[98] Wyckoff H. W., Tsernoglou D., Hanson A. W., Knox J. R.,
Lee B., Richards F. M., J Biol. Chem., 245, 305-328 (1970)
[99] Wyman J., J Curr Topics Cell. Reg., 6, 209-226 (1962)

Jacek Twardowski, Irena Nowak

STRUCTURE AND FUNCTION OF ENZYMES

S u m m a r y

The paper reviews basic protein structures and fundamental theories of enzyme functioning. It provides introduction to such problems as protein primary structure, the relation between protein biosynthesis and its primary structure, protein secondary structure, domain structure, tertiary and quaternary structure, allosteric effect, aggregates of globular proteins, stable multienzyme complexes, the relation between enzymatic activity and their quaternary structure, and enzyme active sites

Doc. dr hab JACEK TWARDOWSKI
Dr IRENA NDWAK
Laboratorium Badań Biostrukturalnych
Instytut Zoologii
Uniwersytetu Jagiellońskiego
ul Karasia 6
30-060 Kraków

Maria Koter, Ewa Grzelińska

INTERPRETACJA WIDM ZNACZNIKÓW SPINOWYCH
STOSOWANYCH W BADANIACH PŁYNNOSCI LIPIDÓW BŁON

1. WSTĘP

W 1965 r. Ohnishi i McConnell [58] po raz pierwszy przyłączyli do makrocząsteczki stabilny rodnik syntetyczny w celu otrzymania informacji o jej strukturze. Od tego czasu obserwuje się coraz szerszy rozwój zastosowań techniki znaczników spinowych. Metoda ta okazała się szczególnie przydatna w badaniach błon biologicznych. Dokładne omówienie jej można znaleźć w monografiach [10, 22, 27, 31, 53] oraz w licznych artykułach (np. [21, 41, 68, 69]). W piśmiennictwie krajowym temat ten poruszają m.in. prace [40, 71].

Celem niniejszego artykułu jest zwrócenie uwagi na pewne wewnętrzne ograniczenia tej metody. Ze względu na złożoność układu może to być np. nakładanie się linii widmowych pochodzących od cząsteczek znacznika zlokalizowanych w różnych obszarach błony. Wskazuje to na konieczność zachowania szczególnej ostrożności zarówno w planowaniu eksperymentu, jak i interpretacji uzyskanych wyników. Większość problemów omówionych w tym artykule odnosi się do stosowanych w badaniach płynności błon znakowanych spinowo kwasów tłuszczowych i ich pochodnych, jednak ogólne zasady są jednakowe dla wszystkich rodzajów znaczników spinowych.

2. PARAMETR UPORZĄDKOWANIA

Podstawy teoretyczne wyznaczenia parametru uporządkowania zostały opisane w pracach [41, 69, 71]. Parametr uporządkowania mierzy rozkład cząsteczek zorientowanych względem dowolnie wybranej osi [68]. Osią tą jest zazwyczaj normalna do powierzchni błony. Zgodnie z danymi literaturowymi parametr uporządkowania może być wyznaczony z następującej zależności:

$$S = \frac{T_{||}' - T_{\perp}}{T_{22} - \frac{1}{2}(T_{xx} + T_{yy})} \frac{a}{a'} \quad (1)$$

a - związek między stałymi rozszczepienia izotropowego dla cząsteczek nitroksylowych w kryształach

$$a = \frac{1}{3} (T_{xx} + T_{yy} + T_{zz})$$

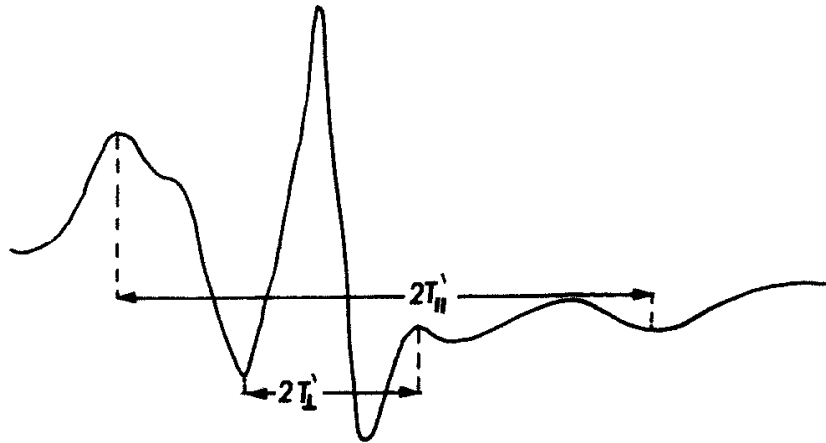
gdy $T_{xx} \approx T_{yy}$ (2)

$$a = \frac{1}{3} (T_{zz} + 2 T_{xx})$$

a' - związek między stałymi rozszczepienia izotropowego dla cząsteczek nitroksylowych w błonie

$$a' = \frac{1}{3} (T'_{||} + 2 T'_{\perp}) \quad (3)$$

$2T_{||}$ jest odległością między zewnętrznymi maksimumami rozszczepienia nadsubtelnego, $2T_{\perp}$ jest odległością między wewnętrznymi maksimumami, $T'_{||}$, T'_{\perp} - wielkości wyznaczone doświadczalnie (rys. 1), T_{xx} , T_{yy} , T_{zz} składowe tensora T mierzone dla kryształu, $T_{xx} = 6,1$ G, $T_{yy} = 6,1$ G, $T_{zz} = 32,4$ G - wartości te są używane do wyznaczenia szybkiego anizotropowego ruchu znacznika w błonie [69].



Rys 1 Metoda wyznaczenia parametrów położenia rozszczepienia nadsubtelnego dla widma EPR błon znakowanych lipidowym znacznikiem spinowym

Niektórzy autorzy proponują następującą zależność do wyznaczenia parametru uporządkowania przy użyciu tylko widmowych parametrów [27-29].

$$S = \frac{T'_{||} - (T'_{\perp} + C)}{T'_{||} + 2(T'_{\perp} + C)} \times 1,723 \quad (4)$$

gdzie $C = 1,4 - 0,053 (T'_{\parallel} - T'_{\perp})$ wyrażone w gausach [28, 29]. Wartość C jest poprawna dla obserwowanych T'_{\parallel} , T'_{\perp} , a podstawą obliczenia stałych współczynników są teoretycznie wyznaczone widma. Jeżeli $a = a'$, wtedy wyrażenie (1) przyjmuje postać:

$$S' = \frac{T'_{\parallel} - T'_{\perp}}{T_{zz} - \frac{1}{2}(T_{xx} + T_{yy})} \quad (5)$$

ponieważ $T_{xx} \approx T_{yy}$

$$S' = \frac{T'_{\parallel} - T'_{\perp}}{T_{zz} - T_{xx}} \quad (6)$$

S' jest często nazywanym parametrem uporządkowania *Seelinga* [69]. Można też wyznaczyć S'' , który jest funkcją T'_{\parallel} , a nie zależy od T'_{\perp} [22]:

$$S'' = \frac{1}{2} \left[\frac{3(T'_{\parallel} - T_{xx})}{(T_{zz} - T_{xx})} - 1 \right] \quad (7)$$

Jeżeli $a = a'$, wtedy T'_{\parallel} można wyrazić jako funkcję T'_{\perp} i wyznaczyć $S_{T'_{\perp}}$ [32, 34]:

$$S_{T'_{\perp}} = \frac{1}{2} \left[\frac{3(T_{zz} + T_{xx}) - 2T'_{\perp}}{(T_{zz} - T_{xx})} - 1 \right] \quad (8)$$

Używając tylko parametru widmowego T'_{\perp} niektórzy autorzy wyznaczają parametr uporządkowania z zależności [2, 28, 29]:

$$S'_{\perp} = \frac{43,76 - 3 T'_{\perp}}{46,16} \cdot 1,723 \quad (9)$$

Parametry S' , S'' , $S_{T'_{\perp}}$ powinny być sobierówne, jeżeli polarność w błonie jest taka sama jak w kryształach i nie ma oddziaływań znacznik-znacznik. Natomiast parametr S uwzględnia różnicę polarności między kryształem a badaną błoną. Parametr uporządkowania S może być wykorzystany do ilościowej interpretacji widma EPR znakowanych spinowo błon, w określaniu ruchu sondy. Lipidowy znacznik wprowadza się w dwuwarstwę lipidową, tak że długa oś jest prostopadła do płaszczyzny powierzchni błony. Sonda ta zdolna jest szybko obracać się wokół tej długiej osi, jednak przy oddalaniu się od wyróżnionej orientacji ruch staje się ograniczony. Poprawny parametr uporządkowania jest pomiarem amplitudy ruchu molekularnej długiej osi wokół średniej orientacji łańcucha kwasu tłuszczowego w dwuwarstwie lipidowej. Jego mak-

symalna wartość wynosi 1,0, gdy ruch znacznika nie występuje (całkowite uporządkowanie), a minimalna 0, gdy ruch znacznika jest izotropowy (nieuporządkowanie) [44, 71]. Parametry uporządkowania S' , S'' , S_{\perp} , S , które są wyznaczone z zewnętrznych i wewnętrznych rozszczepień widm, dostarczają informacji o sprężystości (flexibility) sondy w błonie. Wzrost parametru uporządkowania odpowiada spadkowi sprężystości i odwrotnie obniżenie parametru odpowiada wzrostowi sprężystości.

Parametry uporządkowania zależą od wielu czynników określających stan błon stosunku białka i lipidów w błonie [45], stosunku nasyconych i nienasyconych kwasów tłuszczowych [28], zawartości cholesterolu [42, 67], rozkładu glikolipidów [24], poziomu związanego z błoną Ca^{++} [34, 65] i Mg^{++} [25], temperatury błony.

Parametr uporządkowania mierząc sprężystość znacznika, wydaje się być ciałym opisem zmian płynności błon. Należy pamiętać, że „płynność lipidów” mierzona parametrem S nie daje bezpośredniej informacji o lateralnej dyfuzji znacznika w błonie

Nie każde otrzymane widmo znakowanych spinowo błon pozwala na poprawne wyznaczenie parametru uporządkowania. Błąd przy wyznaczaniu widmowych wartości $2T'_{\perp}$, $2T'_{\parallel}$ powinien być mniejszy niż 0,3 G. Różnica przy wyznaczeniu $2T'_{\parallel}$ wynosząca 0,3 G powoduje różnicę w parametrze uporządkowania o 0,01 [17].

Przy określaniu parametrów widmowych $2T'_{\perp}$, $2T'_{\parallel}$ ważne jest poprawne ustalenie położenia pików poszczególnych ekstremów. Na przykład silnie unieruchomiony znacznik może powodować rozmycie linii, co uniemożliwia precyzyjne określenie parametrów widmowych i może być przyczyną niezbyt poprawnie wyznaczonego parametru S . Jeżeli zmiany wartości parametru są niewielkie, może to prowadzić nawet do błędnych wniosków. W przypadku gdy występuje słabe uporządkowanie, a zewnętrzne ekstrema nadsubtelnego rozszczepienia nie są wyraźne, nie należy wyznaczać parametru uporządkowania [68].

3. CZASY KORELACJI ROTACYJNEJ

Podstawy teoretyczne wyznaczenia czasu korelacji rotacyjnej zostały opisane m. in. w pracach [21, 22, 68, 71].

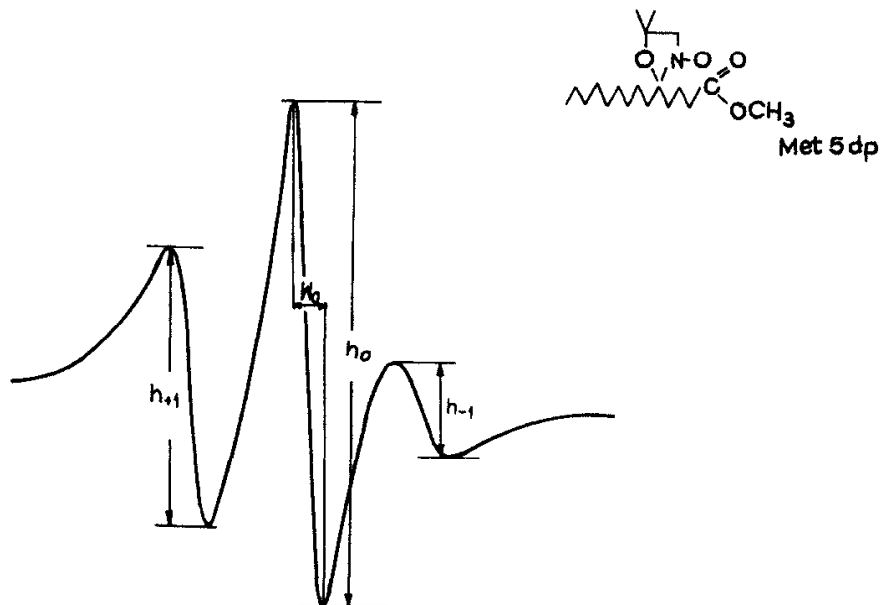
Analiza kształtu widma, tj. amplitudy poszczególnych pików i szerokości linii widmowych pozwala wyznaczyć czas korelacji rotacyjnej (rys. 2). Gdy ruch jest izotropowy, szybkość molekularnej orientacji może być opisana [21, 71]:

$$\tau_R = K \cdot \Delta W \left[\left(\frac{h_0}{h_{-1}} \right)^{1/2} - 1 \right] \quad (10)$$

h_{+1} - wysokość linii niskopolewej,

h_0 - wysokość linii środkowej,

h_{-1} - wysokość linii wysokopolewej,
 ΔW - szerokość linii środkowej.



