

POLSKIE TOWARZYSTWO BIOCHEMICZNE

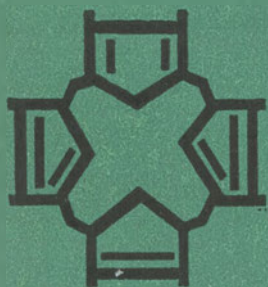
# Postepy Biochemii

POSTBAH 33 (1)  
(1-110) (1987)

1987

tom 33 nr 1

PL ISSN 0032-5422



PAŃSTWOWE  
WYDAWNICTWO  
NAUKOWE

<http://rcin.org.pl>



POLSKIE TOWARZYSTWO BIOCHEMICZNE

# Postępy Biochemii

KWARTALNIK

TOM 33 ZESZYT 1

1987

Wydane z pomocą finansową  
Polskiej Akademii Nauk

Postbah 33 (1)  
(1-112) (1987)

Państwowe Wydawnictwo Naukowe

<http://rcin.org.pl>

## RADA REDAKCYJNA

Przewodniczący: A. Legocki (Poznań)

Zastępca: I. Szumiel (Warszawa)

Sekretarz: B. Grzelakowska-Sztabert (Warszawa)

Członkowie: S. Angielski (Gdańsk), M. Chorąży (Gliwice), E. Czuryło (Warszawa), M. Fikus (Warszawa), E. Gąsior (Lublin), J. Gregorczyk (Szczecin), M. Gumińska (Kraków), D. Hulanicka (Warszawa), W. Jachymczyk (Warszawa), J. Kwiatkowska (Wrocław), S. Lewak (Warszawa),

W. Mejbaum-Katzenellenbogen (Wrocław), A. Morawiecki (Wrocław), J. Pawełekiewicz (Poznań), K. Raczyńska-Bojanowska (Warszawa), L. Wojtczak (Warszawa), Z. Zielińska (Warszawa)

## REDAKTOR NACZELNY

Z. Zielińska

*Instytut Biologii Doświadczalnej im. M. Nenckiego, PAN, ul. Pasteura 3,  
02-093 Warszawa*

## ZASTĘPCA REDAKTORA NACZELNEGO

D. Hulanicka

*Instytut Biochemii i Biofizyki, PAN, ul. Rakowiecka 36, 02-532 Warszawa*

## SEKRETARZ REDAKCJI

J. Tepińska

CZŁONKOWIE REDAKCJI: B. Czartoryska (Warszawa), J. Rytka (Warszawa), J. Skangiel-Kramska (Warszawa), J. Zborowski (Warszawa)

Polskie Towarzystwo Biochemiczne  
ul. Freta 16, 00-227 Warszawa

PAŃSTWOWE WYDAWNICTWO NAUKOWE — WARSZAWA 1987

Nakład 1770 (1680+90)	Oddano do składania 1986.10.02
Ark. wyd. 7,75, ark. druk. 7,0	Podpisano do druku w czerwcu 1987 r.
Pap. druk. sat. kl. IV, 70 g, 70×100	Druk ukończono w lipcu 1987 r.
Zam. 2953/12/86	Cena zł 160,—

Drukarnia im. Rewolucji Październikowej, Warszawa

Profesor dr med.  
**WANDA MEJBAUM-KATZENELLENBOGEN**  
1914—1986  
**Twórczyni Biochemii Uniwersyteckiej  
we Wrocławiu**



Dnia 19 sierpnia 1986 r. zmarła we Wrocławiu profesor Wanda Mejbaum-Katzenellenbogen, uczona o światowej sławie.

Urodzona 1 stycznia 1914 r. we Lwowie, w 1938 r. kończy Wydział Medycyny w Uniwersytecie Jana Kazimierza w rodzinnym mieście, a w rok później uzyskuje stopień naukowy doktora wszech nauk medycznych na tejże Uczelni. Jeszcze podczas studiów staje się uczennicą Jakuba Parnasa — pioniera biochemii polskiej, a w 1939 r. publikuje w *Zeitschrift für physiol. Chemie.*, 256:117. artykuł pt. „Über die Bestimmung kleiner Pentosemengen insbesondere in Derivaten der Adenylsäure”. Pracą tą zasłynęła jako najczęściej cytowany autor we współczesnej nam światowej literaturze badań nad kwasami nukleinowymi.

Działalność naukową i dydaktyczną do 1946 r. kontynuuje we Lwowie, potem przez następne 13 lat na Wydziale Lekarskim Akademii Medycznej we Wrocławiu, od 1959 r. na Wydziale Farmacji i jednocześnie na Uniwersytecie Wrocławskim. W okresie powojennej działalności uzyskuje kolejno stopnie naukowe: docenta (1954), profesora nadzwyczajnego (1961) i profesora zwyczajnego (1973). Z Jej inicjatywy w 1959 r. zostają powołane dwie nowe katedry biochemii, jedna na Wydziale Farmacji AM we Wrocławiu, a druga na Wydziale Nauk Przyrodniczych Uniwersytetu Wrocławskiego. W pierwszych latach działalności na Uniwersytecie Wrocławskim podejmuje się równocześnie wielu funkcji na obu Uczelniach, poza organizacją i kierownictwem obu Katedr w latach 1962—64 jest Dziekanem Wydziału Farmacji, następnie Dyrektorem Instytutu Botaniki i Biochemii U.Wr. Jednocześnie działa jako członek Rady Redakcyjnej kwartalnika Postępów Biochemii, Acta Biochimica Polonica, Wiadomości Chemicznych ponadto pełni funkcję przewodniczącego VIII Oddziału Wrocławskiego Towarzystwa Naukowego. 27 ostatnich lat Jej życia przypadło na tworzenie i rozwój biochemii uniwersyteckiej. Prof. dr W. Mejbaum-Katzenellenbogen zostawiła bogaty dorobek naukowy wyrażający się blisko 150 pracami doświadczalnymi oraz artykułami przeglądowymi, publikowanymi w czasopismach krajowych i zagranicznych. Prace te dotyczą oryginalnych metod analitycznych, do których należy zaliczyć oznaczanie pentoz, białek, alkilorezorcynoli, garbników i glikoprotein oraz badań nad strukturą i funkcją makrocząsteczek. Metoda oznaczania białek za pomocą taniny, znana jako „metoda wrocławska”, umożliwiała badania analityczne w słabo wyposażonych w aparaturę laboratoriach klinicznych i naukowych. Metoda zagęszczania białek za pomocą taniny i kofeiny ułatwiała wydzielanie glikoprotein i innych białek z płynów ustrojowych. Wieloletnie badania nad endogenną funkcją orozomukoidu w surowicy krwi ludzi zdrowych i chorych pozwoliły na odkrycie interakcji tej kwaśnej alfa<sub>1</sub>-glikoproteiny z immunoglobulinami. Zapoczątkowała i rozwinęła w ośrodku wrocławskim badania nad naturalnymi garbnikami, które jak postulowała, w warunkach in vivo mogą immobilizować aktywne biologicznie białka i inne makrocząsteczki organizmów żywych. Udowodniła, że alkilorezorcynole są czynnikami antyżywnieniowymi. Jej szerokie zainteresowania naukowe przyczyniły się do rozwinięcia badań nad strukturą kwasów nukleinowych, inhibitorów proteolitycznych, związków fenolowych oraz glikoprotein przez Jej wychowanków. Te kilka przykładów z Jej bogatego dorobku naukowego ilustruje oryginalność pomysłów badawczych i trwały wkład w rozwój współczesnych badań w zakresie biochemii i biologii molekularnej. Wykształciła wielu uczniów: 150 absolwentów biochemii, promowała 35 doktorów biochemii, 8 doktorów habilitowanych, z których dwie osoby są już profesorami zwyczajnymi, a 4 profesorami nadzwyczajnymi. Znamienną cechą Jej osobowości była stała troska o rozwój i doskonalenie programów nauczania w zakresie bioche-

mii. Ta sfera działalności profesor W. Mejbaum-Katzenellenbogen znalazła swój wyraz w publikacji skryptu do ćwiczeń z biochemii i przetłumaczenia na język polski podręcznika z chemii fizjologicznej autorstwa Harpera. Z Jej inicjatywy w roku 1974 były organizowane pierwsze Sesje Naukowe Absolwentów Biochemii, które w ostatnich latach przerodziły się w Sesje Naukowe Absolwentów Biologii Molekularnej.

Za swoją działalność naukową, dydaktyczną, wychowawczą i organizacyjną została odznaczona Złotym Krzyżem Zasługi (1959), Odznaką XV-lecia Wyzwolenia Dolnego Śląska (1960), Odznaką 1000-lecia Państwa Polskiego (1969), Krzyżem Kawalerskim Odrodzenia Państwa Polskiego (1973), Medalem X-lecia PRL (1975), Medalem Komisji Edukacji Narodowej (1975) oraz wyróżniona tytułem Zasłużony Nauczyciel Polskiej Rzeczypospolitej Ludowej (1982). W uznaniu Jej wybitnych zasług dla polskiej biochemii, Polskie Towarzystwo Biochemiczne w roku 1984 nadało Jej godność Członka Honorowego.

Po przejściu na emeryturę nadal czynnie uczestniczyła w życiu naukowym naszego ośrodka i utrzymywała ścisłe kontakty ze swoimi najbliższymi współpracownikami do ostatnich dni swego życia. Swą silną indywidualnością wywierała wielki wpływ na uczniów i przygodnych współpracowników. W stosunku do siebie i swoich współpracowników była bardzo wymagająca, a jednocześnie bezpośrednia i skromna. Zawsze gotowa była służyć radą, szczególnie przy projektowaniu badań doświadczalnych i przy przygotowywaniu prac do druku. Dodawała otuchy w różnej natury niepowodzeniach życiowych. Nauczyła nas wytrwałości w pracy badawczej i głębokiego poczucia odpowiedzialności za każdą sferę działania nauczyciela akademickiego. W naszej pamięci pozostanie jako wybitna uczona, godny naśladowania nauczyciel akademicki i przyjaciel.

*Uczniowie i współpracownicy*





## ARTYKUŁY

JOANNA GEMEL \*

### Rola fosforylacji i defosforylacji białek w regulacji aktywności metabolicznej chloroplastów

#### Function of Protein Phosphorylation and Dephosphorylation in Regulation of Chloroplast Metabolic Activity

##### Spis treści

- I. Wprowadzenie
- II. Białka fosforylowane w chloroplastach
- III. Kinazy odpowiedzialne za fosforylację dubletu LHCP i białka o masie cząsteczkowej 9 000
  - III-1. Stan oksydoredukcyjny puli PQ a aktywność enzymu
  - III-2. Charakterystyka kinazy fosforylującej dublet LHCP i białko o masie cząsteczkowej 9 000
- IV. Fosfatazy
- V. Biologiczna rola fosforylacji LHCP
  - V-1. Fosforylacja/defosforylacja LHCP jako mechanizm regulujący rozdział energii wzbudzenia pomiędzy fotoukładami
  - V-2. Strukturalne zmiany w błonach tylakoidów towarzyszące przejściom Stan 1-Stan 2
  - V-3. Związek fosforylacji LHCP z cyklem Calvina
- VI. Inne kinazy białkowe chloroplastów
  - VI-1. Kinaza fosforylująca karboksylazę/oksygenazę RuBP

\* Mgr, Zakład Enzymatyki, Instytut Biochemii, Uniwersytet Warszawski, Al. Zwirki i Wigury 93, 02-089 Warszawa.

Wykaz stosowanych skrótów: LHC — zbierający energię kompleks chlorofil a/b — białko; LHCP — część białkowa kompleksu LHC; PQ — plastochinon; RuBP — rybulozo-1,5-bisfosforan; ATP — adenzynodifosforan; P<sub>i</sub> — fosforan nieorganiczny; DCCD — N,N'-dicykloheksylokarbodiimid; cyt — cytochrom; PS I (II) — I (II) układ fotosyntezy; FCCP — karbonylocyjanek-p-trifluorometoksyfenylohydrazonu; DCMU — 3-(3,4-dichlorofenyl)-1,1-dimetylomocznik; DCIP, DCIPH<sub>2</sub> — utleniona i zredukowana forma 2,6-dichlorofenolindofenolu; TMQH<sub>2</sub> — zredukowana forma tetrametylo-p-benzochinonu; Q — pierwotny akceptor elektronów z PS II; PMS — metylosiarczan N-metylofenazyiniowy; Tris — 2-amino-2-hydroksymetylopropan-1,3-diol; NADP<sup>+</sup> — utleniona forma dinukleotydu nikotynamido-adeninowego; DBMIB — 2,5-dibromo-3-metylo-6-izopropyl-p-benzochinon; DAD — 2,3,5,6-tetrametylo-p-fenylendiamina; E<sub>m 7,8</sub> — potencjał połówkowy w pH 7,8; ADP — adenzynodifosforan; F<sub>685</sub>, F<sub>735</sub>, F<sub>681</sub> — fluorescencja chlorofilu przy długości fali 685 nm, 735 nm i 681 nm; AMP — adenzynomonofosforan; PP<sub>i</sub> — pirofosforan.

VI-2. Kinazy białkowe wyizolowane z błon chloroplastów szpinaku

VI-3. Kinaza fosforylująca białka rybosomów w chloroplastach

VII. Regulacja aktywności fosfotransferazy ATP: pirogronian,  $P_i$  przez fosforylację

VIII. Podsumowanie

## Contents

- I. Introduction
- II. Phosphoproteins in chloroplasts
- III. Protein kinases phosphorylating LHCP dublet and protein of molecular weight 9 000
  - III-1. Oxidation-reduction state of the PQ pool and enzyme activity
  - III-2. Characteristics of protein kinase phosphorylating LHCP dublet and protein of molecular weight 9 000
- IV. Phosphatases
- V. Biological role of LHCP phosphorylation
  - V-1. LHCP phosphorylation/dephosphorylation as a mechanism regulating distribution of excitation energy between photosystems
  - V-2. Structural changes in thylakoid membranes accompanying State 1-State 2 transitions
  - V-3. Connection between LHCP phosphorylation and Calvin cycle
- VI. Other protein kinases in chloroplasts
  - VI-1. Protein kinase phosphorylating carboxylase/oxygenase RuBP
  - VI-2. Protein kinases isolated from membranes of spinach chloroplasts
  - VI-3. Protein kinase phosphorylating ribosome proteins in chloroplasts
- VII. Regulation of the activity of phosphotransferase ATP: pyruvate,  $P_i$  by phosphorylation
- VIII. Concluding remarks

## I. Wprowadzenie

Fosforylacja jest jednym z podstawowych mechanizmów regulujących metabolizm w komórkach zwierzęcych [1, 2]. W organizmach roślinnych proces ten jest o wiele słabiej poznany. Początkowo badano wyłącznie fosforylację białek jądrowych i rybosomalnych [3]. Dopiero w 1977 r. Bennett [4] opisał po raz pierwszy fosforylację białek typowo roślinnych, chloroplastowych. Od tego czasu prowadzone są intensywne badania mające na celu dokładne jej scharakteryzowanie, w tym wyjaśnienie jej roli biologicznej. Postęp prac w tej dziedzinie jest przedmiotem kilku artykułów przeglądowych z ostatnich lat [2, 5—9].

## II. Białka fosforylowane w chloroplastach

W chloroplastach fosforylacji ulega szereg białek (Tab. 1), jednak zdecydowanie najsilniej są fosforylowane trzy białka błon tylakoidów: o masach cząsteczkowych 23 000 i 25 000 \* [11, 12] zidentyfikowane jako

\* Stwierdzono, że istnieją różnice międzygatunkowe, a także rozbieżności odnośnie mas cząsteczkowych białek w tym samym gatunku rośliny (Tab. 1). Do ogólnej

Tabela 1.

Białka chloroplastów ulegające fosforylacji

Masa cząsteczkowa białka	Funkcja	Źródła białka	Piśmiennictwo
<b>Białka otoczki</b>			
50 500	Funkcja nieznana	Szpinak	10
29 000	Funkcja nieznana	Szpinak	10
13 000	Funkcja nieznana	Szpinak	10
<b>Białka błon tylakoidów</b>			
8 000	Kanał protonowy dla syntetazy ATP, czyli proteolipid wrażliwy na DCCD	Groch	11
9 000	Składnik cyt $b_{563}$	Groch	12
10 000	Funkcja nieznana	Szpinak	13
23 000	Dwa białka wchodzące w skład LHC	Groch	11, 12
24 000	o masach cząsteczkowych: 23 000—	Jęczmień	7
25 000	26 000	Szpinak	14
26 000	oraz	Groch	4
25 000	25 000—28 000	Groch	11, 12
26 000		Jęczmień	13
27 000		Szpinak	14
28 000		Groch	4
33 000—35 000	Białko wiążące chinon po redukującej stronie PS II	Groch	12
45 000	Białko tworzące centrum reakcji PS II	Groch	12
<b>Białka rybosomalne</b>			
L 18	Białko dużej podjednostki rybosomów	Szpinak	3
L <sup>s</sup> 31	Białko małej podjednostki rybosomów	Szpinak	3
<b>Białka stromy</b>			
100 000 (mezofil)	Fosfotransferaza ATP: pirogronian, P <sub>i</sub>	Kukurydza	15
56 000	Duża podjednostka karboksylazy/oksygenazy RUBP	Szpinak	16
16 000	Mała podjednostka karboksylazy/oksygenazy RUBP	Szpinak	16

białka kompleksu LHC oraz białka o masie cząsteczkowej 9 000 wchodzące w skład kanału protonowego syntetazy ATP [17], cytochromu  $b_{559}$  [18] lub cytochromu  $b_{563}$  [19].

charakterystyki fosforylowanych białek wybrano masę najczęściej cytowaną, natomiast w rozważaniach bardziej szczegółowych taką masę jaka została stwierdzona w danej pracy.

Zaledwie około 1% cząsteczek chlorofilu wykazuje w chloroplastach właściwości centrum reakcji. Pozostała jego część jest odpowiedzialna za absorpcję maksymalnie dużej ilości światła i kierowanie energii wzbudzenia do centrów reakcji [6, 7, 9]. Efektywność działania barwników ulega zwiększeniu dzięki ich powiązaniu z białkami w kompleksy chlorofil — białko (oznaczone skrótem CP od ang. *chlorophyll-protein*) [7]. Około 50—60% chlorofilu [5, 7] i 30% białek [7] wchodzi w skład kompleksów. Znane są dwa rodzaje tego typu kompleksów: CP I przypisywany PS I, o masie cząsteczkowej 110 000 zawierający wyłącznie chlorofil a oraz CP II przypisywany PS II, o masie cząsteczkowej 35 000 zawierający chlorofil a i b w stosunku 1,2:1 [20]. CP II nazywany jest też zbierający energię kompleks chlorofil a/b — białko, w skrócie LHC (od ang. *light harvesting chlorophyll a/b protein complex*) [7]. Jest z nim związanych kilka polipeptydów [21] (w tym dwa polipeptydy podlegające fosforylacji o zbliżonych masach cząsteczkowych 23 000 i 25 000, dla których Bennett zaproponował nazwę dubletu białkowego [12]). Na określenie części białkowej LHC stosuje się powszechnie skrót LHCP [7].

W grochu dublet białek LHCP i białko o masie cząsteczkowej 9 000 fosforylowane są z podobnymi intensywnościami, w jęczmieniu przeważa fosforylacja dubletu, a w szpinaku fosforylacja białka o masie 9 000 [22].

### III. Kinazy odpowiedzialne za fosforylację dubletu LHCP i białka o masie cząsteczkowej 9 000

#### III-1. Stan oksydoredukcyjny puli PQ a aktywność enzymu

Fosforylację białek chloroplastów katalizowaną przez kinazy białkowe stwierdzono inkubując liście [7] lub nienaruszone chloroplasty [4] w obecności [ $^{32}\text{P}$ ]ortofosforanu albo izolowane tylakoidy [23] w obecności [ $\gamma$ — $^{32}\text{P}$ ]ATP. Włączanie radioaktywności do białek z [ $^{32}\text{P}$ ]ortofosforanu

Tabela 2.

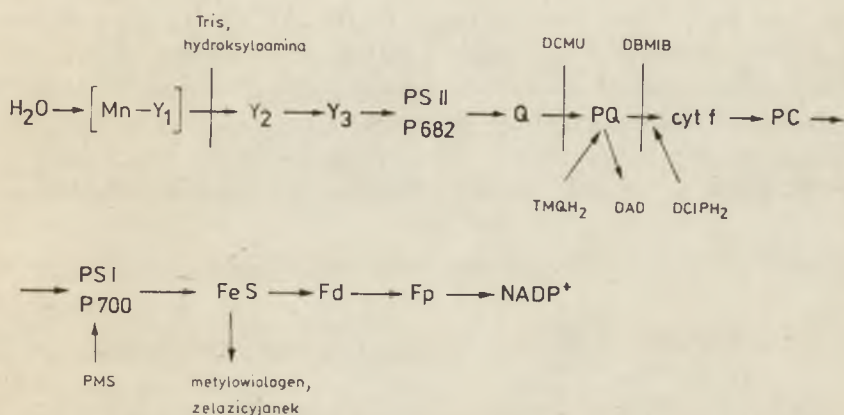
Aktywacja kinazy białkowej tylakoidów grochu przez światło i czynniki redukujące (11)

Warunki inkubacji	Aktywność kinazy (%)
Światło	100
Ciemność	28
Światło + DCMU	21
Światło + DCMU + DCIPH <sub>2</sub>	18
Ciemność + podsiarczyn	111
Światło + podsiarczyn	112
Światło + DCMU + podsiarczyn	121
Ciemność + TMQH <sub>2</sub>	101
Światło + metylowiologen	27
Światło + żelazicyjanek	17

Wg Allena i wsp. [11], dzięki uprzejmości autorów i Macmillan Journals Ltd.

jest wrażliwe na związki rozprzegające np. FCCP [6, 24], co wskazuje na niezbędność fotofosforylacji dla umożliwienia tego procesu [6, 23]. Natomiast fosforylacja białek w obecności  $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{ATP}$  nie podlega wpływowi związków rozprzegających [17, 23, 25]. Zaobserwowano około 4-krotną stymulację świetlną fosforylacji białek dubletu LHCP i białka o masie cząsteczkowej 9 000 [17, 23] (Tab. 2). DCMU, klasyczny inhibitor transportu elektronów działających pomiędzy Q a PQ całkowicie znosi wpływ światła na fosforylację [11, 23].

Miejsca działania DCMU, innych inhibitorów fotosyntetycznego transportu elektronów oraz donorów i akceptorów elektronów wymienionych w dalszej części tekstu przedstawia uproszczony schemat (Ryc. 1).

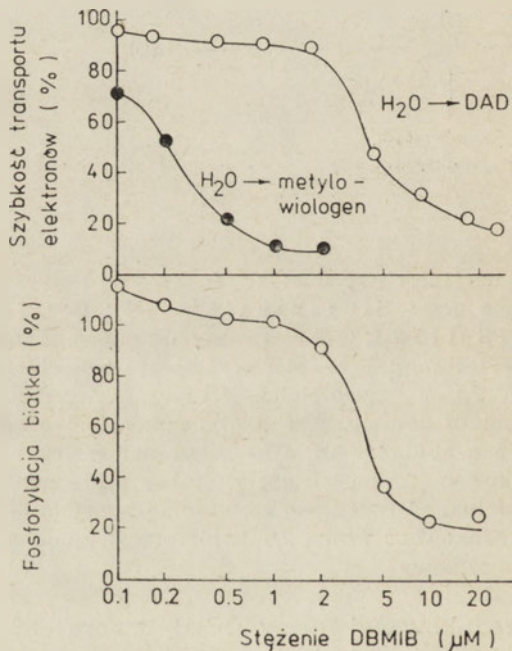


Ryc. 1

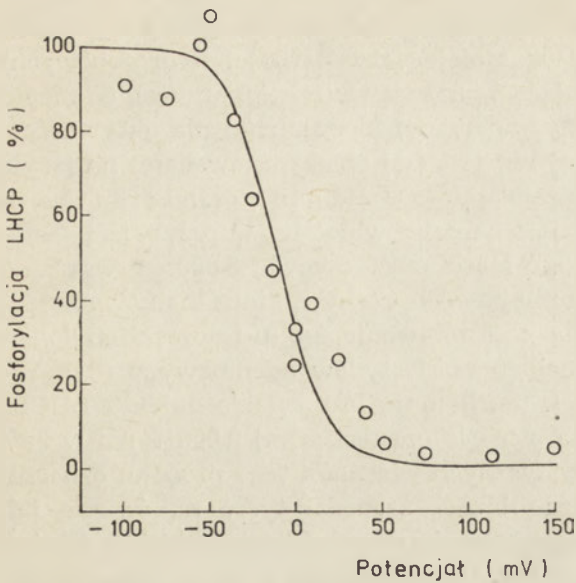
Objaśnienia skrótów użytych na rycinie: Y<sub>1</sub>, Y<sub>2</sub>, Y<sub>3</sub> — hipotetyczne przenośniki elektronów zaproponowane przez Siegenthalera [26]; P-682 i P-700 — centrum reakcji odpowiednio PS II i PS I; Q — pierwotny akceptor elektronów z PS II; PQ — plastochinon; cyt — cytochrom; PC — plastocyanina; FeS — białko FeS Rieskie'go; Fd — ferredoksyna; Fp — flawoproteina (reduktaza ferredoksyna — NADP<sup>+</sup>); NADP<sup>+</sup> — forma utleniona dinukleotydu nikotynamidoadeninowego; Tris — 2-amino-2-hydroksymetylopropan-1,3-diol; DCMU — 3-(3,4-dichlorofenilo)-1,1-dimetylomocznik; TMQH<sub>2</sub> — zredukowana forma tetrametylo-p-benzochinonu; DAD — 2,3,5,6-tetrametylo-p-fenylendiamina; DBMIB — 2,5-dibromo-3-metylo-6-izopropilo-p-benzochinon; DCIPH<sub>2</sub> — zredukowana forma 2,6-dichlorofenoloindofenolu; PMS — metylo-siarczan N-metylofenazyniowy

W obecności zredukowanej formy DCIP, donora elektronów działającego za PQ aktywność kinazy białkowej zahamowanej na skutek obecności DCMU, nie może zostać przywrócona [11]. PMS w tym przypadku nie jest także skuteczny [17]. Sugeruje to niezbędność redukcji przenośnika elektronów łączącego oba fotoukłady dla maksymalnej fosforylacji białek [11, 27, 28]. Sugestię tę potwierdza fakt hamowania aktywności kinazy białkowej przez metylowiologen i żelazycyanek, akceptory przyjmujące elek-

trony z PS I, a więc wpływające na utlenianie przenośników elektronów łączących oba fotoukłady [11]. Dla pełnej aktywności kinazy białkowej niezbędne jest nie tyle światło, co redukcja określonego przenośnika elektronów. Podsiarczyn, związek o niskim potencjale oksydoredukcyjnym, działający w sposób niespecyficzny [11], a także  $\text{TMQH}_2$ , specyficzny donor elektronów dla PQ [29] umożliwiają fosforylację nawet w ciemności [27]. Przedstawione tu fakty wskazują, iż redukcja PQ jest niezbędna dla działania kinazy białkowej fosforylującej białka dubletu LHCP i białko o masie cząsteczkowej 9 000. Istnieje szereg innych, nie zestawionych w tabeli faktów doświadczalnych potwierdzających tę sugestię m.in. obserwacja hamowania aktywacji świetlnej kinazy białkowej przez Tris i hydroksyloaminę. Warto tu dodać, iż aktywność kinazy białkowej zahamowaną przez Tris przywraca zredukowany DCIP [17]. Ponadto zredukowana ferredoksyna stymuluje fosforylację białek [23]. Ciekawe są też doświadczenia z zastosowaniem inhibitora transportu elektronów DBMIB, który w zależności od stężenia hamuje utlenianie lub redukcję PQ.  $1 \mu\text{M}$  DBMIB hamuje transport elektronów w układzie  $\text{H}_2\text{O} \rightarrow$  metyloviologen (Ryc. 2) w około 90%, natomiast redukcję DAD przyjmującego elektrony z Q



**Ryc. 2.** Hamowanie transportu elektronów i kinazy białkowej w chloroplastach grochu przez DBMIB. Szybkość transportu elektronów mierzono polarograficznie jako wydzielanie tlenu w układzie  $\text{H}_2\text{O} \rightarrow \text{DAD}$ , wynosiła ona  $97 \mu\text{moli} \times \text{mg chlorofilu}^{-1} \times \text{h}^{-1}$  oraz jako pobieranie tlenu w układzie  $\text{H}_2\text{O} \rightarrow$  metyloviologen, wynosiła ona  $23 \mu\text{mole} \times \text{mg chlorofilu}^{-1} \times \text{h}^{-1}$ . Wg Allena i wsp. (11), dzięki uprzejmości autorów i Macmillan Journals Ltd



Ryc. 3. Włączanie  $^{32}\text{P}$  z  $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{ATP}$  do LHCP w chloroplastach grochu w zależności od potencjału. Wg Hortona i wsp. (28), dzięki uprzejmości autorów i Elsevier/North-Holland Biomedical Press

w stężeniach przekraczających  $10\ \mu\text{M}$ . Gdy mierzono aktywność kinazy białkowej jako funkcję stężenia DBMIB okazało się, że ulega ona zahamowaniu w obecności co najmniej  $10\ \mu\text{M}$  DBMIB. Wskazuje to na niezbędną redukcję PQ dla aktywności kinazy białkowej [11]. Z pomiarów fosforylacji LHCP w zależności od potencjału w izolowanych chloroplastach grochu (Ryc. 3) wynika, że aktywacja kinazy białkowej ma taki sam potencjał połówkowy jak redukcja PQ ( $E_{m,7,8} = 0$ ) [30, 31] i odpowiada przenośnikowi dwuelektronowemu [28—30, 32]. Rola PQ w regulacji aktywności kinazy białkowej zaproponowana po raz pierwszy niezależnie przez Allena i wsp. [11] oraz Hortona i Blacka [28] jest obecnie, jak wynika z przedstawionych faktów doświadczalnych, dobrze udokumentowana.

### III-2. Charakterystyka kinazy fosforylującej dublet LHCP i białko o masie cząsteczkowej 9 000

Znanych jest szereg własności kinazy białkowej fosforylującej LHCP i białko o masie cząsteczkowej 9 000. Stała Michaelisa wobec ATP wynosi  $90\ \mu\text{M}$  [7, 9, 25], optimum pH 7,5 [17], dla pełnej aktywności enzymu wymagane są jony  $\text{Mg}^{2+}$  w stężeniach 5—10 mM. Wydaje się, że jest to enzym błonowy. Wykazuje on bowiem większą aktywność w błonach tylakoidów niż w chloroplastach poddanych szokowi osmotycznemu [23]. Kinaza jest wrażliwa na działanie inhibitorów grup tiolowych, jak N-n-butylo-

imid, N-fenylomaleimid, N-etylomaleimid, kwas jodoctowy (Uszeregowano je tutaj wg malejących własności hydrofobowych). Najsilniejsze własności hamujące wykazują związki lipofilowe, co mogłoby wskazywać na to, że grupa(y) tiolowa(e) niezbędna(e) dla aktywności katalitycznych kinazy białkowej nie jest (są) wyeksponowana(e) na powierzchnię błony. ATP chroni kinazę białkową przed inhibitorami grup tiolowych, przy czym efekt ochronny jest bardziej widoczny w przypadku fosforylacji dubletu LHCP niż białka o masie cząsteczkowej 9 000, co wskazuje na możliwość istnienia co najmniej dwóch, różnych kinaz białkowych [32]. Potwierdzają to doświadczenia z zastosowaniem 5'-p-fluorosulfonylobenzyloadenozyny (FSBA) [13], analogu nukleotydów adeninowych [33]. W chloroplastach szpinaku związek ten hamuje fosforylację dubletu LHCP w około 95%, natomiast białka o masie cząsteczkowej 9 000 tylko w 35% i z zachowaniem charakterystycznych własności tego procesu; oznacza to, że fosforylacja opisywanego białka zachodzi tylko na świetle lub w ciemności w obecności związku redukującego. Chociaż [<sup>14</sup>C]FSBA wiąże się z kilkoma polipeptydami, to jednak tylko białko o masie cząsteczkowej 50 000 można zabezpieczyć przed wiązaniem tego związku przez wcześniejsze dodanie ADP lub adenozyny. Sugeruje to, że białko o masie cząsteczkowej 50 000 może być kinazą dubletu LHCP [13].

Za istnieniem niezależnych enzymów fosforylujących dublet LHCP i białko o masie cząsteczkowej 10 000 przemawia też stymulacja fosforylacji przez  $Zn^{2+}$ , która jest silna w przypadku dubletu, znikoma natomiast w przypadku białka o masie 10 000 [34, 35].

W LHCP fosforylowany jest fragment białka obdarzony ładunkiem dodatnim, dostępny na powierzchni tylakoidów od strony stromy [6]. Ustalono jego sekwencję aminokwasową:  $NH_2$ —Lys—Ser—Ala—Thr—Thr—Lys—Lys— [5, 36]. Fosfor włączany jest wyłącznie do 1 lub 2 reszt treoniny [4, 5]. Fosforylowany fragment można łatwo odszczepić przez działanie trypsyną [11, 25, 37]. Opisywany enzym może też wykorzystywać jako substrat histon [19, 34].

ADP w stężeniach fizjologicznych hamuje aktywność kinazy białkowej [2, 38], co wskazuje na to, że ładunek energetyczny chloroplastów może być istotnym elementem wpływającym na regulację jej aktywności [7, 39]. Jest to czynnik na tyle decydujący, iż niski stosunek ATP/ADP może wywołać defosforylację nawet gdy pula PQ jest w znacznym stopniu zredukowana [40].

W chloroplastach roślin chłodowrażliwych (np. ryż) w przeciwieństwie do roślin chłodoodpornych (np. jęczmień), na fosforylację LHCP wpływa też temperatura. Poddanie liści lub izolowanych błon tylakoidów roślin chłodowrażliwych działaniu chłodu w zakresie temperatur 0—10°C powoduje hamowanie fosforylacji LHCP. Może to być wynikiem obniżenia aktywności kinazy białkowej lub ograniczenia dostępności jej substratu tj. reszt treoniny LHCP w niskich temperaturach [40a].



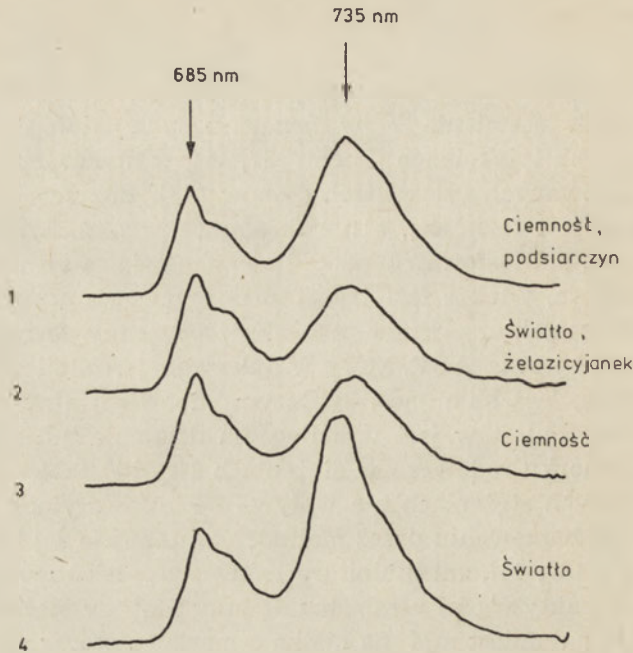
#### IV. Fosfatazy

Fosforylacja białek chloroplastów jest procesem odwracalnym. Wykazano to w liściach jęczmienia [7], w nienaruszonych chloroplastach grochu [4], w izolowanych tylakoidach grochu [37, 41], w nienaruszonych komórkach [42] i izolowanych tylakoidach glonów [43]. Enzym odpowiedzialny za jej przebieg jest fosfataza, a nie działającą w przeciwnym kierunku kinazą białkową, ani fosfotransferazą [2]. Przemawia za tym kilka faktów: 1) kinaza białkowa, a także fosfotransferaza wymagają oprócz fosfobiałka drugiego substratu, który działa jako akceptor grupy fosforanowej. Dla kinazy białkowej jest to ADP, który w opisywanej reakcji nie działa jednak stymulująco, lecz hamująco. 2) Enzym odpowiedzialny za defosforylację białek chloroplastów jest wrażliwy na działanie inhibitora fosfataz roślinnych — fluorku sodowego w stężeniach 10—100 mM. Chlorek sodowy w tych samych stężeniach nie wpływa na defosforylację [37]. Fosfataza podlega też hamowaniu przez molibdenian [42]. Na jej aktywność nie wpływa światło [37, 44], ani inhibitory transportu elektronów, jak DCMU [37, 44]. Dla jej aktywności niezbędne są jony  $Mg^{2+}$  w stężeniach  $\mu M$  dla dubletu LHCP, natomiast mM dla białka o masie cząsteczkowej 9 000 [37]. Czas półtrwania fosfobiałek LHCP w warunkach sprzyjających defosforylacji wynosi 5—8 min, a dla większości innych fosfobiałek około 30 min. Fakty te obok stwierdzenia różnic w optimum pH i temperatury dla defosforylacji różnych białek [2] mogą wskazywać na istnienie kilku fosfataz, specyficznych wobec określonych białek. Ze względu na to, że Triton X-110 znosi aktywność fosfataz, postuluje się, że są one enzymami błonowymi i konieczna jest dla ich działania integralność błon [37].

#### V. Biologiczna rola fosforylacji LHCP

##### V-1. Fosforylacja/defosforylacja LHCP jako mechanizm regulujący rozdział energii wzbudzenia pomiędzy fotoukładami

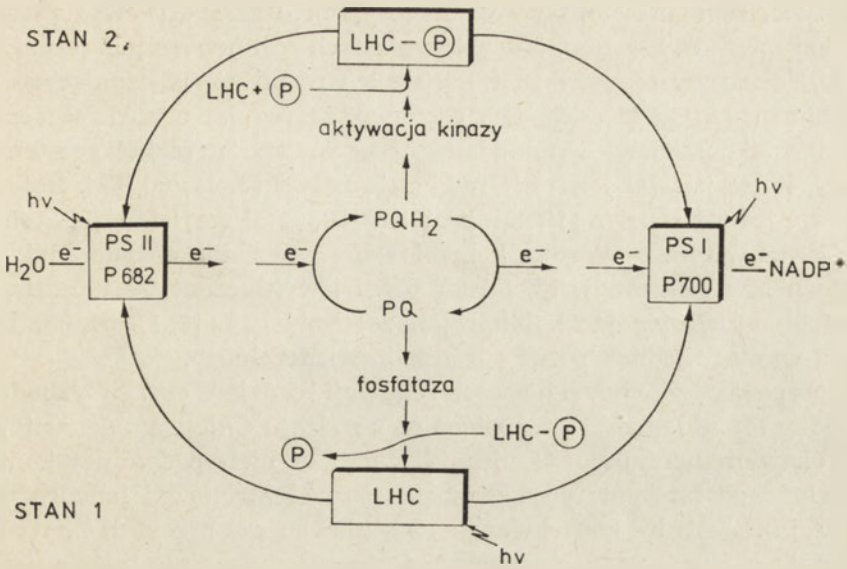
Do wyjaśnienia znaczenia fosforylacji LHCP przyczyniła się w znacznym stopniu analiza fluorescencji składników chloroplastów w warunkach fosforylacji/defosforylacji [44, 45]. W chloroplastach preinkubowanych na świetle po dodaniu ATP obserwowano wzrost fluorescencji mierzonej w temperaturze 77 K przy 735 nm w stosunku do fluorescencji przy 685 nm (Ryc. 4) [11, 25, 44]. Natomiast w chloroplastach preinkubowanych w ciemności stosunek intensywności fluorescencji przy obu długościach fali  $F_{735}/F_{685}$  ulegał znacznej redukcji [11, 25, 46, 47]. Ze względu na to, że fluorescencję przy 735 nm przypisuje się PS I, a przy 685 nm LHC związanemu z PS II [48], można wnioskować o odwracalnym wpływie fosfory-



**Ryc. 4.** Wpływ światła, podsiarczynu i żelazicyjaneku na fosforylację LHCP i widmo fluorescencji chlorofilu w 77K w tylakoidach grochu. Przed rozpoczęciem pomiarów chloroplasty preinkubowano na świetle lub w ciemności. Warunki preinkubacji podano na rycinie (skrótowo — światło, ciemność). Wg Allena i wsp. (11), dzięki uprzejmości autorów i Macmillan Journals Ltd

lacji LHCP na rozdział energii wzbudzenia i kierowaniu energii do PS I kosztem PS II [25]. W tylakoidach grochu na skutek fosforylacji stwierdzono zgodnie z oczekiwaniami, wzrost ilości energii dostarczanej do PS I z 35% w nefosforylowanych do 52% w fosforylowanych błonach [49], w jęczmieniu zaś z 38% do 67% [50]. Można przypuszczać, iż związki wpływające na fosforylację LHCP, wpływają również na stosunek  $F_{735}/F_{685}$ . Żelazicyjanek hamując fosforylację, wpływa na obniżenie  $F_{735}/F_{685}$ , podsiarczyn zaś umożliwiając fosforylację w ciemności powoduje wzrost tego stosunku [11]. Powyższe obserwacje doprowadziły do zaproponowania interesującego schematu regulacji rozdziału energii wzbudzenia w chloroplastach [25, 51] (Ryc. 5) przez fosforylację białek LHCP. Naświetlanie chloroplastów światłem czerwonym o długości fali poniżej 682 nm (tzw. Stan 2) prowadzi do silniejszego wzbudzenia PS II niż PS I, co sprzyja redukcji PQ, który aktywuje kinazę białkową. Enzym ten fosforyluje LHCP, czego konsekwencją jest przenoszenie nadmiaru energii wzbudzenia z PS II do PS I.

