

Pamięci Alberta Lehningera i Larsa Ernsterera, moich przewodników na drodze do poznania oksydacyjnej fosforylacji, artykuł ten poświęcam.

LECH WOJTCZAK

Instytut Biologii Doświadczalnej im. M. Nenckiego PAN
Pasteura 3, 02-093 Warszawa
e-mail: lwac@nencki.gov.pl

SIEDEMDZIESIĄT LAT BADAŃ NAD OKSYDACYJNĄ FOSFORYLACJĄ, CZYLI OD KONSEPCJI CHEMICZNEGO SPRZEŻENIA DO WIRUJĄCEJ ATP-AZY

POCZĄTKI

Za początek współczesnej bioenergetyki możemy uważać odkrycie przez Karla Lohmanna w 1929 r. „nietrwalego fosforanu”, czyli ATP,



Lech Wojtczak, urodzony w 1926 r., profesor w Instytucie Biologii Doświadczalnej im. Marcelego Nenckiego PAN w Warszawie. Wczesną młodość i lata wojny spędził w Piotrkowie Trybunalskim; tamże ukończył szkołę średnią na zespołach tajnego nauczania. Studia biologiczne i chemiczne na Uniwersytecie Łódzkim. Jeszcze w czasach studenckich związał się z Instytutem im. Nenckiego (wówczas z

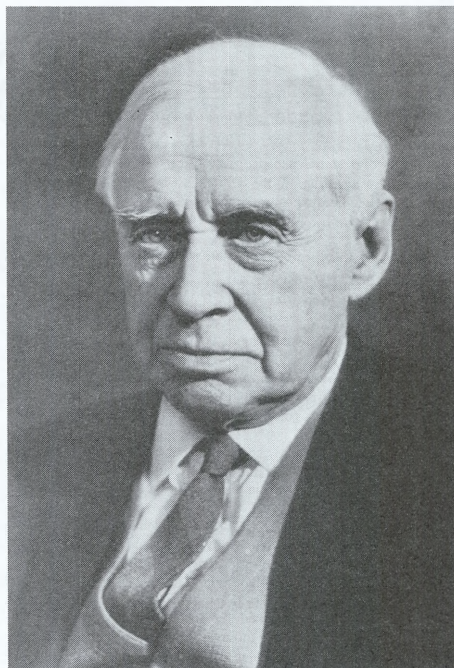
którego centralną rolę w biologicznych procesach energetycznych ostatecznie sformułował dziesięć lat później FRITZ LIPMANN (1941). Wyjaśnienie w latach trzydziestych przez Gustava Embdena, Otto Meyerhofa i Jakuba Parnasa istoty glikolizy wskazało na dwie reakcje, w których zachodzi fosforylacja ADP do ATP. Reakcje te, jedna na poziomie utlenienia aldehydu glicerolo-3-fosforowego, druga — dehydratacji 2-fosfoglicerynianu, były wówczas jedynymi znanymi mechanizmami regeneracji ATP. Wprawdzie cykl kwasów trikarboksylowych (cykl Krebsa) został opisany również w połowie lat trzydziestych, a enzymatyczne podstawy oddychania komórkowego jeszcze wcześniej (Torsten Thunberg i Otto Warburg, od początków stulecia po lata dwudzieste), lecz były one tra-

siedzibą w Łodzi). Odbił staże badawcze w pracowniach E.C. Slatera (Amsterdam), Alberta L. Lehningera (Baltimore, Maryland) i Brittona Chance'a (Filadelfia, Pennsylvania). Ponadto prowadził wieloletnie współprace z Uniwersytetem w Sztokholmie (z Larsem Ernsterem), Akademią Medyczną w Magdeburgu (doktorat honoris causa) i Uniwersytetem w Konstancji (Niemcy). Najwcześniejsze prace, pod kierunkiem Włodzimierza Niemierki, dotyczyły metabolizmu oddechowego owadów. Później zajął się bioenergetyką i biochemią mitochondriów w aspekcie ogólnym. Ważniejsze osiągnięcia dotyczą między innymi budowania i rozpraszania mitochondrialnego potencjału transmembranowego, transportu metabolitów przez błony mitochondrialne oraz regulacyjnej roli kwasów tłuszczowych w mitochondrialnym „sprzężeniu energetycznym”.

ktowane jako szlaki usuwania produktów glikolizy, a nie generacji użytecznej biologicznie energii. Proste jednak porównanie swobodnej energii hydrolizy dwóch (netto) cząsteczek ATP uzyskiwanych w glikolizie z wartością kaloryczną (czyli ciepłem spalania) glukozy wskazywało na zadziwiająco niską wydajność takiego sposobu pozyskiwania energii przez komórkę.

Za odkrywcę oksydacyjnej fosforylacji uważa się rosyjskiego badacza, Władimira Engelhardta (Ryc. 1), który w serii pięknych prac opublikowanych w latach 1930–1932 nad metabolizmem fosforowym w bezjądrowych i nieoddychających erytrocytach królika z jednej strony a zawierających jądra (i jak wiemy — mitochondria) oraz zużywających tlen erytrocytach gołębia z drugiej wykazał, że estryfikacja nieorganicznego fosforanu do związku określonego przezeń jako pirofosforan (obecnie wiemy, że był to ATP) może zachodzić zarówno na drodze glikolizy, jak i dzięki procesom utleniania biologicznego (ENGELHARDT 1930, 1932). Wyniki te zostały wkrótce potwierdzone przez Hermana Kalckara (pracującego wówczas w Danii), który wykazał, że w homogenatach z wątroby i nerki estryfikacja fosforanu zachodziła mimo zahamowania glikolizy.

Mimo że zarówno Engelhardt, jak i Kalckar wykazali wiązanie nieorganicznego fosforanu do związków organicznych dzięki energii utleniania, to właściwe odkrycie oksydacyjnej fosforylacji przypisuje się często rosyjskim badaczom, Bielicerowi i Cybakowej (BELITZER i TZIBAKOVA 1939). Wykazali oni bowiem, że w inkubowanym w warunkach aerobowych homogenacie z mięśnia stosunek liczby cząsteczek zestryfikowanego fosforanu do liczby atomów zużytego tlenu jest wyższy niż 1. Gdyby estryfikacja fosforanu polegała wyłącznie na syntezie ATP w procesie tlenowej glikolizy (której końcowym produktem jest pirogronian), to wartość tego stosunku powinna być 1. A zatem inne jeszcze



Ryc. 1. Władimir Aleksandrowicz Engelhardt (1894–1984).

Urodzony w Moskwie, syn i wnuk lekarzy, otrzymał również wykształcenie medyczne, lecz po ukończeniu studiów poświęcił się całkowicie biochemii. W 1929 r. objął katedrę biochemii na Uniwersytecie w Kazaniu, gdzie mimo prymitywnych warunków prowadził swe pionierskie badania nad estryfikacją fosforanu w erytrocytach. W 1939 r., pracując w Instytucie Biochemii Akademii Nauk ZSRR w Moskwie, dokonał innego fundamentalnego odkrycia wykazując, że kurczliwe białko mięśnia, miozyna, ma aktywność ATP-azy. Był czynny naukowo do końca swego długiego życia. Zdjęcie reproduktowane z opracowania FLORKINA (1975) za zgodą wydawnictwa Elsevier Science, Oxford.

procesy, a mianowicie te, które przypuszczalnie towarzyszą procesom utleniania pirogronianu do CO₂ i wody, musiały być odpowiedzialne za tę dodatkową fosforylację. Podobne wyniki otrzymał wkrótce potem Severo Ochoa, pracujący w Stanach Zjednoczonych badacz hiszpańskiego pochodzenia.

TEORIA CHEMICZNEGO SPRZĘŻENIA

Niejako w sposób oczywisty nasuwał się więc wniosek, że między reakcjami utleniania komórkowego a procesem fosforylacji ADP do ATP muszą występować wspólne ogniwa, również natury chemicznej, podobnie jak to ma miejsce w szlaku glikolitycznym. Na tej zasadzie sformułowano w latach czterdziestych teorię chemicznego sprzężenia oksydacyjnej fosforylacji. Jednym z jej prekursorów był Fritz Lipmann (późniejszy odkrywca CoA), który założył twórczość się ufosforylowanych, wysokoenergetycznych form enzymów oddechowych. Teoria

chemicznego sprzężenia stała się ogólnie przyjętą linią badań na całe dwudziestolecie (1940–1960), a nawet dłużej, tłumaczyła bowiem w zadawalający sposób wiele poznanych wkrótce faktów, a przede wszystkim tak zwaną kontrolę oddechową i odwrotny transport elektronów.

