

POLSKIE TOWARZYSTWO BIOCHEMICZNE

# Postępy Biochemii

POSTBAH 34 (1-2)  
(1-120) (1988)

1988

tom 34 nr 1-2

PL ISSN 0032-5422



*Pw*

PAŃSTWOWE  
WYDAWNICTWO  
NAUKOWE

<http://rcin.org.pl>



**POLSKIE TOWARZYSTWO BIOCHEMICZNE**

# **Postępy Biochemii**

**KWARTALNIK**

**TOM 34 ZESZYT 1-2  
1988**

Wydane z pomocą finansową  
Polskiej Akademii Nauk

Postbah 34 (1)  
(1-2) (1988)

**Państwowe Wydawnictwo Naukowe**

<http://rcin.org.pl>

## RADA REDAKCYJNA

Przewodniczący: A. Legocki (*Poznań*)  
Zastępca przewodniczącego: I. Szumiel (*Warszawa*)  
Sekretarz: B. Grzelakowska-Sztabert (*Warszawa*)  
Członkowie: S. Angielski (*Gdańsk*), M. Chorąży (*Gliwice*), E. Czuryło (*Warszawa*),  
M. Fikus (*Warszawa*), E. Gąsior (*Lublin*), M. Gumińska (*Kraków*), D. Hulanicka  
(*Warszawa*), W. Jachymczyk (*Warszawa*), J. Kwiatkowska (*Wrocław*), S. Lewak  
(*Warszawa*), A. Morawiecki (*Wrocław*), J. Pawełkiewicz (*Poznań*), K. Raczyńska-Boja-  
nowska (*Warszawa*), L. Wojtczak (*Warszawa*), Z. Zielińska (*Warszawa*)

## REDAKTOR NACZELNY

Z. Zielińska

*Instytut Biologii Doświadczalnej PAN*  
*ul. Pasteura 3, 02-093 Warszawa*

## ZASTĘPCY REDAKTORA NACZELNEGO

G. Palamarczyk

*Instytut Biochemii i Biofizyki PAN*  
*ul. Rakowiecka 36, 02-532 Warszawa*

A. Jerzmanowski

*Instytut Biochemii*  
*Uniwersytetu Warszawskiego,*  
*ul. Żwirki i Wigury 93,*  
*02-089 Warszawa*

## SEKRETARZ REDAKCJI

M. Szyszko

*Instytut Biochemii i Biofizyki PAN*  
*ul. Rakowiecka 36, 02-532 Warszawa*

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

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

PAŃSTWOWE WYDAWNICTWO NAUKOWE — WARSZAWA 1988

Nakład 1800 (1702+98)

Ark. wyd. 10,0, ark. druk. 7,5

Pap. druk. mat. kl. IV 70 g, 70×100

Zam. 4932/12/87

Oddano do składania 6.10.1987 r.

Podpisano do druku w kwietniu 1988 r.

Druk ukończono w lipcu 1988 r.

Cena zł 360,—

Drukarnia im. Rewolucji Październikowej, Warszawa

<http://rcin.org.pl>



**Profesor JANINA OPIEŃSKA-BLAUTH**

1895—1987

Profesor doktor Janina Opińska-Blauth urodziła się w Żółkwi pod Lwowem w roku 1895. Po ukończeniu szkoły elementarnej w Żółkwi, kontynuowała naukę we Lwowie, gdzie w 1914 roku uzyskała świadectwo dojrzałości. W tym okresie zaangażowała się w organizację skautingu. W okresie I wojny światowej przebywała w Krakowie i tam na czele IV Krakowskiej Drużyny Harcerskiej aktywnie uczestniczyła w ruchu niepodległościowym. W wieku 19 lat rozpoczęła studia chemiczne na Uniwersytecie Jagiellońskim. Będąc na IV roku studiów, w roku 1918 podejmuje pracę jako asystentka pod kierunkiem profesora Stanisława Bądryńskiego — początkowo w Zakładzie Chemii Lekarskiej Uniwersytetu Jana Kazimierza we Lwowie, a następnie w Katedrze Chemii Fizjologicznej Uniwersytetu Warszawskiego. W roku 1923 Janina Opińska uzyskuje stopień doktora filozofii w zakresie chemii po obronie pracy na temat funkcji kwasów oksyproteinowych w wątrobie. Po zawarciu związku małżeńskiego wyjeżdża do Torunia i przez rok naucza chemii w tamtejszym gimnazjum. W 1924 roku

otrzymuje propozycję objęcia pracy w Państwowym Zakładzie Higieny w Warszawie. W Zakładzie Leków prowadzi badania nad zastosowaniem niektórych metod chemicznych w medycynie sądowej. Wkrótce potem przechodzi do Zakładu Biochemii Państwowego Zakładu Higieny. W tym czasie rozpoczyna badania nad hormonem przytarczyc. Koncentruje się nad metodami izolowania, oczyszczania i określenia aktywności tego hormonu.

Wraz z wybuchem II wojny światowej doktor Opieńska-Blauth przenosi się do Lwowa i podejmuje pracę w Zakładzie Chemii Fizjologicznej Uniwersytetu Jana Kazimierza we Lwowie pod kierunkiem profesora Jakuba Parnasa. Po zajęciu Lwowa przez wojska niemieckie w 1942 roku, dzięki umiejętnym zabiegom i polityce profesorów lwowskich, powstaje namiastka studiów medycznych, w których doktor Opieńska-Blauth uczestniczy nauczając chemii fizjologicznej. Wkrótce jednak wyjeżdża do Warszawy i pracuje w prywatnej firmie analiz. Wraz z wszystkimi mieszkańcami stolicy uczestniczy w powstaniu warszawskim i trafia do obozu w Pruszkowie.

W roku 1944 po rozmowie z profesorem Ludwikiem Hirszfildem, przybywa do Lublina i od roku 1945 roku bierze czynny udział w organizacji Wydziału Lekarskiego w nowo utworzonym Uniwersytecie Marii Curie-Skłodowskiej. Mając odpowiednie kwalifikacje biochemiczne i liczący się z okresu przedwojennego dorobek naukowy, doktor Janina Opieńska-Blauth podejmuje trud organizacji od podstaw Zakładu Chemii Fizjologicznej. W 1947 roku po przeprowadzeniu habilitacji na Wydziale Lekarskim Uniwersytetu Marii Curie-Skłodowskiej w Lublinie, użykuje stanowisko docenta, a w roku 1948 tytuł i stanowisko profesora nadzwyczajnego. Podstawą dla habilitacji były przedwojenne badania nad hormonem przytarczyc. Nominację i stanowisko profesora zwyczajnego przyznano Jej w roku 1956.

Ogromny wysiłek i zaangażowanie w tworzenie placówki naukowo-dydaktycznej jakim był Zakład Chemii Fizjologicznej, nie ograniczył aktywności profesor Janiny Opieńskiej-Blauth w działalności naukowej. Przy współudziale dobranych przez siebie współpracowników rozpoczyna prace nad metabolizmem węglowodanowym *E. coli* w syntetycznych hodowlach. Wykrycie bezfosforowego metabolitu przemiany glukozy gromadzącego się w podłożu, zostało uznane za wartościowe odkrycie i opublikowane w „Nature”. Prace metaboliczne wymagały stosowania czułych, rozdzielczych metod analitycznych. Profesor stała się gorącą propagatorką metody chromatografii bibułowej. Pod Jej kierunkiem opublikowano szereg prac metodycznych dotyczących analizy niektórych kwasów organicznych, aminokwasów i węglowodanów. Prace te o charakterze pionierskim w owym czasie spowodowały napływ z całej Polski licznych szkolących się pracowników naukowych. Ukoronowaniem tego etapu działalności naukowej profesor Janiny Opieńskiej-Blauth było wydanie pod Jej redakcją obszernej monografii p.t. „Chromatografia”. Tej aktywności wydawniczej nie zaniechała i w późniejszych latach, czego wyrazem są opracowane przez Nią inne monografie z zakresu chromatografii, jak: Chromatografia cienkowarstwowa – 1967, Zastosowanie chromatografii w fitochemii – 1967.

Vade Mecum chromatograficzne – 1968, Metody chromatograficzne w badaniach aminokwasów ze szczególnym uwzględnieniem aminoacydury – 1966.

Opanowanie techniki chromatograficznej skierowało zainteresowanie profesor Janiny Opieńskiej-Blauth w dziedzinę aplikacji tej metody do celów medycznych. We współpracy z Kliniką Pediatriczną Akademii Medycznej w Lublinie podjęła badania nad aminoacydurią u dzieci z różnymi wadami rozwojowymi. Wyniki badań opublikowano w licznych pracach jak też przedstawiono pod postacią rozdziału p.t. „Aminoacyduria in Kidney Diseases” w monografii „In Biochemical Clinics” – 1963. Dorobek naukowy Profesor w latach 1945–1965 udokumentowany został 136 pozycjami bibliograficznymi.

Profesor doktor Janina Opieńska-Blauth charakteryzowała się w całym swoim życiu dynamiczną aktywnością organizacyjną, ogólnospołeczną, akademicką i naukową. Z gronem wybitnych biochemików polskich brała udział w powołaniu do życia Polskiego Towarzystwa Biochemicznego, którego została później Członkiem Honorowym. Godność Członka Honorowego przyznało Jej również Polskie Towarzystwo Chemiczne i Lubelskie Towarzystwo Naukowe.

Profesor Janina Opieńska-Blauth pełniła również szereg odpowiedzialnych funkcji akademickich i naukowych. W latach 1946–1949 była prodziekanem Wydziału Lekarskiego Uniwersytetu Marii Curie-Skłodowskiej w Lublinie, a w latach 1956–1959 i 1962–1965 była prorektorem Akademii Medycznej w Lublinie. Macierzysta uczelnia, Akademia Medyczna w Lublinie przyznała Jej tytuł Doktora honoris causa. W skali ogólnopolskiej reprezentowała biochemię poprzez udział w Komisji Biochemicznej przy Ministrze Zdrowia i Opieki Społecznej, Komitecie Biochemicznym Polskiej Akademii Nauk, Radzie Naukowej Instytutu Biochemii i Biofizyki i Instytucie Żywności i Żywienia.

Zgodnie z funkcją profesora wyższej uczelni była nauczycielem i wychowawcą ogromnej rzeszy młodzieży akademickiej kilku wydziałów. Swój entuzjazm i zapał naukowy potrafiła przelać na najbliższych współpracowników. Spośród Jej wychowanków 8 uzyskało tytuły profesora zwyczajnego i nadzwyczajnego, kilku stopnie docenta i wielu stopnie naukowe doktora.

Długa jest lista osiągnięć i sukcesów człowieka, który całe swe pracowite życie i nieustanny entuzjazm poświęcił nauce i nauczaniu. Nie sposób ich wszystkich przedstawić zwłaszcza, że trudno dziś obiektywnie ocenić, które z efektów działania są najbardziej wartościowe. Myślę jednak, że tak jak dla każdego nauczyciela i wychowawcy, świadectwem jego stałego istnienia i nieprzemijającej wartości są ogromne rzesze uczniów i wychowanków.

Odeszła na zawsze 18 listopada 1987.

*Tomasz Borkowski*





ANNA GOŹDZICKA-JÓZEFIAK\*, URSZULA KARWOWSKA\*

## Geny genomu plastydowego, ich organizacja, struktura i transkrypcja

### Genes of plastid genomes, their organization, structure and transcription

#### Spis treści:

- I. Wprowadzenie
- II. Ogólny schemat organizacji DNA plastydów
- III. Organizacja genów rRNA i tRNA w plastydach
  - III-1. 16 S rRNA plastydów i ich geny
  - III-2. 23 S rRNA plastydów i ich geny
  - III-3. tRNA plastydów i ich geny
- IV. Geny kodujące plastydowe białka
- V. Transkrypcja genów plastydów
- VI. Uwagi końcowe

#### Contents:

- I. Introduction
- II. General schema of plastid DNA organization
- III. Organization of plastid rRNA and tRNA genes
  - III-1. Plastid 16 S rRNA and their genes
  - III-2. Plastid 23 S rRNA and their genes
  - III-3. Plastid tRNA and their genes
- IV. Genes coding for plastid proteins
- V. Transcription of plastid genes
- VI. Concluding remarks

Wykaz stosowanych skrótów: RNA – kwas rybonukleinowy, tRNA – RNA transportujący, rRNA – RNA rybosomowy, pętla D – pętla dwuhydrourydylowa w II-rzędowej strukturze tRNA, DNA – kwas dezoksyrybonukleinowy, pz – pary zasad, kpz – tysiące par zasad, G – guanozyna, C – cytydina, T – tymidyna, A – adenozyzna, N – nukleotyd, P – puryna, GTP – guanozynotrójfosforan, Wal – walina, Asn – asparagina, Cys – cysteina, S – białko wchodzące w skład małej podjednostki rybosomalnej, L – białko wchodzące w skład dużej podjednostki rybosomalnej.

\* Dr, Zakład Biochemii Biopolimerów UAM, ul. Fredry 10, 61-701 Poznań

## I. Wprowadzenie

Plastydy są organelami roślin wyższych, których pochodzenie nie jest w pełni wyjaśnione. Istnieją dwie teorie odnośnie ich pochodzenia. Zgodnie z jedną z nich, tzw. teorią endosymbiotyczną, plastydy były początkowo wolnożyjącymi prokariotami, które zaczęły żyć w symbiozie z komórką gospodarza i z biegiem czasu przekształciły się w jej organele. Druga teoria, zwana teorią wewnętrznej kompartmentacji zakłada, że małe fragmenty DNA ulegały kompartmentacji w obrębie prokariotycznego przodka tworząc organele. Żadna z proponowanych teorii nie jest w pełni udokumentowana.

Przeszło 20 lat temu wykazano po raz pierwszy, że plastydy zawierają własny DNA. Od tego czasu prowadzone są intensywne badania właściwości i funkcji plastydowego DNA, współzależności pomiędzy genomem jądrowym, mitochondrialnym i plastydowym oraz organizacji poszczególnych genów genomu plastydowego. DNA izolowano z plastydów roślin różnych gatunków. W większości dotychczas zbadanych roślin plastydowy DNA występuje w formie kowalencyjnie zamkniętej cząsteczki o masie około  $85 \times 10^6$  daltonów i podobnie jak DNA prokariotów nie jest zasocjowany z histonami (1–7).

Plastydy zawierają specyficzne plastydowe tRNA i rRNA oraz kompletny własny aparat translacji, w tym także zestaw enzymów niezbędnych do replikacji DNA, transkrypcji i translacji.

Proces translacji w plastydach zachodzi przy udziale rybosomów o stałej sedymentacji 70 S, podobnych do rybosomów prokariotycznych i bardzo różnych od rybosomów cytoplazmatycznych 80 S. Głównymi składnikami rybosomów 70 S są: 23 S rRNA i 16 S rRNA, poza tym w plastydach roślin niektórych gatunków występują 4,5 S rRNA, 5 S rRNA, 7 S rRNA oraz 3 S rRNA.

Plastydowe tRNA aminoacylowane są przez syntetazy aminoacylo-tRNA specyficzne dla plastydów. Syntetazy aminoacylo-tRNA plastydów mają właściwości podobne do analogicznych enzymów bakteryjnych (8). Fakt ten jak również wrażliwość plastydowego aparatu syntezy białka na antybiotyki (np. chloramfenikol) oraz inicjacja translacji przy udziale N-formylometionylo-tRNA mogą wskazywać na duże podobieństwo plastydów do organizmów prokariotycznych.

## II. Ogólny schemat organizacji DNA plastydów

Plastydy zawierają wiele kopii (do 200 kopii na plastyd) kolistej cząsteczki DNA. W większości badanych roślin koliste cząsteczki DNA stanowią aż 90% całkowitego plastydowego DNA, natomiast resztę jego formy liniowe. Liniowe formy plastydowego DNA przeważają jedynie u kilku gatunków *Acetabularia* (4).

Obwód cząsteczki plastydowego DNA waha się od 27  $\mu\text{m}$  (jak np. u *Codium fragile*) do 62  $\mu\text{m}$  (np. *Chlamydomonas*). Odpowiada to zawartości par zasad od

120 do 195 tysięcy i ciężarowi od 56 do  $95 \times 10^6$  daltonów (4, 7). Gęstość plastydowego DNA w zależności od gatunku roślin wynosi od 1,685 do 1,708  $\text{gem}^{-3}$  (9), natomiast zawartość par zasad G-C od 22% w przypadku *Euglena* (10) do 47% u *Acetabularia* (11). W plastydach roślin wyższych pary G-C stanowią od 36 do 40% całego genomu.

Początkowo uważano, że plastydowy DNA nie zawiera modyfikowanych zasad (5), co wykorzystywano nawet jako jedno z kryteriów jego czystości (12). Później stwierdzono jednak, że plastydowy DNA niektórych roślin zawiera metylowane zasady np. DNA *Chlamydomonas* ulega metylacji podczas procesu gametogenezy (13, 14). Traktując plastydowy DNA niektórych roślin (np. grochu, fasoli) RNA-zami lub alkaliami wykazano w nich obecność rybonukleotydów (15–17). Występują one w różnych miejscach na obu niciach DNA, w ilości od 12 do 18 nukleotydów.

Od kilku lat znane są już mapy fizyczne plastydowych genomów wielu roślin, a także nukleotydowe sekwencje większości ich genów (18–54). W 1986 r. ustalono sekwencję nukleotydową całego genomu plastydowego tytoniu i wątrobowca (54). Uzyskane wyniki pozwoliły na określenie ogólnego schematu organizacji DNA plastydów.

Plastydowy DNA w większości dotychczas zbadanych roślin zawiera dwa odwrotnie zorientowane odcinki o powtórzonej sekwencji i długości po 10 do 28 tysięcy par zasad (51). Sekwencje te oddzielone są rejonami DNA o unikalnej sekwencji: tzw. duży rejon zawiera od 80 do 103 tysięcy par zasad i rejon mały od 12,6 do 26,9 tysięcy par zasad. Wyjątek stanowią tutaj genomy plastydowe roślin motylkowych np. grochu (*Pisum sativum*) i fasoli (*Vicia faba*), w których nastąpiła delecja jednego z odcinków o powtórzonej sekwencji. Natomiast u *Euglena* występują aż trzy kopie tego odcinka lecz są one tak samo zorientowane.

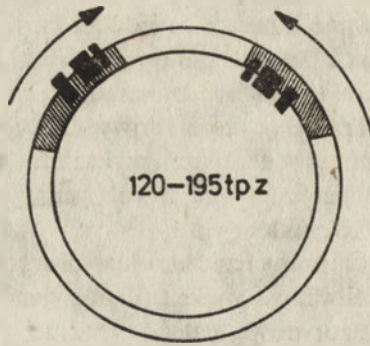
Porównując różne fragmenty plastydowego DNA roślin odległych ewolucyjnie wykazano podobną organizację szeregu sekwencji nukleotydowych w ich genomach. I tak stwierdzono np., że sekwencje nukleotydowe w plastydowych genomach tytoniu i wątrobowca są podobne mimo, że genom plastydowy tytoniu jest większy od genomu wątrobowca o przeszło 30 tysięcy par zasad (54).

Jednakże pomimo znacznej zachowawczości plastydowych genów zaobserwowano przypadki przemieszczenia się fragmentów DNA w obrębie plastydowego genomu. Najczęściej znajdowano je w dużym rejonie DNA o unikalnej sekwencji. Palmer i Thompson sugerują, że odcinki o powtórzonej sekwencji odwrotnie zorientowane mogą mieć decydujący wpływ na stabilność oraz na organizację sekwencji nukleotydowych w plastydowym DNA (36, 37). W genomach plastydowych typu spotykanego u grochu czy fasoli znacznie częściej dochodzi do przemieszczania się fragmentów DNA, ich delecji względnie insercji.

### III. Organizacja genów rRNA i tRNA plastydów

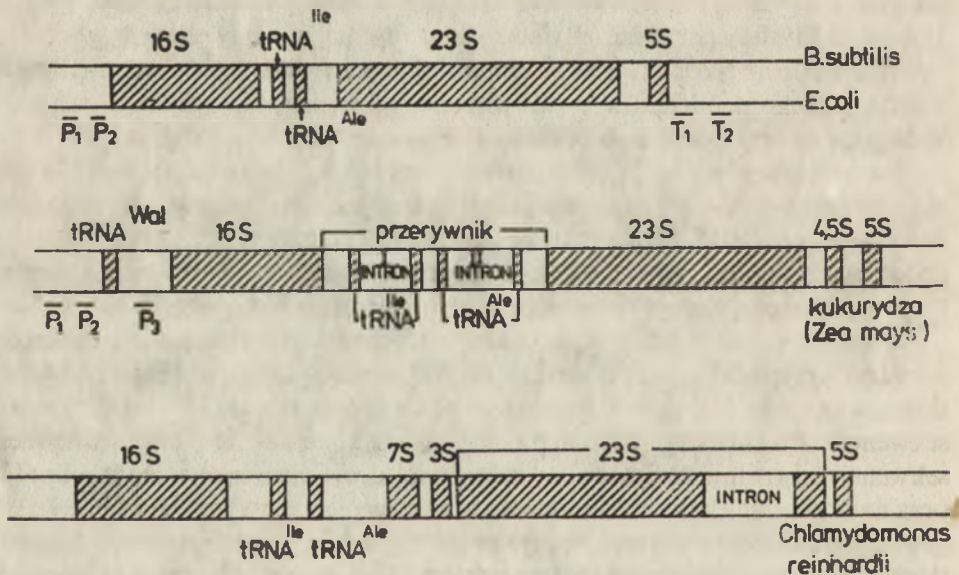
Geny rRNA w plastydach większości badanych roślin występują w obrębie odcinków o powtórzonej sekwencji odwrotnie zorientowanej w ilości dwie kopie

na genom. Najlepiej poznana jest organizacja genów rRNA kukurydzy (Ryc. 1). W genomie plastydowym kukurydzy znajdują się dwa identyczne rejony o powtórzonej sekwencji odwrotnie zorientowane, o długości 22 tysiące par zasad (kpz). Każdy z rejonów zawiera geny 16 S rRNA, 23 S rRNA, 4,5 S rRNA i 5 S rRNA (Ryc. 2). Geny 16 S rRNA i 23 S rRNA oddzielone są przerywnikiem o



Ryc. 1. Ogólny schemat organizacji DNA chloroplastów.

Pola zakreskowane przedstawiają odcinki DNA o odwrotnej orientacji. Czarnymi blokami (■) zaznaczone są kolejno geny 16 S rRNA, 23 S rRNA, i 5 S rRNA. Strzałki wskazują kierunek transkrypcji genów znajdujących się w odcinkach DNA o odwrotnej orientacji



Ryc. 2. Schemat operonu rRNA bakterii i chloroplastów roślin.

Schematycznie przedstawione są geny kodujące różne rRNA (16 S rRNA, 23 S rRNA, 3 S rRNA, 4,5 S rRNA, 5 S rRNA i 7 S rRNA) i tRNA.

P<sub>1</sub>, P<sub>2</sub>, P<sub>3</sub> – miejsca zawierające sekwencje homologiczne do sekwencji promotorowych genów bakterii, T<sub>1</sub>, T<sub>2</sub> – miejsca zawierające sekwencje homologiczne do sekwencji terminujących transkrypcję genów bakterii

długości 2,4 kpz (55). Taki zespół genów rRNA w plastydach określa się mianem operonu rRNA. Podobnie jak u kukurydzy rozmieszczone są geny rRNA w plastydach większości roślin okrytonasiennych. Wyjątek stanowią tutaj rośliny z rodziny motylkowych (np. groch, fasola) oraz *Euglena gracilis*, szczep Z-S, mające pojedyncze kopie genów rRNA, podczas gdy *Euglena gracilis* szczep Z-Ha ma aż trzy kopie genów rRNA i na końcu 5' jednego z operonów dodatkowo zlokalizowany jest gen 16 S rRNA. Geny rRNA *Euglena gracilis* Z-Ha występują w trzech powtarzających się jednostkach o długości 5,6 kpz każda i takiej samej orientacji, tworząc tandemowy układ operonów rRNA (56).

Ogólna organizacja wszystkich analizowanych dotychczas operonów rRNA plastydów wskazuje na duże ich podobieństwo do organizacji obserwowanej w organizmach prokariotycznych (Ryc. 2) (57, 58). W obrębie przerywnika znajdującego się pomiędzy genami 16 S rRNA i 23 S rRNA występują geny tRNA. Przerywnik ten w genomach plastydowych roślin wyższych jest znacznie dłuższy (od 1,6 do 2,4 kpz) niż u bakterii (około 330 pz) i zawiera rozszczerzone geny tRNA.

### III-1. 16 S rRNA plastydów i ich geny

Sekwencje nukleotydowe plastydowych 16 S rRNA określono pośrednio na podstawie analizy sekwencji rDNA (59–71). Najlepiej dotychczas poznane są geny 16 S rRNA kukurydzy, tytoniu i *Euglena*. 16 S rRNA kukurydzy i tytoniu zbudowane są odpowiednio z 1491 i 1186 nukleotydów i wykazują 96,4% homologii sekwencji (60, 63). 16 S rRNA kukurydzy wykazuje także 80% homologii sekwencji nukleotydowej z 16 S rRNA *Euglena*, natomiast z rRNA *E. coli* 74,2%. Różnice pomiędzy 16 S rRNA plastydów a 16 S rRNA *E. coli* wynikają głównie z delecji nukleotydów w plastydowym rDNA. Delecja obejmująca 23 pz (występująca w miejscu odpowiadającym nukleotynom od 453 do 475 w strukturze rRNA *E. coli*) powoduje zanik jednego z ramion w drugorzędowej strukturze rRNA plastydów. Inne mniejsze delecje w rejonie 5'rDNA (w pozycjach odpowiadających nukleotynom od 77 do 99 i od 180 do 250 w strukturze DNA *E. coli*) tylko nieznacznie redukują wymiary odpowiednich ramion w II-rzędowej strukturze rRNA plastydów. Delecje występujące w rejonie nukleotydów od 77 do 99 obserwuje się również u alg. Analiza sekwencji nukleotydowej 16 S rDNA plastydów pozwoliła na zaproponowanie modeli struktury II-rzędowej rRNA (72, 73). Według tych modeli II-rzędowa struktura różnych znanych 16 S rRNA plastydów jest zachowana pomimo zmian jakie obserwowano w ich strukturze I-rzędowej, albowiem zmianom zasad na jednej nici helikalnych odcinków ramion towarzyszą zmiany komplementarnych zasad drugiej nici tych odcinków. Różnice w strukturze poszczególnych rRNA polegają na redukcji pętli dodatkowych w niektórych z nich, co nie ma znaczącego wpływu na strukturę II-rzędową całej cząsteczki.

Podobnie jak u *E. coli* koniec 5'16 S rDNA plastydów jest komplementarny do końca 3', można dlatego przypuszczać, że sekwencje te pełnią taką samą rolę jak sekwencje „Shine Dalgarno” *E. coli*. (74).

Tohdoh i Sugiura (63) analizując sekwencje nukleotydowe 16 S rDNA plastydów tytoniu oraz konstruując model przestrzenny prekursorowego rRNA wskazali na możliwość tworzenia się par zasad pomiędzy rejonami przylegającymi do końca 5' cząsteczki prekursora (nukleotydy od -116 do -8), a rejonem znajdującym się przy końcu 3'tej cząsteczki (nukleotydy od 1185 do 1610), co prowadziłoby do utworzenia struktury jaka tworzy się pomiędzy końcami 5' i 3' prekursorowego rRNA *E. coli*. Struktura taka jest wymagana do aktywności RN-azy III biorącej udział w procesie dojrzewania prekursorowego 16 S rRNA. Obserwacje te sugerują podobny przebieg dojrzewania prekursorowego 16 S rRNA plastydów jak to ma miejsce w przypadku bakterii.

Plastydowe 16 S rRNA mają metylowane nukleotydy prawie w tych samych miejscach jak rRNA *E. coli*. Tylko jedna spośród metylowanych zasad 16 S rRNA *E. coli* nie znajduje swojego odpowiednika w 16 S rRNA plastydów kukurydzy (75).

### III-2. 23 S rRNA plastydów i ich geny

Geny 23 S rRNA plastydów tytoniu i kukurydzy zawierają odpowiednio 2804 i 2898 par zasad. Ich sekwencje nukleotydowe wykazują 92% homologii między sobą, natomiast podobieństwo do 23 S rDNA wynosi 67% dla tytoniu i 71% dla kukurydzy. Rejony sekwencji nukleotydowej 23 S rRNA o znanych funkcjach, takich jak np.: wiązanie rybosomalnych białek L<sub>1</sub> i L<sub>2</sub>, interakcje podjednostek 30 S i 50 S, oddziaływanie z peptydylo-transferazą jak również modyfikacje zasad, znanych plastydowych 23 S rRNA są w dużym stopniu zachowane.

W 23 rRNA kukurydzy występują trzy insercje obejmujące 25, 65 i 78 pz, które powodują pojawienie się dodatkowych pętli w strukturze II-rzędowej rRNA plastydów, nie występujących w strukturze rRNA *E. coli* (73). Insercję 65 pz dotychczas stwierdzono tylko w 23 S rDNA plastydów roślin jednoliściennych.

W odległości 270 pz od końca 3' 23 S rDNA *Chlamydomonas reinhardtii* znajduje się intron o długości 870 pz (Ryc. 2). Intronu tego nie mają 23 S rDNA w innych poznanych dotąd roślinach. Na końcu 3' sekwencji nukleotydowej 23 S rDNA w genomie plastydowym roślin wyższych oraz paproci *Dryopteris acuminata* (76) znajduje się gen 4,5 S rRNA. 4,5 S rDNA zbudowany jest w zależności od gatunku rośliny z 96 do 103 pz (76, 77) i wykazuje przeszło 60% homologii z sekwencją końca 3' rejonu 23 S rDNA *E. coli*. Rejony 3' genu 4,5 S rRNA zawierają sekwencje komplementarne do sekwencji końcowych genów 23 S rRNA. Pochodzenie 4,5 S rDNA nie jest wyjaśnione. Przypuszcza się, że powstał on w wyniku insercji około 100 pz w 3' końcowym rejonie genu 23 S rRNA. W większości znanych plastydowych operonach rRNA, (także bakteryjnych) po genie 23 S rRNA lub po genie 4,5 S rRNA (w przypadku plastydów) znajduje się gen 5 S rRNA (Ryc. 2). Gen ten oddzielony jest od poprzedzającego go genu przerywnikiem. Przerywnik zbudowany jest z 231 pz u kukurydzy i z 256 pz u tytoniu. 5 S rRNA w zależności od gatunku rośliny zawiera od 111 do 122

nukleotydów (68, 75, 78). Sekwencje te są wysoce zachowawcze i wykazują dużą homologię z sekwencją 5 S rRNA cyjanobakterii (66, 68, 70). Stwierdzono, że geny 23 S rRNA, 4,5 S rRNA i 5 S rRNA kukurydzy transkrybowane są razem, a niezbędne do ich rozszczepienia sygnały znajdują się prawdopodobnie w przedzielających je przerywnikach (79).

W rejonie przylegającym do końca 5' genu 23 S rRNA u *Chlamydomonas reinhardtii* znajdują się geny 7 S rRNA i 3 S rRNA, zbudowane odpowiednio z 282 i 47 pz (Ryc. 2) (65). Oba geny są oddzielone od siebie przerywnikiem o długości 23 pz oraz 81 parami zasad od genu 23 S rRNA. Zarówno sekwencje kodujące 7 S rRNA jak i 3 S rRNA oraz odcinek DNA przedzielający oba geny są homologiczne do 5'końcowego fragmentu genów 23 S rRNA *E. coli* i *Euglena*. 5'końcowe sekwencje 7 S rDNA i 3 S rDNA zawierają również sekwencje komplementarne do sekwencji rejonów przylegających do intronu znajdującego się w obrębie genu 23 S rRNA. Dlatego też przypuszcza się, że te rRNA mogą uczestniczyć w procesie wycinania intronu. Dokładna ich rola nie jest poznana.

### III-3. tRNA plastydów i ich geny

Plastydy zawierają pełen zestaw tRNA niezbędny do syntezy plastydowych białek. W plastydowych genomach roślin różnych gatunków stwierdzono obecność od 25 do 40 genów tRNA (52, 54, 80–87). Geny tRNA w plastydach podobnie jak u organizmów prokariotycznych zlokalizowane są pojedynczo lub w zespołach w różnych rejonach cząsteczki plastydowego DNA (52, 54, 88–94). W genomie plastydowym *Euglena* stwierdzono obecność dwóch zespołów genów tRNA (95, 96). W jednym z nich obejmującym fragment 367 pz zlokalizowane są 4 geny tRNA zorganizowane w kolejności: tRNA<sup>Val</sup>UAC-16pz-przerywnik-tRNA<sup>Asn</sup>GUU-3pz-tRNA<sup>Arg</sup>ACG-45pz-tRNA<sup>Leu</sup>UAG. Gen tRNA<sup>Leu</sup> ma odwrotną orientację w stosunku do pozostałych genów. Drugi zespół zawiera 6 genów zorganizowanych w kolejności: tRNA<sup>Tyr</sup>CUA-64pz-tRNA<sup>His</sup>CUG-14pz-tRNA<sup>Met</sup>CAU-4pz-tRNA<sup>Trp</sup>CCA-27pz-tRNA<sup>Glu</sup>UUC-6pz-tRNA<sup>Gly</sup>UCC. Jest to najdłuższy poznany zespół plastydowych genów tRNA. Wszystkie zawarte w nim geny mają taką samą orientację. Analiza sekwencji genów tRNA plastydów wykazała, że niektóre z nich mają sekwencje intronowe (86, 87, 97–101). Introny te są bardzo długie w porównaniu do intronów obecnych w jądrowych genach tRNA. Introny genów jądrowych zawierają tylko od 13 do 60 pz (zlokalizowane po stronie 3'anty kodonu), podczas gdy introny np.: w plastydowych genach tRNA<sup>Ile</sup>, tRNA<sup>Ala</sup> i tRNA<sup>Val</sup> kukurydzy wynoszą odpowiednio 949, 806 i 458 pz, a w genach tRNA<sup>Ile</sup> i tRNA<sup>Ala</sup> z tytoniu 707 i 710 pz. Najdłuższy znany intron plastydowego genu tRNA zbudowany jest z 2526 pz i występuje w tRNA<sup>Liz</sup> tytoniu (100). Sekwencje intronowe w plastydowych genach tRNA umieszczone są przeważnie pomiędzy 1 i 2 lub 2 i 3 zasadą anty kodonu (59), wyjątek może stanowić tRNA<sup>Gly</sup> plastydów tytoniu, który zawiera intron w pętli D (101). Rola intronów nie jest wyjaśniona. Stwierdzono, że geny zawierające nawet bardzo duże introny ulegają ekspresji, a transkrypt w procesie dojrzewania przekształ-

cany jest w funkcjonalną cząsteczkę tRNA (99). Przepuszcza się, że w obrębie dużych sekwencji intronowych zawierających kodon inicjujący i kodon terminujący mogą być kodowane geny białek. Dlatego też te sekwencje nazywa się otwartymi ramkami odczytu (nazwa ang. open reading frames ORF<sub>3</sub>). I tak stwierdzono np., że w insercie genu tRNA<sup>Ile</sup> tytoniu znajdują się otwarte ramki odczytu dla 71 kodonów, w tRNA<sup>Ala</sup> dla 36, natomiast w przypadku genu tRNA<sup>Liz</sup> dla 509, nie wiadomo jednak czy ulegają one ekspresji.