Natomiast, gdy chloroplasty naświetla się światłem dalekiej czerwieni odpowiadającym długości fali powyżej 682 nm (tzw. Stan 1) następuje silniejsze wzbudzenie PS I niż PS II, co prowadzi do utlenienia PQ, zatem



**Ryc. 5.** Schemat przedstawiający regulację rozdziału energii wzbudzenia pomiędzy PS II i PS I w chloroplastach za pośrednictwem odwracalnej fosforylacji LHCP. Wg Staehelina i Arntzena (6), dzięki uprzejmości autorów i Rockefeller University Press

defosforylacji LHCP. Ilość energii wzbudzenia kierowanej do PS I ulega zmniejszeniu. Dzięki temu mechanizmowi nierównomierność wzbudzenia fotoukładów jest korygowana przez wzrost przekazywania energii do ograniczającego fotoukładu [2, 6] i stwarza zabezpieczenie przed zbędnym rozproszeniem nadmiaru energii wzbudzenia [11]. Ma to istotne znaczenie dla poprawienia wydajności kwantowej fotosyntezy, gdy światło jest czynnikiem ograniczającym jej przebieg [5, 52]. Warto przy tym zwrócić uwagę na to, iż *in vivo* trudno wyobrazić sobie przejścia typu Stan 1 — Stan 2 jako indukowane światłem monochromatycznym w zakresie czerwieni, czy dalekiej czerwieni [2]. Analogię do badań *in vitro* łatwo znaleźć, gdy weźmie się pod uwagę, że silne światło słoneczne jest głównie krótkofalowe (większa absorpcja przez PS II), natomiast w cieniu przeważają dłuższe fale (większa absorpcja przez PS I niż przez PS II) [2, 52]. Adaptacja chloroplastów do zmieniających się warunków oświetlenia trwa zaledwie kilka minut [6], co odpowiada czasowi potrzebnemu na fosforylację, czy defosforylację LHCP [8]. Wydaje się więc, iż zaproponowany mechanizm regulacji rozdziału energii wzbudzenia pomiędzy fotoukładami funkcjonuje *in vivo* [2, 53]. Stwierdzono, że równolegle do fosforylacji LHCP i wzrostu przekazywania energii do PS I kosztem PS II występuje wzrost stopnia utlenienia przENOŚNIKA Q i cyt f [54]. W tych warunkach obserwowano także wzrost szybkości transportu elektronów w PS I i odpowiadający mu spadek w PS II [55, 56].

Potwierdzeniem istotnej roli fosforylacji LHCP dla występowania przejść typu Stan 1 — Stan 2 w chloroplastach roślin wyższych jest stwierdzenie, że nie występują one w mutantach roślin nie posiadających funkcjonalnego LHCP [50, 57—59]. Ciekawe, że regulację rozdziału energii wzbudzenia pomiędzy fotoukładami obserwowano u niektórych krasnorostów, które jak wiadomo nie zawierają LHCP [6, 11, 60, 61]. Rolę jego spełniają jednak zapewne fikobiliproteiny [60, 61]. Przejścia typu Stan 1 — Stan 2 są i w tym przypadku kontrolowane przez stan oksydoredukcyjny przenośników elektronów [6, 11, 62, 63]. Niewykluczone, że umożliwia je odwracalna fosforylacja fikobiliprotein zależna od PQ [6, 11, 54, 63]. Hipoteza ta wymaga jednak potwierdzenia doświadczalnego.

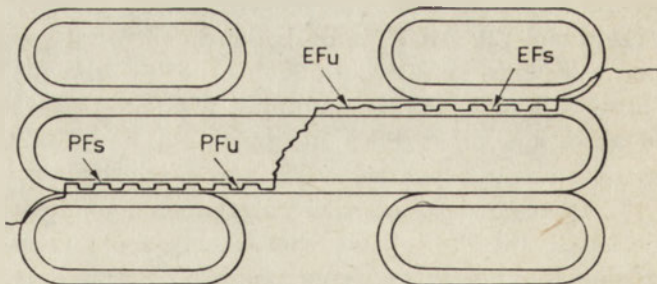
Nietypowe, jeśli chodzi o sposób regulacji rozdziału energii wzbudzenia pomiędzy fotoukładami są też zieleńce z rodzaju *Chlamydomonas* [6, 42]. Stan oksydoredukcyjny PQ ulega bowiem w nich podwójnej kontroli: przez łańcuch fotosyntetycznego transportu elektronów i łańcuch oddechowy [6]. Jest to konsekwencją postulowanego przez Bennoua związania enzymów oddechowych w *Chlamydomonas* nie tylko z frakcją mitochondriów, ale i chloroplastów [64].

#### V-2. Strukturalne zmiany w błonach tylakoidów towarzyszące przejściom Stan 1 — Stan 2

Fosforylacji/defosforylacji LHCP towarzyszą zmiany organizacji strukturalnej błon tylakoidów [65—67]. Wykazano je bezspornie stosując metody biochemiczne i cytologiczne.

Interesujących danych dostarczyła analiza elektroforetyczna lameli gran i stromy otrzymanych z chloroplastów grochu [66, 67].

Terminem lamele gran określa się tu tylko te błony gran, które przylegają do innych błon, zaś odpowiednikiem lameli stromy są wszystkie pozostałe błony tylakoidów. Przedstawiono to na zamieszczonej poniżej rycinie 6.

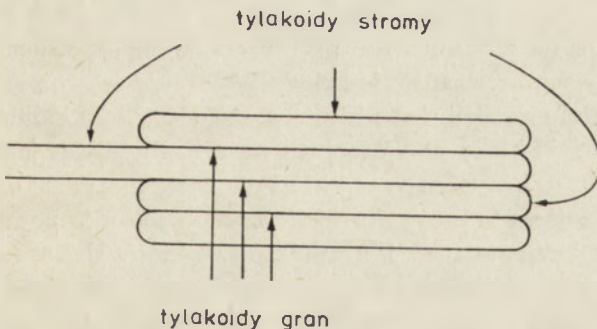


Ryc. 6

Po fosforylacji zaobserwowano spadek zawartości LHCP w granach [66, 67], w których przeważa PS II [68]. Można więc wnioskować o przemieszczaniu się tzw. ruchliwej puli LHC z lameli gran do lameli stromy [66, 67].

Wykazuje ona maksimum fluorescencji w 77 K przy 681 nm. W związku z tym fosforylacji towarzyszy wzrost emisji  $F_{681}$  w lamelach stromy, spadek zaś w lamelach gran oraz wzrost stosunku chlorofilu a do chlorofilu b w lamelach gran i odpowiadający mu spadek w lamelach stromy. Przekonywającego, bezpośredniego dowodu na to, iż fosforylacja LHCP zachodzi w granach i następuje potem przemieszczanie się ufosforylowanego LHC do lameli stromy dostarczyło opisane poniżej doświadczenie. Chloroplasty grochu inkubowano z  $[\gamma^{32}\text{P}]\text{ATP}$  na świetle. Już po 5 min, a tym bardziej po 20 min stwierdzano większe znakowanie lameli gran niż lameli stromy. Jest to zgodne z faktem, iż zasadnicza część LHC (80—90%) występuje w lamelach gran [68]. Jeśli po 5 min fosforylacji dodano do próby DCMU, aby uniemożliwić dalszą fosforylację oraz fluorek sodowy hamujący defosforylację, znakowanie w granach spada, a w lamelach stromy rośnie. Po 15 min rozmieszczenie znakowania jest prawie równomierne [67]. Wynika z tego, że LHCP ulega fosforylacji w granach i część wolnego LHC przemieszcza się do lameli stromy [65—67].

Przeprowadzono szczegółową analizę przemieszczania się białek dubletu LHCP, których masy cząsteczkowe określono w szpinaku na 25 000 i 27 000. Przy okazji stwierdzono, iż włączanie fosforanu do tych białek nie jest równomierne. W nienaruszonych tylakoidach fosforylacja białka o masie cząsteczkowej 25 000 przewyższyła 3-krotnie fosforylację białka o masie 27 000. Ponadto wykazano, że różni się skład białkowy LHC związanego z PS II i podlegającego przemieszczaniu między lamelami gran i stromy. W ruchliwym LHC stosunek ilościowy polipeptydów o masie cząsteczkowej 27 000 do polipeptydów o masie 25 000 wynosi 2:1, natomiast w związanym LHC 4:1 [14]. Dodatkowym potwierdzeniem przemieszczania się ufosforylowanych LHC pomiędzy lamelami gran i stromy są doświadczenia z zastosowaniem kriorytownictwa [15, 69]. W błonach tylakoidów poddanych tej technice wyróżnia się 4 rodzaje powierzchni przełamania (Ryc. 7): w granach  $\text{EF}_s$  i  $\text{PF}_s$ , a w lamelach stromy  $\text{EF}_u$  i  $\text{PF}_u$ , gdzie E i P są to odpowiadające sobie powierzchnie przełamania, E po stronie egzo-



**Ryc. 7.** Tylakoidy poddane technice kriorytownictwa. Wg Stae helina i Arntzena (6), dzięki uprzejmości autorów i Rokefeller University Press

plazmatycznej (ang. *exoplasmic face*), P po stronie plazmatycznej (ang. *protoplasmic face*). Indeks s dotyczy lameli gran (ang. *stacked*), natomiast indeks u dotyczy lameli stromy (ang. *unstacked*) [6, 70]. Cząsteczki o wielkościach 10,5, 13 i 16 nm obserwowane na powierzchni EF stanowią strukturalny odpowiednik kompleksu PS II. Różnice w rozmiarach tych cząsteczek wynikają z tego, że rdzeń kompleksu o średnicy 8 nm jest otoczony przez różną ilość związanego LHC [71]. Wśród cząstek występujących na powierzchni PF wyróżnia się kilka ich rodzajów 10—11 nm cząsteczki PS I ze związanymi kompleksami zbierającymi energię, 8—9 nm cząstki cyt f/b<sub>6</sub>, 9—10 nm cząstki odpowiadające hydrofobowemu fragmentowi czynnika sprzęgającego syntetazy ATP, 8—9 nm cząstki LHCP nie związane silnie z PS II. Obserwacje mikroskopowe ujawniły bezspornie, iż te właśnie cząstki przemieszczają się na skutek fosforylacji z lameli gran do lameli stromy, zaś po defosforylacji w kierunku przeciwnym [6, 66].

Wydaje się, że przemieszczanie się LHC jest konsekwencją zmian konformacyjnych wywołanych zmianą ładunku po fosforylacji [6]. Każda ruchliwa cząstka LHC zawiera prawdopodobnie 6 pojedynczych cząsteczek LHCP [72]. Fosforylacja każdej przemieszczającej się cząstki LHC w zależności od tego, czy fosforylacji w LHCP ulega jedna czy dwie reszty treoniny [4, 5], powoduje wprowadzenie 6—12 ujemnie naładowanych grup fosforanowych [6]. Opisany wzrost ładunku ujemnego w sąsiedztwie PS II po fosforylacji został wykazany doświadczalnie [73]. Zakłóca on występującą pomiędzy błonami równowagę między siłami przyciągania i odpychania [74]. Następuje odwracalne zmniejszenie zdolności błon do tworzenia gran, co wykazano stosując mikroskopię elektronową [66, 75], dichroizm liniowy [76] i subfrakcjonowanie [77]. W ufosforylowanych chloroplastach grochu stwierdzono nawet, że ilość gran jest o około 10—15% [2, 73, 75], a nawet 23% mniejsza niż w organelach niefosforylowanych.

Po odkryciu przemieszczania się LHC pomiędzy lamelami stromy i gran na skutek fosforylacji/defosforylacji, interesująca wydawała się próba wyjaśnienia, czy migracja ta jest warunkiem koniecznym dla przejścia typu Stan 1 — Stan 2 w chloroplastach. Stosując cholesterol lub jego pochodne, które wpływają na zmniejszenie płynności błon [78, 79] w sposób uniemożliwiający przemieszczanie się składników błonowych, nie obserwowano regulacji rozdziału energii wzbudzenia pomiędzy fotoukładami, nawet przy pełnej aktywności kinazy białkowej i fosfatazy. Przedstawione wyjaśnienie przejść typu Stan 1 — Stan 2 w chloroplastach można uzupełnić stwierdzeniem, że przejścia te mają charakter dwuetapowy i obejmują: 1) kowalencyjne modyfikacje LHCP i 2) przemieszczanie się zmodyfikowanego LHC z lameli gran do lameli stromy po fosforylacji, natomiast po defosforylacji w kierunku przeciwnym [5]. Wydaje się, że przenoszenie energii wzbudzenia pomiędzy fotoukładami przez LHCP ma charakter pośredni [6]. Przemieszczanie się ufosforylowanego LHC z lameli gran zmniejsza

możliwość przenoszenia energii pomiędzy centrami PS II na skutek ograniczenia sprzężenia pomiędzy tymi centrami [49, 80, 81]. Wskutek tego zwiększa się ilość energii wzbudzenia przekazywanej do PS I w porównaniu z PS II. Defosforalacja i powrót LHC do lameli gran zwiększa sprzężenie pomiędzy centrami PS II, co z kolei zwiększa ilość energii wzbudzenia przekazywanej do PS II w porównaniu z PS I [49, 80]. Opierając się na przedstawionych danych, Bennett wysunął hipotezę, iż kinaza białkowa LHCP jest zlokalizowana w lamelach gran, zaś fosfataza w lamelach stromy [7].

### V-3. Związek fosforylacji LHCP z cyklem Calvina

Między szybkością asymilacji dwutlenku węgla a stopniem redukcji PQ w chloroplastach zaobserwowano występowanie odwrotnie proporcjonalnej zależności [22, 40]. Wskazuje to na możliwość zależności pomiędzy szybkością włączania CO<sub>2</sub> w chloroplastach a stopniem fosforylacji LHCP [22]. Przypuszczenie to potwierdza obserwacja, iż specyficzny inhibitor cyklu Calvina — aldehyd D,L-glicerynowy stymuluje fosforylację LHCP [82]. Ponadto stwierdzono, że w początkowej fazie wiązania CO<sub>2</sub>\* fosforylacja jest największa, spada natomiast w miarę wzrostu szybkości asymilacji [82]. W fazie zastoju cykl Calvina jest ograniczony niskim poziomem jego pośredników, [85] i warunki sprzyjają redukcji puli PQ, a zatem fosforylacji LHCP i wytwarzaniu ATP głównie w cyklicznym transporcie elektronów, wymagającym udziału PS I. Podwyższenie stosunku ATP/ADP pozwala na nagromadzenie pośredników cyklu Calvina i rozpoczęcie fazy szybkiego włączania CO<sub>2</sub>, co prowadzi do utlenienia PQ więc i defosforylacji LHCP, a w konsekwencji do przewagi niecyklicznego transportu elektronów [9]. Wiążąc to z przedstawioną wcześniej hipotezą regulacji aktywności kinazy białkowej, można wnioskować, że jej aktywność jest największa, gdy PS II jest wzbudzony światłem o tak dużej intensywności, że działanie enzymów stromy nie jest ograniczone ilością wytwarzanego NADPH i ATP [22].

## VI. Inne kinazy białkowe chloroplastów

### VI-1. Kinaza fosforylująca karboksylazę/oksygenazę RuBP

Do najsilniej fosforylowanych białek w stromie chloroplastów szpinaku należą białka o masach cząsteczkowych 56 000 i 16 000, zidentyfikowane

\* W chloroplastach izolowanych z liści przechowywanych przez pewien czas w ciemności, po naświetleniu wiązanie CO<sub>2</sub> osiąga maksimum dopiero po trwającej 1—5 min fazie zastoju [9, 83]. Czas jej trwania można modyfikować przez zmiany stosunku ATP/ADP [9, 84].

odpowiednio jako duża i mała podjednostka RuBP karboksylazy/oksygenazy RuBP [16]. Enzym ten składa się najczęściej z 8 dużych i 8 małych podjednostek i ma masę cząsteczkową około 560 000 [85, 86]. Fosforylację obu jego podjednostek katalizuje niezależna od światła kinaza białkowa, prawdopodobnie enzym rozpuszczalny stromy [16].

Część cząsteczek karboksylazy/oksygenazy RuBP występuje w otoczce chloroplastów [87, 88]. Enzym jest związany z błonami nawet po poddaniu ich działaniu ultradźwięków w buforze o wysokiej sile jonowej, co wskazuje na to, iż wnioskowanie o umiejscowieniu go w otoczce nie jest artefaktem [88]. Te cząsteczki małej podjednostki, które są związane z otoczką, są fosforylowane przez kinazę białkową występującą także w otoczce. Kinaza ta jest stymulowana przez jony  $Mg^{2+}$ , hamowana przez ADP i w zakresie pH 7—8 jest niewrażliwa na zmiany pH [89]. Dodatkowo wymaga dla swej aktywności obecności fosfolipidów, jak fosfatydyloseryna i fosfatydylocholina oraz jonów  $Ca^{2+}$  [90]. Fosforyluje dwa białka związane z zewnętrzną błoną otoczki: wspomnianą małą podjednostkę karboksylazy/oksygenazy RuBP i w mniejszym stopniu polipeptyd o masie cząsteczkowej 24 000 [89]. Niewykluczone, że jest on identyczny z białkiem o właściwościach kinazy białkowej o masie cząsteczkowej 25 000, opisanym wcześniej przez L i n a i w s p. [91]. Biologiczne znaczenie fosforylacji zarówno karboksylazy/oksygenazy RuBP występującej w stromie, jak i w otoczce chloroplastów nie zostało dotąd wyjaśnione.

#### VI-2. Kinazy białkowe wyizolowane z błon chloroplastów szpinaku

Z błon chloroplastów szpinaku, po ich upłynnieniu oktyloglukozydem i cholanem, wyizolowano i oczyszczono dwie różne kinazy białkowe [91, 92], jedną o masie cząsteczkowej 25 000 i drugą o masie 38 000 [91]. Ich aktywność nie podlega kontroli redoks i żadna nie fosforyluje LHCP. Włączają natomiast fosforan z  $[\gamma^{32}P]ATP$  do reszt serynowych kazeiny lub histonu [92]. Aktywność kinazy fosforylującej kazeinę wykryto także w nie zawierających kinazy LHCP chloroplastach komórek pochwy okołowiązkowej kukurydzy [93]. Nie wiadomo, jakie białka są substratami opisanych kinaz białkowych w warunkach *in vivo* [91].

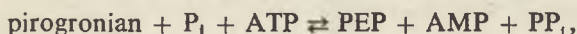
#### VI-3. Kinaza białkowa fosforylująca białka rybosomów w chloroplastach

W izolowanych chloroplastach szpinaku inkubowanych z  $[\gamma^{32}P]ATP$ , w rybosomach fosforylacji ulegają dwa białka. Są to białko L18 w dużej podjednostce oraz białko L'31 w małej podjednostce. Fosforylacja ta jest zależna od światła i zachodzi w reszcie serynowej obu białek [3]. Jej fizjologiczne znaczenie nie jest jasne.

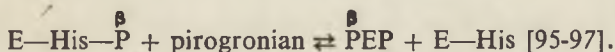
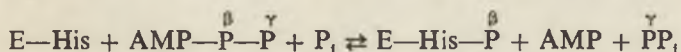


## VII. Regulacja aktywności fosfotransferazy ATP: pirogronian, $P_i$ przez fosforylację

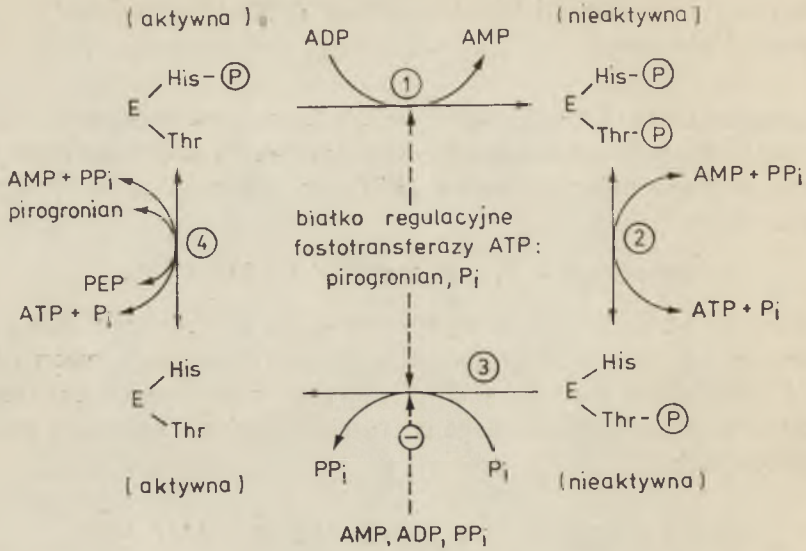
Fosfotransferaza ATP: pirogronian,  $P_i$  (nazywana potocznie dikinazą pirogronian,  $P_i$ ) jest enzymem odpowiedzialnym za przekształcenie pirogronianu w fosfoenolpirogronian (PEP) w roślinach typu  $C_4$  zgodnie z równaniem:



$\beta$ -fosforanowa grupa ATP jest wykorzystywana do ufosforylowania pirogronianu [15, 94], natomiast grupa  $\gamma$ -fosforanowa do ufosforylowania fosforanu [15]. Reakcja ta zachodzi w dwóch etapach z utworzeniem pośrednika enzymatycznego ufosforylowanego w reszcie histydyny, zgodnie z reakcjami cząstkowymi:



W czasie inkubacji nienaruszonych chloroplastów komórek mezofilu kukurydzy (roślina typu  $C_4$ ) na świetle w obecności [ $^{32}\text{P}$ ]ortofosforanu stwierdzono, że najsilniejszemu wyznakowaniu w stromie ulega białko o masie cząsteczkowej 100 000. W elektroforezie w żelu poliakrylamidowym zajmuje ono identyczną pozycję z fosfotransferazą ATP: pirogronia,  $P_i$  i reaguje ze skierowanymi przeciwko niej przeciwciałami. Dowodzi to, iż białko to jest opisywaną fosfotransferazą [98]. Stopień ufosforylowania cząsteczki ma istotne znaczenie dla jej aktywności katalitycznej [15, 97, 98] (Ryc. 8). Enzym ufosforylowany tylko w reszcie histydyny jest aktywny, lecz może ulec inaktywacji na skutek fosforylacji reszty treoniny w reakcji z ADP jako donorem reszty fosforanowej [97, 99] (Ryc. 6, reakcja 1). Usunięcie reszty fosforanowej z histydyny z nieaktywnego enzymu następuje przez reakcję z  $\text{AMP} + \text{PP}_i$  (Ryc. 8, reakcja 2) [97]. Nieaktywna cząsteczka enzymu, ufosforylowana tylko w reszcie treoniny jest aktywowana około 5-krotnie szybciej niż jego forma podwójnie ufosforylowana [96, 97]. Aktywacja polega na fosforolitycznym rozszczepieniu estru fosforanowego treoniny, przebiegającym z obecności fosforanu, z odtworzeniem aktywnego, nieufosforylowanego enzymu i  $\text{PP}_i$  (Ryc. 8, reakcja 3). Aktywacja jest znośzona przez AMP, współzawodniczo w odniesieniu do  $P_i$ , oraz przez ADP i  $\text{PP}_i$ , współzawodniczo w stosunku do nieaktywnego enzymu. Aktywny, nieufosforylowany enzym bierze udział w reakcji z  $\text{ATP} + P_i$ , w której fosforylacji ulega reszta histydyny. Donorem reszty fosforanowej w tej reakcji może też być PEP (Ryc. 8, reakcja 4) [97]. Stwierdzono, iż obie reszty fosforanowe w cząsteczce fosfotransferazy ATP: pirogronian,  $P_i$ : histydyna w centrum aktywnym i treonina w centrum regulatorowym



**Ryc. 8.** Schemat obrazujący regulację aktywności fosfotransferazy ATP: pirogronian,  $P_i$ . Wg Burnella i Hatcha (97), dzięki uprzejmości autorów i Elsevier/North-Holland Biomedical Press

enzymu są położone w bliskim sąsiedztwie [100]. Zarówno aktywacja, jak inaktywacja przebiegają przy udziale tego samego enzymu [97, 99]. Nazywano je białkiem regulacyjnym fosfotransferazy ATP: pirogronian,  $P_i$ . Masa cząsteczkowa jego podjednostki wynosi 45 000, dimeru występującego w pH 7,5 — 90 000, a tetrameru w pH 8,3 — 180 000 [97, 101]. Aktywacja fosfotransferazy nie jest prostym odwróceniem jej inaktywacji, gdyż oba procesy zachodzą w odrębnych miejscach katalitycznych. Świadczy o tym wpływ różnych związków na jeden z przeciwstawnych procesów. AMP i  $PP_i$  hamują aktywację, nie wpływając na inaktywację, natomiast ograniczona proteoliza powoduje tylko zahamowanie aktywacji nie wpływając na inaktywację [97].

Fosforylacja/defosforylacja enzymu stanowi istotny mechanizm regulacyjny jego aktywności *in vivo* [97]. Światło sprzyja inaktywacji fosfotransferazy, ciemność zaś aktywacji. Na świetle zachodzą bowiem zmiany stężenia ATP, zatem i ADP, który odgrywa rolę zarówno substratu w reakcji inaktywacji, jak i inhibitora aktywacji [97].

## VIII. Podsumowanie

Fosforylacja różnych białek chloroplastów jest obecnie poznana w różnym stopniu. W przypadku niektórych białek stwierdzono wyłącznie fakt ich fosforylacji, natomiast jej znaczenie biologiczne nie jest jasne. Fosfo-

rylacja innych białek, w tym dubletu LHCP i jej udział za pośrednictwem PQ w regulacji rozdziału energii wzbudzenia pomiędzy fotoukładami [11, 29, 30], jest dobrze poznana.

W większości opisywanych przypadków fosforylacja i defosforylacja białek są katalizowane przez odrębne enzymy, odpowiednio kinazę wymagającą ATP jako donora reszt fosforanowych oraz fosfatazę powodującą odszczepienie fosforanu z cząsteczki [4, 37, 42—44]. Znany jest jednak jeden nietypowy przykład regulacji aktywności enzymu przez odwracalną fosforylację. Dotyczy on fosfotransferazy ATP: pirogronian,  $P_i$ , a jego szczególny charakter polega na tym, że: 1) fosforylacja i defosforylacja są katalizowane przez ten sam enzym, 2) w reakcji fosforylacji donorem reszty fosforanowej jest ADP, 3) defosforylacja przebiega z udziałem  $P_i$ , więc oprócz nieufosforylowanego białka powstaje  $PP_i$ , czego nie stwierdzono w żadnym innym przypadku [97].

Duże zainteresowanie fosforylacją białek chloroplastów pozwala mieć nadzieję na pełniejsze poznanie tego procesu i jego roli fizjologicznej w najbliższych latach.

Pragnę wyrazić serdeczne podziękowania Panu Prof. Zbigniewowi Kaniudze za zachęcenie mnie do napisania niniejszej pracy oraz cenne uwagi podczas jej przygotowania.

Artykuł opracowano w ramach badań nad strukturą i funkcją aparatu fotosyntezy roślin chłodowrażliwych (temat 1.09 w problemie CPBP 05.02).

Zaakceptowano do druku 7 lipca 1986 r.

## PIŚMIENNICTWO

1. Greengard P., (1978), *Science*, **199**, 146—153.
2. Bennett J., (1984), *Physiol. Plant.*, **60**, 583—590.
3. Guitton C., Dorne A.-M., Mache R., (1984), *Biochim. Biophys. Res. Commun.*, **121**, 297—303.
4. Bennett J., (1977), *Nature*, **269**, 344—346.
5. Haworth P., Kyle D. J., Horton P., Arntzen C. J., (1982), *Photochem. Photobiol.*, **36**, 743—748.
6. Staehelin L. A., Arntzen C. J., (1983), *J. Cell Biol.*, **97**, 1327—1337.
7. Bennett J., (1983), *Biochem. J.*, **212**, 1—13.
8. Allen J. F., (1983), *Trends. Biochem. Sci.*, **8**, 369—373.
9. Bennett J., (1984), w: "Enzyme Regulation by Reversible Phosphorylation. Further Advances.", red. Cohen P., str. 227—246, Elsevier Science Publishers, Amsterdam.
10. Laing W. A., Christeller J. T., (1984), *Plant Sci. Lett.*, **36**, 99—104.
11. Allen J. F., Bennett J., Steinback K. E., Arntzen C. J., (1981), *Nature*, **291**, 21—25.
12. Bennett J., (1979), *Eur. J. Biochem.*, **99**, 133—137.

13. Farchaus J., Dilley R. A., Cramer W. A., (1985), *Biochim. Biophys. Acta*, **809**, 17—26.
14. Larsson U. K., Andersson B., (1985), *Biochim. Biophys. Acta*, **809**, 369—402.
15. Ashton A. R., Hatch M. D., (1983), *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **115**, 53—60.
16. Foyer C. H., (1985), *Biochem. J.*, **231**, 97—103.
17. Alfonzo R., Nelson R., Racker E., (1980), *Plant Physiol.*, **65**, 730—734.
18. Widger W. R., Farchaus J. W., Cramer W. A., Dilley R. A., (1984), *Arch. Biochem. Biophys.*, **233**, 72—79.
19. Süß K. H., (1980), *FEBS Lett.*, **112**, 255—259.
20. Burke J. J., Ditto C. L., Arntzen C. J., (1978), *Arch. Biochem. Biophys.*, **187**, 252—263.
21. Mullet J. E., Arntzen C. J., (1980), *Biochim. Biophys. Acta*, **589**, 100—117.
22. Horton P., (1983), *FEBS Lett.*, **152**, 47—52.
23. Bennett J., (1979), *FEBS Lett.*, **103**, 342—344.
24. Allen J. F., (1984), *FEBS Lett.*, **166**, 237—244.
25. Bennett J., Steinback K. E., Arntzen C. J., (1980), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **77**, 5253—5257.
26. Siegenthaler P.-A., (1974), *FEBS Lett.*, **39**, 337—340.
27. Allen J. F., Horton P., (1981), *Biochim. Biophys. Acta*, **638**, 290—295.
28. Horton P., Allen J. F., Black M. T., Bennett J., (1981), *FEBS Lett.*, **125**, 193—196.
29. White C. C., Chain R. K., Malkin R., (1978), *Biochim. Biophys. Acta*, **502**, 127—137.
30. Goldbeck J. H., Kok B., (1979), *Biochim. Biophys. Acta*, **547**, 347—360.
31. Okayama S., (1976), *Biochim. Biophys. Acta*, **440**, 331—336.
32. Millner P. A., Widger W. R., Abbott M. S., Cramer W. A., Dilley R. A., (1982), *J. Biol. Chem.*, **257**, 1736—1782.
33. Wyatt J. T., Colman R. F., (1977), *Biochemistry*, **16**, 1333—1342.
34. Markwell J. P., Baker N. R., Thornber J. P., (1983), *Photochem. Photophys.*, **5**, 201—207.
35. Markwell J. P., Baker N. R., Bradbury M., Thornber J. P., (1984), *Plant Physiol.*, **74**, 348—354.
36. Mullet J. E., Baldwin T. O., Arntzen C. J., (1981) w: "Photosynthesis", red. Akoyunoglou G., t. 3, str. 577—582, Balaban Int. Science Services, Philadelphia.
37. Bennett J., (1980), *Eur. J. Biochem.*, **104**, 85—89.
38. Markwell J. P., Baker N. R., Thornber J. P., (1982), *FEBS Lett.*, **112**, 171—174.
39. Allen J. F., (1984), *Biochem. Soc. Trans.*, **12**, 774—775.
40. Horton P., Foyer C., (1983), *Biochem. J.*, **210**, 517—521.
- 40a. Moll B. A., Steinback K. E., (1986), *Plant Physiol.*, **80**, 420—423.
41. Hodges M., Barber J., (1984), *Biochim Biophys. Acta*, **767**, 102—107.
42. Beliveau R., Bellemare G., (1979), *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **88**, 797—803.
43. Owens G. C., Ohad I., (1982), *J. Cell Biol.*, **93**, 712—718.
44. Steinback K. E., Bose S., Kyle D. J., (1982), *Arch. Biochem. Biophys.*, **216**, 356—361.
45. Horton P., Black M. T., (1981), *Biochim. Biophys. Acta*, **635**, 53—62.
46. Krause G. H., Behrend U., (1983), *Biochim. Biophys. Acta*, **723**, 176—181.

47. Telfer A., Allen J. F., Barber J., Bennett J., (1983), *Biochim. Biophys. Acta*, **722**, 176—181.
48. Bose S., (1982), *Photochem. Photobiol.*, **36**, 725—731.
49. Haworth P., Kyle D. J., Arntzen C. J., (1982), *Biochim. Biophys. Acta*, **680**, 343—351.
50. Haworth P., Kyle D. J., Arntzen C. J., (1982), *Arch. Biochem. Biophys.*, **218**, 199—206.
51. Williams W. P., (1984), *Biochem. Soc. Trans.*, **12**, 776—778.
52. Bennett J., (1984), *Biochem. Soc. Trans.*, **12**, 771—774.
53. Weis E., (1985), *Biochem. Biophys. Acta*, **807**, 118—126.
54. Telfer A., Barber J., (1981), *FEBS Lett.*, **129**, 161—165.
55. Farchaus J., W., Widger W. R., Cramer W. A., Dilley R. A., (1982), *Arch. Biochem. Biophys.*, **217**, 362—367.
56. Hodges M., Packham N. K., Barber J., (1985), *FEBS Lett.*, **181**, 83—87.
57. Thornber J. P., Highkin H. R., (1974), *Eur. J. Biochem.*, **41**, 109—116.
58. Burke J. J., Steinback K. E., Arntzen C. J., (1979), *Plant Physiol.*, **63**, 237—243.
59. Chow W. S., Telfer A., Chapman D. J., Barber J., (1981), *Biochim. Biophys. Acta*, **638**, 60—68.
60. Gantt E., (1981), *Ann. Rev. Plant. Physiol.*, **32**, 327—347.
61. Glazer A. N., (1982), *Ann. Rev. Microbiol.*, **36**, 173—198.
62. Murata N., (1969), *Biochim. Biophys. Acta*, **172**, 242—251.
63. Ried A., Reinhardt B., (1980), *Biochim. Biophys. Acta*, **592**, 76—86.
64. Bennoun P., (1982), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **79**, 4352—4356.
65. Andersson B., Akerlund H.-E., Jergil B., Larsson C., (1982), *FEBS Lett.*, **149**, 181—185.
66. Kyle D. J., Staehelin L. A., Arntzen C. J., (1983), *Arch. Biochem. Biophys.*, **222**, 527—541.
67. Kyle D. J., Kuang T.-Y., Watson J. L., Arntzen C. J., (1984), *Biochim. Biophys. Acta*, **765**, 89—96.
68. Anderson J. M., Melis A., (1983), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **80**, 745—749.
69. Staehelin L. A., DeWit M., (1984), *J. Cell Biochem.*, **24**, 261—269.
70. Branton D., Bullivant S., Gilula N. B., Karnovsky M. J., Moor H., Muhlethaler K., Northcote D.H., Packer L., Satir B., Satir P., Speth V., Staehelin L. A., Steere R. L., Weinstein R. S., (1975), *Science*, **190**, 54—56.
71. Armond P. A., Staehelin L. A., Arntzen C. J., (1977), *J. Cell Biol.*, **73**, 400—418.
72. McDonnell A., Staehelin C. J., (1980), *J. Cell Biol.*, **84**, 40—56.
73. Kyle D. J., Arntzen C. J., (1983), *Photochem. Photobiophys.*, **5**, 11—25.
74. Barber J., (1982), *Ann. Rev. Plant Physiol.*, **33**, 261—295.
75. Telfer A., Hodges M., Millner P. A., Barber J., (1984), *Biochim. Biophys. Acta*, **766**, 554—562.
76. Biggins J., (1982), *Biochim. Biophys. Acta*, **679**, 479—482.
77. Larsson U. K., Jergil B., Andersson B., (1983), *Eur. J. Biochem.*, **135**, 25—29.
78. Shinitzky M., Skornick Y., Haran-Ghera N., (1979), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **76**, 5313—5316.
79. Barber J., Chow W. S., Scoufflaire C., Lannoye R., (1980), *Biochim. Biophys. Acta*, **591**, 92—103.
80. Kyle D. J., Haworth P., Arntzen C. J., (1982), *Biochim. Biophys. Acta*, **680**, 336—342.

81. Torti F., Gerola P. D., Jennings R. C., (1984), *Biochim. Biophys. Acta*, **767**, 321—325.
82. Allen J. F., Bennett J., (1981), *FEBS Lett.*, **123**, 67—70.
83. Walker D. A., (1976) w: "Topics in Photosynthesis", red. Barber J., str. 235—278, Elsevier, Amsterdam.
84. Walker D. A., Robinson S. P., (1978) w: "Photosynthetic Carbon Assimilation", red. Siegelman H. W., Hind G., str. 43—57, Plenum, New York.
85. Kaniuga Z., (1976), *Post. Biochem.*, **22**, 245—305.
86. Buchanan B. B., Schürman P., (1973) w: "Current Topics in Cellular Regulation", red. Horecker B. L., Stadtman E. R., t. 7, str. 1—20, Academic Press, New York, London.
87. Pineau B., Douce R., (1974), *FEBS Lett.*, **47**, 255—259.
88. Joyard J., Grossman A., Bartlett S. G., Douce R., Chua N.-H., (1982), *J. Biol. Chem.*, **257**, 1095—1101.
89. Soll J., Buchanan B. B., (1983), *J. Biol. Chem.*, **258**, 6686—6689.
90. Muto S., Shimogawara K., (1985), *FEBS Lett.*, **193**, 88—92.
91. Lin Z.-F., Lucero H. A., Racker E., (1982), *J. Biol. Chem.*, **257**, 12153—12156.
92. Lucero H. A., Lin Z.-F., Racker E., (1982), *J. Biol. Chem.*, **257**, 12157—12160.
93. Schuster G., Ohad J., Martineau B., Taylor W. C., (1985), *J. Biol. Chem.*, **260**, 11866—11873.
94. Ashton A. R., Burnell J. N., Hatch M. D., (1984), *Arch. Biochem. Biophys.*, **230**, 492—503.
95. Andrews T. J., Hatch M. D., (1969), *Biochem. J.*, **114**, 117—125.
96. Burnell J. N., (1984), *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **120**, 559—565.
97. Burnell J. N., Hatch M. D., (1985), *Trends. Biochem. Sci.*, **10**, 288—291.
98. Foyer C., (1984), *Biochem. J.*, **222**, 247—253.
99. Burnell J. N., Hatch M. D., (1983), *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **111**, 288—293.
100. Burnell J. N., (1984), *Biochem. Int.*, **9**, 683—689.
101. Burnell J. N., Hatch M. D., (1985), *Arch. Biochem. Biophys.*, **237**, 490—503.

#### Addendum

Ostatnie badania ujawniły, że białko o masie cząsteczkowej 10 000 (por. II) podlegające fosforylacji w błonach tylakoidów nie może być utożsamiane z cytochromem  $b_{559}$  lub  $b_{563}$  ani z proteolipidem wrażliwym na DCCD [102, 103] (porównanie N-końcowych sekwencji aminokwasowych tych białek i analiza ich składu aminokwasowego). Rozpatrywane białko wchodzi w skład PS II i pozostaje silnie związane z lamelami gran również po fosforylacji [104].

Po wielu bezskutecznych próbach wyizolowano z błon tylakoidów szpinaku kinazę białkową (masa cząsteczkowa 64 000) fosforylującą LHCP [105, 106]. Natomiast białko o masie 38 000, uważane przedtem też za kinazę białkową (por. VI-2) jest oksydoreduktazą ferredoksyna : NADP [106] (badania immunologiczne).

102. Farchaus J., Dilley R. A., (1986), *Arch. Biochem. Biophys.* **244**, 94—101.
103. Hird S. M., Dyer T. A., Gray J. C., (1986), *FEBS Lett.* **209**, 181—186.
104. Allen J. F., Holmes N. G., (1986), *FEBS Lett.* **202**, 175—181.
105. Coughlan S. J., Hind G., (1986), *J. Biol. Chem.* **261**, 11378—11385.
106. Coughlan S. J., Hind G., (1986), *J. Biol. Chem.* **261**, 14062—14068.

WALDEMAR MARCZEWSKI

## Rola karboksylazy fosfoenolpirogonianu w roślinach

### Role of Phosphoenolpyruvate Carboxylase in Plants

#### Spis treści

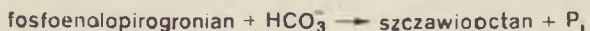
- I. Wprowadzenie
- II. Karboksylaza PEP w liściach roślin  $C_3$  i  $C_4$
- III. Karboksylaza PEP w liściach roślin z rodziny *Crassulaceae*
- IV. Rola karboksylazy PEP w procesie nieautotroficznego włączania  $CO_2$ 
  - IV-1. Rola karboksylazy PEP w brodawkach roślin motylkowych

#### Contents

- I. Introduction
- II. PEP carboxylase in leaves of  $C_3$  and  $C_4$  plants
- III. PEP carboxylase in leaves of CAM plants
- IV. Role of PEP carboxylase in nonautotrophic (dark)  $CO_2$  fixation
  - IV-1. Role of PEP carboxylase in legume root nodules

## I. Wprowadzenie

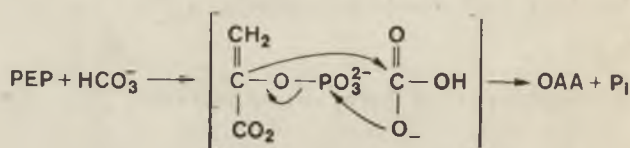
Enzym karboksylaza fosfoenolpirogonianu (ortofosforan: szczawiooctan — karboksylaza) (EC 4.1.1.31.) katalizuje karboksylację fosfoenolpirogonianu do szczawiooctanu (Reakcja 1):



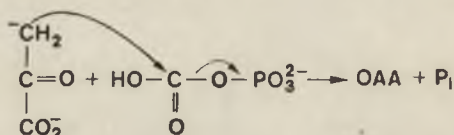
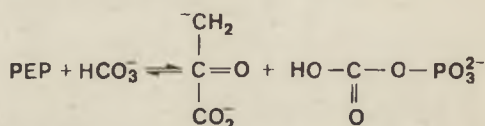
Dr, Zakład Metabolizmu Węgla i Azotu, Uniwersytet im. A. Mickiewicza, 61 701 Poznań, Fredry 10 (Obecny adres — Instytut Ziemniaka, Oddział Naukowo-Badawczy Młochów, 05-832 Rozalin k. Warszawy).