Dalszy postęp w badaniach oksydacyjnej fosforylacji stał się możliwy dzięki wyizolowaniu mitochondriów — organelli komórkowych, w których proces ten zachodził. Dotychczasowe badania na homogenatach komórkowych okazały się bowiem dalece niewystarczające. Dopie-

ro zainicjowana przez A. Claude'a, a następnie rozwinięta i udoskonalona przez G.H. Hogebooma i W.C. Schneidera, metoda „różnicowego” wirowania pozwoliła na uzyskanie względnie czystych preparatów mitochondriów w ilościach umożliwiających ich chemiczne badanie. Pod koniec lat pięćdziesiątych słynna pod tym względem stała się pracownia Davida E. Greena na Uniwersytecie stanu Wisconsin, gdzie z serc bydłęcych otrzymywano mitochondria w ilościach niemalże kilogramowych.

Konsekwencją chemicznego sprzężenia fosforylacji z procesami oksydoredukcji winna być stała stechiometria pomiędzy ilością zsyntetyzowanego ATP (czyli zużytego nieorganicznego fosforanu) a ilością utlenionego substratu lub zużytego tlenu cząsteczkowego. Stosunek ten, oznaczany jako P/O, stał się przedmiotem zainteresowania takich czołowych badaczy oksydacyjnej fosforylacji, jak Britton Chance (Ryc. 2), David E. Green i Albert L. Lehninger



Ryc. 2. Britton Chance (urodz. w 1913 r.).

Wieloletni kierownik Johnson Foundation i Zakładu Biochemii i Biofizyki Uniwersytetu stanu Pennsylvania w Filadelfii. Jest pionierem spektroskopowych badań enzymów. Poza osiągnięciami w dziedzinie mitochondrialnych enzymów oddechowych był pierwszym, który naocznie pokazał tworzenie się kompleksu enzym-substrat na przykładzie katalazy i H_2O_2 . Pasja pozanaukowa — żeglarstwo; zdobywca złotego medalu na Igrzyskach Olimpijskich w 1952 r. Nadal czynny naukowo. Zdjęcie ze zbiorów autora.

(Ryc. 3) w Ameryce oraz E.C. Slater (Ryc. 4) w Europie. Ponieważ wszystkie naturalne substraty oddechowe są donatorami dwuelektronowymi, a atom tlenu — dwuelektronowym akceptorem, przyjęto jako pewnik, że przenie-

nowymi, a atom tlenu — dwuelektronowym akceptorem, przyjęto jako pewnik, że przenie-



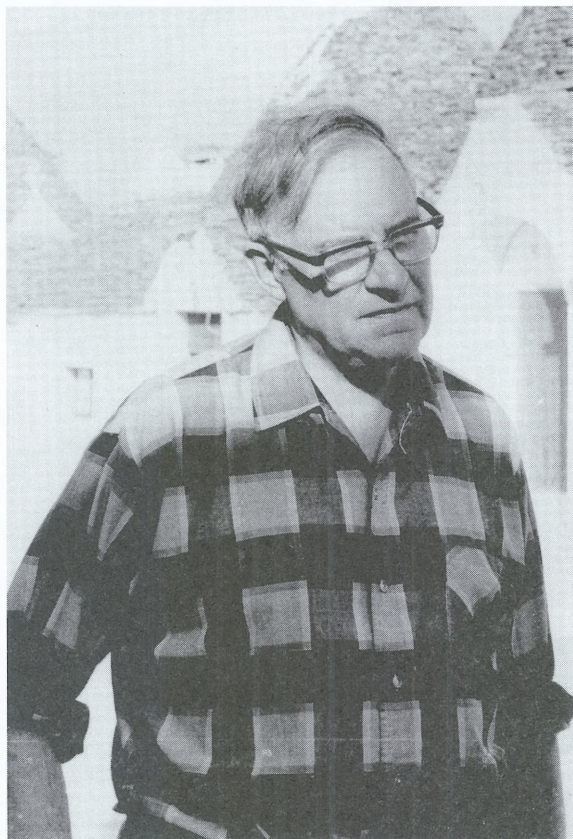
Ryc. 3. Albert L. Lehninger (1917–1986).

Doktorat uzyskał na Uniwersytecie stanu Wisconsin w 1942 r. Wkrótce po wojnie przebywał przez pewien czas w Europie: na Uniwersytetach w Cambridge i w Niemczech Zachodnich. Następnie przez wiele lat kierował Zakładem Chemii Fizjologicznej Uniwersytetu Johnsa Hopkinsa w Baltimore (Maryland), gdzie powstała większość jego prac nad mitochondriami i oksydacyjną fosforylacją. Zespół Lehningera charakteryzował się wybitnie międzynarodowym składem. Autor kilku znanych podręczników biochemii. Zdjęcie reproduktowane z opracowania FLORKINA (1975) za zgodą wydawnictwa Elsevier Science, Oxford.

sieniu wzdłuż łańcucha oddechowego pary elektronów towarzyszy synteza określonej, całkowitej liczby cząsteczek ATP, czyli że teoretyczny stosunek P/O jest zawsze liczbą całkowitą. Jeśli zmierzona wartość P/O nie równała się dokładnie liczbie całkowitej, zakładano, że jest to wartość zaniżona i zaokrąglano ją wzwyż. W ten sposób wywnioskowano, że utlenianiu substratów, których dehydrogenazy współdziałają z NAD, towarzyszą trzy fosforylacje, utlenianiu bursztynianu — dwie, a utlenianiu cytochromu c — jedna.

Wynikiem tych badań było nie tylko oznaczenie wydajności oksydacyjnej fosforylacji, ale także ustalenie, na których odcinkach łańcucha oddechowego ma miejsce sprzężenie energetyczne. W badaniach tych znaczną pomocą okazały się inhibitory transportu elektronów działające w określonych miejscach łańcucha oddechowego, na przykład rotenon, antymycy-

na A, cyjanki, a także sztuczne donory i akceptory elektronów, na przykład żelazicyjanek i tetrametylo-p-fenylendiamina. Jak się okazało, i czego można było oczekiwać na podstawie rozważań termodynamicznych, sprzężenie energetyczne procesu oksydoredukcji z fosfory-



Ryc. 4. E. C. Slater (urodz. w 1917 r. w Melbourne).

Studia chemiczne odbył na Uniwersytecie w Melbourne, a następnie pracował w Australian Institute of Anatomy (podległym Ministerstwu Zdrowia). W 1946 roku realizuje planowany jeszcze przed wojną wyjazd do Europy i rozpoczyna pracę pod kierunkiem Davida Keilina (odkrywcy cytochromów) w Moltano Institute na Uniwersytecie w Cambridge. W 1955 r. obejmuje kierownictwo Laboratorium voor Biochemie, przekształconego później w Instytut im. B.C.P. Jansena na Uniwersytecie w Amsterdamie, które to placówki stały się jednym z głównych ośrodków badań nad mitochondrialnymi procesami oksydoredukcji i oksydacyjnej fosforylacji w Europie. Przez wiele lat był naczelnym redaktorem „*Biochimica et Biophysica Acta*”. Emerytowany w 1985 r., osiadł na południu Anglii oddając się ulubionemu żeglarsztwu. Zdjęcie ze zbiorów autora.

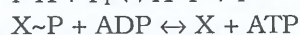
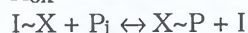
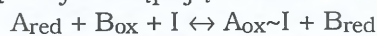
lacją ADP do ATP zachodziło na tych kompleksach enzymatycznych łańcucha oddechowego, na których występowały największe skoki potencjału oksydoredukcyjnego.

Niezależnie, na te same miejsca sprzężenia wskazywały niezwykle pomysłowe badania CHANCE'A (CHANCE i WILLIAMS 1955, CHANCE i współaut. 1955) z zastosowaniem spektrofotometrii dwuwiązkowej. Stosując własnej konstrukcji niezwykle czuły, jak na owe czasy, spe-

ktofotometr, umożliwiający niemalże jednocześnie pomiar absorpcji światła o dwóch różnych długościach fali, Chance był w stanie w zawieszinie mitochondriów oznaczyć stopień utlenienia bądź zredukowania poszczególnych komponentów łańcucha oddechowego. Badania te wykazały, że w stanie spoczynkowym, a więc w warunkach, gdy środowisko inkubacyjne zawierało dostateczną ilość substratu oddechowego i tlenu, lecz brak było akceptora reszt fosforanowych pod postacią ADP, transport elektronów był częściowo zahamowany właśnie pomiędzy wymienionymi wyżej kompleksami łańcucha oddechowego. Dodanie ADP natychmiast znosiło tę blokadę, co przejawiało się zmianą stanu utlenienia bądź redukcji odpowiednich przenośników elektronów.

Britton Chance, fizyk z wykształcenia, był również pierwszym, który do badania procesów oddechowych w mitochondriach zastosował metodę polarograficznego pomiaru stężenia tlenu w roztworze przy pomocy wibrującej elektrody platynowej. Dzięki temu mógł zarejestrować dramatyczne przyspieszenie zużycia tlenu przez zawieszinę mitochondriów natychmiast po dodaniu do niej ADP. Pomiaru tego rodzaju, prowadzone również w innych laboratoriach przeważnie metodą manometryczną przy użyciu aparatu Warburga, stały się podstawą obliczenia tak zwanego współczynnika kontroli oddechowej. Jego wartość do dziś służy za miarę jakości preparatów izolowanych mitochondriów, a także jest ważnym wskaźnikiem stanu metabolicznego mitochondriów w żywej komórce.

