

Wspomnienia z okazji 60-lecia Katedry Biochemii i Biotechnologii

Prof. dr hab. Andrzej Guranowski

Zakład Biochemii, Katedra Biochemii i Biotechnologii,
Wydział Rolnictwa i Bioinżynierii,
Uniwersytet Przyrodniczy w Poznaniu,
ul. Dojazd 11, 60-632 Poznań;
e-mail guranow@up.poznan.pl



Fot. 1. Autor wspomnień (z lewej) wraz z kierownikami Katedry; profesorami Witoldem Walerychem, Jerzym Pawełkiewiczem i Ryszardem Słomskim (listopad 1999 r.).

Ściśle biorąc, to 60 lat minęło od powołania placówki naukowo-dydaktycznej o nazwie *Katedra Biochemii*. Powstała ona przy Wydziale Rolniczym Wyższej Szkoły Rolniczej w Poznaniu w październiku 1956 roku. Inicjatorem utworzenia i kierownikiem Katedry był, wówczas jeszcze docent, dr Jerzy Pawełkiewicz. W ciągu lat zmieniały się: afiliacja, nazwa, kierownictwo i lokalizacja Katedry. Wyższa Szkoła Rolnicza została w 1973 roku przemianowana na Akademię Rolniczą, a ta w 2008 roku na Uniwersytet Przyrodniczy. Wydział Rolniczy stał się Wydziałem Rolnic-

twa i Bioinżynierii, a Katedra Biochemii, bodaj w 1989 roku, Katedrą Biochemii i Biotechnologii. Od 1972 roku, przez niemal dekadę, Katedra Biochemii była częścią Międzyuczelnianego Instytutu Biochemii, w skład którego wchodziły także Katedry Biochemii Uniwersytetu im. Adama Mickiewicza i Akademii Medycznej. Inicjatorem i kierownikiem owego Instytutu był prof. dr Jerzy Pawełkiewicz. Profesor kierował Katedrą Biochemii AR do 1981 roku. W latach 1981-1998 kierownikiem był prof. dr hab. Witold Walerych, a od 1998 roku do dziś jest prof. dr hab. Ryszard Słomski (Fot. 1). W 2012 roku Katedra Biochemii i Biotechnologii przeniosła się z ul. Wołyńskiej 35 (Fot. 2) do nowoczesnego budynku „Biocentrum” przy ul. Dojazd 11 (Fot. 3).



Fot. 2. Budynek przy ulicy Wołyńskiej 35 w Poznaniu. Katedra zajmowała w nim pomieszczenia z lewej strony na piętrach pierwszym i drugim oraz, w podziemiu pokój-chłodnię, pokój kultur tkankowych i pomieszczenia magazynowe (kwiecień 2007 r.).



Fot. 3. Budynek Biocentrum przy ul. Dojazd 11 (półowa maja 2012 r.). Katedra Biochemii i Biotechnologii zajmuje w nim cały prawy segment i przyległą szklarnię. Od końca czerwca 2012 r. do budynku prowadzi chodnik. Na początku grudnia 2016 r. posadzono wzdłuż niego 40 młodych klonów.

W pierwszej dekadzie istnienia Katedry tematyką wiodącą była chemia i biochemia witaminy B₁₂. Od drugiej połowy lat 1960., w ślad za przełomowymi odkryciami biologii (odkryciem struktury DNA, rozszyfrowaniem kodu genetycznego i poznaniem sposobów przekazywania informacji genetycznej z kwasów nukleinowych na białka), głównymi obiektami badań stały się enzymy i inne białka związane z transkrypcją, powstawaniem aminoacylo-tRNA i translacją. A dominującym materiałem badawczym rośliny; łubin żółty, pszenica i jęczmień. Nasza Katedra była wówczas jedną z nielicznych krajowych placówek uczelnianych mających w nazwie „biochemię”.

Moje przybycie do Katedry we wrześniu 1972 roku poprzedzała dwuletnia praca w Zakładzie Genetyki Roślin PAN. Do tej placówki przyszedłem w październiku 1970 roku, korzystając z oferty pracy dla biochemika, jaką Wydział V PAN przesłał w 1969 roku do Katedry Biochemii Uniwersytetu Warszawskiego. Tam, na Wydziale Biologii i Nauk o Ziemi, w latach 1965-70 studiowałem biochemię. Władze PAN oferowały pracę w rozbudowywanym w Poznaniu Zakładzie Genetyki, a wśród zachęć do podjęcia tam pracy była, poza możliwością samodzielnego rozwoju naukowego, możliwość uzyskania mieszkania z puli będącej w dyspozycji władz miasta. Moim rodzinnym miastem była Bydgoszcz a żony Warszawa. Zdecydowaliśmy się jednak na podjęcie samodzielnego życia w miejscu nowym dla każdego z nas. Tym bardziej, że żona, która skończyła na Uniwersytecie Warszawskim fizjologię roślin, również została zatrudniona w Zakładzie Genetyki Roślin. Przyjmował nas wówczas do pracy dr Mirosław Małuszyński.

Dzięki wartościowym pracom dotyczącym biochemii witaminy B₁₂ i pierwszym pracom na temat prze-

kazywania informacji genetycznej, Katedra Biochemii WSR w Poznaniu cieszyła się dobrą opinią. A jej kierownik, prof. dr Jerzy Pawełekiewicz, był konsultantem prac biochemicznych prowadzonych w Zakładzie Genetyki Roślin PAN. Dążyłem do tego, aby pod okiem Profesora odbyć w Katedrze staż naukowy i, jak wspominałem, dążenia te spełniły się. Profesor skierował mnie do laboratorium dr Zenona Schneidera. Dr Schneider wrócił wówczas z ponad dwuletniego stażu podoktorskiego w USA, gdzie badał enzym dehydratazę glicerolową, który ma w swej strukturze koenzym B₁₂. Po powrocie włączył się jednak w badanie procesu transkrypcji, a konkretnie polimerazy RNA. Pod jego opieką przeprowadzałem pilotażowe doświadczenia na ekstraktach z chloroplastów izolowanych przez nas z liści jęczmienia. Wykrywaliśmy w nich aktywność wspomnianej polimerazy. Dr Schneider był wtedy pełen entuzjazmu i okazywał mi różnego rodzaju pomoc; nie tylko w zapewnianiu warsztatu pracy, ale i załatwianiu spraw bytowych; m.in. miejsca w przedszkolu dla córki... Solidną pomoc techniczną miałem też ze strony pani Krystyny Baranowskiej.

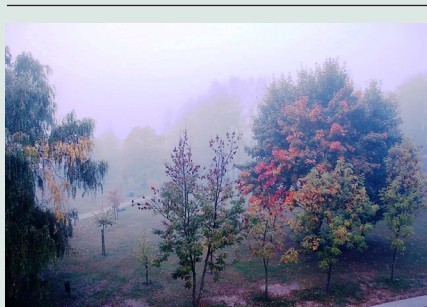
Po kilku tygodniach, Profesor Pawełekiewicz pokazał nam w *Nature* artykuł o polimerazie poliA; enzymie, który dobudowuje sekwencje poliadenylanowe do cząsteczek eukariotycznych mRNA. Postanowiliśmy sprawdzić czy taką aktywność da się wykazać w ekstraktach chloroplastowych. Wyniki okazały się obiecujące, a ponieważ o aktywność polimerazy poliA w roślinach nic nie było wiadomo zająłem się jej oczyszczeniem. Do tego, test wykrywania aktywności polimerazy poliA był tańszy niż test stosowany przy wykrywaniu aktywności polimerazy RNA, bowiem w mieszaninie wystarczyło mieć nie cztery a tylko jeden trifosforan rybonukleozydu. Stosowałem preparat [U-¹⁴C]ATP, czyli związek mający radioaktywne wszystkie atomy węgla adenozyne. Następnym zdarzeniem, które usprawniło, jak miało się wkrótce okazać jakże jednak złudnie, badania polimerazy poliA było trafienie w jednej z publikacji na informację, że łańcuchy eukariotycznych mRNA, dzięki sekwencjom poliadenylanowym na końcu 3', adsorbują się wy-

dajnie na filtrach z azotanu celulozy w środowisku wysokiej siły jonowej (np. 0,5 M KCl). Dysponowaliśmy takimi filtrami i od ręki sprawdziliśmy, że poliadenylany, czyli produkty reakcji katalizowanej przez domniemaną polimerazę poliA, wyłapywały się na nich o wiele wydajniej niż w przypadku stosowanej dotąd metody wytrącania radioaktywnych produktów reakcji kwasem trichlorooctowym i wyłapywania strątu na krążkach bibułowych. Aliści, gdy w ramach charakteryzowania badanej reakcji wypadło określić wielkości jej produktów, czyli domniemanych łańcuchów poliA, okazało się, że to co powstaje, a tak wydajnie łapie się na filtrach z azotanu celulozy było bardzo małą cząsteczką. Przechodziło bowiem przez pory worka dializacyjnego i podczas sączenia molekularnego na żelu Sephadex G-100 wymywało się w rejonach całkowitej objętości kolumny chromatograficznej, a więc tak jak związki bardzo małe. Identycznie zachował się na filtrach produkt kwasowej hydrolizy [U-¹⁴C]ATP, czyli adenina. To ta zasada nukleino-wa okazała się tak silnie adsorbować na filtrach z azotanu celulozy. Ten kłopotliwy dla mnie fakt zachodził wskutek zbiegu dwóch okoliczności: (i) zastosowania w mieszaninie reakcyjnej substratu mającego radioaktywną część adeninową i (ii) istnienia u roślin kilku enzymów, które kolejno degradowały ATP, poprzez ADP, AMP i adenozyne, do adeniny i rybozy. Enzymami tymi były: apyryaza, nukleotydaza, i hydrolaza adenozyne (adenozy-naza). To, że nikt wcześniej nie trafił na to zjawisko można wytłumaczyć tym, iż ci którzy używali do adsorbowania radioaktywnych poliadenylanów na filtrach z azotanu celulozy nie pracowali na materiale roślinnym, a takiego zestawu enzymów jak u roślin nie ma w materiale zwierzęcym; w nim adenozy-na jest bowiem dezaminowana do inozyne, a ta degradowana fosforolitycznie do zasady hipoksantyny i rybozo-1-fosforanu. A ewentualnie ci, którzy pracowali z enzymami roślinnymi i radioaktywnym adenylanem włączonym do polimerów wytrącali te polimery kwasem i strąć zatrzymywali na sączkach bibułowych. Poza adeniną żaden inny ze związków powstających z ATP w przytoczonej sekwen-

cji reakcji nie wiązał się na filtrach, a z innych przetestowanych zasad nukleinowych niele adsorbowała się na filtrach także cytozyna. Uplęnęło trochę czasu nim to zaskakujące odkrycie, które spowodowało zaniechanie badania roślinnej polimerazy poliA przekuliśmy na coś pozytywnego. Zbadaliśmy z dr Schneiderem obszerniej zjawisko adsorbowania się na filtrach z azotanu celulozy. Ustaliśmy warunki jakie temu sprzyjają i zaproponowali, że można w ten sposób oznaczać aktywność adenozy-nazy [1]. Publikacją na ten temat chcieliśmy ostrzec innych badaczy przed nieoczekiwanym sorbowaniem się na filtrach niektórych metabolitów.