Rys. 2. Metoda wyznaczenia wysokości amplitud poszczególnych ekstremów dla widma EPR błon znakowanych lipidowym znacznikiem spinowym

Równanie jest słuszne dla bardzo szybkiego ruchu izotropowego. Stosowanie modelu ruchu izotropowego do obliczeń czasu korelacji dla ruchu anizotropowego nie jest zalecane. W większości przypadków składniki błony wykazują wolny ruch anizotropowy. Dla tego ruchu najlepszym przybliżeniem okazał się model ograniczonego błędzenia. Jednakże do opisu tego ruchu nie wystarcza jeden czas korelacji. Najczęściej zakłada się symetrię osiową ruchu, co prowadzi do wyznaczenia dwóch czasów korelacji τ_B charakteryzującego prędkość ruchu w kierunku prostopadłym do długiej osi cząsteczki lipidowej, τ_C związanego z ruchem wokół tej osi. Ze względu na znacznie większą swobodę ruchu wokół długiej osi niż w kierunku prostopadłym, τ_B jest znacznie krótszy niż τ_C [71]. Czasy korelacji rotacyjnej można wyznaczyć z następujących zależności [21, 68]:

$$\tau_B = \frac{1}{2} C_1 \Delta W \left[\left(\frac{h_0}{h_{+1}} \right)^{1/2} - \left(\frac{h_0}{h_{-1}} \right)^{1/2} \right] \quad (11)$$

gdzie: $C_1 = 1,27 \times 10^{-9}$,

$$\tau_C = \frac{1}{2} C_2 \Delta W \left[\left(\frac{h_0}{h_{+1}} \right)^{1/2} + \left(\frac{h_0}{h_{-1}} \right)^{1/2} - 2 \right] \quad (12)$$

gdzie $C_2 = 1,19 \times 10^{-9}$.

Podane wartości C_1 i C_2 są dla doksycholestanu w kryształach. Stała C_1 zależy od wartości pola magnetycznego (przedstawione wartości są wyznaczone dla pola powyżej 3300 G). Dla lipidowych znaczników przyjmuje się często, że $2C_1 = 2C_2 = 6,5 \times 10^{-10}$. Dla bardzo szybkiego ruchu izotropowego $\tilde{\tau}_B \approx \tilde{\tau}_C$ i można wtedy używać $\tilde{\tau}_R$. Różnica między $\tilde{\tau}_B$ i $\tilde{\tau}_C$ może wskazywać na anizotropię ruchu, uporządkowanie cząsteczki

$$\Delta\tilde{\tau} = \tilde{\tau}_C - \tilde{\tau}_B \quad (13)$$

$\Delta\tilde{\tau}$ określa ilościowo stopień uporządkowania cząsteczek lipidowych.

W równaniach określających czasy korelacji rotacyjnej nie występują położenia ekstremów rozszczepienia nadsubtelnego. Czas korelacji rotacyjnej może być stosowany do wyznaczenia w sposób ilościowy zmian szybkości ruchu, jeżeli wykazemy, że położenia poszczególnych linii są niezmiennie. Gdy ruch jest anizotropowy, to mały wzrost amplitudy wywołuje zaburzenia w kształcie linii takie same jak niewielki wzrost szybkości ruchu. Wzrost amplitudy może także wpływać na przesunięcie pozycji linii wysokopolewej i niskopolewej w kierunku linii środkopolewej [68].

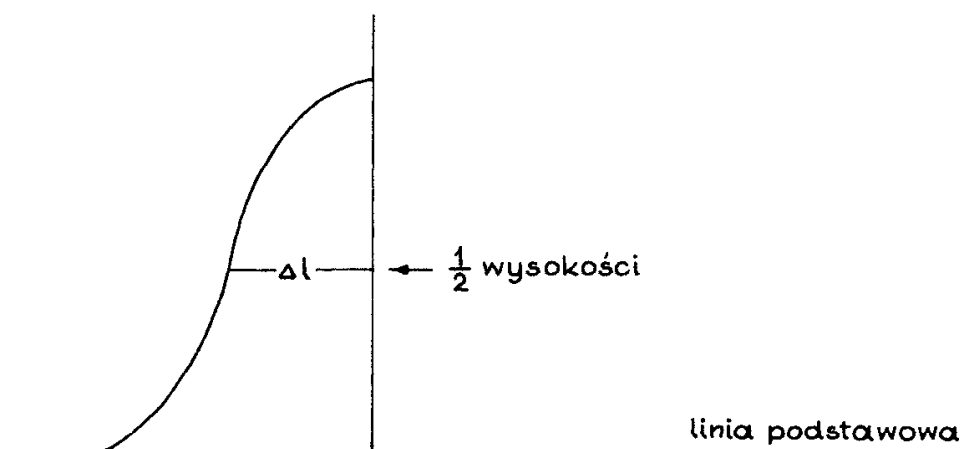
W przypadku błon, gdzie ruch znacznika ma charakter anizotropowy, nie zawsze jest możliwe poprawne wyznaczenie czasu korelacji. Zdaniem [68] można wtedy porównać naturę widm dla próbek mierzonych w różnych warunkach i określić np. amplitudy ekstremów i ich stosunków, bez konieczności odnoszenia efektów do zmian w czasie korelacji.

Najlepszą metodą interpretacji widm jest stosowanie symulacji widm z uwzględnieniem parametru uporządkowania i dwóch czasów korelacji.

4. INNE STOSOWANE PARAMETRY

4.1. POŁÓWKOWA SZEROKOŚĆ EKSTREMUM NISKOPOLEWEGO Δh_{+1}

Jeżeli rozszczepienie zewnętrznych linii widmowych nie wykazuje istotnych zmian, można wyznaczyć parametr połówkowej szerokości ekstremum niskopolewego mierzonego w połowie jego wysokości (rys. 3). Parametr ten jest czuły na niewielkie zmiany obserwowane w widmach [1, 68]. A s h a r f i współprac. [1] stwierdzili, że połówkowa szerokość ekstremum niskopolewego jest odwrotnie proporcjonalna do parametru uporządkowania. Badania te przeprowadzono dla pęcherzyków fosfolipidowych zawierających różne stężenia cholesterolu.



Rys. 3. Wyznaczanie szerokości ekstremum niskopolewego w połowie jego wysokości

4.2. STOSUNEK h_0/h_{-1}

Wielu autorów wykazało, że stosunek h_0/h_{-1} może dostarczać ilościowych danych o lipidach. Zależy on od ruchliwości znacznika w błonie. Zmiany tego stosunku są proporcjonalne do zmian obserwowanych dla czasu korelacji [47, 48, 55].

4.3. STOSUNEK h_{+1}/h_0 (A/C)

Niektórzy badacze stosują stosunek amplitudy linii niskopolewej do środkowej h_{+1}/h_0 [36, 38, 56, 70]. Parametr ten jest miarą szybkości rotacji znacznika. Jego obniżenie świadczy o zmniejszeniu szybkości rotacji.

5. PŁYNNOŚĆ BŁON A PARAMETRY S I τ

Pracując metodą znaczników spinowych określa się często płynność błon przez mierzenie parametru uporządkowania lub czasu korelacji rotacyjnej. G a f f n e y [28, 29] uważa, że płynność błon rozumiana jako sprężystość lipidów mówi o zmianach w organizacji i dynamice mikrośrodowiska, w którym znajduje się znacznik. Względna wartość parametru uporządkowania może być uważana za miarę płynności błony. Lokalną mikrolepkość środowiska można wyznaczyć z zależności:

$$\tau_R = \frac{4\pi\eta r^3}{3KT} \quad (14)$$

- $\tilde{\tau}_R$ - czas korelacji rotacyjnej,
 η - lokalna mikrolepkość środowiska,
 K - stała Boltzmana,
 T - temperatura,
 r - efektywny promień znacznika.

Dla izotropowych płynów płynność jest odwrotnie proporcjonalna do mikrolepkości. Jednakże ponieważ większość środowiska błonowego nie jest izotropowa, potrzeba więcej niż jeden czas korelacji do opisu dynamicznego zachowania się poszczególnych składników [68]. Na ogół przyjmuje się, że niskiemu poziomowi uporządkowania towarzyszy duża szybkość rotacji cząsteczek, jednakże okazuje się, że nie zawsze jest to słuszne. Szczególny przypadek jest wtedy, gdy parametr uporządkowania wynosi 0, a jednocześnie występuje bardzo wolny ruch. Opisane to zostało dla sztucznych błon otrzymanych z białej substancji mózgu zawierającej niskie stężenie cholesterolu [57]. Inny przykład błony zawierającej: 40% lecytyny, 20% DCP i 40% witaminy D, $S \approx 0$, $\tilde{\tau}_B = 1$ ns i całkowicie przeciwstawne wyniki błony zawierającej: 40% lecytyny, 20% DCP i 40% cholesterolu, $S = 0,88$, a $\tilde{\tau}_B = 1,2$ ns [14]. Szeroko jest to opisane w pracy Schreier a i współprac. [68].

Różnica między parametrem uporządkowania a szybkością rotacji może także wynikać z analizy widma, ponieważ do wyznaczenia parametru S wykorzystujemy położenie nadsubtelnego rozszczepienia, a do obliczenia $\tilde{\tau}$ - szerokość linii i ich amplitudę.

6. MOŻLIWOŚĆ ARTEFAKTÓW ZWIĄZANYCH ZE STĘŻENIEM ZNACZNIKÓW

Znakowane spinowo cząsteczki nigdy nie są identyczne z naturalnymi składnikami błon i wprowadzenie ich do badanego układu może powodować pewne zaburzenia w jego stanie. Stwierdzono, np. [11, 16, 72], że inkubacja erytrocytów ze znakowanymi spinowo kwasami tłuszczowymi w zakresie stężeń znacznika 10^{-8} - 10^{-5} M powodowała zmianę ich kształtu prowadzącą do powstania echinocytów, a w wyższych stężeniach lizę krwinek. Jednak w doświadczeniach tych stosunek wagowy znacznika do lipidów był bardzo wysoki, czasem wynosił aż 1 : 2 [11]. Powszechnie uważa się, że nieprzekroczenie stosunku wagowego 1 : 100 zapobiega wystąpieniu istotnych zaburzeń w stanie badanego układu. Obserwowane w tym zakresie stężeń niewielkie zmiany morfologiczne erytrocytów były w przybliżeniu równe tym, jakie wywoływał nie znakowany kwas stearynowy [72]. W tym miejscu należy zwrócić uwagę na fakt, że wolne kwasy tłuszczowe nie są analogami głównych składników strukturalnych błony erytrocytarnej, a więc użyte w wysokim stężeniu mogą również wywoływać podobny detergentom efekt uszkodzający. Godne zalecenia jest stosowanie znaczników spinowo-

wych będących lepszymi analogami naturalnych składników błony, np. glikolipidów czy fosfolipidów

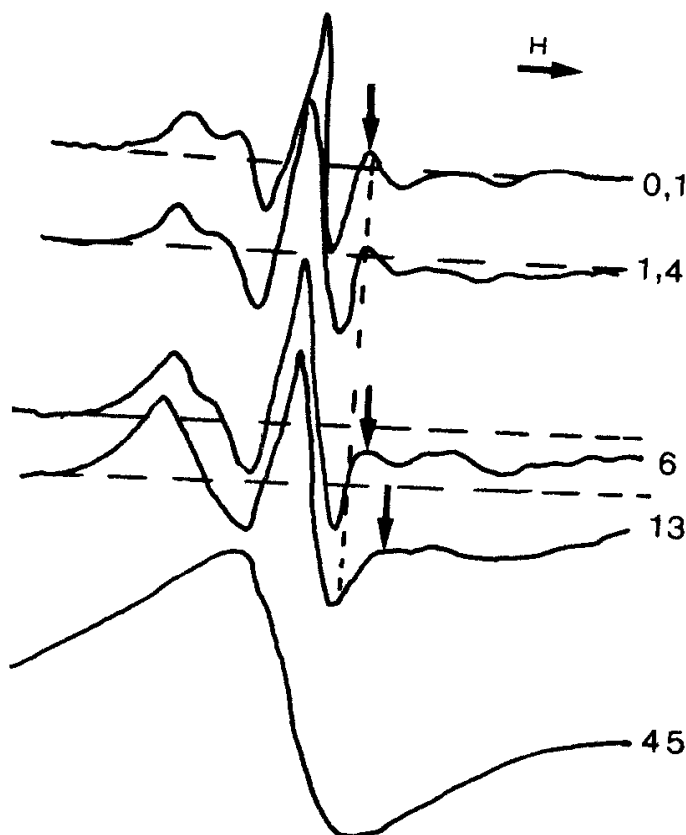
Wysokie stężenia znakowanych spinowo kwasów tłuszczowych lub ich pochodnych w błonie mogą być również źródłem artefaktów, przy wyznaczaniu i interpretowaniu różnych parametrów widmowych. Analiza kształtu widma kwasu 5-doksylostearynowego¹ wprowadzonego do błon plazmatycznych komórek izolowanych z serca szczura [22, 34, 66] pozwoliła stwierdzić pewne jego zniekształcenie już w zakresie stężeń 25-53 µg/mg białka, powyżej zmiany były tak duże, że praktycznie uniemożliwiały interpretację widma. Jednym z pierwszych efektów jest poszerzenie linii środkowej (W_0). W warunkach interakcji między cząsteczkami znacznika szerokość ta wyraża się wzorem.

