



## Syntaza cytrynianowa – zasadniczy enzym metabolizmu każdej komórki

Małgorzata Robak

Katedra Biotechnologii i Mikrobiologii Żywności  
Akademia Rolnicza, Wrocław

### Citrate Synthase – Key Enzyme of Every Cell

#### Summary

This article reviews the current knowledge on the key cellular enzyme: citrate synthase [E.C.4.1.3.7]. The paper includes the description of genes, protein and active site structures, multienzyme complex formation, cellular functions and kinetic parameters. Some possible biotechnological application are presented.

#### Key words:

citrate synthase, gene, structure, function, multienzyme complex.

### 1. Wstęp

Stosowane w biotechnologii nowoczesne metody analizy genu i proteomu, a także możliwość wykorzystania programów komputerowych do symulacji reakcji enzymatycznych oraz analizy obrazów krystalograficznych białek, przyczyniły się w znacznym stopniu do poznania funkcji i stabilności enzymów. Syntaza cytrynianowa (SC) [szczawiooctano-liaza cytrynianu (acetylująca) E.C.4.1.3.7] jest pierwszym enzymem cyklu kwasów trójkarbonylowych i cyklu glioksalowego. Badania nad SC zapoczątkowano pod koniec lat sześćdziesiątych oczyszczaniem enzymu z mięśnia sercowego świni, mięśni piersiowych gołębia, mięśni łyde (1), wątroby szczura (2), komórek drożdży *Saccharomyces cerevisiae* (3), owocu cytryny (4) oraz *Escherichia coli* (5). SC izolowano także z komórek drobnoustrojów o specyficznych właściwościach: bakterii halofilnej (6) i hipertermofilnej (7). Zatem SC jest

#### Adres do korespondencji

Małgorzata Robak,  
Katedra Biotechnologii  
i Mikrobiologii Żywności,  
Akademia Rolnicza,  
ul. Norwida 25,  
50-375 Wrocław;  
e-mail:  
MROB@ozi.ar.wroc.pl

---

**biotechnologia**

2 (49) 111–119 2000

enzymem występującym w każdej komórce, o szerokim zakresie potencjalnego biotechnologicznego wykorzystania.

Celem opracowania jest przedstawienie aktualnego stanu wiedzy na temat tego ważnego w szlaku przemian metabolicznych enzymu. W szczególności dotyczy ono opisu genów kodujących, opisu struktury białka i centrum aktywnego, parametrów kinetycznych reakcji katalizowanej przez ten enzym, wreszcie, funkcji pełnionych przez SC w komórce oraz możliwości aplikacyjnych.

## 2. Opis genów

W komórkach *S. cerevisiae* występują trzy SC, dwie zlokalizowane w mitochondrium i jedna w peroksysomach (8-10). Wszystkie trzy są kodowane przez odrębne homologiczne geny jądrowe: CIT 1, CIT 2 i CIT 3, kodujące odpowiednio białko o 479, 460 i 486 aminokwasach (8,11,12). Geny CIT 1 i CIT 3 kodują izoenzymy mitochondrialne, a CIT 2 izoenzym peroksysomalny.

Ekspresja genu CIT 1 u *S. cerevisiae* podlega represji glukozą (13), podczas gdy u drożdży *Yarrowia lipolytica* obserwowano wysoką aktywność SC pomimo dużego stężenia glukozy w podłożu hodowlanym (14).

Opisany u *Aspergillus nidulans* (*Emericella nidulans*) gen CIT A koduje enzym o ciężarze cząsteczkowym 52,2 kDa, zbudowany z 474 aminokwasów (15). Fragmenty genu kodujące białko są przedzielone 7 sekwencjami intronowymi, a sekwencja 35 aminokwasów N-końca świadczy o mitochondrialnym przeznaczeniu enzymu.