Wykaz stosowanych skrótów: PEP — fosfoenolpirogonian; forma  $C_3$  — forma karboksylazy PEP występująca w liściach roślin, u których odbywa się fotosynteza typu  $C_3$ , występuje również w liściach roślin  $C_4$ ; forma  $C_4$  — forma karboksylazy PEP występująca wyłącznie w liściach roślin, u których odbywa się fotosynteza typu  $C_4$ ; Crassulacean Acid Metabolism (CAM) — określenie sposobu fotosyntezy w typowych sukulentach z rodziny gruboszowatych (*Crassulaceae*); ASP — asparaginian; MA — jabłczan; OAA — szczawiooctan; PA — pirogonian;  $P_i$  — fosforan nieorganiczny; rośliny  $C_3$  i  $C_4$  — rośliny u których pierwotnym produktem fotosyntezy jest odpowiednio związek trójwęglowy i czterowęglowy; RuBP — rybulozo-1,5-bisfosforan.

Bandurski i Greiner [1] wykazali po raz pierwszy aktywność enzymu w liściach szpinaku. Enzym występuje we wszystkich roślinach oraz mikroorganizmach [2, 3]. Reakcja jest silnie egzoergiczna,  $\Delta G = -6$  do  $-8$  kcal/mol (25—34 kJ/mol), przez co w warunkach naturalnych jest praktycznie nieodwracalna [4]. Według Maruyama i wsp. [5] proces karboksylacji przebiega jednoetapowo (Reakcja 2):



O'Leary i wsp. [6] wskazują natomiast, że proces karboksylacji odbywa się w dwóch etapach. W pierwszym etapie powstaje karboksyfosforan oraz enolowa forma pirogronianu. W drugim etapie procesu tworzy się szczawiooctan i uwalnia fosforan (Reakcja 3):



Schemat drugi przebiegu procesu karboksylacji jest bardziej prawidłowy, ponieważ pokazuje aktywację słabo elektrofilowego atomu węgla wodorowęglanu kosztem energii fosfoenolopirogronianu. Energia powstałego karboksyfosforanu jest niezbędna do utworzenia wiązania C—C w drugim etapie procesu [6, 7, 13].

Kofaktorami enzymu są kationy dwuwartościowe, głównie jony  $\text{Mg}^{2+}$  oraz w mniejszym stopniu jony  $\text{Mn}^{2+}$ ,  $\text{Co}^{2+}$ . Jony  $\text{Hg}^{2+}$ ,  $\text{Zn}^{2+}$ ,  $\text{Ni}^{2+}$  również aktywują enzym [2, 6]. Są dane wskazujące, że substratem enzymu jest kompleks  $\text{Mg}^{2+} - \text{PEP}$  [8, 9], ale dominuje pogląd, że karboksylaza PEP reaguje z wolnymi jonami  $\text{Mg}^{2+}$  i wolnym PEP [3]. Drugim substratem karboksylazy PEP są jony  $\text{HCO}_3^-$  [10]. Tylko w jednej pracy [11] wykazano, że enzym izolowany z liści kukurydzy cechuje wyższe powinowactwo do  $\text{CO}_2$ . Nie można jednak wykluczyć, że różne formy enzymu mogą wykorzystywać jako substrat  $\text{CO}_2$  lub  $\text{HCO}^-$  [12].



W zależności od techniki pomiaru masę cząsteczkową karboksylazy PEP określono na 225 650 (wirowanie w gradiencie sacharozowym) w przypadku formy  $C_3$  enzymu, izolowanej z liści kukurydzy [14], a 400 000 (badanie równowagi sedymentacyjnej) w przypadku karboksylazy PEP także z liści kukurydzy [15] i z *Salmonella typhimurium* [18]. Z kolei m.c.z. białka izolowanego z trzciny cukrowej [16] i z liści szpinaku [17] wyznaczona techniką filtracji żelowej wynosi 560 000. Dotychczasowe badania wykazały, że karboksylaza PEP jest tetramerem składającym się z czterech identycznych podjednostek o m.c.z. od 100 000 do 130 000 [15, 18—21]. Stwierdzono również, że aktywność enzymu izolowanego z liści roślin z rodziny gruboszowatych jest regulowana przez dysocjację tetramery do aktywnego dimeru, z czym wiążą się zmiany niektórych własności kinetycznych [19, 20]. W liściach sorgo wykazano dwa rodzaje podjednostek enzymu o m.c.z. 90 000 i 79 000 [22]. Podobne zróżnicowanie stwierdzono w liściach kukurydzy [23]. Sekwencja nukleotydowa genu strukturalnego karboksylazy PEP została określona w przypadku enzymu izolowanego z *E. coli* [21]. Odpowiadający temu genowi łańcuch polipeptydowy składa się z 883 aminokwasów, co odpowiada ciężarowi cząsteczkowemu 99 061 daltonów. W natywnej podjednostce karboksylazy PEP występują dwie reszty histydyny biorące udział w wiązaniu substratu lub reakcji katalitycznej enzymu [24].

W tkankach niezielonych karboksylaza PEP występuje we frakcji cytosolowej [25—27]. Większość danych literaturowych odnośnie rozmieszczenia form enzymatycznych w liściach roślin w fotosyntezie typu  $C_3$ ,  $C_4$  i u *Crassulaceae* wskazuje, że karboksylaza PEP występuje w cytosolu [14, 29—31]. Stwierdzono również aktywność enzymu w chloroplastach [32—34]. W liściach kilku gatunków roślin  $C_4$  wykazano zewnętrzne powiązanie enzymu z błonami chloroplastów [35]. U *Euglena gracilis* stwierdzono aktywność karboksylazy PEP w mitochondriach [36, 37], a u grzyba *Claviceps purpurea* w sferosomach [38].

Ting i Osmond [39] wyróżnili cztery formy enzymatyczne karboksylazy PEP.

1. Fotosyntetyczna forma karboksylazy PEP z liści roślin  $C_4$  o wysokich  $K_m^{PEP}$  (0,59 mM),  $K_m^{Mg^{2+}}$  (0,5 mM) i  $V_m$ , chromatograficznie różna od formy  $C_3$ .

2. Fotosyntetyczna forma karboksylazy PEP z liści roślin  $C_3$  o niskich  $K_m^{PEP}$  (0,14 mM),  $K_m^{Mg^{2+}}$  (0,097 mM) i  $V_m$ , chromatograficznie różna od formy z tkanek niezielonych.

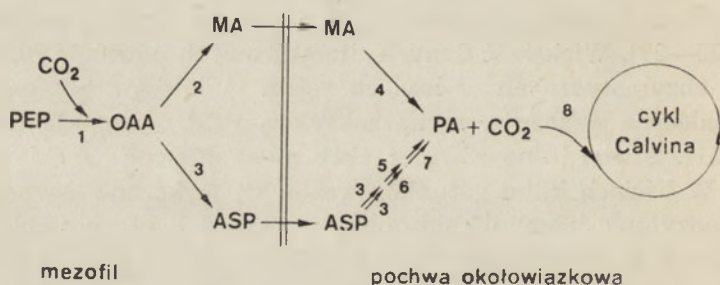
3. Forma karboksylazy PEP z liści roślin z rodziny *Crassulaceae* o niskich  $K_m^{PEP}$  (0,14 mM),  $K_m^{Mg^{2+}}$  i wysokim  $V_m$ , chromatograficznie podobna do fotosyntetycznych form z liści roślin  $C_3$  i  $C_4$ .

4. Forma karboksylazy PEP z tkanek niezielonych (typ nieautotroficzny) o niskich  $K_m^{PEP}$ ,  $K_m^{Mg^{2+}}$  i  $V_m$ , chromatograficznie zmienna.

## II. Karboksylaza PEP w liściach roślin $C_3$ i $C_4$

Procesy zielenienia i rozwoju tkanki liściowej roślin o fotosyntezie typu  $C_4$  wiążą się ze wzrostem aktywności karboksylazy PEP. W liściach kukurydzy stwierdzono 5-krotny wzrost aktywności tego enzymu, spowodowany stymulowaną przez światło syntezą *de novo* białka enzymatycznego [23]. W liściach sorgo aktywność karboksylazy PEP wzrastała 17-krotnie [22]. W zielonych liściach kukurydzy karboksylaza PEP stanowi od 10% [15] do 15% [23] białka. Stosunek ilości karboksylazy PEP do ilości karboksylazy rybulozo-1,5-bisfosforanowej wynosi 2:1 w liściach roślin  $C_4$ , podczas gdy w liściach roślin  $C_3$  wynosi on 0,1:1 [42]. W liściach kukurydzy aktywność formy  $C_4$  stanowi 85% a aktywność formy  $C_3$  15% całkowitej aktywności karboksylazy PEP [14].

Formy  $C_3$  i  $C_4$  enzymu uczestniczą w różnych szlakach metabolicznych. W komórkach mezofilu liści roślin  $C_4$  następuje przy udziale formy  $C_4$  karboksylazy PEP pierwotne włączenie  $CO_2$ . Powstały szczawiooctan jest redukowany do jabłczanu lub aminowany do asparaginianu. Powyższe związki czterowęglowe zostają przeniesione do komórek pochwy okołowiązkowej, gdzie ulegają dekarboksylacji. Uwalniany  $CO_2$  jest wtórnie włączany do cyklu Calvina [28, 44, 45]. (Schemat 1).



**Schemat 1.** Schemat fotosyntetycznego włączenia  $CO_2$  w roślinach  $C_4$ . Cyframi oznaczono enzymy katalizujące kolejne reakcje: karboksylaza PEP (1), dehydrogenaza jabłczanowa zależna od NADP (2), aminotransferaza asparaginianowa (3), dehydrogenaza jabłczanowa (dekarboksylująca) zależna od NADP (4), karboksykinaza PEP (5), dehydrogenaza jabłczanowa zależna od NAD (6), dehydrogenaza jabłczanowa (dekarboksylująca) zależna od NAD (7), karboksylaza RuBP (8).

Aktywność formy  $C_4$  karboksylazy PEP powoduje więc gromadzenie jabłczanu lub asparaginianu jako fotosyntetycznych intermediatów [43]. W liściach roślin  $C_3$  dwutlenek węgla jest bezpośrednio włączany do cyklu Calvina. Fosfoenolopirogronian nie jest więc substratem fotosyntezy jak w liściach roślin  $C_4$ , lecz produktem tego procesu. Aktywność karboksylazy PEP w liściach roślin  $C_3$  powoduje gromadzenie jabłczanu lub asparaginianu jako fotosyntetycznych produktów, co jest sposobem regulacji przepływu węgla w procesie fotosyntezy [43]. Nie wykazano żeby w roślinach

nach C<sub>3</sub> autotroficzne włączanie CO<sub>2</sub> odbywało się przez karboksylację fosfoenolopirogronianu do szczawiooctanu [46]. W ciemności rola karboksylazy PEP w liściach roślin C<sub>3</sub> i C<sub>4</sub> jest podobna do roli tego enzymu w organach niezielonych [43], o czym będzie mowa w dalszej części artykułu.

Formy C<sub>3</sub> i C<sub>4</sub> karboksylazy PEP różnią się wieloma parametrami. Po chromatografii na kolumnie jonowymiennej forma C<sub>4</sub> wypływa przy innej sile jonowej buforu wymywającego niż forma C<sub>3</sub> — zasadniczo przy niższej [14, 40, 41] lub nieco wyższej [43] w zależności od materiału, nośnika i buforu elucyjnego. Kinetyka reakcji przy zmiennym stężeniu PEP jest hiperboliczna w przypadku formy C<sub>3</sub> oraz sigmoidalna w przypadku formy C<sub>4</sub> [41]. Forma C<sub>4</sub> jest wyraźnie aktywowana przez glukozo-6-fosforan [40, 41, 47]. Forma C<sub>3</sub> karboksylazy PEP ma wyższe optimum działania (około 44°C) niż forma C<sub>4</sub> (około 35°C) [35, 42]. W przypadku formy C<sub>4</sub> zależność aktywności enzymu od temperatury wyrażona wykresem Arrheniusa wykazuje nieciągłość przypadającą na 10,8°C [15], 16°C [41], 17—20°C [35] i 15—25°C [14] zależnie od pochodzenia. Przyczynę występowania takiej własności kinetycznej (tzw. temperatury przejścia — ang. *transition temperature*) można upatrywać w powiązaniu enzymu z błonami [35], bądź w odwracalnej dysocjacji tetrameru do aktywnego dimeru [41]. Ponadto kwasy dwukarboksylowe, w szczególności jabłczan i asparaginian, ochraniają formę C<sub>4</sub> przed inaktywacją w temperaturze ponad 50°C [35, 48]. Stwierdzono, że forma C<sub>4</sub> karboksylazy PEP w liściach sorgo ma większy ciężar cząsteczkowy niż forma C<sub>3</sub>, co jest spowodowane obecnością podjednostki o m.c. 90 000 [22]. Ciężar cząsteczkowy formy C<sub>4</sub> w liściach kukurydzy wynosi 225 650 a formy C<sub>3</sub> 270 800 [14]. Takie same masy cząsteczkowe cechują karboksylazę PEP z liści *Atriplex spongiosa* — roślina C<sub>4</sub> i z liści *Atriplex hastata* — roślina C<sub>3</sub> [43]. Jednakowe masy cząsteczkowe wyznaczono dla form C<sub>3</sub> i C<sub>4</sub> enzymu z liści trzciny cukrowej [16]. Obrazy elektroforetyczne wskazują na mniejszą ruchliwość w polu elektrycznym formy C<sub>4</sub> niż C<sub>3</sub> [14, 43, 49]. W kilku publikacjach [6, 14, 15, 48, 50—53] opisano inne wartości przedstawionych powyżej własności form C<sub>3</sub> i C<sub>4</sub> karboksylazy PEP, w zależności od metodyki i warunków doświadczeń. Nie pomniejsza to jednak słuszności dokonania powyższego zestawienia.

Karboksylaza PEP z liści roślin C<sub>4</sub> (forma C<sub>4</sub>) należy do enzymów fotosyntetycznych regulowanych posttranskrypcyjnie przez światło [54]. Główną rolę w regulacji aktywności enzymu odgrywa proces odwracalnego utleniania i redukcji grup —SH białka [55]. W nocy (w ciemności) kinetyka reakcji przy zmiennym stężeniu PEP jest sigmoidalna,  $K_m^{PEP}$  ma wysoką wartość, a aktywność enzymu jest niska. W czasie dnia (na świetle) następuje wzrost aktywności enzymatycznej, obniża się  $K_m^{PEP}$ , a kinetyka reakcji przy zmiennym stężeniu substratu jest hiperboliczna. Jest to spowodowane odwracalnym procesem aktywacji-deaktywacji przez redukcję (w dzień, przez fotosyntetyczne czynniki redukcyjne) i utlenianie (w nocy) grup —SH białka. Związki tiolowe 2-merkaptoetanol i dwutiotreitól stoso-

wane w medium izolacyjnym, jako stabilizatory karboksylazy PEP, uniemożliwiają identyfikację stanów konformacyjnych enzymu występujących in vivo [54, 56].

W chloroplastach niektórych roślin  $C_3$  i  $C_4$  znaleziono tzw. termostabilną formę karboksylazy PEP [57—61]. Wyizolowano ją przy zastosowaniu procedury obejmującej inkubację surowego ekstraktu liściowego w  $50^\circ\text{C}$ , w pH 4,6 [57]. Forma ta wykazuje optimum temperaturowe w pH 5,4 oraz odmienne własności kinetyczne niż labilna forma karboksylazy PEP opisywana powszechnie w literaturze [58, 59]. Produktem działania enzymu jest labilny związek fosfokarbonylowy, który może być metabolizowany do jabłczanu [60, 61], a także wchodzić w reakcję transkarboksylacji z fosforanami pentoz [61]. Występowanie termostabilnej formy karboksylazy PEP nie jest w pełni udowodnione. Może to być tylko artefakt, pojawiający się w czasie oznaczania aktywności enzymu [3].

### III. Karboksylaza PEP w liściach roślin z rodziny *Crassulaceae*

W liściach roślin  $C_4$  reakcja pierwotnego włączenia  $\text{CO}_2$  (aktywność karboksylazy PEP) zachodzi w komórkach mezofilu, a wtórnego (aktywność karboksylazy RuBP) w komórkach pochwy okołowiązkowej (Schemat 1). Natomiast w liściach roślin z rodziny *Crassulaceae* reakcje pierwotnego i wtórnego włączenia  $\text{CO}_2$  odbywają się w obrębie tej samej komórki, ale przebiegają w różnym czasie [62].

W okresie ciemności skrobia jest głównym źródłem fosfoenolopirogronianu w tych roślinach [62]. Jego karboksylacja prowadząca do syntezy kwasów czterowęglowych (w 80—95% jabłczanu) zachodzi w nocy.

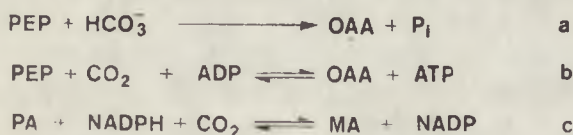
W czasie dnia następuje ich dekarboksylacja i włączanie uwalnianego  $\text{CO}_2$  do cyklu Calvina. Występowanie cyklu dobowego aktywności karboksylazy PEP oraz zmiana aktywności tego enzymu w okresie dłuższym, np. sezonu są ważnymi czynnikami w regulacji procesu fotosyntezy u *Crassulaceae*. Na aktywność karboksylazy PEP wpływają: fotoperiod [63, 64, 71], wiek rośliny [65, 66], stres solny [67, 68], stres wodny [69, 70], temperatura [62, 69]. W liściach rośliny *Kalanchoe blossfeldiana* wykazano obecność form izoenzymatycznych karboksylazy PEP [64]. Izoenzym przeważający w liściach roślin rosnących w warunkach dnia długiego wykazuje maksimum aktywności w czasie dnia. Uczestniczy on w dziennym włączeniu  $\text{CO}_2$ , gdy *Crassulacean Acid Metabolism* jest mało intensywny. Izoenzym ulegający wzmożonej ekspresji w liściach roślin rosnących w warunkach dnia krótkiego wykazuje maksimum aktywności w czasie nocy. Uczestniczy on w ciemniowym włączeniu  $\text{CO}_2$  w sposób typowy dla *Crassulacean Acid Metabolism* [63]. Masy cząsteczkowe obu izoenzymów różnią się nieznacznie, podobnie jak ich własności elektroforetyczne [63] oraz kinetyczne [64]. Przebieg fotosyntezy w roślinach rodzaju *Kalanchoe* za-

leży od wieku liści. W młodych liściach akumulacja jabłczanu w ciemności jest nieznaczna i przebiega jak w roślinach  $C_3$ . Wraz z rozwojem rośliny wykształca się Crassulacean Acid Metabolism [65, 66]. Podobna zmiana sposobu fotosyntezy następuje pod wpływem stresu solnego w liściach *Mesembryanthemum crystallinum*. Na obrazie elektroforetycznym karboksylazy PEP pojawia się wtedy dodatkowy prążek aktywności [67], będący raczej *de novo* syntetyzowaną formą enzymu niż modyfikacją istniejącego już białka [68]. Natomiast w liściach *Umbilicus rupestris* pod wpływem stresu wodnego następuje zmiana własności w istniejącej już formie karboksylazy PEP. Metabolizm węglowy zmienia się z typu  $C_3$  na „częściowo” Crassulacean Acid Metabolism (CAM-idling). W nocy nie występuje netto włączanie  $CO_2$ , a jedynie zachodzi ciemniowa akumulacja jabłczanu z wykorzystaniem oddechowego  $CO_2$  [70].

Regulacja rytmu dzień/noc metabolizmu węglowego u *Crassulaceae* odbywa się głównie na poziomie działania karboksylazy PEP [62]. Powstaje pytanie czy rytm aktywności karboksylazy PEP jest rezultatem cyklicznej syntezy *de novo* i degradacji [73], czy też wynika z modyfikacji enzymu [72]. Przeważa pogląd, że występują dwa stany konformacyjne karboksylazy PEP. Pierwszy stan „fizjologicznie aktywny” charakteryzuje się niskim  $K_m^{PEP}$  i wysokim  $K_i$  MA i funkcjonuje w nocy. Drugi stan „fizjologicznie nieaktywny” wykazuje wysokie  $K_m^{PEP}$  i niskie  $K_i$  MA i dominuje w dzień [72, 74, 75]. Podsumowując, regulacja fotosyntezy u *Crassulaceae* na poziomie aktywności karboksylazy PEP odbywa się zarówno przez syntezę specyficznych form izoenzymatycznych, jak i przez odwracalną modyfikację białek enzymatycznych.

#### IV. Rola karboksylazy PEP w procesie nieautotroficznego włączania $CO_2$

W niezielonych tkankach roślinnych oprócz działania cyklu gliksalowego pulę kwasów organicznych mogą uzupełniać teoretycznie trzy enzymy karboksylujące: karboksylaza PEP (EC 4.1.1.31.) (a), karboksykinaza PEP (EC 4.1.1.32.) (b), dehydrogenaza jabłczanowa (dekarboksylująca) zależna od NADP (EC 1.1.1.40.) (c) [76]. (Schemat 2).



Schemat 2.

Karboksykinaza PEP i dehydrogenaza jabłczanowa (dekarboksylująca) zależna od NADP działają głównie w kierunku dekarboksylacji kwasów

czterowęglowych, a ich aktywność karboksylująca jest bardzo słaba. Enzymy te uczestniczą w innych procesach niż włączanie  $\text{CO}_2$ , np. w procesie glukoneogenezy [76]. Jako właściwy enzym włączający  $\text{CO}_2$  jest karboksylaza PEP. Na temat znaczenia niefotosyntetycznego asymilowania  $\text{CO}_2$  katalizowanego przez ten enzym zarysowało się dużo niejasności i rozbieżności.

Według hipotezy Daviesa karboksylaza PEP tworzy razem z dehydrogenazą jabłczanową zależną od NAD i dehydrogenazą jabłczanową (dekarboksylującą) zależną od NADP układ utrzymujący równowagę kwasowo-zasadową w cytoplazmie, tzw. pH-stat komórkowy [77, 78]. Wzrost pH (na skutek metabolicznych przemian) powoduje wzmożoną aktywność karboksylazy PEP. Powstające w wyniku jej działania kwasy dwukarboksylowe szczawiooctan i jabłczan są źródłem protonów. W rezultacie następuje spadek pH. Z kolei nadmierne jego obniżenie stymuluje aktywność dekarboksylującą dehydrogenazy jabłczanowej zależnej od NADP, co w efekcie prowadzi do wzrostu pH. Dzięki takiemu układowi pH cytoplazmy utrzymuje się na względnie stałym poziomie. Inni autorzy [79, 80] uważają, że pH-stat może funkcjonować w regulacji jedynie krótkotrwałych fluktuacji cytoplazmatycznego stężenia jonów  $\text{H}^+$ . Natomiast długofalowa regulacja cytoplazmatycznego pH musi być powiązana z procesami transportu przez błonę komórkową i między poszczególnymi kompartmentami komórki [79, 80], a nawet z dalekim transportem związków [81, 82]. Na przykład, synteza kwasów organicznych przy udziale karboksylazy PEP jest uzależniona od wymiany jonów  $\text{H}^+$  z jonami  $\text{K}^+$  przez plazmalemmę [79]. Antyport  $\text{H}^+/\text{CO}_2$  powoduje podwyższenie pH, w następstwie czego następuje dysocjacja kwasu węglowego w cytoplazmie. Powstały jon  $\text{HCO}_3^-$  jako substrat karboksylazy PEP stymuluje produkcję kwasów organicznych [76]. Hipotezy przedstawione powyżej nie wyjaśniają wszystkich aspektów regulacji pH cytoplazmy w powiązaniu z aktywnością karboksylazy PEP [83, 84], procesu bardzo skomplikowanego i jeszcze nie w pełni poznanego [80, 81, 85].

Synteza kwasów organicznych przy udziale karboksylazy PEP może być uważana za proces anaplerotycznego uzupełniania cyklu Krebsa [50]. Niewątpliwie ma to miejsce u organizmów jednokomórkowych [32, 86—88]. W tkankach roślin wyższych metabolizm węglowy przebiega w różnych przedziałach komórkowych, przez co jabłczan lub szczawiooctan syntetyzowane w cytoplazmie nie są w równowadze z analogicznymi związkami powstającymi w mitochondriach [32, 89, 90]. Anaplerotyczna funkcja karboksylazy PEP ma znaczenie w produkcji metabolicznych intermediatów niż w bezpośrednim zasilaniu cyklu kwasów trójkarboksylowych [91]. Obserwacje drogi metabolicznej znakowanego węgla z  $^{14}\text{C}$ -glukozy w brodawkach łubinu wykazały, że szczawiooctan powstający w reakcji katalizowanej przez karboksylazę PEP jest zużywany w syntezie aminokwasów bez pośrednictwa cyklu Krebsa [92]. Szybkie

włączanie kwasów organicznych do tego cyklu pochodzących z reakcji karboksylacji PEP obserwowano w korzeniach kukurydzy w warunkach stresowych [93].

W roślinach typu  $C_3$  aktywność karboksylazy PEP jest najwyższa w czasie intensywnego wzrostu i rozwoju, gdy aktywność procesów oddechowych jest większa niż szybkość fotosyntezy [94]. Funkcja tego enzymu może więc polegać na ponownym włączeniu  $CO_2$  powstającego w reakcjach dekarboksylacji [94]. Porównawcze badania karboksylazy PEP i kinazy PA (EC 2.7.1.40.) izolowanych z liścieni nasion soi wykazały, że karboksylaza PEP nie wykorzystuje jako substratu  $CO_2$  uwalnianego podczas dekarboksylacji pirogronianu. Karboksylaza PEP i kinaza PA dostarczają niezależnie produkty swojego działania do odrębnych puli kwasów organicznych w różnych kompartmentach [95]. Aktywność karboksylazy PEP w przeciwieństwie do aktywności kinazy PA zmienia się w zależności od pH, co wskazuje na karboksylazę PEP jako na enzym regulatorowy procesu glikolizy [95, 96]. Układ karboksylaza PEP — dehydrogenaza MA zależna od NAD — dehydrogenaza MA dekarboksylująca zależna od NADP uczestniczy w procesie transhydrogenizacji NADH do NADPH [39, 97, 98], który jest niezbędny w metabolizmie korzeni [99]. Produkcja jabłczanu poprzez ciemniowe włączanie  $CO_2$  może być uważana za proces czasowego magazynowania nadmiaru węgla w komórkach roślinnych [98]. Jabłczan w razie potrzeby jest szybko dekarboksylowany do pirogronianu, który jest utleniany w mitochondriach. Taki sposób czasowego gromadzenia jabłczanu występuje w korzeniach i nasionach roślin tolerancyjnych w warunkach stresu tlenowego [100]. Regulacja stężenia  $CO_2$  jest również niezbędnym warunkiem prawidłowej syntezy białek korzeniowych [101].

#### IV-1. Rola karboksylazy PEP w brodawkach roślin motylkowych

Redukcja azotu atmosferycznego w brodawkach roślin motylkowych jest procesem wymagającym energii i siły redukcyjnej [27, 102, 103]. Koszty energetyczne wzrostu i funkcjonowania brodawek są równie wysokie jak koszty redukcji  $N_2$  [104]. Wykazano, że do zredukowania 1 mola  $N_2$  wymagane jest od 22 do 70 moli ATP [105]. Źródłem ATP i zredukowanych nukleotydów adenylowych jest katabolizm węglowodanów, głównie sacharozy transportowanej przez floem, w komórkach gospodarza [27, 106]. Zachodzi przy tym konieczność „bieżącego” dopływu produktów fotosyntezy dla utrzymania optymalnego tempa włączania  $N_2$  [107]. Obok funkcji energetycznej metabolizm węglowy w cytoplazmie komórek gospodarza ukierunkowany jest na syntezę związków węglowych wymaganych do transportu zredukowanego azotu atmosferycznego [107]. W komórkach gospodarza metabolizm cukrów przebiega głównie przez proces glikolizy. Przepływ węgla przez szlak pentozofosforanowy jest znikomy rzędu 6%

[92]. Wątpliwe jest też występowanie anaplerotycznego cyklu glioksalowego [106, 109] oraz funkcjonowanie szlaku Entnera-Douderoffa w cytosolu komórek gospodarza [92]. Anaplerotyczną drogą tworzenia związków węglowych jest proces karboksylacji fosfoenolopirogronianu katalizowany przez karboksylazę PEP [27]. W brodawkach łubinu nie stwierdzono aktywności innych enzymów karboksylujących, karboksykinazy PEP i karboksylazy RuBP [110]. Schramm [111] postuluje funkcjonowanie w roślinach motylkowych drugiego, obok karboksylazy PEP, anaplerotycznego szlaku metabolicznego, dostarczającego związku węglowe do biosyntezy aminokwasów, poprzez karboksylację malonianu do szczawiooctanu przez bliżej niezidentyfikowany kompleks enzymatyczny. Malonian jest głównym kwasem organicznym w brodawkach soi [112]. Schramm [111, 113] postuluje, że w roślinach motylkowych synteza malonianu przebiega drogą zbliżoną do szlaku Entnera-Douderoffa. Inny sposób syntezy malonianu niż związany z procesem glikolizy stwierdzono w brodawkach soi [114].

Bardzo niskie stężenie tlenu w komórkach brodawkowych [115] powoduje wzrost aktywności wielu enzymów, w tym również karboksylazy PEP [116]. W brodawkach bobu stwierdzono 50 razy wyższą aktywność karboksylazy PEP niż w korzeniach [117]. Wyższą aktywność karboksylazy PEP obserwowano również w brodawkach soi [118]. W brodawkach łubinu poziom aktywności tego enzymu wzrasta 3-krotnie w momencie rozpoczęcia redukcji  $N_2$  [110]. Podobnie w brodawkach lucerny aktywność karboksylazy PEP była znacznie wyższa w porównaniu z brodawkami nieefektywnymi w procesie redukcji  $N_2$  [120]. W materiale tym enzym stanowi 1–2% cytosolowego białka w asymilujących azot brodawkach [119].

W roślinach motylkowych amidowych, gdzie azot jest transportowany z brodawek pod postacią amidów, głównie asparaginy, wzrost aktywności karboksylazy PEP zachodzi razem ze wzrostem aktywności nitrogeazy [110, 117, 120]. Szczawiooctan jako produkt działania karboksylazy PEP jest włączany do biosyntezy asparaginianu [110] bez pośrednictwa cyklu Krebsa [92]. W brodawkach lucerny 25% związków węglowych potrzebnych do asymilacji zredukowanego azotu powstaje dzięki aktywności karboksylazy PEP [120]. Christeller i wsp. [110] uważają natomiast, że anaplerotyczne włączanie  $CO_2$  przez ten enzym zaspokaja w pełni zapotrzebowanie na związki węglowe w brodawkach łubinu. W korzeniach roślin motylkowych ureidowych, gdzie związkami transportującymi zredukowany azot z brodawek są ureidy: alantoina i kwas alantoinowy, maksymalna szybkość asymilacji  $CO_2$  występuje przed procesem nodulacji i włączania  $N_2$ . W brodawkach początkowo obserwuje się jednoczesny wzrost asymilacji  $CO_2$  i redukcji  $N_2$ . Szybkość karboksylacji obniża się w momencie, gdy maleje szybkość biosyntezy i transportu aminokwasów (asparaginy), a wzrasta synteza i eksport ureidów z brodawek [121]. Rola karboksylazy PEP w brodawkach roślin ureidowych jest mniej jasna [122,



123]. W brodawkach fasoli 25<sup>0</sup>/<sub>0</sub> węgla pochodzącego z włączenia <sup>14</sup>CO<sub>2</sub> występuje w aminokwasach, 60—70<sup>0</sup>/<sub>0</sub> w intermediatach cyklu Krebsa, a pozostała część między innymi w ureidach [122]. Karboksylaza PEP działa anaplerotycznie, uzupełniając cykl kwasów trójkarboksylowych w związki węglowe, które zostają wykorzystane do tworzenia glioksalanu. Związek ten jest metabolizowany do glicyny i mrówczanu, które są zużywane w biosyntezie alantoiny [122]. W brodawkach soi stwierdzono znakowanie węglem <sup>14</sup>C pochodzące z <sup>14</sup>CO<sub>2</sub> w intermediacie biosyntezy puryn — ksantynie [123]. Rola ciemniowego włączenia CO<sub>2</sub> może polegać również na syntezie substratów oddechowych oraz kwasów dwukarboksylowych jako jonów przeciwnych do transportu kationów [121]. Zarówno w przypadku roślin motylkowych ureidowych jak i amidowych wspomina się o roli karboksylazy PEP w syntezie kwasu jabłkowego, który może być źródłem węgla i energii dla metabolizmu bakteroidalnego [116]. Możliwy jest także udział tego enzymu w regulacji wewnątrzkomórkowego pH zgodnie z koncepcją Daviesa [121]. Procesy zawiązywania i funkcjonowania brodawek wymagają odpowiedniego stężenia CO<sub>2</sub> w korzeniach, na co zapewne ma wpływ poziom aktywności karboksylazy PEP [124].

Głównym źródłem CO<sub>2</sub> dla karboksylazy PEP są procesy oddechowe [110, 120, 122]. W brodawkach korzeniowych intensywność tych procesów jest bardzo wysoka [125]. Aktywność karboksylazy PEP prowadzi do częściowego odzysku dwutlenku węgla [120]. Również zewnętrzny CO<sub>2</sub> może być substratem karboksylazy PEP [121, 126], oczywiście nie bezpośrednio, gdyż substratem enzymu są jony HCO<sub>3</sub><sup>-</sup>. Wyższy poziom aktywności karboksylazy PEP musi iść w parze z wyższą aktywnością anhidrazy węglanowej. Faktycznie w brodawkach łubinu stwierdzono 12,5-krotnie wyższą aktywność anhidrazy węglanowej niż w korzeniach [110].

Autor dziękuje Panu Prof. dr hab. Ryszardowi W. Schrammowi za cenne uwagi i sugestie podczas przygotowywania niniejszego tekstu.

Zaakceptowano do druku 10 lipca 1986 r.

## PIŚMIENNICTWO

1. Bandurski R. S., Greiner C. M., (1953), *J. Biol. Chem.*, **204**, 781—786.
2. Utter M. F., Kolenbrander H. M., (1972), w: *The Enzymes*, red. Boyer P. D., 3 wyd., t. 6, str. 117—136.
3. O'Leary M. H., (1982), *Ann. Rev. Plant Physiol.*, **33**, 297—315.
4. Vennesland B., Tchen T. T., Loewus F. A., (1974), *J. Am. Chem. Soc.*, **76**, 265—270.
5. Maruyama H., Easterday R. L., Chang H. C., Lane M. D., (1966), *J. Biol. Chem.*, **241**, 2405—2412.
6. O'Leary M. H., Rife J. E., Slater J. D., (1981), *Biochemistry*, **20**, 7308—7314.

7. Fujita N., Izui K., Nishino T., Katsuki M., (1984), *Biochemistry*, **23**, 1774—1779.
8. Mukerji S. K., (1977), *Arch. Biochem. Biophys.*, **182**, 352—359.
9. Mukerji S. K., (1974), *Plant Sci. Lett.*, **2**, 243—248.
10. Reibach P. H., Benedict C. R., (1977), *Plant Physiol.*, **59**, 564—568.
11. Waygood E. R., Mache R., Tan C. K., (1969), *Can. J. Bot.*, **47**, 1455—1458.
12. Coombs J., Maw S. L., Baldry C. W., (1975), *Plant Sci. Lett.*, **4**, 97—102.
13. Hansen D. E., Knowles J. R., (1982), *J. Biol. Chem.*, **257**, 14785—14798.
14. Mukerji S. K., (1977), *Arch. Biochem. Biophys.*, **182**, 343—351.
15. Uedan K., Sugiyama T., (1976), *Plant Physiol.*, **57**, 906—910.
16. Goatly M. B., Coombs J., Smith H., (1975), *Planta*, **125**, 15—24.
17. Mizioroko H. M., Nowak T., Mildvan A. S., (1974), *Arch. Biochem. Biophys.*, **163**, 378—389.
18. Smando R., Waygood E. B., Sanwal B. D., (1974), *J. Biol. Chem.*, **249**, 182—190.
19. Jones R., Wilkins M. B., Coogins J. R., Fewson C. A., Malcolm A. D. B., (1978), *Biochem. J.*, **175**, 391—406
20. Nott D. L., Osmond C. B., (1982), *Aust. J. Plant Physiol.*, **9**, 409—422.
21. Fujita N., Miwa T., Ishijima S., Izui K., Katsuki H., (1984), *J. Biochem.*, **95**, 909—916.
22. Vidal J., Godbillon G., Gadal P., (1983), *Physiol. Plant.*, **57**, 124—128.
23. Hague D. R., Sims T. L., (1980), *Plant Physiol.*, **86**, 505—509.
24. Iglesias A. A., Andreo C. S., (1983), *Biochem. Biophys. Acta*, **749**, 9—17.
25. Danner J., Ting J. P., (1967), *Plant Physiol.*, **42**, 719—724.
26. Ting I. P., (1968), *Plant Physiol.*, **43**, 1919—1924.
27. Rawsthorne S., Minchin F. R., Summerfield R. J., Cookson C., Coombs J., (1980), *Phytochemistry*, **19**, 341—355.
28. Kelly G. J., Latzko E., Gibbs M., (1976), *Ann. Rev. Plant Physiol.*, **27**, 181—205.
29. Spalding M. H., Schmitt M. R., Ku S. B., Edwards G. E., (1979), *Plant Physiol.*, **63**, 738—743.
30. Perrot C., Vidal J., Burlet A., Gadal P., (1981), *Planta*, **151**, 226—231.
31. Winter K., (1982), *Planta*, **154**, 298—308.
32. Mukerji S. K., Ting T. P., (1971), *Arch. Biochem. Biophys.*, **143**, 297—317.
33. Schnarrenberger C., Gras D., Burkhard C., Herbert M., (1980), *Planta*, **147**, 477—484.
34. Schnabl M., (1981), *Planta*, **152**, 307—313.
35. Rathnam C. K. M., (1978), *Planta*, **141**, 289—295.
36. Wolpert J. S., Ernst-Fouberg F. L., (1975), *Biochemistry*, **14**, 1095—1102.
37. Briand J., Cavayrac R., Laval-Martin D., Farineau J., (1981), *Planta*, **151**, 168—175.
38. Vafišek J., Sajdal P., Lojda Z., (1980), *Histochemistry*, **67**, 257—265.
39. Ting I. P., Osmond C. B., (1973), *Plant Physiol.*, **51**, 448—453.
40. Goatly M. B., Smith H., (1974), *Planta*, **117**, 67—73.
41. Vidal J., Gadal P., (1983), *Physiol. Plant.*, **57**, 119—123.
42. Williams L. E., Kennedy R. A., (1978), *Planta*, **142**, 269—274.
43. Ting I. P., Osmond C. B., (1973), *Plant Physiol.*, **51**, 439—447.
44. Bryła J., (1981), w: *Regulacja metabolizmu komórki*, 1 wyd., str. 375—383, PWN, Warszawa.
45. Somerville C. R., Somerville S. C., (1984), *La Recherche*, **15**, 490—502.
46. Willmer C. M., Roksandic Z., (1980), *J. Exp. Bot.*, **35**, 1493—1495.