Porównując sekwencje intronowe genów tRNA plastydów geny te podzielono na trzy grupy (100). Do grupy I zaliczane są geny tRNA plastydów (jak np. tRNA<sup>Leu</sup> fasoli), których introny mogą tworzyć struktury podobne do struktury intronów jaką proponowano w procesie autokatalitycznego rozpadu prekursorowego rRNA *Tetrahymena*.

Grupę II-gą stanowią geny tRNA zawierające introny o podobnej sekwencji nukleotydowej (jak np. geny tRNA<sup>Ile</sup>, tRNA<sup>Ala</sup> z plastydów kukurydzy), których introny wykazują 95% homologii sekwencji. Natomiast geny tRNA np. tRNA<sup>Liz</sup>, tRNA<sup>Gly</sup> tytoniu, zawierające introny, których sekwencje przylegające są podobne do sekwencji znajdujących w intronach genów plastydowych białek zaliczane są do grupy III-ciej rozszczepionych genów tRNA plastydów.

Michel i Dujon (102) wykazali, że introny genów tRNA (tRNA<sup>Ile</sup>, tRNA<sup>Ala</sup>) plastydów kukurydzy są podobne do intronów występujących w obrębie genów mitochondrialnych niektórych grzybów (np. *Sacharomyces cerevisiae*). Sugerować mogłoby to zatem ich wspólne pochodzenie. Zastanawiającym jest jednak dłaczego intronów takich nie zawierają odpowiednie geny *E. coli* i chloroplastów *Euglena*. Znane są sekwencje nukleotydowe kilkudziesięciu plastydowych genów tRNA (95–101). Cechą charakterystyczną plastydowych genów tRNA, właściwą także genom jądrowym jest brak terminalnej sekwencji CCA<sub>OH</sub>. Sekwencje nukleotydowe tRNA plastydów wykazują wyższy stopień homologii do tRNA prokariotów niż do tRNA jądrowych.

#### IV. Geny kodujące plastydowe białka

W rejonach o unikalnej sekwencji plastydowe DNA zawierają geny struktury dla niektórych białek (43, 47, 54, 103–109). W plastydach zidentyfikowano przeszło 55 genów kodujących białka i około 30 otwartych ramek odczytu zawierających od 31 do 2136 kodonów. Niezidentyfikowane ramki odczytu poprzedzielane są przerywnikami bogatymi w sekwencje A-T. Wśród genów kodujących plastydowe białka stwierdzono występowanie genów kodujących: dużą podjednostkę (LS) karboksylazy RuDP, białek wchodzących w skład fotosystemu I i II, kompleksu cytochromów b-f oraz podjednostek ATP-syntazy. Wszystkie te geny występują w jednej kopii na cząsteczkę plastydowego DNA. Ponadto w plastydowym DNA wątrobowca i tytoniu znaleziono geny kodujące 1/3 białek wchodzących w skład plastydowych rybosomów (19 genów), białka podjednostek  $\alpha$ ,  $\beta$  i  $\beta'$ -polimerazy RNA, białka biorące udział w transporcie



elektronów oraz liczne otwarte ramki odczytu. Analiza komputerowa wykazała, że 7 otwartych ramek odczytu ma sekwencje nukleotydowe podobne do sekwencji genów mitochondrialnych człowieka. W sześciu z nich zidentyfikowano geny kodujące podjednostki dehydrogenazy NADH, które okazały się podobne do genów podjednostek dehydrogenazy mitochondrialnej człowieka. Przypuszcza się, że niezidentyfikowane ramki odczytu mogą kodować oksydoreduktazę NADPH plastochinonu, której aktywność wykryto znacznie wcześniej w *Chlamydomonas reinhardtii* oraz niektóre białka biorące udział w procesie fotosyntezy, np. 4Fe-4S-ferrodoksynę. W genomie plastydowym wątrobowca nie znaleziono genu faktora elongacyjnego tufA, który wcześniej został zidentyfikowany w plastydach innych roślin, oraz genu kodującego rybosomalne białko S16.

Geny plastydowych białek występują pojedynczo lub w zespołach, podobnie jak u *E. coli*. Zespół genów białek rybosomalnych wątrobowca: L23-L2-S19-L22-S3-L16-L14-S8-infA-secX-S11-rpoA jest podobnie zorganizowany jak operon białek rybosomalnych str(S12-S7-fus-tufA) u *E. coli*. W 12-tu genach plastydowych białek stwierdzono występowanie od 1 do 9-ciu intronów. Badania struktury tych intronów wykazały, że zawierają one charakterystyczne sekwencje: 5'-NG<sub>C</sub><sup>T</sup>G<sub>C</sub><sup>T</sup>G.....TTTA<sub>G</sub><sup>T</sup>TTTT ATN-3' podobne do sekwencji największej zgodności występujących w genach jądrowych kodujących mRNA. Obserwuje się znaczną zachowawczość genów kodujących plastydowe białka występujące w roślinach różnych gatunków. Geny te wykazują także dużą homologię z odpowiednimi genami cyjanobakterii. Najlepiej poznany jest gen dużej podjednostki (LS) karboksylazy RuDP (110). Karboksylaza RuDP jest enzymem składającym się z 16 podjednostek. Osiem podjednostek dużych o masie 55 000 daltonów każda, kodowanych jest przez DNA plastydów i syntetyzowanych wewnątrz plastydów. Natomiast osiem podjednostek małych o masie 14 000 daltonów koduje genom jądrowy, a ich synteza zachodzi w cytoplazmie. W szpinaku rejon transkrypcyjny genu dużej podjednostki karboksylazy RuDP składa się z 1690 par zasad z czego na rejon kodujący przypada 1425 par zasad. Przy końcach 3' i 5' tego genu znajdowano odcinki DNA zawierające odpowiednio 178 par zasad i 82 pary zasad nie ulegające transkrypcji. Badania szeregu genów innych białek plastydowych zbudowanych z podjednostek wykazały, że u większości z nich przynajmniej jedna podjednostka kodowana jest przez genom jądrowy, a pozostałe przez genom plastydowy. Biosynteza i funkcja plastydów jest zatem kontrolowana przez geny zlokalizowane w dwóch genomach.

## V. Transkrypcja genów plastydów

Sekwencje DNA rozpoznawane przez polimerazy RNA plastydów nie są dokładnie poznane. W rejonach przylegających do końca 5' genów plastydów stwierdzono występowanie sekwencji podobnej do sekwencji promotorów prokariotycznych w pozycji -10 i -35 (Tab. I). Wykazano również, że rejon te

Tabela 1

Roślina	Gen	Rejony przylegające do końca 5 genu
tytoń	tRNA <sup>Am</sup>	ATGAATGGAATTGG.....TATAATG -180 -130
szpinak	LSU	GGTTACGGTTGGGTTG.....TATACAAT -220 -180
kukurydza	LSU	TTTAATGAGTTGATA.....TATCAT -130 -100

Sekwencje nukleotydowe występujące w rejonach przylegających do końców 5'genów plastydów

wiążą polimerazę RNA *E. coli*, która chroni te miejsca przed działaniem DN-azy. Ponadto w rejonie 5'genów tRNA plastydów stwierdzono występowanie sekwencji 5'-GT $\uparrow$ NTA $\uparrow\uparrow$ -3', która zdaniem Gr u i s s e m może być sekwencją promotorową dla polimeraz RNA plastydów (111).

Sekwencje DNA biorące udział w terminacji transkrypcji plastydowych genów nie są również dokładnie poznane. W przeciwieństwie do dużej homologii sekwencji obserwowanej pomiędzy rejonami przylegającymi do końców 5'genów tRNA plastydów, rejony 3'genów tRNA wykazują tylko nieznaczny jej procent. W rejonach 3'genów szeregu plastydowych białek stwierdzono jednak występowanie sekwencji, które mogą tworzyć struktury podobne do struktur terminatorów prokariotycznych (88).

Transkrypcję genów plastydów badano w układzie heterologicznym stosując polimerazę RNA *E. coli* lub polimerazy RNA obecne w ekstraktach komórek HeLa i oocytach żaby oraz w układzie homologicznym. Uważa się, że plastydy zawierają pełny zestaw enzymów niezbędnych do transkrypcji genów RNA plastydów oraz do kontroli dojrzewania pierwotnych transkryptów (111 – 115).

W plastydach występują prawdopodobnie dwie różne polimerazy RNA. Jedna z nich zwana rozpuszczalną bierze udział w transkrypcji genów tRNA, natomiast druga z kompleksu DNA-białko lub transkrypcyjnie aktywnych chromosomów (zwana TAC) transkrybuje geny rRNA. Polimerazy te znacznie różnią się właściwościami jak np: wrażliwością na heparynę, stężenie soli, temperaturę i obecność kationów. Dlatego uważa się, że w plastydach mogą istnieć dwa różne systemy transkrypcyjne. Polimerazy plastydowe w przeciwieństwie do jądrowych polimeraz roślinnych (I i III) nie są wrażliwe na  $\alpha$ -amanitynę. Aktywność polimerazy rozpuszczalnej nie jest inhibowana przez rifampicynę, która całkowicie inhibuje aktywność polimerazy RNA *E. coli*. Polimerazy RNA obecne w plastydach szpinaku poprawnie rozpoznają i transkrybują geny tRNA *Euglena* występujące w zespołach, chociaż obecności takiego zespołu genów nie stwierdzono w genomie plastydowym szpinaku. Geny RNA plastydów są również poprawnie transkrybowane przez polimerazę RNA bakterii. Uważa się, że systemy transkrypcyjne bakterii i plastydów są bardzo podobne, różnią się tylko kofaktorami współpracującymi z enzymem. Prawdopodobnie transkrypcja genów RNA w obu przypadkach rozpoczyna się w innym

miejscu sekwencji promotorowej. W plastydach stwierdzono również występowanie enzymów uczestniczących w procesie dojrzewania pierwotnych transkryptów jak np: syntetazy pseudourydylowej modyfikującej tRNA i nukleotydylotransferazy przyłączającej do końca 3' cząsteczki tRNA sekwencję terminalną CCA<sub>OH</sub> (113). Na przykładzie tRNA<sup>Arg</sup> występującego w zespole genów tRNA *Euglena* wykazano, że usunięcie sekwencji nukleotydowej z końca 3' prekursorowego tRNA prowadzi do nieprawidłowego procesu dojrzewania tej cząsteczki. Być może w rejonach przylegających do końca 3' genu znajdują się sekwencje nukleotydowe, które rozpoznawane są przez specyficzne białka kierujące procesem dojrzewania prekursorowego RNA.

Systemy transkrypcyjne zawarte w plastydach znacznie różnią się od systemów cytozolowych. Wprawdzie wcześniej wykazano, że polimeraza II obecna w ekstraktach komórek *He La* rozpoznaje i prawidłowo transkrybuje plastydowe geny tRNA *Euglena* występujące w zespole: tRNA<sup>Val</sup>-tRNA<sup>Asn</sup>-tRNA<sup>Arg</sup> (113), to dzieje się dlatego, że te tRNA nie różnią się zasadniczo pod względem struktury I-rzędowej od tRNA eukariotycznych i zawierają wewnątrzgenowe sekwencje promotorowe rozpoznawane przez eukariotyczną polimerazę. Pierwotny wspólny transkrypt wymienionego zespołu genów zawiera 268 nukleotydów. Miejsce inicjacji transkrypcji znajduje się prawdopodobnie w pozycji -5 lub -7 od końca 5' genu tRNA<sup>Val</sup>. W przypadku usunięcia genu tRNA<sup>Val</sup> inicjacja transkrypcji rozpoczyna się od następnego genu tRNA co jest dowodem, że istotnie miejscem promotorowym dla polimerazy III z komórek *He La* są sekwencje nukleotydowe zawarte wewnątrz genów tRNA. Również gen tRNA<sup>Arg</sup> plastydów pelargonii transkrybowany jest prawidłowo w oocytach żaby (114). Wykazano, że gen tRNA<sup>Arg</sup> zawiera także sekwencje homologiczne do wewnątrzgenowych sekwencji promotorowych znajdujących się w jądrowych genach tRNA. Polimeraza III z oocytów żaby nie transkrybuje genu 5 S RNA plastydów pelargonii.

Najlepiej poznana jest transkrypcja operonu rRNA plastydów kukurydzy. Geny 16 S, 23 S, 4,5 S i 5 S rRNA operonu kukurydzy transkrybowane są wspólnie dając jeden transkrypt (79). W rejonie przylegającym do końca 5' genu 16 S rRNA plastydów kukurydzy, tytoniu, szpinaku, gorczyicy i spirodeli znajduje się gen tRNA<sup>Val</sup> (116). W genomie plastydowym kukurydzy w pozycjach -420 (oznaczonych jako rejony f<sub>1</sub> lub p<sub>1</sub> operonu rRNA), -330 (miejsce f<sub>2</sub> lub p<sub>2</sub>) i -130 (miejsce f<sub>3</sub> lub p<sub>3</sub>) licząc od pierwszego transkrybowanego nukleotydu z końca 5' genu 16 S rRNA, rozmieszczone są rejony wiążące polimerazę RNA *E. coli*, która chroni te miejsca DNA przed działaniem DN-azy (ryc. 2). Miejsca chronione wykazują sekwencje homologiczne do sekwencji promotorowych genów *E. coli* (92).

Posługując się metodami mapowania z zastosowaniem odwrotnej transkryptazy (technika zwana „primer extension”), nukleazy S<sub>1</sub> oraz hybrydyzacji Southerna, w której próbą radioaktywną był prekursorowy 16 S rRNA znakowany na końcu 5' radioaktywnym GTP wykazano, że transkrypcja 16 S rRNA w operonie rRNA kukurydzy rozpoczyna się w pozycji -117 od

pierwszego transkrybowanego nukleotydu genu 16 S rRNA (117). Rejon ten odpowiada fragmentowi DNA wyznaczonemu wcześniej jako miejsce promotorowe  $p_3$ . Produkt transkrybowany z miejsca promotorowego  $p_3$  nie zawierałby tRNA<sup>Wal</sup>, który znajduje się w rejonie DNA od -302 do 231 przed genem 16 S rRNA. Stwierdzono, że transkrypcja genu tRNA<sup>Wal</sup> rozpoczyna się w zależności od stosowanego układu (homologicznego lub heterologicznego) w miejscach  $p_1$  lub  $p_2$  operonu rRNA kukurydzy (117). Miejsce promotorowe  $p_1$  jest rozpoznawane głównie w układzie homologicznym, natomiast polimeraza RNA *E. coli* rozpoznaje preferencyjnie miejsce promotorowe  $p_2$ . Gen tRNA<sup>Wal</sup> w operonie rRNA kukurydzy stanowi niezależną jednostkę transkrypcyjną. Chociaż sekwencje DNA rozpoznawane przez plastydowe polimerazy RNA nie są dokładnie poznane uważa się, że w plastydach podobnie jak u bakterii sekwencje promotorowe znajdują się w rejonach DNA przylegających do końca 5' genu.

Mechanizm regulacji transkrypcji plastydowych genów nie jest poznany. Wiadomo jednak, że światło jest jednym z czynników regulujących ekspresję plastydowych genów. Wykazano, że światło działające poprzez układ fitochromu zwiększa np: poziom plastydowych mRNA dla polipeptydu związanego z fotosystemem II (118).

## VI. Uwagi końcowe

Pomimo szeroko prowadzonych od dłuższego czasu badań, pochodzenie plastydów nie zostało wyjaśnione. Nie rozstrzygnęły tego problemu również ostatnie prace przedstawiające sekwencje nukleotydowe całego genomu plastydowego wątrobowca i tytoniu, roślin odległych ewolucyjnie. Wykazały jednak, że pomimo różnic w rozmiarach obu genomów, struktura i organizacja ich genów jest bardzo podobna, co sugeruje, że plastydy pochodzą od wspólnego przodka. Równocześnie potwierdziły wcześniejsze wyniki wskazując bardzo wyraźnie, że plastydowe geny są podobnie zorganizowane jak geny prokariotyczne. Z drugiej strony w plastydach stwierdzono występowanie sekwencji homologicznej do sekwencji mitochondrialnego DNA człowieka (54). Identyczne fragmenty rDNA znaleziono wcześniej w plastydach i mitochondriach kukurydzy (119). Wyniki te mogą wskazywać, że zarówno plastydy jak i mitochondria pochodzą od wspólnego przodka. Nie można również wykluczyć możliwości, że w toku ewolucji pomiędzy jądrem komórki a jej organelami dochodziło do wymiany materiału genetycznego (120). Poznanie sekwencji całego genomu plastydów jest podstawą dla dalszych prac nad wyjaśnieniem procesów replikacji i ekspresji plastydowych genów.

*Prof. dr hab. J. Pawelkiewiczowi i prof. dr hab. J. Augustyniakowi za przejrzenie rękopisu pracy i cenne uwagi krytyczne wyrażamy serdeczne podziękowania.*

*Artykuł otrzymano 4 grudnia 1986  
Zaakceptowano do druku 3 sierpnia 1987*

## PIŚMIENICTWO

1. Fluhr R., Edelman M., (1981), *Mol. Gen. Genet.* **181**, 484–490.
2. Jurgenson J. E., Bourque D. P., (1980), *Nucl. Acid Res.*, **8**, 3505–3516.
3. Herrmann R. G., Palta H. K., Kowallik K. V., (1980), *Planta*, **148**, 319–327.
4. Padmanabhan U., Green B. R., (1978), *Biochim. Biophys. Acta*, **521**, 67–73.
5. Kirk J. T. O., (1976) w: *Handbook of Biochemistry and Molecular Biology*, red. Fasman G. D., t. II, 356–362, CRC Press Cleveland.
6. Ee J. H. van, Man in' t Veld W., Planta R. J., (1980), *Plant Physiol.*, **66**, 572–575.
7. Hedberg M. F., Huang Y-S., Hommersand M. H., (1981) *Science*, **213**, 445–447.
8. Guillemaut P., Weil J. H., (1975), *Biochim. Biophys. Acta*, **407**, 240–248.
9. Bohnert H. J., Crouse E. J., Schmitt J. M., (1982) w: *Encyclopedia of Plant Physiology*, red. Parthier B., Boulter D., t. 14, B, 475–530.
10. Slavik N. S., Hershberger C. L., (1976), *J. Mol. Biol.*, **103**, 563–581.
11. Green B. R., Muir B. L., Padmanabhan U., (1977), w: *Progress in Acetabularia research*, red. Woodcock C.F.L., 107–122, Academic Press, London, New York.
12. Whitfeld P. R., Spencer D., (1968), *Biochim. Biophys. Acta*, **157**, 333–343.
13. Burton W. G., Grabowy C. T., Sager R., (1977), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **76**, 1390–1394.
14. Bolen P. L., Grant D. M., Swinton D., Boynton J. E., Gillham N. W., (1982), *Cell*, **28**, 355–343.
15. Kolodner R., Warner R. C., Tewari K. K., (1975), *J. Biol. Chem.*, **250**, 7020–7026.
16. Tewari K. K., (1979), w: *Nucleic Acids in Plants*, red. Hall T. C., Davies J. W., t. I, 41–108, CRC Press Boca Raton.
17. Bedbrook J. P., Kolodner R., (1979), *Ann. Rev. Plant. Physiol.*, **30**, 593–620.
18. Palmer J. D., (1982), *Nucl. Acid Res.*, **10**, 1593–1605.
19. Fluhr R., Edelman M., (1981), *Nucl. Acid Res.*, **9**, 6841–6853.
20. Rochaix J. D., (1978), *J. Mol. Biol.*, **126**, 597–617.
21. Rochaix J. D., (1981), *Experientia*, **37**, 322–332.
22. Rochaix J. D., Malnoe P., (1979), *Cell*, **15**, 661–670.
23. Gray P. W., Hallick R. B., (1977), *Biochemistry*, **16**, 1665–1671.
24. Gray P. W., Hallick R. B., (1978), *Biochemistry*, **17**, 284–289.
25. Orozco E. M., Gray P. W., Hallick R. B., (1980), *J. Biol. Chem.*, **255**, 10991–10996.
26. Stiegler G. L., Matthews H. M., Bingham S. E., Hallick R. B., (1982), *Nucl. Acid Res.*, **10**, 3427–3444.
27. Palmer J. D., Zamir D., (1982), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **79**, 5006–5010.
28. Seyer P., Kowallik K. V., Herrmann R. G., (1981), *Curr. Genet.*, **187**, 61–66.
29. Shen G. F., Chen K. W., Kung S. D., (1982), *Mol. Gen. Genet.*, **182**, 61–66.
30. Gordon K. H. J., Crouse E. J., Bohnert H. J., Herrmann R. G., (1981) *Theor. Appl. Genet.*, **59**, 282–296.
31. Gordon K. H. J., Crouse E. J., Bohnert H. J., Herrmann R. G., (1981) *Theor. Appl. Genet.*, **61**, 373–384.
32. Rawson J. R. Y., Clegg M. T., Thomas K., Reinehart C., Wood B., (1981), *Gene*, **16**, 11–19.
33. Bovenberg W. A., Kool A. J., Nijkaup H. J., (1981), *Nucl. Acid Res.*, **9**, 503–517.
34. Kumar A., Cocking E. C., Bovenberg W. A., Kool A. J., (1982), *Theor. Appl. Genet.*, **62**, 377–383.
35. Chu N. M., Oishi K. K., Tewari K. K., (1981), *Plasmid*, **6**, 279–292.
36. Palmer J. D., Thompson W. F., (1981), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **78**, 5533–5537.
37. Palmer J. D., Thompson W. F., (1982), *Cell*, **29**, 537–550.
38. Link G., (1981), *Nucl. Acid Res.*, **9**, 3681–3694.
39. Link G., Chambers S. F., Thompson J. A., Falk H., (1981), *Mol. Gen. Genet.*, **181**, 454–457.

40. Link G., Bogorad L., (1980), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **77**, 1832–1836.
41. Driesel A.J., Speiss J., Bohnert H.J., (1980), *Biochim. Biophys. Acta*, **610**, 297–310.
42. Schmitt J.M., Bohnert H.J., Gordon K.H.J., Herrmann R.G., Bernardi G., Crouse E.J., (1981), *Eur. J. Biochem.*, **117**, 375–382.
43. Westhoff P., Nelson N., Bunemann H., Herrmann R.G., (1981), *Curr. Genet.*, **4**, 109–120.
44. Whitfeld P.R., Herrmann R.G., Bottomley W., (1978), *Nucl. Acid Res.*, **5**, 1741–1751.
45. Groot G.S.P., von Harten Loosbroek N., (1981), *Curr. Genet.*, **4**, 187–190.
46. Ee J.H.S. van, Vos Y.J., Planta R.J., (1981), *Gene*, **12**, 191–200.
47. Bowman C.M., Koller B., Delius H., Dyer T.A., (1981), *Mol. Gen. Genet.*, **183**, 93–101.
48. Koller B., Delius H., (1980), *Mol. Gen. Genet.*, **178**, 261–269.
49. Schwarz Z., Jolly S.C., Steinmetz A., Bogorad L., (1981), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **78**, 3423–3427.
50. Larrinua J.M., Muskavitch K.M.T., Gubbins E.J., Bogorad L., (1983), *Plant. Mol. Biol.*, **2**, 129–140.
51. Kolodner R., Tewari K.K., (1979), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **76**, 41–45.
52. Mubumbila M., Bowman C.M., Droog F., Dyer T., Kuntz M., Weil J.H., (1985), *Plant Molecular Biology*, **4**, 315–320.
53. Heij H.T., Lustig H., Moeskops D.J., Bovenberg V.A., Bisanz C., Groot G.S., (1983), *Curr. Genet.*, **7**, 1–6.
54. Ohyama K., Fukuzawa H., Kohchi T., Shirai H., Sano T., Sano S., Umesono K., Shiki Y., Takeuchi M., Chang Z., Aota S., Inokuchi H., Ozeki H., (1986), *Nature*, **322**, 572–574.
55. Bedbrook J.R., Kolodner R., Bogorad L., (1979), *Cell*, **11**, 739–749.
56. Rawson J.R.Y., Koshner S.R., Vapnek D., Alton W., Boerma C.L., (1979), *Gene*, **3**, 191–209.
57. Loughney K., Lund E., Dahlberg J.E., (1982), *Nucl. Acid Res.*, **10**, 1607–1624.
58. Morgan E.A., Ikemura T., Nomura M., (1977), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **74**, 2710–2714.
59. Koch W., Edwards K., Kossel H., (1981), *Cell*, **25**, 203–213.
60. Takaiwa F., Sugiura M., (1982), *Nucl. Acid Res.*, **10**, 2665–2675.
61. Schwarz Z., Kossel H., (1979), *Nature*, **279**, 520–522.
62. Schwarz Z., Kossel H., (1980), *Nature*, **283**, 739–742.
63. Tohdoh N., Sugiura M., (1982), *Gene*, **17**, 213–218.
64. Graf L., Roux E., Stutz E., Kossel H., (1982), *Nucl. Acid Res.*, **10**, 6369–6381.
65. Rochaix J.D., Darlix J.L., (1982), *J. Mol. Biol.*, **159**, 383–395.
66. Delihias N., Andersen J., Sprouse H.M., Dudock B., (1981), *Nucl. Acid Res.*, **9**, 2801–2805.
67. Dyer T.A., Bowman C.M., (1979), *Biochem J.*, **183**, 595–604.
68. Corry M.J., Payne P.I., Dyer T.A., (1974), *FEBS Lett.*, **46**, 63–66.
69. Takaiwa F., Sugiura M., (1982), *Nucl. Acid Res.*, **10**, 5369–5373.
70. Edwards K., Bedbrook J., Dyer T.A., Kossel H., (1981), *Biochem. Int.*, **2**, 533–538.
71. Edwards K., Kossel H., (1981), *Nucl. Acid Res.*, **9**, 2853–2869.
72. Noller H.F., Woese C.R., (1981), *Science*, **212**, 403–410.
73. Glotz C., Zwieb C., Brimacombe R., Edwards K., Kossel H., (1981), *Nucl. Acid. Res.*, **9**, 3287–3306.
74. Shine J., Dalgarno L., (1975), *Nature*, **254**, 34–38.
75. Kossel H., Edwards K., Koch W., Schwarz Z., (1980), w *Biological Implications of Protein-Nucleic Acid Interactions*, red. Augustyniak J., 523–540, Elsevier North-Holland Biomedical Press. Amsterdam, New York.

76. Takaiwa F., Kusuda M., Sugiura M., (1982), *Nucl. Acid Res.*, **10**, 2257–2260.
77. Dyer T.A., Leaver C.J., (1981), w: *The Biochemistry of Plants*, red. Marcus A., t. VI, str. 111–168, Academic Press. London, New York.
78. Mackay R., Salgado D., Bonen L., Stackerbrandt E., Doolittle W.F., (1982), *Nucl. Acid Res.*, **10**, 2963–2970.
79. Strittmatter G., Kossel H., (1984), *Nucl. Acid Res.*, **12**, 7633–7647.
80. Grud D.J., Haselkorn B., (1976), *Biochim. Biophys. Acta*, **477**, 82–95.
81. McCrea J.M., Hershberger L., (1976), *Nucl. Acid Res.*, **3**, 2005–2018.
82. Haff L.A., Bogorad L., Corry M.J., Payne P.J., (1976), *Biochemistry*, **15**, 4105–4109.
83. Mecker R., Tewari K.K., (1982), *Biochim. Biophys. Acta*, **696**, 66–75.
84. Goździcka-Józefiak A., Augustyniak J., (1983), *FEBS Lett.*, **156**, 51–54.
85. Quigley F., Grienemberger J.M., Weil J.H., (1985), *Plant. Mol. Biol.* **4**, 305–310.
86. Krebbers E., Steinmetz A., Bogorad L., (1984), *Plant. Mol. Biol.*, **3**, 13–20.
87. Deno H., Kato A., Shinozaki K., Sugiura M., (1982), *Nucl. Acid Res.*, **10**, 7511–7520.
88. Whitfield P.R., Bottomley W., (1983), *Ann. Rev. Plant. Physiol.*, **34**, 279–310.
89. Driesel A.J., Mubumbila M., Keller M., Burkard G., Weil J., (1979), *Gene*, **6**, 285–306.
90. Malnoe P., Rochaix J.D., (1978), *Mol. Gen. Genet.*, **166**, 269–275.
91. Groot G.S., Harten-Loosbrock van N., (1981), *Curr. Genet.*, **4**, 187–190.
92. Schwarz Z., Kossel H., Schwarz E., Bogorad L., (1981), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **78**, 4748–4752.
93. Tohdoh N., Shinozaki K., Sugiura M., (1981), *Nucl. Acid Res.*, **9**, 5399–5406.
94. Hallick R.B., Gray P.W., Chelm B.K., Rushlow K.E., Orozco E.M., (1978), w: *Chloroplast Development*, red. Akoyunoglou G., Argyroudi-Akoyunoglou, str. 619–622, wyd. Elsevier, Amsterdam.
95. Hollingsworth M.J., Hallick R.B., (1982), *J. Biol. Chem.*, **257**, 12795–12799.
96. Orozco E.M., Hallick R.B., (1982), *J. Biol. Chem.*, **257**, 3265–3275.
97. Steinmetz A., Gubbins E.J., Bogorad L., (1982), *Nucl. Acid Res.* **10**, 3027–3037.
98. Sugiura M., Shinozaki K., Deno H., Sugita M., Ohme M., (1984), w: *Molecular Form and Function of Plants*, L-28, Renesse, Holandia.
99. Guillemaunt P., Weil J.H., (1982), *Nucl. Acid Res.*, **10**, 1655–1659.
100. Sugita M., Shinozaki K., Sugiura M., (1985), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **82**, 3557–3561.
101. Ohme M., Kamogashira T., Shinozaki K., Sugiura M., (1984), *Nucl. Acid Res.*, **12**, 6741–6749.
102. Michel F., Dujon B., (1983), *EMBO J.*, **2**, 33–38.
103. Willey D.L., Howe Ch.L., Auffret A.D., Bowman C.M., Dyer T.A., Gray J.C., (1984), *Mol. Gen. Genet.*, **194**, 416–422.
104. Alt J., Weshoff D., Sears B., Nelson N., Hurt E., Hauska G., Herrmann R.G., (1983), *EMBO J.*, **2**, 979–986.
105. Bergman P., Seyer P., Burkard G., Weil J.H., (1984), *Plant. Mol. Biol.* **3**, 29–36.
106. Bovenberg W.A., Howe J., Kool A.J., Nijkamp H., (1984), *Curr. Genet.*, **8**, 283–290.
107. Żurawski G., Bohnert H.J., Whitfield P.R., Bottomley W., (1982), *Proc. Natl. Acad. Sci., USA*, **79**, 7699–7703.
108. Żurawski G., Perot B., Bottomley W., Whitfield P.R., (1981), *Nucl. Acid Res.*, **9**, 3251–3270.
109. Oishi K.K., Tawari K.K., (1983), *Mol. Cell. Biol.*, **3**, 587–595.
110. Freyssinet G., Buetow D.E., (1984), *Isr. J. Bot.*, **33**, 107–131.
111. Gruissem W., Greenberg B.M., Żurawski G., Prescott D.M., Hallick R.B., (1983), *Cell*, **35**, 815–828.

112. Schwarz Z., Jolly S.O., Steinmetz A., Bogorad L., (1981), *Proc. Natl. Acad. Sci., USA*, **78**, 3423–3427.
113. Grissem W., Prescott D.M., Greenberg B.M., Hallick R.B., (1982), *Cell*, **30**, 81–92.
114. Detlef H., Metzloff M., Serfling E., (1984), *Nucl. Acid Res.*, **12**, 8253–8268.
115. Greenberg B.M., Grissem W., Hallick R.B., (1984), *Plant. Mol. Biol.*, **3**, 97–109.
116. Kossel H., Natt E., Strittmatter G., Fritsche E., Goździcka-Józefiak A., Przybył D., (1985), w: *Molecular Form and Function of the Plant Genome*, wyd. Vloten-Doting L., Groot G.S.P., Hall T.C. (Plenum Publishing Corporation, 1985).
117. Strittmatter G., Goździcka-Józefiak A., Kossel H., (1985), *EMBO J.*, **4**, 599–604.
118. Link G., (1982), *Planta*, **154**, 81–86.
119. Stern D.B., Lousdale D.M., (1982), *Nature*, **299**, 698–702.
120. Timmis J., Scott S., (1983), *Nature*, **395**, 56–67.