Dwa geny SC wykazano u *Rhizobium tropici* (16). Jeden gen jest zlokalizowany w chromosomie bakteryjnym, drugi w symbiotycznym plazmidzie. Brak funkcjonalnego genu plazmidowego SC uniemożliwia prawidłowy rozwój brodawek korzeniowych roślin motylkowych.

Ludzki gen SC koduje białko o 466 aminokwasach, które jest w 95% homologiczne do enzymu świńskiego (17).

## 3. Budowa i struktura krystaliczna białka

W ostatnich latach oznaczono i udostępniono w genetycznych oraz enzymatycznych bazach danych ponad 60 sekwencji SC [<http://genome-www.stanford.edu>]. Wszystkie sekwencje wykazują duże podobieństwo struktury pierwszorzędowej. W tabeli 1 zebrano dane dotyczące enzymu z wybranych organizmów. SC z *Acetobacter europaeus*, charakteryzująca się najwyższą z dotychczas poznanych aktywnością właściwą jest homoheksamerem o ciężarze cząsteczkowym 280 kDa (18). SC izolowane z innych bakterii gramujemnych są również homoheksamerami (19,20). Natomiast enzym otrzymany z komórek eukariontów oraz archebakterii i bakterii gramodatnich jest dimerem (21-23). Stopień dimeryzacji SC z serca świni zależy od stężenia enzymu,

obecności substratów, siły jonowej, natury użytego buforu i pH (24). Niskie pH, niska siła jonowa oraz niskie stężenie enzymu utrzymują równowagę pomiędzy monomerym i dimerem. Obecność jednego z substratów, szczawiooctanu sprzyja dimeryzacji. Nie wiadomo jakie czynniki wpływają na tworzenie kompleksu w przypadku heksamery, a zatem w przypadku enzymu z drobnoustrojów gramujemnych. Wiadomo jedynie, że sklonowany do *Escherichia coli* gen SC z archebakterii *Haloferax volcanii* prowadzi do wytworzenia nieaktywnej formy SC, wymagającej inkubacji w 2M KCl (25).

Tabela 1

## Wybrane syntazy cytrynianowe o znanej strukturze pierwszorzędowej

Organizm	Ciężar cząsteczkowy monomeru	Liczba aminokwasów	Stopień polimeryzacji	Rok ustalenia sekwencji genu
<i>Rickettsia prowazekii</i> *	49 323	436	?	1987
<i>E. coli</i>	48 063	427	homoheksamer	1983
<i>Salmonella typhimurium</i>	43 200	389	homodimer	1997
<i>Helicobacter pylori</i>	48 350	426	?	1997
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	47 681	428	homoheksamer	1989
<i>Mycobacterium tuberculosis</i>	47 987	431	homoheksamer	1995
<i>Acetobacter aceti</i>	48 196	436	homoheksamer	1990
<i>Thermoplasma acidophilum</i>	42 941	384	homodimer	1994
<i>Sulfolobus solfataricus</i>	42 811	377	homodimer	1992
<i>Pyrococcus furiosus</i>	42 941	384	homodimer	1997
<i>Bacillus subtilis</i>	40 937	366	homodimer	1995
<i>Candida tropicalis</i>	52 004	467	dimer	1997
<i>Arabidopsis thaliana</i>	52 759	472	homodimer	1989
<i>Citrus maxima</i>	52 183	471	homodimer	1994
<i>Tetrahymena thermophila</i>	52 575	462	homodimer	1991
<i>Gallus gallus</i> (kura)	47 373	433	homodimer	1990
<i>Sus scrofa</i> (świnia)	51 629	464	homodimer	1985

Opracowano na podstawie danych z Swiss-Prot [[http:// expasy.com/cgi-bin/get-sprot](http://expasy.com/cgi-bin/get-sprot)]

\* W latach 1996-1997 ustalono sekwencje genu SC u ponad 20 gatunków *Rickettsii*. U większości gatunków gen ten koduje białko o 411 aminokwasach.

