

RENATA JASIŃSKA

Zakład Biochemii Komórki

Instytut Biologii Doświadczalnej im. M. Nenckiego PAN,

Pasteura 3, 02-093 Warszawa

E-mail: reja@nencki.gov.pl

UJEMNIE NAŁADOWANE FOSFOLIPIDY — BŁONOWE SENSORY KATIONÓW

KLASY FOSFOLIPIDÓW UJEMNIE NAŁADOWANYCH W WARUNKACH FIZJOLOGICZNEGO pH — ICH SPECYFICZNA LOKALIZACJA W BŁONACH

Wśród klas błonowych fosfolipidów (PL), obok dominujących pod względem ilości fosfatydylocholiny (PC) i fosfatydyloetanolaminy (PE), które są jonami dwubiegunowymi (obojnaczymi), należy wyróżnić te, które w fizjologicznym zakresie pH (około 7) charakteryzują się ujemnym ładunkiem polarnej głowy. Są to kwas fosfatydowy (PA), fosfatydyloglicerol (PG), kardiolipina (CL), fosfatydyloinozytol (PI) i jego ufosforylowane pochodne (PIP, PIP2) oraz fosfa-

tydyloseryna (PS). W tej ostatniej cząsteczce wypadkowy ładunek ujemny nadaje jej grupa karboksylowa (stałe dysocjacji grupy fosforanowej, α -aminowej i karboksylowej wynoszą odpowiednio 2, 10 i 3). Rozmieszczenie oraz ilości wymienionych klas PL w różnych błonach komórkowych są nierównomierne i specyficzne dla określonych tkanek (tab. 1) (DIAGNE i współaut. 1984, GENNIS 1989). Mimo że ich ilość w całkowitej puli błonowych PL jest niewielka (kilka do kilkunastu procent), to ich obecność jest warunkiem wielu procesów zachodzących na poziomie błony biologicznej. Każdą z klas charakteryzuje specyficzny skład kwasów tłuszczowych w pozycjach sn-1 i sn-2 szkieletu glicerolowego (GENNIS 1989). W pozycji sn-2 preferencyjnie występują nienasycone kwasy tłuszczowe o różnej liczbie wiązań podwójnych (18:1, 18:2, 20:4, 22:6). Jest to związane z selektywnością enzymów uczestniczących w syntezie i degradacji tych cząstek, w tym z procesami deacylacji-reacylacji oraz przemodelowywania rodzajów molekularnych fosfolipidów (SCHMID i współaut. 1991).

Tabela 1. Zawartość ujemnie naładowanych fosfolipidów (% całkowitej puli PL) na przykładzie tkanek szczura

Tkanka	PS	PI	CL	PA(PG)
Mózg	10,2	1,6	2,5	0,8
Serce	1,7	2,0	15,0	0,0
Płuca	6,5	1,6	1,2	0,0
Wątroba	1,7	4,9	3,6	0,0
Nerki	4,2	3,4	6,8	0,0
Jądra	3,9	3,2	3,7	ślady
Erytrocyty	9,4	4,6	0,0	0,0

Specyficzność gatunkowa ujemnie naładowanych fosfolipidów na przykładzie wątroby i erytrocytów (% całkowitej puli PL)

Wątroba	PS	PI	CL	PA(PG)
człowiek	3,8	6,5	5,5	0,0
szczur	1,7	4,9	3,6	0,0
świnka				
morska	2,0	4,8	2,7	0,0
Erytrocyty				
człowiek	13,4	1,0	0,0	2,7
szczur	9,4	4,5	0,0	0,0
świnka	11,3	2,0	0,0	2,7
morska				

Ujemnie naładowane fosfolipidy w błonach hepatocytów szczura (% całkowitej puli PL)

Błona	PS	PI	CL	PL/białko (μ mol/mg)
Mitochondrialna: OM	1,0	9,2	4,2	0,37
IM	1,0	1,7	17,0	0,26
ER: gładkie	3,9	8,0	2,4	0,39
szorskie	3,5	10,1	1,2	0,25
lizosomalna	2,0	5,9	—	0,16
aparatu Golgiego	4,2	8,7	—	0,83
jądrowa	5,6	4,1	-(4,0)	0,50
plazmatyczna	3,7	6,5	—	0,67

Typ polarnej głowy PL i jej zagęszczenie warunkują właściwości powierzchni błony takie jak: gęstość i rozmieszczenie ładunku powierzchniowego, uwodnienie, oddziaływanie z

kationami i białkami. Natomiast długość i stopień nienasycenia łańcuchów acylowych PL wpływają na wartość parametru uporządkowania błony, ruchliwość i konformację białek.

