

DARIUSZ LATOWSKI^{1,2}, KAZIMIERZ STRZAŁKA²

¹*Zakład Biochemii*

*Akademia Pedagogiczna im. Komisji Edukacji Narodowej
Podchorążych 2, 30-084 Kraków*

²*Zakład Fizjologii i Biochemii Roślin*

Wydział Biochemii, Biofizyki i Biotechnologii

Uniwersytet Jagielloński

Gronostajowa 7, 30-387 Kraków

e-mail: latowski@interia.pl

strzalka@mol.uj.edu.pl

ODWRÓCONE STRUKTURY LIPIDOWE I ICH ROLA W PROCESACH BIOLOGICZNYCH

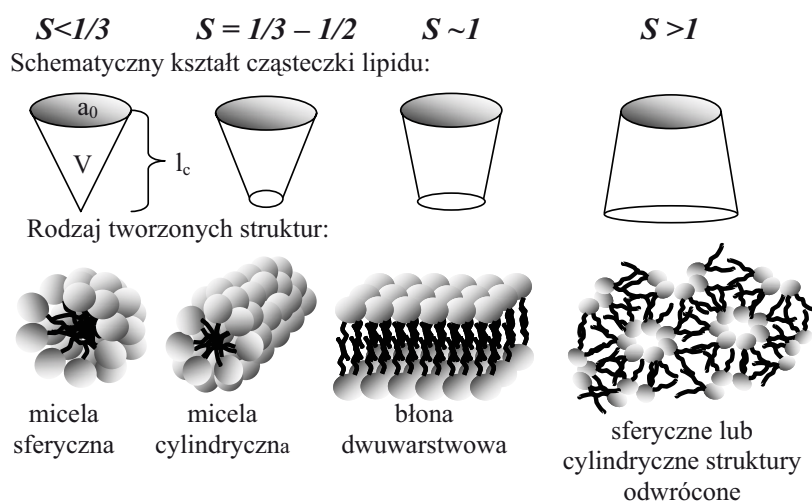
WSTĘP

Lipidy, zwane inaczej tłuszczowcami, to duża grupa związków organicznych o bardzo zróżnicowanej budowie. Ich wspólną cechą jest dobra rozpuszczalność w rozpuszczalnikach organicznych, natomiast w wodzie albo są nierozpuszczalne, albo tworzą roztwory koloidalne o charakterze mikroemulsji. Ta szczególna cecha lipidów wynika z budowy ich cząsteczek, które mogą być albo pozbawione jakichkolwiek ugrupowań zdolnych do oddziaływania z dipolami wody, i wtedy są one całkowicie hydrofobowe, albo też, tak jak jest to w większości przypadków, są cząsteczkami amfifilowymi. Termin amfifilowości, wprowadzony w 1935 r. przez Hartleya, określa jednoczesną niepełną rozpuszczalność danego związku w dwóch różnych rozpuszczalnikach (KILARSKI 1989). Cząsteczki amfifilowe na jednym końcu posiadają grupy rozpuszczalne w jednym typie rozpuszczalnika, a na drugim rozpuszczalne w innym typie, co sprawia, że cząsteczki takie w różnych rozpuszczalnikach mogą tworzyć inne typy struktur, zaś na granicy faz tworzą monowarstwy. Cząsteczki wykazujące charakter amfifilowy mają zdolność do tworzenia tzw. ciekłych kryształów liotropowych, bardzo powszechnych w układach biologicznych.

Ciekłe kryształy liotropowe powstają przez rozpuszczenie cząsteczek wykazujących tendencje do ich tworzenia w odpowiednich rozpuszczalnikach. Inny typ ciekłych kryształów powstaje przez stopienie kryształów stałych i nosi nazwę ciekłych kryształów termotropowych (PASCHER i współaut. 1992). W przypadku lipidów u podstaw amfifilowości leżą dwa typy oddziaływań, hydrofobowe i hydrofilowe.

Ze względu na te właściwości lipidy amfifilowe znalazły szerokie zastosowanie nie tylko w budowie naturalnych błon biologicznych, ale także w wielu procesach technologicznych, jak np. w produkcji stabilnych emulsji wykorzystywanych do produkcji farb, kosmetyków, lateksów, czy w procesach farmaceutycznych np. do wprowadzania leków do wnętrza komórek.

Wszystkie lipidy można podzielić na hydrolizujące i niehydrolizujące. Do lipidów niehydrolizujących zalicza się lipidy izoprenowe i kwasy tłuszczowe, a do pozostałych estry kwasów tłuszczowych i alkoholu. Alkoholami najczęściej wchodzącymi w skład lipidów są glicerol i wielowęglowy aminoalkohol, sfingozyna. Inne długołańcuchowe alkohole spotkać można, jako nieodzowne składniki wosków.



Ryc. 1. Wpływ wartości krytycznego parametru upakowania (S) cząsteczek lipidów na typ tworzonych przez nie struktur w roztworach wodnych

Za hydrofilowe właściwości lipidów odpowiedzialne są najczęściej reszty alkoholowe albo występujące łącznie z nimi, dodatkowe grupy, np. reszty kwasu fosforowego w fosfolipidach, reszty cukrowe w glikolipidach, lub grupa karboksylowa, jak ma to miejsce w przypadku wolnych kwasów tłuszczowych. Za hydrofobowe właściwości lipidów przeważnie odpowiedzialne są alkilowe łańcuchy reszt kwasów tłuszczowych. Innym typem budowy charakteryzują się lipidy izoprenowe, do których należy np. cholesterol. Nie zawierają one ani reszt kwasów tłuszczowych, ani alkoholu. Za właściwości hydrofobowe odpowiedzialne są u tej grupy lipidów budujące je reszty izoprenu, a za hydrofilowe, różne drobne polarne ugrupowania, najczęściej grupy hydroksylowe.