W badaniach strukturalnych wykazano powstawanie dwóch odmiennych typów kryształów syntazy: 1) o symetrii tetragonalnej otrzymany poprzez krystalizację enzymu w formie otwartej, bez związanego szczawiooctanu, oraz 2) o symetrii jednooskowej (monoklinowej), otrzymany z konformacji zamkniętej enzymu – po przyłączeniu szczawiooctanu. Każdy monomer enzymu składa się z 20 spiral, piętnaście z nich tworzy większą podjednostkę, a pięć mniejszą. Obie podjednostki są połączone centrum aktywnym. Pod wpływem przyłączenia substratu (szczawiooctanu) zachodzi nasunięcie małej struktury na dużą, prowadząc do zmiany konformacji.

Główny łańcuch każdej podjednostki przemieszcza się bez deformacji jak sztywna struktura (obrót o  $28^\circ$  i przesunięcie o  $10 \text{ \AA}$ ). Takie nożycowe ruchy są możliwe dzięki deformacji w pętlach łączących poszczególne spirale (26,27). Forma otwarta enzymu jest katalitycznie nieaktywna, nie jest zdolna do wiązania acetylo-CoA i tylko w niewielkim stopniu wiąże cytrynian.

Porównano krystaliczną strukturę zamkniętej formy SC (ze związanym cytrynianem i CoA) z *Pyrococcus furiosus* (archebakterii o optymalnej temperaturze wzrostu  $100^\circ\text{C}$ ) i z *Thermoplasma acidophilum* (optimum wzrostu  $55^\circ\text{C}$ ) do struktury kryształów świńskiego enzymu (optimum temperatury wzrostu organizmu  $37^\circ\text{C}$ ) (28). Wszystkie trzy enzymy są homodimerami o podobnym pofałdowaniu, w których interfeza zasadniczo zawiera 8 alfa-spiralnych regionów zbudowanych z 4 antyrównoległych par spiral. Pomimo podobieństwa struktur krystalicznych SC wykazano istotne różnice w strukturze wtórnej enzymu przechodząc od organizmu mezofilnego do termofilnego i supertermofilnego. Najważniejsze z tych różnic to: wzrost upakowania enzymu, bardziej ściśła asocjacja podjednostek, wzrost ilości par jonowych pomiędzy podjednostkami i redukcja reszt termolabilnych. Wzrost upakowania został spowodowany skróceniem niektórych pętli, wzrostem liczby atomów rozpuszczalnika zamkniętych w strukturze, zoptymalizowanym wewnętrznym upakowaniem i brakiem pustych przestrzeni. Ściślejsza asocjacja dimeru była wynikiem większej komplementarności monomerów i tego, że poszczególne C-końcowe fragmenty jednego monomeru zwinęły się na powierzchni drugiego, czego nie obserwowano dla enzymu z serca świni. Ciekawe jest, że wszystkie regiony spiralne cząsteczki enzymu z *P. furiosus* w porównaniu do enzymu z organizmu mezofilnego są krótsze lub zawierają dodatkowe pary jonów. Aktywowana zimnem SC z bakterii arktycznej DS2-3R wykazuje zwiększoną powierzchnię pętli oraz większą ilość naładowanych reszt i zmniejszoną ilość proliny (29).

Badano także powierzchnie enzymu świńskiego, szczurzego, z drożdży, pomidorów i *E. coli* (21). Wykorzystano w tym celu przeciwciała monoklonalne przeciwko świńskiej i drożdżowej SC. Największy stopień homologii wykazano pomiędzy enzymami w formie dimerycznej, a największe różnice pomiędzy enzymem z *E. coli* i pozostałymi. Natomiast tylko niewielkie podobieństwo stwierdzono pomiędzy SC z peroksysomów i mitochondrium drożdży. Punktowa mutacja izoenzymu mitochondrialnego (His 274 w SC świńskiej czy His 312 w SC1 drożdży), powoduje znaczny wzrost immunologicznego podobieństwa tej formy z izoenzymem peroksysomalnym. Porównując N-końcowy fragment SC z *Drosophila melanogaster* z enzymami z mięśnia sercowego świni i kury, wykazano brak krzyżowych reakcji w teście immunodyfuzji poliklonalnych przeciwciał przeciwko SC z muszki owocowej wobec enzymów pochodzących ze świni i kury (30). Na podstawie uzyskanych wyników można się spodziewać występowania różnic w trzeciorzędowej budowie enzymu.

