

ZBIGNIEW KRUPA

ZASTOSOWANIE ENZYMÓW LIPOLITYCZNYCH W BADANIACH NAD ROLĄ LIPIDÓW W BŁONACH CHLOROPLASTOWYCH

W okresie ostatnich dwudziestu lat jesteśmy świadkami szczególnie szybkich postępów w badaniach nad strukturą i funkcją błon biologicznych, w tym również błon chloroplastowych. Ulepszone, coraz bardziej „wyrafinowane” metody badawcze pozwalające stosunkowo dobrze poznać ilościowy i jakościowy skład lipoproteinowych błon biologicznych dały podstawy do opracowania hipotetycznych modeli błon różnych organelli komórkowych. Wiele z tych badań dotyczy roli lipidów jako strukturalnych i funkcjonalnych składników błon chloroplastowych. Jedną z wielu metod jest zastosowanie enzymów lipolitycznych hydrolizujących mniej lub bardziej selektywnie lipidy błon chloroplastów.

1. Ogólna charakterystyka enzymów lipolitycznych

Podany niżej podział i ogólne charakterystyki enzymów lipolitycznych z konieczności nie obejmują wszystkich znanych enzymów hydrolizujących lipidy zarówno pochodzenia zwierzęcego jak i roślinnego, ponieważ tylko niektóre z nich znalazły zastosowanie w badaniach omawianych w niniejszym artykule. W związku z tym tylko te enzymy będą tu dokładniej omówione.

Enzymy hydrolizujące lipidy określone są terminem „lipaza”. Jest to jednakże termin mylący, ponieważ według Desnuelle i Savaryego oraz Jensena (cyt. wg [24]) „prawdziwa” lipaza (hydrolaza acylowa triacyloglicerolu, E.C.3.1.1.3) jest enzymem hydrolizującym reszty acylowe w zemulgowanych triacyloglicerolach. Znacznie bardziej prawidłowe będzie więc nazywanie ich enzymami lipolitycznymi z podziałem na hydrolazy acylowe i enzymy hydrolizujące polarne grupy lipidów.

W badaniach nad rolą lipidów w błonach chloroplastowych stosuje się głównie różne endogenne i egzogenne hydrolazy acylowe (lipaza trzuskowa, galaktolipaza, sulfolipaza, fosfolipazy A_1 i A_2 , lipaza z bulw ziemniaka, lipaza z kielków pszenicy) oraz niektóre enzymy hydrolizujące polarne grupy lipidów (fosfolipaza C i D).

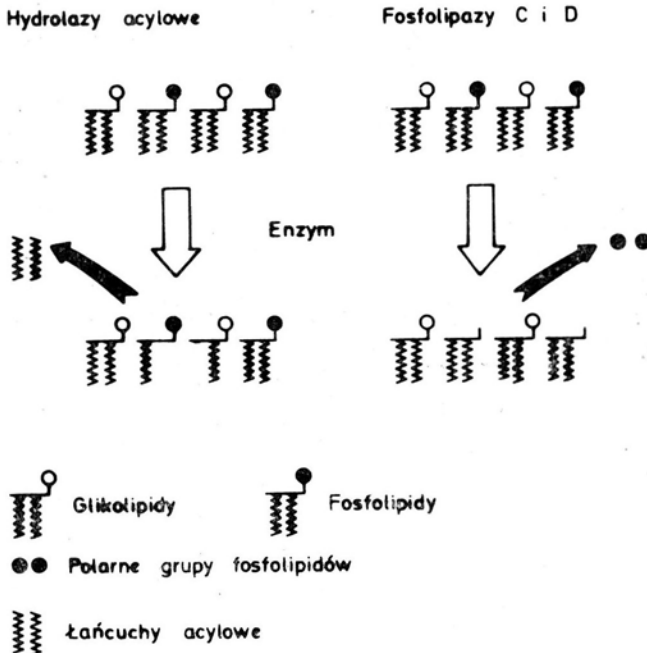
1.1. Hydrolazy acylowe

Hydrolazy acylowe występują powszechnie w organizmach roślinnych i zwierzęcych, zarówno w cytoplazmie podstawowej jak i w różnych organellach komórkowych [23].

Deacylacja lipidów przez hydrolazy acylowe zachodzi na ogół stopniowo — poprzez pośrednik monoacylowy. Wyraźniejsze zróżnicowanie działania tych enzymów na reszty acylowe zaobserwowano jedynie w przypadku fosfolipaz A — fosfolipaza A₁ hydrolizuje najpierw resztę acylową znajdującą się w pozycji 1 cząsteczki lipidu, natomiast fosfolipaza A₂ w pozycji 2. Pewną niedogodnością przy stosowaniu w badaniach hydrolaz acylowych jest to, że są one stosunkowo niespecyficzne. Zróżnicowanie nazw tych enzymów (galaktolipaza, sulfolipaza czy fosfolipaza A) oznacza jedynie to, że w określonych warunkach inkubacji (pH, temperatura, jony metali) enzymy te hydrolizują przede wszystkim określone lipidy: galaktolipidy, fosfolipidy, sulfolipid [11, 12, 22—25, 29, 30, 55, 76].

1.2. Enzymy hydrolizujące polarne grupy lipidów

Pośród enzymów hydrolizujących polarne grupy lipidów w badaniach nad błonami chloroplastowymi znalazły zastosowanie fosfolipazy C i D. Fosfolipaza C to enzym rzadko występujący u roślin. Obecność jej we frakcji plastydowej homogenatu korzenia marchwi wykazał Kates [40]. Fosfolipaza D występuje u wielu roślin wyższych i w niektórych glonach [4, 5, 14, 15, 41, 67].



