

## BUDOWA I FUNKCJE UKŁADÓW BIAŁKOWO-LIPIDOWYCH

### STRUCTURE AND FUNCTION OF PROTEIN-LIPID SYSTEMS

**Adriana Litwińczuk-Mammadova,  
Katarzyna Cieślik-Boczula\*, Maria Rospenk**

*Uniwersytet Wrocławski, Wydział Chemii  
ul. F. Joliot-Curie 14,50-383 Wrocław  
\*e-mail: katarzyna.cieslik@chem.uni.wroc.pl*

---

Abstract

Wykaz stosowanych symboli i oznaczeń

Wprowadzenie

1. Lipidowe matryce błon
  - 1.1. Agregaty lipidowe
  - 1.2. Liposomy
  - 1.3. Przejścia fazowe dwuwarstwy
  - 1.4. Hydratacja warstwy lipidowej
  - 1.5. Wpływ kwasowości i siły jonowej na strukturę dwuwarstwy lipidowej
2. Białka błonowe
  - 2.1. Białka integralne
  - 2.2. Peryferyjne białka błonowe:  $\alpha$ -laktoalbumina
    - 2.2.1. Natywna postać  $\alpha$ -laktoalbuminy
    - 2.2.2. Forma „stopionej globuli”
    - 2.2.3. Oddziaływanie  $\alpha$ -laktoalbuminy z modelową błoną lipidową

Uwagi końcowe

Podziękowanie

Piśmiennictwo cytowane

---

**Dr Adriana Litwińczuk-Mammadova** ukończyła studia magisterskie w 2010 roku na kierunku Informatyka Chemiczna na Wydziale Chemii Uniwersytetu Wrocławskiego. Stopień doktora nauk chemicznych uzyskała w roku 2016 po publicznej obronie rozprawy doktorskiej pt. „Chemometrycznie wspomagana analiza oddziaływania  $\alpha$ -laktoalbuminy z modelową błoną lipidową”. Jej zainteresowania naukowe obejmują oddziaływania w układzie białkowo-lipidowym, przejścia fazowe dwuwarstw lipidowych, pośrednie stany konformacyjne białek i aplikacje metod chemometrycznych do analizy danych spektralnych.

**Dr Katarzyna Cieślik-Boczula** w roku 2002 ukończyła studia na Wydziale Biotechnologii Uniwersytetu Wrocławskiego. Praca magisterska dotyczyła fizykochemicznych badań cieni erytrocytów modyfikowanych związkami chemicznymi o aktywności biologicznej. Pracę doktorską pt. „Właściwości fotofizyczne i funkcje biologiczne pochodnych fenoli.” obroniła z wyróżnieniem w 2007 roku pod kierunkiem prof. dr hab. Aleksandra Kolla na Wydziale Chemii Uniwersytetu Wrocławskiego. Aktualnie realizowane kierunki prac badawczych dotyczą badań struktury i właściwości fizykochemicznych błon lipidowych i układów białkowych metodami FTIR, FTIR-ATR, VCD, TEM, DSC i spektroskopii fluorescencyjnej. Jej zainteresowania obejmują procesy fibrylogenezy i sposobów jej modyfikacji oraz błonowo-zależne mechanizmy chemoprewencyjnej aktywności związków z rodziny fenotiazyn.

**Prof. dr hab. Maria Rospenk** absolwentka chemii Wydziału Matematyki, Fizyki i Chemii Uniwersytetu Wrocławskiego (1969). Stopień naukowy doktora nauk chemicznych uzyskała na Uniwersytecie Wrocławskim w 1977 roku na podstawie rozprawy „Badania wiązania wodorowego w kompleksach zasad tlenowych z HCl i HBr oraz ich deuterowanymi analogami” wykonanej pod kierunkiem prof. Lucjana Sobczyka. Habilitowała się w zakresie chemii fizycznej i teoretycznej w 1992 r., tytuł rozprawy „Równowaga przeniesienia protonu w wewnątrzcząsteczkowym wiązaniu wodorowym w zasadach Mannicha”. W 2004 r. otrzymała tytuł naukowy Profesora, nadany przez Prezydenta RP. Jej zainteresowania naukowe obejmują badania nad stanem wewnątrz- i międzycząsteczkowego wiązania wodorowego oraz jego wpływu na właściwości fizykochemiczne różnorodnych układów.

## ABSTRACT

Biomembranes play many structural and functional roles in both prokaryotic and eukaryotic cells [10]. They define compartments, the communication between the inside and outside of the cell. The main components of biomembranes are lipids and proteins, which form protein-lipid bilayer systems [10]. A structure and physicochemical properties of protein-lipid membranes, which determines biological activities of biomembranes, are strongly dependent on interactions between lipid and protein components and external agents such as a temperature, pH, and a membrane hydration [4]. A lipid bilayer matrix serves as a perfect environment for membrane proteins (Fig. 1), and it assures activities of these proteins. Because biomembranes are composed of many different groups of lipids and proteins and have a complex structure, it is difficult to study in details their physicochemical properties using physicochemical methods. For these reason, lipid membranes of liposomes are used in many scientific laboratories for studding processes associated with a lipid phase transition, a membrane hydration, or protein-membrane interactions. The structure of liposomes (Fig. 5), and an influence of pH and an ionic strength on a lipid bilayer structure are discussed in the presented work. The role of membrane proteins in determination of biological activities of biomembranes is highlighted. A high variety of a structure and an enzymatic activity of membrane proteins is responsible for a high diversity of biological functions of cell membranes [2].  $\alpha$ -Lactalbumin ( $\alpha$ -LA) is a peripheral membrane protein (Figs 8 and 9), its biological function is strongly related to its conformational structure and interaction with lipid membranes [49]. The complex of  $\alpha$ -LA in a molten globule conformational state with oleic acid, termed as a HAMLET complex, are disused in a context of its anti-tumor activity.

Keywords: lipid-protein interactions, DPPC liposomes, phase transitions,  $\alpha$ -lactalbumin, complex HAMLET/BAMLET, molten globule state

Słowa kluczowe: oddziaływania białko-lipid, liposomy DPPC, przejścia fazowe,  $\alpha$ -laktoalbumina, kompleks HAMLET/BAMLET, stopiona globula

---

---

## WYKAZ STOSOWANYCH SKRÓTÓW

$\alpha$ -LA	– $\alpha$ -laktoalbumina (ang. <i>alactalbumin</i> )
BAMLET	– kompleks bydłczej $\alpha$ -laktoalbuminy i kwasu oleinowego indukującego apoptozę komórek nowotworowych (ang. <i>bovine <math>\alpha</math>-lactalbumin made lethal to tumor cells</i> )
CMC	– krytyczne stężenie micelizacji (ang. <i>critical micelle concentration</i> )
DPPC	– dipalmitoilofosfatydylocholina (ang. <i>dipalmitoilphosphatidylcholine</i> )
FRET	– fluorescencyjne rezonansowe przeniesienie energii, homoFRET – efekt występujący między flouoroforami jednego rodzaju (ang. <i>fluorescence resonance energy transfer</i> )
GUV	– gigantyczne jednowarstwowe liposomy (ang. <i>giant unilamellar vesicles</i> )
GT	– galaktozylotransferaza (ang. <i>galactosyltransferase</i> )
HAMLET	– kompleks ludzkiej $\alpha$ laktoalbuminy i kwasu oleinowego indukującego apoptozę komórek nowotworowych (ang. <i>human <math>\alpha</math>lactalbumin made lethal to tumor cells</i> )
H	– heksagonalna symetria upakowania (ang. <i>hexagonal packing</i> )
H <sub>I</sub>	– normalna faza heksagonalna (ang. <i>normal hexagonal phase</i> )
H <sub>II</sub>	– odwrócona faza heksagonalna (ang. <i>inverted hexagonal phase</i> )
L <sub><math>\alpha</math></sub>	– lamelarna faza ciekłokrystaliczna (ang. <i>lamellar liquid crystalline</i> )
L <sub><math>\beta</math></sub>	– lamelarna faza żelowa (ang. <i>lamellar gel phase</i> )
L <sub>c</sub>	– lamelarna faza krystaliczna (ang. <i>lamellar crystalline phase</i> )
LUV	– duże jednowarstwowe liposomy (ang. <i>large unilamellar vesicles</i> )
MG	– stopiona globula (ang. <i>molten globule</i> )
MLV	– wielowarstwowe liposomy (ang. <i>multilamellar vesicles</i> )
MVV	– wielopęcherzykowe liposomy (ang. <i>multivesicular vesicles</i> )
O <sub>1</sub>	– ortorombowa symetria upakowania (ang. <i>orthorhombic packing</i> )

---

OLV	– kilkuwarstwowe liposomy (ang. <i>oligolamellar vesicles</i> )
$P_{\beta'}$	– pofalowana faza żelowa (ang. <i>rippled gel phase</i> )
$P_{\beta}$	– pofalowana faza żelowa (ang. <i>rippled gel phase</i> )
PC	– fosfatydylocholiny (ang. <i>phosphatidylcholines</i> )
S	– parameter upakowanie cząsteczki lipidu
SDS	– dodecylosiarczan sodu (ang. <i>sodium dodecyl sulfate</i> )
SUV	– małe jednowarstwowe liposomy (ang. <i>small unilamellar vesicles</i> )
$T_m$	– temperatura głównego przejścia fazowego (ang. <i>main phase transition temperature</i> )
$T_p$	– temperature przedprzejścia (ang. <i>pretransition temperature</i> )
$T_s$	– temperature subprzejścia (ang. <i>subtransition temperature</i> )
$T_{//}$	– trójskośna symetria upakowania (ang. <i>triclinic packing</i> )
UDP-Gal	– urydynodwufosforan galaktozy (ang. <i>uridine diphosphate glucose</i> )

