

POLSKIE TOWARZYSTWO BIOCHEMICZNE

# Postępy Biochemii

POSTBAH 32 (3)  
(241-392) (1986)

1986

tom 32 nr 3

PL ISSN 0032-5422



PAŃSTWOWE  
WYDAWNICTWO  
NAUKOWE

<http://rcin.org.pl>

## WSKAZÓWKI DLA AUTORÓW

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

Redakcja prosi autorów o przestrzeganie następujących wskazówek:

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

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

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

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

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

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

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

POLSKIE TOWARZYSTWO BIOCHEMICZNE

# Postepy Biochemii

KWARTALNIK

1986 TOM 32 ZESZYT 3

Wydane z pomocą finansową  
Polskiej Akademii Nauk

Postbah 32 (3)  
(241—392) (1986)

Państwowe Wydawnictwo Naukowe

<http://rcin.org.pl>

## RADA REDAKCYJNA

Przewodniczący: A. Legocki (Poznań)

Zastępca: I. Szumiel (Warszawa)

Sekretarz: B. Grzelakowska-Sztabert (Warszawa)

Członkowie: S. Angielski (Gdańsk), M. Chorąży (Gliwice), E. Czuryło (Warszawa), M. Fikus (Warszawa), E. Gąsior (Lublin), J. Gregorczyk (Szczecin), M. Gumińska (Kraków), D. Hulanicka (Warszawa), W. Jachymczyk (Warszawa), J. Kwiatkowska (Wrocław), S. Lewak (Warszawa),  
W. Mejbaum-Katzenellenbogen (Wrocław), A. Morawiecki (Wrocław),  
J. Pawełekiewicz (Poznań), K. Raczyńska-Bojanowska (Warszawa),  
L. Wojtczak (Warszawa), Z. Zielińska (Warszawa)

## REDAKTOR NACZELNY

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

## ZASTĘPCA REDAKTORA NACZELNEGO

D. Hulanicka PAN, Instytut Biochemii i Biofizyki, Rakowiecka 36, 02-532 Warszawa

## SEKRETARZ REDAKCJI

J. Tępińska

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

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

PAŃSTWOWE WYDAWNICTWO NAUKOWE — WARSZAWA 1986

Nakład 1638 + 92	Oddano do składania 20.III.1986 r.
Ark. wyd. 12,0, ark. druk. 9,5	Podpisano do druku w grudniu 1986 r.
Papier druk. sat. kl. IV 71 g. 70×100	Druk ukończono w styczniu 1987 r.
Zam. 2333(12)86	Cena zł 140,—

Drukarnia im. Rewolucji Październikowej, Warszawa



W styczniu 1984 roku minęła setna rocznica urodzin

**JAKUBA KAROLA PARNASA**

uczonego światowej sławy,  
twórcy polskiej szkoły biochemii w latach międzywojennych,  
profesora Chemii lekarskiej Uniwersytetu Jana Kazimierza we Lwowie,  
patrona dorocznej nagrody Polskiego Towarzystwa Biochemicznego  
za najlepszą pracę doświadczalną wykonaną w kraju.



Rok 1938. Profesor Jakub Karol Parnas w Laboratorium Zakładu Chemii Lekarskiej przy ul. Piekarskiej 52.



Towarzystwo Biochemiczne chcąc uczcić pamięć profesora PARNASA zorganizowało dnia 25 września 1985 roku, otwierającą XXI Zjazd, uroczystą sesję naukową w teatrze im. Juliusza Słowackiego w Krakowie, podczas której życie i twórczość naukową Profesora przedstawił Włodzimierz S. Ostrowski, a Marian Kochman wygłosił wykład pod tytułem: „Funkcjonalne zmiany konformacyjne białek”.

Towarzystwo dedykuje profesorowi Parnasowi bieżący zeszyt swego kwartalnika *Postępy Biochemii*.

Osobę i dzieła Profesora przywołują pamięci Czytelników:  
tekst wykładu Włodzimierza S. Ostrowskiego,  
wspomnienia Wandy Mejbaum,

wykaz Jego publikacji, a także publikacji Jego uczniów.

Spojrzenie współczesnej biochemii na wykryte przez Parnasa i Jego współpracowników zjawiska fosforolizy oraz syntezy i odnowy ATP prezentują: artykuł Jacka Kuźnickiego i Konrada Famulskiego oraz artykuł Krystyny Boguckiej.

„O mechanizmach przemian tkankowych” — by przytoczyć tytuł wykładu Profesora z przed blisko pięćdziesięciu lat — mówi w ujęciu dzisiejszej biologii komórki minireview Janiny Kwiatkowskiej.

Chemii żywności i żywienia, której poświęcił On wiele publikacji, tyczy artykuł Jerzego Dziuby. Z tematyką niektórych badań lwowskiej pracowni w zakresie chemii klinicznej graniczą także artykuły Wandy Dobryszczyckiej i Haliny Szafran. Komunikat Komisji Słownictwa Biochemicznego poprzedzają fragmenty odczytu profesora Parnasa „W sprawie polskiej terminologii fizjologiczno-chemicznej”.







## JAKUB KAROL PARNAS

### Życie i Twórczość \*)

Życie i twórczość naukowa Jakuba Karola Parnasa, które przyniosły Mu światową sławę, zbiegają się niemal dokładnie z narodzinami nowoczesnej biochemii. Datą przełomową w procesie wyodrębniania się biochemii jako niezależnej dyscypliny naukowej — zajmującej się wyjaśnia-



Profesor Jakub K. Parnas 1884—1949  
Fotografia z 1938 roku.

niem procesów biologicznych językiem chemii i fizyki — jest niewątpliwie rok 1897, kiedy to Edward Buchner wykazał, że fermentację cukru można przeprowadzić za pomocą bezkomórkowego płynu wyciśniętego z komórek drożdży. Parnas był wówczas trzynastoletnim chłopcem i uczęszczał do gimnazjum we Lwowie. W ciągu następnych trzydziestu

---

\*) Wykład wygłoszony 25 września 1985 roku w Teatrze im. Juliusza Słowackiego w Krakowie podczas Sesji otwarcia XXI-ego Zjazdu Polskiego Towarzystwa Biochemicznego.

lat Parnas stał się jednym z głównych architektów współczesnej biochemii, którzy przez swą pracę, atakowanie podstawowych procesów biologicznych metodami fizykalnymi, ukształtowali jej obecne oblicze i nadali impet dalszym badaniom.

Podstawę strategii odkrycia naukowego stanowi niewątpliwie określenie problemu i kolejności rozwiązywania poszczególnych jego elementów. Zdolność dostrzegania problemu jest o wiele trudniejsza niż umiejętność znalezienia jego rozwiązania, choć ostateczny efekt badania naukowego zależy od obu tych właściwości badacza. Jak można sądzić z rozwoju myśli naukowej profesora Parnasa, a także z wypowiedzi Jego najbliższych współpracowników, cechowały Go obie te właściwości.

Historia nauki nie tylko zapisuje odkrycia naukowe, ich chronologię, ale także określa logikę ich powstawania, wartość koncepcji danego systemu, a więc to, co nazywamy znaczeniem epistemologicznym nauki. Nie będąc historykiem nie pretenduję do tak głębokiej i wszechstronnej analizy dorobku naukowego profesora Parnasa i Jego szkoły. Postaram się natomiast przedstawić sylwetkę naukową Profesora i Jego osiągnięcia w dziedzinie biochemii opierając się przede wszystkim na własnych Jego publikacjach i wypowiedziach oraz na wspomnieniach licznych uczniów i kolegów. Za pomoc w uzyskaniu szczególnie cennych materiałów związanych z tym opracowaniem jestem szczerze wdzięczny profesorom: Tadeuszowi Baranowskiemu, Tadeuszowi Korzybskiemu, Wandzie Mejbaum-Katzenellenbogen, Janinie Opieńskiej-Blauth i Mariuszowi Żydowo. Nie będę się zajmował atmosferą panującą w Zakładzie Parnasa, Jego stosunkiem do podwładnych — te kwestie mogliby nasświetlić tylko ci, którzy tam pracowali. Zresztą na ten temat ukazały się wspomnienia Józefa Hellera i Włodzimierza Mozołowskiego, Tadeusza Korzybskiego, Ireny Mochnackiej, Janiny Opieńskiej-Blauth, Stanisława Hubla i innych.

Z początkiem naszego wieku biochemia, a właściwie chemia fizjologiczna — jak wówczas nazywano tę gałąź wiedzy — koncentrowała swą uwagę głównie na zagadnieniach analizy składników komórki, na glikolizie i fermentacji alkoholowej oraz na mechanizmie pracy mięśnia. Te trzy działy biochemii rozwijały się szczególnie dynamicznie w pierwszych dekadach bieżącego stulecia, dzięki uczonym tak wielkiej klasy jakimi byli Emil Fischer, Franz Hofmeister, Archibald V. Hill, Otto Meyerhof, Otto Wartburg i Hans von Euler. Wśród tej plejady sławnych badaczy, wymienianych przez wszystkie historyczne opracowania biochemii, jest także polski uczoney Jakub Karol Parnas.

Pod koniec lat trzydziestych na podstawie badań nad fermentacją w komórkach drożdży, nad glikogenolizą w mięśniach oraz nad procesami utleniania tkankowego w różnych obiektach biologicznych stopniowo formowała się koncepcja wspólnej drogi katabolicznych przemian, produkcji oraz konserwacji energii w postaci makroergicznych wiązań fosforano-



wych. Dziś, kiedy szlaki tych przemian metabolicznych w komórce są znane i wiemy jakie siły napędzają tę procesy, trudno wczuć się w atmosferę lat — jeszcze nawet z przełomu drugiej i trzeciej dekady — kiedy to o enzymach mówiono jako o czynnikach niematerialnych, a jakieś nieokreślone procesy transformacji energii miały powodować zachodzenie reakcji chemicznych w żywym organizmie.

Na tle ścierających się często nieracjonalnych poglądów wybitnych nawet uczonych, jasność koncepcji procesów metabolicznych formułowanych przez Parnasa jest zaskakująca. Od początku przyjmuje Buchnerowski pogląd o katalitycznym działaniu bezkomórkowych czynników mających jednak określone właściwości fizyko-chemiczne. Jak zobaczymy później, w najwcześniejszych nawet swych pracach postulował Parnas udział enzymów w poszczególnych procesach przemiany materii, a — pamiętajmy — że pierwsza krystalizacja enzymu, ureazy, miała miejsce dopiero w 1926 roku, uznanie zaś enzymów niezbędnych białkowych katalizatorów w przemianach metabolicznych nastąpiło dopiero we wczesnych latach trzydziestych.

Jakub Karol Parnas urodził się 16 stycznia 1884 roku w Mokrze koło Tarnopola. Po szkole powszechnej w Tarnopolu uczęszczał do gimnazjum we Lwowie, a w 1902 roku rozpoczął studia wyższe w Technische Hochschule w Berlinie-Charlottenburgu, które ukończył w 1906 roku. Pracuje następnie przez rok w Instytucie Politechnicznym w Zurychu u znakomitego Richarda Willstättera — twórcy współczesnej chemii organicznej. W owym czasie Zurych był centrum naukowym w zakresie nauk ścisłych w skali Europy. Niewątpliwie więc Parnas znał nowe koncepcje w fizyce przedstawiane przez Alberta Einsteina, czy w matematyce przez Hermana Minkowskiego. Nade wszystko jednak udzielała Mu się atmosfera pracy i nowe idee chemii organicznej prezentowane przez Willstättera. Jako temat pracy doktorskiej otrzymał trudne zadanie wydzielenia tzw. trzeciego izomeru naftochinonu, czyli *amfi*-naftochinonu, (2,6-naftochinonu), którego istnienie podejrzewano, jakkolwiek nikt dotąd nie mógł go wyosobnić. Parnas otrzymuje związek w stanie krystalicznym, charakteryzuje jego właściwości i na tej podstawie uzyskuje stopień doktora filozofii w 1907, roku na Uniwersytecie w Monachium. W tym samym roku rozpoczyna pracę jako asystent w Instytucie Chemii Fizjologicznej w Strasburgu, którym kierował wówczas wybitny uczony i pedagog Franz Hofmeister. Okres pracy u Hofmeistera wspominał później Parnas z najwyższą wdzięcznością i szacunkiem dla swego nauczyciela. Tu bowiem zetknął się z tematyką badawczą, która pozostała Jego ulubioną dziedziną nauki do końca życia. Tu kształtował się Jego główny kierunek twórczości naukowej, która w latach międzywojennych przyniosła naszemu krajowi sławę kolebki badań metabolicznych.

W pracowni Hofmeistera Parnas spotykał wybitnych chemików-fizjologów, między innymi: Franza Knoopa, twórcę koncepcji beta-oksydacji

kwasów tłuszczowych oraz Gustawa Embdena, który jako pierwszy wysunął hipotezę dysmutacji 1,6 difosfofruktozy do dwóch fosfotrioz. Hofmeister był jednym z pierwszych, którzy zaakceptowali enzymatyczną teorię wewnątrzkomórkowego metabolizmu, stąd nazywano go nawet „bogatym w idee fanatykiem”. I te właśnie poglądy przyswoił sobie Parnas u progu swej kariery badawczej, a — jak później zobaczymy — miały one zasadniczy wpływ na wybór kierunków badań, oryginalność podejść doświadczalnych i jakość wyników uzyskiwanych przez Niego oraz Jego uczniów.

Głównym zjawiskiem, jakie zainteresowało Parnasa w pracowni Hofmeistera była dysmutacja aldehydu glicerynowego zachodząca, jak wykazał, pod działaniem fermentów tkankowych. Zjawisko to wykrył Parnas w 1910 roku, a było to pierwsze stwierdzenie, że reakcja Cannizzaro może mieć znaczenie biologiczne. Używając w doświadczeniach perfundowaną wątrobę oraz roztarte skrawki tkanek wykazał redukcję aldehydu glicerynowego do glicerolu, postulując w tym procesie działanie mutazy. Wynik ten dopiero w dwa lata później potwierdził Embden ze współpracownikami. W 1910 roku Parnas wyjechał na roczny staż do Stacji Zoologicznej w Neapolu, gdzie studiował fizjologię i zapoznał się z techniką eksperymentów przy użyciu zwierząt doświadczalnych. Po powrocie do Strasburga rozpoczął badania metabolizmu kwasu mlekowego w tkankach zwierzęcych.

Produkcja kwasu mlekowego przez zmęczony mięsień zajmowała uczonych mniej więcej od połowy ubiegłego stulecia. Z początkiem naszego wieku, a więc w okresie działalności naukowej Parnasa w Pracowni Hofmeistera, wysuwano już nawet pogląd, że glikoliza jest procesem metabolicznie kluczowym w dwu różnych fenomenologicznie zjawiskach: podczas fermentacji alkoholowej w komórkach drożdży oraz podczas skurczu w komórce mięśniowej. Dalsze, stopniowo uzyskiwane dane doświadczalne potwierdziły ten pogląd, mimo, że jako produkt anaerobowych przemian kwasu pirogronowego w drożdżach wykryto aldehyd octowy, a w mięśniach kwas mlekowy. Toteż ważnym odkryciem Parnasa w 1912 roku było stwierdzenie, że kwas L(+)-mlekowy jest szybciej metabolizowany w tkankach zwierzęcych niż jego lewoskrętny enancjomorf D. Oczywiście już wówczas wielu badaczy, jak na przykład W. M. Fletcher i Frederick Gowland Hopkins utrzymywali, że kwas mlekowy w mięśniach powstaje z glikogenu. Ale dopiero Parnas i Richard Wagner w 1914 roku wykazali doświadczalnie, że tak jest rzeczywiście choć nie byli jeszcze w stanie stwierdzić równoważności procesów zanikania glikogenu i powstawania kwasu mlekowego. Tę zależność wykazał później Otto Meyerhof oraz Gustaw Embden.

W 1913 roku dr Parnas zostaje docentem Uniwersytetu w Strasburgu. Następnie wyjeżdża do Cambridge do pracowni Fredericka Gowlanda Hopkinsa, gdzie wówczas właśnie badano pojawienie się w mięśniach



kwasu mlekowego, znajdując znacznie większe jego ilości w mięśni zmęczonym oraz w stanie *rigor mortis* niż w mięśni spoczynkowym. Nagromadzony podczas pracy mięśnia kwas mlekowy szybko zniknął w warunkach tlenowych. Za pomocą bardzo dokładnych pomiarów, mniej więcej w tym samym czasie, Archibald V. Hill wykrył, że podczas pracy mięśnia w obecności tlenu wyzwala się ciepło. Taki był stan wiedzy na temat procesów metabolicznych zachodzących w mięśniach i komórkach drożdży, gdy Parnas znalazł się w Cambridge. Tam też zastaje Go pierwsza wojna światowa.

W 1916 roku Parnas wraca do Polski i na Uniwersytecie Warszawskim organizuje Zakład Chemii Fizjologicznej oraz wykłada ten przedmiot na Wydziale Lekarskim. Nie były to lata sprzyjające pracy badawczej. Niemniej docent Parnas zdołał wkrótce podjąć badania przemiany węglowodanowej w izolowanych mięśniach płazów i z tego zakresu opublikować kilka doniesień, głównie w *Biochemische Zeitschrift*. Przede wszystkim jednak okres ten poświęcił na opracowanie pierwszego podręcznika biochemii w języku polskim, który pod tytułem: „Chemja Fizjologiczna” został wydany przez E. Wendego i H. Altenberga w 1922 roku. Podręcznik ten odegrał w kształceniu lekarzy i biologów taką rolę w latach dwudziestych naszego wieku, jak „Teoria jestestw organicznych” Jędrzeja Sniadeckiego w pierwszej połowie dziewiętnastego stulecia.

Pod koniec 1920 roku Parnas opuścił Warszawę i przeniósł się do Lwowa, gdzie jako profesor zwyczajny Uniwersytetu Jana Kazimierza objął stanowisko kierownika Zakładu Chemii Lekarskiej. Przebywał tu i pracował do 1941 roku. Lata lwowskie profesora Parnasa były najbardziej wydajnym twórczo okresem Jego działalności naukowej. Sam też uważał je za swe najlepsze lata, kiedy to będąc przez cały dzień w Zakładzie miał stały kontakt ze swymi uczniami i współpracownikami, a nie obciążały Go żadne inne obowiązki oprócz pracy badawczej i dydaktycznej.

Jednym z tematów rozwijanych w lwowskim Zakładzie profesora Parnasa była amoniogeneza we krwi i mięśniach. W 1927 roku Gustaw Embden i Margarete Zimmermann znaleźli w mięśniach AMP, nieco wcześniej wykryty już w komórkach drożdżowych. W tym samym roku profesor Parnas z Włodzimierzem Mozołowskim — poszukując źródła powstawania amoniaku w mięśniach — spostrzegają, że uszkodzony mięsień wytwarza znacznie więcej amoniaku niż mięsień prawidłowy i — że amoniak w mięśni pracującym znika podczas jego spoczynku. W dwa lata później Parnas wykazuje istotne zmiany w składzie zasad purynowych mięśnia prawidłowego oraz uszkodzonego i stwierdza, że amoniak pochodzi z AMP, a uwalniany jest pod działaniem swoistej deaminazy mięśniowej. Tak więc, Parnas i Jego współpracownicy rozwijali, jeszcze przed wykryciem ATP, badania prowadzące do odkrycia makroergicznych wiązań fosforanowych i roli nukleotydów adeninowych w meta-

bolizmie mięśnia. W tym samym mniej więcej czasie, gdy w Zakładzie Parnasa szukano źródła pojawiającego się w mięśniu amoniaku, Karl Lohmann wykazał, że ATP jest w mięśniu produktem rozkładu innego związku adenylowego, z którego przy rozpadzie uwalnia się pirofosforan. Było to już właściwie wykrycie ATP, chociaż Lohmann o tym zaanon-sował w *Naturwissenschaften* dopiero w 1929 roku.



Późne lata dwudzieste. Przed Laboratorium. Od lewej: Józef Nuckowski, Stanisław Chrzęszczewski, Włodzimierz Mozołowski, Józef Heller, Jakub K. Parnas, osoba nie-ropoznana, osoba nierozpoznana, Andrzej Klisiecki.

Pod koniec lat dwudziestych i z początkiem lat trzydziestych toczono w kręgach naukowych niekończące się dyskusje w jaki sposób zachodzi fosforylacja glukozy oraz fruktozy, a także jaki to ma związek z produkcją kwasu mlekowego w mięśniach. W dyskusjach tych brali udział tak wybitni uczeni, jak na przykład Otto Meyerhof, Fritz Laquer, Hans von Euler, ale nadal nie było jasnej koncepcji jak przebiega ten proces. W 1935 roku profesor Parnas z Tadeuszem Baranowskim wykazali, że dializowany ekstrakt z mięśni w nieobecności ATP — ale wzbogacony w fosforan nieorganiczny i jony magnezowe — fosforolizuje glikogen, przy czym w mieszaninie reagującej pojawiają się glukozo-6-fosforan (G-6-P) i fruktozo-6-fosforan (F-6-P). W rok później odkrycie to potwierdzili współpracownicy Parnasa: Paweł Ostern i Jan A. Guthke. W swoim artykule, opublikowanym w 1937 roku w *Ergebnisse der Enzymforschung*, Parnas rozważa mechanizm oddziaływania fosforanu nieorganicznego ( $\text{HPO}_4^{2-}$ ) z glikogenem stwierdzając, że po odszczepieniu glukozy



pod działaniem hipotetycznej „fosforylasy” do reszty glikogenu przyłącza się atom wodoru, podczas gdy reszta fosforanowa estryfikuje odłączoną glukozę. Woda, jak wykazał, nie bierze udziału w reakcji, proces ten przeto nazwał fosforolizą.



Rok 1937. W laboratorium. Od lewej: Stanisław Hubl, Jan Dudek, Tadeusz Baranowski, Wojtulewicz (imię nieznane), Jakub K. Parnas, Bogusław Halikowski, Irena Mochnacka, Zbigniew Augustin, Włodzimierz Słobodzian, Wanda Mejbaum, Włodzimierz Szankowski, Tadeusz Korzybski, Bogusław Pieczonka.

Dalsze prace badawcze nad glikolizą prowadzili w St. Louis małżeństwo Gerty i Carl F. Cori, ale lwowski ośrodek kierowany przez Parnasa nadal zaskakiwał świat naukowy swoimi oryginalnymi osiągnięciami. W 1936 r. Paweł Ostern, Jan A. Guthke i Jerzy Terszakowец wykazali, że F-6-P powstający z G-6-P ulega fosforylacji do fruktozodifosforanu, FDP. Znalaziono przeto niezwykle ważne ogniwo łańcucha reakcji glikolizy beztlenowej, które następnie potwierdzili Hans von Euler i Erich Adler. We Lwowie tymczasem Cecylia i Tadeusz Mannowie stwierdzają, że fosforylacja F-6-P do FDP zachodzi w obecności ATP i jonów magnezowych pod działaniem swoistego enzymu — fosfofruktokinazy, który przenosi terminalny fosforan z ATP na F-6-P. W 1938 roku profesor Parnas daje przegląd prac swojej placówki na ten temat w czasopiśmie *Enzymologia*, wskazując na przemianę G-6-P i ATP w FDP i kwas adenylowy (AMP), jako na podstawową reakcję szlaku glikolitycznego. Wniosek, że produktem reakcji jest AMP a nie ADP, jak to jest w istocie, wynikał z braku w tym czasie możliwości analizy stechiometrii tej

reakcji. Schemat glikolizy zaproponowany przez Parnasa, znany w literaturze pod nazwą schematu Embdena-Meyerhofa-Parnasa, w skrócie EMP, jest nadal aktualny i podstawowy dla zrozumienia przemian metabolicznych i energetycznych w każdej komórce.

Badania nad uwalnianiem amoniaku w mięśniach kontynuował Parnas wraz z Osternem i Mannem także w latach trzydziestych, stosując już fluorek i kwas fluorooctowy, niedawno poznane inhibitory niektórych etapów glikolizy. Analizując szczegółowo wpływ kwasu pirogronowego i kwasu fosfoglicerynowego na efektywność produkcji amoniaku postulowali oni, że nieorganiczny fosforan znajdujący w środowisku reakcji jest przenoszony na kreatynę wprost z substancji opisanej przez Lohmanna, czyli ATP. Profesor Parnas ze współpracownikami wykrywają więc reakcję syntezy fosfokreatyny w mięśniach, choć w schamacie który formułują wskazują na ADP jako na dawcę, a nie akceptor fosforanu. Tym niemniej, był to w historii biochemii pierwszy opis reakcji transfosforylacji, czyli przeniesienia reszty fosforanowej z jednej cząsteczki związku organicznego na inną. Równocześnie Parnas opisuje drugi przykład transfosforylacji, w której kwas fosfoenolopirogronowy w obecności AMP lub ADP daje kwas pirogronowy i ADP, względnie ATP. Mimo niemożności technicznej dokładnego określenia akceptora fosforanu opis



Czerwiec 1938 roku. Przed budynkiem Laboratorium. Od lewej: Tadeusz Korzybski, Bogusław Pieczonka, Włodzimierz Słobodzian, Jan Dudek, Włodzimierz Szankowski, Bogusław Halikowski, Wojtulewicz (imię nieznane), Stanisław Hubl, Zbigniew Augustin, Tadeusz Baranowski, Jakub K. Parnas, Wanda Mejbaum, Irena Mochnacka, sekretarka.



tej reakcji jest pierwszym opisem syntezy ATP kosztem energii uzyskanej z glikolizy i nosi nazwę reakcji Parnasa. Przeniesienie fosforanu przebiega w obecności właściwej kinazy, której działanie tu autorzy postulują, a którą Parnas izoluje z mięśni w 1936 roku. Taki sam enzym z komórek drożdżowych został wyosobniony w Jego Zakładzie przez Cecylię i Tadeusza Manna w 1935 roku.



Czerwiec 1938 roku. W Laboratorium. Stoją od lewej: Wojtulewicz (imię nieznane), Bogusław Pieczonka, Tadeusz Korzybski, Włodzimierz Słobodzian, Bogusław Halikowski, Jan Dudek. Siedzą od lewej: Włodzimierz Szankowski, Irena Mochacka, Zbigniew Augustin, Wanda Mejbaum.

W 1938 roku profesor Parnas i Baranowski we współpracy z Györgym Hevesym z Instytutu Teoretycznej Fizyki Uniwersytetu w Kopenhadze wprowadzają radioaktywny fosfor,  $^{32}\text{P}$ , do badań nad przemianą fosforanową w procesie glikogenolizy mięśniowej. Zaledwie rok później Tadeusz Korzybski i Profesor wykazują, że reszta fosforanowa AMP ulega bardzo powolnej odnowie, podczas gdy odnowa reszt fosforanowych gamma i beta w cząsteczce ATP jest bardzo szybka. Badania z użyciem  $^{32}\text{P}$  były naówczas pionierskie, a odkrycie zjawiska odnowy reszt fosforanowych ATP w nieuszkodzonym mięśniu miało znaczenie inspirujące dalsze badania w tym zakresie. Dodajmy, że w Zakładzie Parnasa we Lwowie badano reakcje zachodzące z udziałem nukleotydów adeninowych, zanim jeszcze znaczenie wysokoenergetycznego wiązania fosforanowego zostało opisane w słynnej pracy Fritza Lipmanna, opublikowanej w *Advances in Enzymology* w 1941 roku.

Jak widzieliśmy, już w 1910 roku — w pracy ogłoszonej w *Biochemische Zeitschrift* — Parnas przypisywał ważną rolę procesom oksydo-redukcyjnym w glikolizie. Postulował On występowanie swoistej mutazy aldehydowej katalizującej w tkankach przemianę aldehydu glicerynowego w kwas i alkohol. Ale upłynęło prawie dwadzieścia lat od pierwszej sugestii Parnasa zanim Hans von Euler wykazał bezpośrednio, że dysmutacja aldehydu glicerynowego podczas fermentacji alkoholowej jest rzeczywiście procesem enzymatycznym i, że ta reakcja nie zachodzi bez swoistego kofaktora nazwanego kozymazą (postulowaną przez Sir Arthura Hardena już w 1906 roku). Von Euler izoluje ostatecznie kozymazę I, to jest NAD, z drożdży w 1928 roku, a Otto Wartburg i Walter Christian kozymazę II, to jest NADP, z erytrocytów w 1935 roku.

Kończąc skrótowe przedstawienie osiągnięć naukowych Parnasa i Jego szkoły trzeba podkreślić wyobraźnię i inwencję badawczą Profesora, przejawiającą się między innymi w zdolności wyboru — już w pierwszych latach naszego stulecia — zagadnień istotnych dla dalszego rozwoju biochemii. Na pierwsze miejsce w Jego twórczości naukowej wysuwają się zagadnienia związane z metabolizmem węglowodanów, a więc fosforoliza glikogenu w mięśniach, glikoliza i glukoneogeneza. Prace z tego zakresu były rzeczywiście odkrywcze, a myśli w nich zawarte niejednokrotnie inspirowały innych wielkich badaczy tego okresu. Także w zakresie metabolizmu nukleotydów purynowych oraz amoniogenezy w mięśniach Parnas i Jego uczniowie uzyskali liczące się w świecie wyniki. W badaniu tych właśnie procesów niezbędna była dokładna mikrometoda oznaczania amoniaku i azotu całkowitego w tkankach. Zaproponowano ją w Zakładzie lwowskim — i do dziś — nosi ona nazwę metody Parnasa-Wagnera. W 1937 roku został wydany pod redakcją profesora Parnasa dwutomowy podręcznik pt. „Chemia Fizjologiczna”. Profesor był też autorem dwunastu rozdziałów tego podręcznika.

Profesor Parnas stworzył polską szkołę biochemii, która odegrała wielką rolę w biochemii światowej w latach międzywojennych. Był On przeto wyróżniany w kraju i zagranicą. W roku 1931 został wybrany dziekanem Wydziału Lekarskiego U.J.K. we Lwowie, od roku 1931 był członkiem korespondentem Akademii Umiejętności w Krakowie, na rok akademicki 1931/1932 zaproszono Go jako profesora wymiennego do Zurichu, w 1934 roku otrzymał doktorat honorowy Uniwersytetu w Atenach oraz członkostwo Niemieckiej Akademii Nauk Leopoldina w Halle, w roku 1939 został powołany na profesora w Gandawie.

We wrześniu 1939 wybuchła druga wojna światowa. Po wejściu armii czerwonej do Lwowa Wydział Lekarski z Oddziałem Farmaceutycznym nie zostały zawieszono. Zakład Chemii Lekarskiej przy ulicy Piekarskiej 52 funkcjonował więc pod kierunkiem profesora Parnasa nadal i prowadził intensywną pracę dydaktyczną. Stopniowo warunki pracy ulegały zmianie. Parnas uzyskał fundusze na rozbudowę Zakładu. Zgro-



madziło się wokół Niego wielu młodych, zdolnych entuzjastów biochemii, przybyli też doświadczeni już naukowo chemicy, których losy wojny zagnały do Lwowa. Pod datą 16 kwietnia 1940 roku pisze Parnas o atmosferze tych miesięcy do Włodzimierza Mozołowskiego, od pięciu już lat profesora Uniwersytetu Stefana Batorego w Wilnie: „Ja nie mam jeszcze czasopism zagranicznych, dopiero dostałem *Chemical Abstracts*, z którego dowiedzieliśmy się o naszych pracach, które się w międzyczasie ukazały. Także o pięknej rzeczy Tadzia (Manna), który zageścił karboanhydrazę — jest to związek białkowo-cynkowy bez innych metali! U nas w pracowni jest tak: bardzo dużo ludzi na posadach płatnych, doskonały Heppner z Warszawy, który porwał młodych do chemii organicznej, robią piękne syntezy, nauczyli się tych rzeczy, których u nas nie robiono; doc. Lindenfeld z Warszawy, który uczy wszystkich po kolei prawdziwej mikrochemii; trochę młodszych ludzi, także bardzo sympatyczna Opieńska od Truszkowskiego, która wprzęga się w nasze prace; Józef Heller dostał katedrę biochemii na Wydziale Chemiczno-Biologicznym. Ale w naszych pracach jesteśmy zahamowani przez moc roboty organizacyjnej i to dość trudnej, moc pisaniny, brak zwierząt eksperymentalnych. U Baranowskiego ładnie się rozwijają rezultaty. Ostern (doktor chemii) normalnie chodzi do szkoły — studiuje medycynę”.

Po przekształceniu Wydziału Lekarskiego w Lwowski Państwowy Instytut Medycyny profesor Parnas zostaje dyrektorem Instytutu Chemii Wydziału Lekarskiego. W roku 1940 Zakład profesora Parnasa odwiedzają uczeni radzieccy: akademik A. A. Bohomolec — prezes Ukraińskiej Akademii Nauk oraz profesorowie A. N. Bach, W. A. Engelhardt, A. E. Braunstein, A. W. Paładin, S. S. Medvedev, B. J. Zbarski. Zapraszają Parnasa do Moskwy i do Kijowa, gdzie wraz z Baranowskim przedstawia wyniki osiągnięć z lat ostatnich. Jak wspomina w liście do Mozołowskiego szczególne zainteresowanie wzbudziły tam prace Baranowskiego dotyczące krystalizacji enzymów glikolitycznych. Z przyjemnością także wspomina spotkanie w Moskwie z biochemikami o głośnych już wówczas nazwiskach: Engelhardtem, Braunsteinem i Liną Sztern, którzy przyjmowali Go gościnnie „jak nigdy dotąd i nigdzie”.

Po powrocie, w liście do Mozołowskiego z 21 listopada, pisze oddając sytuację i klimat swego Zakładu: „Pieniądzy władze dają mi moc ale we Lwowie już niedużo można kupić, mają otworzyć filię centrali zakupów laboratoryjnych. Pracownia bardzo ożywiona, ale mało czynni neurasteniczni Lindenfeld i Nowiński, a także trochę neurasteniczny Pawełek (Ostern), doskonale pracuje Baranowski. Moja pozycja tu jest doskonała, traktują mnie z ogromnym szacunkiem i liczą się ze mną. Marchlewski był tu długo (uciekał przed Niemcami), niepotrzebnie zupełnie wrócił do Krakowa, słyszymy, że jest bardzo źle traktowany. Napisz — adresuj via Moskwa”.

Trudności w uzyskaniu czasopism powodują, że każda wiadomość,

jaka do Zakładu dotrze ze świata zewnętrznego nabiera formy sensacji. Można o tym wnosić z podniecenia Profesora z jakim pisze w jednym z listów pod koniec grudnia 1940 roku. „Evans w Berkeley, inkubując kwas pirogronowy z miazgą wątrobową i dwuwęglanem znakowanym  $^{14}\text{C}$  otrzymuje kwas alfa-ketoglutaryny z węglem radioaktywnym!” W tym samym czasie narzeka Parnas na ogromne zadania dydaktyczne, ale też z radością donosi Włodzimierzowi Mozołowskiemu: „Ostern i Baranowski zostali profesorami i pracują nie bez powodzenia”.

Parnas nie cieszył się najlepszym zdrowiem, cierpiał na cukrzycę. Był bardzo wysoki, o znacznej tuszy, pełen kultury i osobistego czaru, o przyjemnym uśmiechu oraz dobroci. Wykładał bardzo interesująco. Wykłady Jego cechowała głęboka wiedza, dowcip — opowiadał często różne anegdoty i przykłady z życia wielkich uczonych, z którymi się zetknął osobiście. Nadmiar prac administracyjnych i dydaktycznych nużyły Go bardzo. Pisze o tym do Mozołowskiego w liście z marca 1941 roku: „Ja sam jestem dość sterany robotami pozabiochemicznymi i moją sytuacją Tantalą przy stole biochemicznym, ale może powoli uda mi się zrzucić ze siebie te wszystkie jałowe posiedzenia i wrócić do poważnej pracy. Inaczej bardzo szybko zgłupieję zupełnie. Literatury amerykańskiej w dalszym ciągu nie mam, choć już za nią zapłaciłem. Jednego zeszytu *Biochem. J.* nie ma nigdzie w Związku Radzieckim, musiał okręć zatonać, który go wiozł... W pracowni z dużym powodzeniem pracuje Józek Heller nad swoimi zawisakami; Ostern z Opieńską i Terszakowcem znaleźli ciekawą fosfatazę wątrobową, która specyficznie zmydla estry heksozofosforowe a nie Hardenę; Baranowski, który pracuje wspaniale i sporo ludzi zajmuje i który nakrystalizował tyle różnych białek, że teraz musi zatrzymać się i to uporządkować. Potem organicy, głównie Heppner mają ładną ciekawą klasę barwników, raczej ciał barwnych bliskich purynom, dotyczą zagadnień zupełnie jeszcze niewyjaśnionych budowy mureksydu, allokantyny i jej fioletowej soli barwej i farb skrzydeł motyli. Z Korzybskim i Mochnacką pracujemy nad glikogennem i tam dużo zagadnień. Poślemy ci odbitki od 1939 r., część po rosyjsku.”

Po napaści hitlerowców na ZSRR w czerwcu 1941 roku profesor Parnas wraz z rodziną zostaje ewakuowany do Kijowa, a stąd z Ukraińską Akademią Nauk do Ufy, gdzie pozostaje do 1943 roku. W maju tegoż roku przybywa do Moskwy i obejmuje kierownictwo wydziału chemicznego Wszechrosyjskiego Instytutu Medycyny Eksperymentalnej, przekształconego w 1944 w wielowydziałowy Instytut Chemii Biologicznej i Medycznej Akademii Nauk ZSRR. Równocześnie profesor Parnas organizuje poświęcone badaniom przemian węglowodanowych laboratorium chemii fizjologicznej Akademii Nauk ZSRR, którym kieruje do końca życia. Wiadomości o profesorze Parnasie z okresu Jego pracy w Moskwie są jedynie fragmentaryczne. Publikacje wskazują na rozwijanie dotych-





Profesor Jakub K. Parnas

Fotografia z wczesnych lat czterdziestych.

czasowych zainteresowań. W pierwszym okresie swej tam działalności cieszył się nadal uznaniem w skali międzynarodowej. W 1942 roku otrzymał nagrodę Stalina za całokształt badań nad chemizmem mięśni, w 1943 został członkiem Akademii Nauk ZSRR, a w rok później członkiem Akademii Nauk Medycznych ZSRR, w 1945 roku został wybrany członkiem Francuskiej Akademii Medycyny w Paryżu i uzyskał doktorat honorowy Sorbony, był wybrany członkiem korespondentem towarzystw biologicznych w Wiedniu i Paryżu, oraz członkiem towarzystw chemicznych w Paryżu, Londynie i Moskwie. W 1948 r. został wybrany czynnym członkiem zagranicznym Polskiej Akademii Umiejętności.

Na przełomie lat 1946 i 1947 profesor Parnas był w Polsce, odwiedził Wrocław i Kraków, wygłosił wykłady na tamtejszych Uniwersytetach. Przeprowadzono z Nim rozmowy w sprawie objęcia przezeń katedry Chemii Fizjologicznej we Wrocławiu lub Krakowie. Wybór padł na Kraków i poczynione zostały odpowiednie kroki formalne. Sprawy te musiały być uzgodnione na najwyższych szczeblach ze względu na stanowiska jakie Parnas piastował w Akademii Nauk i Akademii Nauk Medycznych ZSRR. Z przyczyn jednak, które nie zostały wyjaśnione, objęcie katedry w Krakowie nie doszło do skutku.

Profesor coraz bardziej zapadał na zdrowiu, cukrzyca robiła postępy. W listopadzie 1948 roku donosi Mozołowskiemu, że ma hemiplegię po lewej stronie i ropowicę lewego podudzia. Interesuje Go nadal wszystko, co dzieje się w Polsce. W tym samym liście, na przykład, wyraża zadowolenie, że stanowisko kierownika katedry w Krakowie otrzymał Bole-

ślaw Skarzyński. 29 stycznia 1949 roku Parnas został aresztowany na podstawie oszczerczych zarzutów i zmarł jeszcze tego samego dnia. Po rehabilitacji, która nastąpiła w drugiej połowie 1953 roku, przygotowano tom obejmujący wybór Jego prac, wydany w 1960 roku nakładem Akademii Nauk ZSRR.

W biochemii Jakub Karol Parnas widział nie tylko dziedzinę intelektualnej przygody, ale rozumiał jej znaczenie praktyczne. Dostrzeganie ścisłego związku między nauką a praktyką i przemianami ekonomicznymi było charakterystyczną cechą Jego umysłowości. Był silnie związany z lwowską firmą farmaceutyczną Laokoon. Według wskazań profesora Parnasa i Jego uczniów firma podjęła produkcję czystego AMP i innych nukleotydów jeszcze w latach międzywojennych. Produkowała też fosforany heksoz oraz wydzielała niektóre aminokwasy. Po odkryciu insuliny przez Bantinga i Besta, Parnas podjął prace nad izolowniem jej z trzustek zwierzęcych i wprowadził do celów leczniczych w klinice; prace te finansowała także firma Laokoon. Próbkki otrzymywanych preparatów wysyłane były ze Lwowa bezpłatnie kolegom za granicę. Tak na przykład AMP systematycznie przekazywano państwu Cori do St. Louis, ponieważ pracowali wówczas nad udziałem nukleotydów adeninowych w transfosforylacjach procesu glikolizy beztlenowej.

Parnasa interesowała dietetyka, która jako odrębna nauka rozwinęła się w latach dwudziestych po odkryciu roli pewnych witamin jako koenzymów niektórych procesów metabolicznych, oraz roli niektórych hormonów w przemianach tkankowych. W 1934 roku pod Jego redakcją ukazała się obszerna monografia pt. „Dietetyka” (wydana przez Warszawską Agencję Wydawniczą), w jej opracowaniu uczestniczyli najwybitniejsi ówczesni specjaliści. W książce zostały zawarte podstawy chemiczne i fizjologiczne dietetyki wraz z zagadnieniami patologii przemiany materii. Szczegółowo omówiono w niej na przykład zjawiska awitaminoz, cukrzycy, otyłości oraz objawy niedoboru składników pokarmowych. Było to podstawowe dzieło w tym zakresie w latach międzywojennych, a o ile mi wiadomo, nikt dotąd nie podjął się w naszym kraju opracowania podobnego dzieła z uwzględnieniem nowych danych z tej dziedziny.

W swych poglądach politycznych w latach międzywojennych Parnas sympatyzował z ruchem postępowym i liberalnym. Do swego Zakładu przyjmował ludzi zdolnych, pracowitych, oddanych nauce, bez względu na ich pochodzenie czy poglądy. Wykształcił wielu: po drugiej wojnie światowej, co czwarty profesor biochemii w Polsce mógł się poszczycić pochodzeniem ze szkoły Parnasa. Przez wszystkie lata swego życia zachował Profesor niezależność myśli oraz oddanie racjonalnej twórczości naukowej pozostając w tym wierny sobie do końca.

*Włodzimierz S. Ostrowski*

## PROFESOR JAKUB KAROL PARNAS

we wspomnieniach Wandy Mejbaum

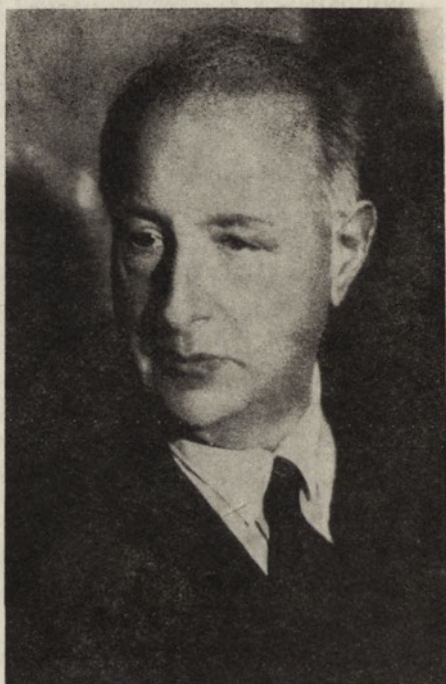
Wykłady profesora Parnasa, które pamiętam z czasu moich studiów na Uniwersytecie Jana Kazimierza we Lwowie, cieszyły się dużą frekwencją, chociaż poruszał w nich zagadnienia trudne. Profesor swe wykłady z chemii ogólnej bogato ilustrował doświadczeniami. W wykładach z chemii lekarskiej często nawiązywał do odpowiednich zagadnień medycyny. Mówił pięknym i bogatym językiem, jasno i precyzyjnie formułował swoje myśli. Poszczególne kwestie naukowe przedstawiał w rysie historycznym aż do osiągnięć ostatnich dni. Cechowała Go niezwykła kultura umysłowa, wyjątkowa pamięć i erudycja. Posługując się — tylko niekiedy — małymi kartkami wyprowadzał zajmujące nieraz całą tablicę wzory. Wśród studentów miewał Profesor swoich entuzjastów, którzy zasiadali w pierwszym rzędzie ławek i stąd wszczynali z Nim ożywione dyskusje. Czasem, gdy Profesorowi zdarzyła się pomyłka w pisanych w pośpiechu wzorach, wskazywali Mu ją usłużnie, za co — szczerze rozbawiony — dziękował. Wykłady Parnasa nigdy nie nużyły, skrzyły się bowiem od dowcipnych anegdot z życia wielkich uczonych, wspomnień osobistych oraz cytatów i rozważań, świadczących o Jego rozległej wiedzy humanistycznej.

Po zdaniu egzaminu z chemii lekarskiej zostałyśmy z Ireną Mochacką i innymi kolegami przyjęci na staż naukowy. Stażyści byli traktowani przez prof. Parnasa na równi z wszystkimi pracownikami naukowymi, uczestniczyli w dyskusjach naukowych oraz pozostawali pod Jego osobistą opieką. Rozpoczęcie stażu już na trzecim roku studiów umożliwiło mi napisanie pracy doktorskiej jeszcze przed ukończeniem studiów.

Działalność dydaktyczną, po powrocie z zagranicy, podjął docent Parnas w organizowanym przez siebie Zakładzie Chemii Fizjologicznej Uniwersytetu Warszawskiego (1916—1919). W tym czasie opracowuje bardzo starannie plan wykładów z chemii fizjologicznej dla studentów Wydziału Lekarskiego z myślą o wykorzystaniu ich w podręczniku. Wydany w 1922 roku był to pierwszy pisany w języku polskim podręcznik tego przedmiotu. Tytuł podręcznika brzmiał „Chemja Fizjologiczna z szczegól-



nym uwzględnieniem fizjologii zwierzęcej”, część pierwsza: „Podstawy chemiczne fizjologii”. We wstępie Parnas pisał: „Nauczanie akademickie winno ukazać uczącemu się nie zastygłą, martwą konstrukcją, lecz pełnię zadań oraz tok pracy i myśli. Opracowując podręcznik nie starałem się zatrzeć charakteru wykładowego, bacząc przy tym pilnie, by nie popaść w swawolę subiektywizmu, przedstawiłem przedmiot tak jak mi się *bona fide* przedstawia, uwzględniając głównie to co w moim przekonaniu stanowi podwaliny gmachu naszej nauki”. W swoim podręczniku Parnas zrealizował te zasady. Od tego czasu minęło ponad 60 lat, lecz podstawowe idee Autora pozostają nadal aktualne, gdyż wskazują drogę, jaką biegła myśl badawcza, aby dojść do dzisiejszych osiągnięć biochemii.



Profesor Jakub K. Parnas.  
Fotografia z późnych lat czterdziestych.

Profesor Parnas stworzył w okresie międzywojennym w Polsce słynny na cały świat ośrodek naukowy, znany jako szkoła lwowska. Położył podwaliny pod rozwój biochemii jako odrębnej od chemii i fizjologii dziedziny nauk przyrodniczych. Jego zainteresowania badawcze koncentrowały się w głównej mierze na poznaniu przemian pośrednich towarzyszących fizjologicznej pracy mięśni a więc dziedziny, w której dopiero precyzowano jej zadania i założenia. W pracowni lwowskiej składano z poszczególnych ogniw doświadczalnych długi łańcuch przemian jakim ulega glikogen w mięśniach. Szczególnie ważnym odkryciem było stwierdzenie, że w obecności nieorganicznych fosforanów znika w wyciągu mięśniowym opalescencja, jaką daje glikogen. Zjawisko to Parnas na-



zwał fosforolizą, jako proces analogiczny z hydrolizą wielocukrów. W postępującej degradacji glikogenu kwas fosforowy zastępuje wodę.

Przemiany fosforanowa i azotowa nukleotydów adeninowych, jak stwierdzono także w pracowni Parnasa, są przemianami cyklicznymi, w których kwas adenyłowy ulega fosforylacji a powstające produkty kolejnej defosforylacji. Nukleotydy adeninowe ulegają również dezaminacji, stanowiąc źródło amoniaku, uwalnianego podczas skurczu mięśnia. Parnas uważał proces amoniogenezy za zjawisko zasadnicze przemiany mięśniowej i twierdził, że każda teoria skurczu mięśnia prądkowanego powinna ją uwzględniać, jeśli ma być teorią zupełną. Ukoronowaniem badań nad udziałem fosforanu nieorganicznego w glikogenolizie było wprowadzenie do badań fosforu promieniotwórczego,  $^{32}\text{P}$ , otrzymanego po raz pierwszy przez Hevesyego w kierowanym przez Nielsa Bohra Instytucie Fizyki Teoretycznej Uniwersytetu w Kopenhadze. W badaniach przeprowadzonych we Lwowie wykazano, że synteza ATP biegnie *in vivo* tak samo jak *in vitro*. Podany królikowi dożylnie fosforan zawierający  $^{32}\text{P}$  odnajdywano w dwóch resztach fosforanowych izolowanego z mięśni kwasu adenylozotryfosforowego.

Powstawanie kwasu mlekowego z glikogenu uważano długo za prostą przemianę, w której uczestniczą dwie reakcje: hydroliza glikogenu do glukozy i rozkład glukozy na dwie cząsteczki kwasu mlekowego. Badania Embdena, Meyerhofa i Parnasa w latach 30-tych wykazały, że proces glikogenolizy w mięśniach stanowi w rzeczywistości ciąg kilkunastu reakcji chemicznych, w których oprócz substratów i produktów pośrednich biorą udział koenzymy stanowiące czynniki o bliżej niezanim działaniu. Parnas działanie koenzymów sprowadził do ich udziału w określonych reakcjach chemicznych. I tak działanie kwasu adenylozotryfosforowego jako koenzymu polega na przekazaniu grupy fosforanowej oraz energii na odpowiedni akceptor. Fakt, że fermentacja alkoholowa w drożdżach oraz glikogenoliza w mięśniach przebiegają według jednego schematu, wskazuje, iż liczne przejawy życia dają się sprowadzić do kilkunastu podstawowych schematów chemicznych. Do dziś, beztlenowa przemiana glukozy w świecie roślin, zwierząt i mikroorganizmów przebiegająca według wspólnego schematu, jest nazywana szlakiem Embdena, Meyerhofa i Parnasa.

Podczas I-go Zjazdu Polskiego Towarzystwa Fizjologicznego w Warszawie (1937 r.) profesor Parnas wygłosił wykład o mechanizmach przemian tkankowych. W wykładzie tym mówił: „Dostrzegamy wśród niemal nieprzebranej liczby związków i przemian ustrojowych coraz to wyraźniej wspólne plany budowy ciał, wspólne i podobne metody przeróbki; chemia fizjologiczna czy fizjologia chemiczna zaczyna wychodzić w wielu dziedzinach z tego okresu, w którym mnożyły się same fakty a brakowało szerszych perspektyw. Jak i w rozwoju innych nauk, tak i w rozwoju chemii fizjologicznej dokładniejsze poznanie faktów napro-

wadziło na połączenie ich, na zrozumienie korelacji chemicznych i — tu i ówdzie — także i fizjologicznych” (*Acta Biologiae Experimentalis*, 1937, XI, 292—307). Tak wypowiedzieć się mógł wówczas tylko badacz o niezwykłym darze obserwacji, umiejętności ścisłego interpretowania doświadczeń i nieprzeciętnej wyobraźni naukowej.

Uczniowie profesora Parnasa uczcili Jego pamięć jako nauczyciela i badacza poświęcając Mu zeszyt *Postępów Biochemii* (tom IV, zeszyt 1, 1958). W zeszycie tym najstarsi uczniowie Profesora, Józef Heller i Włodzimierz Mozołowski, odtworzyli klimat lwowskiego zakładu. Zeszyt zawiera wykaz prac profesora Parnasa, przedruk wstępu Parnasa do podręcznika „Chemja Fizjologiczna” z 1922 r. oraz przedruk Jego wykładu wygłoszonego podczas I-go Zjazdu Polskiego Towarzystwa Fizjologicznego w 1937 roku. Ponadto w tym zeszycie opublikowali swe dedykowane Profesorowi Parnasowi prace: Irena Mochnacka, Tadeusz Mann, Julian Reis, Bohdan Sobczuk, Tadeusz Baranowski i Tadeusz Korzybski. Bolesław Skarżyński wszechstronnie przedstawił twórczość szkoły Jakuba Karola Parnasa w wykładzie inauguracyjnym I-szy Zjazd Polskiego Towarzystwa Biochemicznego w Warszawie w 1958 r. (*Postępy Biochemii*, 1959, V, 3—16).

Wanda Mejbaum-Katzenellenbogen

## Wykaz publikacji Jakuba Karola Parnasa z lat 1907—1949

### Prace Doświadczalne

1. Willstätter R., Parnas J. — Über 2,6-Naphthochinon, (1907), *Ber. Chem. Ges.*, **40**, 1406—1415.
2. Willstätter R., Parnas J. — Über amphi-Naphthochinone. II., (1907), *Ber. Chem. Ges.*, **40**, 3971—3978.
3. Parnas J. — Über Naphthochinone, Dissertation, (1908), München, 9—95.
4. Parnas J. — Über Kephalin, (1909), *Biochem. Z.*, **22**, 411—432.
5. Parnas J. — Energetik glatter Muskeln. VIII Internationaler Physiologen Kongress, Wien, 27—30 September 1910.
6. Parnas J. — Energetik glatter Muskeln, (1910), *Pflügers Archiv. Gesamte Physiol.* **134**, 441—495.
7. Parnas J. — Über fermentative Beschleunigung der Cannizaroschen Aldehydumlagerung durch Gewebssäfte. I. (1910), *Biochem. Z.* **28**, 274—294.
8. Parnas J. — Über Bildung von Glykogen aus Glycerinaldehyd in der Leber, (1912), *Zbl. Physiol.*, **26**, 671—672.
9. Parnas J. — Über das Schicksal der stereoisomeren Milchsäuren im Organismus des normalen Kaninchens. (1912), *Biochem. Z.* **38**, 53—64.
10. Parnas J., Baer J. — Über Zuckerabbau und Zuckeraufbau im Tierischen Organismus, (1912), *Biochem. Z.* **41**, 386—418.
11. Parnas J. — Über die gesättigte Fettsäure des Kephalins, (1913), *Biochem. Z.*, **56**, 17—20.
12. Parnas J., Wagner R. — Über den Kohlenhydratumsatz isolierter Amphibienmuskeln und über die Beziehungen zwischen Kohlenhydratschwund und Milchsäurebildung im Muskel. I. (1914), *Biochem. Z.* **61**, 387—427.
13. Parnas J. K. — Über das Wesen der Muskelerholung, (1915), *Zbl. Physiol.*, **30**, 1—18.
14. Parnas J. K., Laska-Mintz E. — Beeinflussen subminimale Reize den Ablauf chemischer Umsetzungen im isolierten Muskel? (1921), *Biochem. Z.*, **116**, 59—70.
15. Parnas J. K. — Über den Kohlenhydratstoffwechsel der isolierten Amphibienmuskeln. II. (1921), *Biochem. Z.*, **116**, 71—88.
16. Parnas J. K. — Über den Kohlenhydratstoffwechsel der isolierten Amphibienmuskeln. III. Der Umsatz in Muskeln, pankreasdiabetischer Tiere. (1921). *Biochem. Z.*, **116**, 89—101.
17. Parnas J. K. — Über den mechanischen Wirkungsgrad der in isolierten Amphibienmuskeln stattfindenden Verbrennungsprozesse (Vorläufige Mitteilung), (1921), *Biochem. Z.*, **116**, 102—107.
18. Parnas J. K., Krasińska Z. — Über den Stoffwechsel der Amphibienlarven. (1921), *Biochem. Z.*, **116**, 108—137.