GABRIELA KORZUS\*, BOHDAN TURZYNA\*\*

## Proteinazy cysteinowe i ich endogenne inhibitory

### Cysteine proteinases and their endogenous inhibitors

#### Spis treści

- I. Wprowadzenie
- II. Proteinazy cysteinowe
  - II-1. Lizosomowe proteinazy cysteinowe
  - II-2. Cytozolowe proteinazy cysteinowe
  - II-3. Proteinazy cysteinowe pochodzenia bakteryjnego
  - II-4. Sekwencja aminokwasowa proteinaz cysteinowych
- III. Endogenne inhibitory proteinaz cysteinowych
  - III-1. Osoczowe inhibitory proteinaz cysteinowych
  - III-2. Tkankowe inhibitory proteinaz cysteinowych
  - III-3. Sekwencja aminokwasowa inhibitorów proteinaz cysteinowych
- IV. Uwagi końcowe

#### Contents

- I. Introduction
- II. Cysteine proteinases
  - II-1. Lysosomal cysteine proteinases
  - II-2. Cytosolic cysteine proteinases
  - II-3. Bacterial cysteine proteinases
  - II-4. Primary structure of cysteine proteinases
- III. Endogenous inhibitors of cysteine proteinases
  - III-1. Plasma inhibitors of cysteine proteinases
  - III-2. Tissue inhibitors of cysteine proteinases
  - III-3. Primary structure of cysteine proteinase inhibitors
- IV. Concluding remarks

Wykaz stosowanych skrótów: Bz-Arg-2-NNap — benzoilo-arginylo-2-naftylamid, Bz-Arg-NH<sub>2</sub> — benzoilo-arginyloamid, Bz-Arg-OEt-benzoilo-argininy ester etylowy, Z-Arg-Arg-2-NNap — karbobenzoksy-diarginylo-2-naftylamid, Arg-2-NNap — arginylo-2-naftylamid, Leu-

\* mgr, Katedra Diagnostyki Biochemicznej Akademii Medycznej, Pracownia Lipidowa, ul. Kopernika 17, 31-501 Kraków

\*\* dr, Zakład Biochemii Zwierząt, Instytut Biologii Molekularnej Uniwersytet Jagielloński, al. Mickiewicza 3, 31-120 Kraków

2-NNap – leucylo-2-naftyamid, Bz-Arg-Arg-2-NNap – benzoilo-diarginylo-2-naftyamid, Z-Phe-Arg-CHN<sub>2</sub> – karbobenzoksy-fenilo-arginylo-diazometan,  $\alpha_1$ -PI –  $\alpha_1$ -antyproteinaza,  $\alpha_1$ APG –  $\alpha_1$ -globulina ostrej fazy,  $\alpha_2$ M –  $\alpha_2$  makroglobulina,  $\alpha$ -CPI – wysokocząsteczkowy inhibitor osoczowy (Cysteine Proteinase Inhibitor), CPI- $\alpha$ -niskocząsteczkowy inhibitor z naskórka szczura, CPI- $\beta$ -niskocząsteczkowy inhibitor z wątroby szczura, LMW – niskocząsteczkowy kininogen, HMW – wysokocząsteczkowy kininogen, TAT – aminotransferaza tyrozyny, BANA – benzoilo-L-arginylo-2-naftyamid, Fr-P<sub>2</sub>-aza-fruktozo-1,6-difosfataza, G6PDH – dehydrogenaza glukozy-6-fosforanu, TPI (Thiol Proteinase Inhibitor), Z-Phe-Arg-NHMec – karbobenzoksy-fenilo-arginylo-4-metylo-7-kumarylamid, Z-Phe-Arg-AMC – karbobenzoksy-fenilo-arginylo-aminometylokumaryna, Z-Ala-Arg-Arg-4-Me-2-NNap – karbobenzoksy-alanylo-diarginylo-4-metoksy-2-naftyamid, EDTA – sól sodowa kwasu etylenodiaminotetraoctowego, kalpaina I – forma enzymu aktywna przy mikromolowych stężeniach jonów wapnia, kalpaina II – forma enzymu aktywna przy milimolowych stężeniach jonów wapnia.

## I. Wprowadzenie

Proteinazy są endopeptydazami, czyli enzymami rozkładającymi wiązania peptydowe wewnątrz łańcuchów białkowych. W zależności od rodzaju reszty aminokwasowej występującej w centrum aktywnym, obecnie wyróżnia się cztery grupy endopeptydaz:

- proteinazy serynowe (EC 3.4.21. –)
- proteinazy cysteinowe (EC 3.4.22. –)
- proteinazy aspartylowe (EC 3.4.23. –)
- metaloproteinazy (EC 3.4.24. –)

Proteinazy cysteinowe zawierające cysteinę w centrum aktywnym stwierdzono w wielu tkankach i narządach zwierzęcych oraz roślinnych. W zależności od lokalizacji subkomórkowej wyróżniamy proteinazy cysteinowe lizosomowe (katepsyny) lub cytosolowe (kalpaina), jakkolwiek wykryto je też w innych organellach komórkowych np. w jądrach hepatocytów szczura (1) oraz w mitochondriach płazów (2). W pewnych szczególnych warunkach enzymy mogą ulegać sekrecji poza komórkę (np. enzymy sekrecyjne makrofagów) zachowując swoje katalityczne własności. Aktywność powyższych proteinaz jest kontrolowana przez obecność swoistych inhibitorów w płynach ustrojowych i tkankach.

## II. Proteinazy cysteinowe

### II-1. Lizosomowe proteinazy cysteinowe

Proteinazy cysteinowe występujące w lizosomach (tabela 1) są glikoproteinami, mają podobne masy cząsteczkowe (z wyjątkiem katepsyny J), punkty izoelektryczne oraz optimum działania w kwaśnym środowisku, co stwarza szczególne preferencje dla ich wewnątrzlizosomowej aktywności. Z wyjątkiem katepsyny N, którą, jak dotychczas stwierdzono, cechuje tylko aktywność kolagenolityczna, pozostałe enzymy wykazują małą specyficzność substratową

Tabela 1

## Porównanie własności lizosomowych proteinaz cysteinowych

Proteinaza	Pochodzenie	$M_r \times 10^{-3}$	pI	Substrat	Optimum działania	Pismicznictwo
Katepsyna B	wątroba szczura	24—29	4.9—5.3	Z-Arg-Arg-2-NNAp, aldolaza	3.5	3
	wieprzowa śledziona	28 <sup>1</sup>		Z-Ala-Arg-Arg-4Me-2-NNap	6.1	4
Katepsyna H	wątroba szczura	26—28	7.1	BANA, Arg-2-NNap	6.0	5
Katepsyna L	wątroba szczura	22—24	5.8—6.1	Białka, G 6PDH	5.6	6, 7
	wątroba człowieka	29 <sup>2</sup>	5.7—6.3	Z-Phe-Arg-NHMec	4.5—5.5	8
Katepsyna T	wątroba szczura	33.5—35		Białka, TAT	6.9	9, 10, 11
	nerka szczura	33.5—35		Białka, TAT		
Katepsyna M	wątroba szczura	30		Aldolaza, Fr-P <sub>2</sub> -aza	5—7	12, 13
	wątroba królika	30.2		Aldolaza		
Katepsyna N	śledziona szczura	18—20	6.4	Kolagen	3.5—6.0	14
Katepsyna S	śledziona szczura	23—25	6.3—6.9	Białka	4.6—6.0	15
Katepsyna J	wątroba człowieka	230	5.8—6.1	Z-Phe-Arg-AMC	6.2—6.8	16
Indukowana proteinaza	wątroba szczura	20	5.8	Białka	3.5	17

1 — cząsteczka zbudowana z dwóch łańcuchów polipeptydowych o  $M_r = 23\ 000$  i 50002 — cząsteczka zbudowana z dwóch łańcuchów polipeptydowych o  $M_r = 25\ 000$  i 5000

Tabela 2

Występowanie katepsyny B, H i L w różnych tkankach ssaków

Enzym	Źródło izolacji	Piśmiennictwo
Katepsyna B	wątroba królika	13
	mięśnie szkieletowe szczura	18
	śledziona wieprzowa	19
	mózg szczura	24
Katepsyna H	śledziona wieprzowa	19
	mięśnie szkieletowe szczura	18
	wątroba szczura	20, 21
	wątroba człowieka	22
	płuca królika	23
	mózg człowieka	25
Katepsyna L	wątroba szczura	21, 26, 27
	nerka szczura	21, 28
	wątroba królika	29
	mięśnie szkieletowe królika	30
	śledziona wieprzowa	19
	wątroba człowieka	31
	śledziona szczura	21
	mózg człowieka	25

względem substratów białkowych. Najlepiej poznanymi proteinazami lizosomowymi są: katepsyna B (EC 3.4.22.1), katepsyna L (EC 3.4.22.15) i katepsyna H (EC 3.4.22.16), wyizolowane z różnych źródeł (tabela 2).

Najwcześniej odkrytą i najlepiej scharakteryzowaną katepsyną lizosomową jest katepsyna B wyizolowana z różnych tkanek ssaków wielu gatunków (3, 4, 13, 22, 32). Ostatnio, wyizolowano z fibroblastów szczura prekursor katepsyny B o masie cząsteczkowej 45 000–50 000 D (33, 34) oraz zidentyfikowano gen kodujący białko homologiczne z białkiem enzymu z wątroby szczura (34) i gen kodujący białko homologiczne z ludzką katepsyną D (35). W zależności od pochodzenia katepsyny B, jej masa cząsteczkowa wynosi od 24 000 do 28 000 D, a punkt izoelektryczny od pH 4.5 do 5.6. Enzym bardzo dobrze hydrolizuje syntetyczne (z maksymalną aktywnością w pH 6.0) pochodne argininy np. Bz-Arg-2-NNap, Bz-Arg-NH<sub>2</sub>, Bz-Arg-OEt. Katepsyna B jednakże większą aktywność (25–35 razy) przejawia względem syntetycznych pochodnych zawierających dwie reszty arginyłowe np. Z-Arg-Arg-2-NNap. Przypuszczano więc, że sekwencja Arg-Arg w substratach białkowych wyznacza punkty preferencyjnie rozcinanane przez katepsynę B. Badania produktów degradacji glukagonu, zawierającego dwie reszty arginyłowe (Arg<sub>17</sub>–Arg<sub>18</sub>), nie potwierdziły powyższej hipotezy. Stwierdzono, że enzym jest peptydyldipeptydazą odcinającą kolejno dipeptydy od C-końca glukagonu (36, 37). Katepsyna B wykazuje najwyższą aktywność wobec substratów białkowych przy pH 6.0, a poniżej pH

3.0 i powyżej pH 6.0 ulega inaktywacji. Hydroliza utlenionego łańcucha B insuliny wołowej przez enzym (38) świadczy o małej specyficzności katepsyny B. Dane doświadczalne wskazują, że katepsyna B dobrze hydrolizuje aldolazę, hemoglobinę, proteoglikan chrząstki, immunoglobulinę G, białka ściany bakteryjnej, fruktozo-1,6-difosfatazę, glukokinazę (22). Ponadto katepsyna B zdolna jest do degradacji kolagenu (14, 39) i białek miofibrylarnych: miozyny i aktyny (40) oraz proteolitycznej inaktywacji  $\alpha_1$ -antyproteinazy ( $\alpha_1$ -PI) (41).

Katepsyna H izolowana z różnych tkanek ssaków wielu gatunków (5, 19, 32, 42) może mieć masę cząsteczkową od 20 000 do 28 000 D i punkty izoelektryczne od pH 6.5 do 7.5. Z fibroblastów szczura wyizolowano prekursor katepsyny H o masie cząsteczkowej 50 000 D (33). W ostatnich latach zidentyfikowano ludzki i wołowy gen kodujący białko homologiczne z katepsyną H i B (43). Katepsyna H wykazuje niezwykłą specyficzność substratową, albowiem hydrolizuje substraty aminopeptydaz takie jak: Arg-2-NNap, Leu-2-NNap, peptydy, estry (5), co odróżnia ją od pozostałych proteinaz cysteinowych. Maksimum jej aktywności przypada przy pH od 6.0 do 7.0, nieznaczna aktywność przy pH 3.0–3.5, powyżej pH 7.0 jest już niestabilna. Podobnie jak katepsyna B, katepsyna H hydrolizuje syntetyczne substraty takie jak Bz-Arg-OEt, natomiast słabo hydrolizuje Bz-Arg-Arg-2-NNap. Katepsyna H, w przeciwieństwie do katepsyn B i L wyizolowanych z wątroby szczura, nie działa kolagenolitycznie. Natomiast z płuc królika wykazuje taką aktywność przy pH 3,5. *In vitro* katepsyna H inaktywuje aldolazę i glukokinazę (22) oraz  $\alpha_1$ -PI (44). Dobrym substratem katepsyny H jest azokazeina. Ogólnie, specyficzność katepsyny H względem substratów białkowych jest niska.

Ze względu na wysoką specyficzną aktywność proteolityczną, największe zainteresowanie spośród lizosomowych proteinaz cysteinowych, wzbudza katepsyna L. Wyizolowano, scharakteryzowano i porównano katepsyny L z różnych tkanek ssaków wielu gatunków (5, 6, 8, 45, 46). Wyizolowano również (33) z fibroblastów szczura trzy prekursor katepsyny L o masach cząsteczkowych 42 000, 43 000 i 45 000 D. Prekursor wyizolowany z fibroblastów królika (47) ma masę cząsteczkową 44 000 D i jest aktywny proteolitycznie. Katepsyna L wyizolowana z wątroby szczura ma masę cząsteczkową od 21 000 do 24 000 D i punkty izoelektryczne od pH 5.8 do 6.1. Z wyjątkiem Bz-Arg-NH<sub>2</sub>, enzym wykazuje słabą zdolność hydrolizy syntetycznych substratów. Optimum działania odpowiada pH 5.0, przy pH 6.0 i 4.0 enzym zachowuje 70–90% maksymalnej aktywności, a przy pH 7.0–30 do 40%. Dobrymi substratami katepsyny L są: kazeina, hemoglobina, albumina surowicy wołowej. Katepsyna L jest bardzo aktywna w degradacji nierozpuszczalnego kolagenu ścięgni wołu. Aktywność kolagenolityczna enzymu przy pH 3.5 jest 10 razy wyższa w porównaniu z aktywnością katepsyny B. Analiza produktów degradacji utlenionego łańcucha B insuliny (38) wskazuje, że najbardziej podatne na rozcinanie są miejsca substratu, gdzie pozycje P<sub>2</sub> i P<sub>3</sub> (reszty aminokwasowe na 2 i 3 pozycji od rozcinanego wiązania substratu w stronę N-końca) zajmują aminokwasy hydrofobowe takie jak: Phe-Phe, Phe-Val, Leu-Val, Leu-Tyr. Natomiast rodzaj

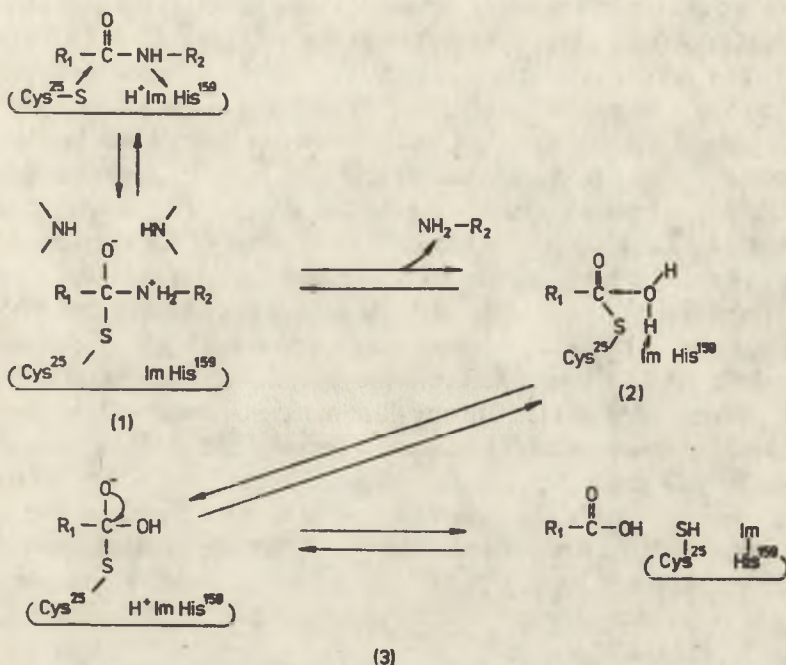
aminokwasu w pozycji  $P_1$  wydaje się być nieistotny. Aktywność enzymu względem takich białek jak: białka cytozolowe, azokazeina, proinsulina, insulina, glukagon,  $\gamma$ -globulina, miozyna, aktyna, kolagen czy histony, jest co najmniej 10 razy wyższa niż aktywność katepsyn B i H (48). Wśród białek cytozolowych substratami katepsyny L są enzymy uczestniczące w metabolizmie węglowodanów: dehydrogenaza glukozy-6-fosforanu, glukokinaza, dehydrogenaza aldehydu 3-fosfoglicerynowego, aldolaza. Ponadto katepsyna L jest zdolna do inaktywacji aminotransferazy ornityny i aminotransferazy tyrozyny (49).

Katepsyny B, H i L, obok katepsyny D, są głównymi endopeptydazami lizosomów. Na podstawie doświadczeń *in vitro* (48), można przypuszczać, że główny udział w degradacji białek wewnątrzkomórkowych przypada katepsynie L. Jest to zgodne z wynikami, jakie uzyskano w badaniach nad lokalizacją i dystrybucją omawianych enzymów w różnych tkankach szczura (5). Największe ilości katepsyn cysteinowych stwierdzono w nerce i komórkach parenchymalnych wątroby, to jest tam, gdzie wewnątrzkomórkowy obrót białek jest największy. Natomiast w narządach i komórkach wyspecjalizowane w degradacji białek zewnątrzkomórkowych (komórki Kupffera), główna aktywność proteolityczna lizosomów pochodzi od proteiny aspartylowej – katepsyny D.

Proteinazy lizosomowe biorą udział w obrocie wewnątrzkomórkowym białek. Dotyczy to przede wszystkim procesów degradacji białek zarówno pobranych z zewnątrz na drodze endocytozy jak i białek wewnątrzkomórkowych. Z badań *in vitro* wynika, że wewnątrzkomórkowa degradacja białek jest procesem selektywnym, to znaczy, że pewne białka są łatwiej degradowane niż inne. Dotyczy to białek o dużej masie cząsteczkowej, niskim punkcie izoelektrycznym oraz białek o wysokim stopniu uzewnętrznienia aminokwasów apolarnych. Przypuszcza się, że degradacja białek przez lizosomowe proteinazy cysteinowe przebiega wewnątrz lizosomów. Za tą hipotezą przemawia optimum działania katepsyn cysteinowych wobec substratów białkowych w kwaśnym środowisku, podczas gdy przy pH około 7 inaktywują się. Katepsyna M może występować w formie związanej z zewnętrzną powierzchnią lizosomów (12, 50), aktywnej w neutralnym środowisku, zdolnej *in vitro* do inaktywacji m.in. aldolazy fruktozo-1,6-dwufosforanu, dehydrogenazy glukozy-6-fosforanu. Dane doświadczalne wskazują, że proteinazy cysteinowe biorą udział w wewnątrzkomórkowej konwersji prekursorów wielu białek i peptydów do form aktywnych np.: proalbuminy do albuminy (kat. B) (51), proinsuliny do insuliny (kat. B i L) (52, 53), prokolagenazy do kolagenazy (kat. B) (54), proenkefalin do enkefalin (kat. B) (51), kalidyny do bradykininy (kat. H) (55). Biorąc pod uwagę przyjętą obecnie hipotezę potranslacyjnej modyfikacji enzymów lizosomowych (56), można przypuszczać, że procesy konwersji probiałek do form aktywnych przy udziale lizosomowych proteinaz cysteinowych przebiegają w aparacie Golgiego lub w pęcherzykach wydzielniczych.

Proteinazy cysteinowe zawierają w centrum aktywnym sulfhydrylową grupę cysteiny (Cys-25) i imidazolową grupę histydyny (His-159). Zablockowanie grupy sulfhydrylowej (Cys-25) centrum aktywnego przez swoiste inhibitory, np.

jodoacetamid, powoduje utratę zdolności katalitycznych proteinaz. Schemat hydrolizy substratów peptydowych przez proteinazy cysteinowe przedstawiono na Ryc. 1. W pierwszym etapie hydrolizy w centrum aktywnym enzymu powstaje



Ryc. 1. Schemat hydrolizy substratów peptydowych przez proteinazy cysteinowe, (1) – powstawanie oksyanionu w centrum aktywnym enzymu, (2) – przekształcenie oksyanionu w tioester, (3) – powrót enzymu do formy aktywnej (wg 57).

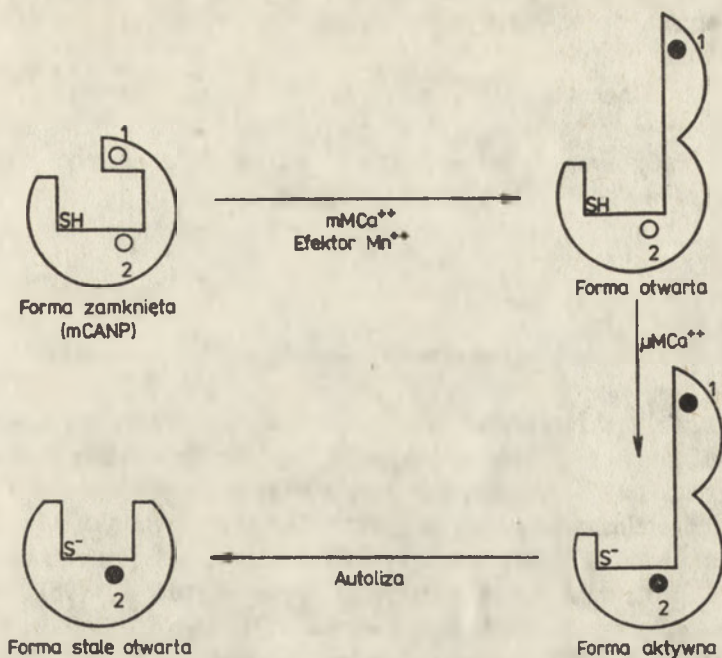
oksyanion (1) (stabilizowany przez wiązania wodorowe tworzące się pomiędzy grupami NH Gln-19 i Cys-25), który jest z kolei przekształcany w tioester (2). W następnym etapie, w obecności wody, zachodzi deacylacja tioestru, katalizowana przez grupę imidazolową His-159. Reakcja ta prowadzi do odtworzenia grupy karboksylowej w zhydrolizowanym substracie peptydowym z jednoczesnym uwolnieniem aktywnej formy proteinazy cysteinowej (57). Szczegółowe dane o mechanizmie działania proteinaz cysteinowych można znaleźć w pracach cytowanych w piśmiennictwie artykułu jako pozycje 58 do 63.

## II-2. Cytosolowe proteinazy cysteinowe

Najlepiej dotychczas poznaną cytosolową proteinazą cysteinową jest proteinaza aktywowana przez jony wapnia (EC 3.4.22.17, kalpaina). W komórkach występuje w dwóch formach jako tzw. kalpaina I (aktywowana przy stężeniach jonów wapnia niższych od 0.1 mM) i kalpaina II (wymagająca do aktywacji stężeń jonów wapnia powyżej 0.1 mM). Występowanie kalpainy stwierdzono w

wielu tkankach zwierzęcych (64–76). W niektórych tkankach, na przykład w mięśniach szkieletowych, w mięśniu sercowym i wątrobie szczura występują zarówno kalpaina I jak i kalpaina II (77), natomiast w analogicznych tkankach kurczaka tylko kalpaina II. Obydwie formy kalpainty są heterodimerami złożonymi z dwóch podjednostek: większej o masie 80 000 D i mniejszej o masie 30 000 D. Maksymalną aktywność wykazują one przy pH 6.8–8.0, a ich punkty izoelektryczne przypadają przy 4.6–5.5 (77, 78). Proteinazy te hydrolizują kazeinę na małe fragmenty peptydowe. Wykazano, że kalpaina hydrolizuje wiązania pomiędzy aminokwasami hydrofobowymi łańcucha B insuliny (79). Skład aminokwasowy podjednostek 80 KD i 30 KD obu form kalpainty jest bardzo zbliżony. Pewne różnice wykazano w obrębie podjednostek 80 KD (podjednostki 30 KD są w obu formach identyczne) (77). Centrum aktywne enzymu występuje w podjednostce 80 KD; blokowane jest ono przez jodoacetamid i inhibitor E 64 (specyficzny inhibitor proteinaz cysteinowych). Wskazuje to jednoznacznie, że kalpaina jest proteinazą cysteinową (77). Przypuszcza się, że podjednostka 30 KD może kontrolować aktywność podjednostki 80 KD poprzez nieznaną dotąd mechanizmy lub może stanowić rodzaj „kotwicy” wyznaczającej miejsce działania enzymu w komórce, czy też ochraniać podjednostkę 80 KD przed degradacją wewnątrz komórki (77, 80). Wrażliwość kalpainty na jony wapnia sugeruje, że kalpaina I jest aktywna w warunkach fizjologicznego stężenia jonów wapnia ( $10^{-7}$ ,  $10^{-6}$  M) natomiast kalpaina II jest w tych warunkach nieaktywna. Stwierdzono jednak dwie drogi aktywowania kalpainty II poprzez częściową autolizę i przez działanie efektora jakim są jony manganu (81, 82, 83). W obecności milimolowych stężeń jonów wapnia zachodzi ograniczona autoliza, podczas której zmienia się masa cząsteczkowa podjednostki z 80 KD do 79 KD, a później do 60 KD z jednoczesnym zwiększeniem wrażliwości kalpainty II na jony wapnia z 410  $\mu$ M (80 KD kalpaina II) do 30  $\mu$ M (60 KD kalpaina II). Kalpaina II jest nieaktywna w obecności milimolowych stężeń jonów manganu lub mikromolowych stężeń jonów wapnia, natomiast w obecności tych dwóch czynników razem staje się aktywna (77). Schemat ilustrujący hipotezę aktywacji kalpainty II przedstawiono na Ryc. 2. Według omawianej hipotezy kalpaina II zawiera dwa miejsca wiążące jony wapnia, stała dysocjacji miejsca pierwszego jest rzędu milimolowego a miejsca drugiego rzędu mikromolowego. Miejsce pierwsze znajduje się na powierzchni cząsteczki, podczas gdy miejsce drugie i grupa -SH centrum aktywnego wewnątrz cząsteczki. Gdy stężenie jonów wapnia podniesie się do poziomu milimolowego, jony wapnia wiążą się z miejscem pierwszym, co indukuje zmiany konformacyjne powodujące odsłonięcie miejsca drugiego i grupy -SH. Następuje wówczas przyłączenie jonów wapnia do miejsca drugiego i kalpaina II staje się aktywna. Jony manganu mogą przyłączać się do miejsca pierwszego zamiast jonów wapnia, powodując identyczne konsekwencje. Podczas autolizy „czapka” zostaje odłączona od cząsteczki i grupa -SH w centrum aktywnym oraz drugie miejsce wiążące jony wapnia są stale odsłonięte, a enzym przechodzi w formę permanentnie otwartą (77).





Ryc. 2. Schematyczny rysunek ilustrujący hipotezę na temat przebiegu aktywacji kalpajny II. O – wolne miejsce wiążące jony wapnia, ● – miejsce ze związanymi jonami wapnia, SH – grupa sulfhydrylowa w centrum aktywnym, S<sup>-</sup> – jon tiolanowy (aktywna forma grupy sulfhydrylowej centrum aktywnego) (wg 77).

Kalpaina wykazuje ograniczoną specyficzną substratową. Szereg enzymów takich jak: kinaza fosforylaza b, syntetaza glikogenowa, hydroksylaza tryptofanu czy kinaza C, są aktywowane przez kalpainę na drodze ograniczonej proteolizy (68). Kalpaina hydrolizuje również białka receptorów estrogenów, progesteronu, glukokortykoidów i epidermalnego czynnika wzrostu (77). Substratami kalpajny są także białka mięśni np.: troponina, tropomiozyna, łańcuch ciężki miozyny czy białko C oraz białka cytoszkieletowe takie jak: tubulina, desmina, filamina czy też białka neurofilamentów (68, 77). Na podstawie specyfiki substratowej kalpajny można wnioskować o roli kalpajny w procesach formowania kształtu komórek, ich ruchów czy agregacji. Kalpaina jest również jednym z mediatorów komórkowego metabolizmu jonów wapnia (84). Zmiany wewnątrzkomórkowego stężenia jonów wapnia wynikające ze zmienionej struktury i przepuszczalności błon mogą prowadzić do stanów patologicznych np. dystrofii mięśniowej. Podwyższenie stężenia jonów wapnia aktywuje kalpainę II, która hydrolizuje białka linii Z miofibrilli. W kolejnym etapie następuje bardzo wyraźny wzrost aktywności katepsyn lizosomowych i degradacja białek miofilamentów (84).

Z cytosolu komórek wątroby szczura wyizolowano również proteinazę cysteinową (85). Jej optimum działania przypada przy pH 7–8. Substratami tej proteinazy są: izolowane łańcuchy A i B insuliny oraz glukagon. Natomiast proinsulina, adrenokortykotropina czy zdenaturowana hemoglobina są odporne

na hydrolizę przez omawianą proteinazę cysteinową. Jej fizjologiczna rola nie jest jak dotychczas poznana.

Enzymy roślinne, takie jak: papaina, chymopapaina, bromelaina czy ficyna są także proteinazami cysteinowymi wyępującymi w cytozolu. Ponieważ w niniejszej pracy omawiane są głównie proteinazy zwierzęce i bakteryjne. Czytelnikom zainteresowanym informacjami na temat proteinaz roślinnych polecamy następujące artykuły przeglądowe wskazane w piśmiennictwie jako pozycje 58 oraz 86–88.

### II-3. Proteinazy cysteinowe pochodzenia bakteryjnego

Dotychczas opisano proteinazy cysteinowe z *Clostridium histolyticum* (89), *Serratia marcesces* (90), *Streptococcus* (91, 92), *Staphylococcus aureus* (93, 94). Masy cząsteczkowe wymienionych proteinaz są różnicowane (od 12 500 D w przypadku proteinazy *Staphylococcus* do 55 000 D w przypadku  $\alpha$ -klostripainy z *Clostridium histolyticum*). Również optima działania tych proteinaz są różne: w przypadku proteinazy *Sacharomycopsis lipolytica* pH 4.2 (95), 5.0–8.0 w przypadku enzymu *Staphylococcus aureus* (94), czy 6.0–9.0 w przypadku proteinazy *Serratia* (90). Ostatnio wykazano hamowanie aktywności proteinazy *Staphylococcus aureus* przez  $\alpha_2$ M osocza końskiego i  $\alpha_1$ APG osocza szczura z reakcją ostrej fazy (94).

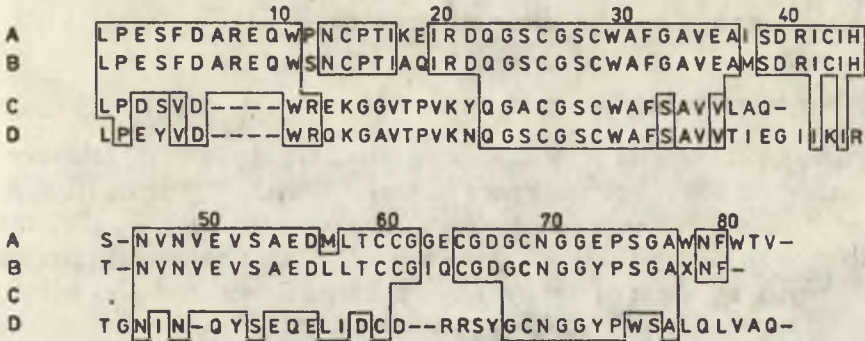
Zbadano strukturę pierwszorzędową wokół aktywnej reszty cysteinowej  $\alpha$ -klostripainy (96) i proteinazy *Streptococcus* (92) i nie wykazano podobieństwa do analogicznego regionu w papainie i katepsynie B.

Mikroorganizmy, a szczególnie bakterie wytwarzają również inhibitory enzymów proteolitycznych w tym proteinaz cysteinowych. Są to z reguły drobnocząsteczkowe związki o charakterze oligopeptydowym. Najlepiej poznany inhibitorem jest leupeptyna wyizolowana z płynów hodowlanych *Streptomyces* (97). Leupeptyna stanowi mieszaninę dwóch trójpeptydów (98). Wewnątrz komórek bakteryjnych syntetyzowany jest kwas leupeptynowy (nie wykazujący własności inhibitorowych), który po redukcji do leupeptyny ulega sekrecji do środowiska. Leupeptyna hamuje aktywność takich proteinaz cysteinowych jak katepsyna B, papaina, kalpaina, katepsyna L i H (5, 15, 16, 17, 48).

### II-4. Sekwencje aminokwasowe proteinaz cysteinowych

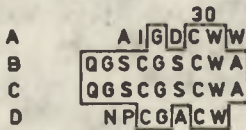
Porównanie sekwencji aminokwasowej N-końcowych części cząsteczek proteinaz cysteinowych wskazuje na wysoki stopień podobieństwa katepsyn i papainy. Ilustruje to Ryc. 3.