W ślad za badaniami doświadczalnymi postępowało teoretyczne rozbudowywanie koncepcji chemicznego sprzężenia. Po pierwsze, badacze doszli do przekonania, że pierwszym produktem reakcji oksydoredukcji jest wysokoenergetyczne połączenie enzymu oddechowego (lub koenzymu) z jakimś bliżej nieokreślonym związkiem (SLATER 1953), lub po prostu „wzbudzona” forma tego enzymu. Następnie, kosztem energii tego połączenia powstawały wysokoenergetyczny związek ufosforylowany, który w końcowym etapie tego ciągu reakcji przekazywałyby resztę fosforanową na ADP. Wprowadzono zatem dwa hipotetyczne intermediały: nieufosforylowany i ufosforylowany, a proces wyglądałby następująco:



gdzie A i B z subskrypsem red lub ox to komponenty łańcucha oddechowego odpowiednio w formie zredukowanej lub utlenionej, I i X — hipotetyczne pośredniki, P_i — nieorganiczny

fosforan, a P — reszta fosforanowa. Symbol ~ oznacza wiązanie wysokoenergetyczne.

Wartą uwagi cechą powyższego schematu jest odwracalność wszystkich reakcji cząstkowych. I rzeczywiście, Martin Klingenberg oraz Lars Ernster (Ryc. 5) stwierdzili, że przebieg procesów oksydoredukcji w łańcuchu oddechowym może być odwrócony przez ATP. Jest to tak zwany odwrotny transport elektronów.

Ponieważ sprzężenie energetyczne ma miejsce na trzech różnych etapach łańcucha oddechowego, należało oczekiwać, że hipotetyczne substancje pośredniczące, a przynajmniej związek I, bezpośrednio reagujący z przenośnikiem elektronów, winny być różne (ERNSTER 1967). W ten sposób liczba hipotetycznych substancji pośredniczących w zamianie energii utleniania w

energii wiązania fosforanowego ATP zaczęła niepokojąco rosnać. Niepokojąco dlatego, że nic nie wskazywało na naturę tych substancji, a usilne ich poszukiwania prowadzone w przodujących laboratoriach przez wiele lat (od połowy lat pięćdziesiątych do co najmniej końca lat sześćdziesiątych) nie dawały zadawalających rezultatów. Wprawdzie pojawiały się doniesienia o wykryciu „wysokoenergetycznej” formy któregoś z przenośników elektronów lub znalezieniu innego związku mającego pośredniczyć w oksydacyjnej fosforylacji, lecz wkrótce okazywało się, że były to mylne interpretacje wyników, a czasem wręcz błędy doświadczalne. Rozwiązanie zagadki przyszło z zupełnie nieoczekiwanej strony. Ale o tym dalej.

„CZYNNIKI SPRZĘGAJĄCE”

Na V Międzynarodowym Kongresie Biochemicznym w Moskwie w 1961 roku Efraim Racker (Ryc. 6) wygłosił swoją maksymę: zamiast tracić czas na badanie „brudnych” preparatów (miał tu na myśli mitochondria), zabierzmy się za oczyszczanie enzymów (oksydacyjnej fosforylacji). On sam wyizolował pierwszy taki enzym. Przez odpowiednie frakcjonowanie rozbitych ultradźwiękami mitochondriów Racker i współpracownicy (PENEFSKY i współaut. 1960) uzyskali frakcję błonową, zdolną katalizować procesy utleniania ale nie syntezy ATP, i rozpuszczalne białko, które wykazywało aktywność ATP-azy. Połączenie obu frakcji przywracało strukturalom błonowym zdolność do syntezy ATP kosztem energii utleniania. Odkrycie to stanowiło pierwszy dowód, że procesy utleniania i fosforylacji są w mitochondriach fizycznie oddzielone. Drugim niezwykle ważnym wynikiem było wykazanie, że ta sama rozpuszczalna frakcja białkowa, kiedy jest związana z fragmentami błony mitochondrialnej, katalizuje syntezę ATP, natomiast wolna — hydrolizę tego związku. Odkrywca nazwał ją „czynnikiem sprzęgającym” (ang. coupling factor), a ponieważ wkrótce znalazł więcej podobnych czynników, oznaczył ją jako „czynnik sprzęgający pierwszy”, w skrócie F₁.

Zrozumienie istoty czynników sprzęgających nie byłoby możliwe bez osiągnięć mikro-

skopii elektronowej i badań nad ultrastukturą mitochondriów. Stosując nową metodę utrwalania preparatów, tak zwane barwienie negatywowe (ang. negative staining, znane również w polskim piśmiennictwie jako barwienie tła), FERNÁNDEZ-MORÁN (1962) wykrył na wewnętrznej stronie wewnętrznej błony mitochondrialnej charakterystyczne „grzybkowate” struktury, nieobecne w żadnych innych błonach biologicznych. Przez krótki czas przypuszczano, że są to identyfikowane w tym samym mniej więcej czasie przez Davida Greena i współpracowników kompleksy łańcucha oddechowego. Wkrótce jednak wykazano (RACKER i współaut. 1965), że owe grzybkowate twory to nic innego jak czynnik sprzęgający F₁. Są one dobrze widoczne na powierzchni zdolnych do fosforylacji cząstek submitochondrialnych, znikają po pozabawieniu cząstek czynnika sprzęgającego, a ponownie można je zaobserwować po rekonstrukcji cząstek fosforylujących (Ryc. 7). Wyjaśniono następnie, że w krótkim „trzonku” łączącym F₁ z błoną tkwi kilka małych białek, niektóre z nich identyczne z innymi czynnikami sprzęgającymi Rackera (między innymi F₆). W samej błonie zaś wyróżniono czynnik sprzęgający oznaczony jako F₀ („o” od oligomycyny, ponieważ połączony z F₁ sprawiał, że aktywność ATP-azowa tego ostatniego była hamowana przez antybiotyk oligomycynę).

PETER MITCHELL I JEGO HIPOTEZA „CHEMIOSMOTYCZNA”

Fizyczne rozdzielenie mitochondrialnego systemu oksydacyjnej fosforylacji na część błonową, zawierającą cały łańcuch oddechowy, i frakcję rozpuszczalną, stanowiącą złożony kom-

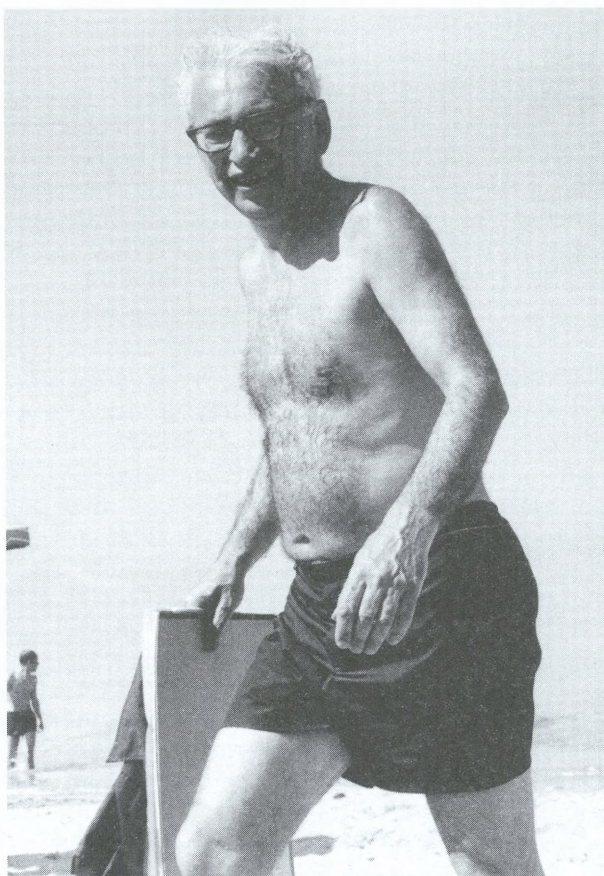
pleks mitochondrialnej ATP-azy, a zarazem syntazy ATP, spowodowało pierwszą rysę w jednolitej dotychczas koncepcji chemicznego sprzężenia. Ale właściwy atak nastąpił z innej



Ryc. 5. Lars (Laszlo) Ernster (1920–1998).