W pracowni dr Schneidera pracowałem trzy lata i, w zaistniałej sytuacji, skierowałem swoje badania ku adenozy-nazie, o której nie było wówczas wiele wiadomo. Oczyszcziłem ją z liści jęczmienia i scharakteryzowałem. Praca doktorska, którą obroniłem 13 grudnia 1975 roku dotyczyła tego enzymu oraz opisanego wyżej zjawiska adsorbowania się adeniny. Promotorem pracy był prof. Jerzy Pawełekiewicz. Do danych, które zawarłem w rozprawie doktorskiej dodaliśmy jeszcze z dr. Schneiderem sporo danych na temat specyficzności substratowej i parametrów kinetycznych charakteryzujących oczyszczoną do homogenności jęczmienną hydrolazę adenozyne [2].

Jesienią 1975 roku zostałem pracownikiem AR i wszedłem w skład zespołu Profesora. Wiązało się to też za zmianą miejsca pracy; przenieśliśmy się z pierwszego piętra ze strony północnej budynku przy ul. Wołyńskiej 35 do laboratorium w pomieszczeniu nr 217 na drugim piętrze po stronie południowej. Pomieszczenie to dzieliłem przez większość czasu w latach 1976-1982 z dr Hieronimem Jakubowskim i panią mgr Elżbietą Starzyńską. Z sentymentem wspominam widok z okna tego pomieszczenia i możliwość śledzenia jak pusty niemal trawnik między naszym budynkiem a Collegium Maximum i budynkami Technologii Drewna w ciągu ponad trzech dekad przekształcał się niemal w park; zmieniający barwy w zależności od pór roku (Fot. 4).



Fot. 4. Jesienne widoki z okna pomieszczenia 217 przy ul. Wołyńskiej 35.

Profesor Pawełekiewicz, uwzględniając moje zaangażowanie w badanie metabolizmu adenozyiny u roślin, zasugerował, abym zajął się hydrolazą S-adenozylhomocysteiny (SAH-azą). Enzym ten katalizuje hydrolizę SAH do adenozyiny i L-homocysteiny, a jego rola biologiczna polega na usuwaniu SAH-u, jednego z produktów biologicznej metylacji zależnej od S-adenozylometioniny (SAM), a zarazem silnego inhibitora tej metylacji. W zamyśle Profesora było także, aby wyizolowana SAH-aza mogła być dodawana do mieszanin reakcyjnych, które służyły dr Henryce Wierzbickiej do monitorowania aktywności metylaz tRNA. (Mimo że po paru miesiącach uzyskałem z nasion łubinu żółtego homogeny preparat SAH-azy, do wykorzystania jego w testach metylazowych nigdy nie doszło). Oczyszczając SAH-azę wykorzystałem kilka klasycznych metod. Fortunnie, z mieszaniny białek, które po czterech krokach oczyszczania ciągle towarzyszyły SAH-azie, tylko ona przepływała przez kolumnę z hydroksypatytytu zrównoważoną buforem o niskiej sile jonowej (10 mM buforem fosforanowo-potasowym o pH 6,8) [3]. (Przełgądając ostatnio dane bibliometryczne przekonałem się, że jest to najczęściej cytowana praca z listy artykułów Profesora). Dzięki tej publikacji dr Giulio Cantoni, który kierował Laboratorium Biochemii Ogólnej i Porównawczej w Narodowym Instytucie Zdrowia Psychicznego w Bethesda w Stanie Maryland przyjął mnie na staż doktorski. Dr Cantoni był odkrywcą metylacji zależnej od SAM oraz odkrywcą aktywności SAH-azy w materiale zwierzęcym.

W laboratorium Cantoniego zajmowałem się porównaniem specyficzności substratowej preparatów SAH-az

z wątroby wołowej i nasion łubinu żółtego. Badając różne analogi adenozyiny jako substraty i/lub inhibitory tych enzymów trafiłem na najbardziej wówczas silny inhibitor, arysteromycynę ($K_i = 10^{-9}$ M). Wyniki tych badań zawarliśmy w pracy przyjętej do *Biochemistry* [4]. W Stanach, przy okazji oczyszczania łubinowej SAH-azy, trafiłem na aktywność hydrolazy metyltioadenozyinowej. Oczyszczyłem ją do stanu jednorodnego, a kluczowym krokiem było wymycie enzymu, który związał się na przygotowanym na miejscu złożu, SAH-agarozą, substratem, czyli 5'-metyltioadenozyiną [5]. Kilka lat później, korzystając z propozycji redaktorów tomu *Methods in Enzymology* poświęconego poliaminom, napisaliśmy dla tego wydawnictwa rozdział o roślinnej hydrolazie metyltioadenozyinowej [6].

Wiedza o metabolizmie adenozyiny u roślin była w latach 70-tych XX wieku, i właściwie ciągle jest, bardzo skromna. Na czasie było więc wówczas poznanie jeszcze innych enzymów katalizujących przemiany tego nukleozydu. Niejako rozpoznawczą pracą było przesłedzenie aktywności enzymów katalizujących reutilizację zasad purynowych w kiełkujących siewkach łubinu żółtego. Badania na ten temat przeprowadziłem we współpracy z dr Jerzym Barankiewiczem z IBB PAN w Warszawie [7]. Potem, w pracowni poznańskiej udało mi się oczyścić i scharakteryzować łubinową kinazę adenozyinową [8] i fosfotransferazę nukleozydową, dla której adenozyina może być jednym z substratów [9]. Ponadto, we współpracy z Profesorem Pawełekiewiczem wykazałem, że o ile SAH-aza jest obecna w liścieniach na każdym stadium rozwojowym nasion łubinu żółtego i w rozwijającej się siewce to hydrolaza adenozyinowa nie jest obecna w liścieniach dojrzewających nasion a pojawia się w nich dopiero w 2-3 dniu kiełkowania [10].

We wrześniu 1976 roku wrócił z USA, po odbyciu rocznego stażu doktorskiego, dr Hieronim Jakubowski. (Dalej, z racji bliskiej przyjaźni, pisząc o nim będę używał zdrobnienia Harek). Jak wspominałem, przez kilka lat dzieliłem z nim w Katedrze to samo pomieszczenie, p. 217. Od owych lat, przez następne dekady, na-

sze kontakty naukowe zaowocowały wieloma publikacjami. Harek przede wszystkim zajmował się syntetazami aminoacylo-tRNA. Na preparatach różnych syntetaz badał mechanizm naprawiania pomyłkowych reakcji, katalizowanie których „wymuszał” na tych enzymach. Ten nurt jego zainteresowań owocuje do dziś; zwłaszcza gdy wziąć pod uwagę wyjaśnianie przemian homocysteiny. Z inspiracji Harka, jeszcze zanim pojechałem do laboratorium Cantoniego, wykonaliśmy badania na kompleksie jaki tworzyła łubinowa SAH-aza z adenozyiną. Opisaliśmy warunki w jakich kompleks taki powstaje, jak go można wyłapywać, i podaliśmy wyznaczone dlań parametry fizykochemiczne [11]. Po moim powrocie z rocznego stażu w lutym 1980 roku, wykonaliśmy z Harkiem dodatkowe eksperymenty opisujące zachowanie się kompleksów adenozyiny z SAH-azą. Wykazaliśmy m.in., że związana z enzymem adenozyina podlega wolnemu przekształceniu do adeniny i rybozy [12]. W 1987 roku napisaliśmy z Harkiem rozdział o łubinowej hydrolazie SAH do *Methods in Enzymology* poświęcony metabolizmowi siarki [13].

Jeszcze przed wyjazdem do USA, w lipcu 1978 roku uczestniczyłem w XII Spotkaniu FEBS w Dreźnie. Poznałem wówczas przy plakacie dr Clausa Wasternacka z Uniwersytetu w Halle. Prezentował w nim wyniki badania przemian zasad i nukleozydów pirymidynowych w pierwotniaku *Euglena gracilis*. Jako, że organizm ten, gdy jest oświetlony może wykształcać chloroplasty i stając się fotoautotrofem nabiera cech komórek roślinnych, a w ciemności jest heterotrofem tak jak organizmy zwierzęce, zaplanowaliśmy sprawdzić czy u eugleny adenozyina jest rozkładana tak jak u roślin, czyli do adeniny i rybozy, czy tak jak u zwierząt, czyli ulega dezaminowaniu do inozyny? Ten zamiar zrealizowaliśmy dopiero po moim powrocie z USA, wczesną wiosną 1981 roku. Podczas dwutygodniowego pobytu w Halle wykazałem, że w ekstraktach z komórek eugleny, i to niezależnie czy hodowanych heterotroficznie czy fotoautotroficznie, występuje swoisty zestaw enzymów, a adenozyina będąca głównym przedmiotem naszych zainteresowań nie była przez te eks-

trakty w żaden sposób przekształcana [14].

15 grudnia 1981 roku, w trzecim dniu stanu wojennego (*sic!*), w Instytucie Biochemii i Biofizyki PAN w Warszawie odbyło się moje kolokwium habilitacyjne. (Ponoć zakaz posiedzeń spłynął do IBB z centrali PAN następnego dnia, w środę). W skład rozprawy habilitacyjnej weszło 6 publikacji o enzymach związanych z przemianami adenozyiny u roślin.