W strukturze drugorzędowej SC1, SC2 i SC3 drożdży *S. cerevisiae* prawdopodobnie jest 22, 18 i 18 odcinków o konfiguracji  $\alpha$ -heliksu; 12, 11 i 17 regionów o konfiguracji  $\beta$ , oraz 27, 25 i 31 fragmentów bez regularnej struktury (27). Fragmenty zawierające centrum aktywne mają nieregularną strukturę.

#### 4. Struktura centrum aktywnego SC

W centrum aktywnym SC1 z *S. cerevisiae* jest His 312, His 361 oraz Asp 419 [http://expasy.hcuge.ch/cgi-bin/enzyme i http://expasy.com/cgi-bin/get-sprot]. W centrum aktywnym syntazy świńskiej znajdują się His 274, His 320 oraz Asp 375 (32). W badaniach opartych na molekularnym modelowaniu wykazano, że podstawą aktywności enzymu świńskiego jest Asp 375, a istotne dla wiązania acetylo-Co A i jego deprotonizacji są dwa aminokwasy His 274 i Asp 375 (33). Pewne znaczenie w procesie wiązania acetylo-CoA, jak się wydaje, mają także Asp 237, Glu 238, His 320, Gly 275, Arg 401, His 235 oraz Asn 242 (34). Natomiast w wiązaniu szczawiooctanu biorą udział: His 238 i Arg 329 (33).

#### 5. Parametry kinetyczne SC

W zależności od źródła enzymu jego powinowactwo do acetylo-CoA oraz do szczawiooctanu jest różne. Najwyższe powinowactwo (do obu substratów) wykazano w przypadku enzymu z komórek eukariotycznych. Syntaza izolowana z organizmów eukariotycznych jest hamowana przez ATP, ADP, palmitylo-CoA i inne acylo-CoA. Enzym izolowany z *E. coli* jest hamowany przez NADH, a nie ulega inaktywacji pod wpływem ATP. Odwrotnej regulacji podlega natomiast SC z *Acetobacter europaeus*: jest hamowana przez ATP, a nie jest przez NADH. Jeszcze innej kontroli musi podlegać enzym z *Bacillus* sp. C4, bowiem nie jest on hamowany ani przez ATP, ani NADH. Izoenzymy SC, obecne w jednej komórce, wykazują także odmienne właściwości kinetyczne. Charakteryzują się odmiennym optimum pH (34), innym profilem inhibicji nukleotydami adeninowymi oraz inną szybkością tworzenia cytrynianu (35). Katalityczne właściwości enzymów z różnych źródeł zebrano w tabeli 2.

Tabela 2

Niektóre parametry kinetyczne wybranych SC

Źródło enzymu	Km dla szczawiooctanu	Km dla acetylo-CoA	Inhibitory
wątroba szczura (2)	4 $\mu$ M	14 $\mu$ M	ATP, palmitylo-CoA
<i>Saccharomyces cerevisiae</i> (3)	2-4 $\mu$ M	1-3 $\mu$ M	ATP, ADP, PP, AMP, Mg <sup>++</sup>
<i>E. coli</i> (5)	500 $\mu$ M	14 $\mu$ M	NADH, brak inhibicji ATP
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> (20)	15 $\mu$ M	47 $\mu$ M	NADH
<i>Drosophila melanogaster</i> (30)	3,1 $\mu$ M	6,7 $\mu$ M	propionilo-CoA, ATP, bursztynylo-CoA, oksoglutaran
<i>Bacillus</i> sp. C4 (23)	4 $\mu$ M	27 $\mu$ M	brak inhibicji NADH, ATP
<i>Yarrowia lipolytica</i> (51)	5 $\mu$ M	10 $\mu$ M	ATP
<i>Acetobacter europaeus</i> *(8)	20 $\mu$ M	51 $\mu$ M	ATP, brak inhibicji NADH, enzym aktywowany octanem