19. Parnas J. K., Wagner R. — Über die Ausführung von Bestimmungen kleiner Stickstoffmengen nach Kjeldahl. (1921), *Biochem. Z.*, **125**, 253—256.
20. Wagner R., Parnas J. K. — Über die eigenartige Störung des Kohlenhydratstoffwechsels und ihre Beziehungen zum Diabetes mellitus. II. Eine klinisch-experimentelle Studie. (1921). *Z. Gesamte Exp. Med.*, **25**, 361—384.
21. Parnas J. K., Wagner R. — Beobachtungen über Zuckerneubildung. I. Nach Versuchen, die an einem Falle besonderer Kohlenhydratstoffwechselstörung angestellt wurden. (1922). *Biochem. Z.*, **127**, 55—65.
22. Wagner R., Parnas J. K. — Zur Korrelation der Blutdrüsen, (1922), *Med. Klin.*, **18**, 135—138.
23. Parnas J. K., Jasiński W. — Rozmieszczenie składników krwi niekoloidowych pomiędzy osocze i krwinki na podstawie analiz krwi rodzimej. (1922), *Spraw. Tow. Nauk. Lwów*, **2**, 163—164.
24. Parnas J. K., v. Jasiński W. — Über die Verteilung von Zucker, Reststickstoff und Calcium im Blute. (1922), *Klin. Wochenschr.* **1**, 2029—2030.
25. Parnas J. K., Rosenblüth A., Wagner R. — Über den Einfluss der Kohlenhydrate auf den Grundumsatz. Nach Versuchen, die an einem Falle besonderer Kohlehydratstoffwechselstörung angestellt wurden. IV. (1923), *Z. Gesamte Exp. Med.*, **38**, 445—457.
26. Parnas J. K., Heller J. — O zawartości amoniaku we krwi. (1924), *Spraw. Tow. Nauk. Lwów*, **4**, 150—161.
27. Parnas J. K., Heller J. — Recherches sur l'ammoniaque du sang. (1924). *C. R. Soc. Biol.*, **91**, 706—707.
28. Parnas J. K., Heller J. — Über den Ammoniakgehalt und über die Ammoniakbildung im Blute. I. (1924), *Biochem. Z.*, **152**, 1—28.
29. Parnas J. K. — Über den Ammoniakgehalt und über die Ammoniakbildung im Blute. II. (1925). *Biochem. Z.*, **155**, 247—255.
30. Parnas J. K. — Badania nad amoniakiem zawartym we krwi i nad jego pochodzeniem. (1925). Księga pamiątkowa XII Zjazdu Lekarzy i Przyrodników Polskich w Warszawie. T. 1, 272—274.
31. Parnas J. K., Taubenhau M. — Über den Ammoniakgehalt und die Ammoniakbildung im Blute. III. Die Entstehung des Blutammoniaks. (1925), *Biochem. Z.*, **159**, 298—310.
32. Parnas J. K., Klisiecki A. — Über Ammoniakgehalt und Ammoniakbildung im Blute. IV. Ist im kreisenden Blute Ammoniak vorhanden? (1926), *Biochem. Z.*, **169**, 255—265.
33. Mozołowski W., Parnas J. K. — Über eine neue Form der Chinhydronelektrode. (1926), *Biochem. Z.*, **169**, 352—354.
34. Parnas J. K. — O amoniaku krwi, jego pochodzeniu i warunkach powstawania. (1926), *Spraw. Tow. Nauk. Lwów*, **6**, 156—158.
35. Parnas J. K. — A vérben lévő ammoniákról és keletktozési médjáról, Therápia II. (1926), *Erfoljam Koranyi Szám*, 77—80.
36. Parnas J. K., Klisiecki A. — Über den Ammoniakgehalt und die Ammoniakbildung im Blute. VI. Experimentelle Untersuchungen über die Faktoren, welche den Ammoniakgehalt des kreisenden Blutes beeinflussen und über die Lokalisation der Ammoniakbildung und des Ammoniakschwundes beim Kaninchen. (1926), *Biochem. Z.*, **173**, 224—248.
37. Parnas J. K. — On ammonia in blood, its formation and its physiological behaviour. XII-th International Physiological Congress held at Stockholm, August 3-6, 1926, (1926), *Skandinav. Archiv.*, **49**, 199—200.
38. Parnas J. K. — Existe-t-il des sels ammoniacaux dans le sang circulant? (1927), *Bull. Soc. Chim. Biol.*, **9**, 76—90.

39. Parnas J. K., Mozołowski W. — Badania nad przemianą azotową mięsni. I i II. (1927), *Spraw. Tow. Nauk. Lwów*, **7**, 105—106, 112—113.
40. Parnas J. K., Mozołowski W. — Über den Ammoniakgehalt und die Ammoniakbildung im Muskel und deren Zusammenhang mit Funktion und Zustandsänderung. I. (1927), *Biochem. Z.*, **184**, 399—441.
41. Parnas J. K., Mozołowski W. — Über die Ammoniakbildung im Muskel und ihren Zusammenhang mit Tätigkeit und Zustandsänderung. (1927), *Klin. Wochenschr.*, **6**, 998—999.
42. Parnas J. K., Mozołowski W., Lewiński W. — Powstawanie amoniaku w mięśniach a praca. (1927), *Spraw. Tow. Nauk. Lwów*, **7**, 167—168.
43. Parnas J. K., Mozołowski W., Lewiński W. — Praca mięśniowa i amoniak we krwi. (1927), *Spraw. Tow. Nauk. Lwów*, **7**, 168.
44. Parnas J. K., Mozołowski W., Lewiński W. — Über die Ammoniakbildung im isolierten Muskel und ihrem Zusammenhang mit der Muskelarbeit. (1927), *Klin. Wochenschr.* **6**, 1710—1711.
45. Parnas J. K., Mozołowski W., Lewiński W. — Über den Ammoniakgehalt und Ammoniakbildung im Blute. IX. Der Zusammenhang des Blutammoniaks mit der Muskelarbeit. III. Über Ammoniakbildung im Muskel und deren Zusammenhang mit Funktion und Zustandsänderung. (1927), *Biochem. Z.*, **188**, 15—23.
46. Parnas J. K. — Badania nad powstawaniem amoniaku i zależnością tej sprawy od czynności i stanu mięśni. (1928), *Acta Biol. Exp.*, **1**, 1—83.
47. Parnas J. K. — Badania nad ciałami aminopurynowymi mięśni oraz uwagi o tzw. stosunku jądrowo-plazmatycznym. (1928), *Spraw. Tow. Nauk. Lwów*, **8**, 104.
48. Parnas J. K., Jaworska J., Lewiński W., Mozołowski W. — O sprzężeniu dezaminacyj beztlenowych z tlenowymi i o przypuszczalnej funkcji chemicznej zasad aminopurynowych zawartych w kwasach nukleinowych. (1928), *Spraw. Tow. Nauk. Lwów*, **8**, 212—215.
49. Parnas J. K. — Über den Purinstoffwechsel des Muskels und über die Muttersubstanz des im Muskel entstehenden Ammoniaks. I. (1928), *Klin. Wochenschr.*, **7**, 1423—1424.
50. Parnas J. K. — Über den Purinstoffwechsel des Muskels und über die Muttersubstanz des im Muskel entstehenden Ammoniaks. II. (1928), *Klin. Wochenschr.*, **7**, 2011—2012.
51. Parnas J. K. — Présentation d'un appareil pour l'équisement rapide des solutions aqueuses des dissolvants légers que l'eau. (1929), *Bull. Soc. Chim. Biol.*, **11**, 796—797.
52. Parnas J. K. — Sur l'existence du lactacidogène. (1929), *Bull. Soc. Chim. Biol.*, **11**, 802—803.
53. Parnas J. K. — Les composés puriques du muscle et leurs transformations physiologiques. (1929), *Bull. Soc. Chim. Biol.*, **11**, 803—804.
54. Parnas J. K. — Le métabolisme du muscle en activité. (1929), *C. R. Soc. Biol. (Réunion plénière)*, **101**, 37—72.
55. Parnas J. K. — Ammonia formation in muscle and its source. (1929), *Am. J. Physiol.*, **90**, 467.
56. Parnas J. K. — Über den Ammoniakgehalt des menschlichen Blutes. (1929), *Pflügers Archiv. Ges. Physiol.*, **221**, 508.
57. Parnas J. K. — Über die Ammoniakbildung im Muskel und ihren Zusammenhang mit Funktion und Zustandsänderung. VI. Der Zusammenhang der Ammoniakbildung mit der Umwandlung des Adeninucleotids zu Inosinsäure. (1929), *Biochem. Z.*, **206**, 16—38.

58. Parnas J. K., Lewiński W., Jaworska J., Umschweif B. — Über den Ammoniakgehalt und die Ammoniakbildung im Froschmuskel. VII. (1930), *Biochem. Z.*, **228**, 366—400.
59. Parnas J. K. — Neue Untersuchungen über den Chemismus der Muskelkontraktion. (1930), *Naturwissenschaften*, **18**, 916.
60. Ostern P., Parnas J. K. — O rzekomej syntezie kwasu moczowego przez miazgę wątrobową. (1930), *Acta Biol. Exp.*, **5**, 19—31.
61. Parnas J. K., Ostern P. — O powstawaniu amoniaku w sercu żabim przeżywającym. (1931), *Spraw. Tow. Nauk. Lwów*, **11**, 36—37.
62. Ostern P., Parnas J. K. — O powstawaniu amoniaku w związku z czynnością serca. (1931), *Acta Biol. Exp.*, **7**, 27—47.
63. Parnas J. K., Ostern P. — Über die Ammoniakbildung im isolierten Froschherzen. II. (1931), *Biochem. Z.*, **234**, 307—322.
64. Parnas J. K. — Über die Muttersubstanz des im Blut und Muskel entstehenden Ammoniaks. (1931), *Biochem. Z.*, **239**, 18—20.
65. Parnas J. K. — Über die postmortale Ammoniakbildung im Muskel. (1932), *Biochem. Z.*, **245**, 159—165.
66. Parnas J. K., Ostern P. — O mianowaniu farmakologicznym pochodnych adenozytowych w tkankach i wyciągach. (1932), *Spraw. Tow. Nauk. Lwów*, **12**, 62.
67. Parnas J. K., Ostern P. — O przemianie nukleotydu adeninowego w sercu i w związku tej przemiany z powstawaniem amoniaku w sercu. (1932), *Spraw. Tow. Nauk. Lwów*, **12**, 62—63.
68. Ostern P., Parnas J. K. — Über die Auswertung von Adenosinderivaten am überlebenden Froschherz. (1932), *Biochem. Z.* **248**, 389—397.
69. Parnas J. K., Ostern P. — Über die Ammoniakbildung im Herzen. III. Über das Adeninunucleotid im überlebenden Froschherzen. (1932), *Biochem. Z.*, **248**, 398—402.
70. Klimek R., Parnas J. K. — Adenylsäure und Adeninunucleotid. (1932), *Biochem. Z.*, **252**, 392—396.
71. Parnas J. K. — Über Ammoniakbildung in der Auftauungskontraktur und der Jodessigsäurekontraktur. (1932), *Klin. Wochenschr.*, **11**, 335.
72. Parnas J. K., Ostern P. — Über die Herzwirkung von Adeninderivaten, insbesondere von Nucleosiden und Nucleotiden. (1932), *Klin. Wochenschr.*, **11**, 1551—1552.
73. Parnas J. K., Klimek R. — Adenylsäure und Adeninunucleotid. (1933), *Z. Physiol. Chem.*, **217**, 75—78.
74. Klimek R., Parnas J. K. — Über die Reaktionen der Purinbasen mit Kupfersulfat und Alkali. (1933), *Z. Physiol. Chem.*, **218**, 30—32.
75. Parnas J. K., Sieniawski J. — Eine photometrische Methode zur Bestimmung des Kohlenoxyds im Blute. I. (1933), *Biochem. Z.*, **266**, 102—106.
76. Parnas J. K. — A propos des diastases déphosphorylantes et désaminantes des tissus musculaire et cardiaque. (1933). IVE Congrès de Chimie Biologique, 8—10 Novembre, 1933., *Bull. Soc. Chim. Biol.*, **15**, 1384—1385.
77. Parnas J. K., Ostern P., Mann T. — Über die Verkettung der chemischen Vorgänge im Muskel. (1934), *Biochem. Z.*, **272**, 64—70.
78. Parnas J. K. — Über den Ammoniakgehalt und die Ammoniakbildung im Blute. XI. (1934), *Biochem. Z.*, **274**, 158—162.
79. Parnas J. K., Ostern P. — Chemistry of anaerobic recovery in muscle (1934), *Nature (London)*, **134**, 627.
80. Parnas J. K., Ostern P., Mann T. — Linkage of chemical changes in muscle. (1934). *Nature (London)*, **134**, 1007.



81. Parnas J. K., Ostern P. — O mechanizmie glikogenolizy mięśniowej. (1934), *Przepl. Fizjol. Ruchu*, **6**, 255—266.
82. Parnas J. K., Ostern P., Mann T. — O istocie i funkcji fizjologicznej amonjogenezy mięśniowej i o sprzężeniu procesów chemicznych w mięśniu. (1934), *Rocz. Chem.*, **14**, 1358—1376.
83. Parnas J. K., Ostern P., Mann T. — Über die Verkettung der chemischen Vorgänge im Muskel. II. (1935), *Biochem. Z.*, **275**, 74—86.
84. Parnas J. K., Ostern P., Mann T. — Über die Verkettung der chemischen Vorgänge im Muskel. III. Die Phosphatübertragung durch Brenztraubensäure. (1935), *Biochem. Z.*, **275**, 163—166.
85. Parnas J. K., Lewiński W. — Über den Ammoniakgehalt und die Ammoniakbildung im Muskel. XXII. Über den Zusammenhang zwischen Ammoniakbildung und Muskeltätigkeit unter aeroben Bedingungen, (1935), *Biochem. Z.*, **276**, 398—407.
86. Parnas J. K., Lutwak-Mannowa C. — O źródłach amoniaku powstającego w mięśniu. (1935), *Spraw. Tow. Nauk. Lwów*, **15**, 112.
87. Parnas J. K., Lutwak-Mann C. — Über den Ammoniakgehalt und Ammoniakbildung im Muskel. XXII. 1. Über die Methode zur Bestimmung der Adenosintriphosphorsäure. 2. Über die zweite ammoniakbildende Substanz des Muskelgewebes. (1935), *Biochem. Z.*, **278**, 11—12.
88. Parnas J. K., Ostern P. — Über die Verkettung der chemischen Vorgänge im Muskel. IX. Die Rolle der Phosphagens. (1935), *Biochem. Z.*, **279**, 94—98.
89. Parnas J. K., Klisiecki A. — O amoniaku krwi, jego pochodzeniu i kolejach fizjologicznych. (1935), *Pol. Gaz. Lek.*, **14**, 637—641.
90. Parnas J. K. — Über die Verkettung der chemischen Vorgänge im Muskel. (1935), *Klin. Wochenschr.*, **14**, 1017—1023.
91. Parnas J. K. — El encadenante de los procesos quínicos en el musculo. (1935), *Res. Circulo Med. Argent.*, **35**, 410, 819—843.
92. Parnas J. K., Baranowski T. — Reakcja początkowa glikogenolizy mięśniowej. (1935), *Spraw. Tow. Nauk. Lwów*, **15**, 216—217.
93. Parnas J. K., Baranowski T. — Sur les phosphorylations initiales du glycogène. (1935), *C. R. Soc. Biol.*, **120**, 307—310.
94. Parnas J. K., Lutwak-Mannowa C., Mann T. — Teoria sprzężenia procesów chemicznych w fermentacji alkoholowej. (1935), *Spraw. Tow. Nauk. Lwów*, **15**, 217—220.
95. Parnas J. K., Lutwak-Mann C., Mann T. — Über die Verkettung der chemischen Umsetzungen in der alkoholischen Gärung. II. Versuch einer Theorie. (1935), *Biochem. Z.*, **281**, 168—174.
96. Parnas Ya. O. — O wzaimoswyzaxi khimicheskikh protsessow w myshtse. (1936), *Usp. Sovrem. Biol.*, **5**, 293.
97. Parnas J. K. — L'enchaînement des processus enzymatiques dans le tissu musculaire. (1936), Ve Congrès de Chimie Biologique, Bruxelles, 23-25 Octobre 1935, *Bull. Soc. Chim. Biol.*, **18**, 53—95.
98. Parnas J. K., Sobczuk B., Mejbaum W. — Le mécanisme de la suppression de l'ammonio-genèse dans le muscle par l'acide pyruvique. (1936), *C. R. Soc. Biol.*, **121**, 701—704.
99. Parnas J. K., Ostern P. — Le mécanisme de la glycogénolyse. (1936), *Bull. Soc. Chim. Biol.*, **18**, 1471—1492.
100. Parnas Ya. O., Ostern P. — Mekhanizm glikogenoliza. (1937), *Usp. Sowrem. Biol.*, **6**, 106.

101. Parnas J. K., Mejbaum W., Sobczuk B. — Le mécanisme de l'action de la phlorhizine sur la glycogénolyse musculaire. (1936), *C. R. Soc. Chim. Biol.*, **122**, 1148—1152.
102. Parnas J. K. — Uzupełniony schemat glikogenolizy mięśniowej. (1936), *Spraw. Tow. Nauk. Lwów*, **16**, 84—87.
103. Parnas J. K., Mochnacka I. — Le rôle de l'acide inosique dans la glycogénolyse musculaire. (1936), *C. R. Soc., Biol.*, **123**, 1173—1175.
104. Parnas J. K. — Der Mechanismus der Glykogenolyse im Muskel. (1937), *Ergebn. Enzymf.* **6**, 57—110.
105. Parnas J. K., Mochnacka I. — O funkcji kwasu inozynowego w przemianie mięśniowej. (1937), *Acta Biol. Exp.*, **11**, 1—2.
106. Parnas J. K., Mochnacka I., Augustin Z. — O koenzymach glikogenolizy mięśniowej. (1937), *Spraw. Tow. Nauk. Lwów*, **17**, 164—165.
107. Parnas J. K., Umschweif B. — Sur le dosage des pentoses dans les nucléotides adényliques. (1937), *Bull. Soc. Chim. Biol.*, **19**, 325—335.
108. Parnas J. K. — Uwagi o destylacji amoniaku przy wykonywaniu oznaczeń kjeldahlowskich w przyrządzie Parnasa i Wagnera. (1937), *Acta Biol. Exp.*, **11**, 107—110.
109. Parnas J. K., Szankowski W. — Über die gegenseitige Vertretbarkeit der Brenztraubensäure und Oxalessigsäure als Wasserstoffakzeptoren in der Muskelglykolyse. (Betrachtungen über den Zusammenhang zwischen aeroben und anaeroben Glykolyse). (1937), *Enzymologia*, **3**, 220—227.
111. Hevesy G., Baranowski T., Guthke J. A., Ostern P., Parnas J. K. — Badania nad glikolizą. Nowa metoda z zastosowaniem fosforu promieniotwórczego. (1938), *Spraw. Tow. Nauk. Lwów*, **18**, 88—95.
111. Hevesy G., Baranowski T., Guthke J. A., Ostern P., Parnas J. K. — Untersuchungen über die Phosphorübertragungen in der Glykolyse und Glykogenolyse, (1938), *Acta Biol. Exp.*, **12**, 34—39.
112. Parnas Ya. O. — O mekhanizme myshechnego glikogenoliza. (1938), *Fiziol. Zh. SSSR*, **24**, 277—293.
113. Hevesy G., Korzybski T., Parnas J. K. — Badania nad przemianą kwasu adenilowego w ustroju zwierzęcym. (1938), *Spraw. Tow. Nauk. Lwów*, **18**, 112—113.
114. Korzybski T., Parnas J. K. — Über Abbau und Wiederaufbau der Adenylsäure im Warmblütermuskel. (1938), *Z. Physiol. Chem.*, **255**, 195—204.
115. Parnas J. K. — Über die Ausführung der Stickstoffbestimmung nach Kjeldahl in der Modifikation von Parnas und Wagner. (1938), *Z. Analyt. Chem.*, **114**, 261—275.
116. Parnas J. K. — Über die Anwendung der radioaktiven Isotopen in der biologischen Forschung. Einleitung. (1938), *Enzymologia*, **5**, 137.
117. Parnas J. K. — Über die enzymatischen Phosphorylierungen in der alkoholischen Gärung und in der Muskelglykogenolyse. (1938), *Enzymologia*, **5**, 166—184.
118. Korzybski T., Parnas J. K. — Observation sur les échanges des atomes du phosphore renfermés dans l'acide adénosinetriphosphorique, dans l'animal vivant, à l'aide du phosphore marqué par du radiophosphore <sup>32</sup>P. (1939), *Bull. Soc., Chim. Biol.*, **21**, 713—716.
119. Korzybski T., Parnas J. K. — Über der Umsatz der Adenosintri-phosphorsäure im lebenden Tier. (1939), *Acta Biol. Exp.*, **13**, 157—166.
120. Parnas J. K. — L'application des isotopes radioactives pour l'exploration des échanges et des transformations biochimiques, (1939), *Bull. Soc. Chim. Biol.*, **21**, 1059—1093.

121. Parnas J. K. — Glykogenolyse. Handbuch der Enzymologie, herausgegeben von F. F. Nord und R. Weidenhagen, New-York. (1940), N.Y.—Berlin. Akad. Verlagsg. Leipzig, 902—967.
122. Parnas Ya. O. — Primenenie radioaktiwnykh izotopow dlya issledovaniya obmena weschestw. (1940), *Fiziol. Zh. SSSR*, **28**, 571.
123. Parnas Ya. O. — Glikogenoliz. (1940), *Usp. Sowrem. Biol.*, **12**, 393—446.
124. Parnas Ya. O. — Izotopi yak indikatora pri biologichnykh doslidzheniyakh. (1940), *Rad. Med.*, **9**, 11—14.
125. Parnas Ya. O. — Enzimy i koenzimy. (1943), *Usp. Sowrem. Biol.*, **16**, 225.
126. Parnas J. K. — Coenzymatic reactions. (1943), *Nature (London)*, **151**, 577.
127. Parnas Ya. O. — Nowye mysli i nowye dostizheniya w biokhimii. (1944), *Usp. Sowrem. Biol.*, **18**, 1.
128. Parnas J. K. — Enzymes and coenzymes. (1944), *Amer. Rev. Sov. Med.*, **1**, 485—517.
129. Parnas Ya. O. — Uspekhi sowetskoï biokhimii za 30 let. Sbornik „Dostizheniya sowetskoï medicinskoï nauki za 30 let”. M. (1947).
130. Parnas Ya. O. — Opredelenie azota po metodu K'el'dalya. (1949), *Zh. Analit. Khim.*, **4**, 54.

### Podręczniki i prace referujące

1. Parnas J. — O związkach tłuszczowych (lipoidach). (1913), *Now. Lek.*, **25**, 591—596.
2. Parnas J. K. — Wskazówki i objaśnienia do ćwiczeń z chemji lekarskiej. Kurs Uniwersytetu Warszawskiego. (1919), Gebethner i Wolf, Warszawa, XIV + 144.
3. Parnas J. K. — Nowe poglądy w nauce o odżywianiu. (O składzie jakościowym pożywienia). (1921), *Pol. Czas. Lek.*, **1**, 14—15, 41—42, 60—61, 77—78, 97—98, 113—114, 128—129, 146—147.
4. Parnas J. K. — Neue Untersuchungen über den Wasserhaushalt der Frosche. (1921), *Biochem. Z.*, **114**, 1—11.
5. Parnas J. K. — Chemja Fizjologiczna z szczególnym uwzględnieniem fizjologii zwierzęcej. Część I. Podstawy chemiczne fizjologii. (1922), E. Wende i H. Altenberg. Warszawa—Lwów, XIII + 559.
6. Parnas J. K. — Podręcznik do ćwiczeń z chemji lekarskiej. (1922), Lwów.
7. Parnas J. K. — Kurs praktyczny chemji fozjologicznej. (1923), St. Kohler, Lwów, XV + 180.
8. Parnas J. K. — Analiza chemiczna krwi. (1922), *Pol. Gaz. Lek.*, **1**, 251—252.
9. Parnas J. K. — Methoden zur Beeinflussung der tierischen Entwicklung durch Gase und der Bestimmung des respiratorischen Gaswechsels während der Entwicklungsvorgänge. Handbuch der biologischen Arbeitsmethoden, herausgegeben von E. Abderhalden. (1923). Abteilung V. Teil 3. A. 651—670.
10. Parnas J. K. — Chemizm oddychania. Podręcznik Fizjologii wydany przez A. Becka. (1924), Gubrynowicz, Lwów—Warszawa—Kraków, T. II, 123—157.
11. Parnas J. K. — Czynność wątroby. Podręcznik Fizjologii wydany przez A. Becka. (1924), Gubrynowicz, Lwów—Warszawa—Kraków, T. II, 261—282.
12. Parnas J. K. — Mocz. Podręcznik Fizjologii wydany przez A. Becka. (1924), Gubrynowicz, Lwów—Warszawa—Kraków, T. II, 283—301.
13. Parnas J. K. — Skład i właściwości mleka. Podręcznik Fizjologii wydany przez A. Becka. (1924), Gubrynowicz, Lwów—Warszawa—Kraków, T. II, 335—340.



14. Parnas J. K. — O nowych postęпах w nauce o nowotworach złośliwych. (1925), *Przyr. Tech.*, **4**, 289—295.
15. Parnas J. K. — Krew jako układ fizyczny. (1925), *Księga Pamiątkowa XII Zjazdu Lekarzy i Przyrodników Polskich w Warszawie*. T. I., 272—274.
16. Parnas J. K. — Polonica u obcych. (Nature o nauce polskiej). (1925), *Przegl. Warsz.*, **48**, 241—244.
17. Parnas J. K. — Allgemeines und Verleichendes des Wasserhaushaltes. Handbuch der normalen und pathologischen Physiologie, herausgegeben von A. Bethe, G. Bergmann, G. Embden, A. Ellinger, J. Springer, Berlin, (1926), **17**, Correlationen III, J.XVII, 137—160.
18. Parnas J. K. — Energetyka czynności mięśniowej. (1926), *Przyr. Tech.*, **5**, 1—10.
19. Parnas J. K. — O kwasicy. (1927), *Pol. Arch. Med. Wewn.*, **5**, 397—482.
20. Parnas J. K. — Ernst Josef Leser. (1928), *Biochem. Z.*, **196**, 1—2.
21. Parnas J. K. — Otto Warburg. (1931), *Pol. Gaz. Lek.*, **10**, 997—998.
22. Parnas J. K. — The chemistry of muscle. (1932), *Ann. Rev. Biochem.*, **1**, 431—456.
23. Parnas J. K. — The chemistry of muscle, (1933), *Ann. Rev. Biochem.*, **2**, 317—336.
24. Parnas J. K. — Prace J. Zalewskiego nad zawartością amonjaku we krwi. (1933), *Rocz. Chem.*, **13**, 640—644.
25. Parnas J. K. — Prof. E. Embden. (1933), *Nature* (London), **132**, 994—995.
26. Parnas J. K. — Uwagi krytyczne do artykułu prof. F. Venuleta „Równowaga kwasowo-zasadowa a miarowość tętna”, (1934), *Warsz. Czas. Lek.*, **11**, 13—15.
27. Parnas J. K., Mozołowski W. — Podstawy chemiczne i fizjologiczne dietyki. (1934), *Dietetyka, Delta*, Warszawa, 3—64.
28. Parnas J. K. — Reforma studiów lekarskich w Polsce. (1934), *Lek. Pol.*, **10**, 107—108.
29. Parnas J. K. — Propaganda zagraniczna nauki polskiej. (1935), *Wiad. Lit.*, **12**.
30. Parnas J. K. — Regulacja chemiczna funkcji ustrojowych. (1936), *Endokrynol. Lek.*, **1**, 3—10.
31. Parnas J. K. — Przemiana materii. (1936), *Świat i Życie*, Książnica Atlas, Lwów—Warszawa, T. IV., 441—456.
32. Parnas J. K. — Tłuszcze. (1936), *Świat i Życie*. Książnica Atlas, Lwów—Warszawa, T. IV., 1108—1116.
33. Parnas J. K. — Trawienie. (1936), *Świat i Życie*, Książnica Atlas, Lwów—Warszawa, T. IV., 1131—1144.
34. Parnas J. K. — Węglowodany. (1936), *Świat i Życie*, Książnica Atlas, Lwów—Warszawa, T. IV., 1256—1272.
35. Parnas J. K. — Witaminy. (1936), *Świat i Życie*. Książnica Atlas, Lwów—Warszawa, T. IV., 1378—1386.
36. Parnas J. K. — O chemizmie rozkładu węglowodanów w mięśniu czynnym, (1936), *Rocz. Nauk Rol. Leśn.*, **40**, 385—401.
37. Parnas J. K. — Laureaci Nobla: H. Dale i O. Loewi. (1936), *Gaz. Pol.* 17 i 18 listop. 1936.
38. Parnas J. K. — Chemia Fizjologiczna. Podręcznik wydany pod redakcją J. K. Parnasa. (1937), *Delta*, Warszawa, T. I. i II. XLIV + 575; XXVII + 682. Następujące rozdziały pióra J. K. Parnasa: a) Od redaktora. T. I. XXII—XXX, b) Fizyko-chemia biologiczna. I. T. I., 1—28, c) Fizyko-chemia biologiczna. I. T. I., 407—524, d) Cukrowce. T. I., 29—90, e) Funkcja pochodnych purynowych

- i przemiana purynowa. T. I., 311—318, f) Przystawianie. T. I., 359—366, g) Tłumaczenie i wstęp do artykułu E. G. Holmes'a: Układ nerwowy jego skład i przemiana. T. II., 269—278, h) Wspólnie z B. Sobczukiem: Tkanka łączna, tkanki podporowe, skóra i wydzieliny skóry. T. II., 285—299, i) Przemiana pośrednia i tkankowa. T. II., 375—430, j) Wymiana oddechowa. T. II., 431—466, k) Odżywianie. T. II., 505—539, l) Dopiski i uzupełnienia. T. I., 207—209, 547—549; T. II., 621—636.
39. Parnas J. K. O mechanizmach przemian tkankowych. (1937), *Acta Biol. Exp.*, **11**, 292—307.
40. Parnas J. K. — W sprawie polskiej terminologii fizjologiczno-chemicznej. (1937), *Acta Biol. Exp.*, **11**, 357—368.
41. Parnas J. K. — W sprawie nomenklatury ciał rujopędnych. (1938), *Endokrynol. Lek.*, **3**, 31—34.
42. Parnas Ja. O. — O nekatorykh uspekakh i itogakh izucheniya vitaminow. (1943), *Izd. AN USSR. Ufa*, 32.
43. Parnas Ya. O. — O kortikosteroidakh. (1943), *Usp. Sowrem. Biol.*, **16**, 495.
44. Parnas Ya. O. — Khimiya i gormony. (1943), *Sow. Med.* **9**, 1.
45. Parnas Ya. O., Vil'tsishteinter K., Oppenkheimer K., Markhlewskii L., Ostern P., (1944), „Biokhimiya”, **9**, 191.
46. Parnas Ya. O. — Nowye vitaminy. (1945), *Byoll. Eksp. Biol. Med.*, **20**, wyp. 1—2, str. 3—15.

### Prace uczniów i współpracowników wykonane w pracowniach i zakładach kierowanych przez J. K. Parnasa

- Bauman A. — Über den stickstoffhaltigen Bestandteil des Kephalins. (1913), *Biochem. Z.*, **54**, 30—39.
- Renall M. H. — Über den stickstoffhaltigen Bestandteil des Kephalins. 1913), *Biochem. Z.*, **55**, 296—300.
- Wagner R. — Lebertumor. (1921), *Wien. Med. Wochenschr.*, **71**, 1129.
- Wagner R. — Lebertumor und Störung des Kohlehydratstoffwechsels. (1921), *Wien. Med. Wochenschr.*, **71**, 1218—1219.
- Wagner R. — Zur Korrelation der Blutdrüsen. (1921), *Wien. Med. Wochenschr.*, **71**, 1942—1944.
- Gruca A., Jankowska W. — O wpływie parenteralnego podawania pepsyny na zawartość antypepsyny we krwi i na wydzielinie soku żołądkowego. (1924), *Pol. Przegl. Chirurg.*, **3**, 281—286.
- Audova A., Wagner R. — Sur le mode d'action de l'insuline. (1924), *C. R. Soc. Biol.*, **90**, 308—310.
- Dadlez J., Jankowska W. — Recherche et la dosage de l'acide oxalique. (1924), *C. R. Soc. Biol.*, **90**, 310—311.
- Mozołowski W. — Sur la nature du sucre sanguin. (1924), *C. R. Soc. Biol.*, **90**, 311—313.
- Audova A., Wagner R. — Ein Beitrag zur Kenntnis der Insulinwirkung. (1924), *Klin. Wochenschr.*, **3**, 231—232.
- Heller J. — Sur la transformation des matières albuminoïdes pendant la métamorphose des lépodoptères *Deilephila euphorbiae*. (1924), *C. R. Soc. Biol.*, **90**, 1360—1361.
- Kriss L. — Über die nephelometrische Bestimmung von Calcium und Magnesium. I. (1925), *Biochem. Z.*, **158**, 203—204.
- Kriss L. — Über die nephelometrische Bestimmung von Calcium und Magnesium. II. (1925), *Biochem. Z.*, **162**, 359—365.

14. Mozołowski W., Hilarowicz H. — O istocie tzw. antypepsyny surowiczej. (1925), Księga Pamiątkowa XII Zjazdu Lekarzy i Przyrodników Polskich, Warszawa, T. I. 272.
15. Heller J. — Przemiana materji u owadów w czasie metamorfozy. (1925), Księga Pamiątkowa XII Zjazdu Lekarzy i Przyrodników Polskich, Warszawa, T. I., 282—283.
16. Hilarowicz H., Mozołowski W. — W sprawie czynności hamujących trawienie pepsynowe i ich domniemanego znaczenia dla patogenezy wrzodu trawiennego żołądka. (1925), Księga Pamiątkowa XII Zjazdu Lekarzy i Przyrodników Polskich, Warszawa, T. II., 28—29.
17. Mozołowski W., Hilarowicz H. — Über das Wesen des sogenannten Serumantipepsins. (1925), *Biochem. Z.*, 164, 295—311.
18. Heller J. — Recherches sur le metabolisme nymphal des insectes. I. (1925), *C. R. Soc. Biol.*, 92, 1006—1008.
19. Heller J. — Recherches sur le metabolisme nymphal des insectes. II., (1925), *C. R. Soc. Biol.*, 93, 1632—1634.
20. Heller J. — Untersuchungen über die Metamorphose der Insekten. I. Stoffwechsel und Entwicklungsdauer bei *Deilephila euphorbiae*. (1925), *Pflügers Arch. Ges. Physiol.*, 210, 736—754.
21. Heller J. — Untersuchungen über die Metamorphose der Insekten. II. Ein Respirationsapparat zur Untersuchung des Gaswechsels kleiner Tiere. (1925), *Biochem. Z.*, 165, 411—419.
22. Mozołowski W. — Insulina. (1925), *Przyr. Tech.* 4, 114—117.
23. Dadlez J. O oznaczaniu kwasu moczowego w moczu. (1925), *Pol. Gaz. Lek.*, 4, 104—106.
24. Hilarowicz H., Mozołowski W. — Über das Wesen des sogenannten Antipepsin des Blutes und über den diagnostischen Wert der Antipepsinuntersuchungen bei peptischen Magengeschwür. (1925), *Zbl. Chirurg.*, 52, 2410—2413.
25. Dadlez J., Lenartowski H. — O wpływie naświetlań promieniami Roentgena na ilość kwasu moczowego we krwi i w moczu. (1925), *Pol. Gaz. Lek.*, 4, 987—990.
26. Heller J. — Chemische Untersuchungen über Metamorphose der Insekt. III. Über die „subitane“ und „latente“ Entwicklung. (1926), *Biochem. Z.*, 169, 208—234.
27. Kalwaryjski B. E. — Über Samenfädenagglutination unter Einwirkung chemischer Agenzien. (1926), *Biochem. Z.*, 169, 355—408.
28. Dadlez J. — Über die Ausscheidung von intravenös eingeführten Calcium. (1926), *Biochem. Z.*, 171, 146—155.
29. Heller J. — Chemische Untersuchungen über die Metamorphose der Insekten. IV. Spinner und Schwärmer. (1926), *Biochem. Z.*, 172, 59—73.
30. Heller J. — Chemische Untersuchungen über die Metamorphose der Insekten. V. Über den Hungerstoffwechsel der Schmetterlinge. (1926), *Biochem. Z.*, 172, 74—81.
31. Klisiecki A. — Über Ammoniakgehalt und Ammoniakbildung im Blute. V. Der Ammoniakgehalt des normalen Menschenblutes. (1926), *Biochem. Z.*, 172, 442—446.
32. Hilarowicz H., Mozołowski W. — O istocie tzw. antypepsyny w surowicy krwi. (1926), *Pol. Przegl. Chirurg.*, 5, 27—46.
33. Hilarowicz H., Mozołowski W. — Zur Antipepsinfrage. (1926), *Zbl. Chirurg.*, 53, 2639—2651.



34. Dadlez J., Koskowski W. — Etude sur l'hyperthermie d'origine pé-riphérique chez le chien. (1926), XII-th International Physiological Congress, held at Stockholm 3—6 August 1926., *Skandiv. Archiv.*, 49.
35. Dadlez J., Koskowski W. — Z badań nad gorączką pochodzenia obwodowego. (1926), *Pol. Gaz. Lek.*, 5, 703—704.
36. Gruca A., Jankowska W. — O zmianach w właściwościach przeciwpptycznych osocza krwi pod wpływem pozajelitowego podawania ciał nieswoistych. (1926), *Pol. Gaz. Lek.*, 5, 125—128.
37. Gruca A., Jankowska W. — Experimenteller Beitrag zur Pepsin- und sogenante Antipepsinfrage. (1926), *Z. Gesamte Exp. Med.*, 52, 692—706.
38. Klisiecki A. — Über einen regelmässigen Unterschied in der Zusammensetzung des männlichen und weiblichen Menschenblutes. (1926), *Biochem. Z.*, 176, 490—500.
39. Hilarowicz H. — Über das Wesen der Botelhoschen Reaktion. (1926), *Z. Gesamte Exp. Med.*, 53, 121—137.
40. Klisiecki A., Mozołowski W., Taubenhaus M. — Über den Ammoniakgehalt und die Ammoniakbildung im Blute. VII. Über den Ammoniakbildung im physiologisch stagnierendem Blute. (1927), *Biochem. Z.*, 181, 80—84.
41. Mozołowski W., Taubenhaus M. — Über den Ammoniakgehalt und die Ammoniakbildung im Blute. VIII. Hängt die Ammoniakbildung im Blute mit der Anwesenheit von Cyanaten zusammen? (1927), *Biochem. Z.*, 181, 85—95.
42. Heller J., Meisels E. L. — Untersuchungen über die Metamorphose der Insekten. VI. Röntgenografische Untersuchungen über den Entwicklungsvorgang. (1927), *Biol. Zentralblatt*, 47, 257—264.
43. Meisels E. L., Heller J. — Über die röntgenologischen Beobachtung der Metamorphose bei Insekten. Versuche an der Schmetterlingsart *Deilephila euphorbiae*. (1927), *Fortschritte auf dem Gebiete der Röntgenstrahlen*, 36, 104—109.
44. Hilarowicz H., Jankowska-Hilarowicz W. — Über das Wesen und den Wert der diagnostischen Krebsreaktion nach Roffo. (1927), *Zbl. Chirurgm.*, 54, 1494—1498.
45. Heller J. — Badania nad przeobrażaniem owadów. (1927), *Spraw. Tow. Nauk. Lwów*, 7, 173—174.
46. Hilarowicz H. — O istocie chemicznej i wartości klinicznej niektórych serologicznych odczynów rozpoznawczych przy raku. (1927), *Med. Dośw. Społ.*, 7, 149—194.
47. Mozołowski W. — O zaczynach. (1927), *Przyr. Tech.*, 6, 433—442.
48. Mozołowski W., Lewiński W. — Über den Ammoniakgehalt und die Ammoniakbildung im Muskel und deren Zusammenhang mit Funktion und Zustandsänderung, IV. (1927), *Biochem. Z.*, 190, 388—398.
49. Chrzęszczewski S., Mozołowski W. — Badania nad sprawą zależności wzajemnej między przemianą azotową a węglowodanową w mięśni. (1928), *Spraw. Tow. Nauk. Lwów*, 8, 31.
50. Chrzęszczewski S., Mozołowski W. — Über dem Ammoniakgehalt und die Ammoniakbildung im Muskel und deren Zusammenhang mit Funktion und Zustandsänderung. V. Der Verlauf der traumatischen Milchsäure- und Ammoniakbildung und ihre Abhängigkeit von hemmenden Faktoren. (1928), *Biochem. Z.*, 194, 233—243.
51. Chrzęszczewski S., Mozołowski W. — Badania nad wzajemną za-

- leżnością powstawania kwasu mlekowego i amonjaku w mięśniach płazów. (1928), *Acta Biol. Exp.*, **2**, 47—60.
52. Mozołowski W. — O źródle amonjaku we krwi. (1928), *Lek. Wojsk.*, **12**, 41—57.
53. Heller J. — Badania nad przeobrażeniem owadów. (1928), *Acta Biol. Exp.*, **2**, 225—315.
54. Heller J. — Zur Auffassung des Unterschiedes zwischen subitaner und latenter Entwicklung von Schmetterlingspuppen. (1928), *Z. Vergl. Physiol.*, **8**, 99—101.
55. Hilarowicz H., Jankowska-Hilarowicz W. — Über das Wesen und den klinischen Wert der Krebsreaktion nach Roffo. (1928), *Z. Krebsforsch.*, **26**, 214—227.
56. Mozołowski W. — Über die Quelle des im Muskel entstehenden Ammoniaks. (1928), *Klin. Wochenschr.*, **7**, 2202—2203.
57. Mozołowski W., Hilarowicz H. — Uwagi o rzekomych właściwościach antypeptycznych surowicy krwi. (1928), *Pol. Gaz., Lek.*, **7**, 409.
58. Nadel A. — Untersuchungen über das Wesen der intracutanen Quaddel mit physiologischer Kochsalzlösung. (1928), *Arch. Dermat.*, **156**, 557.
59. Mozołowski W. — O budowie chemicznej hormonów. (1929), *Przyr. Tech.*, **8**, 49—51.
60. Mozołowski W. — Über den Ammoniakgehalt und die Ammoniakbildung in Blute. X. Über den Ursprung des Blutammoniaks. (1929), *Biochem. Z.*, **206**, 150—157.
61. Heller J. — Über den Harnstoffgehalt des Froschmuskels. (1929), *Biochem. Z.*, **209**, 74—78.
62. Mozołowski W. — O zaczynach proteolitycznych ustroju zwierzęcego. (1929), *Lek. Wojsk.*, **13**, 573—580.
63. Mozołowski W. — W sprawie udziału lekarzy w zawodach sportowych (ze szczególnym uwzględnieniem roli lekarza-chemika). (1929), *Przegl. Sport.-Lek.*, **1**, 56—60.
64. Mozołowski W. — Zasady purynowe krwi i mięśni. (1930), *Księga Pamiętkowa XIII Zjazdu Lekarzy i Przyrodników Polskich*. Wilno, **1**, 295—296.
65. Ostern P. — Über die purinkörper im Kaninchenmuskels. (1930), *Biochem. Z.*, **221**, 64—70.
66. Jaworska J. — Ammoniak und Purinkörper bei Wärmestarre des Froschmuskels. (1930), *Biochem. Z.*, **221**, 71—73.
67. Ostern P. — Über Ammoniakbildung im Froschherz. I. (1930), *Biochem. Z.*, **228**, 401—406.
68. Mann T. — O domniemanym udziale azotu amidowego białek krwi i mięśni w przemianach chemicznych mięśnia pracującego. (1931), *Acta Biol. Exp.*, **6**, 45—57.
69. Mann T. — Über den Ammoniakgehalt und die Ammoniakbildung im Muskel und deren Zusammenhang mit Funktion und Zustandsänderung. VIII. Über den angeblichen Anteil des Aminostickstoffs des Blut- und Muskeleiweisses an den chemischen Vorgängen im arbeitenden Muskel. (1931), *Biochem. Z.*, **231**, 33—38.
70. Mozołowski W., Mann T., Lutwakówna C. — O powstaniu amoniaku w mięśniach zatrutych kwasem jodoctowym. (1931), *Spraw. Tow. Nauk. Lwów*, **11**, 35—36.
71. Mroczkiewiczówna U. — O nukleotydach adeninowych. (1931), *Spraw. Tow. Nauk. Lwów*, **11**, 36.
72. Mozołowski W., Mann T., Lutwak C. — Über den Ammoniakgehalt



- und die Ammoniakbildung im Muskel und deren Zusammenhang mit Funktions- und Zustandsänderung. IX. Die Stellung der Ammoniakbildung in der Reihenfolge der chemischen Vorgänge im tätigen Muskel. (1931), *Biochem. Z.*, **231**, 290—305.
73. Mroczkiewicz U. — Über die tierischen Adeninnucleotide. (1931), *Biochem. Z.*, **235**, 267—270.
74. Lutwak C. — Über den Ammoniakgehalt und die Ammoniakbildung im Muskel und deren Zusammenhang mit Funktions- und Zustandsänderung. X. Über die Ammoniakbildung, welche den Zuckungen jodessigsäure vergifteter Muskel entspricht. (1931), *Biochem. Z.*, **235**, 485—489.
75. Umschweif B. — Über Pankreaspräparate. (1931), *Klin. Wochenschr.*, **10**, 211—213.
76. Ostern P. — Budowa czerwonego barwnika krwi. (1931), *Pol. Gaz. Lek.*, **10**, 892—894, 910—912.
77. Mozołowski W. — Uwagi o sprawie wykrywania cukru gronowego w moczu. (1932), *Prakt. Lek.*, **6**, 1—4.
78. Umschweif B. — Bemerkungen über Lipasebestimmungen in Fermentpräparaten. (1932), *Biochem. Z.*, **249**, 75—82.
79. Nadel A. — Chemische Studien an der menschlichen Haut. I. Untersuchungen an der Leichenhaut, Kritik der Messmethoden. (1932), *Biochem. Z.*, **249**, 83—94.
80. Mozołowski W., Mann T. — Amoniogeneza w krwi zółwia. (1932), *Spraw. Tow. Nauk. Lwów*, **12**, 127—129.
81. Mozołowski W., Baranowski T., Reis J., Sobczuk B. — Amoniogeneza i rozpad grupy pyrofosforanowej w miążdze mięśni żaby. (1932), *Spraw. Tow. Nauk. Lwów*, **12**, 207—208.
82. Mozołowski W., Reis J., Sobczuk B. — Ammoniakbildung und Pyrophosphatzerfall im Muskel. (1932), *Biochem. Z.*, **249**, 157—160.
83. Mozołowski W., Mann T. — Über die Ammoniakbildung im Schildkrötenblut. I. (1932), *Biochem. Z.*, **249**, 161—175.
84. Mozołowski W., Mann T. — Über die Ammoniakbildung im Schildkrötenblute. II. Die Bildung eines phenolartigen Körpers, welche die Ammoniakbildung im hämolysierten Schildkrötenblut begleitet. (1932), *Biochem. Z.*, **250**, 487—488.
85. Mozołowski W. — Nowe zadania doświadczalne nad wydzielaniem moczu w nerce. (1932), *Pol. Gaz. Lek.*, **11**, 913—916.
86. Heller J., Mozołowski W. — O rozmieszczeniu kwasu moczowego pomiędzy krwinki a osocze. (1932), *Wiad. Lek.*, **5**, 12.
87. Ostern P. — Über die Darstellung der Muskeladenyl- und Inosinsäure. (1932), *Biochem. Z.*, **254**, 65—70.
88. Nadel A. — Chemische Studien an der menschlichen Haut. II. Untersuchungen an der normalen und der pathologischen Menschenhaut. (1932), *Arch. Dermat. Syph.*, **165**, 507—524.
89. Nadel A. — Chemische Studien an der menschlichen Haut. III. Über die sog. Rest-N-Diffrenz (Doppelstickstoff) des menschlichen Blutes sowie der menschlichen Haut und ihr Verhalten im Verlaufe mancher Hautkrankheiten. (1933), *Arch. Dermat. Syph.*, **167**, 53—64.
90. Vogelfänger I. — Über das Vorkommen von Acetylcholin im Rinderblut. (1933), *Z. Physiol. Chem.*, **214**, 109—110.
91. Mozołowski W. — Przemiany chemiczne w mięśni pracującym. (1933), *Lek. Wojsk.*, **21**, 193—204, 297—302.



92. Ostern P., Mann T. — Der Mechanismus der Desaminierungen im Herzen und im Skelettmuskel. (1933), *Biochem. Z.*, **260**, 326—353.
93. Klimek R. — Adenylsäure und Adeninnucleotid. II. (1933), *Biochem. Z.*, **262**, 1—2.
94. Mozołowski W., Sobczuk B. — Ammoniakbildung und Pyrophosphatzerfall im Muskel. II. (1933), *Biochem. Z.*, **265**, 42—49.
95. Mozołowski W., Sobczuk B. — Rozpad kwasu adenylotrójfosforowego w mięśniu. (1933), *Przełg. Fizjol. Ruchu*, **5**, 241—258.
96. Lutwakówna C., Mozołowski W. — Stan chemiczny mięśni znuzonych w różnych temperaturach. (1933), *Spraw. Tow. Nauk. Lwów*, **13**, 204—205.
97. Lutwakówna C., Mozołowski W. — Zmiany chemiczne w mięśniach znuzonych w różnych temperaturach. (1933), *Przełg. Fizjol. Ruchu*, **5**, 259—270.
98. Mann T. — Der Mechanismus der Desaminierungen im Skelettmuskel. (1933), *Biochem. Z.*, **266**, 162—168.
99. Mozołowski W. — Ogólne wiadomości z chemii gazów bojowych. I. (1933), *Prakt. Lek.*, **7**, 141—147.
100. Mozołowski W. — Ogólne wiadomości z chemii gazów bojowych. II. (1934), *Prakt. Lek.*, **8**, 33—49.
101. Schütz A. F., Umschweif B. — Über einige Reaktionen der Purinbasen mit Metallsalzen. (1934), *Biochem. Z.*, **268**, 326—330.
102. Mann T. — Sind Methylguanidinoxalsäure (Kreaton), Methylguanidin und Oxalsäure natürliche Bestandteile des Muskelgewebes? (1934), *Biochem. Z.*, **268**, 339—344.
103. Mann T. — O ciałach wywołujących raka. (1934), *Pol. Gaz. Lek.*, **13**, 69—70.
104. Mann T. — O kwasie askorbinowym czyli witaminie C. (1934), Wykład w Towarzystwie Przyrodniczym im. Kopernika.
105. Ostern P. — Über Di-adenosin-pentaphosphorsäure (Herz-nucleotid). (1934), *Biochem. Z.*, **270**, 1—5.
106. Mann T. — O kwasie askorbinowym czyli witaminie C. (1934), *Przyr. Tech.*, **13**, 154—161.
107. Reis J. — La nucléotidase et sa relation avec la désamination des nucléotides dans le coeur et dans le muscle. (1934), *Bull. Soc. Chim. Biol.*, **16**, 385—399.
108. Umschweif B. — Sur les purines nucléoprotéidiques dans le muscle. (1934), *Bull. Soc. Chim. Biol.*, **16**, 543—549.
109. Nadeln A. — Hautkrankheiten und Serumlipase (Tributyrase). I i II. (1934), *Arch. Dermat. Syph.*, **170**, 253—262, 331—340.
110. Lutwak C., Mozołowski W. — Der Einfluss der Temperatur auf die chemische Zusammensetzung der anaerob ermüdeten Muskeln. (1934), *Biochem. Z.*, **272**, 157—166.
111. Schütz F. A. — Zur Frage des natürlichen Vorkommens von 2-Oxy-6-aminopurin. (1934), *Biochem. Z.*, **273**, 52—55.
112. Mann T., Ostern P. — Über Ammoniakgehalt und Ammoniakbildung im Muskel. XXI. Über die Hemmung der Ammoniakbildung durch verschiedene alkalische Pufferlösungen. (1934), *Biochem. Z.*, **274**, 154—157.
113. Ostern P. — O wchłanianiu jelitowym. (1934), *Pol. Gaz. Lek.*, **13**, 537—539, 560—563.
114. Baranowski T., Mozołowski W. — Die Saccharose im Harn bei einem Falle von Pankreaserkrankung. (1934), *Klin. Wochenschr.*, **13**, 955—956.
115. Baranowski T. — Oznaczenia czynności wydzielniczej nerki w przypadku sacharozurii alimentarnej. (1934), *Pol. Gaz. Lek.*, **13**, 611—612.