W zależności od wzajemnych proporcji pomiędzy częścią hydrofilową i hydrofobową w cząsteczkach danego typu lipidów mogą one, oddziałując ze sobą, wykazywać preferencje do tworzenia, w rozpuszczalniku, różnego typu struktur. Stosunek ukazujący wzajemną zależność części hydrofobowej i hydrofilowej w cząsteczce lipidu nazywa się krytycznym współczynnikiem upakowania (S) i wyraża równaniem:

$$S = \frac{v}{a_0 l_c}$$

gdzie: a_0 – pole powierzchni wyodrębniającej obszar oddziaływań ugrupowań hydrofilowych, tzw. hydrofilowej głowy;

v – objętość zajmowana przez ugrupowanie hydrofobowe;

l_c – długość hydrofobowych reszt acylowych (ISRAELACHVILI i współaut. 1975).

Typy tworzonych struktur w zależności od wartości krytycznego współczynnika upakowania lipidu przedstawiono na rycinie 1 (Ryc. 1).

Z biologicznego punktu widzenia na szczególną uwagę zasługują dwa typy struktur tworzonych przez lipidy. Jednym z nich są powszechnie znane dwuwarstwy, drugim tzw. struktury odwrócone, które mogą być sferyczne (odwrócone micelle) lub cylindryczne (odwrócone struktury heksagonalne) (SHIPLEY i współaut. 1973, SEN i współaut. 1981, VERKLEIJ 1984, HAFEZ i CULLIS 2001). Odwrócone micelle nazywa się też w niektórych przypadkach strukturami kubicznymi (HAFEZ i CULLIS 2001). Wnętrze typowych dwuwarstw wypełniają hydrofobowe reszty kwasów tłuszczowych, natomiast w strukturach odwróconych wewnątrz znajduje się woda lub inny rozpuszczalnik polarny i oddziaływujące z nim grupy polarne lipidów (KABANOV i współaut. 1988). O ile dwuwarstwy lipidowe są podstawą systemu błon komórkowych, o tyle biologiczna rola struktur odwróconych i lipidów, które te struktury tworzą ciągle nie jest do końca wyjaśniona.

CZYNNIKI DETERMINUJĄCE TWORZENIE ODWRÓCONYCH STRUKTUR HEKSAGONALNYCH

W 1962 r. Luzzati i Husson wykazali, że niektóre fosfolipidy wchodzące w skład błon biologicznych, po wyizolowaniu i oczyszcze-

niu nie tworzą spontanicznie dwuwarstwy w środowisku wodnym (LUZZATI i HUSSON 1962, RIVAS i LUZZATI 1969, SHIPLEY i współaut.

1973). Kilkanaście lat później postawiono hipotezę, że lipidy te mogą odgrywać ważne funkcje biologiczne (CULLIS i DE KRUIJFF 1979), a istota tych funkcji może być związana z tworzonymi przez nie strukturami istniejącymi w obrębie błon biologicznych. Te tzw. nielamelarne struktury mogące funkcjonować w obrębie błon biologicznych to w głównej mierze odwrócone micelle i odwrócone struktury heksagonale (H_{II}) (HAFEZ i CULLIS 2001). Liczba takich struktur w obrębie dwuwarstwy nie jest jednak stała, ale zależy od wielu czynników, zarówno związanych ze strukturą samych cząsteczek lipidów, jak i warunkami zewnętrznymi (ISRAELACHVILI i MITCHELL 1975, GOUNARIS i współaut. 1983a, BRUCE 1998, WEBB i GREEN 1991).

STRUKTURA CZĄSTECZKI LIPIDU

Jednym z czynników decydujących o typie tworzonych struktur jest wspomniana już budowa cząsteczki lipidu. Może być ona opisana za pomocą krytycznego parametru upakowania (S) wyprowadzonego z rozważań termodynamicznych dotyczących oddziaływań hydrofilowych i hydrofobowych cząsteczki lipidu na granicy faz (ISRAELACHVILI i współaut. 1976, HUI i SEN 1989). Oprócz tego parametru stosuje się jeszcze tzw. geometryczny parametr upakowania, który tym różni się od S , że jego wartość można wyliczyć z bezpośrednich pomiarów strukturalnych cząsteczki prowadzonych metodą dyfrakcji promieni X. Geometryczny parametr upakowania przedstawia się jako stosunek V/Al , gdzie V jest objętością całej cząsteczki lipidu, l jego długością, a A powierzchnią zajmowaną przez polarną głowę lipidu na granicy warstwy lipidowo-wodnej. Zależnie od wartości tego stosunku lipidy tworzą w wodzie struktury różnego typu (MARSH 1996).