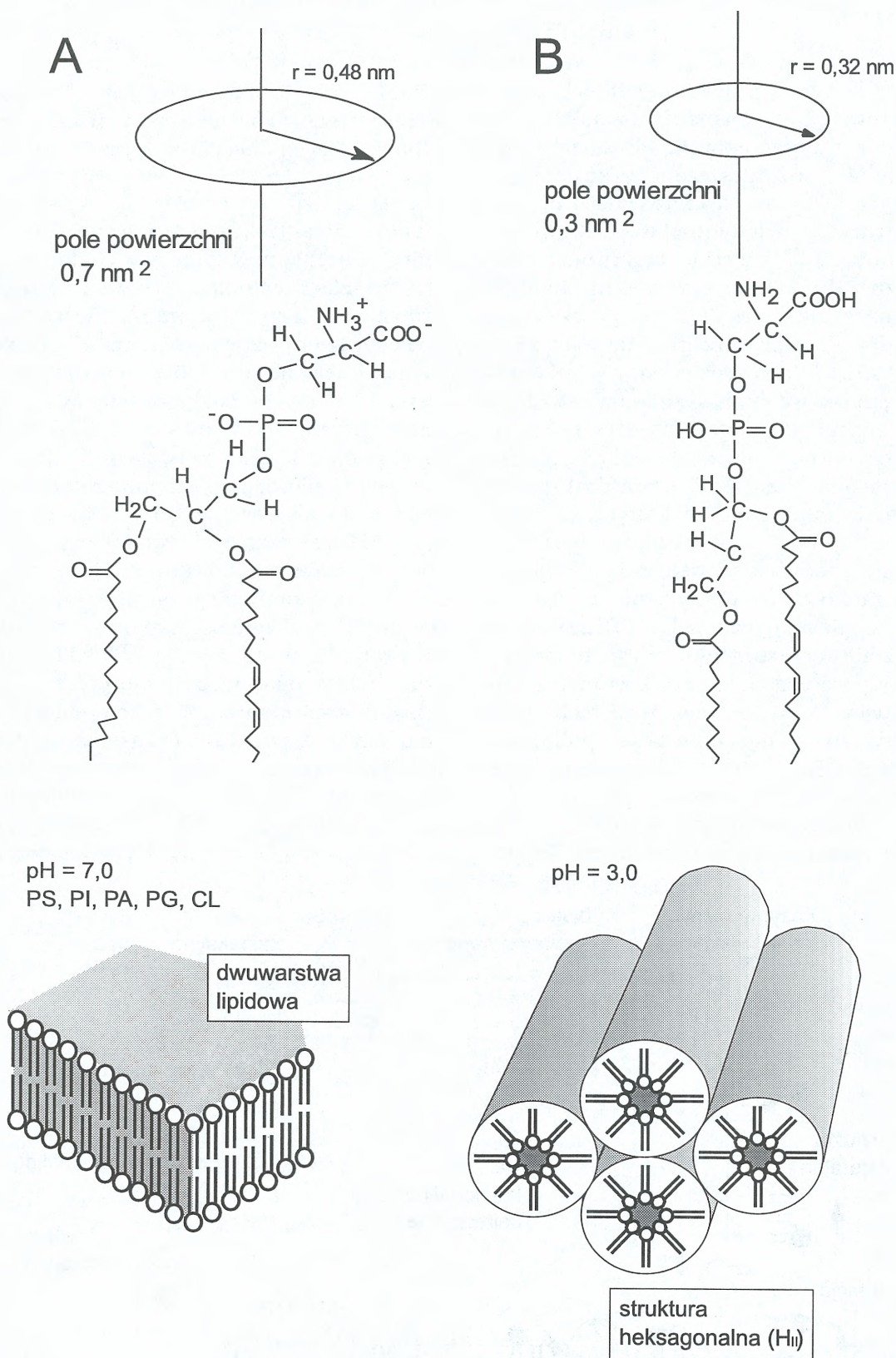
GEOMETRIA GŁOWY POLARNEJ FOSFOLIPIDU A KSZTAŁT LIPIDOWYCH AGREGATÓW

Niektóre właściwości fizyko-chemiczne PL, w tym geometria cząsteczki, upakowanie jej polarnej głowy, hydrofobowość i stopień nienasycenia łańcuchów acylowych decydują o kształcie tworzonych lipidowych agregatów oraz o możliwych przejściach fazowych. Wyjaśnienia na ten temat dostarczyły liczne badania spektroskopowe kryształów PL oraz jedno- i wieloskładnikowych uwodnionych mieszanin PL. Parametr upakowania PL jest opisywany wzorem $v/a \times l$, gdzie v oznacza objętość hydrofobową, a — średnie pole powierzchni zajmowane przez cząsteczkę na granicy faz, l — długość łańcuchów kwasów tłuszczowych. Gdy wartość tego parametru jest mniejsza od $\frac{1}{3}$ to wówczas powstają globularne struktury micelarne, charakterystyczne dla lizofosfolipidów. Gdy wartość ta waha się w zakresie $\frac{1}{2}$ do 1 dla cząsteczek fosfolipidów o cylindrycznym kształcie (PA, PS, PI, PG, CL), to preferowana jest faza lamelarna, w tym dwuwarstwa. Natomiast wartość powyżej 1, związana z bardzo małym polem powierzchni lipidu, prowadzi do utworzenia fazy heksagonalnej H_{II} , która jest najbardziej reprezentatywną dla PE (DE KRUIJFF i współaut. 1985).