116. Baranowski T. — Krzywe glikemiczne w różnych stanach chorobowych. (1934), *Prakt. Lek.*, **8**, 173—186.
117. Ostern P. —  $\bar{O}$  przemianach kwasu adenilowego w tkankach. (1934), *Przeegl. Fizjol. Ruchu*, **6**, 267—318.
118. Ostern P. — Über den Mechanismus der Jodessigsäurevergiftung. (1935), *Biochem. Z.*, **275**, 87—89.
119. Lutwak-Mann C. — Über die Verkettung der chemischen Vorgänge im Muskel. IV. Über die Spezifität der Phosphoglycerinsäure als Phosphatdonator. (1935), *Biochem. Z.*, **275**, 167—168.
120. Ostern P., Mann T. — Über die Verkettung der chemischen Vorgänge im Muskel. V. Über den Zusammenhang der Vorgänge der anaeroben Erholung mit der Atmung. (1935), *Biochem. Z.*, **276**, 408—415.
121. Mann T. — O mechanizmie fosforylacji w przemianie mięśniowej. (1935), *Spraw. Tow. Nauk. Lwów*, **15**, 110—111.
122. Ostern P., Baranowski T., Reis J. — O funkcji fosfagenów w czynności mięśniowej. (1935), *Spraw. Tow. Nauk. Lwów*, **15**, 111—112.
123. Lutwak-Mannowa C. — O przemianach chemicznych w mięśniu zatrutym kwasem jodooctowym. (1935), *Spraw. Tow. Nauk. Lwów*, **15**, 112.
124. Mann T. — Über die Verkettung der chemischen Vorgänge im Muskel. VI. Die Phosphatübertragung durch Phosphobenztraubensäure. (1935), *Biochem. Z.*, **277**, 380—382.
125. Lutwak-Mannowa C., Mann T. — O sprzężeniu przemian chemicznych w fermentacji alkoholowej. (1935), *Spraw. Tow. Nauk. Lwów*, **15**, 220.
126. Heller J. — Latencja poczwerek motyli a kwas adenilopyrofosforowy. (1935), *Spraw. Tow. Nauk. Lwów*, **15**, 221. (
127. Ostern P., Baranowski T., Reis J. — Sur la formation de l'acide adénosinetriphosphorique et sur la rôle des phosphagènes. (1935), *C. R. Soc. Biol.*, **118**, 1414—1417.
128. Mann T. Über die Verkettung der chemischen Vorgänge im Muskel. VII. Die Phosphatabspaltung aus Phosphoglycerinsäure im fluoridvergifteten Muskelbrei. (1935), *Biochem. Z.*, **279**, 82—84.
129. Ostern P., Baranowski T., Reis J. — Über die Verkettung der chemischen Vorgänge im Muskel. VIII. Phosphoglycerinsäure und Adenylsäure. (1935), *Biochem. Z.*, **279**, 85—93.
130. Lutwak-Mann C., Mann T. — Über die Verkettung der chemischen Umsetzungen in der alkoholischen Gärung. I. Bildung und Spaltung der Adenosintri-phosphorsäure und deren Zusammenhang mit den Vorgängen der Zuckerspaltung. (1935), *Biochem. Z.*, **281**, 140—156.
131. Ostern P., Baranowski T. — Über die Verkettung der chemischen Vorgänge im Muskel. X. (Zugleich II. Mitteilung über Diadenosin-pentaphosphorsäure). (1935), *Biochem. Z.*, **281**, 157—167.
132. Mann T. — O zaczynach odszczepiających amoniak w mięśniu szkieletowym. (1935), *Kosmos*, **60**, 113—158.
133. Baranowski T. — Die Saccharose im Blute bei einem Falle von Pankreas-erkrankung. (1935), *Klin. Wochenschr.*, **14**, 1719—1722.
134. Mann T. — O auksynach czyli ciałach regulujących wzrost roślin. (1936), *Przyr. Tech.*, **15**, 13—19.
135. Ostern P., Guthke J. A. — Przemiany początkowe glikogenolizy i wyjaśnienie funkcji estru cukrowjednofosforowego. (1936), *Spraw. Tow. Nauk. Lwów*, **16**, 79—82.
136. Sobczuk B., Mejbaum W. — Mechanizm fosforylacji kwasu adenilo-



- wego przez kwas pyrogronowy i fosforany. (1936), *Spraw. Tow. Nauk. Lwów*, 16, 82—84.
137. Ostern P., Guthke J. A. — Les transformations initiales de la glycogénolyse. La fonction de l'ester hexosémonphosphorique. I. (1936), *C. R. Soc. Biol.*, 121, 282—285.
138. Heller J. — Les composés phosphoriques chez la nymphe et la papillon de *Deilephila euphorbiae*. (1936), *C. R. Soc. Biol.*, 121, 414—416.
139. Ostern P., Guthke J. A., Terszakowec J. — Les transformations initiales de la glycogénolyse. La fonction de l'ester hexosémonphosphorique. II. (1936), *C. R. Soc. Biol.*, 121, 1133—1135.
140. Ostern P., Guthke J. A., Terszakowec J. — Über die Bildung des Hexose-monophosphorsäureesters und dessen Umwandlung in Fruktose-diphosphorsäure-ester im Muskel. (1936), *Z. Physiol. Chem.*, 243, 9—37.
141. Lutwak-Mann C. — Przemiany chemiczne w mięśni pod wpływem zatrucia kwasem jodooctowym. (1936), *Arch. Tow. Nauk. Lwów*, Dział III., 7, z. 6, 1—34.
142. Umschweif B., Gibayło K. — Zagadnienie występowania pyrofosforanu w tkankach zwierzęcych. (1937), *Acta Biol. Exp.*, 11, 6—7.
143. Umschweif B., Gibayło K. — Kommt Pyrophosphat im Muskel und in anderen Geweben vor? (1937), *Z. Physiol. Chem.*, 246, 163—170.
144. Reis J. — O 5-nukleotydzie. (1937), *Spraw. Tow. Nauk. Lwów*, 17, 77—79.
145. Ostern P., Guthke J. A., Umschweif B. — Phosphorylierung von Stärke durch Muskelextrakt. (1937), *Acta Biol. Exp.*, 11, 118—119.
146. Ostern P., Guthke J., Słobodzian W., Terszakowec J. — Wird Phosphoglukonsäure im Muskel umgesetzt?, (1937), *Acta Biol. Exp.*, 11, 120—121.
147. Reis J. — O 5-nukleotydzie. (1937), *Acta Biol. Exp.*, 11, 122—123.
148. Umschweif B., Gibayło K. — Dalsze badania nad związkami wielofosforowymi w komórkach drożdżowych i w mięśni szkieletowym. (1937), *Acta Biol. Exp.*, 11, 124—126.
149. Ostern P., Guthke J. — Vergleichende Untersuchungen über die Glykogenolyse. (1937), *Acta Biol. Exp.*, 11, 175—177.
150. Umschweif B., Gibayło K. — O występowaniu nowego związku wielofosforowego w komórkach drożdżowych. (1937), *Spraw. Tow. Nauk. Lwów*, 17, 165.
151. Gibayło K., Umschweif B. — Sur un constituant phosphorique minéral nouveau, découvert dans la levure, et sur la constitution des acides adenosine-polyphosphoriques. (1937), *C. R. Soc. Biol.*, 125, 275—276.
152. Szankowski W. — O związkach istniejących między glikogenolizą beztlenową a tlenową i o różnicach między przebiegiem tych procesów. (1937), *Spraw. Tow. Nauk. Lwów*, 17, 184.
153. Sobczuk B. — O roli kwasu pyrogronowego w glikogenolizie mięśniowej i o mechanizmie działania floryzyny na zahamowanie glikolizy. (1937), *Spraw. Tow. Nauk. Lwów*, 17, 185.
154. Reis J. Über die spezifische Phosphatase der Nervengewebe. (1937), *Enzymologia*, 2, 110—116.
155. Ostern P., Guthke J. A. — Über die Darstellung der Phosphoglycerinsäure. (1937), *Z. Physiol. Chem.*, 248, 155—158.
156. Reis J. — Über die Aktivität der 5-Nukleotidase in den tierischen und menschlichen Geweben. (1937), *Enzymologia*, 2, 183—190.
157. Ostern P., Terszakowec J. — O enzymatycznej syntezie kwasu adeno-



- zyno-5-fosforowego z adenozyiny. (1937), *Spraw. Tow. Nauk. Lwów*, 17, 242—244.
158. Ostern P., Terszakowec J. — Über die enzymatische Synthese von Adenosin-5-monophosphorsäure (Muskeladenylsäure) aus Adenosin. I. (1937), *Z. Physiol. Chem.*, 250, 155—157.
159. Reis J. — Badania nad swoistością fosfataz. (1937), *Arch. Tow. Nauk. Lwów*, Dział III., 8, z. 7, 1—19.
160. Ostern P., Guthke J. A., Umschweif B. — Enzymatische Phosphorylierung von Stärke. (1937), *Enzymologia*, 3, 5—9.
161. Ostern P. — Witaminy a hormony. (1937), *Pol. Stomatol. Przegl. Dent.*, 15, 279—296.
162. Ostern P. — Tłuszczowce. w: *Chemia Fizjologiczna* wydana pod red. J. K. Parnasa, (1937), *Delta*, Warszawa, T. I., 91—143.
162. Mann T. — Karotenoidy. w: *Chemia Fizjologiczna*, wydana pod red. J. K. Parnasa, (1937), *Delta*, Warszawa, T. I., 179—205.
164. Mann T. — Barwniki pirolowe. w: *Chemia Fizjologiczna* wydana pod red. J. K. Parnasa, (1937), *Delta*, Warszawa, T. I., 319—376.
165. Mann T. — Melaniny i niektóre barwniki zwierzęce. w: *Chemia Fizjologiczna*, wydana pod red. J. K. Parnasa, (1937), *Delta*, Warszawa, T. I., 367—376.
166. Mann T. — Utleniania i redukcje. *Chemia Fizjologiczna*, wydana pod red. J. K. Parnasa, (1937), *Delta*, Warszawa, T. I., 525—546.
167. Ostern P. — Trawienie jelitowe i kał. w: *Chemia Fizjologiczna*, wydana pod red. J. K. Parnasa. (1937), *Delta*, Warszawa, T. II., 169—192.
168. Baranowski T. — Wątroba. w: *Chemia Fizjologiczna*, wydana pod red. J. K. Parnasa. (1937), *Delta*, Warszawa, T. II., 193—213.
169. Ostern P. — Chemia mięśniowa. w: *Chemia Fizjologiczna*, wydana pod red. J. K. Parnasa. (1937), *Delta*, Warszawa, T. II., 215—267.
170. Reis J. — Chemia gałki ocznej. w: *Chemia Fizjologiczna*, wydana pod red. J. K. Parnasa. (1937), *Delta*, Warszawa, T. II., 279—284.
171. Lutwak-Mann C. — Mleko. w: *Chemia Fizjologiczna* wydana pod red. J. K. Parnasa, (1937), *Delta*, Warszawa, T. II., 467—480.
172. Baranowski T. — Najważniejsze metody analizy krwi i moczu. w: *Chemia Fizjologiczna*, wydana pod red. J. K. Parnasa. (1937), *Delta*, Warszawa, T. II., 593—620.
173. Mochnacka I. — Tablice fizjologiczno-chemiczne. w: *Chemia Fizjologiczna*, wydana pod red. J. K. Parnasa. (1937), *Delta*, Warszawa, T. II., 637—649.
174. Augustin Z. — Badania porównawcze nad początkowym etapem glikogolizy mięśniowej. (1938), *Spraw. Tow. Nauk. Lwów*, 18, 95—96.
175. Ostern P., Baranowski T., Terszakowec J. — Fosforylacja adenozyiny przez drożdże i znaczenie tego procesu dla fermentacji alkoholowej. (1938), *Spraw. Tow. Nauk. Lwów*, 18, 96—99.
176. Ostern P., Baranowski T., Terszakowec J. — Über die Phosphorylierung des Adenosins durch Hefe und die Bedeutung dieses Vorgangs in der alkoholische Gärung. (1938), *Acta Biol. Exp.*, 12, 40—44.
177. Ostern P., Baranowski T., Terszakowec J. — Über die Phosphorylierung des Adenosins durch Hefe und die Bedeutung dieses Vorgangs für die alkoholische Gärung. II., (1938), *Z. Physiol. Chem.*, 251, 258—284.
178. Augustin Z. — Vergleichende Untersuchungen über Anfangsvorgänge der Glykogenolyse im Muskel und im Herzen. (1938), *Acta Biol. Exp.*, 12, 45—49.
179. Augustin Z. — Über die Anfangsvorgänge der Glykogenolyse im Muskel und im Herzen. (1938), *Z. Physiol. Chem.*, 255, 61—74.

180. Nadel A. — Über das Verhalten von Einweissverdauungsfractionene im Schulz-Daleschen Experiment. II. (1938), *Z. Gesamte Exp. Med.*, **103**, 446—450.
181. Nadel A. — Wartość i znaczenie prób uczuleniowych w rozpoznawaniu chorób alergicznych skóry. (1938), *Pol. Gaz. Lek.*, **17**, 586—589.
182. Ostern P., Terszakowec J., Hubl S. — Powstawanie adenozyiny i rozpad kwasu nukleinowego w drożdżach. (1938), *Spraw. Tow. Nauk. Lwów*, **18**, 198—199.
183. Baranowski T. — Badania nad przenoszeniem grup fosforanowych przez enzymy mięśniowe. (1938), *Spraw. Tow. Nauk. Lwów*, **18**, 199—200.
184. Ostern P., Terszakowec J., Hubl S. — Über die Phosphorylierung des Adenosins durch Hefe und die Bedeutung dieses Vorgangs für die alkoholische Gärung. III. Bildung des Adenosins und Zerfall der Nucleinsäure in der Hefe. (1938), *Z. Physiol. Chem.*, **255**, 104—125.
185. Baranowski T. — Untersuchungen über phosphatübertragenden Enzyme im Muskelextrakt. (1938), *Acta Biol. Exp.*, **12**, 122—125.
186. Korzybski T. — Nowe poglądy na rolę przysadki mózgowej w przemianie węglowodanów. (1938), *Endokryn. Lek.*, **3**, 3—7.
187. Reis J. — Über die Spezifität der Prostata- und Hodenphosphatase. (1938), *Enzymologia*, **5**, 251—253.
188. Baranowski T. — Über das Enzymsystem der Übertragung von Phosphatgruppen aus der Phosphoglycerinsäure auf Adenylsäure. (1938), *Enzymologia*, **5**, 262—272.
189. Baranowski T. — Badania nad przenoszeniem grup fosforanowych przez enzymy mięśniowe. (1938), *Arch. Tow. Nauk. Lwów*, Dział III., **10**, z. 7, 1—50.
190. Mejbaum W. — Über die Bestimmung kleiner Pentosemenge insbesondere in Derivaten der Adenylsäure. (1939), *Z. Physiol. Chem.*, **258**, 117—120.
191. Sobczuk B. — Rola kwasu pyrogronowego oraz działanie floryzyny w glikogenolizie mięśniowej. (1939), *Arch. Tow. Nauk. Lwów*, Dział III., **11**, z. 3, 1—26.
192. Baranowski T. — Skryształizowane białka mięśni królika. (1939), *Spraw. Tow. Nauk. Lwów*, **19**, 72—74.
193. Baranowski T. — Protéines cristallisables de l'extrait musculaire de lapin. (1939), *C. R. Soc. Biol.*, **130**, 1182—1184.
194. Ostern P., Hubl S. — Darstellung von Glykogen. (1939), *Acta Biol. Exp.*, **13**, 89—90.
195. Mejbaum W. — Mikrometoda oznaczania pentoz i zastosowanie jej do oznaczania kozymazy i fosfokozymazy. (1939), Praca doktorska.
196. Mochnacka I. — Procesy wstępne glikozenolizy. (1939), Praca doktorska.
197. Baranowski T. — Über die Krystallisation von Myogen. (1939), *Acta Biol. Exp.*, **13**, 124—127.
198. Baranowski T. — Die Isolierung von krystallisierten Proteinen aus Kaninchenmuskeln. (1939), *Z. Physiol. Chem.*, **260**, 43—55.
199. Nadel A. — Über das Verhalten von Einweissverdauungsfractionen im Schultz-Daleschen Experiment. III. (1939), *Z. Gesamte Exp. Med.*, **106**, 50.
200. Augustin Z. — Wstępne procesy glikogenolizy w mięśni i sercu. Badania porównawcze. (1939), *Archiwum Tow. Nauk. Lwów*, III, **11**, z. 4.
201. Ostern P., Herbert D., Holmes E. — Formation and break down of glycogen in the liver. (1939), *Biochem. J.*, **33**, 1858.
202. Ostern P., Holmes E., Herbert D., Terszakowec J., Hubl S. — Rypad i obrazowanie glikogena w pečeni. (1940), *Fizjol. Zh. SSSR*, **29**, 276.
203. Baranovskii T. — O krystallicheskom miogene. (1940), *Biokhimiya*, **5**, 174.



204. Khrobak L., Baranowskii T. — O razlichnykh geksagonal'nykh kristallakh miogena A iz myshts krolikov. (1949), *DAN SSSR*, **8**, 28.
205. Stepanenko B. N. — Khimiya khlorofilla. (1944), *Usp. Khim.*, **13**, 490.
206. Belister V. A., Karlina — O preparativnom poluchemii fosfoglitseronovoi kisloty. (1944), *Biokhimiya*, **9**, 6.
207. Petrova A. N. — Amilazy myshts. (1946), *Biokhimiya*, **11**, 119.
208. Stepanenko B. N. — Plazmalogen. (1947), *Usp. Sovrem. Biokhim.*, **1**, 176.
209. Stepanenko B. N. — Zhelchnye pigmenty. (1947), *Usp. Sovrem Biokhim.*, **1**, 269.
210. Stepanenko B. N., Afanas'eva E. M. — O reaktsii s iodom glikogenov razlichnogo proiskhozhdeniya. (1947), *Biokhimiya*, **12**, 111.
211. Stepanenko B. N. — Sovremennye predstavleniya o stroenii khlorofilla. (1949), *Izv. AN SSSR, ser. biol.*, **3**, 241.
212. Stepanenko B. N. — Iodnaya reaktsiya polisakharidov s sodom. (1947), *Usp. Khim.*, **16**, 708.
213. Stepanenko B. N., Minaev P. F., Silaeva E. A. — Deistvie fosforilirovannykh uglevodov na atsetilkholinovuyu kontrakturu myshtsy. (1947), *Byoll. Eksp. Biol. Med.*, **25**, 188.
214. Kotel'nikova A. V. — Ferritin. (1947), *Usp. Sovrem. Biokhim.*, **1**, 219.
215. Petrova A. N. — O gidroliticheskom rasshcheplenii uglevodov v myshtsakh (1947), *Biokhimiya*, **12**, 210.
216. Petrova A. N. — Tireoidnye i antitireoidnye faktory. (1947), *Usp. Sovrem Biokhim.*, **1**,
217. Petrova A. N. — Ob enzime myshts, rasshcheplyayoshchikh 1,6-svyazi v polisakharidakh. (1947), *DAN SSSR*, **58**, 113.
218. Rozenfel'd E. L. — O soedinenii glikogena s belkami. (1947), *DAN SSSR*, **57**, 927.
219. Konikova A. S., Dobbert N. N., Braunshtein A. E. — Labilizatsiya  $\alpha$ -vodoroda aminokislot pri deistvii fermentov pereaminirovaniya (1947), *Biokhimiya*, **12**, 556.
220. Koval'skii V. V. — Khromatograficheskii analiz glikogena. (1947), *DAN SSSR*, **58**, 1083.
221. Stepanenko B. N., Afanas'eva E. M. — K izucheniyu produktov biologicheskogo rozshchepleniya glikogena. (1948), *DAN SSSR*, **63**, 415.
222. Kotel'nikova A. V. — O sushchestvovanii izomerazy adenzindi fosfornoj kisloty. (1948), *Biokhimiya*, **13**, 66.
223. Kotel'nikova A. V. — O fosfomutaze adenzindifosfornoj kisloty iz pecheni. (1948), *DAN SSSR*, **59**, 527.
224. Kotel'nikova A. V. — O dezaminirovanii adenzindifosfornoj kisloty dezaminazoi adenilovoi kisloty v priststvii ekstraktov iz pecheni, (1948), *DAN SSSR*, **62**, 251.
225. Petrova A. N. — Ob enzymaticheskom raspade i sinteze glikogena v myshtsakh. (1948), *Biokhimiya*, **13**, 113.
226. Rozenfel'd E. L., Ravikovich Kh. M. — O spektrakh pogloshcheniya soedinenii glikogena s belkami. (1945), *DAN SSSR*, **59**, 45.
227. Rozenfel'd E. L. — O sushchestvovanii razlichnykh glikogenov i ikh soedinenii s belkami. (1948), *Biokhimiya*, **13**, 306.
228. Rozenfel'd E. L. — Ob usloviyakh rasshchepleniya razlichnykh glikogenov fermentami. (1948), *DAN SSSR*, **62**, 373.
229. Davydova S. Ya., Konikova A. S. — Labilizatsiya  $\alpha$ -vodoroda yablochnoi kisloty pri deistvii malikodegidrazy. (1948), *DAN SSSR*, **9**, 2.
230. Konikova A. S. — Itogi i perspektivy primeneniya tyazhelykh izotopov



- pri issledovanii belkovogo obmena. Soveshchanie po belku, 5-ya konferentsiya po vysokomolekulyarnym soedineniyam. (1948), *Izd. AN SSSR*.
231. Koval'skii V. V. — Issledovanie glikogenov metodom khromatograficheskoi adsorbtsii. (1948), *Biokhimiya*, **18**, 131.
232. Stepanenko B. N., Afanac'eva E. M. — O vzaimodeistvii s yoodom glikogenov i apoglikogenov. (1949), *Biokhimiya*, **14**, 317.
233. Stepanenko B. N., Silaeva E. A. — K izucheniyu svoystv 1,6-difosfata fruktozy. (1949), *DAN SSSR*, **68**, 115.
234. Kotel'nikova A. W. — O fosfomutaze adenzindifosfornoj kisloty zhi-votnykh tksnei. (1949), *Biokhimiya*, **17**, 175.
235. Kotel'nikova A. V. — O mekhanizme perenosa adenilovoi sistemoi makroenergicheskikh fosfatov v drozhakh. (1949), *DAN SSSR*, **69**, 837.
236. Petrova A. N. — Gidroliticheskii raspad polisakharidov v myshtsakh. (1949). *Problemy Sov. Fizjol. Biokhim. Farmak.*, 798.
237. Petrova A. N. — O khimicheskikh svoystvakh i metodakh wydeleniya izomerazy amilozy iz myshts. (1949), *Biokhimiya*, **14**, 2.
238. Petrova A. N., Rosenfel'd E. L., Lebedeva, M. N., Sinitsina L. N. — Metod policheniya fosforolazy iz myshts. (1949), *DAN SSSR*, **64**, 1141.
239. Rosenfel'd E. L. — Vliyanie shchelochnoi obrabotki glikogenov na obrazovanie imi kompleksov s belkami (1949), *DAN SSSR*, **68**, 1073.
240. Vinogradova N. I. — Izuchenie obmena glikogena myshts i pechenii lyagushek s pomyshch'yo deiteriya. (1949), *DAN SSSR*, **69**, 565.
241. Vorob'eva A. A. — Dezaminirovanie adenzintrifosforna kisloty v myshtsakh. (1949), *Vop. Med. Khim.*, 1—2.
242. Tarle M. V., Padrabinek I. A. — Opredelenie sodержaniya vody v biologicheskikh sredakh medodom otgonki. (1949). *Vop. Med. Khim.*, 1—2,

Redakcja kwartalnika *Postępy Biochemii* pragnie serdecznie podziękować profesorowi Tadeuszowi Korzybskiemu za udostępnienie danych bibliograficznych, które pozwoliły na uzupełnienie spisu publikacji profesora Jakuba K. Parsnasa i Jego uczniów.

## ARTYKUŁY

JACEK KUŹNICKI \*),  
KONRAD S. FAMULSKI \*\*)

### **Rola kinaz białkowych i fosfataz w regulacji metabolizmu glikogenu**

### **Role of protein kinases and phosphatases in regulation of glycogen metabolism**

#### *Spis treści*

- I. Wstęp**
- II. Budowa i występowanie glikogenu**
- III. Biosynteza glikogenu**
- IV. Degradacja glikogenu**
- V. Regulacja metabolizmu glikogenu**
  - V-1. Aktywacja glikogenolizy**
  - V-2. Kinaza białkowa zależna od cAMP**
    - V-2.1. Budowa kinazy białkowej**
    - V-2.2. Substraty kinazy zależnej od cAMP**
  - V-3. Kinaza fosforylazy**
    - V-3.1. Budowa kinazy fosforylazy**
    - V-3.2. Aktywacja kinazy fosforylazy**
    - V-3.3. Substraty kinazy fosforylazy**
  - V-4. Kinazy syntazy glikogenu**
- VI. Specyficzność działania kinaz białkowych**
- VII. Fosfatazy fosfoproteinowe**
- VIII. Sprzężenie skurczu mięśni z glikogenolizą**
- IX. Udział insuliny w regulacji metabolizmu glikogenu**
- X. Uwagi końcowe**

#### *Contents*

- I. Introduction**
- II. Structure and distribution of glycogen**
- III. Glycogen biosynthesis**
- IV. Glycogen degradation**

---

\*) Dr, Zakład Biochemii Mięśni i \*\*) Dr, Zakład Biochemii Komórki, Instytut Biologii Doświadczalnej im. M. Nenckiego PAN, ul. Pasteura 3, 02-093 Warszawa.

**V. Regulation of glycogen metabolism****V-1. Activation of glycogenolysis****V-2. cAMP-dependent protein kinase****V-2.1. Structure of protein kinase****V-2.2. Substrates of cAMP-dependent protein kinase****V-3. Phosphorylase kinase****V-3.1. Structure of phosphorylase kinase****V-3.2. Activation of phosphorylase kinase****V-3.3. Substrates of phosphorylase kinase****V-4. Kinases of glycogen synthase****VI. Specificity of protein kinases****VII. Phosphoprotein phosphatases****VIII. Muscle contraction and glycogenolysis coupling****IX. Role of insulin in regulation of glycogenolysis****X. Concluding remarks**

Wykaz stosowanych skrótów: cAMP-PK — kinaza białkowa zależna od cAMP; GSK-3, GSK-4, GSK-5 — kinazy fosforylujące syntazę glikogenu.

**I. Wstęp**

Badanie metabolizmu glikogenu podjął w latach trzydziestych polski uczoney Jakub K. Parnas\*. Jego doniosłym odkryciem w tej dziedzinie było wykazanie, że jony fosforanowe są niezbędne dla rozkładu glikogenu. Parnas nazwał ten proces fosforolizą i postulował istnienie enzymu — fosforylasy glikogenu. Obserwacje te potwierdzone w latach pięćdziesiątych przez małżeństwo Corich otworzyły nowy rozdział w dziedzinie regulacji metabolizmu. Badając przemiany glikogenu wykryto przekaźnik drugiego rodzaju — cAMP oraz proces odwracalnej fosforylacji fosforylasy i kinazy fosforylasy. Ponadto, badając właściwości fosforylasy glikogenu wykazano zjawisko allosterycznej aktywacji (1—3). Prowadzone badania dostarczają wciąż nowych i interesujących informacji o przemianach glikogenu.

Zamierzeniem tego artykułu jest przedstawienie współczesnych poglądów na temat regulacji syntezy i degradacji glikogenu w mięśniach ze szczególnym uwzględnieniem roli kinaz i fosfataz białkowych. (Por. artykuł przeglądowy J. Hutnego wydrukowany w *Post. Biochem.* w 1970 roku (4)).

**II. Budowa i występowanie glikogenu**

Glikogen jest polimerem glukozy, w którym reszty cukrowe połączone są wiązkami  $\alpha$ -1,4, z wyjątkiem pojawiających się średnio co 10

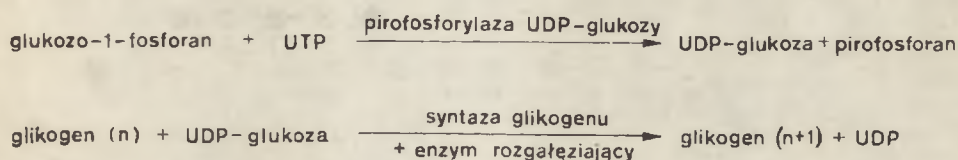
\*) J. K. Parnas, P. Ostern, (1934), O mechanizmie glikogenolizy mięśniowej. *Przegląd Fizjologii Ruchu*, 6, 255—266.



reszt glukozy rozgałęzień utworzonych przez wiązania  $\alpha$ -1,6. Dzięki swej rozgałęzionej strukturze glikogen może być szybko rozkładany lub syntezowany. Głównymi miejscami jego występowania w organizmach zwierząt są mięśnie i wątroba. Glikogen mięśniowy występuje w cytosolu, w postaci granulek o średnicy od 100 do 400Å zawierających różne białka (5—10). Granulki te, znajdują się w bliskim sąsiedztwie sarkoplazmatycznego retikulum i filamentów aktynowych (5). Stwierdzono, że kompleks glikogeno-białkowy izolowany z mięśni szkieletowych królika zawiera następujące enzymy: kinazę fosforylasy, fosforylazę i syntazę glikogenu (8), czyli kluczowe enzymy metabolizmu glikogenu.

### III. Biosynteza glikogenu

Do syntezy glikogenu wykorzystywana jest aktywna forma glukozy, urydynodwufosfoglukoza, powstająca z glukozy-1-fosforanu, w reakcji katalizowanej przez UDP-glukozopirofosforylazę (EC 2.7.7.9), (Ryc. 1). Syntezę glikogenu katalizuje specyficzna syntaza (EC 2.4.1.11), która przyłącza UDP-glukozę do łańcuchów glikogenu złożonych z minimum czterech reszt glukozy połączonych wiązaniem  $\alpha$ -1,4. Syntaza jest tetramerem złożonym z jednakowych podjednostek o masie cząsteczkowej

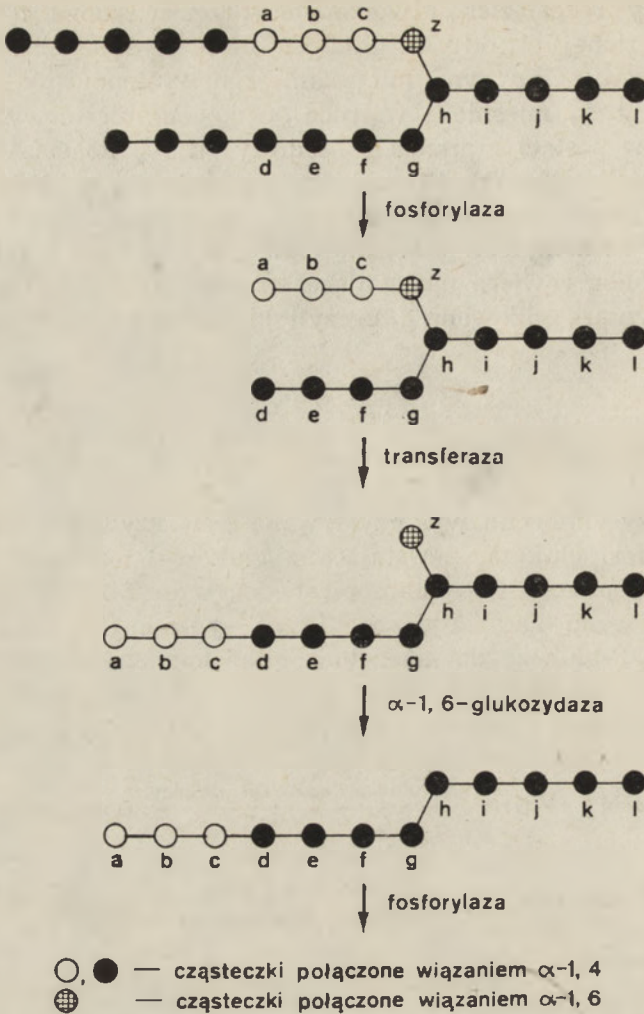


Ryc. 1. Biosynteza glikogenu.

88 kDa (9). W biosyntezie glikogenu bierze również udział enzym rozgałęziający cząsteczki glikogenu (*branching enzyme* (EC 2.4.1.18)). Jego działanie polega na przenoszeniu końcowego fragmentu łańcucha złożonego z sześciu lub siedmiu reszt glukozy na grupę hydroksylową glukozy i utworzeniu wiązania  $\alpha$ -1,6. Enzym rozgałęziający wyizolowano w postaci czystej dopiero w 1980 roku (11). Z trzech wyżej wymienionych enzymów tylko syntaza wydaje się być substratem kinaz białkowych.

### IV. Degradacja glikogenu

Degradację glikogenu w mięśniach katalizują dwa enzymy: fosforylaza (EC 2.4.1.1) i  $\alpha$ -1,6-glukozydaza (EC 3.2.1.68). Fosforylaza odszczepia reszty glukozy od niezredukowanego końca łańcuchów bocznych gli-



Ryc. 2. Rozkład glikogenu.

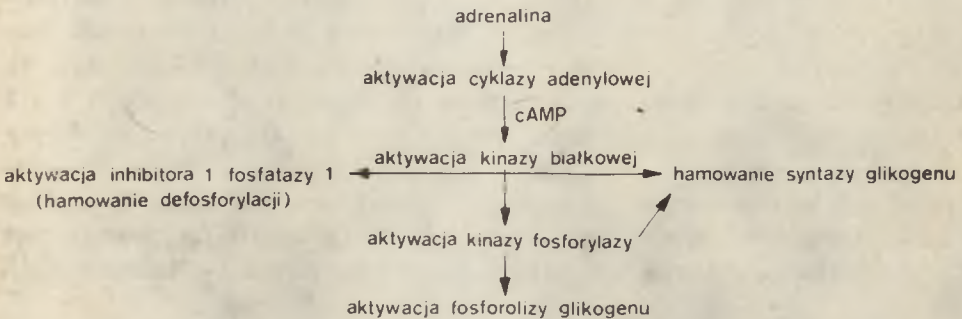
kogenu i przenosi na ortofosforan, tworząc cząsteczkę glukozy-1-fosforanu (Ryc. 2). Proces ten zwany fosforolizą jest z punktu widzenia energetycznego korzystniejszy od hydrolizy, a jednocześnie zapobiega wpływowi glukozy z komórek mięśniowych. Następnym etapem degradacji glikogenu odbywa się przy udziale  $\alpha$ -1,6-glukozydazy, wykazującej dwie aktywności. Pierwsza to aktywność transferazowa polegająca na przeniesieniu trzech reszt glukozy z jednego łańcucha bocznego na drugi z jednoczesnym utworzeniem wiązania  $\alpha$ -1,4 i siedmioresztowego rozgałęzienia. Druga to aktywność hydrolazowa, hydrolizująca wiązania  $\alpha$ -1,6 i odszczepiającej jedną cząsteczkę glukozy (Ryc. 2). Pozostałe reszty glukozy połączone wiązaniem  $\alpha$ -1,4 odrywa, aż do następnego rozgałęzienia, fosforylaza (3). Z dwóch enzymów biorących udział w de-

gradacji glikogenu tylko fosforylaza jest fosforylowana przez specyficzną kinazę białkową.

## V. Regulacja metabolizmu glikogenu

### V-1. Aktywacja glikogenolizy

Na rycinie 3 pokazano schemat rozkładu glikogenu w mięśniach, zachodzącego po aktywacji hormonalnej mięśnia (art. przegl. 10, 11). Adrenalina aktywując cyklazę adenylową zwiększa w komórce mięśniowej stężenie cAMP, który łącząc się z kinazą białkową uaktywnia ten enzym. Kinaza ta fosforyluje kinazę fosforylasy (aktywacja enzymu) i syntazę glikogenu (hamowanie aktywności enzymu). Aktywna kinaza fos-



Ryc. 3. Aktywacja glikogenolizy.

forylazy katalizuje fosforylację fosforylasy, co zwiększa jej aktywność. Dzięki jednoczesnemu zahamowaniu aktywności syntazy glikogenu obserwuje się szybki rozkład glikogenu. Jednocześnie fosforylacji ulega tzw. inhibitor 1 fosfatazy fosfoproteinowej 1. Rola tego procesu będzie wyjaśniona w następnym rozdziale. Schemat podany na rycinie 3 pokazuje ważną prawidłowość, a mianowicie, że przez fosforylację zależną od cAMP aktywowane są enzymy katalizujące procesy degradacji, a hamowane są enzymy biorące udział w biosyntezie.

### V-2. Kinaza białkowa zależna od cAMP

#### V-2.1. Budowa kinazy białkowej

Kinaza białkowa zależna od cAMP (cAMP-PK) jest tetramerem, składającym się z dwóch podjednostek katalitycznych (C) i dwóch podjednostek regulujących (R). Masa cząsteczkowa natywnej kinazy wynosi 170 kDa. Składają się na nią masy cząsteczkowe podjednostek R —

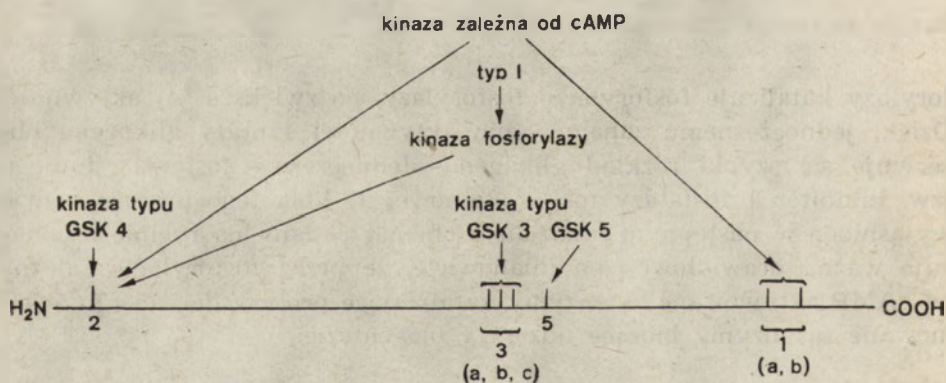


48 kDa i podjednostek C — 41,5 kDa. (12). Zasadniczo wyróżnia się dwa typy tego enzymu tzw. typ I i II (13, 14). Wysoce charakterystyczną cechą różniącą kinazy obu typów jest zdolność autofosforylacji podjednostki regulatorowej bądź jej brak.

Autofosforylację podjednostki regulującej prowadzącą do zwiększenia powinowactwa enzymu wobec cAMP wykazuje tylko kinaza typu II. Przyłączenie cAMP do podjednostek R obu typów kinaz powoduje dysocjację holoenzymu i uwolnienie aktywnych podjednostek C. W mięśniach królika aktywność cAMP-PK typu I stanowi 80% aktywności tej cAMP-PK.

#### V-2.2. Substraty kinazy zależnej od cAMP

cAMP-PK katalizuje fosforylację syntazy glikogenu, kinazy fosforylasy i inhibitora 1 fosfatazy fosfoproteinowej 1 (zob. Ryc. 3). Aktywność syntazy glikogenu uzależniona jest od stężenia różnych metabolitów. Podjednostki syntazy ulegają fosforylacji w kilku miejscach łańcucha peptydowego oznaczonych numerami od 1 do 5 (14—22) (Ryc. 4). cAMP-PK katalizuje fosforylację reszt serynowych w miejscach 1 i 2 (12, 15) przekształcając formę I syntazy w formę D. Aktywność formy ufosforylowanej zależy od stężenia glukozy-6-fosforanu (forma D — dependent). W nieobecności glukozy-6-fosforanu jest ona około 20-krotnie niższa od aktywności w jego obecności. Forma nieufosforylowana jest praktycznie niewrażliwa na glukozy-6-fosforan (forma I — independent).



**Ryc. 4.** Fosforylacja syntazy glikogenu. GSK-3, GSK-4 i GSK-5 to różne kinazy syntazy glikogenu. 1(a, b), 2, 3(a, b, c), 5 oznaczają miejsca fosforylacji w łańcuchu polipeptydowym syntazy glikogenu.

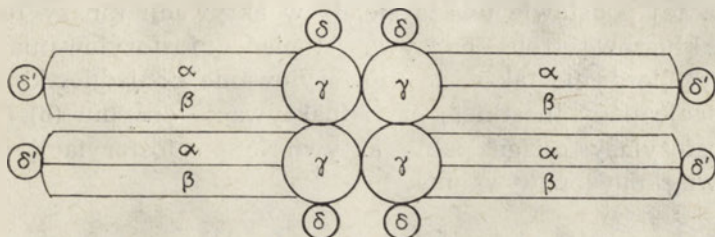
Drugim substratem cAMP-PK jest kinaza fosforylasy. Rola tego procesu zostanie dokładnie omówiona w następnym podrozdziale. Kolejny substrat cAMP-PK to termostabilny inhibitor 1 fosfatazy 1. Masa

cząsteczkowa inhibitora, wyznaczona na podstawie ruchliwości elektroforetycznej wynosi 26 kDa. Białko to nie zawiera reszt cysteiny, tryptofanu i tyrozyny, a fosforylacji ulega jedna z reszt treoniny (14). Po fosforylacji przez cAMP-PK (10) inhibitor 1 przechodzi w formę aktywną, zdolną do hamowania aktywności fosfatazy.

### V-3. Kinaza fosforylazy (EC 2.7.1.38.)

#### V-3.1. Budowa kinazy fosforylazy

Masa cząsteczkowa kinazy fosforylazy wynosi około 1300 kDa. Cząsteczka enzymu składa się z 16 podjednostek czterech rodzajów i można ją opisać wzorem:  $(\alpha_2\beta_2\gamma_2\delta_2)_2$  (Ryc. 5). Podjednostki  $\alpha$  o masie cząsteczko-



**Ryc. 5.** Hipotetyczna struktura kinazy fosforylazy.  $\alpha$  i  $\beta$  to podjednostki ulegające fosforylacji,  $\gamma$  — podjednostka katalityczna,  $\delta$  — kalmodulina związana niezależnie od stężenia jonów wapnia,  $\delta'$  — kalmodulina lub troponina C wiążąca się w obecności jonów wapnia.

wej 145 kDa i  $\beta$  o masie cząsteczkowej 130 kDa są fosforylowane przez kinazę zależną od cAMP. Podjednostki  $\gamma$  (45 kDa) i  $\delta$  (17 kDa) nie ulegają fosforylacji. Centrum aktywne kinazy fosforylazy znajduje się w podjednostce  $\gamma$ . Sekwencja aminokwasów tego polipeptydu wykazuje homologię z podjednostką C cAMP-PK (23). Kinaza fosforylazy aktywowana jest przez jony wapnia. Okazało się, iż podjednostka  $\delta$  jest kalmoduliną (24—26) i że nawet w nieobecności jonów wapnia związana jest ona z kompleksem kinazy fosforylazy. Kinaza fosforylazy wiąże 12 jonów wapnia ze stałą dysocjacji  $1,6 \times 10^{-6}$  M i 4 jony ze stałą  $6 \times 10^{-7}$  M (27, 28, 29). Jony wapnia wysycają podjednostkę początkowo wiążąc się z miejscami o wysokim powinowactwie do  $\text{Ca}^{2+}$  i  $\text{Mg}^{2+}$ , a następnie z miejscami o niższym powinowactwie do jonów wapnia (29). Kinaza fosforylazy wiąże w obecności jonów wapnia dodatkowe cząsteczki kalmoduliny, co powoduje kilkakrotny wzrost aktywności enzymu. Te cząsteczki kalmoduliny nazwano podjednostkami  $\delta'$  celem odróżnienia ich od podjednostek związanych z enzymem niezależnie od stężenia jonów wapnia (16, 30—34). Aktywacja kinazy fosforylazy przez podjednostkę  $\delta'$  hamowana jest przez trifluoperazynę (TFP), silny inhibitor kalmoduliny (33, 35).



Hipotetyczna struktura kinazy fosforylasy z uwzględnieniem miejsca oddziaływania podjednostek  $\delta$  i  $\delta'$  z pozostałymi podjednostkami kompleksu kinazy przedstawiona jest schematycznie na rycinie 5 (12, 33).

#### V-3.2. Aktywacja kinazy fosforylasy

Kinaza fosforylasy, stanowiąca około 1% białek rozpuszczalnych w mięśniach, występuje *in vivo* w dwóch formach: aktywnej (forma a), to jest ufosforylowanej przez cAMP-PK i nieaktywnej, zdefosforylowanej (forma b). Z czterech rodzajów podjednostek kinazy tylko podjednostki  $\alpha$  i  $\beta$  są fosforylowane. Szybkość przyłączenia fosforanu do reszt serynowych podjednostki  $\beta$  jest identyczna z szybkością aktywacji kinazy fosforylasy i pięciokrotnie wyższa od szybkości fosforylacji podjednostki  $\alpha$  (10). Na tej podstawie uważa się, iż w aktywacji kinazy fosforylasy *in vivo* kluczową rolę odgrywa stopień ufosforylowania podjednostki  $\beta$ . Stwierdzono także, że ufosforylowanie podjednostki  $\alpha$  ułatwia defosforylację podjednostki  $\beta$ , czyli inaktywację enzymu (6). Tak więc kinaza fosforylasy osiąga pełną aktywność po fosforylacji podjednostek  $\beta$  i związaniu jonów wapnia.

#### V-3.3. Substraty kinazy fosforylasy

Kinaza fosforylasy katalizuje fosforylację dwóch białek biorących udział w przemianach glikogenu. Są to fosforylaza b i forma I syntazy glikogenu (por. Ryc. 3). Fosforylaza katalizuje rozkład glikogenu do glukozo-1-fosforanu. Aktywność fosforylasy regulują dwa czynniki: stężenia niektórych metabolitów jak np. AMP, ATP i glukozo-6-fosforanu oraz aktywność kinazy fosforylasy, która przekształca formę b w formę a. Fosforylazę b stymuluje AMP, a hamuje ATP i glukozo-6-fosforan. Wysokie stężenia tych dwóch ostatnich związków w mięśniu powodują zahamowanie aktywności fosforylasy b.

Aktywność fosforylasy a nie zależy od stężenia tych efektorów i jest wysoka w warunkach fizjologicznych. Aktywna forma fosforylasy a jest tetramerem, który powstaje w wyniku ufosforylowania nieaktywnego dimeru, czyli formy b fosforylasy glikogenu.

Drugim substratem kinazy fosforylasy jest syntaza glikogenu. Fosforylacji ulega reszta seryny w miejscu 2, co powoduje obniżenie aktywności syntazy glikogenu. W ten sposób kinaza fosforylasy aktywując rozkład glikogenu jednocześnie zapobiega jego syntezie.

#### V-4. Kinazy syntazy glikogenu

Na rycinie 4 pokazano położenie reszt serynowych w cząsteczce syntazy glikogenu, które ulegają fosforylacji pod wpływem pięciu różnych



kinaz białkowych (14—22, 36). Oprócz omówionej już kinazy zależnej od cAMP i kinazy fosforylasy, syntazę glikogenu fosforylują: kinaza syntazy 3 (GSK 3) fosforylująca resztę serynową w miejscu 3 i dwie inne, bliżej niescharakteryzowane kinazy — GSK 4 i GSK 5 fosforylujące odpowiednio miejsca 2 i 5. Fosforylacja miejsca 3 znacznie obniża aktywność syntazy glikogenu. Efekt hamowania aktywności pogłębia fosforylacja pozostałych miejsc. Obecność fosforanu w miejscach 1+2+3 powoduje zwiększenie wartości  $K_m$  syntazy wobec UDP-glukozy, zwiększenie wartości  $K_a$  wobec aktywatora — glukozo-6-fosforanu i obniżenie wartości  $K_i$  wobec inhibitora — fosforanu. Fosforylacja miejsca 5 wpływa pośrednio na aktywność syntazy, gdyż obecność fosfoseryny w tym miejscu jest niezbędna dla aktywności GSK 3 kinazy (37). Miejsce 5 jest *in vivo* prawie całkowicie ufosforylowane. Wydaje się, że GSK 5 jest kinazą której zadaniem jest tworzenie miejsca rozpoznawanego przez inne kinazy (38).

## VI. Specyficzność działania kinaz białkowych

W tabeli 1 pokazano sekwencję aminokwasów w pobliżu reszt seryny lub treoniny fosforylowanych przez kinazę fosforylasy, cAMP-PK i GSK-3. Z tego zestawienia wynikają następujące wnioski dotyczące specyficzności tych kinaz (10):

1. Na ogół fosforylacji ulegają reszty seryny, które są około 100 razy lepszym substratem niż treonina. Toteż interesującym jest fakt, iż w inhibitorze 1 fosfatazy 1 fosforylacji ulega tylko jedna z reszt treoniny mimo obecności 17 reszt seryny.

2. Fosforylacji ulegają tylko niektóre reszty seryny specyficznie fosforylowane przez poszczególne enzymy. Z 200 reszt serynowych kinazy fosforylasy fosforylacji ulegają tylko reszty w pozycji 20 podjednostki  $\alpha$  i w pozycji 100 podjednostki  $\beta$ . Podobne zjawisko obserwuje się w innych fosforylowanych białkach.

3. Porównanie sekwencji aminokwasów w okolicy fosfoseryny lub fosfotreoniny wykazuje pewne podobieństwa. Przed resztą każdej fosforylowanej seryny lub treoniny znajdują się, w odległości dwóch lub trzech reszt, aminokwasy zasadowe, lizyna bądź arginina. Przypuszczalnie dzięki ich obecności tworzy się odpowiednia konformacja łańcucha polipeptydowego rozpoznawana przez kinazę.

4. Specyficzność kinaz zależy także od struktury trzecio- i czwartorzędowej substratu. Na przykład, *in vivo* tylko dwie podjednostki  $\alpha$  i  $\beta$  kinazy fosforylasy ulegają fosforylacji, a pozostałe dwie podjednostki  $\alpha$  i  $\beta$  nie są fosforylowane.

Tabela 1

Specyficzność działania kinaz białkowych regulujących metabolizm glikogenu.

	Substrat	Efekt fosforylacji	Miejsce fosforylacji
Kinaza zależna od cAMP	a) Kinaza fosforylaza: podjednostka $\alpha$	nie znany	—E—R—R—L—S(P)—I—S— —T—E—S—
	podjednostka $\beta$	aktywacja enzymu	—K—R—S—G—S(P)—V—Y— —E—P—L—
	b) Syntaza glikogenu, miejsce 1a	inhibicja enzymu	—K—R—S—N—S(P)—V—D— —T—S—S—
	c) Inhibitor 1 fosfatazy 1	aktywacja inhibitora	—R—R—R—R—P—T(P)—P— —A—T—
Kinaza fosforylaza	a) Fosforylaza b	aktywacja enzymu	—K—R—K—E—I—S(P)—V— —R—G—L—
	b) Syntaza glikogenu, miejsce 2	inhibicja enzymu	—S—R—T—L—S(P)—V—S— —S—L—P—
Kinaza GSK 3	Syntaza glikogenu miejsca 3a, 3b, 3c	inhibicja enzymu	—R—P—A—S(P)—V—P—P— —S(P)—P—S—L—S(P)—R

A = Ala      G = Gly      N = Asn      T = Thr  
D = Asp      I = Ile      P = Pro      V = Val  
E = Glu      K = Lys      R = Arg      Y = Tyr  
P = Phe      L = Leu      S = Ser      (P) = fosforan

## VII. Fosfatazy fosfoproteinowe

Mięśnie szkieletowe królika zawierają trzy fosfatazy o różnej specyficzności wobec białek biorących udział w metabolizmie glikogenu. Wyodróżniono trzy ich klasy (Tab. 2) w zależności od specyficzności substratowej i wrażliwości na różne efekторы (por. 36, 39). Fosfataza typu 1 zbudowana jest z podjednostki katalitycznej (37 kDa) i podjednostki wiążącej glikogen (103 kDa) w stosunku 1:1. Defosforyluje ona fosforylaze, podjednostkę  $\beta$  kinazy fosforylaza i syntazę glikogenu. Aktywność tej fosfatazy hamowana jest przez dwa ciepłotrwałe białka zwane inhibitorem 1 i inhibitorem 2. Inhibitor 1 ulega aktywacji po fosforylacji przez kinazę zależną od cAMP. Fosfataza typu 1 nie przeprowadza defosforylacji swojego efektoru. Z kolei inhibitor 2 jest aktywny w formie nie-



Tabela 2

Charakterystyka fosfatyz fosfoproteinowych.

Typ fosfatazy	Masa cząsteczkowa kDa	Aktywność wobec różnych substratów			Efektory
		Fosforylaza	Kinaza fosforylazy	Syntaza glikogenu	
Fosfataza 1	140	Wysoka	Wysoka (podj. $\beta$ )	Wysoka	Inhibitor 1 i 2
Fosfataza 2A	96	Wysoka	Wysoka (podj. $\alpha$ )	Wysoka (miejsce 3)	nieznane
Fosfataza 2B	80	Niska	Wysoka (podj. $\alpha$ )	Niska	Ca <sup>2+</sup> + kalmodulina

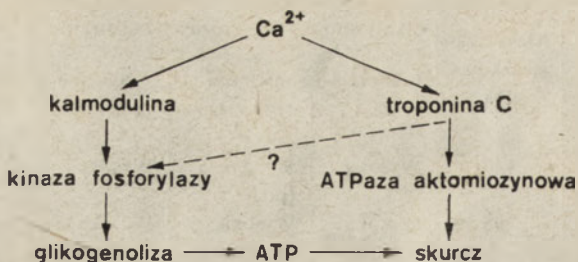
ufosforylowanej. Jego inaktywację katalizuje kinaza GSK 3 fosforylując resztę treoninową (40). Fosfatazy typu 2 są niewrażliwe na wyżej wymienione inhibitory i defosforylują podjednostkę  $\alpha$  kinazy fosforylazy. Fosfataza 2A jest obok fosfatazy 1 najaktywniejszą fosfatazą syntazy glikogenu. Zbudowana jest z podjednostki katalitycznej (36 kDa) i podjednostki regulującej (60 kDa), która działa na fosfatazę hamująco. Fosfataza 2B (identyczna z fosfatazą z mózgu zwaną kalcineuryną) zbudowana jest z podjednostki katalitycznej A (60 kDa) i regulującej B (15 kDa), która mając zdolność wiązania 4 jonów wapnia uwrażliwia aktywność enzymu na stężenie jonów wapnia. Podjednostka A wiąże dodatkowo kalmodulinę i wtedy enzym uzyskuje najwyższą aktywność (41—43). Przy wewnątrzkomórkowych stężeniach jonów wapnia, jakie panują w trakcie skurczu mięśnia, głównym substratem tej fosfatazy jest inhibitor 1 fosfatazy 1 (36).

### VIII. Synchronizacja skurczu mięśni z glikogenolizą

Głównym źródłem energii dla kurczących się mięśni po zużyciu fosfokreatyny jest ATP powstający w procesie glikolizy, zapoczątkowanej fosforolizą glikogenu. Czynnikiem odpowiedzialnym za sprzężenie skurczu mięśni i glikogenolizy są jony wapnia uwalniane do sarkoplazmy po elektrycznej stymulacji mięśni. Troponina C wiąże te jony, co prowadzi do aktywacji ATPazy aktomiozynowej i zapoczątkowania skurczu. Jony wapnia są również wiązane przez kalmodulinę — podjednostkę  $\delta'$  kinazy fosforylazy, co powoduje aktywację procesów glikogenolizy. *In vitro* kinaza fosforylazy może być również aktywowana przez jony wapnia połączone z troponiną C naśladującą podjednostkę  $\delta'$ . Ponieważ cząstki glikogenowe znajdują się w pobliżu filamentów aktynowych zawierających troponinę, aktywacja kinazy fosforylazy przez troponinę C, może być



dodatkowym mechanizmem sprzęgającym skurcz i glikogenolizę (16) (zob. Ryc. 6).



**Ryc. 6.** Rola jonów wapnia w synchronizacji procesów skurczu i glikogenolizy. Linia przerywaną zaznaczono oddziaływanie troponiny C z kinazą fosforylazy stwierdzone *in vitro*. Znak zapytania wskazuje, że znaczenie tego procesu *in vivo* jest jedynie hipotezą.

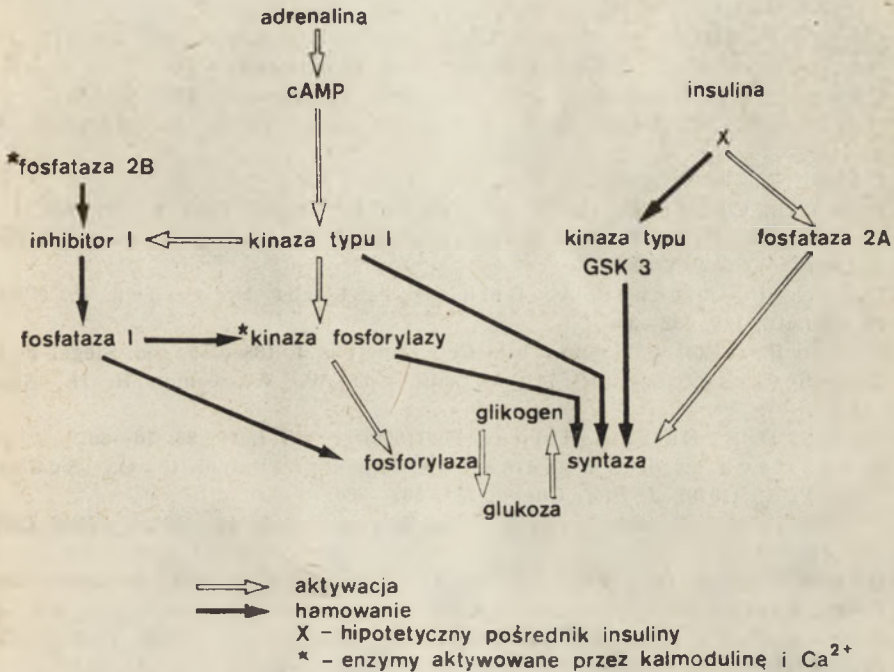
## IX. Udział insuliny w regulacji metabolizmu glikogenu

Historia badań nad insuliną liczy sobie już 60 lat, lecz molekularny mechanizm działania tego hormonu pozostaje ciągle niejasny. Insulina przeciwdziała efektom metabolicznym adrenaliny w mięśniach, a więc wzmacnia syntezę glikogenu jednocześnie hamując jego fosforolizę. Klasyyczne badania prowadzone przez Larnera i wsp. (44) wykazały, iż aktywacja syntazy glikogenu przez insulinę polega na obniżeniu fosforylacji syntazy. Obecnie wiadomo, że defosforylacji ulega głównie miejsce 3 (38). Innym białkiem, którego defosforylacja stymulowana jest przez insulinę, jest inhibitor 1 fosfatazy 1 (39). Uogólniając powyższe obserwacje, można stwierdzić, że regulacja metabolizmu glikogenu przez insulinę polega na aktywacji defosforylacji białek. Jednakże czynnik uwalniany przez aktywację receptora insulinowego i towarzyszącą temu procesowi autofosforylację reszty tyrozynowej receptora (45) nie jest znany. Ten hipotetyczny czynnik powinien aktywować fosfatazy, bądź hamować kinazę GSK 3. Zjawiskiem o niebanalnym znaczeniu jest specyficzna defosforylacja miejsca 3 w cząsteczce syntazy glikogenu przez fosfatazę 1 i fosfatazę 2A w obecności sperminy (produktu dekarboksylacji ornityny) (46). Stężenie sperminy potrzebne do aktywacji fosfataz jest równe stężeniu tego związku w komórce (46). Spermina może także naśladować efekty fizjologiczne insuliny w adypocytach, hepatocytach, czy w mięśniu przepony (por. 36).

## X. Uwagi końcowe

Można obecnie przyjąć, za pewnik, że w komórkach ssaków odwracalna fosforylacja kluczowych enzymów metabolizmu jest powszechnym

mechanizmem regulującym. Z reguły enzymy szlaków biodegradacji są aktywowane przez fosforylację, a enzymy szlaków biosyntezy są przez fosforylację hamowane. Proces regulacji aktywności kinaz i fosfataz białkowych kontrolowany jest przez wiele hormonów, między innymi przez adrenalinę i insulinę. Adrenalina stymuluje syntezę cAMP i w ten sposób aktywuje kinazy zależne od tego efektora. Z kolei insulina po-



Ryc. 7. Regulacja metabolizmu glikogenu w mięśniach.

woduje aktywację fosfataz (Ryc. 7). Prawdopodobnym efektem dla tego procesu jest spermina. Innym regulatorem aktywności kinaz i fosfataz jest wewnątrzkomórkowe stężenie jonów wapnia. Wydaje się, że najbardziej istotnym wnioskiem jaki można wysunąć z przedstawionego w tym artykule materiału jest to, że antagonistyczne hormony, np. adrenalina i insulina wyzwalając, różne czynniki, *de facto* kontrolują stan ufosforylowania tych samych kluczowych białek.

Zaakceptowano do druku 9 stycznia 1986 r.