Ryc. 1. Schemat hydrolizy lipidów błon przez enzymy lipolityczne

Obydwa te enzymy hydrolizują fosfatydylocholinę, fosfatydyloetanolaminę, fosfatydyloserynę, fosfatydyloglicerol, difosfatydyloglicerol i estry O-aminoacylowe fosfatydyloglicerolu. Tak więc i w tym przypadku nie możemy mówić o wąskiej specyficzności substratowej (17).

Oddziaływanie omówionych tu dwóch grup enzymów lipolitycznych na lipidy błon przedstawia, w dużym uproszczeniu, rycina 1.

2. Wpływ egzo- i endogennych enzymów lipolitycznych na reakcje fotochemiczne i strukturę chloroplastów

2.1. Lipaza trzustkowa

Pierwsze prace dotyczące wpływu lipaz na strukturę i funkcję aparatu fotosyntetycznego pojawiły się w literaturze w końcu lat pięćdziesiątych. Spikes [68] stwierdził, że lipaza roślinna i fosfolipaza A nie oddziałują na aktywność reakcji Hilla w chloroplastach izolowanych z liści buraka cukrowego. Negatywny wynik doświadczeń Spikesa na szczęście nie spowodował poniechania dalszych badań. W 1959 roku Hinkson i Vernon [34] wykazali, że lipaza trzustkowa hamuje w 80% aktywność reakcji Hilla. Oprócz inhibicji transportu elektronów lipaza ta powodowała też zmiany w strukturze chloroplastów („rozklejanie się” lamell) u *Euglena gracilis* [26]. Enzym ten silnie hamuje aktywność II układu fotosyntezy, natomiast słabo lub wcale nie wpływa na I układ fotosyntezy i fosforylację cykliczną [13, 27, 46, 53, 54].

Butler i Okayama [13] oraz Okayama i in. [54] wykazali, że lipaza trzustkowa powoduje destrukcję C-550 — pierwotnego akceptora elektronów w II układzie fotosyntezy oraz narusza funkcję cytochromu b_{559} .

2.2. Fosfolipazy

Szereg prac dotyczy wpływu fosfolipaz na strukturę i aktywność fotochemiczną chloroplastów. W badaniach tych stosowano zarówno fosfolipazy A_1 i A_2 (hydrolazy acylowe) jak i fosfolipazy C i D hydrolizujące polarne grupy fosfolipidów.

W opinii większości badaczy fosfolipazy A silnie hamują aktywność II układu fotosyntezy i fosforylacji niecyklicznej, przy czym efekt ten jest, ich zdaniem, wywołany destrukcyjnym oddziaływaniem produktów hydrolizy lipidów (wolne kwasy tłuszczowe i lysofosfolipidy) na transport elektronów w tym fotoukładzie [27, 35—38, 49, 59]. Duval i in. [20] stwierdzili, że fosfolipaza A_2 usuwając z błon tylakoidowych chloroplastów grochu około 80% fosfatydyloglicerolu powoduje spadek wydajności przekazywania energii wzbudzenia elektronowego w obrębie barwników antenowych związanych z centrum aktywnym II fotoukładu oraz znaczny spadek redukcji puli plastochinonu. Autorzy ci wykluczają wpływ produktów hydrolizy na badane procesy.

Odmienne od wyżej omówionych wyniki badań uzyskali Ostrowskaja i in. [57]. Ich zdaniem fosfolipaza A hamuje jedynie aktywność I układu fotosyntezy

i to poprzez bezpośrednie oddziaływanie na fosfolipidy związane, według nich, z centrum aktywnym I fotoukładu.

Uhrig i Tevini [71, 72] stwierdzili, że fosfolipazy C i D silnie hamują aktywność transportu elektronów w II układzie fotosyntezy oraz fosforylację niecykliczną i cykliczną. Działanie tych fosfolipaz autorzy przypisują głównie destrukcji ważnych elementów strukturalnych błony jakimi są fosfolipidy, nie wykluczając jednak rozkojarzającego wpływu produktów hydrolizy.

2.3. Galaktolipaza

Szczególnie interesujące są badania nad galaktolipazą. Enzym ten będący hydrolazą acylową rozkładającą głównie galaktolipidy, dominujące lipidy chloroplastów, po raz pierwszy wyizolowali Sastry i Kates [60] z liści *Phaseolus multiflorus*. Jego preparatykę udoskonalono stopniowo w latach późniejszych [3, 32, 33, 61].

