

KWAŚNE FOSFATAZY ROŚLIN WYŻSZYCH

Acid phosphatases from higher plants.

Mariusz OLCZAK

Summary. Plant acid phosphatases (AcPases, EC 3.1.3.2) are a group of enzymes that catalyse the hydrolysis of a variety of phosphate esters in acid environment. The enzymes are widely distributed in nature and appear to be ubiquitous, occurring in a broad variety of species and tissues. There are many reports on AcPases, but much of this information is fragmentary and the role of plant acid phosphatases are still not clear. Few complete studies have been reported but characteristics of the enzyme of system considered important by one researcher may not be included by another. Two distinct categories of plant AcPases can apparently be distinguished. The first type are „non-specific enzymes” that show little or no substrate specificity. It’s possible, that they appear to be important in the production and recycling of inorganic phosphate in plant tissues. Second class of AcPases are specialised enzymes which have a clear, but non-absolute specificity. These AcPases are hypothesized to have distinct metabolic functions and include: phosphoenolpyruvate phosphatase, phytase, phosphotyrosyl-protein phosphatase, phosphoglycolate phosphatase and 3-phosphoglycerate phosphatase. According to optimal pH for catalysis the enzymes have been classified as being alkaline or acid phosphatases. By contrast to acid phosphatases plant alkaline phosphatases usually display an absolute substrate specificity.

Key words: Acid phosphatase, phosphate metabolism, non-specific phosphatase, plant glycoproteins, phytase, metallophosphatase

Dr Mariusz Olczak, Zakład Biochemii Molekularnej, Instytut Biochemii, Uniwersytet Wrocławski, ul. Tamka 2, 50–137 Wrocław

WSTĘP

Fosfatazy kwaśne (EC 3.1.3.2) występują powszechnie w tkankach roślinnych i są zdolne do hydrolizy fosforanu z różnych monoestrów ortofosforanowych. Proces ten jest termodynamicznie korzystny [62].

Ze względu na optimum pH enzymy te podzielono na fosfatazy kwaśne i zasadowe. Fosfatazy zasadowe zazwyczaj wykazują wysoką specyficzność wobec jednego typu substratu, jak np.: cytozolowa fosfataza fruktozo-1,6-bisfosforanu i fosfataza sacharozo-6-fosforanu. W odróżnieniu od fosfatyz zasadowych, kwaśne fosfatazy najczęściej nie wykazują absolutnej specyficzności substratowej i są zdolne do hydrolizy wielu estrów fosforanowych, często o zróżnicowanej budowie. W ostatnich latach,

wraz z rozwojem technik laboratoryjnych, oczyszczono i poddano analizie strukturalnej kilka białek należących do tej grupy enzymów. Pojawiają się też pierwsze próby izolacji genów kodujących kwaśne fosfatazy. Jednak większość dotychczas opublikowanych prac zawiera dane fragmentaryczne, które koncentrują się albo wyłącznie na oczyszczaniu i charakterystyce strukturalnej enzymu, bądź też na badaniach specyficzności substratowej lub lokalizacji w tkankach roślinnych.

Wśród fosfatyz kwaśnych wyodrębnia się 2 grupy enzymów [19]. Fosfatazy o małej specyficzności substratowej uczestniczą w pozyskiwaniu wolnego jonu fosforanowego z różnych związków zawierających ortofosforan (występujących w glebie lub w pożywce). Fosfatazy „wyspecjalizowane” biorą prawdopodobnie

Tabela 1. Właściwości wybranych kwaśnych fosfatyz pochodzenia roślinnego.
Table 1. Properties of some acid phosphatases isolated from higher plants.

Źródło enzymu <i>Plant source</i>	Masa cząsteczkowa i struktura podjednostkowa <i>Molecular mass and subunit structure</i>	Część cukrowa <i>Carbohydrate motety</i>	Optimum pH <i>Optimum pH</i>	V_{max} dla pNPP V_{max} for pNPP (<i>U/mg</i>)	K_m dla pNPP K_m for pNPP (<i>mM</i>)	Najlepszy* naturalny substrat <i>Best non-synthetic substrate</i>	Odnosnik literaturowy <i>References</i>
Żyto (zarodki) <i>Wheat (germ)</i>	58 kD, monomer	-	6,0	605	0,09	bd	[64]
Bawełna (zarodki) <i>Cotton (embryos)</i>	200 kD, tetramer, 4x55 kD	+	5,0	1444	0,56	bd	[5]
Kukurydza (kultury tkankowe) <i>Maize (suspension cells)</i>	31 kD, monomer	6%	5,5	2,6	0,35	1-glyc-P	[45]
Czarna gorczyca (cytosol) <i>Black mustard (cytosol)</i>	60 kD, monomer	+	5,6	1225	0,29	PP _i	[17]
Czarna gorczyca (wakuola) <i>Black mustard (vacuole)</i>	60 kD, monomer	+	5,6	1193	0,57	PEP	[16]
Słonecznik (nasiona) <i>Sunflower (seeds)</i>	103 kD, dimer, 56++52 kD	+	5,0	113	0,08	PP _i	[48]
Soja (kultury tkankowe) <i>Soybean (suspension cells)</i>	130 kD, dimer, 58++58 kD	+	bd	512	0,30	bd	[40]
Mak (nasiona) <i>Poppy (seeds)</i>	106 kD, dimer, 63++57 kD	+	5,0	28	0,23	P-Tyr	[12]
Ziemniak (bulwy) <i>Potato (tubers)</i>	110 kD, dimer, 57++55 kD	bd	5,0	1250	1,10	P-Tyr	[51]
Ziemiak (bulwy) <i>Potato (tubers)</i>	27 kD, monomer	bd	bd	111	0,59	P-Tyr	[27]
Pomidor (kultury tkankowe) <i>Tomato (suspension cells)</i>	51 kD, monomer	bd	3,8	24	bd	Fru-6-P	[49]
Fasola (nasiona) <i>Kidney (bean seeds)</i>	106 kD, dimer 55++55 kD*	9-11%	4,9	109**	35,70**	ATP	[4, 56, 57]
Kukurydza (nasiona) <i>Maize (seeds)</i>	76 kD, dimer 38++38 kD	-	4,8	2,3	0,56	I ₆ P	[39]

* - o najwyższym V_{max}/K_m lub najwyższym V_{max} (gdy nie wyznaczano K_m); : the highest V_{max}/K_m coefficient or V_{max} (if K_m was not determined), ** - w 25°C; - at 25°C; -; bd - brak danych;...: not determined

udział w konkretnych szlakach metabolicznych komórki roślinnej.

STRUKTURA MOLEKULARNA KWAŚNYCH FOSFATAZ

MASA CZĄSTECZKOWA I BUDOWA PODJEDNOSTKOWA

Niskocząsteczkowe formy o masach 20–40 kD stwierdzono m.in. w nasionach traw [43], rzęsie wodnej [38] i w bulwach ziemniaka [27]. Przykładami fosfataz o wysokiej masie molekularnej (200 kD) jest tetrameryczne białko z zarodków bawełny [5] i fosfatasa z nasion soi [24], o masie 240 kD. Większość dotychczas oczyszczonych kwaśnych fosfataz to białka o masie ok. 50–70 kD. Fakt ten może sugerować strukturalne i ewolucyjne podobieństwo między tymi enzymami [19].