## PIŚMIENNICTWO

1. Karlson P., (1972), Zarys Biochemii, str. 379—384, PWN, Warszawa.
2. Lehninger A. L., (1979), Biochemia, str. 224—226, 471—476, PWRiL, Warszawa.



3. Stryer L., (1981), w: *Biochemistry*, str. 357—382, W. H. Freeman and Company, San Francisco.
4. Hutny J., (1970), *Post. Biochem.*, **16**, 431—447.
5. Wanson J. C., Drochmans P., (1968), *J. Cell. Biol.*, **38**, 130—150.
6. Meyer F., Heilmeyer L. M. G., Haschke R. H., Fischer E. H., (1970), *J. Biol. Chem.*, **245**, 6642—6648.
7. Michalak M., Sarzała M. G., Drabikowski W., (1977), *Acta Bioch. Pol.*, **24**, 105—116.
8. Cohen P., (1974), *Biochem. Soc. Symp.*, **39**, 51—73.
9. Cohen P., (1978), w: *Current Topics in Cellular Regulation*, str. 117—196, red. Horrecker B. L., Stadtman E. R., Acad. Press, New York.
10. Caudwell F. B., Cohen P., (1980), *Eur. J. Biochem.*, **109**, 391—394.
11. Carlson G. M., Bechtel P. J., Graves D. J., (1979), *Adv. Enzymol.*, **50**, 41—115.
12. Cohen P., (1980), *Mol. Asp. Cell Reg.*, **1**, 255—268.
13. Nimo H., Cohen P., (1977), *Adv. Cyclio Nucleotide Res.*, **8**, 145—266.
14. Weller M., (1979), *Protein Phosphorylation*, Pion Limited, London Elsevier, Amsterdam, New York.
15. Parker P., Aitknen A., Bilham T., Embi N., Cohen P., (1981), *FEBS Lett.*, **123**, 332—336.
16. Cohen P., (1980), w: *Calcium and Cell Function*, **1**, 183—199, red. Siegel F. L., Carafoli E., Kretsinger R. M., McLennan D. W., Wasserman R. H., Acad. Press, New York.
17. Rylatt D. B., Embi N., Cohen P., (1979), *FEBS Lett.*, **98**, 76—80.
18. Srivastava A. K., Waisman D. M., Brostrom C. O., Soderling T. R., (1979), *J. Biol. Chem.*, **254**, 583—586.
19. Soderling T. R., Sheorain V. S., Ericsson L. H., (1979), *FEBS Lett.*, **106**, 181—184.
20. Hemmings B. A., Yellowles D., Cohen P., (1980), *Biochem. Soc. Trans.*, **9**, 241P.
21. Huang K.-P., Lee S.-L., Huang F. L., (1979), *J. Biol. Chem.*, **254**, 9867—9870.
22. Embi N., Rylatt D. B., Cohen P. (1980), *Eur. J. Biochem.*, **107**, 519—527.
23. Crabb J., Heilmeyer L. M. G. Jr, (1984), *J. Biol. Chem.*, **259**, 6346—6350.
24. Cohen P., Burchell A., Foulkes J. G., Cohen P. T. W., Vaman T. C., Nairn A. C., (1978), *FEBS Lett.*, **92**, 287—293.
25. Depaoli-Roach A. A., Gibbs J. B., Roach P. J., (1979), *FEBS Lett.*, **105**, 321—324.
26. Grand R. J. A., Shenolikar S., Cohen P., (1981), *Eur. J. Biochem.*, **113**, 359—367.
27. Kilimann M., Heilmeyer L. M. G., (1977), *Eur. J. Biochem.*, **73**, 191—197.
28. Kuźnicki J., Drabikowski W., (1980), *Post. Biochem.*, **26**, 265—290.
29. Kohse P. K., Heilmeyer L. M. G. Jr, (1981), *Eur. J. Biochem.*, **117**, 507—513.
30. Cohen P., Klee C. B., Picton C., Shenolikar S., (1980), *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, 151—161.
31. Cohen P., (1980), *Eur. J. Biochem.*, **111**, 563—574.
32. Shenolikar S., Cohen P. T. W., Cohen P., Nairn A. G., Perry S. V., (1979), *Eur. J. Biochem.*, **100**, 329—337
33. Cohen P., Picton C., Klee C. B., (1979), *FEBS Lett.*, **104**, 25—30.
34. Kuźnicki J., Grabarek Z., Brzeska H., Drabikowski W., Cohen P., (1981), *FEBS Lett.*, **130**, 141—145.



35. Picton C., Klee C. B., Cohen P., (1980), *Eur. J. Biochem.*, **111**, 553—556.
36. Cohen P., (1985), *Eur. J. Biochem.*, **151**, 439—448.
37. Picton C., Woodgett J. R., Cohen P., (1982), *FEBS Lett.*, **150**, 191—196.
38. Parker P. J., Candwell F. B., Cohen P., (1983), *Eur. J. Biochem.*, **130**, 227—234.
39. Ingebritsen T. S. i Cohen P., (1983), *Science*, **211**, 311—338.
40. Hemmings B. A., Yellowees J. C., Kernohan J. C., Cohen P., (1981), *Eur. J. Biochem.*, **119**, 443—450.
41. Klee C. B., Krinks M. H., (1978), *Biochemistry*, **17**, 120—126.
42. Klee C. B., Crouch T. H., Krinks M. H., (1979), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **76**, 6270—6273.
43. Steward A. A., Ingebritsen T. S., Hanalan A., Klee C. B., Cohen P., (1982), *FEBS Lett.*, **137**, 80—84.
44. Villar-Palasi C., Larner J., (1960), *Biochim. Biophys. Acta*, **39**, 171—173.
45. Kasuga M., Zick Y., Blithe D. L., Crettaz M., Kahn C. R., (1982), *Nature* (London), **289**, 667—669.
46. Tung H. Y. L., Pelech S., Fisher M. J., Pogson C. I., Cohen P., (1985), *Eur. J. Biochem.*, **149**, 305—313.



KRYSTYNA BOGUĆKA \*)

## Kompleks ATPazy transportującej protony

### Proton translocating ATPase

#### Spis treści

- I. Wstęp
- II. Struktura i funkcja sektora błonowego  $F_0$ 
  - II-1. Wiązanie katalitycznego sektora  $F_1$  z  $F_0$ 
    - II-1.1. Prokaryoty
    - II-1.2. Mitochondria
  - II-2. Mechanizm translokacji protonów
- III. Struktura i funkcja sektora katalitycznego  $F_1$ 
  - III-1. Mechanizm syntezy i hydrolizy ATP
    - III-1.1. Centrum katalityczne ATPazy  $F_0$ - $F_1$
    - III-1.2. Współdziałanie podjednostek w procesie katalitycznym
    - III-1.3. Reszty aminokwasowe w centrum katalitycznym
    - III-1.4. Synteza i hydroliza ATP
      - III-1.4.1. Czy jest możliwe istnienie ufosforylowanego prekursora ATP, w którym fosfor jest związany kowalencyjnie?
      - III-1.4.2. Energetyka procesu katalitycznego
  - III-2. Hipotezy mechanizmu funkcjonowania ATPazy  $F_0$ - $F_1$

#### Contents

- I. Introduction
- II. Structure and function of the membrane sector  $F_0$ 
  - II-1. Binding of the catalytic sector  $F_1$  to  $F_0$ 
    - II-1.1. Prokaryota
    - II-1.2. Mitochondria
  - II-2. The proton translocation mechanism
- III. Structure and function of the catalytic sector  $F_1$ 
  - III-1. Mechanism of the ATP synthesis and hydrolysis
    - III-1.1. The catalytical centre of  $F_0$ - $F_1$  ATPase
    - III-2. Cooperative interactions between the catalytic subunits
    - III-1.3. The aminoacid residues in the catalytic centre
    - III-1.4. ATP synthesis and hydrolysis

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



### III-1.4.1. Does exist phosphorylated precursor of ATP containing covalently bound phosphate?

### III-1.4.2. Energetics of the catalytic process

## III-2. Hypotheses of function and mechanism of the $F_0$ - $F_1$ ATPase

Wykaz stosowanych symboli i skrótów: ATPaza  $F_0$ - $F_1$  — ATPaza (syntetaza ATP) transportująca protony;  $F_0$  — sektor błonowy enzymu (kanał protonowy);  $F_1$  — sektor katalityczny enzymu (ATPaza);  $F_6$  — białko biorące udział w wiązaniu obu sektorów enzymu; OSCP — oligomycin sensitivity conferring protein, białko nadające enzymowi wrażliwość na oligomycynę, biorące udział w wiązaniu obu jego sektorów;  $F_B$  — białko zawierające czynne grupy SH związane z sektorem błonowym enzymu; DCCD —  $N,N'$ -dwucykloheksylkarbodwuimid, inhibitor enzymu;  $\Delta\mu_{H^+}$  — transmembranowy elektrochemiczny potencjał protonowy.

## I. Wstęp

ATPazy transportujące protony syntetyzują ATP na koszt transmembranowego elektrochemicznego potencjału protonowego,  $\Delta\mu_{H^+}$  (1, 2), utworzonego przez oksydoredukcyjne pompy protonowe, funkcjonujące w łańcuchu oddechowym. Występują one w mitochondriach, chloroplastach i bakteriach. Wiadomości o mechanizmie sprzężenia energetycznego między procesami utleniania a syntezą ATP czytelnik polski może znaleźć w artykule opublikowanym w tomie 31 *Postępów Biochemii* (3).

ATPaza transportująca protony jest kluczowym enzymem w bioenergetyce komórki. Wiedza o jej strukturze czwartorzędowej oraz o usytuowaniu enzymu w błonie jest starsza niż wiedza o jego funkcji. Badania nad ATPazą rozwinęły się po wykryciu przez Fernandez-Morana trzyczęściowej struktury białkowej w błonie mitochondrialnej (4). Struktura ta została wykryta metodą mikroskopii elektronowej z zastosowaniem techniki barwienia negatywowego i zidentyfikowana później jako ATPaza. Odkrycie to było jednym z pierwszych wielkich sukcesów zastosowania techniki barwienia negatywowego.

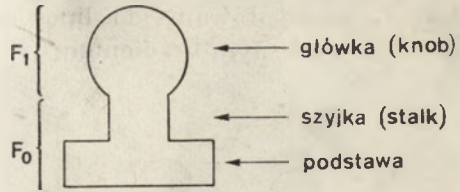
Kompleksy enzymatyczne ATPaz transportujących protony są zbudowane w dwóch sektorów (porównaj z ryciną 1). Sektora będącego integralnym składnikiem wewnętrznej błony mitochondrialnej ( $F_0$ )\* oraz sektora łatwo dysocjującego z błony, a pełniącego funkcję katalityczną

\*) Symbol „F” stosowany do oznaczania białek wchodzących w skład kompleksu ATPazy jest pierwszą literą słowa faktor (czynnik). Literą tą, opatrywaną bądź kolejnymi cyframi arabskimi ( $F_1$ ,  $F_6$ ) bądź kolejnymi literami alfabetu łacińskiego ( $F_B$ ), oznaczano w latach 60-tych odkrywane kolejno białka pełniące funkcje sprzęgające oksydacyjną fosforylację. Obecnie kiedy budowa enzymu została poznana ma to znaczenie historyczne a stosowanie tych symboli jest dyktowane tradycją oraz brakiem słownictwa wyrażającego właściwe funkcje tych białek w kompleksie enzymatycznym.

w kompleksie ( $F_1$ ). Stąd w piśmiennictwie często spotykamy nazwę ATPaza  $F_0$ - $F_1$ . ATPaza  $F_0$ - $F_1$  jest enzymem o cząsteczce znacznie spolaryzowanej na dwie domeny hydrofilową i hydrofobową. W wyniku

Ryc. 1. Ogólny schemat budowy ATPazy  $F_0$ - $F_1$ .

Element strukturalny tworzący „szyjkę” (*stalk*) kompleksu łączy dwa sektory enzymu.



współpracy między grupami Rackera, Chancea i Parsonsa (5) oraz grupą specjalistów mikroskopii elektronowej ustalono, że „główka” (*knob*) kompleksu jest czynnikiem  $F_1$ , sprzęgającym oksydacyjną fosforylację. Czynniki ten, oddzielony od reszty kompleksu jest zdolny do hydrolizy ATP. Późniejsze badania przy pomocy mikroskopii elektronowej izolowanego enzymu potwierdziły sugestię, że trzyczęściowa struktura obserwowana przez Fernandez-Morana jest kompleksem ATPazy,  $F_0$ - $F_1$  (6).

Badania nad kompleksem enzymatycznym ATPazy ułatwia rozpuszczalność  $F_1$  w roztworach wodnych. Oba sektory kompleksu mogą być w sposób prosty oddzielone od siebie a funkcje ich badane niezależnie. Do wyjaśnienia struktury i funkcji enzymu w największej mierze przyczyniły się (i przyczyniają) badania chemicznej modyfikacji jego podjednostek, immunologicznej inaktywacji oraz analizy genetycznej.

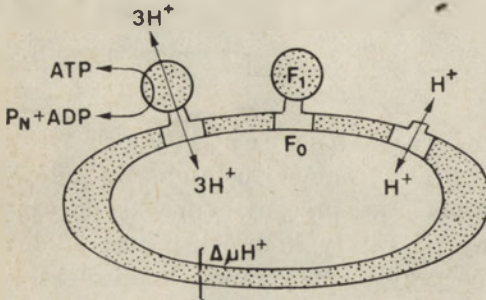
Sektor hydrofobowy kompleksu pozostający w błonie po usunięciu  $F_1$  przyjęto oznaczać symbolem  $F_0$  od nazwy inhibitora oksydacyjnej fosforylacji, antybiotyku oligomycyny, wiążącego się z tym sektorem kompleksu. Sektor  $F_0$  jest często fenomenologicznie opisywany jako kanał protonowy.

## II. Struktura i funkcja sektora błonowego $F_0$

Według teorii chemiosmotycznej oksydacyjna fosforylacja w mitochondriach jest katalizowana przez sekwencję enzymów pompujących protony. Utlenienie substratów w łańcuchu oddechowym powoduje elektrogenną translację protonów z matriks mitochondrialnej. Wyrzucone protony powracają następnie do matriks *via* ATPaza  $F_0$ - $F_1$  aktywując syntezę ATP. Obecnie przyjmuje się, że w tym procesie sektor  $F_0$  kompleksu pełni rolę kanału przepływowego dla protonów. Świadczą o tym obserwacje wzrostu przewodnictwa protonowego błony po usunięciu  $F_1$ , które przejawia się spadkiem  $\Delta\mu_{H^+}$  (7—9). Wzrost przepuszczalności błony w stosunku do protonów jest hamowany przez inhibitory ATPazy wią-

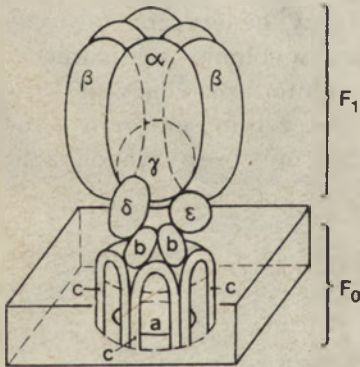


żące się z sektorem  $F_0$  kompleksu (10). Wiele dowodów potwierdzających protonoforetyczną funkcję sektora  $F_0$  dostarczyły badania mutantów bakteryjnych, w których wiązanie  $F_1$  było upośledzone. Mutanty te charakteryzowały się wysokim przewodnictwem protonowym (11—13). Sektor  $F_0$  inkorporowany do liposomów przenosi protony zgodnie z ich elektrochemicznym gradientem (9, 15, 16).



Ryc. 2. Mechanizm działania ATPazy  $F_0$ - $F_1$ . Po prawej stronie ryciny kanał protonowy  $F_0$ ; po lewej schemat hydrolizy i syntezy ATP.

Na rycinie 2 przedstawiono schemat mechanizmu funkcjonowania ATPazy oraz kanału protonowego. Enzym wbudowany do liposomu przekształca energię protonowego potencjału elektrochemicznego. Sektor  $F_0$  bez  $F_1$  jest kanałem protonowym, przez który protony przepływają swobodnie.



Ryc. 3. Organizacja podjednostek białkowych ATPazy  $F_0$ - $F_1$ .

Stosunek liczbowy podjednostek oparto na badaniach enzymu bakterii termofilowych (14)  $\alpha:\beta:\gamma:\delta:\epsilon:a:b:c = 3:3:1:1:1:2:6$ .

$F_0$  jest zanurzony w dwuwarstwie fosfolipidowej błony. Podjednostki  $c$  mają charakterystyczny kształt szpilek do włosów.

Na rycinie 3 przedstawiono hipotetyczny schemat budowy najlepiej poznanego kompleksu  $F_0$ - $F_1$  z organizmów prokariotycznych (14).

Wiele danych eksperymentalnych wskazuje, że zgodnie z modelem przedstawionym na rycinie zbudowane są wszystkie kompleksy ATPazy  $F_0$ - $F_1$  izolowanych z różnych organizmów prokariotycznych i eukariotycznych. Sektor  $F_0$  kompleksu zbudowany jest z trzech podstawowych typów podjednostek białkowych  $a$ ,  $b$ ,  $c$  pozostających w błonie w stosunku liczbowym  $1a:2b:6-10c$ . Liczba podjednostek typu  $c$  różni się



w zależności od źródła, z którego enzym został wyizolowany. ATPaza mitochondriów zwierzęcych zawiera trzy dodatkowe podjednostki białkowe w sektorze  $F_0$  enzymu, czynnik  $F_s$  (17) i  $F_B$  (18, 19) oraz nadający enzymowi wrażliwość na oligomycynę polipeptyd OSCP (*oligomycin sensitivity conferring protein*) (20). Te trzy polipeptydy tworzą prawdopodobnie „szyjkę” (*stalk*) trzyczęściowej struktury białkowej wykrytej metodą mikroskopii elektronowej (Ryc. 1) przez Fernandez-Morana (4). Sektor  $F_1$  enzymu zbudowany jest z pięciu różnych polipeptydów oznaczonych w piśmiennictwie kolejnymi literami greckiego alfabety ( $\alpha, \beta, \gamma, \delta, \epsilon$ ). W mitochondriach zwierzęcych w sektorze  $F_1$  występuje dodatkowy polipeptyd będący inhibitorem enzymu (21, 22).

Mimo znacznego postępu w badaniach struktury kompleksu enzymatycznego ATPazy mechanizm funkcjonowania kanału protonowego jest wciąż daleki od zrozumienia. Badania w tej dziedzinie są prowadzone w dwóch podstawowych kierunkach, mechanizmu wiązania  $F_0$  z sektorem katalitycznym  $F_1$  oraz mechanizmu translokacji protonów.

## II-1. Wiązanie katalitycznego sektora $F_1$ z $F_0$

### II-1.1. Prokarionty

Jest rzeczą znaną, że jedna cząsteczka  $F_0$  jest zdolna do wiązania tylko jednej cząsteczki  $F_1$  także u prokariontów. W procesie wiązania obu sektorów główną rolę pełni podjednostka białkowa typu **b** (porównaj z ryciną 3). Charakteryzuje się ona szczególną budową. Jest bowiem polipeptydem amfifilowym zawierającym sekwencję aminokwasów o właściwościach skrajnie hydrofobowych w końcu N cząsteczki. Segment ten prawdopodobnie tkwi głęboko w dwuwarstwie lipidowej błony (23). Reszta hydrofilowa cząsteczki reaguje z polipeptydami  $\delta$  i  $\epsilon$  należącymi do sektora  $F_1$  kompleksu. Region hydrofobowy cząsteczki tworzy pojedynczy transmembranowy  $\alpha$ -heliks, który kontaktuje się z podjednostkami typu **a** i **c** sektora  $F_0$ . Region hydrofilowy zawiera dwa przylegające do siebie obszary zbudowane z 31 aminokwasów tworzących  $\alpha$ -heliksy. One właśnie kontaktują się z podjednostkami  $\delta$  i  $\epsilon$  sektora  $F_1$  kompleksu tworząc „nóżkę” trzyczęściowej jednostki białkowej. Wiązanie polipeptydu **b** z podjednostkami  $\delta$  i  $\epsilon$   $F_1$  polega prawdopodobnie na interakcji typu heliks-heliks (23, 24). Przypuszcza się, że istotną rolę w tym procesie pełnią atomy magnezu tworząc mosty kationowe między resztami kwasowymi polipeptydu **b** a podjednostkami  $\delta$  i  $\epsilon$  sektora  $F_1$  (24). Polipeptyd **b** prawdopodobnie występuje w błonie w postaci dimeru (Ryc. 3). Zajmuje on centralną pozycję w kompleksie ATPazy i odpowiada za strukturalne powiązanie obu sektorów kompleksu  $F_1$  i  $F_0$ . Zajmując tę pozycję musi on odgrywać szczególną rolę w mechanizmie translokacji protonów przez błonę. Przypuszczenia te potwierdzają doświadczenia

z mutantami bakteryjnymi o upośledzonej syntezie polipeptydu typu b. Mutanty te charakteryzują się drastycznie obniżoną szybkością translokacji protonów (11). Tak znaczny postęp znajomości struktury polipeptydu b sektora  $F_0$  zawdzięczamy w znacznej mierze zastosowaniu programu komputerowego HYDROPLOT (25, 26), dzięki któremu można było wyznaczyć segmenty hydrofobowe polipeptydów (23).

Struktura i funkcja podjednostki białkowej typu a jest mniej jasna. Zastosowanie programu komputerowego do badań tego polipeptydu wykazało, że polipeptyd z *E.coli* zawiera 7 różnych hydrofobowych regionów (26). Większość z nich ma odpowiedniki w błonie mitochondriów zwierzęcych. Trzy z nich mogą tworzyć transmembranowe  $\alpha$ -heliksy. Prawdopodobnie polipeptyd typu a pełni rolę strukturalną w kompleksie. Potwierdzają to doświadczenia przeprowadzone na bakteriach termofilowych, w których usunięto ten polipeptyd (27). Preparaty  $F_0$  z tych bakterii zachowywały funkcję protonoforetyczną. Podjednostki białkowe typu c z sektora  $F_0$  są proteolipidami. Pełnią one prawdopodobnie zasadniczą rolę w mechanizmie translokacji protonów. Ich budowa i funkcja zostaną omówione w rozdziale o mechanizmie przepływu protonów.

#### II-1.2. Mitochondria

W mitochondriach zwierzęcych conajmniej dwa polipeptydy biorą udział w wiązaniu  $F_1$  i  $F_0$ . Należą do nich wspomniany już polipeptyd OSCP charakteryzujący się wydłużonym kształtem cząsteczki (28) oraz polipeptyd  $F_6$  znany jako jeden z czynników sprzęgających oksydacyjną fosforylację (29). Oba polipeptydy zostały wyizolowane i oczyszczone. Czynniki  $F_6$  jest związany z sektorem  $F_0$  i jest prawdopodobnie potrzebny do wiązania OSCP z tym sektorem (30). Istnieją też dane, że czynniki  $F_6$  pełni w procesie wiązania obu sektorów istotną funkcję, podczas gdy OSCP zwiększa powinowactwo wiązania  $F_6$  z sektorem  $F_1$  kompleksu (31). Potwierdzają to dane o wiązaniu tego polipeptydu z cząstkami submitochondrialnymi zubożonymi zarówno w  $F_1$ , jak i w OSCP oraz  $F_6$ .

Niedawno oznaczono pełną sekwencję aminokwasów w polipeptydzie  $F_6$ . Zawiera on 76 reszt aminokwasowych i powtarzające się sekwencje w regionie środkowym cząsteczki. Stwierdzono, że koniec N cząsteczki jest homologiczny wobec końca C podjednostki typu c *E.coli* (32). Homologię sekwencji aminokwasowych stwierdzono też między czynnikiem  $F_6$  a naturalnym inhibitorem enzymu (33). Obecnie wiadomo, że oczyszczony polipeptyd OSCP tworzy trwały kompleks z wyizolowanym  $F_1$  wiążąc się prawdopodobnie z podjednostkami  $\alpha$ . Tak powstały kompleks nadaje wrażliwość na oligomycynę cząsteczkom submitochondrialnym pozbawionym  $F_1$  i OSCP (34). Z danych zawartych w piśmiennictwie wynika, że pozycja OSCP w cząsteczce nie jest jeszcze precy-



zyjnie ustalona. Z przedstawionych przez Gautheron i wsp. (35) wyników widać, że stosunek liczbowy OSCP do  $F_1$  równa się 2:3. Ostatnie dane opublikowane przez Dupuis i wsp. (36, 37) uzyskane dzięki zastosowaniu światłoczułej pochodnej azydkowej OSCP, świadczą o jego reakcji nie tylko z podjednostką  $\alpha$  lecz także z podjednostką  $\beta$  w sektorze  $F_1$ . Dane Archinarda i wsp. (38) uzyskane dzięki zastosowaniu przeciwciał OSCP wskazują, że lokalizacja OSCP jest raczej peryferyjna. Być może wiąże się on także z podjednostką  $\gamma$  sektora  $F_1$ . Wiązanie OSCP z polipeptydem  $\alpha$  potwierdzają doświadczenia z proteolizą tego polipeptydu. Poddanie częściowej proteolizie podjednostki białkowej wywołuje obniżenie zdolności wiązania OSCP z  $F_1$  (39). Możliwe, że OSCP wraz z czynnikiem  $F_6$  pełnią równorzędną rolę strukturalną biorąc udział w wiązaniu obu sektorów enzymu i tworząc jego szyjkę (40) (porównaj z ryciną 1). Polipeptyd OSCP jest obecnie jednym z najlepiej poznanych białek kompleksu enzymatycznego ATPazy  $F_0$ - $F_1$ . Dzięki pracom Ovchinnikova i Ernster'a (41, 42) znana jest jego pełna sekwencja aminokwasów. Zawiera on 190 aminokwasów. W obu końcowych sekwencjach obserwuje się znaczne zagęszczenie aminokwasów obdarzonych ładunkiem elektrycznym nadającym tym regionom cząsteczki właściwości hydrofilowe. Region centralny cząsteczki ma charakter hydrofobowy. Porównanie sekwencji aminokwasów OSCP z sekwencją polipeptydu  $\delta$  sektora  $F_1$  *E.coli* wskazuje na strukturalną homologię obu końcowych regionów cząsteczki, a także obszaru centralnego (41, 43). Sugeruje to, że OSCP jest funkcjonalnym odpowiednikiem podjednostki  $\delta$  prokariotów. Podobną homologię obserwuje się między budową OSCP a budową polipeptydu typu **b** *E.coli* (41). Wysłnięto sugestię o podobieństwie nie tylko struktury, lecz i funkcji OSCP i podjednostki typu **b** prokariotów (41, 44). OSCP zawiera prawdopodobnie strukturalne elementy obu podjednostek  $\delta$  i **b** prokariotów (45, 46). Koniec N cząsteczki OSCP jest bardziej hydrofobowy niż odpowiadający mu segment podjednostki  $\delta$ . Prawdopodobnie tym właśnie końcem polipeptyd OSCP jest związany z błoną. Tym też można tłumaczyć fakt, że podczas usuwania  $F_1$  z błony OSCP pozostaje z nią związany podczas gdy podjednostka  $\delta$  *E.coli* dysocjuje wraz z całym kompleksem  $F_1$  (47). Wiązanie  $F_1$  z sektorem błonowym w błonach zubożonych w  $F_1$  wymaga też obecności dwu- i jednowartościowych kationów (48). Rola ich prawdopodobnie polega na neutralizacji ujemnego ładunku powierzchniowego błony. Dane Sandri i wsp. (49) sugerują, że  $F_6$  w obecności kationów jednowartościowych ( $\text{Cs}^+$ ,  $\text{Rb}^+$ ,  $\text{NH}_4^+$ )  $F_1$  wiąże się z cząsteczkami submitochondrialnymi zubożonymi w  $F_1$ , OSCP i  $F_6$  w takim samym stosunku liczbowym oraz w tym samym miejscu jak w enzymie natywnym.

Na szczególną uwagę zasługuje wykrycie homologii między powtarzającymi się sekwencjami aminokwasowymi w OSCP i translokazie

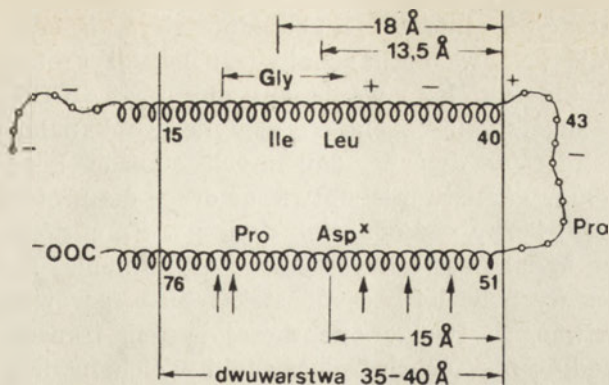


nukleotydów adeninowych (42, 50). W skład kompleksu  $F_0$  mitochondriów wchodzi prawdopodobnie jeszcze jeden polipeptyd oznaczany w piśmiennictwie symbolem  $F_B$  (18, 19) opisany jako czynnik sprzęgający fosforylację oksydacyjną. Jest on ściśle związany z błoną, z której nie ekstrahuje się nawet w obecności detergentu. Częsteczka  $F_B$  zawiera sekwencje aminokwasów o wysokiej hydrobowości oraz funkcjonalnie aktywne grupy sulfhydrylowe (51). Przypuszcza się, że  $F_B$  jest analogiem podjednostki białkowej typu b prokariotów. W piśmiennictwie zawarte są sugestie, że bierze on udział w mechanizmie translokacji protonów (19, 51). Zubożenie enzymu w czynnik  $F_B$  powoduje zahamowanie wymiany między atomami fosforu w fosforanie nieorganicznym i ATP będącej reakcją cząstkową oksydacyjnej fosforylacji (52). Świadczy to również o bliskim powiązaniu funkcjonalnym tego polipeptydu z  $F_1$ .

## II-2. Mechanizm translokacji protonów

Zastosowanie inhibitora N,N'-dwucykloheksylkarbodwuimidu, DCCD, w badaniach ATPazy  $F_0$ - $F_1$  przyniosło wiele istotnych informacji o strukturze i funkcji enzymu (53). Przede wszystkim przyczyniło się do identyfikacji i charakterystyki najbardziej hydrofobowej podjednostki c sektora błonowego. Lipofilowy DCCD łatwo przechodzi przez błonę i reaguje kowalencyjnie z grupami karboksylowymi kwasu asparaginowego lub glutaminowego (54, 55) należącymi do niskocząsteczkowego proteolipidu (m.c. 6500—8000). Podobne proteolipidy znaleziono w mitochondriach, w chloroplastach i bakteriach oraz zidentyfikowano jako podjednostkę typu c enzymu. Z tymi samymi proteolipidami wiąże się niekowalencyjnie także, klasyczny już inhibitor enzymu, antybiotyk oligomycyna (56). Izolowany proteolipid wbudowany do liposomów powoduje wzrost przepuszczalności pęcherzyków w stosunku do protonów. To przewodnictwo protonowe proteoliposomu jest hamowane przez DCCD (57). Badacze z grupy K a g a w y zmierzili szybkość translokacji protonów przez kanał  $F_0$  w proteoliposomie. Wynosi ona 31  $\mu\text{g}$  jonu na min na mg  $F_0$  ( $V_{\text{max}}$ ) i jest proporcjonalna do  $\Delta\mu_{\text{H}^+}$  (58). Porównanie 5 homologicznych proteolipidów wiążących DCCD izolowanych z różnych źródeł (drożdże, *E.coli*, serce byka, *N.crassa*, szpinak) wykazało, że wiele z tych białek jest zbudowane z dwóch skrajnie hydrofobowych równoległych sekwencji aminokwasowych przedzielonych segmentem o właściwościach hydrofilowych. Nadaje to cząsteczce charakterystyczny kształt szpilki do włosów (59). Hipotezę struktury drugo- i trzeciorzędowej proteolipidu c z *E.coli* przedstawia rycina 4.

Segmenty hydrofobowe cząsteczki są utworzone z dwóch transmembranowych  $\alpha$ -heliksów połączonych segmentem hydrofilowym. Sekwencje aminokwasów w segmencie polarnym cząsteczki proteolipidu są identyczne w porównywanych preparatach kompleksu  $F_0$  izolowanego z róż-



Ryc. 4. Przepuszczalna drugo- i trzeciorzędowa struktura podjednostki białkowej c prokariotów (59).

Efekty mutacji w pozycjach 28, 31, 61 i 64 dyskutowane w tekście. Strzałkami oznaczono mutacje w *N. crassa* lub *S. cerevisiae*, które nadają  $F_0$  odporność na oligomycynę. Symbolem x oznaczono kwas asparaginowy, którego grupa karboksylowa wiąże DCCD powodując hamowanie translokacji  $H^+$ .

nych źródeł. Natomiast sekwencje aminokwasowe końca C i N różnią się. W głębi hydrofobowej domeny położonej w dwuwarstwie fosfolipidowej znajduje się kwas asparaginowy ( $Asp_{61}$ ) oznaczony na rycinie 4 symbolem x. Grupa karboksylowa tego aminokwasu reaguje z DCCD i prawdopodobnie pełni istotną funkcję w mechanizmie translokacji protonów w kanale  $F_0$ . Należy wspomnieć, że kwas asparaginowy został także wykryty w domenie hydrofobowej podjednostki III oksydazy cytochromowej w sekwencji aminokwasów homologicznej wobec sekwencji aminokwasów w proteolipidzie *E.coli* (60). W szczepach mutantów *E.coli*, w których  $Asp_{61}$  został wymieniony na inny aminokwas, translokacja protonów nie zachodzi (61, 62). Preparaty  $F_0-F_1$  izolowane z tych bakterii nie reagują z DCCD. Eksperymenty te są głównym dowodem świadczącym o udziale w mechanizmie translokacji protonów grup karboksylowych położonych w hydrofobowej domenie błony. Istnieją też dane, że znajdująca się w środkowym obszarze drugiego segmentu hydrofobowego proteolipidu izoleucyna (porównaj z ryciną 4) bierze udział w niekonwalencyjnym wiązaniu DCCD (33). Wiązanie to jest prawdopodobnie jednym ze stadiów (poprzedzającym kowalencyjne wiązanie z grupą karboksylową) wiązania DCCD przez proteolipid. Na Ryc. 4 strzałkami zaznaczono przypuszczalne miejsca wiązania oligomycyny. Leżą one w pobliżu miejsc wiążących DCCD. Hamowanie enzymu przez oligomycynę i DCCD nie jest addytywne. Oznacza to, że inhibitory te wiążą się z  $F_0$  w miejscach odmiennych. Stosunek molowy oligomycyny i  $F_0$  sugeruje, że białko wiążące inhibitor jest monomerem (63).

Mechanizm hamowania translokacji protonów przez oligomycynę u bakterii polega prawdopodobnie na osłanianiu reszt karboksylowych kwasu asparaginowego bądź glutaminowego przed protonami (59). Na-



leży przypuszczać, że interakcje podjednostek a, b oraz proteolipidu także odgrywają rolę w mechanizmie translokacji protonów. Na podstawie analizy kinetyki hamowania enzymu przez DCCD Kopecky i wsp. (64) sugerowali obecność pojedynczego kanału protonowego, który miał istnieć w dwóch odmiennych stanach konformacyjnych. Zmiana konformacji kanału miała otwierać drogę dla protonów. Obecność sześciu i większej liczby podjednostek typu c w  $F_0$ , z których każda mogłaby zawierać kanał protonowy wymaga wyjaśnienia. Znaczna w stosunku do pozostałych liczba podjednostek typu c (porównaj z ryciną 3) pozwala oczekiwać, że tworzą one raczej system transmembranowych  $\alpha$ -heliksów. Według niektórych badaczy taki wielohelikalny system może tworzyć łańcuchy wiązań  $H^+$  (65—67). Hipotezy te są jednakże zbyt uproszczone i ogólnikowe. Wydaje się, że ostateczne rozwiązanie zagadki mechanizmu translokacji protonów przez sektor  $F_0$  enzymu mogą przynieść badania interakcji grup  $COO^-$  z protonami w hydrofobowych obszarach błony (w dwuwarstwach lipidowych).

Charakterystyka przewodnictwa protonowego przez kanał  $F_0$  wymaga między innymi oznaczenia zależności szybkości przepływu protonów od wartości potencjału transmembranowego. W nienaruszonych sprzężonych mitochondriach zależność ta nie może być badana ponieważ w nieobecności ADP sektor  $F_0$  w połączeniu z  $F_1$  tworzą układ zamknięty dla protonów. Dlatego też w badaniach tego typu stosuje się proteoliposomy ( $F_0$  wbudowany do liposomu) lub innego rodzaju sztuczne błony (68). Innym podejściem eksperymentalnym w badaniach przewodnictwa protonowego kanału  $F_0$  *in situ* są doświadczenia prowadzone na cząstkach submitochondrialnych pozbawionych sektora  $F_1$ . Stosując takie podejście wykazano niedawno, że oddychające cząstki submitochondrialne pozbawione  $F_1$  generują niski potencjał transmembranowy (115—140 mV). Potencjał ten wzrasta o 40 mV po dodaniu oligomycyny. Obniżenie potencjału transmembranowego jest konsekwencją powrotnego przepływu protonów przez otwarte kanały protonowe enzymu (69). Wymienione badania sugerują też, że istnieje wartość progowa potencjału, poniżej której kanał  $F_0$  nie funkcjonuje.

W mitochondriach zwierzęcych istotną rolę w mechanizmie translokacji protonów przypisuje się grupom sulfhydrylowym omówionego już polipeptydu  $F_B$  (18, 19). Modyfikacja tych grup przez  $Cd^{++}$  lub ich utlenienie powoduje zahamowanie translokacji protonów przez kanał. Wykazują to doświadczenia przeprowadzone na proteoliposomach zawierających oczyszczony enzym serca wołu. Blokowanie grup SH podczas energizacji błony przez ATP powoduje spadek  $\Delta\mu_{H^+}$ . Efekt ten jest odwracany przez dwutiotreitol (20). Modyfikacja grup SH powoduje też hamowanie pasywnego transportu protonów w proteoliposomach zawierających  $F_0$ . Podczas elektroforezy kompleksu  $F_0$  znakowanego  $^{115}Cd^{++}$  obserwuje się jedno pasmo białka zawierającego izotop  $Cd^{++}$ , ciężar



cząsteczkowy którego odpowiada czynnikowi  $F_B$  (18). Na podstawie przytoczonych wyników można wnioskować, że polipeptyd  $F_B$  stanowi integralną komponentę kanału protonowego w sektorze  $F_0$  enzymu mitochondrialnego.

W bakteriach podjednostka typu b będąca analogiem polipeptydu  $F_B$  wraz z proteolipidem c stanowią prawdopodobnie podobny system translokujący protony w sektorze  $F_0$  enzymu.

### III. Struktura i funkcja sektora katalitycznego ATPazy

Sektor katalityczny  $F_1$  ATPazy (m.cz. 375) jest zbudowany z podjednostek białkowych pięciu typów (porównaj z ryciną 3). Wszystkie te podjednostki zostały wyizolowane i oczyszczone (70). Trzy z nich największe  $\alpha$  (m.cz. 50.9),  $\beta$  (m.cz. 48.0)  $\gamma$  (m.cz. 27.2) występują u wszystkich organizmów prokariotycznych i eukariotycznych (2, 58, 71—74). Istnieje wiele danych świadczących o tym, że występują one w cząsteczce enzymu w następujących stosunku liczbowym.  $3\alpha:3\beta:1\gamma:1\delta:1\epsilon$  (70,74—76). Znaczną część masy cząsteczki enzymu stanowią zatem podjednostki  $\alpha$ ,  $\beta$  i  $\gamma$  i właśnie zawierający je region  $F_1$  wykazuje właściwości ATPazy.

Izolowany kompleks białkowy  $F_1$  jest zdolny do katalizowania hydrolizy ATP. Dlatego też w piśmiennictwie opisywany jest jako ATPaza. Obserwowane są uderzające podobieństwa struktury, właściwości i funkcji  $F_1$  różnego pochodzenia. Sugerują one, że także mechanizmy ich działania będą bądź podobne, bądź identyczne. Podjednostki kompleksu  $F_0$ - $F_1$  w komórkach eukariontów są kodowane częściowo przez geny jądrowe, a częściowo przez mitochondrialne. Geny te zapewne skutecznie opierały się procesowi ewolucji, skoro zarówno w sektorze  $F_0$  jak i w  $F_1$  ATPazy mitochondrialnej różnych gatunków obserwuje się wiele homologicznych sekwencji aminokwasowych. Zwłaszcza podjednostki białkowe enzymu  $\alpha$  i  $\beta$  wykazują znaczną homologię. Zapewne dlatego, że pełnią one centralną funkcję katalityczną w syntezie ATP, który jest uniwersalnym źródłem energii w świecie organizmów żywych.

Oprócz pięciu wymienionych polipeptydów sektor  $F_1$  enzymu mitochondrialnego zawiera polipeptyd łatwo dysocjujący z kompleksu, grający rolę naturalnego inhibitora enzymu (21, 77). Inhibitor ten wiąże się w sposób odwracalny z  $F_1$ . Pełni on prawdopodobnie funkcję regulacyjną podczas hydrolizy i syntezy ATP (78—80).

Wydaje się, że nagromadzono dostateczną liczbę danych wskazujących, że podjednostki białkowe  $\alpha$  i  $\beta$  występują w kompleksie  $F_1$  w trzech kopiach. Przemienne położenie tych polipeptydów tworzących heksagonalny układ wydaje się najbardziej prawdopodobne. Świadczą o tym pośrednio dane uzyskane dzięki zastosowaniu podejścia eksperymentalnego polegającego na sieciowaniu podjednostek białkowych (58, 81, 82). Heksagonalne usytuowanie podjednostek  $\alpha$  i  $\beta$  obserwowano podczas badań

struktury  $F_1$ , z zastosowaniem metody niskokątowego rozproszenia promieni X (83). Taki kształt położenia w cząsteczce  $F_1$  podjednostek  $\alpha$  i  $\beta$  może być, zdaniem specjalistów, interpretowany jako układ trzech polipeptydów  $\alpha$  i trzech polipeptydów  $\beta$ , otaczających kompleks zbudowany z podjednostek  $\gamma$ ,  $\delta$  i  $\epsilon$ . Potwierdzają to najnowsze dane prezentowane przez Schäfera (84). Dane tego autora uzyskane dzięki zastosowaniu monoklonalnych przeciwciał podjednostki  $\alpha$  potwierdzają też stochiometrię podjednostek  $F_1$ ,  $3\alpha:3\beta:1\gamma:1\delta:1\epsilon$ . Przeprowadzone przez Amzela i wsp. (85) badania ugięcia promieni X przez pojedynczy kryształ  $F_1$  wskazują na obecność trzech mas w cząsteczce enzymu. Dwie z nich powinny zawierać dwa polipeptydy  $\alpha$  i dwa polipeptydy  $\beta$  lub ich kombinację; trzecia z nich — polipeptydy  $\alpha$  i  $\beta$  oraz małe podjednostki ( $\gamma$ ,  $\delta$ ,  $\epsilon$ ). Dane te sugerują, że struktura przemiennego położenia podjednostek  $\alpha$  i  $\beta$  może nie być prawdziwa. Ponadto wykazują one, że pary  $\alpha$  i  $\beta$  podjednostek enzymu nie są strukturalnie równoważne.

### III-1. Mechanizm syntezy i hydrolizy ATP

#### III-1.1. Centrum katalityczne ATPazy $F_0$ - $F_1$

Synteza i hydroliza ATP katalizowane przez ATPazę  $F_0$ - $F_1$ , podobnie jak inne procesy enzymatyczne przebiegają w trzech stadiach. Stadium wiązania substratu, stadium katalityczne oraz stadium usuwania produktu. Przeważająca większość publikowanych prac dotyczących struktury i funkcjonowania centrum katalitycznego enzymu skupia uwagę na stadium wiązania substratu. Badania z zastosowaniem analogów nukleotydów adeninowych wykazały, że w cząsteczce enzymu istnieje sześć miejsc ich wiązania (86). Znajdują się one w dwu największych polipeptydach kompleksu  $\alpha$  i  $\beta$  (86). Badania wiązania światłoczułych analogów ATP (87, 88) i pochodnych alkylowych nukleotydu (89, 90) świadczą o modyfikacji podjednostek  $\beta$  pod wpływem tych analogów. Ważkie informacje uzyskano też dzięki badaniom rekonstytucji kompleksu  $F_1$  z izolowanych podjednostek. Wykazały one, że tylko kompleksy zawierające podjednostkę  $\beta$  są zdolne do hydrolizy ATP (91). Na podstawie tych danych wnioskowano, że centra katalityczne enzymu znajdują się w podjednostkach  $\beta$ . Nukleotydy adeninowe związane są w tych centrach luźno i mogą ze znaczną szybkością wymieniać się z nukleotydami środowiska. W przeciwieństwie do podjednostek  $\beta$ , podjednostki  $\alpha$  zawierają miejsca ścisłego wiązania nukleotydów. Nukleotydy związane niekonwalencyjnie w podjednostkach  $\alpha$  mogą wymieniać się z nukleotydami środowiska z szybkością nieznaczną. Rola tych ściśle związanych nukleotydów nie jest jasna. Niektórzy autorzy (58) przypisują im funkcję strukturalną, podobną do funkcji atomów metali wbudowanych w cząsteczki niektórych enzymów. Nie jest też pewne czy ATP i ADP wiążą się z podjednostkami  $\alpha$  *in vivo*. W ostatnich latach ukazały się w piśmien-



nictwie doniesienia, że niektóre analogi ATP, które w warunkach przeprowadzanych eksperymentów powinny wiązać się z miejscami w podjednostkach  $\beta$  łatwo wymieniającymi nukleotydy z otoczeniem, wiążą się także z podjednostkami  $\alpha$  (92). Dane dotyczące wiązania nukleotydów czytelnik może znaleźć w obszernym artykule przeglądowym Harrisa (93). Proponowane obecnie mechanizmy katalizy zakładają, że centra katalityczne enzymu są tworzone zarówno przez podjednostki  $\beta$  jak i  $\alpha$  w specyficznych miejscach ich kontaktu. Sugerują to wyniki doświadczeń polegających na sieciowaniu podjednostek białkowych  $\alpha$  i  $\beta$  (81). Na podstawie wyników uzyskanych w doświadczeniach z inhibitorami ATPazy (58, 94) sugerowano, że polipeptydy  $\beta$  zawierają specyficzne centra odpowiedzialne za konformacyjną interakcję podjednostka-podjednostka wymaganą do uformowania centrum katalitycznego enzymu. Badania krystalograficzne trzeciorzędowej struktury polipeptydu  $\beta$  wykazały, że białko to zawiera charakterystyczny zmienny układ  $\alpha$ -heliksów oraz struktur  $\beta$  położonych przemiennie i tworzących zwartą strukturę zwany fałdą Rossmanna (95). Układ ten występuje w wielu enzymach zawierających centra wiązania nukleotydów adeninowych. Inhibitor enzymu, światłoczuły analog ATP 8-azydo-ATP, modyfikuje trzy reszty aminokwasowe w tym regionie cząsteczki podjednostki  $\beta$ . Fakt ten sugeruje, że właśnie fałda Rossmanna stanowi fragment centrum katalitycznego w podjednostce  $\beta$ . Jednakże podjednostki  $\alpha$  wiążące nukleotydy adeninowe i prawdopodobnie współdziałające w formowaniu centrum katalitycznego nie zawierają fałdy Rossmanna. Podjednostki  $\alpha$  i  $\beta$  zawierają sekwencje aminokwasowe homologiczne z wieloma białkami wiążącymi nukleotydy adeninowe. Na przykład sekwencje Glu-Gly- Leu- Ala- podjednostek  $\alpha$  eurokariontów znaleziono w syntetazie alanylo- i tyrozylo-t-RNA, sekwencje charakterystyczne dla podjednostek  $\beta$  w polimerazie RNA (71). Znaczną homologię obserwowano między podjednostką  $\beta$ ,  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPazą, translokazą nukleotydów adeninowych, miokinazą, fosfofruktokinazą (96) oraz miozyną (97).

### III-1.2. Współdziałanie podjednostek w procesie katalitycznym

Obecność większej liczby podjednostek katalitycznych w enzymie nasuwa badaczom następujące pytanie: Czy pełnią one równoważne funkcje? Czy zachodzi ich wzajemne oddziaływanie podczas syntezy hydrolizy ATP?

Stosując inhibitor enzymu 4-chloro-7-nitrobenzofurazan, NbF-Cl, Ferguson i wsp. (98, 99) wykazali, że modyfikacja reszty tyrozynowej w jednej podjednostce  $\beta$  powoduje pełne hamowanie hydrolizy ATP. Adolfson i Moudrianakis (100) stwierdzili, że szybkość usuwania ADP związanego w centrum katalitycznym wzrastała po dodaniu nukleotydu do środowiska reakcji. Autorzy ci, wnioskowali, że wiąza-



nie nukleotydów w innym miejscu działa allosterycznie stymulując dysocjację nukleotydów w innym miejscu cząsteczki enzymu. Badacze z grupy Boyera (101—108) proponowali mechanizm syntezy i hydrolizy ATP uwzględniający współdziałanie podjednostek katalitycznych  $F_1$ . Uzyskane przez nich dane wskazywały, że wiązanie ADP i fosforanu nieorganicznego stymuluje usuwanie ATP z centrum katalitycznego podczas jego syntezy, a wiązanie ATP stymuluje usuwanie ADP i fosforanu podczas hydrolizy ATP. Mechanizm zaproponowany przez Boyera (106) opierał się na danych doświadczalnych uzyskanych w badaniach reakcji wymiany atomów tlenu między wodą a fosforanem nieorganicznym zachodzącej w centrum katalitycznym  $F_1$ . Badacze z grupy Boyera wykazali, że cząstki submitochondrialne katalizują wymiany tlenu dwóch typów: (1) wymianę, której ulega atom tlenu fosforanu uformowanego podczas hydrolizy ATP przed opuszczeniem centrum katalitycznego, t.j. wymianę na poziomie intermediatu (*intermediate exchange*) oraz (2) wymianę tlenu zachodzącą między fosforanem a wodą środowiska (*medium exchange*). Następujące fakty doświadczalne posłużyły autorom do sformułowania propozycji współdziałania podjednostek w procesie katalitycznym  $F_1$ :

a) usuwanie ADP z medium hamowało wymianę drugą, a także wymianę ATP- fosforan nieorganiczny w cząstkach submitochondrialnych. Oznacza to, że wiązanie ADP było niezbędne do usuwania ATP.

b) obniżanie koncentracji ATP podczas hydrolizy w cząstkach submitochondrialnych stymulowało inkorporację tlenu do utworzenia fosforanu. Oznacza to, że ADP i fosforan nie mogą być usuwane z jednego miejsca wiązania podczas gdy ATP pozostaje związany. Podobne wyniki uzyskano podczas badań z oczyszczonym enzymem.

c) w cząstkach submitochondrialnych usuwanie ATP ze środowiska hamowało wymianę tlenową  $H_2O$  — fosforan typu drugiego, podczas gdy wymiana na poziomie intermediatu miała miejsce. Oznacza to, że wiązanie ATP jest niezbędne do usuwania fosforanu.

d) obniżanie koncentracji ATP lub fosforanu podczas syntezy ATP w cząstkach submitochondrialnych znacznie stymulowało inkorporację atomu tlenu do ATP. Oznacza to, że wiązanie fosforanu i ADP w jednym z miejsc katalitycznych było niezbędne do usuwania ATP utworzonego w innym miejscu.

Według mechanizmu proponowanego przez grupę Boyera luźne wiązanie substratów w centrum katalitycznym w podjednostce  $\beta$  wywołuje zmianę konformacyjną, dzięki której substraty wiążą się ściśle z enzymem. Zmiana ta osłabia wiązanie produktu reakcji w innej podjednostce  $\beta$ , dzięki czemu może być on usuwany. Mechanizm zaproponowany przez Boyera wyjaśniał kontrowersyjne dane dotyczące pełnej inaktywacji enzymu podczas modyfikacji tylko jednej reszty amiokwasowej w cząsteczce  $F_1$  (109—113).

Na podstawie badań przebiegu katalizowanej przez  $F_1$  hydrolizy światłoczułej pochodnej azydkowej analogu ATP 3'-0-(4-benzoil) benzoil adenozyno-5-trójfosforanu piętnowanej  $^3\text{H}$  i  $^{32}\text{P}$  Williams i Coleman (114) zaproponowali inny mechanizm uwzględniający udział podjednostek  $\alpha$ . Zgodnie z ich hipotezą proces katalityczny hydrolizy ATP przebiega w trzech stadiach: 1) ATP wiąże się z podjednostką  $\beta$ , w której zachodzi proces hydrolizy ATP; 2) uwolniony ADP zostaje przeniesiony na podjednostkę  $\alpha$ , podczas gdy fosforan zostaje usunięty; 3) następną cząsteczką ATP wiąże się z podjednostką  $\beta$ . Wówczas zostaje usunięty ADP. W zaproponowanym schemacie miejsce wiązania ATP w podjednostce  $\beta$  jest przestrzennie zbliżone do miejsca wiązania ADP w podjednostce  $\alpha$ . Oba miejsca są miejscami ścisłego wiązania. Usuwanie ADP jest wynikiem destabilizacji związanego produktu reakcji dzięki obecności następnej cząsteczki substratu. Jest to mechanizm podobny do proponowanego przez Boyera, w którym allosteryczny wpływ usuwania produktu na wiązanie substratu zostaje zastąpiony bezpośrednią reakcją miejsce-miejsce (*site-to-site*). Prace nad wiązaniem analogów nukleotydów dostarczają bezpośrednich dowodów współdziałania podjednostek  $F_1$ . Stosując niektóre analogi Cross i Nalin (86) wykazali, że jedno z miejsc katalitycznych w  $F_1$  charakteryzuje się wysokim powinowactwem wiązania nukleotydów ( $K_d = 18 \mu\text{M}$ ). Pozostałe dwa miejsca mają powinowactwo wiązania znacznie niższe ( $K_d = 1 \mu\text{M}$ ). Zastosowanie innych analogów nukleotydów dało podobne wyniki (115, 116).

Z badań tego typu wynika, że współdziałanie centrów katalitycznych rozpatrywane jako proces wiązania nukleotydów jest negatywne. Innymi słowy, wiązanie nukleotydów w jednym z centrów katalitycznych osłabia ich wiązanie w pozostałych centrach. Negatywne współdziałanie podjednostek w oparciu o wiązania ATP wykazali po raz pierwszy Lardy i wsp. (117, 118). Współdziałanie centrów katalitycznych rozpatrywane w odniesieniu do szybkości procesu katalitycznego jest pozytywne (119, 120). Potwierdzają to obserwacje znacznego ( $10^6$  krotnego) przyspieszenia hydrolizy ATP w jednym z centrów katalitycznych, które zachodziło tylko wtedy, kiedy jedno z dwóch pozostałych centrów zawierało związany nukleotyd (119). Ten wzrost aktywności enzymu jest prawdopodobnie spowodowany wzrostem szybkości usuwania produktów reakcji.

Często jako dowód współdziałania podjednostek katalitycznych przytacza się obserwacje, że jedna tylko cząsteczką niektórych inhibitorów na jedną cząsteczkę enzymu wystarcza do pełnego zahamowania procesu katalitycznego (121). Rectenwald i Hess (122) obserwowali, że aktywność ATPazy rozwijała się z opóźnieniem (okres utajony aktywności) w przypadku, kiedy enzym nie zawierał ściśle związanych nukleotydów. Obserwacja ta również potwierdza współdziałanie katalityczne podjednostek enzymu.



Wyniki wymienionych badań nie wyjaśniają stopnia udziału poszczególnych centrów w procesie katalitycznym. Do zrozumienia tego problemu w znacznym stopniu mogą się przyczynić prace badaczy grupy Penefsky'ego (123, 124). Dobierając stosunek stężeń ATP/ $F_1$  badali oni szybkość hydrolizy ATP w warunkach, w których mogło funkcjonować tylko jedno centrum katalityczne enzymu. Oznaczyli szybkość maksymalną jednomiejscowej katalizy oraz obliczyli wartość  $K_m$  i szybkości maksymalnej dwu- i trzymiejscowej katalizy (120). Uzyskane wyniki sugerowały, że każde z trzech miejsc katalitycznych  $F_1$  jest zdolne do hydrolizy ATP, a całość procesu katalitycznego konsekwencją współdziałania wszystkich centrów.