Wśród czynników zmieniających molekularny kształt PL najbardziej istotne znaczenie mają protony, a więc zmiany pH, oraz kationy dwuwartościowe. Jak wykazano, w jednoskładnikowych układach modelowych w warunkach pH 7,0, PS, PI, PA, PG, CL tworzą fazę lamelarną, gdyż grupa karboksylowa PS i grupy fosforanowe wszystkich PL są zdysocjowane w pH 7,0, a pole powierzchni wynosi średnio $0,7 \text{ nm}^2$ (rys. 1). Jednak obniżenie pH środowiska do około 3,0 powoduje uprotonowanie wymienionych grup i przez to zmniejszenie pola powierzchni cząsteczki do około $0,3 \text{ nm}^2$. Konsekwencją redukcji odpychania elektrostatycznego między polarnymi głowami jest utworzenie fazy H_{II} . Inne dwuwartościowe kationy, takie jak Li^+ , Na^+ , K^+ w znacznie większych stężeniach, powodują

wyłącznie neutralizację ujemnego ładunku. Szczególne właściwości mają kationy dwuwartościowe, to jest Ca^{2+} , Mg^{2+} i Mn^{2+} . Wykazują one wysokie powinowactwo do ujemnie naładowanych PL; wiążąc się z nimi powodują albo powstawanie precypitatów (PG i PI) w fazie lamelarnej, bądź przejście w fazę H_{II} (PA, CL, PS). W układach mieszanych z PE, obecność 30 mol% PS, PG, CL lub 15 mol% PI stabilizuje dwuwarstwę. Wprowadzenie jonów wapnia prowadzi do utworzenia H_{II} obydwu składników, z wyjątkiem PS tworzącej struktury ślimakowe na tle fazy heksagonalnej PE.

Metodą spektroskopii w podczerwieni (CASAL i współaut. 1987), umożliwiającą badanie widm oscylacyjnych dla identyfikacji grup funkcyjnych stwierdzono, że Li^+ i Na^+ tworzą ciasne kompleksy z PS, powodując unieruchomienie jej grup karbonylowych. Wykorzystując obecność asymetrycznego atomu fosforu wykazano, że dwa wiązania estrowe P-O pozostają w konformacji standardowej „gauche-gauche” czyli skośna-skośna, tak jak dla układu bez kationów (rys. 1). Natomiast Ca^{2+} , wiążąc się z resztą fosforanową cząsteczki PS, powoduje zmianę konformacji wiązań estrowych P-O na „antiplanar-antiplanar” czyli naprzeciwległy w jednej płaszczyźnie i indukuje tworzenie wiązania wodorowego między grupami karbonyłowymi oraz uwięzienie cząsteczki wody. Inne badania wykazały, że Ca^{2+} i Mg^{2+} , wiążą się z resztą fosforanową PS, co powoduje oprócz dehydratacji cząsteczki, unieruchomienie grupy karboksylowej i łańcuchów acylowych fosfolipidu (CASAL i współaut. 1987, CHOI i współaut. 1991). Najnowsze prace z zastosowaniem dwukierunkowego NMR dowodzą, że konformacyjne zmiany w cząsteczce PS, zachodzące pod wpływem mierzczkowania pH, dotyczą również szkieletu glicerolowego. Jego położenie jest prostopadłe do całej cząsteczki w pH 7,0 i równoległe do całej cząsteczki, a prostopadłe do powierzchni błony w pH około 3,0 (SANSON i współaut. 1995).



Rys. 1. Proponowane konformacje polarnej głowy cząsteczki fosfatydyloseryny.