Fosfatazy o masach powyżej 70 kD wykazują budowę podjednostkową. Jak przedstawiono w tabeli 1, niektóre roślinne fosfatazy to heterodimery, zbudowane z podjednostek o nieznacznie różniących się między sobą masach cząsteczkowych. Fosfatasa kwaśna z nasion słonecznika zbudowana jest z dwóch podjednostek o masach 56 i 52 kD [48]. Podjednostki stanowią agregat dwóch niezależnie działających enzymów o nieznacznych różnicach w składzie aminokwasowym i o podobnych, chociaż nie identycznych właściwościach kinetycznych. W innych przypadkach nie stwierdzono aktywności w poszczególnych podjednostkach białkowych.

SKŁAD AMINOKWASOWY KWAŚNYCH FOSFATAZ

Wśród fosfataz o podobnej specyficzności substratowej stwierdzono podobieństwa w składzie aminokwasowym np.: dla fosfatazy izolowanej z nasion soi [28] i enzymu z nasion kukurydzy [39], które zaliczono do grupy fitaz, hydrolizujących kwas fitynowy. Kwaśne fosfatazy pochodzenia roślinnego zawierają często powyżej 40% aminokwasów o charakterze niepolarnym co może wyjaśnić łatwość do niespecyficznych oddziaływań z innymi białkami.

HOMOLOGIA W STRUKTURZE I-RZĘDOWEJ BIAŁKA

Dotychczas poznane są tylko dwie sekwencje aminokwasowe roślinnych kwaśnych fosfataz, uprzednio wyizolowanych z materiału roślinnego. Fosfatasa z komórek pomidora, o masie 51 kD jest homodimerem o optimum pH 3,5–4,0. Wyizolowano mRNA i otrzymano cDNA zawierający informację o dojrzałym białku o masie 24,9 kD, oraz hydrofobowym terminalnym peptydzie sygnałowym. Peptyd ten, zbudowany z 38 reszt aminokwasowych, nie występuje w dojrzałym enzymie [65]. Nie znaleziono homologii pomiędzy sekwencją aminokwasów w tym enzymie a jakąkolwiek poznaną dotychczas sekwencją aminokwasową w fosfatazach nieroślinnych. Stwierdzono natomiast, że fosfatasa z pomidora wykazuje duże podobieństwo w sekwencji aminokwasowej do białka zapasowego vsp (ang. *vsp* – *vegetative storage protein*) pochodzącego z soi. Okazało się, że białko vsp ma śladową aktywność fosfatazową [15].

Drugim enzymem, dla którego wyznaczono pełną sekwencję aminokwasową jest białko z nasion fasoli, zawierające w swoim centrum aktywnym atomy Fe(III) i Zn(II). [36]. Aktualnie jest to najlepiej poznana, pod względem budowy chemicznej, roślinna kwaśna fosfatasa [4, 56, 57]. Białko to jest glikoproteiną zbudowaną z dwóch jednakowych podjednostek, każda o masie 55 kD. Część białkowa podjednostki zbudowana jest z 432 aminokwasów. Stwierdzono, że N-końcowy fragment łańcucha wykazuje duże podobieństwo z wyznaczoną wcześniej sekwencją 17 pierwszych reszt aminokwasowych N-końca metalofosfatazy z soi [40]. Ostatnie badania dowodzą, że odcinki łańcucha budujące centrum aktywne enzymu są w dużym stopniu homologiczne do analogicznych odcinków łańcucha polipeptydowego uteroferryiny – kwaśnej metalofosfatazy z komórek ssaków [36]. Badania strukturalne obu enzymów wykazały duże podobieństwo w budowie przestrzennej tych białek [37]. Rola kwaśnych metalofosfataz w komórkach ssaków i w komórkach roślin wyższych nie jest wyjaśniona. Zachowanie bardzo podobnych fragmentów łańcucha polipeptydowego w tak odległych ewolucyjnie or-

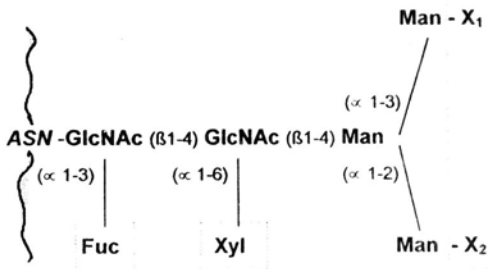
ganizmach sugeruje, że fosfatazy te mogą pełnić kluczowe funkcje w metabolizmie komórkowym.

Ostatnie badania potwierdziły istnienie w roślinach podjednostek fosfatyz serynowo-treoninowych homologicznych do zwierzęcych [20, 55]. Stosując jako sondy znane sekwencje nukleotydowe DNA kodującego enzymy pochodzące z komórek zwierzęcych, udało się potwierdzić istnienie u roślin sekwencji homologicznych. Geny kodujące białka homologiczne do podjednostek katalitycznych i regulatorowych zwierzęcych fosfatyz białkowych stwierdzono u rzodkiewnika (*Arabidopsis thaliana*) [55] i grochu (*Pisum sativum*) [20]. Świadczy to o konserwatywnym charakterze tych białek. Enzymy te należą jednak najczęściej do grupy fosfatyz alkalicznych.

CZĘŚĆ CUKROWA ENZYMU

Większość roślinnych kwaśnych fosfatyz jest glikoproteinami. O obecności komponenty węglowodanowej w cząsteczce enzymu wnioskuje się najczęściej na podstawie zdolności kwaśnych fosfatyz do interakcji z lektyną – konkanawaliną A. Właściwość ta jest często wykorzystywana w procesie oczyszczania białka.

Dotychczas opublikowano tylko jedną pracę opisującą strukturę łańcuchów cukrowych budujących cząsteczkę kwaśnej fosfatyz [56]. Enzym ten, izolowany z nasion fasoli jest metalofosfatyzą mającą 5 miejsc glikozylacji na każdej z dwóch jednakowych podjednostek. Wszystkie łańcuchy zawierają ksylozę, mają charakter kompleksowy, z terminalnie przyłączonymi cząsteczkami N-acetyloglukozaminy i galaktozy. Cztery łańcuchy zawierają fukozę połączoną wiązaniem 1–3 glikozydowym z rdzeniową N-acetyloglukozoaminą. Niektóre oligomery cukrowe wykazują heterogenność, związaną z obecnością dodatkowych, terminalnych reszt galaktozy. Pewna pula cząsteczek fosfatyz nie posiada jednego z pięciu oligosacharydów, co wyjaśnia zjawisko heterogenności enzymu, obserwowane w elektroforezie w żelu poliakrylamidowym. Sumarycznie białko zawiera od 9 do 11,5 % cukrów. Ogólny plan budowy wszystkich pięciu oligosacharydów tej fosfatyz przedstawiono na rysunku 1.



Ryc. 1. Schemat budowy łańcucha N-glikozydowego fosfatyz z nasion fasoli. X₁, X₂ oznaczają reszty galaktozy lub N-acetyloglukozaminy. W ramkach fragmenty łańcucha występujące opcjonalnie.

Fig. 1. Structure of N-linked oligosaccharide of acid phosphatase from red kidney bean (X₁ and X₂ – galactose or N-acetylglucosamine residues). Framed fragments are optional.