Odmienne podejście metodyczne zastosowali badacze grupy Hatfield'iego (125). Badali oni szybkość hydrolizy w szerokim zakresie stężeń ATP przy stałym stężeniu  $F_1$ . Wyniki przedstawione w postaci zależności Eadie-Hofstee ( $v/[s]$  versus  $v$ ) analizowano przy pomocy komputera, którego program zakładał, że środowisko inkubacyjne zawiera większą liczbę ATP-ów o różnym  $K_m$  i  $V_{max}$ . Porównanie danych eksperymentalnych z symulowanymi sugeruje obecność trzech centrów katalitycznych o odmiennych właściwościach. Świadczą o tym trzy różniące się znacznie wartości  $K_m$ . Modyfikacja jednego z centrów przez DCCD pozbawiała enzym 95% aktywności. Przytoczone dane sugerują, że centra katalityczne pełnią nierównoważne funkcje w enzymie. Niesymetryczna struktura kompleksu podjednostek  $3\alpha$   $3\beta$   $\gamma$  wskazuje też na nierównoważność funkcji centrów katalitycznych (miejsca kontaktu podjednostek  $\alpha - \gamma$  lub  $\beta - \gamma$ ) (126).

### III-1.3. Reszty aminokwasowe w centrum katalitycznym

Badania polegające na chemicznej modyfikacji reszty argininowej sugeruje, że arginina występuje w centrach katalitycznych enzymów katalizujących transport grupy fosforylowej lub reakcję fosforylacji (127). Oczyszczony mitochondrialny  $F_1$  zawiera znaczną ilość argininy (128). Badania Seniora (129) wskazywały na szczególną rolę tyrozyny w wiązaniu nukleotydów. Prawdopodobnie bierze ona udział w wiązaniu ich pierścienia purynowego (129—132). Wiele danych (133—137) wskazuje na rolę lizyny w centrum katalitycznym  $F_1$ . Wysuwano sugestię, że bierze ona udział w wiązaniu nukleotydów poprzez ich reszty fosforanowe. Obecność argininy i lizyny w centrum katalitycznym  $F_1$  pozostaje w zgodzie z koncepcją udziału dwóch naładowanych dodatnio grup chemicznych, które mogą być odpowiedzialne za jednoczesne wiązanie dwóch anionowych substratów enzymu  $H_2PO_4^-$  i  $ADP^-$  (137, 138).

W piśmiennictwie można znaleźć dane wskazujące na obecność aminokwasów grup karboksylowych w centrum katalitycznym  $F_1$ . Mody-



fikacja jednego z centrów przez DCCD polega prawdopodobnie na blokowaniu tych grup (139).

Wykazano, że hydroliza ATP jest całkowicie hamowana przez dwie cząsteczki DCCD na jedną cząsteczkę  $F_1$  (140) oraz stwierdzono, że inaktywacja enzymu przez DCCD jest związana z modyfikacją podejnostki  $\beta$  (141). W piśmiennictwie można też znaleźć dane, że seryna może być miejscem wiązania DCCD (142).

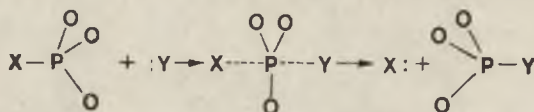
### III-1.4. Synteza i hydroliza ATP

Kiedy elektrochemiczny potencjał protonowy  $\Delta\mu_{H^+}$ , który jest siłą napędową syntezy ATP, osiąga wysoką wartość (ok. 200 mV), enzym pełni funkcje syntetazy ATP w procesie oksydacyjnej fosforylacji. Obniżanie  $\Delta\mu_{H^+}$  przy pomocy protonoforu powoduje aktywację jej aktywności ATPazowej i hamowanie oksydacyjnej fosforylacji. Zarówno synteza ATP, jak i jego hydroliza są hamowane przez inhibitory translokacji protonów w  $F_0$ , przykładem których jest omówiona wyżej oligomycyna. Zarówno synteza, jak i hydroliza ATP zachodzą w tych samych centrach katalitycznych  $F_1$  (143). Reakcja katalizowana przez syntetazę ATP jest wypadkową trzech procesów: 1) translokacji protonów przez dwuwarstwą lipidową (omówioną wyżej), 2) tworzenia (lub hydrolizy) wiązania bezwodnikowego P-O-P w ATP, 3) sprzężenia procesu przepływu protonów z tworzeniem tego wiązania. Pierwsze dwa procesy, jak wiemy, mogą zachodzić w sektorach  $F_0$  i  $F_1$  enzymu niezależnie. Trzeci zaś wymaga prawdopodobnie szczególnej czwartorzędowej konfiguracji obu sektorów.

#### III-1.4.1. Czy jest możliwe istnienie ufosforylowanego prekursora ATP, w którym fosfor jest związany kowalencyjnie?

Podstawową funkcją ATPazy  $F_1$  podczas syntezy ATP jest końcowa reakcja transfosforylacji. Przez wiele lat postulowano przebieg tej reakcji z udziałem wysokoenergetycznych pośredników. Badania w tym kierunku były inspirowane przez wczesne prace dotyczące dehydrogenazy 3-fosfoglicerylaldehydu (144), a idea wysokoenergetycznych intermediatów została sprecyzowana jasno przez Slatera w hipotezie chemicznego sprzężenia (145). Późniejsze udane próby izolowania ufosforylowanych pochodnych niektórych ATPaz, jak  $Ca^{2+}$ -ATPazy (146),  $Na^+$ ,  $K^+$ -ATPazy (147) oraz  $H^+$ -ATPazy błony plazmatycznej (148) wskazują, że poszukiwania ufosforylowanych prekursorów ATP w procesie oksydacyjnej fosforylacji nie były pozbawione podstaw. Jednakże późniejsze dane o położeniu atomu fosforu w cząsteczce fosforanu (149) podczas hydrolizy ATP katalizowanej przez  $F_1$  (150, 151) świadczą, że próby izolowania ufosforylowanych kowalencyjnych pochodnych enzymu były skazane na niepowodzenie. Nawet przy założeniu, że taki ufosforylowany po-

średnik jest zbyt labilny, by można go było izolować, wyżej wymienione badania powinny być wykazać jego obecność. Badania stereochemicznego przebiegu katalizy enzymatycznej translokacji grupy fosforylowej, wskazują, że zbliżenie akceptora tej grupy do atomu fosforu może wpływać na jego konfigurację przestrzenną. Atom ten bądź zachowuje pierwotną konfigurację, bądź ulega inwersji.



Inwersję atomu fosforu obserwuje się podczas procesu katalitycznego kinaz. Natomiast w procesach katalitycznych fosfataz i fosfomutazy przebiegających z udziałem ufosforylowanych pośredników atom fosforu zachowuje swoją pierwotną konfigurację przestrzenną. W badaniach procesu katalizowanego przez  $F_1$ , substratem był tiofosforan ATP znakowany stereospecyficznie tlenem  $^{18}\text{O}$  w pozycji  $\gamma$ . Ulegał on hydrolizie w wodzie wzbogaconej w  $^{17}\text{O}$ . Produktem hydrolizy był nieorganiczny [ $^{16}\text{O}$ ,  $^{17}\text{O}$ ,  $^{18}\text{O}$ ] tiofosforan. Analiza jego konfiguracji z zastosowaniem techniki NMR wykazała, że atom fosforu  $\gamma$  w ATP ulega usunięciu podczas hydrolizy ATP (152). Oznacza to, że fosforan usuwany jest z ATP wprost do wody bez udziału ufosforylowanego prekursora. Wyniki te wykluczają także powstawanie metafosforanu jako formy przejściowej. Sugerują one, że proces katalityczny oraz usuwanie jego produktów stanowią precyzyjnie zharmonizowane zjawisko.

Ważnym stadium w badaniach mechanizmu syntezy ATP było oznaczenie kolejności formowania wiązania  $\text{P}-\text{O}-\text{P}$  ( $\beta-\gamma$ ) w ATP oraz etapu uwalniania  $\text{H}_2\text{O}$  w tej reakcji. Dzięki pomysłowej technice zastosowanej przez *Wimmera* i *Rose* (153) udało się oznaczyć szybkości pobierania  $\text{H}_2\text{O}$  i rozszczepiania wiązania  $\beta-\gamma$  w ATP podczas jego hydrolizy. Wyniki tych badań wskazują, że oba procesy przebiegają z tą samą szybkością.

#### III-1.4.2. Energetyka procesu katalitycznego

Powstawanie bezwodnikowego wiązania między grupami fosforylowymi  $\beta-\gamma$  w ATP w środowisku wodnym wymaga znacznej zmiany swobodnej energii. Dlatego też przez wiele lat uwaga badaczy poszukujących mechanizmu użytkowania swobodnej energii utleniania substratów skupiała się głównie na tej reakcji. Obecnie mechanizm powstawania wiązania  $\beta-\gamma$  zachodzący w centrum katalitycznym  $F_1$  jest znany. Wiemy, że podstawową reakcją tego mechanizmu jest usuwanie wody z fosforanu nieorganicznego spowodowane nukleofilowym atakiem atomu tlenu grupy fosforylowej  $\beta$  w ADP na atom fosforu w fosforanie. Wiemy



też, że proces tworzenia wiązania  $\beta-\gamma$  w ATP nie wymaga energii. Do wyjaśnienia tego problemu przyczyniły się głównie omówione już częściowo prace grupy Boyera (108), które dotyczyły mechanizmu reakcji wymiany izotopowej między atomem tlenu w fosforanie i atomem tlenu w wodzie. Badacze grupy Boyera wykazali, że protonofory nie hamują wymiany na poziomie intermediatu. Zachodzenie tej wymiany oznacza, że ATP związany z enzymem w centrum katalitycznym ulega hydrolizie i resyntezie. Brak hamowania jej przez protonofory wskazuje, że reakcja powstawania wiązania  $\beta-\gamma$  w ATP nie wymaga energii. Innymi słowy swobodna energia ( $\Delta G_0$ ) tej reakcji równa się, lub jest bliska zeru, jeżeli zachodzi między substratami związanymi w centrum katalitycznym enzymu. Należy dodać, że wymianę na poziomie intermediatu obserwowano podczas badań nad oczyszczonym enzymem mitochondrialnym  $F_1$  oraz izolowanym z chloroplastów (108, 104). Stwierdzono, że oba enzymy są zdolne do syntezy ATP związanego w centrum katalitycznym, a stałe równowagi tych reakcji sugerują, że powstawanie  $F_1$ -ATP z  $F_1$ ADP i fosforanu jest procesem izoergicznym, przebiegającym z nieznaczną zmianą swobodnej energii. Wyniki prac z oczyszczonymi enzymami sugerują, że tworzenie kowalencyjnej struktury ATP w centrum katalitycznym enzymu nie wymaga ani gradientu protonów, ani potencjału transmembranowego. Faktów tych nie przewidywał Mitchell formułując swoją hipotezę działania syntetazy ATP (154, 155). Druga z badanych wymian tlenowych (medium exchange) jest hamowana przez protonofory. Zachodzenie tej wymiany może oznaczać, że wiązanie substratów z enzymem oraz usuwanie produktów reakcji mogą być reakcjami endoergicznymi w mechanizmie syntezy ATP. Gresser i w sp. (158) stwierdzili wzrost wartości  $K_m$  (dla ADP i fosforanu) w obecności protonoforu podczas syntezy ATP w cząstkach submitochondrialnych. Oznacza to obniżenie powinowactwa wiązania substratów w obecności protonoforu i sugeruje, że reakcją endoergiczną w procesie katalitycznym jest reakcja wiązania substratów. Czynniki rozprzegające hamują wymianę atomów tlenu w grupie fosforylowej ATP i  $H_2O$  podczas hydrolizy ATP. W warunkach tych jak wiemy, zachodzi wymiana na poziomie substratu między fosforanem a wodą w centrum katalitycznym. Oznacza to, że wiązanie ATP wciąż ma miejsce, podczas gdy jego usuwanie jest hamowane przez czynnik rozprzegający. Dane te implikują, że reakcją wymagającą dostarczenia energii w procesie katalitycznym jest usuwanie nukleotydów. W laboratorium Penefsky'ego niedawno zmierzono szybkości i stałe równowagi kilku reakcji mechanizmu hydrolizy (lub syntezy ATP) w warunkach, kiedy proces katalityczny przebiega z udziałem tylko jednego centrum katalitycznego (mechanizm minimum) (130). Okazało się, że reakcja uwalniania ATP z kompleksu  $F_1$ -ATP przebiega ze skrajnie niską szybkością ( $k = 7 \times 10^6 \cdot \text{sec}^{-1}$ ). Dane doświadczalne wskazują, że zastosowanie pola



elektrycznego (50  $\mu$ s) przyspiesza przebieg tego najwolniejszego stadium katalitycznego (156, 157). Być może proces energizacji kosztem  $\Delta\mu_{H^+}$  wywołuje zmianę konformacyjną ułatwiającą usuwanie nukleotydu przez osłabienie jego wiązania. Podobne sugestie zawarte są we wcześniejszej publikacji Harrisa i Slatera (166).

Przytoczone dane i rozważania sugerują, że hipoteza Mitchella o bezpośrednim udziale „energizowanych” protonów (154, 155) w reakcji powstawania wiązania  $\beta - \gamma$  w ATP nie znajduje potwierdzenia eksperymentalnego. Zgodnie z tą hipotezą protony podczas przepływu przez kanał w sektorze  $F_0$  miały być kierowane do centrum katalitycznego  $F_1$ , gdzie miały reagować bezpośrednio z atomem tlenu usuwanym z fosforanu nieorganicznego. Jak dotąd brak jest danych doświadczalnych o bezpośrednim udziale protonów w stadium procesu katalitycznego wymagającego energii. Przypuszcza się, że zmiany konformacyjne zachodzące w białkach zawierających znaczną liczbę  $\alpha$ -heliksów o specyficznym ich usytuowaniu mogą powodować usuwanie nukleotydów z  $F_1$ .

Hipotezę uwzględniającą udział  $\alpha$ -helikalnych „przewodów protonowych” w zmianach konformacyjnych białek błonowych przedstawił Marvin (159). Może ona być podstawą do rozważań nad mechanizmem mającym miejsce w  $F_1$ .

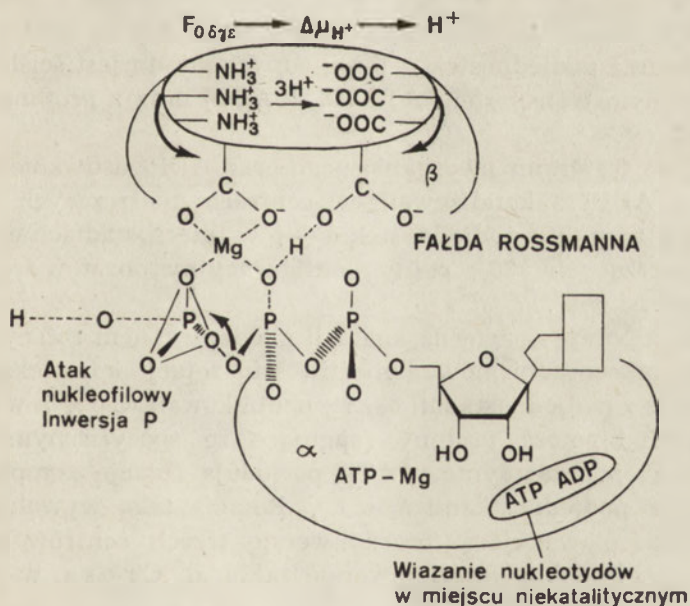
### III-2. Hipotezy mechanizmu funkcjonowania ATPazy $F_0$ - $F_1$

Brak wystarczająco udokumentowanych danych nie przeszkadza licznym spekulacjom na temat prawdopodobnego mechanizmu funkcjonowania enzymu. Niektóre z nich zostaną przedstawione niżej.

Znacznym krokiem naprzód w stosunku do hipotezy Mitchella była hipoteza Crossa przedstawiona w 1981 roku (121). Wyjaśniała ona precyzyjnie rolę poszczególnych aminokwasów (opisanych wyżej) oraz atomów magnezu w centrum katalitycznym enzymu. Autor zakładał zachodzenie energio-zależnej zmiany konformacyjnej powodującej przejście formy latentnej enzymu w formę aktywną. Według niego centra katalityczne enzymu miały przechodzić cykliczne interkonwersje stanów o niskim i wysokim powinowactwie wiązania ligandów.

Na rycinie 5 przedstawiono najnowszą hipotezę mechanizmu funkcjonowania ATPazy  $F_0$ - $F_1$  zaproponowaną przez Kagawę (160). Według jego hipotezy cząsteczka  $F_1$  zawiera domenę (w górnej części ryciny w kształcie elipsy), w której zgrupowane są aminokwasy kwaśne i zasadowe. Kwasowe reszty i zasadowe tych aminokwasów mogą ulegać cyklicznej protonacji i deprotonacji z udziałem protonów napływających do domeny przez kanał w kompleksie sektora  $F_0$  z podjednostkami białkowymi sektora  $F_1$ . Neutralizacja ładunku ujemnego  $COO^-$  powodować ma zmianę konformacyjną w fałdzie Rossmanna, podczas której kompleks  $ATP-Mg^{2+}$  zostaje usuwany z centrum katalitycznego. Grupy karboksy-

lowe następnie ulegają deprotonacji, a uwolnione protony są usuwane do fazy wodnej po stronie  $F_1$  (matriks w przypadku mitochondriów). Zgodnie z przedstawioną przez Kaga wę hipotezą domena kwasowo-zasadowa stanowi rodzaj centrum dyspozycyjnego dla pozostałej części centrum katalitycznego enzymu. W domenie tej zachodzi zamiana energii przepływających protonów w energię konformacji. Podobne zmiany konformacyjne cząsteczki spowodowane reakcją protonacji i deprotonacji są istotą efektu Bohra w hemoglobinie. Fischer i Oesterhelt proponowali podobny mechanizm transportu protonów z udziałem reszt aminokwasowych pełniących rolę dawców i biorców protonów w bakteriorodopsynie (161) a Papa (163) w cytochromach. Zgrupowanie trzech reszt zasadowych i kwasowych w domenie pozostaje w zgodzie z przyjętą stechiometrią ( $3 H^+/ATP$ ) syntezy ATP. Koncepcja udziału domen kwasowo-zasadowych w mechanizmie syntezy ATP znajduje potwierdzenie w badaniach genetycznych nad poszukiwaniem homologicznych sekwencji aminokwasowych; takie sekwencje zbudowane z Asp-Glu-Leu-Ser-Glu-Glu-Asp (kwaśna sekwencja) oraz z Arg-Ala-Lys-Ile-X-Arg (zasadowa sekwencja) znaleziono w  $F_1$  mitochondriów zwierzęcych, chloroplastów i niektórych bakterii (162). Ważnym szczegółem jest informacja, że aminokwasy te znajdują się w podbliziu fałdy Rossmanna. Przedstawiona hipoteza jest zgodna z omówionymi wynikami badań stereochemicznych mechanizmu  $F_1$ , według których atom fosforu w fosforanie ulega inwersji i jest atakowany nukleofilowo przez  $O^-$  w ADP.



Ryc. 5. Hipoteza domeny kwasowo-zasadowej (160).



W świetle nagromadzonej obecnie wiedzy o strukturze i funkcji białek kurczliwych mechanistyczne koncepcje funkcjonowania ATPaz transportujących protony przeżywają niejako renesans. Wyrazem tego jest opublikowana niedawno przez Mitchella (164) hipoteza rotujących podjednostek ATPazy  $F_0$ - $F_1$ . Hipoteza ta zakłada analogię między ruchem obrotowym wici niektórych pierwotniaków a mechanizmem ATPaz  $F_0$ - $F_1$ , oraz nawiązuje do mechanizmu działania aktomiozyny. Opiera się ona na następujących założeniach:

1) podjednostki  $\beta$   $F_1$  naładowane ujemnie kontaktują się z dodatnio naładowaną podjednostką  $\gamma$ ; powierzchnie obu podjednostek są do siebie dopasowane; położenie każdej z trzech podjednostek  $\beta$  w stosunku do siebie podczas obrotu różni się o  $120^\circ$ .

2) Centra katalityczne enzymu tworzą się w miejscach przylegania specyficznych domen na powierzchniach trzech par podjednostek  $\alpha$  —  $\beta$ .

3) W miejscach kontaktów podjednostek  $\alpha$  —  $\beta$  zachodzi współzależny transport ATP oraz  $P_n$ -ADP; współdziałanie typu „push-pull” jest spowodowane ruchem rotacyjnym podjednostek.

4) Wiązanie ligandów i przenoszenie ich między centrami katalitycznymi a translokującymi zależy od bliskości i orientacji kątowych powierzchni podjednostek.

5) Podjednostka  $\gamma$  (lub kompleks  $\gamma$  —  $\epsilon$ ) działa jak drzwi obrotowe cyklicznie łączące centrum katalityczne uformowane przez każdą parę podjednostek  $\alpha$  —  $\beta$  z kanałem protonowym w sektorze  $F_0$ .

6) Wejście protonów do centrum katalitycznego (wysoki elektrochemiczny potencjał protonowy  $\Delta\mu_{H^+}$ ) przez drzwi obrotowe w podjednostce  $\gamma$  (lub w kompleksie  $\gamma$  —  $\epsilon$ ) powoduje ruch obrotowy na skutek wzajemnego odpychania podjednostek  $\alpha$ ,  $\beta$  i  $\gamma$ ; odpychanie to jest ściśle związane z współzależnym transportem ATP/( $P_n$  + ADP) oraz z protonacją i usuwaniem  $O^{2-}$ .

7) Wejście fosforanu nieorganicznego oraz ADP, usuwanie ATP oraz fosforylacja ADP są katalizowane w centrach mieszczących się w powierzchniach kontaktu podjednostek  $\alpha$  —  $\beta$  w trzech stadiach cyklu obrotowego wynoszących  $120^\circ$ ; pełny konfiguracyjny obrotowy cykl katalityczny wynosi  $360^\circ$ .

Podobną hipotezę opartą na analogii między ruchem rotacyjnym wici niektórych mikroorganizmów a możliwością rotacji kompleksu podjednostek **b** wraz z podjednostkami  $\delta$ ,  $\epsilon$  i  $\gamma$  opublikowali Cox i w s.p. (165). Zgodnie z ich hipotezą protony reagujące ze specyficznymi grupami w sektorze  $F_0$  podczas syntezy ATP powodują rotację kompleksu podjednostki **b** z podjednostkami  $\delta$ ,  $\epsilon$  i  $\gamma$ . Rotacja taka wywołuje zmianę konformacyjną powodującą interkonwersję trzech centrów katalitycznych enzymu. Podobną interkonwersję zakładał Cross w swojej hipotezie (121).



## PIŚMIENICTWO

1. Boyer P. D., Chance B., Ernster L., Mitchell P., Racker E., Slater E. C., (1977), *Ann. Rev. Biochem.*, **46**, 955—966.
2. Walker J. E., Saraste M., Gay N. J., (1984), *Biochem. Biophys. Acta*, **768**, 164—200.
3. Bogucka K., (1985), *Post. Biochem.*, **31**, 5—28.
4. Fernandez-Moran H., Oda T., Blair P. V., Green D. E., (1964), *J. Cell. Biol.*, **22**, 63—100.
5. Racker E., Tyler D. D., Estabrook R. W., Conover T. E., Parsons D. F., Chance B., (1965), w: *Oxidases and Related Redox Systems* (King T. E., Mason H. S., Morrison M. eds.) vol. 2, 1077—1094, Willey, New York.
6. Soper J. W., Decker G. L., Pedersen P. R., (1979), *J. Biol. Chem.*, **254**, 11170—11178.
7. Kagawa Y., (1978), *Biochim. Biophys. Acta*, **505**, 45—93.
8. Fillingame R. H., (1980), *Ann. Rev. Biochem.*, **49**, 1079—1114.
9. Okamoto H., Sone N., Hirata H., Yoshida M., Kagawa Y., (1977), *J. Biol. Chem.*, **252**, 6125—6130.
10. Linnett P. E., Beechy R. B., (1979), w: *Methods in Enzymology*, vol. LV (Fleischer, S., Packer, L., eds.), Academic Press, New York, 472—475.
11. Fillingame R. H., (1981), *Curr. Top. Bioenerg.*, **11**, 35—106.
12. Downie J. A., Gibson F., Cox G. B., (1979), *Ann. Rev. Biochem.*, **48**, 103—131.
13. Downie J. A., Cox G. B., Laugman L., Ash G., Becker M., Gibson F., (1981), *J. Bacteriol.*, **145**, 200—210.
14. Sebald W., Friedl P., Schairer H. M., Hoppe J., (1982), *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, **402**, 28—44.
15. Glaser E., Norling B., Ernster L., (1980), *Eur. J. Biochem.*, **110**, 225—235.
16. Negrin R. S., Foster D. L., Fillingame R. H., (1980), *J. Biol. Chem.*, **255**, 5643—5649.
17. Kanner B. I., Serrano R., Kondrach M. A., Racker E., (1976), *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **69**, 1050—1056.
18. Sanadi D. R., (1984), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **81**, 1371—1374.
19. Sanadi D. R., (1982), *Biochim. Biophys. Acta*, **683**, 1—88.
20. Mac Lennan D. H., Tzagoloff A., (1968), *Biochemistry*, **7**, 1603—1610.
21. Pullman M. E., Monroy G. C., (1963), *J. Biol. Chem.*, **238**, 3762—3769.
22. Brooks J. C., Senior A. E., (1971), *Arch. Biochem. Biophys.*, **147**, 467—470.
23. Walker J. E., Saraste M., Gay N. J., (1982), *Nature*, **298**, 867—869.
24. Cox G. D., Jans D. A., Fimmel A. L., Gibson F., Hutch I., (1984), *Biochim. Biophys. Acta*, **768**, 201—208.
25. Kyte J., Doolittle R. F., (1982), *J. Mol. Biol.*, **157**, 105—132.
26. Walker J. E., Gay N. J., Runswick M. J., Tybulewicz V. L. J., Falk G., (1983), w: *Structure and Function of Membrane Proteins* (Quagliariello E., Palmieri, F. eds.) Elsevier Science Publishers, Amsterdam, New York, 167—178.
27. Sone N., Yoshida M., Hirata H., Kagawa Y., (1978), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **75**, 4219—4223.
28. Dupuis A., Zaccai G., Satre M., (1983), *Biochemistry*, **22**, 5951—5956.
29. Fessenden-Raden J. M., (1972), *J. Biol. Chem.*, **247**, 2351—2357.

30. Vadineanu A., Berden J. A., Slater E. C., (1976), *Biochim. Biophys. Acta*, **449**, 468—479.
31. Russel L. K., Kirkley S. A., Kleyman T. L., Chau S. H. E., (1976), *Biochim. Biophys. Res. Commun.*, **73**, 434—443.
32. Grinkevich V. A., Aldanova N. A., Kostetsky P. V., Modyanov N. N., Ovchinnikov Yu. A., Hundal T., Ernster L., (1985), Proc. 16th FEBS Meeting, Part B, 483—488, VNU Science Press, Utrecht.
33. Sebald W., Hoppe J., (1981), *Curr. Top. Bioenerg.*, **12**, 1—64.
34. Hundal T., Norling B., Ernster L., (1984), *J. Bioenerg. Biomembranes*, **16**, 535—550.
35. Gautheron D. C., Godinot C., Deleage G., Penin F., (1985) w: Abstracts, International Symposium in Achievements and Perspectives in Mitochondrial Research, University of Bari, Adriatica Editrice, 89.
36. Dupuis A., Issartel J. P., Lunardi J., Satre M., Vignais P. V., (1985) w: Third European Bioenergetics Conference, Hanover, Short reports 301—302.
37. Dupuis A., Lunardi J., Issartel J. P., Vignais P. V., (1985), *Biochemistry*, **24**, 734—739.
38. Archinard P., Maradi-Ameli M., Godinot C., Gautheron D. C., (1984), *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **123**, 1254—1261.
39. Dunin S. O., Heppel L. A., Fullmer C. S., (1980), *J. Biol. Chem.*, **255**, 6891—6896.
40. Ernster L., Grinkevich V. A., Hundal T., Modyanov N. N., Norling B., Ovchinnikov Yu. A., Sandri G., Wojtczak L., (1986), *Chemica Scripta*, Cammridge University Press w druku.
41. Ovchinnikov Yu. A., Modyanov N. N., Grinkevich V. A., Aldanova N. A., Trubetskaya O. E., Nazimov I. V., Hundal T., Ernster L., (1984), *FEBS Lett.*, **166**, 19—22.
42. Ovchinnikov Yu. A., Modyanov N. N., Grinkevich V. A., Aldanova N. A., Kostetsky P. N., Trubetskaya T., Hundal T., Ernster L., (1984), *FEBS Lett.*, **175**, 109—112.
43. Walker J. E., Runswick M. J., Saraste M., (1982), *FEBS Lett.*, **146**, 393—396.
44. Hoppe J., Sebald W., (1984), *Biochim. Biophys. Acta*, **768**, 1—27.
45. Kamazawa H., Mabudi K., Kayano T., Noumi T., Sekiya T., Futai M., (1981), *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **103**, 613—620.
46. Gay N. J., Walker J. E., (1981), *Nucleic Acids Res.*, **9**, 3919—3926.
47. Grinkevich V. A., Aldanova N. A., Kostetsky P. N., Modyanov N. N., Hundal T., Ovchinnikov Yu. A., Ernster L., (1984) w: Third European Bioenergetics Conference Hanover, Short reports.
48. Sandri G., Suranyi E., Erikson L. E. G., Westman J., Ernster L., (1983), *Biochim. Biophys. Acta*, **723**, 1—6.
49. Sandri G., Wojtczak L., Ernster L., (1985), *Arch. Biochem. Biophys.*, **239**, 595—602.
50. Aquilla H., Misra D., Eulitz M., Klingenberg M., (1982), *Hoppe-Seylers, Z. Physiol. Chem.*, **363**, 345—349.
51. Yagi T., Hatefi Y., (1984) w: Third European Bioenergetics Conference, Hanover, Short reports, 381—382.
52. Hughes J. B., Joshi S., Murfitt R. R., Sanadi D. R., (1979), w: Membrane Bioenergetics (Lee, C. P., Schatz, G., Ernster, L., eds.), 81—95, Addison-Wesley.

53. Beechey R. B., Robertson A. M., Holloway C. T., Knight J. S., (1967), *Biochemistry*, **6**, 3867—3879.
54. Sebald W., Wachter E., (1978), w: Energy Conservation in Biological Membranes (Schäffer G., Klingenberg M. eds.), Springer-Verlag, Berlin, 283—288.
55. Maw D., Wachter E., Wallace B. A., (1983), *Biochemistry* **21**, 4860—4868.
56. Enns R. K., Criddle R. S., (1977), *Arch. Biochem. Biophys.*, **182**, 587—600.
57. Sigrist-Nelson K., Azzi A., (1980), *J. Biol. Chem.*, **255**, 10638—10643.
58. Sone N., Hamamoto T., Kagawa Y., (1981), *J. Biol. Chem.*, **256**, 2873—2877.
59. Senior A. E., Wise J. G., (1983), *Membrane Biol.*, **73**, 105—124.
60. Prochaska L. J., Bisson R., Capaldi R. A., Steffens G. C. M., Buse G., (1981), *Biochim. Biophys. Acta*, **637**, 360—373.
61. Hoppe J., Schairer R., Sebald W., (1980), *FEBS Lett.*, **109**, 107—111.
62. Wachter E., Schmid R., Deckers G., Altendorf K., (1980), *FEBS Lett.*, **113**, 265—270.
63. Glaser E., Norling B., Kopecky J., Ernster L., (1982), *Eur. J. Biochem.*, **121**, 525—531.
64. Kopecky J., Querrieri F., Papa S., (1983), *Eur. J. Biochem.*, **131**, 17—24.
65. Dunker A. K., Marvin D. A., (1978), *J. Theor. Biol.*, **72**, 9—16.
66. Nagle J. F., Mille M., Morovitz H. J., (1980), *J. Chem. Phys.*, **72**, 3959—3971.
67. Nagle J. F., Morovitz H. J., (1978), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **75**, 298—303.
68. Schindler H., Nelson N., (1982), *Biochemistry*, **21**, 5787—5794.
69. Seren S., Caporin G., Gallazo F., Lippe G., Ferguson S. J., Sorgato M. C., (1985), *Eur. Biochem.*, **152**, 373—379.
70. Walker J. E., Fearnley I. M., Gay N. J., Gibson B. W., Northrop F. D., Powell S. J., Runswick M. J., Saraste M., Tybulewicz V. L. J., (1985), *J. Mol. Biol.*, **184**, 677—701.
71. Yoshida M., Sone N., Hirata H., Kagawa Y., Ui N., (1979), *J. Biol. Chem.*, **254**, 9525—9533.
72. Kanazawa H., Futai M., (1982), *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, **402**, 45—64.
73. Runswick M. J., Walker J. E., (1983), *J. Biol. Chem.*, **258**, 3081—3089.
74. Hatefi J., (1985), *Ann. Rev. Biochem.*, **54**, 1015—1069.
75. Esch F. S., Allison W. S., (1979), *J. Biol. Chem.*, **254**, 10740—10746.
76. Dunn S. D., (1982), *J. Biol. Chem.*, **257**, 7354—7359.
77. Frangione B., Rosenwasser E., Penefsky H. S., Pullman M. E., (1981), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **78**, 7403—7407.
78. Power J., Cross R. L., Harris D. A., (1983), *Biochim. Biophys. Acta*, **724**, 128—141.
79. Carlson C., Ernster L., (1981), *Biochim. Biophys. Acta*, **638**, 345—357.
80. De Pierre J. W., Ernster L., (1977), *Ann. Rev. Biochem.*, **46**, 201—234.
81. Dunn S. D., Heppel L. A., (1981), *Arch. Biochem. Biophys.*, **210**, 421—436.
82. Schäfer H. J., Scheurich P., Rothgeber G., Dose K., Mayer A., Klingenberg M., (1980), *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **95**, 562—568.
83. Furuno T., Ikegami A., Kihara H., Yoshida M., Kagawa Y., (1983), *J. Mol. Biol.*, **170**, 137—153.
84. Schäfer G., (1985), w: Abstracts, International Symposium on Achieve-



- ments and Perspectives in Mitochondrial Research, University of Bari, Adriatica Editrice, 81.
85. Amzel L. M., McKinney M., Narayanan P., Pedersen R. L., (1982), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **78**, 5852—5856.
  86. Cross R. L., Nalin C. M., (1982), *J. Biol. Chem.*, **257**, 2874—2881.
  87. Wagenvoord R. J., Van der Kraan I., Kemp A., (1977), *Biochim. Biophys. Acta*, **460**, 17—24.
  88. Carlier M. F., Holowka D. A., Hammes G. G., (1979), *Biochemistry*, **18**, 3452—3457.
  89. Esch F. S., Allison W. S., (1978), *J. Biol. Chem.*, **253**, 6100—6106.
  90. Hulla F. W., Höckel M., Rack M., Risi S., Dose K., (1978), *Biochemistry*, **17**, 823—828.
  91. Yoskida M., Some N., Hirata H., Kagawa Y., (1977), *J. Biol. Chem.*, **252**, 3480—3485.
  92. Senior A. E., (1979), *J. Biol. Chem.*, **254**, 11319—11322.
  93. Harris D. A., (1978), *Biochim. Biophys. Acta*, **463**, 245—273.
  94. Wise J. G., Latchney L. R., Senior A. E., (1981), *J. Biol. Chem.*, **256**, 10383—10359.
  95. Rossmann M. G., Argos P., (1981), *Ann. Rev. Biochem.*, **50**, 497—532.
  96. Saraste M., (1982), *Biochem. Soc. Trans.*, **10**, 203—206.
  97. Walker J. E., Saraste M., Runswick M. J., Gay N. J., (1982), *EMBOJ*, **1**, 945—951.
  98. Ferguson S. J., Lloyd W. J., Radda G. K., (1975), *Eur. J. Biochem.*, **54**, 127—153.
  99. Ferguson S. J., (1977), *Biochem. Soc. Trans.*, **5**, 1281—1283.
  100. Adolfsen R., Moudrianakis E. N., (*Arch. Biochem. Biophys.*, **172**, 425—433.
  101. Kayalar C., Rosing J., Boyer P. D., (1976), *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **72**, 1153—1159.
  102. Kayalar C., Rosing J., Boyer P. D., (1976), *Fed. Proc.*, **25**, (7) 1601.
  103. Kayalar C., Rosing J., Boyer P. D., (1977), *J. Biol. Chem.*, **252**, 2486—2491.
  104. Hutton R. L., Boyer P. D., (1979), *J. Biol. Chem.*, **254**, 9990—9993.
  105. Hackney D. D., Rosen G., Boyer P. D., (1979), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **76**, 3646—3650.
  106. Boyer P. D., (1979), w: Membrane Bioenergetics (Lee C. P., Schatz G., Ernster L., eds.), Addison-Wesley Publishing Company, 127—143.
  107. Rossing J., Kayalar C., Boyer P. D., (1977), *J. Biol. Chem.*, **252**, 2478—2485.
  108. Choate G., Hutton R. L., Boyer P. D., (1979), *J. Biol. Chem.*, **254**, 286—290.
  109. Holowka D. A., Hammes G. G., (1977), *Biochemistry*, **16**, 5538—5545.
  110. Ferguson S. J., Lloyd W. J., Radda G. K., (1976) *Biochemistry*, **159**, 347—353.
  111. Vallejos R. H., Viale A., Andreo L. S., (1976), *FEBS Lett.*, **84**, 304—308.
  112. Marcus F., Schuster S. M., Lardy H. A., (1976), *J. Biol. Chem.*, **251**, 1775—1780.
  113. Scheurich P., Schäfer H. J., Dose K., (1978), *Eur. J. Biochem.*, **88**, 253—257.
  114. Williams N., Coleman P. S., (1982), *J. Biol. Chem.*, **257**, 2834—2841.

115. Wise J. G., Latchney L. R., Senior A. E., (1982), *Biophys. J.*, **37**, 114a.
116. Grubmeyer C., Penefsky H. S., (1981), *J. Biol. Chem.*, **256**, 3718—3727.
117. Schuster S., Ebel R. E., Lardy H. A., (1975), *J. Biol. Chem.*, **250**, 7848—7853.
118. Ebel R. E., Lardy H. A., (1975), *J. Biol. Chem.*, **250**, 191—196.
119. Grubmeyer C., Cross R. L., Penefsky H. S., (1982), *J. Biol. Chem.*, **257**, 12092—12100.
120. Cross R. L., Grubmeyer C., Penefsky H. S., (1982), *J. Biol. Chem.*, **257**, 12101—12105.
121. Cross R. L., (1981), *Ann. Rev. Biochem.*, **50**, 681—714.
122. Rectenwald D., Hess B., (1979), *FEBS Lett.*, **108**, 257—260.
123. Grubmeyer C., Penefsky H. S., (1981), *J. Biol. Chem.*, **256**, 3728—3734.
124. Penefsky H. S., Cross R. L., Grubmeyer C., (1982), *Abstr. Second. Eur. Bioenerg. Conf.*, 17—18, Lyon, L.B.T.H.-C.N.R.S.
125. Wong S. Y., Matsuno-Yagil A., Hatefi Y., (1984), *Biochemistry*, **23**, 5004—5009.
126. Pedersen P. L., (1985), w: Abstracts, International Symposium on Achievements and Perspectives in Mitochondrial Research, University of Bari Adriatica Editrice, 80.
127. Riordan J. F., McElvany K. D., Borders C. L., (1977), *Science*, **195**, 884—886.
128. Knowles A. F., Penefsky H. S., (1972), *J. Biol. Chem.*, **247**, 6624—6630.
129. Senior A. E., (1983), *Biochemistry*, **12**, 3622—3627.
130. Penefsky H. S., Garrett N. E., Chang T. M., (1976), w: *The Structural Basis of Membrane Function*, 69—79.
131. Sutton R., Ferguson S. J., (1985), *Eur. J. Biochem.*, **148**,
132. Akhrem A. A., Kisel H. A., Kozlov I. A., Tsybovsky I. S., Vulfson E. N., (1985), *FEBS Lett.*, **187**, 249—252.
133. Colombo G., Hubert E., Marcus F., (1972), *Biochemistry*, **11**, 1798—1803.
134. Ferguson S. J., Loyd W. J., Radda G. K., (1974), *FEBS Lett.*, **38**, 234—236.
135. Godinot C., Penin F., Gautheron D. C., (1979), *Arch. Biochem. Biophys.*, **192**, 225—234.
136. Sugiyama Y., Mukohata Y., (1979), *FEBS Lett.*, **98**, 276—280.
137. Kasahara M., Penefsky H. S., (1978), *J. Biol. Chem.*, **253**, 4180—4187.
138. Selwyn M. J., (1967), *Biochem. J.*, **105**, 279—288.
139. Penefsky H. S., (1967), *J. Biol. Chem.*, **242**, 5789—5795.
140. Pougéois R., Satre M., Vignais P. V., (1979), *Biochemistry*, **18**, 1408—1413.
141. Shoshan V., Selman B. R., (1980), *J. Biol. Chem.*, **255**, 384—389.
142. Takeda K., Miki J., Kanazawa H., Tsuchiya T., Futai N., (1985), *J. Biochem.*, **97**, 1401—1407.
143. Sloothaak J. B., Berden J. A., Herweijer M. A., Kemp A., (1985), *Biochim. Biophys. Acta*, **83**, 27—38.
144. Racker E., Krinsky I., (1952), *J. Biol. Chem.*, **198**, 731—743.
145. Slater E. C., (1953), *Nature*, **172**, 975—978.
146. Hasselbach W., Waas W., (1982), *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, **402**, 459—469.
147. Skou J. C., (1982), *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, **402**, 169—184.

148. Goffeau A., Slayman C. W., (1981), *Biochim. Biophys. Acta*, **639**, 197—223.
149. Knowles J. R., (1980), *Ann. Rev. Biochem.*, **49**, 877—919.
150. Cohn M., (1982), *Ann. Rev. Biophys. Bioenerg.*, **11**, 23—42.
151. Webb M. R., Grubmeyer C., Penefsky H. S., Trentham D. R., (1980), *J. Biol. Chem.*, **255**, 11637—11639.
152. Senter P., Eckstein F., Kagawa Y., (1983), *Biochemistry*, **22**, 5514—5518.
153. Wimmer M. J., Rose I. A., (1977), *J. Biol. Chem.*, **252**, 6769—6775.
154. Mitchell P., (1974), *FEBS Lett.*, **43**, 189—194.
155. Mitchell P., (1977), *FEBS Lett.*, **78**, 1—20.
156. Hamamoto T., Ohno K., Kagawa Y., (1982), *J. Biochem.*, **91**, 1759—1766.
157. Teisse J., Knox B. E., Tsong T. Y., Wehrle J., (1981), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **78**, 7473—7477.
158. Gresser M. J., Myers J. A., Boyer P. D., (1982), *J. Biol. Chem.*, **257**, 12030—12038.
159. Marvin D. A., (1983), *FEBS Lett.*, **156**, 1—5.
160. Kagawa Y., (1984), w: Bioenergetics (Ernster, L. ed.) New Comprehensive Biochemistry, **9**, 149—189, Elsevier, Amsterdam, New York, Oxford.
161. Fischer U. C., Oesterhelt D., (1980), *Biophys. J.*, **31**, 139—146.
162. Runswick M. J., Walker J. E., (1983), *J. Biol. Chem.*, **258**, 3081—3089.
163. Papa S., (1982), *J. Bioenerg. Biomembr.*, **14**, 69—86.
164. Mitchell P., (1985), *FEBS Lett.*, **182**, 1—7.
165. Cox G. B., Jans D. A., Fimmel A. L., Gibson F., Hatch L., (1984), *Biochim. Biophys. Acta*, **768**, 201—208.
166. Harris E. J., Slater E. C., (1975), *Biochim. Biophys. Acta*, **387**, 335—348.



## MINIREVIEW

JANINA KWIATKOWSKA

### Fosfolipidy inozytowe w przetwarzaniu informacji w komórkach

#### Inositol phospholipids in intracellular transformations of information

Komórki odbierają za pomocą receptorów różnorodne informacje, przekazywane im pod postacią chemicznych i fizycznych sygnałów pierwotnych, takich jak hormony, neurotransmitery, jony, fotony itp. Sygnały te indukują następnie powstawanie substancji wewnątrzkomórkowych, zwanych przekaźnikami wtórnymi. Liczba tych przekaźników jest ograniczona w porównaniu z sygnałami pierwotnymi, zachodzi więc uproszczenie informacji. Przekażniki wtórne uruchamiają mechanizmy, za pośrednictwem których regulują rozliczne funkcje komórkowe. Do najlepiej poznanych przekaźników wtórnych należą cykliczne nukleotydy, stymulujące fosforylację białek za pomocą kinaz A i G.

Dużym i zrozumiałym zainteresowaniem cieszą się ostatnio przekaźniki wtórne, które powstają z fosfolipidów inozytowych. Lipidy te zajmują szczególne miejsce w układach przetwarzania informacji, gdyż powstają z nich dwa różne przekaźniki wtórne o odmiennym mechanizmie działania, a mianowicie trifosfoinozytol ( $\text{InsP}_3$ ) i diacyloglicerol (DG). Pobudzają one wiele ważnych zdarzeń komórkowych, takich jak mobilizacja wapnia, aktywacja cyklicznej guanylowej, aktywacja kinaz białkowych: C i tyrozynoswoistej, oraz uwalnianie kwasu arachidowego, prekursora prostaglandyn.

Do czynników pobudzających hydrolizę lipidów inozytowych należy wiele hormonów, neurotransmiterów i substancji wzrostowych i mitogennych, takich jak: acetylocholina, adrenalina, angiotensyna, pankreozymina, tyreoliberyna, bradykinina, wazopresyna, serotonina, histamina, EGF, PDGF, fitohemaglutynina, leukocydyna itp. W fotoreceptorach czynnikiem takim są fotony, w płytkach krwi — PAF i trombina, a w komórkach jajowych — spermatozoidy. Układ fosfolipidów inozytowych związany jest z działaniem receptorów określonej grupy: muskarynowego dla acetylocholiny, alfa — dla adrenaliny,  $V_1$  dla wazopresyny

\*) Prof. dr hab., Zakład Biochemii Akademii Medycznej we Wrocławiu, ul. Chałubińskiego 10, 50-368 Wrocław.

Wykaz skrótów używanych w pracy: DG — diacyloglicerol; EGF — nabłonkowy czynnik wzrostu;  $\text{InsP}_3$  — inozytolo-1,4,5-trifosforan, potoczna nazwa trifosfoinozytol;  $\text{InsP}_2$  — inozytolo-1,4-bifosforan;  $\text{Ins(1)P}$  — inozytolo-1-fosforan;  $\text{Ins(4)P}$  — inozytolo-4-fosforan; PAF — czynnik aktywujący płytki; PDGF — płytkowy czynnik wzrostu;  $\text{PtdIns}$  — fosfatydylo-1-inozytol;  $\text{PtdIns(4)P}$  — fosfatydylo-inozytolo-4-fosforan;  $\text{PtdIns(4,5)P}_2$  — fosfatydyloinozytolo-4,5-bisfosforan.

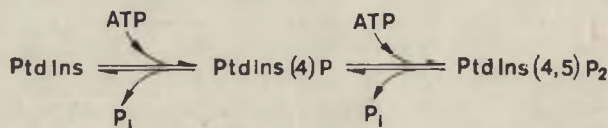
i  $H_1$  — dla histaminy. Łatwo zauważyć, że są to receptory odpowiedzialne za aktywację cykazy guanylowej i powstawanie cyklicznego GMP.

Rozkład lipidów inozytowych, wywołany działaniem sygnałów pierwotnych jest zjawiskiem rozpowszechnionym w organizmach żywych. U zwierząt obserwowano go w wielu tkankach: wątrobie, mózgu, śliniankach, mięśniach, komórkach krwi, fibroblastach, gruczołach dokrewnych, nowotworach itp. (1—6).

Lipidy inozytowe występują w komórkach bakterii, roślin i zwierząt. Są one na ogół zlokalizowane po wewnętrznej stronie błony plazmatycznej. Odnaczają się specyficznym składem kwasów tłuszczowych z dużą przewagą stearynianu i arachidonianu, występujących w stosunku 1:1. W fosfolipidach inozytowych płytek krwi kwasy te stanowią ponad 85% ogólnej zawartości reszt acylowych (7).

Głównym inozytowanym składnikiem błon jest fosfatydylo-1-inozytol (PtdIns). Z niego to pod wpływem kinaz błony komórkowej powstają kolejno fosfatydyloinozytolo-4-fosforan (PtdIns(4)P) oraz fosfatydyloinozytolo-4,5-bisfosforan (PtdIns(4,5)P<sub>2</sub>). Uważa się, że to właśnie ten ostatni jest odbiorcą sygnałów receptorowych i prekursorem przekaźników wtórnych.

Niemale zainteresowanie wzbudza fakt, że fosforylacja PtdIns może zachodzić pod wpływem kinaz będących produktami onkogenów *src*, wirusa sarkomy Rousa i *ros*, wirusa sarkomy ptasiej. Obok kinaz w komórkach działają także fosfatazy lipidów inozytowych. Współdziałanie kinaz i fosfataz prowadzi do powstania cyklicznego:



Do tego energetycznie kosztownego cyklu nie dochodzi, gdy pod wpływem odpowiedniego sygnału pierwotnego zajdzie reakcja hydrolizy PtdIns(4,5)P<sub>2</sub>:



Ta właśnie reakcja jest kluczowym etapem układu regulacyjnego z udziałem lipidów inozytowych. Katalizują ją fosfodiesteraza (fosfolipaza C). Mechanizm, za pomocą którego informacja z receptora zostaje przekazana na fosfodiesterazę nie został dotąd jednoznacznie wyjaśniony. Postuluje się, że zmiana konformacji receptora zaburza strukturę błony w taki sposób, że PtdIns(4,5)P<sub>2</sub> staje się dostępny dla enzymu. Wiele przemawia za tym, że łącznikiem między fosfodiesterazą a receptorem może być białko wiążące GTP, podobnie jak ma to miejsce w układzie cykazy adenylanowej. W wielu tkankach nukleotydy guanylowe stymulują procesy zależne od lipidów inozytowych.

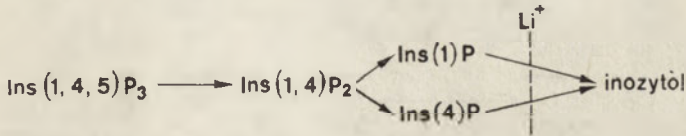
Produktami hydrolizy PtdIns(4,5)P<sub>2</sub> są 1,2-diacylglicerol oraz *myo*-inozytolo-1,4,5-trifosforan (InsP<sub>3</sub>). Znalaziono też śladowe ilości *myo*-inozytolo-1,3,4-trifosforanu, ale rola tego związku nie jest na razie znana. W wielu tkankach i narządach zaobserwowano wzrost stężenia InsP<sub>3</sub> pod wpływem hormonów i innych substancji sygnałowych. Wzrost ten idzie w parze z wewnątrzkomórkową mobilizacją jonów wapnia, będąc jej przyczyną, a nie skutkiem, jak pierwotnie sądzono. Wapń staje się więc jak gdyby trzecim przekaźnikiem, pobudzającym już bezpośrednio różne procesy komórkowe.

Dodając InsP<sub>3</sub> do permeabilizowanych komórek, utrzymywanych w środowisku o niskich stężeniach Ca<sup>2+</sup>, już po 1—2 sek. uzyskiwano wzrost stężenia tego jonu, utrzymujący się ponad 60 sek. Szybkość ta odpowiada czasowi odpowiedzi badanych komórek na bodźce uwalniające InsP<sub>3</sub> z lipidów inozytowych. InsP<sub>3</sub> mobilizuje



wapń z retikulum endoplazmatycznego, ale nie mobilizuje go z mitochondriów. Wykazano to, stosując odpowiednie inhibitory oraz warunki sprzyjające nagromadzeniu wapnia w jednym z tych dwu „magazynów”. Wydaje się, że  $\text{InsP}_3$  pobudza mechanizm uwalniania  $\text{Ca}^{2+}$  z retikulum, ale nie wpływa na transport do wnętrza i gromadzenie wapnia, ani też za odpowiedzialną z ten proces ATPazę. Działanie  $\text{InsP}_3$  ogranicza się prawdopodobnie tylko do części retikulum, wyposażonej w odpowiednie receptory (4, 8, 9).

Działanie  $\text{InsP}_3$  na mobilizację wapnia jest wysoce swoiste. Inozytlobis- i monofosforany nie wykazują żadnej aktywności, podobnie jak *myo*-inozytol. Ma to tym większe znaczenie fizjologiczne, że w komórkach  $\text{InsP}_3$  ulega błyskawicznie defosforylacji do nieaktywnych związków.



Fosfataza  $\text{InsP}_3$  jest zlokalizowana w błonie. Jest to enzym wysoce aktywny. Następnie działają fosfatazy cytoplazmatyczne. Hydroliza inozytolomonofosforanów do inozytolu jest hamowana przez sole litu (10). Inozytol jest niezbędny dla resyntezy lipidów inozytolołowych, a więc  $\text{Li}^+$  może hamować cały układ przetwarzania informacji z ich udziałem. Uważa się, że ten właśnie mechanizm może leżeć w podłożu działania  $\text{Li}^+$  jako leku psychotropowego, czy czynnika hamującego wydzielanie hormonów. Szybki rozkład  $\text{InsP}_3$  w komórce sprawia, że ma on krótkotrwałe działanie, tak typowe dla wszystkich przekaźników wtórnych.

Drugim sygnałem wtórnym, wyzwalanym z fosfolipidów inozytolołowych jest digliceryd, zawierający jedną nienasyconą resztę acylową (przeważnie arachidonową). Związkowi temu przypisuje się duże znaczenie jako naturalnemu aktywatorowi kinazy białkowej C, uczestniczącej w procesach egzocytozy, wzrostu i proliferacji komórek. Niezastąpionym aktywatorem tego enzymu jest fosfatydyloseryna, wiążąca się z hydrofobową domeną kinazy C. W nieobecności DG kinaza jest jednak aktywna jedynie w środowisku o bardzo wysokich stężeniach  $\text{Ca}^{2+}$ . DG zwiększa powinowactwo enzymu wobec wapnia do tego stopnia, że pełna aktywność występuje już w fizjologicznych jego stężeniach. Działanie DG jest swoiste i ani mono- ani triglicerydy lub wolne kwasy tłuszczowe nie wykazują aktywności. Nieodwracalną aktywację kinazy C wywołują analogi DG, estry forbolowe, znane jako sytmulatory wzrostu nowotworowego (5, 6). Jak wykazano, zarówno substancje sygnałowe, pobudzające rozkład  $\text{PtdIns}(4,5)\text{P}_2$ , jak i syntetyczne DG, zawierające nienasycony acyl stymulują fosforylację białek, znanych jako substraty kinazy C (białko 40K płytek krwi, białka komórek nowotworowych itp.) (11).

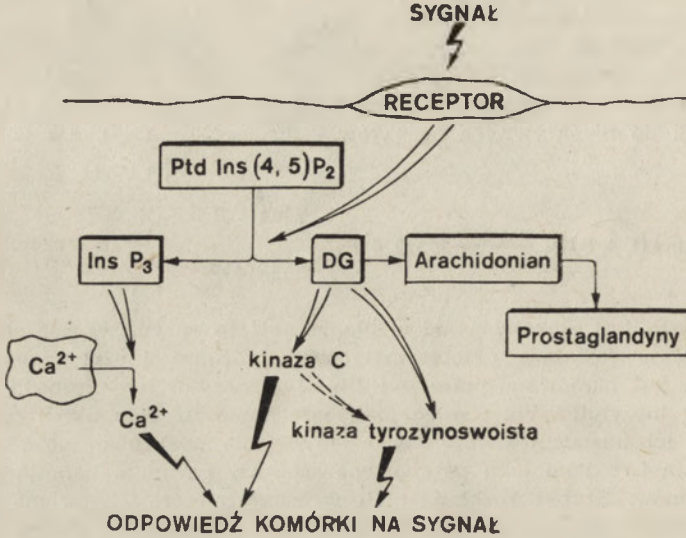
Pojawiły się też doniesienia na temat aktywacji kinaz tyrozyno-swoistych. DG i estry forbolowe pobudzały fosforylację reszt tyrozynowych peptydu 43K fibroblastów zarodka kureczęcia, imitując pod tym względem działanie czynników wzrostu i białek transformujących. Działanie takie byłoby niezależne, lub tylko pośrednio zależne od kinazy C, gdyż ta ostatnia katalizuje fosforylację reszt serynowych i treoninowych, ale nie katalizuje fosforylacji reszt tyrozynowych (12).