McCarty i Jagendorf [47] stwierdzili, że endogenna galaktolipaza uaktywniająca się w czasie starzenia chloroplastów hamuje II układ fotosyntezy i rozkojarza transport elektronów oraz fotofosforylację. Bamberger i Park [6] oraz Wintermans i in. [74] wykazali, że galaktolipaza narusza integralność błony chloroplastowej szczególnie istotną dla fosforylacji cyklicznej i niecyklicznej. Nie sposób też, ich zdaniem, pominąć roli kwasu linolenowego uwalnianego na skutek hydrolizy lipidów chloroplastowych. Autorzy ci stwierdzają, że nawet przy niskich stężeniach (0.1 mola kwasu/mol chlorofilu) następuje zahamowanie aktywności fotofosforylacji, a przy stężeniach wyższych (1 mol kwasu/mol chlorofilu) również transportu elektronów w II układzie fotosyntezy. Interesujące wyniki badań nad wpływem galaktolipazy na fotosyntetyczny transport elektronów przedstawili Ostrowskaja i in. [56]. Wykazali oni, że galaktolipaza silnie hamuje aktywność I układu fotosyntezy w całych chloroplastach i w lekkiej subfrakcji chloroplastowej. Efekt ten autorzy przypisują rozkładowi ważnych strukturalnych lipidów chloroplastowych (monogalaktolipidu i digalaktolipidu) związanych ich zdaniem przede wszystkim z centrum aktywnym I fotoukładu. Autorzy wykluczają ponadto inhibujące działanie kwasu linolenowego dowodząc, że ilości kwasu linolenowego uwalniającego się w czasie hydrolizy nie powodują, w przeciwieństwie do galaktolipazy, zmian w widmach fluorescencji niskotemperaturowej w całych chloroplastach i w lekkiej subfrakcji. Na powiązanie galaktolipidów z centrum aktywnym I układu fotosyntezy wskazują również wyniki badań nad galaktolipazą opublikowane przez Kochubei i in. [42].

Odmienne poglądy na działanie galaktolipazy na fotosyntetyczny transport elektronów reprezentują w swych pracach Anderson i in. [3] oraz Shaw i in. [61]. Ich zdaniem około 50—60% lipidów chloroplastowych (monogalaktolipidu, digalaktolipidu, fosfatydyloglicerolu i fosfatydylocholiny) może być zhydrolizowane przez galaktolipazę bez wpływu na transport elektronów pod warunkiem, że do mieszaniny reakcyjnej dodano uprzednio odtłuszczonej albuminy krwi wołu (BSA) wiążącą uwalniane w tym procesie kwasy tłuszczowe [21, 39]. Działanie galaktolipazy na I i II układ fotosyntezy autorzy ci sprowadzają więc wyłącznie do pośred-

niego, hamującego wpływu wolnych kwasów tłuszczowych (szczególnie kwasu linolenowego).

Krupa i Baszyński [45] i Krupa [44] badając wpływ galaktolipazy na transport elektronów w I układzie fotosyntezy w chloroplastach szpinaku wykazali, że enzym ten usuwając z błon chloroplastowych około 40% galaktolipidów (w tym 56% monogalaktolipidu i 15% digalaktolipidu) hamuje w około 75% aktywność I fotoukładu. Autorzy ci stwierdzili również, że albumina krwi wołu powoduje nieznaczną, bo zaledwie 12% reaktywację tego fotoukładu. Ponadto ilości uwalnianych w trakcie hydrolizy enzymatycznej kwasów tłuszczowych (około 3.1 mola kwasu/mol chlorofilu) nie powinny, zgodnie ze stwierdzeniami innych autorów [9, 10, 31, 63, 66] hamować aktywności I fotoukładu. Z powyższych rozważań wynika więc, że inhibicję transportu elektronów w I układzie fotosyntezy wywołaną przez działanie galaktolipazy należy przede wszystkim rozpatrywać jako efekt usunięcia z błon chloroplastowych lipidów, istotnych składników strukturalnych.

Teza Krupy i Baszyńskiego została potwierdzona przez Michalskiego i Kaniugę [48]. Autorzy ci, badając wpływ egzogennej galaktolipazy z liści fasoli na aktywność fotochemiczną chloroplastów pomidora stwierdzili, że inhibicja transportu elektronów w I układzie fotosyntezy jest efektem usunięcia z błon ważnych lipidów strukturalnych i nie można jej odwrócić przez dodanie do mieszaniny reakcyjnej albuminy krwi wołu. Znaczy to, że spadek aktywności I fotoukładu nie wynika z akumulacji wolnych kwasów tłuszczowych.

Interesujące wyniki doświadczeń nad wpływem enzymów proteolitycznych i lipolitycznych na cząstki subchloroplastowe wzbogacone w aktywność I układu fotosyntezy przedstawili Borisevitch i in. [7]. Z badań tych wynika, że równoczesne oddziaływanie fosfolipazą A i galaktolipazą na cząstki PS I poddane analizie elektretowo-termicznej powoduje w nich znaczne zmiany prądu termodepolaryzacji. Tak więc destrukcja lipidów, samych w sobie w niewielkim stopniu związanych z termodepolaryzacją błon, prowadzi do zmian strukturalnych w obrębie I fotoukładu pozwalających na większą swobodę zmian konformacyjnych cząstek białkowych tego fotoukładu. Efektem tych zmian jest obniżenie wartości prądu termodepolaryzacji.

3. Mechanizmy oddziaływania enzymów lipolitycznych na aktywność fotochemiczną chloroplastów

Wyniki badań nad wpływem enzymów lipolitycznych na strukturę i funkcję chloroplastów przedstawione w niniejszym artykule i sposób ich interpretacji przez różnych autorów budzą wiele wątpliwości. Zdaniem autora artykułu wątpliwości te wynikają z kilku przyczyn:

a. nie poznano dotychczas enzymu lipolitycznego, który wykazywałby wąską specyficzność substratową tylko w stosunku do jednego określonego lipidu. Udaje się jedynie, dobierając odpowiednie warunki inkubacji, specyficzność tę znacznie zawęzić,

b. niezwykle trudne jest oddzielenie od siebie efektów bezpośredniego oddziaływania tych enzymów na strukturę błon od pośredniego wpływu produktów hydrolitycznego rozkładu lipidów, takich jak wolne kwasy tłuszczowe, monoglicerydy, lysolipidy i inne,

c. niejednokrotnie różni autorzy badając to samo zjawisko uzyskiwali wyniki, które rozmaicie interpretowali.