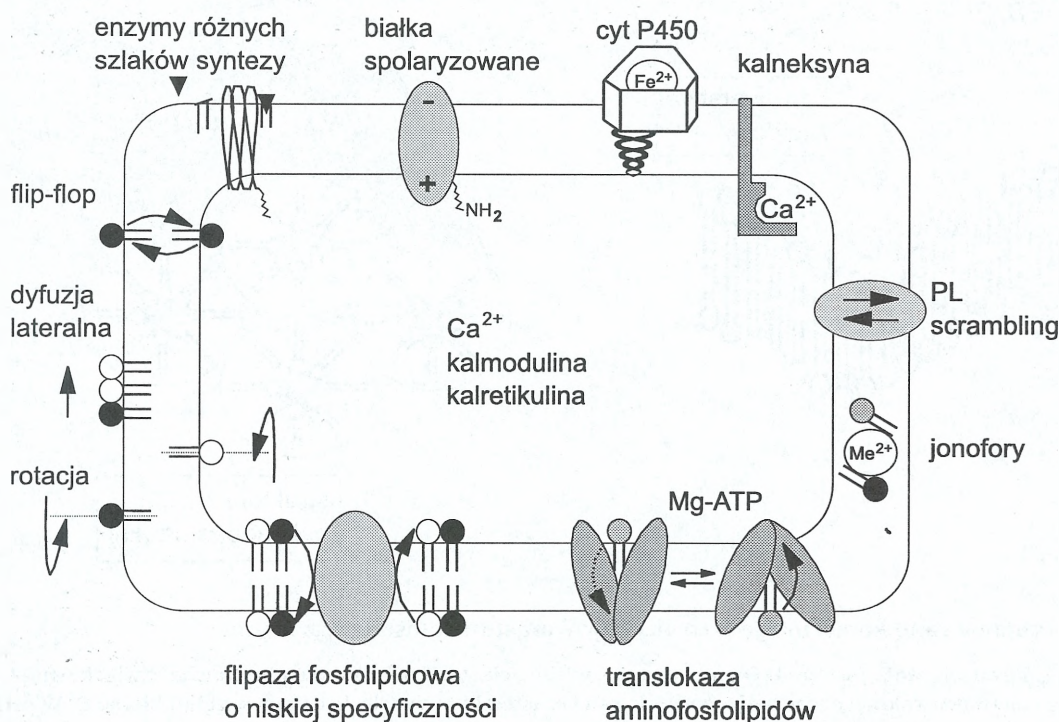
A. W pH 7,0 dwa wiązania estrowe P-O pozostają w konformacji standardowej „*gauche-gauche*” czyli skośna-skośna; położenie szkieletu glicerolowego jest prostopadłe do całej cząsteczki i równoległe do powierzchni błony. B. W pH 3,0 uprostonowanie grup karboksylowej i fosforanowej powoduje zmianę konformacji wiązań estrowych P-O na „antiplanar-antiplanar” czyli naprzeciwległą w jednej płaszczyźnie i indukuje tworzenie wiązania wodorowego między grupami karbonyłowymi; położenie szkieletu glicerolowego jest równoległe do całej cząsteczki i prostopadłe do powierzchni błony.

ASYMETRIA UJEMNIE NAŁADOWANYCH FOSFOLIPIDÓW W BŁONACH I SYSTEMY JĄ UTRZYMUJĄCE

Błony komórek prawidłowych wykazują w stanie równowagi swoistą asymetrię pod względem rozmieszczenia PL. PE i ujemnie naładowane PL są rozmieszczone po stronie cytoplazmatycznej błony plazmatycznej i po stronie ekstracytoplazmatycznej błon wewnątrzkomórkowych. W procesie organizacji błony biologicznej funkcjonują różne mechanizmy utrzymujące asymetrię tych cząsteczek oraz warunkujące ich przemieszczanie (HJELMSTAD i BELL 1991). Tym bardziej, że nie wszystkie błony komórkowe mają jednakową zdolność syntetyzowania PL (LONGMUIR 1987). Najbardziej aktywna pod tym względem jest siateczka śródplazmatyczna (ER), która posłuży jako przykład do omówienia niektórych procesów (rys. 2), a najmniej — błona plazmatyczna.

Wyniki wielu badań wskazują, że biosynteza PL zachodzi asymetrycznie, na ogół po stronie cytoplazmatycznej błon ER, ze względu na położenie centrum aktywnego błonowych enzymów poszczególnych szlaków metabolicznych. Stwierdzono, że większość tych białek enzymatycznych ma charakter politopowy (HJELMSTAD i BELL 1991), ich domeny transbłonowe i hydrofilowe uczestniczą w transporcie nowo syntetyzowanych cząsteczek produktu w płaszczyźnie poprzecznej błony (DEVAUX

1993), a często aktywność jest stymulowana w obecności dwuwartościowych kationów. W błonach ER są obecne inne białka spolaryzowane, to jest cytochrom P450 (NELSON i STROBEL 1988, CENTENO i GUTIERREZ-MERINO 1992) i kalneksyna (BERGERON i współaut. 1994), których segment N-końcowy znajduje się po stronie ekstracytoplazmatycznej. Mogą one utrzymywać asymetryczne rozmieszczenie PL, podlegających różnym ruchom. Współczynnik dyfuzji lateralnej PL w błonach biologicznych wynosi $10^{-8} \text{ cm}^2/\text{s}$, co odpowiada dystansowi $2 \text{ }\mu\text{m/s}$. Inaczej mówiąc, sąsiadujące PL zmieniają swoje miejsca z częstością 10^7 na s. Ruch ten, jest w niewielkim stopniu zależny od budowy polarnej głowy, podobnie jak ruch rotacyjny ($10^9/\text{s}$) cząsteczki wokół osi. Natomiast ruch ujemnie naładowanych PL w płaszczyźnie poprzecznej, który jest procesem wolnym (minuty), w obecności protonów i kationów dwuwartościowych jest efektywnie przyspieszany (s). W oparciu o jonoforetyczne właściwości PL zaproponowano, jako dodatkowy mechanizm transportu tych cząsteczek przez hydrofobową barierę błony, tworzenie struktur dimerycznych z centralnie unieruchomionym kationem (REUSCH 1985). Najbardziej aktywnym jonoforem okazał się PA, wykazujący pre-