$$W_0 = W_1 + W_{dip} + W_{wym} \quad (15)$$

gdzie W_1 - szerokość linii przy braku interakcji między cząsteczkami znacznika, W_{dip} - poszerzenie linii spowodowane interakcją dipol-dipol, W_{wym} - poszerzenie linii wynikające z interakcji wymiany, będące funkcją częstości zderzeń między cząsteczkami znacznika, zależnej z kolei od stężenia znacznika i szybkości dyfuzji [63]. Dalszym efektem nadmiaru znacznika jest zwiększenie odległości $2T_{\perp}$ (rys 4). Wydaje się, że $2T_{\parallel}$ w przeciwieństwie do $2T_{\perp}$ jest stałe w dużym zakresie stężeń [30, 34, 66], jednak w przypadku erytrocytów znakowanych kwasem 12-doksylostearynowym również i ta wielkość wykazywała zależność od stężenia zmienność [30, 65, 66]. Obserwowane przez niektórych autorów obniżenie parametru uporządkowania w następstwie jedynie zmian $2T_{\perp}$, może być interpretowane jako wynik interakcji między cząsteczkami znacznika, bowiem w przypadku rzeczywistego upłynięcia zwiększenie $2T_{\perp}$ powinno być równoczesne ze zmniejszeniem $2T_{\parallel}$ [30] H u b b e l l i M c C o n n e l l [41] zaobserwowali obniżenie parametru uporządkowania znakowanej spinowo dipalmitylolocytyny w przypadku gdy stosunek ilościowy znacznika do lipidów został zwiększony od 1 · 600 do 1 · 100. Nadmiar znacznika nie modyfikował parametru S uwzględniającego jedynie $2T_{\parallel}$ [66]. S a u e r h e b e r i współprac. [66] zaproponowali wyznaczenie parametru m dla stwierdzenia interakcji między cząsteczkami znacznika.

$$m = \frac{S'}{S''} = \frac{2}{3} \frac{(T_{\parallel} - T_{\perp})}{(T_{\parallel} - a)} \quad (16)$$

¹Numeracja węgla zgodnie z angielską nomenklaturą.

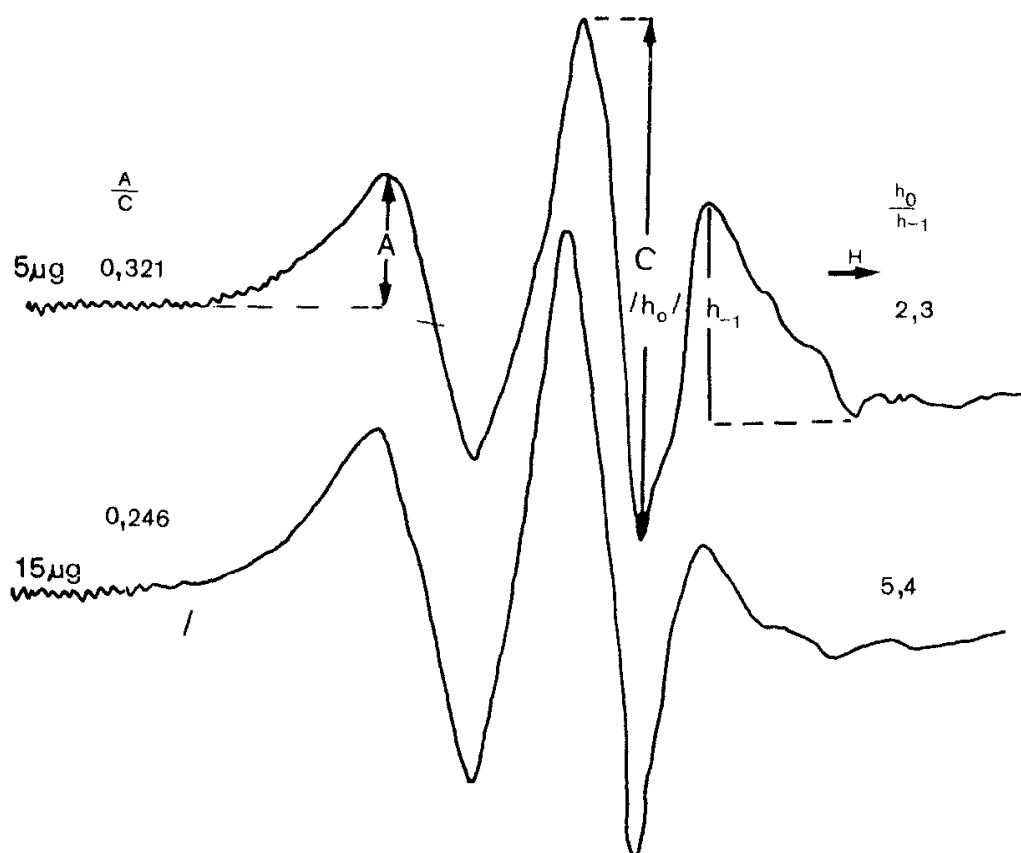


Rys. 4. Wpływ stężenia znacznika na widma EPR błon erytrocytów ludzkich znakowanych kwasem 5-doksylostearynowym 0,1, 1,4, 6,0, 13,0, 45,0 µg znacznika/mg białka [30]

lub

$$m = \frac{T_{||} - a}{T_{||} - a'} \quad (17)$$

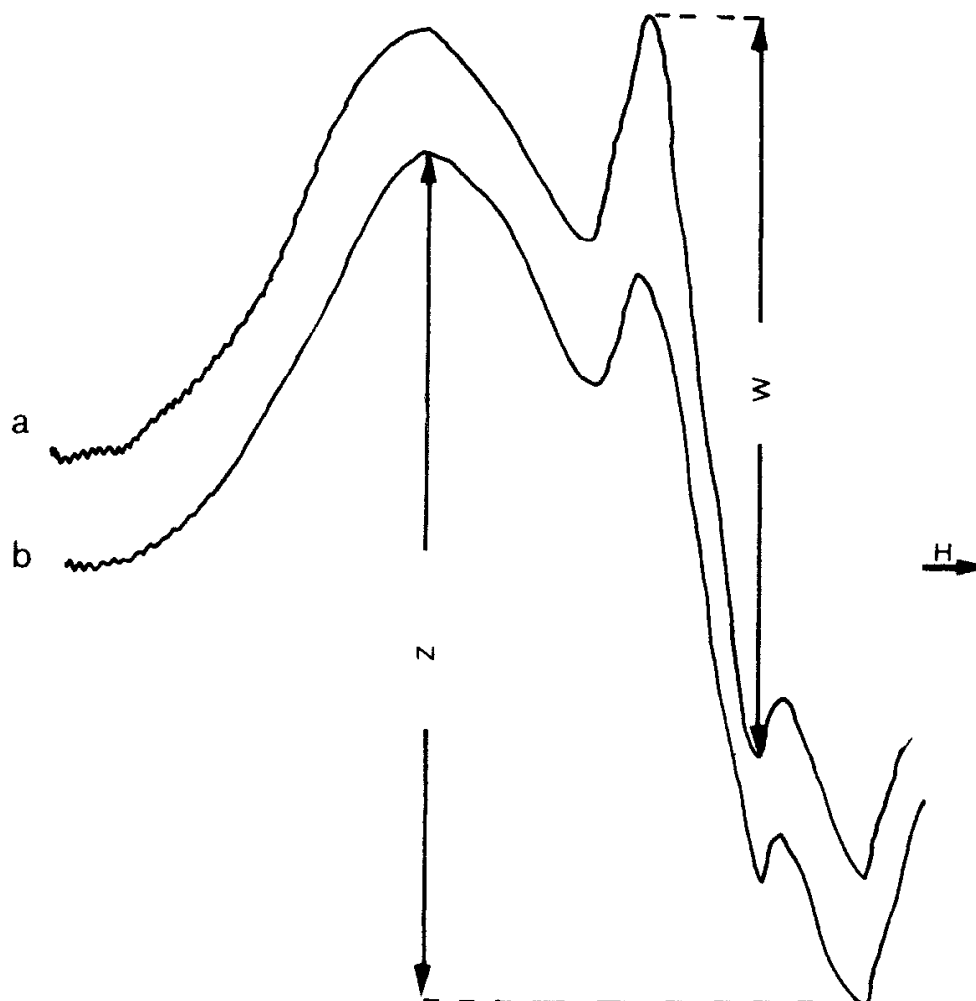
w przypadku gdy polarność błony jest taka sama jak w układzie modelowym i nie zachodzi interakcja między cząsteczkami znacznika $m = 1$, a gdy jest obecna $m < 1$. Zbyt duże stężenie znakowanego spinowo kwasu tłuszczowego w błonach powodowało również obniżenie wysokości linii wysokopolewej, co w konsekwencji prowadziło do zależnych jedynie od stężenia zmian $\tilde{\nu}_C$ [23] czy też stosowanych czasem parametrów h_0/h_{-1} (rys. 5). Interakcja między cząsteczkami znaczników może powodować także zniekształcenia widma polegające na obniżeniu linii podstawowej w jego wysokopolewej części przy równoczesnym jej podniesieniu w niskopolewej części [30]. Te zmiany w widmie wpływają również na omawiane powyżej parametry [23] oraz modyfikują parametr A/C. Wysokość A linii niskopolewej wyznaczana jest od linii podstawowej, a więc jej podniesienie powoduje zależne tylko od stężenia zmniejszenie



Rys. 5. Wpływ stężenia znacznika 12-doksylostearynianu metylu związanego z błonami erytrocytów człowieka na parametry widmowe A/C i h_0/h_{-1}

A/C (rys. 5). Rezultatem użycia nadmiaru znacznika mogą być dodatkowe „płynne linie”. Ich obecność w widmie nie jest jednak jednoznacznym wskaźnikiem nadmiaru znacznika, ponieważ ich intensywność zależy od stężenia błon oraz rozpuszczalności znacznika w wodzie [12, 66]. Dobra rozpuszczalność kwasu 12-doksylostearynowego powoduje, że w jego widmie obok silnie unieruchomionych linii odpowiadających cząsteczkom znacznika związanym z błoną, obecne są linie charakterystyczne dla znacznika zlokalizowanego w środowisku wodnym [12] nawet wtedy, gdy użyty jest w niewielkim stężeniu. Stosunek ich wysokości definiowany jako współczynnik podziału f (rys. 6) jest miarą frakcji znacznika zlokalizowanej w błonie [68]

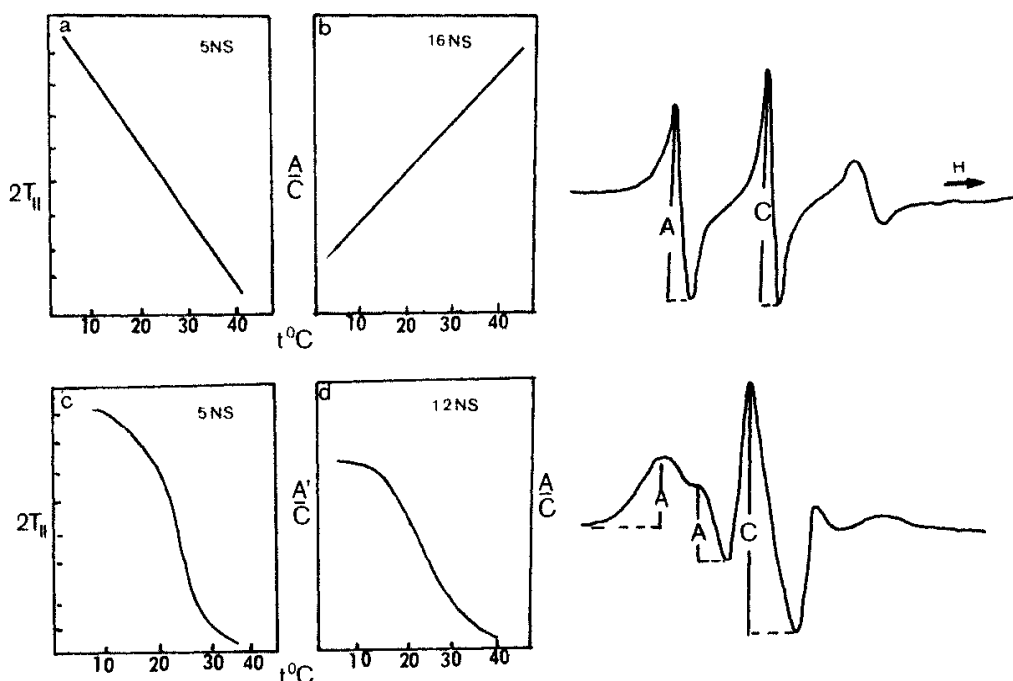
Obecność „płynnych linii” w widmach słabo rozpuszczalnego estru metylowego wskazuje na użycie go w nadmiarze lub też może być spowodowane jego hydrolizą [12]. W publikowanych bezpośrednio po sobie pracach poświęconych płynności błon biologicznych i sztucznych, dość często niezgodne rezultaty są tłumaczone stosowaniem zbyt dużego stężenia znacznika [61, 62]. Istotnie, dość często trudno jest rozróżnić zmiany w płynności czy polarności danego układu, wywołane działaniem okre-