Podobnie jak to się ma w przypadku innych przekaźników wtórnych, DG jest szybko usuwany z komórki. Może to nastąpić drogą aktywacji do kwasu fosfatydowego, a następnie do CDP-diglicerydu, co prowadzi do resyntezy lipidów inozytolołowych. Inną możliwością jest hydroliza DG z uwolnieniem kwasów tłuszczowych. Ponieważ jednym z nich jest arachidonian, jest to droga wiodąca do syntezy prostaglandyn  $\text{PG}_2$ , a w płytkach krwi także tromboksanu.

Jak widać z wyżej przytoczonych danych, każdy z sygnałów wtórnych, uwal-



nianych z lipidów inozytowych ma odmienny mechanizm działania:  $\text{InsP}_3$  jest odpowiedzialny za mobilizację wapnia, zaś DG za aktywację kinazy białkowej C, a może i kinazy tyrozyno-swoistej. Schemat działania obu przekaźników przedstawiono na Rys. 1. Rozpatrując biologiczne efekty stymulacji układu lipidów inozytowych musimy brać pod uwagę oba te mechanizmy.



Rys. 1. Udział lipidów inozytowych w przetwarzaniu informacji w komórkach.

W wielu przypadkach działanie obu przekaźników wtórnych  $\text{InsP}_3$  i DG, jest synergiczne. Niezależność, a zarazem synergizm ich działania można wykazać na przykładzie płytek krwi. Fizjologiczną odpowiedzią tych komórek na trombinę i PAF jest sekrecja serotoniny. Towarzyszy jej fosforylacja białka 40K. DG i estry forbolowe, wprowadzone do płytek stymulują, zgodnie z oczekiwaniem fosforylację, serotonina jest jednak wydzielana w znacznie mniejszych ilościach niż pod wpływem naturalnych bodźców. Pełny efekt fizjologiczny uzyskuje się dopiero po dodaniu jonoforów, zwiększających stężenie wapnia w komórce (7, 13).

Synergiczne działanie  $\text{InsP}_3$  i DG wykazano także w innych komórkach, w których egzocytoza jest związana z hydrolizą lipidów inozytowych. Zarówno aktywacja kinazy C jak i mobilizacja wapnia są niezbędne dla maksymalnego wydzielania histaminy z komórek tucznych, adrenaliny z rdzenia i aldosteronu z kory nadnerczy oraz insuliny z trzustki (5, 14, 15).  $\text{InsP}_3$  uczestniczy także w regulacji wydzielania parathormonu z przytarczyc (16).

Obydwa przekaźniki wtórne zdają się odgrywać rolę w procesach proliferacji komórek pobudzanych przez mitogeny i czynniki wzrostu (6, 17, 18). Rola kinazy C w tych procesach polega między innymi na fosforylacji i aktywacji nośnika  $\text{Na}^+/\text{H}^+$  w błonie plazmatycznej, co powoduje wzrost pH cytoplazmy. Alkaliczacja taka wydaje się konieczna dla inicjacji replikacji DNA i proliferacji. Syntetyczne DG i estry forbolowe wywołują wzrost pH w cytoplazmie fibroblastów, komórek HeLa, neuroblastoma itp. (19). DG pobudzają też pobieranie heksoz, rozrywanie włókienek aktyny i inne procesy, uważane za następstwo aktywacji kinaz białkowych przez czynniki wzrostowe (18).

Od dawna wiąże się proliferację komórek z mobilizacją wapnia. Rozkład  $\text{PtdIns}(4,5)\text{P}_2$  idzie w parze z mobilizacją  $\text{Ca}^{2+}$  obserwowaną w zapłodnionych

jajach żełowca i różnicujących się keratynocytach. Iniekcja  $\text{InsP}_3$  do oocytów rozgwiezdy wywołuje zmiany błonowe typowe dla zapłodnienia i wczesnych etapów rozwoju. Stężenie  $\text{InsP}_3$  wzrasta w komórkach pobudzanych przez PDGF, bombesynę, wazopresynę i inne czynniki wzrostowe (4).

Duże zainteresowanie wzbudza hipoteza o możliwym powiązaniu między działaniem niektórych onkogenów a układem regulacji z udziałem lipidów inozytowych. Jak już wspomniano, produkty onkogenów *src* i *ros* mogą fosforylować PtdIns i PtdIns(4)P. Onkogen *sis* jest związany z produkcją PDGF, a *erb-B* koduje receptor EGF — wiadomo zaś, że czynniki te działają poprzez lipidy inozytowe. Sugeruje się, że produkt onkogenu *ras* może być aktywatorem fosfodiesterazy (20).

$\text{InsP}_3$  zdaje się spełniać znaczącą rolę w procesach widzenia. Przypuszczalnie jest on od dawna poszukiwanym łącznikiem między wychwytem fotonów przez fotoreceptory oka a impulsem elektrycznym i bodźcem nerwowym. Pod wpływem fotonów zmniejsza się zawartość PtdIns(4,5) $\text{P}_2$  w błonie fotoreceptorów, wzrasta zaś stężenie  $\text{InsP}_3$  w komórce.  $\text{InsP}_3$  wprowadzony do fotoreceptorów oka kraba i wołu wywołuje zmiany podobne do tych, jakie powoduje światło, a mianowicie powoduje uwolnienie  $\text{Ca}^{2+}$  z dysków zewnętrznej części pałeczek siatkówki do cytoplazmy (4, 21).

Wymienione przykłady efektów fizjologicznych, wywoływanych przez przeznaczniki wtórne powstające z lipidów inozytowych wskazują jak ważne miejsce zajmują te ostatnie w procesach regulacji. Badania na ten temat zaczęły się stosunkowo niedawno i można przypuszczać, że najbliższa przyszłość przyniesie wiele nowych faktów i informacji, które umożliwią dokładne umiejscowienie tego nowego typu regulacji w złożonym schemacie kontroli procesów biologicznych.

Zaakceptowano do druku 6 stycznia 1986 r.

## PISMIENNICTWO

- Berridge M. J., (1984), *Biochem. J.*, **220**, 345—360.
- Nishizuka Y., (1983), *Trends Biochem. Sci.*, **8**, 13—15.
- Joseph S. K., (1984), *Trends Biochem. Sci.*, **9**, 420—421.
- Berridge M. J., Irvine R. F., (1984), *Nature*, **312**, 315—321.
- Nishizuka Y., (1984), *Nature*, **308**, 693—698.
- Nishizuka Y., (1984), *Trends Biochem. Sci.*, **9**, 163—166.
- Mauco G., Dangelmaier C. A., Smith J. B., (1984), *Biochem. J.*, **224**, 933—940.
- Carsten M., Miller J. D., (1985), *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **130**, 1027—1031.
- Streb H. P., Irvine R. F., Berridge M. J., Schultz I., (1983), *Nature*, **306**, 67—69.
- Storey D. J., Shears S. B., Kirk C. J., Mitchell R. H., (1984), *Nature*, **312**, 374—376.
- Tapley P. M., Murray A. W., (1984), *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **122**, 158—164.
- Gilmore T., Martin G. S., (1983), *Nature*, **306**, 487—490.
- Naka M., Nishikawa M., Adelstein R. S., Hidaka H., (1983), *Nature*, **306**, 490—492.
- Hadjian A. J., Cully M., Chambaz E., (1984), *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **124**, 393—399.

15. Whitaker M., (1985), *FEBS Lett.*, **198**, 137—140.
16. Epstein P. A., Prentki M., Atie M. F., (1985), *FEBS Lett.*, **188**, 141—144.
17. Ziboh V. A., Iseroff R. R., Pandey R., (1984), *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **122**, 1234—1240.
18. Vicentini L. M., Villereal M. L., (1984), *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **123**, 663—667.
19. Moolenaar W. H., Tertoolen L. G. J. de Laat S. W., (1984), *Nature*, **312**, 371—374.
20. Michell B., (1984), *Nature*, **308**, 770.
21. Ghalayini A., Anderson R. I., (1984), *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **124**, 503—506.



## ARTYKUŁY

JERZY DZIUBA \*)

### **Molekularne i koloidalne aspekty micelarnej struktury kazeiny**

**Molecular and colloidal aspects of the micellar casein structure**

#### *Spis treści*

- I. Wstęp**
- II. Skład miceli kazeinowych**
- III. Heterogenność kazeiny**
- IV. Molekularna charakterystyka kazeiny**
- V. Budowa miceli kazeinowej**
  - V-1. Rola koloidalnego fosforanu wapnia**
  - V-2. Submicelarna budowa miceli kazeinowej**
  - V-3. Położenie kazeina  $\alpha$  w miceli kazeinowej**
- VI. Podsumowanie**

#### *Contents*

- I. Introduction**
- II. Composition of casein micelle**
- III. Heterogeneity of casein**
- IV. Molecular characteristic of casein**
- V. Structure of casein micelle**
  - V-1. Role of colloidal calcium phosphate**
  - V-2. Submicellar structure of casein micelle**
  - V-3. Location of  $\alpha$ -casein in the casein micelle**
- VI. Summary**

### **I. Wstęp**

W świecie żywnym występuje wiele układów białkowych powstających na drodze asocjacji monomerycznych podjednostek (1). Takie

Wykaz stosowanych skrótów: NANA — kwas N-acetylneuraminowy; Gal — galaktoza; GalNAc — N-acetylogalaktozoamina.

\*) Doc. dr hab. Zakład Biochemii Żywności, Instytut Fizyki i Chemii Żywności ART, Olsztyn.

asocjaty mają trwałą strukturę i składają się z kilku identycznych lub różnych podjednostek, a także mogą składać się z wielu identycznych podjednostek. Kazeina w mleku występuje w postaci porowatych, sferycznych cząstek o znacznych rozmiarach, określanych jako micelle kazeinowe. Spośród wielu innych systemów białkowych micelarna kazeina wyróżnia się co najmniej z dwóch powodów. Po pierwsze, chociaż micelle są duże i mają trwałą strukturę, to jednak charakteryzują się bardzo dużą zmiennością. Najmniejsze micelle o średnicy około 25 nm mają około 450 monomerycznych podjednostek (2), natomiast największe micelle o średnicy przekraczającej 150 nm mogą zawierać ponad 10 000 podjednostek (3). Po drugie, nawet tak duża liczba podjednostek agreguje w sposób uporządkowany tworząc micelle z czterech głównych, nieidentycznych podjednostek kazeiny  $\alpha_{s1}$ ,  $\alpha_{s2}$ ,  $\beta$  i  $\kappa$ .

Właściwości miceli kazeinowych w dużym stopniu determinują zachowanie mleka w trakcie technologicznych procesów, takich jak pasteryzacja, sterylizacja, zagęszczanie oraz tworzenie skrzepu podczas produkcji sera.

W artykule dokonano oceny najnowszych koncepcji budowy miceli kazeinowej w aspekcie jej molekularnych i koloidalnych właściwości. Szczególną uwagę poświęcono położeniu kazeiny  $\kappa$  ze względu na jej zasadniczą rolę w stabilizowaniu miceli kazeinowej.

## II. Skład miceli kazeinowych

Micelle kazeinowe przede wszystkim składają się z białek, lecz zawierają także małe, ale istotne, ilości nieorganicznych składników, z któ-

Tabela 1

Przybliżony skład micel kazeinowych w mleku krowim.

Składnik	Zawartość	Pišmiennictwo
	(g/100 g micel)	
Kazeina $\alpha_{s1}$	33	4
Kazeina $\alpha_{s2}$	11	4
Kazeina $\beta$	33	4
Kazeina $\kappa$	11	4
Kazeina $\gamma$ , R, S, TS	4	4
Wapń	2,9	4
Fosforan	4,0	4
Cytryniany	0,5	4
NANA	0,3	5
Gal	0,2	5
GalNac	0,1	5

rych najważniejszymi są wapń i fosforan (Tabela 1). Część białkowa miceli składa się głównie z czterech różnych podjednostek kazeiny  $\alpha_{s1}$ ,  $\alpha_{s2}$ ,  $\beta$  i  $\kappa$ , które występują w stosunku zbliżonym do 3:1:3:1 (4). Ponadto w micelach występują w mniejszych ilościach takie składniki kazeiny, jak  $\gamma_1$  (kazeina  $\gamma$ ),  $\gamma_2$  (kazeina TS i S),  $\gamma_3$  (kazeina R) i  $\lambda$  (6, 7). Stanowią one C-kończącą sekwencję kazeiny  $\beta$  (8—10), z wyjątkiem kazeiny  $\lambda$ , która jest fragmentem kazeiny  $\alpha_{s1}$  (11). Wszystkie te składniki powstają w wyniku post-wydzielniczej proteolizy kazeiny  $\beta$  i  $\alpha_{s1}$  (11—14).

### III. Heterogenność kazeiny

Kazeinę można rozdzielić na 20 frakcji białkowych metodą elektroforezy w żelach skrobiowym i poliakryloamidowym w obecności 4—6 M mocznika i czynnika redukującego (15—18). Ta znaczna heterogenność kazeiny może być rozpatrywana jako mikroheterogenność wynikająca ze zróżnicowanego stopnia ufosforylowania, glikozylocji lub genetycznie kontrolowanej substytucji aminokwasów.

Kazeina  $\alpha_{s1}$  jest mieszaniną dwóch białek, kazeiny  $\alpha_{s0}$  i  $\alpha_{s1}$ , które mają taki sam łańcuch polipeptydowy (Ryc. 1), lecz odpowiednio 8 i 9 moli fosforanów na mol białka (19).

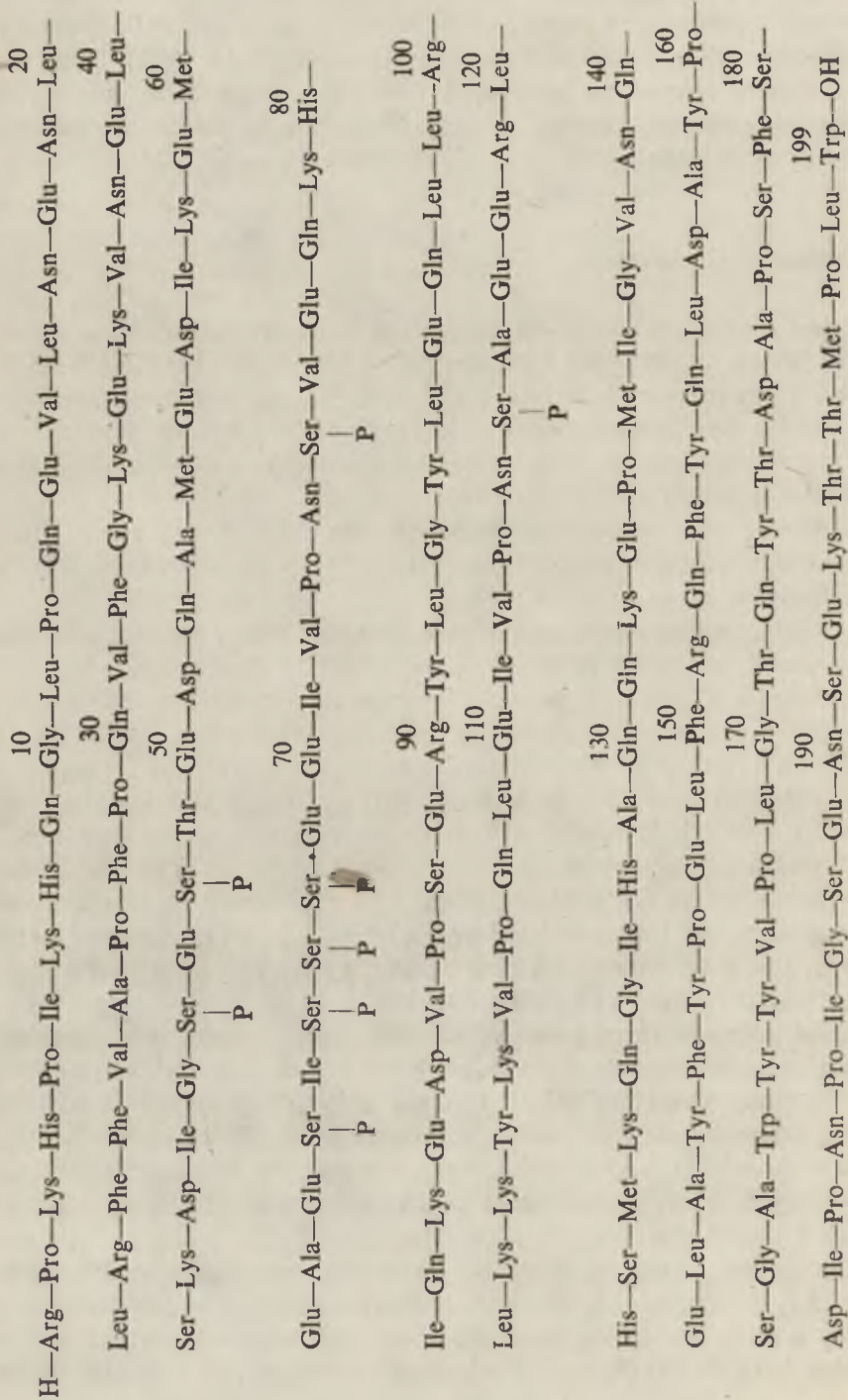
Kazeina  $\alpha_{s2}$  jest mieszaniną czterech białek, kazeiny  $\alpha_{s2}$ ,  $\alpha_{s3}$ ,  $\alpha_{s4}$  i  $\alpha_{s6}$ , o takiej samej sekwencji aminokwasowej (Ryc. 2), lecz odpowiednio zawierających 13, 12, 11 i 10 moli fosforanów na mol białka (20).

Kazeina  $\beta$  i  $\kappa$  mają stałą liczbę reszt fosforanowych, odpowiednio 5 i 1 (21). Na rycinach 3 i 4 przedstawiono sekwencję aminokwasową i położenie reszt fosforanowych w kazeinie  $\beta$  (Ryc. 3) i kazeinie  $\kappa$  (Ryc. 4). Wrażliwość różnych składników kazeiny na strącanie przez jony wapniowe wzrasta z liczbą reszt fosforanowych (22—25). W kazeinie  $\kappa$  występuje jedna reszta fosforanowa, stąd jej rozpuszczalność w obecności jonów wapniowych. Cząsteczki kazeiny  $\kappa$  mogą asocjować z cząsteczkami kazeiny  $\alpha_s$  i  $\beta$ , a w obecności jonów wapniowych chronią je przed strącaniem, tworząc trwałe koloidalne cząstki (23, 26).

Spośród różnych form kazeiny, kazeina  $\kappa$  jest jedyną glikoproteiną. Jej reszta węglowodanowa zbudowana jest z kwasu N-acetyloneuraminowego (NANA), galaktozy (Gal) i N-acetylgalaktozoaminy (GalNAc) w formie trisacharydu lub tetrasacharydu (Ryc. 5). W kazeinie  $\kappa$  występuje od 0 do 5 moli NANA/mol białka oraz od 0 do 3 łańcuchów oligosacharydowych, które są związane z łańcuchem polipeptydowym głównie przez Thr 133 oraz Thr 131 i Thr 135.

Poszczególne formy kazeiny są hydrolizowane przez podpuszczkę (EC 3.4.23.4) w różnym zakresie. Podstawowym substratem jest kazeina  $\kappa$ , w której z dużą szybkością hydrolizowane jest wiązanie pomiędzy Phe 105 a Met 106 (28, 29) (Ryc. 4). Proteoliza kazeiny  $\alpha_{s1}$  i  $\beta$  zachodzi znacz-





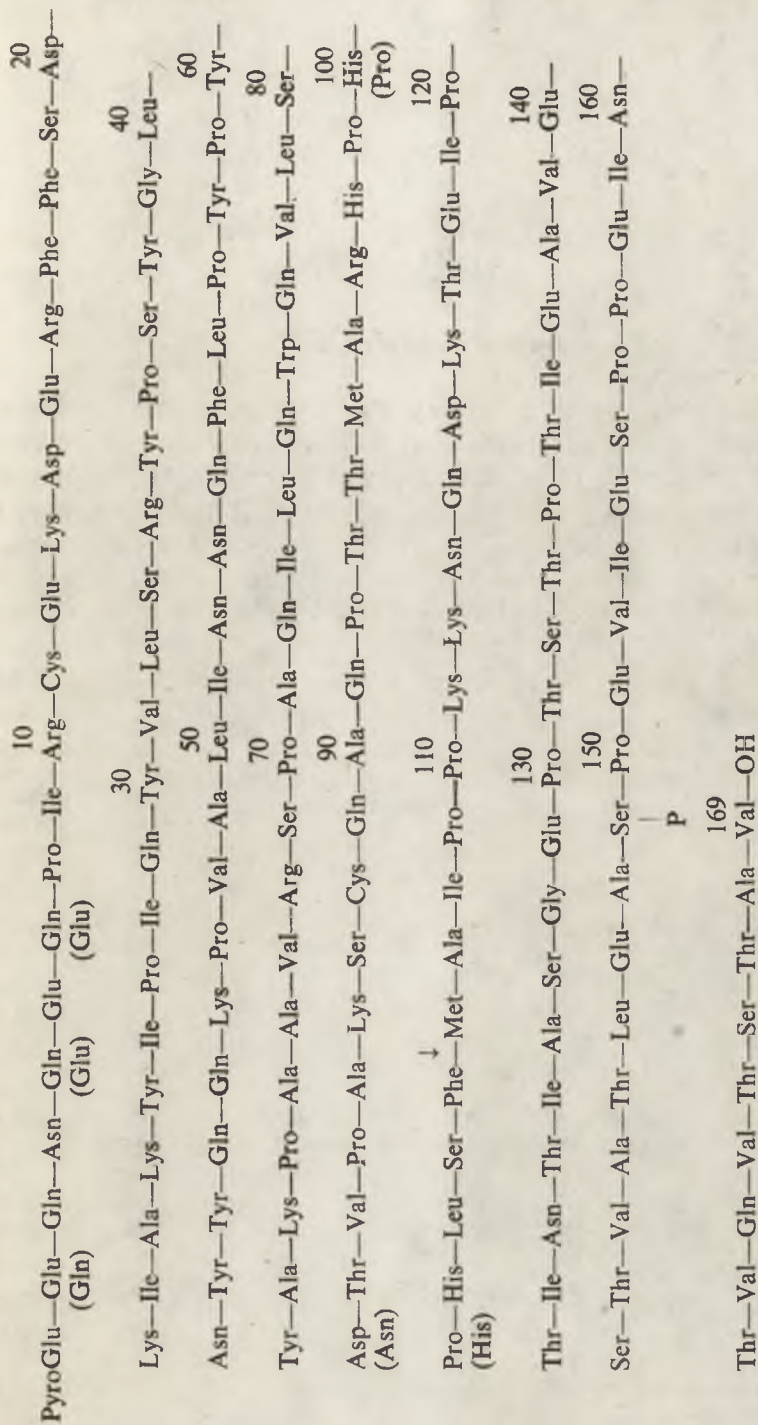
Ryc. 1. Sekwencja aminokwasowa wariantu genetycznego B kazełny  $\alpha_{51}$  (39)

10  
 H—Lys—Asn—Thr—Met—Glu—His—Val—Ser—Ser—Glu—Glu—Ser—Ile—Ser—Gln—Glu—Thr—Tyr—  
 P P P  
 20  
 Lys—Gln—Glu—Lys—Asn—Met—Ala—Ile—Asn—Pro—Ser—Lys—Glu—Asn—Leu—Cys—Ser—Thr—Phe—Cys—  
 30  
 40  
 Lys—Glu—Val—Val—Arg—Asn—Ala—Asn—Glu—Glu—Tyr—Ser—Ile—Gly—Ser—Ser—Ser—Glu—Glu—  
 50  
 60  
 Ser—Ala—Glu—Val—Ala—Thr—Glu—Glu—Val—Lys—Ile—Thr—Val—Asp—Asp—Lys—His—Tyr—Gln—Lys—  
 70  
 P  
 Ala—Leu—Asn—Glu—Ile—Asn—Glu—Phe—Tyr—Gln—Lys—Phe—Pro—Gln—Tyr—Leu—Gln—Tyr—  
 80  
 100  
 Gln—Gly—Pro—Ile—Val—Leu—Asn—Pro—Trp—Asp—Gln—Val—Lys—Arg—Asn—Ala—Val—Pro—Ile—Thr—  
 110  
 120  
 Pro—Thr—Leu—Asn—Arg—Glu—Gln—Leu—Ser—Thr—Ser—Glu—Glu—Asn—Ser—Lys—Lys—Thr—Val—Asp—  
 130  
 P P  
 140  
 Met—Glu—Ser—Thr—Glu—Val—Phe—Thr—Lys—Lys—Thr—Lys—Leu—Thr—Glu—Glu—Lys—Asn—Arg—  
 150  
 P  
 160  
 Leu—Asn—Phe—Leu—Lys—Lys—Ile—Ser—Gln—Arg—Tyr—Gln—Lys—Phe—Ala—Leu—Pro—Gln—Tyr—Leu—  
 170  
 180  
 Lys—Thr—Val—Tyr—Gln—His—Gln—Lys—Ala—Met—Lys—Pro—Trp—Ile—Gln—Pro—Lys—Thr—Lys—Val—  
 190  
 200  
 Ile—Pro—Tyr—Val—Arg—Tyr—Leu—OH  
 207

Ryc. 2. Sekwencja aminokwasowa wariantu genetycznego A kazeiny  $\alpha_{52}$ ; **Tho** i **Ser** — prawdopodobne, dodatkowe miejsca fosforylacji (20)

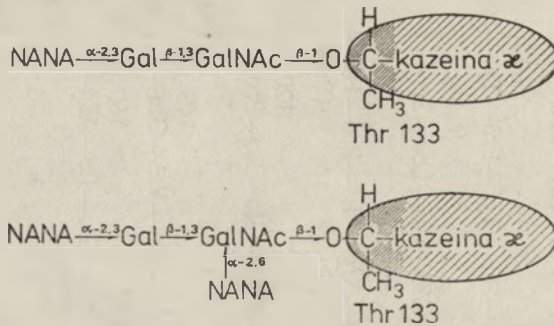






Ryc. 4. Sekwencja aminokwasowa wariantu genetycznego B kazeiny \* (45)

nie wolniej (30—36), podczas gdy kazeina  $\alpha_{s2}$  jest niemal całkowicie odporna na działanie podpuszczki (37, 38).



Ryc. 5. Sekwencja tri- i tetrasacharydu kazeiny  $\alpha$  (27)

Wszystkie główne białka kazeiny wykazują genetyczny polimorfizm spowodowany na ogół podstawieniem jednego lub dwóch aminokwasów, a niekiedy brakiem do 13 reszt aminokwasowych (20, 21, 40—45).

W tabeli 2 przedstawiono różnice w sekwencji aminokwasowej czterech głównych podjednostek kazeiny. Częstotliwość występowania poszczególnych wariantów genetycznych zależy od rodzaju i rasy bydła (46—52). Dotychczas nie stwierdzono żadnych istotnych różnic właści-

Tabela 2

Różnice w sekwencji aminokwasowej wariantów genetycznych czterech głównych podjednostek kazeiny.

Położenie reszt aminokwasowych	Wariant genetyczny						Piśmiennictwo
1. Kazeina $\alpha_{s1}$ 14—26 53 192	A brak Ala Glu	B Ala Glu	C występuje Ala Gly	D Thr.P Glu			39, 40
2. Kazeina $\alpha_{s2}$ 50—58 lub 51—53 lub 52—60	A występuje	B ?	C ?	D brak			20, 41, 42
3. Kazeina $\beta$ 35 36 37 67 106 122	A <sup>1</sup> Ser. P Glu Glu His His Ser	A <sup>2</sup> Ser. P Glu Glu Pro His Ser	A <sup>3</sup> Ser. P Glu Glu His Gln Ser	B Ser. P Glu Glu His His Arg	C Ser Glu Lys His His Ser	E Ser. P Lys Glu Pro His Ser	21, 39, 43
4. Kazeina $\kappa$ 136 148	A Thr Asp	B Ile Ala					44, 45

wości technologicznych mleka wynikających z obecności różnych wariantów genetycznych kazeiny, z wyjątkiem bardzo rzadkiego wariantu D kazeiny  $\alpha_{s1}$  i być może kazeiny  $\kappa$  (7).

#### IV. Molekularna charakterystyka kazeiny

We wcześniejszych badaniach ustalono sekwencję czterech głównych podjednostek kazeiny,  $\alpha_{s1}$ ,  $\alpha_{s2}$ ,  $\beta$  i  $\kappa$  (20, 39, 43, 44), co umożliwiło ich molekularną charakterystykę. Najbardziej znaczącą cechą tych struktur jest nieproporcjonalne rozmieszczenie aminokwasów kwaśnych, ufosforylowanej seryny oraz aminokwasów hydrofobowych wzdłuż łańcucha polipeptydowego (ryciny 1—4). Jak wykazali Bloomfield i Mead (53), nierównomierne rozmieszczenie aminokwasów w monomerycznych podjednostkach jest przyczyną występowania silnie ujemnie naładowanych fragmentów, które są oddzielone od fragmentów silnie hydrofobowych. Decyduje to o amfifilowym charakterze cząsteczek kazeiny. Są one podatne na interakcje pomiędzy sobą oraz polimeryzację za pomocą wiązań hydrofobowych i jonowych, szczególnie przy udziale jonów wapniowych (54).

Badania przy pomocy dichroizmu kołowego i dyspersji skręcalności optycznej wykazały, że cząsteczki kazeiny mają niewiele struktur drugo- i trzeciorzędowych (55—58). Przy wykorzystaniu metody Chou i Fasmana (59) określono (60), że kazeina  $\alpha_{s1}$  może mieć do 8%  $\alpha$ -heliksu, do 13% struktury  $\beta$  oraz zakręty łańcucha. Cząsteczka kazeiny  $\alpha_{s1}$  ma postać zwartej, wydłużonej elipsoidy zawierającej większość aminokwasów hydrofobowych oraz pętlę utworzoną głównie z aminokwasów kwaśnych i fosfoseryny, ułożoną w kierunku fazy wodnej. Zwarty hydrofobowy obszar cząsteczki jest stabilizowany wewnątrzcząsteczkowymi oddziaływaniami hydrofobowymi, podczas gdy część zewnętrzna, pętla o wysokim ładunku ujemnym w wyniku tworzenia się wiązań jonowych łatwo może wchodzić w interakcje z przylegającymi cząsteczkami kazeiny. Kazeina  $\alpha_{s2}$  zawiera obszary o strukturze  $\alpha$ -heliksu i  $\beta$ , które podobnie jak w kazeinie  $\alpha_{s1}$ , stanowią łącznie około 20% długości łańcucha polipeptydowego. Kazeina  $\beta$  może mieć do 14%  $\alpha$ -heliksu, 16% struktury  $\beta$  i 70% struktury nieuporządkowanej. Cząsteczka kazeiny  $\beta$  zbudowana jest ze zwartego obszaru hydrofobowego oraz fragmentu łańcucha polipeptydowego o wysokim ładunku ujemnym, pomiędzy 1—25 resztą, dostępnego dla środowiska wodnego. Kazeina  $\kappa$  może zawierać 21%  $\alpha$ -heliksu, 29% struktury  $\beta$  i około 20% zakrętów łańcucha. Cząsteczka kazeiny  $\kappa$  zbudowana jest również ze zwartego obszaru hydrofobowego oraz wyeksponowanego fragmentu łańcucha polipeptydowego, zawierającego znaczną część aminokwasów kwaśnych oraz ujemnie naładowaną sekwencję reszt węglowodanowych. Uważa się, że ta część kazeiny  $\kappa$  jest odpowie-



działna za stabilność micelnego systemu kazeiny (61—64). Odłączenie tej części, zwanej glikomakropeptydem, w wyniku działania podpuszczki, prowadzi do destabilizacji miceli kazeinowej. Wokół wiązania wrażliwego na działanie podpuszczki, Phe 105 — Met 106, występuje sekwencja aminokwasów 102—108, przyjmująca strukturę  $\alpha$ -heliksu. Sekwencja ta wykazuje również silną tendencję do tworzenia struktury  $\beta$ . Taki układ stwarza szczególne możliwości tworzenia się wiązań wodorowych z centrum aktywnym podpuszczki. Poza tym sekwencja 102—108 znajduje się między dwoma stabilnymi zakrętami łańcucha, co decyduje o łatwym dostępie enzymu do wiązania podatnego na hydrolizę (65).

Niska zawartość struktury helikalnej oraz struktury  $\beta$  w cząsteczkach kazeiny decyduje o ich znacznej podatności na enzymatyczną hydrolizę. Ponadto wysoka hydrofobowość kazeiny, szczególnie kazeiny  $\beta$  powoduje, że poptydy uwalniane w wyniku enzymatycznej hydrolizy są gorzkie (66). Omówione cechy struktury kazeiny stanowią niewątpliwą przyczynę ich wyższej podatności na enzymatyczną hydrolizę w porównaniu z białkami serwatkowymi. Ma to korzystne znaczenie w aspekcie żywieniowym, wywołuje jednak negatywne skutki ekonomiczne w przetwórstwie mleka, wynikające z hydrolizy kazeiny przez występujące w mleku proteazy, jak i dostające się do mleka w wyniku zakażeń — zewnątrzkomórkowe proteazy bakterii psychrotrofowych. Enzymy te nie hydrolizują białek serwatkowych (67).

Cząsteczki kazeiny  $\alpha_{s1}$  i  $\beta$  mogą wiązać znaczne ilości jonów wapniowych, co prowadzi do agregacji, a w konsekwencji do strącenia (22). Izotermy wiązania jonów wapniowych zostały przedstawione w pracach Dalglisha i Parkera (24, 25, 68). W normalnych warunkach kazeina  $\alpha_{s1}$  wiąże się do 10 moli  $\text{Ca}^{2+}$ /mol białka i 20 moli  $\text{Ca}^{2+}$ /mol białka przy wysokim stężeniu jonów wapniowych. Wiązanie jonów wapniowych, które zależy od temperatury, pH i siły jonowej, odbywa się prawdopodobnie głównie przy pomocy reszt fosfoserynowych, a przy wysokich stężeniach jonów wapniowych również przy udziale reszt asparaginy i glutaminowych kazeiny. Wiązanie jonów wapniowych zmniejsza ładunek cząsteczek białkowych umożliwiając ich asocjację. W przypadku kazeiny  $\alpha_{s1}$  tworzą się najpierw oktamery, które dalej agregują aż do strącenia przy wyższym stężeniu jonów wapniowych. Mechanizm asocjacji kazeiny  $\beta$  w środowisku jonów wapniowych nie został jeszcze tak dokładnie poznany jak kazeiny  $\alpha_{s1}$ , jednak jest on podobny w ogólnym zarysie.

Kazeina  $\kappa$ , które nie ma większej liczby reszt fosforanowych, wiąże  $\text{Ca}^{2+}$  znacznie słabiej i jest rozpuszczalna w jego obecności. Kazeina  $\kappa$  asocjuje z kazeiną  $\alpha_s$  i  $\beta$ , a w obecności jonów wapniowych chroni je przed strąceniem. Powstają wtedy koloidalne cząstki, które generalnie są podobne, lecz nieco mniej stabilne od natywnych miceli kazeiny (23, 26).

## V. Budowa miceli kazeinowej

### V-1. Rola koloidalnego fosforanu wapnia

W normalnym mleku około 95% kazeiny występuje w postaci micelarnych cząstek o masie cząsteczkowej około  $10^8$  i przeciętnej średnicy 130 nm. Niektóre inne właściwości miceli kazeinowych zestawiono w Tabeli 3. 92% suchej masy miceli stanowią białka, a około 6% małe jony, głównie wapniowe, fosforanowe, magnezowe i cytrynianowe, powszechnie określane jako koloidalny fosforan wapniowy. W ciągu ostatnich 10 lat niewiele uwagi poświęcono koloidalnemu fosforanowi wapniowemu. Z wcześniejszych badań wynikało, że koloidalny fosforan wapniowy jest prawdopodobnie kompleksem apatytowo związanego trzeciorzędowego fosforanu wapniowego  $[Ca_3(PO_4)_2]$  i cytrynianu wapniowego (75—78).

Tabela 3

Fizyko-chemiczne właściwości micel kazeinowych mleka krowiego

Charakterystyka	Wartość	Piśmiennictwo
Kazeina w stanie micelarnym		
0—5°C	75—80%	54
25°C	95—98%	54
Średnica, nm	100—250	53, 69, 70
Stała sedymentacji, $S_{20,w}$	$8-22 \times 10^2 S$	54
Masa cząsteczkowa	$2-18 \times 10^8$	71—73
Solwatacja, g wody/g suchych micel		
0—5°C	2—3	54—74
25°C	1,6—2	54
Objętość właściwa, $cm^3 \cdot g^{-1}$		
25°C	3,5—6	54

W roztworach nie zawierających białka trzeciorzędowy fosforan wapniowy może występować w znacznych ilościach tylko w środowisku o pH 8 (79). W mleku, a więc środowisku o pH 6,7, przekształcenie fosforanu wapniowego w bardziej stałą formę, na przykład hydroksyapatyt, jest zahamowane. Przy stosunku molowym magnezu do wapnia w mleku odtłuszczonym (średnio 0,18) przekształcenie amorficznego trzeciorzędowego fosforanu wapniowego w krystaliczny hydroksyapatyt jest całkowicie hamowane (80). Obecność kazeiny ponadto zapobiega flokulacji koloidalnego fosforanu. Na podstawie tych obserwacji i wyników badań składu koloidalnego fosforanu w sztucznych systemach miceli kazeinowych Schmidt i w sp. (81) wysunęli hipotezę, że natura koloidalnego fosforanu wapniowego jest podobna do amorficznego fosforanu triwapniowego. Ostatnio, na podstawie pomiarów pozornego ilo-



czynu rozpuszczalności, *Chaplin* (82) wysunął wniosek, że struktura koloidalnego fosforanu wapniowego jest podobna do struktury fosforanu diwapniowego  $\text{Ca}(\text{HPO}_4)_{0,7}(\text{PO}_4)_{0,2}$ .

Sposób wiązania koloidalnego fosforanu z kazeiną nie jest dokładnie wyjaśniony. Na podstawie obrazów z mikroskopu elektronowego, koloidalny fosforan wapniowy można sobie wyobrazić jako całkowicie chromione przed kontaktem z fazą wodną cząsteczki łączące submicelle wewnątrz miceli (83—85).

#### V-2. Submicelarna budowa miceli kazeinowej.

W mleku, z którego w różny sposób zostaje usunięty koloidalny fosforan, micelle ulegają dezintegracji do znacznie mniejszych cząstek złożonych z licznych monomerycznych podjednostek kazeiny (69, 79, 83, 85—88). Cząstki te zawierają w przybliżeniu 0,2 mmole  $\text{Ca}^{2+}/\text{g}$  kazeiny (77) i podczas dializy wobec systemów buforowych bez wapnia rozpadają się do wolnych cząsteczek kazeiny (4). Kompleksy różnych cząsteczek kazeiny, określane przez *Slattery'ego* (89) jako submicelle, są widoczne w mikroskopie elektronowym (69, 85, 86). Na rycinie 6 przedstawiono elektronogram micel kazeinowych mleka krowiego, gdzie łatwo



Ryc. 6. Elektronogram micel kazeinowych mleka krowiego (obraz uzyskany techniką skaningowej mikroskopii elektronowej)



można zauważyć submicelle. Zdjęcie uzyskano techniką skaningowej mikroskopii elektronowej.

W historii rozwoju poglądów na strukturę miceli kazeinowej znaczące miejsce zajmują hipotezy Rosego (90) Waugh'a i wsp. (22, 91) oraz Garniera i Ribadeau-Dumas (92). Pełną krytykę tych hipotez przeprowadził Slattery (89). Aktualnie najbardziej prawdopodobna wydaje się hipoteza zakładająca submicelarną budowę miceli kazeinowej. Po raz pierwszy taką hipotezę wysunęli Slattery i Evard (93, 94). Na podstawie amfifilowej budowy poszczególnych cząsteczek kazeiny, autorzy ci przedstawili mechanizm powstawania zarówno submiceli jak i miceli kazeinowej. Według Slattery'ego i Evarda submicelle stanowią sferyczne agregaty cząsteczek trzech głównych form kazeiny utworzone z co najmniej 30 monomerycznych podjednostek. Względna ilość każdej z trzech form kazeiny może być zmienna w miceli kazeinowej. Uwzględniając proporcje, w jakich różne formy kazeiny występują w mleku, oraz przyjmując, że wzrost miceli jest zahamowany, kiedy zewnętrzną jej powierzchnię stanowi kazeina  $\kappa$ , Slattery i Evard przedstawili minimalną micelę jako agregat 14 submiceli połączonych wiązaniami hydrofobowymi. Średnica submiceli, zarówno obliczona, jak i wyznaczona eksperymentalnie, wynosi 15—20 nm, jest mniejsza niż średnica agregatów, na przykład cząsteczek kazeiny  $\beta$  (83, 86, 95, 96). Wynika stąd, że interakcje różnych cząsteczek kazeiny prowadzą do utworzenia mniejszych cząstek niż w przypadku samoasocjacji cząsteczek tej samej formy kazeiny. Hipoteza Slattery'ego i Evarda (93), zakładająca hydrofobowe interakcje pomiędzy submicelami, nie tłumaczy rozpadu miceli do wolnych cząsteczek kazeiny w wyniku dializy (83). Ponadto budzi wątpliwość sposób wnikania jonów wapniowych i fosforanowych do wnętrza miceli.

W tym samym czasie Schmidt i Payens (87) przedstawili własną hipotezę struktury miceli kazeinowej. Założyli oni, że czynnikiem ograniczającym rozmiary, zarówno submiceli, jak i miceli, jest ilość hydrofilowych grup cząsteczek kazeiny  $\alpha_{s1}$ ,  $\alpha_{s2}$ ,  $\beta$  i  $\kappa$ . Schmidt i Payens nie uwzględnili jednak zmiennej zawartości kazeiny  $\kappa$  w miceli oraz, że to ona jest podstawowym czynnikiem ograniczającym rozmiary miceli (81). Uzupełniając swoją hipotezę Schmidt (4) przyjął za Slatterym i Ewardem (93, 94), że obecność kazeiny  $\kappa$  w powierzchniowej warstwie miceli kazeinowej ogranicza jej rozmiary oraz to, iż kazeina  $\kappa$  występuje proporcjonalnie w większych ilościach w mniejszych micelach. Uwzględniając to, Schmidt (4) przedstawił submicelle jako cząstki, w których apolarne reszty cząsteczek czterech głównych form kazeiny tworzą hydrofobowy rdzeń. Ten rdzeń otoczony ma być przez polarną warstwę utworzoną z fragmentów cząsteczek kazeiny  $\alpha_{s1}$ ,  $\alpha_{s2}$  i  $\beta$ , zawierających dużo reszt fosfoserynowych, oraz C-końcowych silnie ujemnych fragmentów cząsteczek kazeiny  $\kappa$ . C-końcowe fragmenty

cząsteczek kazeiny  $\kappa$ , zwane glikomakropeptydem, znajdować mają się w jednym, ściśle określonym obszarze submiceli, którego wielkość jest proporcjonalna do ilości cząsteczek kazeiny  $\kappa$ . W ten sposób submicelarne cząstki mają zawierać obszary bogate w fosforany i obszary bez fosforanów, bogate w kazeinę  $\kappa$ . Submicelle bogate w fosforany mają tworzyć micelę za pośrednictwem bardzo drobnego koloidalnego fosforanu wapniowego, który przyłączony jest do kazeiny  $\alpha_{s1}$ ,  $\alpha_{s2}$  i  $\beta$  głównie przez ich reszty fosfoserynowe. Submicelle z niską zawartością lub bez kazeiny  $\kappa$ , według Schmidta, znajdować się mają wewnątrz miceli. Wzrost miceli przebiegać ma tak długo, aż cała zewnętrzna powierzchnia miceli pokryje się kazeiną  $\kappa$ .

### V-3. Położenie kazeiny $\kappa$ w miceli kazeinowej

Omówione hipotezy budowy miceli kazeinowej, jak się zdaje, są dotychczas rozwiązaniami teoretycznymi. Wynika to głównie z niedostatecznych danych eksperymentalnych, dotyczących zwłaszcza interakcji poszczególnych cząsteczek kazeiny z koloidalnym fosforanem oraz wpływu interakcji cząsteczek kazeiny na przebieg agregacji. Niepodważalna jednak jest podstawowa rola kazeiny  $\kappa$  w stabilizowaniu miceli kazeinowych (61—64, 98) oraz jej wpływ na rozmiary miceli (76, 79, 97). Ten wpływ kazeiny  $\kappa$  na rozmiary miceli przypisuje się hydrofilowej części jej cząsteczki, zwanej makropeptydem, która oprócz wielu polarnych reszt aminokwasowych może zawierać reszty węglowodanowe (27).

Poglądy na położenie kazeiny  $\kappa$  w miceli kazeinowej są rozbieżne. Wielu badaczy uważa, że znajduje się ona głównie na powierzchni miceli (4, 91, 93, 94, 99, 100). Inni badacze zakładają, że kazeina  $\kappa$  znajduje się głównie wewnątrz miceli (101) lub zarówno wewnątrz, jak i na powierzchni miceli (90, 92, 97, 102). Wydaje się, że nowe dane Carrolla i Farrela (103) pozwalają na określenie położenia kazeiny  $\kappa$  w miceli. Przez zastosowanie przeciwciała znakowanego ferrytyną autorzy ci wykazali za pomocą techniki mikroskopii elektronowej, że położenie kazeiny  $\kappa$  zależy od rozmiarów miceli. W micelach o średnicy  $142 \pm 32$  nm kazeina  $\kappa$  znajduje się głównie na obwodzie, a w micelach o średnicy  $92 \pm 22$  nm w całym ich przekroju. Wyniki te potwierdzają pierwotną hipotezę Slattery'ego (93, 94) oraz uzupełnioną hipotezę Schmidta (87).

Interesującym zagadnieniem jest położenie w miceli kazeinowej kazeiny  $\kappa$  bez węglowodanów oraz kazeiny  $\kappa$  zawierającej węglowodany. Badania Damicza i Dziuby (104—108), dotyczące mechanizmu proteolizy kompleksów białek mleka, a w szczególności indukowanych cieplnie kompleksów micelarnej kazeiny z białkami serwatkowymi, jak i kompleksów micelarnej kazeiny ze zdenaturowanymi alkoholem białkami serwatkowymi, pozwoliły wysunąć wnioski na temat położenia kazeiny  $\kappa$  w miceli kazeinowej. Uzyskane wyniki wskazują, że kazeina  $\kappa$



zawierająca węglowodany położona jest na powierzchni miceli, a kazeina  $\kappa$  bez węglowodanów w całym przekroju miceli. Problem ten jest przedmiotem dalszych badań.

## VI. Podsumowanie

W mleku krowim micelle kazeinowe występują o bardzo różnej wielkości (109). Najmniejsze micelle mają średnicę około 25 nm i utworzone są z około 450 monomerycznych podjednostek kazeiny (2), natomiast największe micelle mają średnicę przekraczającą 150 nm i utworzone są z ponad 10 000 monomerycznych podjednostek (13). Tak duża liczba podjednostek w sposób uporządkowany tworzy micelle na drodze asocjacji cząsteczek czterech głównych form kazeiny:  $\alpha_{s1}$ ,  $\alpha_{s2}$ ,  $\beta$  i  $\kappa$ . Najnowsze koncepcje (4, 87, 93, 94), oparte na wynikach badań przy użyciu mikroskopu elektronowego zakładają submicelarną budowę miceli. Submicelle przedstawione są jako cząstki, w których apolarne reszty cząsteczek czterech głównych form kazeiny tworzą hydrofobowy rdzeń. Ten rdzeń otoczony jest przez polarną warstwę utworzoną z fragmentów cząsteczek kazeiny  $\alpha_{s1}$ ,  $\alpha_{s2}$  i  $\beta$ , zawierających dużo reszt fosfoserynowych, oraz C-końcowych silnie elektroujemnych fragmentów cząsteczek kazeiny  $\kappa$ . Takie submicelle tworzą micelę za pośrednictwem bardzo drobnego koloidalnego fosforanu wapniowego, który przyłączony jest do kazeiny  $\alpha_{s1}$ ,  $\alpha_{s2}$  i  $\beta$  głównie przez ich reszty fosfoserynowe. Wzrost miceli przebiega tak długo, aż cała zewnętrzna powierzchnia miceli pokryje się kazeiną  $\kappa$ . Kazeina ta może być położona w całym przekroju albo na powierzchni miceli co zależy od rozmiarów miceli.

Panu doc. dr hab. Zbigniewowi Śmietanie składam serdeczne podziękowanie za pomoc w otrzymaniu elektronogramu miceli kazeinowych.

Zaakceptowano do druku 17 października 1985 r.

## PIŚMIENICTWO

1. Darnell D. W., Klotz I. M., (1975), *Arch. Biochem. Biophys.*, **166**, 651—682.
2. Waugh D. F., Talbot B., (1971), *Biochemistry*, **10**, 4153—4159.
3. Rose D., Colvin J. R., (1966), *J. Dairy Sci.*, **49**, 1091—1097.
4. Schmidt D. G., (1980), *Neth. Milk Dairy J.*, **34**, 42—64.
5. Dziuba J., Damicz W., Smorągiewicz W., (1976), *Zesz. nauk. ART Olszt.*, **10**, 17—26.
6. Davies D. T., Law A. J., (1977), *J. Dairy Res.*, **44**, 213—221.
7. Fox P. F., Mulvill D. M., (1982), *J. Dairy Res.*, **49**, 679—693.
8. Gordon W. G., Groves M. L., (1975), *J. Dairy Sci.*, **58**, 574—582.



9. Eigel W. N., Keenan T. W., (1979), *Inter. J. Biochem.*, **10**, 529—535.
10. Andrews A. T., Alichanidis E., (1983), *J. Dairy Res.*, **50**, 275—290.
11. Aimutis W. R., Eigel W. N., (1980), *J. Dairy Sci.*, **63**, supp., **1**, 55.
12. Groves M. L., Gordon W. G., Kalan E. B., Jones S. B., (1973), *J. Dairy Sci.*, **56**, 558—568.
13. Eigel W. N., (1977), *Inter. J. Biochem.*, **8**, 187—192.
14. Andrews A. T., (1979), *J. Dairy Res.*, **46**, 215—218.
15. Peterson R. F., (1963), *J. Dairy Sci.*, **46**, 1136—1139.
16. Schmidt D. G., (1964), *Biochim. Biophys. Acta*, **90**, 411—414.
17. Josephson R. V., (1972), *J. Dairy Sci.*, **55**, 1535—1543.
18. Dziuba J., (1981), *Zesz. nauk. ART Olszt.*, **16**, 111—119.
19. Manson W., Carolan T., Annan W. D., (1977), *Eur. J. Biochem.*, **78**, 411—417.
20. Brignon G., Ribadeau-Dumas B., Mercier J. C., Pellissier (1977), *FEBS Lett.*, **76**, 274—279.
21. Whitney R., Brunner J. R., Ebner K. E., Farrell H. M., Josephson R. V., Morr C. V., Swaisgood H. E., (1976), *J. Dairy Sci.*, **59**, 759—815.
22. Waugh D. F., Creamer L. K., Slattery C. W., Dresdner G. W., (1970), *Biochemistry*, **9**, 786—795.
23. Waugh D. F., Slattery C. W., Creamer L. K., (1971), *Biochemistry*, **10**, 817—823.
24. Parker T. G., Dalgleish D. G., (1977), *Biopolymers*, **16**, 2533—2547.
25. Dalgleish D. G., Parker T. G., (1980), *J. Dairy Res.*, **47**, 113—122.
26. Schmidt D. G., (1979), *J. Dairy Res.*, **46**, 351—355.
27. Jolles P., Fiat A.-M., (1979), *J. Dairy Res.*, **46**, 187—191.
28. Jolles J., Alais C., Jolles P., (1968), *Biochim. Biophys. Acta*, **168**, 591—593.
29. De Koning P. J., (1968), *Neth. Milk Dairy J.*, **22**, 121—124.
30. Creamer L. K., Mills O. E., Richards E. L., (1971), *J. Dairy Res.*, **38**, 269—280.
31. Haga M., Yamauchi K., Aoyagi S., (1983), *Agric. Biol. Chem.*, **47**, 1467—1471.
32. Hill R. D., Lahav E., Givol D., (1974), *J. Dairy Res.*, **41**, 147—153.
33. Mulvihill D. M., Fox P. F., (1977), *J. Dairy Res.*, **44**, 533—540.
34. Visser S., Slangen K. J., (1977), *Neth Milk Dairy J.*, **31**, 16—30.
35. Mulvihill D. M., Fox P. F., (1979), *Milchwiss.*, **34**, 680—683.
36. Mulvihill D. M., Fox P. F., (1979), *J. Dairy Res.*, **46**, 641—651.
37. Snoren T. H. M., Riel J. A. M., (1979), *Zuivelzicht*, **71**, 766—768.
38. Shimizu M., Yamauchi K., Takamiya Y., Genguli N. C., (1983), *Milchwiss.*, **38**, 268—270.
39. Mercier J. C., Grosclaude F., Ribadeau-Dumas B., (1971), *Eur. J. Biochem.*, **23**, 41—51.
40. Grosclaude F., Mahe M.-F., Mercier J. C., Ribadeau-Dumas B., (1972), *Eur. J. Biochem.*, **26**, 328—337.
41. Grosclaude F., Mahe M.-F., Mercier J. C., Bonnemaire J., Tessier J. H., (1976), *Ann. Genet. Sel. anim.*, **8**, 481—491.
42. Grosclaude F., Joudrier P., Mahe M.-F., (1979), *J. Dairy Res.*, **46**, 211—213.
43. Ribadeau-Dumas B., Brignon G., Grosclaude F., Mercier J. C., (1972), *Eur. J. Biochem.*, **25**, 505—514.

44. Jolles J., Schoentgen F., Alais C., Jolles P., (1972), *Chimia*, **26**, 645—646.
45. Mercier J. D., Brignon G., Ribadeau-Dumas B., (1973), *Eur. J. Biochem.*, **35**, 222—235.
46. Aschaffenburg R., (1968), *J. Dairy Res.*, **35**, 447—460.
47. Li F. H. F., Gount S. N., (1972), *Biochem. Genet.*, **6**, 9—20.
48. Brunner J. R., (1977), w: Food Proteins, red. Whitaker J. R., Tannenbaum S. R., str. 175—208; Avi Publishing Company, Inc., Westport, Connecticut.
49. Bell K., Hopper K. E., McKenzie H. A., (1981), *Austr. J. Biol. Sci.*, **34**, 149—159.
50. Schaar J., (1984), *J. Dairy Res.*, **51**, 397—406.
51. Grandison A. S., Ford G. D., Millard D., Owen A. J., (1984), *J. Dairy Res.*, **51**, 407—416.
52. McLean D. M., Graham B. E. R., Ponzoni R. W., McKenzie H. A., (1984), *J. Dairy Res.*, **51**, 531—546.
53. Bloomfield V. A., Meady R. J., (1975), *J. Dairy Sci.*, **58**, 592—601.
54. Morr C. V., (1979), *ACS Symp. Ser. Funct. Protein Str.*, **92**, 65—79.
55. Herskovits T. T., (1966), *Biochem.*, **5**, 1018—1026.
56. Krescheck G. C., (1965), *Acta Chem. Scand.*, **19**, 375—382.
57. Ono T., Yutani K., Odagiri S., (1973), *Agr. Biol. Chem.*, **37**, 957—965.
58. Shimazaki K., Arima S., (1973), *Agr. Biol. Chem.*, **37**, 1229—1235.
59. Chou P. Y., Fasman G. D., (1978), *Adv. Enzymol.*, **47**, 45—148.
60. Dziuba J., (1984), *II Sesja nauk. Olszt.*, 167—169.
61. Waugh D. F., Hippel P. H., (1956), *J. Am. Chem. Soc.*, **78**, 4576—4585.
62. Hill R. D., Laing R. R., (1965), *J. Dairy Res.*, **32**, 193—201.
63. Hill R. D., Wake R. G., (1969), *Nature*, **221**, 635—639.
64. Jolles J. C., Alais C., Jolles P., (1969), *Nature*, **222**, 668—670.
65. Loucheux-Lefebvre M.-H., Aubert J. P., Jolles P., (1978), *Biophys. J.*, **23**, 323—336.
66. Guigoz Y., Solms J., (1976), *Chem. Sens. Flav.*, **2**, 71—84.
67. Fox P. F., (1981), *Neth. Milk Dairy J.*, **35**, 233—253.
68. Dalgleish D. G., Parker T. G., (1979), *J. Dairy Res.*, **46**, 259—263.
69. Schmidt D. G., Spek C. A., Bucheim W., Hinz A., (1974), *Milchwiss.*, **29**, 455—459.
70. Jolles P., (1975), *Mol. Cell. Biochem.*, **7**, 73—85.
71. Kirchmeier, (1973), *Neth. Milk Dairy J.*, **27**, 191—198.
72. Downey W. K., (1973), *Neth. Milk Dairy J.*, **27**, 218—219.
73. Morr C. V., Lin S. H. C., Dewan R. K., Bloomfield V. A., (1973), *J. Dairy Sci.*, **56**, 415—418.
74. Bloomfield V. A., Morr C. V., (1973), *Neth. Milk Dairy J.*, **27**, 103—120.
75. Pyne G. T., McGann, (1960), *J. Dairy Res.*, **27**, 9—17.
76. Rose D., (1965), *J. Dairy Sci.*, **48**, 139—146.
77. Morr C. V., Josephson R. V., Jenness R., Manning P. B., (1971), *J. Dairy Sci.*, **54**, 1555—1563.
78. Jenness R., (1973), *Neth. Dairy Milk J.*, **27**, 251—257.
79. Chughtai A., Marshall R., Nancollas G. H., (1968), *J. Phys. Chem.*, **72**, 208—211.
80. Boskey A. L., Posner A. S., (1974), *Mat. Res. Bull.*, **9**, 907—916.
81. Schmidt D. G., Koops J., Westerbeek D., (1977), *Neth. Milk Dairy J.*, **31**, 328—341.
82. Chaplin L. C., (1984), *J. Dairy Res.*, **51**, 251—257.