Rys. 2. Ruchy fosfolipidów i udział białek w utrzymywaniu asymetrii fosfolipidów w błonach endoplazmatycznego retikulum.

ferencje w stosunku do $Mn^{2+} > Ca^{2+}$, natomiast PG i PE synergistycznie wspomagały indukowaną translokację PA. Podobne właściwości wykazuje także CL, odpowiednio z selektywnością wobec Rb^{+} , Ca^{2+} , Mn^{2+} (TYSON i współaut. 1976) oraz PS z selektywnością wobec Fe^{2+} . Jest prawdopodobne, że zaobserwowany, szczególnie w obecności jonów wapnia, szybki wyrzut PL, tak zwany „lipid scrambling” (SMEETS i współaut. 1994), może być odpowiednikiem właściwości jonoforetycznych PL w stosunku do kationów. Należy podkreślić, że w hepatocytach w warunkach *in vivo* wewnątrzkomórkowa homeostaza jonów wapnia jest zależna od stężenia wolnego jonu w świetle struktur ER, które jest ograniczone ze względu na obecność kilku białek wiążących Ca^{2+} , takich jak kalmodulina (ALVAREZ i współaut. 1991), kalretikulina (MICHALAK i współaut. 1992), CaBP2 — glikoproteina o aktywności izomeryzy dwusiarczkowej (VAN i współaut. 1993), kalneksyna (BERGERON i współaut. 1994) oraz ujemnie naładowanych PL. Homeostaza tego kationu jest regulowana w cyklu inozytolo-1,4,5-trisfosforanu przez hormony mobilizujące Ca^{2+} (wazopresynę, glukagon, insulinę) (BOND i współaut. 1987), cytochromy P450 (ALVAREZ i współaut. 1991), zawartość fosforanu uwalnianego z glukozo-6-fosforanu (BENEDETTI i FALCERI 1986). Ponadto w aktywnym transporcie PL w płaszczyźnie poprzecznej uczestniczy flipaza fosfolipidowa o niskiej specyficzności, przemieszczająca dwukierunkowo PC, PE, PS (ich czas półtrwania w płaszczyźnie poprzecznej błony wynosi 25 s) (BUTON i współaut. 1996). Udział innego białka, translokazy aminofosfolipidów zależnej od ATP, w zachowaniu asymetryczności błony plazmatycznej jest dobrze udokumentowany

(ZACHOWSKI 1993), w przypadku błon ER raczej hipotetyczny. Można jednak przypuszczać, że w błonach ER funkcję taką spełnia ją transbłonowe segmenty Ca^{2+} , Mg^{2+} -ATPazy (RAKOWSKA i współaut. 1997).

Powracając do selektywności występowania niektórych PL należy zwrócić uwagę, że inne organelle, jak na przykład mitochondria, syntetyzują tylko niektóre fosfolipidy: CL i PE, co jest związane z obecnością specyficznych enzymów, w przypadku mitochondriów syntazy kardiolipinowej i dekarboksylazy fosfatydoloserynowej (LONGMUIR 1987). Dlatego PL, pochodzące z różnych źródeł mogą docierać do odpowiednich błon komórkowych tylko dzięki wydajnym, selektywnym procesom transportowym (VOELKER 1996, JASIŃSKA 1993), w których są zaangażowane również zmiany konformacyjne cząsteczek ujemnie naładowanych PL pod wpływem jedno- i dwuwartościowych kationów. Do procesów tych należą: a) dyfuzja lateralna w płaszczyźnie dwuwarstw lub w miejscach kontaktowych oraz reorientacja PL w płaszczyźnie poprzecznej dwuwarstw pomiędzy jej zewnętrzną i wewnętrzną monowarstwą, tak zwany flip-flop (proces zależny od parametru uporządkowania błony i składu lipidowego); b) przeniesienie lipidowego monomeru przez cytosol, spontanicznie lub przy udziale białek transportujących lipidy, które zależy od hydrofilowości i hydrofobowości transportowanej cząsteczki (JASIŃSKA 1993); c) transport PL (endocytoza, egzocytoza, transcytoza) w postaci pęcherzyków, które odrywają się od błony donorowej, migrują przez cytosol i ulegają fuzji z docelową błoną akceptorową, zależnie od ich ładunku powierzchniowego lub specyficznych receptorów (np. fuzjogennych glikoprotein).