Rys. 6. Widma EPR błon erytrocytów krowy a) natywnych, b) napromienionych dawką 3 Mrad znakowanych kwasem 12-doksylostearynowym
 z - linia odpowiadająca frakcji znacznika zlokalizowanego w błonie, w - linia odpowiadająca frakcji znacznika rozpuszczonego w fazie wodnej $f = \frac{z}{z + w}$ [68]

ślonych czynników, od zmian widmowych w następstwie interakcji między cząsteczkami znacznika, czasem zmiany te mogą się na siebie nakładać, co może prowadzić do artefaktów, np. pozornego „upłynnienia”. Na ogół przyjmuje się, że prawdziwe parametry widmowe, niezależne od interakcji między cząsteczkami znacznika, a więc odnoszące się jedynie do „wewnętrznych” właściwości błony, uzyskuje się, jeśli stosunek wagowy znacznika do lipidów nie przekracza 1 : 100 [22] (w przypadku najczęściej stosowanych kwasów tłuszczowych oznacza to ok. 5 µg znacznika na 1 mg białka). Wydaje się jednak, że odpowiednio niskie stężenie (tj. takie, przy któ-

rym „szumy” nie przeszkadzają w analizie widma) powinno być wyznaczane eksperymentalnie, bowiem optymalne stężenie może zależeć od rodzaju preparatu. W przypadku błon z komórek wątroby szczura znakowanych kwasem 5-doksylostearynowym rzeczywisty parametr uporządkowania otrzymywano, jeśli stosunek ten nie przekraczał 1 : 250 [66], natomiast dla limfocytów badanych za pomocą znakowanych spinowo fosfolipidów czy cerebrozydów wynosił 1 : 300 [24]. Współistnienie w błonach mniej lub bardziej płynnych domen lipidowych [26, 33, 43] i preferencyjna lokalizacja znacznika w fazach bardziej płynnych [15, 59, 75] mogą wywoływać wrażenie nadmiaru znacznika nawet wtedy, gdy jego stężenie jest dostatecznie niskie [42]. Taka wybiórcza lokalizacja znacznika w jednej z faz heterogennego układu może uniemożliwiać obserwacje zmian zachodzących w innej fazie układu [9, 15, 75]. Występowanie ubogich w cholesterol domen (a więc bardziej płynnych), w bogatych w cholesterol błonach [50] może komplikować interpretację wyników, gdyż określona płynność i polarność środowiska, w którym znajduje się znacznik, byłaby reprezentatywna jedynie dla lokalnych czy nietypowych domen [22]. Obecność znacznika w domenach różniących się płynnością znajduje na ogół odbicie w heterogennym widmie [35, 56]. Jednak czasem zdarza się, że w wyniku silnego nakładania się składowych o różnym stopniu unieruchomienia otrzymuje się widmo pozornie homogenne, mimo podziału znacznika między różne fazy [31]. Taki typ widma obserwowany np. w przypadku błon erytrocytarnych znakowanych 12-doksylostearynianu metylu [36-38], uniemożliwiał prostą interpretację w kategoriach parametru uporządkowania czy też czasu korelacji. W takich przypadkach do oceny zmian w sprężystości łańcuchów kwasów tłuszczowych wykorzystywano ilościowe parametry wyliczane na podstawie wysokości linii widmowych [36, 38, 47, 48, 56, 78]. Należy jednak zwrócić uwagę, że interpretacja parametrów tego typu zależy od charakteru widma znacznika (rys. 7). Stosunek wysokości linii niskopolewej i środkowej A/C w przypadku prostego widma pochodzącego od homogennej populacji cząsteczek znacznika jest miarą szybkości rotacji cząsteczek znacznika (i, tym samym, mikrolepkości błony). Wzrost wartości tego parametru świadczy o zwiększeniu szybkości rotacji cząsteczek znacznika [70] (rys. 7a, b). Jednak jeśli widmo jest złożone i powstaje w wyniku superpozycji widma reszt słabiej i silniej unieruchomionych, analogiczny stosunek (jeśli mierzy się wysokość nieskopolewej linii pochodzącej od sygnału silniej unieruchomionej populacji reszt znacznika) jest również zależny od udziału populacji silniej unieruchomionych reszt znacznika w widmie. Stosunek ten zwykle maleje w miarę wzrostu płynności błony (spowodowanej np. zwiększaniem się temperatury) i wtedy spadek, a nie wzrost stosunku wysokości najbardziej niskopolewej linii widma do wysokości linii środkowej może towarzyszyć wzrostowi płynności błony [56] (rys. 7c, d). Szczególną pułapką interpretacyjną może być przypadek pośredni, gdy słabo nierozdzielony pik niskopolewy jest wynikiem superpozycji sygnałów pochodzących od silnie i słabo unieruchomionych reszt znacznika. W takiej sytuacji wzrost



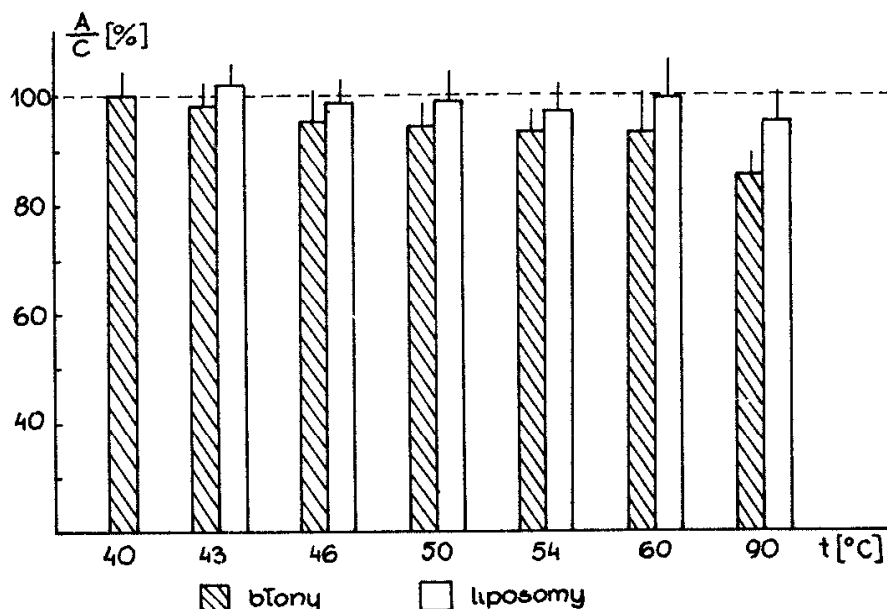
Rys 7. Wpływ temperatury na parametry widmowe A/C (A'/C) i $2T_{||}$.
 A - wysokość linii niskopolewej odpowiadająca populacji słabo unieruchomionych reszt znacznika, A' - wysokość linii niskopolewej pochodzącej od silnie unieruchomionej populacji reszt znacznika
 Liniją przerywaną zaznaczono hipotetyczny przebieg krzywej w przypadku gdy mierzy się wysokość pochodzącą od sygnału słabo unieruchomionej populacji reszt znacznika 12 NS (t.j. tę samą, jaka występuje w przypadku 16 NS). Dpracowano na podstawie [56, 70]

płynności błony może prowadzić z jednej strony do zwiększania się stosunku wysokości linii niskopolewej i środkowej (dla sygnału słabo unieruchomionych reszt znacznika), a z drugiej - do spadku udziału (a więc i wysokości linii niskopolewej silnie unieruchomionych reszt znacznika) (rys. 7d).

7. MOŻLIWOŚĆ ARTEFAKTÓW ZWIĄZANYCH Z ODDZIAŁYWANIEM ZNACZNIKÓW LIPIDOWYCH Z BIAŁKAMI BŁON

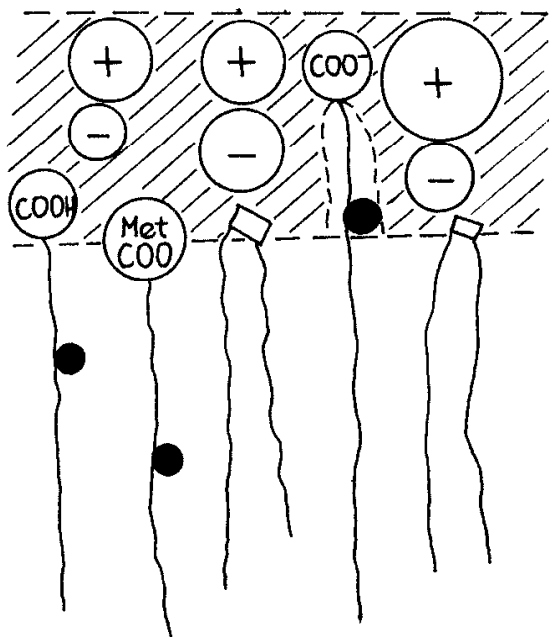
Jak już wcześniej wspomniano, podział znacznika między domeny w różny sposób ograniczające jego ruchliwość powoduje, że otrzymane widmo jest heterogenne. Po wszechnie uważa się, że składnik słabo unieruchomiony pochodzi od znacznika znajdującego się w wolnej dwuwarstwie lipidowej. Interpretacja lokalizacji cząsteczek silnie unieruchomionych nie jest jednoznaczna [8, 19, 30, 39, 46, 49, 54, 74, 79]. Istnieją sugestie, że silnie unieruchomiony składnik widma pochodzi od cząsteczek wbudowanych w lipidy graniczne [46, 47]. W badaniach oddziaływania typowego biał-

ka integralnego, oksydazy cytochromowej z fosfolipidami, w układzie zawierającym oba składniki, widma lipidowych znaczników spinowych były heterogenne, tj. zawierały składnik silnie unieruchomiony [45]. Z drugiej strony, podobny typ widma otrzymano w układzie polipeptyd gramicydyna-lipidy-woda [19]. Ostatnio dość często sugeruje się możliwość wiązania się znakowanych spinowo kwasów tłuszczowych i ich pochodnych z białkami błony [8, 12, 31, 54, 78, 79]. Analiza widm 12-doksylostearynianu metylu wprowadzonego do błon erytrocytów wskazywała, że część „płynna” widma, a więc pochodząca od słabo unieruchomionych cząsteczek znacznika stanowi jedynie 20%, pozostałe 80% to silnie unieruchomiona składowa widma [39]. Zdaniem [77-79] zmniejszenie ruchliwości znaczników lipidowych wprowadzonych do błon może być wynikiem ich absorpcji na powierzchni białek integralnych. Być może poprzez wiązania wodorowe łączą się one z grupami aminowymi białek [49]. Stąd wniosek, że dla stwierdzenia rzeczywistych zmian w lipidach błon wskazane jest sprawdzanie uzyskanych wyników poprzez znakowanie czystych, nie zawierających białek, układów lipidowych. Można przypuszczać, że obserwowane często zmiany w widmach znakowanych spinowo kwasów tłuszczowych czy ich pochodnych wprowadzonych do błon natywnych, odnoszą się zarówno do lipidów, jak i białek [9, 12, 30, 54, 78, 79]. Pouczającym potwierdzeniem tej tezy mogą być niezgodne wyniki badań dotyczące zmian płynności błon komórkowych i czystych układów lipidowych uzyskane za pomocą tych znaczników. I tak, widma EPR znakowanych spinowo błon erytrocytów wskazywały na zmiany w płynności lipidów pod wpływem działania hipertermii, podczas gdy widma liposomów z lipidów izolowanych z tych błon pozostały niezmienione (rys.