## WPROWADZENIE

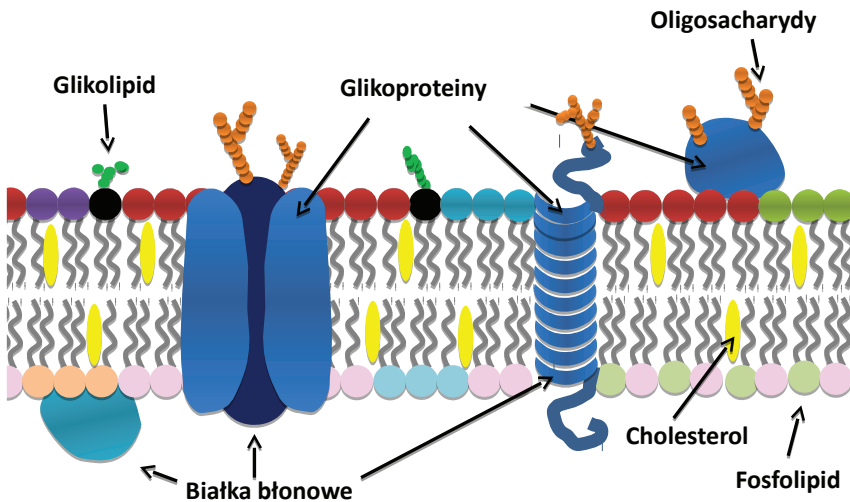
Obecność błon komórkowych jest wspólną cechą organizmów eukariotycznych i prokariotycznych. Błony plazmatyczne izolują komórki i nadają im indywidualny charakter. Dodatkowo, u eukariotów, błony wewnątrzkomórkowe otaczają organelle, takie jak, mitochondria, jądro komórkowe, chloroplasty i lizosomy. Tworzą przedziały międzykomórkowe utrzymujące indywidualny skład jonów i określoną wartość pH wydzielonej przestrzeni. Dzięki obecności specyficznych białek błonowych działających jako kanały, przekaźniki, receptory, pompy czy transformatory energii i enzymów, dwuwarstwy białkowo-lipidowe uczestniczą w kontrolowanym transporcie między oddzielanymi obszarami i tym samym umożliwiają ich integralność. Odgrywają także zasadniczą rolę w komunikacji biologicznej uczestnicząc w przekazie informacji lub samodzielnie generując sygnały o charakterze chemicznym lub elektrycznym. Tak różnorodne funkcje biologiczne jakie pełnią błonowe układy białkowo-lipidowe występują dzięki ich specyficznej budowie, w której lipidowa macierz błonowa stanowi idealne środowisko dla funkcjonowania białek błonowych o szerokim spektrum działania. Duża różnorodność w strukturze i składzie chemicznym błonowych dwuwarstw lipidowych ogranicza ich szczegółową analizę strukturalną w badaniach z wykorzystaniem metod fizykochemicznych. Z tego powodu, w badaniach złożonych układów błon biologicznych powszechnie stosuje się liposomowe modele błon lipidowych. Na ich podstawie zostaną omówione przejścia fazowe dwuwarstw lipidowych, ich hydratacja oraz wpływ kwasowości i siły jonowej na strukturę błon lipidowych. W kolejnych rozdziałach pracy zostanie podkreślona rola białek błonowych, których duża różnorodność w aktywności jest odpowiedzialna za złożone funkcje biologiczne błon komórkowych. Rola peryferyjnych białek błonowych, zależna od struktury modyfikowanej stanem fizykochemicznym dwuwarstwy lipidowej i czynnikami zewnętrznymi zostanie opisana na przykładzie  $\alpha$ -laktoalbuminy.

### 1. LIPIDOWE MATRYCE BŁON

W 1925 r. Gorter i Grendel [1] na podstawie badań nad czerwonymi krwinkami dowiedli, że błony biologiczne zawierają lipidy zorganizowane w dwuwarstwy. Pół wieku później, Singer i Nicolson [2], zaprezentowali model błony biologicznej określany mianem „płynnej mozaiki”. W modelu tym rdzeniem błony jest płynna dwuwarstwa lipidowa penetrowana przez białka (Rys. 1). Błony biologiczne cechuje asymetryczność wynikająca z obecności odrębnego typu lipidów i białek w wewnętrznej i zewnętrznej warstwie lipidowej. Białka i niektóre lipidy tworzące zewnętrzną powierzchnię błony, dodatkowo zawierają krótkie łańcuchy cukrowe i nazywane są odpowiednio glikoproteinami i glikolipidami. Integralność składników białkowo-lipidowych błony biologicznej zapewniają słabe oddziaływania międzycząsteczkowe. Model „płynnej mozaiki” podkreśla dynamiczność struktury

błony biologicznej, której komponenty wykazują silną mobilność i zdolność do wykonywania ruchów lateralnych w obrębie błony [1].

Zgodnie z przedstawionym schematem błony biologiczne stanowią bardzo złożony i wieloskładnikowy układ. Z tego powodu, w badaniach nad ich właściwościami i oddziaływaniem z innymi cząsteczkami, powszechnie stosuje się modelowe sztuczne błony, w których macierz lipidowa przedstawiona jest poprzez zorientowaną dwuwarstwę lipidową, najczęściej jedno- lub dwuskładnikową [3].



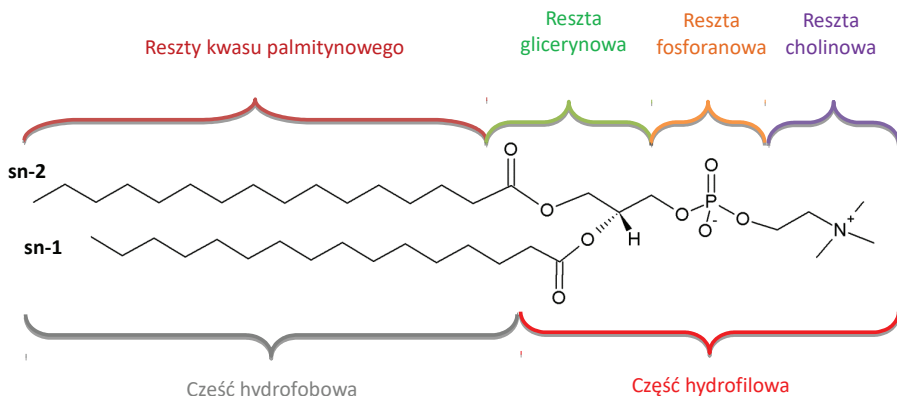
Rysunek 1. Schemat budowy błony biologicznej jako „płynnej mozaiki”  
Figure 1. A fluid mosaic model of a structure of biological membrane

Lipidy budujące rdzeń błony biologicznej stanowią heterogenną grupę biocząsteczek, które praktycznie nie rozpuszczają się w wodzie, natomiast dobrze w rozpuszczalnikach niepolarnych [4, 5]. Pomimo znacznego zróżnicowania składu lipidowego błony, ściśle zależnego od miejsca jej występowania, w strukturze dwuwarstwy lipidowej występują trzy główne typy lipidów: fosfolipidy, glikolipidy i cholesterol. Wśród fosfolipidów występujących w błonach plazmatycznych najliczniejszą grupę stanowią fosfatydylocholina (PC), gdzie cholina jest połączona wiązaniem estrowym z grupą fosforanową [6, 7].

Jednym z najczęściej stosowanych fosfolipidów w preparacji sztucznych błon lipidowych jest dipalmitoilofosfatydylocholina (DPPC) (Rys. 2). Uzyskane modele w znacznym stopniu odzwierciedlają właściwości naturalnych błon biologicznych, z tego powodu są chętnie wykorzystywane zarówno w badaniach eksperymentalnych, jak i obliczeniowych [8].

Kolejną klasą cząsteczek lipidów wchodzących w skład błon biologicznych, reprezentowaną w mniejszej liczbie, są zawierające jednostki cukrowe glikolipidy. Związki te występują przede wszystkim w tkankach układu nerwowego, np. 21% glikolipidów buduje otoczkę mielinową szczyrego mózgu [6, 7]. Ponadto, w bło-

nach komórkowych zwierząt występuje również cholesterol, który dzięki swojej sztywnej strukturze reguluje płynność błon biologicznych.



Rysunek 2. Schemat budowy cząsteczki DPPC  
Figure 2. A structure of DPPC molecule

### 1.1. AGREGATY LIPIDOWE

Lipidy wykazują amfifilowy charakter wynikający z obecności w jednej cząsteczce zarówno fragmentu o właściwościach hydrofilowych („polarna główka”) jak i hydrofobowych („ogon węglowodorowy”). Amfifilowość powoduje, że lipidy w rozpuszczalniku organizują się spontanicznie [7, 9, 10]. Przy niskich stężeniach, cząsteczki amfifilu w środowisku wodnym pozostają zwykle w postaci monomerycznej. Wzrost stężenia lipidu powyżej wartości tzw. krytycznego stężenia micelizacji (ang. *critical micelle concentration*, CMC) powoduje samoorganizację lipidów w przestrzenne struktury o różnej morfologii [11, 12]. Zasadniczą siłą tego procesu są oddziaływania hydrofobowe. Ograniczenie kontaktów części hydrofobowej z polarnymi cząsteczkami wody powoduje znaczny wzrost uporządkowania całego układu. Ponadto, korzystne oddziaływania van der Waalsa między łańcuchami węglowodorowymi oraz oddziaływania przez wiązania wodorowe i elektrostatyczne części polarnej cząsteczki lipidu, dodatkowo stabilizują powstałe formy [5, 10]. Siła oddziaływań międzycząsteczkowych, która odzwierciedla sposób agregacji zależy od kształtu cząsteczki lipidu (Rys. 3).