IMPLIKACJE *IN VIVO* WYNIKAJĄCE Z ODDZIAŁYWANIA UJEMNIE NAŁADOWANYCH FOSFOLIPIDÓW Z KATIONAMI — ZMIANY RUCHLIWOŚCI FOSFOLIPIDÓW, MODULACJA AKTYWNOŚCI INTEGRALNYCH BIAŁEK BŁONOWYCH, PROCESY FUZJI BŁON

Jak opisano w poprzednim rozdziale oddziaływanie kationów z polarnymi głowami ujemnie naładowanych PL zmienia ich ruchliwość w płaszczyźnie poprzecznej błony. Ułatwione pokonywanie bariery energetycznej przyspiesza transport „flip-flop” PL. Bezsprzecznym jest również fakt tworzenia przez te PL, w obecności Ca^{2+} i Cd^{2+} , domen w płaszczyźnie poprzecznej błon, charakteryzujących się obniżoną płynnością w stosunku do otoczenia. Obydwa kationy, ze względu na ten sam promień jonowy (odpowiednio 0,099 i 0,097 nm), współ-

zawodniczą o miejsce wiązania z pojedynczą grupą anionową dwóch sąsiadujących cząsteczek PA lub PS (SORENSEN 1988). Kompetycja tego typu może mieć znaczenie w ochronie komórek przed toksycznym działaniem Cd^{2+} , co wykazano pozbawiając pożywkę hodowlaną jonów wapnia (SORENSEN 1988). Ochronny wpływ Ca^{2+} , reagujących z tlenem grupy fosforanowej PS, na wydajność syntezy PE w zależnej od Ca^{2+} reakcji wymiany zasad, stwierdzono w przypadku stymulowanej Fe^{2+} peroksydacji lipidów błon ER (JASIŃSKA i współaut. 1996).

Ujemnie naładowane PL uczestniczą w regulacji aktywności wielu białek błonowych. Są to najczęściej: a) enzymy zorganizowane w łańcuchy transportu elektronów w mitochondriach i błonach ER, takie jak kompleks I/III i IV oksydazy cytochromu c, cytochromy: c, P450_{sec}, b5, P452; b) transportery kationów, takie jak Na⁺/K⁺-ATPazy, Ca²⁺/Mg²⁺-ATPazy, kanał K⁺, translokazy karnityny-acylokarnityny; c) nośniki: nukleotydów adeninowych, fosforanowy, pirogronianowy. Częsteczki PL, które eksponują w odpowiednich warunkach ujemny ładunek i stanowią otoczenie kanału jonowego mogą wiązać kationy znajdujące się w zewnątrzkomórkowym środowisku i zmieniać funkcje transporterów.

Biologiczna aktywność wielu rozpuszczalnych białek ujawnia się w momencie utworzenia trójskładnikowego kompleksu [PL-Ca²⁺-białko]. Niektóre z nich są odpowiedzialne za plastyczność organelli komórkowych i komór-

ki, między innymi białka rodziny S-100, aneksyny, miozyna II z mózgu. Inne są zaangażowane w kaskadzie przekazywania sygnałowego, między innymi izoformy kinazy białkowej C i kinaza Raf-1, lub w procesach neurotransmisji, między innymi synaptotagmina I czy rabfilina-3A.

Znany jest również stymulujący wpływ omawianych PL na translokację nowo syntetyzowanych białek (DE KRUIJFF 1994), procesy replikacji i transportu kwasów nukleinowych (WU i współaut. 1992). Transport wielu biomolekuł między błonami naturalnymi bądź sztucznymi zachodzi w wyniku ich fuzji. Odsyłając zainteresowanego Czytelnika do jednego z licznych artykułów przeglądowych (BURGER i VERKLEIJ 1990), opisujących mechanizmy i czynniki regulujące ten proces, należy wspomnieć, że fuzja błon z udziałem ujemnie naładowanych PL i kationów jest zjawiskiem dobrze poznanym.