Komponenta cukrowa enzymu stanowi zazwyczaj niewielki procent całkowitej masy molowej białka. Kwaśna fosfatyz z hodowli *in vitro* komórek kukurydzy zawiera 6% cukrów obojętnych [45]. W skład części cukrowej enzymu wchodzi: mannoza, fukoza, ksyloza i galaktoza, w stosunku molowym 5,0:1,8:0,4:0,2. Wskazuje to, wg autora, na istnienie w cząsteczce białka zarówno łańcuchów wysokomannozowych jak i złożonych. Fosfatyz z bulw batatów zawiera 9 % cukrów obojętnych z czego N-acetyloglukozamina stanowi 2,9% całkowitej masy enzymu [25, 59, 60]. Część cukrowa fosfatyz zarodków żyta stanowi 9% ogólnej masy enzymu, w tym 2% masy stanowią pentozy [21].

JONY METALI JAKO SKŁADNIK NIEKTÓRYCH ROŚLINNYCH FOSFATAZ

Poczynając od lat 70-tych wyodrębniono kilka roślinnych fosfatyz [24, 33, 59, 60], które wykazywały fioletowe zabarwienie w roztworach wodnych (ang. *violet-colored phosphatases*). Działanie związków chelatujących, takich jak wersenian i fenantrolina powodowało utratę aktywności enzymatycznej i odbarwienie roztworu [60]. Sądzono, że w centrum aktywnym enzymu znajduje się jon metalu. Podejrzewano, że w cząsteczkach metalofosfatyz z batatów znajdują się atomy manganu (II) [24, 27]. Późniejsze ba-

dania, przeprowadzone na homogennym preparacie enzymu udowodniły, że w centrum aktywnym białka znajdują się 2 atomy żelaza, a mangan występuje tylko w śladowych ilościach [31].

Z nasion fasoli wyodrębniono barwną, kwaśną fosfatazę określono jej sekwencję, strukturę przestrzenną i budowę centrum aktywnego ze związanymi koordynacyjnie atomami Fe(III) i Zn(II) [4, 57]. Tego typu struktura przypomina dobrze scharakteryzowane metalofosfatazy zwierzęce, zawierające najczęściej 2 atomy żelaza związane koordynacyjnie w centrum aktywnym o słabo określonej specyficzności [1, 8, 14]. Niestety, podobnie jak w przypadku fosfataz pochodzenia zwierzęcego i innych roślinnych metalofosfataz, nie jest znana fizjologiczna rola tego enzymu.

HETEROGENNOŚĆ KWAŚNYCH FOSFATAZ POCHODZENIA ROŚLINNEGO

Charakterystyczną cechą wielu fosfataz jest ich mikroheterogenność. Heterogenność fosfataz pochodzących z tego samego źródła może być uwarunkowana genetycznie, gdy synteza enzymu regulowana jest przez kilka niezależnych *loci* genetycznych. W tym przypadku enzymy nieznacznie różnią się składem aminokwasowym. Heterogenność można też wyjaśnić różnicami w glikozylacji lub ograniczoną proteolizą białka [22, 64].

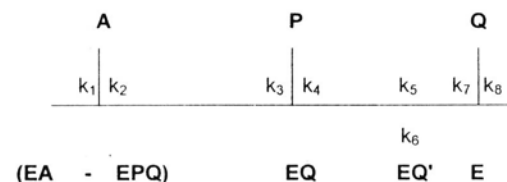
W przypadku fosfatazy wyodrębnionej ze szpilek sosny stwierdzono występowanie enzymu pod postacią dwóch form, różniących się właściwościami kinetycznymi, specyficznością substratową, punktem izoelektrycznym i optimum pH. Okazało się, że enzym ten może ulegać asocjacji z naturalnym polirybonukleotydem. Obie formy (wolna oraz zasocjowana z krótkim odcinkiem RNA) występują w komórce w stanie równowagi [34].

REAKCJE KATALIZOWANE PRZEZ KWAŚNE FOSFATAZY

MECHANIZM REAKCJI ENZYMATYCZNEJ KWAŚNYCH FOSFATAZ

Mechanizmy działania kwaśnych fosfataz zostały dobrze poznane i opisane już w latach 60-tych [32]. Ogólnie przyjęty schemat reakcji

zakładający sekwencyjne uwalnianie produktów przedstawiono na rysunku 2.



Ryc. 2. Mechanizm reakcji hydrolizy estrów fosforanowych katalizowanej przez kwaśną fosfatazę [32]. k₁ – k₈ – stałe szybkości poszczególnych reakcji. E – enzym; EA – kompleks enzym+substrat; EPQ – kompleks enzymu z oboma produktami reakcji; EQ – kompleks enzymu z drugim produktem, EQ' – kompleks po izomeryzacji; A – substrat; P – pierwszy alkoholowy produkt; Q – drugi produkt-Pi.

Fig. 2. Mechanism of phosphate esters hydrolysis by acid phosphatase[32].

Jako pierwszy uwalniany jest alkoholowy produkt reakcji, który bądź nie hamuje enzymu lub hamuje go niekompetycyjnie. Jako drugi produkt reakcji uwalniany jest fosforan nieorganiczny będący kompetycyjnym inhibitorem enzymu.

POMIARY AKTYWNOŚCI ENZYMATYCZNEJ

Roślinne kwaśne fosfatazy są najczęściej enzymami mało specyficznymi i hydrolizują dobrze naturalne i syntetyczne estry fosforanowe. Do wykrywania aktywności fosfatazowej, zwłaszcza podczas oczyszczania enzymu wykorzystuje się sztuczny substrat – *paranitrofenylofosforan* (pNPP)*. Produkt reakcji – *paranitrofenol* absorbuje światło o długości fali 405 nm.

Pomiary aktywności wobec potencjalnych, naturalnych substratów polegają na pomiarze ilości uwolnionego fosforanu nieorganicznego.

*Objaśnienia skrótów: ATP – adenozyntrofosforan, CKTK – cykl kwasów trikarboksylowych, Fru-6-P – fruktozo-6-fosforan, 1-glyc-P – 1-glicerofosforan, I₆P – sześćfosforan inozytoli (kwas fitynowy), kD – kilodalton, K_m – stała Michaelisa, NAD-G-3-PD – dehydrogenaza aldehydu 3-fosfoglicerynowego, PEP-fosfoenolopirogronian, PFK – fosfofruktokinaza, P_i-fosforan nieorganiczny, pNPP – paranitrofenylofosforan, PP_i – pirofosforan, P-Tyr – fosfotyrozyna, RuBP – rybulozodifosforan, V_{max} – szybkość maksymalna reakcji enzymatycznej.

SPECYFICZNOŚĆ SUBSTRATOWA I OPTIMUM PH

Ze względu na specyficzność w stosunku do różnych substratów kwaśne fosfatazy roślin wyższych można podzielić na dwie grupy:

– fosfatazy niespecyficzne, hydrolizujące różne naturalne i syntetyczne estry kwasu ortofosforanowego,

– fosfatazy wyspecjalizowane, mające preferencje do hydrolizy konkretnego, endogennego substratu.

Fosfatazy niespecyficzne uczestniczą w odzyskiwaniu fosforanu z wielu typów estrów kwasu ortofosforanowego. np.: podczas kiełkowania i intensywnego wzrostu rośliny. Być może biorą udział w hydrolizie estrów fosforanowych magazynowanych w wakuoli. Enzymy te, aktywne wobec pNPP mogą rozkładać także ATP, ADP, AMP, pirofosforan, glicerofosforan, fosforany monosacharydów, hydroksyaminokwasów i wiele innych. Enzymy zlokalizowane w ścianie komórkowej mogą być wydzielane na zewnątrz, do gleby bądź pożywki. Fosfatazy niespecyficzne różnią się między sobą parametrami kinetycznymi. Stałe Michaelisa wobec pNPP dla tych enzymów wahają się w granicach 0,05–1,5mM, najczęściej wynoszą ok. 0,2–0,6 mM (Tabela 1).