Istnieją jeszcze inne parametry wiążące kształt cząsteczki lipidu z typem tworzonych struktur, ale wszystkie sprowadzają się do wzajemnych zależności między wielkością ugrupowania polarnego i hydrofobowego cząsteczki lipidu (PASCHER i współaut. 1992). Udział hydrofobowych łańcuchów kwasów tłuszczowych w przestrzennej strukturze cząsteczki zależy natomiast od stopnia ich nienasylenia. W zależności od obecności i liczby wiązań podwójnych w resztach acylowych budujących cząsteczki lipidów, mogą one tworzyć normalne lub odwrócone struktury. Przykładem jest jeden z najbardziej znanych nielamelarnych lipidów, monogalaktozydylacyloglicerol (MGDG), główny składnik błon

fotosyntetycznych roślin. Jego zdolność do tworzenia struktur H_{II} wyraźnie spada wraz ze wzrostem nasycenia reszt acylowych i to do tego stopnia, że MGDG zawierający jedynie nasycone reszty acylowe nie tworzy H_{II} , ale dwuwarstwy w tzw. stanie żelu, różniące się od typowych błon biologicznych większym uporządkowaniem wewnętrznym (BISHOP i współaut. 1980; GOUNARIS i współaut. 1983a, b; SEN i współaut. 1983; MANNOCK i współaut. 1985). Podobną prawidłowość zaobserwowano w przypadku innych nielamelarnych lipidów, do których można zaliczyć np. fosfatydyloetanoloaminę (PE).

STOPIEŃ HYDRATAcji

Oprócz samej geometrii cząsteczek lipidów na typ tworzonych przez nie struktur wpływa też stopień hydratacji ich polarnych ugrupowań. Na podstawie rozważań związanych z wartościami krytycznego parametru upakowania (ISRAELACHVILI i współaut. 1980) sądzono, że lipidy, które charakteryzują się małymi rozmiarami swoich ugrupowań polarnych, można uważać za predysponowane do tworzenia fazy H_{II} . Tak jest w przypadku PE, gdzie objętość ugrupowania polarnego zajmuje 159 \AA^3 . Objętość reszty polarnej w innym fosfolipidzie, jakim jest fosfatydylocholina (PC) wynosi 245 \AA^3 i lipid ten jest jednym z typowych lipidów tworzących dwuwarstwę. Okazało się jednak, że objętość polarnej głowy MGDG (238 \AA^3), lipidu łatwo tworzącego fazę H_{II} jest znacznie większa niż w przypadku PE i jest zbliżona do wartości uzyskanej dla PC (SEN i HUI 1988). Mimo, iż wielkość ugrupowań polarnych w MGDG i PC jest bardzo zbliżona lipidy te tworzą zupełnie inne struktury. Badania związane ze stopniem hydratacji polarnych głów lipidów wykazały, że na jedną cząsteczkę PC przypada około 50 cząsteczek wody, podczas, gdy na jedną cząsteczkę MGDG i PE tylko 5 (SEN i HUI 1988). Na podstawie dalszych badań stwierdzono, że wszystkie lipidy nielamelarne wiążą znacznie mniej wody niż lipidy spontanicznie tworzące dwuwarstwy. Może to mieć związek z dużą zdolnością tworzenia wiązań wodorowych zarówno pomiędzy polarnymi ugrupowaniami lipidów, jak i związkami będącymi wodorowymi donorami lub akceptorami, co zaobserwowano dla PE i MGDG (SEN i HUI 1988). Ponieważ hydratacja jest ważnym czynnikiem stabilności błon uważa się, że niższy stopień uwodnienia lipidów nielamelarnych, może być przyczyną powodowanych przez nie zaburzeń w

typowych dwuwarstwach i tworzenia w nich struktur odwróconych (YEAGLE i SEN 1986, SEN i HUI 1988, MCINTOSH 1996).

CZYNNIKI ZEWNĘTRZNE DETERMINUJĄCE TWORZENIE ODWRÓCONYCH STRUKTUR LIPIDOWYCH

Badania ostatnich trzydziestu lat dostarczyły wielu nowych informacji o czynnikach nie związanych ze strukturą cząsteczki lipidu, a ułatwiających powstanie odwróconych struktur lipidowych. Jednym z nich jest kwasowość środowiska. W 1983 r. zaobserwowano, że przy obniżeniu wartości pH poniżej 7, w błonach fotosyntetycznych dochodzi do wyraźnego zwiększenia udziału struktur H_{II} (GOUNARIS i współaut. 1983a, b). Potwierdzono to w 1985 r. (THOMAS i współaut. 1985), kiedy udowodniono, że oprócz kwaśnego środowiska do pojawiania się struktur H_{II} w obrębie dwuwarstwy zbudowanej z fosfolipidów, przyczynia się też zastosowanie fosfolipazy A_2 powodującej usunięcie reszt fosforanowych z cząsteczek lipidów. Ciekawe wyniki otrzymano w 1983 r. (HOPE i współaut. 1983). Prowadzono wówczas badania na liposomach wrażliwych na zmiany pH. Liposomy te były zbudowane z dwóch typów lipidów wykazujących tendencję do tworzenia struktur H_{II} . Jednym z nich była PE, drugim fosfatydyloseryna (PS). Właściwością różniącą oba te lipidy była zdolność do jonizacji, którą cechowała się jedynie PS. Stwierdzono, że jeśli do liposomów uzyskanych z PE wprowadzi się PS, to struktura błony tych liposomów będzie zależna od zmian pH. Liposomy zawierające PS i PE w stosunku 2:8, w alkalicznym i obojętnym pH, w niskiej temperaturze, charakteryzowały się obecnością typowej dwuwarstwy. Obniżenie wartości pH skutkowało pojawieniem się w tej temperaturze odwróconych struktur heksagonalnych i zmianami właściwości liposomów (HOPE i CULLIS 1980). Na tej podstawie można by przypuszczać, że na zmiany pH bardziej wrażliwe są lipidy zdolne do jonizacji. Obecność ładunku w cząsteczce lipidu uważa się za czynnik stabilizujący dwuwarstwę. Zmiany pH w środowisku wpływają też prawdopodobnie na wzrost stabilizujących struktury H_{II} wiązań wodorowych między tymi lipidami (SEN i HUI 1988). Mechanizm wpływu podwyższonego stężenia jonów oksoniowych w środowisku na tworzenie w obrębie błon lipidowych struktur odwróconych nie jest wyjaśniony, choć zjawisko to jest wykorzystywane w praktyce (HAFEZ i CULLIS 2001).