Przy okazji prac nad hydrolazą metylioadozyny poznałem literaturę dotyczącą zidentyfikowania u zwierząt i niektórych bakterii nowego szlaku prowadzącego od metylioadozyny do metioniny. Na szlaku tym reutilizacji podlega grupa metylioadozyna i cztery węgle rybozy budujących metylioadozynę a po jej enzymatycznej hydrolizie metylioadozynę. U wymienionych organizmów metylioadozyna jest degradowana fosforolitycznie, co prowadzi do adeniny i metylioadozyno-1-fosforanu. I z tego ostatniego związku, po dekarboksylacji i kilku przemianach, powstaje metionina. Istniała też praca informująca, że także u roślin odnajduje się w metioninie znakowane atomy węgla i siarki pochodzące z metylioadozyny. Wiedząc, że liczne przemiany małych cząsteczek zachodzą po ich ufosforylowaniu oraz, że po enzymatycznej hydrolizie metylioadozyny jaką katalizuje wspomniana hydrolaza u roślin wśród produktów pojawia się metylioadozyna, podejrzewałem, iż rośliny powinny mieć kinazę, która katalizuje ufosforylowanie tego metabolitu. Dysponując przywiezionymi ze Stanów preparatami metylioadozyny różnie wyznakowanymi radioaktywnym węglem, przeprowadziłem w Poznaniu doświadczenia, w których jednoznacznie wykazałem istnienie spodziewanej kinazy metylioadozyny w ekstraktach z różnych gatunków roślin. Enzym, kinazę metylioadozyny, z nasion łubinu żółtego znacznie podczyściłem i scharakteryzowałem [15].

Udało się w Polsce przeprowadzić jeszcze inne doświadczenia dotyczące reutilizacji grupy metylioadozyny i atomów węgla metylioadozyny. Skorzystałem z doświadczeń dr Andrzeja Paszewskiego, który w IBB PAN od

lat zajmował się przemianami siarki u grzybów. Dysponował on różnymi szczepami grzyba *Aspergillus nidulans* z mutacjami na znanych dotąd szlakach wiodących do metioniny. Grzybnia takich mutantów mogła wzrastać, gdy do pożywki dodano metioniny, ale jak wykazaliśmy, była w stanie także rozwijać się, gdy do pożywki dodaliśmy metylioadozynę. Przy okazji wykazaliśmy, że u badanego grzyba metylioadozyna jest degradowana fosforolitycznie [16].

W latach 1981-82 zająłem się innym roślinnym enzymem związanym z metabolizmem zasad i nukleozydów purynowych. Wykryłem w nasionach łubinu żółtego hydrolazę swoistą wobec inozyny [17]. W artykule tym umieściłem też uaktualniony schemat przemian zasad, nukleozydów i nukleozydów purynowych u roślin.

Harek w tych samych latach badał roślinne syntetazy aminoacylo-tRNA. Wykazał, że łubinowa syntetaza specyficzna wobec fenyloalaniny, w pewnych okolicznościach produkuje, tak jak syntetazy o tej specyficzności wyizolowane w innych laboratoriach z bakterii czy drożdży, takie nietypowe dinukleotydy jak diadenozynotrifosforan (ApppA) czy diadenozynotetrafosforan (AppppA). Zadałem wówczas pytanie: czy są w komórkach enzymy katalizujące przekształcanie tych związków? Dysponowaliśmy handlowymi preparatami obu dinukleozydów i szybko przekonaliśmy się, że w preparatach z nasion łubinu żółtego jest enzym, który w obecności jonów magnezowych (Mg^{2+}) katalizuje hydrolizę AppppA do ATP (pppA) i AMP (pA). Stosując klasyczne metody oczyszczania białek, w tym elektroforezę na żelu poliakrylamidowym w warunkach niedenaturujących, otrzymaliśmy homogeny preparat hydrolazy AppppA. Enzym ten katalizował też hydrolizę wyższych homologów, czyli ApppppA i AppppppA, a jednym z produktów tych reakcji był zawsze pppA. ApppA nie był substratem tej hydrolazy. Wkrótce wykazaliśmy, że za hydrolizę ApppA odpowiada inne białko. Przy jego oczyszczaniu trafiliśmy na aktywność enzymu, który katalizował hydrolizę ApppA i AppppA. Badając jego specyficzność substratową przekonaliśmy się, że

jest to fosfodiesteraza typu I. Dla tej hydrolazy substratami są związki, z których w wyniku reakcji uwalnia się 5'-NMP, a więc także NAD, FAD czy polinukleotydy. Tę fosfodiesterazę również udało się oczyścić do stanu elektroforetycznej jednorodności. Hydrolazę ApppA uda się do tego stanu oczyścić kilkanaście lat później; patrz niżej. Artykuł o trzech enzymach degradujących dinukleozydopolifosforany opublikowaliśmy w 1983 roku [18]. W 1984 roku artykuł został wyróżniony przez Polskie Towarzystwo Biochemiczne nagrodą Karola Parnasa. Ta praca rozpoczęła okres moich badań różnych aspektów biochemii nietypowych (di)nukleozydów, który właściwie trwa do dziś. W ciągu dwóch dekad doświadczenia na tym polu prowadziłem, poza Polską, w NRF, Francji, NRD, Wielkiej Brytanii, Hiszpanii, Danii, USA i Australii. Korzystałem przy tym ze związków, analogów dinukleozydopolifosforanów, wytworzonych przez chemików z Instytutu Biologii Molekularnej w Moskwie, Uniwersytetu w Sheffield, Centrum Badań Molekularnych i Makromolekularnych PAN w Łodzi i Katedry Biofizyki Uniwersytetu Warszawskiego.

Dzięki nawiązaniu przez Harka wiosną 1982 roku kontaktu z prof. Eggehardem Hollerem, który badał różne syntetazy aminoacylo-tRNA pod kątem zdolności do syntetyzowania dinukleozydopolifosforanów, od listopada 1982 do lutego 1983 roku przebywałem w jego pracowni na Uniwersytecie w Regensburgu. Stało się to możliwe dzięki krótkoterminowemu stypendium Europejskiej Organizacji Biologii Molekularnej (EMBO). Aplikując o nie podałem, że chcę sprawdzić czy w bakteriach jest enzym degradujący AppppA. Mój pobyt w pracowni prof. Hollera okazał się bardzo pomyślny, gdyż znalazłem w ekstraktach z komórek *Escherichia coli* enzym, który, w przeciwieństwie do asymetrycznie działającej hydrolazy znalezionej w łubinie, katalizuje symetryczną hydrolizę AppppA, wiodącą do dwóch cząsteczek ADP (ppA). Wykrycie tej reakcji stało się możliwe, gdy w mieszaninie reakcyjnej zastosowałem jon kobaltowy (Co^{2+}) [19].

Pamiętając o tym, że adenozyjna jest przekształcana w różny sposób przez organizmy należące do różnych grup systematycznych i widząc, że AppppA jest inaczej hydrolizowany u wyższych eukariota (roślin i zwierząt) niż u bakterii, postanowiłem sprawdzić, jak związek ten przekształcany jest u drożdży. Badania na ten temat prowadziłem w laboratorium kierowanym przez dr Sylvaina Blanqueta w Ecole Polytechnique w podparyskim Palaiseau. Także ta placówka od lat badała syntetazy aminoacylo-tRNA i warunki w jakich niektóre z nich tworzą dinukleozydopolifosforany. Miłym zaskoczeniem było, że w ekstraktach z drożdży *Saccharomyces cerevisiae* jest enzym, który katalizuje nie hydrolizę lecz fosforolizę AppppA, w wyniku czego produktami reakcji są ATP (pppA) i ADP (ppA). Stosując radioaktywny ortofosforan wykazałem, że grupa fosforanowa pojawia się wyłącznie w pozycji β w ADP. W ciągu 2 miesięcy od wykrycia tej nowej reakcji oczyściłem katalizującą ją białko. Przeprowadziłem badania charakteryzujące katalizowane reakcje, w tym zdolność do przeprowadzania wymiany między ortofosforanem ze środowiska, a fosforanem w pozycji β u różnych ppN [20,21].

Po półtorarocznym pobycie we Francji, w kwietniu 1985 roku wróciłem do Polski. Chciałem kontynuować w swej poznańskiej pracowni badania enzymów związanych z przemianami nietypowych nukleotydów. Fortunnie, podczas podróży z Poznania do Warszawy, bodaj latem 1985 roku, spotkałem w pociągu profesora Macieję Wiewiórowskiego. Interesował się tym co robiłem i co chciałem robić. Powiedział, że w Łodzi prof. Wojciech Stec tworzy zespół składający się z chemików i biochemików, którzy w ramach Centralnych Planów Badawczo-Rozwojowych sponsorowanych przez PAN mają zajmować się różnymi biologicznie ważnymi związkami fosforu. Moje zainteresowania spotkały się z przychylnością profesora Steca i dołączyłem do wspomnianego zespołu. Dzięki temu przez następne 5 lat dysponowałem pewną kwotą pieniędzy na badania w kraju i wyjazdy za granicę, aby badać różne aspekty biochemii nietypowych dinukleotydów. Wyniki tych badań

ukazały się w ośmiu publikacjach i stały się atutem przy staraniu się o granty przyznawane przez Komitet Badań Naukowych, który powstał w Polsce po przemianie ustrojowej.

Prace o enzymach katalizujących degradację AppppA skłoniły chemików z Instytutu Biologii Molekularnej Akademii Nauk ZSRR do wytworzenia różnych metylenowych analogów tego dinukleotydu i zaproponowania nam współpracy. Po powrocie z Francji podjąłem się przetestowania owych związków jako potencjalnych substratów i jako inhibitorów z czterema enzymami katalizującymi degradację AppppA: łubinową asymetrycznie działającą hydrolazą AppppA, łubinową fosfodiesterazą, symetrycznie działającą hydrolazą AppppA z *E. coli* i fosforylazą AppppA z drożdży. Cztery bardzo czyste analogi przekazał mi „okazją” dr Aleksander Biriukov. Wyniki tych testów ukazały się w 1987 roku [22].

Wiosną 1986 roku przyjechał do mego laboratorium dr Claus Wasternack z Uniwersytetu w Halle. Podtrzymując moje zainteresowania biochemią porównawczą postanowiliśmy sprawdzić jak ApppA i AppppA są degradowane przez ekstrakty z przywiezionych przez niego komórek *Euglena gracilis*. Okazało się, że u tego pierwotniaka jest, tak jak u drożdży degradacja fosforolityczna. O ile jednak enzym drożdżowy nie degraduje ApppA, enzym eugleny degraduje oba dinukleotydy. Fosforan ze środowiska pojawia się zawsze w ADP [23]. (Pierwszy raz współautorką publikacji została pani Elżbieta Starzyńska, która pomagała mi w pracach eksperymentalnych do 2005 roku). W następnym roku i w tym samym czasopiśmie opublikowałem z doktorem Wasternackiem kolejny artykuł, w którym zawarliśmy wyniki moich badań przeprowadzonych w jego laboratorium na temat lokalizacji fosforylasy ApppA/AppppA w subfrakcjach komórkowych eugleny [24].

