

ANDRZEJ BODYL

Zakład Systematyki Zwierząt i Zoogeografii
Instytut Zoologiczny Uniwersytetu Wrocławskiego
WrocławMECHANIZM TRANSPORTU AKTYWNEGO
PRZEZ PLAZMAEMMĘ KOMÓREK ROŚLINNYCH

WSTĘP

Aktywny transport różnych cząsteczek przez błonę cytoplazmatyczną należy do procesów wymagających energii metabolicznej. W komórkach roślinnych, zgodnie z postulatami chemiosmotycznej teorii Mitchella (Mitchell 1985, Nicholls 1987, *Podstawy cytofizjologii* 1992), energia ta jest wykorzystywana do polaryzacji elektrochemicznej plazmaemmy i wytwarzania tak zwanej siły transportowej (Briskin 1990, Poole 1978, Sz 1985). W procesie energizacji błony cytoplazmatycznej są zaangażowane specyficzne pompy protonowe (Doering i współaut. 1992, Luetge i Clarkson 1985, Serrano 1989, 1990), których aktywność powoduje jednokierunkowy (wektorowy) transport H^+ na zewnątrz komórki do apoplastu. Prowadzi to do asymetrycznego rozmieszczenia protonów w poprzek plazmaemmy i powstania gradientu potencjału chemicznego jonów H^+ . Efektem zmian stężenia protonów po zewnętrznej i wewnętrznej stronie błony komórkowej są różnice w wartości pH cytoplazmy i środowiska zewnętrznego (ΔpH). Większe stężenie protonów w obszarze pozakomórkowym przyczynia się do zakwaszenia ściany komórkowej (pH około 5,5), natomiast wartość pH cytoplazmy, stabilizowana przez wewnątrzkomórkowy system buforowy, wynosi około 7,0 (Sz 1985). Ponieważ wektorowy transport H^+ na zewnątrz plazmaemmy ma charakter elektrogeny, oprócz gradientu chemicznego tworzy się również gradient potencjału elektrycznego oznaczany przez $\Delta\Psi$. Jak wykazały pomiary elektrofizjologiczne średnia wartość $\Delta\Psi$ dla komórek roślinnych wynosi około -120 mV (po stronie cytoplazmy) (Sz 1985). Gradient pH i ładunku elektrycznego są składnikami gradientu elektrochemicznego protonów $\Delta\mu_{H^+}$ (Nicholls 1987, *Podstawy cytofizjologii* 1992, Sz 1985), który zapisujemy następującym wzorem:

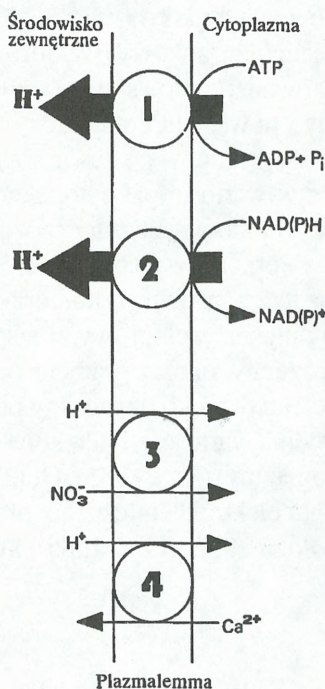
$$\Delta\mu_{H^+} = \Delta\Psi - \frac{2,3 RT}{F} \Delta pH$$

gdzie: R oznacza stałą gazową, T — temperaturę w °K, F — stałą Faradaya. Dla temperatury 30°C wzór ten upraszcza się do postaci:

$$\Delta\mu_{H^+} = \Delta\Psi - 60\Delta pH$$

TRANSPORT AKTYWNY JEST PROCESEM DWUETAPOWYM

Występujący w poprzek błony komórkowej gradient H^+ stanowi pewną formę energii potencjalnej, która może być zużyta w transporcie różnych cząsteczek, takich jak jony nieorganiczne, węglowodany, aminokwasy czy regulatory wzrostu (S z e 1985). Transport ten odbywa się najprawdopodobniej na zasadzie kotransportu (B r i s k i n 1990, P o o l e 1978, S z e 1985). Polega on na sprzężonym ruchu protonu oraz transportowanej cząsteczki przy udziale specyficznych nośników białkowych. W zależności od tego, czy transport cząsteczek, przykładowo kationów i anionów nieorganicznych, odbywa się do wewnątrz czy też na zewnątrz komórki wyróżniamy odpowiednio symport i antyport protonowy (rys. 1). W przypadku symportu zarówno H^+ , jak i pobierana przez komórkę substancja, są transportowane do cytoplazmy (ten sam kierunek transportu). Przykładem symportu protonowego może być transport azotanów przez plazmalemmę komórek roślinnych (K ł o b u s 1990). W przypadku antyportu, wnikanie protonu do wnętrza komórki jest związane z przemieszczaniem się transportowanej cząsteczki do środowiska zewnętrznego (przeciwny kierunek transportu). Na zasadzie antyportu protonowego odbywa się, na przykład wydzielanie Ca^{2+} do ściany komórkowej, co stanowi jeden z mechanizmów regulacji cytosolowego poziomu tego jonu w komórkach roślinnych (B i a ł c z y k i L e c h o w s k i 1990).



Energii dla funkcjonowania transporterów błonowych dostarcza dyfuzja jonów H^+ , które zgodnie z istniejącym w poprzek plazmalemmy gradientem chemicznym dążą do wyrównania swoich stężeń po obu stronach błony. Ruch protonów do cytoplazmy jest wzmacniany dodatkowo siłami elektrostatycznymi, które powodują przyciąganie H^+ przez ujemnie naładowane wnętrze komórki.

Energii dla funkcjonowania transporterów błonowych dostarcza dyfuzja jonów H^+ , które zgodnie z istniejącym w poprzek plazmalemmy gradientem chemicznym dążą do wyrównania swoich stężeń po obu stronach błony. Ruch protonów do cytoplazmy jest wzmacniany dodatkowo siłami elektrostatycznymi, które powodują przyciąganie H^+ przez ujemnie naładowane wnętrze komórki.

Rys. 1. Chemiosmotyczny model transportu aktywnego. Gradient potencjału elektrochemicznego protonów $\Delta\mu_{H^+}$ powstały dzięki pompie protonowej typu H^+ -ATPazy (1) lub NAD(P)H-oksydoreduktazy (2) może być wykorzystywany w transporcie azotanów (3) i wapnia (4). Transport NO_3^- odbywa się na zasadzie symportu, natomiast Ca^{2+} na drodze antyportu protonowego. Jony azotanowe przenikają do wnętrza, a wapniowe na zewnątrz komórki.

Transport aktywny, odbywający się według modelu chemiosmotycznego, jest procesem dwuetapowym (B r i s k i n 1990, P o o l e 1978, S z e 1985). Pierwszy etap jest związany z funkcjonowaniem plazmalemmowych pomp protonowych, które „pompując” na zewnątrz błony jony H^+ prowadzą do utworzenia gradientu elektrochemicznego protonów $\Delta\mu_H$. Jest to tak zwany transport pierwotny. Aktywny transport protonów, zachodzący podczas transportu pierwotnego, jest połączony ze zużyciem energii, której dostarczają ATP lub NADH i NADPH. Podobnie jak w przypadku syntezy ATP w mitochondriach i chloroplastach (G r e g o r y 1989, N i c h o l l s 1987, *Podstawy cytofizjologii* 1992), czynnikiem sprzęgającym (łączącym) proces endoergiczny (transport aktywny) z egzoergicznym (hydroliza ATP lub utlenianie NADH i NADPH) jest $\Delta\mu_H$. W drugim etapie określanym jako transport wtórny jony H^+ , dzięki istniejącym w poprzek błony komórkowej różnicom pH (ΔpH) i ładunku elektrycznego ($\Delta\Psi$), powracają do wnętrza komórki, a proces ten jest sprzężony z transportem różnych cząsteczek, w którym zaangażowane są specyficzne nośniki błonowe.