Fosfatazy wyspecjalizowane wykazują dużą aktywność wobec pośrednich produktów metabolizmu, takich jak ATP, pirofosforan, 3-PGA czy PEP (Tabela 1). Zbadane wartości V_{max} i K_m sugerują, że związki te mogą być podstawowymi substratami dla tych fosfataz *in vivo* [19]. Przykładem fosfatazy o dużej, chociaż nie absolutnej specyficzności jest cytozolowa forma enzymu z pochryznu jadalnego (*Dioscorea esculentum*), o maksymalnej aktywności wobec fenylofosforanu. Dwie inne formy tego enzymu związane z błoną komórkową preferencyjnie hydrolizują AMP [35]. Bardzo dobrze scharakteryzowano wakuolarną formę fosfatazy z komórek czarnej gorczycy – termolabilne białko o wysokiej specyficzności wobec PEP [16].

Fosfatazy zdolne do hydrolizy estrów inozytolu nazwano fytazami. Przykładami tych enzymów są dobrze scharakteryzowane białka z fasoli [28] i kukurydzy [39]. Fytazy, w odróżnie-

niu od większości „wyspecjalizowanych” fosfataz, hydrolizują wiele naturalnych substratów, często z dużo większą szybkością niż fitinian. Wykazują bardzo niskie (mikromolowe) wartości K_m tylko w stosunku do estrów inozytolu i aktywności są bardzo silnie hamowane przez nieorganiczny fosforan.

Inne fosfatazy kwaśne preferencyjnie hydrolizują fosforany hydroksyaminokwasów. Enzymy te, rozkładające tyrozynowe estry kwasu fosforanowego, wyizolowano między innymi z nasion maku [12] i z bulw ziemniaka [27, 51]. Ich optimum pH wynosi poniżej 7,0, chociaż znaleziono także fosfatazy alkaliczne o podobnych preferencjach substratowych, np.: z nasion pszenicy [10]. Fosfatazy roślinne, biorące udział w procesach defosforylacji fosfoseryny i fosfotreoniny, posiadają zazwyczaj, podobnie jak u zwierząt, optimum pH powyżej 7,0 [9, 44, 54].

Optimum pH działania kwaśnych fosfataz wobec pNPP waha się zwykle w granicach 4,0–5,8. Większość dotychczas wyizolowanych enzymów ma optimum pH ok. 5,0–5,5 (Tabela 1).

WPLYW EFEKTORÓW

Typowym inhibitorem kwaśnych fosfataz jest jon fluorkowy. Inhibicja ma charakter niekompetycyjny, natomiast produkt hydrolizy – jon fosforanowy jest kompetycyjnym inhibitorem enzymu [32]. Przypuszcza się, że hamowanie reakcji hydrolizy spowodowane wzrostem stężenia uwalnianego fosforanu ma podstawowe znaczenie w regulacji aktywności enzymatycznej większości kwaśnych fosfataz. Wskazuje na to wyznaczona w kilku przypadkach stała inhibicji dla fosforanu, która jest porównywalna ze stałymi Michaelisa mierzonymi wobec pNPP [6, 28, 45, 66]. Inne jony, podobne w budowie przestrzennej do fosforanu, takie jak arsenian, molibdenian, winian i szczawian także mogą hamować aktywność enzymatyczną fosfataz [16, 17, 35, 52, 53]. Niektóre dwuwartościowe kationy metali mogą być stymulatorami aktywności fosfatazowej [11, 16, 28].

ROLA KWAŚNYCH FOSFATAZ W METABOLIZMIE ROŚLIN

LOKALIZACJA

Ze względu na lokalizację w komórce i obszar działania enzymy podzielono na dwie klasy [19]: wewnątrzkomórkowe i zewnątrzkomórkowe. Fosfatazy zewnątrzkomórkowe są zlokalizowane w ścianie komórkowej [16, 23] i mogą być wydzielane przez korzeń do otaczającej ryzosfery [29, 42, 61]. Fosfatazy występujące w korzeniach są głównie zlokalizowane w merystemie apikalnym i zewnętrznych powierzchniach ścian komórkowych [42]. Uczestniczą w hydrolizie różnych produktów organicznych występujących na zewnątrz komórki, na przykład w glebie, gdzie większość fosforanu występuje w postaci związanej, a zawartość wolnych jonów ortofosforanowych jest bardzo niska (ok. $1\mu\text{M}$) [41]. Podczas głodu fosforanowego zewnątrzkomórkowe fosfatazy działają jako „system ratowniczy”, hydrolizując każdy zestyfikowany substrat do nieorganicznego fosforanu, który szybko ulega resorpcji [18, 42]. Enzymy z tej grupy to najczęściej fosfatazy niespecyficzne, zdolne do hydrolizy wielu naturalnych substratów. Fosfatazy wewnątrzkomórkowe występują praktycznie w każdym organie u roślin, między innymi w spoczynkowych i kiełkujących nasionach [5, 28], w korzeniach [17] liściach i kwiatach [13, 52] i kulturach komórkowych [49]. W wielu przypadkach stwierdzono występowanie fosfataz w wakuolach. Taka lokalizacja daje enzymom dostęp tylko do tych substratów, które są przepuszczalne dla tonoplastu [13]. Prawdopodobnie fosfatazy tam występujące mogą odgrywać istotną rolę w oczyszczaniu organizmu z niektórych toksycznych związków gromadzonych w wakuolach [7, 63].

REGULACJA BIOSYNTETY FOSFATAZ KWAŚNYCH ZWIĄZANA Z ICH ROLĄ W TKANKACH ROŚLINNYCH

Podobnie jak w przypadku innych białek roślinnych, regulacja ekspresji genów kodujących kwaśne fosfatazy modulowana jest przez różne czynniki, zewnątrz – i wewnątrzkomórkowe

[19]. Mechanizm wzrostu aktywności fosfatazowej został najlepiej poznany w kiełkujących nasionach. Nasiona spoczynkowe mają duże zapasy fosforu lecz bardzo małą aktywność fosfatazową, która gwałtownie wzrasta podczas kiełkowania [6, 28]. Wzrostowi aktywności fosfatazowej towarzyszy mobilizacja rezerwy fosforanowej nasion. W warstwie aleuronowej większości nasion rezerwą tą jest fosforan inozytolu (fitynian). Wyizolowano kilka enzymów, pochodzących m.in. z batatów, ryżu i fasoli, które hydrolizują fitynian [28, 60, 66].

Wykazano, że w młodych tkankach aktywność enzymatyczna pozostaje pod kontrolą kwasu giberelinowego [2], a w starszych tkankach także kwasu abscysynowego [13]. Kwas giberelinowy, produkowany przez rozwijający się zarodek, stymuluje syntezę enzymu i jego wydzielanie na zewnątrz komórki [5]. Stymulacja tym fitohormonem odbywa się na poziomie translacji [22]. Enzym początkowo związany z błonami retikulum endoplazmatycznego transportowany jest przez pęcherzyki błonowe w kierunku plazmalemy a następnie do ściany komórkowej. Obniżenie stężenia fitohormonu wywołuje nagromadzenie enzymu w bliskich plazmalemy warstwach ściany komórkowej [2].