Rys. 8. Wpływ hipertermii na widma EPR 12-doksylostearynianu związanego z błonami erytrocytów krowy i liposomami otrzymanymi z lipidów izolowanych z błon

8) [38] Podobnie, wyniki uzyskane w badaniach wpływu promieniowania jonizującego [37, 52] i innych czynników wywołujących peroksydację [6, 47, 48, 76] zależały od tego, czy znakowaniu poddawano preparaty natywnych błon czy też czystych układów lipidowych. Porównanie frakcji erytrocytów o różnym wieku wykazywało znacznie większe zmiany parametru uporządkowania w badaniach samych erytrocytów niż w przypadku utworzonych z nich liposomów [5]. O ile więc interpretacja widm w czystych układach lipidowych nie stwarza na ogół problemów, o tyle w przypadku natywnych błon należy zachować ostrożność mając świadomość, że białka błon mogą oddziaływać ze znacznikami stosowanymi jako sondy części lipidowej. Stwierdzenie to nie dyskryminuje oczywiście metody znaczników spinowych, bowiem odnosi się ono w ogóle do wszystkich metod wykorzystujących zewnętrzne sondy [4, 7, 18, 60]. Można przypuszczać, że oddziaływanie znaczników lipidowych z białkami błon, być może nasilone wskutek działania różnych czynników [12, 20, 73, 78] (denaturacja białek?), może być jednym z powodów różnic w badaniach błon i liposomów. Porównanie współczynników podziału f kwasu 12-doksylostearynowego obliczonych dla błon natywnych i poddanych działaniu promieniowania wskazuje na większą liczbę miejsc wiążących znacznik (Grzelińska, wyniki nie publikowane) (rys. 6), a być może również inny ich charakter w przypadku zmodyfikowanego preparatu. Wcześniej sugerowano możliwość innego wiązania się znacznika do błon drożdży przed i po działaniu promieniowania UV [20] oraz do błon erytrocytarnych modyfikowanych przez chlorpromazynę [78] czy 3-metylindol [12]. Z drugiej strony, w przypadku liposomów z soi [13] obserwowano bardzo nieznaczne obniżenie współczynnika podziału w na-



Rys. 9. Lokalizacja znakowanych spinowo kwasów tłuszczowych i ich pochodnych w błonie [64]

stępsztwie peroksydacji, co moze oznaczać mniejsze wiązanie się znacznika. Zwiększone wiązanie znacznika widoczne w przypadku błon, ale nie liposomów [13] może świadczyć, że w modyfikowanych preparatach błon dodatkowymi miejscami wiążącymi znacznik mogą być zdenaturowane białka. Otrzymane wyniki mogą więc dotyczyć zarówno białek, jak i lipidów, przy czym jedne zmiany mogą maskować inne

Przy porównaniu rezultatów uzyskanych w różnych eksperymentach należy pamiętać, że pH środowiska wpływa na lokalizację znacznika w badanym układzie (rys. 9) [64]. Na zakończenie warto przypomnieć, że ze względu na łatwość z jaką znaczniki ulegają utlenieniu czy redukcji, duży wpływ na uzyskane wyniki ma sposób ich przygotowania i przechowywania

Trudności analizy i interpretacji widm znakowanych spinowo kwasów tłuszczowych i ich pochodnych przedstawione w tym artykule mogą czasem skłaniać do wniosku, że metoda ta jest dość zawodna. Oczywiście takie rozumowanie nie jest słuszne, przedstawione powyżej ograniczenia odnoszą się do wszystkich metod spektroskopowych wykorzystujących zewnętrzne sondy. Wydaje się, że w większości przypadków znaczniki spinowe dostarczają wiarygodnych informacji o stanie błon naturalnych czy sztucznych, o ile planowanie eksperymentu i interpretacja danych są przeprowadzane z pewną ostrożnością, a badaniom widm towarzyszą badania ewentualnych zmian struktury i funkcji badanego obiektu po wprowadzeniu znacznika.

Maszynopis wpłynął do Redakcji 15 VI 1988

LITERATURA

- [1] Ashraf J., Feix J. B., Butterfield D. A., *Biosci. Rep.*, 4, 115 (1984).
- [2] Bates B. L., Lesin E. S., Dppenheimer S. B., *Biochim. Acta*, 465, 400 (1977)
- [3] Barrett M. D., Lugoner P., *Biochim., Biophys. Acta*, 363, 127 (1974)
- [4] Barrow D., Lentz B. R., *Biophys. J.*, 48, 221 (1985).
- [5] Bartosz G., *Biochim Biophys. Acta*, 664, 69 (1981).
- [6] Bartosz G., Christ G., Bosse H., Stephan R., Gartner H., *Z. Naturforsch.*, 43a, 1381 (1987).
- [7] Bashford C. L., Morgan C. G., Radda G. K., *Biochim. Biophys. Acta*, 426, 157 (1976).
- [8] Benga G. H., Chapman D., *Rev. Roum Biochim.*, 13, 251 (1976).
- [9] Benga G. H., Porumb T., Wrigglesworth J. M., *J Bioenerg Biomembr.*, 13, 269 (1981)
- [10] Berliner L., "Spin labelling theory and application", Acad. Press, New York-San Francisco-London 1976.
- [11] Bieri V. G., Wallach D. F. H., Lin P. S., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 71, 4797 (1974).
- [12] Bray T. M., Sandberg H. F., Carlson J. R., *Biochim. Biophys. Acta*, 382, 534 (1975).
- [13] Bruch R. C., Thayer W. S., *Biochim. Biophys. Acta*, 733, 216 (1983).
- [14] Butler K. W., Smith C. P., *Can. J. Biochem.*, 56, 117 (1978).

- [15] Butler K. W., Tattrie N. H., Smith I. C. P., *Biochim. Biophys. Acta*, 363, 351 (1974).
- [16] Butterfield O. A., Chesnut D. P., Appel S. H., Rosses A. O., *Nature*, 263, 159 (1976).
- [17] Cestaro B., Cerrato G., Marchesini S., Viani P., Pistolesi S., Cesare O., *Chem. Phys. Lipids*, 33, 251 (1983).
- [18] Chapman O., Benga G., „Biological membrane”, t. 5, Acad. Press, Inc. London 1984, s. 1-56.
- [19] Chapman O., Cornell B. A., Elias A. W., Perry A., *J. Mol. Biol.*, 113, 517 (1977).
- [20] Collins J. M., Cohn G. E., Lis L. J., *Chem. Phys. Lipids*, 30, 297 (1982).
- [21] Connon B., Polnaszek C. F., Butler K. W., Eriksson L. E. G., Smith I. C. P., *Arch. Biochem. Biophys.*, 167, 505 (1975).
- [22] Curtain C. C., Gordon L. W., „Membranes, detergents and receptor solubilization”. Ed. A. R. Liss, Inc. New York, 1984, s. 177.
- [23] Curtain C. C., Looney F. O., Marchalonis J. J., Reason J. K., *J. Membr. Biol.*, 44, 211 (1978).
- [24] Curtain C. C., Looney F. O., Smelstorius J. A., *Biochim. Biophys. Acta*, 596, 43 (1980).
- [25] Ehrstrom M., Eriksson L. E., Israelachvili J., Ehrenberg A., *Biochem. Biophys. Res. Com.*, 55, 396 (1973).
- [26] Fried D. S., *J. Cell Biol.*, 93, 243 (1982).
- [27] Fung L. W. M., Johnson M. E., „Current topics in bioenergetics”. Ed. C. P. Lee, Acad. Press, 13, 107 (1984).
- [28] Gaffney B. J., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 72, 664 (1975).
- [29] Gaffney B. J., [w:] „Spin labeling. Theory and applications”, Acad. Press, New York 1976, s. 567.
- [30] Gordon L. M., Looney F. O., Curtain C. C., *J. Membr. Biol.* B4, B1 (1985).
- [31] Gordon L. M., Mobley P. W., „Membrane fluidity in biology”, t. 4 - „Cellular Aspects”. Eds C. Aloia, J. Boggs, New York 1985, s. 11.
- [32] Gordon L. M., Sauerheber R. O., *Biochim. Biophys. Acta*. 466, 34 (1977).
- [33] Gordon L. M., Sauerheber R. O., „The role calcium in biological system”, t. 2, Boca Raton: CRC Press, Inc. Floryda 1982, s. 3-16.
- [34] Gordon L. M., Sauerheber R. O., Esgate J. A., *J. Supramol. Structure*, 9, 299 (1978).
- [35] Gordon L. M., Sauerheber R. O., Esgate J. A., Oipple I., Murchmont R. J., Houslay M. D., *J. Biol. Chem.*, 255, 5419 (1980).
- [36] Grzeźlińska E., Bartkowiak A., Bartosz G., Leyko W., *Int. J. Radiat. Biol.*, 41, 473 (1982).
- [37] Grzeźlińska E., Bartosz G., Gwoździński K., Leyko W., *Int. J. Radiat. Biol.*, 36, 325 (1979).
- [38] Grzeźlińska E., Bartosz G., Leyko W., Chapman I. V., *Int. J. Radiat. Biol.*, 42, 45 (1982).
- [39] Guille J., Reason J. K., Gębicki J. M., *Free Rad. Biol. Med.*, 3, 147 (1987).
- [40] Gwoździński K., Bartosz G., *Zagad. Biof. Współcz.*, 3, 45 (1978).
- [41] Hubbell W., Mc Connell H. M., *J. Am. Chem. Soc.*, 93, 314 (1971).
- [42] Jain M. K., „Current topics in membranes and transport, t. 6, Acad. Press, New York 1975, s. 1-55.
- [43] Jain M. K., White H. B., „Advances in lipid research, t. 15, Acad. Press, New York 1977, s. 1-60.

- [44] Jost P. C., Griffith O. H., Ann NY Acad Sci., 348, 391 (1980).
- [45] Jost P. C., Griffith O. H., Capaldi R. A., Vanderkooi G., Proc. Natl Acad Sci USA, 70, 480 (1973).
- [46] Jost P., Nadakavukaren K. K., Griffith O. H., Biochemistry, 16, 3110 (1977).
- [47] Józwiak Z., Bartosz M., Leyko W., Stud. Biophys., 116, 27 (1986)
- [48] Józwiak Z., Pałecz D., Leyko W., Stud. Biophys., 120, 235 (1987).
- [49] Kang S. Y., Gutowski H. S., Hsung J. C., Jacobs R., King T. E., Rice D., Oldfield E., Biochemistry, 18, 3257-3267 (1979).
- [50] Karnowsky M. J., Kleinfeld A. M., Hoover R. L., Klavnsner R. D., J. Cell. Biol., 94, 1 (1982).
- [51] Keith A. D., Sharnoff M., Cohn G. E., Biochim Biophys. Acta, 300, 379 (1973).
- [52] Kotler M., Surewicz W. K., Stud. Biophys., 106, 79 (1985)
- [53] Lichtenstejn G., „Metod spinowych metok w molekularnoj biologii”, Nauka, Moskwa 1974.
- [54] Marsh D., Trends Biochem, 8, 330 (1983)
- [55] Minetti M., Cecarini M., Distasi A. M. M., J. Cell Biochem, 25, 73 (1984).
- [56] Morrisett J. D., Pownall H. J., Plumlee R. T., Smith L. C., Zehner E. Z., Esfahani M., Wakil S. J., J. Biol. Chem., 250, 6969 (1975).
- [57] Neal M. J., Butler K. W., Polnaszek C. F., Smith I. C. P., Mol. Pharmacol., 12, 144 (1976).
- [58] Ohnishi S., McConnell H. M., J Am Chem Soc., 87, 2293 (1965)
- [59] Oldfield E., Keough K. M., Chapman D., FEBS Let., 20, 344 (1972).
- [60] Polasek J., Jarolim P., Gen Physiol Biophys., 6, 425 (1987)
- [61] Popp-Snijders C., Schouten J. A., van Blitterswijk W. J., van der Veen E. A., Biochim Biophys. Acta, 854, 31 (1986)
- [62] Richter C., Chem., Phys. Lipid, 44, 175 (1987)
- [63] Sackmann E., Trauble H., Gallia H., Overath P., Biochemistry, 12, 5360 (1973).
- [64] Sanson A., Ptak M., Rigaud J. L., Gary-Bobo C. M., Chem. Phys Lipids, 17, 435 (1976).
- [65] Sauerheber R. D., Gordon L. M., Proc. Soc. Exp. Biol. Med., 150, 28 (1975)
- [66] Sauerheber R. D., Gordon L. M., Crosland R. D., Kuwahara M. O., J Membr Biol, 31, 131 (1977)
- [67] Sauerheber R. D., Zimmerman T. S., Esgate J. A., van der Laan W. P., Gordon L. M., J. Membr. Biol., 52, 201 (1980).
- [68] Schreier S., Polnaszek C. F., Smith I. C. P., Biochim Biophys. Acta, 515, 375 (1978).
- [69] Seelig J., J. Am. Chem. Soc., 92, 3881 (1970)
- [70] Stuhne-Sekalec L., Stancev N. Z., Can J. Biochem., 56, 943 (1978).
- [71] Surewicz K. W., Zagad. Biof Współcz., 3, 21 (1978).
- [72] Swift L. L., Atkinson J. B., Perkins R. C. J., Dalton L. R., Le Quire V. S., J Membr. Biol, 52, 165 (1980).
- [73] Verma S., Wallach D., Biochim Biophys. Acta, 382, 73 (1975).
- [74] Wallach D. F. H., Verma S. P., Weidekamm E., Bieri V., Biochim. Biophys Acta, 356, 68 (1974)

- [75] Wisniewski B J, Parkes J G, Huang Y O., Fox C. F., Proc Acad Sci. USA, 71, 4381 (1974).
- [76] Yamaguchi T., Fujita Y., Kuroki S, Ohtsuka E, Kimoto E., J. Biochem, 94, 377 (1983)
- [77] Yamaguchi T., Takehara H, Shibata E., Kimoto E, Biochim Biophys. Acta, 736, 150 (1983).
- [78] Yamaguchi T, Watanabe S, Kimoto E, Biochim Biophys Acta, 820, 157 (1985)
- [79] Yamamoto Y, Niki E Eguchi J., Biochim Biophys. Acta, 819, 29 (1985)

Maria Koter, Ewa Grzeleńska

INTERPRETATION OF SPIN LABELS SPECTRA APPLIED
FOR THE STUDY OF THE LIPID FLUIDITY

S u m m a r y

Spin labelling has become one of the most popular and valuable spectroscopic techniques used especially in membrane research. The electron paramagnetic resonance spectra EPR of nitroxide spin labels provided novel information about kinetic and structural properties of biological membranes as well as of model systems (phospholipid bilayers).

The article presents the methods of interpretation of EPR spectra of spin labelled membranes. We also discuss some limitations of this technique application for the study of biological membranes.