STRUKTURA I FUNKCJONOWANIE ATPazy PLAZMALEMMOWEJ

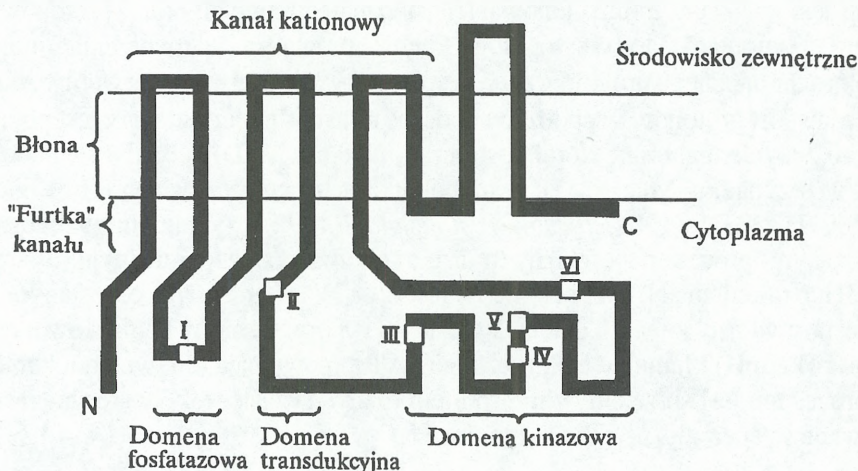
Podstawowym enzymem, który w komórkach roślinnych uczestniczy w tworzeniu gradientu elektrochemicznego protonów jest H^+ -ATPaza (B r i s k i n i H a n s o n 1992, S e r r a n o 1989, 1990, S z e 1985). Białko to o ciężarze cząsteczkowym wynoszącym około 105 kD (S e r r a n o 1990) jest zlokalizowane w plazmalemmie i występuje prawdopodobnie jako dimer lub trimer (A n t o n i S p a n s w i c k 1986, B r i s k i n i współaut. 1985). Przypuszcza się jednak, że każda z podjednostek H^+ -ATPazy może uczestniczyć niezależnie w transporcie protonów (G o o r m a g h t i g h i współaut. 1986). Funkcjonowanie H^+ -ATPazy wiąże się z odwracalnymi stanami fosforylacji i defosforylacji (B r i s k i n i H a n s o n 1992, S e r r a n o 1989, 1990), które są połączone ze zmianami konformacyjnymi łańcucha polipeptydowego. Schematycznie można to zapisać w następujący sposób:



przy czym E_1 oznacza konformację enzymu przed fosforylacją, a E_2 — po fosforylacji.

Ostatnie badania jakie przeprowadzono przy użyciu cDNA kodującego H^+ -ATPazy u kilku wybranych gatunków roślin, grzybów i pierwotniaków pozwoliły na zaproponowanie modelu tego białka w błonie (rys. 2). Przyjmuje się (B r i s k i n i H a n s o n 1992, S e r r a n o 1989, 1990), że łańcuch polipeptydowy H^+ -ATPazy tworzy osiem fragmentów transmembranowych, które od strony środowiska zewnętrznego są połączone czterema krótkimi pętlami zewnętrznymi, natomiast po stronie wewnątrzkomórkowej — jedną małą i dwoma dużymi pętlami cytoplazmatycznymi. Analiza komputerowa sekwencji aminokwasowych tych segmentów wskazała na możliwość istnienia w plazmalemmie 8 odcin-

ków o konformacji α -helisy (S e r r a n o 1989). Każdy z fragmentów transmembranowych byłby zbudowany z około 20 reszt aminokwasowych. Sześć pier-



Rys. 2. Proponowany model obszaru transmembranowego oraz funkcjonalnych domen H^+ -ATPazy (S e r r a n o 1989). Sekwencję sześciu wysoce konserwatywnych regionów zaznaczonych w postaci niezamalowanych kwadratów przedstawiono w tabeli 1.

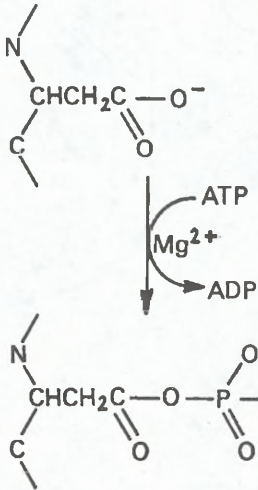
wszych helis tworzyłoby tunel, przez który mogłyby być transportowane protony. Helisy te powinny być amfipatyczne¹, co umożliwiłoby otrzymanie w hydrofobowym obszarze błony komórkowej kanału hydrofilowego, który jest wymagany dla wszystkich tuneli błonowych uczestniczących w transporcie kationów. Badania modelowe z syntetycznymi peptydami o właściwościach amfipatycznych sugerują, że do zbudowania funkcjonalnego kanału kationowego są wymagane cztery (O i k i i współaut. 1988) lub sześć (L e a r i współaut. 1988) α -helis. Podobną konstrukcję posiadają również naturalne tunele błonowe dla jonów nieorganicznych pochodzące z komórek różnych grup organizmów (K w i a t k o w s k a 1991).

Bliższa analiza struktury H^+ -ATPazy wymaga badań rentgenograficznych, które są obecnie niemożliwe, ponieważ jak dotychczas nie udało się wyizolować tego białka z błony i przeprowadzić go w postać krystaliczną.

Jak już wspomniano funkcjonowanie kanału protonowego H^+ -ATPazy jest połączone z fosforylacją i defosforylacją cząsteczki białka. Grupa fosforanowa uwalniana podczas hydrolizy ATP przyłącza się do reszty asparaginianowej (S e r r a n o 1990) (wiązanie acylofosforanowe, rys. 3) znajdującej się w bardzo

¹ Pojęcie amfipatyczności jest związane z polaryzacją hydrofilowo-hydrofobową α -helisy. Oznacza to, że na powierzchni cylindra, który tworzy fragment helikalny hydrofobowe i hydrofilowe reszty aminokwasów grupują się w dwóch oddzielnych sektorach tworząc, w zależności od stopnia amfipatyczności, obszary o różnie zaznaczonej hydrofilowości i hydrofobowości. Następnie kilka takich amfipatycznych α -helis poprzez asocjację może utworzyć w plazmalemmie tunel hydrofilowy. Jego wnętrze będzie zbudowane przez sektory hydrofilowe, natomiast obszary hydrofobowe będą oddziaływały z fosfolipidami błony oraz łączyły poszczególne α -helisy.

konserwatywnym ewolucyjnie obszarze drugiej pętli wewnętrznej, który określa się jako domenę transdukcyjną (S e r r a n o 1989). Sekwencję aminokwasową tego fragmentu podano w tabeli 1. Zawiera on oprócz asparagianu 3 reszty treoniny oraz jedną glicynę, leucynę i lizynę. W tej samej pętli są zlokalizowane jeszcze cztery inne zachowawcze sekwencje, które wspólnie tworzą domenę kinazową (S e r r a n o 1989). W obszarze tym następuje wiązanie ATP oraz jego hydroliza. Model przestrzenny domeny kinazowej przedstawiono na rysunku 4. W wiązaniu cząsteczki ATP uczestniczą prawdopodobnie cztery reszty asparagianu oraz dwie reszty lizyny. Trzy spośród czterech reszt asparagianu wiążą się z adeniną (aminokwasy te znajdują się w obszarze IV, V i VI), natomiast czwarta łączy się za pośrednictwem jonu Mg^{2+} z dwiema resztami kwasu fosforowego β i γ (aminokwas ten jest położony w obszarze VI). Dwie zasadowe reszty lizyny oddziałują elektrostatycznie z grupami fosforanowymi, przy czym pierwsza z nich, znajdująca się w obszarze III, stabilizuje resztę γ , a druga położona w obszarze VI — resztę α .



Trzecim fragmentem funkcjonalnym w H^+ -ATPazie jest domena fosfatazowa (S e r r a n o 1989), która katalizuje odłączenie fosforanu związanego wcześniej przez asparagian w obszarze transdukcyjnym. Domena ta znajduje się w pierwszej pętli cytoplazmatycznej i zawiera krótki, również bardzo zachowawczy filogenetycznie obszar składający się z treoniny, glicyny, glutaminianu oraz seryny.

Rys. 3. Mechanizm fosforylacji H^+ -ATPazy. Reszta kwasu asparaginowego znajdująca się w domenie transdukcyjnej (obszar II na rys. 2) jest podczas cyklu katalitycznego enzymu fosforylowana z utworzeniem bezwodnikowego wiązania acylofosforanowego. Wiązanie to powstaje między resztą $-COO^-$ asparagianu i grupą fosforanową ATP.