We wrześniu 1986 roku prof. Stec zorganizował w Łodzi drugą konferencję na temat chemii fosforu ukierunkowanej na biologię. Zaprezentowałem wówczas w formie plakatu wyniki wspomnianych wyżej doświadczeń dotyczących oddzia-

ływania różnych enzymów z metylenowymi analogami AppppA. Na konferencji był prof. Michael Blackburn, chemik z Uniwersytetu w Sheffield. Przyznał, że we współpracy z biochemikiem z Liverpoolu, dr Aleksandrem McLennanem, prowadzi badania podobne do zaprezentowanych przeze mnie. Analogi AppppA syntetyzowane w jego laboratorium dr McLennan testuje na enzymie, hydrolazie AppppA z krewetki *Artemia salina*. Nawiązana wówczas z profesorem Blackburnem współpraca miała trwać przez niemal dwie dekady i zaowocowała dwunastoma wspólnymi publikacjami. Pierwszą był artykuł opisujący oddziaływanie analogów AppppA zsyntetyzowanych w Sheffield z posiadanymi przeze mnie enzymami degradującymi AppppA [25]. Potem, od wiosny 1989 roku, wielokrotnie jeździłem do Sheffield, aby prowadzić badania zarówno na hydrolazie AppppA jak i enzymach związanych z degradacją innych nietypowych (di)nukleotydów; ApppA i adenozyno 5'-tetrafosforanu (pppA). Najbardziej cenię sobie artykuł o regiospecyficzności hydrolitycznych degradacji ApppA, AppppA i niektórych analogów, katalizowanych przez trzy różne enzymy [26].

W międzyczasie, na początku 1987 roku byłem ponownie w Regensburgu na krótkoterminowym stypendium EMBO. Tym razem, w pracowni prof. Hollera badałem tworzenie AppppA z adenylosiarczanu i ATP, katalizowane przez drożdżową fosforylazę AppppA [27].

W Sheffield oczyściłem też do stanu jednorodnego hydrolazę AppppA z nasion łubinu wąskolistnego (*Lupinus angustifolius*). Nasiona przesłane zostały do Sheffield przez prof. Kenwynę Gaylera z Uniwersytetu w Melbourne, który zajmował się białkami łubinowymi. Został on zachęcony przez prof. Blackburna do zajęcia się hydrolazą AppppA z łubinu. Wykonane w Sheffield częściowe sekwencjonowanie oczyszczonej hydrolazy AppppA ułatwiło pracownicy prof. Gaylera, naszej rodaczce Danucie Maksel dotarcie do genu, a następnie wytworzenie zrekombinowanych białek hydrolazy. Były wśród nich białka zmutowane w rejonie podejrzanym o udział w katalizie. Zostałem

włączony w ten nurt badań i podczas dwóch krótkich pobytów w pracowni prof. Kenwyna Gaylera, w latach 1998-99 i 1999-2000, jako stypendysta Uniwersytetu w Melbourne, wykonałem różnorodne pomiary kinetyczne na wytworzonych białkach. Na podstawie tych badań Danuta Maksel została doktorem. Wyniki naszych doświadczeń ukazały się w dwóch artykułach opublikowanych w latach 1998 i 2001 [28,29].

W 1989 roku zauważyłem, że jon fluorkowy jest silnym i bardzo swoistym inhibitorem asymetrycznie działających hydrolaz AppppA. W mikromolarnych stężeniach hamuje on tylko te hydrolazy; niezależnie od tego z którego organizmu enzymy pochodzą. Krótki, ale często potem cytowany komunikat na ten temat ukazał się w 1990 roku [30].

Pod koniec lat 1980, wraz z moją pierwszą doktorantką Dorotą Łażewską badaliśmy jak różne enzymy degradujące AppppA traktują chiralne na fosforze, α tiofosforanowe analogi tego substratu. Sami wytworzyliśmy te analogi angażując syntetazę lizylo-tRNA, która należy do ligaz najsprawniej katalizujących syntezę diadenozynopolifosforanów. Pomocą przy identyfikacji produktów degradacji owych analogów służyli pani Łażewskiej wówczas doktorzy Piotr Guga i Andrzej Okruszek z Centrum Badań Molekularnych i Makromolekularnych PAN w Łodzi. Ważną informacją uzyskaną w toku tych badań było, że drożdżowa fosforylaza AppppA rozkłada (S_p)AppppAaS z taką samą szybkością z obu jego stron, a fakt, że w powstałym ppAaS zachowana jest konfiguracja (S_p) wskazuje, że fosforoliza substratu zachodzi poprzez produkt pośredni, w którym enzym wiąże w centrum aktywnym adenozylo 5'-tiofosforan [31]. Te wyniki i opracowanie oczyszczania hydrolazy AppppA z łożyska ludzkiego oraz charakterystyka tego enzymu weszły w skład pracy doktorskiej pani Doroty Łażewskiej. Obrona pracy odbyła się w 1993 roku. W tym samym roku w *Protein Expression and Purification* zostały opublikowane wyniki badania ludzkiej hydrolazy AppppA [32].

Osobny rozdział w historii moich badań zajmuje współpraca z Hiszpanami, Antonim Sillero i jego żoną Marią-Antonią Günther Sillero. Pierwszy pobyt w ich laboratorium na Wydziale Medycznym Autonomicznego Uniwersytetu w Madrycie trwał od października 1989 do końca stycznia 1990. Interesowało nas czy, prócz niektórych syntetaz aminoacylo-tRNA, inne ligazy aktywujące z udziałem ATP kwasy organiczne mogą produkować AppppA i/lub ApppA. Okazało się, że tak. Szczególnie aktywnie syntezę AppppA (ale nie ApppA) katalizowała lucyferaza ze świetlika *Photinus pyralis* [33,34].

Z owego pobytu w Madrycie przywozłem ciekawą obserwację, że enzym apyryaza, obecny w ekstraktach z liścieni siewek łubinu żółtego, wytrzymuje traktowanie 1 M roztworem kwasu nadchlorowego. Traktowanie ekstraktów tym kwasem wchodzi w zakres jednej z metod usuwania makrocząsteczek gdy celem jest badanie małych cząsteczek. W naszym przypadku chodziło o ewentualne oznaczenia w tych roślinnych ekstraktach stężeń (di)nukleotydów. Szczegółowe zbadanie tej nieoczekiwanej właściwości apyrazy przeprowadziłem w Poznaniu [35].

Innego nieoczekiwanego odkrycia dokonaliśmy z panią Elżbietą Starzyńską w 1993 roku. Inspiracją do przeprowadzenia kolejnych badań o charakterze biochemii porównawczej było prezentowane na Zjeździe Polskiego Towarzystwa Biochemicznego w Łodzi doniesienie zespołu prof. Moniki Jeżewskiej z IBB PAN o nietypowym dla zwierząt, bo fosforolitycznym, degradowaniu adenozyny do adeniny i rybozo-1-fosforanu przez ekstrakt ze ślimaka winniczka. Wiedząc już jak AppppA może być przekształcany w różnych grupach systematycznych sprawdziliśmy, czy i jak jest ten dinukleotyd degradowany przez ekstrakty z narządów ślimaka. Okazało się, że zachodząca bardzo szybko przemiana nie zachodzi w łańcuchu oligofosforanowym, ale polega na kolejnym deaminowaniu reszt adeninowych, co prowadzi do powstania z diadenozynotetrafosforanu diinozyno-tetrafosforanu (IppppI). W szczegółowych badaniach wyka-

zaliśmy, że mało swoista deaminaza występująca u winniczka może katalizować deaminację AMP i różnych jego pochodnych, w tym diadenozynooligofosforany, NAD, FAD, ADP czy ATP [36].

Zapoznając się z literaturą dotyczącą nietypowych nukleotydów trafiłem na artykuły o adenozylo-5'-tetrafosforanie (ppppA). Donoszono w nich o tym, że ten homolog ATP występuje w preparatach ATP, że jest silnym inhibitorem hydrolaz AppppA i, że u zwierząt jest swoistym enzymem, który katalizuje hydrolizowanie ppppA do ortofosforanu i pppA. Okazało się, że taki enzym występuje również w ekstraktach z nasion łubinu żółtego. We współpracy z Brytyjczykami z Uniwersytetu w Sheffield, oczyściliśmy ten enzym i scharakteryzowali [37].

Od października 1995 roku do końca sierpnia 1996 roku przebywałem jako stypendysta Fulbrighta na Uniwersytecie Teksańskim w San Antonio. (Z wdzięcznością zaznaczę tu, że moje starania o to stypendium poparli listami rekomendacyjnymi profesorowie Dawid Shugar i Andrzej Legocki). W laboratorium prof. Larryego Barnesa zajmowałem się głównie białkiem Fhit z komórek człowieka. Białko to jest kodowane przez gen, który ulega często mutacjom wywołującym pojawianie się w różnych rejonach przewodu pokarmowego guzów nowotworowych. Cechą charakterystyczną białka Fhit jest sekwencja triady histydynowej. Białka natywne i zmutowane w różnych pozycjach owej triady nadesłali badacze z Filadelfii, z laboratorium kierowanym przez panią prof. Kay Huebner. Zauważyli oni, że z racji sekwencji aminokwasowej Fhit najbardziej przypomina jedną z hydrolaz AppppA wykrytą w pracowni prof. Barnesa w drożdżach *Schistosaccharomyces pombe* i opisaną kilka miesięcy wcześniej. Badacze interesowało czy natywne białko Fhit katalizuje hydrolizę AppppA. Tuż po Nowym Roku 1996, tego samego dnia w którym białko Fhit nadeszło, wykazałem, że najsprawniej katalizuje ono hydrolizę ApppA. Mutacje w triadzie histydynowej upośledzały lub całkowicie uniemożliwiały katalizę. Jako, że białko Fhit podejrzewane było o bycie supresorem nowotworzenia,

praca jaką wysłaliśmy do *Biochemistry* była na tyle „gorąca”, że ukazała się w trybie przyspieszonym [38]. Spośród moich prac jest to najczęściej cytowana publikacja.

Równocześnie, podczas pobytu w San Antonio, wykazałem u drożdży *S. cerevisiae* aktywność hydrolazy ppppA. Prócz ppppA, substratami tej hydrolazy były tetrafosforan i trifosforan, ale już nie pirofosforan. Fortunnym zrzędzeniem losu, szukając literatury o ppppA, trafiłem na artykuły o polifosfatazach, które katalizują degradację długich łańcuchów polifosforanowych. Jedną z nich, egzopolifosfataza scPPX1, preferuje jako substraty polifosforany, ale shydrolizuje także tetra- i trifosforan, lecz nie ATP. Zatelefonowałem do prof. Artura Kornberga, w którego pracowni zajmującej się biochemią polifosforanów, oczyszczono tę polifosfatazę. Poinformowałem o tym czym się zajmuję i, że chciałbym porównać aktywności obu enzymów. Od jednego ze współpracowników profesora, dr Shenjiang Liu, otrzymałem do przetestowania preparat rekombinowanej egzopolifosfatazy. Okazało się, że enzym ten katalizuje usunięcie skrajnej reszty fosforanowej z ppppA i pod względem właściwości molekularnych i kinetycznych jest tożsamy z oczyszczonym przeze mnie do homogenności drożdżowym enzymem o aktywności hydrolazy ppppA. Uzupełniające doświadczenia przeprowadziłem już w Poznaniu i napisałem publikację o przebadanym enzymie [39].