Szczególnie wysoki stopień podobieństwa odnajdujemy w katepsynie B wątroby szczura i śledziony wołu. Spośród pierwszych 80 reszt aminokwasowych



**Ryc. 3.** Sekwencje aminokwasowe proteinaz cysteinowych, A – katepsyna B śledziony wołu, B – katepsyna B wątroby szczura, C – katepsyna L śledziony wołu, D – papaina (wg 99).

jedynie 9 reszt nie jest identycznych. Na rycinie pokazano również duże podobieństwo N-końcowej części cząsteczki katepsyny L i papainy. W katepsynie B stwierdzono mostek dwusiarczkowy pomiędzy Cys-14 a Cys-43, który nie występuje w katepsynie L i w papainie. Cys-29 znajduje się w centrum aktywnym papainy, katepsyny B i L. Szczególnie stały ewolucyjnie jest region centrum aktywnego wokół Cys-29 zarówno w cząsteczkach katepsyn B, H, L jak i w cząsteczce roślinnej proteinazy cysteinowej – papainy. Następnym fragmentem o dużym podobieństwie jest region 69–73 w katepsynie B i papainie, prawdopodobnie jako konsekwencja mostka dwusiarczkowego Cys-26 a Cys-69 (99, 100). Rycina 4 przedstawia sekwencje aminokwasów wokół aktywnej reszty cysteiny w kalpainie i w innych proteinazach cysteinowych (101). Widoczne jest



**Ryc. 4.** Porównanie sekwencji aminokwasowej kalpainy i sekwencji innych proteinaz cysteinowych, A – kalpaina mięśni szkieletowych kurczaka, B – katepsyna B wątroby szczura, C – papaina, D – bromelaina (wg 101).

również duże podobieństwo strukturalne regionu centrum aktywnego kalpainy oraz odpowiednich regionów innych proteinaz cysteinowych, co sugeruje ich wspólne pochodzenie. Pomimo podobieństwa regionu centrum aktywnego kalpaina różni się zasadniczo od pozostałych proteinaz cysteinowych. Różnice te dotyczą większej masy cząsteczkowej kalpainy oraz konieczności aktywacji przez jony wapnia. Na tej podstawie wysunięto hipotezę, że enzym ten jest produktem fuzji genu proteinazy cysteinowej i genu białka wiążącego wapń (102).

### III. Endogenne inhibitory proteinaz cysteinowych

#### III-1. Osoczowe inhibitory proteinaz cysteinowych

Pierwsze doniesienia o obecności w osoczu specyficznych inhibitorów proteinaz cysteinowych pojawiły się w końcu lat 70-tych. Wykazano (103), że w surowicy człowieka występuje wysokocząsteczkowy inhibitor ( $\alpha_2$ -CPI, masa cząsteczkowa – 90 000 D), który hamuje aktywność roślinnych proteinaz cysteinowych tj. papainy, ficyny i bromelainy. Dalsze badania wykazały obecność takiego inhibitora także w osoczu ludzkim (104, 105) oraz w surowicy szczura (106) i wołu (107).

W surowicy ludzkiej obecne są dwie formy ( $\alpha_1$ -CPI,  $\alpha_2$ -CPI) (105) lub trzy formy ( $\alpha_1$ -CPI,  $\alpha_2$ -CPI<sub>1</sub>,  $\alpha_2$ -CPI<sub>2</sub>) (108) inhibitora. Wszystkie są glikoproteinami o punkcie izoelektrycznym przypadającym przy pH mniejszym od 7.0. Formy  $\alpha_1$ -CPI i  $\alpha_2$ -CPI dają krzyżową reakcję immunologiczną, dlatego często określa się je jako  $\alpha$ -CPI lub  $\alpha$ -TPI. Wykazano, że  $\alpha$ -CPI hamuje lizosomalne katepsyny cysteinowe, cytozolową proteinazę – kalpainę i proteinazę pochodzenia roślinnego – papainę (103, 104, 109). Wartości stałych kinetycznych reakcji  $\alpha$ -CPI z proteinazami cysteinowymi (110, 111) pozwalają sądzić, że jedną z fizjologicznych funkcji  $\alpha$ -CPI jest hamowanie katepsyny L.

W 1983 roku (112) wyizolowano z surowicy szczura inhibitor proteinaz cysteinowych o masie cząsteczkowej 68 000 D i wykazano, że jest on identyczny z tzw.  $\alpha_1$ -globuliną ostrej fazy ( $\alpha_1$ -APG) (115). Reakcja ostrej fazy jest odpowiedzią organizmu w początkowym okresie infekcji (lub po urazie) i charakteryzuje się między innymi znacznym podwyższeniem stężenia niektórych białek osoczowych zwanymi białkami ostrej fazy (np.  $\alpha_2$ M, haptoglobina, fibrynogen).  $\alpha_1$ -APG opisana po raz pierwszy w 1964 roku (114) występuje w osoczu szczurów zdrowych w stężeniu 0,5 mg/ml. U szczurów z reakcją ostrej fazy następuje kilkakrotny przyrost stężenia tego białka w osoczu (115), jednakże jego funkcja nie była dotychczas poznana. Oprócz aktywności antyproteolitycznej  $\alpha_1$ -APG pełni rolę kininogenu (prekursora hormonów tkankowych – kinin) w osoczu szczura (116), podobnie jak wysokocząsteczkowe inhibitory proteinaz cyteinowych osocza człowieka i wołu (117, 118, 119). W 1984 roku określono sekwencję aminokwasową sklonowanego ludzkiego  $\alpha_2$ -CPI i stwierdzono identyczność sekwencji z wołowym niskocząsteczkowym kininogenem (LMW) (108). Na podstawie badań immunologicznych, kinetycznych i analizy sekwencji aminokwasowej potwierdzono tożsamość  $\alpha_2$ -CPI i LMW oraz  $\alpha_1$ -CPI i wysokocząsteczkowego kininogenu HMW (117). Dane kinetyczne dotyczące aktywności inhibitorowej kininogenów LMW i HMW z surowicy człowieka, szczura i wołu (118) potwierdziły poprzednie wyniki. Ostatnie doniesienia (120) wskazują, że niskocząsteczkowy kininogen z osocza człowieka zawiera trzy domeny o znacznej homologii w N-końcowej części cząsteczki, przy czym jedna z tych domen nie zawiera sekwencji Gln-Val-Val-Ala-Gly i nie hamuje aktywności proteinaz cysteinowych. W dwóch pozostałych domenach kininogenu sekwencja

ta jest obecna, dzięki czemu domeny te wykazują działanie inhibitorowe, a stosunek stechiometryczny reakcji enzym:inhibitor wynosi 2:1. Jedna z domen hamuje zarówno proteinyazy lizosomowe (katepsyna B, H i L), jak i proteinyazę cytosolową kalpainę.

W 1982 roku w dwu pracowniach wykazano niezależnie obecność niskocząsteczkowych inhibitorów w surowicy ssaków (121, 122). Z surowicy szczura (121) wyizolowano białko o masie cząsteczkowej 16 000 D hamujące katepsynę H i papainę, a z surowicy człowieka białko o podobnej masie cząsteczkowej hamujące aktywność katepsyny B i H (122). Istnienie takich inhibitorów potwierdzili też inni autorzy (107, 123). Pod względem parametrów molekularnych, własności inhibitorowych i sekwencji aminokwasowej niskocząsteczkowe osoczowe inhibitory przypominają inhibitory tkankowe.

### III-2. Tkankowe inhibitory proteinaz cysteinowych

Tkankowe inhibitory proteinaz cysteinowych wyizolowano z komórek różnych tkanek ssaków oraz z płynów ustrojowych (100, 122, 124, 125). W 1985 roku Barrett zaproponował dla takich inhibitorów nazwę cystatyny (126). W tkankach i płynach ustrojowych człowieka występują cystatyny różniące się strukturą i właściwościami, oznaczono je przeto jako cystatyny A, B, C i S. Także w innym materiale występują cystatyny o podobnych właściwościach, niekiedy nawet identyczne pod względem immunologicznym i sekwencji aminokwasowej, dlatego też określa się je jako cystatyny typu A, B i C.

U człowieka cystatyna A występuje w wątrobie (127), wielojądrzastych granulocytach (128), śledzionie (129), ślinie, łzach i płynie owodniowym (124) oraz w spermie (124, 130). Pod względem sekwencji aminokwasowej cystatyna A przypomina epidermalny CPI szczura (CPI- $\alpha$ ) (131). W wątrobie szczura nie wykazano cystatyny A, natomiast jest ona obecna w innych tkankach i narządach takich jak: skóra, pochwa, przewód pokarmowy.

Cystatynę B wyizolowano z wątroby człowieka i szczura (127, 132, 133), śledziony człowieka (129). Wykazano, że cystatyna B jest syntetyzowana i może być wydzielana przez monocyty krwi ludzkiej (126).

Cystatyna C (wcześniej znana jako niskocząsteczkowe zasadowe białko wędrujące w strefie  $\gamma$ -globulin) występuje w dużej ilości w komórkach neurosekrecyjnych, w płynie mózgowo-rdzeniowym i płynie nasiennym (134). W normalnym osoczu stężenie cystatyny C jest niskie (0.08  $\mu$ M). Podwyższone stężenie tego białka zaobserwowano w surowicy człowieka z chorobą autoalergiczną (135), w moczu człowieka z niewydolnością nerek (134). Pod względem aktywności i struktury przypomina bardzo dobrze scharakteryzowany inhibitor z jaja kurzego (136). Inhibitor ten występuje także w surowicy kurzej (136), a ostatnio przy pomocy techniki immunohistochemicznej zlokalizowano go w cytoplazmie komórek mięśniowych kury (137).

Niskocząsteczkowy inhibitor proteinaz cysteinowych wyizolowany ze śliny i gruczołów ślinowych człowieka (138) nazywany cystatyną S przypomina niskocząsteczkowy inhibitor surowicy ludzkiej.

Cystatyny są białkami o niskiej masie cząsteczkowej w zakresie 11 000 – 14 000 D, nie zawierają części cukrowej. Występują w wielu formach różniących się punktem izoelektrycznym. Punkty izoelektryczne tych inhibitorów przypadają przy pH mniejszym od 7,0, z wyjątkiem ludzkich cystatyn A i B (o pI 8.1 i 9.5). Są to białka wyjątkowo stabilne zachowują aktywność przy różnych pH, są odporne na działanie wysokiej temperatury (127, 139, 140), a niektóre z nich nie tracą aktywności nawet podczas gotowania jak np. cystatyna jaja kurzego (126).

Niskocząsteczkowe inhibitory proteinaz cysteinowych hamują zarówno proteinazy pochodzenia zwierzęcego (katepsyny B, H, L) jak i proteinazy roślinne (papaina, chymopapaina, ficyna). Inhibitory endopeptydaz na ogół nie hamują egzopeptydaz, jednakże wykazano, że cystatyny mają zdolność hamowania dipeptydylopeptydazy I (katepsyna C) (127, 136). Poszczególne cystatyny różnią się powinowactwem do hamowanych enzymów (Tabela 3). Spośród

Tabela 3

Wartości  $K_i$  (nanomole) reakcji hamowania proteinaz cysteinowych przez ludzkie cystatyny i L-kininogen ( $\alpha$ -CPI) (141)

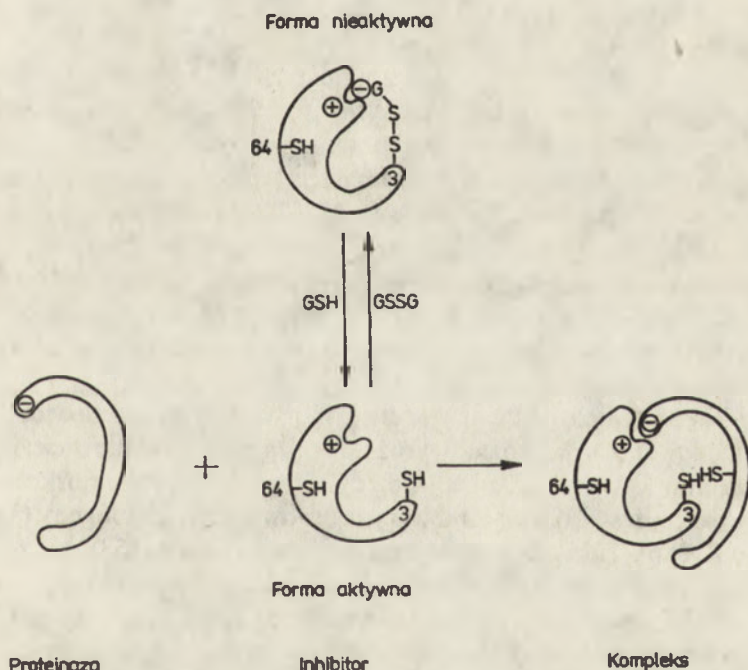
	Cystatyna A	Cystatyna B	Cystatyna C	L-kininogen
Papaina	0.019	0.12	0.005	0.015
Katepsyna B	8.2	73	0.25	600
Katepsyna H	0.31	0.58	0.28	1.2
Katepsyna L	1.3	0.23	0.005	0.017
Dipeptydylopeptydaza I	33	0.23	3.5	130
Kalpaina	10 000	10 000	10 000	1.0

omawianych ludzkich inhibitorów, cystatyna C wykazuje najsilniejsze działanie inhibitorowe w stosunku do ludzkich proteinaz cysteinowych. Cystatyny nie hamują proteinazy zależnej od jonów wapnia (126, 127, 132, 133, 134, 136, 142, 143). Kalpaina jest enzymem, którego aktywność jest hamowana przez niektóre niskocząsteczkowe inhibitory pochodzenia bakteryjnego (leupeptyna), przez wysokocząsteczkowe inhibitory np. kininogen oraz przez swoisty, endogeny inhibitor zwany kalpastatyną. Obecność kalpastatyny stwierdzono w komórkach mięśni szkieletowych kury (144), królika (145), wołu (146), mięśnia sercowego wołu (147) czy w ludzkich erytrocytach (68, 74). Kalpastatyna charakteryzuje się stosunkowo dużą masą cząsteczkową rzędu 250 000 – 300 000 D, będącą wynikiem agregacji mniejszych pojednostek o masie 34 000 – 70 000 D, w zależności od materiału, z którego została wyizolowana. Kalpastatyna jest białkiem termostabilnym o niskiej zawartości aminokwasów aromatycznych oraz niskim punkcie izoelektrycznym przypadającym przy pH 4.55. Kalpastatyna tworzy kompleksy zarówno z kalpainą I jak i kalpainą II nie wykazując specyfiki tkankowej. Hamowanie aktywności kalpainskiej zachodzi w obecności mikromolowych stężeń jonów wapnia, a kalpainskiej II przy stężeniach milimolo-

wych. Tworzenie kompleksu kalpaina-kalpastatyna jest reakcją odwracalną; po rozdysocjowaniu tego kompleksu w obecności EDTA, zarówno enzym jak i inhibitor odzyskują pełną aktywność (148). Stosunek stechiometryczny reakcji inhibitor:enzym waha się w zakresie od 0.24 do 2 w zależności od materiału, z którego został wyizolowany inhibitor i enzym (77).

Cystatyny hamują aktywność proteinaz w sposób odwracalny. Cystatyna jaja kurzego hamuje kompetycyjnie papainę w stosunku stechiometrycznym 1:1. Kompleks cystatyna-papaina ulega dysocjacji podczas denaturacji w nieobecności czynników redukujących, dlatego też wyklucza się tworzenie stabilnego wiązania kowalencyjnego (np. wiązania dwusiarczkowego) przy powstawaniu kompleksu.

W przypadku cystatyny z wątroby szczura, *in vitro* reszta cysteinowa w pozycji 3 uczestniczy w regulowaniu działania inhibitora poprzez tworzenie i redukcję mieszanych mostków dwusiarczkowych, a *in vivo* działanie cystatyny może być regulowane przez zmiany stężenia zredukowanego glutationu lub przez zmiany stosunku grup -SH do utlenionego glutationu (149, 150). Hipotezę przebiegu regulacji aktywności proteinaz cysteinowych przedstawia Ryc. 5. Trzeba jednak zaznaczyć, że aktywna reszta cysteinowa enzymu oraz reszta cysteinowa w pozycji 3 inhibitora nie są bezpośrednio zaangażowane w reakcję



Ryc. 5. Schemat regulacji aktywności proteinaz cysteinowych. Stosunek ilościowy zredukowanego glutationu (GSH) do utlenionego (GSSG) jest czynnikiem regulującym aktywność inhibitora. W obecności wyższego stężenia glutationu zredukowanego inhibitor przechodzi w formę aktywną i tworzy kompleks z enzymem (wg 149).

enzym – inhibitor, ponieważ karboksylowany enzym lub inhibitor nadal zachowują zdolność do tworzenia kompleksów (116). Ponadto niektóre inne cystatyny (np. CPI- $\alpha$ , cystatyna A) nie zawierają reszt cysteinowych. Potwierdza to hipotezę, że reszta cysteinowa inhibitora może uczestniczyć, lecz nie jest konieczna w reakcji hamowania, a proponowany schemat może dotyczyć tylko pewnej grupy cystatyn.

Mechanizm hamowania proteinaz cysteinowych przez cystatyny pod pewnymi względami przypomina mechanizm hamowania proteinaz serynowych przez ich inhibitory. Cystatyny wiążą się z aktywnym miejscem enzymu w sposób podobny do wiązania substratu, a stałe szybkości oraz stałe równowagi osiągają wielkości tego samego rzędu jak odpowiednie wartości wyznaczone w przypadku inhibitorów proteinaz serynowych (151).

### III-3. Sekwencje aminokwasowe inhibitorów proteinaz cysteinowych

W ostatnich latach poznano sekwencje aminokwasowe wielu niskocząsteczkowych i wysokocząsteczkowych inhibitorów proteinaz cysteinowych: cystatyny B z wątroby szczura (152), cystatyny A z naskórka szczura (CPI- $\alpha$ ) (131), cystatyny A z granulocytów człowieka (153), cystatyny z jaja kurzego (99, 154), cystatyny C z osocza człowieka (135), cystatyny S z gruczołów ślinowych człowieka (143), cystatyny B z wątroby człowieka (155),  $\alpha$ -CPI z osocza człowieka (108) i szczura (156).

Rysunek 6 przedstawia sekwencje aminokwasowe powyższych inhibitorów. Sekwencja aminokwasowa  $\alpha$ -CPI składa się z trzech fragmentów: segment 1, 2 i 3, których skład aminokwasowy przypomina niskocząsteczkowe inhibitory. Obserwuje się dużą homologię w centralnych częściach cząsteczek cystatyn oraz segmentów  $\alpha$ -CPI (reszty aminokwasowe 47–74). Prawdopodobnie region ten jest istotny dla aktywności biologicznej omawianych inhibitorów. Fragment 53–57 większości wskazanych inhibitorów zawiera sekwencje Gln-Val-Val-Ala-Gly. Syntetyczne peptydy o identycznej strukturze hamują aktywność papainy (157), co potwierdza hipotezę o niezbędności tego fragmentu w cząsteczce inhibitora.

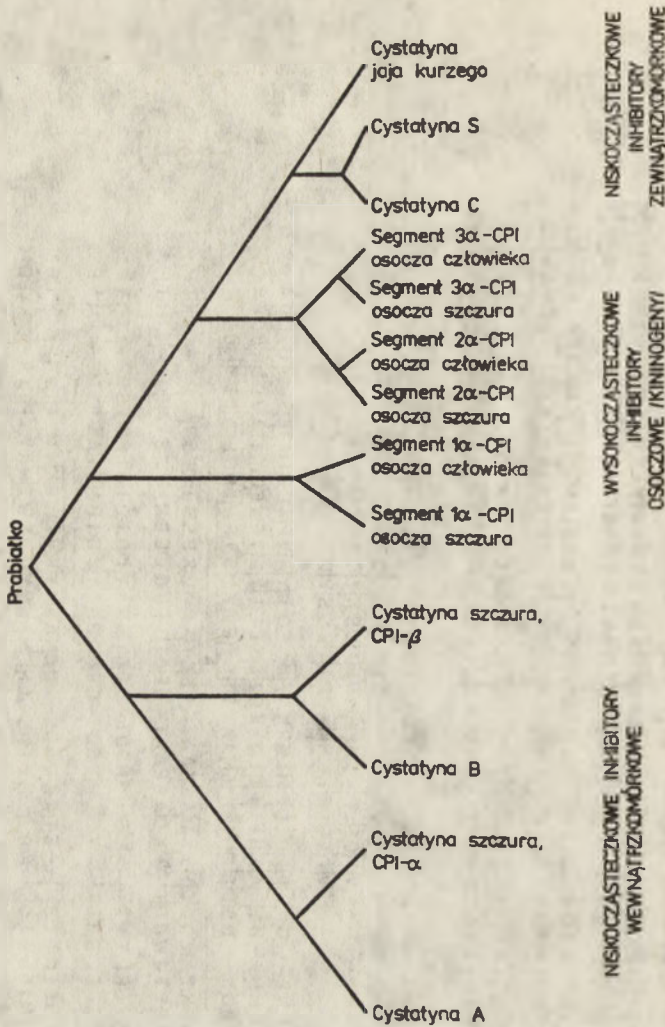
Ogólnie, wśród omawianych, w miarę jednorodnych pod względem struktury pierwszorzędowej białek, można wyróżnić trzy grupy, a mianowicie: cystatyny wewnątrzkomórkowe (1, 2, 3, 4 Ryc. 6), cystatyny zewnątrzkomórkowe (5, 6, 7 Ryc. 6), wysokocząsteczkowe inhibitory osocze, czyli kininogeny (8a, 8b, 8c, 9a, 9b, 9c Ryc. 6). Taki też podział przyjmuje się obecnie (158).

Podobieństwa sekwencji aminokwasowej białek tu omawianych sugerują wspólne ewolucyjne pochodzenie od pierwotnego „prabiałka”. Rycina 7 przedstawia hipotetyczne drzewo rodowe inhibitorów proteinaz cysteinowych. Ewolucyjne zmiany w obrębie niskocząsteczkowych inhibitorów mogły następować poprzez delekcje czy insercje krótkich odcinków genu. Natomiast wysokocząsteczkowe inhibitory mogły powstać przez podwójną, oddzieloną w czasie duplikację genu (159).



1	MIPGGLSFAKPA	P	E	I	Q	F	I	V	D	K	V	K	P	Q	E	E	K	T	N	E	T	Y	---	G	K	L	E	A	V	Q	V	K	I	T	Q	V	A	G	T	N	Y																				
2	MDPG--TT	G	I	V	G	V	S	E	A	K	P	A	T	P	E	I	Q	E	V	A	D	K	V	K	R	Q	L	E	E	K	T	N	E	K	Y	---	E	K	F	V	E	V	E	K	S	Q	V	A	G	I											
3	MMCGAPS	A	T	Q	P	A	T	E	I	Q	H	A	D	O	V	R	S	Q	E	E	K	N	K	F	---	P	V	F	K	A	S	F	K	S	Q	V	A	G	T	N	Y																				
4	MMCGAPS	A	T	M	P	A	T	E	I	Q	E	I	A	D	K	V	K	S	Q	L	E	E	K	N	K	F	---	D	V	F	K	A	S	F	R	I	Q	V	A	G	T	N	Y																		
5	SSPGKPPRL	V	G	G	P	M	A	S	V	E	E	G	V	R	R	A	L	D	F	A	V	G	V	N	K	A	S	N	D	M	Y	H	S	R	A	L	V	V	R	A	R	K	I	Q	I	V	A	G	V	N	Y										
6	IIPGGIY	D	A	D	L	N	D	E	W	G	R	A	I	H	F	A	T	S	E	N	K	A	T	E	D	E	Y	R	R	P	L	O	V	L	R	A	R	E	O	T	F	G	V	N	Y																
7	SEDRSRLL	G	A	P	P	V	D	E	N	D	E	G	L	O	R	A	I	Q	F	A	M	A	E	K	N	R	A	S	N	D	K	Y	S	R	V	R	V	I	S	A	K	R	Q	L	V	I	S	G	I	K	Y										
8a	QESQSE	I	D	C	N	D	K	D	E	K	A	V	A	A	L	K	K	N	S	O	N	S	N	O	F	V	L	R	I	T	E	A	T	K	T	V	G	S	D	T	F	Y																			
9a	QEEGAQ	E	M	D	R	N	D	E	T	V	Q	A	V	D	T	A	L	K	K	N	A	E	L	E	S	G	N	O	F	L	L	R	V	T	E	G	T	K	K	D	G	A	E	T	L	Y															
8b	AE	G	P	V	T	A	Q	D	C	I	G	C	V	H	P	I	S	O	S	P	O	L	E	P	I	T	I	R	H	G	I	Q	F	N	N	T	Q	H	S	S	L	F	M	L	N	E	V	K	R	A	I	Q	R	O	V	V	A	G	I	N	F
9b	R	K	G	P	K	T	E	E	D	C	V	G	C	F	O	P	I	M	D	S	O	I	K	P	V	I	K	H	A	V	E	H	N	N	T	K	H	T	H	I	F	A	L	T	K	I	K	S	A	H	S	O	V	V	A	G	M	D	Y		
8c	G	K	D	F	O	P	P	T	K	I	C	V	G	C	P	R	I	P	T	N	S	P	E	T	E	T	H	T	T	K	L	N	A	E	N	N	I	A	T	F	Y	F	K	I	O	N	V	K	A	R	I	Q	V	V	A	G	K	K	Y		
9c	G	D	L	F	S	K	K	P	L	I	C	F	G	K	N	I	P	V	D	S	P	G	I	K	E	A	L	G	H	S	I	A	Q	L	A	Q	H	N	H	L	F	Y	F	K	I	D	T	V	K	A	I	S	Q	V	V	A	G	T	K	Y	
1	V	I	K	V	R	A	G	D	N	K	Y	M	H	L	K	---	---	---	V	F	K	S	L	P	G	O	N	E	---	D	L	V	L	T	G	Y	Q	V	D	K	N	K	D	D	E	L	T	G	F												
2	F	M	K	V	D	V	G	N	R	F	L	H	M	K	---	---	---	V	L	R	G	L	S	G	D	---	D	L	K	L	D	Y	Q	T	N	K	T	K	N	D	E	L	T	D	F																
3	F	I	K	V	H	G	D	E	F	V	H	L	R	---	---	---	V	F	Q	S	L	P	H	E	N	K	---	P	L	T	L	S	N	I	Q	T	N	K	A	K	H	D	E	L	T	Y															
4	F	I	K	V	D	V	G	E	K	V	H	L	R	---	---	---	V	F	E	R	L	P	H	E	N	K	---	P	L	T	L	S	N	I	Q	T	N	K	A	K	H	D	E	L	T	Y															
5	F	L	D	V	E	L	G	R	T	I	C	I	K	T	O	N	L	---	D	N	C	P	F	H	D	P	F	H	L	K	R	K	A	F	C	S	F	Q	I	V	A	V	P	S	O	G	T	M	T	S	K	S	I	C	O	D	A				
6	F	F	D	V	E	V	G	R	T	I	C	I	K	S	O	P	N	---	D	T	C	A	F	H	E	Q	P	E	L	O	K	K	O	J	C	S	F	E	I	Y	E	V	P	W	E	D	R	M	S	L	V	D	S	R	C	Q	E	A			
7	I	L	Q	V	E	I	G	R	T	I	C	I	F	K	S	G	D	---	O	S	C	E	F	H	D	E	P	E	M	A	K	Y	T	T	C	T	F	V	Y	S	I	P	W	L	N	O	I	K	L	E	S	K	C	O							
8a	S	F	K	Y	E	I	K	E	G	D	P	V	O	S	G	K	T	---	W	O	D	C	E	Y	K	D	A	A	K	A	A	T	---	G	E	C	T	A	T	V	G	K	R	S	T	K	F	S	V	A	T	---	C	O	I	T	P				
9a	S	F	K	T	Q	I	K	E	G	N	S	V	O	S	G	L	T	---	W	O	D	C	D	F	K	D	A	E	E	A	T	---	G	E	C	T	I	T	L	G	L	L	E	N	---	K	F	S	V	A	T	---	C	N	I	T	P				
8b	R	I	T	Y	S	I	V	O	T	N	C	S	K	E	N	F	L	T	P	O	C	---	---	---	K	S	I	W	N	G	D	T	---	G	E	C	T	D	N	A	Y	I	D	I	Q	L	R	I	A	S	F	S	O	N	---	C	O	I	Y	P	
9b	K	I	I	Y	S	I	V	O	T	N	C	S	K	E	D	F	P	L	R	E	D	C	---	---	---	V	P	L	P	Y	G	D	H	---	G	E	C	R	G	H	T	V	D	I	H	N	T	I	A	G	F	S	O	S	---	C	D	L	Y	P	
8c	F	I	D	F	V	A	R	E	T	I	D	S	K	E	S	N	E	E	L	T	E	S	C	---	---	---	E	T	K	L	G	O	S	---	L	D	N	A	E	V	Y	V	P	W	E	K	I	Y	F	T	V	N	---	C	O	P	L	G	M		
9c	V	I	E	F	I	A	R	E	T	N	C	S	K	O	T	N	E	L	T	A	D	C	---	---	---	E	T	K	H	L	E	S	---	L	N	O	N	A	N	V	M	R	P	W	E	N	K	V	V	P	I	V	---	C	O	A	L	D	M		

Ryc. 6. Sekwencje aminokwasowe niakoząteczkowych inhibitorów proteinaz cysteinowych (cystatyny) i trzech segmentów wysokoząteczkowych inhibitorów przypominających cystatyny: 1 — cystatyna A z granulocytów człowieka (153), 2 — cystatyna z wątroby szczura (CPI- $\alpha$ ) (131), 3 — cystatyna B z wątroby człowieka (155), 4 — cystatyna z wątroby szczura (CPI- $\beta$ ) (152), 5 — ludzka cystatyna C (135), 6 — ludzka cystatyna S (143), 7 — cystatyna jaja kury (154), 8a — segment 1  $\alpha$ -CPI (reszty aminokwasowe 19—127) z osocza człowieka (108), 9a — segment 1  $\alpha$ -CPI (reszty aminokwasowe 19—129) z osocza szczura (156), 8b — segment 2  $\alpha$ -CPI (reszty aminokwasowe 128—249) z osocza człowieka (108), 9b — segment 2  $\alpha$ -CPI (reszty aminokwasowe 130—251) z osocza szczura (156), 8c — segment 3  $\alpha$ -CPI (reszty aminokwasowe 250—373) z osocza człowieka (108), 9c — segment 3  $\alpha$ -CPI (reszty aminokwasowe 252—374) z osocza szczura (156). ———— mostki dwusiarczkowe, ———— prawopodobne mostki dwusiarczkowe.



Ryc. 7. Hipotetyczne drzewo genealogiczne inhibitorów proteinaz cysteinowych (wg 100)

### Uwagi końcowe

Nie zbadano dotychczas roli fizjologicznej ani proteinaz cysteinowych lizosomowych ani cytosolowych. W przypadku proteinaz lizosomowych badania *in vitro* wskazują, że udział katepsyn cysteinowych w wewnątrzkomórkowej degradacji białek jest znaczny. Degradacja zarówno białek zewnątrzkomórkowych jak i wewnątrzkomórkowych zachodzi w lizosomach. Wykazano (160), że makrofagi płuc mogą degradować elastynę, a 60% aktywności elastynolitycznej jest udziałem enzymu, który jest hamowany przez Z-Phe-Arg-CHN<sub>2</sub>, specyficzny inhibitor proteinaz cysteinowych. Ostatnie doniesienia (161) wykazują, że katepsynę L cechuje wysoka aktywność elastynolityczna (pH 5.5), porówny-

walna z aktywnością wieprzowej elastazy trzustkowej. Wcześniejsze doniesienia o aktywności kolagenolitycznej proteinaz cysteinowych (14, 39) pozwalają przypuszczać, że enzymy te mogą aktywnie uczestniczyć w degradacji zrębu łącznotkankowego płuc, co może przyczyniać się do rozedmy płuc. Dodatkowym argumentem przemawiającym za taką hipotezą jest inaktywacja przez te enzymy  $\alpha_1$ -PI — głównego inhibitora elastazy leukocytowej (41, 44). Trzeba jednak zaznaczyć, że aktywność katepsyn cysteinowych poza komórką może być jedynie lokalna (48), ponieważ środowisko zewnątrzkomórkowe nie sprzyja działaniu proteolitycznemu omawianych enzymów. Natomiast niektóre proteinazy bakteryjne wydzielane w hodowlach bakteryjnych do medium wykazują znaczną aktywność proteolityczną w środowisku obojętnym (97). Proteinazy te mogą być istotnym czynnikiem patogennym pewnych chorób np. inaktywując  $\alpha_1$ -PI (162, 163) mogą przyczyniać się do niszczenia zrębu łącznotkankowego płuc przez elastazy.

Są dane doświadczalne wskazujące, że lizosomowe proteinazy cysteinowe (w szczególności katepsyna B) mogą, jak się zdaje, uczestniczyć w inwazji i przerzutach pewnych typów nowotworów (164, 165, 166). Wysoka aktywność proteolityczna, w środowisku kwaśnym, lizosomowych proteinaz cysteinowych wydzielanych przez komórki nowotworowe ułatwia degradację tkanek otaczających guza i przygotowanie miejsca dla nowych komórek nowotworowych (167, 168).

Wydaje się, że w najbliższej przyszłości należy oczekiwać dalszych postępów w badaniach nad biosyntezą, ustaleniem struktury, mechanizmem działania proteinaz cysteinowych i ich endogennych inhibitorów. Pozwoli to na poznanie ich roli biologicznej w metabolizmie białek i ewentualnej roli w procesach patologicznych.

*Praca przygotowana w ramach tematu 04.01.2.10. finansowanego przez PAN.*

*Artykuł otrzymano 18 grudnia 1986 r.*

*Zaakceptowano do druku 3 września 1987 r.*

#### PIŚMIENNICTWO:

1. Motizuki M., Tsurugi K., Ogata K., (1984), *Eur. J. Biochem.*, **138**, 39–43.
2. Goto T., Ohsga M., Okazaki T., (1985), *Biochim. Biophys. Acta*, **829**, 371–376.
3. Towatari T., Kawabata Y., Katunuma N., (1979), *Eur. J. Biochem.*, **102**, 279–289.
4. Takahashi T., Yonezawa S., Dehdarani A. H., Tang J., (1986), *J. Biol. Chem.*, **261**, 9368–9374.
5. Kirschke H., Langner J., Riemann S., Wiederanders B., Ansoerge S., Bohley B., (1980), w: „Protein Degradation in Health and Diseases”, Excerpta Medica, 15–35.
6. Kirschke H., Langner J., Wiederanders B., Ansoerge S., Bohley P., (1977), *Eur. J. Biochem.*, **74**, 293–301.
7. De Martino G.N., Doebler T.W., Miller L.L., (1977), *J. Biol. Chem.*, **252**, 7511–7516.
8. Mason R.W., Green G.D.J., Barrett A.J., (1985), *Biochem. J.*, **226**, 233–241.
9. Gohda E., Pitot H.C., (1980), *J. Biol. Chem.*, **255**, 7371–7379.