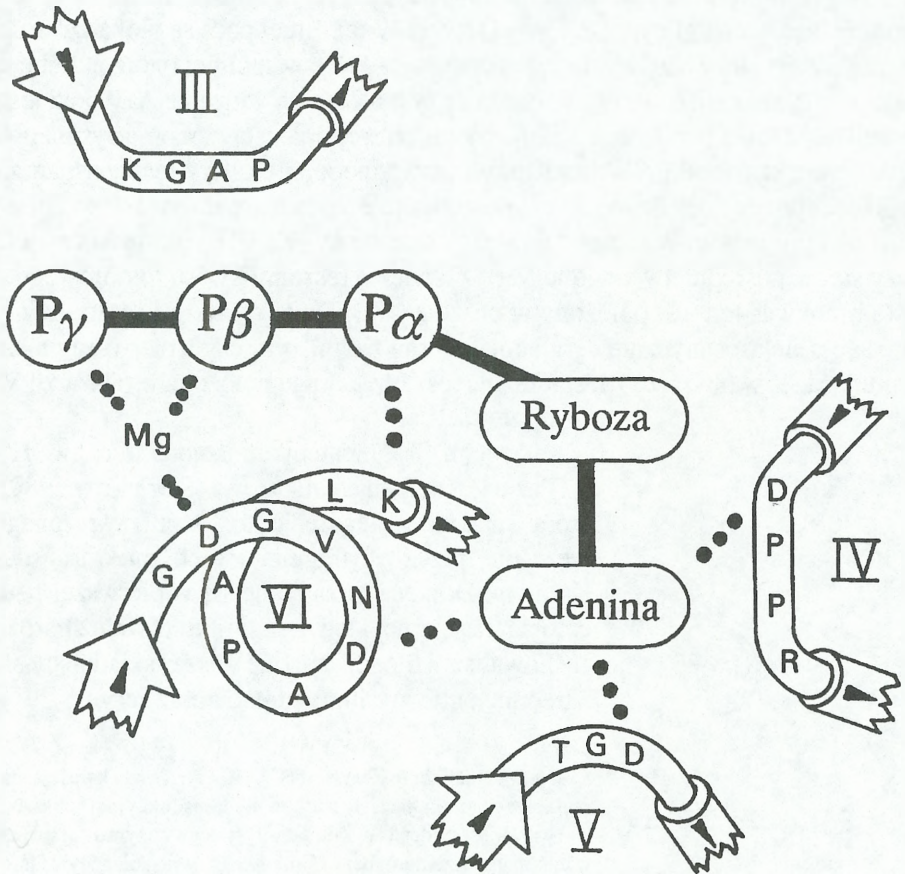
Tabela 1

Konserwatywne obszary H^+ -ATPazy oraz ich przypuszczalne funkcje^a (S e r r a n o 1989)

Obszar		Proponowana funkcja
1	TGES	Aktywność fosfatazowa (E)
2	DKTGTLT	Fosforylacja i transdukcja (D)
3	KGAP	Wiązanie ATP i/lub aktywność kinazowa (K)
4	DPPR	Wiązanie ATP (D)
5	MITGD	Wiązanie ATP (D)
6	TGDGVNDAPALK	Wiązanie ATP (dwa D i K)

^a Sekwencje aminokwasów zachowawczych obszarów H^+ -ATPazy przedstawiono w formie kodu jednoliterowego. Symbole literowe poszczególnych reszt aminokwasowych oznaczają odpowiednio: T — treonina, G — glicyna, E — glutaminian, S — seryna, D — asparagian, K — lizyna, L — leucyna, A — alanina, P — prolina, R — arginina, M — metionina, I — izoleucyna, V — walina, N — asparagina.

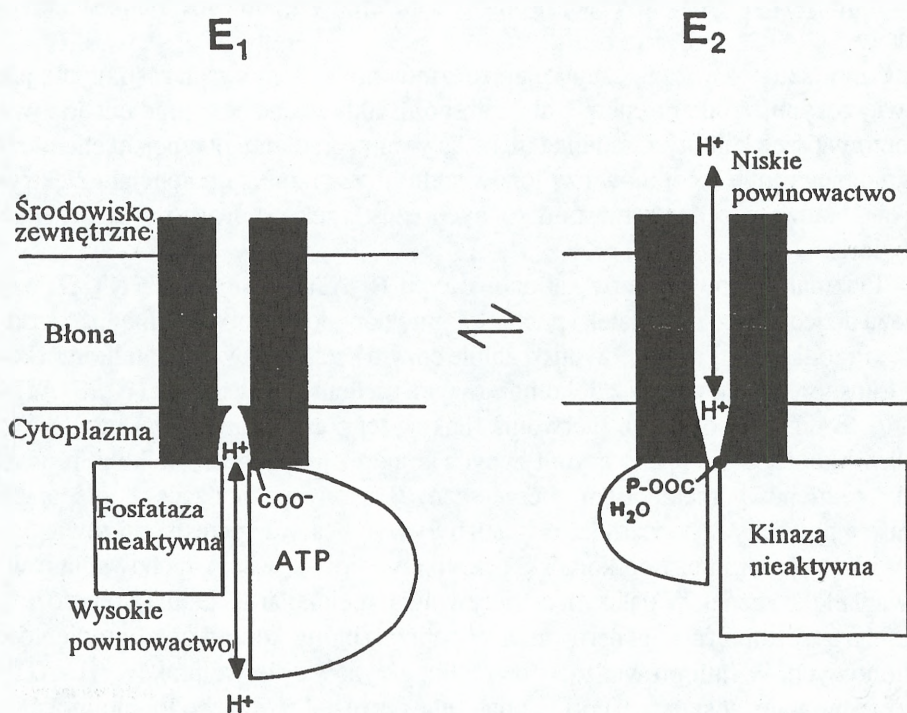
Przyjmuje się, że trzy funkcjonalne domeny H^+ -ATPazy są położone przy podstawie kanału protonowego tworząc rodzaj „furtki” dla tego tunelu (S e r r a-



Rys. 4. Hipotetyczne miejsca wiążące ATP w H^+ -ATPazie (S e r r a n o 1989). Cyfry rzymskie od III do VI odpowiadają konserwatywnym obszarom z tabeli 1. Strzałki reprezentują odcinki β -harmonijki, natomiast cylindry- fragmenty α -helisy. Wyjaśnienie symboli poszczególnych aminokwasów podano w tabeli 1.

no 1990, rys. 5). W konformacji E_1 domena kinazowa jest aktywna, a fosfatazowa nieaktywna i miejsce wiązania protonu w „furtce” kanału wiąże H^+ od strony cytoplazmatycznej z wysokim powinowactwem. W konformacji E_2 domena fosfatazowa jest aktywna, a kinazowa nieaktywna i miejsce wiązania protonu w „furtce” kanału wiąże H^+ ze strony zewnętrznej błony z niskim powinowactwem. Dlatego też, aby enzym zakończył swój cykl katalityczny, musi przechodzić z jednej konformacji do drugiej, co powoduje skuteczne pompowanie protonów. Wydaje się (S e r r a n o 1990), że zmiana konformacyjna jest „włączana” przez fosforylację konserwatywnego regionu II. Ponieważ region ten (domena transdukcyjna) jest najprawdopodobniej zlokalizowany w „furtce” kanału, zmiana konformacyjna

może modyfikować zarówno powinowactwo i kierunkowość kanału, jak i aktywność domeny kinazowej i fosfatazowej.



Rys. 5. Model mechanizmu sprzęgającego hydrolizę ATP z transportem protonów w H⁺-ATPazie (Serrano 1990).

H⁺-ATPaza NALEŻY DO ODREBNEJ RODZINY AKTYWNYCH POMP KATIONOWYCH

Odpowiednikiem H⁺-ATPazy w komórkach zwierzęcych jest Na⁺, K⁺-ATPaza (Serrano 1989). Enzym ten, zwany popularnie pompą sodowo-potasową, katalizuje wymienny transport Na⁺ i K⁺, przy czym jony sodu są transportowane na zewnątrz, a jony potasu do wewnątrz komórki (*Podstawy cytofizjologii* 1992). Prowadzi to do różnic w stężeniu tych jonów po obu stronach plazmalemmy. Stężenie Na⁺ w środowisku pozakomórkowym jest około 12 razy wyższe, a K⁺ około 39 razy niższe niż w środowisku wewnątrzkomórkowym (*Podstawy biofizyki* 1985). Gradient elektrochemiczny jonów sodu, podobnie jak gradient H⁺ w komórkach roślinnych, może zostać następnie zużyty w aktywnym transporcie różnych cząsteczek. Stwierdzono (Darnell i współaut. 1986), że powrotny ruch Na⁺ do cytosolu może być sprzężony z transportem cukrów i aminokwasów, który odbywa się na zasadzie symportu. Natomiast na drodze antyportu jest uruchamiany przez jony sodu zewnątrzkomórkowy transport Ca²⁺ (Darnell i współaut. 1986).