Biosynteza enzymu pozostaje również pod kontrolą kwasu abscysynowego. W młodych, rozwijających się tkankach jego obecność hamuje wydzielanie fosfatazy poza komórkę. W warunkach głodu fosforanowego, jak również w starszych tkankach fitohormon ten przyspiesza i wzmacnia aktywność enzymu a strumień nieorganicznego fosforanu zostaje skierowany do młodych, rozwijających się organów [13, 28]. Wzrost aktywności fosfataz kwaśnych, będący pod kontrolą fitohormonów, obserwuje się w procesie kwitnienia, zazieleniania się etiolowanych siewek i podczas rozwoju plastydów [11, 46, 53].

Na aktywność fosfataz duży wpływ mogą mieć także lektyny. W badaniach *in vitro* stwierdzono wpływ lektyn roślinnych na właściwości katalityczne fosfataz kwaśnych [22]. Interakcja glikoproteinowych fosfataz z lektynami specyficznymi wobec cukrowych receptorów pozwala

przypuszczać, że istotną rolę w tym oddziaływaniu odgrywa węglowodanowy składnik enzymu. W przypadku fosfatyz izolowanych z nasion wiechliny łąkowej oraz kupkówki stwierdzono przesunięcie optimum pH enzymu w stronę kwaśną oraz wzrost termostabilności [22].

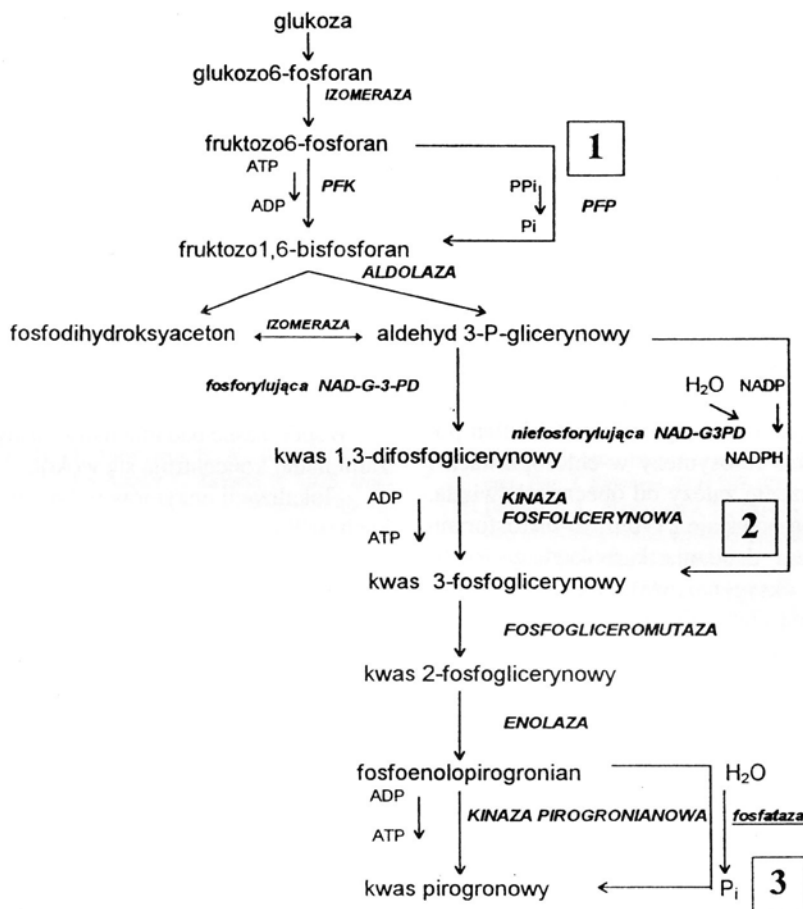
Pośród czynników zewnętrznych modulujących aktywność fosfatyz w tkankach roślinnych istotny wpływ wywierają dwuwartościowe kationy, takie jak Ni^{2+} Ca^{2+} Mg^{2+} [26], zasolenie lub deficyt wody [3, 47] a przede wszystkim niedobór fosforanu w glebie bądź pożywce. Sekrecja fosfatyz może być stymulowana przez jony wapnia, magnezu, niklu i prawdopodobnie przebiega dwuetapowo. W pierwszym etapie do środowiska zwalniany jest enzym obecny w ścianie komórkowej. W drugiej fazie następuje aktywny transport fosfatyz z wnętrza komórki przez barierę energetyczną jaką jest plazmalemma [61]. Sekrecja fosfatyz występuje zazwyczaj w warunkach głodu fosforanowego [18].

Fosfatyz pełnią ważną rolę w kontrolowaniu ilości pobieranego fosforu, jego obiegu i regulacji całej gospodarki fosforanowej. Ilość i aktywność enzymu w tkankach zależy od ilości znajdującego się w komórce fosforanu [16, 18, 61]. Wpływ niedoboru fosforanu nieorganicznego na aktywność i ilość wydzielanego enzymu obserwowano na przykładzie hodowli pomidorów [29]. Przy braku w podłożu jonów fosforanowych stwierdzono gwałtowny wzrost aktywności fosfatyzowej w ścianie komórkowej i plazmalemie oraz szybkie uwalnianie enzymu na zewnątrz komórki. Podobny przebieg syntezy i sekrecji fosfatyz, regulowanej ilością pobieranego fosforu, zaobserwowano w kulturach tkankowych tytoniu [29, 49]. Również badania nad kulturami *Brassica nigra* dowiodły, że synteza wakuolarniej, specyficznej wobec PEP fosfatyz oraz niespecyficznej fosfatyz zlokalizowanej w ścianie komórkowej zależy od ilości pobieranego z zewnątrz fosforanu [18]. Niedobór fosforanu zwiększał produkcję obu typów fosfatyz, a także innych enzymów związanych z gospodarką fosforanową, takich jak karboksylaza PEP czy fosfofruktokinaza zależna od pirofosforanu [58]. Równoległa indukcja wszystkich tych enzymów sugeruje istnienie u roślin wyższych

zsynchronizowanej regulacji gospodarki fosforanowej. Wzrost aktywności fosfatyzowej, stymulowany brakiem wolnego fosforanu ujawnia się najszybciej w tkankach w pełni dojrzałych, a uwalniany podczas hydrolizy fosforan nieorganiczny jest transportowany do młodych tkanek. Również w okresie starzenia zachodzą wyraźne zmiany aktywności enzymu. Wzrost aktywności enzymatycznej można tłumaczyć udziałem fosfatyz w autolizie komórki, poprzedzonej zmianami przepuszczalności błon i uwalnianiem enzymu z lizosomów do cytoplazmy. Procesy lityczne powodują nekrozę tkanek oraz zmiany prowadzące do wtórnych podziałów komórkowych. Mechanizmy te mogą występować w procesach gojenia się zranionej tkanki.