Dr MARIA KOTER
Dr EWA GRZELEŃSKA
Katedra Biofizyki
Uniwersytetu Łódzkiego
ul. Banacha 12/16
90-237 Łódź

Barbara Wachowicz

MOLEKULARNE MECHANIZMY PROCESU ATEROGENEZY

1 WSTĘP

Miażdżyca jest procesem patologicznym zachodzącym w tętnicach i prowadzącym do ogniskowego zgrubienia naczynia. Rozwija się niepostrzeżenie przez wiele lat. Najczęściej w stadium końcowym dochodzi przy udziale płytek krwi do powstania zakrzepu zamykającego światło naczynia. Prowadzi to do ostrych objawów klinicznych, m.in. zawału serca lub udaru mózgu. Zmiany miażdżycowe w ścianie tętnicy przedstawiono schematycznie na rys. 1.

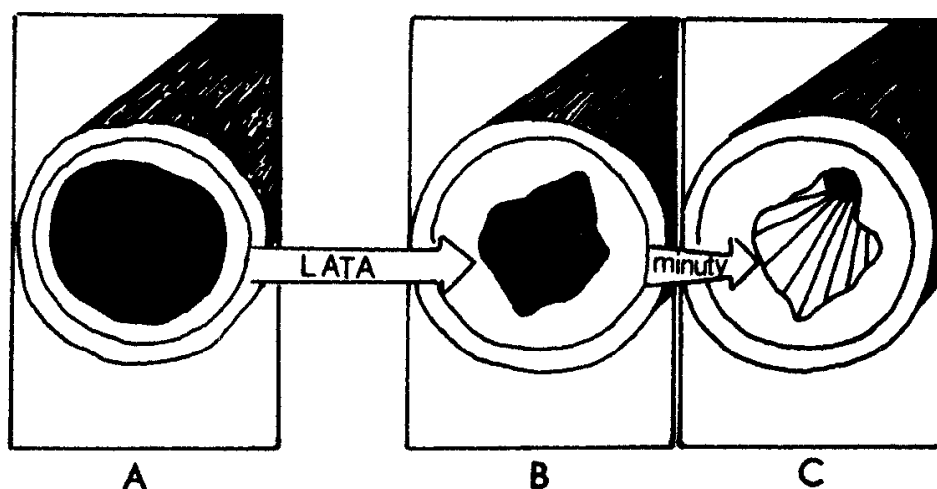
Patogenne mechanizmy prowadzące do powstawania zmian miażdżycowych w ścianie naczynia krwionośnego są bardzo złożone i nie są całkowicie wyjaśnione. Prace badawcze nad patogenezą miażdżycy prowadzone w wielu ośrodkach obejmują badania epidemiologiczne i podstawowe. Te pierwsze wykrywają i ustalają czynniki zwiększające zagrożenie chorobą miażdżycową i jej komplikacjami. Badania podstawowe prowadzone na zwierzętach doświadczalnych i wykorzystujące hodowle kultur komórkowych mają na celu poznanie procesów biochemicznych zachodzących w ścianie naczynia krwionośnego.

Do podstawowych czynników ryzyka zalicza się m.in. zaawansowany wiek, hipercholesterolemię, nadciśnienie tętnicze, cukrzycę, palenie tytoniu i otyłość.

W powstawaniu zmian chorobowych w ścianie tętnic istotną rolę odgrywają następujące procesy

- uszkodzenie czy też naruszenie integralności śródbłonna naczynia,
- migracja monocytów i komórek mięśni gładkich do błony wewnętrznej naczynia,
- proliferacja migrujących komórek mięśni gładkich naczynia,
- intensywna synteza substancji międzykomórkowej włókien kolagenowych i proteoglikanów,
- gromadzenie się lipidów

Lipidy, a przede wszystkim cholesterol transportowany w formie lipoprotein osocza (frakcja LDL) jest odkładany nie tylko w syntetyzowanej substancji międzykomórkowej, ale także w makrofagach i komórkach mięśni gładkich naczynia, przyczyniając się do zgrubienia tętnic [39].



Rys. 1. Uproszczony schemat powstawania zmian miażdżycowych w ścianie tętnicy A - przekrój tętnicy zdrowej, B - przekrój tętnicy zmienionej miażdżycowo (zmniejszone światło naczynia), C - komplikacje spowodowane zakrzepem utworzonym w miejscu zmian miażdżycowych

Istnieje wiele hipotez próbujących wyjaśnić patogenezę miażdżycy. Najnowsze poglądy na etiologię tej choroby zostały przedstawione w opublikowanych pracach [B, 26]. Najbardziej popularnymi obecnie hipotezami są: hipoteza odpowiedzi na uraz naczynia, hipoteza lipidowa, zakrzepowa [26], prostacyklinowa [16] i hipoteza monoklonalna B e n d i t t a [2]. Wszystkie one nie wykluczają się wzajemnie, a właściwie uzupełniają

Na szczególną uwagę zasługuje hipoteza odpowiedzi na uraz naczynia w ujęciu R o s s a, dokumentująca początkowe stadia powstawania zmian miażdżycowych [29-32] w wyniku uszkodzenia śródbłonna naczynia. Uwzględnia ona w aterogenezie udział komórek ściany naczynia - śródbłonna i miocytów - oraz komórek i składników krwi - płytek krwi, monocytów, lipoprotein. Hipoteza przedstawiona przez R o s s a podkreśla istotną rolę uszkodzenia śródbłonna naczynia i aktywację płytek krwi w inicjowaniu patogenezy miażdżycy.

2. PŁYTKI KRWI I ŚRÓDBŁONEK NACZYNIA

Płytki krwi są najmniejszymi elementami morfotycznymi krwi. Nie posiadają jądra. W ich cytoplazmie znajdują się liczne ziarnistości typu alfa i ziarnistości o dużej gęstości elektronowej. Ziarnistości alfa są wyspecjalizowane w gromadzeniu białek podobnych do białek osoczowych (fibrynogen, fibronektyna, albumina, czynniki osoczowe V i VIII) oraz specyficznych białek płytki, do których zalicza się trombospondynę, β -tromboglobulinę, antyheparynowy czynnik płytkowy PF₄

oraz płytkowy czynnik wzrostowy PDGF (platelet-derived growth factor). Pod wpływem wielu czynników fizjologicznych, a zwłaszcza pod wpływem kolagenu, trombiny, ADP, tromboksanu A_2 (TxA_2) i czynnika PAF (platelet aggregating factor) dochodzi do pobudzenia i aktywacji płytek krwi. Aktywacja płytek krwi odgrywa bardzo ważną rolę w inicjowaniu i tworzeniu zmian miażdżycowych w ścianie naczynia [6, 7, 22, 30, 33, 35, 44]. Pobudzone płytki krwi przylegają do „obcych” powierzchni, zmieniają kształt, uwalniają zmagazynowane w ziarnistościach związki. Na ich powierzchni zostają wyeksponowane receptory dla fibrynogenu, co umożliwia tworzenie agregatów płytkowych. W stymulowanych i pobudzonych płytkach, kiedy wzrasta stężenie jonów wapniowych, podnosi się aktywność fosfolipaz, dochodzi do uwalniania z fosfolipidów błony płytkowej kwasu arachidonowego, który zostaje utleniony przy udziale cyklooksygenazy do tromboksanu A_2 i innych prostanoidów. Tę przemianę określa się jako kaskadę kwasu arachidonowego [45, 46].

Według hipotezy Rossa [29-32], w zapoczątkowaniu procesu miażdżycowego istotną rolę odgrywa uszkodzenie śródbłonna - komórek, które tworzą ciągłą, jednowarstwową integralną wyściółkę naczynia krwionośnego, stanowiąc barierę oddzielającą naczynie od przepływającej krwi. Można przypuszczać, że miejscowe upośledzenie funkcji komórek śródbłonna inicjuje rozwój choroby. Uszkodzenie czy też usunięcie komórek śródbłonna i odsłonięcie włókien kolagenowych znajdujących się w warstwie subendotelialnej naczynia jest czynnikiem powodującym aktywację płytek krwi. Płytki krwi ulegają adhezji w miejscu uszkodzenia śródbłonna, tworzą agregaty przyścienne. W tych miejscach mogą nawet powstawać zakrzepy z udziałem fibryny. Aktywacja płytek krwi pod wpływem kolagenu czy też ADP pochodzącego z uszkodzonych komórek prowadzi również do sekrecji wielu aktywnych związków zmagazynowanych w ziarnistościach płytki, a także do stymulacji przemiany kwasu arachidonowego i wytworzenia TxA_2 - czynnika wzmagającego rozmiar agregatów płytkowych i powodującego skurcz naczynia [43]. Z płytek uwalniają się czynniki chemotaktyczne dla leukocytów oraz PDGF - czynnik wzrostowy powodujący migrację miocytów do warstwy wewnętrznej naczynia i odgrywający rolę w proliferacji tych komórek [17]. Uszkodzenie śródbłonna i odsłonięcie warstwy subendotelialnej ułatwia migrację monocytów/makrofagów do błony wewnętrznej naczynia. Pod wpływem PDGF, a także przy współdziałaniu czynników wzrostowych, pochodzących ze śródbłonna - EGF (endothelial growth factor) i makrofagów - MGF (macrophag growth factor) [10], następuje migracja miocytów do błony wewnętrznej naczynia, gdzie zachodzi ich proliferacja połączona z syntezą białek i glikozoaminoglikanów [21, 22, 30]. Zmieniony śródbłonek ułatwia transport lipoprotein do błony wewnętrznej. Tam zachodzi akumulacja lipidów i cholesterolu, zarówno w komórkach (makrofagi, miocyty), które obciążone lipidami przekształcają się w tzw. komórki piankowate, jak i w substancji międzykomórkowej. Ross [29] uważa, że jeżeli uraz jest niewielki i czynnik uszka-

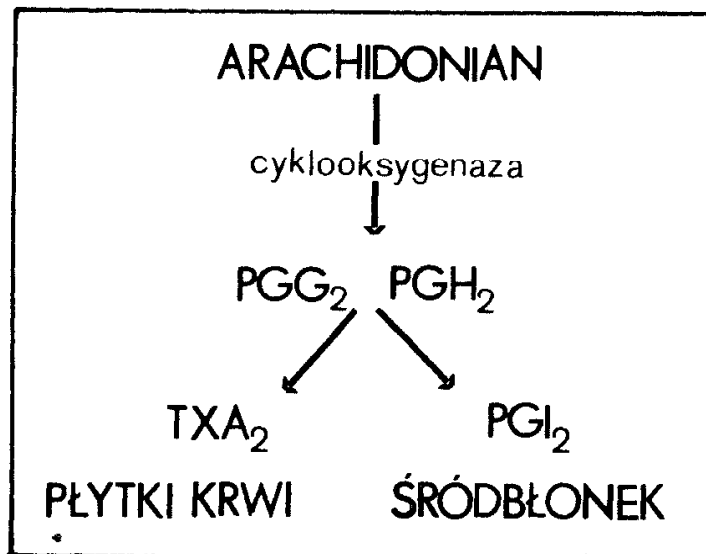
dzający zostanie usunięty, zmiany miażdżycowe mogą być cofnięte i integralność ściany tętniczej może być zachowana. Przy stałej obecności czynnika uszkodzającego i jego długotrwałym, chronicznym działaniu nie obserwuje się procesu regresji, natomiast dochodzi do umocnienia (zwapnienia) powstałych złogów miażdżycowych. Prowadzi to do zgrubienia błony wewnętrznej naczynia i tym samym do zmniejszenia światła tętnicy. Przepływ krwi w tych miejscach jest utrudniony. Przy zmienionej miażdżycowo powierzchni mogą powstawać agregaty płytkowe i zakrzepy zamykające całkowicie światło tętnicy.

Uszkodzenie śródbłonna może być spowodowane zarówno działaniem czynników mechanicznych (np. siłami hemodynamicznymi krwi, nadciśnieniem tętniczym), jak też chemicznych, takich jak hipercholesterolemia, obecność homocysteiny czy toksyn we krwi [15, 29, 32]. Większość czynników zwiększających ryzyko choroby miażdżycowej powoduje zmiany w śródbłonie naczynia krwionośnego. Uszkodzenie śródbłonna jest bezpośrednią przyczyną aktywacji płytek krwi. Śródbłonek kontroluje mechanizmy zapobiegające agregacji tych komórek [1, 5, 24]. Jednym z najważniejszych mechanizmów zabezpieczającym płytki krwi przed aktywacją jest kaskadowa przemiana arachidonianu w komórkach śródbłonna i wytwarzanie prostacykliny PGI_2 [5, 16]. W 1976 r. Bunting i współprac. [5] odkryli, że PGH_2 jest enzymatycznie transformowany przez śródbłonek naczyniowy do substancji (prostacyklina, PGI_2) hamującej agregację płytek krwi i działającej rozkurczowo na tętnice. Mechanizm działania PGI_2 polega na aktywacji cyklicznej adenylowej w płytkach krwi. Nagromadzenie się cAMP w płytkach krwi hamuje ich agregację i sekrecję [16].

Równowaga między tworzeniem się tromboksanu A_2 i prostacykliny w układzie krążenia została hipotetycznie uznana za zasadniczy mechanizm homeostatyczny współdziałania płytek krwi i śródbłonna naczynia. Syntetaza prostacykliny - enzym przekształcający PGH_2 w PGI_2 - jest oporna na działanie wielu związków. Bardzo silnymi wybiórczymi jej inhibitorami są nadtlenki lipidów. Niedobór PGI_2 powstający wskutek zatrucia nadtlenkami lipidów uznano za główny mechanizm powodujący rozwój miażdżycy [16, 18, 41]. Tworzenie nadtlenków lipidów zachodzi spontanicznie i nieenzymatycznie w osoczu, w obecności tlenu cząsteczkowego i jonów metali działających jako katalizator reakcji. Witamina E jako silny antyoksydant może spełniać rolę ochronną i zabezpieczać przed powstawaniem nadtlenków lipidów.