Urodzony w Budapeszcie, mimo żydowskiego pochodzenia przetrwał wojnę dzięki szwedzkiemu paszportowi, za sprawą szwedzkiego dyplomaty Raoula Wallenberga, który w ten sposób uratował wielu węgierskich Żydów. W 1946 r. wyemigrował do Szwecji, gdzie rozpoczął pracę w Instytucie Biologii Doświadczalnej im. Wenner-Grena na Uniwersytecie Sztokholmskim. W 1967 r. objął Katedrę Biochemii na tymże Uniwersytecie. Poza zagadnieniami energetyki mitochondrialnej zajmował się stresem oksydacyjnym i biologiczną ochroną przed działaniem wolnych rodników tlenowych. Był jednym z inicjatorów Europejskich Konferencji Bioenergetycznych (EBEC), odbywających się co dwa lata począwszy od 1980 r. Cechowały go niezwykle docieklawy umysł, szerokie zainteresowania (również pozanaukowe) i przyjazny, ciepły stosunek do ludzi. Zdjęcie z artykułu AZZONIEGO i LEE (1999) reproduktowane za zgodą wydawnictwa Elsevier Science, Oxford.

strony. Mało znany wówczas biochemik brytyjski, PETER MITCHELL (1961) (Ryc. 8), opublikował krótką pracę negującą tę koncepcję od podstaw. W oparciu o swe wcześniejsze badania nad oksydacyjną fosforylacją u bakterii doszedł do wniosku, że procesy oksydoredukcji, czyli transport elektronów, i reakcja fosforylacji ADP są wzajemnie sprzężone nie przez jakiś pośrednik chemiczny, lecz przez czynnik natury fizycznej, mianowicie gradient stężenia protonów i gradient potencjału elektrycznego po obu stronach błony mitochondrialnej. Uogólnienie tej koncepcji na błony mitochondrialne, a w dalszej perspektywie na błony chloroplastów, stało się podstawą zunifikowanej teorii sprzężenia energetycznego, zaprezentowanej następnie w kilku obszernych publikacjach (m.in. MITCHELL

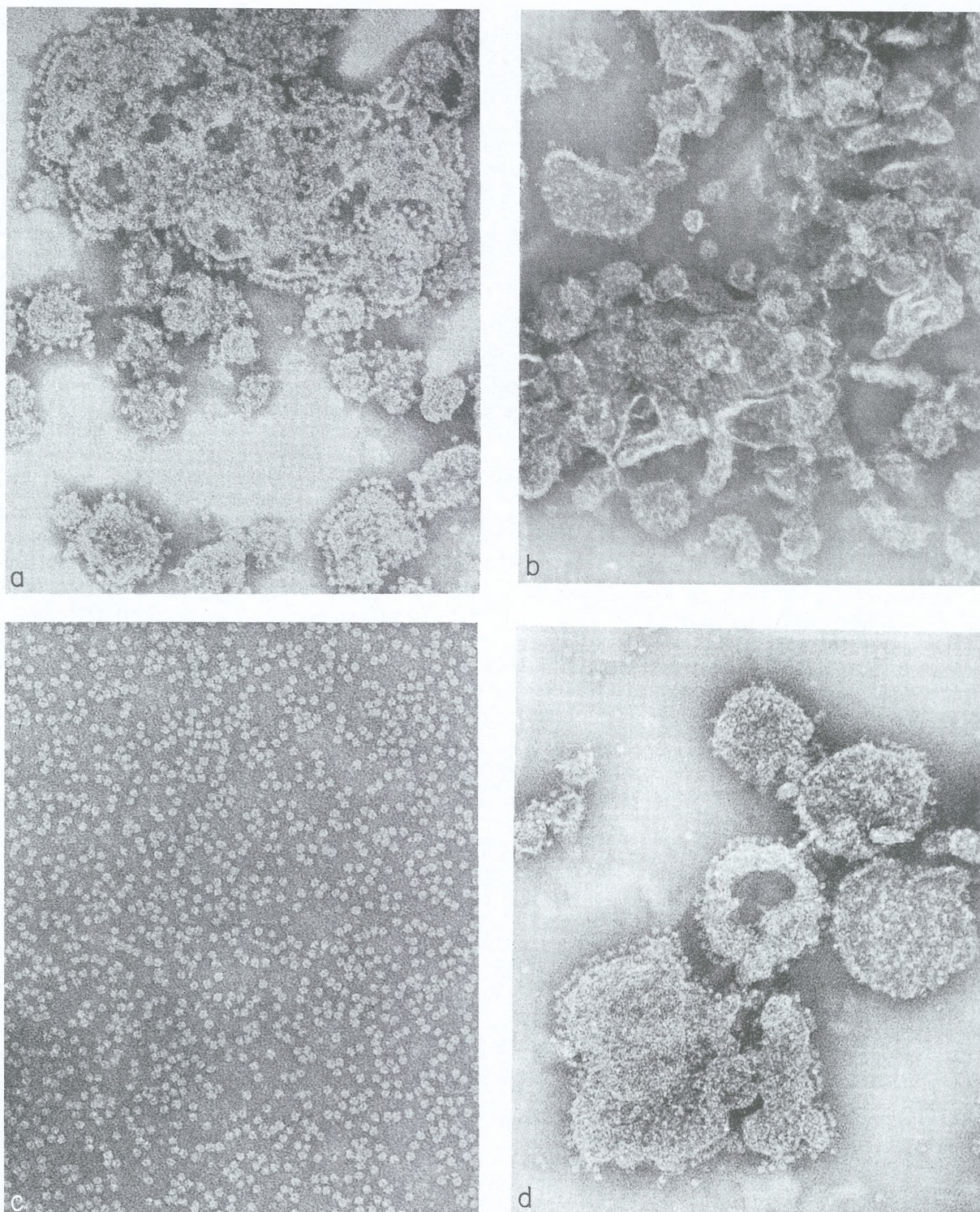


Ryc. 6. Efraim Racker (1913–1991).

Urodzony w Starym Sączu, w ówczesnym zaborze austriackim, w ubogiej rodzinie żydowskiej, która w 1915 r. przeniosła się do Wiednia. Studia wyższe rozpoczął na wiedeńskiej Akademii Sztuk Pięknych, zamierzając poświęcić się malarstwu. Jednakże zrażony formalizmem i dyscypliną tam panującą przeniósł się na medycynę. Niemniej malarstwo sztalugowe i rysunek uprawiał z zamiłowaniem i talentem nadal, będąc również u szczytu swej kariery naukowej. Studia lekarskie ukończył tuż przed aneksją Austrii przez hitlerowskie Niemcy (1938 r.). Zdołał jednak wyjechać do Wielkiej Brytanii, gdzie w czasie wojny był przez pewien czas internowany jako obywatel wrogiego państwa. W 1941 r. udaje mu się wyjechać do Stanów Zjednoczonych, gdzie spędzi resztę życia. Odkryć, o których mowa w niniejszym artykule, dokonał RACKER w czasie swej dwunastoletniej (1954–1966) pracy w Public Health Research Institute w Nowym Jorku. Później, do swych ostatnich dni, kierował Sekcją Biochemii i Biologii Molekularnej oraz Komórkowej na Cornell University w Ithace (stan New York). Na zdjęciu (ze zbiorów autora) na plaży w okolicach Bari (Włochy) ze szkiecownikiem w ręku (1969 r.).

1966), a także na III Zjeździe Federacji Europejskich Towarzystw Biochemicznych w Warszawie (MITCHELL i MOYLE 1967).

Doniosłość hipotezy „chemiosmotycznej” (bo tak, nieco myląc, nazwał swą koncepcję autor) możemy w pełni ocenić dopiero z pewnej perspektywy czasowej. Po pierwsze, tłumaczy ona, dlaczego, mimo usilnych starań, nie udało się wykryć chemicznych wysokoenergetycznych substancji pośredniczących, gdyż one



Ryc. 7. Rekonstrukcja fosforylujących cząstek submitochondrialnych.

a — Fosforylujące cząstki otrzymane przez rozbicie ultradźwiękami mitochondrów serca. Na powierzchni cząstek widoczne „kuleczkowate” struktury, będące kompleksem F_1 . b — Cząstki pozbawione F_1 , niezdolne do syntezy ATP, lecz zawierające kompletny łańcuch oddechowy. c — Wyizolowany kompleks F_1 , wykazujący aktywność ATP-azy. d — Zrekonstruowane fosforylujące cząstki otrzymane przez odpowiednie połączenie preparatów b i c. Zdjęcia z mikroskopu elektronowego; preparaty barwione negatywowo. Z prac E. Rackera według ERNSTERA i SCHATZA (1981). Reprodukacja za zgodą The Rockefeller University Press, New York.

po prostu nie istnieją. Natomiast postulowany przez Mitchella elektrochemiczny gradient protonów po obu stronach wewnętrznej błony mitochondrialnej okazał się łatwy do zmierzenia.

Po drugie, teoria ta, jak już wspomniano wyżej, w uniwersalny sposób opisywała sprzężenie energetyczne zarówno na poziomie prokariotów, jak i w mitochondriach i chloroplastach



Ryc. 8. Peter Mitchell (1920–1992).