47. Coombs J., Baldry C. W., Bucke C., (1973), *Planta*, **110**, 95—107.
48. Holaday A. S., Black C. C., (1981), *Plant Physiol.*, **67**, 330—334.
49. Vidal J., Cavalie G., Gadal P., (1976), *Plant Sci. Lett.*, **7**, 265—270.
50. Wong K. F., Davies D. D., (1973), *Biochem. J.*, **131**, 451—458.
51. Nakamoto H., Ku M. S. B., Edwards G. E., (1983), *Plant Cell Physiol.*, **24**, 1387—1393.
52. Coombs J., Maw S. L., Baldry C. W., (1974), *Planta*, **117**, 279—292.
53. Bhagwat A. S., Sane P. V., (1976), *Indian J. Exp. Biol.*, **14**, 155—158.
54. Karabourniotis G., Manetas Y., Gavalas N. A., (1983), *Plant Physiol.*, **73**, 735—739.
55. Manetas Y., Gavalas N. A., (1982), *Photosynthetica*, **16**, 59—66.
56. Manetas Y., Karabourniotis G., Gavalas N. A., (1983), *Physiol. Veg.*, **21**, 911—917.
57. Leblova S., Mareš J., (1975), *Photosynthetica*, **9**, 177—184.
58. Pan D., Waygood E. R., (1971), *Can. J. Bot.*, **49**, 631—643.
59. Pan D., Tan K. H., (1982), *Plant Sci. Lett.*, **27**, 69—75.
60. Pan D., Tan K. H., (1981), *Z. Naturforsch.*, **36c**, 688—691.
61. Pan D., Tan K. H., (1981), *Photosynthetica*, **15**, 511—517.
62. Kluge M., (1982), w: *Photosynthesis: Development, Carbon Metabolism, and Plant Productivity*, red. Govindjee, t. 2, str. 231—262, Academic Press, New York.
63. Brulfert J., Arrabaca M. C., Guerrier D., Queiroz O., (1979), *Planta*, **146**, 129—133.
64. Brulfert J., Müller D., Kluge M., Queiroz O., (1982), *Planta*, **154**, 326—331.
65. Amagasa T., (1982), *Plant Cell Physiol.*, **23**, 1471—1474.
66. Brulfert J., Guerrier D., Queiroz O., (1982), *Planta*, **154**, 332—338.
67. von Willert D. J., Treichel S., Kirst G. O., Curdts E., (1976), *Phytochemistry*, **15**, 1435—1436.
68. Foster J. G., Edwards G. E., (1981), *Plant Physiol.*, **67**, 139.
69. Osmond C. B., (1978), *Ann. Rev. Plant Physiol.*, **29**, 379—414.
70. Daniel P. P., Bryant J. A., Woodward F. J., (1984), *Biochem. J.*, **218**, 387—393.
71. Queiroz O., Morel C., (1974), *Plant Physiol.*, **53**, 596—602.
72. Brulfert J., Vidal J., Gadal P., Queiroz O., (1982), *Planta*, **156**, 92—94.
73. Pierre J. N., Queiroz O., (1978), *Planta*, **144**, 143—151.
74. Manetas Y., (1982), *Photosynt. Res.*, **3**, 321—333.
75. Winter K., (1982), *Planta*, **154**, 298—308.
76. Jacoby B., Laties G. G., (1971), *Plant Physiol.*, **47**, 525—531.
77. Davies D. D., (1973), *Symp. Soc. Exper. Biol.*, Cambridge, t. 27, str. 513—530.
78. Davies D. D., (1979), *Ann. Rev. Plant Physiol.*, **30**, 131—158.
79. Smith F. A., Raven J. A., (1979), *Ann. Rev. Plant Physiol.*, **30**, 289—311.
80. Roberts J. K. M., Ray P. M., Wade-Jardetzky N., Jardetzky O., (1980), *Planta*, **152**, 74—78.
81. Raven J. A., Allen S., (1983), *Bioch. Soc. Transactions*, **11**, 73—74.
82. Findenegg G. R., von Beusichem M. L., Keltjens W. G., (1984), 4 Congress FESSP, Strasbourg, str. 463—464.
83. Stout R. G., Cleland R. E., (1978), *Planta*, **139**, 43—45.
84. Morgutti S., Sacchi G. A., Cocucci S. M., (1984), *Physiol. Plant.*, **60**, 70—74.
85. Smith F. A., (1984), *J. Exp. Bot.*, **35**, 43—50.

86. Kenealy W. R., Zeikus J. G., (1982), *FEMS Microbiology Lett.*, **14**, 7—10.
87. Kodaki T., Fujita N., Kameshita I., Izui K., Katsuki H., (1984), *J. Biochem.*, **95**, 637—642.
88. McAlister L. E., Evans E. L., Smith T. E., (1981), *J. Bacteriol.*, **146**, 200—208.
89. Ting I. P., Führ I., Curry R., Zschoche W. C., (1975), w: *Isozymes, II. Physiological Function*, red. Market C. L., str. 369—385, Academic Press, New York, San Francisco, London.
90. Lips S. H., Beevers H., (1966), *Plant Physiol.*, **41**, 709—712.
91. Oaks A., Bidwell R. G. S., (1970), *Ann. Rev. Plant Physiol.*, **21**, 43—46.
92. Laing W. A., Christeller J. T., Sutton W. D., (1979), *Plant Physiol.*, **63**, 450—454.
93. Lips S. H., Beevers H., (1966), *Plant Physiol.*, **41**, 713—717.
94. Hedley C. L., Harvey D. M., Keely R. J., (1975), *Nature*, **258**, 352—354.
95. Adams C. A., Broman T. H., Rinne R. W., (1982), *Plant Cell Physiol.*, **23**, 959—965.
96. Duggleby R. G., Dennis D. T., (1973), *Plant Physiol.*, **52**, 312—317.
97. Fowler M. W., (1974), *Biochim. Biophys. Acta*, **372**, 245—254.
98. Adams C. A., Rinne R. W., (1981), *Plant Cell Physiol.*, **22**, 1011—1021.
99. Stepan-Sarkissian G., Fowler M. W., (1978), *Int. J. Biochem.*, **9**, 917—922.
100. Aldasoro J., Nicolas G., (1980), *Phytochemistry*, **19**, 3—5.
101. Splittstoesser W. E., (1966), *Plant Physiol.*, **41**, 755—759.
102. Phillips D. A., (1980), *Ann. Rev. Plant Physiol.*, **31**, 29—49.
103. Lea P. J., Olufemi Awonaike K., Cullimore J. V., Miflin B. J., (1982), *Israel J. Bot.*, **31**, 140—154.
104. Patterson T. G., LaRue T. A., (1983), *Plant Physiol.*, **72**, 701—705.
105. Verma D. P. S., Long S., (1983), w: *International Review of Cytology, Suppl.*, **14**, red. Jean K. W., str. 211—215, Academic Press, New York.
106. Peterson J. B., LaRue T. A., (1981), *Plant Physiol.*, **58**, 489—493.
107. Robertson J. S., Farnden K. J. F., (1980), w: *The Biochemistry of Plants*, red. Miflin B. J., t. 5, str. 65—113, Academic Press, New York.
108. Reynolds P. H. S., Blevin D. G., Boland M. J., Schubert K. R., Randall D. D., (1982), *Plant Physiol.*, **55**, 255—260.
109. Johnson G. V., Evans H. J., Ching T. M., (1966), *Plant Physiol.*, **41**, 1330—1336.
110. Christeller J. T., Laing W. A., Sutton W. D., (1977), *Plant Physiol.*, **60**, 47—50.
111. Schramm R. W., (1983), *Acta Physiol. Plant.*, **5**, 79—92.
112. Stumpf D. K., Burris R. H., (1981), *Plant Physiol.*, **43**, 1919—1924.
113. Schramm R. W., *Israel J. Bot.*, **31**, 131—139.
114. Reibach P. H., Streeter J. G., (1983), *Plant Physiol.*, **72**, 634—640.
115. Bergersen F. J., Turner G. L., (1975), *J. Gen. Microbiol.*, **89**, 31—47.
116. DeVries G. E., In T Veld P., Kijne J. W., (1980), *Plant Sci. Lett.*, **20**, 115—123.
117. Lawrie A. C., Wheeler C. T., (1975) *New Phytol.*, **74**, 437—445.
118. Heytler P. K., Hardy R. W. F., (1981), *Plant Physiol.*, **67**, 80.
119. Vance C. P., Stade S., (1984), *Plant Physiol.*, **75**, 261—264.
120. Vance C. P., Stade S., Maxwell C. A., (1983), *Plant Physiol.*, **72**, 469—473.
121. Coker III G. T., Schubert K. R., (1981), *Plant Physiol.*, **67**, 691—696.
122. Cookson C., Hughes H., Coombs J., (1980), *Planta*, **148**, 338—345.

123. Boland J. M., Schubert K. R., (1982), *Arch. Biochem. Biophys.*, **213**, 486—491.
124. Evans H. J., Emerich D. W., Lipo J. E., Maier R. J., Carter K. R., Hanus F. J., Russell S. A., (1980), w: International Symposium on Nitrogen Fixation, red. Stewart W. D. P., Galon J. R., str. 55—81, Academic Press, New York.
125. Layzell D. B., Rainbird R. M., Atkins C. A., Pate J. S., (1979), *Plant Physiol.*, **64**, 888—891.
126. Yaneyama T., Ohtani T., (1983), *Plant Cell Physiol.*, **24**, 971—977.



Pani Profesor Stelli Niemierko  
z wyrazami wdzięczności  
za wprowadzenie w fascynującą  
dziedzinę neurochemii

JOLANTA SKANGIEL-KRAMSKA \*

## Neuroreceptory

### Neuroreceptors

#### Spis treści

- I. Wstęp
- II. Klasyfikacja neuroreceptorów
- III. Mechanizmy działania neuroreceptorów
- IV. Regulacja aktywności neuroreceptorów
- V. Budowa cholinergicznego receptora nikotynowego
- VI. Synteza cholinergicznego receptora nikotynowego
- VII. Uwagi końcowe

#### Contents

- I. Introduction
- II. Classification of neuroreceptors
- III. Mechanisms of neuroreceptor action
- IV. Regulation of neuroreceptor activity
- V. Structure of cholinergic nicotinic receptor
- VI. Synthesis of cholinergic nicotinic receptor
- VII. Final remarks

### I. Wstęp

Jak wiadomo, przekazywanie impulsów nerwowych z neuronu na neuron odbywa się na ogół na drodze chemicznej przy udziale neurotransmiterów. Impuls nerwowy, docierając do zakończenia nerwowego, powoduje depolaryzację błony presynaptycznej i uwolnienie neurotransmitera do szczeliny synaptycznej. Określony neurotransmitter łączy się następnie z odpowiednim receptorem, znajdującym się w błonie postsynaptycznej. Etap ten zapoczątkowuje szereg zjawisk, które prowadzą do przekazania informacji do neuronu postsynaptycznego lub do komórek tkanki efekto-

---

\* Dr, Zakład Neurofizjologii, Instytut Biologii Doświadczalnej im. M. Nenckiego PAN, ul. Pasteura 3, 02-093 Warszawa.

rowej, tzn. mięśni lub gruczołów. Wszystkie dotychczas poznane receptory neurotransmiterów, tzw. neuroreceptory, są białkami integralnymi błony komórkowej i zaliczamy je do klasy receptorów powierzchniowych.

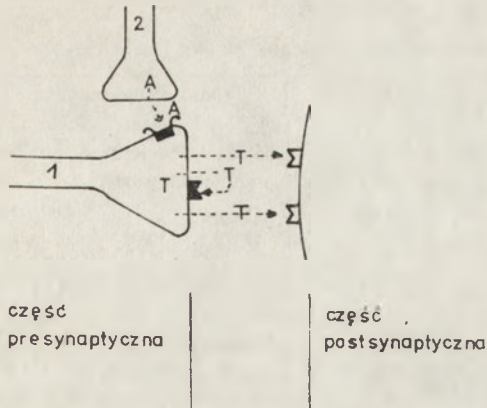
## II. Klasyfikacja neuroreceptorów

Wybiórcze reagowanie z określonymi neurotransmiterami stanowi podstawę klasyfikacji neuroreceptorów. Na tej zasadzie wyróżniamy receptory cholinergiczne, adrenergiczne, dopaminergiczne itd. Dalsza klasyfikacja uwzględnia zdolność neuroreceptorów do wiązania różnych egzogennych substancji. Niektóre ligandy wywołują podobny efekt jak rodzimy neurotransmitter, określono je przeto jako substancje agonistyczne. Znane są również związki, które blokują odpowiedź, dlatego określamy je jako substancje antagonistyczne. Różne właściwości farmakologiczne receptorów a także różna zdolność wiązania określonych ligandów wskazują na heterogenność neuroreceptorów [1]. Na podstawie różnicy w reagowaniu z egzogennymi ligandami wyodrębniono, np. dwa typy receptora cholinergicznego: nikotynowy — pobudzany przez nikotynę oraz muskarynowy — pobudzany przez muskarynę (alkaloid wyizolowany z muchomora *Amanita pantherina*) [2]. Z kolei, pośród cholinergicznym receptorów muskarynowych można wyróżnić takie, które są wrażliwe na substancję antagonistyczną pirenzepinę, jak i takie, które jedynie w małym stopniu blokowane są przez ten związek [3, 4, 5].

Podkreślić należy, że wykrycie w układzie nerwowym miejsc wiążących morfinę dało impuls do poszukiwania ich rodzimych ligandów. Przyczyniło się to z kolei do wykrycia endorfin i enkefalin, neurotransmiterów peptydowych o ogromnej roli fizjologicznej [6]. Poznanie miejsc wiążących egzogenną substancję doprowadziło więc do zidentyfikowania występujących naturalnie ligandów. Zagadnienia te zostały już omówione na łamach *Postępów Biochemii* [7]. Nadal natomiast nie są dokładnie zidentyfikowane rodzime ligandy receptorów leków o działaniu przeciwlękowym z grupy benzodiazepin. Ostatnie dane wskazują, że niektóre endogenne peptydy mogą działać na te receptory [por. 8].

Oprócz omówionej powyżej klasyfikacji możemy wyróżnić dwa typy receptorów w zależności od miejsca ich występowania względem szczeliny synaptycznej. Są to receptory post- i presynaptyczne (Ryc. 1). Znakomita większość receptorów występuje postsynaptycznie i one właśnie odgrywają bezpośrednią rolę w przekazywaniu impulsu nerwowego. Receptory presynaptyczne natomiast biorą udział w subtelnej regulacji procesów uwalniania neurotransmitera z zakończenia nerwowego i jego ponownego wychwyty [9, 10, 11]. W przypadku, kiedy zachodzi zgodność pomiędzy rodzajem uwalnianego z zakończenia nerwowego neurotransmitera a rodzajem receptora występującego presynaptycznie, mówimy o autoreceptorach.





**Ryc. 1.** Zróżnicowane występowanie neuroreceptorów na elementach neuronalnych. Wydzielenie neurotransmitera T z zakończenia nerwowego 1 oraz jego stężenie w szczelinie synaptycznej zależy od obecności w błonie presynaptycznej autoreceptorów oraz receptorów neurotransmitera A (wydzielanego z zakończenia nerwowego 2).

### III. Mechanizmy działania neuroreceptorów

Efektorem przyłączenia się neurotransmitera do receptora postsynaptycznego jest powstanie postsynaptycznego potencjału czynnościowego, pobudzeniowego lub hamulcowego. Niektóre receptory, np. cholinergiczny nikotynowy i prawdopodobnie receptory niektórych neurotransmiterów aminokwasowych, stanowią zarazem kanał jonowy [12, 13]. Aktywacja receptora powoduje otwarcie kanału jonowego i wtedy efekt obserwuje się bardzo szybko. Na przykład przyłączenie się acetylocholinę do receptora nikotynowego powoduje, że w ciągu jednej milisekundy kanał otwiera się i około 10 000 kationów, głównie sodowych, przepływa przez kanał wywołując zmianę postsynaptycznego potencjału błonowego. Nie wszystkie receptory wywołują tak szybką odpowiedź, np. efekt pobudzenia cholinergicznego receptora muskarynowego oraz  $\beta$  adrenergicznego ujawnia się po okresie latencji rzędu milisekund, a nawet sekund i może trwać sekundy, a nawet minuty (Tabela 1). Obserwacje te nasunęły przypuszczenie, że w błonie obecne są dodatkowe układy przetwarzające sygnał. Dopiero po powstaniu wtórnego przekaźnika rejestruje się odpowiedź. Drogi przetworzenia sygnału mogą prowadzić do wytworzenia różnorodnych wtórnych przekaźników.

Najlepiej poznanym sposobem przetworzenia sygnału jest aktywacja układu cykazy adenylowej i synteza cAMP. Między innymi zaobserwowano, że pobudzenie receptora dopaminergicznego w jądrze ogoniastym mózgu szczura powoduje wzrost poziomu cAMP. Wzrost ten wyprzedza odpowiedź komórki [15]. W tym przypadku zatem, wzbudzenie impulsu w neuronie postsynaptycznym wiąże się z produkcją wtórnego przekaźnika.

Tabela 1.

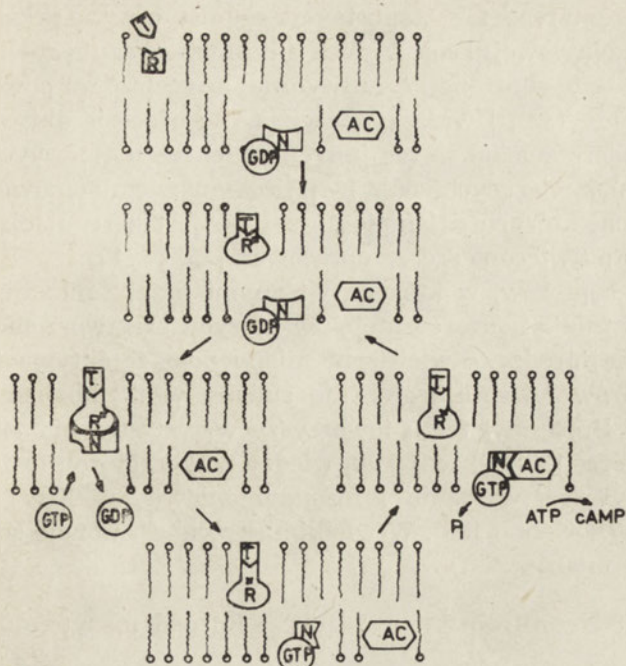
Porównanie efektu działania niektórych receptorów (wg 14)

Receptor	Ligand	Źródło receptora	Charakter odpowiedzi
Cholinergiczny nikotynowy	ACh	Mięśnie szkieletowe, organ elektryczny	Natychmiastowa depolaryzacja pobudzeniowa
GABA ergiczny A	GABA	Mózg	Natychmiastowa hiperpolaryzacja hamulcowa
Cholinergiczny muskarynowy	ACh	Mięśnie gładkie, mózg	Powolny, zróżnicowany-pobudzeniowy lub hamulcowy zależnie od umiejscowienia
Adrenergiczny $\beta_2$	NA	Mięśnie gładkie	

ACh — acetylocholina; GABA — kwas  $\gamma$  aminomasłowy; NA — noradrenalina.

ka. Nasuwa się pytanie, w jaki sposób aktywacja receptora wywołana przyłączeniem się neurotransmitera może wpłynąć na stymulację aktywności cyklazy adenylowej. Receptor i enzym stanowią przecież dwa odrębne elementy błony. Co więcej, cyklaza adenylowa jest enzymem wieloskładnikowym [16, 17, 18]. Przyjmowany powszechnie model płynnej mozaikowej budowy błony komórkowej Singera i Nicholsona [19] ułatwia zrozumienie sprzężenia aktywacji receptora ze stymulacją cyklazy adenylowej, ponieważ zakłada on możliwość swobodnego przemieszczania się w bocznej płaszczyźnie błony integralnych białek. Opierając się na powyższym założeniu wysunięto koncepcję ruchomego receptora [por. 20]. Przyłączenie neurotransmitera do receptora wywołuje zmiany konformacyjne, które umożliwiają interakcję białka regulatorowego wiążącego GTP z katalityczną jednostką cyklazy adenylowej. W wyniku tego cyklaza aktywuje się i wzmacnia się synteza wtórnego przekaźnika, tj. cAMP [21, 22, 23, 24]. Sekwencję zjawisk i przemieszczanie się w płaszczyźnie bocznej błony przedstawia Ryc. 2 [wg 24].

Przyłączenie neurotransmitera do receptora może wywołać również efekt przeciwny, tj. hamowanie aktywności cyklazy adenylowej poprzez interakcję z inhibitorową podjednostką regulatorową wiążącą GTP [16, 19, 20]. Wynika stąd, że aktywność enzymu może być kontrolowana przez receptory na drodze ich współdziałania z aktywującym lub inhibitorowym białkiem regulatorowym. Na przykład pobudzenie receptorów  $\beta_1$  i  $\beta_2$  adrenergicznych wzmacnia aktywność cyklazy adenylowej, natomiast aktywacja adrenergicznego receptora  $\alpha_1$  hamuje jej aktywność w efekcie czego spada zawartość cAMP [24]. Sytuacja jest bardziej skomplikowana w przypadku receptorów dopaminergicznych. Receptory, określane jako  $D_1$ , sprzężone są z układem cyklazy adenylowej i ich pobudzenie wzmacnia syntezę cAMP. Receptory  $D_2$  natomiast wydają się działać niezależnie od układu cyklazy adenylowej, tym niemniej w niektórych przypadkach ich pobudzenie powoduje spadek zawartości cAMP w komórkach efektorowych [25, 26, 27].



Ryc. 2. Schemat działania neuroreceptora sprzężonego z układem cyklazy adenylowej [wg 24].

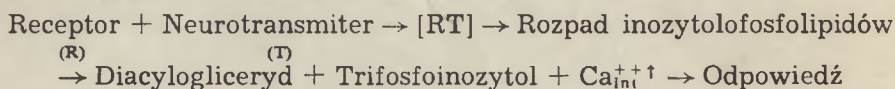
Neurotransmitter (T) wiążąc się z receptorem (R) powoduje zmiany konformacyjne w cząsteczce receptora ( $R^*$ ) co równocześnie ułatwia przemieszczanie się w bocznej płaszczyźnie błony. Wytworzony kompleks ( $TR^*$ ) może wówczas przyłączyć białko wiążące nukleotyd guaninowy, tj. jednostkę regulatorową (N). Związanie N powoduje odłączenie GDP i przyłączenie GTP. W następstwie tego procesu kompleks N z GTP oddysocjowuje od  $TR^*$  i przyłącza się do jednostki katalitycznej cyklazy adenylowej (AC), powodując aktywację enzymu. Uruchamia się zatem produkcja cAMP z ATP, a równocześnie hydroliza GTP do GDP powoduje, że jednostka regulatorowa odłącza się od AC, co umożliwia ponowną interakcję z kompleksem  $TR^*$ .

Znane są również układy receptorowe, w których wtórnym przekaźnikiem są inne cykliczne nukleotydy, np. cGMP [27, 28, 29, 30]. Pobudzenie, np. cholinergicznego receptora muskarynowego może powodować w niektórych przypadkach wzrost stężenia cGMP. Ciekawe, że w odpowiedzi na stymulację muskarynową w neuronach prądkowia obserwuje się oprócz wzrostu cGMP spadek zawartości cAMP. Wydaje się jednak, że oba procesy przebiegają niezależnie [30].

System regulujący aktywność cyklazy adenylowej w istocie rzeczy jest znacznie bardziej skomplikowany niż wynikałoby to z przedstawionego opisu. Hirata i Axelrod [32] postulują, że wytworzenie kompleksu neurotransmitter — receptor powoduje aktywację metylotransferaz. W wyniku tego procesu następuje metylacja fosfolipidów błonowych — fosfatydyloetanolaminy i fosfatydylocholiny. Metylacja wywołuje translokację fosfolipidów na drodze mechanizmu *flip-flop* i wzrost płynności błony. Wobec powyższego zwiększa się możliwość dyfuzji bocznej i szansa reago-

wania kompleksu receptor — substancja agonistyczna ze składnikami układu cyklicznej adenylowej. Dane innych autorów wskazują również, że związanie specyficznej substancji agonistycznej z receptorem powoduje zmianę płynności błony [32]. Uważa się także, że w procesie aktywacji cyklicznej adenylowej bierze udział szereg innych białek regulatorowych, dotyczy to zwłaszcza białek wiążących wapń [34]. Szczegółowemu omówieniu układów receptorowych, których działanie sprzężone jest z regulacją cyklicznych nukleotydów poświęcono szereg opracowań [35, 36, 17].

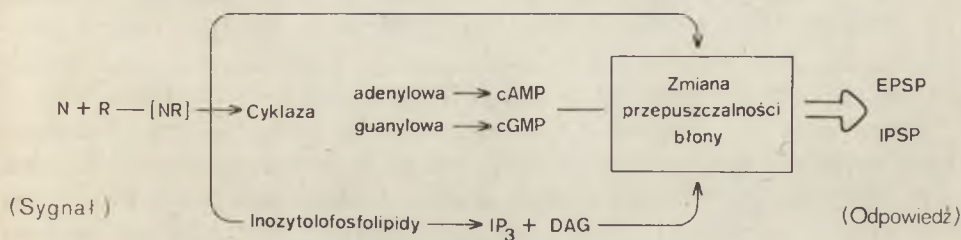
Oprócz receptorów, w których wtórnymi przekaźnikami są cykliczne nukleotydy istnieją neuroreceptory, w których przetworzenie sygnału zachodzi na innej drodze. Stwierdzono mianowicie, że aktywacja niektórych neuroreceptorów wywołuje głębokie zmiany w metabolizmie inozytolo-fosfolipidów. Procesowi temu towarzyszy wzrost stężenia jonów wapniowych w komórce [37]. Obecny stan wiedzy dotyczący roli fosfolipidów inozytolo-wych w przetwarzaniu informacji omawia J. Kwiatkowska w *Postęпах Biochemii* [38]. W wielkim skrócie sekwencję zdarzeń można zapisać następująco:



Oba metabolity wytwarzane podczas hydrolizy, tj. trifosfoinozytol i diacylogliceryd mogą pełnić rolę wtórnego przekaźnika [37, 39]. Trifosfoinozytol powoduje bowiem uwolnienie jonów wapniowych z wewnątrzkomórkowym pozamitochondrialnych magazynów, diacylogliceryd natomiast jest bezpośrednim allosterycznym aktywatorem kinazy białkowej C [40]. Dodatkowo, aktywacja obrotu inozytolo-fosfolipidów, wywołana pobudzeniem neuroreceptorów, powoduje wzrost przepuszczalności błon plazmatycznych dla jonów wapniowych, na drodze różnej od otwarcia napięciowo zależnego kanału jonowego [41]. Pozostaje jeszcze szereg niejasności w mechanizmie przetworzenia sygnału przez receptory, których aktywacja wzmacnia metabolizm inozytolo-fosfolipidów. Dotyczy to zarówno udziału jonów wapniowych jak i jonów jednowartościowych [42, 43, 44] oraz dróg defosforylacji inozytolo-fosforanów [45]. Niewykluczone jest również, że działanie receptora, sprzężone z metabolizmem inozytolo-fosfolipidów może również wiązać się z regulacją aktywności cyklicznej adenylowej nukleotydu [38, 39]. Receptory, których aktywacja wywołuje głębokie zmiany w metabolizmie inozytolo-fosfolipidów, to np. receptory  $\alpha_1$ , adrenergiczny,  $H_1$ , histaminergiczny,  $V_1$ , wazopresynowy oraz cholinergiczny receptor muskarynowy [41].

Receptory określonego neurotransmitera mogą działać wykorzystując różne mechanizmy przetworzenia sygnału. Przykładem jest receptor cholinergiczny muskarynowy, który może przetwarzać sygnał poprzez regulację syntezy cyklicznych nukleotydów albo na drodze wywołania zmian

w metabolizmie inozytolofosfolipidów. Wydaje się również, że cholinergiczny receptor muskarynowy może działać bezpośrednio, zmieniając przepuszczalność błony dla jonów [31, 46, 47]. Jakże czynniki determinują dany mechanizm przetworzenia informacji nie jest dotychczas wyjaśnione. Ogólne omówienie sposobów przetworzenia sygnału chemicznego, zachodzących z udziałem wtórnych przekaźników znajdzie czytelnik w artykule B e r r i d g e ' a [48]. Drogi prowadzące do przetworzenia sygnału i wywołania odpowiedzi neuronu przedstawia schemat (Ryc. 3).



**Ryc. 3.** Schemat dróg prowadzących od zadziałania sygnału na neuroreceptor do wywołania odpowiedzi neuronu.

$IP_3$ -trifosfoinozytol, DAG-diacylogliceryd, EPSP-pobudzeniowy potencjał postsynaptyczny, IPSP-hamulcowy potencjał postsynaptyczny.

#### IV. Regulacja aktywności neuroreceptorów

Aktywność neuroreceptorów może ulegać krótko i długotrwałym zmianom. W zależności od charakteru tych zmian mówimy o nadwrażliwości (ang. *supersensitivity*) lub obniżeniu wrażliwości (ang. *hyposensitivity* lub *desensitisation*) receptorów. Krótkotrwały spadek wrażliwości receptorów jest częstym zjawiskiem, występującym wtedy, gdy bardzo szybko po przyłączeniu się neurotransmitera do receptora i wywołaniu efektu, dalsze działanie neurotransmitera na receptor nie powoduje powstania odpowiedzi postsynaptycznej. Mechanizm nie jest dobrze poznany, ale przyczyną mogą być zmiany konformacyjne receptorów lub chwilowe wyczerpanie się kofaktora w układzie przetworzenia sygnału, np. GTP. Niewykluczone, że białko receptorowe podobnie jak enzymatyczne, może podlegać odwracalnej metylacji albo fosforylacji, które wpływają na jego aktywność [49].

Wiele uwagi poświęcono możliwości regulacji aktywności receptorów przez lipidy błonowe [50, 33, 32]. Między innymi stwierdzono, że wzrost mikrolepkkości lipidów błonowych powoduje zwiększenie dostępności receptora serotonergicznego dla 5-hydroksytryptaminy, jego rodzimego neurotransmitera. Przeciwnie, dostępność receptora  $\beta$  adrenergicznego dla ligandów spada wraz ze wzrostem lepkości błony, co stwierdzono w retikulocytach szczura [51].

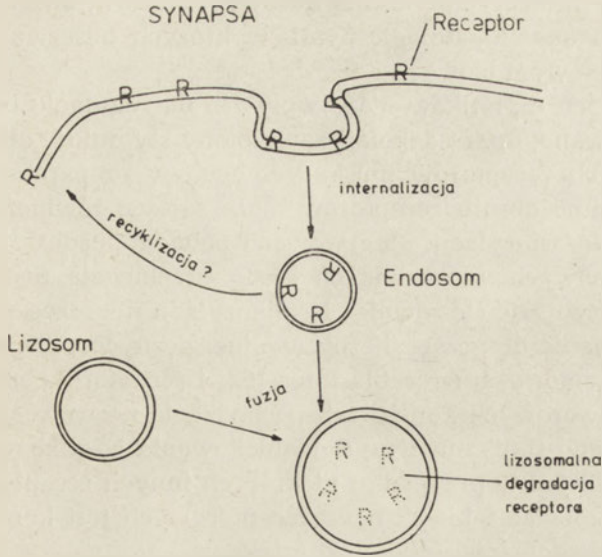
Długotrwałe zmiany we wrażliwości receptorów mogą zależeć od liczności danej populacji receptorów, a więc od efektywności syntezy

de novo i tempa rozpadu receptorów. Długotrwałe obniżenie poziomu neurotransmitera, np. wskutek uszkodzenia dróg nerwowych, wywołuje przeważnie wzrost liczby receptorów w docelowej strukturze mózgu. W wyniku tego obserwuje się zwiększenie wrażliwości (ang. *denervation supersensitivity*). Odwrotnie, długotrwały wzrost poziomu neurotransmitera, np. po chronicznym podawaniu niektórych leków, prowadzi na ogół do obniżenia liczby receptorów co objawia się spadkiem wrażliwości. Tego typu zmiany w reaktywności określane są jako zmiany adaptacyjne. Okazuje się również, że pobudzenie neuroreceptorów może wpływać na liczbę i powinowactwo receptorów innej klasy. Mówimy wtedy o heterospecyficznej regulacji aktywności neuroreceptorów, która jest wyrazem współdziałania pomiędzy różnymi układami neurotransmitterowymi [52, 20].

Dane dotyczące degradacji neuroreceptorów pochodzą przede wszystkim z badań nad cholinergicznym receptorem nikotynowym. Wynika z nich, że receptor ulega internalizacji na drodze endocytozy. Proces ten zachodzi przy udziale struktur cytoszkieletowych i wymaga wkładu energii. Następnie, po fuzji endosomu z lizosomem, cząsteczki receptora ulegają proteolizie (Ryc. 4) [14, 53]. Proces rozpadu receptora nikotynowego w mięśniach poprzecznie prążkowanych zajmuje około 90 min. W niektórych stanach chorobowych (*myasthenia gravis*) dochodzi do ułatwienia rozpadu receptorów nikotynowych w wyniku autoimmunogennej modulacji. Okres półtrwania receptora w płytce nerwowo mięśniowej skraca się wówczas z 7 do 2,5 dnia. Prowadzi to do znacznego niedoboru receptorów nikotynowych [14, 54, 55]. W przypadku cholinergicznego receptora muskarynowego wydaje się jednak, że nieaktywny receptor może rozpadać się w błonie komórkowej. Nie udało się bowiem zaobserwować endocytozy trytowanych substancji antagonistycznych tego receptora w neuronalnych układach modelowych. Okres półtrwania cholinergicznego receptora muskarynowego wynosi 12—14 h [31].

Jest jeszcze inna możliwość regulacji liczby neuroreceptorów, nie wykluczone jest bowiem, że mogą one ulegać internalizacji a następnie recykliczacji, podobnie jak to stwierdzono w przypadku niektórych receptorów powierzchniowych, które nie są związane z neurotransmisją [56, 57, 53]. Hipotetyczny przebieg tych zjawisk przedstawia schemat (Ryc. 4). Prawdopodobnie jednak endocytozie podlega sam neuroreceptor a nie kompleks receptora z neurotransmiterem. Trzeba bowiem pamiętać, że wszystkie reakcje dotyczące przekazania informacji przez neurotransmitter zachodzą w błonie komórkowej i nie jest konieczne wniknięcie kompleksu receptora z ligandem do wnętrza komórki efektorowej.

Sprawa recykliczacji neuroreceptorów nie jest dotychczas jasna. Badania Gardnera i Fambrough [58] dostarczają danych przeciwko recykliczacji cholinergicznego receptora nikotynowego. Ostatnie dane dotyczące receptorów  $\beta$  adrenergicznych jednakże przemawiają za możliwością recykliczacji neuroreceptorów. Mianowicie, badając mechanizmy

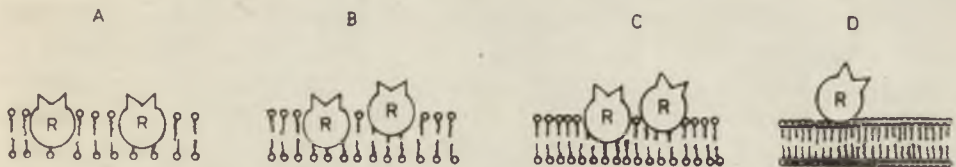


**Ryc. 4.** Hipotetyczny przebieg internalizacji i recykliczacji neuroreceptora.

Neuroreceptor R ulega internalizacji na drodze endocytozy. Etap ten może składać się z kilku stadiów pośrednich [por. 57]. Następnie, w wyniku fuzji endosomu z lizosomem cząsteczki receptora ulegają degradacji. Możliwe jest również ponowne wbudowanie neuroreceptorów w błonę komórkową.

bardzo szybkiego wzrostu liczby receptorów  $\beta$  adrenergicznych w sarkolemnie, na skutek niedotlenienia mięśnia sercowego stwierdzono, że zwiększa się zawartość receptorów we frakcji sarkolemmy kosztem receptorów znajdujących się we frakcji lekkich pęcherzyków, pochodzących z błon wewnątrzkomórkowych. Powyższe wyniki, wydają się wskazywać na możliwość eksternalizacji receptorów adrenergicznych [59].

Ciekawą hipotezę dotyczącą regulacji aktywności i liczby receptorów wysunął Schinitzky [33, 51]. Koncepcję swoją oparł na badaniach fizykochemicznych, z których wynika, że integralne białka błonowe mogą wykonywać ruchy nie tylko w płaszczyźnie bocznej błony ale również w kierunku prostopadłym do jej powierzchni. Zwiększenie sztywności błony może zatem spowodować wypychanie cząsteczek receptora do przestrzeni pozakomórkowej, gdzie mogłyby się rozpadać (Ryc. 5). Taki me-



**Ryc. 5.** Wpływ płynności błony na dostępność i aktywność receptorów błonowych [wg 33].

A —receptor trudno dostępny dla ligandów; B — część receptorów dostępna dla liganda; C — wszystkie receptory dostępne dla liganda, D — utrata receptora przez wypchnięcie go z błony do przestrzeni międzykomórkowej.

chanizm może tłumaczyć obniżenie liczby receptorów, związane ze starzeniem się lub stanami patologicznymi, w których obserwuje się zmiany w składzie lipidowym błon.

Szereg innych czynników może wpływać na regulację liczby receptorów. Obserwowano, np. że depolaryzacja błony stymuluje obniżenie liczby cholinergicznycy receptorów muskarynowych w preparatach synaptosomów [60]. Tempo obrotu receptorów może zależeć również od procesów fosforylacji i defosforylacji, obserwowano bowiem spadek liczby receptorów muskarynowych w warunkach kiedy przebiegała fosforylacja [61]. Ważną rolę przypisuje się również N-glikozylacji neuroreceptorów. Wskazują na to badania dotyczące liczby cholinergicznycy receptorów muskarynowych w komórkach neuroblastoma [62] i receptorów enkefalinergicznycy w nowotworowych komórkach pochodzenia nerwowego [63], w których zastosowano tunikamycynę do zablokowania N-glikozylacji. Wydaje się, że podobnie jak w przypadku niektórych innych receptorów powierzchniowych glikozylacja białek neuroreceptorowych jest konieczna dla ich transportu i wbudowania w błonę komórkową.

Regulacja aktywności neuroreceptorów poprzez zmianę ich liczby jest intrygującym mechanizmem zwłaszcza w świetle badań farmakodynamicznycy. Wydaje się bowiem, że w błonie komórki efektorowej występuje więcej receptorów niż to jest konieczne, by uzyskać maksymalną odpowiedź biologiczną. Ten nadmiar receptorów (ang. *spare receptors*) stanowi swoisty zapas, który mógłby być zabezpieczeniem w przypadkach awaryjnycy i zapewniałby utrzymanie reaktywności komórki na niezmiennym poziomie [por. 20 i 64].

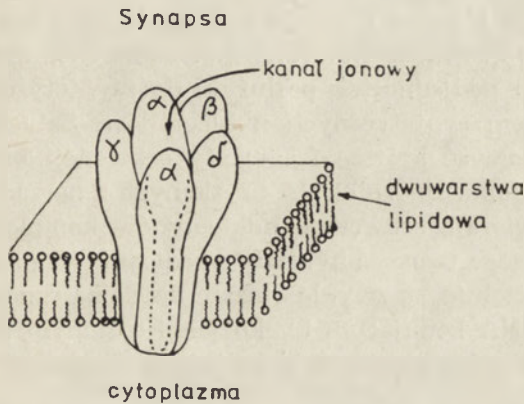
Podsumowując, regulacja aktywności neuroreceptorów może zachodzić na drodze zmian liczby cząsteczek neuroreceptorów w błonie komórkowej i na drodze zmian powinowactwa wobec ligandów. Mimo rozlicznycy badań na ten temat, zwłaszcza farmakologicznycy, jest jeszcze bardzo wiele niejasności w mechanizmach procesów wpływającycy na efektywność działania neuroreceptorów.

## V. Budowa cholinergicznycy receptora nikotynowycy

Fakt, że neuroreceptory są integralnymi składnikami błony sprawił, że białka te jest trudno wyizolować i poznać strukturę pierwszorzędową. Co więcej, gęstość poszczególnycy rodzajów neuroreceptorów w mózgu jest bardzo mała i waha się w granicach 1—100 pmoli związanycy liganda na gram świeżej tkanki. Dotychczas udało się wyodrębnić i w pełni zbadać strukturę pierwszorzędową cholinergicznycy receptora nikotynowycy. Stało się to możliwe dlatego, że znaleziono niezwykle bogate źródło receptora nikotynowycy, jakim jest narząd elektryczny niektóryc y ryb, np. dętwy (*Torpedo*) i węgorza elektrycznycy (*Electrophorus electricus*). Re-



ceptor nikotynowy stanowi około 20% białek błonowych tego narządu. Ponadto dostępne są obecnie neurotoksyny o charakterze peptydowym, występujące w jadzie niektórych węży, które wiążąc się z receptorem nikotynowym stanowią swoistą sondę. Receptor nikotynowy po solubilizacji błon synaptycznych z narządu elektrycznego oczyszczano, stosując chromatografię powinowactwa, w której Sepharosę sprzężono z  $\alpha$  neurotoksyną. Stwierdzono następnie, drogą elektroforezy w żelu poliakrylamidowym, że białko cholinergicznego receptora nikotynowego jest pentamerem składającym się z dwu podjednostek  $\alpha$  i podjednostek  $\beta$ ,  $\gamma$ ,  $\delta$ . Podjednostki te mają zbliżoną masę cząsteczkową 55 000 [65, 66, 67].



Ryc. 6. Model cholinergicznego receptora nikotynowego [wg 82].  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$ ,  $\delta$  — podjednostki receptora.

Obrazy z mikroskopu elektronowego kryształów uzyskanych z pęcherzyków synaptycznych narządu elektrycznego *Torpedo* i ich trójwymiarowe rekonstrukcje dają wyobrażenie o organizacji przestrzennej cząsteczki receptora i jej usytuowaniu w błonie [68, 69]. Wynika z nich, że receptor cholinergiczny jest symetryczną, pentametryczną strukturą. Podjednostki receptora o kształcie wrzecionowatym rozmieszczone są wokół światła kanału jonowego. Ukierunkowanie poszczególnych podjednostek w błonie jest podobne. Tworzą one cylindryczną cząsteczkę o prawie stałej średnicy. Część cząsteczki receptora, o której jeszcze nie wiele wiadomo, wystaje poza wewnętrzną stronę błony komórkowej (Ryc. 6).

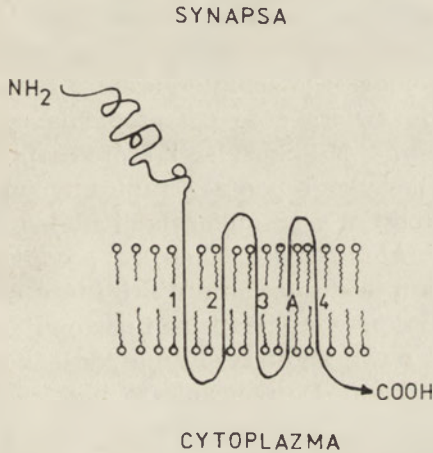
Wyodrębnione podjednostki receptora nikotynowego z narządu elektrycznego użyto do zidentyfikowania metodami chemicznymi niektórych sekwencji aminokwasowych. Ilość oczyszczonych fragmentów polipeptydowych jest jednakże zbyt mała, by w ten sposób zbadać pełną strukturę pierwszorzędową receptora. Całkowitą sekwencję aminokwasową podjednostek receptora odtworzono na podstawie sekwencji nukleotydów mRNA [70, 71]. By przekonać się, które mRNA koduje receptor nikotynowy użyto układu modelowego jakim są oocyty żaby. Okazało się, że jeśli mRNA

z narządu elektrycznego wszczepi się do oocytów *Xenopus* to są one zdolne do przetworzenia informacji zawartej w mRNA w prawidłowy sposób, tj. wytwarzają aktywny receptor nikotynowy [72]. Odpowiada on wybiórczo na acetylocholinę i pod jej wpływem otwiera kanał jonowy [73]. Analiza elektroforetyczna oraz porównanie map peptydowych wykazały, że białko receptora nikotynowego wyprodukowane przez oocyty ma taką samą budowę podjednostkową jak białko z narządu elektrycznego [72, 74]. Układ translacyjny oocytów żaby posłużył także do identyfikacji mRNA kodującego inne białka receptorowe, np. białko receptora GABAergicznego [74].