3.1. Pośrednie oddziaływanie enzymów lipolitycznych na strukturę i funkcję błon chloroplastowych

3.1.1. Wpływ produktów hydrolizy lipidów chloroplastowych na aktywności fotochemiczne. Wyniki wielu badań wskazują na to, że wolne kwasy tłuszczowe (przede wszystkim nienasycone) zarówno egzo- jak i endogenne uwalniane w czasie enzymatycznej hydrolizy lipidów, silnie hamują aktywności fotochemiczne chloroplastów [3, 16, 47, 49, 50, 58, 61, 73, 74]. Większość tych badaczy szczególnie podkreśla, że oddziaływanie enzymów lipolitycznych na strukturę i funkcję chloroplastów polega na inhibującym działaniu wolnych kwasów tłuszczowych na aktywność I i II układu fotosyntezy. Podobną rolę przypisuje się też takim produktom hydrolizy lipidów, jak kwas fosfatydowy [59] czy lysolipidy [37, 38].

Wydaje się jednak, że hamowanie aktywności fotochemicznych przez wolne kwasy tłuszczowe należy zawęzić wyłącznie do II układu fotosyntezy. Wielu badaczy dowiodło bowiem, że stężenia kwasów tłuszczowych uwalnianych w czasie hydrolizy lipidów błon hamują jedynie transport elektronów w II układzie fotosyntezy (przede wszystkim między hipotetycznymi przenośnikami Y_2 i Y_3), natomiast na I fotoukład nie mają w tych stężeniach żadnego ujemnego wpływu [9, 10, 31, 48, 62—66].

3.1.2. Detergentowe własności produktów hydrolizy lipidów. W ciągu ostatnich kilku lat badania nad oddziaływaniem enzymów lipolitycznych na błony biologiczne oraz monomolekularne i bimolekularne sztuczne błony lipidowe dowiodły, że gęstość upakowania lipidów w błonie jest ważnym parametrem hydrolizy enzymatycznej. Stwierdzono, że zbyt duże napięcie powierzchniowe błony (powyżej 30 mN/m) znacznie utrudnia lub w ogóle uniemożliwia penetrację błony przez enzymy lipolityczne i hydrolizę jej składników lipidowych [18, 19, 70].

Wiadomo również, że niektóre produkty hydrolizy enzymatycznej lipidów takie, jak wolne kwasy tłuszczowe (szczególnie nienasycone) i lysolipidy są związkami czynnymi powierzchniowo [1, 23, 28, 43, 51, 52]. Związki te działając jako silne detergenty mogłyby, zmniejszając napięcie powierzchniowe błony, rozluźnić jej strukturę i ułatwić działanie enzymów lipolitycznych. Tak więc oprócz bezpośredniego oddziaływania kwasów tłuszczowych na aktywność fotochemiczną chloroplastów należy wziąć pod uwagę również i ten aspekt ich działania na błony biologiczne.

3.1.3. Albumina krwi wołu (BSA) jako czynnik zabezpieczający błony chloroplastowe przed działaniem enzymów lipolitycznych. W badaniach nad wpływem enzymów lipolitycznych na błony chloroplastowe bardzo często stosuje się odtłuszczoną albuminę krwi wołu (BSA), znaną ze zdolności do wiązania wolnych kwasów tłuszczowych i lysolipidów [21, 39]. Powszechnie uważa się, że białko to, wiążąc produkty hydrolizy lipidów, uniemożliwia ich dalsze hamujące działanie na aktywność transportu elektronów w fotoukładach [3, 61]. Nie można jednak wykluczyć, że BSA usuwając z bezpośredniego otoczenia trawionej błony silne detergenty, jakimi są produkty hydrolizy lipidów, uniemożliwia tym samym dalsze działanie enzymu szczególnie w przypadku błon o dużym napięciu powierzchniowym.

Hirayama i Matsui [35] sądzą, że enzymatyczna inhibicja transportu elektronów może być efektem lokalnych uszkodzeń błony, a albumina mogłaby te uszkodzenia naprawiać i zabezpieczać błonę chloroplastową przed działaniem enzymów lipolitycznych. Możliwe też, że albumina krwi wołu łagodzi nieco działanie enzymów lipolitycznych i nie dopuszcza do nieodwracalnych zmian konformacyjnych w białkach błon [69]. Oznaczałoby to, że pozostałe w błonie lipidy zdolne są nadal do utrzymywania białek błony w takim stanie konformacyjnym i strukturalnym, który pozwala na zachowanie aktywności związanych z tą błoną bądź też umożliwia stosunkowo łatwą ich rekonstrukcję.