WYKORZYSTANIE WŁAŚCIWOŚCI UJEMNIE NAŁADOWANYCH FOSFOLIPIDÓW DO KONSTRUOWANIA LIPOSOMÓW PRZENOSZĄCYCH LEKI — APLIKACJA MEDYCZNA

Jedną z metod efektywnego podawania leków, opartą na mechanizmie selektywnego rozpoznawania i włączania, jest konstruowanie odpowiednich liposomów wypełnionych terapeutykami. Wykorzystanie tej metody w terapii wielu chorób jest bardzo obiecujące, mimo że mechanizmy nie zostały ostatecznie wyjaśnione. Stwierdzono na przykład, że wprowadzenie ujemnego ładunku w postaci 10 mol% PS, PA lub PG do liposomów zbudowanych z PC i cholesterolu (stosunek molowy 2:1), w których zamknięto sondę fluorescencyjną, zwiększa ich wyłapywanie przez wątrobę (GABIZON i PAPAHAJOPOULOS 1992). Efektywność działania PL wzrastała w następującym porządku: PS > PA > PG i wynosiła odpowiednio 75%, 63% i 43% odzysku sondy. W przypadku PA, PL o najprostszej głowie polarnej stymulacja ta była proporcjonalna do jego procentowej zawartości. Na tej podstawie wywnioskowano, że proces absorpcji liposomów inicjuje interakcja ujemnego ładunku grupy

fosforanowej i oddziaływanie z jonami wapnia, a nie rozpoznawanie ich przez receptor. Zarówno PA, jak i PS, szczególnie w obecności Ca²⁺, ułatwiają międzybłonowy kontakt i fuzję. Hipoteza ta wydaje się być prawdziwą, gdyż wprowadzenie PI, który nie jest fuzjogennym PL, powodowało zahamowanie absorpcji liposomów, podczas gdy jego ufosforylowana pochodna (PIP), o wyższym powinowactwie do Ca²⁺, znosiła hamujący wpływ PI. Używając analogicznych, jak wymienione wyżej, liposomów stwierdzono, że linie komórek CV1 i J774 (odpowiednio komórki nerki małpy afrykańskiej i jednojądrowe fagocyty układu retikuloendotelialnego) mają zdolność subtelnej rozpoznawania różnic w strukturze polarnych głów PL na powierzchni pęcherzyków. Autorzy sugerują, że efektywność wyłapywania liposomów przez komórki nie jest związana z ich ujemnym ładunkiem powierzchniowym, lecz jest specyficznym kontrolowana przez polarne głowy PL (LEE i współaut. 1992).

NEGATIVELY CHARGED PHOSPHOLIPIDS — SENSORS FOR CATIONS IN MEMBRANES

Summary

Anionic phospholipids are under physiological conditions negatively charged and play the role of membrane sensors for cations, especially for calcium ions. These phospholipids: phosphatidic acid, phosphatidylglycerol,

cardiolipin, phosphatidylserine, phosphatidylinositol and their phosphorylated derivatives, are specifically distributed within the transverse and horizontal planes of the membrane. The functional asymmetry of aminophospho-

lipids is a prerequisite for the proper functioning of the cell and is carefully maintained by various intracellular and membrane systems. This asymmetry has many impli-

cations for the structural and functional properties of the plasma membrane and membranes of intracellular organelles.