Jeszcze przed wyjazdem do San Antonio, przy dużym zaangażowaniu pani Elżbiety Starzyńskiej, udało się oczyścić do stanu jednorodności białko łubinowej hydrolazy ApppA. Z wykrytych na początku lat 1980. w ekstraktach z nasion łubinu trzech enzymów związanych z metabolizmem diadenozynooligofosforanów tej hydrolazy nie udało się nam wcześniej doczyścić do homogenności. Kluczowym etapem w pomyślnej procedurze była chromatografia powinowactwa na jednej z agaroz produkcji „Sigmy” z unieruchomionym adenylanem. Wykorzystaliśmy przy tym kilka przesłanek. Otóż w omówionych wyżej pracach nad regiospecyficznością hydrolizowania ApppA i/lub ApppppA wykazaliśmy, że hy-

drolaza ApppA zawsze uwalniała z substratu adenylan (AMP, pA) i to ten produkt reakcji zawierał ciężki izotop tlenu, ^{18}O , pochodzący z wody H_2^{18}O . To, i niska wartość K_m dla ApppA (rzędu 10^{-6} M), sugerowało, że enzym wiąże z dużą specyficznością substrat od strony pA. Spośród kilku, różnie podstawionych żeli agarozo-AMP tylko na jednym dało się enzym skutecznie oczyścić. Dysponując homogenną hydrolazą ApppA scharakteryzowaliśmy szczegółowiej jej specyficzność substratową. Skupiliśmy się na analogach tzw. cap-u występującego na 5' końcu mRNA. Związki te wytworzone zostały przez chemików z zespołu dr Edwarda Darżynkiewicza w Katedrze Biofizyki Uniwersytetu Warszawskiego. Niektóre z tych analogów były sprawniej hydrolizowane niż cząsteczka ApppA, co sugeruje, że hydrolaza ApppA może usuwać pozostałości po mRNA. Praca opisująca oczyszczanie hydrolazy ApppA i wyniki hydrolizowania przez nią różnych substratów ukazała się w 1996 roku w *Protein Expression and Purification* [40]. Jak wykażą dalsze badania, łubinowa hydrolaza ApppA jest białkiem Fhit, a ono zdolne jest do katalizowania wielu innych przemian; o czym niżej.

Przez dwie dekady, począwszy od wczesnych lat 1990., testowałem różne analogi nukleotydów jako potencjalne substraty i/lub inhibitory enzymów degradujących ApppA i/lub ApppppA czy ppppA. Współpracowałem przy tym z pracownikami Michaela Blackburna w Sheffield, UK; Justa Justesena w Århus, Dania; Antonia Sillero w Madrycie oraz z chemikami: Janiną Baraniak z zespołu prof. Wojciecha Steca z Łodzi oraz Elżbietą Bojarską, Januszem Stępińskim, Joanną Kowalską i Jackiem Jemielitym z zespołu dr Edwarda Darżynkiewicza z Warszawy [40-42]. W jednej z prac dotyczącej analogów brała też udział Mariola Galbas [43], a w innej Małgorzata Pietrowska-Borek; obie z AR w Poznaniu [42].

Od 1987 roku wiadomo było, że w organizmach, zwłaszcza pod wpływem stresu, gromadzą się różne dinukleozydo- tri- i tetrafosforany; w tym wyłącznie pirymidynowe, takie jak CppppC czy UppppU. Nie wiadomo było jednak jakie enzymy mogłyby ka-

talizować pojawianie się takich związków. Korzystając z handlowo dostępnego preparatu urydylylotransferazy UTP-glukozy-1-fosforan wykazałem, że enzym ten może katalizować przeniesienie reszty urydylylowej z UPD-glukozy na tri- lub tetrapolifosforan oraz na UTP czy różne ppppN, dzięki czemu mogą powstawać ppppU, pppppU oraz różne UppppN, np. ApppppU, UppppU i GpppppU. W pracy na ten temat [44] po raz pierwszy pokazaliśmy, że transferaza związana z metabolizmem nukleotydów pirymidynowych może odpowiadać za pojawianie się w komórkach dinukleozydopolifosforanów zawierających w swej strukturze wyłącznie nukleozydy pirymidynowe.

W dekadzie 2001-2010 powstały dwie prace, za powstanie których wdzięczny jestem prof. Clausowi Wasternackowi z Halle. Obie miały na celu pokazanie czy niektóre ligazy są zdolne do katalizowania syntezy nietypowych mon- i/lub dinukleotydów. Pierwsza powstała po zachęceniu mnie przez Clausa do współpracy z dr Erikiem Kombrinkiem, który w Instytucie Maxa Plancka pod Kolognią badał metabolizm kwasów cynamonowych u roślin. Uzyskaliśmy od niego zrekombinowaną ligazę kumarylo-koenzymu A. W ramach swej pracy doktorskiej, pani Małgorzata Pietrowska-Borek scharakteryzowała warunki w których enzym ten może syntetyzować ApppppA, ppppA i pppppA [45]. Druga praca, już ze współautorstwem Clausa Wasternacka, powstała na temat specyficzności substratowej i produktów ubocznych reakcji katalizowanych przez syntetazę jasmonian-aminokwas. Wśród owych produktów był ppppA. Eksperymenty związane z tą pracą przeprowadziłem podczas miesięcznego pobytu w Instytucie Biochemii Roślin w Halle latem 2006 roku [46].

W listopadzie 1998 roku pracę badawczą w moim laboratorium podjął pan Maciej Szuwart, słuchacz Zaocznego Studium Doktoranckiego przy Wydziale Rolniczym AR w Poznaniu. Zaproponowałem mu powrót do moich zainteresowań metabolizmem nukleotydów purynowych u roślin. Po negatywnych wynikach uzyskanych w trakcie realizacji dwóch innych tematów postanowiliśmy sprawdzić

czy w ekstraktach z nasion łubinu żółtego jest aktywność hydrolazy guanozynowej. Okazało się, że jest taka aktywność. Pan Szuwart oczyścił do stanu jednorodnego białko hydrolazy, która prócz guanozyny z porównywalną sprawnością degraduje hydrolitycznie także inozynę. Do tego zauważyliśmy, że aktywność ta jest stymulowana jonami wapnia Ca^{2+} . Wyniki te stały się podstawą pracy doktorskiej obronionej w 2006 roku, a publikacja poświęcona hydrolazie guanozynowo-inozynowej ukazała się w tym samym roku w *Phytochemistry* [47].

W pierwszej dekadzie XXI. wieku ponownie współpracowałem z Harkiem. W ślad za jego pracami nad tiolaktonem homocysteiny i odkryciem w surowicy krwi człowieka enzymu, który rozkłada ten związek do homocysteiny, sprawdziłem najpierw czy tak działający enzym występuje u roślin, a potem czy jest w komórkach zwierząt (człowieka) i drożdży. Pracując w Poznaniu wykryłem hydrolazę tiolaktonu homocysteiny w ekstraktach z nasion łubinu żółtego i znacznie podczyściłem ten enzym. Podczas dwumiesięcznego pobytu w pracowni Harka na Uniwersytecie Medycznym i Dentystycznym w Newark, w stanie New Jersey w USA, wykazaliśmy, że roślinna syntetaza metionilo-tRNA jest, tak jak metioninowe syntetazy z innych organizmów, zdolna jest do wytworzenia tiolaktonu homocysteiny oraz, że w pewnych okolicznościach (przy wymuszonej antybiotykami aminopteryną blokadzie szlaku remetylacji homocysteiny do metioniny) związek ten nagromadza się w tkankach roślinnych [48].

Nieco później wykryłem aktywność hydrolazy tiolaktonu homocysteiny w ekstraktach z łożyska ludzkiego i z drożdży. Enzym z łożyska doczyścił do stanu jednorodnego kolejny mój doktorant, Jarosław Zimny, a z ekstraktów drożdżowych, Marta Sikora, doktorantka Harka. Analiza jednorodnych białek po poddaniu ich spektrometrii mas wykazała, że aktywność każdej z hydrolaz tiolaktonu homocysteiny jest nieodłączną właściwością białka znanego dotąd jako hydrolaza bleomycyny. Jarosław Zimny w

pracowni Harka w Newark przeprowadzał uzupełniające doświadczenia, badając różne drożdżowe mutanty i charakteryzując omawiany enzym. Na tej podstawie obronił w 2006 roku pracę doktorską. Harek był kopromotorem tej pracy. Wyniki zebrane przez oboje doktorantów znalazły się w obszernej publikacji, która ukazała się w 2006 roku [49]. Rozprawa pana Zimnego została nagrodzona przez premiera Donalda Tuska, a wręczenie stosownego dyplomu odbyło się w Warszawie w Urzędzie Rady Ministrów w lutym 2007 roku.

Ostatnie osiem lat to okres, w którym moje prace doświadczalne skupiały się przede wszystkim na białkach z rodziny HIT, czyli posiadających aminokwasową sekwencję triady histydynowej. Przesłanką do zajęcia się tymi białkami były prace amerykańskich badaczy kierowanych przez prof. Perry Fraya nad mechanizmem reakcji katalizowanych przez hydrolazę ApppA, a więc białko Fhit. Wykazali oni, że podczas katalizowanej reakcji tworzy się w centrum aktywnym enzymu kompleks pośredni enzymu z resztą adenylanową, a zaangażowana jest przy tym reszta histydynowa. Jeden z jej atomów azotu tworzy w tym przejściowym kompleksie wiązanie amidofosforanowe (N-P), które jest następnie rozbijane przez cząsteczkę wody. Idąc tym tropem wykazałem, że niewielki nukleotyd, fosforamid adenozyiny (NH_2 -pA) jest bardzo dobrym substratem białek Fhit; niezależnie od ich biologicznego pochodzenia. Innymi dobrymi substratami, z których białka Fhit katalizowały uwalnianie adenylanu (AMP) były: inny naturalny metabolit adenilylosiarczan (SO_4 -pA) oraz syntetyczna pochodna adenylanu, adenilylofluorek (F-pA) [50]. Kontynuując tę tematykę, zainteresowaliśmy się specyficznością substratową wykazywaną przez inne białka z rodziny HIT. Jednym z wniosków jakie wysnuiliśmy po doświadczeniach przeprowadzonych na kilku takich białkach jest, że aktywność fosforamidazy nukleozydowej wykazują poza białkami Fhit inne białka HIT [51]. Różne rekombinowane białka z rodziny HIT wytworzył dla potrzeb tej i kolejnych prac dr Paweł Bieganowski z Centrum Medycyny Doświadczalnej i Klinicznej PAN w Warszawie.