83. Schmidt D. G., Buchheim W., (1970), *Milchwiss.*, **25**, 596—600.
84. McGann T. C. A., Pyne G. T., (1960), *J. Dairy Res.*, **27**, 403—418.
85. Shimmin P. D., Hill R. D., (1964), *J. Dairy Res.*, **31**, 121—123.
86. Buchheim W., Welsch U., (1973), *Neth. Milk Dairy J.*, **27**, 163—180.
87. Schmidt D. G., Payens T. A. J., (1976), w: *Surface and Colloid Science*, red. Matijevic E., **9**, 165—229; New York, Wiley and Sons Inc..
88. Knoop A. M., Knoop E., Frede E., Precht D., Wiechen A., (1979), *Milchwiss.*, **34**, 129—131.
89. Slattery Ch. W., (1976), *J. Dairy Sci.*, **59**, 1547—1556.
90. Rose D., (1969), *Dairy Sci. Abstr.*, **31**, 171—175.
91. Waugh D. F., Noble R. W., (1965), *J. Amer. Chem. Soc.*, **87**, 2246—2257.
92. Garnier J., Ribadeau-Dumas B., (1970), *J. Dairy Res.*, **37**, 493—504.
93. Slattery Ch. W., Evard R., (1973), *Biochim., Biophys. Acta*, **317**, 529—538.
94. Slattery Ch., (1977), *Biophys. Chem.*, **6**, 59—64.
95. Schmidt D. G., Buchheim W., (1976), *Neth. Milk Dairy J.*, **30**, 17—29.
96. Buchheim W., Schmidt D. G., (1979), *J. Dairy Res.*, **46**, 277.
97. Creamer L. K., Wheelock J. V., Samuel D., (1973), *Biochim. Biophys. Acta*, **317**, 202—206.
98. Farrell H. M., (1973), *J. Dairy Sci.*, **56**, 1195—1206.
99. Chaplin B., Green M. L., (1982), *J. Dairy Res.*, **49**, 631—643.
100. Schmidt D. G., Both P., (1982), *Milchwiss.*, **37**, 336—337.
101. Parry R. M., Carroll R. J., (1969), *Biochim. Biophys. Acta*, **194**, 138—150.
102. Dziuba J., (1978), *Proc. 20th int. Dairy Congr.*, Paris, 261—262.
103. Carroll R. J., Farrel H. M., (1983), *J. Dairy Sci.*, **66**, 679—686.
104. Damicz W., Dziuba J., (1975), *Milchwiss.*, **30**, 399—405.
105. Damicz W., Dziuba J., (1975), *Milchwiss.*, **30**, 747—753.
106. Dziuba J., (1979), *Acta Aliment. Pol.*, **5**, 97—115.
107. Dziuba J., (1984), *XX Zjazd PTBioch.*, Olsztyn, str. 40.
108. Dziuba J., Prusik J., (1985), *Zesz. nauk. ART Olszt.*, **20**, (w druku).
109. Payens T. A. J., (1979), *J. Dairy Res.*, **46**, 291—306.



WANDA DOBRYSZYCKA \*)

## **Wpływ modyfikacji struktury haptoglobiny na jej właściwości biologiczne**

**Effect of modifications of the haptoglobin structure  
on the biological properties**

### *Spis treści*

- I. Wstęp**
- II. Struktura haptoglobiny**
- III. Ko- i post-translacyjne modyfikacje struktury haptoglobiny**
- IV. Właściwości biologiczne haptoglobiny**
- V. Chemiczne modyfikacje struktury haptoglobiny**
  - V-1. Modyfikacje reszt aminokwasowych**
  - V-2. Trawienie trypsyną**
  - V-3. Redukcja wiązań dwusiarczkowych**
  - V-4. Reakcje z lektynami**
- VI. Uwagi końcowe**

### *Contents*

- I. Introduction**
- II. Haptoglobin structure**
- III. Co- and post-translational modifications of the haptoglobin structure**
- IV. Biological properties of haptoglobin**
- V. Chemical modifications of the haptoglobin structure**
  - V-1. Modifications of amino acid residues**
  - V-2. Digestion with trypsin**
  - V-3. Reduction of disulfide bonds**
  - V-4. Reactions with lectins**
- VI. Final remarks**

\*) Prof. dr hab., Katedra i Zakład Biochemii Farmaceutycznej, Akademii Medycznej, ul. Szewska 38/39, 50-139 Wrocław.

Wykaz stosowanych skrótów: Hp — haptoglobina; Hb — hemoglobina; Hp-Hb — kompleks haptoglobiny z hemoglobina; hp  $\alpha$ , hp  $\beta$  — podjednostki  $\alpha$  (lekkie) i  $\beta$  (ciężkie) haptoglobiny; Hpr — białko podobne do haptoglobiny, zawierające sekwencję retrowirusową; surowica antyHp — surowica odpornościowa skierowana przeciwko ludzkiej haptoglobinie; Con A — konkanawalina A; GP — glikopeptyd (y).

## I. Wstęp

Ko- i post-translacyjne modyfikacje struktury białek stanowią kolejne etapy ich „dojrzewania”. Do tego typu modyfikacji należą: wewnątrzkomórkowy transport białka i jego kompartmentalizacja (glikozylacja za pośrednictwem fosforanu dolicholu w szorstkim endoplazmatycznym retikulum), endocytoza i degradacja (częściowa deglikozylacja i wiązanie przez receptory wątrobowe), ograniczona proteoliza zapewniająca osiągnięcie natywnej struktury czy fosforylacja warunkująca właściwą aktywność i inne podobne mechanizmy. Kontrola szlaków metabolicznych w systemach biologicznych dokonuje się przez kowalencyjne modyfikacje i zmiany allosteryczne konformacji białek, głównie enzymów. Z kolei różnorodne modyfikacje struktury białka dokonywane w laboratorium służą do identyfikacji reszt aminokwasowych czy też odcinków łańcucha polipeptydowego, znajdujących się w obszarach aktywnych enzymów lub w determinantach antygenowych, co odbija się na odpowiednich aktywnościach biologicznych.

W niniejszym opracowaniu, poświęconym haptoglobinie omówię obydwa rodzaje modyfikacji a mianowicie te związane z translacją, dzięki którym powstaje jedyna w swoim rodzaju trójwymiarowa struktura białka oraz chemiczne modyfikacje struktury haptoglobiny, wykonywane w Zakładzie Biochemii Farmaceutycznej Akademii Medycznej we Wrocławiu celem określenia współzależności obszarów aktywnych cząsteczki haptoglobiny wiążących hemoglobinę, przeciwciała oraz lektyny roślinne i zwierzęce.

Haptoglobina (Hp) jest kwaśną  $\alpha_2$ -glikoproteina, której obecność w surowicy krwi ludzkiej została stwierdzona w 1940 r. przez Polonovskiego i Jayle'a. Białko to tworzy z hemoglobina (Hb) trwały kompleks, który wykazuje aktywność enzymatyczną „prawdziwej” peroksydazy. W przypadkach wewnątrznaczyniowej hemolizy, powstanie kompleksu Hp-Hb zapobiega przejściu hemoglobiny przez nerki a tym samym utracie żelaza. Haptoglobina nie jest jednak typowym białkiem transportowym jak hemopeksyna (transportu hemu) czy transferyna (transport żelaza). Związana z hemoglobina haptoglobina podlega „samobójczo” endocytozie w komórkach układu siateczkowo-śródbłonkowego wątroby, podczas gdy żelazo pozostaje dostępne dla dalszych przemian.

## II. Struktura haptoglobiny

Molekularna heterogenność haptoglobiny jest wyrażona w trzech głównych fenotypach, Hp 1—1, Hp 2—2 i Hp 2—1. Hp 1—1 wędruje w elektroforezie skrobiowej lub w żelu poliakryloamidowym w postaci jednego pasma, natomiast Hp 2—2 i Hp 2—1 dzielą się na charakterystyczną serię polimerów (1). Cząsteczka Hp 1—1 składa się z dwóch łańcuchów lekkich ( $hp \alpha^1$ ) połączonych mostkami dwusiarczkowymi i z dwóch łańcuchów ciężkich ( $hp \beta$ ), które związane są z  $hp \alpha$  poprzez mostki dwusiarczkowe. W mikroskopie elektronowym obraz haptoglobiny jest podobny do sztangi o długości 124 Å, której kuliste zakończenia (łańcuchy  $\beta$ ) stanowią miejsca wiązania hemoglobiny (2). Podjednostka  $\alpha^1$  składa się z 83 a  $\beta$  z 245 aminokwasów.

Na podstawie różnic w pozycji 53  $hp \alpha^1$  (Lys lub Glu) rozróżniamy elektroforetyczne warianty Hp  $\alpha^1 F$  (*fast*) i Hp  $\alpha^1 S$  (*slow*). Podstawą polimorfizmu haptoglobin 2—2 i 2—1 jest obecność  $hp \alpha^2$  (142 aminokwasy), który powstał przy częściowej duplikacji genu jako produkt niehomologicznego *crossing over* między genami *Hp1F* i *Hp1S*. Sekwencja aminokwasowa i rozmieszczenie śród- i międzyłańcuchowych wiązań dwusiarczkowych została podana przez Kurosky'ego i wsp. (3, 1).

Geny *Hp1F* i *Hp1S* kodują podjednostki  $hp \alpha^1 F$ ,  $hp \alpha^1 S$  i  $hp \beta$ . Gen *Hp2* koduje  $hp \alpha^2$  i  $hp \beta$ . Łańcuchy  $\beta$  kodowane przez 3 geny są identyczne (1). Metodą hybrydyzacji *in situ* klonowanego fragmentu DNA, zlokalizowano geny kodujące zarówno łańcuchy  $\alpha$  jak i  $\beta$  haptoglobiny w paśmie 16q chromozomu 22, dowodząc, że jest to jedyne *locus* haptoglobiny w ludzkim genomie (4).

## III. Ko- o post-translacyjne modyfikacje struktury haptoglobiny

Już w 1981 r. Haugen i wsp. (5) zaproponowali model pierwotnego produktu translacji mRNA haptoglobiny w postaci jednego polipeptydu zawierającego elementy podjednostek  $\alpha$  (bez Met) i  $\beta$  (3 reszty Met) oraz 18-aminokwasowy peptyd sygnałowy na N-końcu. Model ten okazał się prawidłowy. Taki pierwotny produkt translacji w postaci jednego polipeptydu (preprohaptoglobina) jest kotranslacyjnie w szorstkim retikulum endoplazmatycznym N-glikozylowany za pośrednictwem fosforanu dolicholu. Powstanie prohaptoglobiny zachodzi przez stopniową glikozylację wyłącznie w regionie  $\beta$ , toteż w dwuwymiarowej elektroforezie można zauważyć szereg pochodnych o różnej zawartości cukrów a zwłaszcza kwasu sjałowego zajmującego pozycję końcową w dwu trójantennowych i dwu dwuantennowych łańcuchów oligosacharydowych. Dimery prohaptoglobiny są post-translacyjnie rozszczepiane proteolitycznie w C-końcowej części łańcucha  $\alpha$  połączonego resztą Arg z Ile regionu  $\beta$ .



Arg jest usuwana przez karboksypeptydazę B, podczas gdy dimery pozostają połączone mostkiem dwusiarczkowym. Ostatnim aktem „dojrzenia” haptoglobiny jest powstanie tetramerów (Hp 1—1) lub polimerów (Hp 2—2, Hp 2—1), utrzymywanych przez wiązania -S-S- (6, 7, 8).

Post-translacyjne modyfikacje haptoglobiny są analogiczne z mechanizmem aktywacji proteaz serynowych, a sekwencja wiążąca Arg regionu  $\alpha$  z regionem  $\beta$  — (-Arg-Ile-Ile-Gly-Gly-) jest homologiczna wobec sekwencji, przy której zachodzi proteolityczne rozszczepienie prekursorów proteaz serynowych. Łańcuch  $\beta$  wykazuje znaczne podobieństwo w sekwencji aminokwasowej f' w strukturze trzeciorzędowej z rodziną chymotrypsynogenu (trypsyna, elastaza,  $\alpha$ -chymotrypsyna), a łańcuch  $\alpha$  z peptydem aktywacji plazminogenu. Haptoglobina nie jest jednak proteazą, gdyż His-57 i Ser-195 znajdujące się w obszarze aktywnym trypsyny są zastąpione w haptoglobinie przez Lys i Ala (3, 9, 10).

Na podstawie podobieństwa segmentu 21—37 w łańcuchu  $\alpha$  z łańcuchami kappa i lambda białek Bence-Jonesa oraz ze względu na charakterystyczną strukturę, stwierdzono ewolucyjny związek haptoglobiny z immunoglobulinami (11). Zdziwiająco podobieństwo w sekwencji i chemicznym charakterze aminokwasów oraz II- i III-rzędowej strukturze łańcucha haptoglobiny i konkanawaliny A (Con A) znaleźli Dobryszcka i współpr. (12, 13).

Klonowanie i analiza nukleotydów cDNA pozwoliły na wyizolowanie z ludzkiego genomu sekwencji zasad wykazującej znaczną strukturalną homologię z genami haptoglobiny. Okazało się, że duplikacja genu haptoglobiny spowodowała powstanie bardzo podobnego białka (Hpr), w którego genie znajduje się sekwencja podobna do retrowirusowej, komplementarna do izoleucynowego tRNA. Nowy typ retrowirusa znalezionego wewnątrz genu w ludzkim genomie został nazwany RTVL-I. W Hpr znajduje się 27 substytucji aminokwasów w stosunku do haptoglobiny (2 w peptydzie sygnałnym, 9 w regionie  $\alpha$  i 16 w regionie  $\beta$ ). Reszta Arg, łącząca łańcuchy  $\alpha$  i  $\beta$  jest zachowana, podobnie jak 40 aminokwasów po obu jej stronach.

Cys-15 w łańcuchu  $hp\alpha 1F$  jest zastąpiona w Hpr przez Phe, lecz w Hpr znajduje się dodatkowa Cys w pozycji 157 na miejscu Val w  $hp\beta$ , co stabilizuje strukturę tetrameru, podobnie jak w haptoglobinie. Substytucje dotyczą aminokwasów, które nie grają istotnej roli w wiązaniu hemoglobiny (14). Maeda (15) uważa, że gen *Hpr* jest funkcjonalny, lecz jego ekspresja może być normalnie bardzo niska, może mieć miejsce w innych tkankach niż wątroba, w której zachodzi biosynteza haptoglobiny lub też ujawniać się na innym szczeblu ontogenezy (krew płodu nie zawiera haptoglobiny). Może to być również pseudogen, który nie ulega ekspresji. Wydaje się, że sekwencja retrowirusowa, znajdująca się w odległości tylko 3 kpz od genu haptoglobiny może wpływać na transkrypcję haptoglobiny i/lub Hpr a konsekwencje tego w dziedzinie pato-

fizjologii są na razie trudne do przewidzenia. Należy wziąć pod uwagę, że haptoglobina należy do białek „ostrej fazy” i jej poziom we krwi wzrasta znacznie w stanach zapalnych o różnej etiologii, w chorobie reumatycznej, nowotworowej i in.

#### IV. Właściwości biologiczne haptoglobiny

Wzrost poziomu haptoglobiny w surowicy krwi pod wpływem różnych bodźców był znany od dawna i wykorzystywany w diagnostyce i prognozie wielu chorób, w monitorowaniu terapii, określaniu okresu remisji lub wznowy nowotworowej. Znaczenie biologiczne wzmożonej biosyntezy haptoglobiny, gdy jej stężenie jest 5—10-krotnie większe od prawidłowego, nie jest znane. Wydawało się, że przypisanie haptoglobinie właściwości endogennego inhibitora syntetazy prostaglandynowej (16) pozwoli na wyjaśnienie wzrostu poziomu haptoglobiny jako jednego z czynników mechanizmu sprzężenia zwrotnego w utrzymywaniu homeostazy. Doświadczenia *in vivo* nie potwierdziły jednak znaczącej roli haptoglobiny jako mediatora w kaskadzie reakcji modulujących stan zapalny (17, 18).

Podstawowa właściwość haptoglobiny, tworzenie kompleksu z hemoglobina, zyskała ostatnio nowe naświetlenie. Hemoglobina, podobnie jak inne związki zawierające żelazo katalizuje w obecności  $O_2^-$  i  $H_2O_2$  powstawanie bardzo reaktywnego i biologicznie niebezpiecznego rodnika hydroksylogowego (reakcja Fentona) (19). Haptoglobina, wiążąc hemoglobinę zapobiega powstawaniu rodników  $OH$  i nadtlenków lipidowych w obszarach zapalnych a tym samym spełniała by ważną fizjologiczną funkcję. Kompleks Hp-Hb wykazuje aktywność peroksydazową w nie fizjologicznym, kwaśnym pH  $\sim 4.5$ , a więc chociaż aktywność ta stała się podstawą specyficznych metod oznaczania ilościowego, należy ją uznać za przypadkową, bez istotnej roli w reakcji Fentona.

Spośród innych właściwości haptoglobiny należy wymienić inhibicję katepsyny B (wprawdzie tylko w krwi szczura) (20), hemaglutynacji wirusowej (21) oraz modulację różnych odpowiedzi immunologicznych, zwłaszcza funkcji limfocytów i makrofagów. Można tu przytoczyć inhibicję mitogenezy limfocytów B (w dużych stężeniach), lub stymulację (w małych stężeniach) (22) i inhibicję indukowanej przez lektyny transformacji limfocytów (23). Ponadto haptoglobina jest podobnym do przeciwciał naturalnym bakteriostatykiem aglutynującym streptokoki z antygenem T4 (24) i wiążącym *Actinomyces pyogenes*, bakterie wywołujące ropne zakażenie u bydła (25).

Jak widać z tego pobieżnego wyliczenia, stosunkowo dokładne poznanie struktury i mnogości aktywności biologicznych haptoglobiny nie przyczyniło się jak na razie, do jasnego sformułowania jej roli w żywym



organizmie, podobnie zresztą jak w przypadku innych glikoprotein nie będących hormonami, enzymami lub inhibitorami ściśle określonych reakcji. Rola biologiczna haptoglobiny jest tym bardziej zagadkowa, że człowiek może egzystować bez tego białka w krwi. Pomijam tu ahaptoglobinemię noworodków do 3 miesięcy życia oraz czynniki patologiczne jak ostre schorzenia mięszu wątroby lub hemolizę wewnątrznaczyniową. Okazało się, że u około 4<sup>0</sup>/o dorosłych i 12<sup>0</sup>/o dzieci murzynów afrykańskich występuje ahaptoglobinemia (26). Pytanie, czy mamy tu do czynienia z „milczącym allelem” czy też z bardzo daleko posuniętą hypohaptoglobinemią, nie doczekało się jeszcze odpowiedzi.

## V. Chemiczne modyfikacje struktury haptoglobiny

Zależność właściwości fizyko-chemicznych, biologicznych i immunologicznych haptoglobiny od zmian w strukturze cząsteczki była badana od dwudziestu lat w Zakładzie Biochemii Farmaceutycznej Akademii Medycznej we Wrocławiu. Skupiliśmy się przede wszystkim na charakterystyce i współzależności obszarów aktywnych haptoglobiny, biorących udział w wiązaniu hemoglobiny, przeciwciała oraz lektyn roślinnych i zwierzęcych (receptorów wątrobowych).

Przeprowadziliśmy następujące badania:

- 1) Modyfikacje reszt aminokwasowych: tyrozyny, tryptofanu, lizyny, histydyny.
- 2) Trawienie trypsyną; izolacja glikopeptydów.
- 3) Redukcja wiązań dwusiarczkowych; izolacja podjednostek  $\alpha$  i  $\beta$ .
- 4) Modyfikacja części oligosacharydowej; odszczepianie kwasu sjałowego, galaktozy i N-acetyloglukozaminy.

### V-1. Modyfikacje reszt aminokwasowych (27, 28, 29).

Reszty tyrozynowe były modyfikowane za pomocą odczynników o różnym charakterze i specyficzności (N-acetyloimidazol, tetranitrometan, jod); na reszty tryptofanowe działano N-bromobursztynyloimidem i bromkiem 2-hydroksy-5-nitrobenzylowym, na grupy  $\epsilon$ -aminowe lizyny azlaktone p-nitrobenzoilowaliny lub bezwodnikiem kwasu bursztynowego; reszty histydynowe sulfanilazowano.

Tworzenie aktywnego kompleksu hemoglobiny z modyfikowanymi tyrozylopochodnymi haptoglobiny zachodziło nawet przy zablokowaniu większości powierzchniowych reszt tyrozynowych, wszystkich wolnych grup aminowych a częściowo przy zablokowaniu obok tyrozyn również reszt histydynowych, jakkolwiek powodowało to pewne zmiany konformacji białka (pomiaru perturbacji termicznej, ORD i CD, IR). Udział reszt tyrozynowych w reakcji z przeciwciałem był dość ograniczony, pod-



czas gdy grupy aminowe w ogóle nie wpływające na reakcję z hemoglobina blokowały pewną część obszaru aktywnego wiążącego przeciwciała. Pochodne haptoglobiny z modyfikowanymi resztami tryptofanowymi wykazywały drastycznie zmniejszoną zdolność wiązania hemoglobiny i bardzo wysoką specyficzną immunologiczną.

Prawdopodobnie na powierzchni cząsteczki haptoglobiny istnieją dwa, stosunkowo niezależne od siebie obszary, odpowiedzialne za wiązanie hemoglobiny i przeciwciała, zachodzące na siebie tylko w regionie zawierającym 3 z 12 reszty tryptofanowe i 3 z 28 reszty tyrozynowe. O takiej zależności świadczy również możliwość tworzenia trójskładnikowych aktywnych kompleksów, w których do haptoglobiny przyłączona jest hemoglobina i przeciwciała.

## V-2. Trawienie trypsyną

Bliższą charakterystykę obszarów aktywnych haptoglobiny i ich współzależności, przeprowadzono izolując glikopeptydy otrzymane przez trawienie haptoglobiny (30) lub podjednostki  $\beta$  (31). Z czterech glikopeptydów otrzymanych z Hp 1-1 dwa wykazywały nikłą zdolność wiązania hemoglobiny (11 i 4% w stosunku do natywnego białka), a bardzo wysoką wiązania przeciwciała (przeszło 80% reaktywności antygenowej), zawierając 7 determinant antygenowych, z których jedna była nieobecna w natywnym białku. Pozostałe dwa glikopeptydy nie reagowały z surowicą antyHp, lecz były silnymi inhibitorami reakcji haptoglobiny z przeciwciałem, a jeden z nich był głównym miejscem wiązania lektyny, konkanawaliny A (Con A) (32). Chociaż część cukrowa nie bierze udziału w reakcji haptoglobiny z hemoglobina, to jednak przyłączenie Con A do haptoglobiny powoduje pewną przeszkodę steryczną dla hemoglobiny, to też kompleks (Hp-Con A)—Hp wykazuje tylko około połowy aktywności peroksydazowej w stosunku do Hp-Hb lub (Hp-Hb)—Con A.

Doświadczenie z glikopeptydami izolowanymi z trzech głównych typów genetycznych Hp 1—1, 2—2 i 2—1 pozwoliły na znalezienie determinanty antygenowej charakterystycznej dla Hp 1—1, ukrytej wewnątrz natywnej cząsteczki haptoglobiny i różnic ilościowych w immunoprecipitacji między haptoglobinami poszczególnych typów, które do tej pory były uważane za nierozróżnialne immunologicznie (33).

Podjednostka  $\beta$  haptoglobiny identyczna we wszystkich jej typach, gra specjalną rolę w jej właściwościach biologicznych. Wiązanie  $\alpha\beta$  dimerów hemoglobiny zachodzi w regionie hp  $\beta$  (2), jednak izolowany łańcuch  $\beta$  wykazuje tylko około 15% aktywności peroksydazowej w kompleksie z hemoglobina. Łańcuchy  $\alpha$ , czy może ich części, są więc prawdopodobnie konieczne aby utworzyć prawidłową hydrofobową wnękę, pozwalającą na związanie hemoglobiny. Haptoglobina chroni znajdującą się w kompleksie hemoglobina przed kwaśną denaturacją i przekształca ją

w enzym — peroksydazę. Większość determinant antygenowych znajduje się na hp $\beta$ . Ponadto lektyny wiążą się z charakterystycznymi ugrupowaniami łańcuchów oligosacharydowych, znajdujących się wyłącznie w hp $\beta$ . Uważa się, że ten region pozostał zachowany bez zmian w czasie ewolucji dłużej niż inne obszary cząsteczki haptoglobiny.

Po trawieniu trypsyną hp $\beta$  otrzymano 5 glikopeptydów (GP I—V), które nie tworzyły aktywnego kompleksu z hemoglobina, lecz wykazywały interesujące powinowactwo wobec Con A i zróżnicowane właściwości immunologiczne (31). Prawie wszystkie cukry znajdowały się w GP I i II a grupy -SH, powstałe przez redukcję wiązań dwusiarczkowych w GP III i IV. Mając do dyspozycji sekwencję aminokwasową hp $\beta$  (1) można było zlokalizować GP I i II we fragmencie między Lys-17 a Lys-90, a GP III i IV w pozostałych dwóch trzecich hp $\beta$ , liczącego 245 aminokwasów. GP I nie reagował z surowicą antyHp, lecz silnie hamował reakcję precypitacji Hp-antyHp lub hp $\beta$ —antyHp. GP II zawierał determinantę antygenową nieobecną w Hp 2—1 i w hp $\beta$ , który z kolei wykazywał tylko częściową zgodność antygenową z Hp 2—1. Te „brakujące” determinanty antygenowe mogły być determinantami sekwencyjnymi lub(i) konformacyjnymi, związanymi ze strukturą natywnego białka m.in. z obecnością hp $\alpha$  lub ze zniszczeniem struktury przy preparacji hp $\beta$  albo też podczas trypsynolizy. Przewidywanie determinant antygenowych w hp $\beta$  na podstawie hydrofilowości i współczynników dostępności kolejnych aminokwasów oraz  $\beta$ -skrętów łańcucha polipeptydowego pozwoliło na zdefiniowanie 2 sześciopetydowych determinant między Ala-51 i Leu-69 w oligosacharydowej części hp $\beta$  i czterech między Val-97 i Lys-164 w części cysteinowej, przy czym jedna z determinant zawiera w sobie sekwencję bardzo podobną do tuftsyny (Thr-Lys-Pro-Arg), a mianowicie Lys-Thr-Prp lub Thr-Pro-Lys (D o b r o s z y c k a — nie publikowane).

### V-3. Redukcja wiązań dwusiarczkowych

Po redukcji międzylańcuchowych mostków dwusiarczkowych łączących hp $\alpha$  z hp $\beta$  i hp $\alpha$  między sobą, można było preparować podjednostki  $\alpha$  i  $\beta$  a w przypadku Hp 2—1  $\alpha^1$ ,  $\alpha^2$  i  $\beta$ . Dzięki identyfikacji masy cząsteczkowej i składu podjednostkowego związków pośrednich powstających w czasie stopniowej redukcji lub utlenienia i reasocjacji — obserwowano zjawisko rozfałdowywania się białka oraz powstania w reakcji odwrotnej oryginalnej struktury globularnej przez dopasowywanie się podjednostek i odtwarzanie pierwotnych wiązań dwusiarczkowych (34, 35). Symetria wzoru strukturalnego cząsteczki haptoglobiny okazała się pozorna, gdyż pewne, wydawało by się równodostępne wiązania —S—S— różniły się istotnie w podatności na działanie odczynnika redukującego. Tworzenie aktywnego kompleksu z hemoglobina zależało od obecności



wiązań łączących podjednostki, gdyż redukcja zaledwie 3—4 mostków —S—S— z 10 znajdujących się w Hp 2—1 zmniejszała aktywność peroksydazową o 50%, natomiast utlenienie prowadziło do przeszło 80% odzyskania pierwotnej aktywności wiązania hemoglobiny. W przeciwieństwie do kompleksu z hemoglobina, produkty redukcji haptoglobiny wykazywały pełną reaktywność antygenową w immunoprecypitacji z surowicą antyHp.

Z izolowanych podjednostek haptoglobiny ludzkiej, końskiej i wieprzowej tworzono białka hybrydowe. Wiązanie hemoglobiny i swoistość immunologiczna międzygatunkowych hybrydowych haptoglobin zależała od pochodzenia hp  $\beta$  (36, 37).

#### V-4. Reakcje z lektynami

Intensywność reakcji Hp 1—1, 2—2 i 2—1 z Con A zależała od stopnia polimeryzacji cząsteczki haptoglobiny, przy czym usunięcie kwasu sjałowego, znajdującego się w pozycji terminalnej łańcuchów oligosacharydowych nie zmieniało wiązania Con A. Do kompleksu Hp-Con A można było dołączyć hemoglobinę, podobnie jak do preformowanego kompleksu Hp-Hb wiązała się Con A (32).

Wiązanie hp  $\beta$  przez Con A było efektywniejsze niż w przypadku natywnej haptoglobiny a wiązanie GPI a zwłaszcza GPII otrzymanych przez trypsynolizę hp  $\beta$  było nadzwyczaj wysokie, prawie dwukrotnie większe niż w reakcji Con A z Hp 2—1, co wskazuje, że w tych glikopeptydach muszą się znajdować ugrupowania mannobiozylo-N-acetyloglukozaminowe, charakterystyczne dla reakcji z Con A (31).

Chromatografia powinowactwa Hp 1—1, 2—2 i 2—1 oraz izolowane hp  $\beta$  pozwoliła na rozdzielenie wariantów molekularnych wiążących się mocno, słabo lub wcale nie wiążących się z Con A-Sepharose (38, 39). Wyłącznie frakcje wiążące się z Con A-Sepharose tworzyły kompleks z hemoglobina i wykazywały pełną reaktywność immunologiczną, przy czym były one niejednokrotnie bardziej aktywne niż wyjściowe, niefrakcjonowane preparaty. W tej chwili trudno jest określić czy frakcje, które rozdzielają się podczas chromatografii powinowactwa, stanowiące do 25% w głównych typach haptoglobin a do 85% w glikopeptydach, są wyrazem dwu- i trójantennowych struktur oligosacharydowych (te ostatnie przeważają w nie wiążących Con A frakcjach glikoprotein), czy też są to artefakty, powstające podczas preparacji a usunięcie frakcji nie wiążącej się z Con A-Sepharose daje w wyniku preparaty wysoko oczyszczone, o odpowiednio wyższej aktywności biologicznej.

Haptoglobina, podobnie jak inne glikoproteiny krwi ssaków znika szybko z krążenia po odsjałowaniu, gdyż wiąże się ze specyficznymi receptorami (lektynami) hepatocytów (szlak przemian Ashwella-Morella). Receptory w wątrobie ptaków są zdolne do endocytozy glikoprotein m.in.



haptoglobiny, po odszczepieniu z nich kwasu sjałowego i galaktozy a odślonięciu N-acetyloglukozaminy (40). U niższych kręgowców lektyny wątrobowe wykazują znacznie mniejszą swoistość w stosunku do modyfikowanych glikoprotein, również takich z mannozą w pozycji terminalnej, z których usunięto kwas sjałowy, galaktozę i N-acetyloglukozaminę (41).

Nasze badania skupiły się na kurzej haptoglobinie, różniącej się budową i właściwościami od analogicznych białek ssaków. Tworzy ona aktywny kompleks tylko z hemoglobiną homologiczną, to też kura była dobrym obiektem badań nad rozpoznawaniem przez lektyny wątrobowe zarówno homologicznych i heterologicznych haptoglobin jak i ich kompleksów z odpowiednimi hemoglobinami. Kompleksy Hp-Hb mają własne receptory, różne od agalaktoglikoproteinowych, znajdujące się głównie w komórkach Kupffera układu siateczkowo-śródbłonkowego (42, 43, 44).

Doświadczenia z blokowaniem różnych dróg endocytozy pozwoliły na nakreślenie „mieszanego typu” katabolizmu haptoglobiny i kompleksu Hp-Hb w krwi kur, a mianowicie przez wiązanie ze swoistym receptorem agalaktoglikoprotein, ze swoistym receptorem kompleksu i przez endocytozę w układzie siateczkowo-śródbłonkowym. W przypadku blokowania jednej z dróg, w których rozpoznawane są również subtelne różnice w budowie heterologicznych haptoglobin, następuje stymulacja innych, przy czym dochodzi tu jeszcze możliwość wydalania przez nerki nadmiaru hemoglobiny nie związanej z haptoglobiną. Modyfikacja części cukrowej haptoglobiny i wiązanie hemoglobiny są więc sygnałami kierunkowymi dróg do poszczególnych kompartmentów, również pozawątrobowych i stanowią ogólne elementy regulacji katabolizmu haptoglobiny i kompleksu Hp-Hb w krwi kręgowców.

## VI. Uwagi końcowe

Pominałam w niniejszym opracowaniu wiele zagadnień dotyczących znaczenia poziomu haptoglobiny we krwi w diagnostyce klinicznej oraz prób powiązania głównych typów genetycznych haptoglobiny z innymi układami grupowymi krwi i narażeniem na choroby, począwszy od nowotworów i chorób układu krążenia a skończywszy na schizofrenii. Wyniki licznych prac tego typu, na ogół określanych jako kontrowersyjne nie wniosły niczego oryginalnego do zagadki roli biologicznej haptoglobiny. Miejmy nadzieję, że współczesny rozwój technik laboratoryjnych pozwoli na zebranie dodatkowych informacji a tym samym da odpowiedzi na pytania dotyczące tego białka, niby zwykłego, dobrze już poznanego, lecz kryjącego w sobie wiele białych plam, czekających nowego opracowania.

## Podziękowania

Cytowane prace zespołu Katedry Biochemii Farm. A.M. we Wrocławiu były wykonywane dzięki pomocy finansowej z NIH (fundusz im. Marii Skłodowskiej-Curie) nr 05-056-N, z Polskiej Akademii Nauk (Instytut iBologii Doświadczalnej im. M. Nenckiego) nr II.02.03 oraz z Min. Szkolnictwa Wyższego, Nauki i Techniki nr R.I.9.

Zaakceptowano do druku 17 października 1985 r.

## PIŚMIENNICTWO

1. Bowman B. H., Kurosky A., (1982), *Adv. Human Genet.*, **12**, 189—261.
2. Wejman J. C., Hovsepian D., Wall J. S., Hainfeld J. F., Greer J., (1984), *J. Mol. Biol.*, **174**, 319—341.
3. Kurosky A., Barnett D. R., Lee T.-H., Touchstone B., Hay R. E., Arnot M. S., Bowman B. H., Fitch W. M., (1980), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **77**, 3388—3392.
4. McGill J. R., Yang F., Baldwin W. D., Brune J. L., Barnett D. R., Bowman B. H., Moore C. M., (1984), *Cytogenet. Cell Genet.*, **38**, 155—157.
5. Haugen T. H., Hanley J. M., Heath E. C., (1981), *J. Biol. Chem.*, **256**, 1055—1057.
6. Yang F., Brune J. L., Baldwin W. D., Barnett D. R., Bowman B. H., (1983), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **80**, 5875—5879.
7. Goldstein L. A., Heath E. C., (1984), *J. Biol. Chem.*, **259**, 9212—9217.
8. Anderson L., Anderson N., (1984), *Clin. Chem.*, **30**, 1898—1905.
9. Greer J., (1980), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **77**, 3393—3397.
10. Arcoleo J. P., Greer J., (1982), *J. Biol. Chem.*, **257**, 10063—10068.
11. Black J. A., Dixon G. H., (1968), *Nature*, **218**, 736—741.
12. Dobryszczycka W., Dobryszczycki P., Guszczynski T., (1982), *Acta Biochim. Polon.*, **29**, 299—309.
13. Dobryszczycka W., Przysiecki B., (1984), *FEBS Lett.*, **171**, 85—88.
14. Maeda N., Yang F., Barnett D. R., Bowman B. H., Smithies O., (1984), *Nature*, **309**, 131—135.
15. Maeda N., (1985), *J. Biol. Chem.*, **260**, 6698—6709.
16. Saeed S. A., McDonald-Gibson W. J., Cuthbert J., Copas J. L., Schneider C., Butt N. M., Colier H. O. J., (1977), *Nature*, **270**, 32—36.
17. Damas J., Deflandre E., (1984), *Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol.*, **327**, 143—147.
18. Dobryszczycka W., Przysiecki B., Krawczyk E., Rudkowska B., (1984), *Arch. Int. Physiol. Bioch.*, **92**, 47—52.
19. Sadrzadeh S. M. H., Graf E., Panter S. S., Hallaway P. E., Eaton J. W., (1984), *J. Biol. Chem.*, **259**, 14354—14356.
20. Pagano M., Nicola M. A., Engler R., (1982), *Can. J. Biochem.*, **60**, 631—637.
21. Lisowska E., Dobryszczycka W., (1967), *Biochem. Biophys. Acta*, **133**, 338—345.
22. Baseler M. W., Burrell R., (1983), *Inflammation*, **7**, 387—400.
23. Kudo J., Okubo H., Ikuta T., Hivata Y., Ishibashi H., (1982), *Biomed. Res.*, **3**, 417—421.
24. Prokop O., Köhler W., (1979), *Zbl. Gynakol.*, **101**, 1111—1116.

25. Lämmler C., Chhatwal G. S., Blobel H., (1985), *Can. J. Microbiol.*, **31**, 657—659.
26. Putnam F. W., (1975), w: *The Plasma Proteins*, vol. II, Second Ed. Academic Press, New York, 1—50.
27. Dobryszczycka W., Bec-Kątnik J., (1975), *Acta Biochim. Polon.*, **22**, 143—153.
28. Kątnik I., Dobryszczycka W., (1978), *Acta Biochim. Polon.*, **25**, 325—332.
29. Kątnik I., Dobryszczycka W., (1981), *Studia Biophys.*, **84**, 217—223.
30. Kątnik I., Dobryszczycka W., (1981), *Biochim. Biophys. Acta*, **670**, 17—24.
31. Dobryszczycka W., Guszczynski T., (1985), *Int. J. Biochem.*, **17**, 917—923.
32. Dobryszczycka W., Kątnik I., (1982), w: *Lectins-Biology Biochemistry, Clinical Biochemistry*, vol. II, W. de Gruyter Co, Berlin, New York 381—392.
33. Kątnik I., Guszczynski T., Dobryszczycka W., (1984), *Arch. Immunol. Ther. Exp.*, **32**, 111—120.
34. Dobryszczycka W., Krawczyk E., (1983), *Acta Biochim. Polon.*, **30**, 203—212.
35. Dobryszczycka W., Guszczynski T., (1985), *Biochim. Biophys. Acta*, **829**, 13—18.
36. Dobryszczycka W., Osada J., Woźniak M., (1979), *Intern. J. Biochem.*, **10**, 75—79.
37. Krawczyk E., Dobryszczycka W., (1980), *Acta Biochim. Polon.*, **27**, 335—343.
38. Kątnik I., (1984), *Biochim. Biophys. Acta*, **790**, 8—14.
39. Kątnik I., Guszczynski T., Dobryszczycka W., (1985), w: *Lectins*, vol. IV, W. de Gruyter Co, Berlin, New York, 253—258.
40. Kawasaki T., Ashwell G., (1977), *J. Biol. Chem.*, **252**, 6536—6543.
41. Dobryszczycka W., Osada J., Chorążyczewski J., (1982), *Comp. Biochem. Physiol.*, **71B**, 259—263.
42. Dobryszczycka W., Woźniak M., Krawczyk E., Furmaniak-Kazimierzczak E., (1981), *Int. J. Biochem.*, **13**, 739—743.
43. Woźniak M., (1984), *Comp. Biochem. Physiol.*, **79B**, 413—416.
44. Woźniak M., Dobryszczycka W., (1983), *Acta Biochim. Polon.*, **30**, 123—135.

#### Addendum:

Po oddaniu artykułu do druku ukazały się w 1986 r. prace zespołu A. Van Der Straten (DNA 5, 129—136; Bioscience Reports 6, 363—373) o ekspresji cDNA haptoglobiny w drożdżach *Saccharomyces cerevisiae* i w *E. coli*. W cDNA hp  $\alpha^2$  znajdują się dwa potężne bakteryjne promotory, z których jeden prawdopodobnie funkcjonuje *in vivo* a pod kontrolą drugiego powstało białko hybrydowe, składające się z hp  $\alpha^2$  i  $\alpha_1$ -antytrypsyny.



## MINIREVIEW

HALINA SZAFRAN \*)

### **Biologicznie aktywne peptydy przewodu pokarmowego i trzustki**

#### **Biologically active peptides of gastrointestinal tract and pancreas**

Regulacja procesów trawienia i wchłaniania składników pokarmowych, a następnie ich zużywania i magazynowania w organizmie człowieka w istotny sposób zależy od działania układu hormonalnego przewodu pokarmowego i trzustki. Dla hormonów peptydowych tego układu proponowano w ciągu ostatnich lat różne nazwy, a mianowicie hormony jelitowe, hormony żołądkowo-jelitowe, hormony żołądkowo-jelitowo-trzustkowe (gastro-enteropancreatic hormones, GEP). Wydaje się, że ta ostatnia nazwa jest najbardziej uzasadniona, bowiem podkreśla bezpośrednio współdziałanie hormonów wydzielanych przez komórki endokryne błony śluzowej żołądka i jelita z hormonami trzustkowymi. Szczegółowe dane dotyczące struktury, własności, występowania i działania niektórych hormonów układu GEP były przedmiotem kilku referatów poglądowych opublikowanych w piśmiennictwie polskim (18, 19, 20, 21, 22). Jednak ze względu na bardzo szybki postęp wiedzy w tej dziedzinie wydało się celowym zwięzłe przedstawienie wyników ostatnich badań prowadzonych w różnych kierunkach, dotyczących peptydów tej grupy.

Peptydy układu GEP działają nie tylko w sposób typowy dla hormonów, czyli na drodze endokrynej, ale także na drodze parakrynej oraz często jako neuroprzekaźniki w zakończeniach nerwów peptydoergicznych przewodu pokarmowego. Niektóre z tych neuroprzekaźników mogą przedostawać się do krwi, szczególnie po silnym pobudzeniu ich wydzielania, na przykład przez podanie posiłku. Często ten sam peptyd może działać na różnych drogach. Gastryna i somatostatyna a także insulina i glukagon, uważane za typowe hormony, działają również na drodze parakrynej. Dwa pierwsze z wymienionych peptydów regulują w ten sposób nawzajem swoje wydzielanie, natomiast insulina i glukagon mają poprzez działanie parakryne wpływ na czynność zewnątrzwydzielniczą trzustki. Pośladto, gastryna i somatostatyna są wydzielane z zakończeń nerwowych. W niektórych przypadkach nawet poszczególne formy molekularne tego samego peptydu działają na różnych drogach. Przykładem może być cholecystokinina-33 (CCK-33), która działa głównie na drodze endokrynej oraz gastryna, CCK-4, czteropeptyd mający wspólny fragment gastryny i CCK od C-końca cząsteczki, wydzielany z niektórych zakończeń nerwowych w trzustce. Przedstawione powyżej fakty spowodowały, że

\*) Prof. dr hab. Halina Szafran I Katedra Chirurgii Ogólnej i Klinika Chirurgii Gastroenterologicznej Akademii Medycznej im. M. Kopernika w Krakowie. Ul. M. Kopernika 40, 31-501 Kraków.

coraz częściej dla tych biologicznie aktywnych peptydów używa się nazwy „peptydy regulacyjne” a nie hormony.

Spośród peptydów układu GEP, do typowych hormonów działających przede wszystkim na drodze endokrynną zaliczył Grossman (5) gastrynę, CCK, sekretynę, peptyd hamujący wydzielanie żołądkowe (GIP) nazwany ostatnio glukozo-zależnym peptydem uwalniającym inusulinę, polipeptyd trzustkowy (PP), somatostatynę i motylinę. Do tej grupy zalicza się również insulinę i glukagon trzustkowy. Jak wiadomo, pobudzanie uwalniania do krwi insuliny i glukagonu zależy przede wszystkim od poziomu glukozy i aminokwasów we krwi. Jednak również niektóre peptydy układu GEP takie jak GIP, sekretyna, gastryna i CCK mają swój udział w tym procesie. Wykazano, że poza trzustką glukagon jest również syntetyzowany w komórkach „A”, występujących w błonie śluzowej trzonu i części przyodźwiernikowej żołądka oraz dwunastnicy (24).

W zakończeniach nerwowych układu peptydergicznego przewodu pokarmowego i trzustki stwierdzono występowanie peptydu uwalniającego gastrynę (GPR), bombezyny, wazoaktywnego peptydu jelitowego (VIP), substancji P (SP) neurotensyny, enkefalin, jelitowego peptydu PHI (PHI-27), peptydu uwalniającego tyreotropinę (TRH), gastryny, CCK-4, peptydu PYY i neuropeptydu PY. Peptydy te są w znacznym stopniu odpowiedzialne za pobudzanie uwalniania wymienionych wcześniej hormonów układu GEP, a przede wszystkim gastryny, CCK, PP i insuliny.

Niektóre spośród peptydów regulacyjnych układu GEP mają w swojej strukturze jednakowe fragmenty łańcuchów peptydowych. Jeżeli taki fragment, lub ewentualnie fragmenty, występują w miejscach cząsteczki, od których zależy aktywność biologiczna, to peptydy te mogą działać antagonistycznie przy wiązaniu się z tym samym typem receptorów na komórkach tkanki docelowej, lub synergistycznie, jeżeli wiążą się z receptorami obu typów. W pierwszym przypadku przykładem może być działanie gastryny i CCK na komórki okładzinowe błony śluzowej żołądka, a w drugim wpływ sekretyny i VIP-u na komórki pęcherzykowe trzustki.

Biorąc pod uwagę wspólne fragmenty w strukturze, a także często podobne działanie, wyodrębniono spośród peptydów regulacyjnych układu GEP trzy rodziny. Do pierwszej z nich należą wszystkie formy molekularne gastryny i CCK oraz ceruleina. W skład drugiej, zwanej rodziną sekretynową, wchodzi: sekretyna, glukagon trzustkowy, glicetyna, VIP, GIP oraz PHI-27. Do trzeciej rodziny opisanej ostatnio należą: polipeptyd YY (PYY), występujący w błonie śluzowej dwunastnicy i jelita cienkiego, a także w jelicie grubym, neuropeptyd Y (PY), oczyszczony z jelita świni oraz polipeptyd PP, oczyszczony z trzustki kilku gatunków zwierząt, a także człowieka (3, 16, 23). Obecność PYY wykazano również u człowieka w błonie śluzowej jelita (13).

Wspólną cechą niektórych peptydów układu GEP, niezależnie od tego czy zalicza się je do jednej z trzech wymienionych rodzin czy też nie, jest występowanie C-końcowej grupy amidowej, niezbędnej do ich działania. Do peptydów zawierających to ugrupowanie należą: gastryna, CCK, GRP, PP, sekretyna, SP, TRH i VIP. Mechanizm powstawania C-końcowej grupy amidowej nie został jeszcze ostatecznie wyjaśniony, ale przyjmuje się, że powstaje ona na drodze proteolizy specyficznego wiązania peptydowego (17). Czasem, jak np. w przypadku gastryny, od N-końca cząsteczki występuje grupa pyroglutamylova, powstająca w trakcie procesów posttranslacyjnych. Zarówno C-końcowa grupa amidowa jak i N-końcowa grupa pyroglutamylova chronią hormony posiadające te ugrupowania przed działaniem wewnątrzkomórkowych egzopeptydaz. Znajdujące się w ko-



mórkach endopeptydazy hydrolizują natomiast stosunkowo łatwo większe formy molekularne hormonu do mniejszych form.

Niektóre hormony należące do układu GEP występują w postaci kilku form molekularnych, różniących się długością łańcucha peptydowego lub obecnością specjalnych ugrupowań. W przypadku gastryny, CCK i somatostatyny, z tego samego prekursora powstaje kilka aktywnych biologicznie form hormonu. Zachodzi to nie tylko na drodze specyficznej proteolizy ale także w trakcie innych procesów posttranslacyjnych, na przykład sulfonowania grup fenyłowych tyrozyny, tak jak w przypadku gastryny. Wynika z tego, że w grupie peptydów regulacyjnych układu GEP występuje zarówno makro- jak i mikroheterogenność (9). Wśród tych peptydów stwierdzono także heterogenność gatunkową, wyrażającą się występowaniem w tych samych pozycjach sekwencji różnych aminokwasów (9).

Jeżeli chodzi o poszczególne peptydy układu GEP to badania nad występowaniem i działaniem indywidualnych form molekularnych są zaawansowane w różnym stopniu. Najdokładniejsze badania w tej dziedzinie przeprowadzono w przypadku gastryny, CCK i somatostatyny. Gastryna występuje w kilku formach molekularnych, a mianowicie: G-58 S, G-34, G-34 S, G-17, G-17 S, G-14 i G-14 S. W formach „S” tyrozyna znajdująca się w pozycji 6 licząc od C-końca cząsteczki jest sulfonowana. Jak wcześniej podano, poszczególne wymienione formy hormonu powstają z tego samego prekursora, przy czym prawdopodobnie w pierwszym lub w drugim etapie powstaje G-34 (duża gastryna), a dopiero z niej pozostałe mniejsze formy hormonu, to znaczy G-17 (mała gastryna) i G-14 (mini-gastryna). Ostatnio wyizolowano z guza trzustki człowieka polipeptyd zbudowany z 58 aminokwasów, nazwany G-58, który stanowi większy fragmenty prekursora gastryny, zbudowanego ze 101 aminokwasów (11, 25). Niektóre zakończenia nerwowe w trzustce wydzielają gastrynę, CCK-4. Przypuszcza się, że ten peptyd jest także syntetyzowany w specjalnych komórkach „TG”, występujących w jelicie cienkim oraz w trzustce. W komórkach tych nie wykazano obecności innych form molekularnych gastryny lub CCK.

CCK występuje w postaci pięciu form molekularnych, a mianowicie: CCK-58, CCK-39, CCK-33, CCK-12 oraz CCK-8. We wszystkich formach tyrozyna w pozycji 7 licząc od C-końca cząsteczki jest sulfonowana, co stanowi warunek konieczny dla aktywności biologicznej hormonu. W tym względzie CCK różni się od gastryny, której formy sulfonowane i niesulfonowane wykazują podobną aktywność biologiczną. Wydaje się, że CCK-58 może być prekursorem wszystkich mniejszych form hormonu, bowiem w stosunku do CCK-39 ma tylko dodatkowy fragment zbudowany z 17 aminokwasów od N-końca cząsteczki. Nie można również wykluczyć hipotezy, że właśnie CCK-58 jest podstawową formą tego hormonu.

Innym hormonem występującym w postaci kilku form molekularnych jest somatostatyna. Wyodrębniono do tej pory u człowieka zdrowego trzy formy molekularne tego hormonu: SS-14, cykliczną formę SS-14 i SS-28. Przypuszcza się, że w postaci różnych form molekularnych występują również takie hormony jak GIP, PP i sekretyna, jednak badania dotyczące heterogenności cząsteczkowej tych peptydów są w mniejszym stopniu zaawansowane.

Z reguły, w komórkach wytwarzających dany hormon zgromadzone są większe formy niż te, które są uwalniane do osocza krwi. Może być jednak odwrotnie. W przypadku gastryny, syntetyzowanej w komórkach „G” części przyodźwiernikowej żołądka, u człowieka 90% hormonu stanowi mniejsza forma, G-17, natomiast w komórkach „G” błony śluzowej dwunastnicy ta forma stanowi tylko 50%, zaś pozostałe 50% stanowi G-34. W osoczu krwi w przeważającej ilości występuje G-34.

Peptydy układu GEP są syntetyzowane nie tylko w komórkach endokrynych



ale także w zakończeniach nerwowych przewodu pokarmowego i trzustki oraz w innych narządach, takich jak na przykład mózg i płuca. Procesy związane z syntezą łańcucha peptydowego, a szczególnie procesy posttranslacyjne mogą przebiegać z różną szybkością w kilku miejscach, w których powstaje dany peptyd. Przykładem może być tworzenie sulfonowanych i niesulfonowanych form gastryny. Poza układem GEP hormon ten jest syntetyzowany w przysadce mózgowej, w komórkach wytwarzających ACTH i hormon melanoforowy a także w neuronach (12). U człowieka w komórkach „G” układu GEP stosunek form sulfonowanych do niesulfonowanych gastryny ulega zmianie w zależności od wieku. W komórkach wytwarzających ACTH powstają formy G-58 i G-34 tylko jako formy niesulfonowane, natomiast w komórkach melanoforowych, a także w neuronach wytwarzana jest G-17 co najmniej w 50% sulfonowana. W przypadku gastryny występują więc dość istotne różnice dotyczące przebiegu modyfikacji posttranslacyjnych (12).

W warunkach fizjologicznych poszczególne formy molekularne danego peptydu mogą wykazywać różny stopień aktywności. Jako przykład służą formy molekularne somatostatyny SS-14 i SS-28. W przestrzeni trzewnej SS-28 działa znacznie słabiej niż SS-14. W mózgu jest natomiast odwrotnie (8). Zachowanie takie nie jest jednak regułą, wykazano bowiem, że G-34 i G-17 pobudzają wydzielanie jonów wodorowych w komórkach okładzinowych błony śluzowej żołądka człowieka z taką samą siłą (2). Nie mniej jednak do niedawna przypuszczano, że G-17 jest najbardziej aktywną formą tego hormonu.

Rozmieszczenie w obrębie błony śluzowej żołądka i jelita oraz w trzustce komórek endokrynnych układu GEP pomiędzy innymi komórkami, często również sekrecyjnymi, wydzielającymi poszczególne składniki płynów trawiennych, utrudniło w bardzo znacznym stopniu zarówno ich badania histologiczne jak i funkcjonalne. Dopiero po opracowaniu wystarczająco swoistych metod immunohistochemicznych udowodniono występowanie typowych komórek endokrynnych dla następujących peptydów regulacyjnych układu GEP: gastryny, CCK, sekretyny, GIP, motyliny, enteroglukagonu, neurotensyny, PP, somatostatyny i SP. Występowanie specjalnych komórek w trzustce syntetyzujących insulinę i glukagon znane było oczywiście znacznie wcześniej. Obecnie używane są dwa systemy klasyfikacji komórek produkujących hormony układu GEP. Pierwszy, został zaakceptowany na konferencji w Lozannie w 1977 roku, drugi system dotyczący komórek endokrynnych układu GEP u człowieka został przyjęty na zjeździe w Santa Monica w roku 1980 (14, 15).

Komórki endokrynnego układu GEP mogą reagować w tym samym czasie na kilka różnych bodźców, niezależnie od drogi ich działania. Komórki te, z wyjątkiem komórek trzustki, odznaczają się dużą wrażliwością mechanizmu rejestrującego zmiany w składzie chemicznym w zawartości przewodu pokarmowego. Składniki pożywienia są więc dla nich silnymi bodźcami wydzielniczymi. W przypadku komórek endokrynnych trzustki dopiero wchłonięte składniki pożywienia powodują uwalnianie hormonów. Pobudzenie komórek endokrynnych układu GEP do uwalniania hormonów zachodzi także pod wpływem innych peptydów tego układu oraz na drodze nerwowej.