3.2. Bezpośrednie oddziaływanie enzymów lipolitycznych na strukturę i funkcję błon chloroplastowych

Jak nietrudno zauważyć z przedstawionych powyżej rozważań, autorzy omówionych prac rozpatrują wpływ enzymów lipolitycznych na błony chloroplastowe przede wszystkim jako wtórne oddziaływanie produktów hydrolizy. Należy jednak pamiętać o tym, że struktura i funkcja błon są ze sobą powiązane i wzajemnie się warunkują. Lipidy błon biologicznych umożliwiają utrzymanie prawidłowego stanu konformacyjnego cząstek białkowych i właściwego ich miejsca w strukturze błony, zapewniając tym samym prawidłowy przebieg między innymi reakcji fotochemicznych w chloroplastach. Zdaniem autora niniejszego artykułu inhibujące działanie enzymów lipolitycznych na reakcje transportu elektronów w błonach tylakoidowych należy rozpatrywać przede wszystkim jako efekt usunięcia z tych błon ważnych składników strukturalnych. Z badań autora [44, 45] wynika, że aktywność transportu elektronów w I układzie fotosyntezy obniżoną do 25% na skutek działania galaktolipazy na chloroplasty szpinaku można w pewnym stopniu przywrócić uzupełniając brakujące galaktolipidy (monogalaktolipid i digalaktolipid). Stopień reaktywacji I układu fotosyntezy wzrastał, gdy oprócz galaktolipidów dodano do błon chloroplastowych również plastocjaninę. Można by więc sądzić, że galaktolipaza rozluźniając strukturę lipidową błony tylakoidowej powoduje również wydostawanie się z niej plastocjaniny. Brak szczegółowych danych doświadczalnych nie pozwala jednak na ostateczne rozstrzygnięcie tego problemu. Być może prowadzone obecnie badania przyniosą odpowiedź na to pytanie.

4. Rola lipidów w błonach chloroplastowych w oparciu o badania z zastosowaniem enzymów lipolitycznych

Niespecyficzność substratowa enzymów lipolitycznych powoduje, że ich oddziaływanie na lipidy błon chloroplastowych jest mało wybiórcze. Stąd też niezwykle trudno jest, wyłącznie na podstawie tego rodzaju badań, określić miejsce i rolę poszczególnych lipidów w błonach chloroplastowych. Istnieją jednak pewne sugestie, które chciałbym tu pokrótce przedstawić.

Bamberger i Park [6] badając wpływ galaktolipazy na błony chloroplastowe stwierdzili, że po działaniu enzymu zmienia się obraz kriorytowanych błon tylakoidowych i ich zdaniem związane jest to z usunięciem galaktolipidów z płynnej frakcji błon tylakoidów. Hoshina i Nishida [38] sądzą, że fosfatydylocholina może odgrywać rolę w stabilizacji struktury błon chloroplastowych. Ciekawe wnioski z badań nad wpływem fosfolipazy A_2 na reakcje fotochemiczne w chloroplastach grochu wyciągnęli Duval i in. [20]. Ich zdaniem kluczowe znaczenie dla aktywności II układu fotosyntezy ma fosfatydyloglicerol, a szczególnie te jego cząsteczki, które zawierają unikalny wśród lipidów chloroplastowych kwas trans- Δ_3 -heksadecenowy (16:1). Lipid ten, oprócz udziału w łączeniu tylakoidów w grana (szybki wzrost zawartości fosfatydyloglicerolu w okresie formowania się struktur granalnych), mógłby zapewniać specyficzne połączenie między fotoukładami a tak zwanym „light harvesting system”. Obecność fosfatydyloglicerolu wpływa też na wielkość puli plastochinonu wykorzystywanej przez II fotoukład. Jeśli pulę plastochinonu wyobrazimy sobie, zgodnie z hipotezą Witta [75] jako strukturę sieciową, fosfatydyloglicerol mógłby warunkować prawidłową organizację tej „sieci”.

Anderson [2] opierając się między innymi na badaniach Bretschera [8] i Zwaala i in. [77] nad wpływem fosfolipaz na błony erytrocytów dowodzących asymetrycznej dystrybucji lipidów między zewnętrzną i wewnętrzną warstwę ich podwójnej błony wyciągnął pewne wnioski o lokalizacji lipidów w błonie tylakoidowej. Obojętne galaktolipidy zawierające dużo nienasyconych kwasów tłuszczowych mogłyby tworzyć płynną frakcję błon tylakoidów ponieważ wiadomo, że im większy stopień nienasyconienia grup acylowych tym większa jest płynność błony. Niektóre fosfolipidy oraz sulfolipid, posiadające bardziej nasycone grupy acylowe, mogłyby być lipidami granicznymi i wiązać się przede wszystkim z kompleksem chlorofilowo-białkowym 2. Ponadto lipidy te dzięki swemu ujemnemu ładunkowi mogłyby wraz z kompleksem chlorofilowo-białkowym 2, przy udziale jonów Mg^{2+} , uczestniczyć w spajaniu błon dwóch sąsiadujących ze sobą tylakoidów.

5. Uwagi końcowe

Niniejszy krótki przegląd badań nad strukturą i funkcją błon chloroplastowych z zastosowaniem enzymów lipolitycznych dowodzi, że metoda ta nie może być stosowana jako jedyna, w oderwaniu od innych metod badawczych stosowanych w poznawaniu struktury i funkcji lipidów w błonach (mikroskopia elektronowa,

metody spektroskopowe, metody immunologiczne, metody ekstrakcyjne przy użyciu niepolarnych rozpuszczalników organicznych). Konieczne jest niewątpliwie syntetyczne podsumowanie dotychczasowych wyników i opracowanie jednolitego modelu budowy błon chloroplastowych, jednakże wobec znacznych braków w danych doświadczalnych na taką syntezę trzeba będzie jeszcze poczekać. Należy jednak pamiętać o tym, że struktura i funkcja błony są ze sobą ściśle powiązane i każde naruszenie struktury powoduje zakłócenie funkcji z niej wynikających.