Działalność naukową rozpoczął na Uniwersytecie w Edynburgu, skąd wyszło jego pierwsze sformułowanie hipotezy „chemiosmotycznej”. Następnie na skutek poważnej choroby na dwa lata przerwał działalność naukową i zajął się restaurowaniem starego pałacu w Kornwalii, którego stał się właścicielem. Założył w nim własne laboratorium (Glynn Research Foundation) i, ceniąc sobie nade wszystko niezależność, na którą pozwalał mu własny stan majątkowy, nigdy już nie wrócił do rygorów struktur akademickich. Sposobem bycia i wyglądem przypominał raczej dziewiętnastowiecznego poetę niż współczesnego biologa. Równie nietypowe było wyróżnienie go nagrodą noblowską. Przywykliśmy do tego, że nobliści z nauk eksperymentalnych rozporządzają ogromnymi warsztatami badawczymi i armiami współpracowników. Tymczasem Mitchell pracował sam lub z wierną współpracownicą, Jennifer Moyle (w zespole tym Peter był źródłem pomysłów, Jennifer zaś świetną eksperymentatorką), przy pomocy dość prostej aparatury, częściowo własnej konstrukcji. Przypomina nam to starą prawdę, że w nauce idea warta jest czasem więcej niż najbardziej wyszukana metodyka badawcza. Zdjęcie ze zbiorów autora.

komórek eukariotycznych. Po trzecie wreszcie, w niezwykle prosty sposób tłumaczyła takie zjawiska jak odwrotny transport elektronów, działanie szeregu substancji zaliczanych do tak zwanych rozprzegaczy oksydacyjnej fosforylacji, jak wreszcie zależny od energii transport przez błonę mitochondrialną szeregu substancji o charakterze jonowym. Elektrochemiczny gradient protonowy, czyli krócej siła protonomotoryczna, zawierał dający się zmierzyć zasób energii (WOJTCZAK i współaut. 1986).

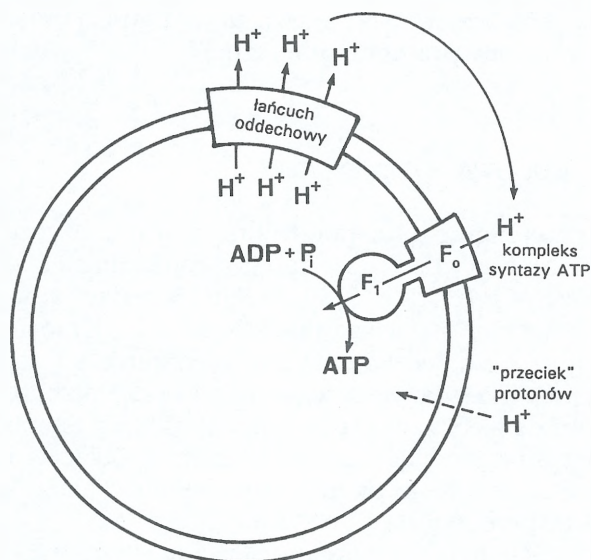
Dwa podejścia eksperymentalne dostarczyły spektakularnych dowodów na poparcie hipotezy chemiosmotycznej. Pierwsze, jeszcze w po-

łowie lat sześćdziesiątych, polegało na sztucznym (bez udziału transportu elektronów) wytworzeniu w mitochondriach lub chloroplastach gradientu pH lub gradientu potencjału elektrycznego i wykazaniu, że może on być wykorzystany do syntezy ATP. Dla błon chloroplastowych dokonali tego JAGENDORF i URIBE (1966), inkubując tylakoidy najpierw w środowisku lekko kwaśnym, a następnie zmieniając pH na alkaliczne w obecności ADP i fosforanu. W mitochondriach zaś wywołano dyfuzyjny potencjał jonów K^+ , umieszczając je w niskopotasowym środowisku w obecności jonoforu potasowego, walinomycyny (COCKRELL i współaut. 1967). W obu przypadkach zaobserwowano powstawanie ATP.

Drugi rodzaj doświadczeń polegał na skonstruowaniu modelu błony mitochondrialnej przez włączenie do pęcherzyka fosfolipidowego (liposomu) z jednej strony fragmentu łańcucha oddechowego, z drugiej zaś mitochondrialnej ATP-azy (kompleksu F_0F_1). Tak zrekonstruowany układ zdolny był produkować ATP kosztem procesów oksydoredukcji (RACKER i współaut. 1965). Jeszcze bardziej pomysłowe było „skrzyżowanie” w tym samym liposomie mitochondrialnego kompleksu F_0F_1 i bakteriorodopsyny, „napędzanej” światłem pompy protonowej fotofosforylującej bakterii (RACKER i STOECKENIUS 1974). W tym przypadku uzyskano syntezę ATP pod wpływem światła.

Trzeba było jednak około 10 lat (od opublikowania pierwszych obszerniejszych rozpraw Mitchella w 1966 r. do połowy lat siedemdziesiątych), by „społeczność bioenergetyczna”, łącznie z czołowymi autorytetami w tym zakresie, w pełni przyjęła nową koncepcję i bez zastrzeżeń uznała, że od dawna poszukiwanym intermedialtem oksydacyjnej fosforylacji jest po prostu elektrochemiczny gradient protonowy na wewnętrznej błonie mitochondrialnej, czyli różnica stężeń jonów wodorowych (ΔpH , wyższe stężenie po zewnętrznej stronie błony) i różnica potencjału elektrycznego ($\Delta \Psi$, potencjał dodatni po zewnętrznej stronie) (Ryc. 9). W 1978 r. Peter Mitchell otrzymał nagrodę Nobla w zakresie chemii.

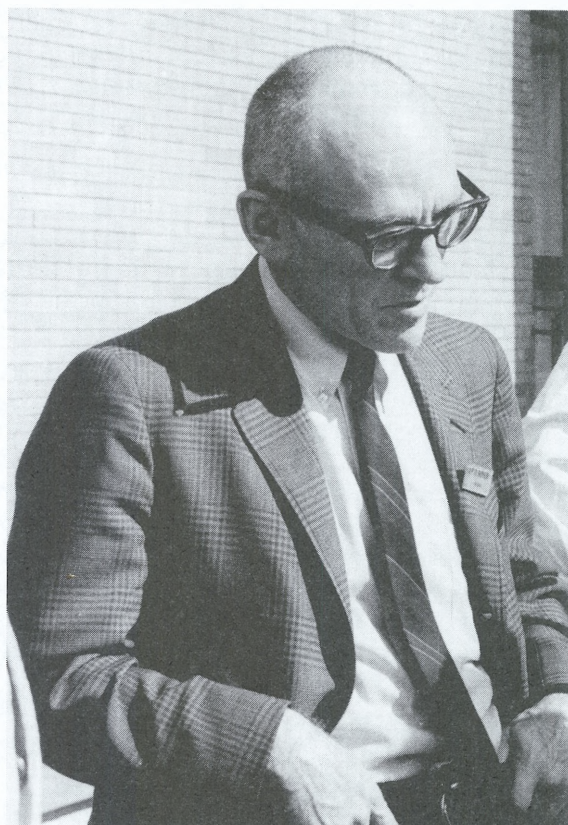
Zapomina się często, że w tym samym czasie co Mitchell inny brytyjski badacz, R.J.P. WILLIAMS (1961), opublikował podobną koncepcję. Przyjął on jednak, że tworzący się kosztem łańcucha oddechowego gradient protonów występuje wyłącznie w obrębie lipidowej fazy wewnętrznej błony mitochondrialnej, a nie, jak zakładał Mitchell, rozciąga się na obie fazy wodne po dwóch stronach błony. Istnienie takiego zlokalizowanego gradientu protonowego trudno byłoby wykazać doświadczalnie, podczas kiedy mit-



Ryc. 9. Schematyczne przedstawienie teorii chemiosmotycznej Mitchella (szczegóły w tekście).

chellowski zdelokalizowany potencjał elektrochemiczny był łatwo mierzalny. To prawdopodobnie sprawiło, że koncepcja Williamsa nie znalazła szerszego uznania. Dopiero kilkanaście lat później niektórzy autorzy, między innymi Douglas Kell w Anglii i Hans Westerhoff w Holandii (WESTERHOFF i współaut. 1984), podjęli próbę reanimacji koncepcji gradientu zlokalizowanego. Według obecnego naszego rozumienia istnienia gradientu lokalnego w obrębie błony nie można wykluczyć, niemniej dla oksydacyjnej fosforylacji czynnikiem zasadniczym jest potencjał zdelokalizowany, tak jak to zakładał Mitchell.

Powszechna akceptacja teorii chemiosmotycznej pozwoliła inaczej spojrzeć na niektóre problemy bioenergetyki mitochondrialnej. Między innymi w nowym świetle ukazał się problem stechiometrii oksydacyjnej fosforylacji. Na stosunek P/O zaczęliśmy patrzeć jako na wartość czysto empiryczną, a nie jako odzwierciedlenie ciągu reakcji chemicznych. Dopuszczalna wydaje się jego wartość ułamkowa. Pojawił się natomiast problem dwóch innych stechiometrii, a mianowicie wydajności segregacji protonów towarzyszącej transportowi elektronów, czyli stosunek $H^+/2e^-$, oraz wydajności syntezy ATP kosztem strumienia protonów przez syntazę ATP, czyli H^+/ATP . Wartość $H^+/2e^-$ okazała się różna dla różnych kompleksów łańcucha oddechowego i wynosi od 2 do 4. Z drugiej strony okazało się, że elektrochemiczny gradient protonów może być wykorzystywany nie tylko do syntezy ATP, lecz także dla transportu niektórych substratów oddechowych i fosforanu z cytosolu do wnętrza mitochondriów (ko-



Ryc. 10. Paul D. Boyer (urodz. w 1918 r.).