Szczególnymi osiągnięciami w zakresie rozszyfrowania struktury pierwszorzędowej receptora nikotynowego mogą poszczycić się badacze japońscy z zespołu *N u m y* (por. 75) oraz angielscy z zespołu *B a r n a r d a* [63, 66, 71, 75]. Zidentyfikowane metodami chemicznymi sekwencje końca aminowego podjednostek posłużyły do zsyntetyzowania znakowanych radioizotopem syntetycznych nukleotydów. Sztuczne oligonukleotydy, mogące kodować krótsze fragmenty sekwencji białkowych, użyto jako sondy do badania zbioru cDNA uzyskanych z narządu elektrycznego. cDNA, które zawierają sekwencję nukleotydów komplementarną wobec sekwencji sond, mogą tworzyć hybrydy z radioaktywną sondą. Klonowane cDNA, które się izoluje, są zwykle dłuższe niż sama sonda. Dało to dalsze informacje o mRNA kodującym białko jak i o samym białku receptorowym. Ostatecznie pełna struktura genu intron—egzon została odtworzona [76, 77, 78, 79].

Podjednostki receptora nikotynowego wykazują znaczną homologię w sekwencji aminokwasów (36—41%) [76], co sugeruje, że ewoluowały poprzez duplikację i reduplikację pierwotnej podjednostki [75, 67, 80]. Wydedukowana sekwencja aminokwasowa podjednostki  $\alpha$  różnych gatunków zwierząt różni się tylko w niewielkim stopniu, co sugeruje, że strukturalne cechy zachowywały się konserwatywnie podczas ewolucji. Zgodnie z powyższym receptor nikotynowy z mięśni ssaków ma podobną budowę i właściwości farmakologiczne do receptora z narządu elektrycznego węgorza elektrycznego (ryby kostnoszkieletowej) i drętwy (ryby chrzęstnoszkieletowej) [14]. Badania sekwencji aminokwasowych podjednostki  $\alpha$  wykazały, że polipeptyd ten zawiera naprzemiennie fragmenty hydrofobowych i hydrofilowych aminokwasów. Fragmenty hydrofobowe są na tyle długie, że mogą penetrować w poprzek błonę. Analiza hydrofobowości sekwencji aminokwasowej ujawniła, że w podjednostce  $\alpha$  receptora nikotynowego występują 4 fragmenty hydrofobowe. Wykazują one znaczną homologię na poziomie aminokwasowym, co sugeruje, że są one podobnie ukierunkowane w błonie [70, 72, 76, 77]. Fakt, że pozostałe podjednostki receptora mają zbliżone profile hydrofobowości pozwala sądzić, że są one w podobny sposób usytuowane w błonie. Sugeruje to zatem, że łańcuch polipeptydowy każdej z podjednostek przenika przez błonę czterokrotnie, a por kanału jest nienaładowany [76, 70, 14, 69]. W laboratorium *S t r o u d a*

stwierdzono jednakże, że oprócz 4 fragmentów o charakterze hydrofobowym i strukturze  $\alpha$  heliksu występuje jeszcze jeden fragment, który może również penetrować poprzez błonę [81]. Ma on charakter amfipatyczny, tj. zawiera zarówno regiony hydrofilowe jak i hydrofobowe. Grupy hydrofilowe zarówno dodatnio jak i ujemnie naładowane są eksponowane po jednej stronie fragmentu amfipatycznego. W konsekwencji przypuszcza się, że fragmenty amfipatyczne każdej z pięciu podjednostek receptora nikotynowego wyściełają kanał jonowy, w którego ścianach występują naprzemiennie regiony z przewagą ładunków dodatnich lub ujemnych. Za taką właśnie budową kanału jonowego receptora nikotynowego przemawiają badania z zastosowaniem specyficznych przeciwciał w celu zidentyfikowania położenia końcowej grupy karboksylowej, jak również doświadczenia, w których użyto przeciwciał skierowanych przeciwko niektórym fragmentom łańcucha polipeptydowego [81, 82]. Ryc. 7 przedstawia topografię ułożenia podjednostki w błonie [wg 81 i 69].



**Ryc. 7.** Ułożenie podjednostki cholinergicznego receptora nikotynowego w błonie [wg 81 i 69].

1, 2, 3, 4 — fragmenty hydrofobowe łańcucha polipeptydowego; A — fragment amfipatyczny.

Ostatnio otrzymano oczyszczony preparat receptora GABAergicznego z mózgu wołu [83, 84]. Jest to glikoproteid o masie cząsteczkowej 220 000, zbudowany z dwu typów podjednostek o masie 53 000 i 57 000. Niewiele jednak jeszcze wiadomo o budowie pierwszorzędowej tego receptora.

## VII. Synteza receptorów

Stosunkowo najwięcej danych na temat syntezy neuroreceptorów de novo uzyskano badając cholinergiczny receptor nikotynowy w warunkach *in vivo* jak i *in vitro*. Syntezę funkcjonalnego receptora nikotynowego

przeprowadzono wykorzystując, wspomniane już uprzednio, oocyty żaby, którym wstrzykiwano nieoczyszczone mRNA z narządu elektrycznego dętwy (*Torpedo*) [64, 67]. Do syntezy podjednostek receptora nikotynowego użyto natomiast pęcherzyki szorstkiej siateczki endoplazmatycznej otrzymane z trzustki psa, które poddano działaniu mRNA wyizolowanego z narządu elektrycznego. Nowo zsyntetyzowane podjednostki receptora zidentyfikowano przy użyciu specyficznych przeciwsurowic wytworzonych przeciw każdej z podjednostek. Badania te wykazały, że każda z podjednostek receptora zawiera sekwencję sygnałową i że poszczególne podjednostki syntetyzowane są przy pomocy oddzielnego mRNA [85, 86, 87]. Stwierdzono także, że nowosyntetyzowany receptor nikotynowy jest obecny w aparacie Golgiego i ulega kontranslacyjnej glikozylacji [89].

W badaniach syntezy receptora nikotynowego, w których zastosowano mysie komórki pochodzenia mięśniowego BC 3H-1, udało się poznać lepiej sposób w jaki nowosyntetyzowane podjednostki tworzą cząsteczkę receptora. Do identyfikacji podjednostek używano przeciwciał monoklonalnych [88, 89, 90, 91]. Na podstawie uzyskanych wyników, Merlie i w s p. [91] zasugerowali następującą sekwencję zdarzeń, które prowadzą do wytworzenia funkcjonalnego cholinergicznego receptora nikotynowego. Synteza podjednostki zawiera etap odszczepienia sygnałowej sekwencji oraz etap kontranslacyjnej N-glikozylacji, które mają trwać około 1 minuty (Zablokowanie glikozylacji poprzez tunicamycynę powoduje rozpad podjednostki). Podjednostka  $\alpha$  po glikozylacji zdolna jest wiązać przeciwciała monoklonalne mAb61. Stwierdzono, że produkowany jest znaczny nadmiar podjednostek  $\alpha$  w stosunku do ilości, które wchodzą w skład cząsteczki receptora. Po zakończeniu translacji następuje okres trwający około 30 min., w którym nowo zsyntetyzowane podjednostki dojrzewają pod względem konformacyjnym. Dojrzewanie to przejawia się m.in. tym, że podjednostka  $\alpha$  nabywa zdolność wiązania  $\alpha$  toksyny i przeciwciał MIR mABS. Po fazie dojrzewania dwie podjednostki  $\alpha$  zespalają się z pozostałymi podjednostkami wchodzącymi w skład cząsteczki receptora nikotynowego, tj.  $\beta$ ,  $\gamma$ ,  $\delta$ . Etap ten trwa 30—90 minut. Nadmiar nowosyntetyzowanych podjednostek ulega rozpadowi. Faza szybkiego transportu kompleksu receptorowego z aparatu Golgiego do powierzchni błony komórkowej zajmuje 90—150 minut. Ostatni etap to umiejscowienie receptora w błonie.

Ostatnio, zespół N u m y przeprowadził funkcjonalną analizę cholinergicznego receptora nikotynowego, stosując jako układ ekspresji oocyty żaby [92]. Na drodze ukierunkowanej mutagenyzy modyfikowano w określonych miejscach podjednostkę  $\alpha$ , co pozwoliło na stwierdzenie, które z fragmentów łańcucha polipeptydowego są niezbędne do prawidłowej funkcji receptora. Z badań tych wynika, że występujące przy N końcu reszty cysteinowe w pozycji 192 i 193, które obecne są jedynie w podjednostce  $\alpha$ , odgrywają specyficzną rolę w wiązaniu acetylocholino i  $\alpha$  bun-

garotoksyny. Reszty cysteinowe w pozycji 128 i 142 (występujące we wszystkich podjednostkach receptora nikotynowego) tworzą prawdopodobnie mostek dwusiarczkowy w każdej z podjednostek i warunkują utrzymanie właściwej konformacji tej części receptora, która znajduje się po zewnętrznej stronie błony komórkowej. Dla prawidłowej konformacji podjednostki  $\alpha$  konieczna jest N-glikozylacja reszty asparaginowej w pozycji 141. Mutant, w którym zastąpiono wyżej wymienioną resztę kwasem asparaginowym tylko w niewielkim stopniu może wiązać  $\alpha$  bungarotoksynę.

## VI. Uwagi końcowe

Z przedstawionego przeglądu wynika, że warunkiem przekazania sygnału niesionego przez neurotransmitter do komórki efektorowej jest połączenie się ze swoistym receptorem na powierzchni błony komórkowej. Różnorodność dróg przetworzenia sygnału oraz mechanizmów modulujących aktywność receptorów sprawia, że działanie sieci neuronalnej może być bardzo subtelnie kontrolowane.

Trzeba sobie zdać sprawę, że nadzwyczaj intensywny rozwój badań nad receptorami w ostatniej dekadzie zawdzięczamy przede wszystkim wprowadzeniu nowych technik badawczych. Opracowanie metody wiązania radioaktywnych ligandów o bardzo wysokiej aktywności specyficznej przez receptory umożliwiło scharakteryzowanie właściwości miejsc receptorowych w preparatach błonowych. Oddaje to szczególne usługi zwłaszcza w farmakologii (por. 93, 94). To samo narzędzie służy do badania rozmieszczenia neuroreceptorów i ich właściwości w skrawkach mózgu i innych tkanek przy zastosowaniu autoradiografii (por. 95 i 96). Zastosowanie przeciwciał monoklonalnych i klonowanego cDNA zrewolucjonizowało podejście do badań receptorowych. Do największych osiągnięć neurochemii ostatnich lat można bowiem zaliczyć poznanie pełnej struktury pierwszorzędowej i drugorzędowej cholinergicznego receptora nikotynowego.

Opracowanie wykonano w ramach Programu CPBP 04.01

Zaakceptowano do druku 18 lipca 1986 r.

## PISMIENNICTWO

1. Snyder S. H., Goodman R. R., (1980), *J. Neurochem.*, **35**, 5—15.
2. Dale H. H., (1914), *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, **6**, 147—160.
3. Hammer R., Berrie C. P., Birsdall N. J. M., Burgen A. S. V., Hulme E. C., (1980), *Nature*, **283**, 90—92.
4. Watson M., Yamamura H. I., Roeske W. R., (1983), *Life Sci.*, **32**, 3001—3011.

5. Cortés R., Palacios J. M., (1986), *Brain Res.*, **362**, 227—238.
6. Hughes J., Smith T. W., Kosterlitz H. W., Fothergill L. A., Morgan B. A., Morris H. R., (1975), *Nature*, **258**, 577—579.
7. Przewłocki A., (1985), *Post. Bioch.*, **31**, 463—486.
8. Marx J. M., (1985), *Science*, **227**, 934.
9. Langner S. Z., (1980), *Trends Neurosci.*, **3**, 110—112.
10. Starke K., (1981), *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.*, **21**, 7—31.
11. Laduron P. M., (1985), *Biochem. Pharmac.*, **34**, 467—470.
12. Stevens C. F., (1985), *Trends Neurosci.*, **8**, 335—336.
13. Talvenheimo J. A., (1985), *J. Membrane Biol.*, **87**, 77—91.
14. Lindstrom J., (1985), w: Neurotransmitter Receptor Binding, red. Yamamura H. I., Enna S. J., Kuhar M. J., str. 123—152, Raven Press, New York.
15. Kebabian J. W., Petzold G. L., Greengard P., (1982), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **69**, 2145—2149.
16. Bonnet K. A., (1983), w: Handbook of Neurochemistry, red. Lajtha A., t. 4, str. 331—336, Plenum Press, New York.
17. Rodbell M., (1983), w: Cell Surface Receptors, red. Strange P. G., str. 227—239, Ellis Horwood Ltd, New York.
18. Stone T. W., (1984), w: Brain Receptor Methodologies, red. Marangos P. J., Campbell I. C., Cohen R. M., part A, str. 171—189, Academic Press, Orlando.
19. Singer S. J., Nicholson G. L., (1972), *Science*, **175**, 720—731.
20. Hollenberg M. D., (1985), w: Neurotransmitter Receptor Binding, red. Yamamura H. I., Enna S. J., Kuhar M. J., str. 1—39, Raven Press, New York.
21. Cassel D., Selinger Z., (1978), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **75**, 4155—4175.
22. De Lean A., Stadel J. M., Lefkowitz R. J., (1980), *J. Biol. Chem.*, **255**, 7108—7117.
23. Lefkowitz R. J., Caron M. G., Michel T., Stadel J. M., (1982), *Fed. Proc.*, **41**, 2664—2670.
24. Minneman K. P., (1981), w: Neurotransmitter Receptors, red. Yamamura H. I., Enna S. J., part 2, str. 188—268, Chapman and Hall, London.
25. Kebabian J. W., Calne D. B., (1979), *Nature*, **277**, 93—95.
26. Creese J., Sibley D. R., Hamblin M. W., Left S. E., (1983), *Annu. Rev. Neurol. Neurosci.*, **6**, 43—71.
27. Seeman P., (1984), w: Brain Research Methodologies, red. Marangos P. J., Campbell I. C., Cohen R. M., part A, str. 285—307, Academic Press, Orlando.
28. Dascal N., Landau E. M., (1982), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **79**, 3052—3062.
29. Nathanson N., (1982), *Trends Neurosci.*, **5**, 401—404.
30. Burgisser E., De Lean A., Lefkowitz R., (1982), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **75**, 1016—1020.
31. Klein W. L., (1984), w: Current Topics in Cellular Regulation, red. DeLuca A., Lardy H., Cross R. L., t. 24, str. 129—144, Academic Press, Orlando.
32. Hirata F., Axelrod J., (1980), *Science*, **209**, 1082—1090.
33. Shinitzky M., (1984), w: Membrane Fluidity, red. Kates M., Manson L. A., str. 585—601, Plenum Press, New York.
34. Rodbell M., (1980), *Nature*, **284**, 17—22.
35. Bonnet K. A., (1982), w: Handbook of Neurochemistry, red. Lajtha A., t. 1, str. 257—280, Plenum Press, New York.
36. Lefkowitz R. J., Stadel J. M., Caron M. G., (1983), *Annu. Rev. Biochem.*, **52**, 159—186.
37. Downes C. P., Michell R. H., (1985), w: Molecular Aspects of Cellular Regulation, red. Cohen P., Houslay M. D., t. 4, str. 3—56, Elsevier, Amsterdam.

38. Kwiatkowska J., (1986), *Post. Bioch.*, **32** (w druku).
39. Maldolesi J., (1985), w: Abstracts of International School "Biomembrane and Receptor Mechanisms", Catania, Cannizzaro, September 23 — October 4.
40. Nishizuka Y., (1983), *Trends Biochem. Sci.*, **8**, 13—16.
41. Berridge M. J., (1983), w: Cell Surface Receptors, red. Strange P. G., str. 207—226, Ellis Horwood Ltd, New York.
42. Michell R. H., (1982), *Nature*, **296**, 492—493.
43. Hawthorne J. N., (1982), *Nature*, **295**, 281—282.
44. Abdel-Latif A. A. (1983), w: Handbook of Neurochemistry, red. Lajtha A., t. 3, str. 91—131, Plenum Press, New York.
45. Michell B., (1986), *Nature*, **319**, 176—177.
46. Birsdall N., Hulme E., Burgen A., (1980), *Proc. R. Soc. Lond. (Biol)*, **207**, 1—12.
47. Hashigushi T., Kobayashi H., Tosaka T., Lebet B., (1982), *Brain Res.*, **242**, 378—382.
48. Berridge M. J., (1985), *Sci. Amer.*, **253**, 142—152.
49. Koshland D. E., (1985), w: Abstracts of 13th International Congress of Biochemistry, MO-PL str. 3, Amsterdam, August 25—30.
50. Hawthorne J. N., Picard M. R., (1979), *J. Neurochem.*, **32**, 5—14.
51. Shinitzky M., (1985), w: Abstracts of International School "Biomembrane and Receptor Mechanisms, Catania, Cannizzaro, September 23 — October 4.
52. Birsdall N. J., (1982), *Trends Neurosci.*, **5**, 137—138.
53. Pumplin D., Fambrough D., (1982), *Annu. Rev. Physiol.*, **44**, 319—335.
54. Wilson S., Vincent A., Newsome-Davis J., (1983), *J. Neurol. Neurosurg. Psychiatry*, **46**, 377—382.
55. Wilson S., Vincent A., Newsome-Davis J., (1983), *J. Neurol. Neurosurg. Psychiatry*, **46**, 385—387.
56. Paston I. H., Helmreich E. J. M., (1979), *Science*, **214**, 504—509.
57. Dautry-Varsat A., Lodish H. F., (1984), *Sci. Amer.*, **250**, 48—54.
58. Gardner J. M., Fambrough D. M., (1979), *Cell*, **16**, 61—74.
59. Maisel A. S., Motulsky H., Insel P. A., (1985), *Science*, **230**, 183—186.
60. Luqmani Y. A., Bradford H. F., Birsdall N. J. M., Hulme E. C., (1979), *Nature*, **277**, 481—483.
61. Burgoyne R. A., (1983), *J. Neurochem.*, **40**, 324—331.
62. Liles W. C., Nathanson N. N., (1986), *J. Neurochem.*, **46**, 89—95.
63. McLawhon R. W., Cernak D., Ellory J. C., Danson G., (1983), *J. Neurochem.*, **41**, 1286—1296.
64. Ariëns E. J., Beld A. J., Rodriques de Miranda J. F., Simonis A. M., (1979), w: The Receptors, red. O'Brien R. D., t. 1, str. 33—91, Plenum Press, New York.
65. Reynolds J. A., Karlin A., (1978), *Biochemistry*, **17**, 2035—2038.
66. Lindstrom J., Merlie J., Yogeewaran G., (1979), *Biochemistry*, **18**, 4465—4470.
67. Raftery M., Hunkapiller M., Strader C., Hood L., (1980), *Science*, **208**, 1454—1457.
68. Brisson A., Unwin P., (1985), *Nature*, **315**, 474—477.
69. Stevens C. F., (1985), *Trends Neurosci.*, **8**, 1—3.
70. Devillers-Thiery A., Giraudat J., Bentaboulet M., Changeux J. P., (1983), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **80**, 2067—2071.
71. Sumikawa K., Houghton M., Smith J., Bell L., Richards B., Barnard E. A., (1982), *Nucleic Acids Res.*, **10**, 5809—5822.

72. Sumikawa K., Houghton M., Emtage J., Richards B. M., Barnard E. A., (1981), *Nature*, **292**, 241—246.
73. Barnard E. A., Miledi R., Sumikawa K., (1982), *Proc. R. Soc. Lond. (Biol.)*, **215**, 241—246.
74. Barnard E. A., Besson D., Bilbe G., Brown D. A., Constanti A., Conti-Tronconi B. M., Dolly J. O., Dunn S. M. J., Mehraban F., Richards B. M., Smart T. G., (1983), w: 48th Cold Spring Harbor Symposium: Molecular Neurobiology, str. 109—124, CSH Laboratory, Cold Spring Harbor, New York.
75. Numa S., (1985), *Abstr. J. Neurochem.*, **44** (Suppl.), S 1.
76. Noda M., Takahashi H., Tanabe T., Toyosato M., Kikyotani S., Furutani Y., Hirose T., Takashima H., Inayama S., Miyata T., Numa S., (1983), *Nature*, **302**, 528—532.
77. Noda M., Furutani Y., Takahashi H., Toyosato M., Tanabe T., Shimizu S., Kikyotani S., Kayano T., Hirose T., Inayama S., Numa S., (1983), *Nature*, **305**, 818—823.
78. Noda M., Takahashi H., Tanabe T., Yogosato M., Furutani Y. I., Hirose T., Asai M., Inayama S., Miyata T., Numa S., (1982), *Nature*, **299**, 793—797.
79. Mishina M., Kurosaki T., Tobimatsu T., Morimoto Y., Noda M., Yamamoto T., Terao M., Lindstrom J., Takahashi H., Kuno M., Numa S., (1984), *Nature*, **307**, 604—608.
80. Conti-Tronconi B., Hunkapiller M., Lindstrom J., Rafteri M., (1982), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **79**, 6489—6493.
81. Finer-Moore J., Stroud R. M., (1984), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **81**, 155—158.
82. Fairclough R. H., Finer-Moore J., Love R. A., Kristoffer-son D., Desmuelles J., Stroud R. M., (1983), w: 48th Spring Cold Harbor Symposium: Molecular Neurobiology, str. 9—20, CSH Laboratory, Cold Spring Harbor, New York.
83. Sigel E., Stephenson F. A., Mamalaki C., Barnard E. A., (1983), *J. Biol. Chem.*, **258**, 6965—6971.
84. Stephenson F. A., (1985), w: Abstracts of International School "Biomembrane and Receptor Mechanisms" Catania, Cannizzaro, September 23—October 4.
85. Anderson D., Blobel G., (1981), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **78**, 5598—5608.
86. Anderson D., Walter P., Blobel G., (1982), *J. Cell Biol.*, **93**, 501—506.
87. Sebbane R., Clokey G., Merlie J. P., Tzartos D., Lindstrom J., (1983), *J. Biol. Chem.*, **258**, 3294—3303.
88. Fombrough D., Devreotes P., (1978), *J. Cell Biol.*, **76**, 237—244.
89. Merlie J. P., Sebbane R., Tzartos S., Lindstrom J., (1982), *J. Biol. Chem.*, **257**, 2694—2701.
90. Merlie J. P., Lindstrom J., (1983), *Cell*, **34**, 747—757.
91. Merlie J. P., Sebbane R., Gardner S., Olson E., Lindstrom J., (1983), w: 48th Cold Spring Harbor Symposium: Molecular Neurobiology, str. 135—146, CSH Laboratory, Cold Spring Harbor, New York.
92. Mishina M., Tobimatsu T., Imoto K., Tanaka K., Fijita Y., Fukuda K., Kurosaki M., Takahashi H., Kuno M., Numa S., (1985), *Nature*, **313**, 364—369.
93. Bennett J. P. Jr., Yamamura H. I., (1985), w: Neurotransmitter Receptor Binding, red. Yamamura H. I., Enna S. J., Kuhar M. J., str. 61—89, Raven Press, New York.



94. Creese I., (1985), w: Neurotransmitter Receptor Binding, red. Yamamura H. I., Enna S. J., Kuhar M. J., str. 189—233, Raven Press, New York.
95. Herkenham M., (1984), w: Brain Receptor Methodologies, red. Marangos P. J., Campbell I. C., Cohen R. M., part A, str. 127—152, Academic Press, Orlando.
96. Kuhar M., (1985), w: Neurotransmitter Receptor Binding, red. Yamamura H. I., Enna S. J., Kuhar M. J., str. 153—176, Raven Press, New York.



JADWIGA NOWORYTKO \*, AMALIA GUZDEK \*\*

## Potranslacyjne modyfikacje glikoprotein

### Post-Translational Modifications of Glycoproteins

#### Spis treści

##### I. Wstęp

##### II. Fosforylowane glikoproteiny

###### II-1. Enzymy lizosomowe

###### II-1.1. Struktura łańcuchów oligosacharydowych

###### II-1.2. Fosforylacja łańcuchów oligosacharydowych enzymów lizosomowych

###### II-1.3. Interakcja enzymów lizosomowych z receptorem fosfomannozylowym

###### II-1.4. Fosforylowane i sulfurylowane oligosacharydy enzymów lizosomowych *Dictyostelium discoideum*

###### II-2. Inne fosforylowane glikoproteiny

##### III. Sulfurylowane glikoproteiny

##### IV. Acylowane glikoproteiny błon

##### V. Uwagi końcowe

#### Contents

##### I. Introduction

##### II. Phosphorylated glycoproteins

###### II-1. Lysosomal enzymes

###### II-1.1. Structure of oligosaccharide chains

###### II-1.2. Phosphorylation of oligosaccharide chains of lysosomal enzymes

###### II-1.3. Interaction of lysosomal enzymes with the phosphomannosyl receptor

###### II-1.4. Phosphorylated and sulphated lysosomal enzymes of *Dictyostelium discoideum*

###### II-2. Other phosphorylated glycoproteins

---

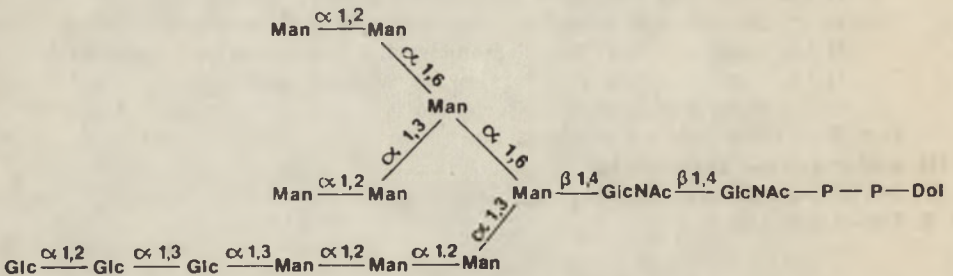
Dr \*, Dr \*\*, Zakład Biochemii Zwierząt Instytutu Biologii Molekularnej UJ,  
31-120 Kraków, Al. Mickiewicza 3

Wykaz stosowanych skrótów: Man — mannoza; Glc — glukoza; GlcNAc — N-acetyloglukozamina; P — reszta fosforanowa; Dol — dolichol; endo-H — endo- $\beta$ -N-acetyloglukozaminidaza; H; PAPS — adenozylo-3'-fosfo-5'-sulfosforan; UDP-GlcNAc — urydynodifosfo-N-acetyloglukozamina; Man-6-P — mannozo-6-fosforan; GlcNAc-fosfotransferaza — N-acetyloglukozaminylo-1-fosfotransferaza UDP-N-acetyloglukozamina-glikoproteina; GlcNAc-fosfodiesteraza —  $\alpha$ -N-acetyloglukozaminylo-1-fosfodiester N-acetyloglukozaminidaza.

- III. Sulphated glycoproteins  
 IV. Acylated membrane glycoproteins  
 V. Concluding remarks

## I. Wstęp

Łańcuchy cukrowe glikoprotein połączone z polipeptydem wiązaniem N-glikozyloaminowym można sklasyfikować ze względu na ich strukturę na trzy rodzaje, to jest na łańcuchy bogate w mannozę, złożone i hybrydowe. Zawierają one identyczny pentasacharydowy rdzeń utworzony z trzech reszt mannozy (Man) i dwóch reszt N-acetyloglukozaminy (GlcNAc), różnią się natomiast strukturą pozostałej części łańcucha. Mechanizm ich syntezy jest jednakowy, a dawcą łańcuchów cukrowych glikoprotein jest dolichylodifosfortetradekasacharyd ( $\text{Glc}_3\text{Man}_9\text{GlcNAc}_2\text{-P-P-Dol}$ ) [1, 2]. Strukturę prekursorowego tetradekasacharydu podaje Rycina 1.



Ryc. 1. Struktura prekursorowego tetradekasacharydu: Man — mannoza; Glc — glukoza; GlcNAc — N-acetyloglukozamina; P — reszta fosforanowa; Dol — dolichol.

Glikozylacja łańcuchów polipeptydowych jest procesem kotranslacyjnym zachodzącym w szorstkiej siateczce śródplazmatycznej [3]. W procesie tym tetradekasacharyd zostaje przeniesiony w całości na powstający polipeptyd i tworzy się wiązanie N-glikozyloaminowe. Następnie rozpoczyna się proces zwany obróbką oligosacharydu (ang. *processing*). Inicjują go  $\alpha$ -glukozydazy I i II. Enzymy te odszczepiają kolejno trzy reszty glukozy z łańcucha oligosacharydowego [4—7], co prowadzi do utworzenia łańcuchów bogatych w mannozę ( $\text{Man}_9\text{GlcNAc}_2$ -). Kolejna hydroliza czterech wiązań  $\alpha$ -1,2 łączących reszty mannozy, katalizowana przez  $\alpha$ -mannozydazy [8—12], przekształca  $\text{Man}_9\text{GlcNAc}_2$ - w heptasacharyd ( $\text{Man}_5\text{GlcNAc}_2$ -). Łańcuch heptasacharydowy ulega następnie dalszej obróbce w wyniku której powstają łańcuchy złożone lub hybrydowe.

Łańcuchy cukrowe glikoprotein połączone wiązaniem N-glikozyloaminowym mogą podlegać potranslacyjnym modyfikacjom. W artykule zostaną omówione dane dotyczące potranslacyjnej obróbki łańcuchów

cukrowych glikoprotein przede wszystkim fosforylacji i sulfurylacji monosacharydów budujących ich część cukrową, jak również acylacji ich łańcuchów polipeptydowych.

## II. Fosforylowane glikoproteiny

### II-1. Enzymy lizosomowe

#### II-1.1. Struktura łańcuchów oligosacharydowych

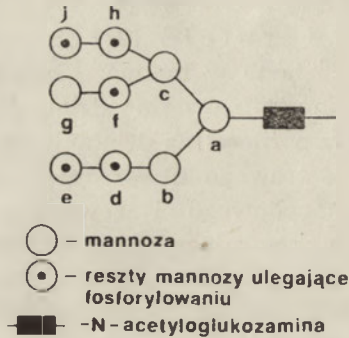
Reszty Man-6-P stwierdzono po raz pierwszy w bogatych w mannozę łańcuchach oligosacharydowych nowo zsyntetyzowanych kwaśnych hydrolaz [13—15]. Obecnie wiadomo, że Man-6-P pełni funkcję znacznika podczas transportu enzymów do lizosomów [16—20].

W 1980 r. Tabas i Kornfeld [21] otrzymali z  $\beta$ -glukuronidazy komórek limfomy myszy bogate w mannozę łańcuchy oligosacharydowe zawierające reszty fosforanowe odporne na działanie alkalicznej fosfatazy. Okazało się, że przyczyną oporności na działanie tego enzymu jest występowanie wiązania fosfodiesterowego utworzonego między resztami mannozy łańcucha oligosacharydowego i zewnętrzną  $\alpha$ -związaną resztą N-acetyloglukozaminy, przykrywającą resztę fosforanową. Obecność reszt  $\alpha$ -N-acetyloglukozaminy związanych z resztami fosforanowymi wykazali także inni autorzy [22, 23]. Wysłunięto przypuszczenie, że takie oligosacharydy są prekursorami w syntezie fosforylowanego znacznika. Przeprowadzono szczegółową charakterystykę znakowanych ( $2-^3\text{H}$ )mannozą fosforylowanych oligosacharydów, uwolnionych po działaniu endo- $\beta$ -N-acetyloglukozaminidazy H (endo-H) z glikopeptydów komórek limfomy myszy [24].

Endo-H hydrolizuje wiązanie glikozydowe między dwiema resztami N-acetyloglukozaminy w części rdzeniowej bogatych w mannozę i wielu hybrydowych łańcuchów oligosacharydowych glikoprotein i glikopeptydów [25—27]. W wyniku reakcji jedna reszta N-acetyloglukozaminy pozostaje związana z Asn łańcucha polipeptydowego, a nienaruszony w swej pozostałej części łańcuch oligosacharydowy zostaje uwolniony. Endo-H nie działa na łańcuchy złożone.

Wykazano wiele wspólnych cech w strukturze fosforylowanych oligosacharydów. Wszystkie są łańcuchami bogatymi w mannozę, przy czym liczba reszt mannozy w łańcuchu waha się od 6 do 9. W poszczególnych łańcuchach liczba reszt fosforanowych, ich ułożenie i sposób związania jest różna. Łańcuchy oligosacharydowe mogą zawierać jedną (80%), dwie (20%), a niekiedy nawet trzy reszty fosforanowe. Spośród możliwych 9 reszt mannozy w łańcuchu oligosacharydowym jedynie 5 może wiązać

się z resztą fosforanową, a ich położenie nie jest przypadkowe. Trzy z pięciu możliwych miejsc wiązania reszt fosforanowych są szczególnie uprzywilejowane. Rycina 2 podaje położenie reszt mannozy w łańcuchu oligosacharydowym, które mogą ulec estryfikacji kwasem fosforowym. Najczęściej są fosforylowane reszty mannozy w pozycji **d** a także **i** i **h**, lecz nigdy nie stwierdzono równoczesnego podstawienia reszt mannozy w położeniu **i** i **h** łańcucha cukrowego. W żadnym z analizowanych oligosacharydów reszta mannozy **g** nie jest fosforylowana. Przepuszczalnie zostaje odcięta zanim reszta **f** zwiąże się z resztą fosforanową lub też zostaje usunięta wkrótce po estryfikacji tej reszty w wyniku obróbki  $\alpha$ -mannozydazą. Również reszty mannozy w pozycji **a**, **b** oraz **c**, a więc reszty mannozy części rdzeniowej oligosacharydu nigdy nie ulegają estryfikacji. Na ogół oligosacharydy (75%) zawierają reszty fosforanowe w formie diestru, tylko niektóre (25%) w formie monoestru.



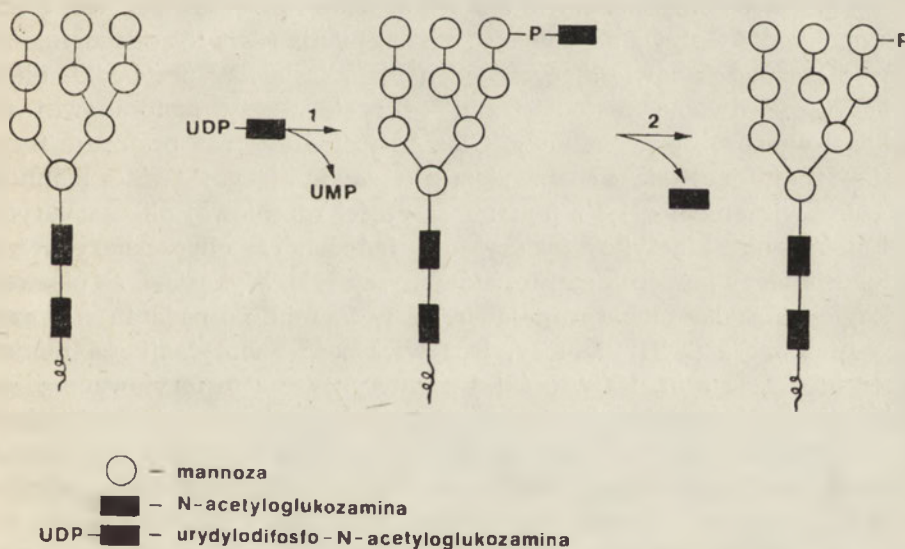
Ryc. 2. Bogaty w mannozę łańcuch oligosacharydowy.

Fosforylowane oligosacharydy  $\beta$ -glukuronidazy śledziona człowieka [23],  $\beta$ -heksozaminidazy i katepsyny D fibroblastów [22] mają podobne cechy strukturalne do omawianych powyżej cech fosforylowanych oligosacharydów glikoprotein z komórek limfomy myszy. Poprzednio uzyskane wyniki potwierdzono także analizą anionowych oligosacharydów uwolnionych z glikoprotein wewnątrzkomórkowych i wydzielanych przez komórki linii P388D<sub>1</sub> makrofagów myszy [28]. Wykazano mianowicie, że główna frakcja oligosacharydów uwolnionych z glikoprotein po działaniu endo-H składa się z łańcuchów bogatych w mannozę z jednym lub dwoma fosfomonoestrami lub diestrami w pozycjach **d**, **f**, **h** oraz **i**. Oprócz łańcuchów bogatych w mannozę stwierdzono w analizowanej frakcji także łańcuchy cukrowe typu hybrydowego. Łańcuchy te zawierają 1 do 3 reszt kwasu sjałowego dołączonych do rozgałęzienia wiążącego się wiązaniem  $\alpha$ -1,3 z  $\beta$ -mannozą. W niektórych łańcuchach hybrydowych drugie rozgałęzienie ulegało fosforylowaniu. Reszta fosforanowa występowała w formie diestru lub monoestru i stwierdzano ją niemal wyłącznie w pozycji **h** lub **i**.

## II-1.2. Fosforylacja łańcuchów oligosacharydowych enzymów lizosomowych

Wbudowywanie reszt fosforanowych w łańcuchy oligosacharydowe kwaśnych hydrolaz jest procesem dwuetapowym [21, 29]. Wniosek ten wypływa ze stwierdzenia, że Man-6-P jest syntetyzowany jako fosfodiester przykryty resztą  $\alpha$ -N-acetyloglukozaminy [21, 22] podczas gdy w dojrzałym enzymie występuje w formie monoestru [17, 18]. Etap pierwszy polega na przeniesieniu GlcNAc-1-P z donorowej UDP-GlcNAc na grupę -OH przy C-6 końcowej lub przedostatniej reszty mannozy w bogatych w mannozę łańcuchach oligosacharydowych zsyntetyzowanych de novo enzymów lizosomowych. Reakcję katalizuje lizosomowa, specyficzna N-acetyloglukozaminylo-1-fosfotransferaza UDP-N-acetyloglukozamina [29, 30]. W wyniku reakcji powstaje wiązanie diestrowe tzw. przykryty fosforan (ang. *covered phosphate*). W następnym etapie zewnętrzne reszty N-acetyloglukozaminy ulegają selektywnemu wycięciu przez specyficzną  $\alpha$ -N-acetyloglukozaminylo-1-fosfodiester N-acetyloglukozamidazę [31, 39, 40]. Przekształca ona fosfodiester w tzw. odkryty mannozo-6-fosforan (ang. *uncovered phosphate*) [41]. Rycina 3 przedstawia wbudowywanie reszt fosforanowych w łańcuchy oligosacharydowe enzymów lizosomowych.

Enzymy uczestniczące w syntezie znacznika Man-6-P występują w błonach aparatu Golgiego [31—34]. GlcNAc-fosfotransferazę oczyszczono częściowo z solubilizowanych przez Triton X-100 błon aparatu Golgiego wątroby szczura i określono jej własności [35]. Wykazano, że fosforan doli-



**Ryc. 3.** Wbudowywanie reszt fosforanowych w łańcuchy oligosacharydowe enzymów lizosomowych: 1 — N-acetyloglukozaminylo-1-fosfotransferaza UDP-N-acetyloglukozamina-glikoproteina; 2 —  $\alpha$ -N-acetyloglukozaminylo-1-fosfodiester N-acetyloglukozamidaza; UMP — urydynomonofosforan.

cholu nie wpływa na jej aktywność [30], co wskazuje, że fosforylacja reszt mannozy nie zachodzi na etapie pośredników lipidowych. GlcNAc-fosfo-transferaza nie wykazuje absolutnej selektywności względem łańcuchów oligosacharydowych kwaśnych hydrolaz, gdyż glikopeptydy tyreoglobuliny są *in vitro* dobrymi akceptorami dla tego enzymu [30].

W fibroblastach chorych z objawami choroby spichrzania zwanej też mukolipidazą II (ang. *I-cell disease*) stwierdzono brak lub znaczny niedobór N-acetyloglukozaminylo-1-fosfotransferazy UDP-GlcNAc-glikoproteina [29, 36—38]. W przypadku mukolipidozy II defekt biochemiczny wyraża się niezdolnością fibroblastów do syntezy fosforylowanego znacznika w cząsteczkach pewnych enzymów lizosomowych. W związku z tym enzymy lizosomowe są wydzielane do środowiska pozakomórkowego, a nie przekazywane do lizosomów mimo, że fibroblasty pacjentów z tym schorzeniem zawierają prawidłowe receptory. Powoduje to obniżenie poziomu wielu kwaśnych hydrolaz w fibroblastach i innych komórkach tkanki łącznej, przy niezmienionej zawartości tych enzymów w komórkach wątroby i innych narządów. Równocześnie podwyższa się poziom hydrolaz tej grupy w płynach ustrojowych np. w surowicy i moczu.

Enzymem uczestniczącym w „odmaskowaniu” znacznika fosfomannozyowego w nowo zsyntetyzowanych kwaśnych hydrolazach jest  $\alpha$ -N-acetyloglukozaminylo-1-fosfodiester N-acetyloglukozaminidaza zwana uprzednio N-acetyloglukozaminylofosfodiesterazą lub glikozydazą fosfodiesterową. GlcNAc-fosfodiesteraza jest przypuszczalnie glikoproteina i wykazuje selektywność wobec reszt N-acetyloglukozaminy związanych wiązaniem  $\alpha$  [39]. Wielkość oligosacharydu ani też obecność lub brak peptydu z nim związanego nie wpływa na szybkość odszczepiania reszt N-acetyloglukozaminy z cząsteczek zawierających jeden fosfodiester. W przypadku oligosacharydu z dwoma fosfodiestrami odkrycie reszty fosforanowej nie zachodzi w sposób przypadkowy. GlcNAc-fosfodiesteraza preferuje fosfodiester znajdujący się na rozgałęzieniu zawierającym resztę mannozy związaną wiązaniem  $\alpha$ -1,3 z  $\beta$ -mannozą części rdzeniowej oligosacharydu.