10. Gohda E., Pitot H.C., (1981), *J. Biol. Chem.*, **256**, 2567–2572.
11. Gohda E., Pitot H.C., (1981), *Biochim. Biophys. Acta*, **659**, 114–122.
12. Pontremoli S., Melloni E., Salamino F., Sparatore B., Michetti M., Horecker B.L., (1982), *Arch. Biochem. Biophys.*, **214**, 376–385.
13. Erickson-Viitanen S., Balestren E., Mc Dermott M.J., Horecker B.L., Melloni E., Pontremoli S., (1985), *Arch. Biochem. Biophys.*, **243**, 46–61.
14. Etherington D.J., (1976), *Biochem. J.*, **153**, 199–209.
15. Turk V., Kregar I., Popović T., Ločnikar P., Kopitar M., Brzin J., (1980), *Period. Biol.*, **82**, 363–367.
16. Liao J.C.R., Lenney J.F., (1984), *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **124**, 909–916.
17. Tanaka K., Ikegaki N., Ichihara A., (1984), *J. Biol. Chem.*, **259**, 5937–5944.
18. Goldspink D.F., Levis E.M., (1985), *Biochem. J.*, **230**, 833–836.
19. Lynn K.R., Labow R.S., (1984), *Can. J. Biochem.*, **62**, 1301–1308.
20. Davidson E., Pode B., (1975), *Biochim. Biophys. Acta*, **397**, 437–442.
21. Bando Y., Kominami E., Katunuma N., (1986), *J. Biochem.*, **100**, 35–42.
22. Barrett A.J., (1977), w: „Proteinases in Mammalian Cells and Tissues” (red. Barrett A.J.), North-Holland Publishing Co, Amsterdam, New York, Oxford, 181–205.
23. Snigh H., Kalnitsky G., (1978), *J. Biol. Chem.*, **253**, 4319–4329.
24. Bernstein H.G., Kielhoff G., Kirschke H., Wiederanders B., Wolf G., Khudoerkov R., Dorn A., (1986), w: „Intracellular Protein Catabolism”, Abstrakt Nr 2.9. 6<sup>th</sup> Symposium, Halle.
25. Azaryan A.V., Galayan A.A., (1986), w: „Intracellular Protein Catabolism”, Abstrakt Nr 2.7. 6<sup>th</sup> Symposium, Halle.
26. Towatari T., Tanaka K., Yoshikawa D., Katunuma K., (1978), *J. Biochem.*, **84**, 659–671.
27. Barrett A.J., Kirschke H., (1981), *Methods Enzymol.*, **80**, 535–561.
28. Strenler G.J., Manganiello V.C., (1979), *J. Biol. Chem.*, **254**, 11891–11898.
29. Mason R.W., Taylor M.A.J., Etherington D.J., (1984), *Biochem. J.*, **217**, 209–217.
30. Okitani A., Matsukara U., Kato H., Fujimaki M., (1980), *J. Biochem.*, **87**, 1133–1143.
31. Mason R.W., Green G.D.J., Barrett A.J., (1985), *Biochem. J.*, **226**, 233–241.
32. Ločnikar P., Popović T., Lah T., Kregar J., Babnik J., Kopitar M., Turk V., (1981), w: „Proteinases and their inhibitors”, (red. Turk V., Vitale L.J.), Mladinska Knjiga, Ljubiana and Pergamon Press, 109–117.
33. Wiederanders B., Kirschke H., (1986), w: „Intracellular Protein Catabolism”, Abstrakt Nr 2.4. 6<sup>th</sup> Symposium, Halle.
34. San Segundo B., Jin Chan S., Steiner D.F., (1985), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **82**, 2320–2324.
35. Fong D., Calhoun D.H., Hsieh W.T., Lee B., Wells R.D., (1986), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **83**, 2909–2913.
36. Takahashi T., Dehdarani A.H., Yonezawa S., Tang J., (1985), *J. Biol. Chem.*, **261**, 9375–9381.
37. Aronson N.N., Barrett A.J., (1978), *Biochem. J.*, **171**, 759–765.
38. Kärger H.J., Dettmer R., Etzold G., Kirschke H., Bohley P., Langner J., (1980), *FEBS Lett.*, **114**, 257–260.
39. Burleigh M.C., (1977), w: „Proteinases in Mammalian Cells and Tissues” (red. Barrett A.J.), North-Holland Co., Amsterdam, New York, Oxford, 285–307.
40. Schwartz W.N., Bird J.W.C., (1977), *Biochem. J.*, **167**, 811–820.
41. Johnson D., Travis J., (1977), *Biochem. J.*, **163**, 639–647.
42. Yamamoto K., Kanata O., Kato Y., (1984), *J. Biochem.*, **95**, 477–484.
43. Salvesen G., Gay N., Walker J., (1986), w druku.
44. Lokshina L.A., Golubeva N.V., Yegorova T.P., Zlatopolsky A.D., Orekhovich V.N., (1986), w: „Intracellular Protein Catabolism”, Abstract Nr 2.6. 6<sup>th</sup> Symposium, Halle.

45. Kirschke H., Pepperle M., Schmidt J., Wiederanders B., (1986), w: „Intracellular Protein Catabolism”, Abstract Nr 2.1, 6<sup>th</sup> Symposium, Halle.
46. Kirschke H., Langner J., Wiederanders B., Ansorge S., Bohley P., (1976), *Acta Biol. Med. Ger.*, **35**, 285–299.
47. Maciewicz R.A., Wardale R.J., (1986), w: „Intracellular Protein Catabolism”, Abstract Nr 2.5, 6<sup>th</sup> Symposium, Halle.
48. Kirschke H., Langner J., Wiederanders B., Ansorge S., Bohley P., (1979), w: „Processing and Turnover of Proteins and Organelles in the Cells”, (red. Rapoport S., Schewe T.), Pergamon Press, Oxford–New York, 107–115.
49. Katunuma N., Towatari T., Kominami E., Hashida S., (1981), w: „Proteinases and their inhibitors” (red. Turk V., Vitale L.J.), Mladinska Knjiga, Ljubliana and Pergamon Press, 83–93.
50. Pontremoli S., Melloni E., Damiani G., Michetti M., Salamino F., Sparatore B., Horecker B.L., (1984), *Arch. Biochem. Biophys.*, **233**, 267–271.
51. Quinn P.S., Jrdah J.G., (1978), *Biochem. J.*, **172**, 301–309.
52. Ansorge S., Kirschke H., Friedrich K., (1977), *Acta Biol. Med. Ger.*, **36**, 1723–1727.
53. Coradello H., Pollak A., Pagano M., Leban J., Lubec G., (1981), *I.R.C.S. Med. Sci.*, **9**, 766–767.
54. Eechout Y., Vaes G., (1977), *Biochem. J.*, **166**, 21–31.
55. Marks N., Kopitar M., Stern F., Berg M.J., (1985), w: „Intracellular Protein Catabolism”, Riss A.R., Inc., 247–249.
56. Kornfeld S., (1986), *J. Clin. Invest.*, **77**, 1–6.
57. Rich D.H., (1986), w: „Proteinase Inhibitors” (red. Barrett A.J., Salvesen G.C.), Elsevier Science Publishers BV, 153–186.
58. Machowicz E., Sarnecka-Keller M., (1972), *Post. Bioch.*, **18**, 95–114.
59. Street J.P., Brown R.S., (1985), *J. Amer. Chem. Soc.*, **107**, 6084–6089.
60. Skorey K.I., Brown R.S., (1985), *J. Amer. Chem. Soc.*, **107**, 4070–4072.
61. Street J.P., Skorey K.I., Brown R.S., Ball R.G., (1985), *J. Amer. Chem. Soc.*, **107**, 7669–7679.
62. Asboth B., Stokum E., Khan J.U., Polgar L., (1984), *Biochemistry*, **24**, 606–609.
63. Polgar L., Halasz P., (1982), *Biochem. J.*, **207**, 1–10.
64. Suzuki K., Ishiura S., Tsuji S., Katamoto T., Sugita H., Imahori K., (1979), *FEBS Lett.*, **107**, 355–358.
65. Mellgren R.L., Repetti A., Muck T.C., Easley J., (1982), *J. Biol. Chem.*, **257**, 7203–7209.
66. Dayton W.R., Goll D.E., Zeece H.G., Robson R.M., Reville W.J., (1983), *Biochemistry*, **15**, 2150–2158.
67. Ishiura S., Murofushi H., Suzuki K., Imahori K., (1978), *J. Biochem.*, **84**, 225–230.
68. Murachi T., (1983), w: „Calcium and Cell Function”, (red. Cheung W.Y.), 377–410.
69. Otsuka Y., Tanaka H., (1983), *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **111**, 700–709.
70. Lane R.D., Mellgren R.L., Mericle H.T., (1984), *J. Mol. Cell. Cardiol.*, **17**, 863–872.
71. Pontremoli S., Melloni E., Salamino F., Sparatore B., Michetti M., Horecker B.L., (1984), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **81**, 53–56.
72. Malik M.N., Fenko M.D., Iqbal K., Wisniewski H.M., (1983), *J. Biol. Chem.*, **258**, 8955–8962.
73. Pontremoli S., Melloni E., (1985), w: „Intracellular Protein Catabolism”, Liss A.R., Inc., 127–140.
74. Melloni E., Sparatore B., Salamino F., Michetti M., Pontremoli S., (1982), *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **107**, 1053–1059.
75. Kamakura K., Ishiura S., Suzuki K., Sugita H., Toyokura Y., (1985), *J. Neur. Res.*, **13**, 391–403.
76. Kamakura K., Ishiura S., Fujita T., Nonaka I., Sugita H., (1985), *Muscle and Nerve*, **8**, 380–382.

77. Suzuki K., Kawashima S., Imahori K., (1984), w: „Calcium Regulation in Biological Systems”, Takeda Science Foundation, 213–226.
78. Goll D.E., Edmunds T., Kleese W.C., Sathe S.K., Shannon J.D., (1985), w: „Intracellular Protein Catabolism”, Liss A.R., Inc., 151–164.
79. Ishiura S., Sugita H., Suzuki K., Imahori K., (1979), *J. Biochem.*, **86**, 579–581.
80. Suzuki K., Emori Y., Ohno S., Imahori S., Kawasaki H., Miyake S., (1986), *Biomed. Biochim. Acta*, **45**, 1487–1491.
81. Suzuki K., Tsuji S., Kubeta S., Kimura J., Imahori K., (1981), *J. Biochem.*, **90**, 275–278.
82. Inomata M., Imahori K., Kawashima S., (1986), *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **138**, 638–643.
83. Suzuki K., Ishiura S., (1983), *J. Biochem.*, **93**, 1463–1471.
84. Sugita H., Ishiura S., Kamakura K., Nakase H., Hagiwara K., Nonaka I., Tomomatsu K., (1984), w: „Calcium Regulation in Biological Systems”, Takeda Science Foundation, 243–256.
85. Shroyer L.A., Varandani P.T., (1985), *Arch. Biochem. Biophys.*, **236**, 205–219.
86. Buttle D.J., Barrett A.J., (1984), *Biochem. J.*, **223**, 81–88.
87. Zucker S., Buttle D.J., Nicklin M.H.J., Barrett A.J., (1985), *Biochim. Biophys. Acta*, **828**, 196–204.
88. Kamphuis J.G., Kalk K.H., Swarte M.B.A., Drenth J., (1984), *J. Mol. Biol.*, **179**, 233–256.
89. Gilles A.M., Imhoff J.M., Keil B., (1979), *J. Biol. Chem.*, **254**, 1462–1468.
90. Matsumoto K., Maeda H., Takata K., Kamata R., Okamura R., (1984), *J. Bacteriol.*, **157**, 225–232.
91. Lo S.S., Liang S.M., Liu T.Y., (1984), *Anal. Biochem.*, **136**, 89–92.
92. Tai J.Y., Kortt A.A., Liu T.Y., Elliott S.D., (1976), *J. Biol. Chem.*, **251**, 1955–1959.
93. Arvidson S., Holme T., Lindholm B., (1973), *Biochim. Biophys. Acta*, **302**, 135–148.
94. Korzus G., (1986), Praca magisterska, Kraków, UJ.
95. Yamada T., Ogrydziak D. M., (1983), *J. Bacteriol.* **154**, 23–31.
96. Gilles A. M., De Wolf A., Keil B., (1983), *Eur. J. Biochem.*, **130**, 473–479.
97. Umezawa H., (1982), *Ann. Rev. Microbiol.*, **36**, 75–99.
98. Ning M. C. Y. J., Beynon R. J., (1986), *Int. J. Biochem.*, **18**, 813–820.
99. Turk V., Brzin J., Kopitar M., Kregar I., Ločnikar P., Langer M., Popovič T., Ritonja A., Vitale L., Machleidt W., Giralaldi T., Sava G., (1983), w: „Proteinase Inhibitors: Medical and Biological Aspects”, (red. Katanuma N.), Japan Sci. Soc. Press, Tokyo–Springer–Verlag–Berlin, 125–134.
100. Turk V., Brzin J., Lenarčič B., Ločnikar P., Popovič T., Ritonja A., Babnik J., Bode W., Machleidt W., (1985), w: „Intracellular Protein Catabolism”, Liss R. A., 91–103.
101. Suzuki K., Hayashi H., Hayashi T., Iwai K., (1983), *FEBS Lett.*, **152**, 67–70.
102. Ohno S., Emori Y., Imajoh S., Kawasaki K., Kisaragi M., Suzuki K., (1984), *Nature*, **312**, 566–570.
103. Sasaki M., Minakata K., Yamamoto H., Niwa M., Kato T., Ito N., (1977), *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **76**, 917–924.
104. Ryley H. C., (1979), *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **89**, 871–878.
105. Gounaris A. D., Brown M. A., Barrett A. J., (1984), *Biochem. J.*, **221**, 445–452.
106. Wakamatsu N., Kominami E., Katunuma N., (1982), *J. Biol. Chem.*, **257**, 14653–14656.
107. Hirado M., Niinobe M., Fujii S., (1983), *Biochem. Biophys. Acta*, **757**, 196–201.
108. Okhubo J., Kurachi T., Takasawa T., Shiokawa H., Sasaki M., (1984), *Biochemistry*, **23**, 5691–5696.
109. Pagano M., Engler R., (1984), *FEBS Lett.*, **166**, 62–66.
110. Pagano M., Engler R., (1982), *FEBS Lett.*, **138**, 307–310.

111. Pagano M., Esnard F., Engler R., Gauthier F., (1984), *Biochem. J.*, **220**, 147–155.
112. Esnard F., Gauthier F., (1983), *J. Biol. Chem.*, **258**, 12443–12447.
113. Esnard F., Wibissond L., Lombart C., Gauthier F., (1984), w: „Marker Proteins in Inflammation”, (red. Arnaud P., Bienvenu J., Laurent P.), Walter de Gruyter Co., Berlin, New York, 557–561.
114. Darcy D. A., (1964), *Br. J. Exp. Pathol.*, **45**, 281–293.
115. Koj A., Dubin A., Kasperczyk H., Bereta J., Gordon A. H., (1982), *Biochem. J.*, **206**, 545–553.
116. Katunuma N., Kominami E., (1985), w: „Intracellular Protein Catabolism”, Liss A. R., Inc., 71–79.
117. Müller-Esterl W., Fritz H., Machleidt W., Ritonja A., Brzin J., Kotnik M., Turk V., Kellermann J., Lottspeich F., (1985), *FEBS Lett.*, **182**, 310–314.
118. Suyeoshi T., Enjyoji K., Shimida T., Kato H., Iwanaga S., Bando Y., Kominami E., Katunuma N., (1985), *FEBS Lett.*, **182**, 193–195.
119. Bereta J., Kurdowska A., (1986), *Zesz. Nauk. UJ, Prace z Biol. Mol.*, (do druku).
120. Salvesen G., Parkes C., Abrahamson M., Grubb A., Barrett A. J., (1986), *Biochem. J.*, **234**, 429–434.
121. Iwata D., Hirado M., Niinobe M., Fujii S., (1982), *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **104**, 1525–1531.
122. Lenney J. F., Liac J. R., Sugg S. L., Gopalakrishnan V., Wong H. C. H., Ouye K. H., Chan P. W. H., (1982), *Biochim. Biophys. Acta*, **108**, 1581–1587.
123. Gauthier F., Pagano M., Esnard F., Mouray H., Engler R., (1983), *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **110**, 449–455.
124. Abrahamson M., Barrett A. J., Salvesen G., Grubb A., (1986), w druku.
125. Katunuma N., Wakamtsu N., Takio K., Titani K., Kominami E., (1983), w: „Proteinase Inhibitors: Medical and Biological Aspects”, (red. Katunuma N.), Japan Sci. Soc. Press, Tokyo–Springer–Verlag–Berlin, 135–145.
126. Barrett A. J., (1985), w: „Intracellular Protein Catabolism”, Liss A. R., Inc., 105–116.
127. Green G. D. J., Kembhavi A. A., Davies M. E., Barrett A. J., (1984), *Biochem. J.*, **218**, 939–946.
128. Brzin J., Kopitar M., Turk V., Machleidt W., (1983), *Hoppe-Seyler's Z., Physiol. Chem.*, **364**, 1475–1480.
129. Järvinen M., Rinne A., (1982), *Biochim. Biophys. Acta*, **708**, 210–217.
130. Minakata K., Assano M., (1985), *Biol. Chem. Hoppe-Seyler*, **366**, 15–18,
131. Taio K., Kominami E., Bando Y., Katunuma N., Titani K., (1984), *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **121**, 149–154.
132. Kominami E., Wakamtsu N., Katunuma N., (1981), *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **99**, 568–575.
133. Hirado M., Iwata D., Niinobe M., Fujii S., (1981), *Biochem. Biophys. Acta*, **669**, 21–27.
134. Barrett A. J., Davies M. E., Grubb A., (1984), *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **120**, 631–636.
135. Brzin J., Popovič T., Turk V., Borchart U., Machleidt W., (1984), *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **118**, 103–109.
136. Anastasi A., Brown M. A., Kembhavi A. E., Micklin M. J. H., Sayers Ch. A., Sunter D. C., Barrett A. J., (1983), *Biochem. J.*, **211**, 129–138.
137. Wood L., Yorke G., Reisen F., Bird I. W. C., (1985), w: „Intracellular Protein Catabolism”, Liss A. P., Inc., 81–90.
138. Minakata K., Assano M., (1984), *Hoppe-Seyler's Z., Physiol. Chem.*, **365**, 399–403.
139. Hibino T., Fukuyama K., Epstein W. L., (1980), *Biochim. Biophys. Acta*, **632**, 214–226.
140. Takeda A., Kobayashi S., Samejima T., (1983), *J. Biochem.*, **94**, 811–820.
141. Barrett A. J., (1987), *TIBS*, **12**, 193–196.

142. Hibino T, Fukuyama K, Epstein W. L., (1980), *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **93**, 440–447.
143. Isemura S, Saitoh E, Ito S, Isemura M., (1984), *J. Biochem.*, **96**, 1311–1314.
144. Ishiura S, Tsuji S, Murofushi H, Suzuki K., (1982), *Biochim. Biophys. Acta*, **701**, 216–223.
145. Takahashi-Makamura M., Tsuji S, Suzuki K, Imahori K., (1981), *J. Biochem.*, **90**, 275–278.
146. Shannon J. D., Gall D. E., (1985), w: „Intracellular Protein Catabolism”, Liss A. E., Inc., 257–259.
147. Mellgren R. L., Carr T. C., (1983), *Arch. Biochem. Biophys.*, **225**, 779–783
148. Imajoh S, Suzuki K., (1985), *FEBS Lett.*, **187**, 47–50.
149. Katunuma N., Kominami E., (1985), w: „Current Topics in Cellular Regulation”, Acad. Press Inc., 345–360.
150. Wakamatsu N., Kominami E., Takio K., Katunuma N., (1984), *J. Biol. Chem.*, **259**, 13832–13838.
151. Nicklin N. J., Barrett A. J., (1984), *Biochem. J.*, **223**, 245–253.
152. Takio K., Kominami E., Wakamatsu N., Katunuma N., Titani K., (1983), *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **115**, 902–908.
153. Machleidt W., Borchart U., Fritz H., Brzin J., Ritonja A., (1983), *Hoppe-Seyler's Z., Physiol. Chem.*, **364**, 1481–1486.
154. Schwabe C., Anastasi A., Crow H., Mc Donald J. K., Barrett A. J., (1984), *Biochem. J.*, **217**, 813–817.
155. Ritonja A., Machleidt W., Barrett A. J., (1985), *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **131**, 1187–1192.
156. Anderson K. P., Heath E. C., (1985), *J. Biol. Chem.*, **260**, 12065–12071.
157. Okada Y., Teho N., Itoh N., Okamoto H., (1985), *Chem. Pharm. Bull.*, **33**, 5149–5152.
158. Barrett A. J., Rawlings N. D., Davies M. E., Machleidt W., Salvesen G., Turk V., (1986), w: „Proteinase Inhibitors” (red. Barrett A. J., Salvesen G.), Elsevier Science Publishers BV, 517–569.
159. Salvesen G., Parkes C., Rawlings N. D., Brown M. A., Barrett A. J., Abrahamson M., Grubb A., (1986), *Biochem. J.*, w druku.
160. Chapman H. A., Stone O. L., (1984), *Biochem. J.*, **222**, 721–728.
161. Mason R. W., Johnson D. A., Barrett A. J., Chapman H. A., (1986), *Biochem. J.*, **233**, 925–927.
162. Potempa J., Baran K., Porwit-Bóbr Z., (1985), w: „The Staphylococci” (red. Jeljaszewicz J.), Zbl. Bakt. Suppl. 14, Gustav Fischer Verlag, Stuttgart, New York, 335–336.
163. Potempa J., Wątorek W., Travis J., (1986), *J. Biol. Chem.*, **261**, 14330–14334.
164. Sloane B. F., Honn K. V., (1984), *Canc. Met. Rev.*, **3**, 249–263.
165. Mullins D. E., Rohrllich S. T., (1983), *Biochim. Biophys. Acta*, **695**, 177–214.
166. Dansette P. M., Makedonska V. B., Jerina D. M., (1978), *Arch. Biochem. Biophys.*, **187**, 290–298.
167. Gill S. S., Hammock B. D., (1979), *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **89**, 965–971.
168. Dufek V., Jirasek V., Kral V., Matouš B., Dražna E., (1985), *Neoplasma*, **32**, 51–54.



RENATA MIKSTACKA\*

## Rola transferaz glutationowych w inaktywacji związków kancerogennych

The role of glutathione transferases in inactivation of carcinogenic compounds

### Spis treści:

- I. Wstęp
- II. Biosynteza i degradacja glutationu
- III. Klasyfikacja transferaz glutationowych i ich specyficzność substratowa
- IV. Inaktywacja związków kancerogennych na drodze sprzężania z glutationem
  - IV-1. Indukcja transferaz glutationowych
  - IV-2. Modyfikacje metabolizmu glutationu
- V. Uwagi końcowe

### Contents:

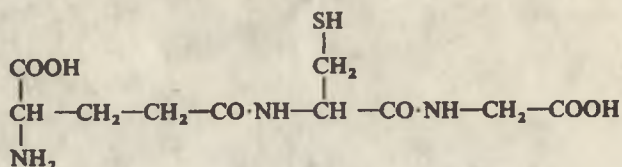
- I. Introduction
- II. Biosynthesis and degradation of glutathione
- III. The classification of glutathione transferases and their substrate specificity
- IV. Inactivation of carcinogenic compounds by conjugation with glutathione
  - IV-1. Induction of glutathione transferases
  - IV-2. Modifications of glutathione metabolism
- V. Final remarks

### I. Wstęp

Udział glutationu w transformacji związków egzogennych o toksycznym, mutagenym i kancerogennym działaniu jest obecnie wszechstronnie badany. Prowadzone są badania funkcji tego trójpeptydu (wzór I) jako czynnika nukleofilowego, reduktora nadtlenków i wolnych rodników oraz jego udziału w regulacji homeostazy  $Ca^{2+}$  w hepatocytach (1).

Reakcję sprzężania glutationu z elektrofilowym substratem katalizują transferazy glutationowe (EC 2.5.1.18). Występują one przede wszystkim w cytosolu, jakkolwiek wykryto również ich aktywne formy w mikrosomach, jądrach,

\* Dr nauk przyr., Zakład Genetyki Człowieka PAN, ul. Strzeszyńska 32, 60-479 Poznań



$\gamma$ -L-glutamyl-L-cysteinylglycyna

Wzór I

blonach jądrowych i mitochondriach (2, 3, 4). Reakcji sprzęgania z glutationem ulegają związki endogenne, takie na przykład jak leukotrieny, prostaglandyny, hormony sterydowe. Przede wszystkim jednak glutation reaguje z elektrofilowymi metabolitami związków egzogennych. Są to pochodne wielopierścieniowe węglowodorów aromatycznych, aflatoksyn, licznych leków przekształcanych przez system monooksygenaz związanych z cytochromem P-450. Przypuszcza się, że szczególnie ważną rolę w metabolizmie ksenobiotyków odgrywa transferaza glutationowa występująca w mikrosomach w bliskim sąsiedztwie systemu enzymów zależnych od cytochromu P-450.

## II. Biosynteza i degradacja glutationu

Biologiczny czas półtrwania glutationu wynosi od 1 h w nerkach do kilku dni w erytrocytach, komórkach nerwowych, płucach i śledzionie (1). Biosynteza glutationu katalizowana jest przez dwa enzymy: syntetazę  $\gamma$ -glutamylcysteinową (EC 6.3.2.2) i syntetazę glutationową (EC 6.3.2.3). Dostępność cysteiny stanowi czynnik ograniczający szybkość resyntezy glutationu w warunkach jego znacznego zużycia.

Badania stężenia glutationu w surowicy krwi pochodzącej z różnych naczyń krwionośnych wykazały, że pomiędzy narządami organizmu odbywa się intensywny transport glutationu w formie zredukowanej. Najwyższą zawartość glutationu w porównaniu z innymi tkankami wykazują wątroba i nerki (tabela 1).

Glutation podlega w komórkach odwracalnym reakcjom modyfikującym (ryc. 1). W wyniku sprzęgania z aldehydami i merkaptanami powstają estry tiolowe (GS-CO-R) i dwusiarczki (GS-SR). Utleniona forma glutationu (GS-SG) powstaje w reakcji glutationu z nadtlenkami, katalizowanej przez peroksydazy glutationowe (EC 1.11.1.9). Wyróżnia się peroksydazy glutationowe zależne od selenu, zużywające  $\text{H}_2\text{O}_2$  i organiczne nadtenki jako substraty oraz peroksydazy glutationowe niezależne od selenu, które preferencyjnie zużywają organiczne nadtenki. Glutation działając jako wewnątrzkomórkowy reduktor hamuje proces peroksydacji kwasów tłuszczowych (6). Odpowiednie stężenie glutationu w formie zredukowanej zapewnia reakcja odwrotna polegająca na redukcji GSSG do GSH katalizowanej przez reduktazę glutationową (NAD(P)H) (EC 1.6.4.2). Jedną z funkcji glutationu polega na odwracalnej

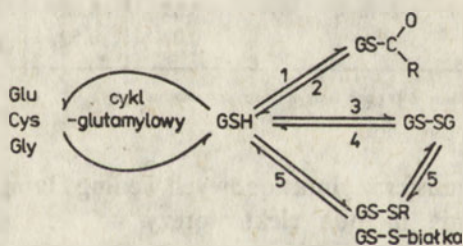
Tabela 1

Zawartość glutationu w tkankach myszy (5)

Tkanka	Stężenie glutationu [ $\mu\text{mole/g}$ ]
Mózg	$2.08 \pm 0.15$
Serce	$1.35 \pm 0.10$
Płuca	$1.52 \pm 0.13$
Śledziona	$3.43 \pm 0.35$
Wątroba	$7.68 \pm 1.22$
Trzustka	$1.78 \pm 0.31$
Nerki	$4.13 \pm 0.15$
Błona śluzowa jelita cienkiego	$2.94 \pm 0.16$
Błona śluzowa okrężnicy	$2.11 \pm 0.19$
Mięśnie szkieletowe	$0.78 \pm 0.05$

modyfikacji tiolowych grup białek, prowadzącej do zmian aktywności enzymatycznych (7).

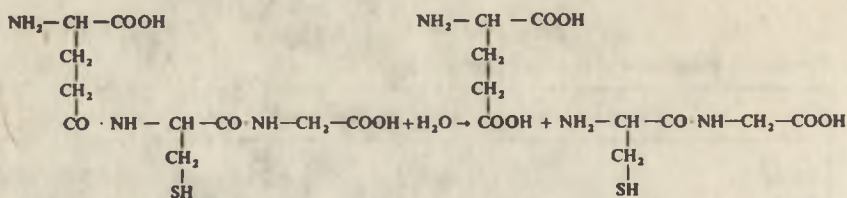
Glutation transportowany przez błony komórkowe (szczegółowy mechanizm aktywnego transportu glutationu nie jest dotąd wyjaśniony) może być degradowany przez  $\gamma$ -glutamylotransferazę (EC 2.3.2.2) – enzym związany z błonami komórkowymi, którego miejsce aktywne znajduje się po zewnętrznej stronie błony komórkowej (ryc. 2). Natomiast glutation wydalany z komórek nie zawierających  $\gamma$ -glutamylotransferazy dostaje się do surowicy krwi, skąd jest usuwany przez nerki na drodze kłębkowej filtracji oraz reakcji katalizowanej przez  $\gamma$ -glutamylotransferazę, przebiegającej w kanalikach nerkowych (8, 9).



Ryc. 1. Schemat odwracalnych reakcji zachodzących z udziałem glutationu za pośrednictwem następujących enzymów: 1 – glioksalaza I i dehydrogenaza formaldehydowa; 2 – glioksalaza II i hydrolaza S-formyloglutationowa; 3 – peroksydaza glutationowa; 4 – reduktaza glutationowa; 5 – transferazy tiolowe

### III. Klasyfikacja transferaz glutationowych i ich specyficzność substratowa

Wyizolowane z komórek ssaków transferazy glutationowe stanowią dimery białka o ciężarze od 45 000 do 50 000 D, składające się z dwóch takich samych różnych podjednostek polipeptydowych (10, 11). Pierwsze próby w kierunku



Ryc. 2. Katalizowana enzymatycznie hydroliza glutationu

klasyfikacji transferaz glutationowych poczynił Habig i wsp. (12), którzy oznaczyli rozdzielone i oczyszczone przez siebie transferazy kolejnymi literami alfabetu w zależności od kolejności ich eluowania podczas chromatografii kolumnowej na CM-celulozie homogenatu wątroby szczura. Transferazy A, B, C, D i E wykazują szeroką i nakładającą się specyficzność substratową oraz różnią się właściwościami immunochemicznymi i aktywnościami katalitycznymi (tabela 2).

Tabela 2

Specyficzne aktywności transferaz glutationowych A, B, C i E\* z wybranymi substratami (12)

Substraty	Transferazy glutationowe			
	A	B	C	E
1,2-Dwuchloro-4-nitrobenzen	4.3	0.003	2.0	0.0001
1-Chloro-2,4-dwunitrobenzen	62	11	10	0.01
trans-4-fenyl-3-buten-2-on	0.02	0.001	0.40	0.0001
Jodometan	0.02	0.59	0.01	8.9

\* Transferaza D nie została przez Habiga i wsp. oczyszczona

Nomenklatura transferaz glutationowych według Habiga straciła znaczenie z chwilą wyodrębnienia metodą elektroforezy na żelu poliakryloamidowym pierwszych czterech podjednostek enzymu:  $Y_a$ ,  $Y_{b1}$ ,  $Y_{b2}$  i  $Y_c$ . W 1983 roku na konferencji w Dundee zaproponowano nowy system nomenklaturowy pozwalający odróżnić enzymy będące homodimerami od heterodimerów (13) (tabela 3).

Formy anionowe transferaz glutationowych zawierają dwa miejsca aktywne w odróżnieniu od form kationowych zawierających jedno miejsce aktywne. Zaobserwowano duże powinowactwo hormonów sterydowych (kortykosteronu, progesteronu i androsteronu) do form anionowych transferaz glutationowych (14).

Każda z form kationowej transferazy glutationowej wykazuje inne właściwości spektralne i odmienne mechanizmy wiązania substratów. Jednak wszystkie wykazują specyficzną aktywność wobec 1-chloro-2,4-dwunitrobenzenu i

Tabela 3

Nomenklatura transferaz glutationowych według Jakoby'ego (13)

Podjednostki	Nazwa enzymu	
Y <sub>a</sub> Y <sub>a</sub> Y <sub>a</sub> Y <sub>c</sub> Y <sub>c</sub> Y <sub>c</sub>	transferaza glutationowa 1-1 transferaza glutationowa 1-2 transferaza glutationowa 2-2	formy anionowe
Y <sub>b1</sub> Y <sub>b1</sub> Y <sub>b2</sub> Y <sub>b2</sub>	transferaza glutationowa 3-3 transferaza glutationowa 4-4	formy kationowe

reagują krzyżowo z przeciwciałami specyficznymi dla transferazy glutationowej B (15).

Zastosowanie ulepszonych metod elektroforezy na żelu poliakrylamidowym w obecności SDS do rozdziału podjednostek transferaz glutationowych pozwoliło wyodrębnić z wątroby szczura dalsze trzy podjednostki: Y<sub>r</sub>, Y<sub>k</sub>, Y<sub>n</sub> (16, 17). Obecnie obserwuje się intensywny rozwój badań polimorfizmu transferaz glutationowych, w związku z czym można się spodziewać w najbliższym czasie dalszych zmian i uzupełnień w klasyfikacji tych enzymów.