Również wzrost siły jonowej w środowisku przyczynia się do zwiększonego udziału struktur odwróconych w błonie lipidowej. Można przypuszczać, że mechanizm oddziaływania tego czynnika jest zbliżony do procesów leżących u podstaw wpływu pH (GOUNARIS i współaut. 1983a, b).

Wzrost zawartości wody w układzie powoduje z kolei przesunięcie równowagi w rodzaju tworzonych struktur w stronę dwuwarstwy (HSIEH i współaut. 1997). Może to być związane ze wspomnianym już wcześniej stopniem uwodnienia ugrupowań polarnych lipidów tworzących i nie tworzących dwuwarstwy i w konsekwencji z proporcjami przestrzeni zajmowanych przez ugrupowania polarne i niepolarne cząsteczki lipidowej. Większa zawartość wody w układzie powoduje zapewne relatywne zwiększenie udziału części hydrofilowej do hydrofobowej w cząsteczce lipidu, a to z kolei predysponuje cząsteczkę do tworzenia dwuwarstwy.

Taki sam mechanizm obowiązuje prawdopodobnie w przypadku kolejnego czynnika wpływającego na rodzaj tworzonych przez lipidy struktur, czyli temperatury. Wraz ze wzrostem temperatury zwiększa się prawdopodobieństwo powstania struktur odwróconych. W przypadku izolowanego z błon fotosyntetycznych MGDG, charakteryzującego się dużym udziałem kwasów tłuszczowych nienasyconych, tworzenie struktur H_{II} obserwuje się w bardzo szerokim zakresie temperatur, bo od -15 do 80°C przy ponad 50% zawartości lipidów w wodzie (GOUNARIS i współaut. 1983b). W temperaturze 55°C struktury H_{II} tworzy nawet MGDG zawierający jednonienasycone kwasy tłuszczowe (MANNOCK i współaut. 1985). Im wyższa temperatura, tym wyższa dynamika reszt acylowych wchodzących w skład lipidów i tym większa zajmowana przez nie przestrzeń. W takich warunkach parametry cząsteczki predysponują ją do tworzenia odwróconych miceli lub struktur H_{II} .

Być może z uwodnieniem cząsteczek lipidów należy wiązać opisane w latach 1989, 1994 i 1998 zjawisko silnego wpływu cukrów na strukturę błony (KOYNOVA i współaut. 1989, ROY 1994, DEMEL i współaut. 1998). Cukry, jako związki osmotycznie czynne oddziałując z wolnymi dipolami wody obniżają stopień uwodnienia środowiska. Traktowanie roztworami cukrów błon zbudowanych z fosfolipidów, powodowało przechodzenie dwuwarstwy w strukturę H_{II} (KOYNOVA i współaut. 1989). Niektórzy uważają, że reszty cukrowe obecne w lipidach

blon fotosyntetycznych mogą wywierać podobny skutek, jak cząsteczki cukru dostarczone w roztworze (ROY 1994).

Innymi związkami, które przyczyniają się do powstawania H_{II} są alkanany, lokujące się w środkowej części dwuwarstwy, przy ostatnich atomach węgla reszt acylowych i przyczyniające się najprawdopodobniej do wzrostu szybkości ruchów rotacyjnych lipidów. To z kolei sprzyja przechodzeniu struktur lamellarnych w fazę H_{II} (GAWRISCH i HOLTE 1996). Uważa się również, że niektóre białka, jak np. cytochrom *c*, czy białka poddawane sztucznej, a być może też i naturalnej hydrofobizacji, mogą stymulować powstawanie odwróconych struktur heksagonalnych (KABANOV i współaut. 1988).