\* Aktywność właściwa tego enzymu jest najwyższa z dotychczas opisanych. Wynosi 228  $\mu$ moli/min/mg białka.

## 6. Tworzenie kompleksów SC z innymi białkami

Na podstawie badań kinetycznych reakcji katalizowanych przez dehydrogenazę pirogronianową (DHP) i syntazę cytrynianową (SC) z serca świni oraz mieszaniny obu tych enzymów wywnioskowano o utworzeniu kompleksu obu enzymów (36). Powstały kompleks wykazuje wyższe powinowactwo do CoA i do acetylo-CoA niż wolne enzymy. Jeden kompleks dehydrogenazy pirogronianowej wiąże 10-11 dimerów SC, a stała dysocjacji wynosi 5,7-6,0  $\mu\text{M}$  (37). Asocjacja tych dwóch enzymów usprawnia dynamiczną kompartmentację acetylo-CoA w mitochondriach, ułatwia przemianę pirogronianu w kierunku cytrynianu.

Wykazano także tworzenie kompleksu SC z mitochondrialną dehydrogenazą jabłczanową (38). Kompleks ten tworzy się w stosunku 1:1 i na jego powstawanie ma wpływ oksoglutaran (obniża zdolność asocjacji) i NADH (podwyższa). Natomiast bez wpływu na tworzenie kompleksu pomiędzy SC i dehydrogenazą jabłczanową pozostają NAD, szczawiooctan, cytrynian, ATP i jabłczan. Asocjacja SC z cytosolową dehydrogenazą jabłczanową jest słabsza. Z badań kinetycznych wynika, że dehydrogenaza jabłczanowa jest aktywowana przez SC. Prawdopodobnie wszystkie enzymy cyklu Krebsa tworzą jeden wspólny wieloenzymowy kompleks – metabolon – umożliwiający sprawniejszy przepływ metabolitów (39,40).

Innym enzymem współdziałającym z SC jest tiolaza (41). Wymienione enzymy koprecypitują w glikolu polietylenowym oraz wspólnie migrują w chromatografii żelowej. Może to być również spowodowane utworzeniem kompleksu enzymów cyklu glioksalowego w peroksisomach.

## 7. Funkcje SC w komórce

SC – szczawiooctano-liaza cytrynianu – jest pierwszym enzymem cyklu kwasów trójkarboksylowych i cyklu glioksalowego. Katalizuje ona kondensację reszty acylowej pochodzącej z acetylo-CoA z kwasem szczawiooctowym, co prowadzi do wytworzenia cytrynianu. Powstały metabolit ulega dalszym przemianom prowadzącym do nagromadzenia energii oraz do powstania głównych prekursorów w metabolizmie komórki. Cytrynian jest ważnym dla komórki regulatorem przemian: jego nadmiar hamuje pierwszy etap glikolizy na poziomie fosfofruktokinazy oraz aktywuje syntezę kwasów tłuszczowych na poziomie liazy cytrynianowej i syntazy malonylo-CoA (42).