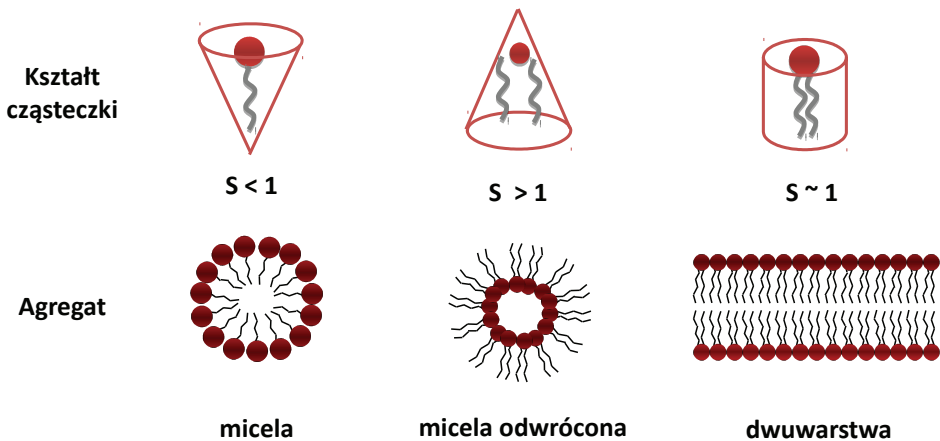
Typ formowanej struktury przestrzennej można przewidzieć na podstawie wartości tzw. parametru upakowania  $S$ , wyrażonego wzorem:

$$S = \frac{V}{al}$$

gdzie  $V$  oznacza objętość części hydrofobowej,  $a$  – powierzchnie przekroju poprzecznego części polarnej,  $l$  – długość łańcucha węglowodorowego. Cząsteczka amfifilu,



której grupy części polarnej zajmują większy obszar niż łańcuchy alifatyczne ( $S < 1$ ), ma kształt klinu i w środowisku wodnym tworzy micelle. Natomiast, forma odwróconej miceli jest charakterystyczna dla cząsteczek o kształcie stożka, w których część hydrofobowa zajmuje większą objętość niż polarna głowa ( $S > 1$ ). Obie struktury organizują się w cylindryczne nielameralne fazy, odpowiednio: heksagonalną  $H_I$  i heksagonalną odwróconą  $H_{II}$ . Cząsteczki lipidu, których część polarna i apolarna zajmują podobne obszary ( $S \sim 1$ ), w wodzie grupują się w lamelną strukturę dwuwarstw, a przy większych stężeniach tworzą wielowarstwę [11, 13]. Przykładem związków, których cząsteczka ma kształt klina są lizofosfolipidy i detergenty. Natomiast, odwrócone micelle są charakterystyczne dla fosfatydyloetanolaminy [13]. Wartości CMC dla ich form micelarnych znajdują się w granicach od  $10^{-5}$  do  $10^{-2}$  mol/dm<sup>3</sup> [11]. Dla dwuwarstw tworzonych przez cząsteczki lipidu np. fosfatydylocholino (PC), sfingomielinu [13], parametr CMC przyjmuje wartości z zakresu od  $10^{-10}$  do  $10^{-6}$  mol/dm<sup>3</sup> [11]. Natomiast, uwodnienie cząsteczek PC w znacznym nadmiarze wody, prowadzi do powstania zawiesiny dwuwarstwowych agregatów, zwanych liposomami [11].



Rysunek 3. Zależność struktury agregatów lipidowych od kształtu cząsteczki amfifilowej lipidu przedstawiona na podstawie danych z literatury [11–13]

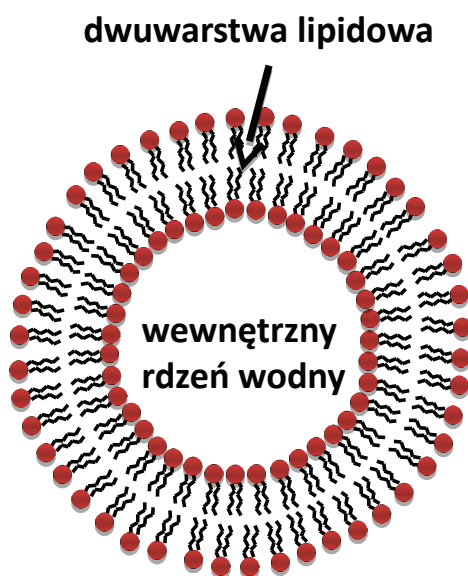
Figure 3. The dependence of a shape of lipid molecules on the aggregation structure based on the literature data [11–13]

Sposób agregacji można kontrolować poprzez zmianę czynników zewnętrznych. Kwasowość środowiska determinuje strukturę przestrzenną cząsteczek lipidu PC i PS. Przy pH obojętnym cząsteczki te organizują się w dwuwarstwę, po zakwaszeniu próbki agregują w postaci odwróconej fazy heksagonalnej  $H_{II}$ . Wolna cząsteczka kardiolipiny chętnie przyjmuje strukturę dwuwarstw, jednak po koordynacji kationu wapnia, preferuje formowane odwróconej miceli. W zależności od rodzaju lipidu, czynnik temperaturowy może powodować zmianę typu agregacji lub właściwości fizycznych agregatu przy zachowaniu jego ogólnej struktury. Wraz ze

wzrostem temperatury dwuwarstwy fosfatydyloetanolaminy przechodzą w odwróconą fazę heksagonalną  $H_{II}$  [13].

## 1.2. LIPOSOMY

Niski stosunek liczby cząsteczek amfifu do cząsteczek rozpuszczalnika utrudnia powstanie ciągłej fazy lamelarniej [11]. W obszarze swobodnych krawędzi dwuwarstw dochodzi do niekorzystnych energetycznie kontaktów łańcuchów węglowodorowych z cząsteczkami wody. Dążąc do zminimalizowania energii układu, dwuwarstwy reorganizują się spontanicznie, zamykając struktury lamelarne w szczelny pęcherzyk lipidowy [15–17]. Nanopęcherzyki zawierające wewnętrzny rdzeń wodny otoczony przez koncentrycznie rozmieszczone dwuwarstwy lipidowe określa się jako liposomy (Rys. 4).



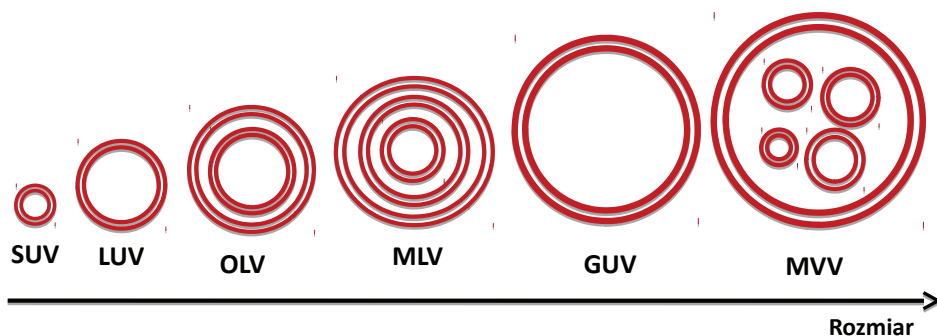
Rysunek 4. Przekrój pęcherzyka lipidowego zbudowanego z pojedynczej dwuwarstwy lipidowej

Figure 4. The cross-section of single bilayer lipid vesicle

W latach 60. ubiegłego wieku, Bangham jako pierwszy zaobserwował tworzenie liposomów w trakcie prowadzonych badań nad fosfolipidami i skrzepami krwi [16, 18, 20, 21]. Od tego momentu, są one przedmiotem szerokich badań w dziedzinie biochemii, medycyny, farmacji, kosmetologii i w technologii żywności. Liposomy z powodu podobieństwa strukturalnego i funkcjonalnego do naturalnych błon komórkowych, stały się nośnikami leków, antygenów, białek błonowych, sond diagnostycznych i innych związków chemicznych w transporcie do komórki docelowej [16–19].

Liposomy klasyfikuje się na podstawie rozmiaru i liczby dwuwarstw (Rys. 5):

- małe jednowarstwowe liposomy (ang. *Small Unilamellar Vesicles*, SUV), których średnica przyjmuje wartości z zakresu od 20 do 100 nm,
- duże jednowarstwowe liposomy (ang. *Large Unilamellar Vesicles*, LUV) o średnicy powyżej 100 nm,
- olbrzymie jednowarstwowe liposomy (ang. *Giant Unilamellar Vesicles*, GUV) o średnicy powyżej 1000 nm,
- kilkuwarstwowe liposomy (ang. *Oligolamellar Vesicles*, OLV), w których rdzeń wodny jest otoczony przez kilka centrycznie ułożonych dwuwarstw o średnicy 100–500 nm,
- wielowarstwowe liposomy (ang. *Multilamellar Vesicles* (MLV) zawierające znacznie większą liczbę dwuwarstw niż OLV, a ich średnica przekracza 500 nm,
- wielopęcherzykowe liposomy (ang. *Multivesicular Vesicles*, MVV) o średnicy przekraczającej 1000 nm, we wnętrzu których występuje kilka mniejszych liposomów.