UDZIAŁ KWAŚNYCH FOSFATAZ W PODSTAWOWYCH SZLAKACH METABOLICZNYCH

Niedobór fosforu ma poważny wpływ na główne szlaki metaboliczne, m.in. powoduje obniżenie poziomu ATP a także ogranicza szybkość glikolizy. W wyniku badań nad hodowlami komórek z *Brassica nigra in vitro* odkryto u roślin inną, alternatywną drogę jednego z etapów glikolizy, występującą w warunkach niedoboru fosforanu [16, 42, 58], (Ryc. 3). Z komórek *Brassica nigra* [16] oraz z glonu *Selenastrum minutum* [58] wyizolowano fosfatyzę specyficzną wobec PEP. Liczne badania wykazały, że w roślinach fosfatyz PEP współdziała z kinazą pirogronianową w utrzymaniu ogólnej puli PEP i acetylo-koenzymu A. Stwierdzono, że w zależności od dostępności nieorganicznego fosforanu, poziom fosfatyz PEP i ADP-zależnej kinazy pirogronianowej ulega zmianom. W warunkach niedoboru fosforanu, kinaza pirogronianowa jest eliminowana z komórek a ilość i aktywność fosfatyz PEP wzrasta. W warunkach nadmiaru fosforanu, aktywność i poziom fosfatyz PEP maleje a wzrasta ilość i aktywność kinazy pirogronianowej. W ten sposób komórka otrzymuje dodatkowe ilości pirogronianu, którego powstawanie normalną drogą wymaga obecności nieorganicznego fosforanu. Dzieje się to jednak kosztem fosforylacji substratowej związanej z syntezą ATP. Poza tym dodatkowa częste-



Ryc. 3. Model glikolizy z zaznaczeniem alternatywnych dróg metabolicznych, indukowanych niedoborem fosforanu w komórkach *Brassica nigra* [16]. Cyfry 1, 2 i 3 oznaczają hipotetyczne, dodatkowe drogi metaboliczne; Cyfra 3 – reakcja z udziałem fosfatazy PEP, aktywnej w warunkach głodu fosforanowego.

Fig. 3. A model suggesting the three Pi starvation inducible glycolytic 'bypasses' (indicated by numbers 1, 2 and 3) of *Brassica nigra* cells [16].

czka fosforanu, powstająca podczas hydrolizy PEP może być wykorzystana w innych procesach metabolicznych, co jest nie bez znaczenia w warunkach niedoboru fosforanu w środowisku. Teoria systemu ratowniczego funkcjonującego w glikolizie i związanego z udziałem kwaśnej fosfatazy specyficznej wobec PEP wymaga jednak dalszych badań. Wspomniany enzym zlokalizowany jest w wakuoli, można założyć, że istnieje hipotetyczny szlak transportujący substrat (PEP) i produkt (pirogronian) przez tonoplast. Jak dotąd nie poznano jednak mechanizmu tego transportu.

Przypuszczalnie podobna indukcja i regulacja enzymatyczna zachodzi także dla enzymów: PFP-fosfofruktosofosfatazy i PFK-fosfofruktokinazy (oznaczonych cyfrą 1 na rys.3), oraz dla dehydrogenazy fosforylującej NAD-G3PD i niefosforylującej NAD-G3PDH (oznaczonych cyfrą 2 na rys.3). Występowanie alternatywnych dróg w glikolizie może mieć istotne znaczenie dla komórki, ponieważ spadek puli pirogronianu pociąga za sobą obniżenie puli acetylo-CoA. Niski poziom acetylo-CoA spowalnia CKTK, cykl gliksalowy, biosyntezę lipidów i fotooddychanie.

Innym przykładem udziału fosfatów w regulacji podstawowych procesów metabolicznych w komórce roślinnej jest cykl glikolany. Główne szlaki przemian tego cyklu zachodzą w peroksisomach komórek liści roślin wyższych. Jednym z najważniejszych procesów cyklu glikolany jest stymulowane przez światło pobieranie tlenu i wydzielanie dwutlenku węgla. Zjawisko to w fizjologii roślin nazwano fotoodychaniem.

W wyniku reakcji, zachodzących w chloroplastach, peroksisomach i mitochondriach, szlak ten prowadzi do wytworzenia glicyny i seryny z glicerynianu lub glikolanu. Glikolan powstaje podczas fotosyntezy w chloroplastach i jego wytworzenie zależy od obecności światła. Fosfoglikolan powstaje z rybulozo-*bis*fosforanu pod wpływem działania karboksylazy RuBP (aktywność tlenowa). Jednakże liczne doświadczenia wykazały, że utlenienie glikolanu do glioksalanu a następnie synteza glicyny i seryny może zachodzić także w ciemności. W ten sposób odkryto alternatywną drogę powstawania glicyny i seryny bezpośrednio z 3-PGA (przy udziale fosfatów). Inicjacja tej drogi zachodzi prawdopodobnie w warunkach głodu fosforanowego, gdy drastycznie spada poziom ATP, ADP i Pi [46, 52, 53].

FIZJOLOGICZNA ROLA FOSFATÓW HYDROLIZUJĄCYCH ESTRY FOSFORANOWE HYDROKSYAMINOKWASÓW

Procesy fosforylacji i defosforylacji białek, przebiegające z udziałem kinaz i fosfatów białkowych, mają kluczowe znaczenie w regulacji cyklu komórkowego i metabolizmu komórki.

Aktywność fosfatów typu serynowo-treoninowego wykryto w różnych przedziałach komórki roślinnej. Enzymy te biorą udział w aktywacji kilkunastu różnych enzymów, między innymi karboksylazy PEP [9] syntetazy sacharozo-6-fosforanu [54].

Używając inhibitorów wykazano, że inne enzymy z tej grupy mogą brać udział w regulacji biogenezy kalusa [55]. Fosfaty fosfotreoninowe to jednak najczęściej enzymy o zasadowym optimum pH.

Wyzolowano natomiast kilka roślinnych

kwaśnych fosfatów fosfotyrozynowych, lecz ich rola w regulacji metabolizmu nie jest jeszcze wyjaśniona [27, 35, 51]. W komórkach zwierzęcych fosfaty fosfotyrozynowe regulują wzrost i proliferację komórek, cykl komórkowy [30] i integralność cytoszkieletu w zależności od różnych zewnętrznych stymulacji, mogą także funkcjonować jako supresory komórek nowotworowych lub jako aktywatory podziałów komórek T [50].

PERSPEKTYWY ROZWOJU BADAŃ NAD KWAŚNYMI FOSFATAZAMI

Współczesne badania nad kwaśnymi fosfatami nadal koncentrują się wokół:

- lokalizacji enzymów w komórkach i tkankach roślinnych,
- wyjaśnienia podstaw molekularnych heterogenności enzymów pochodzących z tych samych tkanek i narządów,
- badania mechanizmów indukcji enzymów i roli fitohormonów,
- ujednoczenia warunków pomiarów parametrów kinetycznych wobec naturalnych substratów, takich jak pirofosforan, ATP, PEP, kwas fosfoglicerynowy, fitynian i fosforany hydroksyaminokwasów.

Postęp w powyżej wymienionych dziedzinach powinien umożliwić w najbliższych latach wyjaśnienie faktycznej roli kwaśnych fosfatów w metabolizmie komórki roślinnej. Niewątpliwie wiele informacji dotyczących ewolucyjnego pochodzenia tych enzymów i ewentualnej homologii z innymi grupami białek dostarczą badania oparte o techniki biologii molekularnej. Być może pozwoli to także poznać mechanizmy regulacji syntezy kwaśnych fosfatów występujące na poziomie transkrypcji.