W śródbłonie, oprócz PGI_2 , powstaje czynnik EDRF (Endothelial-Derived Relaxant Factor) w wyniku utleniania kwasu arachidonowego przy udziale lipooksygenazy. Czynniki te wykazują silne działanie antyagregacyjne poprzez stymulację syntezy cGMP [1].

Śródbłonek reguluje również poziom czynnika PAF (1-O-alkilo-2-acetylo-sn-glicerylo-3-fosfocholiny) w układzie naczyniowym, biorąc udział w deacylacji PAF i tworzeniu lizo-PAF [4].



Rys. 2. Schemat przemiany arachidonianu w płytkach krwi i w ścianie naczynia krwionośnego
 PGG_2 , PGH_2 - nadtlarki prostaglandyn, PGI_2 - prostacyklina, TXA_2 - tromboksan A_2

3. BARIERA ŚRÓDBŁONKOWA DLA LIPOPROTEIN OSOCZA

Jest faktem bezspornym, że ogniskowe gromadzenie się lipidów w ścianie tętnic jest uważane za główny czynnik w etiopatogenezie miażdżycy. Transport lipidów i cholesterolu przez barierę śródbłonkową od dawna budzi zainteresowanie badaczy.

Formą transportującą lipidy i cholesterol w osoczu są lipoproteiny. Wyróżnia się 4 podstawowe frakcje lipoproteinowe krążące w osoczu: HDL, LDL, VLDL i chylomikrony. Ich pełną nazwę i skład podano w tab. 1 [23]. W patogenezie miażdżycy istotną rolę odgrywa frakcja LDL, a w szczególności stosunek ilościowy estrów cholesterolu w lipoproteinach LDL/HDL, a nie stężenie wolnego cholesterolu.

Istnieją dowody na to, że cząsteczki lipoprotein przechodzą przez nieuszkodzony śródbłonek drogą diacytozy, czyli transcytozy. Znakowane lipoproteiny są transportowane przez śródbłonek aorty szczura w pinosomach o średnicy 75 nm. Odległości między komórkami śródbłonka są zazwyczaj nie większe niż 2 nm i mogą się zwiększać przy rozkurczu naczynia. Dlatego też nie wyklucza się możliwości przechodzenia lipoprotein między komórkami [20]. Przy uszkodzeniu śródbłonka, np. w chronicznej hipercholesterolemii czy też w obszarze urazu hemodynamicznego, cząsteczki lipoprotein mogą przechodzić między komórkami śródbłonka [34]. Rozmiar uszkodzenia śródbłonka jest trudny do oceny. Usunięcie kwasu sjałowego z powierzchni komórek śródbłonka, które nie powoduje dostrzegalnych mikroskopowo zmian morfologicznych, przyczynia się do 20-krotnego wzrostu endocytozy cząsteczek LDL [14].

T a b e l a 1

Właściwości i skład lipoprotein osocza

Fracja	Chylomikrony	Lipoproteiny		
		o bardzo małej gęstości	o małej gęstości	o dużej gęstości
Skrót	-	VLDL	LDL	HDL
Gęstość	0,94	0,94-1,006	1,006-1,063	1,063-1,21
Białko	1-2%	5-10%	20-24%	45-50%
Lipidy	98-99%	89-94%	75-80%	50-55%
fosfolipidy	3-8%	12-18%	20-25%	20-30%
trójglicerydy	86-94%	55-65%	8-12%	3-6%
estry cholesterolu	1-3%	12-14%	35-40%	14-18%
cholesterol	0,5-1%	6-8%	5-10%	3-5%

Komórki śródbłonna naczyniowego mają na swej powierzchni specyficzne receptory dla cząsteczek LDL i mogą włączać i degradować cząsteczki LDL, zarówno przy udziale mechanizmu receptorowego jak i drogą płynnej endocytozy [20].

Śródbłonek odgrywa ważną rolę w katabolizowaniu cząsteczek LDL, gdyż modyfikuje je i przekształca w nową formę lipoprotein [27], która jest degradowana przez komórki naczyń i makrofagi 3-10 razy szybciej niż natywna cząsteczka LDL [25]. Biologiczna modyfikacja cząsteczek LDL przez śródbłonek ułatwia gromadzenie i odkładanie lipidów i cholesterolu w ścianie naczyń [39, 42]. Modyfikacja cząsteczek LDL zachodząca pod wpływem komórek śródbłonna polega na zmianie ich ruchliwości elektroforetycznej, wzroście ładunku ujemnego, spadku gęstości, zmniejszeniu ilości fosfolipidów korelującej ze wzrostem aktywności fosfolipazy A₂ i tworzeniem nadtlenków lipidów [25, 40, 42]. W obecności śródbłonna naczyniowego zachodzi fragmentacja apoproteiny B w cząsteczce LDL. Znaczenie modyfikacji cząsteczek LDL *in vivo* nie jest wyjaśnione. Nie stwierdzono obecności tak zmienionych cząsteczek LDL w osoczu, natomiast wykazano ich obecność w złogach miażdżycowych i w miejscach procesów zapalnych. Modyfikacja cząsteczki LDL powoduje zwiększone łączenie się tak zmienionych cząsteczek LDL z receptorami na powierzchni makrofagów, internalizację, a następnie ich degradację przez makrofagi, które przekształcają się w komórki piankowe. Proces ten zachodzi przy udziale specyficznych receptorów obecnych na makrofagach i rozpoznających zmodyfikowaną, tzw. EC-LDL, cząsteczkę LDL [42]. Dlatego też uważa się, że biologicznie zmodyfikowana cząsteczka LDL może uczestniczyć w odkładaniu cholesterolu w ścianie naczyń.

W modyfikacji cząsteczek LDL biorą udział wolne rodniki: anionorodnik nadadtlenkowy, rodnik hydroksylowy i tlen singletowy [18]. H e n r i k s o n i współpr.

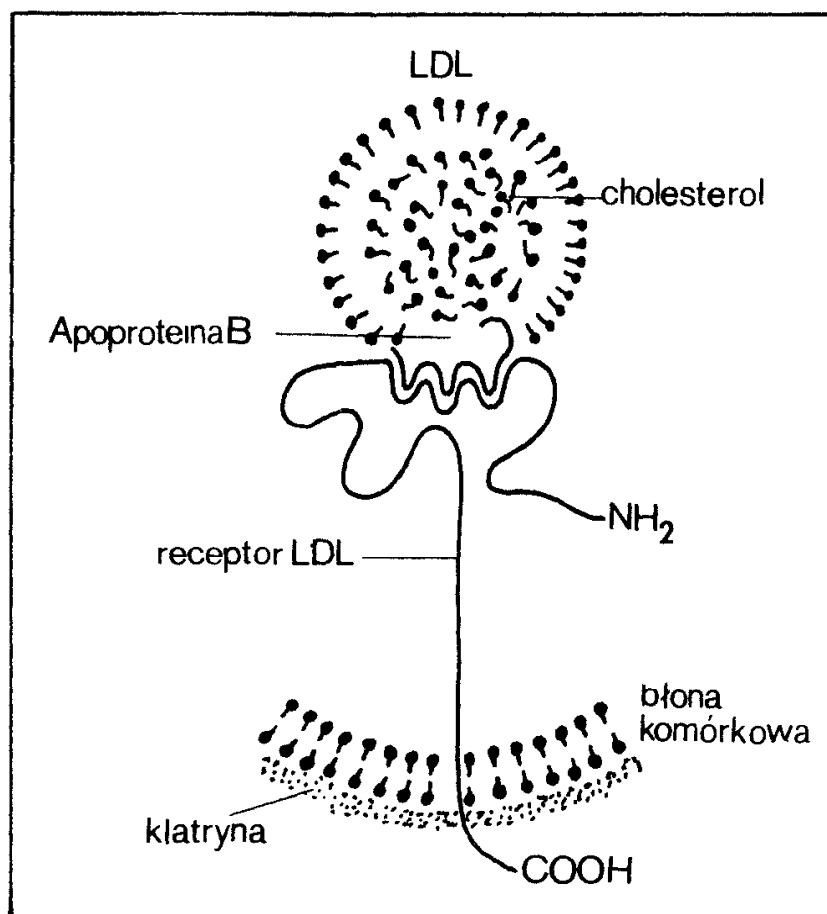
[18] stwierdzili w aorcie zmienionej miażdżycowo podwyższoną aktywność dysmutazy ponadtlenkowej. Wskazywać by to mogło na istnienie obronnego mechanizmu przeciw wzrastającemu w ścianie naczynia poziomowi wolnych rodników. Van Hinnsebergh i współpr. [42] uważają, że w modyfikowaniu cząsteczek LDL czynnikiem inicjującym jest oksydacja wielonienasyconych kwasów tłuszczowych. Ich rozpad prowadzi do powstawania aldehydów, a przede wszystkim dialdehydu malonowego (30 pmol/ μ g białka LDL), który silnie modyfikuje cząsteczkę LDL. Pewną rolę w modyfikowaniu cząsteczek LDL może odgrywać dialdehyd malonowy pochodzący z przemiany arachidonianu płytek krwi [29]. Przed modyfikacją lipoprotein chronią antyoksydanty obecne w osoczu; reagują one bezpośrednio z nadtlenkami lipidów. Do antyoksydantów zalicza się m.in. witaminę E i butylohydroksytoluen. Przed peroksydacją LDL zabezpiecza również histydyna, która jest zmiataczem tlenu singletowego.

Modyfikacja cząsteczek LDL jest hamowana w obecności lipoprotein frakcji HDL, które stymulują syntezę prostacykliny [42]. Wysoki poziom HDL jest ujemnym czynnikiem ryzyka zmian miażdżycowych. Jest odpowiedzialny za zwrotny transport cholesterolu do wątroby.

4. RECEPTOROWO-ZALEŻNY METABOLIZM CHOLESTEROLU

W komórkach ssaków istnieje autoregulowany mechanizm przyswajania cholesterolu, polegający na regulowanym procesie włączania cząsteczki LDL przy udziale powierzchniowych receptorów, a następnie degradowaniu tej cząsteczki przez określone enzymy. Mechanizm tych przemian został przedstawiony przez Goldstein a i Brown a [13]. Za badania nad receptorowo-zależnym metabolizmem cholesterolu i rolę lipoprotein w etiopatogenezie miażdżycy badacze ci w 1985 r. otrzymali nagrodę Nobla w dziedzinie medycyny i fizjologii.

Cząsteczka LDL wiąże się ze specyficznym receptorem o wysokim powinowactwie do LDL znajdującym się na powierzchni komórki. Rolę receptora pełni glikoproteina o masie cząsteczkowej 164 tys. Receptor zawiera 5 domen strukturalnych, z których 3 znajdują się po zewnętrznej stronie błony komórkowej. Za wiązanie z receptorem jest odpowiedzialny region apoproteiny B cząsteczki LDL, bogaty w lizynę i argininę. Obecność reszt lizyny i argininy warunkuje oddziaływanie elektrostatyczne między ujemnie naładowanym regionem receptora a dodatnio naładowaną apoproteiną. Miejsce wiązania cząsteczki LDL jest zlokalizowane po stronie zewnętrznej błony komórkowej. Po przyłączeniu się LDL do receptora, cząsteczka przechodzi do „dołeczków” - wgłębień okrytych białkiem klatryną, zostaje opłaszczona i tworzy pęcherzyk. Pęcherzyk przemieszcza się do pierwotnego lizosomu, zlewa się z nim i tworzy wtórny lizosom. Receptory oddzielone od cząsteczki LDL wracają do powierzchni. Ten etap określa się nazwą recyklicacji receptorów. W lizosomie zachodzi degradacja apoproteiny B do aminokwasów usuwanych poza komórkę oraz degradacja li-



Rys. 3. Schemat budowy cząsteczki LDL i oddziaływania jej z receptorem znajdującym się na powierzchni komórki

Cząsteczka LDL obciążona cholesterolem jest rozpoznawana przez specyficzny receptor o dużym powinowactwie do LDL, znajdujący się na powierzchni komórki. Interakcja LDL - receptor zachodzi dzięki oddziaływaniu elektrostatycznemu między częścią białkową (apoproteina B) cząsteczki LDL a N-końcowym regionem receptora

pidów. Powstaje m.in. wolny cholesterol, który po opuszczeniu lizosomu przedostaje się do cytoplazmy. Wykorzystanie cholesterolu przez komórkę zależy od rodzaju komórki i od zapotrzebowania. Wszystkie komórki włączają cholesterol do nowosyntetyzowanych błon. W wyspecjalizowanych komórkach cholesterol pochodzący z LDL spełnia inną rolę - jest np. przekształcony w kwasy żółciowe czy hormony steroidowe.