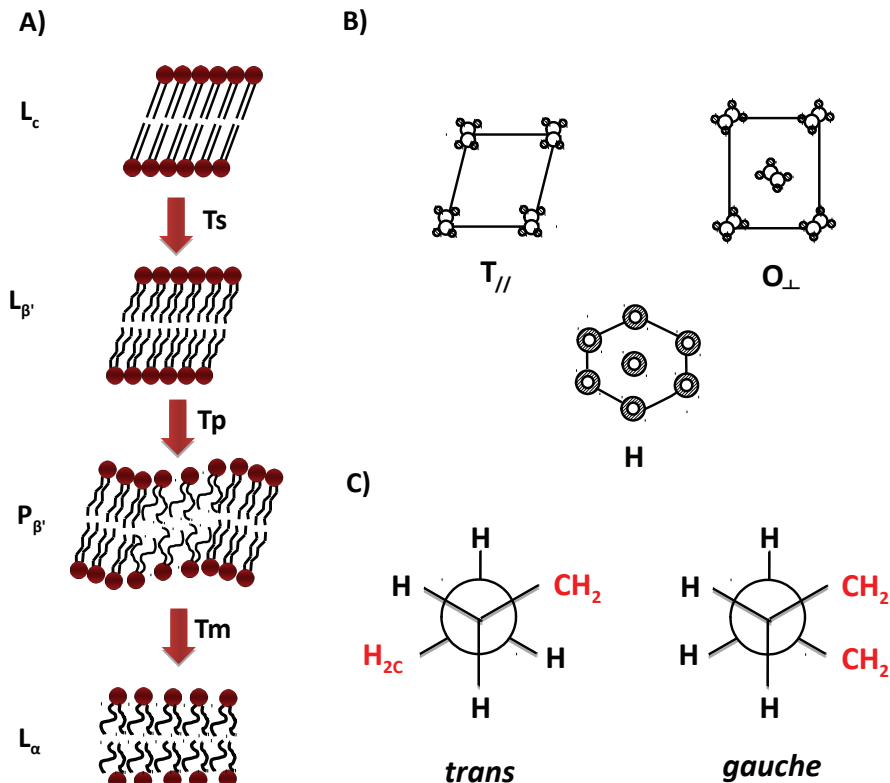


Rysunek 5. Klasyfikacja liposomów ze względu na rozmiar i liczbę dwuwarstw  
Figure 5. The classification of liposomes based on a size and a number of bilayers

### 1.3. PRZEJŚCIA FAZOWE DWUWARSTWY LIPIDOWEJ

Dwuwarstwy lipidowe wykazują duży polimorfizm strukturalny w funkcji temperatury. Temperaturowe przejścia fazowe są uwarunkowane cechami budowy cząsteczki lipidu, i tak np. wydłużenie łańcuchów węglowodorowych podwyższa temperaturę przejścia fazowego. Zasadnicze znaczenie w determinacji temperatury przejścia fazowego mają również: stopień nasycenia acylowych łańcuchów lipidowych, stopień hydratacji dwuwarstwy, kwasowość oraz obecność jonów, cząsteczek cukrów, aminokwasów i cholesterolu. W pełni uwodniona dwuwarstwa DPPC przechodzi przez trzy przejścia fazowe przy zmianie temperatury od 18 do 42°C (Tab. 1 i Rys. 6 A), podczas których dochodzi do zmiany parametrów upakowania (Rys. 6 B). W trakcie grzania wzrasta swoboda ruchu cząsteczek towarzyszy

wzrost uwodnienia. Proces ten wynika między innymi z osłabienia oddziaływań elektrostatycznych i van der Waalsa [22].



Rysunek 6. (A) Graficzna projekcja przejść termotropowych uwodnionych dwuwarstw DPPC, przedstawiona na podstawie danych z literatury [28–30]. (B) Rodzaje bocznej upakowania cząsteczek lipidowych w dwuwarstwie lipidowej: trójskośne ( $T_{//}$ ), ortorombowe ( $O_{\perp}$ ), heksagonalne (H) [26]. (C) Typy konformacji wiązań C-C łańcuchów alkilowych dwuwarstw lipidowych [31]

Figure 6. (A) Graphical representation of thermotropic transitions in fully hydrated DPPC bilayers based on the literature data [28–30]. (B) Lateral lipid chain-packing in a lipid bilayer: the triclinic ( $T_{//}$ ), the orthorhombic ( $O_{\perp}$ ), the hexagonal (H) [33]. (C) Conformations of C-C bonds in the lipid alkyl chains [31]

**Tabela 1.** Parametry termodynamiczne przejść fazowych dla uwodnionych dwuwarstw DPPC przedstawione na podstawie danych z literatury [14]

**Table 1.** The thermodynamic parameters of phase transitions in fully hydrated DPPC bilayers based on the literature data [14]

Typ przejścia fazowego	$L_c \rightarrow L_{\beta'}$	$L_{\beta'} \rightarrow P_{\beta'}$	$P_{\beta'} \rightarrow L_{\alpha}$
Temperatura (°C)	$18,8 \pm 3,1$	$34,4 \pm 2,5$	$41,3 \pm 3,1$
$\Delta H$ (kcal/mol)	$3,4 \pm 1,1$	$1,3 \pm 1,0$	$8,2 \pm 1,4$

W zakresie niskich temperatur, dwuwarstwa DPPC znajduje się w fazie krystalicznej oznaczanej w nomenklaturze Luzzatiego symbolem  $L_c$  (ang. *lamellar crystalline phase*) [23]. Faza  $L_c$  charakteryzuje się uporządkowanymi, wydłużonymi i sztywnymi lipidowymi łańcuchami węglowodorowymi, których nachylenie względem normalnej dwuwarstwy wynosi  $28^\circ$ . Ponadto, wszystkie łańcuchy węglowodorowe znajdują się w konformacji typu *all-trans*. Sztywna trójskośna ( $T_{||}$ ) symetria upakowania łańcuchów węglowodorowych efektywnie utrudnia rotację wzdłuż wiązań węgiel–węgiel [24, 25]. Ciasne ułożenie polarnych główek lipidowych ogranicza ich ruch i uniemożliwia penetrację cząsteczek wody w głąb dwuwarstwy [25]. Dalszy wzrost temperatury powoduje przemianę z fazy krystalicznej do fazy żelowej (ang. *lamellar gel phase*,  $L_\beta$ ), tzw. subprzejście ( $T_S$ ) [14]. Dochodzi wówczas do spadku uporządkowania i zmiany symetrii boczego upakowania cząsteczek lipidowych na ortorombowe ( $O_\perp$ ), gdzie kąt nachylenia łańcuchów alifatycznych względem normalnej dwuwarstwy wynosi  $32^\circ$  [25–27]. W wyniku rozluźnienia struktury rośnie poziom hydratacji części polarnej i przyrasta grubość dwuwarstwy z  $59 \text{ \AA}$  do  $64 \text{ \AA}$  [28]. Kolejny wzrost temperatury wywołuje pojawienie się w obrębie dwuwarstwy domen zawierających cząsteczki DPPC bogate w konformację *gauche* łańcuchów alifatycznych (Rys. 6 C). Powoduje to dalszy wzrost nieuporządkowania prowadzący do heksagonalnej symetrii upakowania (H). Stan ten charakteryzuje wzrost hydratacji, swobody rotacji w łańcuchach alifatycznych oraz zwiększenie grubości dwuwarstwy do wartości  $67 \text{ \AA}$  [35]. Tak przedstawioną fazę określa się mianem pofałdowanej fazy żelowej (ang. *rippled gel phase*,  $P_\beta$ ), a przemianę z  $L_\beta$  do  $P_\beta$  przedprzejściem [14, 25].

W temperaturze około  $41^\circ\text{C}$  dwuwarstwa DPPC ulega głównemu przejściu fazowemu i przechodzi do fazy ciekłokrystalicznej (ang. *liquid-crystalline phase*,  $L_\alpha$ ) [14]. Ta przemiana jest zdominowana topnieniem łańcuchów alkilowych. Wzrost liczby zagięć łańcucha alifatycznego (około 4–5 wiązań *gauche* na łańcuch) powoduje skrócenie ich długości i wzrost zajmowanej objętości [25], a także zaburzenie symetrii heksagonalnego upakowania lateralnego. W wyniku boczego rozprężenia dwuwarstwy staje się cieńsza ( $60 \text{ \AA}$ ) [28]. Ponadto, faza  $L_\alpha$  cechuje się największym stopniem nieuporządkowania, swobodą ruchu, rozluźnieniem warstw oraz dużą płynnością [25].

Błony biologiczne komórek żywych organizmów najczęściej występują w fazie ciekłokrystalicznej. Ich płynność jest regulowana zawartością różnych substancji takich jak: cholesterol lub woda. Płynność determinuje ruchliwość cząsteczek budujących błonę, których ruch może odbywać się na drodze dyfuzji rotacyjnej i lateralnej [14]. Dodatkowo, fosfolipidy mogą ulegać ruchowi typu „flipflop”, podczas którego mogą przemieszczać się między sąsiednimi monowarstwami [5].

#### 1.4. HYDRATACJA WARSTWY LIPIDOWEJ

Rodzaj i liczba faz termotropowych silnie zależy od stopnia uwodnienia dwuwarstwy lipidowej. Dehydratacja powoduje zanik fazy  $P_{\beta}$  i znaczne podwyższenie temperatury głównego przejścia fazowego ( $T_m$ ), która dla całkowicie odwodnionej dwuwarstwy zwanej także suchym filmem, wynosi  $99,3^{\circ}\text{C} \pm 3,3^{\circ}\text{C}$  [14]. Podwyższenie  $T_m$  o blisko  $58^{\circ}\text{C}$  jest wynikiem powstania sieci wiązań wodorowych w części polarnej dwuwarstwy. W oddziaływanie przez wiązanie wodorowe zaangażowany jest atom wodoru pochodzący od cholinowej grupy metylowej pierwszej cząsteczki DPPC i atom tlenu grupy drugiej cząsteczki DPPC. Konsekwencją utworzenia sieci międzycząsteczkowych wiązań wodorowych, jest reorientacja fragmentu cholinowego, który w suchym filmie DPPC ustawiony jest równoległe do powierzchni dwuwarstwy [32, 33].