Ostatnim z dyskutowanych w literaturze czynników ułatwiających powstawanie struktur H_{II} jest obecność jonów metali. Van Venetie zaobserwował w 1982 r., że dodatek wysokich stężeń jonów manganu(II) powodował powstawanie struktur H_{II} w błonie mitochondrialnej (VAN VENETIË i VERKLEIJ 1982). Również inne małe jony dwuwartościowe

takich pierwiastków jak wapń czy magnez, przyczyniały się do ułatwiania powstawania odwróconych struktur heksagonalnych, co zaobserwowano w przypadku lipidu mitochondrialnego – kardiolipiny (DE KRUIJFF i współaut. 1982). Dwuwartościowy kation baru nie wywoływał takich efektów. Tłumaczy się to tym, że małe jony wnikają w przestrzenie między przyległymi, naładowanymi ujemnie grupami fosforanowymi lipidów, wzmacniając oddziaływania między nimi. Jony baru są na to zbyt duże (KILLIAN i współaut. 1994, RIETVELD i współaut. 1994). Jak wykazały badania opublikowane w 2001 r., również w przypadku lipidów nie posiadających ładunków jony wapnia, podobnie jak i jony La^{3+} , stymulowały powstawanie struktury H_{II} . Oddziaływanie jonów ma miejsce w pobliżu reszt fosforanowych, których ładunek ujemny został zubożony dodatnim ładunkiem reszt choliny. Takie oddziaływanie jonów indukuje zmiany konformacyjne w cząsteczce lipidu, które ułatwiają tworzenie struktur H_{II} (TANAKA i współaut. 2001).

ZNACZENIE ODWRÓCONYCH STRUKTUR HEKSAGONALNYCH

Badania nad występowaniem odwróconych struktur lipidowych w błonach naturalnych wykazały, że struktury te stanowią nieodzowny składnik błon, umożliwiający spełnianie właściwych im funkcji biologicznych. Powstawanie takich struktur jest niezbędne w procesach związanych z fuzją błon lipidowych, zaangażowanych w takie procesy jak endo-, czy egzocytoza, fuzja frakcji mikrosomalnych wątroby, infekcje wirusowe i wiele innych (CHERNOMORDIK i współaut. 1993). Jedną z odmian fosfatydyloetanoloaminy zawierającą w swej cząsteczce dwie reszty kwasu oleinowego (DOPE) jest powszechnie stosowana do formowania tzw. fuzogenicznych, opartych na lipidach układów dostarczających (FLDS) (ang. fuzogenic lipid-based delivery systems). Sam lipid nazwano nawet lipidem fuzogenicznym („fuzogenic lipid”) (HAFEZ i CULLIS 2001) z powodu wyraźnego stymulowania fuzji typowych błon lipidowych. Okazało się, że wszystkie lipidy zdolne do tworzenia struktur H_{II} przyczyniają się do fuzji dwuwarstw lipidowych (HOPE i CULLIS 1979, ELLENS i współaut. 1985). Zjawisko to wykorzystano do produkcji FLDS wzbogacając typowe liposomy w DOPE. Tak modyfikowane liposomy, ulegają łatwo fuzji z błonami

komórkowymi i są z powodzeniem wykorzystywane do wprowadzania do komórek nie tylko małych cząsteczek, ale nawet makromolekuł, takich jak niektóre leki, czy plazmidy (HAFEZ i CULLIS 2001). Zastąpienie w FLDS DOPE przez PC całkowicie hamowało fuzję błon i uniemożliwiło dostarczanie substancji do wnętrza komórek (HAFEZ i CULLIS 2001).

Wydaje się również, że odwrócone struktury lipidowe mogą odgrywać istotną rolę w procesie wprowadzania syntetyzowanych w cytoplazmie białek do organelli takich, jak chloroplasty, czy mitochondria (BRUCE 1998). Badania prowadzone na układach modelowych wykazały, że przenikanie przez błonę peptydów sygnałnych takich białek, jak mała podjednostka Rubisco, ferredoksyna czy plastocyanina możliwe jest wtedy, gdy te sztuczne układy błonowe zawierają lipidy wykazujące tendencję do tworzenia struktur odwróconych (RAPOPORT 1992, PINNADUWAGE i BRUCE 1996, BRUCE 1998).

Inną ważną rolę odwróconych struktur lipidowych i lipidów je tworzących jest umożliwienie tworzenia stabilnych zakrzywień błon lipidowych, co odgrywa szczególną rolę w stabilizacji wewnętrznych, pofałdowanych błon mitochondrialnych i błon chloroplasto-

wych (GRUNER 1985). Lipidy nielamellarne umożliwiają też lokowanie białek w błonie, choć nie wiadomo, czy w ich pobliżu tworzą właściwe sobie struktury. Wiadomo natomiast, że lipidy takie wpływają na aktywność niektórych z tych białek, takich jak rodopsyna, kinaza C, czy protonozależna ATP-aza (ZIDOVETZKI 1996, MITCHELL i współaut. 1992, HAFEZ i CULLIS 2001). W naszym zespole wykazaliśmy po raz pierwszy, że obecność odwróconych struktur heksagonalnych jest niezbędna do aktywności deepoksydazy wiolaksantyny, enzymu roślinnego katalizującego jedną z reakcji cyklu ksantofilowego, ważnego mechanizmu chroniącego rośliny przed stresem świetlnym (LATOWSKI i współaut. 2004). Wykazaliśmy również, że lipofilowe barwniki roślinne odgrywają ważną rolę w tych reakcjach, znacznie lepiej rozpuszczają się w lipidach tworzących H_{II} niż w lipidach budujących typowe dwuwarstwy (GOSS i współaut. 2005, 2006).