LITERATURA

- [1] ANTANAITIS B. C., AISEN P. 1984. Stoichiometry of iron binding by uteroferrin and its relationship to phosphate content. *J. Biol. Chem.* **259**: 2066–2069.
- [2] ASHFORD A., JACOBSEN J. 1974. Cytochemical localization of phosphatase in Barley aleurone cells: The pathway of gibberelic acid induced enzyme release. *Planta* **120**: 81–105.
- [3] BARRET-LENNARD E. G., ROBSON A. D., GREENWAY H. 1982. Effect of phosphorus deficiency and water defi-

- cit on phosphatase activity from wheat leaves. *J. Exp. Bot.* **333**: 682–693.
- [4] BECK J. L., MCCONACHIE L. A., SUMMORS A. C., ARNOLD W. N., DE JERSEY J., ZERNER B. 1986. Properties of a purple phosphatase from red kidney bean: a zinc-iron metalloenzyme. *Biochim. Biophys. Acta* **869**: 61–68.
- [5] BHARGAVA R., SACHAR R. C. 1987. Induction of acid phosphatase in cotton seedlings: Enzyme purification, subunit structure and kinetic properties. *Phytochemistry* **26**: 1293–1297.
- [6] BISWAS T. K., CUNDIFF C. 1991. Multiple forms of acid phosphatase in germinating seeds of *Vigna sinensis*. *Phytochemistry* **30**: 2119–2125.
- [7] BOLLER T., KENDE H. 1979. Hydrolytic enzymes in the central vacuole of plant cells. *Plant Physiol.* **63**: 1123–1132.
- [8] CAMPBELL H. D., DIONYSIUS D. A., KEOUGH D. T., WILSON B. E., DE JERSEY J., ZERNER B. 1978. Iron-containing acid phosphatases: comparison of the enzymes from beef spleen and pig allantoic fluid. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **82**: 615–620.
- [9] CARTER P. J., NIMMO H. G., FEWSON C. A., WILKINS M. B. 1990. *Briophyllum fedtschenkoi* protein phosphatase type 2A can dephosphorylate phosphoenolpyruvate carboxylase. *FEBS Lett.* **263**: 233–236.
- [10] CHENG W.-F., TAO M. 1989. Purification and characterization of a phosphotyrosyl-protein phosphatase from wheat seedlings. *Biochim. Biophys. Acta* **998**: 271–276.
- [11] CHRISTELLER J. T., TOLBERT N. E. 1978. Phosphoglycolate phosphatase. *J. Biol. Chem.* **253**: 1780–1785.
- [12] CHUNG R. P.-T., POLYA G. M. 1992. Copurification and characterisation of poppy seed phosphatase and phosphoprotein phosphatase activities. *Plant Sci.* **84**: 153–162.
- [13] DE LEO P., SACHER J. 1970. Control of ribonuclease and acid phosphatase by auxin and abscisic acid during senescence of *Rhoeo* leaf sections. *Plant Physiol.* **46**: 806–811.
- [14] DEBRUNNER P. G., HENDRICH M. P., DE JERSEY J., KEOUGH D. T., SAGE T. J., ZERNER B. 1983. Mössbauer and EPR study of the binuclear iron centre in purple acid phosphatase. *Biochim. Biophys. Acta* **745**: 103–106.
- [15] DEWALD D. B., MASON H. S., MULLET J. E. 1992. The soybean vegetative storage proteins vsp and vsp are acid phosphatases active on polyphosphates. *J. Biol. Chem.* **22**: 15958–15964.
- [16] DUFF S. M., LEFEBVRE D. D., PLAXTON W. C. 1989. Purification and characterization of a Phosphoenolpyruvate phosphatase from *Brassica nigra* suspension cells. *Plant Physiol.* **90**: 734–741.
- [17] DUFF S. M., LEFEBVRE D. D., PLAXTON W. C. 1991. Purification, characterization and subcellular localization of acid phosphatase from *Brassica nigra* suspension cells. Comparison with phosphoenolpyruvate phosphatase. *Arch. Biochem. Biophys.* **286**: 226–232.
- [18] DUFF S. M., PLAXTON W. C., LEFEBVRE D. D. 1991. Phosphate-starvation response in plant cells. *De novo* synthesis and degradation of acid phosphatase. *Proc. Natl. Acad. Sci. (USA)* **88**: 9538–9542.
- [19] DUFF S. M., SARATH G., PLAXTON W. C. 1994. The role of acid phosphatases in plant phosphorus metabolism. *Physiol. Plant.* **90**: 791–800.
- [20] EVANS M., FAWCETT T., BOULTER D., FORDHAM-SKELTON A. P. 1994. A homologue of the 65 kDa regulatory subunit of protein phosphatase 2A in early pea (*Pisum sativum* L.) embryos. *Plant Mol. Biol.* **24**: 689–695.
- [21] FERENS M., MORAWIECKA B. 1983. Materiały XIX Zjazdu Polskiego Towarzystwa Biochemicznego str. 330
- [22] FERENS M., MORAWIECKA B. 1984. Kwaśne fosfatazy roślin. *Postępy Biochemii* **30**: 462–475.
- [23] FERTE N., MOUSTACAS A., NARI J., TEISSERE M., BOREL M., THIEBART I., NOAT G. 1993. Characterization and kinetic properties of soya-bean cell-wall phosphatase. *Eur. J. Biochem.* **211**: 297–304.
- [24] FUJIMOTO S., NAKAGAWA T., OHARA A. 1977. Isolation of violet-colored acid phosphatase from soybean. *Agric. Biol. Chem.* **41**: 599–600.
- [25] FUJIMOTO S., OHARA A., UEHARA K. 1980. Carbohydrate and metal analyses of violet-colored acid phosphatase of sweet potato. *Agric. Biol. Chem.* **44**: 1659–1660.
- [26] GABBRIELLI R., GROSSI L., VERGNAMO O. 1989. The effects of nickel, calcium and magnesium on the acid phosphatase activity of two *Alyssum* species. *New Phytol.* **111**: 631–636.
- [27] GELLATLY K., MOORHEAD G. B. G., DUFF S. M., LEFEBVRE D. D., PLAXTON, W. C. 1993. Purification of potato tuber acid phosphatase having characteristics of a protein tyrosine phosphatase. *Plant. Physiol.* **102**: S-27.
- [28] GIBSON D. M., ULLAH H. J. 1988. Purification and characterization of phytase from cotyledons of germinating soybean seeds. *Arch. Biochem. Biophys.* **260**: 503–513.
- [29] GOLDSTEIN A. H., BAERTLEIN D. A., DANON A. 1989. Phosphate starvation stress as an experimental system for molecular analysis. *Plant Mol. Biol. Rep.* **7**: 7–16.
- [30] GOULD K. L., NURSE P. 1989. Tyrosine phosphorylation of the fission yeast cdc2⁺ protein kinase regulates entry into mitoses. *Nature* **342**: 39–45.
- [31] HEFLER S. K., AVERILL B. A. 1987. The „manganese(III) – containing” purple acid phosphatase from sweet potatoes is an iron enzyme. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **146**: 1173–1177.
- [32] HSU R. Y., CLELAND W. W., ANDERSSON L. 1966. Mechanism of action of the nonspecific phosphomonoesterases from potatoes. *Biochemistry* **5**: 799–807.
- [33] IGAUE I., WATABE H., TAKAHASHI K., TAKEKOSHI M., MOROTA A. 1976. Violet-colored acid phosphatase isoenzymes associated with cell wall preparations from rice plant cultured cells. *Agric. Biol. Chem.* **40**: 823–825.
- [34] JONSSON I. 1981. Acid phosphatase from needles of *Pinus silvestris*. Purification of two interconvertible enzyme and characterization of a low-molecular we-