Jony potasu nie uczestniczą w transporcie wtórnym. Ich główną funkcją jest tworzenie potencjału dyfuzyjnego (*Podstawy biofizyki* 1985), co prowadzi do powstania po cytoplazmatycznej stronie plazmalemy ujemnego ładunku elektrycznego.

Powyższe rozważania sugerują, że zarówno w komórkach roślinnych, jak i zwierzęcych, źródłem energii dla transportu aktywnego jest gradient jonowy tworzony przez kationy. Gradient ten, będący sumą gradientu potencjału chemicznego danego jonu (protonów czy jonów sodu) oraz gradientu potencjału elektrycznego, może napędzać transport różnych cząsteczek na drodze symportu lub antyportu.

Plazmalemmowe pompy kationowe typu H^+ -ATPazy oraz Na^+ , K^+ -ATPazy należą do jednej rodziny białek i pochodzą prawdopodobnie od wspólnego „przodka”. „Przodkiem” tym był przypuszczalnie enzym katalizujący zewnątrzkomórkowy transport H^+ połączony z dokomórkowym ruchem jonów potasu (H^+ , K^+ -ATPaza ?) (S e r r a n o 1989). Pierwotną funkcją tej pompy kationowej mogło być „odkwaszanie” cytoplazmy prymitywnych komórek anaerobowych, które prowadziły beztlenowy metabolizm energetyczny. Protony pochodzące z dysocjacji kwasów powstałych podczas fermentacji były wyrzucane do przestrzeni zewnątrzkomórkowej, natomiast do komórki przenikały jony K^+ w celu zachowania równowagi elektrycznej. W dalszym etapie ewolucji molekularnej białka z tej rodziny zaczęły uczestniczyć w generowaniu w poprzek błony komórkowej gradientów kationowych. W linii prowadzącej do roślin, grzybów i pierwotniaków (H^+ -ATPazy) zachowany został transport H^+ , natomiast przestał prawdopodobnie funkcjonować transport jonów potasu. W linii wiodącej do zwierząt (Na^+ , K^+ -ATPazy) protony zostały zastąpione przez jony sodu, przy czym nie zanikł transport K^+ . Interesującym jest, że H^+ -ATPazy z grzybów i roślin mogą być stymulowane przez jony potasu (B r i s k i n i H a n s o n 1992, S z e 1985), co świadczyłoby o degeneracji miejsca transportu K^+ w tym enzymie (S e r r a n o 1989). Również w zwierzęcej Na^+ , K^+ -ATPazie odkryto pewne pierwotne właściwości, polegające na niewielkiej aktywności wymiany H^+ na K^+ (H a r a i N a k a o 1986). Aktywności te są niewątpliwie pewnym świadectwem zaszłej już ewolucji, a jednocześnie umożliwiają odtworzenie hipotetycznego „przodka” tych białek.

Do rodziny aktywnych pomp kationowych (tab. 2) należą również Ca^{2+} -ATPazy z komórek roślin i zwierząt, H^+ , K^+ -ATPaza z gastrocytów (komórki żołądka) oraz K^+ -ATPazy z komórek bakterii (S e r r a n o 1989, 1990). Ca^{2+} -ATPazy katalizują wymianę Ca^{2+} na H^+ (jony wapnia transportowane są na zewnątrz komórki), natomiast K^+ -ATPazy wymianę Na^+ lub H^+ na K^+ (jony potasu przenikają do wnętrza komórki). Wzajemne powiązania filogenetyczne między tymi białkami przedstawiono na rysunku 6.

Wszystkie wymienione wcześniej ATPazy należą do tak zwanych (EP) ATPaz (B r i s k i n i H a n s o n 1992). W enzymach tych terminalna grupa fosforanowa (P) odłączana od ATP podczas jego hydrolizy przyłącza się do cząsteczki białka

Tabela 2

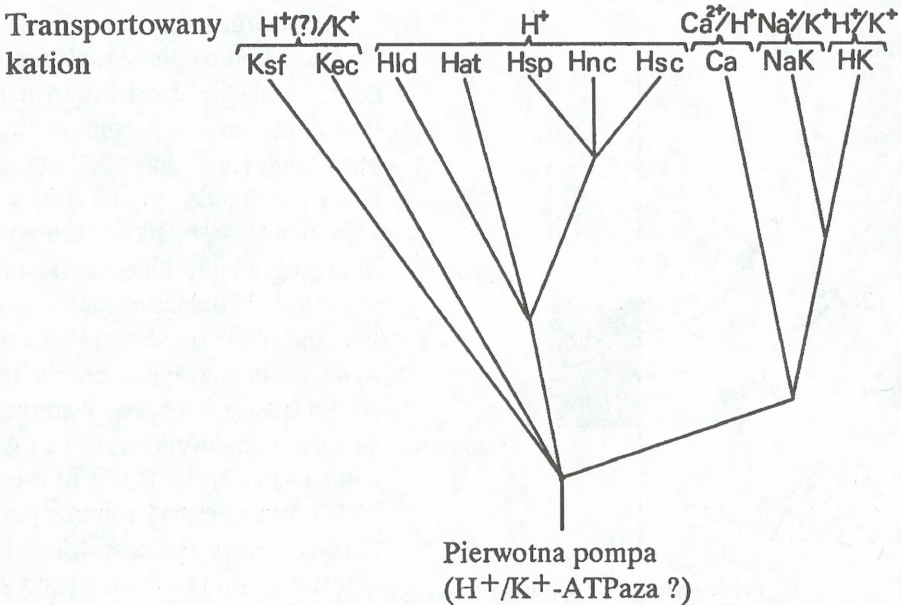
Podobieństwo między (E-P)ATPazami^{a,b} (Serrano 1989)

	Hsc	Hnc	Hsp	Hat	Hld	Ca	NaK	HK	Ksf	Kec
Hsc	100	86,0	85,2	58,2	56,5	49,5	47,1	48,5	48,1	47,8
Hnc		100	86,6	59,7	57,8	47,6	48,8	47,2	49,1	46,3
Hsp			100	56,7	55,6	49,8	47,5	49,4	45,6	43,2
Hat				100	57,8	49,7	50,3	48,9	47,7	44,5
Hld					100	48,0	48,7	50,5	47,8	46,0
Ca						100	53,0	53,8	47,7	45,3
NaK							100	81,1	46,1	43,8
HK								100	44,4	45,1
Ksf									100	47,9
Kec										100

^a Symbole sekwencji różnych ATPaz: Hsc, H⁺-ATPaza z *Saccharomyces cerevisiae*; Hnc, H⁺-ATPaza z *Neurospora crassa*; Hsp, H⁺-ATPaza z *Saccharomyces pombe*; Hat, H⁺-ATPaza z *Arabidopsis thaliana*; Hld, H⁺-ATPaza z *Leishmania donovani*; Ca, Ca²⁺-ATPaza z retikulum endoplazmatycznego; NaK Na⁺K⁺-ATPaza z nerki; HK, H⁺K⁺-ATPaza z żołądka; Ksf, K⁺-ATPaza z *Streptococcus faecalis*; Kec, K⁺-ATPaza z *Escherichia coli*.