Transferazy glutationowe człowieka oznaczane są literami greckimi, jakkolwiek również istnieje tendencja do uściślenia słownictwa w oparciu o identyfikację podjednostek wchodzących w skład cząsteczki enzymu. Transferazy glutationowe człowieka wykazują specyficzność tkankową, różnią się rozkładem w tkankach płodowych i tkankach ludzi dorosłych, a także wykazują zróżnicowanie międzyosobnicze (7). Charakterystykę transferaz glutationowych człowieka przedstawiono w tabeli 4.

Tabela 4

Podział i właściwości transferaz glutationowych człowieka

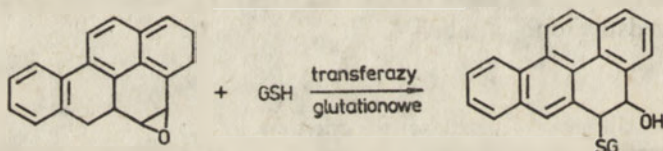
	Transferazy glutationowe		
	α β γ δ ε	μ	π ρ λ
Tkanka	wątroba nadnercza tkanki płodowe	wątroba nadnercza	łożysko (π) erytrocyty (ρ) płuca (λ) wątroba
Punkt izoelektryczny (pH)	8	6.5	4.8
Aktywności enzymatyczne wobec wybranych substratów [μmol · min <sup>-1</sup> · mg <sup>-1</sup> ]			
1-Chloro-2,4-dwunitrobenzen	64	187	105
Kwas etakrynowy	0.03	0.081	0.86
Nadtlenek kumenu	0.6	0.63	0.03
Trans-4-fenylo-3-buten-2-on	0.001	0.36	0.01
4,5-Epoksybenzo(a)piren	0.047	0.92	0.13

Na uwagę zasługuje fakt, że transferaza  $\mu$  wykazuje znacznie wyższą aktywność w stosunku do 4,5-epoksybenzo(a)pirenu w porównaniu z pozostałymi transferazami glutationowymi człowieka.

#### IV. Inaktywacja związków kancerogennych na drodze sprzężenia z glutationem

Do substratów transferaz glutationowych należą elektrofilowe produkty metabolicznej aktywacji związków kancerogennych, takich jak wielopierścieniowe węglowodory aromatyczne i ich pochodne chlorowcowe, aminy aromatyczne, aflatoksyny i inne. Rozróżnia się następujące interakcje transferaz glutationowych z chemicznymi kancerogenami:

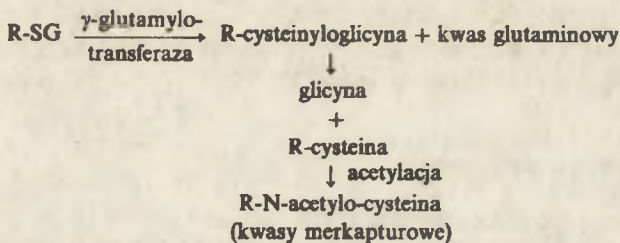
- niekonwencyjne wiązanie transferaz z metabolitami związków kancerogennych; w ten sposób wychwytywane są cząsteczki elektrofilowe, co umożliwia ich transport w obrębie komórki i wydalanie ich na zewnątrz (18);
- kowalencyjne wiązanie transferaz glutationowych z kancerogenami co prowadzi do nieodwracalnej inaktywacji enzymu (19);
- sprzężanie elektrofilowych metabolitów i glutationu pod działaniem transferazy glutationowej (ryc. 3). Wydajność inaktywacji kancerogennych związków przez sprzężanie z glutationem zależy od właściwości reaktywnych związków,
- szybkości nieenzymatycznej reakcji między glutationem i badanymi związkami oraz od stężeń substratów transferaz i glutationu.



Ryc. 3. Reakcja sprzężenia 4,5-epoksybenzo(a)pirenu

Przypuszcza się, że koniugaty glutationu ulegają dalszemu metabolizmowi przez odszczepienie reszt glutaminowej i glicynowej, a następnie przez acetylację wolnej grupy aminowej i reszty cysteinowej (ryc. 4). Powstające w ten sposób kwasy merkapturowe z podstawnikami przy atomie siarki są wydalane z organizmu.

Elektrofilowe metabolity związków kancerogennych różnią się znacznie powinowactwem do transferaz glutationowych. Reaktywne produkty metabolizmu benzo(a)pirenu (BP) i aflatoksyny B<sub>1</sub> są jak dotąd najlepiej poznanymi, wydajnie inaktywowanymi na drodze sprzężenia z glutationem substratami transferaz. Niektóre metabolity BP (3-hydrokso-BP, dwuhydrodiol w pozycjach 4,5-, 7,8-, 9,10-) wiążą się z transferazami glutationowymi w sposób niekowalencyjny (20). Reakcja sprzężenia epoksytleńków BP z glutationem wydaje się mieć szczególne znaczenie, gdyż związki te charakteryzują się silnym



Ryc. 4. Biotransformacja koniugatów glutationowych (R-SG)

powinowactwem do komórkowego DNA. 4,5-Epoksy-BP jest wydajnie sprzęgany z glutationem, podczas gdy 7,8-epoksy-BP reaguje z glutationem słabo (21). Także 7,8-dwuhydroksy-9,10-epoksy-7,8,9,10-czterohydro-BP (izomer anty) – metabolit BP o silnych właściwościach mutagennych i kancerogennych ulega reakcji sprzęgania z glutationem pod działaniem transferaz glutationowych (22, 23, 24).

Wiązanie metabolitów BP z DNA było zależne od stężenia glutationu w mieszaninie inkubacyjnej zawierającej izolowane jądra komórek wątroby szczura i frakcję cytoplazmatyczną. Hamowanie wiązania metabolitów BP z DNA potwierdzono w układach rekonstruowanych zawierających oczyszczone transferazy A, B, C lub E, z których transferaza E wykazywała najsilniejsze właściwości katalityczne, a transferaza A – najsłabsze (20). Wpływ stężenia glutationu na wiązanie 7,8-dwuhydroksy-9,10-epoksy-7,8,9,10-czterohydro-BP (izomer anty) z DNA obserwowano w hodowlach komórkowych *in vitro* (25, 26).

Substratami transferaz glutationowych mogą być również epoksytylenki aflatoksyny B<sub>1</sub> – związki o silnym działaniu hepatokancerogennym (27). Szybkość wiązania aflatoksyny B<sub>1</sub> z DNA była odwrotnie proporcjonalna do szybkości sprzęgania metabolitów aflatoksyny B<sub>1</sub> z glutationem. Reakcja wiązania aflatoksyny B<sub>1</sub> z DNA ulegała zahamowaniu w obecności frakcji mikrosomalnej jak również cytoplazmatycznej z wątroby zwierząt, przy czym silniejsze działanie obserwowano w przypadku wątroby chomika niż w przypadku wątroby szczura (28). Sprzęganie 8,9-epoksyafatoksyny B<sub>1</sub> z glutationem katalizowały transferazy 1-1, 1-2 i 2-2 (29).

Przeciwstawną funkcję glutationu, polegającą na umożliwieniu tworzenia adduktów z DNA obserwowano w przypadku niektórych chlorowcopochodnych alkanów (30). W wyniku reakcji 1,2-dwubromoetanu z glutationem katalizowanej przez transferazy glutationowe powstają związki łączące się z guaniną w cząsteczce DNA, co w konsekwencji zaburza proces odczytywania i przekazywania informacji genetycznej.

Istotna funkcja transferaz glutationowych w zapobieganiu chemicznej kancerogenezie zachęcała naukowców do badań aktywności tego enzymu u ludzi. Badania populacyjne aktywności transferaz glutationowych w ludzkich leukocytach jednojądrzastych wykazały znaczne (15-krotne) międzyosobnicze różnicowanie aktywności tego enzymu (31). Zmienność aktywności transferazy

glutationowej, oznaczanej kilkakrotnie u jednego osobnika nie przekraczała 10%. Sugeruje się przydatność oznaczeń aktywności transferaz glutationowej do oceny podatności na raka płuc u ludzi (32, 33).

#### IV-1. Indukcja transferaz glutationowych

Indukcja enzymów metabolizujących ksenobiotyki odgrywa ważną rolę w procesie inicjacji chemicznej kancerogenezy. Stopień oddziaływania związków kancerogennych z komórkami makromolekułami zależy od proporcji pomiędzy izoenzymami zaangażowanymi w biotransformacji prokancerogenów (system monooksygenaz zależnych od cytochromu P-450) a enzymami sprzęgającymi reaktywne metabolity, do których należą transferazy glutationowe. Uzasadnione wydaje się badanie inaktywacji związków kancerogennych w powiązaniu z procesami aktywacji prokancerogenów, w których uczestniczy enzymatyczny system zależny od cytochromu P-450.

Zarówno enzymy zależne od cytochromu P-450, jak i transferazy glutationowe są indukowalne przez związki egzogenne. Do induktorów transferaz glutationowych należą wielopierścieniowe węglowodory aromatyczne (34), fenobarbital (35), nienasycone związki karbonylowe (36) i przeciwutleniacze (37). Na przykład, podanie w diecie 2(3)-tert-butylo-4-hydroksyanizolu powodowało 5-krotny wzrost wątrobowej, cytoplazmatycznej aktywności transferazy glutationowej w stosunku do ( $\pm$ ) 7,8-dwuhydroksy-9,10-epoksy-7,8,9,10-czterohydro-BP jako substratu (38). Indukowalność transferaz glutationowych badano u różnych szczepów myszy (charakteryzujących się odmiennym genotypem w stosunku do *locus Ah*), którym podano 3-metylocholanren lub 5,6-benzoflawon. Wyniki badań wskazywały, że indukcja transferaz glutationowych przebiegała za pośrednictwem genów różnych od genów regulatorowych w *locus Ah* (39).

Oznaczono sekwencje nukleotydowe łańcuchów mRNA specyficznych dla podjednostek polipeptydowych  $Y_a$ ,  $Y_b$ ,  $Y_c$ , (40, 41, 42). Fenobarbital i 3-metylocholanren indukują silniej syntezę podjednostek  $Y_a$  i  $Y_c$ , w porównaniu z syntezą pojednostek  $Y_b$ . Przypuszcza się, że transkrypcja genów różnych izoenzymów transferaz glutationowych jest regulowana w sposób niezależny (43).

Indukcja transferaz glutationowych przez przeciwutleniacze powodowała zahamowanie tworzenia adduktów metabolitów BP z DNA (44). Ponadto zaobserwowano, że związki hamujące proces nowotworzenia indukowany w przedłożądkach myszy przez BP podwyższały aktywność transferaz glutationowych w badanej tkance (45). Przeciwnowotworowe działanie kwasu elaginowego obserwowane u myszy wynikały z jego funkcji induktora transferaz glutationowych i inhibitora utleniania BP w płucach i wątrobie badanych zwierząt (46).

#### IV-2. Modyfikacje metabolizmu glutationu

Z punktu widzenia farmakologii, toksykologii i terapii nowotworów zmiany stężenia glutationu w komórkach odgrywają bardzo istotną rolę. Dla osiągnięcia



pożądanych efektów poprzez obniżenie lub podwyższenie stężenia glutationu stosuje się inhibitory enzymów biorących udział w jego syntezie lub degradacji. Najczęściej stosowanym związkiem obniżającym stężenie glutationu w komórkach jest sulfoksymina butioniny – inhibitor syntazy glutaminowej i syntazy  $\gamma$ -glutamylcysteinowej (47, 48). Hamując syntezę glutationu w hodowli hepatocytów szczura powodowano zwiększone wiązanie 2-amino-3-metylo-imidazolo(4,5t)-chinoliny i 2-acetylo-aminofluorenu do komórkowych kwasów nukleinowych (49). Natomiast zahamowanie wiązania mutagenu – 7,12-dwumetylobenzantracenu z DNA komórek zarodka kurczęcia hodowanych *in vitro* obserwowano jako wynik dodania do komórek glutationu, cysteiny oraz kwasu askorbinowego (50).

Podwyższenie stężenia glutationu, występujące po podaniu  $\gamma$ -glutamylcysteiny, tiazolidyny – prekursora cysteiny oraz samej cysteiny, chroni komórki przed toksycznym działaniem leków (51, 52, 53, 54). W przypadku komórek nowotworowych znaczenie ma obniżenie stężenia glutationu, zwiększające ich wrażliwość na radioterapię oraz na czynniki chemoterapeutyczne (55, 56). Obniżenie stężenia glutationu w linii komórek ludzkich (nowotworu jajnika) powodowało wyraźny wzrost cytotoksyczności leku cytostatycznego – melfalanu (57), a zatem potęgowało jego efekt terapeutyczny.

Zmiany stężenia glutationu w komórce mogą odbywać się również za pośrednictwem  $\gamma$ -glutamylotransferazy – enzymu biorącego udział w degradacji glutationu (patrz rozdz. II). Stwierdzono indukcję aktywności  $\gamma$ -glutamylotransferazy w pierwotnej hodowli hepatocytów szczura pod wpływem promotorów raka wątroby, takich jak fenobarbital, cykliczne związki chlorowcowe, estrogeny, kłofibrat i jego pochodne (58). Rejony tkanki wątroby barwiące się pozytywnie w histochemicznych badaniach  $\gamma$ -glutamylotransferazy wykazywały podwyższone stężenie glutationu (59). Uważa się, że podwyższone stężenie  $\gamma$ -glutamylotransferazy na powierzchni hepatocytów zwierząt doświadczalnych, którym podawano związki kancerogenne, umożliwia resyntezę glutationu zużywanego w reakcji detoksykacji. Komórki, w których dochodzi do szybkiego uzupełniania zużywanego glutationu (m.in. wydalanego w postaci sprzężonej z substratami transferaz glutationowych) posiadają większe szanse przeżycia i proliferacji także w warunkach chemioterapii. Podwyższony poziom  $\gamma$ -glutamylotransferazy obserwowano w komórkach nowotworowych różnych tkanek, w tym także w nowotworach płuc i gruczołakoraku płuc człowieka (60), co może być przyczyną zmniejszenia skuteczności leków cytostatycznych.

## V. Uwagi końcowe

Procesy aktywacji i dezaktywacji związków kancerogennych zależą od szeregu sprzężonych ze sobą aktywności enzymatycznych. Nasuwa się wniosek o celowości kompleksowych badań nad wzajemnymi relacjami enzymów aktywujących związki o potencjalnie kancerogennym działaniu oraz enzymów umożli-

wiających ich dezaktywację, do których należą transferazy glutationowe, a także układów enzymatycznych zaangażowanych w biosyntezę i degradację glutationu. Poznanie biochemicznych aspektów metabolizmu ksenobiotyków posiada duże znaczenie dla postępu w zakresie chemicznej kancerogenezy, chemioterapii i profilaktyki nowotworów.

Artykuł otrzymano 15 stycznia 1987 r.  
Zaakceptowano do druku 12 września 1987 r.

## PIŚMIENNICTWO

1. Orrenius S., Moldeus P., (1984), *Trends in Pharmacol. Sciences*, **5**, 432–435.
2. Morgenstern R., Meijer J., DePierre J.W., Ernster L., (1980), *Eur. J. Biochem.*, **104**, 167–174.
3. Morgenstern R., Lunqvist G., Andersson G., Balk L., DePierre J.W., (1984), *Biochem. Pharmacol.*, **33**, 3609–3614.
4. Morgenstern R., DePierre J.W., Jörnvall H., (1985), *J. Biol. Chem.*, **260**, 13976–13983.
5. Griffith O.W., Meister A., (1979), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **76**, 5606–5610.
6. McCay P.B., Gibson D.D., (1982), w: *Lipid Peroxides in Biology and Medicine*, red. Yagi K., str. 179–197, Academic Press, New York.
7. Mannervik B., Guthenberg C., Jensson H., Warholm M., Alin P., (1983), w: *Functions of Glutathione: Biochemical, Physiological, Toxicological and Clinical Aspects*, red. Larsson A., et al., str. 75–88, Raven Press, New York.
8. Curthoys N.P., Hughey R.P., (1979), *Enzyme* **24**, 383–403.
9. Griffith O.W., Meister A., (1979), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **76**, 268–272.
10. Bhargava M.M., Listowsky I., Arias I.M., (1978), *J. Biol. Chem.*, **253**, 4112–4115.
11. Bhargava M.M., Ohmi N., Listowsky I., Arias I.M., (1980), *J. Biol. Chem.*, **255**, 724–727.
12. Habig W.H., Pabst M.J., Jakoby W.B., (1974), *J. Biol. Chem.*, **249**, 7130–7139.
13. Jakoby W.B., Ketterer B., Mannervik B., (1984), *Biochem. Pharmacol.*, **33**, 2539–2540.
14. Maruyama H., Listowsky I., (1984), *J. Biol. Chem.*, **259**, 12449–12455.
15. Maruyama H., Arias I.M., Listowsky I., (1984), *J. Biol. Chem.*, **259**, 12444–12448.
16. Hayes J.D., (1986), *Biochem. J.*, **233**, 789–798.
17. Hayes J.D., Mantle T.J., (1986), *Biochem. J.*, **237**, 731–740.
18. Tipping E., Ketterer B., (1981), *Biochem. J.*, **195**, 441–452.
19. Smith G.J., Ohl V.S., Litwack G., (1977), *Cancer Res.*, **37**, 8–14.
20. Hesse S., Jernström B., (1984), w: *Biochemical Basis of Chemical Carcinogenesis*, red. Greim H., Kramer H., Jung R., Marquardt H., Oesch F., str. 5–12, Raven Press, New York.
21. Jerina D.M., (1976), w: *Glutathione: Metabolism and Function*, red. Arias I.M., Jakoby W.B., str. 267–279, Raven Press, New York.
22. Cooper C.S., Hewer A., Ribeiro O., Grover P.L., Sims P., (1980), *Carcinogenesis*, **1**, 1075–1080.
23. Glatt H.R., Friedberg T., Grover P.L., Sims P., Oesch F., (1983), *Cancer Res.*, **43**, 5713–5717.
24. Jernström B., Martinez M., Meyer D.J., Ketterer B., (1985), *Carcinogenesis*, **6**, 85–89.
25. Jernström B., Babson J.R., Moldeus P., Homgren A., Reed D.J., (1982), *Carcinogenesis*, **3**, 861–866.
26. Ho D., Fahl W.E., (1984), *J. Biol. Chem.*, **259**, 11231–11235.

27. Degen G.H., Neumann H.-G., (1981), *Carcinogenesis*, **2**, 299–306.
28. Raj H.G., Clearfield M.S., Lotlikar P.D., (1984), *Carcinogenesis*, **5**, 879–884.
29. Coles B., Meyer D.J., Ketterer B., Stanton C.A., Garnew R.C., (1985), *Carcinogenesis*, **6**, 693–698.
30. Inskeep P.B., Guengerich F.P., (1984), *Carcinogenesis*, **5**, 805–808.
31. Seidegard J., DePierre J.W., Birberg W., Pilotti A., Pero R.W., (1984), *Biochem. Pharmacol.*, **33**, 3053–3058.
32. Seidegard J., Pero R.W., (1985), *Human Genet.*, **69**, 66–68.
33. Seidegard J., Pero R.W., Miller D.G., (1986), *Carcinogenesis*, **7**, 751–754.
34. Arias I.M., Fleischner G., Kirsch R., Michkin S., Gatmaitan Z., (1976), w: *Glutathione: Metabolism and Function*, red. Arias I.M., Jakoby W.B., str. 175–188, Raven Press, New York.
35. Wolf C.R., Moll E., Friedberg T., Oesch F., Buchmann A., Kuhlmann W.D., Kunz H.W., (1984), *Carcinogenesis*, **5**, 993–1002.
36. Masuhawa T., Nishimura T., Iwata H., (1984), *Experientia*, **40**, 1272–1275.
37. Pearson W.R., Windle J.J., Morrow J.F., Benson A.M., Talalay P., (1984), *J. Biol. Chem.*, **259**, 2052–2062.
38. Dock L., Martinez M., Jernström B., (1984), *Carcinogenesis*, **5**, 841–844.
39. Felton J.S., Ketley J.M., Jakoby W.B., Aitio A., Bend J.R., Nebert D.W., (1980), *Mol. Pharmacol.*, **18**, 559–564.
40. Ding G.J.-F., Ding V.D.-H., Rodkey J.A., Bennett C.D., Lu A.Y.H., Pickett C.B., (1986), *J. Biol. Chem.*, **261**, 7952–7957.
41. Telakowski-Hopkins C.A., Rodkey J.A., Bennett C.D., Lu A.Y.H., Pickett C.B., (1985), *J. Biol. Chem.*, **260**, 5320–5325.
42. Tu C.-P.D., Reddy C.C., (1985), *J. Biol. Chem.*, **260**, 9961–9964.
43. Pickett C.B., Telakowski-Hopkins C.A., Ding G.J.-F., Argenbright L., Lu A.Y.H., (1984), *J. Biol. Chem.*, **259**, 5182–5188.
44. Ioannou Y.M., Wilson A.G.E., Anderson M.W., (1982), *Carcinogenesis*, **3**, 739–745.
45. Sparnins V.L., Wattenberg L.W., (1981), *J. Natl. Cancer Inst.*, **66**, 769–771.
46. Das M., Bickers D.P., Mukhtar H., (1985), *Carcinogenesis*, **6**, 1409–1413.
47. Griffith O.W., Meister A., (1978), *J. Biol. Chem.*, **253**, 2333–2338.
48. White R.D., Norton R., Bus J.S., (1984), *Toxicol. Lett.*, **23**, 25–32.
49. Loretz L.J., Pariza M.W., (1984), *Carcinogenesis*, **5**, 895–899.
50. Liotti F.S., Bodo M., Pezzetti F., Guerrieri P., Menghini A.R., (1986), *Oncology*, **43**, 183–186.
51. Williamson J.M., Boettcher B., Meister A., (1982), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **79**, 6246–6249.
52. Nagamatsu K., Inoue K., Terao T., Toki S., (1986), *Biochem. Pharmacol.*, **35**, 1675–1678.
53. Gurtoo H.L., Hipkens J.H., Sharma S.D., (1981), *Cancer Res.*, **41**, 3584–3591.
54. Russo A., Mitchell J.B., McPherson S., Fiedman N., (1984), *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.*, **10**, 1675–1678.
55. Meister A., Griffith O.W., (1979), *Cancer Treat. Rep.*, **63**, 1115–1121.
56. Dethmers J.K., Meister A., (1981), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **78**, 7492–7496.
57. Green J.A., Vistica D.T., Young R.C., Hamilton T.C., Rogan A.M., Ozols R.F., (1984), *Cancer Res.*, **44**, 5427–5431.
58. Edwards A.M., Lucas C.M., (1985), *Carcinogenesis*, **6**, 675–678.
59. Deml E., Oesterle D., (1980), *Cancer Res.*, **40**, 490–491.
60. Dempo K., Elliott K.A., Desmond W., Fishman W.H., (1981), *Oncoderm. Biol. Med.*, **2**, 21–37.



WOJCIECH NIEWIAROWSKI\*

## Badania oddziaływań centrum aktywnego enzymu z substratem za pomocą metody stereochemicznej

A study of interaction of the active centre of enzyme with substrate by a stereochemical approach

*Spis treści:*

- I. Wstęp
- II. Mechanizmy podstawienia nukleofilowego na atomie fosforu
- III. Badania mechanizmów reakcji enzymatycznych za pomocą metody stereochemicznej

*Contents:*

- I. Introduction
- II. Mechanisms of nucleophilic substitution at the phosphorus atom
- III. Studies of the mechanisms of enzymatic reactions by a stereochemical approach

Wykaz stosowanych skrótów: cAMP – cykliczny 3', 5'-fosforan adenozyne; HPLC – wysokociśnieniowa chromatografia cieczowa; MRJ – magnetyczny rezonans jądrowy; svPDE – fosfodiesteraza z jadu węża; cUMP – cykliczny 2',3'-fosforan urydyny; cUMPS – cykliczny 2',3'-tiofosforan urydyny; RNaza A – rybonukleaza z trzustki;  $U_{P(S)}C$  – tiofosforan urydylo(3'-5')cytydyny;  $U_pC$  – urydylo(3'-5')cytydyna; ATP – 5'-triofosforan adenozyne; DNaza II – kwaśna deoksyrybonukleaza;  $T_{P(S)}NP$  – 3'-(4-nitrofenylo)tiofosforan tymidylo(3'-5')tiofosforanu tymidyny; TLC – chromatografia cienkowarstwowa;  $T_{P(S)}T$  – tiofosforan tymidylo(3'-5')tymidyny;  $NP_{P(S)}T_{P(S)}T$  – 5'-(4-nitrofenylo)tiofosforan tymidylo(3'-5')tiofosforanu tymidyny; MS – spektrometria masowa;  $pT_pT$  – 5'-fosforan tymidylo(3'-5')tymidyny;  $T_pT$  – tymidylo(3'-5')tymidyna;  $pT$  – 5'-fosforan tymidyny; n.P-1 – nukleaza z *Penicillium citrum*;  $NP_{P(S)}T$  – 5'-(4-nitrofenylo)tiofosforan tymidyny;  $TMPS$  – 5'-tiofosforan tymidyny;  $p(S)NP$  – 4-nitrofenylotiofosforan.

### I. Wstęp

Produkty naturalne takie jak DNA, RNA czy fosfolipidy zawierają w swej strukturze grupę fosforanową, połączoną dwoma wiązaniami estrowymi z

\* Dr, Zakład Chemii Bioorganicznej, Centrum Badań Molekularnych i Makromolekularnych PAN, ul. Boczna 5, 90-362 Łódź

różnymi podstawnikami. W kwasach nukleinowych są nimi deoksyryboza lub ryboza, w fosfolipidach zaś glicerol, cholina bądź inny alkohol. Oprócz ww. diestrów w przyrodzie występuje wiele innych związków o budowie monoestrów fosforanowych, np. ATP i GTP.

Informacje na temat oddziaływań grup czynnych enzymów z cząsteczką substratu, w trakcie reakcji, pochodzą przede wszystkim z badań kinetycznych (1, 2, 3). Jakkolwiek można za ich pomocą stosunkowo dobrze charakteryzować daną reakcję uwzględniając przy tym takie parametry jak stężenie enzymu, stężenie substratów, produktów, inhibitorów i aktywatorów oraz siłę jonową, pH i temperaturę to dowód na istnienie wiązania kowalencyjnego pomiędzy grupami funkcyjnymi centrum aktywnego i substratem także uzyskuje się stosując metodę stereochemiczną. Jej istota polega na wykorzystaniu obserwowanego w przyrodzie zjawiska chiralności, łatwego do wyjaśnienia na przykładzie tetrakoordynacyjnych związków węgla. Wiele z nich zbudowanych jest w ten sposób, że atom węgla, zwany asymetrycznym, połączony jest z czterema różnymi podstawnikami (np. w aminokwasach jest nim węgiel związany z grupami  $-\text{COOH}$ ,  $-\text{NH}_2$ ,  $-\text{R}$ ,  $-\text{H}$ , wyjątek stanowi glicyna). Każda cząsteczka tego rodzaju występuje w formie pary izomerów będących swymi lustrzanymi odbiciami, które tak jak ręce lewa i prawa nie są identyczne (termin „chiralność”, z greckiego „chiros” – ręka, został wprowadzony przez Cahna). Izomery, które są wzajemnymi odbiciami lustrzanymi noszą nazwę enancjomerów, np. D- i L-alanina. Możliwe jest także występowanie innego rodzaju izomerów – diastereoizomerów jakimi są np. (–)-erytroza i (–)-treoza. Ze względu na to, że zawierają więcej niż jeden asymetryczny atom węgla występują one w formach nie będących lustrzanymi odbiciami.

Atom fosforu w mono- i diestrach fosforanowych występujących w przyrodzie ma również charakter tetrakoordynacyjny, zaś w celu badań biochemicznych możliwe jest nadanie mu asymetrii i co za tym idzie wywołanie chiralności grupy fosforanowej. W przypadku diestrów (związki prochiralne) poprzez zastąpienie niemostkowego atomu tlenu siarką (lub  $^{18}\text{O}$ ), w monoestrach (związki proprochiralne) zaś poprzez wprowadzenie izotopów tlenu  $^{17}\text{O}$  i  $^{18}\text{O}$  (lub  $^{18}\text{O}$  i siarki) zamiast izotopu  $^{16}\text{O}$ .

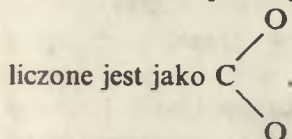
Biosynteza i biodegradacja kwasów nukleinowych i nukleotydów odbywa się w wyniku katalizowanych przez enzymy reakcji, które można uznać za procesy dwucząsteczkowego, nukleofilowego podstawienia na atomie fosforu  $|\text{S}_{\text{N}}2(\text{P})\text{-bimolecular nucleophilic substitution at phosphorus atom}|$  (4). Reakcje chemiczne tego typu starannie badano w wielu laboratoriach, zaś uzyskane wyniki doprowadziły do wniosku, że stereochemiczną konsekwencją pojedynczego aktu podstawienia odpowiadającego mechanizmowi  $\text{S}_{\text{N}}2(\text{P})$  jest inwersja konfiguracji na atomie fosforu (5, 7). Do badań użyto związki modelowe czyli takie, w których przestrzenne ułożenie podstawników w grupie fosforanowej było precyzyjnie określone za pomocą dostępnych metod spektroskopowych, zaś przypisanie konfiguracji dokonano w oparciu o reguły Cahna, Ingolda i Preloga (6). Przyjęty

przez nich system zakłada uszeregowanie grup związanych z asymetrycznym atomem wg zbioru reguł kolejności:

1. Podstawniki szereguje się w porządku malejących liczb atomowych atomów związanych bezpośrednio z asymetrycznym atomem.

2. Gdy z asymetrycznym atomem związane są dwa atomy lub więcej takich samych atomów, wówczas o porządku decydują liczby atomowe drugich z kolei atomów tych grup lub jeżeli dwa z nich są takie same, ten ma pierwszeństwo, który ma więcej podstawników o większych liczbach atomowych.

3. Wiązanie podwójne traktuje się jak dwa wiązania pojedyncze, np.  $C=O$



Po ustaleniu kolejności cząsteczkę orientuje się tak by grupa ostatnia w szeregu kolejności znalazła się najdalej od obserwatora. Jeżeli inne grupy licząc w ustalonym porządku, są ułożone zgodnie z ruchem wskazówek zegara, konfigurację absolutną cząsteczki oznacza się jako R, a jeżeli odwrotnie do ruchu wskazówek zegara – jako S.

Skoro procesy biosyntezy i biodegradacji związków naturalnych mogą być rozważane jako reakcje podstawienia nukleofilowego, możliwe było zastosowanie do ich badania metod stereochemicznych. Warunkiem było przeprowadzenie prochiralnej lub propochiralnej grupy fosforanowej w chiralną. Enzymy katalizujące przemiany kwasów nukleinowych mogą oddziaływać z substratem tylko poprzez wiązania wodorowe albo tworzyć produkt pośredni będący kowalencyjnym kompleksem enzym-substrat.

Wyniki badań chemicznych nad reakcjami przebiegającymi wg mechanizmu  $S_N2(P)$  udowodniły, że po ataku nukleofilowym tworzy się produkt ze zmienioną konfiguracją grupy fosforanowej (inwersja). Zatem powstanie produktu reakcji enzymatycznej z inwersją konfiguracji w grupie fosforanowej oznacza, że nastąpił pojedynczy akt podstawienia nukleofilowego na atomie fosforu dokonany przez cząsteczkę drugiego substratu (np. wody). Biokatalizator ograniczył się więc do tworzenia z substratem co najwyżej wiązań wodorowych. Gdy reakcja enzymatyczna przebiega z retencją konfiguracji w grupie fosforanowej (tj. zachowaniem konfiguracji grupy fosforanowej wynikającym z faktu, że atakujący nukleofil zajął miejsce grupy opuszczającej) to jest ona rezultatem parzystej ilości inwersji, a więc co najmniej dwóch podstawień nukleofilowych. Pierwszego z nich dokonał enzym i utworzył kowalencyjne wiązanie z substratem, które następnie rozpadło się w wyniku drugiego ataku nukleofilowego kolejnej cząsteczki substratu. W tym przypadku utworzył się pośredni, kowalencyjny kompleks enzym-substrat (7 – 12).

Artykuł przedstawia stereochemiczną analizę mechanizmów reakcji enzymatycznych związanych z metabolizmem biopolimerów zawierających grupę fosforanową.

## II. Mechanizm podstawienia nukleofilowego na atomie fosforu

Mechanizmy nukleofilowego podstawienia na atomie fosforu bada się w modelowych reakcjach chemicznych (5, 7, 13) a uzyskane wyniki można odnosić następnie do procesów katalizowanych przez enzymy. Analogicznie jak w chemii związków węgla podstawienie nukleofilowe na atomie fosforu może przebiegać wg mechanizmu dysocjacyjnego lub asocjacyjnego.