Przebadano kinetykę fosforylacji łańcuchów oligosacharydowych  $\beta$ -glukuronidazy komórek makrofagów myszy [41]. Wykazano, że pierwszy fosforylowany oligosacharyd pojawia się w 20 min. po podaniu znakowanego prekursora ( $2$ - $^3$ H)mannozy, lecz większość fosforylacji ma miejsce w czasie 40—60 min. Najwcześniej zsyntetyzowane fosforylowane oligosacharydy są już pozbawione reszt glukozy co wskazuje, że fosforylacja zachodzi po przeniesieniu tetradekasacharydu na tworzący się łańcuch polipeptydowy, utworzeniu wiązania N-glikozyloaminowego i obróbce reszt glukozy. Jest więc zjawiskiem potranslacyjnym, za czym przemawia również obecność w aparacie Golgiego enzymów uczestniczących w syntezie znacznika fosfomannozyowego [31—35]. Odslonięcie fosfodiestru rozpoczyna się wkrótce po fosforylacji oligosacharydu i przebiega równocześnie z odszczepieniem 1 do 2 końcowych reszt mannozy.



**II-1.3. Interakcja enzymów lizosomowych z receptorem fosfomannozylowym**

Wykazano, że powinowactwo oligosacharydów uwolnionych z glikoprotein komórek linii P388D<sub>1</sub> makrofagów myszy wobec receptora fosfomannozylowego wątroby wołu zależy od szeregu cech strukturalnych oligosacharydu [28]. Istotne znaczenie ma oprócz liczby podstawionych grup fosforanowych także położenie ich w cząsteczce oraz obecność końcowych reszt mannozy w łańcuchu oligosacharydowym. Najwyższą zdolność wiązania wykazują oligosacharydy zawierające dwa fosfomonoestry. Powinowactwo cząsteczek z jednym fosfomonoestrem zależy od położenia reszty fosforanowej w łańcuchu cukrowym. Najsilniej wiąże się z receptorem reszta mannozy w pozycji *d*. Usunięcie z łańcucha oligosacharydowego końcowych reszt mannozy związanych wiązaniem  $\alpha$ -1,2 z Man-6-P zwiększa jego zdolność wiązania się z receptorem. Najwyższe powinowactwo wobec receptora wykazuje fragment łańcucha oligosacharydowego o niżej podanej sekwencji :P-Man $\alpha$ 1  $\rightarrow$  2 Man $\alpha$ 1  $\rightarrow$  3 Man $\beta$ 1  $\rightarrow$  4 GlcNAc-. Wykazano również, że enzymy lizosomowe komórek BW 5147 Thy-1<sup>-</sup>E limfomy myszy zawierające oligosacharydy z jedną resztą Man-6-P w położeniu *d*, wolne od końcowych reszt mannozy wykazują wysokie powinowactwo wobec receptora i ulegają adsorpcyjnej endocytozie [42].

Związanie się enzymu lizosomowego z receptorem umożliwia sortowanie grupy białek przeznaczonych do lizosomów od innych mających odmienne wewnątrz- lub zewnątrzkomórkowe przeznaczenie. Wysuwa się przypuszczenie, że reszty Man-6-P zabezpieczają łańcuchy oligosacharydowe prawidłowych kwaśnych hydrolaz przed obróbką w łańcuchy złożone. Obróbka łańcuchów bogatych w mannozę w łańcuchy złożone może prowadzić do sekrecji hydrolaz [20].

**II-1.4. Fosforylowane i sulfurylowane oligosacharydy enzymów lizosomowych *Dictyostelium discoideum***

Śluzowiec *Dictyostelium discoideum* jest prostym eukariontem z dobrze rozwiniętym układem lizosomowym [43]. Kwaśne hydrolazy syntetyzowane przez ten organizm wykazują znaczne powinowactwo wobec receptora fosfomannozylowego ludzkich fibroblastów [44] i receptora wątroby wołu, mogą więc być używane jako ligandy podczas oczyszczania tego receptora [28, 45]. Przedstawiono częściową charakterystykę bogatych w mannozę łańcuchów cukrowych następujących enzymów lizosomowych:  $\alpha$ -mannozydazy,  $\beta$ -D-glukuronidazy i  $\beta$ -D-N-acetyloglukozaminidazy z komórek *D. discoideum* szczepu AX3 [46]. Okazało się, że oligosacharydy te zawierają na ogół 1 lub 2 reszty fosforanowe oraz 1 do 4 reszt siarczanowych. Ułożenie reszt fosforanowych jest podobne do ich ułożenia w łańcuchach heterosacharydowych enzymów lizosomowych ssaków [23, 24, 28]. Prawie wszystkie reszty fosforanowe występują jednak w formie odmien-

nego niż u ssaków, opornego na działanie kwasu, fosfodiestru: Man-6-P-OCH<sub>3</sub>, [47]. Wykazano, że S-adenozylometionina jest dawcą grup metylo-owych w procesie biosyntezy fosfodiestru metylofosfomannozyłowego, a najwyższa, swoista aktywność metylotransferazowa występuje w błonach aparatu Golgiego [48].

Niewiele wiadomo dotychczas o położeniu reszt siarczanowych w łańcuchach oligosacharydowych tych hydrolaz. Wydaje się, że reszty siarczanowe estryfikują głównie reszty N-acetyloglukozaminy części rdzeniowej oligosacharydów, a tylko niewiele ich wiąże się z resztami mannozy bocznych rozgałęzień łańcucha.

Niecałkowita obróbka reszt glukozy w cząsteczkach prekursorowego tetradekasacharydu związana z brakiem aktywności glukozydazy II w komórkach recesywnego mutantu *D. discoideum* zwanego mod.A upośledza fosforylację i sulfurylację bogatych w mannozę łańcuchów cukrowych enzymów lizosomowych tego eukarionta [49]. Glikopeptydy uzyskane z komórek mod.A zawierają mniej reszt fosforanowych i siarczanowych aniżeli ich komórki macierzyste. Są uboższe w oligosacharydy z dwiema resztami fosforanowymi, a zawierają więcej monofosforylowanych łańcuchów. Podobnie jak w komórkach macierzystych *D. discoideum* reszty fosforanowe występują w łańcuchach oligosacharydowych w formie diestru opornego na działanie kwasu. W glikopeptydach uzyskanych z komórek mod.A zwiększa się również liczba nefosforylowanych łańcuchów zawierających jedną lub dwie reszty glukozy. Obecność reszt glukozy w łańcuchu obniża wydajność fosforylacji reszt mannozy znajdujących się w ich sąsiedztwie. Być może reszty glukozy stanowią steryczną przeszkodę dla fosfotransferazy. Nieznaczące zmiany w strukturze oligosacharydów wpływają jednak na poziom i własności enzymów lizosomowych syntetyzowanych przez komórki mod.A. W komórkach tych stwierdzono obniżony poziom  $\alpha$ -mannozydazy-1, N-acetyloglukozaminidazy, a zwłaszcza  $\beta$ -glukozydazy-1, a także jej szybszą degradację *in vivo* [50, 51]. Przymuszczalnie reszty fosforanowe i siarczanowe są niezbędne dla stabilizacji tego enzymu.

## II-2. Inne fosforylowane glikoproteiny

Fosforylacji ulegają nie tylko łańcuchy oligosacharydowe kwaśnych hydrolaz. Wbudowywanie reszt fosforanowych może zachodzić również w inne glikoproteiny i w łańcuchy odmiennego typu niż bogaty w mannozę.

W 1984 roku wykazano, że z procesem nowotworzenia są związane zmiany w strukturze łańcuchów cukrowych tyreoglobuliny ludzkiej [52]. Tyreoglobulina wyosobniona ze zmienionych chorobowo tkanek tarczycy (brodawczak) jest bogatsza w trójantenowe łańcuchy złożone. Łańcuchy złożone tyreoglobuliny pochodzącej z tkanki nowotworowej nie zawierają

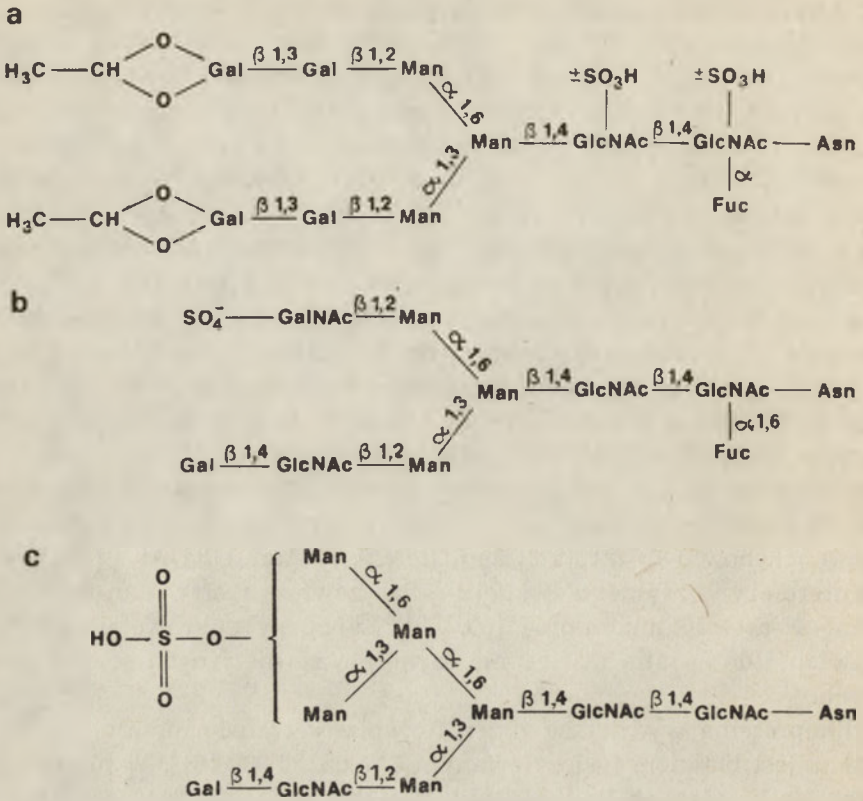
reszt kwasu sjałowego, a zawierają jedną resztę fosforanową w formie diestru. W tyreoglobulinie ze zmienionych chorobowo tkanek tarczycy wykazano także bogate w mannozę oraz hybrydowe łańcuchy oligosacharydowe zawierające jedną resztę fosforanową związaną wiązaniem diestrowym [53]. Podobnie jak w cząsteczkach kwaśnych hydrolaz ssaków resztę fosforanową blokuje  $\alpha$ -N-acetyloglukozamina. Obecność reszt fosforanowych w łańcuchach cukrowych tyreoglobuliny komórek nowotworowych może powodować szybsze usuwanie tego białka za pośrednictwem receptorów dla Man-6-P obecnych na powierzchni komórek tarczycy.

Do fosforylowanych glikoprotein należą również uteroferyna, białko sekrecyjne błony śluzowej macicy świni [54], oraz glikoproteina wydzielana przez fibroblasty myszy transformowane wirusem Kirstena. Uteroferyna jest białkiem transportującym żelazo przez łożysko dla utrzymania hemopoezy u płodu [55]. Występuje w formie nieaktywnej i aktywnej enzymatycznie, wykazując aktywność kwaśnej fosfatazy [56—58]. Część cukrowa uteroferyny stanowi 4,8% cząsteczki i złożona jest z pojedynczych łańcuchów o strukturze:  $\text{Man}_5\text{GlcNAc}_2$ - i  $\text{Man}_6\text{GlcNAc}_2$ - [59]. Około 30% uteroferyny zsyntetyzowanej *in vivo* zawiera reszty Man-6-P zablokowane N-acetyloglukozaminą [59, 60]. Łańcuchy cukrowe uteroferyny wydzielanej do światła macicy nie zawierają zewnętrznych reszt fosforanowych.

Glikoproteina wydzielana przez fibroblasty transformowane wirusem Kirstena jest białkiem fosforylowanym o m.c. 35 000 [61]. W nietransformowanych komórkach linii 3T3 glikoproteina nie ulega sekrecji. Dopiero pod wpływem amin lizosomotropowych np.  $\text{NH}_4\text{Cl}$  zostaje wydzielona do środowiska, co sugeruje, że ta glikoproteina może być niezidentyfikowanym enzymem lizosomowym. Stwierdzono, że łańcuchy oligosacharydowe glikoproteiny wydzielanej przez komórki linii 3T3 transformowane wirusem Kirstena wiążą się z receptorem fosfomannozylowym. Interakcja z receptorem potwierdza więc obecność fosfomannozylowego znacznika w łańcuchach cukrowych sekrecyjnej formy glikoproteiny. Dotychczas nie wyjaśniono jednak przyczyny ilościowego wydzielania glikoproteiny do medium. Przypuszcza się, że białku temu brak nieokreślonych jeszcze bliżej własności warunkujących, obok znacznika, jego translokację do lizosomów.

### III. Sulfurylowane glikoproteiny

W ostatnich latach sulfurylowane glikoproteiny zawierające łańcuchy związane z Asn znaleziono w wielu komórkach i tkankach (Ryc. 4). Występują one m.in. w tkance mózgowej [62], w nerkach szczura [63], płucach płodu człowieka i kurczęcia [64, 65], w komórkach śródbłonna naczyń



Ryc. 4. Struktura sulfurylowanych łańcuchów oligosacharydowych: a — glikoprotein NN i F otoczki wirusa SV5 [77]; b — hormonu luteinizującego owcy [72]; c — ovoalbuminy [74].

[66, 67], embrionach jaja jeżowca [68] i melanocytach [69]. Reszty siarczanowe wykazano również w fibronektynie komórek melanomy [70], luteotropinie [71—73], albuminie jaja [74], w powierzchniowych glikoproteinach komórek tarczycy [75] oraz glikoproteinach wirusowych [76, 77].

Stopień sulfurylacji glikoprotein jest różny; około 10—20% łańcuchów cukrowych może ulegać estryfikacji [75, 77]. Sulfurylacji podlegają różne łańcuchy oligosacharydowe, zarówno bogate w mannozę, hybrydowe jak i złożone. Reszty siarczanowe mogą wiązać się z różnymi monosacharydami (mannozą, galaktozą, heksozaminami) w bocznych rozgałęzieniach łańcucha oligosacharydowego, jak również z resztami N-acetyloglukozaminy części rdzeniowej oligosacharydu. Związanie reszty siarczanowej z resztą N-acetyloglukozaminy części rdzeniowej wymaga jednak uprzednio dołączenia w obecności N-acetyloglukozaminytransferazy I pierwszego antenowego monosacharydu (N-acetyloglukozaminy) do reszty mannozy związanej wiązaniem  $\alpha$ -1,3 z  $\beta$ -mannozą części rdzeniowej [78].

Niewiele wiadomo o enzymach katalizujących proces sulfurylacji łańcuchów cukrowych glikoprotein. Ponieważ różne reszty cukrowe występujące w różnych miejscach łańcuchów oligosacharydowych glikoprotein ulegają sulfurylacji, przypuszcza się, że następuje to bądź pod działaniem odrębnych sulfotransferaz o dużej specyficzności substratowej, bądź też przeciwnie, pod działaniem sulfotransferaz o małej specyficzności. Niewiele również wiadomo o mechanizmie procesu sulfurylacji. Ogólnie uważa się, że reszty siarczanowe przenoszone są z adenzyno-3'-fosfo-5'-sulfofosforanu (PAPS) na odpowiednie akceptory. Wiadomo, że nukleotyd ten występujący u ssaków, drożdży i bakterii powstaje z ATP i nieorganicznego siarczanu w cytosolu [79, 80]. Przenoszenie zaś reszt siarczanowych z PAPS na drobiny akceptorowe zachodzi w aparacie Golgiego. Nasuwa się pytanie w jaki sposób PAPS staje się dostępny dla sulfotransferaz w świetle aparatu Golgiego. W latach 1982—85 wykazano, że zachodzi translokacja PAPS, a także innych nukleotydów cukrowych poprzez błony aparatu Golgiego [81—84]. W translokacji uczestniczą specyficzne dla każdego nukleotydu białka transportujące. Wniknięciu nukleotydu do światła aparatu Golgiego towarzyszy równoważne uwolnienie odpowiedniego mononukleotydu do cytosolu.

Rola biologiczna sulfurylowanych glikoprotein jest słabo poznana. Przypuszcza się, że odgrywają one pewną rolę podczas embriogenezy, a także podczas różnicowania komórkowego. Być może uczestniczą w wewnątrzkomórkowym ruchu i zagęszczaniu glikoprotein w wakuolach. Obecność reszt siarczanowych może zwiększać stabilność glikoprotein przez podwyższenie oporności na działanie egzoglikozydaz i proteinaz.

#### IV. Acylowane glikoproteiny błon

Acylowane glikoproteiny wykazali po raz pierwszy w 1979 roku Schmidt i wsp. [85, 86] w otoczce wirusa pęcherzykowego zapalenia jamy ustnej (VSV) i wirusa *Sindbis*. Autorzy stwierdzili, że glikoproteiny  $E_1$  i  $E_2$  wirusa *Sindbis* oraz glikoproteina G VSV wiążą kwasy tłuszczowe, które są odporne na ekstrakcję rozpuszczalnikami organicznymi i/lub detergentami. Można je natomiast uwolnić z glikoprotein na drodze łagodnej hydrolizy metanolemowym roztworem KOH [85]. Wiązanie kwasów tłuszczowych przez glikoproteiny wirusów jest zjawiskiem szeroko rozpowszechnionym. Acylowanie glikoprotein stwierdzono bowiem zarówno w przypadku różnych wirusów, jak i różnych komórek gospodarzy użytych do pomnażania wirusa [87]. Wybiórcze acylowanie łańcuchów polipeptydowych obserwuje się także w białkach pochodzenia nie wirusowego np. bliżej niezidentyfikowanego białka o m.c.z. 20 000 w fibroblastach kurczęcia, w komórkach KB człowieka oraz w komórkach myelomy myszy [88]. Wykazano również specyficzne wiązanie kwasu palmitynowego z receptorem

transferyny w komórkach linii T wyprowadzonej z limfomy ludzkiej [89], z rodopsyną wołu [90] oraz z glikoforyną erytrocytów myszy [91].

Acylowanie jest procesem potranslacyjnym zachodzącym przypuszczalnie w błonach aparatu Golgiego [92, 93]. Wrażliwość acylowanych glikoprotein na łagodną hydrolizę alkaliczną oraz działanie hydroksylaminy [88, 89], a także skład aminokwasowy fragmentu łańcucha polipeptydowego związanego z błoną nasuwa przypuszczenie, że kwasy tłuszczowe wiążą się wiązaniem estrowym z resztami seryny łańcucha polipeptydowego tych białek. Wydaje się, że są acylowane fragmenty łańcucha polipeptydowego, które ulegają zasocjowaniu z warstwą lipidową błony.

Dotychczasowe dane doświadczalne pozwoliły na sformułowanie następujących hipotez na temat roli acylowanych glikoprotein [94]: 1) hipotezy tzw. „kotwicy”, 2) funkcjonalnego powiązania między kwasami tłuszczowymi a transportem i/lub procesem sortowania, 3) hipotezy fuzji. Hipoteza pierwsza przyjmuje, że kwasy tłuszczowe mogą stanowić rodzaj lipofilnej kotwicy utrzymującej cząsteczki acylowanych białek w warstwie lipidowej błon [87, 89, 95]. Przemawia za tym wysoka zawartość aminokwasów hydrofilowych we fragmentach łańcuchów polipeptydowych zasocjowanych z błoną. Wbudowywanie reszt acylowych w takie fragmenty mogłoby zwiększać hydrofobowość, a przez to ściślejsze powiązanie glikoproteiny z warstwą lipidową. Hipoteza ta nie tłumaczy jednak faktu, że wiele glikoprotein związanych z błonami nie ulega acylowaniu podczas biosyntezy [87, 89]. Druga hipoteza jest oparta na spostrzeżeniu, że zmiany w acylowaniu glikoprotein zahamowują wewnątrzkomórkowy transport białka z aparatu Golgiego do błony plazmatycznej [96]. Uważa się, że reszty acylowe stanowią sygnał dla transportu. Hipoteza ta nie wyjaśnia jednak tego faktu, że nie wszystkie białka transportowane i zatapiane w błonie ulegają acylowaniu. Trzecią hipotezę wysunięto na podstawie zdolności acylowanych glikoprotein pochodzenia wirusowego do indukowania fuzji błon. Tę właściwość wykazują np. białko F wirusa *Sendai*, HA<sub>2</sub> wirusa grypy i E<sub>2</sub> wirusa *Colona*, a także kwas olejowy, od dawna znany czynnik fuzogenny [97], obecny we frakcji kwasów tłuszczowych uwolnionych z glikoproteiny E<sub>1</sub> wirusa *Sindbis*. Która z hipotez okaże się najbliższa rzeczywistości wykażą dalsze badania. Na uwagę zasługuje fakt, że nie tylko integralne białka błon ale również białka sekrecyjne mogą ulegać acylowaniu [98]. Kowalencyjne dołączenie kwasów tłuszczowych może odgrywać pewną rolę w ich metabolizmie.

Glikoproteiny mogą ulegać również modyfikacji przez wprowadzenie w ich cząsteczki bardziej złożonych składników. Wykazano, że glikoproteina otoczki *Trypanosoma brucei* o m.c. 50 000—60 000, podlega serii niezwykłych modyfikacji potranslacyjnych [99]. Z C-końca tej glikoproteiny zostają usunięte aminokwasy hydrofobowe, a z  $\alpha$ -karboksylową grupą C-końcowego aminokwasu wiąże się wiązaniem amidowym glikolipid o nieznannej jeszcze strukturze, złożony z etanoloaminy, fosforanu,

cukrów, glicerolu i kwasu mirystynowego [100]. Szybkość z jaką zachodzi wbudowywanie glikolipidu przemawia za tym, że w tym procesie preformowany glikolipid zostaje w całości przeniesiony na łańcuch polipeptydowy. Przyjmuje się, że C-końcowy glikolipid zakotwicza glikoproteinę w błonie plazmatycznej przez pogrążenie się w dwumolekularnej warstwie lipidowej błony.

## V. Uwagi końcowe

Szereg białek ulega kontrtranslacyjnym i/lub potranslacyjnym modyfikacjom [101]. Dzięki nim białka uzyskują nowe własności i mogą w bardziej różnorodny sposób wpływać na procesy komórkowe. Modyfikacje kotranslacyjne takie jak glikozylacja łańcucha polipeptydowego z utworzeniem wiązania N-glikozyloaminowego oraz ograniczona proteoliza (ang. *limited proteolysis*) zachodzą w momencie, kiedy syntetyzowany łańcuch polipeptydowy jest jeszcze związany z rybosomami. Do modyfikacji potranslacyjnych należą m.in. glikozylacja prowadząca do utworzenia wiązania O-glikozydowego, częściowa proteoliza (ang. *partial proteolysis*) jak również fosforylacja, sulfurylacja i acylowanie. Ostatnio Lederkremer i Parodi [102] wykazali 3-O-metylację reszt mannozy w bogatych w mannozę łańcuchach oligosacharydowych glikoprotein grzyba *Mucor rouxii*. Oporność oligosacharydów na działanie  $\alpha$ -mannozydazy wykazuje, że reszty 3-O-metylowe mannozy znajdują się blisko nieredukującego końca lub są końcowymi monosacharydami słabo rozgałęzionych łańcuchów cukrowych. Brak reszt metylowych w cząsteczce prekursorowego tetradekasacharydu przemawia za tym, że metylacja reszt mannozy w cząsteczkach glikoproteiny grzyba jest potranslacyjną modyfikacją łańcuchów cukrowych. Rola biologiczna metylowanych oligosacharydów nie jest jeszcze znana. Z dotychczasowych danych wynika, że modyfikacje białek mogą modulować ich sekrecję, wewnątrzkomórkowy transport, procesy procesy endocytozy zachodzące z udziałem receptorów jak również procesy degradacji cząsteczek białek. Ostateczne wyjaśnienie funkcji biologicznej zmodyfikowanych glikoprotein dostarczą zapewne dalsze badania.

Zaakceptowano do druku 27 czerwca 1986 r.

## PIŚMIENNICTWO

1. Elting J. J., Chen W. W., Lennarz W. J., (1980), *J. Biol. Chem.*, **255**, 2325—2331.
2. Murphy L. A., Spiro R. G., (1981), *J. Biol. Chem.*, **256**, 7487—7494.
3. Chichi U., Lennarz W. J., (1977), *J. Biol. Chem.*, **252**, 7901—7904.
4. Kornfeld S., Li E., Tabas I., (1978), *J. Biol. Chem.*, **253**, 7771—7778.
5. Spiro R. G., Spiro M. J., Bhojroo V. D., (1979), *J. Biol. Chem.*, **254**, 7659—7667.

6. Grinna L. S., Robbins P. W., (1979), *J. Biol. Chem.*, **254**, 8814—8818.
7. Turco S. J., Robbins P. W., (1979), *J. Biol. Chem.*, **254**, 4560—4567.
8. Opheim D. J., Touster O., (1978), *J. Biol. Chem.*, **253**, 1017—1023.
9. Tabas I., Kornfeld S., (1979), *J. Biol. Chem.*, **254**, 11655—11663.
10. Forsee W. T., Schutzbach J., (1981), *J. Biol. Chem.*, **256**, 6577—6582.
11. Tulsiani D. R. P., Hubbard S. C., Robbins P. W., Touster O., (1982), *J. Biol. Chem.*, **257**, 3660—3668.
12. Bischoff J., Kornfeld S., (1983), *J. Biol. Chem.*, **258**, 7907—7910.
13. Kaplan A., Achord D. T., Sly W. S., (1977), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **74**, 2026—2030.
14. Sando G. N., Neufeld E. F., (1977), *Cell*, **12**, 619—627.
15. Ullrich K., Mersmann G., Weber E., von Figura K., (1978), *Biochem. J.*, **170**, 643—650.
16. von Figura K., Klein U., (1979), *Eur. J. Biochem.*, **94**, 347—354.
17. Distler J., Hieber V., Sahagian G., Schnickel R., Jourdian G. W., (1979), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **76**, 4235—4239.
18. Natowicz M. R., Chi M. M. Y., Lowry O. H., Sly W. S., (1979), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **76**, 4322—4326.
19. Hasilik A., Neufeld E. F., (1980), *J. Biol. Chem.*, **255**, 4946—4950.
20. Sly W. S., (1982), w: The glycoconjugates, red. Horowitz M. I., t. 4B, str. 3—25, Academic Press, New York.
21. Tabas I., Kornfeld S., (1980), *J. Biol. Chem.*, **255**, 6633—6639.
22. Hasilik A., Klein U., Waheed A., Strecker G., von Figura K., (1980), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **77**, 7074—7078.
23. Natowicz M., Baenziger J. U., Sly W. S., (1982), *J. Biol. Chem.*, **257**, 4412—4420.
24. Varki A., Kornfeld S., (1980), *J. Biol. Chem.*, **255**, 10847—10858.
25. Tarentino A. L., Maley F., (1974), *J. Biol. Chem.*, **249**, 811—817.
26. Tai T., Yamashino K., Kobata A. (1977), *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **78**, 434—441.
27. Kobata A., (1979), *Anal. Biochem.*, **100**, 1—14.
28. Varki A., Kornfeld S., (1983), *J. Biol. Chem.*, **258**, 2808—2818.
29. Hasilik A., Waheed A., von Figura K., (1981), *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **98**, 761—767.
30. Reitman M. L., Kornfeld S., (1981), *J. Biol. Chem.*, **256**, 4275—4281.
31. Varki A., Kornfeld S., (1980), *J. Biol. Chem.*, **255**, 8398—8401.
32. Waheed A., Pohlmann R., Hasilik A., von Figura K., (1981), *J. Biol. Chem.*, **256**, 4150—4152.
33. Pohlmann R., Waheed A., Hasilik A., von Figura K., (1982), *J. Biol. Chem.*, **257**, 5323—5325.
34. Goldberg D. E., Kornfeld S., (1983), *J. Biol. Chem.*, **258**, 3159—3165.
35. Waheed A., Hasilik A., von Figura K., (1982), *J. Biol. Chem.*, **257**, 12322—12331.
36. Waheed A., Hasilik A., Cantz M., von Figura K., (1982), *Z. Physiol. Chem.*, **363**, 169—178.
37. Berger E. G., Buddecke E., Kamerling J. P., Kobata A., Paulson J. C., Vliegenthart J. F. G., (1982), *Experientia*, **38**, 1129—1162.
38. Reitman M. L., Varki A., Kornfeld S., (1981), *J. Clin. Invest.*, **67**, 1574—1579.
39. Varki A., Kornfeld S., (1981), *J. Biol. Chem.*, **256**, 9937—9943.
40. Waheed A., Hasilik A., von Figura K., (1981), *J. Biol. Chem.*, **256**, 5717—5721.



41. Goldberg D. E., Kornfeld S., (1981), *J. Biol. Chem.*, **256**, 13060—13067.
42. Gabel C., Kornfeld S., (1982), *J. Biol. Chem.*, **257**, 10605—10612.
43. Dimond R. L., Burns R. A., Jordan K. B., (1981), *J. Biol. Chem.*, **256**, 6565—6572.
44. Freeze H. H., Miller A. L., Kaplan A., (1980), *J. Biol. Chem.*, **255**, 11081—11084.
45. Fisher H. D., Creek K. E., Sly W. S., (1982), *J. Biol. Chem.*, **257**, 9938—9943.
46. Freeze H. H., Yeh R., Miller A. L., Kornfeld S., (1983), *J. Biol. Chem.*, **258**, 14874—14879.
47. Gabel Ch. A., Costello C. E., Reinhold V. N., Kurz L., Kornfeld S., (1984), *J. Biol. Chem.*, **259**, 13762—13769.
48. Freeze H. H., Wolgast D., (1985), 13-th Inter. Congress Biochem., Abstr. TH-154, str. 483, Amsterdam.
49. Freeze H. H., Yeh R., Miller A. L., Kornfeld S., (1983), *J. Biol. Chem.*, **258**, 14880—14884.
50. Free S. J., Schimke R. T., Freeze H., Loomis W. F., (1978), *J. Biol. Chem.*, **253**, 4102—4106.
51. Free S. J., Schimke R. T., (1978), *J. Biol. Chem.*, **253**, 4107—4111.
52. Yamamoto K., Tsuji T., Tarutani O., Osawa T., (1984), *Eur. J. Biochem.*, **143**, 133—144.
53. Yamamoto K., Tsuji T., Tarutani O., Osawa T., (1985), *Biochim. Biophys. Acta*, **838**, 84—91.
54. Chen T. T., Bazer F. W., Cetorelli J. J., Pollard W. E., Roberts R. M., (1973), *J. Biol. Chem.*, **248**, 8560—8566.
55. Buhi W. C., Ducsay C. A., Bazer F. W., Roberts R. M., (1982), *J. Biol. Chem.*, **257**, 1712—1721.
56. Schlosnagle D. C., Bazer F. W., Tsibris J. C. M., Roberts R. M., (1974), *J. Biol. Chem.*, **249**, 7574—7579.
57. Schlosnagle D. C., Sander E. G., Bazer F. W., Roberts R. M., (1976), *J. Biol. Chem.*, **251**, 4680—4685.
58. Davis J. C., Lin S. S., Averill B. A., (1981), *Biochemistry*, **20**, 4062—4067.
59. Saunders P. T. K., Renegar R. H., Raub T. J., Baumbach G. A., Atkinson P. H., Bazer F. W., Roberts R. M., (1985), *J. Biol. Chem.*, **260**, 3658—3665.
60. Baumbach G. A., Saunders P. T. K., Bazer F. W., Roberts R. M., (1984), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **81**, 2985—2989.
61. Sahagian G. G., Gottesman M. M., (1982), *J. Biol. Chem.*, **257**, 11145—11150.
62. Margolis R. K., Margolis R. V., (1970), *Biochemistry*, **9**, 4389—4396.
63. Lemkin M. C., Farquhar M. G., (1981), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **78**, 1726—1730.
64. Heifetz A., Kinsey N. H., Lennarz W. J., (1980), *J. Biol. Chem.*, **255**, 4528—4534.
65. Heifetz A., Snyder J. M., (1981), *J. Biol. Chem.*, **256**, 4957—4967.
66. Heifetz A., Allen D., (1982), *Biochemistry*, **21**, 171—177.
67. Heifetz A., Watson Ch., Johnson A. R., Roberts M. K., (1982), *J. Biol. Chem.*, **257**, 13581—13586.
68. Heifetz A., Lennarz W. J., (1979), *J. Biol. Chem.*, **254**, 6119—6127.
69. Bhavanandan V. P., (1981), *Biochemistry*, **20**, 5595—5602.
70. Wilson B. S., Ruberto G., Ferrone S., (1981), *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **101**, 1047—1051.

71. Parsons T. F., Pierce J. G., (1980), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **77**, 7089—7093.
72. Bedi G. S., French W. C., Bahl O. P., (1982), *J. Biol. Chem.*, **257**, 4345—4355.
73. Green E. D., Gruenebaum J., Bielińska M., Baenziger J. U., (1984), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **81**, 5320—5324.
74. Yamashita K., Ueda I., Kobata A., (1983), *J. Biol. Chem.*, **258**, 14144—14147.
75. Edge A. S. B., Spiro R. G., (1984), *J. Biol. Chem.*, **259**, 4710—4713.
76. Nakamura K., Compans R. W., (1978), *Virology*, **14**, 303—319.
77. Prehm P., Scheid A., Choppin P. W., (1979), *J. Biol. Chem.*, **254**, 9669—9677.
78. Merkle R. K., Elbein A. D., Heifetz A., (1985), *J. Biol. Chem.*, **260**, 1083—1089.
79. Robbins P. W., Lipmann F., (1958), *J. Biol. Chem.*, **233**, 681—685.
80. Robbins P. W., Lipmann F., (1958), *J. Biol. Chem.*, **233**, 686—691.
81. Sommers L. W., Hirschberg C. B., (1982), *J. Biol. Chem.*, **257**, 10811—10817.
82. Schwarz J. K., Capasso J. M., Hirschberg C. B., (1984), *J. Biol. Chem.*, **259**, 3554—3559.
83. Capasso J. M., Hirschberg C. B., (1984), *J. Biol. Chem.*, **259**, 4263—4266.
84. Capasso J. M., Hirschberg C. B., (1984), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **81**, 7051—7055.
85. Schmidt M. F. G., Bracha M., Schlesinger M. J., (1979), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **76**, 1687—1691.
86. Schmidt M. F. G., Schlesinger M. J., (1979), *Cell*, **17**, 813—819.
87. Schmidt M. F. G., (1982), *Virology*, **116**, 327—338.
88. Schlesinger M. J., Magee A. I., Schmidt M. F. G., (1980), *J. Biol. Chem.*, **255**, 10021—10024.
89. Omary B. M., Trowbridge I. S., (1981), *J. Biol. Chem.*, **256**, 4715—4718.
90. O'Brien J. J., Zatz M., (1984), *J. Biol. Chem.*, **259**, 5054—5057.
91. Dolci E. D., Palade G. E., (1985), *J. Biol. Chem.*, **260**, 10728—10735.
92. Schmidt M. F. G., Schlesinger M. J., (1980), *J. Biol. Chem.*, **255**, 3334—3339.
93. Dunpy W. G., Fries E., Urbani J. J., Rothman J. E., (1981), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **78**, 7453—7457.
94. Schmidt M. F. G., (1982), *Trends Biochem. Sci.*, **7**, 322—324.
95. Rice C. M., Bell J. R., Hunkapiller M. W., Strauss E. G., Strauss J. H., (1981), *J. Mol. Biol.*, **154**, 355—378.
96. Zilberstein A., Schneider M., Paster M., Lodish H. F., (1980), *Cell*, **21**, 417—427.
97. Ahkong Q. F., Fisher D., Tampion W., Lucy J. A., (1973), *Biochem. J.*, **136**, 147—155.
98. Hoeg J. M., Meng M. S., Ronan R., Fairwell T., Brewer H. B., (1986), *J. Biol. Chem.*, **261**, 3911—3914.
99. Bangs J. D., Hereld D., Krakow J. L., Hart G. W., Englund P. T., (1985), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **82**, 3207—3211.
100. Holder A. A., (1983), *Biochem. J.*, **209**, 261—262.
101. Moore B. R., Free S. J., (1985), *Int. J. Biochem.*, **17**, 283—289.
102. Lederkremer G. Z., Parodi A. J., (1984), *J. Biol. Chem.*, **259**, 12514—12518.

MAGDALENA RUCKA \*, TOMASZ WINNICKI \*\*, JANUSZ S. ŻUK \*\*\*

## Membrany (błony) enzymatyczne

### Enzyme membranes

#### Spis treści

- I. Wstęp
- II. Procesy membranowe
- III. Membrany jako narzędzia w biotechnologii
- IV. Immobilizacja enzymów z użyciem membran ultrafiltracyjnych
  - IV-1. Metody fizyczne
  - IV-2. Metody chemiczne

#### Contents

- I. Introduction
- II. Membrane processes
- III. Membranes — a tool in biotechnology
- IV. Enzyme immobilization using ultrafiltration membranes
  - IV-1. Physical
  - IV-2. Chemical

### I. Wstęp

Jesteśmy obecnie świadkami szybkiego postępu w dziedzinie wykorzystania przez przemysł osiągnięć nauk podstawowych, takich jak: biochemia, mikrobiologia, genetyka. Spowodowało to zwiększenie zainteresowania ośrodków naukowych badaniami, które znajdują zastosowania przemysłowe. Do takich niewątpliwie zalicza się tematyka związana ze sztucznymi membranami enzymatycznymi oraz reaktorami membranowymi.

Błona biologiczna stanowi barierę selektywnie przepuszczającą jedne, a zatrzymującą inne składniki roztworów uczestniczące w metabolizmie komórkowym organizmów roślinnych i zwierzęcych.

---

\* Dr, Instytut Chemii Organicznej i Fizycznej Politechniki Wrocławskiej, Wybrzeże Wyspiańskiego 27, 50-370 Wrocław, \*\* Prof. dr hab. inż., Instytut Inżynierii Ochrony Środowiska Politechniki Wrocławskiej, Wybrzeże Wyspiańskiego 27, 50-370 Wrocław, \*\*\* Dr inż., Politechnika Rzeszowska, ul. W. Pola 2, 35-959 Rzeszów

Dzięki zaawansowaniu badań mikrobiologicznych i biochemicznych można dziś precyzyjnie określić przynajmniej większość funkcji transportowych i separacyjnych błon naturalnych. Jak w wielu innych znanych przypadkach w rozwoju techniki, również w tym przypadku, poznanie struktury błon biologicznych i związanej z nią fenomenologii zjawisk biegnących przy ich udziale pozwoliło na syntezę odpowiednich sztucznych materiałów błonotwórczych i rozwój technik ich formowania w membrany.

Termin „membrany” jest dziś w polskiej nomenklaturze technicznej synonimem błon sztucznych czy syntetycznych i jednoznacznie odróżnia je od błon naturalnych czy biologicznych, nie powinien być zatem eliminowany z biologicznej literatury specjalistycznej.

Stosowanie terminu membrana nie ma jedynie waloru semantycznego. Struktura błon sztucznych czy syntetycznych różni się w sposób istotny od struktury swego pierwowzoru, również w przypadku tzw. homogennych membran o wysokim stopniu uporządkowania cząstek polimeru.

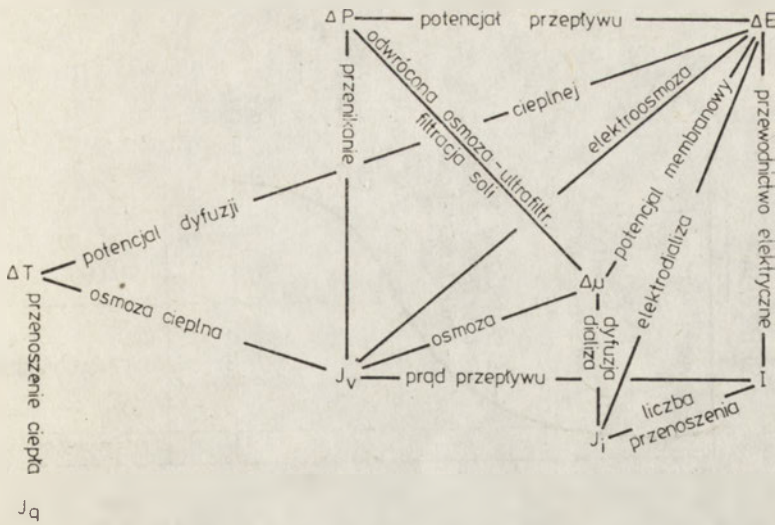
Przy tworzeniu sztucznego materiału membranowego należy wyraźnie rozgraniczać dwa stadia — syntezę materiału błonotwórczego i jego preparowanie w celu wytworzenia formy użytkowej membrany. W niektórych przypadkach wytworzenie membrany ogranicza się do procesu jednoetapowego. O roboczych formach membran będzie jeszcze mowa.

Wreszcie należy zauważyć, że zakres znaczeniowy terminu „membrana sztuczna” jest szerszy od „membrana syntetyczna”, gdyż mieszczą się w nim obok organicznych membran polimerowych również membrany mineralne — szklane czy ceramiczne — oraz inne potencjalne materiały membranowe.

Istotnego znaczenia technicznego nabierają również układy emulsyjne, np. woda—olej—woda czy olej—woda—olej, nazywane membranami ciekłymi. W takim międzyfazowym układzie zachodzą interesujące procesy transportowe, w których główną rolę odgrywa gradient aktywności chemicznych.