Odwrócone struktury lipidowe są też stosowane w różnego rodzaju badaniach modelowych. Przykładem mogą być eksperymenty związane z badaniem aktywności niektórych enzymów, a wykorzystujące odwrócone micelle, jako mikroheterogeniczne medium zapewniające optymalne warunki do przebiegu katalizowanej przez badany enzym reakcji (KABANOV i współaut. 1988). Enzymy takie mogą być pułapkowane wewnątrz zawierających wodę miceli. Micelle natomiast tworzone są przez znajdujące się w rozpuszczalnikach organicznych typowe lipidy, albo detergenty. Układy wykorzystujące odwrócone micelle znajdują szczególne zastosowanie w badaniach kinetyki enzymatycznej reakcji, których substraty są nierozpuszczalne w wo-

dzie. Niektórzy badacze dzielą enzymologię na tradycyjną (wodną), czyli taką, w której badane reakcje zachodzą w środowisku wodnym i micelnym, gdzie rozpuszczalnikiem jest rozpuszczalnik organiczny (KABANOV i współaut. 1988).

Odwrócone micelle znalazły zastosowanie w badaniach z użyciem technik immunologicznych (KABANOV i współaut. 1989). Istnieją także doniesienia o wykorzystaniu takich struktur do stworzenia warunków umożliwiających pozakomórkową translację (NAMETKIN i współaut. 1992)

Obecność odwróconych struktur udowodniono zarówno w przypadku błon naturalnych, jak i sztucznych błon lipidowych (QUINN i WILLIAMS 1983, SPRAGUE i STAEHELIN 1984, HARANČZYK i współaut. 1995). Wspomniane pokrótce funkcje jakie struktury te mogą pełnić, szczególnie w kinetykach enzymatycznych, sprawiają, że cieszą się one coraz większym zainteresowaniem badaczy i być może posłużą do szybszego wyjaśnienia niezrozumiałych dotąd mechanizmów niektórych reakcji enzymatycznych, tak jak udało się tego dokonać w naszym zespole w przypadku deepoksydazy wiolaksantynowej.

Zwrócenie uwagi na egzystujące w błonie odwrócone struktury lipidowe powoduje równocześnie pewną zmianę w postrzeganiu frakcji lipidowej błon biologicznych. Wiadomo, że nie jest to już tylko i wyłącznie jednorodna struktura dwuwarstwy, ale oparty na harmonijnej różnorodności konglomerat dynamicznie współistniejących form zapewniających trwanie, w zmieniającym się środowisku, komórek i całych organizmów, z ogromem złożoności przebiegających w nich procesów.

THE INVERTED LIPID STRUCTURES AND THEIR ROLE IN BIOLOGICAL PROCESSES

Summary

Lipids may form two main types of structures: bilayer, and inverted structures. The inverted structures can form either cylindrical inverted hexagonal structures or spherical and have inverted micelles known also as cubic phase. The type of structure formed depends on the chemical texture of lipids, degree of hydration of their polar groups, and several other external factors, such as pH, temperature, and presence of some chemicals or salt ions. The inverted structures play an important role in several biological processes. They can promote membrane fusion. This was applied to design of lipid based delivery systems for a lot of chemicals which have

to be placed inside the cells. These structures are also used in the so-called micellar enzymology and as a new approach in homogeneous enzyme immunoassay utilizing the systems of surfactant reversed micelles in organic solvents for determination of the catalytic activity of the enzymes solubilized in such systems. Cell-free translation was also observed in reversed micelles. Some enzymes as violaxanthin de-epoxidase, protein kinase C and ATP-ase require for their activity lipids creating inverted structures. These lipids are also necessary in the transport of some proteins through membranes.