W trakcie uwadniania suchego filmu, cząsteczki wody penetrują część polarną. Badania nad oddziaływaniem cząsteczek wody z fosfolipidami są zazwyczaj prowadzone z wykorzystaniem metod obliczeniowych [4, 33–35]. Cząsteczki wody zrywają sieć oddziaływań wodorowych między atomem wodoru części cholinowej i atomem tlenu części fosforanowej kolejnych cząsteczek lipidu. W wyniku uwolnienia, grupa cholinowa zmienia położenie i układa się prostopadle do powierzchni błony [34]. Obliczenia teoretyczne dla dwuwarstwy w fazie żelowej wykazały, że tlen grupy fosforanowej może tworzyć maksymalnie trzy wiązania wodorowe. Natomiast, z powodu bliskości części hydrofobowej, każdy atom tlenu fragmentu COPOC i grup C=O może tworzyć maksymalnie jedno wiązanie z wodą [35].

Jedna cząsteczka PC wchodząca w skład dwuwarstwy w fazie  $L_{\beta}$  może teoretycznie utworzyć do 11 wiązań wodorowych. Natomiast, dwuwarstwa w fazie ciekłokrystalicznej charakteryzuje się niemal dwa razy większą zawartością wody, 20,5 cząsteczek wody przypada na jedną cząsteczkę PC. Z kolei, cząsteczki wody mogą tworzyć mostki wewnątrzcząsteczkowe i międzycząsteczkowe. Pierwszy typ mostków powstaje poprzez oddziaływanie z dwoma atomami tlenu grupy fosforanowej jednej cząsteczki. Natomiast, w drugim przypadku formowany jest mostek typu PC-woda-PC [35]. Oddziaływania przez wiązanie wodorowe między wodą a cząsteczkami PC są stale zrywane i tworzone na nowo. Powstała w ten sposób dynamiczna sieć wiązań wodorowych stabilizuje strukturę przestrzenną warstwy lipidowej. Występowanie „mostków wodorowych” w strukturze dwuwarstwy PC potwierdzono w badaniach krystalograficznych [4, 34].

#### 1.5. WPŁYW KWASOWOŚCI I SIŁY JONOWEJ NA STRUKTURĘ DWUWARSTWY LIPIDOWEJ

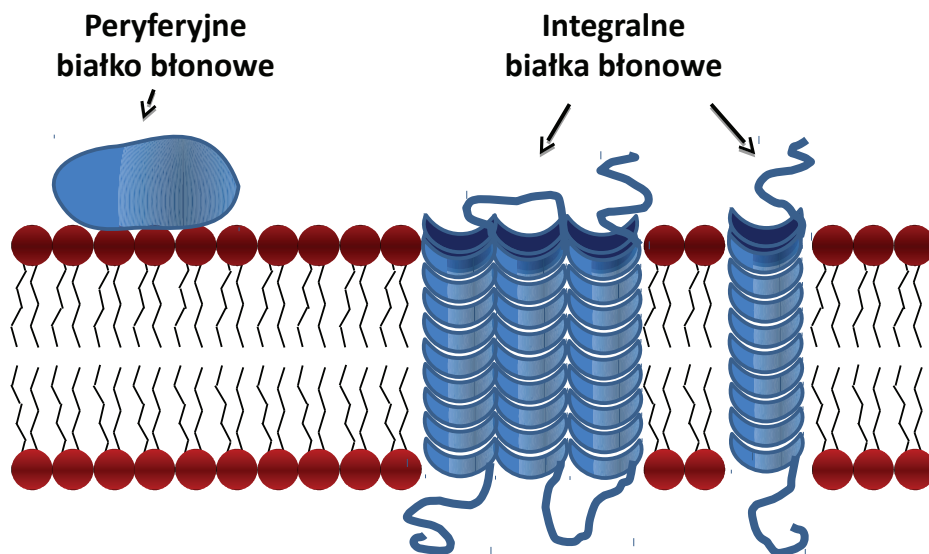
Struktura i własności fizyczne błon lipidowych są modyfikowane przez zmianę kwasowości i siły jonowej otaczającego je medium [36]. W obrębie dwuwarstwy zbudowanej z cząsteczek PC, gęstość elektronowa jest ulokowana na atomie tlenu części

fosforanowej, natomiast w części cholinowej występuje deficyt elektronów. Taka separacja ładunków powoduje, że część polarna cząsteczki PC przy pH neutralnym występuje w postaci jonu obojnaczego (zwitterjonu) [37]. Obniżenie wartości pH prowadzi do zniesienia zwitterjonowej postaci cząsteczek PC w wyniku protonacji grupy  $-\text{PO}_2^-$  ( $\text{pK} = 3,8-4,0$ ) [38, 39]. Cząsteczki PC stają się wówczas dodatnio naładowane na atomie azotu grupy cholinowej, co powoduje ich wzajemne odpychanie [40]. Te niekorzystne siły odpychające są kompensowane przez wiązania wodorowe typu  $\text{PO}\cdots\text{HOP}$ , tworzone między sprotonowanymi grupami fosforanowymi kolejnych cząsteczek PC [14]. Powstała sieć wiązań wodorowych stabilizuje błonę lipidową poprzez zmniejszenie efektywności odpychania między dodatnio naładowanymi główkami [40], to z kolei prowadzi do zwiększenia siły oddziaływań van der Waalsa między hydrofobowymi łańcuchami alifatycznymi. O dominacji oddziaływań przyciągających nad odpychającymi w obrębie dwuwarstwy PC świadczy fakt podwyższenia temperatury głównego przejścia fazowego błony lipidowej w wyniku wzrostu kwasowości układu [14]. Jednym z dowodów na obecność wiązań wodorowych typu  $\text{PO}\cdots\text{HOP}$  jest ograniczenie dyfuzji cząsteczek PC w obrębie dwuwarstwy lipidowej [41].

Ważnymi czynnikami zmieniającymi właściwości fizykochemiczne błony są jony jedno- i dwuwartościowe, które występują w naturalnej błonie lipidowej. Sposób oddziaływania błona-jony jest regulowany m.in. przez zmianę wartości pH. Zmiany wartości pH cytosolu stymulują wzrost i rozwój komórki oraz regulują oddziaływania elektrostatyczne matrycy lipidowej z jonami (m.in.  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Na}^+$  i  $\text{Cl}^-$ ) w wielu procesach biologicznych. Przykładowo, gdy wartość pH medium jest większa od  $\text{pK}_{a,1}$  cząsteczki DPPC, jon  $\text{Ca}^{2+}$  wchodzi w oddziaływanie z błoną i inicjuje jej fuzję. Kation wapnia wypiera cząsteczki wody z mostka pomiędzy dwoma grupami  $\text{PO}_2^-$  sąsiednich cząsteczek PC i prowadzi do reorientacji polarnej główki [42]. Powstały kompleks  $\text{PC}-\text{Ca}^{2+}$  powoduje lokalną dehydratację i zwiększenie uporządkowania struktury lipidowej. Wpływ kationu wapnia na własności fizyczne dwuwarstwy silnie uwarunkowany jest jego stężeniem [43], i tak, przy stężeniach jonu  $\text{Ca}^{2+}$  większych od 10 mM następuje zanik przedprzejścia i wzrost temperatury głównego przejścia fazowego do  $43^\circ\text{C}$  w wyniku stabilizacji struktury błony lipidowej [44]. Jony jednowartościowe (np.  $\text{Na}^+$  i  $\text{Cl}^-$ ) mają znacznie mniejszy wpływ na błonę i zaburzają strukturę warstwy dopiero przy stężeniach powyżej 300 mM [45, 46]. Z powodu niewielkiego promienia van der Waalsa, jony sodu penetrują dwuwarstwę i akumulują się w części glicerynowej. Oddziaływanie  $\text{Na}^+$  z tlenem grupy karboksylowej redukuje mobilność kompleksu. Jony  $\text{Cl}^-$  pozostają w oddziaływaniu z atomem azotu części cholinowej [45, 46]. Wykazano, że obecność jonu chloru na powierzchni dwuwarstwy lipidowej zmienia ustawienie części hydrofilowej, jednak nie ma wpływu na jej własności fizyczne [46].

## 2. BIAŁKA BŁONOWE

Strukturę błony biologicznej określa dwuwarstwa cząsteczek lipidowych, natomiast w jej charakterystycznych funkcjach takich jak np. transport cząsteczek, przekazywanie informacji biologicznej i przemiana energii, uczestniczą białka błonowe [1, 10]. Powszechnie w literaturze [1, 6, 10] stosuje się podział białek błonowych na białka integralne oraz białka powierzchniowe (peryferyjne), które różnią się sposobem związania z błoną lipidową (Rys. 7).



Rysunek 7. Sposób oddziaływania białek błonowych z błoną lipidową  
Figure 7. Interactions of the membrane proteins with the lipid membrane

### 2.1. BIAŁKA INTEGRALNE

Białka integralne różnicują się pod względem stopnia osadzenia w matrycy lipidowej. Liczną grupę stanowią białka transbłonowe, które przechodzą jeden lub kilka razy poprzez dwuwarstwę lipidową, w taki sposób, że ich fragmenty hydrofilowe mają kontakt z płynem zewnątrzkomórkowym i cytozolem, natomiast fragmenty hydrofobowe oddziałują z apolarnym wnętrzem dwuwarstwy lipidowej. Niektóre białka błonowe są osadzone częściowo jedynie w monowarstwie błony. Najbardziej powszechnym błonowym motywem strukturalnym występującym w białkach integralnych jest amfipatyczna ahelisa. Jej hydrofobowa powierzchnia utworzona z apolarnych reszt bocznych otacza szkielet polipeptydowy spięty wiązaniami wodorowymi w spiralny kształt [1, 6, 10]. Z powodu współzawodnictwa cząsteczek wody w tworzeniu wiązań wodorowych pomiędzy grupami  $-NH$  i  $-C=O$ ,  $\alpha$ -helisa jest bardziej stabilna w środowisku węglowodorowym niż wodnym. Obecność błono-



wego fragmentu heliakalnego można przewidzieć na podstawie sekwencji aminokwasów w łańcuchu polipeptydowym białka. Do jej identyfikacji służy zmiana wartości wolnej energii przeniesienia danego aminokwasu ze środowiska apolarnego do wodnego. Jej dodatnia wartość wskazuje, że przeniesienie helisy zbudowanej tylko z np. fenyloalaniny z hydrofobowego wnętrza błony do środowiska wodnego byłoby termodynamicznie niekorzystne. Natomiast, transfer do środowiska polarnego byłby bardzo korzystny energetycznie dla helisy zbudowanej wyłącznie z argininy, ponieważ wartość wolnej energii przeniesienia jest w tym przypadku ujemna [47].