^b Porównanie podobieństwa sekwencji (E-P) ATPaz dokonano za pomocą programu komputerowego BESTFIT

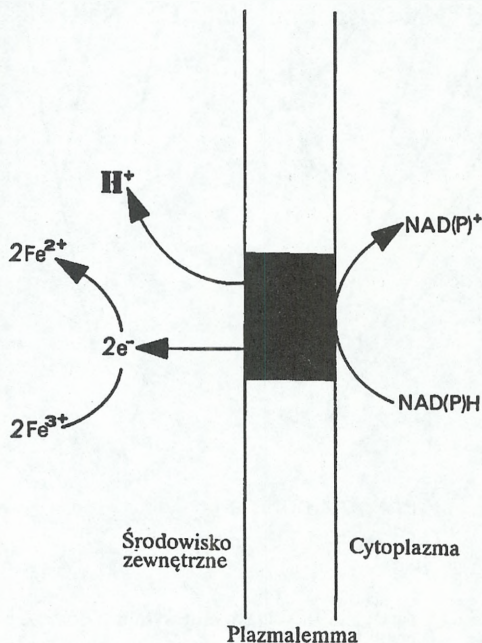
(E) tworząc ufosforylowaną formę pośrednią (EP) ATPazy. W dalszej reakcji fosforan jest odczepiany i ATPaza może połączyć się z następną cząsteczką kwasu fosforowego.



Rys. 6. Hipotetyczna ewolucja (EP) ATPaz (Serrano 1989). Wyjaśnienie symboli poszczególnych ATPaz znajduje się w tabeli 2.

NAD(P)H-OKSYDOREDUKTAZY JAKO TRANSMEMBRANOWE POMPY PROTONOWE

W plazmalemmie komórek roślinnych oprócz pompy protonowej hydrolizującej ATP funkcjonuje najprawdopodobniej również przepływ H^+ zależny od transmembranowego systemu transportu elektronów (Boetger i współaut. 1991, Doering i współaut. 1992, Luettge i Clarkson 1985, Moller i Crane 1990). Najważniejszym elementem tego układu są oksydoreduktazy nukleotydów pirydynowych, czyli dinukleotydu nikotynamidoadeninowego (NADH) i fosforanu dinukleotydu nikotynamidoadeninowego (NADPH) (rys. 7). Utlenianie NAD(P)H jest związane z uwalnianiem elektronów i protonów. Przy zużywaniu elektronów przez pozakomórkowego "biorcę" system ten działa jak pompa protonowa i może przez tworzenie $\Delta\mu_H$ współuczestniczyć w pobieraniu różnych cząsteczek. Akceptorami elektronów są najczęściej chelaty trójwartościowego żelaza z kwasami organicznymi, takimi jak przykładowo kwas cytrynowy. Ponieważ mają one stosunkowo wysoki potencjał redoks umożliwia to skuteczną redukcję Fe^{3+} do Fe^{2+} . System oksydoredukcyjny błony komórkowej może również uczestniczyć w redukcji żelaza znajdującego się w fitosideroforach i sideroforach produkowanych odpowiednio przez komórki roślin oraz bakterii (Boetger i współaut. 1991). Ostatnio Doering i współautorzy (1992) wykazali, że „biorcą” elektronów dla układu redoks może być także witamina K.



W komórkach roślinnych oprócz nieindukcyjnego systemu redoks, zwanego standardowym lub konstytutywnym, występuje inny, określany jako „turbo”, i mający charakter indukcyjny (Boetger i współaut. 1991). Indukcja tego systemu następuje podczas deficytu Fe w roślinie. Funkcjonowanie systemu „turbo” wiąże się z dwoma różnymi strategiami pobierania tego pierwiastka z gleby w warunkach stresu żelazowego (Boetger i współaut. 1991, Roemheld 1987). W strategii II, reprezentowanej przez trawy, (przedstawiciele rodziny *Poaceae*) Fe^{3+} jest wychwytywany za pomocą naturalnych chela-

Rys. 7. NAD(P)H-oksydoreduktazy jako plazmalemmowe pompy protonowe.

torów zwanych fitosideroforami, które są produkowane w komórkach korzeni. Kompleks fitosideroforu oraz jonu żelazowego jest transportowany następnie przez plazmalemmę komórek ryzodermy przy udziale specyficznych nośników. Redukcja Fe^{3+} odbywa się już wewnątrz rośliny w tkankach korzenia i pędu. Strategia I jest obecna u pozostałych okrytozalążkowych, nagonasiennych oraz paprotników. Zasadniczym elementem w tym systemie jest indukcyjna reduktaza „turbo”. Enzym ten redukuje nierozpuszczalne związki żelaza trójwartościowego, umożliwiając w ten sposób powstanie puli jonów Fe^{2+} , które następnie są transportowane przez błonowe kanały dla kationów dwuwartościowych. Funkcjonowanie reduktazy „turbo” jest powiązane z aktywnością H^+ -ATPazy, która powoduje zakwaszenie ryzosfery (B o e t g e r i współaut. 1991, R o e m h e l d 1987). Spadek pH w strefie korzeniowej przyczynia się do zwiększenia rozpuszczalności związków Fe^{3+} , a tym samym usprawnia asymilację żelaza w warunkach deficytowych.

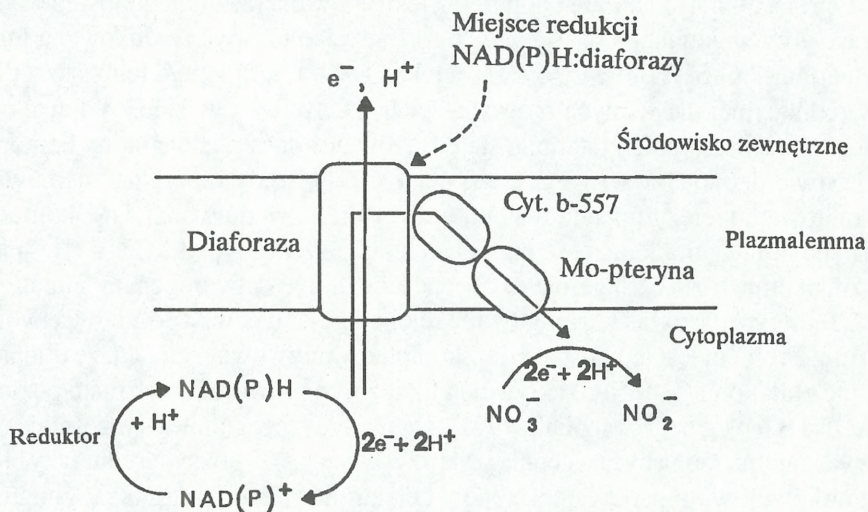
Tak więc w komórkach roślinnych system oksydoredukcyjny może uczestniczyć w generowaniu gradientu elektrochemicznego protonów dwiema niezależnymi drogami. Pierwszą stanowi konstytutywny system standardowy, natomiast drugą — indukcyjny system „turbo”.

Oprócz NADH i NADPH donorem elektronów dla plazmalemmowego systemu oksydoredukcyjnego w komórkach roślinnych może być zredukowana forma glutationu (2 G-SH, B o e t g e r i współaut. 1991). Trójpeptyd ten jest źródłem siły redukcyjnej dla różnych procesów zachodzących w cytosolu. W ten sposób cytoplazmatyczna pula glutationu staje się również dostępna dla błony komórkowej. Stwierdzono (B o e t g e r i współaut. 1991), że w komórkach marchwi po potraktowaniu ich sulfoksyiminą butioniny, która powoduje obniżenie komórkowego poziomu glutationu, nastąpił spadek redukcji żelazicyjanku ($Fe(CN)^{3-}$) przez plazmalemmę o 30%. Sugeruje to obecność w błonie dehydrogenazy glutationowej. Teoretycznie układ ten mógłby funkcjonować jako pompa protonowa tworząca $\Delta\mu_H$. Problem jest jednak bardziej skomplikowany z uwagi na fakt, że utleniona postać glutationu (G-S-S-G) aktywuje glikolizę, co prowadzi do wzrostu poziomu NADH (B o e t g e r i współaut. 1991). Nukleotydy te, zgodnie z wcześniejszymi rozważaniami, mogą być następnie wykorzystywane przez oksydoreduktazy błony komórkowej w transporcie protonów i elektronów, natomiast udział glutationu w tym procesie byłby tylko pośredni i polegał na stymulacji szlaku glikolitycznego.