LITERATURA

- BISHOP D. G., KENRICK J. R., BAYSTON J. H., MACPHERSON A. S., JOHNS S. R., 1980. *Monolayer properties of chloroplast lipids*. *Biochim. Biophys. Acta* 602, 248–259.
- BRUCE B. D., 1998. *The role of lipids in plastid protein transport*. *Plant Mol. Biol.* 38, 223–246.
- CHERNOMORDIK L. V., VOGEL S. S., SOKOLOFF A., ONARAN H. O., LEIKINA E. A., ZIMMERBERG J., 1993. *Lysolipids reversibly inhibit Ca²⁺, GTP- and pH-dependent fusion of biological membranes*. *FEBS Lett.* 318, 71–76.
- CULLIS P. R., DE KRUIJFF B., 1979. *Lipid polymorphism and the functional roles of lipids in biological membranes*. *Biochim. Biophys. Acta* 559, 399–420.
- DE KRUIJFF B., VERKLEIJ A. J., LEUNISSEN-BIJVELT J., VAN ECHTELD C. J., HILLE J., RIJNBOUT H., 1982. *Further aspects of the Ca²⁺-dependent polymorphism of bovine heart cardiolipin*. *Biochim. Biophys. Acta* 693, 1–12.
- DEMEL R. A., DORREPAAL E., EBSKAMP M. J. M., SMEEKENS J. C. M., DE KRUIJFF B., 1998. *Fructans interact strongly with model membranes*. *Biochim. Biophys. Acta* 1375, 36–42.
- ELLENS H. BENTZ, J., SZOKA F. C., 1985. *H⁺- and Ca²⁺-induced fusion and destabilisation of liposomes*. *Biochemistry* 24, 3099–3106.
- GAWRISCH K., HOLTE L. L., 1996. *NMR investigations of non-lamellar phase promoters in the lamellar phase state*. *Chem. Phys. Lipid.* 81, 105–116.
- GOSS R., LOHR M., LATOWSKI D., GRZYB J., VIELER A., WILHELM C., STRZAŁKA K., 2005. *Role of hexagonal structure-forming lipids in diadinoxanthin and violaxanthin solubilization and de-epoxidation*. *Biochemistry* 44, 4028–36.
- GOSS R., LATOWSKI D., GRZYB J., VIELER A., LOHR M., WILHELM C., STRZAŁKA K., 2006. *Lipid dependence of diadinoxanthin solubilization and de-epoxidation in artificial membrane systems resembling the lipid composition of the natural thylakoid membrane*. *Biochim. Biophys. Acta* 10.1016/j.bbamem.2006.06.006.
- GOUNARIS K., MANNOCK D. A., SEN A., BRAIN A. P. R., WILLIAMS W. P., QUINN P. J., 1983a. *Polyunsaturated fatty acyl residues of galactolipids are involved in the control of bilayer/non bilayer lipid transitions in higher plant chloroplasts*. *Biochim. Biophys. Acta* 732, 229–242.
- GOUNARIS K., SEN A., BRAIN A. P. R., QUINN P. J., WILLIAMS W. P., 1983b. *The formation of non-bilayer structures in total polar lipid extracts of chloroplast membranes*. *Biochim. Biophys. Acta* 728, 129–139.
- GRUNER S. M., 1985. *Intrinsic curvature hypothesis for biomembrane lipid composition: a role for nonbilayer lipids*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 82, 3665–3669.
- HAFEZ I. M., CULLIS P. R., 2001. *Roles of lipid polymorphism in intracellular delivery*. *Adv. Drug Deliv.* 47, 139–148.
- HARAŃCZYK H., STRZAŁKA K., DIETRICH W., Blicharski J. S., 1995. *³¹P-NMR observation of the temperature and glycerol induced non-lamellar phase formation in wheat thylakoid membranes*. *J. Biol. Phys.* 21, 125–139.
- HOPE M. J., CULLIS P. R., 1979. *The bilayer stability of inner monolayer lipids from the human erythrocyte*. *FEBS Lett.* 107, 323–326.
- HOPE M. J., CULLIS P. R., 1980. *Effects of divalent cations and pH on phosphatidylserine model membranes: a ³¹P-NMR study*. *Biochim. Biophys. Res. Commun.* 92, 846–852.
- HOPE M. J., WALKER D. C., CULLIS P. R., 1983. *Ca²⁺ and pH induced fusion of small unilamellar vesicles consisting of phosphatidylethanolamine and negatively charged phospholipids: a freeze fracture study*. *Biochim. Biophys. Res. Commun.* 110, 15–22.
- HSIEH C. H., SUE S. C., LYU P. C., WU W. G., 1997. *Membrane packing geometry of diphytanoylphosphatidylcholine is highly sensitive to hydration: phospholipid polymorphism induced by molecular rearrangement in the headgroup region*. *Biophys. J.* 73, 870–877.
- HUI S.-W., SEN A., 1989. *Effect of lipid packing on polymorphic phase behavior and membrane properties*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 86, 5825–5829.
- ISRAELACHVILI J. N., MITCHELL D. J., 1975. *A model for the packing of lipids in bilayer membranes*. *Biochim. Biophys. Acta* 389, 13–19.
- ISRAELACHVILI J. N., MITCHELL D. J., NINHAM B. W., 1976. *Theory of self-assembly of hydrocarbon amphiphiles into micelles and bilayers*. *J. Chem. Soc. (Faraday II)* 72, 1525–1568.
- ISREALACHVILI J. N., MARCELJA S., HORN R. G., 1980. *Physical principles of membrane organization*. *Q. Rev. Biophys.* 13, 121–200.
- KABANOV A. V., LEVASHOV A. V., KLYACHKO N. L., NAMYOTKIN S. N., PSHEZHETSKY A. V., 1988. *Enzymes entrapped in reversed micelles of surfactants in organic solvents: a theoretical treatment of the catalytic activity regulation*. *J. Theor. Biol.* 133, 327–343.
- KABANOV A. V., KHRUTSKAYA M. M., ERMIN S. A., KLYACHKO N. L., LEVASHOV V., 1989. *A new way in homogeneous immunoassay: reversed micellar systems as a medium for analysis*. *Anal. Biochem.* 181, 145–148.
- KILARSKI W., 1989. *Molekularna budowa błony komórkowej. Fizjologia i Farmakologia błony komórkowej*. Ossolineum.
- KILLIAN J. A., KOORENGEVEL M. C., BOUWSTRA J. A., GOORIS G., DOWHAN W., DE KRUIJFF B., 1994. *Effect of divalent cations on lipid organization of cardiolipin isolated from Escherichia coli strain AH930*. *Biochim. Biophys. Acta* 1189, 225–232.
- KOYNOVA R., TENCHOV B., QUINN P., 1989. *Sugars favor formation of hexagonal phase at the expense of the lamellar liquid-crystalline phase in hydrated phosphatidylethanolamines*. *Biochim. Biophys. Acta* 980, 377–380.
- LATOWSKI D., ÅKERLUND H.-E., STRZAŁKA K., 2004. *Violaxanthin de-epoxidase, the xanthophyll cycle enzyme, requires lipid inverted hexagonal structures for its activity*. *Biochemistry* 43, 4417–20.
- LUZZATI V., HUSSON F., 1962. *The structure of the liquid-crystalline phases of lipid-water systems*. *J. Cell. Biol.* 12, 207–219.
- MANNOCK D. A., BRAIN A. P. R., WILLIAMS W. P., 1985. *The phase behaviour of 1,2-diacyl-3-monogalactosyl-sn-glycerol derivatives*. *Biochim. Biophys. Acta* 817, 289–298.
- MARSH D., 1996. *Intrinsic curvature in normal and inverted lipid structures and in membranes*. *Biophys. J.* 70, 2248–2255.
- MCINTOSH T. J., 1996. *Hydration properties of lamellar and non-lamellar phases of phosphatidylcholine and phosphatidylethanolamine*. *Chem. Phys. Lipids* 81, 117–131.
- MITCHELL D. C., KIBELBEK J., LITMAN B. J., 1992. *Effect of phosphorylation on receptor conformation: The metarhodopsin I — metarhodopsin II equilibrium in multiply phosphorylated rhodopsin*. *Biochem. J.* 31, 8107–8111.