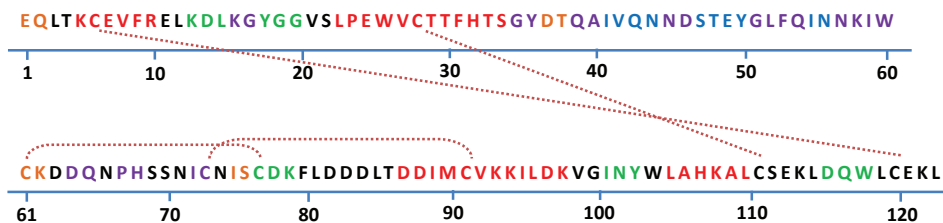
## 2.2. PERYFERYJNE BIAŁKA BŁONOWE: $\alpha$ -LAKTOALBUMINA

W odróżnieniu do białek integralnych, białka peryferyjne można wydzielić z błony stosując czynniki, które nie niszczą struktury dwuwarstwy lipidowej (np. zmiana wartości pH). Białka powierzchniowe wiążą się z błoną najczęściej w wyniku oddziaływania elektrostatycznego z polarną częścią fosfolipidów [1, 6, 10].

Do białek peryferyjnych należy  $\alpha$ -laktoalbumina ( $\alpha$ -LA) [48]. Tą metaloproteinę cechuje globularna struktura trzeciorzędowa oraz niska masa cząsteczkowa: 14,2 kDa [49].  $\alpha$ -Laktoalbumina odgrywa zasadniczą rolę w wielu procesach biologicznych. Przede wszystkim, uczestniczy w końcowym etapie biosyntezy laktozy w gruczołach sutkowych ssaków. Na błoniastej powierzchni aparatu Golgiego,  $\alpha$ -laktoalbumina tworzy kompleks enzymatyczny z galaktozylotransferazą (GT), który katalizuje reakcję urydynodwufosforanu galaktozy (UDP-Gal) z glukozą. Produktem tej reakcji jest laktoza [49, 50].

### 2.2.1. Natywna postać $\alpha$ -laktoalbuminy

Pierwszorzędowa struktura bydłczej  $\alpha$ -laktoalbuminy stanowi łańcuch polipeptydowy zbudowany z 123 aminokwasów, zakończony resztą kwasu glutaminowego (końcowa grupa aminowa przy N-koniec) i resztą leucyny (końcowa grupa karboksylowa, C-koniec). W sekwencji aminokwasowej bydłczej  $\alpha$ -laktoalbumina występuje osiem reszt cysteinowych świadczących o obecności wiązań disiarczkowych (Rys. 8), które utrzymują globularną strukturę białka [51, 52].



Rysunek 8. Sekwencja reszt aminokwasowych natywnej  $\alpha$ -laktoglobuliny pochodzącej z krowiego mleka (Źródło: RCSB Protein Data Bank, PDB ID: 1F6S) [52]. Elementy struktury drugorzędowej: ahelisa (kolor czerwony),  $\beta$ -kartka (kolor niebieski),  $\beta$ -zgięcia (kolor pomarańczowy), helisa  $3_{10}$  (kolor zielony), pętla (kolor fioletowy), mostek dwusiarczkowy (czerwona linia przerywana)

Figure 8. The amino acid sequence of the native bovine  $\alpha$ -lactoglobulin (RCSB Protein Data Bank, PDB ID: 1F6S) [52]. Secondary structural elements: ahelix (red),  $\beta$ -sheet (blue),  $\beta$ -turn (orange),  $3_{10}$ -helix (kolor green), loop (violet), disulfide bond (red dotted line)

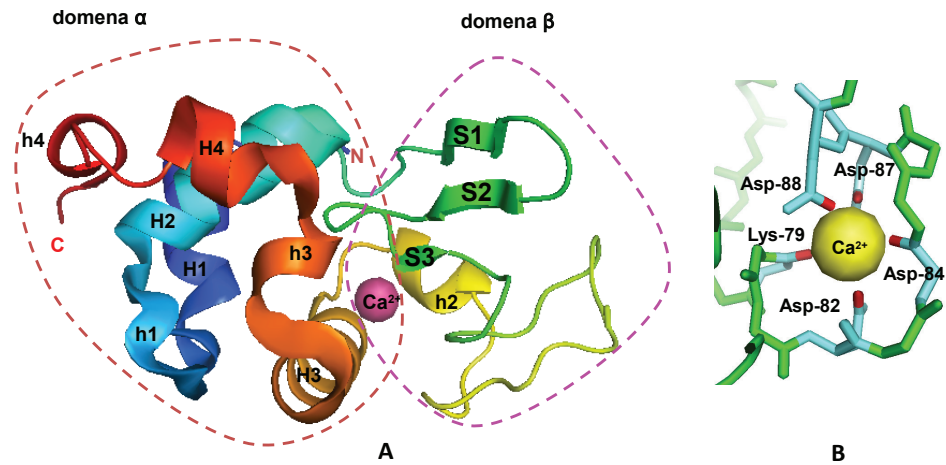
$\alpha$ -Laktoalbumina jest genetycznie i strukturalnie homologiczna do lizozymu typu c. Trójwymiarowa struktura wyznaczona na podstawie rentgenografii strukturalnej potwierdziła podobieństwo drugorzędowych struktur  $\alpha$ -laktoalbuminy i lizozymu typu c. Pomimo tego, ich struktura pierwszorzędowa jest identyczna jedynie w 40%. Ta odmienność jest ściśle związane ze specyficzną rolą  $\alpha$ -laktoalbuminy w syntezie laktozy [49, 51, 52].

Postać natywnej  $\alpha$ -laktoalbuminy jest zdefiniowana przez dwie domeny (Rys. 9A). Większa jest domeną ahelikalną, której reszty aminokwasowe należące do obu końcowych odcinków łańcucha polipeptydowego (tj. reszty od pozycji 1 do 34 i od 86 do 123) układają się w przestrzenne formy czterech klasycznych ahelisy typu  $3_6$ <sub>13</sub> (H1: reszty 511, H2: 2334, H3: 8698, H4: 105109) i trzech krótszych helisy typu  $3_{10}$  (h1: reszty 1820, h3: 101104, h4: 115118). Mniejszą domeną jest  $\beta$ -domena, którą budują reszty aminokwasowe od pozycji 35 do pozycji 85 zorganizowane w następujące struktury: trójsegmentową, antyrównoległą  $\beta$ -kartkę (S1: reszty 4144, S2: 4750, S3: 5556) oraz krótką  $3_{10}$ -helisę (h2: reszty 7780). Te dwie domeny spinają cztery mostki cysteinowe utworzone między resztami: 6120, 6177, 7391 i 28111. Obecność wiązań CysCys oraz koordynacja kationów metali stabilizuje strukturę  $\alpha$ LA. Miejsce wiązania jonu wapnia stanowi pętla utworzona przez dwa mostki disiarczkowe (Cys73-Cys91 i Cys61-Cys77) pomiędzy ahelisą (H3, adomena) i  $3_{10}$ -helisą (h2,  $\beta$ -domena). Motyw wiążący wapń w cząsteczce  $\alpha$ -laktoalbuminy jest krótszy od typowego fragmentu helisa-pętla-helisa charakterystycznego dla rodziny białek typu „EFhand” [49, 52, 53]. Stała asocjacji jonu  $\text{Ca}^{2+}$  dla bydłowej  $\alpha$ -laktoalbuminy wyznaczona w temperaturze 20–25°C przy pH 7 wynosi  $3 \times 10^8 \text{ M}^{-1}$  [49].

Rysunek 9B przedstawia fragment struktury  $\alpha$ -laktoalbuminy stanowiący miejsce wiązania jonu  $\text{Ca}^{2+}$ . Bezpośrednio w koordynacji biorą udział tleny grup karboksylowych reszt Asp82, Asp87 i Asp88 oraz tleny grup karbonylowych reszt Lys79 i Asp84 tworzących szkielet polipeptydowy. Ponadto, w wiązaniu kationu wapnia uczestniczą dwie cząsteczki wody, które są rozlokowane przestrzennie formując zaburzoną bipiramidę pentagonalną. Odległości pomiędzy jonem wapnia i

atomami tlenu białkowego liganda znajdują się w przedziale 2.302.40 Å. Częsteczka  $\alpha$ -laktoalbuminy z jodem  $\text{Ca}^{2+}$  określana jest jako forma *holo* [49, 52].

Usunięcie jonu wapnia z cząsteczki *holo*  $\alpha$ -laktoalbuminy np. za pomocą odczynnika EDTA, powoduje pojawienie się niekorzystnych oddziaływań reszt Asp w kieszeni koordynacyjnej. Lokalny nadmiar ładunku wymusza zmianę strukturalną, podczas której dochodzi do reorganizacji  $\alpha$ -helisy H3 i uformowania tzw. formy *apo* [52,54]. Oba izomery różnią się pod względem stabilności termicznej, którą odzwierciedla temperatura przejścia ( $T_m$ ) ze stanu natywnego do zdenaturowanego. Wartość  $T_m$  dla formy *apo* wynosi 34°C, z kolei dla formy *holo* jest o 30°C wyższa i wynosi 64°C [54].