Obok udziału SC w cyklu Krebsa i cyklu glioksalowym wykazano istotne znaczenie tego enzymu w innych procesach. Brak w komórkach *S. cerevisiae* aktywnego genu CIT1, kodującego jeden z izoenzymów mitochondrialnych, powoduje utratę zdolności drożdży do wzrostu na octanie (43). Uszkodzenie lub delecja tego genu powoduje zmniejszoną indukcję liazy izocytrynianowej, 1,6-fruktozo-bisfosfatazy, karboksykinazy fosfoenolo-pirogronianowej i syntazy acetylo-CoA przez octan (44). Natomiast, gen CIT3, którego ekspresja jest zwykle słabsza niż ekspresja CIT1, w przy-

padku delecji tego ostatniego w pełni zastępuje jego funkcje (13). Brak w komórce aktywnych genów CIT 1 i CIT 2 manifestuje się auksotrofią glutaminianową (43). Auksotrofia ta spowodowana brakiem SC jest w pełni zrozumiała (brak kwasu oksoglutaminowego, bezpośredniego prekursora kwasu glutaminowego), natomiast trudno zrozumieć wpływ SC na wykorzystanie octanu. Możliwym wytłumaczeniem jest udział tego enzymu w transporcie octanu lub jego formy aktywnej (acetylo-CoA) przez błonę mitochondrialną. SC może także brać udział w odporności komórek na niskie pH i na toksyczne działanie octanu (23). Obok przypuszczalnego udziału SC w transporcie octanu przez błony (mitochondrialną u eukariontów, plazmatyczną u prokariotów) wykazano, że enzym ten współdziała w transporcie cytrynianu i jabłczanu (45,46).

Asymilacja nietypowych źródeł węgla, jakim są alkanany, kwasy tłuszczowe oraz oleje przez *Yarrowia lipolytica* jest możliwy m.in. dzięki SC. Obserwowano dużą aktywność tego enzymu zarówno podczas wzrostu *Y. lipolytica* na glukozie jak i na heksadekanie (47-49).

## 8. Możliwości biotechnologicznego zastosowania SC

SC jest ważnym enzymem w komórce, a w biotechnologii może okazać się podstawowym enzymem nie tylko dla biosyntezy kwasu cytrynowego, ale również pozostałych kwasów cyklu Krebsa, a nawet aminokwasów tworzonych na ich bazie. SC jest także bardzo ważna w biosyntezie kwasów tłuszczowych, poprzez dostarczanie cytrynianu – prekursora i aktywatora tego procesu.

Gen SC może być także wykorzystany jako sonda genetyczna identyfikująca czynniki chorobotwórcze. Z powodzeniem przeprowadzono tym sposobem identyfikację *Bartonella quintana*, drobnoustroju wywołującego zapalenie mięśnia sercowego u ludzi (50).

Wykazane różnice w trzeciorzędowej budowie enzymu, warunkujące powstanie swoistych przeciwciał, stwarzają możliwości do zastosowania SC jako szczepionki. W pierwszych badaniach prowadzonych na myszach dowiedziono o indukcji odporności na *Helicobacter pylori* po doustnym szczepieniu myszy białkiem homologicznym do SC (31).

Bardzo interesujące są doniesienia o pośrednictwie tego enzymu w procesie tworzenia brodawek korzeniowych u roślin motylkowych (17). Być może istnieje możliwość zwiększenia ilości przyswajanego przez rośliny motylkowe azotu poprzez indukowanie powstawania brodawek korzeniowych przez SC.

## 9. Podsumowanie

W komórkach eukariotycznych izoenzymy SC są kodowane przez trzy geny jądrowe, w komórkach prokariotycznych przez 1 gen chromosomalny i jeden pla-

zmidowy. Występujące w komórkach *S. cerevisiae* geny SC są homologiczne w 59-74%. Wszystkie SC wykazują stosunkowo duży stopień homologii struktury pierwszorzędowej. Odmienne są natomiast niektóre istotne parametry katalityczne, stabilność oraz stopień polimeryzacji. Przyczyny tej odrębności, a także jej wpływ na kontrolę podstawowych przemian komórkowych, w dalszym ciągu pozostają w sferze badań. Przypuszczalnie SC jest enzymem kontrolującym różnorodne procesy poprzez uczestnictwo w wieloenzymowych kompleksach umożliwiających sprawniejszy przepływ metabolitów. Perspektywy szerszego wykorzystania SC w biotechnologii stają się realne. Kontynuacja badań nad tym enzymem jest zatem celowa i umożliwia dalszy postęp poznawczy i aplikacyjny.