U rośliny, łubinu żółtego, poza hydrolazą ApppA, aktywność fosforamidazy nukleozydowej wykazało inne białko. Oczyściliśmy je do stanu homogenności i scharakteryzowaliśmy. Nie katalizowało ono hydrolizy ApppA [52]. Opracowana procedura oczyszczenia tego enzymu okazała się bardzo prosta. Wykorzystaliśmy w niej frakcjonowane wytrącanie białka acetonem, dużą termostabilność enzymu i chromatografię powinowactwa na jednej z AMP-agaroz, z której zaadsorbowany enzym daje się wymywać substratem, czyli NH_2 -pA. Analiza białka po zastosowaniu spektrometrii mas wykazała, że to łubinowe białko jest najbardziej podobne do białka Hint1 z *A. thaliana*. Dwa lata później opublikowaliśmy artykuł o oczyszczeniu do stanu homogenności i scharakteryzowaniu białka Hint2 z wątroby owcy, które jest białkiem mitochondrialnym [53]. Doświadczenia dotyczące Hint2 prowadziliśmy już w Biocentrum, do którego przenieśliśmy się definitywnie w maju 2012 roku. Z pomieszczenia 2.09 zajmowanego w segmencie A mam widok na działki, budynki hoteli i szpitali (Fot. 5). Pewne białka HIT ujawniły nieoczekiwanie dwojaką aktywność polegającą na tym, że katalizowały rozkład SO_4 -pA albo hydrolitycznie, co prowadziło do pojawiania się wśród produktów reakcji AMP, albo fosforolitycznie, w wyniku czego wśród produktów pojawiał się ADP [54].



Fot. 5. Widoki z okna pomieszczenia 2.09 segmentu A Biocentrum.

W tym samym okresie, w latach 2006-2010, pracę doktorską wykonywała pod moją opieką pani Ewa Włodzik; po wyjściu za mąż przyjęła nazwisko Bretes. Przedmiotem jej zainteresowania była badana przeze mnie we wczesnych latach 1980. hydrolaza metyltioadenozyny. Po wyizolowa-

niu białka tego enzymu z nasion łubinu żółtego, zidentyfikowała gen kodujący tę hydrolazę i scharakteryzowała reszty aminokwasowe, które biorą udział w katalizowaniu reakcji. Wśród zebranych danych były też takie, które, wraz z danymi literaturowymi, pozwoliły zasugerować, że istnieje powiązanie między regulowaniem ekspresji wspomnianego genu a metabolizowaniem jonu siarczanowego. Wszystkie zebrane informacje weszły w skład pracy doktorskiej obronionej w 2010 roku oraz artykułu opublikowanego rok później [55].

Nowy obszar badań rozpoczęła pani dr Małgorzata Pietrowska-Borek. Odkryła mianowicie, że już w mikromolarnych stężeniach, ApppA i AppppA podane do pożywki, na której wzrastały 7-dniowe siewki *A. thaliana*, szybko indukują wzmózoną ekspresję genów kodujących enzymy kluczowe dla syntezy związków fenylpropanoidowych. A związki te pojawiają się w dużych ilościach w tkankach roślinnych narażonych na stres. W kolejnych pracach z tej serii pani Pietrowska-Borek wykazała w innej roślinie, winorośli, że analogicznie zachowuje się ApppA, i że funkcję cząsteczki sygnałowej może spełniać także inny nietypowy nukleotyd, fosforamid adenozyne, $\text{NH}_2\text{-pA}$. Prace te pokazały, że wymienione związki zachowują się jak *alarmony*; co postulowano jeszcze w latach 1980. nie podając jednak danych eksperymentalnych, które potwierdzałyby proponowaną funkcję tych nukleotydów. Opisane tu odkrycia ukazały się w latach 2011-2015 [56-68].

Dwie z ostatnich moich prac, które ukazały się w 2015 roku, opisują kolejne nieznanne i niespodziewane właściwości białek Fhit. W jednej opisałem ich zdolność do katalizowania fluorolizy pewnych pochodnych nukleotydowych. W obecności wysokich stężeń jonu fluorokowego Fhit katalizuje wyparcie grupy siarczanowej z nukleozido-fosfosiarczanu ($\text{SO}_4\text{-pN}$) lub grupy aminowej z nukleozido-fosforanoamidu ($\text{NH}_2\text{-pN}$) przez jon fluorokowy, w wyniku czego powstaje dany nukleozido-fosforanofluorek (F-pN). Wśród innych białek z rodziny HIT zdolność do katalizowania fluorolizy wykazały też Hint1 i Hint2. Była ona jednak dużo słabsza niż wykazana

przez białka Fhit [59]. Fosforanoamidy różnych nukleozydów wykorzystane w tej pracy były wytworzone przez dr Joannę Romanowską, przy konsultacji z profesorami Adamem Kraszewskim i Jackiem Stawińskim z Instytutu Chemii Bioorganicznej PAN w Poznaniu.

W drugiej pracy wykazaliśmy, że aktywność przypisywana dotąd odrębnej transferazie, mianowicie adenylylotransferazie adenylylosiarczan-amoniak, odpowiedzialnej za ewentualne pojawianie się w komórkach $\text{NH}_2\text{-pA}$, jest właściwością Fhit. Do tego wniosku doszliśmy po tym, gdy pani Anna Wojdyła-Mamoń wykryła aktywność owej transferazy w ekstraktach z nasion łubinu żółtego, uzyskała białko enzymu w stanie jednorodnym i przekazaniu go do analizy w spektrometrze mas. Z porównania z innymi białkami, informacje z bazy danych o sekwencjach aminokwasowych wskazały na silne podobieństwo naszego białka do białka roślinnej hydrolazy dinukleozidotrifosforanów, a zatem do białka Fhit. Mając do dyspozycji preparaty rekombinowanych białek Fhit z innych źródeł wykazaliśmy, że każde z nich wykazuje wspomnianą wyżej aktywność adenylylotransferazy [60].

Wśród prac, których jestem współautorem, są trzy łączące moje zainteresowania nietypowymi nukleotydami z wywoływanymi przez nie efektami fizjologicznymi w tkankach zwierzęcych. Grupę niemiecką kierowaną przez dr Markusa van der Gieta, która wykazała istnienie ppppA wśród związków wytwarzanych przez komórki śródbłonna, zachęciłem do zbadania efektów wywieranych przez ppppA i jego metylenowe analogi. W swych doświadczeniach wykonanych na tkankach szczura badacze niemieccy wykazali, że ppppA jest silnym związkiem obkurczającym naczynia krwionośne, działającym przez puryno receptor P2X1 [61].

Dwie inne prace powstały w zespole prof. dr hab. Jerzego Bełtowskiego na Uniwersytecie Medycznym w Lublinie. Profesor Bełtowski interesował się efektami jakie w organizmach zwierzęcych i ludzkich wywołuje siarkowodor. Od kilku lat wiadomo bowiem, że związek ten w małych

stężeniach korzystnie działa na różne procesy życiowe. Gdy w swych pracach nad specyficznością substratową różnych białek HIT wykazałem, że Hint1 może uwalniać siarkowodor z tiofosforanów adenozyne lub guanozyne (S-pA lub S-pG) [51-53], zasugerowałem Bełtowskiemu, aby sprawdził, czy związki te podane organizmom nie będą efektywnymi donorami H_2S . W doświadczeniach jakie przeprowadził jego zespół pokazano, że tak się w istocie dzieje. Najważniejszą obserwacją było, że izolowane kłębuszki nerkowe reagowały na podane tiofosforany nukleozydów wzmózoną filtracją. Zasugerowaliśmy, że badane tionukleotydy mogą być stosowane jako leki zdolne uwalniać H_2S bez wywoływania efektów ubocznych, tak jak to się dzieje przy zastosowaniu syntetycznych dawców siarkowodoru, gdyż po uwolnieniu siarkowodoru powstają z nich typowe nukleotydy, mogące wejść w naturalne szlaki przemian [62]. W innym układzie doświadczalnym, zespół prof. Bełtowskiego wykazał, że każdy z obu tiofosforanów nukleozydów może być dawcą siarkowodoru dzięki aktywności enzymatycznej w komórkach tłuszczowych otaczających naczynia krwionośne, wywołując obniżenie ciśnienia krwi. Szczegóły tych ostatnich doświadczeń i ich wyniki opublikowaliśmy w 2015 roku [63].

Jako że jestem nauczycielem akademickim, wspomnę także krótko o swej działalności dydaktycznej. Poza opieką sprawowaną w minionych latach nad pięciorgiem doktorantów i kilkorgiem magistrantów, prowadziłem wykłady i ćwiczenia z enzymologii dla studentów drugiego roku na kierunku biotechnologia. Opracowałem autorski program tego przedmiotu. Różne zagadnienia przekazywane na wykładach, takie jak metody izolowania enzymów, charakteryzowanie ich od strony molekularnej, wyznaczanie parametrów kinetycznych czy testowanie inhibitorów reakcji enzymatycznych, zilustrowałem licznymi przykładami z własnych prac. Nadto, program ćwiczeń bazuje na moich oryginalnych pracach eksperymentalnych. Pozwala to ekonomicznie wykorzystać posiadany sprzęt, odczynniki i preparaty enzymatyczne. Podczas trwającego jeden semestr kursu studenci poznają sposoby rozbijania

materiału biologicznego; w tym bakterii (dezintegracja ultradźwiękami) i drożdży (nebulizacja), a spośród metod oczyszczania białek enzymatycznych poznają w praktyce frakcjonowane wysalanie siarczanem amonowym, sączenie molekularne i chromatografię jonowymienną. Mają też okazję zapoznać się z różnym metabolizowaniem niektórych związków przez organizmy należące do różnych grup systematycznych. Konkretnie, po kilku krokach oczyszczania enzymu z bakterii *Escherichia coli* lub drożdży *Saccharomyces cerevisiae*, identyfikują we frakcjach wymywanych z kolumny wypełnionej żelom Sephadex G-100, odpowiednio, symetrycznie działającą hydrolazę AppppA [19] lub fosforylazę AppppA [20]. Poznają różne sposoby mierzenia aktywności enzymatycznej z wykorzystaniem kolorymetrii. W jednym z ćwiczeń, dysponując skomputeryzowanym spektrofotometrem, (zakupionym na początku lat 1990. z mego pierwszego grantu finansowanego przez Komitet Badań Naukowych) śledzą zmianę absorpcji, jaka zachodzi dzięki efektowi hiperchromowemu towarzyszącemu rozpadowi AppppA na mononukleotydy adeninowe, który katalizowany jest przez jeden z badanych enzymów. Przy okazji wyznaczają zależność aktywności enzymatycznej od stężenia jonu magnezowego Mg^{2+} . W innym ćwiczeniu, korzystając z różnicy w widmach substratu (adenozyny lub AMP) i produktu (inozyny lub IMP), monitorują postęp reakcji deaminacji katalizowanej przez deaminazę adenozykową lub adenylanową, a przy okazji wyznaczają wartości K_m dla tych substratów. W opracowaniu tego ćwiczenia korzystałem z publikacji o deaminazie adenylanowej ze ślimaka winniczka [36]. Wreszcie, mierząc zanik absorpcji jaki zachodzi gdy tiolakton homocysteiny jest rozkładany przez hydrolazę bleomycyny do homocysteiny [49] mogą wyznaczyć parametry kinetyczne dla tego enzymu. W tym ćwiczeniu studenci zapoznają się również z alternatywnymi sposobami oznaczania aktywności enzymatycznej; w tym przypadku przy zastosowaniu odczynnika dającego barwną reakcję w miarę pojawiania się w mieszaninie reakcyjnej homocysteiny, produktu z wolną grupą sulfhydrylową.