BŁONOWA REDUKTAZA AZOTANOWA PRZYKŁADEM POMPY REDOKS

Ciekawym przykładem transplazmalemmowej pompy protonowej typu NAD(P)H-oksydoreduktazy jest reduktaza azotanowa (NR) występująca w błonie komórkowej (J o n e s i M o r e l 1988, W a r d i współaut. 1988). Łańcuch polipeptydowy NR tworzy trzy domeny, z których każda wiąże inny koenzym (B u c z e k i M a r c i n i a k 1990, H o f f i współaut. 1992, S o l o m o n s o n

i B a r b e r 1990). W obszarach tych zgodnie ze wzrostem potencjału redoks znajdują się odpowiednio FAD (I domena), cytochrom b_{557} (II domena) oraz Mo-pteryna (III domena). Układ ten funkcjonuje jak łańcuch oksydoredukcyjny i przekazując elektrony z NADH lub NADPH na jon azotanowy powoduje jego redukcję do jonu azotynowego. Interesujący model funkcjonowania reduktazy azotanowej w błonie komórkowej okrzemek z rodzaju *Thalassiosira* przedstawili J o n e s i M o r e l (1988). Autorzy ci stwierdzili spadek aktywności oksydoredukcyjnej plazmalemy po potraktowaniu komórek tego glonu przeciwciałami anty-NR. Wyniki te były interpretowane jako dowód na obecność w błonie cytoplazmatycznej komórek *Thalassiosira* reduktazy azotanowej oraz jej udział w transporcie jonów nieorganicznych. Aktywność oksydoredukcyjna NR jest związana najprawdopodobniej z domeną flawoproteinową zawierającą FAD. Obszar ten określa się również jako podjednostkę diaforazową. Według Jonesa i Morela (rys. 8) elektrony pochodzące z NADH i NADPH były transportowane na pozakomórkowe akceptory. Przepływowi elektronów na zewnętrzną stronę plazmalemy towarzyszył ruch jonów H^+ . Protony te uczestniczyły następnie w tworzeniu po obu stronach błony gradientu elektrochemicznego, który mógł być wykorzystany w transporcie NO_3^- oraz innych jonów.



Rys. 8. Proponowany model reduktazy azotanowej związanej z plazmalemą (J o n e s i M o r e l 1988). Podjednostka NAD(P)H:diaforazowa funkcjonuje jako transplazmalemowa reduktaza zewnątrzkomórkowych akceptorów elektronów oraz pompa protonowa. Domeny zawierające cytochrom b_{557} oraz Mo-pterynę uczestniczą w redukcji NO_3^- po wewnętrznej stronie błony komórkowej. Wytworzony w poprzek błony gradient elektrochemiczny protonów może być następnie zużyty w transporcie azotanów lub innych jonów.

Częściowym potwierdzeniem słuszności tych rozważań są doświadczenia z NADH: NR izolowaną z liści dyni, która redukowała Fe^{3+} do Fe^{2+} w sideroforach bakteryjnych (C a s t i g n e t t i i S m a r e l l i 1984, C a s t i g n e t t i i S m a

relli 1986). Podobne wyniki otrzymano również w eksperymentach z fitosideroforami traw (S m a r e l l i i C a s t i g n e t t i 1988). Było interesującym, że optimum pH dla redukcji Fe^{3+} w fitosideroforze wynosiło 6,0, natomiast dla redukcji azotanów -7,5. Można przyjąć, że podjednostka diaforazowa NR funkcjonuje jako reduktaza organicznych chelatów Fe i uczestniczy w asymilacji żelaza. Aktywność ta jest najprawdopodobniej związana z generowaniem $\Delta\mu_{\text{H}^+}$ w poprzek plazmalemmy.

W innym doświadczeniu z zastosowaniem zewnątrzkomórkowego akceptora elektronów J o n e s i M o r e l (1988) wykazali spadek pierwotnej syntezy aminokwasów, co było związane ze zmniejszeniem puli glutaminianu oraz glutaminy. Efekt ten był prawdopodobnie spowodowany zatrzymaniem ruchu elektronów z FAD na cytochrom b_{557} i Mo-pterynę, a następnie jon azotanowy. W konsekwencji zahamowało to redukcję NO_3^- oraz włączanie ich do pierwotnej syntezy aminokwasów. Dane te sugerują, że plazmalemmowa NR jest enzymem bifunkcyjnym. Uczestniczy on zarówno w transporcie jonów działając jako pompa protonowa, jak i redukcji NO_3^- do NO_2^- po wewnętrznej stronie błony komórkowej.

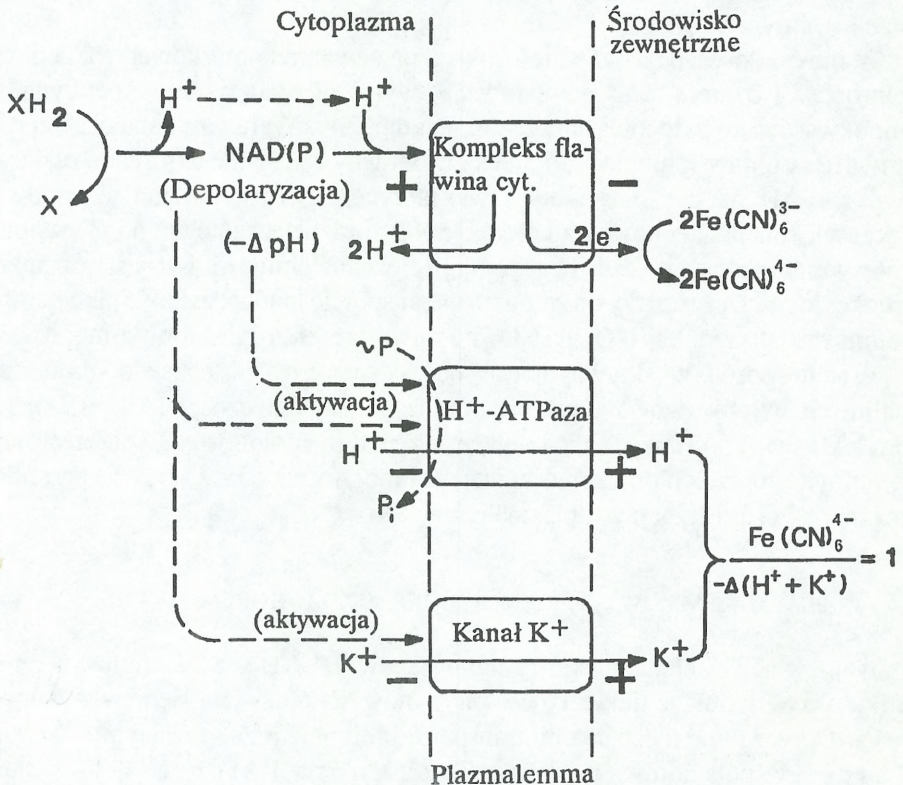
W ten sposób w aktywnym transporcie różnych cząsteczek do komórek roślinnych byłyby zaangażowane dwa układy enzymatyczne: NAD(P)H-oksydoreduktazy i H^+ -ATPazy funkcjonujące jako pompy protonowe. Tworzony przez te pompy w poprzek błony komórkowej $\Delta\mu_{\text{H}^+}$ mógłby napędzać aktywne przemieszczanie się cząsteczek przez plazmalemmę.

PLAZMALEMMOWY SYSTEM REDOKS AKTYWATOREM H^+ -ATPazy

Najpewniejszy element tego systemu stanowi H^+ -ATPaza. Natomiast w przypadku oksydoreduktaz nukleotydów pirydynowych pojawiają się pewne wątpliwości. Dotyczą one mechanizmu transportu protonów przez te enzymy. Według M a r r è i współautorów (1988) oraz T r o c k n e r a i M a r r è (1988) system oksydoredukcyjny plazmalemmy nie wydziela jonów H^+ na zewnątrz błony (rys. 9). Pozostają one w cytoplazmie i wspólnie z przetransportowanymi na pozakomórkowe akceptory elektronami powodują rozdzielanie w poprzek błony dodatnich i ujemnych ładunków elektrycznych, co prowadzi do depolaryzacji plazmalemmy. Poza tym gromadzące się w cytosolu protony powodują jego zakwaszenie. Stan taki (depolaryzacja plazmalemmy oraz zakwaszenie cytoplazmy) aktywuje H^+ -ATPazę, która rozpoczyna wydzielanie H^+ . Według tej koncepcji NAD(P)H-oksydoreduktazy byłyby tylko pośrednio zaangażowane w transmembranowy transport protonów.