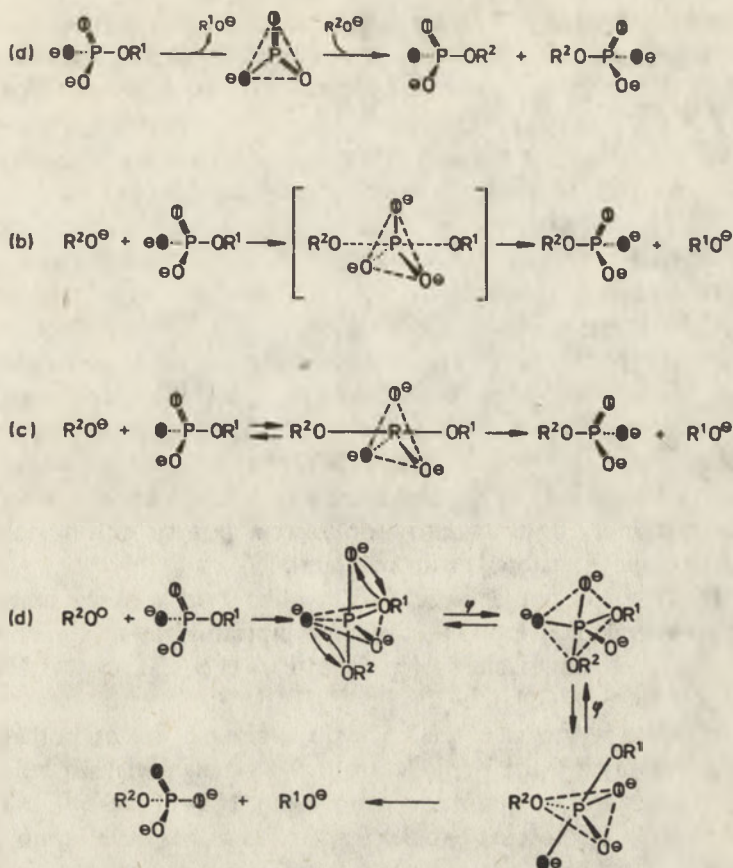
Mechanizm dysocjacyjny [ $S_N1(P)$ , jednocząsteczkowe podstawienie nukleofilowe] zakłada, że proces podstawienia nukleofilowego ma charakter dwuetapowy. Najpierw w wyniku dysocjacji wiązania fosfor – grupa opuszczająca następuje rozpad substratu i utworzenie się związku pośredniego – metafosforanu, który ma planarną budowę. Potem zaś atakuje nukleofil. Pierwszy etap decyduje zarówno o szybkości reakcji, bowiem przebiega znacznie wolniej niż drugi, jak i o jej stereochemii, gdyż planarność metafosforanu powoduje, że atak nukleofila może nastąpić z obu stron (Ryc. 1a). Produkt powstaje zarówno z retencją jak i inwersją konfiguracji na atomie fosforu dając racemiczną mieszaninę izomerów.

Najogólniej mówiąc mechanizm asocjacyjny typu  $S_N2(P)$  polega na ataku nukleofila na tetrakoordynacyjny atom fosforu co powoduje utworzenie pięciowiązalnego stanu przejściowego (nietrwała struktura) bądź produktu pośredniego (trwałego) o budowie bipiramidy trygonalnej. Ze względu na wzajemne ułożenie grup atakującej (nukleofila) i opuszczającej oraz strukturę związku pośredniego rozróżniane są trzy rodzaje omawianego procesu różniące się stereochemią tworzonego produktu. Pierwszy z nich zakłada, że w stanie przejściowym zarówno grupa atakująca jak i opuszczająca ustawione są kolinearnie, zaś pozostałe trzy podstawniki przy atomie fosforu ułożone są w jednej płaszczyźnie, prostopadłej do linii utworzonej przez grupy atakującą i opuszczającą. Tworzenie wiązania nukleofil-fosfor jest procesem synchronicznym ze zrywaniem wiązania fosfor-grupa opuszczająca. Konsekwencją stereochemiczną opisanego podstawienia przebiegającego przez stan przejściowy jest inwersja konfiguracji (Ryc. 1b).

W trakcie reakcji, dla których postuluje się kolejne dwa mechanizmy  $S_N2(P)$  obserwowano tworzenie trwałego produktu pośredniego. Pierwszy z mechanizmów zakłada, że grupa nukleofilowa atakuje atom fosforu od strony przeciwnej do grupy opuszczającej. Utworzony produkt pośredni ma geometrię bipiramidy trygonalnej, w której pozycje wierzchołkowe zajmują grupy atakująca i opuszczająca, zaś pozostałe podstawniki rozmieszczone są ekwatorialnie. Geometria produktu pośredniego jest taka sama jak przedstawionego wyżej stanu przejściowego. Rozpadowi wiązania fosfor-grupa opuszczająca towarzyszy inwersja konfiguracji na atomie fosforu (Ryc. 1c).

Druga propozycja mechanizmu  $S_N2(P)$  z udziałem produktu pośredniego wyjaśnia te przypadki, w których atak nukleofila następuje niekolinearnie do grupy opuszczającej. Pierwszy produkt pośredni o strukturze bipiramidy trygonalnej ulega, zgodnie z zasadą odwracalności mikrostanów, przegrupo-





**Ryc. 1.** Podstawienie nukleofilowe na atomie fosforu: (a) – mechanizm dysocjacyjny –  $S_N1(P)$ ; ze względu na planarność metafosforanu atak nukleofila możliwy jest z obu stron – powstają produkty z inwersją konfiguracji; (b), (c), (d) – mechanizm asocjacyjny –  $S_N2(P)$ ; (b) – atak nukleofila ( $R^2O^-$ ) następuje kolinearnie z grupą opuszczającą  $-OR^1$ , reakcja przebiega przez stan przejściowy, produkt końcowy powstaje z inwersją konfiguracji (mechanizm „in line”); (c) – mechanizm jw. ale tworzy się trwały produkt pośredni, produkt końcowy powstaje z inwersją konfiguracji (mechanizm „in line”); (d) – atak nukleofila następuje niekolinearnie z grupą opuszczającą  $-OR^1$ , do jej odejścia wymagana jest permutacyjna izomeryzacja ( $\varphi$ ) przebiegająca przez stan piramidy tetragonalnej, produkt końcowy powstaje z retencją konfiguracji na fosforze (mechanizm „adjacent”);  $R^1=R^2=$ alkil,  $\ominus=^{17}O$ ,  $\bullet=^{18}O$ . W reakcjach enzymatycznych postuluje się występowanie tylko mechanizmu (b) pojedynczego lub wielokrotnego, w tym przypadku  $R^2O^-$  może być grupą funkcyjną centrum aktywnego enzymu (5, 18, 22).

waniu w wyniku permutacyjnej izomeryzacji do kolejnego produktu pośredniego, w którym grupa opuszczająca zajmuje pozycję apikalną. Zarówno charakter elektronowy podstawników przy fosforze jak i struktura wiązania wyjściowego determinują liczbę izomeryzacji permutacyjnych jakim ulega produkt pośredni. Jeżeli wymienione czynniki pozwalają, aby jeden akt izomeryzacji permutacyjnej wprowadził grupę opuszczającą w pozycję apikalną, rozpadowi produktu pośredniego towarzyszy utworzenie produktu końcowego z retencją konfiguracji w stosunku do substratu (Ryc. 1d).

Ostatni z opisanych rodzajów mechanizmu  $S_N2(P)$  wyjaśnia powstanie produktu reakcji chemicznej z retencją konfiguracji na atomie fosforu, która wynika z permutacyjnej izomeryzacji produktu pośredniego. Ponieważ w reakcjach enzymatycznych produkt także może powstać z retencją rozważmy czy w układach biologicznych permutacyjna izomeryzacja jest w ogóle możliwa. Teoretycznie rzecz biorąc mogłaby ona mieć miejsce gdyby nukleofil zaatakował cząsteczkę substratu niekolinearnie do grupy opuszczającej [inaczej mechanizm „adjacent” (8)]. Utworzony pięciowiązalny produkt pośredni musiałby ulec takiemu przegrupowaniu, właśnie w wyniku permutacyjnej izomeryzacji, które wprowadziłoby grupę opuszczającą w dogodny do odejścia położenie.

Pod pojęciem permutacyjnej izomeryzacji (zwanej także pseudorotacją) wg mechanizmu zaproponowanego przez B e r r y ' e g o (14) rozumie się przegrupowanie produktu pośredniego o budowie bipiramidy trygonalnej polegające na synchronicznej zamianie dwóch podstawników apikalnych z dwoma ekwatorialnymi. Przegrupowaniu mogą ulec układy spełniające określone wymagania wynikające z dążenia podstawników do zajęcia pozycji ekwatorialnych lub apikalnych zgodnie z następującymi regułami:

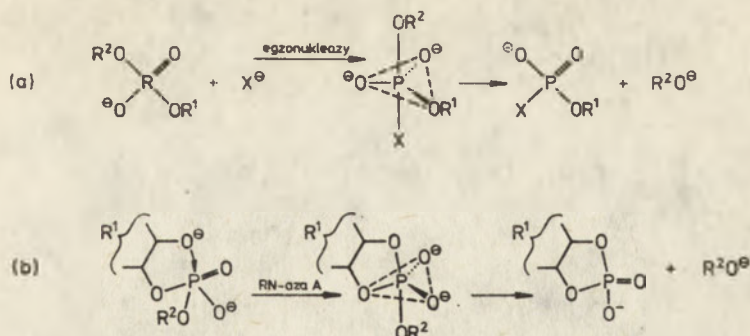
1. Im większa elektroujemność podstawnika tym większa tendencja do zajęcia pozycji apikalnej (apikofilowość) w bipiramidzie trygonalnej, szereg apikofilowości przedstawia się następująco:  $F > H > CH_3 > OC_6H_5 > Cl > > SCH_3 > OCH_3 > N(CH_3)_2 > CH_3 > C_6H_5$ .

2. Podstawniki wykazujące tendencję do tworzenia wiązań podwójnych są ekwatorialne; atomy z jedną parą elektronów wykazują większą tendencję do zajęcia pozycji ekwatorialnej niż te z dwoma, np.  $N > O > S > F > Cl$ .

3. Podstawniki objętościowo małe są apikofilowe, zaś duże zajmują pozycję ekwatorialną.

4. Pierścień pięcioczłonowy (np. w cyklicznym 2',3'-fosforanie nukleozydu) układa się apikalno-ekwatorialnie, zaś sześcioczłonowy (np. w cAMP) apikalno-ekwatorialnie lub ekwatorialno-ekwatorialnie (15).

Stosując powyższe reguły przeanalizujemy możliwe zmiany ułożenia podstawników przy atomie fosforu w grupie fosforanowej, w trakcie enzymatycznej hydrolizy kwasów nukleinowych. Reakcje te przebiegać będą wg mechanizmu  $S_N2(P)$ , więc utworzony zostanie pięciowiązalny związek przejściowy o strukturze bipiramidy trygonalnej. Badania nad działaniem nukleaz pozwalają sądzić, że degradacja kwasów nukleinowych przebiega albo poprzez cykliczny 2',3'-fosforan nukleozydu (RN-aza A) albo poprzez acykliczny związek przejściowy (5'- i 3'-nukleazy). Chciałbym podkreślić, że zarówno w pierwszym jak i w drugim przypadku związek pośredni ma strukturę bipiramidy trygonalnej, w której obdarzone ujemnymi ładunkami atomy tlenu są grupami elektronodonorowymi, muszą więc zająć pozycje ekwatorialne. Siłą rzeczy grupy opuszczająca i atakująca ustawione są kolinearnie w pozycjach apikalnych (Ryc. 2). Rozważmy zatem czy taki układ może ulec permutacyjnej izomeryzacji. Według mechanizmu Berry'ego przebiega ona w ten sposób, że jeden z podstawników staje się nieruchomy, zaś pozostałe poprzez stan przejściowy o strukturze piramidy



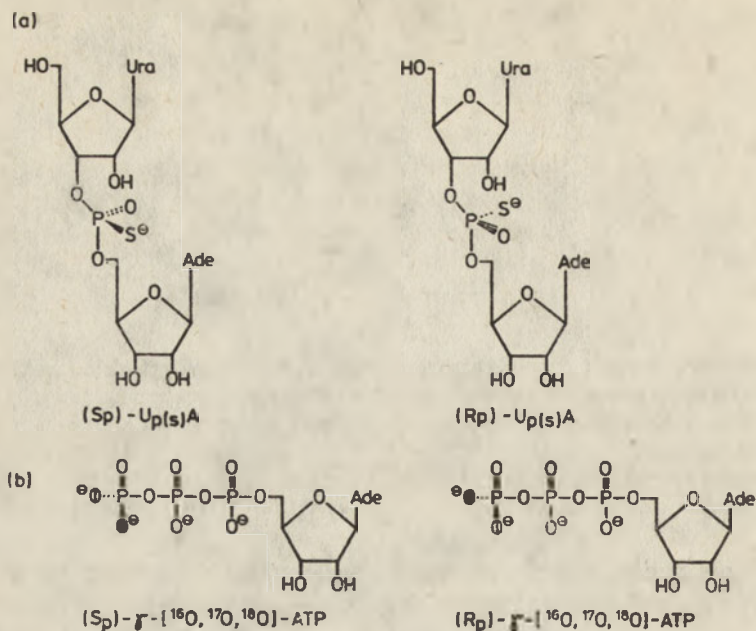
Ryc. 2. Tworzenie związku przejściowego o strukturze bipiramidy trygonalnej w czasie enzymatycznej hydrolizy kwasów nukleinowych; (a) – hydroliza RNA przez egzonukleazy; (b) – hydroliza RNA przez rybonukleazę A; (trzustkową) w pierwszym etapie zostaje utworzony cykliczny 2',3'-fosforan nukleotydu.

R<sup>1</sup> = nukleozyd lub nukleotydy, R<sup>2</sup> = nukleozyd, X = grupa atakująca (nukleofil) HO<sup>-</sup> lub grupa funkcyjna centrum aktywnego enzymu.

tetragonalnej ulegają przemieszczeniu – dwa do tej pory ekwatorialne w pozycje apikalne i dwa apikalne w ekwatorialne. Ponieważ ujemnie naładowane atomy tlenu mają tendencję do zajmowania pozycji ekwatorialnej jeden z nich stanowiłby oś obrotu piramidy, drugi zaś wraz z OR<sup>1</sup> musiałby być skierowany w pozycję apikalną. Na ich miejsce weszłyby podstawniki OR<sup>2</sup> i X, co stanowiłoby pogwałcenie reguły polarności definiującej ułożenie podstawników ze względu na ich elektroujemność (O<sup>-</sup> nie może zająć pozycji apikalnej). Zatem, praktycznie, permutacyjna izomeryzacja w układach biologicznych jest mało prawdopodobna co oznacza, że wynikająca z niej retencja konfiguracji w produkcie reakcji enzymatycznej musi być rezultatem dwóch inwersji. Pierwsza powstaje po ataku nukleofilowym reszty aminokwasowej z centrum aktywnego enzymu, druga zaś jest wynikiem hydrolizy kowalencyjnego związku przejściowego enzym-substrat pod wpływem cząsteczki wody.

### III. Badania mechanizmu reakcji enzymatycznych za pomocą metody stereochemicznej

Badania stereochemiczne mechanizmów reakcji enzymatycznych, w których grupa fosforanowa lub nukleotydydowa ulega przeniesieniu na odpowiedni akceptor prowadzone są od blisko dziesięciu lat (4, 8–12). Użytymi substratami były związki z chiralną grupą fosforanową, tzn. w przypadku diestrów tiofosforany lub [<sup>18</sup>O]-fosforany, w których jeden z izotopów tlenu zastąpiono siarką lub <sup>18</sup>O. W monofosforanach wprowadzono w miejsce dwóch izotopów <sup>16</sup>O izotop <sup>18</sup>O i siarkę lub <sup>17</sup>O i <sup>18</sup>O. Każdy z tak utworzonych chiralnych (tio-) fosforanów występuje w postaci pary diastereoizomerów, których konfiguracje absolutne określone za pomocą reguł Cahn, Ingolda i Preloga definiuje się jako Sp i Rp (S i R oznacza konfigurację absolutną, P-atom fosforu) (Ryc. 3). Do



Ryc. 3. Diastereoizomery o konfiguracjach absolutnych (Sp)- i (Rp)- na atomach fosforu; (a) – tiofosforany urydyloadenozyny  $U_{P(s)}A$ ; (b) –  $\gamma$ -[ $^{16}\text{O}$ ,  $^{17}\text{O}$ ,  $^{18}\text{O}$ ]-trifosforany adenozyzny (ATP).

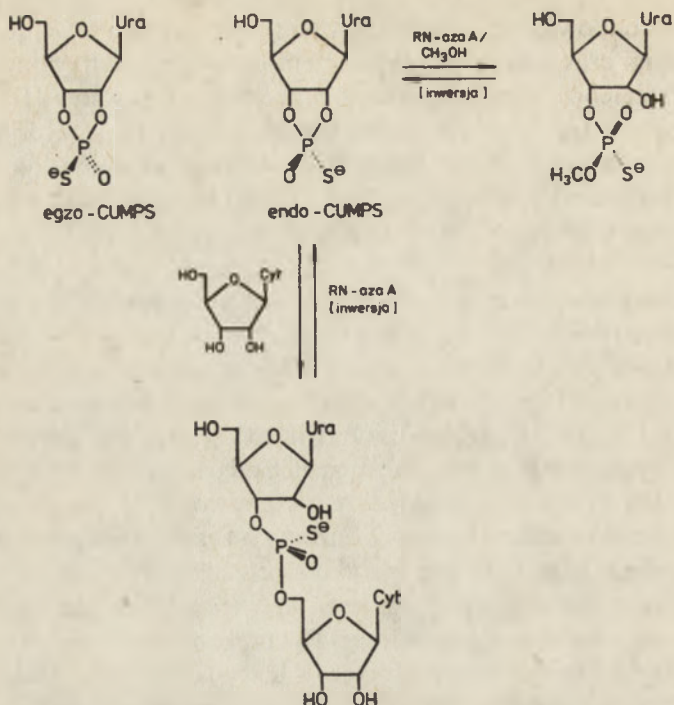
badania stereochemii reakcji może być użyty zarówno diastereoizomer Sp- jak i Rp- pod warunkiem, że jest on trawiony przez enzym. Istnieje jednak zasadnicza różnica pomiędzy chiralnymi tiofosforanami i fosforanami, bowiem wprowadzenie do grupy fosforanowej cięższego izotopu bądź izotopów tlenu nie zaburza reakcji enzymatycznej, gdyż biokatalizator trawi taki związek tak samo jak pro- (lub propro-) chiralny fosforan. Enzym nie jest w stanie odróżnić tak małej modyfikacji w grupie fosforanowej. Zastąpienie atomu tlenu znacznie większą siarką, a więc utworzenie chiralnego tiofosforanu może za to pociągnąć za sobą poważne konsekwencje. Enzymy bardzo często rozróżniają diastereoizomery tiofosforanu, z których jeden może być trawiony drugi zaś nie, co uwidaczniają różne szybkości reakcji, wahające się w granicach od 0 do 10 000 razy (16, 17). Zdarzają się też przypadki, że żaden z utworzonych diastereoizomerów nie jest substratem (19). Zastąpienie atomu tlenu siarką może również pociągnąć za sobą zmiany w mechanizmie reakcji pomimo, że wynik stereochemiczny będzie taki sam jak dla fosforanów, co może wynikać np. z przesunięcia równowagi w kierunku syntezy nie zaś hydrolizy (16, 20, 21). Dlatego też, obecnie stosuje się pochodne nukleotydów (i oligonukleotydów) zawierające w swej strukturze grupę fosforanową, której chiralność wywołana jest przez wprowadzenie cięższych izotopów tlenu.

Znane jest kilka metod syntezy tiofosforanów nukleozydów, które polegają albo na tiofosforylacji grup 5'- lub 3'-OH nukleozydów z pozostałymi grupami funkcyjnymi zablokowanymi albo na stereoselektywnym wprowadzeniu siarki

do uprzednio odpowiednio zmodyfikowanej reszty fosforanowej (8, 23, 24, 25, 26). Przez długi czas poważnym problemem był rozdział otrzymanych pochodnych na diastereoizomery i dopiero powszechne zastosowanie HPLC w dużej mierze usunęło tę trudność. Pochodne tiofosforanowe nukleozydów mogą być stereospecyficznie przekształcone w [ $^{18}\text{O}$ ]-fosforany nukleozydów (27, 28, 29, 30). Te substraty, a także wzbogacone w  $^{17}\text{O}$  można również otrzymać na drodze syntezy chemicznej wychodząc z nukleozydów i stosując reagenty zawierające izotopy  $^{17}\text{O}$  i  $^{18}\text{O}$  (31, 32).

Konfiguracje absolutne substratów, jak też i otrzymanych w wyniku reakcji enzymatycznych produktów będących chiralnymi fosforanami można oznaczyć albo za pomocą spektrometrii masowej albo wysokorozdzielczego  $^{31}\text{P}$ -MRJ dzięki wykorzystaniu specyficznych właściwości izotopowo oznakowanej grupy fosforanowej (25, 33, 34). Izotop  $^{18}\text{O}$  związany z atomem fosforu powoduje przesunięcie sygnału w górę pola, w przedziale od 0.01 do 0.04 ppm, w zależności od tego czy jest to wiązanie pojedyncze czy podwójne. W przypadku tiofosforanów nukleozydów można stosować enzymy o znanej wybiórczości substratowej, tj. trawiące tylko jeden z pary diastereoizomerów (8). Wiadomo, że fosfodiesteraza z jadu węża svPDE jest stereoselektywna, trawi tylko diestry tiofosforanowe o konfiguracji absolutnej Rp, może więc być użyta do stereochemicznej analizy budowy diastereoizomerów innego diestru tiofosforanu bowiem hydrolizie ulegnie tylko Rp)-izomer zaś (Sp)-pozostanie nienaruszony (82, 83).

Pierwszym z enzymów, którego mechanizm działania badano metodą stereochemiczną była RN-aza A. Na podstawie dotychczas uzyskanych wyników wiadomo było, że katalizuje ona odwracalną reakcję hydrolizy RNA (związek o budowie diestru fosforanowego) przebiegającą przez produkt pośredni – cykliczny 2',3'-fosforan nukleozydu (36). W celu wyjaśnienia, czy w trakcie hydrolizy biopolimeru któraś z grup centrum aktywnego wiąże się kowalencyjnie z cząsteczką substratu, Eckstein i wsp. zsyntetyzowali zmodyfikowany nukleotyd – cykliczny 2',3'-tiofosforan urydyny (cUMPS) zawierający chiralną grupę tiofosforanową by użyć go zamiast cUMP. W wyniku reakcji RN-azy A z cUMPS, w obecności metanolu, powstał produkt-dia stereoizomer estru metylowego 3'-tiofosforanu urydyny. Konfigurację absolutną na atomie fosforu w tym związku zidentyfikowano za pomocą rentgenografii strukturalnej jako R. Drugą reakcją, którą także katalizowała RN-aza A była synteza tiofosforanu urydylocytydyny ( $U_{\text{P(S)}}\text{C}$ ), jako substraty użyto endo cUMPS i cytydyny. W tym przypadku powstający diastereoizomer  $U_{\text{P(S)}}\text{C}$  był analogiem di-rybonukleotydu – urydylocytydyny ( $U_{\text{P}}\text{C}$ ), w naturalnych warunkach trawionym przez enzym do 3'-fosforanu urydyny i cytydyny. Konfigurację absolutną na atomie fosforu w  $U_{\text{P(S)}}\text{C}$  oznaczono jako R. Tak więc, zgodnie z mechanizmem  $S_{\text{N}}2(\text{P})$  i uwzględniając, że starszeństwo podstawników wg reguł Cahn, Ingolda i Preloga uległo zmianie w grupie tiofosforanowej produktu, reakcja transestryfikacji katalizowana przez RN-azę A przebiegała z inwersją konfiguracji na atomie fosforu, podobnie jak metanoliza cUMPS. Oznacza to, że w obu reakcjach enzym nie tworzy wiązań kowalencyjnych z substratami (Ryc. 4) (37, 38, 39).

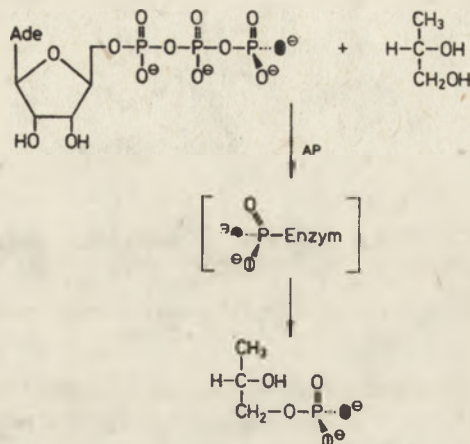


Ryc. 4. Stereochemia reakcji katalizowanej przez RN-azę A (37, 38, 39).

Badania stereochemiczne nie wykazały wiązań kowalencyjnych w kompleksie RN-azy A i cząsteczek substratu, co potwierdza wcześniej zaproponowany schemat mechanizmu działania centrum aktywnego enzymu. Zgodnie z nim His-119 i Lys-41 tworzą wiązania wodorowe pomiędzy obdarzonymi ładunkami ujemnymi tlenami wiązania internukleotydu, zaś atak nukleofilowy grupy 2'-hydroksylowej jest możliwy dzięki oderwaniu od niej protonu przez His-12. Tworzący się pięciowiązalny stan przejściowy o geometrii bipiramidy trygonalnej jest stabilizowany przez His-119 i Lys-41 aż do chwili oderwania grupy opuszczającej, którą jest cytydina. Utworzony produkt pośredni cUMP, w wyniku katalizowanego przez His-119 ataku nukleofilowego cząsteczki wody, ulega przekształceniu w stan przejściowy o kształcie bipiramidy trygonalnej, a następnie rozpada się do fosforanu cytydyny (40).

Badania nad stereochemią enzymatycznej hydrolizy monoestrów fosforanowych rozpoczęło wyjaśnienie przez Knowlesa i wsp. przebiegu reakcji katalizowanej przez alkaliczną fosfatazę. Powoduje ona przeniesienie grupy fosforanowej z ATP na alkohole z wycinalnymi grupami hydroksylowymi lub aminowymi. Substratem był diastereoizomer (Sp)- $\gamma$ -[<sup>16</sup>O, <sup>17</sup>O, <sup>18</sup>O]-ATP, czyli związek którego chiralność grupy  $\gamma$ -fosforanowej wywołano zastępując dwa <sup>16</sup>O izotopami <sup>17</sup>O i <sup>18</sup>O. Akceptorem grupy [<sup>16</sup>O, <sup>17</sup>O, <sup>18</sup>O]-fosforanowej był 1,2-propandiol. Fosforylacji uległy obie grupy hydroksylowe otrzymano bowiem 1- i 2-fosforylowane propandiole w proporcji 6:1, powstały też znaczne ilości

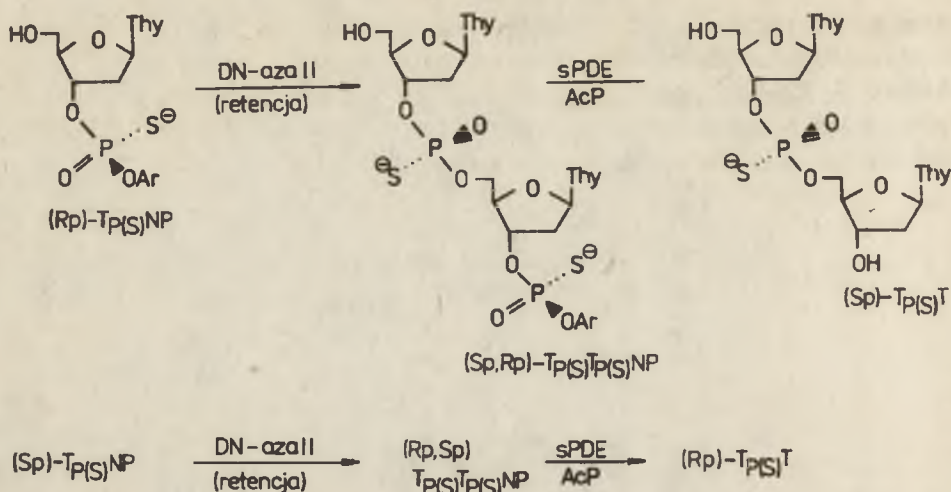
nieorganicznego fosforanu. Po analizie stereochemicznej 1-[ $^{16}\text{O}$ ,  $^{17}\text{O}$ ,  $^{18}\text{O}$ ]-fosforopropandiolu stwierdzono, że ma on konfigurację absolutną na atomie fosforu S. Reakcja przebiegała zatem z retencją konfiguracji, co w świetle powyższych rozważań oznacza, że enzym tworzy kowalencyjny produkt pośredni wiążąc się z cząsteczką substratu (Ryc. 5.) (41). Konkluzja wynikająca z



Ryc. 5. Stereochemia reakcji katalizowanej przez alkaliczną fosfatazę (41).

rezultatu badań stereochemicznych jest w pełni spójna z wcześniejszymi obserwacjami (42). Stwierdzono bowiem, że po inkubacji nieorganicznego fosforanu z enzymem przy pH 6 utworzył się fosforan seryny (96, 97). Na tej podstawie M o r t o n sformułował hipotezę mówiącą, że reakcja przebiega w dwóch etapach: w pierwszym następuje fosforylacja aminokwasu w centrum aktywnym alkalicznej fosfatazy, innymi słowy utworzenie produktu pośredniego enzym-substrat, w drugim zaś jego hydroliza (98).

Kolejnym przykładem enzymu, którego mechanizm działania badano za pomocą metody stereochemicznej jest deoksyrybonukleaza wyizolowana z cielęcej śledziony (DN-aza II). Katalizowana reakcja jest trudna do śledzenia, gdyż DN-aza II cechuje się aktywnościami endo- i egzonukleazową, rozcina zarówno jedno- jak i dwuniciowy DNA oraz odcina nukleozydy od 3'-końca pojedynczego łańcucha kwasu deoksyrybonukleinowego (99). Ostatnia cecha zadecydowała o wyborze substratów nadających się do badania stereochemii DN-azy II; były nimi diastereoizomery 3'-(4-nitrofenylo)tiofosforanu tymidyny ( $T_{P(S)}NP$ ) otrzymane wg metody opracowanej w Zakładzie Chemii Bioorganicznej CBMM PAN w Łodzi (100, 101). W takim związku jak  $T_{P(S)}NP$  reszta 4-nitrofenylowa imituje nukleozyd, zaś obecność siarki decyduje o chiralności grupy difosforanowej. Użycie ww. diastereoizomerów pozwoliło nie tylko ustalić stereochemię katalizowanej przez DN-azę II reakcji, ale także wykryć nieznaną do tej pory aktywność polegającą na przenoszeniu funkcji 4-nitrofenylotiofosforanowej z pozycji 3' do 5'-dinukleotydu (Ryc. 6).

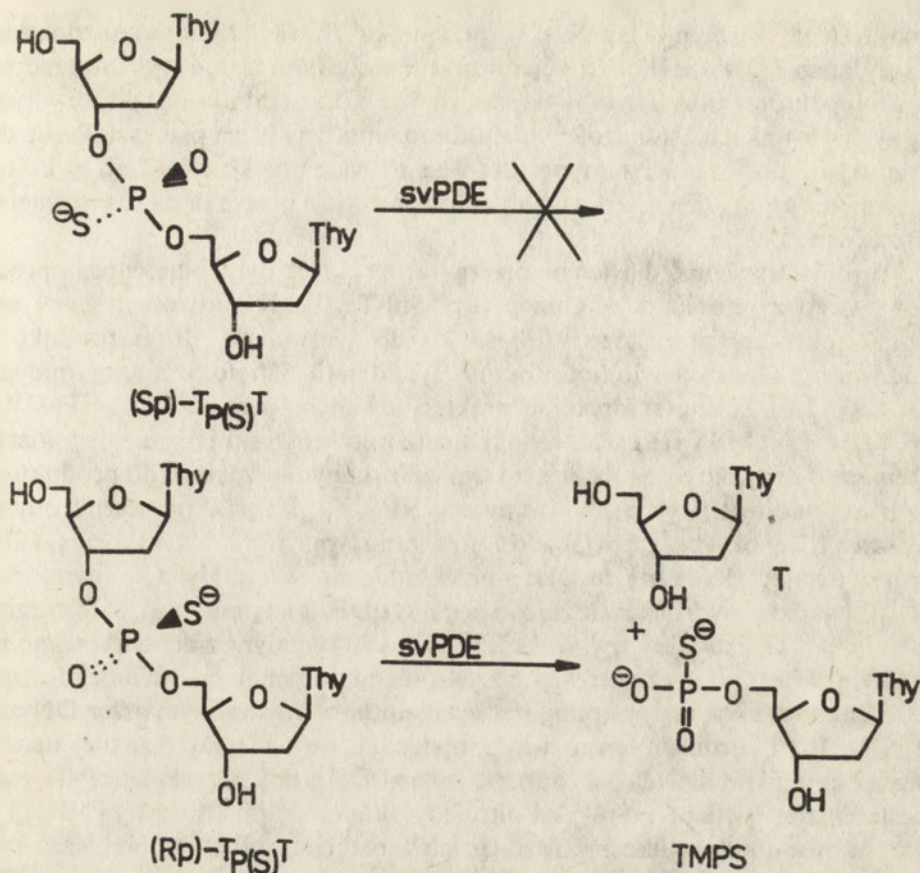


Ryc. 6. Badania stereochemii reakcji transestryfikacji katalizowanej przez DN-azę II.

Trawienie  $T_{P(S)}NP$  o konfiguracji absolutnej na atomie fosforu Rp spowodowało powstanie produktu 3'-(4-nitrofenylo)tiofosforanu tymidylo(3'-5')tiofosforanu tymidyny [ $T_{P(S)}T_{P(S)}NP$ ]. Strukturę utworzonego związku zidentyfikowano porównując go za pomocą TLC,  $^{31}P$ -MRJ i HPLC z syntetycznym wzorcem, jednakże ustalenie konfiguracji absolutnych na atomach fosforu wymagało dalszych badań. Pochodna trinukleotydu  $T_{P(S)}T_{P(S)}NP$  ze względu na dwie chiralne grupy fosforanowe występuje w formie czterech diastereoizomerów. W celu zidentyfikowania konfiguracji absolutnej w pozostałych po reakcji enzymatycznej  $T_{P(S)}T_{P(S)}NP$  należałoby porównać właściwości fizykochemiczne produktu w każdym z czterech syntetycznych diastereoizomerów  $T_{P(S)}T_{P(S)}NP$ . Teoretycznie byłoby to możliwe gdyby rozdzielały się one na analitycznej kolumnie HPLC lub wykazywały odmienne wartości przesunięć chemicznych w widmach  $^{31}P$ -MRJ. Jednakże cztery syntetyczne diastereoizomery  $T_{P(S)}T_{P(S)}NP$  cechował ten sam czas retencji i te same wartości przesunięć chemicznych. Dlatego też konfigurację absolutną w produkcie reakcji enzymatycznej oznaczono dopiero po przekształceniu go w tiofosforan tymidylo(3'-5')tymidyny [ $T_{P(S)}T$ ]. Związek ten jest mieszaniną diastereoizomerów, jednakże w tym przypadku ich rozdział za pomocą HPLC jest możliwy. Oba diastereoizomery (Rp)- i (Sp)- $T_{P(S)}T$  zostały otrzymane na drodze syntezy chemicznej, a ich konfiguracje absolutne na atomach fosforu oznaczono poprzez trawienie svPDE, tak więc hydrolizowanemu diastereoizomerowi przypisano konfigurację Rp, a nietrawionemu Sp (Ryc. 7) (102).