LITERATURA

- ALVAREZ J., MONTERO M., GARCIA-SANCHO J., 1991. *Cytochrome-P450 may link intracellular Ca^{2+} stores with plasma membrane Ca^{2+} influx*. *Biochem. J.* 274, 193–197.
- BENEDETTI A., FALCERI R., 1986. *On a possible role for glucose-6-phosphatase in the regulation of liver cell cytosolic calcium concentration*. *Trends Biochem. Sci.* 11, 284–285.
- BERGERON J. J. M., BRENNER M. B., THOMAS D. Y., WILLIAMS D. B., 1994. *Calnexin: a membrane-bound chaperone of the endoplasmic reticulum*. *Trends Biochem. Sci.* 19, 124–128.
- BOND M., VADASZ G., SOMLYO A. V., SOMLYO A. P., 1987. *Subcellular calcium and magnesium mobilization in rat liver stimulated in vivo with vasopressin and glucagon*. *J. Biol. Chem.* 262, 15630–15636.
- BURGER K. N. J., VERKLEIJ A. J., 1990. *Membrane fusion*. *Experientia* 46, 631–644.
- BUTON X., MORROT G., FELLMANN P., SEIGNEURET M., 1996. *Ultrafast glycerophospholipid-selective transbil motion mediated by a protein in the endoplasmic reticulum membrane*. *J. Biol. Chem.* 271, 6651–6657.
- CASAL H. L., MANTSCH H. H., PALTAUF F., HAUSER H., 1987. *Infrared and ^{31}P -NMR studies of the effect of Li^+ and Ca^{2+} on phosphatidylserine*. *Biochim. Biophys. Acta* 919, 275–286.
- CENTENO F., GUTIERREZ-MERINO C., 1992. *Localization of functional centers in the microsomal cytochrome P-450 system*. *Biochemistry* 31, 8473–8481.
- CHOI S., WARE W., LAUTERBACH S. R., PHILIPS W. M., 1991. *Infrared spectroscopic studies on phosphatidylserine bilayer interaction with calcium ion: effect of cholesterol*. *Biochemistry* 30, 8563–8568.
- DE KRUIJFF B., CULLIS P. R., VERKLEIJ A. J., HOPE M. J., VAN ECHTELD C. J. A., TARASCHI T. F., 1985. *Lipid polymorphism and Membrane Function*. [W:] A. N. MARTONOSI (red.), *The Enzymes of Biological Membranes*. Tom 1, *Membrane Structure and Dynamics*. Plenum Press, New York, 131–204.
- DE KRUIJFF B., 1994. *Anionic phospholipids and protein translocation*. *FEBS Lett.* 346, 78–82.
- DEVAUX P. F., 1993. *Lipid transmembrane asymmetry and flip-flop in biological membranes in lipid bilayer*. *Curr. Opin. Struct. Biol.* 3, 489–494.
- DIAGNE A., FAUVEL J., RECORD M., CHAP H., DOUSTE-BLAZY L., 1984. *Studies on the ether phospholipids. II. Comparative composition of various tissues from human, rat and guinea pig*. *Biochim. Biophys. Acta* 793, 221–231.
- GABIZON A., PAPAHAJDOPOULOS D., 1992. *The role of surface charge and hydrophobic peroxidation inhibits synthesis of phosphatidylethanolamine via the ethanolamine base exchange reaction in rat liver microsomes*. *FEBS Lett.*, 386, 33–38.
- JASIŃSKA R., 1993. *Transport i dekarboksylacja fosfatydyloleryny*. Praca doktorska. Instytut Biologii Doświadczalnej im. M. Nenckiego.
- LEE K.-D., HONG K., PAPAHAJDOPOULOS D., 1992. *Recognition of liposomes by cells: in vitro binding and endocytosis mediated by specific lipid headgroups and surface charge density*. *Biochim. Biophys. Acta* 1103, 185–197.
- LONGMUIR K. J. 1987. *Biosynthesis and distribution of lipids*. [W:] F. BRONNER (red.), *Membrane Structure and Function*. Current Topics in Membranes and Transport. Tom 29. Academic Press, INC, 129–175.
- MICHALAK M., MILNER R. E., BURNS K., OPAS M., 1992. *Calreticulin*. *Biochem. J.* 285, 681–692.
- NELSON D. R., STROBEL H. W., 1988. *On the membrane topology of vertebrate cytochrome P-450 Proteins*. *J. Biol. Chem.* 263, 6038–6050.
- RAKOWSKA M., JASIŃSKA R., LENART J., KOMAŃSKA I., MAKOWSKI P., DYGAŚ A., PIKUŁA S., 1997. *Membrane integrity and phospholipid movement influence the base exchange reaction in rat liver microsomes*. *Mol. Cell. Biochem.*, 168, 163–176.
- REUSCH R. N., 1985. *A mechanism for phosphoglyceride and Ca^{2+} transbilayer movement*. *Chem. Phys. Lipids* 37, 53–67.
- SANSON A., MONCK M. A., NEUMANN J. M., 1995. *$2D\ ^1H$ -NMR conformational study of phosphatidylserine diluted in perdeuterated dodecylphosphocholine micelles. Evidence for a pH-induced conformational transition*. *Biochemistry* 34, 5938–5944.
- SCHMID P. C., JOHNSON S. B., SCHMID H. H. O., 1991. *Remodeling of rat hepatocyte phospholipids by selective acyl turnover*. *J. Biol. Chem.* 266, 13690–13697.
- SMEETS E. F., COMFURIUS P., BEVERS E. M., ZWAAL R. F. A., 1994. *Calcium-induced transbilayer scrambling of fluorescent phospholipid analogs in platelets and erythrocytes*. *Biochim. Biophys. Acta* 1195, 281–286.
- SORENSEN E. M. B., 1988. *Fluorescence Polarization to evaluate the fluidity of natural and reconstituted membranes*. [W:] H. J. HILDERSON (red.), *Fluorescence Studies on Biological membranes*. Subcellular Biochemistry. t. 13. Plenum Press, NY, 159–193.
- TYSON C. A., VANDE ZANDE H., GREEN D. E., 1976. *Phospholipids as ionophores*. *J. Biol. Chem.* 251, 1326–1332.
- VAN P. N., RUPP K., LAMPEN A., SÖLING H.-D., 1993. *CaBP2 is a rat homolog of ERp72 with protein disulfide isomerase activity*. *Eur. J. Biochem.* 213, 789–795.
- VOELKER D. R., 1996. *Lipid assembly into cell membranes*. [W:] D. E. VANCE, J. VANCE (red.), *Biochemistry of Lipids, Lipoproteins and Membranes*. t. 31. Elsevier, 391–422.
- WU S.-X., AHLQUIST P., KAESBERG P., 1992. *Active complex in vitro replication of nodavirus RNA requires glycerophospholipid*. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 89, 11136–11140.
- ZACHOWSKI A., 1993. *Phospholipids in animal eukaryotic membranes: transverse asymmetry and movement*. *Biochem. J.* 294, 1–14.