W jednym z ćwiczeń wykorzystalem obserwacje poczynione podczas badania zmian aktywności hydrolazy adenozykowej w liścieniach nasion łubinu żółtego podczas kiełkowania [10]. W ekstraktach z liścieni zebranych w kilku kolejnych dniach kiełkowania oznaczana jest aktywność adenozyminy. Zdolność przekształcania adenozyminy do adeniny i rybozy jest obserwowana na chromatogramach cienkowarstwowych. Różnica w wartościach R_f między adenozyną a adeniną, na płytkach pokrytych celulozą i rozwijanych w wodzie, jest na tyle duża, że pod lampą emitującą krótki ultrafiolet wyraźnie widać, gdzie substrat przekształcił się w produkt i, jeśli próbki mieszanin reakcyjnych pobierano w odstępach czasu, z jaką intensywnością. W tym ćwiczeniu studenci mają możliwość przekonać się, że aktywności niektórych enzymów zależą od stadium ontogenetycznego danego organizmu. W przypadku hydrolazy adenozykowej jest tak, że aktywność ta nie występuje w suchych nasionach i pojawia się w liścieniach dopiero po trzecim dniu kiełkowania, osiągając największą intensywność w dniach piątym czy szóstym.

W krótkich pokazowych eksperymentach studenci poznają efekty wytrącania białka różnymi odczynnikami. Sprawdzają zarazem czy strącenie jest odwracalne (w przypadku siarczanu amonowego czy acetonu), czy nie jest (w przypadku silnych kwasów, trichlorooctowego czy nadchlorowego). Prowadzący ćwiczenie omawiają przy okazji przydatność każdego z testowanych odczynników w procedurach biochemicznych stosowanych przy oczyszczaniu białek lub oznaczaniu ich aktywności; np. podczas biosyntezy białka czy kwasów nukleinowych, gdy stosuje się radioaktywne substraty; odpowiednio: aminokwasy czy trifosforany nukleozydów.

Przez lata, w przygotowywaniu i prowadzeniu ćwiczeń pomagali mi panie: Elżbieta Starzyńska, Anna Maria Wojdyła, Małgorzata Pietrowska-Borek, a ostatnio Olga Utyro oraz Jarosław Zimny. Studenci chwalą te ćwiczenia za to, że są ciekawe i, że „wychodzą”. A my, osoby przygotowujące je, pilnujemy, żeby tak było...

Opisane pokrótce prace i okoliczności w jakich powstały nie objęły wszystkich, w sumie dziewięćdziesięciu moich recenzowanych publikacji. Nie wspomniałem tu o artykułach przeglądowych i paru pracach opisujących wyniki testowania przeróżnych analogów nietypowych mono- i dinukleotydów jako potencjalnych substratów i/lub inhibitorów badanych enzymów. Udział cudzoziemców w powstawaniu wielu moich prac mam zamiar opisać szczegółowo w oddzielnym artykule wspomnieniowym.

Poznań, grudzień 2016 r.

PIŚMIENNICTWO

1. Schneider Z, Guranowski A (1975) Determination of labeled adenine by means of adsorption on cellulose nitrate filters; a sensitive method for estimation of nucleosidase activity. *Analyt Biochem* 68: 493-504
2. Guranowski A, Schneider Z (1977) Purification and characterization of adenosine nucleosidase from barley leaves. *Biochim Biophys Acta* 482: 145-158
3. Guranowski A, Pawelkiewicz J (1977) Adenosylhomocysteinase from yellow lupin seeds; purification and properties. *Eur J Biochem* 80: 517-523
4. Guranowski A, Montgomery JA, Cantoni GL, Chiang PK (1981) Adenosine analogs as substrates and inhibitors of S-adenosylhomocysteine hydrolase. *Biochemistry* 20: 110-115
5. Guranowski AB, Chiang PK, Cantoni GL (1981) 5'-Methylthioadenosine nucleosidase; purification and characterization of the enzyme from *Lupinus luteus* seeds. *Eur J Biochem* 114: 293-299
6. Guranowski AB, Chiang PK, Cantoni GL (1983) 5'-Methylthioadenosine nucleosidase (*Lupinus luteus* seeds). *Meth Enzymol* 94: 365-369
7. Guranowski A, Barankiewicz J (1979) Purine salvage in cotyledons of germinating lupin seeds. *FEBS Lett* 104: 220-226
8. Guranowski A (1979) Plant adenosine kinase; purification and some properties of the enzyme from *Lupinus luteus* seeds. *Arch Biochem Biophys* 196: 220-226
9. Guranowski A (1979) Nucleoside phosphotransferase from yellow lupin seedling cotyledons. *Biochim Biophys Acta* 569: 13-22
10. Guranowski A, Pawelkiewicz J (1978) Adenosylhomocysteinase and adenosine nucleosidase activities in *Lupinus luteus* cotyledons during seed formation and germination. *Planta* 139: 245-247
11. Jakubowski H, Guranowski A (1978) Adenosylhomocysteinase:adenosine complex. *Biochim Biophys Res Commun* 84: 1060-1068