Przedstawiona koncepcja nie tylko nie wyklucza udziału oksydoreduktaz plazmalemmowych w transporcie aktywnym, lecz zakłada, że układ generujący gradient elektrochemiczny H^+ stanowi kompleks H^+ -ATPazy i NAD(P)H-oksydoreduktazy. Ponadto jest możliwe, że system redoks uaktywnia H^+ -ATPazę bez masowego uwalniania protonów do cytosolu. Jeśli istnieje ścisły związek prze-

strzenny między miejscem utleniania NAD(P)H a miejscem wiązania H^+ , prowadzącym do aktywacji H^+ -ATPazy, to proton mógłby się przemieszczać do tego centrum w oddzielnym tunelu membranowym. Hipoteza ta (Boetger i współaut. 1991) jest oparta na analogii z chloroplastowym kanałem protonowym, który jest kontrolowany przez wapń (Dille y i Chiang 1988).



Rys. 9. Model przepływu elektronów i protonów połączony z redukcją żelazicyjanu ($Fe(CN)_3^-$) (Marrè i współaut. 1988). $Fe(CN)_3^-$ jest redukowany na zewnątrz błony ale H^+ uwalniane podczas utleniania NAD(P)H pozostają wewnątrz komórki. Protony te powodują następnie depolaryzację plazmalemmy i zakwaszenie cytosolu, co uaktywnia H^+ -ATPazę, która rozpoczyna wydzielanie H^+ .

GRADIENT ELEKTROCHEMICZNY PROTONÓW PODSTAWOWYM ŹRÓDŁEM ENERGII DLA RÓŻNYCH PROCESÓW KOMÓRKOWYCH

Ponieważ gradient elektrochemiczny protonów wydaje się być uniwersalnym źródłem energii dla różnych procesów endoergicznych zachodzących w komórkach roślinnych, spróbujemy jeszcze porównać mechanizm syntezy ATP w mitochondriach i chloroplastach (Gregory 1989, Nichols 1987, Podstawy cytofizjologii 1992) z omówionym tu mechanizmem transportu aktywnego różnych cząsteczek przez błonę cytoplazmatyczną. W obu przypadkach mamy do

czynienia z procesami wymagającymi energii. Według chemiosmotycznej teorii Mitchella magazynem tej energii jest gradient elektrochemiczny protonów $\Delta\mu_{\text{H}^+}$ powstający w wyniku wektorowego transportu jonów H^+ . Gradient ten łączy procesy endoergiczne (synteza ATP, transport aktywny) z procesami egzoergicznymi (transport elektronów, hydroliza ATP lub utlenianie NADH i NADPH). W tworzeniu $\Delta\mu_{\text{H}^+}$ uczestniczą pompy protonowe wyrzucające H^+ na zewnątrz lub do wewnątrz pewnego przedziału oddzielonego błoną. W mitochondriach i chloroplastach funkcję tych pomp spełniają pewne fragmenty łańcucha transportu elektronów, a protony są transportowane do przestrzeni perimitochondrialnej i wnętrza (lumen) tylakoidu. Natomiast w plazmalemmie, jak to przedstawiono powyżej, pompami protonowymi są H^+ -ATPazy i NAD(P)H-oksydoreduktazy, przy czym H^+ gromadzą się po zewnętrznej stronie błony komórkowej.

Czynnikiem warunkującym aktywność pomp protonowych jest źródło energii umożliwiające transport jonów wodorowych. W pierwszym przypadku jest nim ruch elektronów w łańcuchu oddechowym i fotosyntetycznym, a ściślej potencjał oksydoredukcyjny, natomiast w drugim hydroliza ATP lub utlenianie NADH i NADPH. Tworzenie ATP oraz aktywny transport różnych cząsteczek przez błonę cytoplazmatyczną są połączone z przemieszczaniem się jonów H^+ do obszaru, gdzie ich stężenie w wyniku aktywności pomp protonowych jest mniejsze (matriks mitochondrium, stroma chloroplastu, wnętrze komórki). Prowadzi to do wyrównania stężeń protonów po obu stronach błony oraz zaniku gradientu elektrochemicznego H^+ ($\Delta\mu_{\text{H}^+}$ ulega rozproszeniu). W mitochondriach i chloroplastach proces ten umożliwia syntezę ATP w czynnikach sprzęgających F_1 i CF_1 syntaz ATP (ATPazy). Natomiast wtórny transport protonów przez plazmalemmę uruchamia funkcjonowanie białek nośnikowych, które po przyłączeniu H^+ mogą uczestniczyć w transporcie różnych cząsteczek. W ten sposób zarówno tworzenie ATP, jak i transport aktywny możemy uznać za procesy dwuetapowe. W pierwszym z nich dochodzi do powstania w poprzek błony gradientu elektrochemicznego protonów $\Delta\mu_{\text{H}^+}$, który w drugim etapie tego procesu jest źródłem energii napędzającej syntezę ATP oraz aktywność białek transportowych.

ZAKOŃCZENIE

Do chwili ogłoszenia przez Mitchella hipotezy chemiosmotycznej wiele procesów bioenergetycznych było niezrozumiałych. Choć pierwotnie koncepcja ta tłumaczyła tylko mechanizm syntezy ATP w mitochondriach, to jednak dość szybko przekonano się o uniwersalności $\Delta\mu_{\text{H}^+}$ jako źródła energii w układach komórkowych. Teorię chemiosmotyczną zaadoptowano również do wyjaśnienia mechanizmu transportu aktywnego przez plazmalemmę komórek roślinnych. Podobnie jak w przypadku fosforylacji oksydacyjnej i fotosyntetycznej, źródłem energii dla transportu aktywnego jest gradient elektrochemiczny protonów, który tworzy się dzięki aktywności pomp protonowych.

Podstawową pompą protonową w plazmalemmie komórek roślinnych jest H^+ -ATPaza. Enzym ten dzięki hydrolizie ATP katalizuje wektorowy transport H^+ do apoplastu (transport pierwotny), co przyczynia się do zmiany wartości potencjału membranowego oraz pH w cytoplazmie i środowisku zewnętrznym. Energia zgromadzona w gradiencie elektrycznym ($\Delta\Psi$) i chemicznym (ΔpH) może być następnie wykorzystana w transporcie aktywnym jonów nieorganicznych, węglowodanów, aminokwasów i regulatorów wzrostu (transport wtórny). Transport ten odbywa się na zasadzie symportu i antyportu protonowego przy udziale specyficznych białek transportowych. Innym typem pompy protonowej w komórkach roślinnych są NAD(P)H-oksydoreduktazy, których aktywność prowadzi do utleniania wewnątrzkomórkowej puli nukleotydów pirydynowych. Funkcjonowanie oksydoreduktaz plazmalemmowych jako układów generujących $\Delta\mu_{H^+}$ jest powiązane przypuszczalnie z redukcją i asymilacją żelaza. Oprócz jonów Fe^{3+} akceptorem elektronów może być również witamina K. Według niektórych autorów pompy redoks są tylko pośrednio, poprzez aktywację H^+ -ATPazy, zaangażowane w transporcie jonów H^+ .

Przedstawione w tej pracy koncepcje świadczą o uniwersalności mechanizmów odpowiedzialnych za transport błonowy. Zarówno w komórkach roślin, jak i grzybów, zwierząt oraz bakterii aktywne przemieszczanie się różnych cząsteczek przez plazmalemmę jest napędzane gradientem kationów jednowartościowych. Gradienty te tworzą się przede wszystkim w wyniku aktywności pomp kationowych należących do rodziny EP ATPaz. Białka te pochodzą przypuszczalnie od jednego wspólnego „przodka”, którym była bakteryjna H^+, K^+ -ATPaza (?).

Dokładne zrozumienie mechanizmu transportu aktywnego przez plazmalemmę komórek roślinnych wymaga dalszych badań eksperymentalnych. Celem tych prac byłoby lepsze poznanie struktury i funkcjonowania H^+ -ATPazy, układu oksydoredukcyjnego błony komórkowej oraz transporterów błonowych działających na zasadzie kotransportu protonowego. Należy oczekiwać również odkrycia nowych białek zaangażowanych w transport aktywny. Białka te mogą być nie znanymi jeszcze pompami protonowymi oraz układami transportującymi aktywnie cząsteczki różnych związków organicznych i nieorganicznych.

Pragnę podziękować Pani Doktor Beacie Pokryszko za pomoc w powstaniu niniejszego artykułu, a także Pani Profesor Beacie Zagórskiej-Marek i Panu Profesorowi Józefowi Buczkowi za przeczytanie manuskryptu oraz udzielenie cennych rad i wskazówek.