## Literatura

1. Srere P. A., (1969), *Methods in Enzymology*, Ed. Lovenstein J. M., 13, 3-11, Academic Press, New York.
2. Shephard D., Garland P. B., (1969), *Methods in Enzymology*, Ed. Lovenstein J. M., 13, 11-16, Academic Press, New York.
3. Parvin R., (1969), *Methods in Enzymology*, Ed. Lovenstein J. M., 13, 16-19, Academic Press, New York.
4. Bogin E., Wallace A., (1969), *Methods in Enzymology*, Ed. Lovenstein J. M., 13, 19-22, Academic Press, New York.
5. Weitzman P. D. J., (1969), *Methods in Enzymology*, Ed. Lovenstein J. M., 13, 22-26, Academic Press, New York.
6. Higa A., Cazzulo J. J., (1975), *Biochem. J.*, 147(2), 267-274.
7. Muir J. M., Russell R. J., Hough D. W., Danson N. J., (1995), *Protein. Eng.*, 8(6), 583-592.
8. Suissa M., Suda K., Schatz G., (1984), *EMBO J.*, 3, 1773-1781.
9. Rickey T., Lewin H. S., (1986), *Mol. Cell Biol.*, 3, 488-493.
10. Lewin A. S., Hines V., Small G. M., (1990), *Mol. Cell Biol.*, 10, 1399-1405.
11. Rosenkrantz M., Alam T., Kim K-S., Clarc B. J., Srere P. A., Guarente L. P., (1986), *Mol. Cell Biol.*, 6, 4509-4515.
12. Jia Y-K., Becam A-M., Herbert C. J., (1997), *Molecular Microbiology*, 24 (1), 53-59.
13. Rosenkrantz M., Kell C. S., Pennell E. A., Webster M., Devenish L. J., (1994), *Curr. Genet.*, 25(3), 185-195.
14. Robak M., (1997), *Zesz. Nauk. AR Wrocław, Technol. Żyw.* XI, 319, 47-56.
15. Park B. W., Han K. H., Lee C. Y., Lee C. H., Maeng P. J., (1997), *Mol. Cells*, 7(2), 290-295.
16. Hernandez-Lucas I., Pardo M. A., Segovia L., Miranda J., Martinez-Romera E., (1995), *Appl. Environ. Microbiol.*, 61(11), 3992-3997.
17. Goldenthal M. J., Marin-Garcia J., Ananthakrishnan R., (1998), *Genome*, 41(5), 733-738.
18. Sievers M., Stockli M., Teuber M., (1997), *FEMS Microbiol. Lett.*, 146 (1), 53-58.
19. Bhayana V., Duckworth H. W., (1984), *Biochemistry*, 23(13), 2900-2905.
20. Donald L. J., Molgat G. F., Duckworth H. W., (1989), *J. Bacteriol.*, 171(10), 5542-5550.
21. Nemeth P., Small W. C., Evans C. T., Zhi W., Persson L. O., Srere P. A., (1991), *J. Mol. Recognit.*, 4(2-3), 77-83.
22. Mukherjee A., Smitherman T. C., Robinson J. B., Butsch R. W., Richards E. G., Srere P. A., (1980), *Adv. Myocardiol.*, 1, 329-337.
23. Schendel F. J., August P. R., Anderson C. R., Hanson R. S., Flickinger M. C., (1992), *Appl. Environ. Microbiol.*, 58(1), 335-345.
24. McEvily A. J., Harrison J. H., (1986), *J. Biol. Chem.*, 261(6), 2593-2598.
25. Connaris H., Chaudhuri J. B., Danson M. J., Hough D. W., (1999), *Biotechnol. Bioeng.*, 64(1), 38-45.
26. Lesk A. M., Chothia C., (1984), *J. Mol. Biol.*, 174, 175-191.