Badania nad mechanizmem oksydacyjnej fosforylacji prowadził w Zakładzie Chemii i Biochemii Uniwersytetu stanowego Kalifornii w Los Angeles (obecnie emerytowany profesor w tymże Zakładzie). Nagroda Nobla w zakresie chemii w 1977 r. (wspólnie z Johnem E. Walkerem i Jensem C. Skou). Zdjęcie ze zbiorów autora.

sztem ΔpH), a także na eksport ATP i import do mitochondriów ADP (kosztem $\Delta\Psi$). Wartość stosunku H^+/ATP równą 2 oznaczyli MOYLE i MITCHELL (1973) dla reakcji hydrolizy ATP przez cząstki submitochondrialne. Jednakże dla syntezy ATP w całych mitochondriach bardziej prawdopodobna wydaje się wartość 3 (WOJTCZAK i współaut. 1986).

Zarówno w swej oryginalnej publikacji z 1961 r., jak i w późniejszych pracach Mitchell przyjmował, że gradient ładunków po obu stronach wewnętrznej błony mitochondrialnej powstaje na skutek segregacji protonów przez łańcuch oddechowy. Ten proces zachodzi na tych odcinkach łańcucha oddechowego, na których oksydoredukcja polegająca na międzycząsteczkowym przekazywaniu całego atomu wodoru ulega przekształceniu w oksydoredukcję wyłącznie „elektronową” i na odwrót. Wówczas uwalniany proton jest wydzielany po zewnętrznej stronie błony, a przy przejściu odwrotnym — pobierany proton pochodzi z wnętrza mitochondrionu. W późniejszych latach wykazano, że zachodzi również aktywne wypompowywanie

protonów na niektórych odcinkach łańcucha oddechowego, przede wszystkim na poziomie oksydazy cytochromowej (WIKSTRÖM 1998). W

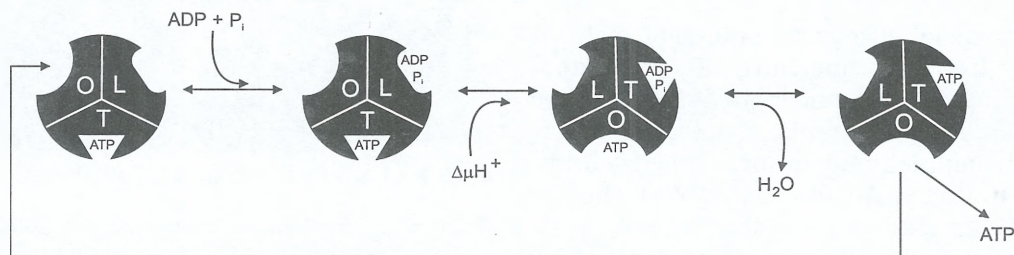
sposób oczywisty zwiększa to wydajność budowania siły protonomotorycznej.

TEORIA „KONFORMACYJNA” I BUDOWA SYNTAZY ATP

Historycznie biorąc, wcześniejszym konkurentem teorii chemicznego sprzężenia niż teoria chemiosmotyczna była hipoteza konformacyjna. Jej twórca, amerykański naukowiec, Paul D. Boyer (Ryc. 10), już w końcu lat pięćdziesiątych zaproponował, że poszukiwanym wysokoenergetycznym „intermediatem” nie jest jakaś odrębna substancja chemiczna, lecz przejściowa, wysokoenergetyczna konformacja enzymów zaangażowanych w mitochondrialne procesy oksydoredukcji. Wywołuje ona z kolei odpowiednią zmianę konformacyjną mitochondrialnej syntazy ATP. Energia zakumulowana pod postacią zmiany konformacyjnej umożli-

trznej błonie mitochondrialnej jest tym czynnikiem, który powoduje zmianę konformacji syntazy ATP (BOYER 1997). Kolejność reakcji polegających na 1) wiązaniu cząsteczki ADP i fosforanu z cząsteczką enzymu, 2) zmianie konformacji miejsca wiążącego i odpowiednim zbliżeniu do siebie związanych molekuł i 3) następującym w wyniku tego „wymuszeniu” połączenia się ADP z fosforanem i utworzeniu cząsteczki ATP przedstawia Ryc. 11.

Schemat ten zakłada istnienie w cząsteczce syntazy trzech miejsc wiążących nukleotydy adeninowe, przy czym w określonym momencie każde z tych miejsc wykazuje odmienną konfor-



Ryc. 11. Model konformacyjny sprzężenia energetycznego Boyera.

Zmiana konformacji trzech miejsc katalitycznych następuje pod wpływem elektrochemicznego gradientu protonowego ($\Delta\mu\text{H}^+$). Dalsze objaśnienia w tekście.

wiałyby związanym z molekułą enzymu cząsteczkom ADP i fosforanu połączenie się z odłączeniem cząsteczki wody. Słabą stroną tej koncepcji była trudność wyobrażenia sobie, że zmiany konformacyjne tak szybko mogły być przekazywane pomiędzy bądź co bądź ogromnymi kompleksami enzymatycznymi tkwiącymi w błonie mitochondrialnej, jakimi są z jednej strony kompleksy łańcucha oddechowego, a z drugiej syntaza ATP. Z drugiej jednak strony, w miarę postępu badań nad mitochondrialną, chloroplastową i bakteryjną syntazą ATP pojawiły się obserwacje zgodne z założeniami teorii konformacyjnej. Wykazano mianowicie, że syntaza ATP, czyli kompleks F_0F_1 , wiąże nukleotydy adeninowe i że wiązaniu temu towarzyszy zmiana konformacji białka. Stało się to jednak możliwe dopiero w latach siedemdziesiątych i osiemdziesiątych dzięki nowym fizykochemicznym metodom badania konformacji białek.

W swej zmodyfikowanej postaci teoria konformacyjna stanowi kompromis z teorią chemiosmotyczną. Przyjmuje mianowicie, że to elektrochemiczny gradient protonowy na wewnę-

mację (oznaczoną na rysunku literami O, L i T) charakteryzująca się innym powinowactwem do tych nukleotydów (patrz opracowania przeglądowe: BOGUCA 1997, WOJTCZAK 1998). Takie założenie znalazło pełne potwierdzenie w badaniach nad strukturą syntazy ATP. Dokonano tego, a nawet krystalizacji kompleksu F_1 , na przełomie lat siedemdziesiątych i osiemdziesiątych.

Rozmiary niniejszego artykułu nie pozwalają na szersze przedstawienie przebiegu tych niezmiernie interesujących badań. Zainteresowanego Czytelnika odsyłam przeto do niedawnego opracowania przeglądowego po polsku (BOGUCA 1997) oraz obszernych monografi samych badaczy w te zagadnienia zaangażowanych (np. AMZEL i PEDERSEN 1983). Tutaj przypomnę jedynie krótko współcześnie przyjęty model mitochondrialnej syntazy ATP (Ryc. 12). Właściwa część katalityczna, słynny już pierwszy czynnik sprzęgający Rackera, czyli F_1 , będący zarazem mitochondrialną ATP-azą, okazał się złożonym kompleksem białkowym. Po rozbiciu czynnikami denaturującymi zidentyfi-

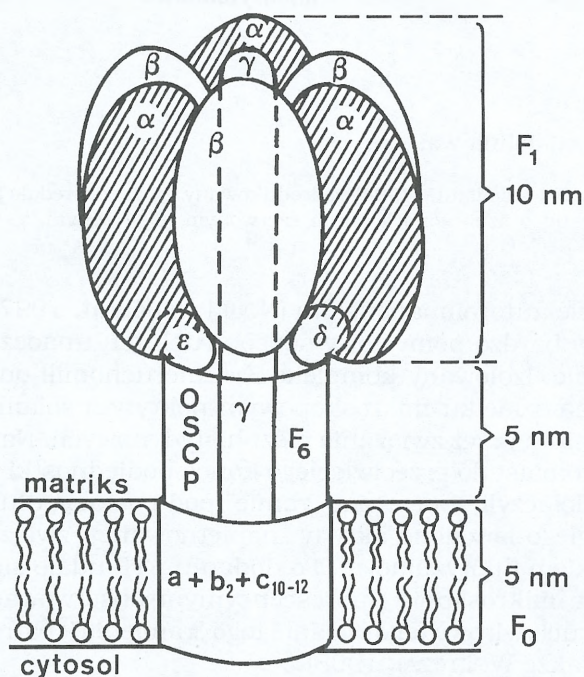
kowano w nim pięć różnych łańcuchów peptydowych, przy czym dwa z nich, α i β , występują w trzech kopiach. Centralną pozycję w tym kompleksie zajmuje bardzo wydłużona podjednostka γ . Natomiast część błonowa, czyli F_0 , składa się z kilkunastu niezwykle hydrofobowych białek stanowiących integralną strukturę wewnętrznej błony mitochondrialnej. Oba kom-

pleksy połączone są krótką „szyjką” zawierającą kilka niewielkich cząsteczek białkowych. Trzy podjednostki β odpowiadają prawdopodobnie trzem centrom katalitycznym, wiążącym z różnym powinowactwem nukleotydy adeninowe, w modelu konformacyjnym (Ryc. 11). Tak skonstruowany model tylko czekał, by ... nadać mu ruch.