Rysunek 9. (A) Wizualizacja drugorzędowej struktury natywnej *holo*  $\alpha$ -laktoalbuminy pochodzącej z krowiego mleka (Źródło: RCSB Protein Data Bank, PDB ID: 1F6S) [52]. (B) Wyodrębniony fragment struktury  $\alpha$ -laktoalbuminy stanowiący miejsce koordynowania jonu wapnia. Atomy tlenu z terminalnych grup reszt aminokwasowych uczestniczących w koordynacji oznaczono kolorem czerwonym. W projekcji nie uwzględniono cząsteczek wody [52]

Figure 9. (A) A visualisation of secondary structure of the native bovine  $\alpha$ -lactoglobulin (RCSB Protein Data Bank, PDB ID: 1F6S) [52]. (B) The calcium ion-binding side of the  $\alpha$ -lactoglobulin. Oxygens from terminal groups of amino acid residues involved in the coordination of  $\text{Ca}^{2+}$  are marked in red. The projection does not include water molecules [52]

### 2.2.2. Forma „stopionej globuli”

Natywną cząsteczkę  $\alpha$ -laktoalbuminy zarówno w postaci *holo* jak i *apo*, można przeprowadzić w formę nazywaną potocznie „stopioną globulą” (z ang. *molten globule*, MG) lub postacią częściowego statystycznego kłębka globuli działając takimi czynnikami, jak: silne czynniki denaturacyjne (np. mocznik, chlorowodorek guanidyny) w średnich stężeniach, wysoka temperatura czy zakwaszenie środowiska. Forma stopionej globuli posiada kompaktową strukturę drugorzędową zbliżoną do postaci natywnej oraz jedynie zarys struktury trzeciorzędowej z nieuporządkowanymi i ruchliwymi łańcuchami bocznymi [49]. Konsekwencją braku upakowanej

struktury trzeciorzędowej jest wzrost promienia cząsteczki białka, który podczas przejścia z postaci natywnej do stanu stopionej globuli zmienia się od 15.7 Å do 17.2 Å. Rozluźnienie białka w stanie stopionej globuli ułatwia penetrację cząsteczek wody w głąb jego struktury powodując znaczny wzrost uwodnienia [53].

W wyniku działania czynnika denaturującego, natywna forma białka ulega częściowemu rozpleceniu. Wzrost odległości między łańcuchami bocznymi osłabia siłę oddziaływań van der Waalsa, które stabilizują strukturę trzeciorzędową białka. Związany z tym procesem wzrost energii układu jest bilansowany przez przyrost entropii towarzyszący zwiększeniu amplitudy ruchów międzycząsteczkowych. Jednocześnie w wyniku działania sił hydrofobowych, apolarne łańcuchy boczne są izolowane od środowiska wodnego. Oddziaływania hydrofobowe stabilizują strukturę stopionej globuli [49, 55]. Postać stopionej globuli jest uważana za trzeci stan termodynamiczny oddzielony barierą energetyczną od postaci natywnej (N) i rozfałdowanej (U) białka [56]:



Podobna sytuacja może zachodzić w żołądku noworodka karmionego piersią, gdzie  $\alpha$ -laktoalbumina pochodząca z mleka matki przechodzi w środowisku kwasów żołądkowych w formę kwasowej stopionej globuli i wiąże się z kwasem oleinowym powstałym w wyniku hydrolizy trójglicerydów katalizowanej przez lipazy. W tak utworzonym kompleksie stabilizowanym kwasem oleinowym forma stopionej globuli  $\alpha$ -laktoalbuminy w określonych warunkach selektywnie indukuje apoptozę komórek nowotworowych i jest szczególnie skuteczna w walce z czerniakiem i białaczką [53, 57–59]. Kompleks ten jest znany pod nazwą HAMLET (ang. *human  $\alpha$ -lactalbumin made lethal to tumor cells*) i porównywany jest do mitycznej Hydry Lernejskiej, ponieważ atakuje jednocześnie najważniejsze organelle komórki nowotworowej. Działanie przeciwnowotworowe wykazuje również kompleks kwasu oleinowego z  $\alpha$ -laktoalbuminą otrzymaną z krowiego mleka, który określa się mianem BAMLET (ang. *bovine  $\alpha$ -lactalbumin made lethal to tumor cells*) [60]. Stwierdzono, że decydującym momentem w procesie apoptozy jest wiązanie kompleksu HAMLET z powierzchnią błony komórkowej, po którym następuje jego szybka internalizacja przez komórkę nowotworową, gdzie wyniszcza strukturę chromatyny oraz powoduje fragmentację DNA.

Oddziaływanie błona – białko w stanie stopionej globuli, które zachodzi tylko na poziomie zewnętrznej hydrofilowej warstwy błony, jest traktowane jako czynnik, który w głównej mierze decyduje o ataku kompleksu HAMLET na organelle komórki nowotworowej [59]. Za słusznością przedstawionej tezy przemawia fakt, że natywna postać  $\alpha$ -laktoalbuminy wyizolowana z serwatki ludzkiego mleka, nie wywołuje apoptozy komórkowej. Autorzy pracy [59] wskazują, że różnice pomiędzy aktywnością biologiczną formy natywnej i stopionej globuli wynikają z odmiennej struktury trzeciorzędowej. Przypuszcza się więc, że dzięki stabilizacji stanu stopio-

nej globuli cząsteczką kwasu oleinowego, białko  $\alpha$ LA może skutecznie oddziaływać z błoną lipidową komórki nowotworowej.

### 2.2.3. Oddziaływanie $\alpha$ -laktoalbuminy z modelową błoną lipidową

Kluczowym momentem apoptozy komórek nowotworowych przez kompleks HAMLET oraz regulacji laktogenezy jest specyficzne oddziaływanie  $\alpha$ -laktoalbuminy w formie stopionej globuli z błoną biologiczną. Powinowactwo  $\alpha$ -laktoalbuminy do błony może być modyfikowane odmiennym składem lipidowym błon komórek nowotworowych, jak również czynnikami zewnętrznymi, np. kwasowością i temperaturą [61, 62]. W neutralnym pH  $\alpha$ -laktoalbumina zachowuje się jak białko peryferyjne, które z powodu niskiej aktywności powierzchniowej oddziałuje jedynie z zewnętrzną powierzchnią dwuwarstwy lipidowej w wyniku sił elektrostatycznych. W tej sytuacji penetracja błony jest jedynie możliwa w temperaturze bliskiej temperaturze głównego przejścia fazowego charakterystycznej dla fosfatydylocholin. Redukcja wartości pH, prowadzi do przejścia białka ze stanu natywnego do stanu kwasowej stopionej globuli, podczas którego  $\alpha$ -helisy stają się coraz bardziej wyeksponowane w kierunku powierzchni błony. Wówczas, dominującą rolę odgrywają oddziaływania hydrofobowe, które promują integrację białka z wnętrzem dwuwarstwy lipidowej [62].

Warto podkreślić fakt, że w pewnych zakresach stężeń  $\alpha$ -laktoalbumina prowadzi do rozbicia dwuwarstwy lipidowej w wyniku oddziaływań  $\alpha$ -helisy z apolarnym wnętrzem błony. W literaturze przedstawiono dwie koncepcje dotyczące hipotetycznego kształtu powstałych systemów. Według Hanssens i współpracownicy [63]  $\alpha$ -laktoalbumina solubilizuje błonę lipidową i uczestniczy w powstaniu małych micelarnych układów, w których hydrofobowa powierzchnia  $\alpha$ -helisy jest odseparowana od roztworu wodnego monowarstwą lipidową. Swoją teorię oparli na obserwacji znacznej redukcji rozproszenia światła dla próbki liposomy/ $\alpha$ -laktoalbumina o pH 4 i 2 przy stosunku molowym obu komponentów w zakresie od 50 do 200.

Dla porównania, Segrest [64] w swoich rozważaniach nad prawdopodobną geometrią asocjatu amfipatycznych  $\alpha$ -helis z pęcherzykami lipidowymi zaproponował, że powstały kompleks ma kształt dysku. W centrum tarczy znajduje się dwuwarstwa lipidowa a na jej krawędziach hydrofobowe łańcuchy alkilowe są ekranowane przez amfipatyczne  $\alpha$ -helisy.

## UWAGI KOŃCOWE

Błonowe układy białkowo-lipidowe wykazują różnorodność w swej strukturze. Stan konformacyjny białek błonowych oraz struktura dwuwarstw lipidowych silnie na siebie wpływają, modyfikując się wzajemnie. To determinuje właściwości biologiczne układów błonowych oraz umożliwia ich regulację. Błonowe białko

$\alpha$ -laktoalbuminy wykazuje zdolność do przyjmowania różnych form strukturalnych, m.in. stopionej globuli, które określają jego aktywność biologiczną, np. przeciwnowotworową w kompleksie HAMLET/BALMET. Specyficzne oddziaływanie kompleksu kwasowej stopionej globuli  $\alpha$ -laktoalbuminy z kwasem oleinowym na komórki nowotworowe jest najprawdopodobniej podyktowane odmienną i specyficzną dla komórek nowotworowych strukturą i składem lipidowym błon komórkowych. Dodatkowo, zmieniając czynniki zewnętrzne, takie jak temperatura, pH, uwodnienie, siła janova itd., następuje regulacja aktywności biologicznej układów błonowych poprzez zmianę ich właściwości fizykochemicznych.

### PODZIĘKOWANIE

Autorzy pracy pragną podziękować Narodowemu Centrum Nauki za wsparcie finansowe otrzymane w ramach dwóch grantów OPUS o numerach 2015/17/B/ST4/03717 i 2012/05/B/ST4/02029.