MECHANISM OF ACTIVE TRANSPORT ACROSS THE PLASMA MEMBRANE IN PLANT CELLS

Summary

Active transport is a process which is directly dependent on the metabolic energy. In plant cells, according to Mitchell's theory, this energy is used to polarize the plasma membrane and to create electrochemical gradient of $\Delta\mu_{H^+}$ (the primary transport). This

gradient may be used in the active transport of inorganic ions, sugars, amino acids and growth regulators (the secondary transport). This transport is probably based on the proton symport or proton antiport.

The basic proton pump in the plasma membrane of plant cells is H^+ -ATPase. This enzyme is composed of the three functional domains (transduction, kinase and phosphatase domains), activity of which connected with the hydrolysis of ATP, enables H^+ transport. Another part of the protein chain takes part in the process of the construction of proton channel. H^+ -ATPase belongs to the family of active action pumps (EP) ATPases, ancestor of which was bacterial H^+, K^+ -ATPase (?). In animal cells the function of H^+ -ATPase is fulfilled by Na^+, K^+ -ATPase creating the Na^+ gradient.

Another type of proton pump in plant cells is probably NAD(P)H-oxidoreductase, involved with reduction and assimilation of iron. Following another concept, the redox pumps are involved only indirectly in the proton transport through activation of H^+ -ATPase.

LITERATURA

- Anton G. E., Spanswick R. M., 1986. *Purification and properties of the H^+ -translocating ATPase from the plasma membrane of tomato roots*. Plant Physiol. 81, 1080–1085.
- Białczyk J., Lechowski Z., 1990. *Rola wapnia w funkcjonowaniu systemów informacyjnych komórki roślinnej*. Wiad. Bot. 34, 11–30.
- Boetger M., Crane F. L., Barr R., 1991. *Physiological aspects of transplasma membrane electron transport in roots and cultured carrot cells*. [W:] *Oxidoreduction at the Plasma Membrane: Relation to Growth and Transport*, tom II: Plants, wyd. Crane F. L., Morre D. J., Loew H. E., CRC Press, Boca Raton, Ann Arbor, Boston, s. 207–236.
- Briskin D. P., 1990. *Transport in plasma membrane vesicles approaches and perspectives*. [W:] *The Plant Plasma Membrane: Structure, Function and Molecular Biology*, wyd. Larsson C., Moller J. M., Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, s. 154–181.
- Briskin D. P., Hanson J. B., 1992. *How does the plant plasma membrane H^+ -ATPase pump protons?* J. Exp. Bot. 43, 269–289.
- Briskin D. P., Thornely W. R., Roti-Roti J. L., 1985. *Target molecular size of the red beet plasma membrane ATPase*. Plant Physiol. 78, 642–644.
- Buczek J., Marciniak J. 1990. *Reduktaza azotanowa i reductaza azotynowa — kluczowe enzymy asymilacji azotanów w roślinach wyższych*. Wiad. Bot. 34, 19–32.
- Castignetti D., Smarelli J. Jr., 1984. *Siderophore reduction catalysed by higher plants NADH: nitrate reductase*. Biochem. Biophys. Res. Commun. 125, 52–58.
- Castignetti D., Smarelli J. Jr., 1986. *Siderophores the iron nutrition of plants and nitrate reductase*. FEBS Lett. 209, 147–151.
- Darnell J., Lodish H., Baltimore D., 1986. *Molecular cell biology*. Scientific American Books, New York.
- Dilley R. A., Chiang G., 1988. *Ca^{2+} gating of proton fluxes in thylakoid membranes*. [W:] *Plasma Membrane Oxidoreductases in Control of Animal and Plant Growth*, wyd. Crane F. L., Morre D. J., Loew H., Plenum Press, New York, s. 199–204.
- Doering O., Luethje S., Boettger M., 1992. *Modification of the activity of the plasma membrane redox system of Zea mays L. roots by vitamin K_3 and dicumarol*. J. Exp. Bot. 43, 175–181.
- Goormaghtigh E., Chadwick C., Scarborough G. A., 1986. *Monomers of the Neurospora plasma membrane H^+ -ATPase catalyze efficient proton translocation*. J. Biol. Chem. 261, 7466–7471.
- Gregory R. P. F., 1989. *Photosynthesis*. Chapman and Hall, New York.

- Hara Y., Nakao M., 1986. *ATP-dependent H⁺ uptake by proteoliposomes reconstituted with purified Na⁺, K⁺ -ATPase*. J. Biol. Chem. 261, 12655–12658.
- Hoff T., Stummann B. M., Henningsen K. W., 1992. *Structure, function and regulation of nitrate reductase in higher plants*. Physiol. Plant. 84, 616–624.
- Jones G. J., Morel F. M. M., 1988. *Plasmalemma redox activity in the diatom Thalassiosira. A possible role for nitrate reductase*. Plant Physiol. 87, 143–147.
- Kłobus G., 1990. *Endogenna regulacja pobierania azotanów*. Wiad. Bot. 34, 33–42.
- Kwiatkowska J., 1991. *Budowa kanałów jonowych: rodziny strukturalne*. Post. Biochem. 37, 122–128, 1991.
- Lea J. D., Wasserman Z. R., DeGrado W. F., 1988. *Synthetic amphiphilic peptide model for protein ion channels*. Science 240, 1177–1181.
- Luettge U., Clarkson D. T., 1985. *Mineral nutrition: plasmalemma and tonoplast redox activities*. Progress in Bot. 47, 73–86.
- Marrè M. T., Moroni A., Albergoni F. G., Marrè E., 1988. *Plasmalemma redox activity and H⁺ extrusion. I. Activation of the H⁺ -pump by ferricyanide — induced potential depolarization and cytoplasm acidification*. Plant Physiol. 87, 25–29.
- Mitchell P. M., 1985. *The correlation of chemical and osmotic forces in biochemistry*. J. Biochem. 97, 1–18.
- Møller J. M., Crane F. L., 1990. *Redox processes in the plasma membrane*. [W:] *The Plant Plasma Membrane: Structure, Function and Molecular Biology*, wyd. Larsson C., Møller J. M., Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, s. 93–126.
- Nicholls D. G., 1987. *Bioenergetyka. Wprowadzenie do teorii chemiosmotycznej*. PWN, Warszawa.
- Oiki S., Dauho W., Montal M., 1988. *Channel protein engineering: synthetic 22-mer peptide from the primary structure of the voltage — sensitive sodium channel forms ionic channel in lipid bilayers*. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 85, 2393–2397.
- Podstawy biofizyki*, 1985. Opracowanie zbiorowe pod redakcją A. Piławskiego. PZWL, Warszawa.
- Podstawy cytofizjologii*, 1992. Opracowanie zbiorowe pod redakcją J. Kawiaaka, J. Mireckiej, M. Olszewskiej i J. Warchoła. PWN, Warszawa.
- Poole R. J., 1978. *Energy coupling for membrane transport*. Annu. Rev. Plant Physiol. 29, 437–460.
- Roemheld V., 1987. *Different strategies for iron acquisition in higher plants*. Physiol. Plant. 70, 231–234.
- Serrano R., 1989. *Structure and function of plasma membrane ATPase*. Annu. Rev. Plant Physiol. 40, 61–94.
- Serrano R., 1990. *Plasma membrane ATPase*. [W:] *The Plant Plasma Membrane: Structure, Function and Molecular Biology*, wyd. Larsson C., Møller J. M., Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, s. 127–153.
- Smarelli J. Jr., Castignetti D., 1988. *Iron assimilation in plants reduction of ferrirhodosiderophore by NADH: nitrate reductase from squash*. Planta 173, 563–566.
- Solomonson L. P., Barber M. J., 1990. *Assimilatory nitrate reductase: functional, properties and regulation*. Annu. Rev. Plant Physiol. 41, 225–253.
- Sze H., 1985. *H⁺ -translocating ATPase: advances using membrane vesicles*. Ann. Rev. Plant Physiol. 36, 175–208.
- Trockner V., Maaré E., 1988. *Plasmalemma redox chain and H⁺ extrusion. II. Respiratory and metabolic changes associated with fusaric acid - induced and with ferricyanide - induced H⁺ extrusion*. Plant Physiol. 87, 30–35.
- Ward M. R., Tischner R., Huffaker R., 1988. *Inhibition of nitrate transport by anti-nitrate reductase IgG fragments and the identification of plasma membrane associated nitrate reductase in roots of barley seedlings*. Plant Physiol. 88, 1141–1145.