WIRUJĄCY ENZYM

Dokonał tego brytyjski badacz, John E. Walker. Stosując najnowsze techniki badania konformacji białek, jak rentgenowska analiza kryształów, mikroskopia elektronowa najwyższej rozdzielczości i magnetyczny rezonans jądrowy, a także posługując się specyficznymi inhibitorami i analogami ATP, prześledził dokładnie

trzon „szyjki” łączącej F_1 z F_0 . Molekularny model zmian konformacyjnych, odpowiadających stanom O, L i T w schemacie Boyera (Ryc. 11), dał wynik wręcz sensacyjny. Wykazano, że każdej zmianie konformacyjnej musi towarzyszyć obrót kompleksu F_1 względem podjednostki γ o kąt 120° tak, że pełnemu obrotowi kompleksu F_1 (nazwijmy go „głową”) względem „szyjki” towarzyszy hydroliza, względnie synteza, trzech cząsteczek ATP (ABRAHAMS i współaut. 1994). Znając specyficzną aktywność ATP-azy (ewentualnie syntazy ATP, jeśli proces rozpatrywać w kierunku syntezy), można obliczyć szybkość tego ruchu wirowego. Okazało się, że przy pełnej aktywności enzymu wynosi on (w zależności od pochodzenia enzymu: z mitochondriów, chloroplastów czy bakterii) od 130 do 270 obrotów na sekundę (!). Ponieważ „głowa” (F_1) wydaje się być połączona w sposób sztywny z elementem błonowym (F_0) za pomocą takich białek jak F_6 i OSCP (Ryc. 12), przyjmuje się, że to raczej podjednostka γ wiruje wewnątrz nieruchomej „głowy” (Ryc. 13).

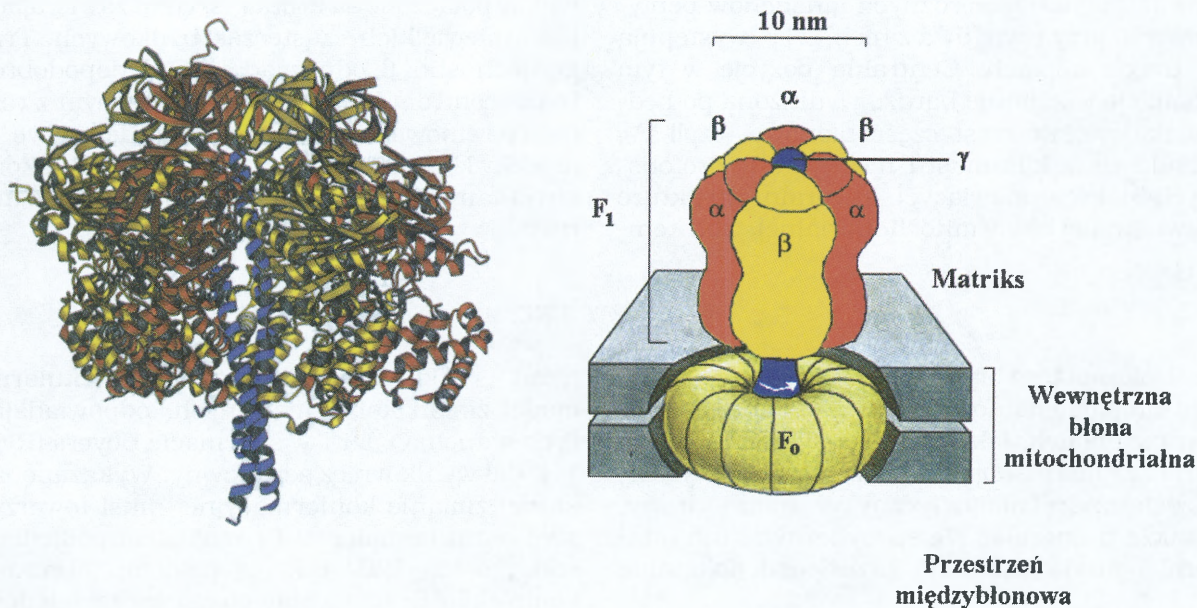


Ryc. 12. Kompleks mitochondrialnej syntazy ATP.

Część „głowa”, kompleks F_1 , zbudowana jest z podjednostek α , β (po trzy), δ i ϵ ; segment błonowy, F_0 , — z kilkunastu hydrofobowych białek a , b i c . Łączy je małe białko: F_6 i OSCP (*oligomycin sensitivity conferring protein*). Rdzeń całej struktury stanowi podjednostka γ .

przebieg enzymatycznej hydrolizy ATP na poziomie molekularnym. (Oczywiście w układzie sprzężonym, w nienaruszonej błonie mitochondrialnej, proces syntezy ATP winien przebiegać dokładnie tak samo, tylko w kierunku odwrotnym.) Po pierwsze, zidentyfikowano reszty aminokwasowe zaangażowane w wiązanie nukleotydów adeninowych na podjednostkach β . Okazało się, że sąsiadują one bezpośrednio z centralnie usytuowaną podjednostką γ , stanowiącą

I oto mamy klucz do zrozumienia mechanizmu syntezy ATP: strumień protonów, napędzany przez siłę protonomotoryczną, wpada z przestrzeni międzybłonowej do wewnętrznej przestrzeni mitochondrialnej przez błonowy sektor syntazy (kompleks F_0). W sposób jak na razie tajemniczy wywołuje to ruch wirowy podjednostki γ , niczym strumień wody nadający ruch wirnikowi turbiny elektrowni wodnej. Przeciwległy koniec podjednostki γ (która nie jest symetryczna względem swej osi podłużnej, lecz jest wygięta), obracając się w „kanale” utworzonym przez podjednostki α i β , powoduje kolejne ich odkształcanie sprawiając, że centra aktywne podjednostek β przyjmują odpowiednie konformacje o zmiennym powinowactwie do ADP i ATP, jak to przewidywała teoria konformacyjna Boyera. Zgodnie z tą teorią „wymusza” to wiązanie się ADP z fosforanem i utworzenie cząsteczki ATP, a następnie jej oddysocjowanie do fazy wodnej. Gdy kompleks F_0F_1 działa w kierunku hydrolizy ATP a nie jego syntezy, wówczas oczywiście wszystkie procesy, w tym rów-



Ryc. 13. Wirująca ATP-aza (syntaza ATP) według koncepcji Johna Walkera.

Model strukturalny po lewej stronie rysunku według ABRAHAMSA i współaut. (1994) reprodukowany za zgodą redakcji Nature, copyright (1994) Macmillan Magazines Ltd. Podjednostki α oznaczono kolorem czerwonym, β — żółtym, γ — niebieskim lub fioletowym.

niez ruch obrotowy podjednostki γ , przebiegają w kierunku odwrotnym.

Za wyjaśnienie tych procesów leżących u molekularnych podstaw mechanizmu syntezy ATP Paul Boyer i John Walker otrzymali w 1997 roku nagrodę Nobla (podzielili się nią z Jensem Skou, uhonorowanym za odkrycie ATP-azy sodowo-potasowej) (WOJTCZAK 1998).

Mimo submikroskopowych rozmiarów tego najmniejszego silnika obrotowego świata, gdzie podjednostki α i β wraz z całym kompleksem F_0 stanowią stojan, a podjednostka γ wirnik, udało

się autorom japońskim (NOJI i współaut. 1997) w bardzo pomysłowy sposób ruch ten unaocznnić. Izolowany kompleks F_1 unieruchomili oni na szkiełku mikroskopowym pokrytym solami niklu przez związanie reszt histydynowych. Natomiast do przeciwległego końca podjednostki γ dołączyli poprzeczne „ramię” pod postacią długiego łańcucha aktyny „napiętnowanej” związkami fluoryzującymi. Po dodaniu ATP udało się w mikroskopie fluorescencyjnym obserwować ruch wirowy tego właśnie tego „ramienia” (patrz także WOJTCZAK 1998).

CO DALEJ?