27. Remington S., Wiegand G., Huber R., (1982), *J. Mol. Biol.*, 158, 111-152.
28. Russell R. J., Ferguson J. M., Hough D. W., Danson M. J., Taylor G. L., (1997), *Biochemistry*, 36(33), 9983-9994.
29. Gerike V., Danson M. J., Russell N. J., Hough D. W., (1997), *Eur. J. Biochem.*, 248(1), 49-57.
30. Lee S., Park C., Yim J., (1997), *Mol. Cells*, 7(5), 599-604.
31. Dunkey M. L., Harris S. J., McCoy R. J., Musicka M. J., Evers F. M., Beagley L. G., Lumley P. J., Beagley K. W., Clancy R. L., (1999), *FEMS Immunol. Med. Microbiol.*, 21(2), 221-225.
32. Karpusas M., Branchaud B., Remington S. J., (1990), *Biochemistry*, 29, 2213-2219.
33. Mulholland A. J., Richards W. G., (1997), *Proteins*, 27, 9-25.
34. Evans C. T., Kurz L. C., Remington S. J., Srere P. A., (1996), *Biochemistry*, 35(33), 10661-10672.
35. Segovia J. L., Zafra M. F., Alejandre M. J., Garcia-Peregrin E., (1982), *Rev. Esp. Fisiol.*, 38(3), 267-270.
36. Sumegi B., Gyocsi L., Alkonyi I., (1980), *Biochim. Biophys. Acta*, 616(2), 158-166.
37. Sumegi B., Alkonyi I., (1983), *Biochim. Biophys. Acta*, 749(2), 163-171.
38. Tompa P., Batke J., Ovaldi J., Welch G. R., Srere P. A., (1987), *J. Biol. Chem.*, 262(13), 6089-6092.
39. Przybyla-Zawislak B., Gadde D. M., Ducharm K., McCammon M. T., (1999), *Genetics*, 152, 153-166.
40. Haggie P. M., Brindle K. M., (1999), *J. Biol. Chem.*, 274(7), 3941-3945.
41. Sumegi B., Gilbert H. F., Srere P. A., (1985), *J. Biol. Chem.*, 260 (1), 188-190.
42. Evans C. T., Ratledge C., (1985), *Biotechnol. Genetic. Engin. Review*, 3, 349-375.
43. Kispal G., Rosenkrantz M., Guarente L., Srere P. A., (1987), *J. Biol. Chem.*, 263(23), 11145-11149.
44. Kispal G., Evans K. T., Malloy G., Srere P. A., (1988), *J. Biol. Chem.*, 264(19), 11204-11210.
45. Sandor A., Johnson J. H., Srere P. A., (1994), *J. Biol. Chem.*, 269(47), 29609-29612.
46. Grigorenko E. V., Small W. C., Persson L. O., Srere P. A., (1990), *J. Mol. Recognit.*, 3 (5-6), 215-219.
47. Robak M., Wojtatowicz M., Rymowicz W., (1994), *Bulletin of Polish Academy of Sciences, Biological Sciences*, 42, 151-157.
48. Furukawa T., Ogino T., Matsuyischi T. (1982), *J. Ferment. Technol.*, 60(4), 281-286.
49. Glazunova L. M., Finogienova T. V., (1976), *Mikrobiol.*, 45(3), 444-449.
50. Patel R., Newell J. O., Procop G. W., Persing D. H., (1999), *Am. J. Clin. Pathol.*, 12(1), 36-40.
51. Morgunov I. G., Sharyshev A. A., Mikulinskaya O. V., Sokolov D. M., Finogienova T. V., (1994), *Biochimica*, 58(9), 1320-1329.