LITERATURA

- [1] Acker L., Geyer J., 1969. Über die Phospholipase B des Gerstenmalzes. II. Untersuchungen zur Wirkungsweise des Enzyms. Z. Lebensm. Untersuch. Forsch. 140, 269—276.
- [2] Anderson J. M., 1975. Molecular organization of chloroplast thylakoids. Biochim. Biophys. Acta 416, 191—235.
- [3] Anderson M. M., McCarty R. E., Zimmer E. A., 1974. The role of galactolipids in spinach chloroplast lamellar membranes. I. Partial purification of a bean leaf galactolipid lipase and its action on subchloroplast particles. Plant Physiol. 53, 699—704.
- [4] Antia, N. J., Bilinski E., Lav Y., 1970. Identification and characterization of phospholipase D in a unicellular red alga (*Porphyridium cruentum*). Can. J. Biochem. 48, 643—648.
- [5] Astrachan L., 1973. The bond hydrolyzed by cardiolipin-specific phospholipase D. Biochim. Biophys. Acta 296, 79—88.
- [6] Bamberger E. S., Park R. B., 1966. Effect of hydrolytic enzymes on the photosynthetic efficiency and morphology of chloroplasts. Plant Physiol. 41, 1591—1600.
- [7] Borisevitch G. P., Kononenko A. A., Rubin A. B., Kochubej M., Schadchina T. M., 1979. Effects of external electric fields on pea subchloroplast particles. Plant Sci. Lett. 14, 275—280.
- [8] Bretscher M. S., 1973. Membrane structure: Some general principles. Science 181, 622—629.
- [9] Brody S. S., Brody M., Döring G., 1970. Effects of linolenic acid on system II and system I — associated light induced changes in absorption of chloroplasts. Z. Naturforsch. 25 b, 367—372.
- [10] Brody S. S., 1970. The effects of linolenic acid and extracts of *Ricinus* leaf on system I and system II. Z. Naturforsch. 25 b, 855—859.
- [11] Burns D. D., Galliard T., Harwood J. L., 1977. Catabolism of sulphoquinovosyl diacylglycerol by an enzyme preparation from *Phaseolus multiflorus*. Phytochemistry 16, 651—654.
- [12] Burns D. D., Galliard T., Harwood J. L., 1979. Purification of acyl hydrolase enzymes from the leaves of *Phaseolus multiflorus*. Phytochemistry 18, 1793—1797.
- [13] Butler W. L., Okayama S., 1971. The photoreduction of C-550 in chloroplasts and its inhibition by lipase. Biochim. Biophys. Acta 245, 237—239.
- [14] Cole R., Bennis G., Proulx P., 1974. Cardiolipin specific phospholipase D activity in *Escherichia coli* extracts. Biochim. Biophys. Acta 337, 325—332.
- [15] Comes P., Kleinig H., 1973. Phospholipids and phospholipase D in the true slime mold *Physarum polycephalum*. Biochim. Biophys. Acta 316, 13—18.
- [16] Constantopoulos G., Kenyon C. N., 1968. Release of free fatty acids and loss of Hill activity by aging spinach chloroplasts. Plant Physiol. 43, 531—536.
- [17] Dawson R. M. C., 1973. Specificity of enzymes involved in the metabolism of phospholipids [w:] Form and Function of Phospholipids, red. G. B. Ansell, R. M. C. Dawson, J. N. Hawthorne, Elsevier Scientific Company, Amsterdam—London—New York, 97—116.
- [18] Demel R. A., 1979. Interaction of lipids and proteins in model systems [w:] Proceedings of the 5th Winter School on Biophysics of Membrane Transport, Wrocław, t. 1, 267—282.
- [19] Demel R. A., Geurts van Kessel W. S. M., Zwaal R. F. A., Roelofsen B., van Deenen L. L. M.,