Nie chciałbym tu fantazjować na temat dalszych kierunków badań nad mechanizmem sprzężenia energetycznego. Można jednakże stwierdzić, co w chwili obecnej wydaje się konieczne do wyjaśnienia, aby nasza wiedza o syntezie ATP kosztem procesów oksydoredukcji w łańcuchu oddechowym stała się w miarę kompletna. Otóż niewątpliwie pełniejszego zbadania wymagają zarówno molekularne mechanizmy aktywnego transportu protonów przez łańcuch oddechowy jak i sposób, w jaki strumień protonów nadaje ruch wirowy podjednostce syntazy ATP.

Jeśli chodzi zaś o szerszą pojętą energetykę mitochondriów, to ogromne zainteresowanie budzą, również w aspekcie praktycznym: 1) rola mitochondriów w homeostazie komórkowej kationów nieorganicznych, głównie K^+ i Ca^{2+} (SZEWCZYK i współaut. 1996, BERNARDI 1999, MAKOWSKA i współaut. 2000), 2) udział mitochondriów w procesie programowanej śmierci komórki (apoptozie) (HIRSCH i współaut. 1997, GRADZKA 2000) i 3) znaczenie genetycznych defektów mitochondriów w patogenezie niektórych chorób (PRONICKA 1995, WALLACE 1999).

LITERATURA

- ABRAHAMS J. P., LESLIE A. G. W., LUTTER R., WALKER J. E., 1994. Structure at 2.8 Å resolution of F_1 -ATPase from bovine heart mitochondria. *Nature* 370, 621–628.
- AMZEL L. M., PEDERSEN P. L., 1983. Proton ATPases: structure and mechanism. *Annu. Rev. Biochem.* 52, 801–824.
- AZZONE G. F., LEE C. -P., 1999. Lars Ernster (1920–1998). *Trends Biochem. Sci.* 24, 166–167.
- BELITZER V. A., TZIBAKOVA E. T., 1939. O mechanizmie fosforilowania, soprozajenowo c dychanijem (streszczenie w j. fr.). *Biochimija* 4, 516–535.
- BERNARDI P., 1999. Mitochondrial transport of cations: channels, exchangers, and permeability transition. *Physiol. Rev.* 74, 1127–1155.
- BOGUCKA K., 1997. ATPaza F_0F_1 — budowa i funkcja. *Kosmos* 46, 137–146.
- BOYER P. D., 1997. The ATP synthase — a splendid molecular machine. *Annu. Rev. Biochem.* 66, 717–749.
- CHANCE B., WILLIAMS G. R., 1955. Respiratory enzymes in oxidative phosphorylation. I-IV. *J. Biol. Chem.* 217, 383–438.
- CHANCE B., WILLIAMS G. R., HOLMES W. F., HIGGINS J., 1955. Respiratory enzymes in oxidative phosphorylation. V. Mechanism of phosphorylation in the respiratory chain. *J. Biol. Chem.* 217, 439–451.
- COCKRELL R. S., HARRIS E. J., PRESSMAN B. C., 1967. Synthesis of ATP driven by a potassium gradient in mitochondria. *Nature* 215, 1487–1489.
- ENGELHARDT W. A., 1930. Ortho- und Pyrophosphat im aeroben und anaeroben Stoffwechsel der Blutzellen. *Biochem. Z.* 227, 16–38.
- ENGELHARDT W. A., 1932. Die Beziehungen zwischen Atmung und Pyrophosphatumsatz in Vogelerythrocyten. *Biochem. Z.* 251, 343–368.
- ERNSTER L., 1967. The reaction sequence in oxidative phosphorylation. [W:] *Biochemistry of Mitochondria*. SLATER E. C., KANIUGA Z., WOJTCZAK L. (red.), Academic Press and P.W.N., London, Warszawa, 29–51.
- ERNSTER L., SCHATZ G., 1981. Mitochondria: A historical review. *J. Cell Biol.* 91, 227s-255s.
- FERNÁNDEZ-MORÁN H., 1962. Low temperature electron microscopy and X-ray diffraction studies of lipoprotein components in lamellar systems. *Circulation* 26, 1039–1065.
- FLORKIN M., 1975. A history of biochemistry. III. History of the identification of the sources of free energy in organisms. [W:] *Comprehensive Biochemistry*, t. 31. FLORKIN M., STOTZ E. H. (red.), Elsevier, Amsterdam.
- GRADZKA I., 2000. Apoptoza: decyzja należy do mitochondrium. *Postępy Bioch.* 46, 2–16.
- HIRSCH T., MARZO I., KROEMER G., 1997. Role of the mitochondrial permeability transition pore in apoptosis. *Biosci. Rep.* 17, 67–76.
- JAGENDORF A. T., URIBE E., 1966. ATP formation caused by acid-base transition of spinach chloroplasts. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 55, 170–177.
- LIPMANN F., 1941. Metabolic generation and utilization of phosphate bound energy. *Adv. Enzymol.* 1, 99–162.
- MAKOWSKA A., ZABŁOCKI K., DUSZYŃSKI J. (2000) The role of mitochondria in the regulation of calcium influx into Jurkat cells. *Eur. J. Biochem.* 267, 877–884
- MITCHELL P., 1961. Coupling of phosphorylation to electron and hydrogen transfer by chemi-osmotic type of mechanism. *Nature* 191, 144–148.
- MITCHELL P., 1966. Chemiosmotic coupling in oxidative and photosynthetic phosphorylation. *Biol. Rev.* 41, 445–502.
- MITCHELL P., MOYLE J., 1967. Proton-transport phosphorylation: Some experimental tests. [W:] *Biochemistry of Mitochondria*. SLATER E. C., KANIUGA Z., WOJTCZAK L. (red.), Academic Press and P.W.N., London, Warszawa, str. 53–74.
- MOYLE J., MITCHELL P., 1973. Proton translocation quotient for the adenosine triphosphatase of rat liver mitochondria. *FEBS Lett.* 30, 317–320.
- NOJI H., YASUDA R., YOSHIDA M., KINOSHITA K. jr., 1997. Direct observation of the rotation of F_1 -ATPase. *Nature* 386, 299–302.
- PENEFSKY H. S., PULLMAN M. E., DATTA A., RACKER E., 1960. Partial resolution of the enzymes catalyzing oxidative phosphorylation. II. Participation of a soluble adenosine triphosphatase in oxidative phosphorylation. *J. Biol. Chem.* 235, 3330–3336.
- PRONICKA E., 1995. Choroby mitochondrialne (cytopatie mitochondrialne) i inne pierwotne kwasicie mleczanowe. *Post. Pediatrii* 4, 3–29.
- RACKER E., 1980. From Pasteur to Mitchell: A hundred years of bioenergetics. *Fed. Proc.* 39, 210–215.
- RACKER E., STOECKENIUS W., 1974. Reconstitution of purple membrane vesicles catalyzing light-driven proton uptake and adenosine triphosphate formation. *J. Biol. Chem.* 249, 662–663.
- RACKER E., TYLER D. D., ESTABROOK R. W., CONOVER T. E., PARSONS D. F., CHANCE B., 1965. Correlations between electron-transport activity, ATP-ase, and morphology of submitochondrial particles. [W:] *Oxidases and Related Redox Enzymes*. KING T.E., MASON H. S., MORRISON M. (red.), John Wiley & Sons, New York, str. 1077–1094.
- SLATER E. C., 1953. Mechanism of phosphorylation in the respiratory chain. *Nature* 172, 975–978.
- SLATER E. C., 1981. The discovery of oxidative phosphorylation. *Trends Biochem. Sci.* 6, 226–227.
- SZEW CZYK A., CZYŻ A., WÓJCIK G., WOJTCZAK L., NAŁE CZ M. J., 1996. ATP-regulated K^+ channel in mitochondria: pharmacology and function. *J. Bioenerg. Biomembr.* 28, 145–150.
- WALLACE D. C., 1999. Mitochondrial diseases in man and mouse. *Science* 283, 1482–1488
- WESTERHOFF H. V., MELANDRI B. A., VENTUROLI G., AZZONE G. F., KELL D. B., 1984. A minimal hypothesis for membrane-linked free-energy transduction: The role of independent, small coupling units. *Biochim. Biophys. Acta* 786, 257–292.
- WILLIAMS R. J. P., 1961. Possible functions of chains of oxidoreductases. *J. Theor. Biol.* 1, 1–17.
- WIKSTRÖM M., 1998. Proton translocation by the respiratory haem-copper oxidases. *Biochim. Biophys. Acta* 1365, 185–192.
- WOJTCZAK L., 1998. Nagroda Nobla z chemii za 1997 rok - mitochondrialna syntaza ATP. *Postępy Bioch.* 44, 2–5.
- WOJTCZAK L., ŻÓLKIEWSKA A., DUSZYŃSKI J., 1986. Energy-storage capacity of the mitochondrial proton-motive force. *Biochim. Biophys. Acta* 851, 313–321.

Autor zwraca uwagę Czytelnika również na dwa artykuły przeglądowe nie cytowane w tekście: RACKER i współaut. (1965) i SLATER (1981).