Stężenie hormonu w osoczu krwi zależy, jak wiadomo, nie tylko od szybkości syntezy i uwalniania z komórek endokrynnych ale także od szybkości degradacji. Część hormonów układu GEP nie ulega degradacji w wątrobie, bowiem ich stężenie w żyłce wrotnej i we krwi obwodowej jest podobne. Występują jednak w tym zakresie różnice pomiędzy poszczególnymi hormonami układu GEP. Na przykład insulina jest inaktywowana w wątrobie w około 40%, podczas gdy gastryna przechodzi przez wątrobę nienaruszona. Do niedawna przypuszczano, że nerki są głównym narządem usuwającym z krążenia większość peptydów układu GEP. Jednak

obecnie wiadomo, że ich degradacja zachodzi tam najwyżej w 30%. Poza wątrobą i nerkami proces rozpadu tych peptydów może przebiegać również w innych tkankach, na przykład w jelicie i płucach. Miarą szybkości degradacji peptydów w organizmie jest okres półtrwania, który różni się w sposób istotny nie tylko dla poszczególnych hormonów ale nawet dla różnych form molekularnych danego peptydu. Na przykład okres półtrwania dla GIP wynosi 20 minut, dla sekretyny 2 minuty, dla CCK 3 do 5 minut a dla somatostatyny od 1 do 3 minut. Okres półtrwania dla G-34 wynosi od 39 do 42 minut, podczas gdy dla G-17 od 6 do 7 minut.

W ciągu doby poziom hormonów układu GEP w osoczu krwi zmienia się. Jest on na ogół niższy w okresie podstawowym, czyli międzytrawiennym, natomiast wzrasta w okresie poposiłkowym czyli trawiennym. Z reguły w okresie trawiennym stężenie hormonów układu GEP jest kilkakrotnie wyższe niż w warunkach podstawowych. Wyjątek stanowią CCK i sekretyna, których poziom rośnie tylko o około 30%. Należy jednak podkreślić, że hormony te działają na komórkę pęcherzykową trzustki synergistycznie. Do chwili obecnej nie wyjaśniono jeszcze jakie mechanizmy są odpowiedzialne za wydzielanie peptydów regulacyjnych układu GEP w okresie podstawowym. Jedną z dróg uwalniania tych peptydów jest na pewno pobudzenie na drodze nerwowej.

W okresie trawiennym, a więc po posiłku, pierwszym hormonem uwalnianym pod wpływem białek, peptydów i aminokwasów obecnych w soku żołądkowym jest gastryna, pobudzająca wydzielanie kwasu solnego przez komórki okładzinowe błony śluzowej trzonu żołądka. Kwas solny po przedostaniu się do dwunastnicy pobudza uwalnianie sekretyny z komórek „S” zgrupowanych w największej ilości w opuszcze dwunastnicy (4). Ostatnio, obecność komórek „S” wykazano również w błonie śluzowej części przyodźwiernikowej żołądka (1). Sekretyna, będąca peptydem o charakterze zasadowym jest wydzielana wówczas, gdy pH treści dwunastniczej jest niższe niż 4,5. Przypuszcza się, że kwasy tłuszczowe oraz aminokwasy mogą także brać udział w uwalnianiu tego hormonu. W tym samym czasie pod wpływem niskocząsteczkowych peptydów oraz L-aminokwasów, spośród których fenyloalanina i tryptofan działają najaktywniej, jest uwalniana CCK. Przedostające się z żołądka do jelita jony wodorowe powodują również uwalnianie tego hormonu. Pobudzająco na komórki „I” syntetyzujące CCK działają także długołańcuchowe kwasy tłuszczowe, monoglicerydy oraz jony wapniowe. Pod wpływem glukozy a także kwasów tłuszczowych obecnych w treści dwunastniczej, powstających prawdopodobnie w początkowym okresie trawienia z trójglicerydów pod wpływem lipazy żołądkowej, jest uwalniany GIP.

Chociaż po podaniu posiłku stwierdzono wyraźny wzrost stężenia enteroglukagonu, PP, motyliny i VIP w osoczu krwi, to jednak nie wyjaśniono, które składniki pożywienia są odpowiedzialne za uwalnianie tych peptydów. Wydaje się, że w przypadku enteroglukagonu są to trójglicerydy lub długołańcuchowe kwasy tłuszczowe oraz cukry proste. PP jest uwalniany prawdopodobnie pod wpływem posiłku białkowego. Należy tu jednak zaznaczyć, że musi być to działanie pośrednie, ponieważ u człowieka hormon ten jest w 90% syntetyzowany w trzustce. Składniki pokarmowe uwalniające motylinę i VIP są nieznane.

Po osiągnięciu zawartości szczytowej w osoczu krwi sekretyna VIP i GIP zaczynają hamować uwalnianie gastryny. Nieco później gastryna, sekretyna, GIP, CCK a następnie także insulina i glukagon pobudzają wydzielanie somatostatyny, która z kolei hamuje wydzielanie wszystkich wymienionych wyżej hormonów. Stąd przypuszcza się, że właśnie somatostatyna może być nadrzędnym peptydem, regulującym wydzielanie hormonów układu GEP w końcowym etapie okresu trawiennego. Równoległe z somatostatyną, pod wpływem sekretyny, CCK i GIP-u



jest uwalniany w trzustce PP, który poprzez wpływ na komórki „S” i komórki „I” ogranicza uwalnianie sekretyny i CCK. W sumie na skutek opisanego współdziałania pomiędzy poszczególnymi peptydami układu GEP oraz różnymi składnikami pożywienia mniej więcej po upływie około dwóch i pół godzin od podanego posiłku dochodzi do obniżenia poziomu tych peptydów w osoczu krwi. Ich stężenie osiąga wtedy wartości podobne do tych, jakie były przed posiłkiem. Dokładna ocena działania poszczególnych peptydów układu GEP w okresach poposiłkowych jest jednak trudna ze względu na to, że szereg procesów przebiega równolegle.

Zagadnieniem dotyczącym peptydów układu GEP, będącym przedmiotem wielu badań jest działanie tych peptydów w warunkach fizjologicznych. W przypadku gastryny, wykazano że hormon ten pobudza wydzielanie jonów wodorowych, czynnika wewnętrznego Gastla, pepsyny a także lipazy przez komórki błony śluzowej trzonu żołądka. Z kolei sekretyna hamuje wydzielanie jonów wodorowych w soku żołądkowym, natomiast pobudza wydzielanie jonów wodorowęglanowych i wody w soku trzustkowym, w żółci oraz w płynie wydzielanym przez gruczoły dwunastnicy. Hormonem pobudzającym wydzielanie enzymów proteolitycznych, lipolitycznych, glikolitycznych oraz nukleaz a także wody i wodorowęglanów w soku trzustkowym jest CCK. Peptyd ten przyspiesza także obkurczanie woreczka żółciowego co prowadzi do szybszego wydzielania żółci. Również glukagon trzustkowy przyspiesza wydzielanie żółci.

GIP hamuje wydzielanie soku żołądkowego tylko u zwierząt niektórych gatunków, natomiast nie wykazano tej funkcji hormonu u człowieka. Peptydem ograniczającym wydzielanie soku trzustkowego jest PP. Glukagon trzustkowy hamuje zarówno wydzielanie soku żołądkowego jak i trzustkowego a także ogranicza wchłanianie wody i elektrolitów z jelita. Przedstawiony schemat współdziałania hormonów układu GEP w zakresie pobudzania i hamowania wydzielanych płynów trawiennych nie jest na pewno jeszcze kompletny, ponieważ uwzględniono w nim tylko te peptydy, których własności są najlepiej poznane.

Biorąc pod uwagę zmiany poziomu hormonów układu GEP w osoczu krwi w ciągu doby, Jorde i Burhol (7) wyróżnili dwie ich grupy. Do pierwszej zaliczyli gastrynę, insulinę i somatostatynę oraz GIP i PP, natomiast do drugiej sekretynę, CCK i VIP. U człowieka zdrowego najwyższe stężenie hormonów pierwszej grupy występuje w okresach trawiennych. Potem, poziom gastryny i insuliny wraca do wartości rannych, to znaczy występujących przed pierwszym posiłkiem. W przypadku somatostatyny w ciągu dnia jest podobnie, natomiast stężenie tego hormonu rośnie w godzinach wieczornych. Ze względu na funkcje somatostatyny wydaje się to być uzasadnione, bowiem w nocy jest najdłuższa przerwa w przyjmowaniu posiłków. Stężenie GIP w okresach międzytrawiennych w ciągu dnia jest wyższe niż przed przyjęciem pierwszego posiłku. Jeżeli okaże się, że jak u świni także u człowieka GIP aktywizuje lipazę lipoproteidową w naczyniach kapilarnych tkanki tłuszczowej, podwyższony poziom hormonu w ciągu dnia byłby uzasadniony. Wyższy poziom PP w ciągu dnia, w okresach międzytrawiennych, niż przed przyjęciem pierwszego posiłku pozostaje do tej pory niewyjaśniony.

Chociaż hormony zaliczone przez Jorde i Burhola (7) do drugiej grupy są również uwalniane do krwi w zależności od przyjmowanych posiłków, to jednak najwyższe ich stężenie występuje u człowieka zdrowego późno wieczorem lub w nocy. Przyczyny wysokiego wtedy poziomu sekretyny, CCK i VIP-u nie są znane. Podobnie jak w przypadku somatostatyny nasuwa się pytanie, jakie czynniki są odpowiedzialne za uwalnianie wymienionych hormonów w tym okresie doby.

Działanie peptydów układu GEP na poziomie komórki jest jeszcze jednym kierunkiem badań prowadzonym przede wszystkim na izolowanych komórkach pęcherzykowych trzustki oraz w mniejszym nieco zakresie na komórkach okładzi-



nowych błony śluzowej trzonu żołądka. Wykazano obecność sześciu klas receptorów na błonie komórek pęcherzykowych trzustki przy czym cztery z nich to receptory peptydów układu GEP takich jak CCK, sekretyna, VIP i bombesyna (10).

CCK-33 może wiązać się od C-końca cząsteczki z receptorami jednej podklasy, natomiast od N-końca cząsteczki z receptorami drugiej podklasy. Pierwszy typ kompleksów jest odpowiedzialny za pobudzenie wydzielania białka enzymatycznego soku trzustkowego, poprzez aktywację metabolizmu fosfolipidów błonowych i mobilizację jonów wapnia w obrębie cytoplazmy. Drugi typ kompleksów przyspiesza pobieranie i zużywanie materiału energetycznego: glukozy i kwasów tłuszczowych, poprzez przyspieszenie procesu utleniania mitochondrialnego.

W przypadku sekretyny i VIP kompleksy hormon-receptor aktywują układ cyklazy adenylowej w błonie komórek pęcherzykowych, co pociąga za sobą wszystkie konsekwencje tego procesu w obrębie komórek. Prowadzi to ostatecznie do pobudzenia wydzielania wody i elektrolitów. Działanie CCK, sekretyny i VIP-u jest zsynchronizowane co stanowi warunek konieczny do tego, aby zachodziło wydzielanie białka enzymatycznego w roztworze wodnym o odpowiednim stężeniu elektrolitów.

Obecność receptorów gastrynowych wykazano na błonie komórek okładzinowych błony śluzowej trzonu żołądka. Kompleks hormon-receptor powoduje w tych komórkach mobilizację jonów wapnia przy współdziałaniu kalmoduliny (6). Jest to warunkiem koniecznym do pobudzenia wydzielania płynu okładzinowego, którego głównym składnikiem jest kwas solny i czynnik wewnętrzny Castla. Drugim warunkiem do tego, aby nastąpiło pobudzenie wydzielania z komórek okładzinowych jest równoczesny wzrost stężenia c-AMP, co z kolei zależy od aktywacji cyklazy adenylowej. U człowieka proces ten zachodzi pod wpływem histaminy działającej w tym samym czasie na drodze parakrynej. Podobnie jak w komórkach pęcherzykowych trzustki, również w komórkach okładzinowych aby pobudzić wydzielanie musi równocześnie nastąpić wzrost stężenia c-AMP i jonów wapnia.

Przedstawione w niniejszym opracowaniu fakty dotyczące własności, występowania i działania peptydów układu GEP wskazują nie tylko na duży postęp wiedzy w tej dziedzinie ale także na szereg problemów, jeszcze do tej pory niewyjaśnionych. Tym niemniej można już obecnie twierdzić, że funkcja peptydów układu GEP w organizmie człowieka nie ogranicza się tylko do ich wpływu na przewod pokarmowy ale poprzez współdziałanie z innymi hormonami jest znacznie szersza niż dawniej przypuszczano.

Zaakceptowano do druku 30 grudnia 1985 roku

## PIŚMIENNICTWO

1. Chey W. Y., Chang T. M., Park H. J., Lee K. Y., Escoffery R., (1983), *Endocrinology*, **113**, 651—656.
2. Eysselein V. E., Maxwell V., Reedy T., Wunsch A., Walsh J. H., (1984), *J. Clin. Invest.*, **73**, 1284—1290.
3. Flaten O., (1983), *Scand. J. Gastroenterol.*, **18**, 1—4.
4. Greenberg G. R., McCloy R. F., Baron J. H., Bryant M. G., Bloom S. R., (1982), *Europ. J. Clin. Invest.*, **12**, 361—372.
5. Grossman M. J., (1977), *Federation Proc.*, **36**, 1930—1932.
6. Heldsinger A. A., Vinih A. J., (1984), *J. Clin. Invest.*, **74**, 124—132.
7. Jorde R., Burhol P. G., (1985), *Scand. J. Gastroenterol.*, **20**, 1—4.

8. Konturek S. J., Kwiecień N., Obtulowicz W., Bielański W., Oleksy J., Schally A. V., (1985), *Scand. J. Gastroenterol.*, **20**, 31—38.
9. Mutt V., (1982), *Scand. J. Gastroenterol., Suppl.*, **77**, 133—152.
10. Petersen O. H., (1982), *Brit. Med. Bull.*, **38**, 297—302.
11. Reeve J. R., Walsh J. H., Tompkins R. K., Hawke D., Shively J. E., (1984), *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, **123**, 404—409.
12. Rehfeld J. F., Andersen B. N., Petersen B., (1983), *Scand. J. Gastroenterol.*, **18**, 19—24.
13. Roddy D. R., Koch T. R., Reilly W. A., Carney J. A., Go V. L. W., (1985), *Gastroenterology*, **88**, 1557.
14. Solcia E., Polak J. M., Pearse A. G. E., Forssman W. G., Larsson L., Sundler F., Lechago J., Grimelius L., Fujita T., Greutzfeld W., Gepts W., Falkmer S., Lefranc G., Heitz Ph., Hage E., Buchan A. M. J., Bloom S. R., Grossman M. I., (1978), w: *Gut Hormones* red. Bloom S. R., str. 40; Churchill-Livingstone, Edinburgh.
15. Solcia E., Capella C., Buffa R., Usellini L., Fiocca R., Sessa F., (1981) w: *Physiology of the gastrointestinal tract* red. Johnson L. R., 39—58; Raven Press, Now York.
16. Solomon T. E., (1985), *Gastroenterology*, **88**, 838—844.
17. Suchanek G., Kreil G., (1977), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **74**, 975—978.
18. Szafran H., Sztefko K., (1984), *Endokrynol. Pol.*, **35**, 125—138.
19. Szafran Z., Szafran H., Sztefko K., (1985), *Endokrynol. Pol.*, **36**, 61—73.
20. Sztefko K., Szafran H., (1981), *Diag. Lab.*, **17**, 129—142.
21. Sztefko K., Szafran H., (1982), *Diag. Lab.*, **18**, 199—217.
22. Sztefko K., Szafran H., (1985), *Diag. Lab.*, **21**, 1—10.
23. Taylor I. L., (1985), *Gastroenterology*, **88**, 731—737.
24. Unger R. H., Dobbs R. E., Orci L., (1978), *Ann. Rev. Physiol.*, **40**, 307—343.
25. Walsh J. H., dane w przygotowaniu do druku.

## SŁOWNICTWO

JAKUB KAROL PARNAS

### W sprawie polskiej terminologii fizjologiczno-chemicznej<sup>1</sup>

(Fragmenty)

„Przy pracach redakcyjnych nad polskim podręcznikiem Chemii Fizjologicznej nasunęło mi się więcej zagadnień, trudności i sprzeczności terminologicznych, aniżeli nasuwa się zwykle przy codziennej pracy badawczej i dydaktycznej. Miałem przy tym sposobność do zapoznania się z różnymi odchyleniami od tego słownictwa, do którego jestem przyzwyczajony, a to było podniętą do głębszego zastanowienia się nad zagadnieniami terminologicznymi. Przez tę pracę byłem przygotowany do przedstawienia *ex improviso* referatu na wieczorne dyskusyjnym Oddziału Warszawskiego Polskiego Towarzystwa Fizjologicznego dnia 3 grudnia 1937; w obecny tekst tego referatu starałem się włączyć uwagi dyskusyjne uczestników tego zebrania i dołączyć do tych uwag moje własne refleksje. Dalsze refleksje nasunął »Spis Błędów i Nieściśłości Językowych Polskiego Słownictwa Chemicznego«, ułożony przez Komisję Językową przy Zarządzie Głównym Polskiego Towarzystwa Chemicznego w Warszawie. Spis ten zarówno w części dotyczącej błędów, jak i w części, dotyczącej spolszczenia języków obcych, stanowi niewątpliwie doniosły postęp; w nielicznych tylko punktach jestem innego zdania, aniżeli autorzy tych wniosków.

Poprawa i ujednostajnienie polskiej terminologii fizjologiczno-chemicznej wymaga przede wszystkim uzgodnienia poglądów na kilka zagadnień zasadniczych. Zagadnienia te ujmuję w formę wniosków następujących:

1. Terminologia polska w dziedzinie biochemii powinna być zgodna z terminologią używaną w Chemii organicznej, mineralnej i fizycznej.

2. W terminologii związków, którymi zajmuje się Chemia Fizjologiczna, należy dążyć do utrzymania i rozwijania nazw polskich, jeżeli takie nazwy już istnieją, albo jeżeli w słownictwie życia codziennego i technicznym istnieją już przygotowane źródłosłowy. W przypadkach nato-

<sup>\*)</sup> Odczyt wygłoszony na posiedzeniu dyskusyjnym Oddziału Polskiego Towarzystwa Fizjologicznego w Warszawie, *Acta Biologiae Experimentalis.*, 11, 357—368, 1937.



miast, w których źródłosłowów takich brak w języku polskim, należy przyswajać nazwy obce, urobione ze źródeł łacińskich i greckich; a przyswajać je należy w taki sposób, ażeby nazwy były logiczne, jasne, nie dwuznaczne, i w brzmieniu swoim nie kłóciły się z właściwościami języka polskiego: przyswajać tak, jak przyswajano wyrazy obce w dobrej polszczyźnie w. XIX.

3. Przy urabianiu nazw polskich należy trzymać się zasad przyjętych w dawniejszym słownictwie polskim, oraz tych, które przyjęła Unia Chemii Czystej i Stosowanej. Tak np. należy dążyć do tego, ażeby końcówka *ina* albo *yna* oznaczały tylko ciała o charakterze zasadowym albo amfoterycznym, i żeby końcówka *ol* oznaczała związki organiczne wodorotlenowe." (...)

„Zepsucie słownictwa chemicznego w wieku XX wynikało stąd, że wielu z nas, powróciwszy do Polski po wieloletnim pobycie poza krajem i po wyszkoleniu wyłącznym za granicą, wprowadzało terminologię, do której przyzwyczailiśmy się poza krajem — nie tylko terminologię ale i gwarę pracownianą — bez liczenia się z tym, czego w słownictwie chemicznym dokonali Ci, którzy w Polsce tymi sprawami się zajmowali. Te grzechy należy moim zdaniem naprawić. Jako przykład zupełnie zbędnych wyrazów, przyjętych w gwarze laboratoryjnej z języków obcych, przytoczę »bagietkę«, używaną w Warszawie dla określenia pręcika szklanego. Gwara laboratoryjna stwarza z roku na rok słowa niekiedy bardzo nieładne, ale przyjmujące się: twórcami tych słów są nieraz bardzo wybitni przedstawiciele nauki, którzy przy tym niekoniecznie muszą mieć kulturę językową i wyczucie właściwości języka polskiego.” (...)

„Innym czynnikiem, który wpływa na zepsucie języka naukowego, jest wpływ niedbałego języka dziennikarskiego.” (...) Na przykład: »słowo »reasumować« weszło na skutek nieporozumień dziennikarskich w użycie jako synonim słowa *resumować*, które rzeczywiście oznacza *streszczać*; *reasumować* natomiast znaczy *odwoływać*, *wycofać*, np. *reasumować uchwałę Wydziału*. Podobnie słowa *działać* i *oddziaływać* są użyte jako synonimy, jak się to utarło w ostatnich dwudziiesięcioleciach pod wpływem niedbałości językowej dziennikarzy i polityków. *Działać* i *oddziaływać* pozostają względem siebie w stosunku takim, jak *agere* i *reagere*: różnica w chemii szczególnie ważna, i w słownictwie chemicznym dawniejszym starannie uwzględniona.” (...)

„Jeżeli prace nad uzgodnieniem i zrjonalizowaniem terminologii, i nadaniem jej poprawności językowej posuną się, to będziemy musieli wyrzec się niektórych przyzwyczajzeń, ale ułatwimy sobie pracę, nie będziemy tracić czasu na rozważania językowe i poprawienie słownictwa swojego i kolegów, i bardzo ułatwimy uczenie się naszym uczniom. Zdaje mi się, że warto nad tym popracować i uzgodnienie przeprowadzić w niektórych punktach, swobodę natomiast pozostawić w innych, dokładnie określonych.” (...).

KOMUNIKAT KOMISJI SŁOWNICTWA  
POLSKIEGO TOWARZYSTWA BIOCHEMICZNEGO

## Zmiany w słownictwie enzymów

W nowym wydaniu „Enzyme nomenclature and classification” opracowanym przez Komitet Słownictwa IUB i Połączone Komisje Słownictwa Biochemicznego IUB-IUPAC, a będącym obecnie w druku, wprowadzono pewne zmiany o charakterze ogólnym. Podano je do wiadomości w „Newsletter January 1984”, ogłoszonym w większości czasopism biochemicznych (1). Komisja Słownictwa PTBioch. pragnie powiadomić czytelników Postępów Biochemii o wprowadzonych zmianach, tym bardziej, że dotyczą one nazw, budzących częste nieporozumienia i kontrowersje.

## Syntazy

Do Komisji Słownictwa IUB napłynęło wiele uwag, świadczących o tym, że nazwy „syntaza” i „syntetaza” są zbyt do siebie podobne, by mogły zadowalająco określać wzajemnie wykluczające się pojęcia. W nowym wydaniu „Enzyme nomenclature” zmieniono nazwy zalecane, pozostawiając jednak możliwość używania dotychczasowych określeń tym autorom, którym dawny system odpowiada. Nazwę „syntaza” z dodatkiem nazwy substancji można obecnie nadawać każdemu enzymowi, katalizującemu reakcję, w której ta substancja powstaje. W ten sposób nazwę „syntaza” można nadawać także enzymom, katalizującym reakcje przebiegające z hydrolizą trifosforanów nukleozydów, a więc enzymom, które dotychczas nie mogły nosić tej nazwy. Do nazw takich jak syntaza glikogenowa, syntaza cytrynianowa mogą dojść obecnie takie, jak np. syntaza glutaminowa, syntaza NAD<sup>+</sup> itp.

Enzymy, katalizujące reakcje z towarzyszącą hydrolizą trifosforanów nukleozydów powinny w swej nazwie zawierać raczej określenia „ligaza” niż „syntetaza”, z wymienieniem łączących się reaktantów. I tak nazwy: ligaza tyrozyna-tRNA i ligaza octan-CoA winny zastąpić nazwy syntetaza tyrozylo-tRNA i syntetaza acetylo-CoA. Obok zalecanych nazw pozostawia się jednak formę „syntetaza” jako dopuszczalną. Autorzy mogą więc nadal używać określenia „syntetaza” dla wyróżnienia enzymów, których reakcje wymagają hydrolizy trifosforanów nukleozydów. Zważywszy jednak, jak wielu biochemików nie rozróżnia znaczenia nazw „syntaza” i „syntetaza” autorzy ci będą lepiej zrozumiani przez czytelników, gdy używają formy „ligaza”.

## Sjalidaza

Enzym EC 3.2.1.18, uprzednio zwany neuraminidazą, w nowym wydaniu „Enzyme nomenclature” nosi nazwę sjalidaza. Enzym ten działa raczej na reszty kwa-



su sjałowego, niż neuraminowego, skoro nazwa „kwas sjałowy” oznacza N- i O-acylowane kwasy neuraminowe.

## ATPazy

Specjalnie powołany zespół (N. M. Green, I. M. Glynn, W. Hasselbach, L. E. Hokin i K. van Dam) opracował sposób zapisu ATPaz. Wszystkie ATPazy występowały dotychczas pod wspólnym hasłem EC 3.6.1.3. Uznając, że katalizowane reakcje mogą obejmować zarówno mechaniczne przenoszenie i pompowanie jonów, jak i hydrolizę ATP, w nowym wydaniu wprowadzono szereg osobnych hasel, choć reakcję określa się nadal jako hydrolizę ATP.

EC 3.6.1.32 ATPaza miozynowa

EC 3.6.1.33 ATPaza dyneinowa

EC 3.6.1.36 ATPaza transportująca  $H^+/K^+$

EC 3.6.1.37 ATPaza transportująca  $Na^+/K^+$

EC 3.6.1.38 ATPaza transportująca  $Ca^{2+}$

W specjalny sposób potraktowano następujące enzymy, które wymieniono oddzielnie, chociaż katalizują jedną reakcję:

EC 3.6.1.34 syntaza ATP, transportująca  $H^+$

EC 3.6.1.35 ATPaza transportująca  $H^+$

Ta pierwsza oznacza enzymy, tworzące ATP w mitochondriach i chloroplastach, ta druga — enzymy wykorzystujące hydrolizę ATP do pompowania jonów  $H^+$ , np. w błonie plazmatycznej *Neurospora* i drożdży.

Inny zespół (H. Bielka, J. J. Champoux, M. Gellert, N. M. Green i J. C. Wang) służył radą przy umieszczaniu w spisie ATPaz zależnych od DNA. Należą do nich enzymy rozdzielające nici DNA (np. „helikaza II” z *E. coli*) i enzymy, renaturujące zdenaturowany DNA (np. „rep A” z *E. coli*). ATPazy, których nie wymieniono oddzielnie, można nadal zaliczać do EC 3.6.1.3.

## Topoizomerazy

W nowym wydaniu „Enzyme nomenclature” wprowadzono dwa hasła:

EC 5.99.1.2. topoizomeraza DNA

EC 5.99.1.3. topoizomeraza DNA (hydrolizująca ATP)

Topoizomeraza DNA katalizuje relaksację superhelikalnych skrętów DNA poprzez nacięcie (*nicking*) i zamknięcie łańcuchów. Dotychczas znano ją jako enzym „Typu I”. Topoizomeraza DNA, hydrolizująca ATP, znana dotychczas jako enzym „Typu II”, może wstawiać superhelikalne skręty, a także nacinać i łączyć z powrotem łańcuchy DNA.

## Glukokinaza

W poprzednim wydaniu „Enzyme nomenclature” nazwa „glukokinaza” EC 2.7.1.2 odnosiła się wyłącznie do enzymów wysoce swoistych względem glukozy, takich jakie występują w bakteriach, mięczakach i bezkręgowcach. Tym niemniej, nazwę oraz numer klasyfikacyjny nadawano często izoenzymowi heksokinazy (EC 2.7.1.1), charakterystycznemu dla wątroby ssaków, mimo iż izoenzym ten nie jest bardziej swoisty względem glukozy niż inne izoenzymy heksokinazy tego samego zwierzęcia. W nowym wydaniu książki wątrobowy izoenzym heksokinazy będzie wyraźnie



przypisany do EC 2.7.1.1, ale zaznaczy się możliwość używania nadal w piśmiennictwie nazwy „glukokinaza”.

#### PIŚMIENNICTWO

1. International Union of Biochemistry, International Union of Pure and Applied Chemistry. Nomenclature Committee of IUB, IUB-IUPAC Joint Commission on Biochemical Nomenclature. Newsletter January 1984. *Z. Physiol. Chem.*, 1984, 365, I—V.

*Tłumaczyła Janina Kwiatkowska*



## SPRAWOZDANIA

### Kurs FEBS na temat „Izolowanie i charakterystyka białek błonowych: aspekty biochemiczne i biofizyczne”

(Włochy, Brisighella, 8—14 września 1985 r., Parma, 15—21 września 1985 r.)

Tegoroczny kurs biochemiczny Federacji Europejskich Towarzystw Biochemicznych odbył się we Włoszech. Organizatorami kursu byli profesorowie: A. Vecli i L. Masotti z Parmy (Włochy) oraz profesor A. Azzi z Berna (Szwajcaria). Pierwsza, teoretyczna część kursu odbyła się w Brisighelli w pobliżu Faenzy w prowincji Rawenna. Stu dziesięciu uczestników z Europy oraz Stanów Zjednoczonych i Kanady wysłuchało 27 wykładów poświęconych różnym aspektom biochemii i biofizyki błon. Tytuły wykładników brzmiały:

- 1) Ewolucja koncepcji organizacji błon (L. Ernster, A. Martonosi),
- 2) Struktura i funkcja wybranych białek błonowych (A. Azzi, M. Baltscheffsky, H. Betz, W. Cramer, B. Hess, K. Leonard, Yu. A. Ovchinnikov, J. P. Rosenbush, G. Zaccai),
- 3) Rekonstrukcja białek błonowych (H. J. Apell, R. Bentz, S. Papa),
- 4) Organizacja i funkcja mitochondrialnych układów transportujących (M. Klingenberg, P. Vignais) oraz jonowych kanałów błonowych (E. Bamberg, F. Conti, P. Joliot, A. Martonosi, L. Masotti, W. Sebald),
- 5) Zastosowanie technik fizykochemicznych (magnetyczny rezonans jądrowy, spektroskopia fluorescencyjna, autoradiografia) w badaniach białek błonowych (J. Brunner, G. Levy, C. Montecucco, A. G. Szabo, A. V. Xavier).

Uczestnicy kursu mieli również możliwość zaprezentowania wyników własnych badań w czasie dwóch wieczornych konferencji oraz w sesji plakatowej. Zajęciom programowym towarzyszyły liczne dyskusje i konsultacje.

W czasie eksperymentalnej części kursu odbywającej się w laboratoriach Uniwersytetu w Parmie wzięło udział 41 osób, głównie z Włoch (11), RFN (7), Wielkiej Brytanii (5), Szwajcarii (4), Francji (4), a także z Polski (3), NRD (2), Szwecji (2), Czechosłowacji (1), Izraela (1) i Holandii (1). Wykonały one 5 przez siebie wybranych z 13 możliwych doświadczeń, mających na celu poznanie najnowszych technik oczyszczania białek błonowych, znakowania składników błonowych przy użyciu znaczników fluorescencyjnych i spinowych oraz zastosowania spektroskopii w badaniach struktury białek i ich oddziaływań z lipidami (elektronowy rezonans paramagnetyczny, jądrowy rezonans magnetyczny, fluorymetria, dichroizm kołowy). Uczestnicy tej części kursu mogli również zapoznać się z metodami rekonstrukcji mitochondrialnych układów transportujących w sztucznych pęcherzykach fosfolipidowych. Eksperymenty poprzedzone były trzema wykładami o charakterze metodycznym (G. Anastasi, P. Riccio, A. Spisni).

Organizatorzy kursu zadbali również o zorganizowanie wypoczynku uczestników w czasie wolnym od zajęć. Odbywały się wspólne spotkania towarzyskie oraz wycieczka do Rawenny.

Mariusz Michalik





## KRONIKA POLSKIEGO TOWARZYSTWA BIOCHEMICZNEGO

### **XXI Zjazd Polskiego Towarzystwa Biochemicznego**

Kraków, 25—27 września 1985 r.

W dniach 25—27 września 1985 r. obradował w Krakowie XXI Zjazd Polskiego Towarzystwa Biochemicznego. W obradach brało udział 900 osób, w tym 14 osób z zagranicy jako goście Zjazdu, którzy prezentowali wiedzę różnych kierunków biochemii. Byli to goście z Jugosławii, Węgier, Bułgarii, Anglii, USA, Kanady, RFN i Francji. Otwarcie Zjazdu odbyło się w sali teatru im. Juliusza Słowackiego. Sesję otworzył Przewodniczący Komitetu Naukowo-Organizacyjnego XXI Zjazdu PTBioch. doc. dr Zdzisław Żak. O znaczeniu krajowych zjazdów biochemicznych mówił Prezes Zarządu Głównego Polskiego Towarzystwa Biochemicznego — prof. dr Kazimierz Zakrzewski.

Sesja otwarcia Zjazdu była poświęcona uczczeniu 100-rocznicy urodzin Jakuba Karola Parnasa — twórcy polskiej szkoły biochemicznej. Wspomnienia o życiu i osiągnięciach naukowych Profesora J. K. Parnasa przedstawił prof. dr hab. Włodzimierz S. Ostrowski. Treść odczytu będzie przedmiotem oddzielnej publikacji w *Postęпах Biochemii*.

Odczyt plenarny nt.: „Funkcjonalne zmiany w strukturze makrocząsteczek” wygłosił prof. dr Marian Kochman.

Podczas Zjazdu odbyło się zebranie Zarządu Głównego PTBioch., na którym omówiono niektóre problemy aktualnego Zjazdu oraz program następnego Zjazdu PTBioch. w Katowicach w 1986 r. Zarząd Główny powołał Komisję do Nagrody dla młodych biochemików im. W. Mozołowskiego. Przewodniczącym był prof. dr Zdzisław Szafran. Komisja rozpatrzyła 13 kandydatur i podała Zarządowi Głównemu charakterystykę według zalecanego systemu punktacji.

XXI Zjazd organizował Uniwersytet Jagielloński, Akademia Medyczna im. M. Kopernika i Akademia Rolnicza im. H. Kołłątaja. Obrady Zjazdu odbywały się w 4 Instytutach Uniwersytetu Jagiellońskiego. Tematem wiodącym w programie naukowym była struktura i funkcja makrocząsteczek, odbyło się też 6 sympozjów i sesje plakatowe.

Temat wiodący, którego organizatorem był doc. dr Z. Żak, obejmował 22 komunikaty i dłuższe wykłady wprowadzające. Posiedzenia dotyczyły następujących problemów: strukturalne i stereochemiczne własności łańcuchów oligo- i polipeptydowych, badania przestrzenne struktury inhibitorów trypsyny, zmiany konformacyjne niektórych enzymów, badania kompleksów aminoacyl tRNA-ligaza oraz własności i znaczenie fizjologiczne haptoglobulin.

### **Symposium — Cukrzyca doświadczalna jako model cukrzycy klinicznej**

Organizator: dr Anna Kordowiak, dr Amalia Guzdek.

Właściwa sesja naukowa była poprzedzona krótką uroczystością dla uczczenia pamięci zmarłej Prof. dr Marii Sarneckiej-Keller, Prorektora Uniwersytetu Ja-

giellońskiego. Podczas tej uroczystości, w imieniu J. Magnificencji Rektora UJ odśpiewał tablicę pamiątkową i nadał audytorium imię Profesor Sarneckiej-Keller, Prorektor Uniwersytetu prof. dr Andrzej Kopff. Natomiast omówienie działalności naukowej zmarłej — przedstawił Prorektor UJ, profesor dr Aleksander Koj.

Podczas właściwej sesji naukowej w sympozjum A poza 3 wykładami wprowadzającymi, dotyczącymi problemów metabolizmu lipidów w cukrzycy, regulacji wydzielania i obwodowego działania insuliny oraz glukoneogenezy i ureogenezy w warunkach cukrzycy doświadczalnej, przedstawiono łącznie 16 referatów lub plakatów. Tematyka obejmowała zmiany składu i funkcji, jak również struktury niektórych organelli błoniastych komórki, badania syntezy części cukrowej glikoprotein, metabolizmu alfa-ketokwasów, zmiany glikozaminoglikanów i kolagenu podczas gojenia się ran u zwierząt z cukrzycą, jak również badania nad rolą insuliny liposomalnej w regulacji poziomu glukozy oraz zmiany aktywności niektórych enzymów.

### **Sympozjum B — Peptydy fizjologiczne czynne — struktura i wpływ na komórki docelowe**

Organizator: doc. dr hab. Andrzej Klein.

Sympozjum poświęcono omówieniu trzech wybranych grup peptydów regulacyjnych: hormonów przewodu pokarmowego, neuropeptydów oraz czynników wzrostu i różnicowania. Zgodnie z założeniami programowymi Sympozjum podzielono na trzy półdienne spotkania, z których każde rozpoczynał wykład wprowadzający. Wygłoszone wykłady wprowadzające nie tylko naświetliły współczesny punkt widzenia na poszczególne grupy peptydów, ale także wskazały na ścisłe powiązania pomiędzy hormonami, neuropeptydami i czynnikami wzrostu. Prezentowane teorie, aczkolwiek jeszcze dyskusyjne, rzucają nowe światło na całą grupę peptydów regulacyjnych, związków, które w obecnej chwili są przedmiotem olbrzymiego zainteresowania przedstawicieli wielu różnych dyscyplin naukowych. Przedstawione w ramach Sympozjum referaty wywołały znaczne zainteresowanie uczestników Zjazdu. Przedstawiono łącznie 22 komunikaty ustne.

### **Sympozjum C — Fosfohydrolazy**

Organizator: prof. dr Włodzimierz S. Ostrowski.

Sympozjum dotyczyło kwaśnych i zasadowych fosfataz oraz fosfodiesteraz, ich struktury i funkcji biologicznej jak również problemy patologii i mechanizmów działania tych enzymów. Przedstawiono 26 doniesień ustnych i plakatów, w tym trzy odczyty gości zagranicznych.

### **Sympozjum D — Biochemia leukocytów i makrofagów**

Organizatorzy: prof. dr Aleksander Koj, dr Jerzy Naskalski, doc. dr Jan M. Zgliszczyński.

Sympozjum odbyło się w dniach 26 i 27 września 1985 r. w sali 056 A Instytutu Fizyki UJ.

W pierwszym dniu tematyka dotyczyła występowania i własności enzymów proteolitycznych leukocytów oraz ich osoczowych inhibitorów. W sumie wygło-



szo 7 trzydziestominutowych referatów oraz 8 piętnastominutowych komunikatów, a po każdym odbywała się krótka dyskusja. Obrady i dyskusja toczyły się w języku angielskim.

W drugim dniu obrad, poświęconym działaniu mieloperoksydazy oraz innym mechanizmom bakterioobójczym, wygłoszono 4 trzydziestominutowe referaty oraz 8 piętnastominutowych komunikatów (w języku angielskim).

Łącznie Sympozjum obejmowało 34 referaty i komunikaty. Materiały sympozjum są obecnie przygotowywane do druku w *Folia Histochemica et Cytobiologica* (zeszyt 2/1986).

W Sympozjum uczestniczyło 10 zaproszonych prelegentów z zagranicy, w tym 6 osób na koszt Uniwersytetu Jagiellońskiego, a 4 na koszt Polskiego Towarzystwa Biochemicznego.

### **Sympozjum E — Ekotoksyny i biochemiczne mechanizmy ich działania**

Organizator: prof. dr Maria Gumińska.

Sympozjum to obejmowało problematykę podstawowych mechanizmów intoksykacji organizmów żywych oraz wybrane mechanizmy szczegółowe związane z działaniem związku fluoru, wybranych metali ciężkich, cyjanków, pastycydów, substancji mutagennych i mechanizmów związanych z mutagenezą i karcinogenezą chemiczną. Ponadto omawiane były problemy możliwości neutralizowania efektów toksycznych.

Omówiono także problemy środowiska oraz szeroki aspekt badań analitycznych, obejmujący diagnostykę chemiczną i biochemiczną. W ramach sympozjum wygłoszono 75 referatów, komunikatów i plakatów.

W podsumowaniu Sympozjum wysunięto propozycję kontynuowania sympozjów ekologicznych w czasie następnych zjazdów oraz utworzenia sekcji badań nad zagrożeniem środowiska substancjami chemicznymi i zobowiązanie tej sekcji do nawiązania kontaktu z Komitetem Ekologii PAN. Dyskutowana była również sprawa utworzenia sekcji polskiej Europejskiego Towarzystwa Mutagenyzy Środowiskowej. Byłoby korzystne przypisanie tej sekcji do Polskiego Towarzystwa Biochemicznego, jakkolwiek podnoszono propozycję utworzenia jej przy Polskim Towarzystwie Genetycznym.

### **Sympozjum F — Gospodarka wapniowo-fosforanowa**

Organizatorzy: prof. dr Stefan Angielski i prof. dr Roman Lorenc.

Sympozjum obejmowało 13 komunikatów nt. wiązania jonów  $Ca^{2+}$  i ich roli w regulacji procesów związanych z procesami transportu w błonach oraz aktywności niektórych enzymów i innych czynników aktywnych biologicznie.

Oprócz sympozjów w czasie trwania Zjazdu odbywała się sesja plakatowa, związana zarówno z tematyką sympozjów, jak na tematy różne, np. proteinazy (19), biochemia nowotworów (20), konformacja białek (16), lipidy i lipoproteiny (8), enzymologia (32), biochemia tkanek (17), biochemia roślin (43), biochemia bakterii (13), biochemia kliniczna (42), biochemia wysiłku (17), błony biologiczne i immunologia (5), genetyka molekularna (46), różne (24), łącznie przedstawiono 308 plakatów.

Streszczenia wszystkich materiałów zjazdowych tj. wykładów wprowadzających, referatów, doniesień ustnych i plakatów — obejmują 523 pozycje.

W czasie Zjazdu odbyła się wystawa firm krajowych i zagranicznych, produkujących odczynniki i aparaturę laboratoryjno-pomiarową pod symbolem Bioche-

mia 85. Głównym organizatorem tej wystawy był Dział Nauki i Współpracy z Zagranicą UJ, a opiekę nad rozlokowaniem poszczególnych stoisk i przebieg całej wystawy aranżował inż. Jerzy Depowski.

Organizację zakwaterowania i imprez towarzyszących Zjazdowi zajął się PT Orbis w Krakowie. Liczni uczestnicy mieli okazję poznania architektury i zabytków Krakowa oraz mogli uczestniczyć w przedstawieniach teatralnych.

XXI Zjazd PTBioch. był jednym z liczniejszych zjazdów pod względem uczestnictwa i materiałów, które przedstawiono jako dorobek biochemii ostatnich lat. Atmosfera Krakowa i liczny udział uczestników stworzyły dobre warunki do kontaktów i dyskusji nie tylko podczas posiedzeń, ale również w spotkaniach kulturalowych.

*Anna Kordowiak i Zdzisław Żak*

Kraków, dnia 4 listopada 1985 r.

### **25-lecie Oddziału Szczecińskiego Polskiego Towarzystwa Biochemicznego**

W 1986 roku upływa 25 lat od powołania Szczecińskiego Oddziału Polskiego Towarzystwa Biochemicznego. 13 stycznia 1961 roku ukonstytuował się Zarząd Oddziału PtBioch.. Zostało to potwierdzone przez Zarząd Główny pismem z dnia 24 lutego 1981 r. PTB-55/61 oraz pismem Prezydium Rady Narodowej w Szczecinie z dnia 8 marca 1961 r. SW-II/28/61. Przewodniczącymi Oddziału byli kolejno: Jan Dobrowolski (1961), Stefan Kotkowski (1961—1963), Zygmunt Machoy (1963—1964), Bogdan Różycki (1964—1968), Janusz Gregorczyk (1968—1971 i 1971—1974), Zygmunt Machoy (1974—1977 i 1977—1980), Janusz Gregorczyk (1980—1983), Zygmunt Machoy (1983—1986). W chwili powołania Oddziału Szczecińskiego liczył on 15 osób. Obecnie Oddział Szczeciński liczy 44 osoby skupiając pracowników z trzech wyższych uczelni Szczecina: Pomorskiej Akademii Medycznej, Akademii Rolniczej i Wyższej Szkoły Pedagogicznej, a obecnie Uniwersytetu Szczecińskiego. Od lat członkowie Oddziału Szczecińskiego wchodzi w skład Zarządu Głównego PTBioch.

Do głównych celów działalności Oddziału należy organizowanie zebrań naukowych z udziałem prelegentów miejscowych i zamiejscowych, krajowych i zagranicznych oraz współpraca z innymi Towarzystwami Naukowymi w tym zakresie. W czasie swego 25-lecia istnienia Oddziału zorganizował on dwa krajowe zjazdy Polskiego Towarzystwa Biochemicznego (1970, 1983), czterokrotnie Dni Biochemiczne (1969, 1971, 1974, 1975). Odbyły się także sympozja specjalistyczne. Dwa sympozja z zakresu metabolizmu związków fluoru (1979, 1983) oraz sympozjum n.t. biochemii miażdżycy (1983). Oba ostatnie dwa sympozja odbyły się w ramach XIX Zjazdu Polskiego Towarzystwa Biochemicznego. Dla uczczenia 25-lecia istnienia Oddziału zostaną zorganizowane w 1986 roku dwa sympozja specjalistyczne, a mianowicie III Sympozjum Fluorowe i II Sympozjum Biochemii Miażdżycy. Wszystkie zjazdy i sympozja odbywały się z udziałem zaproszonych gości z kraju i z zagranicy. Oddział Szczeciński PTBioch. wydał wspólnie ze Szczecińskim Towarzystwem Naukowym dwie pełne publikacje: „Biochemia w ochronie środowiska naturalnego”, PWN Warszawa—Poznań 1978, „Metabolizm fluoru” PWN Warszawa—Poznań 1982. Materiały II Sympozjum Fluorowego zostały wydrukowane w „Czasopiśmie Stomatologicznym” 1983, XXXVI, 9, a streszczenia i ko-

mentarze sympozjów fluorowych w czasopismach: *Fluoride 1980 i 1984*, *Roczniki Państwowego Zakładu Higieny*, 1984, oraz *Czasopismo Stomatologiczne 1984*.

W związku z powołaniem w 1985 roku Uniwersytetu Szczecińskiego, a w jego ramach nowych kierunków studiów na Wydziale Biologii i Nauki o Morzu, Oddział Szczeciński zamierza rozszerzyć swoją działalność poprzez współpracę z nowymi jednostkami organizacyjnymi przez co zwiększy się stan liczebny Oddziału Szczecińskiego Polskiego Towarzystwa Biochemicznego.

*Zygmunt Machoy* — przewodniczący  
*Dorota Samujło* — sekretarz





RECENZJA

„Pflanzenphysiologie”,

Wyd.: H. Barris i E. Libbert; Gustaw Fischer Verlag, Jena, 1984, s. 591 oraz 198 rysunków i 11 tabel.

Opiniowany tom jest następnym z wydawanej od szeregu lat serii „Słowników biologicznych”, których ukazało się już 6. Ponieważ według oświadczenia Autorów zawartego w przedmowie, wydanie słownika biochemicznego nie jest przewidywane chwilowo w tej serii, obecnie wydany tom zawiera w równej mierze (a może w głównej?) hasła biochemiczne i biofizyczne. Wartość jego podnosi ponadto fakt zamieszczenia bardzo licznych haseł związanych z innymi dyscyplinami, bez których wiedza biochemiczna i fizjologiczna byłaby niepełna, a mianowicie z genetyką, cytologią, morfologią, ekologią, a także mikrobiologią. Ze względu na przewagę mimo wszystko haseł biochemicznych recenzja tego tomu w Postępkach Biochemii jest uzasadniona.

Przy ocenie wydawnictwa „Pflanzenphysiologie”, które stanowi formę pośrednią pomiędzy leksykonem i słownikiem, nie należy pomijać analogicznego wydania z przed 8 lat (1976) Brockhaus ABC Biochemie, Leipzig, którego zespół autorki składał się głównie z pracowników Instytutu Biochemii Roślin w Halle/Saale. Oba te wydawnictwa wykazują mianowicie liczne podobieństwa w doborze haseł biochemicznych i ich sformułowaniu, a nawet mają prawie identyczną objętość. Autorami opiniowanego dzieła są natomiast pracownicy naukowci Uniwersytetu w Greifswald (NRD), ale również RFN (Haupt — Norymberga) i Holandii (Linskens — Nijmegen).

Jednakże wydany obecnie tom zawiera, jak wspomniano, większe zróżnicowanie haseł z uwzględnieniem wymienionych dyscyplin pokrewnych, co można uznać za pozytywne, gdyż Czytelnik spotka w nim liczne terminy mniej używane, a przydatne w biochemii. Stąd hasła są formułowane bardziej zwięźle, jakkolwiek nie sądzę, aby odbiło się to ujemnie na wartości zawartych w nich informacji. Warto też zaznaczyć, że hasła są sformułowane dwustopniowo: na wstępie podaje się zwięzłą definicję terminu, a następnie jej rozwinięcie i szereg informacji uzupełniających, a w przypadku typowych substancji chemicznych — wzór. Autorzy podają wiedzę stosunkowo nowoczesną, słownictwo przyjęte przez IUPAC oraz jednostki miary SI, co dodatkowo podnosi wartość wydawnictwa. Hasła są zamieszczone alfabetycznie w sposób jednolity, bez podziału na działy czy grupy tematyczne.

Stosunkowo najtrudniej ocenić prawidłowość doboru haseł, gdyż zarówno dobór ten, jak i jego ocena nie mogą być wolne od podejścia subiektywnego. Niemniej można chyba zaryzykować pogląd, że zadowolony on powinien nie tylko biologa o zainteresowaniach ogólnych, ale i bardziej specjalnych, np. rolniczych, gdyż zawiera hasła z wielu różnych dziedzin. W zakresie biochemii znaleźć można wiele omówień ważniejszych grup, jak i pojedynczych związków naturalnych, ich przemian i uczestniczących enzymów. Przemiany są z reguły uzupełnione czytel-

nymi, choć nie zawsze nowocześnie przedstawionymi schematami reakcji. Wiele schematów, tym razem przedstawionych obrazowo dotyczy podstawowych zjawisk fizjologicznych i genetycznych.

Z rozważań powyższych nie wynika jednak, aby opiniowana pozycja mogła stanowić podstawę systematycznego pogłębiania wiedzy, jakkolwiek umiejętne krzyżowanie haseł pozwala na szybkie wyszukanie szerszej wiedzy dotyczącej określonego zagadnienia. Niemniej może ona stanowić wartościowe źródło wiedzy encyklopedycznej dla uzupełnienia określonych informacji. Dlatego tom „Pflanzenphysiologie” stanowi niewątpliwie wartościową pozycję uzupełniającą dla biologów parających się nauką i dydaktyką.

*Jerzy Kączkowski*



## SPIS TREŚCI

### Biografia i wspomnienia:

W setną rocznicę urodzin Jakuba Karola Parnasa — dedykacja . . . . .	243
W. S. Ostrowski — Jakub Karol Parnas — Życie i twórczość . . . . .	247
W. Mejbäum-Katzenellenbogen — Jakub Karol Parnas we wspomnieniach Wandy Mejbäum . . . . .	261
Spis publikacji Jakuba Karola Parnasa i Jego współpracowników . . . . .	265

### Artykuły:

J. Kuźnicki, K. Famulski — Rola kinaz białkowych i fosfataz w regulacji metabolizmu glikogenu . . . . .	285
K. Bogucka — Kompleks ATPazy transportującej protony . . . . .	301
J. Kwiatkowska — Fosfolipidy inozytowe w przetwarzaniu informacji w komórkach (Minireview) . . . . .	329
J. Dziuba — Molekularne i koloidalne aspekty micelarnej struktury kazeiny . . . . .	335
W. Dobryszcka — Wpływ modyfikacji struktury haptoglobiny na jej właściwości biologiczne . . . . .	353
H. Szafran — Biologicznie aktywne peptydy przewodu pokarmowego i trzustki (Minireview) . . . . .	365

### Słownictwo:

J. K. Parnas — W sprawie polskiej terminologii fizjologiczno-chemicznej (fragmenty) . . . . .	373
Komunikat Komisji Słownictwa Biochemicznego: Zmiany w słownictwie enzymów (J. Kwiatkowska) . . . . .	375

### Sprawozdania i kronika Polskiego Towarzystwa Biochemicznego:

Kurs FEBS na temat „Izolowanie i charakterystyka białek błonowych: aspekty biochemiczne i biofizyczne” (M. Michalik) . . . . .	379
XXI Zjazd Polskiego Towarzystwa Biochemicznego w Krakowie (A. Kordowiak, Z. Żak) . . . . .	381
Dwudziestopięciolecie Oddziały Szczecińskiego Polskiego Towarzystwa Biochemicznego (Z. Machoy, D. Samujło) . . . . .	384

### Recenzja:

„Pflanzenphysiologie” (J. Kączkowski) . . . . .	387
---	-----



# POSTĘPY BIOCHEMII

## ARTICLES IN POLISH

Volume 32

Number 3

### Biography and recollection:

In memory of Professor Jakub Karol Parnas — a dedication on the hundredth anniversary of his birth . . . . .	243
W. S. Ostrowski — Jakub Karol Parnas — Life and creativity . . . . .	247
W. Mejbaum-Katzenellenbogen — Professor Jakub Karol Parnas — in recollection of Wanda Mejbaum . . . . .	261
J. K. Parnas bibliography . . . . .	265

### Articles:

J. M. Kuźnicki, K. S. Famulski — Role of protein kinases and phosphatases in regulation of glycogen metabolism (Dept. of Muscle Biochemistry, and Dept. of Cellular Biochemistry, Nencki Institute of Experimental Biology, Warszawa) . . . . .	285
K. Bogucka — Proton translocating ATPase (Dept. of Cellular Biochemistry, Nencki Institute of Experimental Biology, Warszawa) . . . . .	301
J. Kwiatkowska — Inositol phospholipids in intracellular transformations of information (Dept. of Biochemistry, School of Medicine, Wrocław) (Minireview) . . . . .	329
J. Dziuba — Molecular and colloidal aspects of the micellar casein structure (Dept. of Food Biochemistry, Institute of Food Physics and Chemistry, Agrotechnical University, Olsztyn) . . . . .	335
W. Dobryszcka — Effects of modifications of the haptoglobin structure on its biological properties (Dept. of Pharmaceutical Biochemistry, School of Medicine, Wrocław) . . . . .	353
H. Szafran — Biologically active peptides of gastrointestinal tract and pancreas (Surgery Dept. School of Medicine, Kraków). (Minireview) . . . . .	365

### Biochemical Nomenclature:

J. K. Parnas — Remarks to the Polish nomenclature in physiological chemistry — (reprints of some essential points, 1937) . . . . .	373
J. Kwiatkowska (tłumacz) — Information about new rules in enzyme nomenclature . . . . .	375
Meeting reports and the chronicle of the Polish Biochemical Society . . . . .	381
Review of a book . . . . .	387



FOR THE YEAR 1911

REVENUE

Volume 1

Number 1

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

## SPIS TREŚCI

## Biografia i wspomnienia:

W setną rocznicę urodzin Jakuba Karola Parnasa — dedykacja . . . . .	243
W. S. Ostrowski — Jakub Karol Parnas — Życie i twórczość . . . . .	247
W. Mejbaum-Katzenellenbogen — Jakub Karol Parnas we wspomnieniach Wandy Mejbaum . . . . .	261
Spis publikacji Jakuba Karola Parnasa i Jego współpracowników . . . . .	265

## Artykuły:

J. Kuźnicki, K. Famulski — Rola kinaz białkowych i fosfataz w regulacji metabolizmu glikogenu . . . . .	285
K. Bogucka — Kompleks ATPazy transportującej protony . . . . .	301
J. Kwiatkowska — Fosfolipidy inozytowe w przetwarzaniu informacji w komórkach (Minireview) . . . . .	329
J. Dziuba — Molekularne i koloidalne aspekty micelarnej struktury kazeiny . . . . .	335
W. Dobrzyńska — Wpływ modyfikacji struktury haptoglobiny na jej właściwości biologiczne . . . . .	353
H. Szafran — Biologicznie aktywne peptydy przewodnictwa pokarmowego i trzustki (Minireview) . . . . .	365

## Słownictwo:

J. K. Parnas — W sprawie polskiej terminologii fizjologiczno-chemicznej (fragmenty) . . . . .	373
Komunikat Komisji Słownictwa Biochemicznego: Zmiany w słownictwie enzymów (J. Kwiatkowska) . . . . .	375
Sprawozdania i kronika Polskiego Towarzystwa Biochemicznego:	
Kurs FEBS na temat: „Izolowanie i charakterystyka białek błonowych: aspekty biochemiczne i biofizyczne” (M. Michalik) . . . . .	379
XXI Zjazd Polskiego Towarzystwa Biochemicznego w Krakowie (A. Kordowiak, Z. Żak) . . . . .	381
Dwudziestopięciolecie Oddziału Szczecińskiego Polskiego Towarzystwa Biochemicznego (Z. Machoy, D. Samujło) . . . . .	384

## Recenzja:

„Pflanzenphysiologie” (J. Kączkowski) . . . . .	387
---	-----