### PIŚMIENNICTWO CYTOWANE

- [1] G. Karp, *Cell and molecular biology: concepts and experiments*, John Wiley, 2010.
- [2] S.J. Singel, G.L. Nicolson, *Science*, 1972, **175**, 720.
- [3] K. Sugano, *Artificial Membrane Technologies to Assess Transfer and Permeation of Drugs in Drug Discovery*, [w:] John B. Taylor, David J. Triggle, *Comprehensive Medicinal Chemistry*, tom II, Elsevier, 2007.
- [4] M. Pasenkiewicz-Gierula, *KOSMOS*, 2009, **58**, 49.
- [5] E.P. Solomon, L.R. Berg, D.W. Martin, *Biology*, Thomson Books/Cole, Belmont USA 2008.
- [6] B. Alberts, *Podstawy biologii komórek 2*, Wydawnictwo Naukowe PWN, Warszawa 2005.
- [7] K. Dołowy, A. Szewczyk, S. Pikuła, *Błony biologiczne*, Wydawnictwo „Śląsk”, Katowice – Warszawa 2003.
- [8] J. Ulander, A.D.J. Haymet, *Biophys. J.*, 2003, **85**, 3475.
- [9] A. Kozubek, A.F. Sikorski, J. Szopa, *Molekularna organizacja komórek*, tom II, *Lipidy, liposomy i błony biologiczne*, Wydawnictwo Uniwersytetu Wrocławskiego, Wrocław 1996.
- [10] L. Stryer, *Biochemia*, Wydawnictwo Naukowe PWN, Warszawa 2003.
- [11] G. Tresset, *PMC Biophysics*, 2009, **2**, 1.
- [12] C. Chipot, M.L. Klein, M. Tarek, *Modeling lipid membranes*, [w:] *Handbook of Materials Modeling*, S. Yip (red.), Springer, Netherlands 2005.
- [13] D.E. Vance, J.E. Vance, *Biochemistry of Lipids, Lipoproteins and Membranes*, Elsevier, 2008.
- [14] R. Koynova, M. Caffrey, *Biochim. Biophys. Acta*, 1998, **1376**, 91.
- [15] B. Alberts, A. Johnson, J. Lewis, *Molecular Biology of the Cell*, Garland Science, New York 2002.
- [16] A. Laouini, C. Jaafar-Maalej, I. Limayem-Blouza, S. Sfar, C. Charcosset, H. Fessi, *J. Colloid Sci. Biotechnol.*, 2012, **1**, 147.
- [17] Y. P. Patil, S. Jadhav, *Chem. Phys. Lipids*, 2014, **177**, 18.
- [18] D. Bitounis, R. Fanciullino, A. Iliadis, J. Ciccolini, *ISRN Pharm.*, 2012, **2012**, 1.
- [19] V.V. Mody, M.I. Nounou, M. Bikram, *Adv. Drug Deliv. Rev.*, 2009, **61**, 795.
- [20] A.D. Bangham, *Adv. Lipid Res.*, 1963, **1**, 63.

- [21] G. Sessa, G. Weissmann, *J. Lipid Res.*, 1968, **9**, 310.
- [22] D. Chapman, *Q. Rev. Biophys.*, 1975, **8**, 185.
- [23] A. Tardieu, V. Luzzati, F. C. Reman, *J. Mol. Biol.*, 1973, **75**, 711.
- [24] T. Le Bihan, M. Pézolet, *Chem. Phys. Lipids*, 1998, **94**, 13.
- [25] R.N.A.H. Lewis, R.N. McElhaney, *The Mesomorphic Phase Behavior of Lipid Bilayers*, [w:] *The Structure of Biological Membranes*, P. L. Yeagle (red), CRC Press, 2005.
- [26] D. Marsh, *Chem. Phys. Lipids*, 2012, **165**, 59.
- [27] S. Tristram-Nagle, R. Zhang, R.M. Suter, C.R. Worthington, W.J. Sun, J.F. Nagle, *Biophys. J.*, 1993, **64**, 1097.
- [28] D.M. Small, R.A. Zoeller, *Lipids, Structure and Biochemistry of*, [w:] *Encyclopedia of Human Biology*, Tom 4, Academic Press, Inc., 1991, 725.
- [29] M. Kranenburg, B. Smit, *J. Phys. Chem. B*, 2005, **109**, 6553.
- [30] J.M. Rodgers, J. Sørensen, F.J.-M. de Meyer, B. Schiøtt, B. Smit, *J. Phys. Chem. B*, 2012, **116**, 1551.
- [31] M. Eeman, M. Deleu, *Biotechnol. Agron. Soc. Environ.*, 2010, **14**, 719.
- [32] T. Kaasgaard, C.J. Drummond, *Phys. Chem. Chem. Phys.*, 2006, **8**, 4957.
- [33] J. Yin, Y.-P. Zhao, *J. Colloid Interface Sci.*, 2009, **329**, 410.
- [34] U. Essmann, L. Perera, M.L. Berkowitz, *Langmuir*, 1995, **11**, 4519.
- [35] M. Pasenkiewicz-Gierula, Y. Takaoka, H. Miyagawa, K. Kitamura, A. Kusumi, *J. Phys. Chem. A*, 1997, **101**, 3677.
- [36] H. Träuble, M. Teubner, P. Woolley, H. Eibl, *Biophys. Chem.*, 1976, **4**, 319.
- [37] M. Langner, K. Kubica, *Chem. Phys. Lipids*, 1999, **101**, 3.
- [38] A. Lucero, M.R. Rodríguez Niño, A.P. Gunning, V.J. Morris, P.J. Wilde, J.M. Rodríguez Patino, *J. Phys. Chem. B*, 2008, **112**, 7651.
- [39] A. Lucero Caro, A.R. Mackie, A.P. Gunning, P.J. Wilde, V.J. Morris, M.R. Rodríguez Niño, J.M. Rodríguez Patino, *Role of Electrostatic Interactions on Molecular Self-Assembly of Protein + Phospholipid Films at the Air-Water Interface*, [w:] *Food Colloids: Self-assembly and Material Science*, E. Dickinson, M.E. Leser (Red.), Royal Society of Chemistry, Cambridge 2007.
- [40] S. Furuike, V.G. Levadny, S.J. Li, M. Yamazaki, *Biophys. J.*, 1999, **77**, 2015.
- [41] R. Zimmermann, D. Küttner, L. Renner, M. Kaufmann, J. Zitzmann, M. Müller, *Biointerphases*, 2009, **4**, 1.
- [42] N.N. Casillas-Ituarte, X. Chen, H. Castada, H.C. Allen, *J. Phys. Chem. B*, 2010, **114**, 9485
- [43] Z.K. Issa, Ch.W. Manke, B.P. Jena, J.J. Potoff, *J. Phys. Chem. B*, 2010, **114**, 13249.
- [44] M.G. Ganesan, D.L. Schwinke, N. Weiner, *Biochim. Biophys. Acta Biomembranes*, 1982, **686**, 245.
- [45] R.A. Böckmann, A. Hac, T. Heimburg, H. Grubmüller, *Biophys. J.*, 2003, **85**, 1647.
- [46] A.A. Gurtovenko, *J. Chem. Phys.*, 2005, **122**, 244902.
- [47] D.M. Engelman, T.A. Steitz, A. Goldman, *Ann. Rev. Biophys. Biophys. Chem.*, 1986, **15**, 321.
- [48] A.V. Agasøster, Ø. Halskau, E. Fuglebakk, N.Å. Frøystein, A. Muga, H. Holmsen, A. Martinez, *J. Biol. Chem.*, 2003, **278**, 21790.
- [49] E.A. Permyakov, *αLactalbumin*, Nova Science Publishers, Inc., Nowy York 2005.
- [50] N.J. Kuhn, D.T. Carrick, C.J. Wilde, *J. Dairy Sci.*, 1980, **63**, 328.
- [51] K. Brew, F.J. Castellino, T.C. Vanaman, R.L. Hill, *J. Biol. Chem.*, 1970, **245**, 4570.
- [52] E.D. Chrysinia, K. Brew, K.R. Acharya, *J. Biol. Chem.*, 2000, **275**, 37021.
- [53] K. Kuwajima, *FASEB J.*, 1996, **10**, 102.
- [54] R. Wijesinha-Bettoni, C.M. Dobson, C. Redfield, *J. Mol. Biol.*, 2001, **312**, 261.
- [55] O.B. Ptitsyn, *Biochemistry*, 1997, **63**, 367.
- [56] O.B. Ptitsyn, V.N. Uversky, *FEBS Lett.*, 1994, **341**, 15.
- [57] K.H. Mok, J. Pettersson, S. Orrenius, C. Svanborg, *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, 2007, **354**, 1.

- [58] L. Gustafsson, O. Hallgren, A.-K. Mossberg, J. Pettersson, W. Fischer, A. Aronsson, C. Svanborg, *J. Nut.*, 2005, **135**, 1299.
- [59] M. Svensson, A. Håkansson, A.-K. Mossberg, S. Linse, and C. Svanborg, *PNAS*, 2000, **97**, 4221.
- [60] J. Król, A. Litwińczuk, A. Zarajczyk, Z. Litwińczuk, *Medycyna Wet.*, 2008, **64**, 1375.
- [61] I. Hanssens, C. Houthuys, W. Herreman, F.H. van Cauwelaert, *Biochim. Biophys. Acta*, 1980, **602**, 539.
- [62] W. Herreman, P. van Tornout, F.H. van Cauwelaert, I. Hanssens, *Biochim. Biophys. Acta*, 1981, **640**, 419.
- [63] I. Hanssens, J.C. van Ceunebroeck, H. Pottel, G. Preaux, F. van Cauwelaert, *Biochim. Biophys. Acta*, 1985, **817**, 154.
- [64] J.P. Segrest, *Chem. Phys. Lipids*, 1977, **18**, 7.

Praca wpłynęła do Redakcji 11 grudnia 2016