Problem gradientów, jako siły motorycznej wszystkich procesów membranowych, wymaga również krótkiego omówienia. Najczęściej stosowane techniczne procesy membranowe wykorzystują takie zjawiska jak: różnicę ciśnień (mikrofiltracja, ultrafiltracja, odwrócona osmoza czyli hiperfiltracja), różnicę potencjału elektrycznego (elektrodializa, elektroosmoza), różnicę aktywności chemicznych czyli stężeń (dializa Donnana, ciekłe membrany), różnicę ciśnienia parcjalego par wynikającą z gradientu temperatur (destylacja membranowa, perwaporacja) [1], (Ryc. 1).

Techniczny sens wielu procesów membranowych wynika jednak również, a może przede wszystkim, ze swoistych, specyficznych własności materiału membranowego. Pod tym względem można wyróżnić dwa główne mechanizmy transportowo-separacyjne. Pierwszy z nich związany jest z budową przestrzenną materiału membranowego, nadającą mu własności sita, w skrajnie subtelnym wymiarze — sita molekularnego, przepuszcza-



Ryc. 1. Siły motoryczne procesów membranowych

jącego cząstki mniejsze, a zatrzymującego większe, tak na poziomie roztworu rzeczywistego jak też układów koloidalnych czy makrozawiesinowych.

Drugi mechanizm jest znacznie bardziej skomplikowany i wiąże się z wbudowaniem do materiału membranowego specyficznych układów o własnościach jonowymiennych, katalitycznych, redoksowych, półprzewodnikowych, mikrobiologicznych w tym enzymatycznych i innych. W takim układzie membrana poza spełnieniem funkcji separacyjno-transportowych jest również nośnikiem układów czynnych odpowiedzialnych za bieg odpowiednich reakcji chemicznych, biochemicznych i fizycznych.

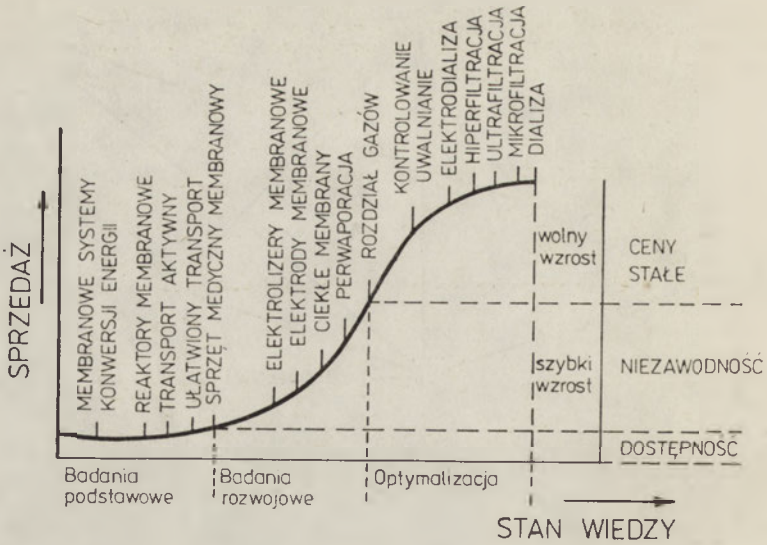
## II. Procesy membranowe

W dążeniu do konkretnego celu technologicznego niezbędne jest uwzględnienie dwóch podstawowych kryteriów: siły napędowej procesu (występującego gradientu, o którym już była mowa) oraz natury rozdzielanych składników.

Jeżeli chodzi o własności cząstek rozdzielanych przez membranę to na wybór i przebieg procesu najistotniejszy wpływ mają takie ich cechy jak:

- wielkość i ruchliwość,
- podatność na hydratację, solwatację lub inne formy aglomeracji,
- stan dysocjacji, jonizacji czy inna forma czynności elektrycznej,
- specyficzne własności chemiczne, a wśród nich: „agresywność”

w stosunku do materiału membrany lub blokowanie jej powierzchni czy porów, niestabilność w dynamicznych warunkach operacji membranowej.



Ryc. 2. Stan zaawansowania badań nad procesami membranowymi oraz światowy rynek urządzeń wykorzystujących te procesy

Potencjalne możliwości zastosowania określonej operacji membranowej nie są jeszcze jednoznaczne z techniczną dyspozycyjnością danego procesu. Zakorzenione już w praktyce i rozwinięte techniki: odwrócona osmoza i elektrodializa, dzięki dobrze opanowanej preparatyce membran i oprzyrządowaniu przemysłowemu, są szeroko stosowane w różnych dziedzinach. W niektórych konkretnych przypadkach te zastosowania wynikają bardziej z dyspozycyjności danej techniki membranowej niż z warunków procesu. W takich wypadkach znajdują swą szansę nowe, mniej jeszcze rozwinięte operacje membranowe, przy których proces biegnie z lepszymi wydajnościami i przy lepszym bilansie energetycznym. Pojawia się też duża grupa procesów, które nie były możliwe do realizacji bez zastosowania nowych technik membranowych. Aktualny stan rozwoju poszczególnych technik membranowych zawarty jest w opracowaniu Drioli [2] i schematycznie przedstawiony na rycinie 2. Ukazuje on stan technicznego zaawansowania poszczególnych operacji membranowych mierzony wielkością sprzedaży poszczególnych systemów i ich niezawodnością. Widoczne jest, że najbardziej zaawansowane są takie, konwencjonalne już procesy membranowe, jak: dializa, mikrofiltracja, ultrafiltracja, hiperfiltracja (odwrócona osmoza) i elektrodializa. Prace badawcze w zakresie tej grupy metod sprowadzają się głównie do optymalizacji procesu. Popyt na urządzenia tego typu zaczyna się stabilizować. Druga grupa operacji wykorzystuje takie procesy, jak kontrolowane uwalnianie, separacja gazowa, perwaporacja, ciekłe membrany, membranowe elektrody i elektrolizery. Tu sprzedaż systemów jest globalnie znacznie niższa, a dynamika sprzedaży dużo więk-

sza. Metody te odznaczają się wystarczającą już niezawodnością. Badania dotyczą głównie prac rozwojowych. Wreszcie trzecia grupa operacji wykorzystuje: ułatwiony transport, transport aktywny, reaktory membranowe, membranowy sprzęt medyczny inny niż sztuczna nerka, membranowe systemy konwersji energii. Techniki te nie wyszły jeszcze w większości z fazy badań podstawowych, są już jednak rynkowo osiągalne, lecz ich ogólna sprzedaż jest mała.

### III. Membrany jako narzędzia w biotechnologii

W dwu ciśnieniowych procesach membranowych, jak hiperfiltracja i ultrafiltracja, stosuje się bardzo zbliżony typ materiału membranowego oraz urządzeń technicznych. Różni je zasadniczo zakres stosowanych ciśnień roboczych przy hiperfiltracji o rząd wyższy oraz molekularny poziom rozdziału cząstek rozpuszczonych czy zawieszonych.

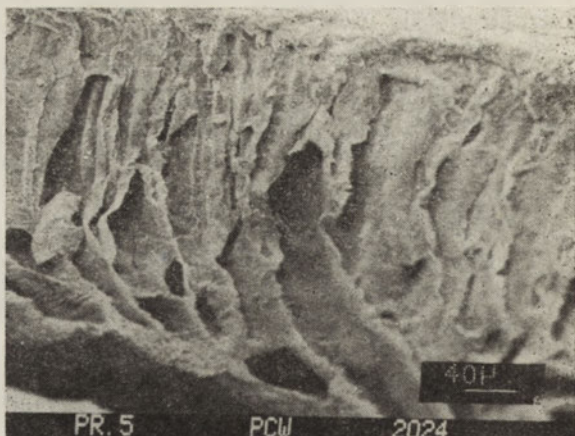
Hiperfiltracja polega na przepuszczeniu wody, a zatrzymaniu wszystkich pozostałych cząstek roztworu rzeczywistego. Jeżeli są to cząstki soli, to w roztworze panuje ciśnienie osmotyczne proporcjonalne do stężenia roztworu i aby spowodować przepływ rozpuszczalnika od roztworu stężonego do rozcieńczonego, należy przyłożyć ciśnienie przewyższające różnicę ciśnień osmotycznych. Stąd też inna nazwa tego procesu brzmi: odwrócona osmoza. Zazwyczaj stosuje się ciśnienia robocze wynoszące kilka MPa (kilkadziesiąt atmosfer).

W trakcie ultrafiltracji przepuszczany jest rozpuszczalnik oraz cząstki soli, a zatrzymywane większe cząstki organiczne. Ciśnienie osmotyczne nie wywiera tutaj znaczącego wpływu na przebieg procesu i stąd ciśnienia robocze nie przekraczają 0,2 do 0,5 MPa (2 do 5 atm).

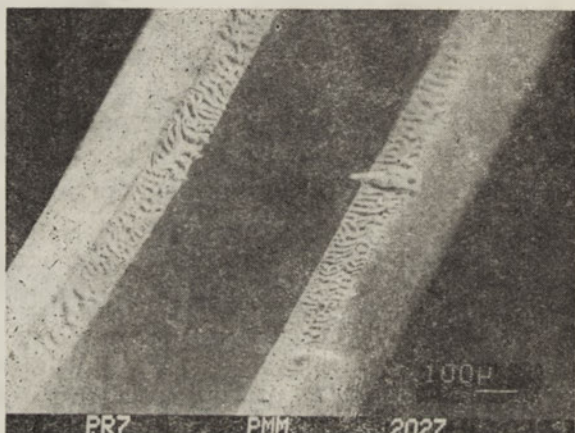
Pierwszym materiałem błonotwórczym zastosowanym z powodzeniem do hiper- i ultrafiltracji były wielooctany celulozy, które nadal są najszerszej stosowane do odsalania i uzdatniania wody, zwłaszcza metodą ultrafiltracji. Stosowano też wiele innych polimerów, w tym najczęściej poliamidy, a ostatnio polisulfony.

Najlepsze efekty filtracyjne osiągnięto przy użyciu tzw. membran asymetrycznych (ryc. 3), w których mikroporowaty materiał membrany, stanowiący ponad 90% jej przekroju, pokrywa cienka warstewka, tzw. „skórka”, utworzona z tego samego polimeru, lecz o znacznie subtelniejszej porowatości. To w tej właśnie warstwie uzyskuje się właściwy efekt sita molekularnego, a pozostały przekrój membrany spełnia funkcje nośnika nadającego jej kształt i wytrzymałość. Rurkową membranę symetryczną (tzn. bez wyróżnicowanej skórki) przedstawia rycina 4.

Charakteryzując rozwiązania aparaturowe można wyróżnić co najmniej pięć grup systemów operacyjnych, które stosowane są w hiper- i ultrafil-



**Ryc. 3.** Przekrój poprzeczny przez płaską membranę ultrafiltracyjną o strukturze asymetrycznej



**Ryc. 4.** Membrana ultrafiltracyjna w postaci mikrorurki. Wycięty fragment ścianki ukazuje symetryczną strukturę porów

tracji i wiążą się z kształtem jaki nadano materiałowi membranowemu. Są to:

a) system płytowo-ramowy, w którym stosuje się płaskie arkusze membran; stracił on znaczenie w technologiach odsalania, ale ma i może mieć rosnące znaczenie przy ultrafiltracji, w tym w reaktorach membranowych,

b) system modułów spiralnych, w którym stosuje się również membrany płaskie w postaci zrolowanej, co powoduje, że działa podobnie jak:

— system rurowy, zbudowany z rur nośnych z materiału porowatego pokrytych wewnątrz właściwą membraną,

— system mikrorurkowy, zwany też czasem kapilarnym lub „spagetti”, złożony z pęku mikrorurek we wspólnej obudowie,



— system włókien kapilarnych, również pracujących w pękach.

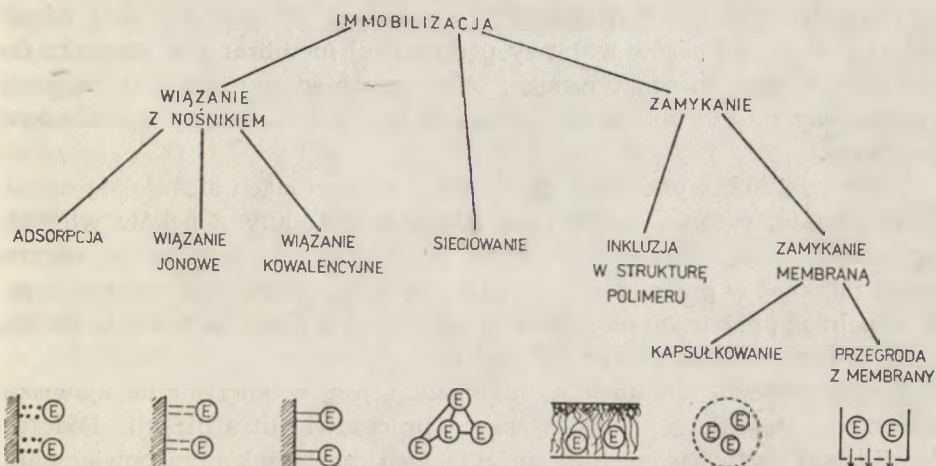
Nie wchodząc w szczegóły operacyjne można tylko stwierdzić, że każdy z wymienionych systemów ma określone wady i zalety, stąd optymalne ich stosowania wiążą się z różnymi procesami i warunkami, w których biegają.

Śród komercyjnie dostępnych membran najlepiej spełniają wymagania technologiczne membrany ultrafiltracyjne, tak w formie arkuszy, jak i też rurowej.

Arsenał środków jakimi dysponuje dziś technologia polimerów i preparatyka membran pozwala jednak również na tworzenie materiału membranowego specjalnie przeznaczonego do pełnienia określonych zadań w bioreaktorach.

#### IV. Immobilizacja enzymów z użyciem membran ultrafiltracyjnych

Unieruchamianie enzymów lub całych komórek jest od dawna przedmiotem licznych badań. Pierwsze prace nad enzymami unieruchomionymi przy pomocy membran miały na celu modelowanie warunków i struktur wewnątrzkomórkowych [3, 4]. Rosnące zainteresowanie immobilizowanymi enzymami wiąże się obecnie przede wszystkim z zastosowaniami przemysłowymi. Ocenia się bowiem, że technika ta doprowadzi do znacznego obniżenia kosztów procesów biotechnologicznych. W skali produkcyjnej immobilizowane enzymy można stosunkowo łatwo odzyskiwać lub stosować je w metodach ciągłych. Immobilizacja polega bądź na związaniu białka enzymatycznego ze stałym nośnikiem, bądź też na zamknięciu enzymu w ograniczonej przestrzeni. Schemat sposobów immobilizacji podany jest na rycinie 5.



Ryc. 5. Sposoby immobilizacji enzymów

Nośnik, z którym enzym jest związany może być uformowany w różny sposób. Najczęściej są to kulki, mogą to być również płaskie membrany, rurki lub mikrorurki. W zastosowaniach przemysłowych membrany o właściwościach katalitycznych umożliwiają połączenie rozdziału składników mieszaniny reakcyjnej z samą reakcją. Obszerny wykaz prac na temat płaskich membran oraz rurek i mikrorurek z immobilizowanymi enzymami znaleźć można w książce Chibaty [5].

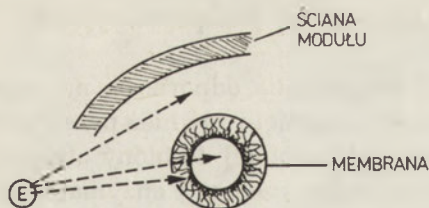
#### IV-1. Metody fizyczne

Na wstępie wspomniano o tym, że unieruchomienie enzymu można osiągnąć przez fizyczne zamknięcie w pewnej, określonej przestrzeni. Można to uzyskać w dwojaki sposób. Mieszanina reakcyjna zawierająca enzym może być zamknięta w przestrzeni ograniczonej membraną albo enzym może być zamknięty w strukturze polimeru tworzącego membranę. W pierwszym przypadku membrana stanowi ściany lub jedną ze ścian reaktora. Do tego celu wykorzystuje się membrany o tak dobranych wielkościach porów, aby nie przepuszczały danego enzymu.

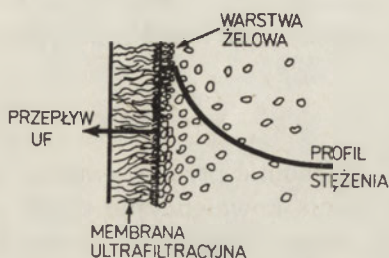
Wprowadzenie enzymu w strukturę membrany może mieć miejsce w czasie jej wytwarzania lub też po jej uformowaniu. Najbardziej rozpowszechnioną metodą produkcji membran UF jest wylewanie ich z roztworu polimeru. Chcąc wprowadzić enzym w strukturę membrany dodaje się go do roztworu, z którego wytwarza się membranę. Ten sposób immobilizacji jest najczęściej stosowany w przypadku membran z octanu celulozy [6, 7]. Warunki w jakich uzyskuje się membrany z innych polimerów, a szczególnie rozpuszczalniki materiału membranowego, mogą powodować denaturację białka. Wprowadzenie enzymu do gotowej membrany odbywa się przez filtrowanie roztworu zawierającego enzym przez asymetryczną membranę w kierunku odwrotnym do normalnego przepływu ultrafiltracyjnego. Ten sposób immobilizacji wymaga dobrania odpowiedniej wielkości porów warstwy podporowej membrany w stosunku do wielkości białka enzymatycznego. Aby zapobiec wymywaniu enzymu z membrany można dodatkowo stosować czynnik sieciujący np. aldehyd glutarowy.

We wszystkich wymienionych do tej pory metodach stosuje się membrany płaskie, rurowe lub włókna kapilarne. Moduły z pęków włókien kapilarnych dają jeszcze dodatkowe możliwości immobilizacji; enzym można zamknąć w przestrzeni wewnątrz włókien, roztworem enzymu można wypełniać przestrzeń na zewnątrz włókien lub może on tkwić w strukturze samych membran (Ryc. 6).

Innym prostym sposobem immobilizacji jest wykorzystanie zjawiska polaryzacji stężeniowej towarzyszącej procesowi ultrafiltracji. Podczas ultrafiltracji roztworu enzymu stężenie jego cząsteczek przy powierzchni membrany może być na tyle duże, że wytworzona w ten sposób warstwa



Ryc. 6. Możliwości immobilizacji enzymu za pomocą modułu z mikrorurek



Ryc. 7. Schemat powstawania zjawiska polaryzacji stężeniowej

uzyskuje strukturę żelu. Zjawisko to jest schematycznie przedstawione na rycinie 7.

Badaniami nad immobilizacją enzymów przez tzw. „żelowanie” zajmuje się od wielu lat Uniwersytet w Neapolu [8, 9, 10]. Początkowo badano tam żelowanie czystego białka enzymatycznego — kwaśnej fosfatazy i  $\beta$ -glukozydazy na powierzchni membran z octanu celulozy. W dalszych pracach stosowano również inne substancje jako środki wspomagające proces żelowania białka enzymatycznego oraz inkludowano enzymy w żelach tworzonych przez białka nieaktywne. Prowadzono też prace nad sprzęganiem (przed ultrafiltracją) enzymu z albuminą surowicy krwi przy pomocy aldehydu glutarowego [11]. Warstewka żelu zawierającego enzym osiągała grubość około 0,005 cm. Stosowano też żelowanie białka enzymatycznego wraz z długołańcuchowymi polimerami — Separanem, dextranem lub CM-celulozą [12]. Immobilizowana tą techniką fosfataza kwaśna wykazywała dobrą odporność na denaturację termiczną i naprężenia ścinające [13]. Ostatnio technikę żelowania zastosowano również do unieruchamiania enzymu jabłczanowego (E.C.1.1.1.40) i spośród kilku innych wytypowano ją jako metodę najlepszą do praktycznego wykorzystania [14].

W omawianych wyżej badaniach uzyskano żel, który wykazuje dobrą wytrzymałość na naprężenia ścinające wywołane przepływem cieczy nad powierzchnią membrany. Można sądzić, że stosowany polimer nie miał istotnego wpływu na aktywność enzymatyczną. Przy tej metodzie immobilizacji pozorny spadek aktywności właściwej enzymu (w stosunku do aktywności enzymu swobodnego) spowodowany prawdopodobnie oporami

transportu substratu i produktu, jest porównywalny z innymi metodami immobilizacji.

Efekt stabilizacji i zwiększenia odporności na zrywanie podczas mieszania i przepływu cieczy osiągnięto również przez utworzenie błony z inkludowanym enzymem [11] podobnej do błony otrzymywanej przez odparowanie roztworu białka nieaktywnego i enzymatycznego [15]. Metoda ta zasługuje na uwagę zwłaszcza dlatego, że jest wyjątkowo prosta i łatwa do stosowania nawet wtedy, gdy dysponuje się tylko stosunkowo prymitywnym urządzeniem do ultrafiltracji. Technika ta daje też możliwości tworzenia układów wieloenzymatycznych, które brane są obecnie pod uwagę, jako te, które mogą zastąpić immobilizowane komórki.

#### IV-2. Metody chemiczne

Enzym można także uruchomić przez chemiczne związanie z materiałem polimerycznym. Wiązania kowalencyjne silnie wiążą enzym z membraną, lecz równocześnie mogą powodować zmiany konformacji centrum aktywnego dając w efekcie obniżenie lub zanik aktywności enzymu, niezależnie od możliwości powstania ograniczeń przestrzennych i wynikającego z nich utrudnionego dostępu substratu do centrum aktywnego. Bardzo często enzymy immobilizuje się w membranach z octanu celulozy. Jest to konsekwencją faktu, że octan celulozy jest surowcem, z którego wytwarza się membrany ultrafiltracyjne, z drugiej zaś strony celuloza i jej pochodne są dobrymi nośnikami przy immobilizacji enzymów. Na popularność celulozy złożyło się kilka przyczyn, między innymi niska cena, duża hydrofilność, prostota syntezy różnego rodzaju pochodnych. Związanie enzymu z celulozą przeprowadza się na ogół stosując wielofunkcyjne, niskocząsteczkowe związki sprzęgające takie, jak aldehyd glutarowy, tróchlorkek triazyny, CNBr i inne [16]. Pomimo dużego rozpowszechnienia nośniki celulozowe mają kilka dotkliwych wad, z których najważniejszą jest podatność na rozkład pod wpływem mikroorganizmów. Celuloza ma silne własności sorpcyjne w stosunku do białka, a więc po procesie immobilizacji do usunięcia nadmiaru białka trzeba stosować roztwory o wysokiej sile jonowej, co w przypadku enzymów oligomerycznych prowadzić może do ich dysocjacji.

Innym tworzywem, które jest wykorzystywane do produkcji membran ultrafiltracyjnych, a równocześnie służy jako nośnik do immobilizacji enzymów jest poliamid. Tworzywa poliamidowe aktywuje się przez chemiczne odblokowanie grup aminowych [19], między innymi przez kwaśną hydrolizę. Immobilizacja enzymu następuje w wyniku sprzęgania aldehydem glutarowym [17, 18].

Kolejnym tworzywem, które ostatnio coraz powszechniej służy do produkcji membran jest polisulfon. Tworzywo to nie nadaje się do bezpośredniego wiązania enzymu ze względu na brak odpowiednich grup funkcyj-

nych, a modyfikacje chemiczne pogarszają własności ultrafiltracyjne membrany [20]. Staude i in. [20, 21, 22] otrzymali membranę polisulfonową o dobrych własnościach ultrafiltracyjnych, która równocześnie dawała możliwość kowalencyjnego wiązania enzymu. Były to membrany heterogenne, których matrycę stanowił polisulfon, natomiast wprowadzony do roztworu, z którego wylewano membranę, eter poliarylowy z odpowiednimi podstawnikami, umożliwiał wiązanie enzymu.

Rozwój chemii tworzyw sztucznych stwarza niewątpliwie nowe perspektywy chemicznej immobilizacji enzymów i produkcji doskonalszych membran ultrafiltracyjnych. Należy jednak pamiętać, że fizyczna immobilizacja może mieć również szerokie zastosowanie, zarówno w badaniach laboratoryjnych, jak i w przemyśle. Unika się wtedy niebezpieczeństwa częściowej dezaktywacji enzymu w wyniku zmian chemicznych i strukturalnych w obrębie centrum aktywnego. Zmiany te w większym stopniu wpływają na aktywność enzymu niż ograniczenie przestrzenne spowodowane wbudowaniem enzymu w strukturę membrany [16].

Zaakceptowano do druku 15 sierpnia 1986 r.

## PIŚMIENNICTWO

1. Winnicki T., (1972), w: Zjawiska towarzyszące transportowi wody przez membrany osmotyczne i jonowymienne w procesach ultrafiltracji i elektrodializy. Pr. Nauk. Inst. Inż. Chem. Politechniki Wrocławskiej, 13, 14—21, Wrocław.
2. Drioli E., Nakagaki M., (1984), w: Scientific and Industrial Membrane Development, 65—80, Progetto Finalizzato Chimica Fine e Secondaria, C.N.R. Stresa.
3. Goldman R., Kedem O., Katchalski E., (1968), *Biochemistry*, 7, 4518—4523.
4. Boguslaski R. C., Blaedel W. J., Kissel T. R., (1974), w: Insolubilized Enzymes, red. Salmons M., Saronio G., Garattini S., 87—112, Raven Press, New York.
5. Chibata I., (1978), w: Immobilized Enzymes, 62—68, John Wiley, New York.
6. Strathmann H., (1985), *Trends Biotechnol.*, 3, 112—118.
7. Hartmeier W., (1985), *ibid*, 3, 149—153.
8. Drioli E., Gianfreda L., Palescandolo R., Scardi V., (1975), *Biotechnol. Bioeng.*, 17, 1365—1367.
9. Capobianco G., Drioli E., Ragosta G., (1977), *J. Solid Phase Biochem.*, 2, 315—328.
10. Drioli E., Scardi V., (1976), *J. Membr. Sci.*, 1, 237—248.
11. Gianfreda L., Greco Q., (1981), *Biotechnol. Lett.*, 3, 33—38.
12. Greco Q., Gianfreda L., (1981), *Biotechnol. Bioeng.*, 22, 801—813.
13. Alfani F., Albanesi D., Cantarella M., Scardi V., (1982), *Enzyme Microb. Technol.*, 4, 181—184.
14. Iorio G., Catapano G., Drioli E., Rossi M., Rella M., (1985), *J. Membr. Sci.*, 22, 317—324.
15. Trevan M. D., (1980), w: Immobilized Enzymes, 203—205, John Wiley, New York.

16. Iorio G., (1985), w: 1st International School on Artificial Membranes, Winnicki T., Mike A. (red.) Wydawnictwo Politechniki Wrocławskiej, Wrocław.
17. Inman D. J., Hornby W. E., (1972), *Biochem. J.*, **129**, 255—258.
18. Velicangil O., Howell J. A., (1977), *Biotechnol. Bioeng.*, **19**, 1891—1894.
19. Ginman R., Collis J. S., Knox J. M., (1983), *Appl. Biochem. Biotechnol.*, **8**, 213—226.
20. Staude E., Jorisch W., (1981), *Angew. Makromol. Chem.*, **96**, 21—36.
21. Ansorge W., Staude E., (1983), *Angew. Makromol. Chem.*, **119**, 105—123.
22. Ansorge W., Staude E., (1985), *J. Membr. Sci.*, **22**, 283—295.

MAGDALENA RUCKA \*, JANUSZ S. ŻUK \*\*, TOMASZ WINNICKI \*\*\*

## Enzymatyczne reaktory membranowe

### Enzyme Membrane Reactors

#### *Spis treści*

- I. Typy reaktorów membranowych
- II. Kinetyka reakcji w różnych układach modelowych
  - II-1. Reaktor z włókien kapilarnych
  - II-2. Membrana z inkludowanym enzymem
  - II-3. Warstwa żelowa na powierzchni membrany
- III. Zastosowanie enzymatycznych reaktorów membranowych

#### *Contents*

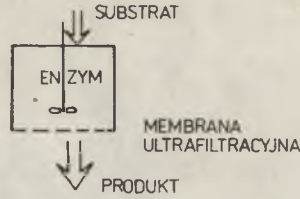
- I. Types of membrane reactors
- II. Kinetics of different systems
  - II-1. Hollow-fibre reactor
  - II-2. Membrane with entrapped enzyme
  - II-3. Gel layer on the membrane surface
- III. Application of the enzyme membrane reactors

### I. Typy reaktorów membranowych

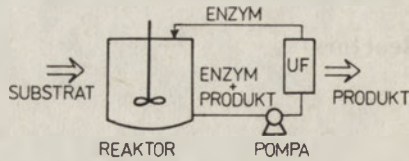
Poprzedni nasz artykuł dotyczył enzymatycznych membran [1]. Obecnie chcemy się zająć reaktorami, których częścią składową są sztuczne membrany ultrafiltracyjne. Membranę taką można wykorzystać jako pół-przepuszczalną przegrodę zatrzymującą cząstki większe od wymiaru porów. Można ją zatem zastosować jako przegrodę zamykającą (immobilizującą) enzym w pewnej, określonej przestrzeni. Najprostszym urządzeniem tego typu jest komora ultrafiltracyjna służąca równocześnie jako reaktor z całkowitym wymieszaniem. Substrat podawany jest do reaktora pod ciśnieniem, a odbierany jest ultrafiltrat zawierający produkt reakcji

---

\* Dr, Instytut Chemii Organicznej i Fizycznej Politechniki Wrocławskiej, Wybrzeże Wyspiańskiego 27, 50-370 Wrocław, \*\* Dr inż., Politechnika Rzeszowska, ul. W. Pola 2, 35-959 Rzeszów, \*\*\* Prof. dr hab. inż., Instytut Inżynierii Ochrony Środowiska Politechniki Wrocławskiej, Wybrzeże Wyspiańskiego 27, 50-370 Wrocław.



Ryc. 1. Schemat bioreaktora, którego jedną ścianę stanowi membrana ultrafiltracyjna

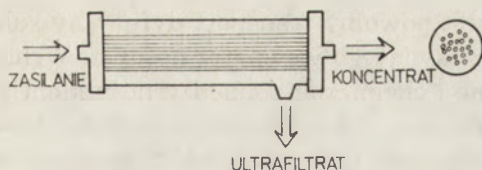


Ryc. 2. Bioreaktor typu przemysłowego z urządzeniem ultrafiltracyjnym do oddzielania produktów reakcji od enzymu

(Ryc. 1). Taki zblokowany układ stosowany jest przede wszystkim do celów laboratoryjnych. W aparaturze przemysłowej komora reakcji i urządzenia ultrafiltracyjne są przestrzennie rozdzielone (Ryc. 2). Zasadnicze cechy obu reaktorów są podobne. Łączą one zalety reaktora z całkowitym wymieszaniem z zaletami reaktora z immobilizowanym enzymem. Enzym jest zatrzymywany w układzie, nie obserwuje się tu spadku jego aktywności, nie ma bowiem ograniczenia kontaktu centrum aktywnego z cząsteczką substratu. Dalsze zalety takiego systemu ujawniają się w przypadkach substratów nierozpuszczalnych lub wielkocząsteczkowych, które w wyniku reakcji dają produkty niskocząsteczkowe. Wtedy zarówno enzym jak i substrat są całkowicie zatrzymywane, a jedynie produkt reakcji jest usuwany na zewnątrz reaktora. Reaktor taki może pracować w sposób ciągły, przy wysokich stężeniach substratu gwarantujących wysycenie enzymu, przy czym nie trzeba obawiać się, że reakcja będzie hamowana przez produkty. Ograniczenie czasu pracy takiego reaktora wynika głównie ze zmniejszania się przepływu ultrafiltracyjnego wywołanego zjawiskiem polaryzacji stężeniowej. Przy powierzchni membrany powstaje gradient stężenia cząstek zatrzymywanych. Prowadzi to do formowania się tzw. warstwy polaryzacyjnej stwarzającej dodatkowe opory hydrauliczne. Makrocząsteczki mogą również adsorbować się na powierzchni membrany lub zatykać jej pory. Przy dłuższej pracy może dojść nawet do całkowitego zatkania membrany. Przeciwdziała się tym zjawiskom w różny sposób, zwiększając tzw. transport powrotny (od powierzchni membrany) np. przez dobranie odpowiednich warunków hydrodynamicznych, przez stosowanie membran asymetrycznych, mniej podatnych na zatykanie oraz przez dobór odpowiedniego tworzywa z którego wykonana jest membrana.

W celu zwiększenia wydajności reaktora stosuje się możliwie dużą powierzchnię membran. Układem, który zapewnia najlepszy stosunek po-





**Ryc. 3.** Schemat modułu ultrafiltracyjnego z włóknami kapilarnymi. Po prawej stronie pokazano przekrój poprzeczny. (W rzeczywistości moduł może zawierać do kilku tysięcy włókien)



**Ryc. 4.** Schemat membrany ultrafiltracyjnej w postaci mikrorurki (włókna kapilarnego) z enzymem immobilizowanym w porach membrany

wierzchni membran do objętości urządzenia są moduły z włóknami kapilarnymi (Ryc. 3). Moduły kapilarne mogą też być same reaktorami. Możliwych jest tutaj kilka układów, a wybór najodpowiedniejszego zależy od reakcji, jaka ma być w nim prowadzona. Można roztworem enzymu wypełnić przestrzeń w module na zewnątrz membran. Enzym może być też immobilizowany w obrębie porów asymetrycznej membrany. Wewnętrzna „skórka” takiej membrany jest nieprzepuszczalna dla enzymu, natomiast pozwala na swobodny przepływ substratu i produktu. Substrat dyfunduje do przestrzeni porów, gdzie jest przetwarzany przez znajdujący się tam enzym, a produkt dyfunduje z powrotem do przepływającego przez światło membran roztworu i jest odbierany na zewnątrz (Ryc. 4). Efektywność takiego reaktora jest ograniczona głównie przez szybkość dyfuzji substratu i produktu.

Poza prezentowanymi powyżej, klasycznymi już rozwiązaniami, stosowane są reaktory, w których enzym jest immobilizowany na powierzchni membrany w warstwie żelowej. Układy takie będą omówione w dalszej części pracy.

## II. Kinetyka reakcji w różnych układach modelowych

Wspomniano poprzednio, że immobilizacja enzymu często pociąga za sobą spadek szybkości reakcji enzymatycznej nie wynikający z modyfikacji białka enzymatycznego. Przyczyn może być kilka, z których główną jest przestrzenne utrudnienie dostępu do centrum aktywnego. Drugą, nie mniej

ważną przyczyną jest powolny transport dyfuzyjny substratu do centrum aktywnego enzymu tkwiącego wewnątrz nośnika. Wchodzą również w grę siły elektrostatyczne i chemiczne pomiędzy nośnikiem a substratem, które mogą działać odpychająco na cząsteczki substratu. Również nie bez znaczenia jest lokalna zmiana mikrośrodowiska enzymu, na przykład wzrost lub spadek pH odbijający się na szybkości reakcji. Obszerny opis kinetyki immobilizowanych enzymów oraz komórki traktowanej jako układ immobilizowanych biokatalizatorów ograniczonych półprzepuszczalną membraną, podaje w pracy przeglądowej Kasche [2].

Jednym z podstawowych parametrów, za pomocą którego można porównywać aktywności danego enzymu w różnych układach, jest współczynnik efektywności  $\eta$ , który jest stosunkiem początkowej szybkości reakcji w układzie z immobilizowanym biokatalizatorem do początkowej szybkości reakcji z biokatalizatorem w roztworze przy jednakowych ilościach biokatalizatora. Odchylenia tego współczynnika od jedności świadczą o wpływie dodatkowych czynników na kinetykę reakcji. Najczęściej wartości współczynnika są mniejsze od jedności ze względu na ograniczenia szybkości transportu masy. Mogą jednak zachodzić przypadki uzyskiwania wartości  $\eta$  większej od jedności. Dzieje się tak zwłaszcza wtedy, gdy mamy do czynienia z reakcją nieizotermiczną lub hamowaniem przez produkt. Współczynnik ten w przypadku różnych stężeń substratu można łatwo obliczyć ze wzoru 2:

$$\eta(S) = \frac{V'(S)}{V'_{\max}} \frac{V_{\max}}{V(S)}$$

gdzie:  $V$  i  $V'$  są odpowiednio szybkościami reakcji dla enzymu w roztworze i enzymu immobilizowanego

$S$  — stężenie substratu

Za pomocą współczynnika  $\eta$  można ilościowo określić wpływ poszczególnych czynników na pracę reaktora z immobilizowanym enzymem

#### II-1. Reaktor z włókien kapilarnych

W praktyce najczęściej spotyka się układy, w których urządzenia ultrafiltracyjne jest połączone z reaktorem z całkowitym wymieszaniem. Enzym, substrat i produkt znajdują się w komorze reaktora, gdzie mieszanie jest na tyle intensywne, że nie występują gradienty stężeń żadnego ze składników mieszaniny reakcyjnej. Ogólny opis kinetyki reakcji w takim systemie jest taki sam, niezależnie od tego czy zastosujemy moduł ultrafiltracyjny z włókien kapilarnych czy z płaskich membran, czy układ jest zablokowany, czy rozdzielony. Przedstawia się on następująco [3]:

$$X + \frac{K'_m}{S_0} \left( \frac{X}{1-X} \right) = k\tau$$

gdzie: X — stopień przereagowania =  $S_0 - S : S_0$   
 $S_0$  — początkowe stężenie substratu (w dopływie)  
 $S$  — stężenie substratu w reaktorze  
 $K'_m$  — względna stała Michaelisa  
 $k$  — stała szybkości reakcji  
 $\tau$  — zmodyfikowany czas przetrzymania w reaktorze =  $EV/SJ$   
 $E$  — stężenie enzymu w reaktorze  
 $V$  — objętość reaktora  
 $J$  — przepływ

Kolejnym rozwiązaniem jest układ, w którym membrana rozdziela przestrzeń z substratem od przestrzeni z enzymem. Układ taki można ogólnie opisać następującymi równaniami [4]:

$$\begin{aligned} S_0 & \frac{k_1}{-k_1} S_E \\ E + S_E & \frac{k_2}{k_2} ES \\ ES & \frac{k_4}{k_4} E + P_E \\ P_E & \frac{k_6}{-k_6} P_0 \end{aligned}$$

gdzie:  $k$  — stałe szybkości reakcji,  
 $E$  — enzym,  
 $S$  — substrat,  
 $P$  — produkt,  
 indeksy  $O$  i  $E$  oznaczają:  $O$  — przedział substratu,  $E$  — przedział enzymu

Przy założeniu, że enzym nie przechodzi przez membranę, a substrat i produkt przez nią dyfundują, wydajność procesu może być kontrolowana albo przez szybkość reakcji enzymatycznej, albo przez szybkość dyfuzji substratu przez ścianki włókien kapilarnych. W przypadku systemu ograniczonego szybkością dyfuzji, szybkość reakcji w reaktorze jest funkcją przepływu wzdłużnego i liczby Reynoldsa, która określa warunki hydrodynamiczne mające istotny wpływ na szybkość dyfuzji. Natomiast, gdy szybkość reakcji w układzie jest kontrolowana przez szybkość reakcji enzymatycznej, wtedy wartość jej nie zależy od przepływu wzdłużnego.

Teoretyczne omówienie kinetyki katalizy enzymatycznej w reaktorze z enzymem związanym z wewnętrzną powierzchnią membran rurowych zawiera praca Kobayashi i Laidlera [5], w której autorzy szczegółowo rozpatrują wpływ szybkości dyfuzji oraz różne typy inhibicji.

Kato i wsp. [6] opracowali teoretyczny model innego typu reaktora. Składa się on z dwu współosiowych włókien, z których wewnętrzne jest przepuszczalne dla produktu reakcji i nieprzepuszczalne dla wielocząsteczkowego substratu i enzymu. Reakcja odbywa się wewnątrz środkowego włókna, a produkt na zasadzie ultrafiltracji przechodzi do ze-

wnętrznego włókna i jest usuwany na zewnątrz reaktora. Założenia teoretyczne tego modelu zostały przez autorów poparte danymi eksperymentalnymi. Opracowując profile stężeń enzymu i substratu w wewnętrznym włóknie, uwzględniające polaryzację stężeniową, wykazano jak istotne znaczenie ma dla procesu długość i średnica włókna oraz czas przetrzymania, potrzebny na usunięcie produktu.

W pracy Kitano i wsp. [7] roztwór enzymu wypełnia wnętrze włókien, a substrat jest na zewnątrz. Substrat i produkt dyfundują przez ścianki włókna. Porównano względne stałe Michaelisa otrzymane w różnych warunkach prowadzenia procesu. Były one wyższe niż wartości używane w roztworze niezwiązanego enzymu, co jest zgodne z doniesieniami dotyczącymi enzymów unieruchomionych za pomocą innych metod imobilizacji. Tłumaczy się to wpływem na szybkość katalizy dyfuzji przez ścianki włókna.