1975. Relation between various phospholipase actions on human red cell membranes and the interfacial phospholipid pressure in monolayers. *Biochim. Biophys. Acta* 406, 97—107.
- [20] Duval J. C., Tremolieres A., Dubacq J. P., 1979. The possible role of transhexadecenoic acid and phosphatidylglycerol in light reactions of photosynthesis. The photochemistry and fluorescence properties of young pea leaf chloroplasts treatment by phospholipase A₂. *FEBS Lett.* 106, 414—418.
- [21] Friedlander M., Neumann J., 1968. Stimulation of photoreactions of isolated chloroplasts by serum albumin. *Plant Physiol.* 43, 1249—1254.
- [22] Galliard T., 1971. Enzymic deacylation of lipids in plants. The effects of free fatty acids on the hydrolysis of phospholipids by the lipolytic acyl hydrolase of potato tuber. *Eur. J. Biochem.*, 21, 90—98.
- [23] Galliard T., 1973. Phospholipid metabolism in photosynthetic plants [w:] *Form and Function of Phospholipids*, red. G. B. Ansell, R. M. C. Dawson, J. N. Hawthorne, Elsevier Scientific Publishing Company, Amsterdam—London—New York, 253—288.
- [24] Galliard T., 1975. Degradation of plant lipids by hydrolytic and oxidative enzymes [w:] *Recent Advances in the Chemistry and Biochemistry of Plant Lipids*, red. T. Galliard, E. I. Mercer, Academic Press, London—New York—San Francisco, 319—357.
- [25] Galliard T., Matthew J. A., 1973. Lipids of potato tuber. II. Lipid-degrading enzymes in different varieties of potato tuber. *J. Sci. Fd. Agric.* 24, 623—627.
- [26] Greenblatt C. L., Olson R. A., Engel E. K., 1960. Absorption microscopy of enzymatically treated cell-free chloroplasts. *J. Biophys. Biochem. Cytol.* 7, 235—238.
- [27] Gressel J., Avron M., 1965. The effects of structural degradation on the coupled photochemical activities of isolated chloroplasts. *Biochim. Biophys. Acta* 94, 37—41.
- [28] Habermann E., Mölbert E., 1954. Zur morphologischen Differenzierung der Hämolyse durch Bienengift, Schlangengift, Lysolecithin und Digitonin. *Arch. Exper. Path. Pharmacol.* 223, 203—216.
- [29] Hasson E. P., Laties G. G., 1976. Separation and characterization of potato lipid acylhydrolases. *Plant Physiol.* 57, 142—147.
- [30] Hasson E. P., Laties G. G., 1976. Purification and characterization of an A type phospholipase from potato and its effect on potato mitochondria. *Plant Physiol.* 57, 148—152.
- [31] Hawcroft D. M., Friend J., 1975. Stimulation by added lipids of phosphorylation associated with photosystem I [w:] *Proceedings of the 3rd International Congress on Photosynthesis*, red. M. Avron, Elsevier Scientific Publishing Company, Amsterdam—Oxford—New York, t. 1, 603—608.
- [32] Helmsing P. J., 1967. Hydrolysis of galactolipids by enzymes in spinach leaves. *Biochim. Biophys. Acta* 144, 470—472.
- [33] Helmsing P. J., 1969. Purification and properties of galactolipase. *Biochim. Biophys. Acta* 178, 519—533.
- [34] Hinkson J. W., Vernon L. P., 1959. Comparison of three photochemical activities of chloroplasts. *Plant Physiol.* 34, 268—272.
- [35] Hirayama O., Matsui T., 1976. Effects of lipolytic enzymes on the photochemical activities of spinach chloroplasts. *Biochim. Biophys. Acta* 432, 540—547.
- [36] Hirayama O., Nomotobori T., 1978. Preparation and characterization of phospholipid-depleted chloroplasts. *Biochim. Biophys. Acta* 502, 11—16.
- [37] Hoshina S., Kaji T., Nishida K., 1975. Photoswelling and light-inactivation of isolated chloroplasts. I. Change in lipid content in light-aged chloroplasts. *Plant Cell Physiol.* 16, 465—474.
- [38] Hoshina S., Nishida K., 1975. Photoswelling and light inactivation of isolated chloroplasts. II. Functional and structural changes in isolated chloroplasts under the influence of lysolecithin. *Plant Cell Physiol.* 16, 475—484.
- [39] Howes C. D., Stern A. I., 1969. Photophosphorylation during chloroplast development in red kidney bean. I. Characterization of the mature system and the effect of BSA and sulfhydryl reagents. *Plant Physiol.* 44, 1515—1522.
- [40] Kates M., 1955. Hydrolysis of lecithin by plant plastid enzymes. *Can. J. Biochem.* 33, 575—589.
- [41] Kates M., Sastry P. S., 1969. Phospholipase D [w:] *Methods in Enzymology*, red. J. N. Lowenstein, Academic Press, New York and London, t. 14, 197—204.
- [42] Kochubei S. M., Shadchina T. M., Kononenko A. A., Lukashev E. P., Timofeev K. N.,

- Matorin D. N., 1975. Effect of galactolipase on photoreactions in light chloroplast fragments. *Photosynthetica* 9, 255—260.
- [43] Krogmann D. W., Jagendorf A. T., 1959. Inhibition of the Hill reaction by fatty acids and metal chelating agents. *Arch. Biochem. Biophys.* 80, 421—430.
- [44] Krupa Z., 1978. Udział lipidów chloroplastowych w aktywności I układu fotosyntezy. Rozprawa doktorska, UMCS Lublin, 32—37.
- [45] Krupa Z., Baszyński T., 1975. Requirement of galactolipids for photosystem I activity in lyophilized spinach chloroplasts. *Biochim. Biophys. Acta* 408, 26—34.
- [46] Mantai K. E., 1970. Some effects of hydrolytic enzymes on coupled and uncoupled electron flow in chloroplasts. *Plant Physiol.* 45, 563—566.
- [47] McCarty R. E., Jagendorf A. T., 1965. Chloroplast damage due to enzymatic hydrolysis of endogenous lipids. *Plant Physiol.* 40, 725—735.
- [48] Michalski W. P., Kaniuga Z., 1980. Photosynthetic apparatus in chilling-sensitive plants. VII. Comparison of the effect of galactolipase treatment of chloroplasts and cold-dark storage of leaves on photosynthetic electron flow. *Biochim. Biophys. Acta* 589, 84—99.
- [49] Mołotkowskij J. G., 1968. Gidroliz fosfolipidow i obrazowanie swobodnych żirnych kisłot w izolowanych chloroplastach. *Biochimia* 33, 961—968.
- [50] Mudd J. B., 1967. Fat metabolism in plants. *Ann. Rev. Plant Physiol.* 18, 229—252.
- [51] Neumann W., Habermann E., 1957. Clearing action of lysolecithin. *Nature* 180, 1284.
- [52] Nygaard A. P., Dianzani M. V., Bahr G. F., 1954. The effect of lecithinase A on the morphology of isolated mitochondria. *Exper. Cell. Res.* 6, 455—460.
- [53] Okayama S., 1964. Effect of lipase-digestion on photochemical activities of isolated chloroplasts. *Plant Cell Physiol.* 5, 145—156.
- [54] Okayama S., Epel B. L., Erixon K., Lozier R., Butler W. L., 1971. The effects of lipase on spinach and *Chlamydomonas* chloroplasts. *Biochim. Biophys. Acta* 253, 476—482.
- [55] Opute F. I., 1975. Lipase activity in germinating seedlings of *Cucumeropsis edulis*. *J. Exp. Bot.* 26, 379—386.
- [56] Ostrovskaya L. K., Kochubey S. M., Yakovenko A. M., Manuilskaya S. V., 1972. The role of lipid components in molecular organization of photosynthetic system of higher plants [w:] Proceedings of the 2nd International Congress on Photosynthesis Research, red. G. Forti, M. Avron, A. Melandri, Dr. W. Junk N. V. Publishers, Haque, t. 2, 1619—1630.
- [57] Ostrowskaja Ł. K., Koczubej S. M., Szadczina T. M., 1975. Diejstwije fosfolipazy A na spektralnyje i fotochimizjeskije swojstwa chloroplastow i ich fragmentow. *Biochimia* 40, 169—174.
- [58] Pedersen T. A., Kirk M., Bassham J. A., 1966. Inhibition of photophosphorylation and photosynthetic carbon cycle reactions by fatty acids and esters. *Biochim. Biophys. Acta* 112, 189—203.
- [59] Rodionow W. S., Niuppiewa K. A., Chołopcewa N. P., Markowa Ł. W., Drozdow C. N., 1977. Razpriedielenije fosfolipidow w listiach niekatorych widow karfofielia w zawisimosti ot zamorozkow. *Fizjol. Rast.* 24, 845—853.
- [60] Sastry S. P., Kates M., 1964. Hydrolysis of monogalactosyl and digalactosyl diglycerides by specific enzymes in runner-bean leaves. *Biochemistry* 3, 1280—1287.
- [61] Shaw A. B., Anderson M. M., McCarty R. E., 1976. Role of galactolipids in spinach chloroplast lamellar membranes. II. Effects of galactolipid depletion on phosphorylation and electron flow. *Plant Physiol.* 57, 724—729.
- [62] Siegenthaler P. A., 1972. Aging of the photosynthetic apparatus. IV. Similarity between the effects of aging and unsaturated fatty acids on isolated spinach chloroplasts as expressed by volume changes. *Biochim. Biophys. Acta* 275, 182—191.
- [63] Siegenthaler P. A., 1973. Change in pH dependence and sequential inhibition of photosynthetic activity in chloroplasts by unsaturated fatty acids. *Biochim. Biophys. Acta* 305, 153—162.
- [64] Siegenthaler P. A., 1974. Inhibition of photosystem II electron transport in chloroplasts by fatty acids and restoration of its activity by Mn^{2+} . *FEBS Lett.* 39, 337—340.
- [65] Siegenthaler P. A., Horakova J., 1975. Control of the photosynthetic electron transport by free fatty acids and by Mn^{2+} salts [w:] Proceedings of the 3rd International Congress on Photosyn-