12. Jakubowski H, Guranowski A (1981) S-Adenosylhomocysteinase from yellow lupin seeds; stoichiometry and reactions of the enzyme:adenosine complex. *Biochemistry* 20: 6877-6881
13. Guranowski A, Jakubowski H (1987) Adenosylhomocysteinase from yellow lupine. *Meth Enzymol* 143: 430-434
14. Guranowski A, Wasternack C (1982) Adenine and adenosine metabolizing enzymes in cell-free extracts from *Euglena gracilis*. *Comp Biochem Physiol* 71 B: 483-488
15. Guranowski A (1983) Plant 5-methylthioribose kinase; properties of the partially purified enzyme from yellow lupin (*Lupinus luteus* L.) seeds. *Plant Physiol* 71: 932-935
16. Guranowski A, Paszewski A (1982) Metabolism of 5'-methylthioadenosine in *Aspergillus nidulans*; an alternative pathway for methionine synthesis via utilization of the nucleoside methylthio group. *Biochim Biophys Acta* 717: 289-294
17. Guranowski A (1982) Purine catabolism in plants; purification and some properties of inosine nucleosidase from yellow lupin (*Lupinus luteus* L.) seeds. *Plant Physiol* 70: 344-349
18. Jakubowski H, Guranowski A (1983) Enzymes hydrolyzing ApppA and/or AppppA in higher plants; purification and some properties of diadenosine triphosphatase, diadenosine tetraphosphatase, and phosphodiesterase from yellow lupin (*Lupinus luteus*) seeds. *J Biol Chem* 258: 9982-9989
19. Guranowski A, Jakubowski H, Holler E (1983) Catabolism of diadenosine 5',5'''-P¹,P⁴-tetraphosphate in procaryotes; purification and properties of diadenosine 5',5'''-P¹,P⁴-tetraphosphate (*symmetrical*) pyrophosphohydrolase from *Escherichia coli* K12. *J Biol Chem* 258: 14784-14789
20. Guranowski A, Blanquet S (1985) Phospholytic cleavage of diadenosine 5',5'''-P¹,P⁴-tetraphosphate; properties of homogeneous diadenosine 5',5'''-P¹,P⁴-tetraphosphate α,β -phosphorylase from *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biol Chem* 260: 3542-3547
21. Guranowski A, Blanquet S (1986) Diadenosine 5',5'''-P¹,P⁴-tetraphosphate α,β -phosphorylase from yeast supports nucleoside diphosphate-phosphate exchange. *J Biol Chem* 261: 5943-5946
22. Guranowski A, Biryukov A, Tarussova NB, Khomutov RM, Jakubowski H (1987) Phosphonate analogues of diadenosine 5',5'''-P¹,P⁴-tetraphosphate as substrates or inhibitors of procaryotic and eucaryotic enzymes degrading dinucleoside tetraphosphates. *Biochemistry* 26: 3425-3429
23. Guranowski A, Starzyńska E, Wasternack C (1988) Specific phosphorylase from *Euglena gracilis* splits diadenosine 5',5'''-P¹,P⁴-tetraphosphate (Ap₄A) and diadenosine 5',5'''-P¹,P³-triphosphate (Ap₃A). *Int J Biochem* 20: 449-455
24. Wasternack C, Hess S, Löffler A, Guranowski A (1989) Intracellular localization of dinucleosideoligophosphate phosphorylase from *Euglena gracilis*. *Int J Biochem* 21: 1089-1095
25. Guranowski A, Starzyńska E, Taylor GE, Blackburn GM (1989) Studies on some specific Ap₄A-degrading enzymes with the use of various methylene analogues of P¹,P⁴-bis(5',5'''-adenosyl) tetraphosphate. *Biochem J* 262: 241-244
26. Guranowski A, Brown P, Ashton PA, Blackburn GM (1994) Regiospecificity of the hydrolysis of diadenosine polyphosphates catalyzed by three specific pyrophosphohydrolases. *Biochemistry* 33: 235-240
27. Guranowski A, Just G, Holler E, Jakubowski H (1988) Synthesis of diadenosine 5',5'''-P¹,P⁴-tetraphosphate (AppppA) from adenosine 5'-phosphosulfate and adenosine 5'-triphosphate catalyzed by yeast AppppA phosphorylase. *Biochemistry* 27: 2959-2964
28. Maksel D, Guranowski A, Ilgoutz SC, Moir A, Blackburn GM, Gayler KR (1998) Cloning and expression of diadenosine 5',5'''-P¹,P⁴-tetraphosphate hydrolase from *Lupinus angustifolius* L. *Biochem J* 329: 313-319
29. Maksel D, Gooley PR, Swarbrick JD, Guranowski A, Gange Ch, Blackburn GM, Gayler K (2001) Characterization of active residues in diadenosine tetraphosphate hydrolase from *Lupinus angustifolius*. *Biochem J* 357: 399-405
30. Guranowski A (1990) Fluoride is a strong and specific inhibitor of (*asymmetrical*) Ap₄A hydrolases. *FEBS Lett* 262: 205-208
31. Lazewska D, Guranowski A (1990) P³-Chiral phosphorothioate analogues of bis(5'-adenosyl)tetraphosphate (Ap₄A); their enzymatic synthesis and degradation. *Nucleic Acids Res* 18: 6083-6088
32. Lazewska D, Starzyńska E, Guranowski A (1993) Human placental (*asymmetrical*) diadenosine 5',5'''-P¹,P⁴-tetraphosphate hydrolase: purification to homogeneity and some properties. *Protein Expression Purif* 4: 45-51
33. Guranowski A, Günther Sillero MA, Sillero A (1990) Firefly luciferase synthesizes P¹,P⁴-bis(5'-adenosyl)tetraphosphate (Ap₄A) and other dinucleoside polyphosphates. *FEBS Lett* 271: 215-218
34. Günther Sillero MA, Guranowski A, Sillero A (1991) Synthesis of dinucleoside polyphosphates catalyzed by firefly luciferase. *Eur J Biochem* 202: 507-513
35. Guranowski A, Starzyńska E, Rataj-Guranowska M, Günther Sillero MA (1991) Purification of apyrase from yellow lupin cotyledons after extraction with perchloric acid. *Protein Expres Purif* 2: 235-239
36. Guranowski A, Starzyńska E, Günther Sillero MA, Sillero A (1995) Conversion of adenosine(5')oligophospho(5')adenosines into inosine(5')oligophospho(5')inosines by non-specific adenylate deaminase from the snail *Helix pomatia*. *Biochim Biophys Acta* 1243: 78-84.
37. Guranowski A, Starzyńska E, Brown P, Blackburn GM (1997) Adenosine 5'-tetraphosphate phosphohydrolase from yellow lupin seeds; purification to homogeneity and some properties. *Biochem J* 328: 257-262
38. Barnes LD, Garrison PN, Siphrahvili Z, Guranowski A, Robinson AK, Ingram SW, Croce CM, Ohta M, Huebner K (1996) Fhit, a putative tumor suppressor in humans, is a dinucleoside 5',5'''-P¹,P³-triphosphate hydrolase. *Biochemistry* 35: 11529-11535
39. Guranowski A, Starzyńska E, Barnes LD, Robinson AK, Liu S (1998) Adenosine 5'-tetraphosphate phosphohydrolase activity is an inherent property of soluble exopolyphosphatase from yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochim Biophys Acta* 1380: 232-238
40. Guranowski A, Starzyńska E, Bojarska E, Stępiński J, Darzynkiewicz E (1996) Dinucleoside 5',5'''-P¹,P³-triphosphate hydrolase from yellow lupin (*Lupinus luteus*) seeds: purification to homogeneity and hydrolysis of mRNA 5'-cap analogs. *Protein Expres Purif* 8: 416-422
41. Guranowski A, Starzyńska E, McLennan AG, Baraniak J, Stec WJ (2003) Adenosine-5'-O-phosphorylated and adenosine-5'-O-phosphorothioylated polyols as strong inhibitors of *symmetrical* and *asymmetrical* dinucleoside tetraphosphatases. *Biochem J* 373: 635-640
42. Guranowski A, Starzyńska E, Pietrowska-Borek M, Jemielity J, Kowalska J, Darzynkiewicz E, Thompson MJ, Blackburn GM (2006) Methylene analogues of adenosine 5'-tetraphosphate: their chemical synthesis and recognition by human and plant mononucleoside tetraphosphatases and dinucleoside tetraphosphatases. *FEBS J* 273: 829-838
43. Guranowski A, Galbas M, Hartmann R, Justesen J (2000) Selective degradation of 2'-adenylated diadenosine tri- and tetraphosphates, Ap₃A and Ap₄A, by two specific human dinucleoside polyphosphate hydrolases. *Arch. Biochem Biophys* 373: 218-224
44. Guranowski A, deDiego A, Sillero A, Günther Sillero MA (2004) Uridine 5'-polyphosphates (p₅U and p₄U) and uridine(5') polyphospho(5')nucleosides (Up_nNs) can be synthesized by UTP:glucose-1-phosphate uridylyltransferase from *Saccharomyces cerevisiae*. *FEBS Lett* 561: 83-88
45. Pietrowska-Borek M, Stuble H-P, Kombrink E, Guranowski A (2003) 4-Coumarate:coenzyme A ligase has the catalytic capacity to synthesize and reutilize various (di)adenosine polyphosphates. *Plant Physiol* 131: 1401-1410
46. Guranowski A, Miersch O, Staswick P, Suza W, Wasternack C (2007) Substrate specificity and products of side-reactions catalyzed by jasmonate:amino acid synthetase (JAR1). *FEBS Lett* 581: 815-820
47. Suzwart M, Starzyńska E, Pietrowska-Borek M, Guranowski A (2006) Calcium-stimulated guanosine-inosine nucleosidase from yellow lupin (*Lupinus luteus*). *Phytochemistry* 67: 1476-1485

48. Jakubowski H, Guranowski A (2003) Metabolism of homocysteine-thiolactone in plants. *J Biol Chem* 278: 6765-6770
49. Zimny J, Sikora M, Guranowski A, Jakubowski H (2006) Protective mechanisms against homocysteine toxicity: the role of bleomycin hydrolase. *J Biol Chem* 281: 22485-22492
50. Guranowski A, Wojdyła AM, Pietrowska-Borek M, Bieganski P, Khurs EN, Cliff MJ, Blackburn GM, Błaziak D, Stec, WJ (2008) Fhit proteins can also recognize substrates other than dinucleoside polyphosphates. *FEBS Lett* 582: 3152-3158
51. Guranowski A, Wojdyła AM, Zimny J, Wypijewska A, Kowalska J, Łukaszewicz M., Jemielity, J., Darżynkiewicz, E., Jagiełło, A. & Bieganski, P. (2010) Recognition of different nucleotidyl-derivatives as substrates of reactions catalyzed by various HIT-proteins. *New J Chem* 34: 888-893
52. Guranowski A, Wojdyła AM, Rydzik AM, Stepieński J, Jemielity J (2011) Plant nucleoside 5'-phosphoramidate hydrolase; Simple purification from yellow lupin (*Lupinus luteus*) seeds and properties of homogeneous enzyme. *Acta Biochim Pol* 58: 131-136
53. Bretes E, Wojdyła-Mamoń AM, Kowalska J, Jemielity J, Kaczmarek R, Baraniak J, Guranowski A (2013) Hint2, the mitochondrial nucleoside 5'-phosphoramidate hydrolase; properties of the homogeneous protein from sheep (*Ovis aries*) liver. *Acta Biochim Pol* 60: 249-254
54. Guranowski A, Wojdyła AM, Zimny J, Wypijewska A, Kowalska J, Jemielity J, Davis RE, Bieganski P (2010) Dual activity of certain HIT-proteins: *A. thaliana* Hint4 and *C. elegans* DcpS act on adenosine 5'-phosphosulfate as hydrolases (forming AMP) and as phosphorylases (forming ADP). *FEBS Lett* 584: 93-98
55. Bretes E, Guranowski A, Nuc K (2011) 5'-Methylthioadenosine nucleosidase from yellow lupine (*Lupinus luteus*) - molecular characterization and mutational analysis. *Protein Pept Lett* 18: 817-824
56. Pietrowska-Borek M, Nuc K, Zielezińska M, Guranowski A (2011) Diadenosine polyphosphates (Ap₃A and Ap₄A) behave as alarmones triggering the synthesis of enzymes of the phenylpropanoid pathway in *Arabidopsis thaliana*. *FEBSOpenBio* 1: 1-6
57. Pietrowska-Borek M, Czekala Ł, Belchí-Navarro S, Pedreño MA, Guranowski A (2014) Diadenosine triphosphate is a novel factor which in combination with cyclodextrins synergistically enhances the biosynthesis of *trans*-resveratrol in *Vitis vinifera* cv. Monastrell suspension cultured cells. *Plant Physiol Biochem*. 84: 271-276
58. Pietrowska-Borek M, Nuc K, Guranowski A (2015) Exogenous adenosine 5'-phosphoramidate behaves as a signal molecule in plants; it augments metabolism of phenylpropanoids and salicylic acid in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Physiol Biochem* 94: 144-152
59. Wojdyła-Mamoń AM, Zimny J, Romanowska J, Kraszewski A, Stawiński J, Bieganski P, Guranowski A (2015) Novel activity of Fhit proteins: catalysts for fluorolysis of nucleoside 5'-phosphoroamidates and nucleoside 5'-phosphosulfates to generate nucleoside 5'-phosphorofluoridates. *Biochem J* 468: 337-344
60. Wojdyła-Mamoń AM, Guranowski A (2015) Adenylylsulfate-ammonia adenylyltransferase activity is another inherent property of Fhit proteins. *Biosci Rep* 35: e00235
61. Tölle M, Jankowski V, Schuchardt M, Wiedon A, Huang T, Hub F, Kowalska J, Jemielity J, Guranowski A, Loddenkemper Ch, Zidek W, Jankowski J, van der Giet M (2008) Adenosine 5'-tetraphosphate is a highly potent purinergic endothelium-derived vasoconstrictor. *Circ Res* 103: 1100-1108
62. Bęłtowski J, Guranowski A, Jambroz-Wiśniewska A, Korolczuk A, Wojtak A (2014) Nucleoside monophosphorothioates as the new hydrogen sulfide precursors with unique properties. *Pharmacol Res* 81: 34-43
63. Bęłtowski J, Guranowski A, Jambroz-Wiśniewska A, Wolski A, Hałas K (2015) Hydrogen sulfide (H₂S)-mediated vasodilatory effect of nucleoside 5'-monophosphorothioates in perivascular adipose tissue. *Can J Physiol Pharmacol* 93: 585-595