Ilość wolnego cholesterolu w cytoplazmie komórki, pochodząca z LDL, kontroluje i stabilizuje poziom wewnątrzkomórkowego cholesterolu poprzez uruchomienie 3 procesów:

- 1) ogranicza zdolność komórki do syntezy własnego cholesterolu przez hamowa-

nie aktywności reduktazy 3-hydroksy-3-metyloglutarylo CoA (HMGCoA-reduktaza), enzymu katalizującego biosyntezę de novo cholesterolu,

2) aktywuje enzym acylo CoA-cholesterol-acylotransferazę (ACAT) katalizującą tworzenie estrów cholesterolu jako formy magazynowania nadmiaru cholesterolu,

3) hamuje na zasadzie ujemnego sprzężenia zwrotnego syntezę nowych receptorów dla cząsteczek LDL na powierzchni komórki [11-13].

Liczba czynnych receptorów na błonie komórki kształtuje się w zależności od zapotrzebowania na cholesterol i od stężenia frakcji LDL w środowisku komórki. Komórki są w stanie regulować sobie liczbę receptorów na powierzchni. Przy braku egzogenego LDL liczba receptorów na powierzchni wzrasta.

Receptory dla cząsteczek LDL odgrywają bardzo ważną rolę w zachowaniu ustrojowej homeostazy cholesterolu. W nieobecności receptora, przy braku genu odpowiedzialnego za syntezę prawidłowych receptorów dla cząsteczek LDL, co ma miejsce w rodzinnej hipercholesterolemii, obserwuje się zaburzenia metabolizmu lipidowego. W rodzinnej hipercholesterolemii obserwuje się wysoki poziom cholesterolu w osoczu (frakcja LDL) i zaawansowaną, przedwczesną miażdżycę nawet w pierwszej dekadzie życia. U homozygot powikłania prowadzą nawet do śmierci [11, 13]. U heterozygot z rodzinną hipercholesterolemią występują mniej nasilone objawy kliniczne, co jest uzależnione od zmniejszonej liczby receptorów, a tym samym zmniejszonej internalizacji i degradacji cząsteczek LDL [11, 13].

Do badań nad rolą receptorów dla LDL w rozwoju miażdżycy wykorzystuje się króliki z wrodzoną hipercholesterolemią, tzw. króliki W a t a n a b e, [28, 36, 47, 48], ale nie szczury, u których nie obserwuje się tych zaburzeń metabolizmu cholesterolu [3].

Całkowity ustrojowy katabolizm lipoprotein frakcji LDL jest zależny zarówno od receptorów o wysokim powinowactwie do LDL, jak i od drogi niezależnej od receptorów - drogi endocytozy. Zablokowanie drogi zależnej od receptorów można wywołać chemiczną modyfikacją łańcucha apoproteiny B, np. acetylacją czy metylacją reszt lizyny [36-39]. Śródbłonek, który nie gromadzi cholesterolu i jest wyspecjalizowany w transcytozie cząsteczek LDL, może również degradować w niewielkim stopniu cząsteczki LDL przy udziale receptorów dla LDL. Jego istotną funkcją wydaje się być modyfikacja cząsteczek LDL umożliwiająca internalizację i degradację cząsteczek LDL przez makrofagi posiadające specyficzne receptory rozpoznające zmodyfikowane cząsteczki LDL [27, 29, 42].

Złożona budowa receptora dla cząsteczki LDL i dalsze, skomplikowane losy w komórce powodują, że możliwość mutacji uszkadzających funkcjonowanie jest duża.

Oznaczanie liczby receptorów dla LDL w celach diagnostycznych wykonuje się w limfocytach krwi obwodowej i w hodowlach fibroblastów skóry. Przy niedoborze receptorów poziom LDL w osoczu jest wysoki i wpływa to niekorzystnie na ścianę naczyń krwionośnych.

Teoria receptorowa przedstawiona przez Brown a i Goldsteina zakłada, że większość przypadków miażdżycy w głównej populacji jest spowodowana przez niebezpiecznie wysoki poziom LDL we krwi, wynikający z wady czy też produkcji niewystarczającej liczby receptorów dla LDL. Subtelne czynniki genetyczne czy też środowiskowe (w tym również dieta) mogą wpływać na nieadekwatną liczbę receptorów dla LDL

5. ZAKOŃCZENIE

Miażdżycę zalicza się do metabolicznych chorób cywilizacyjnych. Zmiany miażdżycowe wykryto nawet w tętnicach mumii egipskich, dlatego też można uważać, że na miażdżycę chorowano już w starożytności. Wydaje się jednak, że w czasach, kiedy średnia życia nie przekraczała 30 lat, choroba ta nie stanowiła takiego zagrożenia jak obecnie.

Chociaż przyczyny rozwoju miażdżycy pozostają nadal nie w pełni wyjaśnione, znane są jednak podstawowe czynniki ryzyka tej choroby, co umożliwia i interwencję i działania profilaktyczne. Istotną rolę w profilaktyce odgrywa właściwa dieta ograniczająca spożywanie tłuszczu zwierzęcego, a tym samym cholesterolu i nasyconych kwasów tłuszczowych. Dieta bogata w cholesterol powoduje spadek liczby komórkowych receptorów dla LDL, podwyższa poziom LDL i cholesterolu w osoczu oraz prowadzi do niekorzystnych zmian w ścianie naczyń. Kwasy tłuszczowe spożywane z pokarmem mogą mieć wpływ na zaburzenie równowagi między biosyntezą prostacykliny a TXA_2 [9]. Kwas linolowy pochodzący z tłuszczu roślinnego jest prekursorem kwasu dihomu γ -linolenowego i arachidonowego, zmniejszającym aktywność płytek krwi. Spożywanie ryb dostarcza natomiast kwasu eikozopentaenowego (EPA), który przekształca się do PGI_3 i TXA_3 [19]. Ten ostatni w porównaniu z TXA_2 jest słabszym czynnikiem agregującym przy tym samym działaniu i aktywności PGI_3 i może decydować o przewadze właściwości antyagregujących płytki krwi. Wzrastające wraz z wiekiem ryzyko choroby miażdżycowej może być uzależnione również od zmiany aktywności syntetazy prostacyklinowej. Zarówno w miażdżycy ludzi, jak też i w miażdżycy doświadczalnej wywołanej u zwierząt obserwuje się zahamowanie tworzenia prostacykliny uzależnione od szkodliwego działania nadtlenuków lipidów na syntetazę prostacykliny. Witamina E stosowana jako antyoksydant hamuje powstawanie nadtlenuków lipidów i zabezpiecza utrzymanie stałego poziomu produkcji PGI_2 . Syntezę PGI_2 w płucach wzmacnia aktywność ruchowa, która jest zaliczana do jedynego ujemnego czynnika ryzyka w miażdżycy.

Maszynopis wpłynął do Redakcji 21 I 1988

LITERATURA

- [1] Azuman H, Ishikawa M., Sekizaki S., Br. J. Pharm., 88, 411 (1986)
- [2] Benditt E P, Benditt J. M., Proc Natl Acad. Sci., 70, 1753 (1973).
- [3] Bhattacharya S, Balasubramaniam S, Simons L A., Biochem J., 234, 493 (1986).
- [4] Blank M L, Spector A. A., Kaduce T L., Lee T, Snyder F., Biochim. Biophys. Acta, 876, 373 (1986)
- [5] Bunting S., Gryglewski R., Moncada S, Vane J R., Prostaglandins, 12, 897 (1976).
- [6] Clair R. W. S., Progress in Cardiovascular Dis., 26, 109 (1983).
- [7] Conard J, Samama M. M., Sem. Thromb Hem. 12, 87 (1986)
- [8] Dembińska-Kieć A, [w] „Prostaglandyny i inne eikozanoidy”, red B Zaorska, PZWL, Warszawa 1986, s 208
- [9] Fitzgerald G. A., Smith B., Pedersen A. K., Brash A. R., N Engl J. Med., 310, 1065 (1984)
- [10] Gajdusek C, DiGorlato P, Ross R, Schwartz S, J Cell Biol., 85, 467 (1980).
- [11] Goldstein J L., Science, 191, 150 (1976).
- [12] Goldstein J. L., Anderson R G. W., Brown M. S., Nature, 279, 679 (1979).
- [13] Goldstein J. L., Brown M. S., Ann Rev. Biochem., 46, 897 (1977).
- [14] Gore P, Born G. V R., Atherosclerosis, 57, 33 (1982).
- [15] Gore P., Shafi S, Br J Exp Pharm., 63, 447 (1982)
- [16] Gryglewski J. R., Trends Pharmacol. Sci, 1, 164 (1980).
- [17] Habenicht A J R, Dresel H. A., Goerig M., Weber J. A., Stoehr M, Glomset J A, Ross R, Schettler G, Proc Natl. Acad. Sci USA, 83, 1344 (1986).
- [18] Henriksson P, Bergstrom K., Edhag O, Thromb. Res., 38, 195 (1985).
- [19] Knapp H. R., Reill I. A G., Alessandrini P., Fitzgerald G. A., N. Engl. J. Med., 314, 937 (1986).
- [20] Leake D. S., Bowyer D. E., Exp Mol. Pathol., 35, 84 (1981).
- [21] Majack R A., Cook S. C., Bornstein P., J. Cell Biol., 101, 1059 (1985).
- [22] Mustard J. F., Kinlough-Rathbone R. L., Packham M A., Prostaglandin, thromboxane Leukotriene Res, 13, 235 (1985).
- [23] Myant N B., Clin. Science, 62, 261 (1982).
- [24] Papp A. C, Crowe L., Pettigre W. C., Wu K. K, Thrombos Res, 42, 549 (1986).
- [25] Parthasarathy S., Steinbrecher H. S, Barnett J., Witztum J. L., Steinberg D., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 82, 3000 (1985).
- [26] Piróg K. E., Post. Biol Kom., 12, 163 (1985)
- [27] Pitas R E., Boyles J, Mahley R. W., Bissell D. M., J. Cell. Biol., 100, 103 (1985).
- [28] Pittman R. C., Carew T. E., Attie A. D., Witztum J. L., Watanabe Y., Steinberg D., J. Biol. Chem., 257, 7994 (1982).
- [29] Ross R., Harker L., Nature, 215, 934 (1976).
- [30] Ross R., J. Cardiovasc. Pharmacol., 7, S186 (1985).
- [31] Ross R., Glomset J. A., N. Eng. J. Med., 295, 369 (1976).
- [32] Ross R., Harker L., Nature, 215, 934 (1976).
- [33] Shmulewitz A., Brock J. G., Aviram M., Biochem. J., 224, 13 (1984).
- [34] Simionescu N., Simionescu M., Palade F. E., Ann. N.Y. Acad. Sci., 275, 64 (1976).

- [35] Sinzinger H, Sem. Thrombos. Hemostas, 12, 124 (1986).
- [36] Slater H. R., McKinney L., Packard C. J., Shepherd J, Arteriosclerosis, 4, 604 (1984).
- [37] Slater H. R., McKinney L., Shepherd J, Packard C. J., Biochim. Biophys. Acta, 792, 318 (1984).
- [38] Slater H. R., Shepherd J., Packard C. J., Biochim. Biophys Acta, 713, 435 (1982)
- [39] Steinberg D, Arteriosclerosis, 3, 283 (1983).
- [40] Steinbrecher U. P., Parthasarathy S., Leake D. S., Witztum J. L., Steinberg D., Proc. Natl Acad Sci USA, 81, 3883 (1984).
- [41] Szczekliak A, Gryglewski R. J., Artery, 7, 488 (1980)
- [42] Van Hinsbergh V W. M., Scheffer M, Havekes L, Kempen H. J. M., Biochim. Biophys. Acta, 878, 49 (1986).
- [43] Verstraete M., Dejana E., Fuster V., Lapetina E., Moncada S., Mustard J F, Tans G, Vargafitig B. B., Haemostasis, 15, 89 (1985).
- [44] Wachowicz B, Post. Biol. Kom., 5, 109 (1978)
- [45] Wachowicz B., Krajewski T, Acta Univ. Lodz., Folia Bioch Biophys., 5, 133 (1986)
- [46] Wachowicz B, Krajewski T, Post. Hig. Med Dośw., 33, 377 (1979).
- [47] Watanabe Y., Arteriosclerosis, 36, 261 (1980).
- [48] Wiklund O., Carew T. E., Steinberg D., Arteriosclerosis, 5, 135 (1985)

Barbara Wachowicz

MOLECULAR MECHANISMS OF ATHEROGENESIS

. Summary

Recent views and concepts on the molecular processes occurring in the vessel walls during atherogenesis are presented. Attention is called to the role of blood platelet activation, endothelium injury and transport of low density lipoprotein (LDL) into vessel wall in the development of the atherosclerotic lesions. The significance of endothelium as well in the inhibition of blood platelet activation (prostacyclin PGI₂) as in the modification of low density lipoproteins is discussed.

Doc. dr hab. BARBARA WACHOWICZ
Instytut Biochemii Ogólnej
Instytut Biochemii
Uniwersytetu Łódzkiego
ul. Banacha 12/16
90-237 Łódź

**Państwowe Wydawnictwo Naukowe
Oddział w Łodzi 1989**

Wydanie I Nakład 500+90 egz Ark. wyd 9,75 Ark. druk. 8,50
Papier offset. kl. III 80 g. 70×100 Oddano do składania w grudniu 1988 r.
Podpisano do druku w październiku 1989 r. Druk ukończono w listopadzie 1989 r.
Zam 857/88 S 3

**Zakład Graficzny Wydawnictw Naukowych
Łódź ul Zwirki 2**