- ight factor associated with the enzyme. *Biochim. Biophys. Acta* **660**: 204–213.
- [35] KAMENAN A., DIOPOH J. 1983. Properties of two membrane-bound acid phosphatases compared with those of a cytoplasmic acid phosphatase from *Dioscorea rotundata*. *Plant Sci. Lett.* **32**: 305–312.
- [36] KLABUNDE T., STAHL B., SUERBAUM H., HAHNAER S., KARAS M., HILLENKAMP F., KREBS B., WITZEL H. 1994. The amino acid sequence of the red kidney bean Fe(III)-Zn(II) purple acid phosphatase. *Eur. J. Biochem.* **226**: 369–375.
- [37] KLABUNDE T., STRÄTER N., KREBS B., WITZEL H. 1995. Structural relationship between the mammalian Fe(III)-Fe(II) and the Fe(III)-Zn(II) plant purple acid phosphatases. *FEBS Lett.* **367**: 56–60.
- [38] KNYPL J. S., ROMANOWSKA Z. W., WILCZEK J. 1981. *Materialy IIIrd Symposium on Plant Growth Regulators*, Warna, Bułgaria, str.86.
- [39] LABOURE A.-M., GAGNON J., LESCURE A.-M. 1993. Purification and characterization of a phytase (myo-inositol-hexakisphosphate phosphohydrolase) accumulated in maize (*Zea mays*) seedlings during germination. *Biochem. J.* **295**: 413–419.
- [40] LEBANSKY B. R., MCKNIGHT T. D., LAWRENCE L. R. 1992. Purification and characterization of a secreted purple phosphatase from soybean suspension cultures. *Plant Physiol.* **99**: 391–395.
- [41] LEE R. B. 1988. Phosphate influx and extracellular phosphatase activity in barley roots and rose cells. *New Phytol.* **109**: 141–148.
- [42] LEFEBVRE D. D., DUFF S. D., FIFE C. A., JULIEN-INALSINGH C., PLAXTON W. C. 1990. Response to intracellular, cell surface, and secreted phosphatase activities compared to increases in P_i-absorption rate. *Plant Physiol.* **93**: 504–511.
- [43] LORENC-KUBIS I., MORAWIECKA B. 1980. Purification and some properties of the main polymorphic form of acid phosphatase from *Poa pratensis* seeds. *Acta Biochim. Polon.* **27**: 345–353.
- [44] MCKINTOSH C., COGGINS J., COHEN P. 1991. Subcellular distribution, detection of protein phosphatase 2C and identification of protein phosphatase 2A as the major quinque dehydrogenase phosphatase. *Biochem. J.* **273**: 733–738.
- [45] MIERNYK J., A. 1992. Purification and characterization of the major acid phosphatase isoenzyme secreted by maize endosperm cultures. *Phytochemistry* **31**: 2613–2616.
- [46] MULLIGAN R., TOLBERT N. 1980. Properties a membrane bound phosphatase from the tylakiods spinach chloroplasts. *Plant Physiol.* **66**: 1169–1173.
- [47] PAN S. 1987. Characteristics of multiple acid phosphatases in salt stressed spinach leaves. *Aust. J. Plant. Physiol.* **14**: 117–124.
- [48] PARK H. C., VAN ETTEN R. L. 1986. Purification and characterization of homogenous sunflower seed acid phosphatase. *Phytochemistry* **25**: 351–357.
- [49] PAUL E. M., WILLIAMSON V. M. 1987. Purification and properties of acid phosphatase-1 from nematode resistant tomato cultivar. *Plant Physiol.* **84**: 399–403.
- [50] PINGEL J. T., THOMAS M. L. 1989. Evidence that leukocyte-common antigen is required for antigen-induced T lymphocyte proliferation. *Cell* **58**: 1055–1065.
- [51] POLYA G. M., WETTENHALL R. E. H. 1992. Rapid purification and N-terminal sequencing of potato tuber cyclic nucleotide binding phosphatase. *Biochim. Biophys. Acta* **1159**: 179–184.
- [52] RANDALL D. D., TOLBERT N. E. 1971. 3-Phosphoglycerate phosphatase in plants. I. Isolation and characterization from sugar cane leaves. *J. Biol. Chem.* **246**: 5510–5517.
- [53] RANDALL N. E., TOLBERT N. E., GREML D. 1971. 3-Phosphoglycerate phosphatase in plants. II. Distribution, physiological considerations, and comparison with phosphoglycolate phosphatase. *Plant Physiol.* **48**: 480–487.
- [54] SIEGL G., MACKINTOSH C., STITT M. 1990. Sucrose-phosphate synthase is dephosphorylated by protein phosphatase 2A in spinach leaves: evidence from the effects of okadaic acid and microcystin. *FEBS Lett.* **270**: 198–202.
- [55] SLABAS A. R., FORDHAM-SKELTON A. P., FLETCHER D., MARTINEZ-RIVAS J. M., SWINHOE R., CROY R. R. D., EVANS I. M. 1994. Characterisation of cDNA and genomic clones encoding homologues of the 65 kDa regulatory subunit of protein phosphatase 2A in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Mol. Biol.* **26**: 1125–1138.
- [56] STAHL B., KLABUNDE T., WITZEL H., KREBS B., STEUP M., KARAS M., HILLENKAMP F. 1994. The oligosaccharides of the Fe(III)-Zn(II) purple acid phosphatase of the red kidney bean. *Eur. J. Biochem.* **214**: 313–321.
- [57] SUERBAUM H., KÖRNER M., WITZEL H., ALTHAUS E., MOSEL B., MÜLLER-WARMUTH W. 1993. Zn-exchange and Mössbauer studies on the [Fe-Fe] derivatives of the purple acid Fe(III)-Zn(II)-phosphatase from kidney beans. *Eur. J. Biochem.* **214**: 313–321.
- [58] THEODOROU M. E., PLAXTON W. C. 1993. Metabolic adaptations of plant respiration to nutritional phosphate deprivation. *Plant Physiol.* **101**: 339–344.
- [59] UEHARA S., FUJIMOTO S., TANIGUCHI T. 1974. Studies on violet-colored acid phosphatase of sweet potato. I. Purification and some physical properties. *J. Biochem.* **75**: 627–638.
- [60] UEHARA S., FUJIMOTO S., TANIGUCHI T., NAKAI K. 1974. Studies on violet-colored acid phosphatase of sweet potato. II. Enzymatic properties and amino acid composition. *J. Biochem.* **75**: 639–649.
- [61] UEKI K., SATO S. 1977. Regulation of phosphate synthesis by orthophosphate in cultured tobacco cells. *Plant Cell Physiol.* **18**: 1253–1263.
- [62] VINCENT J. B., CROWDER M. W., AVERILL B. A. 1992. Hydrolysis of phosphate monoesters: a biological problem with multiple chemical solutions. *Trends Biochem. Sci.* **17**: 105–110.
- [63] VOGELI-LANGE R., HOLLANDER-CZYTKO H., AMRHEIN N. 1989. Characterization and subcellular compartmentation of acid phosphatase in glycosate-treated buckwheat cell cultures. *Plant Sci.* **64**: 259–266.
- [64] WAYMACK P. P., VAN ETTEN R., L. 1991. Isolation and characterisation of a homogeneous isoenzyme of whe-

- at germ acid phosphatase. *Arch. Biochem. Biophys.* **288**: 621–633.
- [65] WILLIAMSON V. M., COLWELL G. 1991. Acid phosphatase-1 from nematode resistant tomato. Isolation and characterization of its gene. *Plant Physiol.* **97**: 139–146.
- [66] YAMAGATA H., TANAKA K., KASAI Z. 1980. Purification and characterization of acid phosphatase in aleurone particles of rice grains. *Plant Cell Physiol.* **21**: 1449–1460.