- NAMETKIN S. N., KOLOSOV M. I., OVODOV S. Y., ALEXANDROV A. N., LEVASHOV A. V., ALAKHOV V. Y., KABANOV A. 1992. *Cell-free translation in reversed micelles*. FEBS Lett. 309, 330-332.
- PASCHER I., LUNDMARK M., NYHOLM P.-G., SUNDELL S., 1992. *Crystal structures of membrane lipids*. Biochim. Biophys. Acta 1113, 339-373.
- PINNADUWAGE P., BRUCE B. D., 1996. *In vitro interaction between a chloroplast transit peptide and chloroplast outer envelope lipids is sequence-specific and lipid class-dependent*. J. Biol. Chem. 271, 32907-32915.
- QUINN P. J., WILLIAMS W. P., 1983. *The structural role of lipids in photosynthetic membranes*. Biochim. Biophys. Acta 737, 223-266.
- RAPOPORT T. A., 1992. *Transport of proteins across the endoplasmic reticulum membrane*. Science 258, 931-936.
- RIETVELD A. G., CHUPIN V. V., KOORENGEVEL M. C., WIENK H. L., DOWHAN W., DE KRUIJFF B., 1994. *Regulation of lipid polymorphism is essential for the viability of phosphatidylethanolamine-deficient Escherichia coli cells*. J. Biol. Chem. 269, 28670-28675.
- RIVAS E., LUZZATI V., 1969. *Polymorphisme des lipides polaires et des galacto-lipides de chloroplastes de maïs, en présence d'eau*. J. Mol. Biol. 41, 261-275.
- ROY R. C. Y., 1994. *Destabilisation of lamellar dispersion of thylakoid membrane lipids by sucrose*. Biochim. Biophys. Acta 1212, 129-133.
- SEN A., HUI S.-W., 1988. *Direct measurement of head-group hydration of polar lipids in inverted micelles*. Chem. Phys. Lipids 49, 179-184.
- SEN A., WILLIAMS W. P., QUINN P. J., 1981. *The structure and thermotropic properties of pure 1,2-diacylgalactosylglycerols in aqueous systems*. Biochim Biophys Acta 663, 380-389.
- SEN A., MANNOCK D. A., COLLINS D. J., QUINN P. J., WILLIAMS W. P., 1983. *Thermotropic phase properties and structure of 1, 2-distearoylgalactosylglycerols in aqueous systems*. Proc. Royal Soc. London. Series A, Math. Phys. Sci. 388, 247.
- SHIPLEY G. G., GREEN, J. P., NICHOLS B. W., 1973. *The phase behavior of monogalactosyl, digalactosyl, and sulphoquinovosyl diglycerides*. Biochim. Biophys. Acta 311, 531-544.
- SPRAGUE G. S., STAEHELIN L. A., 1984. *Effect of reconstitution method on the structural organization of isolated chloroplast membrane lipids*. Biochim. Biophys. Acta 777, 306-322.
- TANAKA T., LI S. J., KINOSHITA K., YAMAZAKI M., 2001. *La³⁺ stabilizes the hexagonal II (H_{II}) phase in phosphatidylethanolamine membranes*. Biochim. Biophys. Acta 1515, 189-201.
- THOMAS P. T., BRAIN A. P. R., QUINN P. J., WILLIAMS W. P., 1985. *Low pH and phospholipase A₂ treatment induce the phase-separation of non-bilayer lipids within pea chloroplast membranes*. FEBS Lett. 183, 1, 161-166.
- VAN VENETIË R., VERKLEIJ A. J., 1982. *Possible role of non-bilayer lipids in the structure of mitochondria: a freeze-fracture electron microscopy study*. Biochim. Biophys. Acta 692, 397-405.
- VERKLEIJ A. J., 1984. *Lipidic intramembranous particles*. Biochim. Biophys. Acta 779, 43-63.
- WEBB M., GREEN B., 1991. *Biochemical and biophysical properties of thylakoid acyl lipids*. Biochim. Biophys. Acta 1060, 133-158.
- YEAGLE P. L., SEN A., 1986. *Hydration and the lamellar to hexagonal II phase transition of phosphatidylethanolamine*. Biochem. 25, 7518-7522.
- ZIDOVETZKI R., 1996. *Role of lipid membrane structure in the mechanism of activation of protein kinase C and phospholipase A₂*. [W:] *Structural and Biological Roles of Lipids Forming Non-Lamellar Structures*. EPAND R. M. (red.). Advances in Lipid Research, Academic Press, San Diego, CA.