- thesis, red. M. Avron, Elsevier Scientific Publishing Company, Amsterdam—Oxford—New York, t. 1, 655—664.
- [66] Siegenthaler P. A., Rawyler A., 1977. Aging of the photosynthetic apparatus. V. Change in pH dependence of electron transport and relationships to endogenous free fatty acids. *Plant Sci. Lett.* 9, 265—273.
- [67] Soucek A., Michalec C., Souckova A., 1971. Identification and characterization of a new enzyme of the group „phospholipase D” isolated from *Corynebacterium ovis*. *Biochim. Biophys. Acta* 227, 116—128.
- [68] Spikes J. D., 1957. Inactivation of isolated chloroplasts by crystalline trypsin. *Plant Physiol.* 32, suppl. v.
- [69] Swoboda G., Fritsche J., Hasselbach W., 1979. Effects of phospholipase A₂ and albumin on the calcium-dependent ATPase and the lipid composition of sarcoplasmic membranes. *Eur. J. Biochem.* 95, 77—88.
- [70] Tuquet C., de Lubac M., 1975. Action de la phospholipase A sur l'enveloppe des chloroplastes d'Epinard. *C. R. Acad. Sci. Paris* 281, sér. D, 1313—1316.
- [71] Uhrig H., Tevini M., 1976. Effekte der Phospholipase D auf den Elektronentransport und die Lipidzusammensetzung isolierter Spinachchloroplasten. *Planta* 128, 173—178.
- [72] Uhrig H., Tevini M., 1977. Lipid composition and photochemical activities of phospholipase C-treated spinach chloroplasts. Abstracts of the 4th International Congress on Photosynthesis, Reading, 386.
- [73] Vernon L. P., Zaugg W. S., 1960. Photoreduction by fresh and aged chloroplasts. Requirement for ascorbate and 2,6-dichlorophenol-indophenol with aged chloroplasts. *J. Biol. Chem.* 235, 2728—2733.
- [74] Wintermans J. F. G. M., Helmsing P. J., Polman B. J. J., van Gisbergen J., Collard J., 1969. Galactolipid transformations and photochemical activities of spinach chloroplasts. *Biochim. Biophys. Acta* 189, 95—105.
- [75] Witt H. T., 1979. Energy conversion in the functional membrane of photosynthesis. Analysis by light pulse and electric pulse methods. The central role of the electric field. *Biochim. Biophys. Acta* 505, 355—427.
- [76] Yagi T., Benson A. A., 1962. Plant sulfolipid. V. Lysosulfolipid formation. *Biochim. Biophys. Acta* 57, 601—603.
- [77] Zwaal R. F. A., Roelofsen B., Colley M. C., 1973. Localization of red cell membrane constituents. *Biochim. Biophys. Acta* 300, 159—182.

Dr ZBIGNIEW KRUPA

Zakład Fizjologii Roślin

Instytut Biologii Uniwersytetu Marii Curie-Skłodowskiej

ul. Akademicka 19, 20-033 Lublin