## II-2. Membrana z inkludowanym enzymem

Jest to klasyczny już model, który opisuje rozkład stężeń substratu i produktu w membranie z unieruchomionym enzymem, która rozdziela dwa przedziały, jeden z substratem i drugi z produktem [8, 9, 10, 11]. Transport obu składników odbywa się w membranie na drodze dyfuzji. Zakłada się przy tym równomierny rozkład biokatalizatora w obrębie membrany. W nieskończenie małej objętości, w której stężenie substratu jest jednakowe, reakcję można opisać zgodnie z prawem Michaelisa — Menten. Oznaczając grubość membrany przez  $2l$  i zakładając, że membrana jest prostopadła do osi  $x$ , szybkość transportu substratu i produktu można przedstawić w oparciu o II prawo Ficka w sposób następujący [9]:

$$\frac{\delta S}{\delta t} = D_s \frac{\delta^2 S}{\delta x^2} - \frac{V_{\max} S}{K_m + S}$$

$$\frac{\delta P}{\delta t} = D_p \frac{\delta^2 P}{\delta x^2} - \frac{V_{\max} S}{K_m + S}$$

gdzie:  $D_s$  — współczynnik dyfuzji substratu (zakładamy, że jest on niezależny od stężenia)

$D_p$  — współczynnik dyfuzji produktu

Oba równania dają po rozwiązaniu przepływy oraz profile stężeń substratu i produktu wewnątrz membrany. Zakładając, że reakcja w każdym punkcie membrany jest reakcją pierwszego rzędu otrzymujemy, dla stanu stacjonarnego, równanie [9]:

$$S = A_{\exp} (\Phi x/2l) + B_{\exp} (-\Phi x/2l)$$

gdzie:  $A$  i  $B$  — stałe całkowania

$\Phi$  — moduł Thielego definiowany wzorem:

$$\Phi = 2l \sqrt{V_{\max}/K_m D_s}$$

Dla niesymetrycznych warunków brzegowych tzn.  $S_1$  po jednej stronie membrany  $\neq 0$ ,  $S_2$  po drugiej stronie membrany  $= P_1 = P_2 = 0$ , stężenia w punkcie  $x$  wynoszą 9:

$$S = \frac{S_1 \sinh \Phi [1 - (x/2l)]}{\sinh \Phi}$$

$$P = \frac{D_s S_1}{D_p} \left\{ \frac{\sinh \Phi [1 - (x/2l)]}{\sinh \Phi} + \frac{x}{2l} - 1 \right\}$$

a dla symetrycznych warunków brzegowych tzn.  $S_1 = S_2 = S_0$ ,  $P_1 = P_2 = 0$ :

$$S = \frac{S_0 \{ \sinh \Phi (x/2l) + \sinh \Phi [1 - (x/2l)] \}}{\sinh \Phi}$$

$$P = S_0 - S$$

Oparte na powyższym modelu opisy kinetyki Michaelisa — Menten, inhibicji substratowej, inhibicji kompetytywnej i niekompetytywnej podali w swej pracy Laidler i Kobayashi [8, 10]. Rees [11] opracował sposób obliczania przy pomocy szeregu potęgowego profilów stężeń substratu i produktu w obrębie tak modelowanego układu bez konieczności zakładania warunków brzegowych procesu i biorąc pod uwagę inhibicję produktem reakcji.

Ważnym zagadnieniem jest optymalizacja rozmieszczenia katalizatora wzdłuż przekroju poprzecznego membrany, tak aby osiągnąć maksymalną szybkość reakcji na jednostkę powierzchni membrany i w konsekwencji zmniejszyć wpływ nieprzereagowanego substratu. Teoretyczne rozważania na ten temat znaleźć można w pracy Kellera i wsp. [12]

Ostatnio Ansonge i Staudé zastosowali opis heterogennej katalizy w reaktorze rurowym ze stałym wypełnieniem, do membrany z inkludowanym enzymem [13]. Model ten zakłada, że inkluzja enzymu zachodzi wyłącznie w warstwie podporowej membrany, na powierzchni membrany enzym jest nieobecny. To założenie umożliwia ściśle zdefiniowania objętości, w której przebiega reakcja. Stwierdzono, że względna stała Michaelisa jest funkcją stopnia przereagowania substratu i przepływu objętościowego przez membranę.

### II-3. Warstwa żelowa na powierzchni membrany

Doświadczenia nad wykorzystaniem zjawiska polaryzacji stężeniowej w celu immobilizowania enzymów na powierzchni membrany prowadzono od lat w różnych układach. Wykorzystywano płaskie i rurowe membrany, warstwę żelu tworzonego z czystego białka enzymatycznego [14, 15, 16] lub przez inkluzję w żelu albuminy surowiczej [17, 18]. Badano kinetykę reakcji biegnącej w warstwie żelowej enzymu w układzie z recyrkulacją

substratu [15]. Alfani i in. [19] stwierdzili w swej pracy, że w omawianym układzie decydującą rolę odgrywa transport konwekcyjny przy przenoszeniu substratu do enzymu.

Greco i wsp. [18] wstępnie przyjęli dwa różne rodzaje warstwy żelowej na powierzchni membrany. Pierwszy układ zawiera żel homogeny. Transport masy, zarówno na drodze dyfuzji jak i konwekcji, odbywa się w całej objętości żelu. Drugi układ zawiera warstwę żelu heterogenego. Zakłada się w tym przypadku przenikanie roztworu zasilającego przez warstwę żelu kanalikami, podczas gdy reakcja enzymatyczna odbywa się w obszarach żelu traktowanych jako płaskie płytki, do których dyfunduje substrat. Zakładano, że kinetyka procesu może być opisana zgodnie z prawem Michaelisa — Menten. Określony przez autorów na podstawie drugiego z zakładanych modeli współczynnik efektywności ma postać:

$$\eta = \frac{(M+1)Pe}{\Phi^2 \rho^2 (1-\varepsilon)} [1-\gamma]$$

gdzie:  $M$  — bezwymiarowa stała Michaelisa,  $M = K_m/S$

$Pe$  — liczba Pecleta

$\rho$  — bezwymiarowa grubość żelu,  $\rho = \Delta/l$ ,  $\Delta$  — grubość,  $l$  — wymiar obszarów żelu, gdzie zachodzi reakcja

$\varepsilon$  — porowatość żelu

$\gamma$  — stężenie substratu przy powierzchni żelu

#### II-4. Membrana jako przegroda rozdzielająca substrat i enzym

Furusaki i in. [20, 21] zaproponowali model reaktora, w którym membrana rozdziela przedziały z enzymem i z substratem, a ciśnienie doprowadzane jest na przemian do części enzymatycznej i substratowej. Membrana jest przepuszczalna dla produktu i substratu. Układ z sinusoidalną zmianą przepływu ultrafiltracyjnego wywołaną zmianą ciśnienia lub pulsacyjnym przepływem ultrafiltracyjnym wykorzystali również Kim i Chang [22] do opracowania teoretycznego modelu pozwalającego na określenie wpływu procesu ultrafiltracji na zachowanie się reaktora. Wychodząc z bilansu masy dla rozpuszczalnika i substancji rozpuszczonej (wody i substratu) po dwu stronach membrany, zakładając, że reakcja zachodzi zgodnie z kinetyką Michaelisa — Menten i wprowadzając zmienne bezwymiarowe, otrzymali następujące równania dla bilansu masy substratu:

$$v_1 \frac{dS_1}{d\tau} - FS_1 \sin \tau = -(S_1 - S_2) - sFf(S_1 S_2) \sin \tau + L(1 - S_1)$$

$$v_2 \frac{dS_2}{d\tau} + FS_2 \sin \tau = (S_1 - S_2) + sFf(S_1 S_2) \sin \tau - \frac{\lambda^2 S_2}{M + S_2}$$

gdzie:  $f(S_I, S_{II}) = \begin{cases} S_I & \text{w cyklu postępowym} \\ S_{II} & \text{w cyklu wstecznym} \end{cases}$

$$v_1 = \gamma W - F(1 - \cos \tau)$$

$$v_2 = \gamma W + F(1 - \cos \tau)$$

s — współczynnik

gdzie:

(zmiennie bezwymiarowe)

$W = \omega V_{I0} / P_m A$  — częstotliwość

$F = P_a / P_m$  — stosunek konwekcji do dyfuzji

$\tau = \omega t$  — czas

$L = Q / P_m A$  — szybkość przepływu

$S_1 = S_I / S_i$  — stężenie substratu w przedziale I

$S_2 = S_{II} / S_i$  — stężenie substratu w przedziale II

$M = K_m / S_i$  — stała Michaelisa

$\gamma = V_{II0} / V_{I0}$  — stosunek objętości

$\lambda^2 = V_{max} V_{II} / P_m A S$  — liczba Damköhlera

(Pozostałe zmiennie)

$\omega$  — częstotliwość,  $s^{-1}$

$V$  — objętość przedziału,  $m^3$

$A$  — powierzchnia membrany,  $m^2$

$P_m$  — przepuszczalność membrany

$P_a$  — stała definiowana wzorem:  $P_a = J_v / \sin(\omega t)$

$J_v$  — przepływ rozpuszczalnika przez membranę

$t$  — czas,  $s$

$Q$  — szybkość przepływu objętościowego,  $m^3/s$

$S_I$  — stężenie substratu w przedziale I, bez enzymu

$S_{II}$  — stężenie substratu w przedziale II, z enzymem

$S_i$  — stężenie substratu w roztworze zasilającym

Autorzy prowadzili symulację numeryczną testując założone równania modelowe. Symulację przeprowadzono dla dwóch układów: nieprzepływowego ( $L = 0$ ) i układu z ciągłym przepływem. W obu przypadkach założono, że znormalizowana stała Michaelisa wynosi 1. W przypadku modelu nieprzepływowym spadek stężenia substratu można było aproksymować zależnością wykładniczą:

$$S_I = S_0 \exp\left(-\frac{\alpha F \tau}{2 W}\right)$$

gdzie:  $\alpha$  — współczynnik proporcjonalności

Stwierdzono, że spadek stężenia substratu zależy od takich parametrów jak:  $F$ ,  $W$ ,  $\lambda^2$ . Analizując spadek stężenia substratu przy różnych wartościach liczby Damköhlera (od 1 do 100), która jest miarą szybkości reakcji w stosunku do szybkości dyfuzji, zaobserwowano, że spadek stężenia substratu jest znacznie gwałtowniejszy przy wysokich wartościach liczby

Damköhlera. Jeśli częstotliwość,  $W$ , maleje, wpływa to również na ostrzejszy spadek stężenia substratu. Równocześnie mniej wyraźnie występuje ta ostatnia zależność, gdy wartość  $F$  jest niska, tzn. gdy transport przez membranę zachodzi głównie na drodze dyfuzyjnej.

Drugim analizowanym układem był układ z przepływem ciągłym. Symulacja polegała na zmianie następujących parametrów:  $\lambda^2$  (liczba Damköhlera), wartości  $F$  oraz  $L$ , jako odwrotności czasu przetrzymania. Wydłużając czas przetrzymania obserwować można przejście od stanu kontrolowanego przez szybkość reakcji do stanu kontrolowanego przez dyfuzję, przy niższych wartościach liczby Damköhlera.

Model opracowany przez *Kim* i *Chang*a [22] pozwala na określenie, przynajmniej co do rzędu, wielkości parametrów, które wpływają na efektywność reaktora.

### III. Zastosowanie enzymatycznych reaktorów membranowych

W rozdziale tym ograniczymy się do przedstawienia kilku typowych przykładów zastosowań reaktorów membranowych.

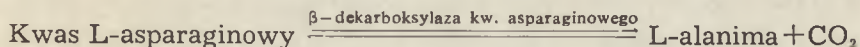
Zastosowanie membran ultrafiltracyjnych może być bardzo korzystne wtedy, gdy w wyniku reakcji enzymatycznej z wielkocząsteczkowego substratu powstają produkty drobnocząsteczkowe. Dzieje się tak podczas hydrolizy białka — procesu, który szeroko wykorzystuje się w przemyśle spożywczym do otrzymywania zmodyfikowanych preparatów białkowych tzw. hydrolizatów białkowych. Szereg prac na ten temat opublikowali *Cheryan* i *Deeslie* [3, 23, 24]. Prace te zmierzały do optymalizacji procesu. Stwierdzono, że najlepsze wyniki daje układ: reaktor i połączony z nim moduł ultrafiltracyjny. Ważny jest dobór odpowiedniego enzymu, który oprócz wysokiej aktywności powinien mieć szerokie spektrum działania (być mało specyficznym). Enzym o takich własnościach działać może również na osady odkładające się w układzie, zapobiegając zatykaniu membran. *Cheryan* i *Deeslie* badali czynniki wpływające na stabilność pracy reaktora konkludując, iż spadek jego efektywności może być powodowany inaktywacją enzymu, ucieczką drobnocząsteczkowych fragmentów enzymu oraz przenikaniem drobnocząsteczkowych aktywatorów przez membranę.

Innym procesem, w którym mogą znaleźć zastosowanie reaktory membranowe jest rozkład celulozy. Proces ten budzi obecnie wielkie zainteresowanie na całym świecie, ponieważ celuloza należy do zasobów odnawialnych, jest cennym surowcem do otrzymywania paliw np. etanolu. Ciekawe prace na ten temat prowadzili między innymi *Hägerdahl* i *wsp.* [25]. Starano się połączyć w jednym układzie rozkład celulozy do celobiozy katalizowany przez glukozę i hydrolizę celobiozy do glukozy katalizowaną przez  $\beta$ -glukozydazę. Obie te reakcje są silnie hamowane przez produkty



końcowe. Dobre wyniki uzyskano przez zastosowanie reaktora membranowego z odpowiednio dobraną membraną, która zatrzymuje enzymy i substraty natomiast przepuszcza niskocząsteczkowe produkty reakcji. Dodatkową zaletą takiego systemu jest znaczne zmniejszenie kosztów produkcyjnych. Szacuje się, że koszty enzymów wynoszą w procesie konwencjonalnym 40% kosztów ogólnych. Proces prowadzono w zablokowanym reaktorze ultrafiltracyjnym. Zastosowanie reaktorów membranowych do rozkładu celulozy było przedmiotem innych prac [26, 27, 28].  $\beta$ -glukozydaza, jako jeden z kluczowych enzymów tego procesu, była przedmiotem badań w reaktorze membranowym z żelową warstwą enzymu na powierzchni membrany [29]. Stwierdzono znaczne przedłużenie (dwudziestokrotne) okresu półtrwania aktywności enzymatycznej w porównaniu z wolnym enzymem w roztworze. Kitano i wsp. [7] badali zachowanie się dwóch enzymów — ureazy i urykazy w reaktorze z włókien kapilarnych. Innym enzymem, który był przedmiotem licznych badań w reaktorach membranowych jest fosfataza kwaśna [14, 16, 30]. Stosując reaktor membranowy uzyskano większą stabilność tak ważnego w przemyśle farmaceutycznym enzymu jak acylaza penicylinowa, która jest stosowana przy produkcji półsyntetycznych penicylin [31].

Reaktor membranowy wykorzystano również do ciągłej produkcji L-alaniny z kwasu fumarowego [32]. Reakcja zachodzi w dwóch etapach:



Zastosowano dwa odrębne reaktory do dwóch etapów reakcji. Podobnie jak w poprzednim przykładzie reaktory pracowały jako reaktory z całkowitym wymieszaniem a moduł ultrafiltracyjny z włóknami kapilarnymi służył do oddzielania i zawracania enzymów. W związku z tym, że enzymy były zawracane do reaktora, można było zastosować kosztowne, czyste preparaty enzymatyczne. Poza tym przy stosowaniu jako katalizatorów pojedynczych enzymów, a nie całych komórek, unika się powstawania niepożądanych produktów ubocznych, w tym przypadku powstawanie kwasu jabłkowego, co często ma miejsce przy katalizie prowadzonej przez całe komórki.

Prowadzono prace nad stabilizacją enzymów w reaktorach membranowych [33, 34]. Białko enzymatyczne inkludowano w żel białkowy tworzony na powierzchni membrany z albuminy surowicy krwi i sieciowany aldehydem glutarowym. Stosowano również długołańcuchowe polimery syntetyczne (poliakrylomid) do dynamicznego unieruchamiania enzymów w pobliżu membrany. Ten ostatni sposób pozwalał na uniknięcie pozornego spadku aktywności enzymu powodowanego ograniczeniami przestrzen-

nymi w warstwie żelu. Osiągnięto dobre wyniki w stabilizacji kwaśniej fosfatazy, dehydrogenazy  $\beta$ -galaktozowej i  $\beta$ -glukozydazy.

Enzymy służyć mogą również do zwiększania strumienia ultrafiltracyjnego przeciwdziałając zatykaniu membrany podczas prowadzenia procesu ultrafiltracji np. ścieków lub innych roztworów zawierających białka. Enzymy proteolityczne immobilizowane na powierzchni membrany przez adsorpcję poprawiały przepływ ultrafiltracyjny o 20% do 70% [35, 36, 37].

Reaktor membranowy został wykorzystany przez H o q a i w s p. [38] do syntezy trójglicerydów. Zastosowano w nim silnie hydrofobową membranę jako przegrodę oddzielającą lipazę rozpuszczoną w roztworze glicerolu od płynnych kwasów tłuszczowych. Reaktor pozwalał na ciągłą syntezę glicerydów bez konieczności wytwarzania emulsji. Produkt był otrzymywany w stanie czystym, osiągnięto 90% przereagowania substratów.

Opisywane do tej pory enzymy, były głównie hydrolazami katalizującymi proste reakcje, niewymagającymi drobnocząsteczkowych koenzymów. Do niedawna zastosowanie bioreaktorów membranowych ograniczano właśnie do tego typu reakcji. Zatrzymywanie drobnocząsteczkowego koenzymu wymagałoby stosowania membran o znacznie mniejszych porach, takich jakich się używa do odwróconej osmozy. Membrany te mają znacznie mniejszą przepuszczalność w porównaniu z ultrafiltracyjnymi, poza tym oddzielanie koenzymu od drobnocząsteczkowych produktów mogłoby stwarzać dodatkowe trudności. Podobne problemy występują również przy innych sposobach immobilizacji. Rozwiązano ten problem przez związanie koenzymu z większą cząsteczką. Taki funkcjonalny kompleks nie przechodzi przez membranę ultrafiltracyjną [39]. Zastosowano reaktor z płaską membraną ultrafiltracyjną i recyrkulacją do produkcji L-leucyny przez aminację  $\alpha$ -ketoizokapronianu. Katalizatorem była dehydrogenaza L-leucyny. Do regeneracji zredukowanego podczas powyższej reakcji NADH zastosowano dehydrogenazę mrówczanową. NADH był kowalencyjnie wiązany z glikolem polietylenowym. W ten sposób uzyskano reaktor do ciągłej produkcji L-leucyny, który pracował przez 48 godzin osiągając stopień przereagowania 99%. Reaktor ten został zastosowany w skali przemysłowej.

Przykłady zastosowania reaktorów membranowych staraliśmy się dobrać w ten sposób, aby zilustrowały one możliwości jakie dają te urządzenia. Pominęliśmy natomiast reaktory, w których stosowane są wprawdzie różnego typu błony, lecz błony te nie są membranami ultrafiltracyjnymi. Są to błony w czujnikach pomiarowych (elektrody enzymatyczne), błony stosowane do immobilizacji enzymów do celów diagnostyki medycznej, błony wykorzystywane do tworzenia sztucznych organów.

Reaktory membranowe, a zwłaszcza moduły kapilarne, są coraz szerzej wykorzystywane jako reaktory z immobilizowanymi komórkami, zarówno do procesów fermentacji, jak i do hodowli tkankowych. Spełniają one szereg wymagań stawianych przed nowoczesnymi procesami biotechnolo-

gicznymi. Służą do prowadzenia procesów ciągłych, w których przez cały czas utrzymywane jest wysokie stężenie biokatalizatora. Skraca to czas przetrzymywania w reaktorze. Reakcja prowadzona jest w warunkach optymalnych, ze stałym usuwaniem produktów. W przypadku zatrzymywania przez membranę wielkocząsteczkowego substratu można prowadzić reakcję przy wysokich stężeniach substratu (przy maksymalnej szybkości reakcji) bez obawy o ucieczkę substratu.

Reaktory membranowe pozwalają z jednej strony na pełne wykorzystanie zalet wynikających z immobilizacji biokatalizatorów, a z drugiej strony — na wyeliminowanie zjawisk niekorzystnych towarzyszących katalizie enzymatycznej w skali przemysłowej.

Zaakceptowano do druku 2 września 1986 r.

## PIŚMIENNICTWO

1. Rucka M., Winnicki T., Żuk J. S., (1987), *Post. Bioch.*, 1, 81—92.
2. Kasche V., (1983), *Enzyme Microb. Technol.*, 5, 2—13.
3. Deeslie W. D., Cheryan M., (1982), *Biotechnol. Bioeng.*, 24, 69—82.
4. Davis J. C., (1974), *Biotechnol. Bioeng.*, 16, 1113—1122.
5. Kobayashi T., Laidler K. J., (1974), *Biotechnol. Bioeng.*, 16, 99—118.
6. Katoh S., Yanagida T., Sada E., (1978), *J. Chem. Eng. Japan*, 11, 143—146.
7. Kitano H., Yoshijima S., Ise N., (1980), *Biotechnol. Bioeng.*, 22, 2643—2653.
8. Kobayashi T., Laidler K. J., (1974), *Biotechnol. Bioeng.*, 16, 77—97.
9. Thomas D., Caplan S. R., (1976), w: *Membrane Separation Processes* red. Meares P., 357—371, Elsevier, Amsterdam.
10. Laidler K. J., Bunting P., (1980), *Methods Enzymol.*, 64, 227—248.
11. Rees D. C., (1984), *Bull. Math. Biol.*, 46, 229—234.
12. Keller J. B., Falkowitz M. S., Frisch H., (1984), *Chem. Eng. Sci.*, 39, 604—607.
13. Ansorge W., Staude E., (1985), *J. Membr. Sci.*, 22, 283—295.
14. Drioli E., Gianfreda L., Palesscandolo R., Scardi V., (1976), w: *Analysis and Control of Immobilized Enzyme Systems*, red. Thomas D., Kernevez J. D., 179—186, Elsevier, Amsterdam.
15. Drioli E., Mendia M., Molinari R., (1978), *Desatination*, 24, 193—209.
16. Capobianco G., Drioli E., Ragosta G., (1977), *J. Solid Phase Biochem.*, 2, 315—328.
17. Cantarella M., Remy M. M., Scardi V., Alfani F., Iorio G., Greco Q., Jr., (1979), *Biochem. J.*, 179, 15—18.
18. Greco Q. Jr., Alfani F., Gianfreda L., Palesscandolo R., Scardi V., (1980), *Chem. Eng. Commun.*, 7, 145—157.
19. Alfani F., Iorio G., Greco Q. Jr., Cantarella M., Remy H., Scardi V., (1979), *Chem. Eng. Sci.*, 34, 1213—1215.
20. Furusaki S., Kojima T., Miyauchi T., (1977), *J. Chem. Eng. Japan*, 10, 233—238.
21. Furusaki S., Miyauchi T., (1981), *J. Chem. Eng. Japan*, 14, 479—483.

22. Kim I. H., Chang H. N., (1983), *J. Chem. Eng. Japan*, **16**, 67—71.
23. Cheryan M., Deeslie W. D., (1980), w: *Ultrafiltration Membranes and Applications*, red. Cooper A. R., 591—601, Plenum Press, Nowy Jork.
24. Deeslie W. D., Cheryan M., (1981), *Biotechnol. Bioeng.*, **23**, 2257—2261.
25. Hagerdal B., Lopez-Leiva M., Mattiason B., (1980), *Desalination*, **35**, 365—373.
26. Henley R. G., Yang R. Y., Greenfield P. F., (1980), *Enzyme Microb. Technol.*, **2**, 206—208.
27. Jones C. K., Yang R. Y., (1980), *Chem. Eng. Commun.*, **6**, 283—291.
28. Hahn-Hägerdal B., Andersson E., Lopez-Leiva M., Mattiason B., (1981), *Biotechnol. Bioeng. Symp.*, **11**, 651—661.
29. Gianfreda L., Livolisi A. M., Scarfi M. R., Greco Q. Jr., (1982), *Enzyme Microb. Technol.*, **4**, 322—326.
30. Alfani F., Albanesi D., Cantrarella M., Scardi V., (1982), *Enzyme Microb. Technol.*, **4**, 181—184.
31. Greco Q. Jr., Veronese F., Largajolli R., Gianfreda L., (1983), *European J. Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **18**, 333—338.
32. Jande A. S., Hustedt H., Wandrey C., (1982), *ibid.*, **15**, 59—63.
33. Greco Q. Jr., Gianfreda L., (1981), *Biotechnol. Bioeng.*, **23**, 801—813.
34. Gianfreda L., Greco Q. Jr., (1981), *Biotechnol. Lett.*, **3**, 33—38.
35. Jeng C. W., Wang S. S., Davidson B., (1980), *Enzyme Microb. Technol.*, **2**, 145—148.
36. Howell J. A., Velicangil O., (1980), w: *Ultrafiltration Membranes and Applications*, red. Cooper A. R., 217—229, Plenum Press. Nowy Jork.
37. Żuk J. S., Rucka M., Rak J., (1982), *Environ. Protect. Eng.*, **8**, 95—103.
38. Hog M. M., Yamane T., Shimizu S., Funada T., Ishida S., (1984), *JAOS*, **61**, 776—781.
39. Wichman R., Wandrey C., Büchmann A. F., Kula M. R., (1981), *Biotechnol. Bioeng.*, **23**, 2789—2802.

## SPRAWOZDANIE

### III Sympozjum Fluorowe Polskiego Towarzystwa Biochemicznego w Szczecinie

W dniach 30—31 maja 1986 r. odbyło się w Szczecinie III Sympozjum fluorowe pt.: „Wpływ fluorków zawartych w atmosferze na rośliny i żywność”. W obradach wzięło udział ponad 70 osób z ośrodków krajowych (Kraków, Łódź, Lublin, Poznań, Wrocław, Puławy, Warszawa, Kórnik, Cieplice, Piotrków, Szczecin) oraz zagranicznych (Erfurt, Cottbus, Rostock, České Budejovice, Würzburg, Odense). W Sympozjum uczestniczyli także przedstawiciele Władz, instytutów naukowych, wyższych uczelni szczecińskich oraz instytucji zajmujących się ochroną środowiska. Wygłoszono 17 referatów sympozjalnych i przedstawiono 27 doniesień plakatowych. Goście z zagranicy przedstawiali swoje referaty w języku angielskim.

W pierwszym dniu obrad przedstawiono następujące referaty związane z głównym hasłem III Sympozjum:

1. Znaczenie badań związków fluoru na terenie Pomorza Zachodniego — Z. Machoy (Szczecin);
2. Problem fluoru w przemyśle nawozowym — U. Głabisz (Szczecin);
3. Reaktywność a emisja związków fluoru — I. Pollo (Lublin);
4. Warunki meteorologiczne panujące wokół Zakładów Chemicznych „Police” — K. Prawdzic (Szczecin);
5. Zawartość fluoru w roślinach w strefie oddziaływania emisji Zakładów Chemicznych „Police” — S. Borowiec, Z. Zabłocki (Szczecin);
6. Wpływ emisji przemysłowych na zawartość fluoru w roślinach wybranych gatunków leśnych — A. Sienkiewicz, I. Cichocka (Poznań);
7. Oddziaływanie fluoru zawartego w emisjach przemysłowych na środowisko leśne — S. Kmieciak (Szczecin);
8. Badania dziennego pobierania fluorków przez wybraną część ludności żyjącej na terenach o różnym zanieczyszczeniu fluorkami — S. Melde, B. Dominok (Cottbus /NRD/);
9. Wzrost zawartości fluoru w żywności i wynikające z tego konsekwencje — R. Valach (České Budejovice /Czechosłowacja/).

W drugim dniu obrad przedstawione referaty dotyczyły najnowszych osiągnięć w zakresie problematyki fluorowej czyli „Współczesnych poglądów na zagadnienia związane z toksykologią, terapią, profilaktyką i analityką związków fluoru”:

1. Długotrwałe doświadczenie w leczeniu osteoporozy fluorkiem sodowym — J. Franke (Erfurt /NRD/);
2. Długotrwałe, zawodowe narażenie zdrowia na działanie fluorków — P. Grandjean (Odense /Dania/);
3. Interakcje fluoru i magnezu w badaniach *in vitro* i *in vivo* — M. Gumińska (Kraków);
4. Niektóre zagadnienia toksykologii związków fluoru — J. Markiewicz (Kraków);
5. Fluoroza zwierząt domowych — T. Juszkievicz, J. Szkoda (Puławy);

6. Współczesne problemy profilaktyki fluorkowej — M. Kobyłańska (Poznań);
7. Modyfikujące wpływy fluoru na mechaniczne i chemiczne właściwości w mikro-warstwie tkanki twardej: nowa metoda oznaczania i niektóre wyniki — E. Gabriel (Würzburg /RFN/);
8. Radiometryczne metody oznaczania fluoru — H. Bem (Łódź).

Sesja plakatowa trwająca przez cały pierwszy dzień obrad zakończyła się dyskusją uczestników przy plakatach, natomiast podsumowanie sesji plakatowej i Sympozjum odbyło się w drugim dniu obrad.

W czasie Sympozjum wyświetlono dwa filmy. Jeden dotyczył rozwoju aglomeracji Szczecina, drugi pt.: „Adverse effects of topical fluorinated steroids” został udostępniony organizatorom przez British Council. Uczestnicy otrzymali program, streszczenia doniesień plakatowych oraz wydane drukiem referaty III Sympozjum fluorowego z dwujęzycznym tytułami polskim i angielskim. Odbyło się również tradycyjne spotkanie towarzyskie. Uczestnicy Sympozjum byli zakwaterowani w hotelach i domach akademickich, a do sali obrad byli dowożeni autobusami.

Z podsumowania Sympozjum wynika, że w porównaniu z innymi Polska należy do krajów o znacznym zanieczyszczeniu środowiska związkami fluoru, a świadomość, zainteresowanie oraz edukacja społeczeństwa o istniejących zagrożeniach fluorem jest mała.

O większym zainteresowaniu problematyką fluorkową za granicą świadczy między innymi spora ilość publikacji z tego zakresu jak i chęć udziału naukowców z sąsiednich krajów w Sympozjum w Szczecinie mimo, że było ono Sympozjum krajowym. Rangę naukową Sympozjum zwiększył na pewno udział w nim Prezydenta Międzynarodowego Towarzystwa Badania Fluorków jak i eksperta Światowej Organizacji Zdrowia.

*Przewodniczący — Prof. dr Z. Machoy  
Sekretarz — Dr D. Samujło*

## POSTĘPY BIOCHEMII

### ARTICLES IN POLISH

Volume 32

Number 1

Obituary — Professor Wanda Mejsbaum-Katzenellenbogen . . . . .	3
Articles	
J. Gemel — Role of Protein Phosphorylation and Dephosphorylation in Regulation of the Metabolic Activity of Chloroplast (Institute of Biochemistry, Warsaw University, Warszawa) . . . . .	7
W. Marczewski — Role of Phosphoenolpyruvate Carboxylase in Plants (Carbon and Nitrogen Metabolism Laboratory, A Mickiewicz University, Poznań; address for correspondence: Institute for Potato Research, Research Unit Młochów) . . . . .	29
J. Skangiel-Kramska — Neuroreceptors (Department Neurofizjology, Nencki Institute of Experimental Biology, Warszawa) . . . . .	45
J. Noworytko, A. Guzdek — Post-translational Modifications of Glycoproteins (Department of Animal Biochemistry, Institute of Molecular Biology, Jagiellonian University, Kraków) . . . . .	65
M. Rucka*, T. Winnicki**, J. S. Żuk*** — Enzyme Membranes (* Institute of Organic and Physical Chemistry, Technical University of Wrocław, **Institute of Environmental Protection Engineering, Technical University of Wrocław, ***Lukasiewicz Technical University, Rzeszów) . . . . .	81
M. Rucka*, J. S. Żuk**, T. Winnicki*** — Enzyme Membrane Reactors (*Institute of Organic and Physical Chemistry, Technical University of Wrocław, **Lukasiewicz Technical University, Rzeszów, ***Institute of Environmental Protection Engineering, Technical University of Wrocław	93

#### DO WIADOMOŚCI AUTORÓW

Informuję, że w dniu 7 maja 1987 r. Pełnomocnik Dyrektora d/s Publikacji Zleconych i Czasopism uzgodnił z Biurem Wydawnictw PAN, że autorów za zmiany dokonywane w korektach powyżej 3% oraz za przekłiszowania należy obciążać w/g kosztów faktycznych. Po ustaleniu z drukarniami kosztów za przelany wiersz, poprawki ręczne i przekłiszowania proszę powiadomić Komitetu Redakcyjne o nowych obciążeniach.

Koszt poprawki wynosi zł 60.—  
Przekłiszowanie rysunku całostronicowego zł 1246.—  
półstronicowego zł 623.—  
mniejszy zł 415.—

Kier. Zesp. Prod. Publ. Zlec. PWN  
(W. Siedlecki)



## WSKAZÓWKI DLA AUTORÓW

Kwartalnik „Postępy Biochemii” publikuje artykuły monograficzne omawiające wąskie tematy, oraz artykuły przeglądowe referujące szersze zagadnienia z biochemii i nauk pokrewnych. Artykuły pierwszego typu winny w sposób syntetyczny omawiać wybrany temat na podstawie możliwie pełnego piśmiennictwa z kilku ostatnich lat, a artykuły drugiego typu na podstawie piśmiennictwa z ostatnich dwóch lat. Objętość takich artykułów nie powinna przekraczać 20 stron maszynopisu (nie licząc ilustracji i piśmiennictwa). Kwartalnik publikuje także artykuły typu *minireviews*, do 10 stron maszynopisu, z dziedziny zainteresowań autora, opracowane na podstawie najnowszego piśmiennictwa, wystarczającego dla zilustrowania problemu. Ponadto kwartalnik publikuje krótkie noty, do 5 stron maszynopisu, informujące o nowych interesujących osiągnięciach biochemii i nauk pokrewnych, oraz noty przybliżające historię badań w zakresie różnych dziedzin biochemii. Przekazanie artykułu do Redakcji jest równoznaczne z oświadczeniem, że nadesłana praca nie była i nie będzie publikowana w innych czasopismach, jeżeli zostanie ogłoszona w „Postępkach Biochemii”. Autorzy artykułu odpowiadają za prawidłowość i ścisłość podanych informacji. Autorów obowiązuje korekta autorska: poprawki wynikające z błędów drukarni nanosimy ołówkiem; niezbędne zmiany autorskie nanosimy niebieskim atramentem. Koszty zmian tekstu w korekcie (poza poprawieniem błędów drukarskich) ponoszą autorzy. Artykuły honoruje się według obowiązujących stawek. Autorzy otrzymują 25 odbitek swego artykułu.

Redakcja prosi autorów o przestrzeganie następujących wskazówek:

**Forma maszynopisu:** maszynopis pracy i wszelkie załączniki należy nadsyłać w dwu egzemplarzach. Maszynopis powinien być napisany jednostronnie, z podwójną interlinią, z marginesem ok. 4 cm po lewej i ok. 1 cm po prawej stronie; nie może zawierać więcej niż 60 znaków w jednym wierszu nie więcej niż 30 wierszy na stronie zgodnie z Normą Polską.

**Układ maszynopisu:** strona okładkowa nienumerowana zawiera imiona i nazwisko(a) autora(ów), adres(y) Zakład(ów) w języku polskim i angielskim, w których pracują autorzy, adres pocztowy, na który autorzy życzą sobie otrzymywać korespondencję, adres prywatny, telefon miejsca pracy, tytuł artykułu (w języku polskim i angielskim) oraz — w prawym dolnym rogu — liczbę stron, liczbę rycin, wzorów i tabel oraz skrót tytułu (nie więcej niż 25 znaków drukarskich).

**Strona tytułowa (1)** imiona (w pełnym brzmieniu) i nazwisko(a) autora(ów), tytuł pracy w języku polskim i angielskim, rzeczowy spis treści w języku polskim i angielskim, tytuł naukowy autora(ów) i jego (ich) miejsce(a) pracy, wykaz skrótów stosowanych w pracy.

**Strona 2 i następne** obejmują tekst pracy do spisu piśmiennictwa włącznie, tabele, spis rycin, wzorów oraz tytuły i objaśnienia do rycin na stronach końcowych.

Dla przejrzystości tekstu obowiązuje podział artykułu na rozdziały i podrozdziały, których tytuły informować rzeczowo winny o przedstawionych treściach. Rzeczowy spis treści publikujemy bezpośrednio po tytule pracy. Rozdziały numerujemy liczbami rzymskimi, a podrozdziały odpowiednią rzymską i arabską (np. I-1). Tytułów podrozdziałów nie wydzielonych z tekstu nie trzeba numerować. W tekście nie należy stosować żadnych podkreśleń ani rozstrzelonego druku. Ewentualne sugestie autorskie co do charakteru czcionki drukarskiej należy zaznaczyć ołówkiem na marginesie maszynopisu. W przypadku umieszczenia w tekście liter alfabetu greckiego należy na marginesie wpisać ołówkiem ich fonetyczne brzmienie. Tabele i ryciny numerujemy cyframi arabskimi a wzory rzymskimi. W tekście nie należy umieszczać żadnych table, rycin czy wzorów, lecz w żądanym miejscu pozostawić wolny wiersz i zaznaczyć: Tabela 1, Ryc. 1. Wzór 1 itp. Numerację wzoru w tekście należy podawać po nazwie związku, np. kwas glutaminowy (1).

Redakcja prosi autorów o zwrócenie szczególnej uwagi na poprawność językową tekstu a także na ścisłość i jasność sformułowań, unikanie gwary laboratoryjnej oraz o niewprowadzanie do tekstu tworzonych doraźnie skrótów, nawet jeśli niektóre z nich bywają używane w pracach obcojęzycznych.

Redakcja zastrzega sobie możliwość skrócenia tekstu i wprowadzania poprawek nie wpływających na treść pracy.

**Piśmiennictwo:** w artykule należy cytować prace oryginalne z ostatnich kilku lat oraz najważniejsze artykuły przeglądowe omawiając przedstawioną dziedzinę z uwzględnieniem artykułów opublikowanych w „Postęпах Biochemii”. W tekście należy podawać jedynie nazwiska badaczy, których prace mają podstawowe znaczenie w przedstawionej dziedzinie. Omawiane prace trzeba numerować w kolejności ich cytowania w tekście. Wykaz piśmiennictwa zatem obejmuje prace opatrzone kolejnymi numerami, ale nie uporządkowane alfabetycznie. Odnosiniki bibliograficzne winny mieć formę zalecaną przez Komisję Wydawców Czasopism Biochemicznych Międzynarodowej Unii Biochemików (IUB) według *Biochim. Biophys. Acta* (1972), 271, 1 np.

Pispa J. P., Buchanan F. M., (1971), *Biochim. Biophys. Acta*, 247, 181—184.

Cytując wydawnictwa książkowe podawać należy kolejno: nazwisko(a) i inicjały autora(ów), rok wydania, tytuł książki, nazwisko(a) i inicjały jej redaktorów(a), tom, pierwszą i ostatnią stroną cytowanej publikacji, nazwę wydawnictwa oraz miejsce wydania, np.

Dixon M., Weeb E. C., (1964), *Enzymes*, 2 wyd., str. 565, Langmans Green and Co., London;

Grant J. K., (1969) w *Essays in Biochemistry*, red. Campbell P. N., Greville G. D., t. 5, str. 1—58; Academic Press, London.

**Załączniki:** każdy załącznik należy sporządzić w 2 egz. na oddzielnych kartkach i opatrzyć kolejnym numerem odpowiadającym numerowi użytemu w tekście oraz oznaczyć (na górze strony ołówkiem) nazwiskiem pierwszego autora i początkowymi wyrazami tytułu pracy.

Tabele należy kolejno numerować cyframi arabskimi. Tytuły tabel i nagłówki rubryk powinny jasno opisywać ich treść zaznaczając, z jakich (jakiej) pracy) pochodzą informacje podane w tabeli.

Ryciny, tj. wykresy, rysunki, schematy lub fotografie należy opatrzyć numeracją w kolejności ich omówienia w tekście. Przyjmuje się zasadę numeracji rycin cyframi arabskimi, a wzorów cyframi rzymskimi. Fotografie czarno-białe (kontrastowe) powinny być wykonane na papierze matowym. Pozostałe ryciny należy wykonać tuszem na białym papierze lub na kalce technicznej. Wymiar ryciny nie powinien być mniejszy niż 10×15 cm, a naniesione linie nie powinny być cieńsze niż 1 mm. Ramki ujmujące wykresy można wykonać linią cieńszą niż linie właściwe wykresu. Cyfry i litery służące do opisu rysunku powinny mieć wysokość nie mniejszą niż 5 mm. Na rysunkach nie należy umieszczać opisów słownych, lecz posługiwać się skrótami. Osie wykresów natomiast winny być opatrzone napisem łatwo zrozumiałym. Dla oznaczenia punktów doświadczalnych można stosować następujące symbole: ○ □ △ ● ■ ▲. Rycinę należy opatrzyć na odwrocie oznaczeniem „góra” i „dół” (ołówkiem). Decyzję o stopniu zmniejszenia ryciny podejmie wydawca.

Podpisy i objaśnienia pod rycinami powinny być dołączone na oddzielnej kartce. Oznaczenia, których nie można wpisać na maszynie, należy wyraźnie nanieść czarnym tuszem.

Ze względu na wewnętrzną spójność artykułu zaleca się autorom konstruowanie oryginalnych rysunków i zbiorczych tabel na podstawie danych z piśmiennictwa. Prawie wszystkie czasopisma zastrzegają sobie wyłączność druku prac wraz z ich dokumentacją (*Copyright*). Przed włączeniem tabel, wykresów czy schematów do artykułu przeznaczonego do publikacji w *Postęпах Biochemii* należy uzyskać zgodę na przedruk i przedłożyć ją Redakcji.

Redakcja prosi o właściwe pakowanie artykułów, aby zabezpieczyć maszynopis i ilustracje przed pogięciem.



## SPIS TREŚCI

Profesor Wanda Mejbaum-Katzenellenbogen — Wspomnienie . . . . .	3
Artykuły	
J. Gemel — Rola fosforylacji i defosforylacji białek w regulacji aktywności metabolicznej chloroplastów . . . . .	7
W. Marczewski — Rola karboksylazy fosfoenolopirogronianu w roślinach . . . . .	29
J. Skangiel-Kramaska — Neuroreceptory . . . . .	45
J. Noworytko, A. Guzdek — Potranslacyjne modyfikacje glikoprotein . . . . .	65
M. Rucka, T. Winnicki, J. S. Żuk — Membrany (błony) enzymatyczne . . . . .	81
M. Rucka, J. S. Żuk, T. Winnicki — Enzymatyczne reaktory membranowe (błonowe) . . . . .	93
Sprawozdanie	
III Sympozjum Fluorowe Polskiego Towarzystwa Biochemicznego w Szczecinie (D. Samujło, Z. Machoy) . . . . .	107