Badany diastereoizomer  $T_{P(S)}T_{P(S)}NP$  potraktowano mieszaniną fosfodiesterazy ze śledziny i kwaśnej fosfatazy. Spowodowało to usunięcie grupy 4-nitrofenylowej i tiofosforanowej z końca 3' modyfikowanego deoksyrybonukleotydu. Powstały związek zidentyfikowano jako (Sp)- $T_{P(S)}T$ , poprzez porównanie z czasami retencji syntetycznych wzorców (Rp)- i (Sp)- $T_{P(S)}T$ , oznaczono więc





Ryc. 7. Oznaczanie konfiguracji absolutnych na atomach fosforu w diastereoizomerach (Sp)- i (Rp)- $T_{P(S)}T$ .

w ten sposób konfigurację absolutną internukleotydu grupy tiofosforanowej (21). Stereochemiczny przebieg reakcji, tzn. przejście od (Rp)- do (Sp)-diastereoizomeru tylko pozornie sugeruje inwersję konfiguracji, należy bowiem uwzględnić fakt iż w produkcie, w stosunku do substratu, nastąpiła zmiana starszeństwa podstawników. W (Rp)- $T_{P(S)}NP$  najstarszym był atom siarki potem zaś 4-nitrofenyl i reszta nukleozydowa; w produkcie, po siarce, kolejność jest odwrócona, starsza jest tymidyna związana przez grupę 3'-hydroksylową. Oznacza to, że w rzeczywistości reakcja przebiega z retencją konfiguracji na atomie fosforu, czyli, że w jej trakcie tworzony jest kowalencyjny produkt pośredni enzym-substrat.

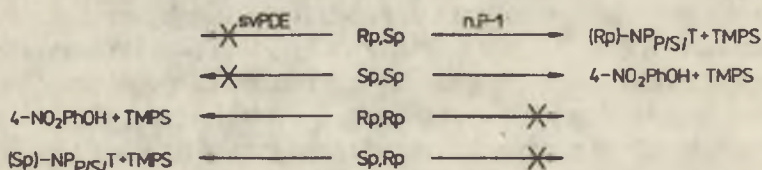
Konfiguracja absolutna terminalnej grupy tiofosforanowej nie mogła w trakcie reakcji ulec zmianie, gdyż jedynym racjonalnym tłumaczeniem powstania  $T_{P(S)}T_{P(S)}NP$  w czasie trawienia (Rp)- $T_{P(S)}NP$  jest założenie, że reakcja ma charakter transestryfikacji, tzn. po utworzeniu kompleksu  $T_{P(S)}$  – DN-aza II jest on atakowany przez grupę 5'-hydroksylową drugiej cząsteczki substratu, co powoduje oderwanie enzymu z jednoczesnym powstaniem produktu. Na

podkreślenie zasługuje fakt, że w przypadku trawienia diastereoizomerów  $T_{P(S)}NP$  przez DN-azę II obserwujemy przede wszystkim transestryfikację nie zaś hydrolizę, której można byłoby się spodziewać biorąc pod uwagę fakt, że w tych samych warunkach 3'-(4-nitrofenylo) fosforan tymidyny ulega przekształceniu do produktu 3'-fosforanu tymidyny (21). Jest to więc przykład reakcji, w której zastąpienie atomu tlenu siarką w substracie powoduje przesunięcie równowagi w stronę syntezy.

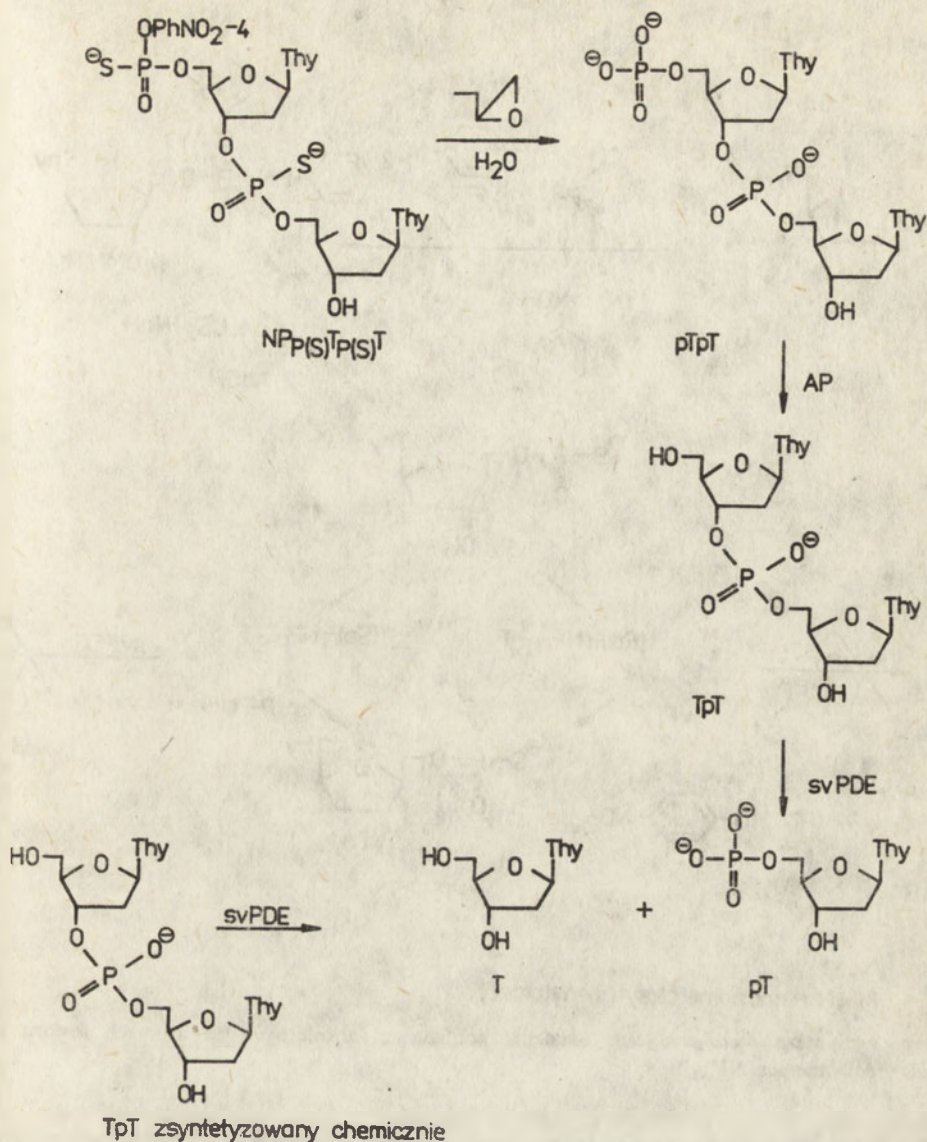
Wyniki trawienia diastereoizomeru  $(Sp)-T_{P(S)}NP$  były odmienne, oprócz powstałego z retencją konfiguracji  $(Rp, Sp)-T_{P(S)}T_{P(S)}NP$  utworzył się w ok. dziesięciokrotnej przewadze w stosunku do pierwszego, drugi produkt o budowie 5'-(4-nitrofenylo)tiofosforanu tymidylo(3'-5')tiofosforanu tymidyny  $[NP_{P(S)}T_{P(S)}T]$ . Został on w pełni scharakteryzowany za pomocą TLC,  $^{31}P$ -MRJ,  $^1H$ -MRJ, UV, MS i HPLC, a wyniki analiz potwierdzono poprzez degradację chemiczno-enzymatyczną na drodze reakcji o znanym przebiegu do produktów o znanej budowie (Ryc. 8). Wyizolowany  $NP_{P(S)}T_{P(S)}T$  został przekształcony w reakcji z 1,2-epoksybutanem (30) do 5'-fosforanu tymidylo(3'-5')tymidyny  $(p_pT_pT)$ , który stosując alkaliczną fosfatazę przekształcono w tymidylo(3'-5')tymidynę  $(T_pT)$ , by dalej hydrolizować za pomocą svPDE do tymidyny i 5'-fosforanu tymidyny  $(pT)$ . Produkty ww. reakcji, tj.  $T_pT$ ,  $pT$  i tymidynę zidentyfikowano za pomocą HPLC poprzez porównanie z wzorcami otrzymanymi na innej drodze.

Oznaczenia wymagały konfiguracje absolutne w utworzonym przez DN-azę II  $NP_{P(S)}T_{P(S)}T$ . Problem ten rozwiązano stosując dwa enzymy o znanej stereochemii katalizowanej reakcji, opisane już svPDE i nukleazę P-1 (n.P-1) oraz diastereoizomery  $(Rp)$ - i  $(Sp)$ -5'-(4-nitrofenylo)tiofosforanu tymidyny  $[NP_{P(S)}T]$ , jako wzorce do identyfikacji powstających w reakcji produktów. Nukleaza P-1 trawi tiofosforany dialkilowe o konfiguracji absolutnej Sp na atomie fosforu (92, 103). Syntezę  $NP_{P(S)}T$  i oznaczanie konfiguracji absolutnej, także przy użyciu nukleazy P-1 prezentuje Ryc. 9.

Wzorując się na pracach *Steca i w s p.* (103) zaproponowano następujący sposób postępowania uwzględniający wszystkie możliwe warianty konfiguracji absolutnych grup tiofosforanowych  $NP_{P(S)}T_{P(S)}T$ :

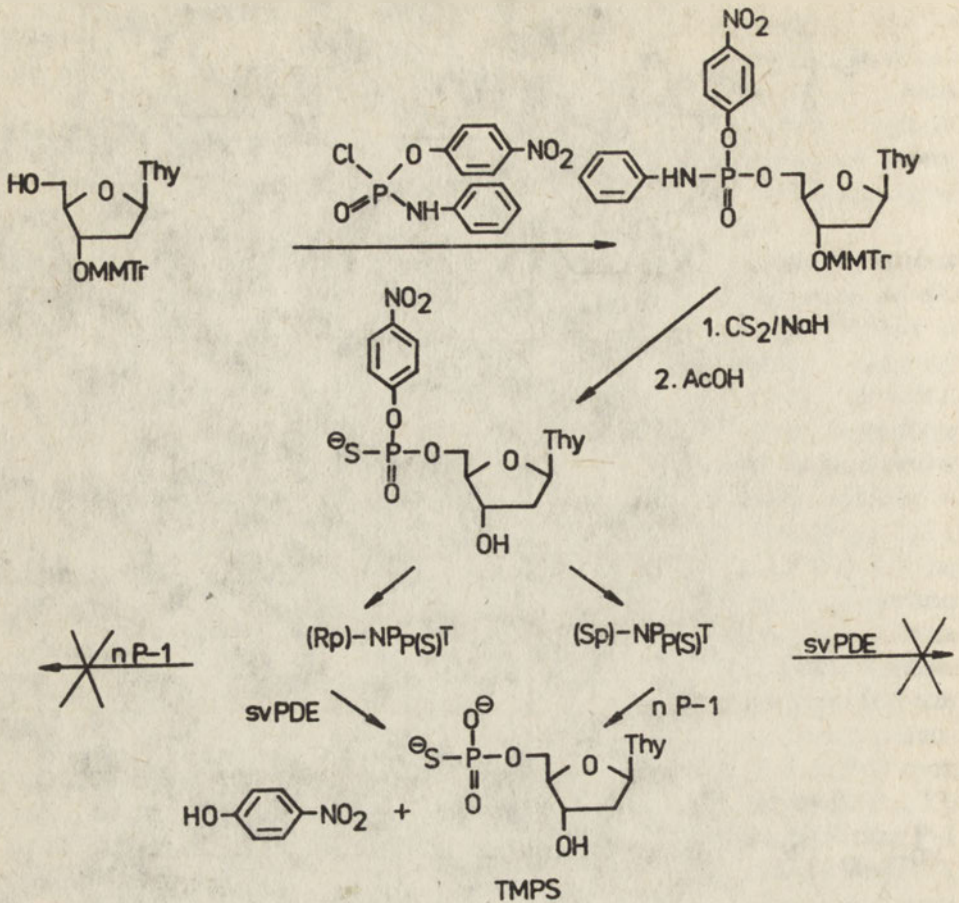


Wyniki trawień wykazały, że  $NP_{P(S)}T_{P(S)}T$  jest  $(Sp, Rp)$ -diastereoizomerem, był on bowiem trawiony przez svPDE do  $(Sp)-NP_{P(S)}T$  i 5'-tiofosforanu tymidyny (TMPS) i nie był hydrolizowany przez nukleazę P-1 (Ryc. 10). Główny produkt reakcji  $(Sp)-T_{P(S)}NP$  z DN-azą II powstał zatem z retencją konfiguracji na obu atomach fosforu, jednakże wyjaśnienie mechanizmu reakcji było w tym przypadku znacznie trudniejsze. Przyjęto hipotezę, że  $(Sp, Rp)-NP_{P(S)}T_{P(S)}T$  powstaje z



Ryc. 8. Identyfikacja głównego produktu utworzonego w trakcie reakcji (Sp)-T<sub>P(S)</sub>NP z DN-azą II.

(Rp, Sp)-T<sub>P(S)</sub>T<sub>P(S)</sub>NP; w celu jej potwierdzenia syntetyczne diastereoizomery (Rp, Sp)-, (Sp, Sp)- i (Rp, Rp)-T<sub>P(S)</sub>T<sub>P(S)</sub>NP trawiono DN-azą II. Zgodnie z przypuszczeniami zaobserwowano, że (Rp, Sp)-T<sub>P(S)</sub>T<sub>P(S)</sub>NP ulega przekształceniu w (Sp, Rp)-NP<sub>P(S)</sub>T<sub>P(S)</sub>T. Na tej podstawie zaproponowano następujący mechanizm: (Sp)-T<sub>P(S)</sub>NP tworzy z enzymem kowalencyjny kompleks, który po ataku nukleofilowym drugiej cząsteczki substratu zostaje przekształcony w (Rp, Sp)-T<sub>P(S)</sub>T<sub>P(S)</sub>NP. Tlen ulega ponownemu związaniu z enzymem – tworzy się drugi kowalencyjny kompleks enzym-T<sub>P(S)</sub>NP z jednoczesnym uwolnieniem T<sub>P(S)</sub>T.

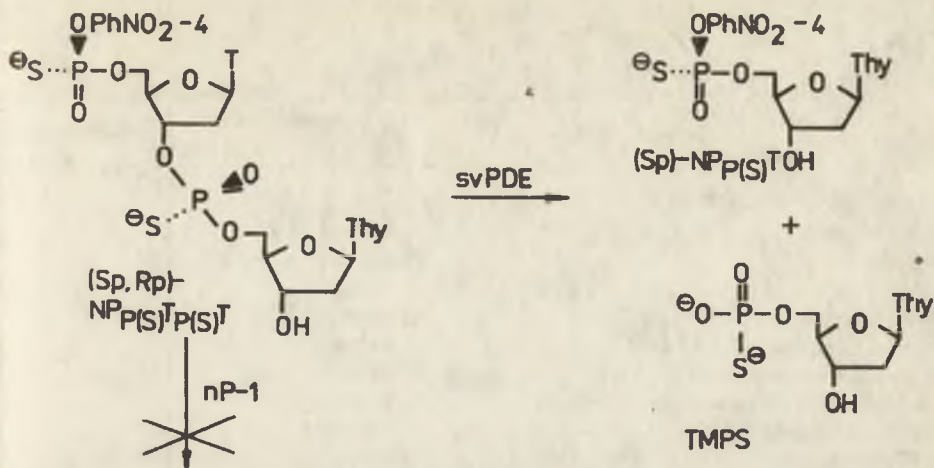


MMTr = monometoksytrifenylometyl

Ryc. 9. Synteza i enzymatyczne ustalenie konfiguracji absolutnych na atomach fosforu w diastereoizomerach  $\text{NP}_{P(S)}\text{T}$ .

Tiofosforan dinukleozydu dysponuje dwoma grupami hydroksylowymi (w pozycjach 3' i 5') o właściwościach nukleofilowych. Każda z nich może zaatakować kompleks produkt pośredni – enzym. Jeżeli nukleofilem jest 3'-OH nastąpi regeneracja  $\text{T}_{P(S)}\text{T}_{P(S)}\text{NP}$ , zaś gdy 5'-OH powstanie  $\text{NP}_{P(S)}\text{T}_{P(S)}\text{T}$  (21).

Do chwili obecnej stosując metodę stereochemiczną zbadano ponad pięćdziesiąt enzymatycznych reakcji przeniesienia grupy fosforanowej oraz nukleotydydowej na odpowiedni akceptor, wykazując w większości inwersję konfiguracji na atomie fosforu (ok. 80%, patrz Tabela 1). Oznacza to, że na ogół reakcja polega na przeniesieniu grupy bezpośrednio z donora na akceptor, enzym zaś stanowi czynnik umożliwiający i przyspieszający proces. W reakcjach enzymatycznych biegnących z retencją konfiguracji biokatalizator jest akceptorem grupy fosfora-



Ryc. 10. Oznaczenie konfiguracji absolutnych na atomach fosforu w produkcie  $\text{NP}_{\text{P(S)}}\text{T}_{\text{P(S)}}\text{T}$  za pomocą trawienia fosfodiesterazą z jadu węża i nukleazą P-1.

Tabela 1

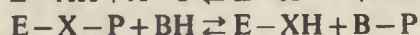
Stereochemiczny przebieg enzymatycznego przeniesienia grupy fosforanowej bądź nukleotydylowej

Enzym	Stereochemiczny wynik reakcji	Odnośnik
Rybonukleaza (trzustkowa), E.C. 3.1.27.5:		
hydrolyza	inwersja	37, 38
transestryfikacja	inwersja	39
Rybonukleaza T <sub>1</sub> , E.C. 3.1.27.3	inwersja	43
Rybonukleaza T <sub>2</sub> , E.C. 3.1.27.1	inwersja	44
Fosfohydrolaza z <i>Enterobacter aerogenes</i> , E.C. 3.14.1.	inwersja	45
Polimeraza RNA zależna od DNA z <i>E. coli</i> , E.C. 2.7.7.6:		
inicjacja	inwersja	46
elongacja	inwersja	47
Polimeraza DNA zależna od DNA z <i>E. coli</i> , E.C. 2.7.7.7	inwersja	48, 49
z Faga T4	inwersja	50
z Faga T7	inwersja	51
Odwrotna transkryptaza	inwersja	52
Fosforylaza polinukleotydoma, E.C. 2.7.7.8:		
wymiana	retencja	53
elongacja	inwersja	54
Adenilotransferaza tRNA, E.C. 2.7.7.20	inwersja	55
Ligaza RNA, E.C. 6.5.1.3	inwersja	56
Pirofosforylaza UDP-glukoza-1,3-β-D-glukan, E.C. 2.4.1.34	inwersja	57
Urydyliotransferaza galaktozo-1-fosforanowa, E.C. 2.7.7.10	retencja	57

c.d tabeli 1.

Enzym	Stereochemiczny wynik reakcji	Oдносьnik
Cyklaza adenylanowa, E.C. 4.6.1.1 bakteryjna	inwersja	58
śsaków	inwersja	59
Kinaza nukleozydodifosforanowa, E.C. 2.7.4.6	retencja	57
Syntetaza acetylo-CoA, E.C. 6.2.1.1	inwersja	60, 34
Kinaza adenylanowa, E.C. 2.7.4.3	inwersja	57
Kinaza adenozykowa, E.C. 2.7.1.20	inwersja	61
Fosfotransferaza nukleozydowa, E.C. 2.7.1.77	retencja	62
Nukleaza S1, E.C. 3.1.30.1	inwersja	63
ATPaza miozynowa, E.C. 3.6.1.8	inwersja	64
ATPaza mitochondrialna, E.C. 3.6.1.8	inwersja	65
ATPaza z reticulum endoplazmatycznego, E.C. 3.6.1.8	retencja	66
dGTPaza, E.C. 3.1.5.1:		
czynnik wydłużający G	inwersja	67
czynnik wydłużający T	inwersja	68
Kinaza fosfoglicerynianowa, E.C. 2.7.2.3	inwersja	69, 70
Heksokinaza, E.C. 2.7.1.1	inwersja	71, 72, 73
Kinaza glicerolowa, E.C. 2.7.1.30	inwersja	72, 74
Kinaza pirogronianowa, E.C. 2.7.1.40	inwersja	75, 71, 72
Kinaza polinukleotydomowa, E.C. 2.7.4.4	inwersja	76, 77
Fosfodiesteraza cyklicznych nukleotydów, E.C. 3.1.4.17	inwersja	32, 78, 79, 80
Cyklaza guanylanowa, E.C. 4.6.1.2	inwersja	81
Fosfodiesteraza z jadu węża, E.C. 3.1.4.1	retencja	82, 83, 84, 85
Syntetaza Aminoacylo-tRNA	inwersja	86, 87
Alkaliczna fosfataza, E.C. 3.1.3.1	retencja	41
Kinaza octanowa, E.C. 2.7.2.1	inwersja	72
Kinaza kreatynowa E.C. 2.7.3.2	inwersja	88
Nukleaza ze Staphylococcus aureus, E.C. 3.1.23.27	inwersja	90
Fosfodiesteraza ze śledziony, E.C. 3.1.31.1:		
hydroliza	retencja	91
transestryfikacja	retencja	21
Fosfogliceromutaza, E.C. 2.7.5.3	retencja	91
Nukleaza P1 z Penicillium citrum, E.C. 3.1.30.1	inwersja	92, 103
Dn-aza II, E.C. 3.1.22.1:		
transestryfikacja	retencja	22
Kwaśna fosfataza, E.C. 3.1.3.2	retencja	94
DN-aza I, E.C. 3.1.21.1	inwersja	9
6-Fosfofruktokinaza, E.C. 2.7.1.11	inwersja	93

nowej (lub nukleotydomowej), którą następnie przenosi na cząsteczkę drugiego substratu wg schematu:



gdzie E jest enzymem, XH grupą z centrum aktywnego, np.  $NH_2$  – lizyny,

OH – seryny lub imidazolową histydyny, A i B donorem i akceptorem grupy fosforanowej P. W tych zatem przypadkach, w których stwierdzono retencję konfiguracji, postuluje się, mając dane eksperymentalne z badań innego typu, możliwość występowania związku pośredniego o strukturze E-X-P.

*Autor dziękuje Pani Prof. dr hab. Zofii Zielińskiej i Panu Prof. dr hab. Wojciechowi J. Stecowi za pomoc przy opracowaniu artykułu.*

*Artykuł otrzymano 4 grudnia 1986 r.  
Zaakceptowano do druku 7 września 1987 r.*

## PIŚMIENNICTWO

1. Segel I.H., (1975), *Enzyme Kinetics*, wyd. Wiley J. and Sons, Inc.
2. Fersht A.R., (1980), *Enzymatic and Non-enzymic Catalysis*, wyd. Horwood E. Ltd., str. 13–26.
3. Rao B.D.N., Kayne F.J., Cohn M., (1979), *J. Biol. Chem.*, **254**, 2689–2696.
4. Eckstein F., Romaniuk P.L., Connolly B.A., (1982), *Methods Enzymol.*, **87**, 198–213.
5. Westheimer F.H., (1981), *Rearrangements in Ground and Excited States*, wyd. de Mayo P., t. 2, str. 229–241.
6. Cahn R.S., (1964), *J. Chem. Educ.*, **41**, 116–120.
7. Benkovic S.J., Schray K.J., (1971), *The Enzymes*, **8**, 201–238.
8. Eckstein F., (1983), *Angewandte Chemie, Int. Ed. Engl.*, **22**, 423–439.
9. Gerlt J.A., Coderre J.A., Mehdi S., (1983), *Advances in Enzymol.*, **55**, 291–380.
10. Knowles J.R., (1980), *Ann. Rev. Biochem.*, **49**, 877–919.
11. Koziołkiewicz M., Niewiarowski W., Uznański B., Stec W.J., (1986), *Phosphorus and Sulfur*, **27**, 81–92.
12. Frey P.A., (1982), *New Comp. Biochem.*, **3**, 210
13. Westheimer F.H., (1968), *Acct. Chem. Res.*, **1**, 70–78.
14. Berry R.S., (1960), *J. Chem. Phys.*, **32**, 933–938.
15. Emsley J., Hall D., (1976), *Chemistry of Phosphorus*, wyd. Harper and Row Ltd., str. 65–68.
16. Niewiarowski W., Uznański B., (1985), *Europ. J. Biochem.*, **153**, 145–153.
17. Gerlt J.A., Mehdi S., Coderre J.A., Rogers W.O., (1980), *Tetrahedron Lett.*, **21**, 2385–2389.
18. Clapp C.H., Westheimer F.H., (1974), *J. Amer. Chem. Soc.*, **96**, 6710–6712.
19. v Dobeln U., Reichard I., (1976), *J. Biol. Chem.*, **251**, 3616–3622.
20. Mehdi S., Gerlt J.A., (1981), *J. Amer. Chem. Soc.*, **103**, 7018–7021.
21. Uznański B., Niewiarowski W., Stec W.J., (1986), *J. Biol. Chem.*, **261**, 592–598.
22. Clapp C.H., Satterthwaite A.C., Westheimer F.H., (1975), *J. Amer. Chem. Soc.*, **97**, 6873–6874.
23. Stec W.J., Okruszek A., Lesiak K., Uznański B., Michalski J., (1976), *J. Org. Chem.*, **41**, 227–233.
24. Zieliński W.J., Leśnikowski Z.J., Stec W.J., (1976), *J. Chem. Soc. Chem. Commun.*, 772–773.
25. Baraniak J., Lesiak K., Sochacki M., Stec W.J., (1980), *J. Amer. Chem. Soc.*, **102**, 4533–4534.
26. Zieliński W.S., Stec W.J., (1977), *J. Amer. Chem. Soc.*, **99**, 8365–8366.
27. Sammons R.D., Frey P.A., (1982), *J. Biol. Chem.*, **257**, 1138–1140.

28. Connolly B.A., Eckstein F., Földner H.H., (1982), *J. Biol. Chem.*, **257**, 3382–3387.
29. Lowe G., Tansley G., Cullis P.M., (1982), *J. Chem. Soc., Chem. Commun.*, 595–596.
30. Guga P., Okruszek A., (1984), *Tetrahedron Lett.*, **25**, 2897–2900.
31. Abbott S.J., Jones S.R., Weinman S.A., Knowles J.R., (1978), *J. Amer. Chem. Soc.*, **10**, 255–258.
32. Jarvest R.L., Lowe G., Baraniak J., Stec W.J., (1982), *Biochem. J.*, **203**, 461–470.
33. Lowe G., Potter B.V.L., Sproat B.B.S., Hull, (1979), *J. Chem. Soc., Chem. Commun.*, 733–735.
34. Tsai M.-D., (1979), *Biochemistry*, **18**, 1468–1472.
35. Abbott S.J., Jones S.R., Weinman S.A., Backhoff F.M., McLaferty F.W., Knowles J.R., (1979), *J. Amer. Chem. Soc.*, **101**, 4323–4332.
36. Richards F.M., Wyckhoff H.W., (1971), *The Enzymes*, wyd. Boyer P.D., 3 wyd., t. 4, str. 647–806, Academic Press, New York.
37. Saenger W., Suck D., Eckstein F., (1974), *Eur. J. Biochem.*, **46**, 559–565.
38. Usher D.A., Ernrich E.S., Eckstein F., (1972), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **69**, 115–118.
39. Usher D.A., Richardson D.J., Eckstein F., (1970), *Nature*, **228**, 663–665.
40. Saenger W., (1984), *Principles of Nucleic Acid Structure*, str. 174, wyd. Cantor C.R., Springer-Verlag, New York Inc.
41. Jones S.R., Kindman L.A., Knowles J.R., (1978), *Nature*, **275**, 564–565.
42. Reid W.T., Wilson I.B., (1971), *The Enzymes*, wyd. Boyer P.D., wyd. 3, t. 4, str. 373–415, Academic Press, New York.
43. Eckstein F., Schulz H.H., Ruterjans, Haar W., Maurer W., (1972), *Biochemistry*, **11**, 3507–3512.
44. Burgers P.M.J., Eckstein F., (1979), *Biochemistry*, **18**, 592–596.
45. Gerlt J.A., Wan W.H.Y., (1979), *Biochemistry*, **18**, 4630–4638.
46. Yee D., Armstrong V.W., Eckstein F., (1979), *Biochemistry*, **18**, 4116–4120.
47. Burgers P.M.J., Eckstein F., (1978), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **75**, 4798–4800.
48. Burgers P.M.J., Eckstein F., (1979), *J. Biol. Chem.*, **254**, 6889–6893.
49. Brody R.S., Frey P.A., (1981), *Biochemistry*, **20**, 1245–1251.
50. Romaniuk P.J., Eckstein F., (1982), *J. Biol. Chem.*, **257**, 7684–7688.
51. Brody R.S., Adler S., Modrich P., Stec W.J., Leśnikowski Z.J., Frey P.A., (1982), *Biochemistry*, **21**, 2570–2572.
52. Bartlett P.A., Eckstein F., (1982), *J. Biol. Chem.*, **257**, 8879–8884.
53. Marlier J.F., Bryant F.R., Benkovic S.J., (1981), *Biochemistry*, **20**, 2212–2217.
54. Burgers P.M.J., Eckstein F., (1979), *Biochemistry*, **18**, 450–454.
55. Eckstein F., Sternbach H., von der Haar, (1977), *Biochemistry*, **16**, 3429–3432.
56. Bryant F.R., Benkovic S.J., (1982), *Biochemistry*, **21**, 5877–5885.
57. Sheu K.-F.R., Richard J.P., Frey P.A., (1979), *Biochemistry*, **18**, 5548–5556.
58. Gerlt J.A., Coderre J.A., Wolin M.S., (1980), *J. Biol. Chem.*, **255**, 331–334.
59. Eckstein F., Romaniuk P.J., Heideman W., Storm D.R., (1981) *J. Biol. Chem.*, **256**, 9118–9120.
60. Midelfort C.F., Sarton-Miller I., (1978), *J. Biol. Chem.*, **253**, 7127–7129.
61. Richard J.P., Carr M.C., Ives D.H., Frey P.A., (1980), *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **94**, 1052–1056.
62. Richard J.P., Prasher D.C., Ives D.H., Frey P.A., (1979), *J. Biol. Chem.*, **254**, 4339–4331.
63. Potter B.V.L., Romaniuk P.J., Eckstein F., (1983), *J. Biol. Chem.*, **258**, 1758–1760.
64. Webb M.R., Trentham D.R., (1980), *J. Biol. Chem.*, **255**, 8629–8632.
65. Webb M.R., Grubmeyer C., Penefsky H.S., Trentham D.R., (1980), *J. Biol. Chem.*, **255**, 11637–11639.
66. Webb M.R., Trentham D.R., (1981), *J. Biol. Chem.*, **256**, 4884–4887.
67. Webb M.R., Eccleston J.F., (1981), *J. Biol. Chem.*, **256**, 7734–7737.



68. Eccleston J. F., Webb M. R., (1982), *J. Biol. Chem.*, **257**, 5046–5048.
69. Tsai M.-D., Chang T. T., (1980), *J. Amer. Chem. Soc.*, **102**, 5416–5418.
70. Webb M. R., Trentham D. R., (1980), *J. Biol. Chem.*, **255**, 1775–1779.
71. Orr G. A., Simon J., Jones S. R., Chin G. J., Knowles J. R., (1978), *Proc. Natl. Acad. Sci USA*, **75**, 2230–2233.
72. Blätter W. A., Knowles J. R., (1979), *Biochemistry*, **18**, 3927–3933.
73. Lowe G., Potter B. V. L., (1981), *Biochem. J.*, **199**, 227–230.
74. Pliura D. H., Schamburg D., Richard J. P., Frey P. A., Knowles J. R., (1980), *Biochemistry*, **19**, 325–329.
75. Lowe G., Cullis P. M., Jarvest R. L., Potter B. V. L., Sproat B. S., (1981), *Philos. Trans. R. Soc. London B*, **293**, 75.
76. Jarvest R. L., Lowe G., (1981), *Biochem. J.*, **199**, 273–276.
77. Bryant P. R., Benkovic S. J., Sammons D., Frey P. A., (1981), *J. Biol. Chem.*, **256**, 5965–5969.
78. Burgers P. M. J., Eckstein F., Hunneman D. H., Baraniak J., Kinast R., Lesiak K., Stec W. J., (1979), *J. Biol. Chem.*, **254**, 9959–9961.
79. Cullis P. M., Jarvest R. L., Lowe G., Potter B. V. L. (1981), *J. Chem. Soc., Chem. Commun.*, 245–246.
80. Coderre J. A., Mehdi S., Gerlt J. A., (1981), *J. Amer. Chem. Soc.*, **103**, 1872–1875.
81. Senter P. D., Eckstein F., Mülsch A., Böhme E., (1983), *J. Biol. Chem.*, **258**, 6741–6745.
82. Bryant F. R., Benkovic S. J., (1979), *Biochemistry*, **18**, 2825–2828.
83. Burgers P. M. J., Eckstein F., Hunneman D. H., (1979), *J. Biol. Chem.*, **254**, 7476–7478.
84. Jarvest R. L., (1981), *Biochem. J.*, **199**, 447–450.
85. Mehdi S., Gerlt J. A., (1981), *J. Biol. Chem.*, **256**, 12164–12166.
86. Langdon S. P., Lowe G., (1979), *Nature*, **281**, 320–321.
87. Lowe G., Sproat B. S., Tansley G., (1983), *Eur. J. Biochem.*, **130**, 341–346.
88. Hansen D. H., Knowles J. R., (1981), *J. Biol. Chem.*, **256**, 5967–5969.
89. Blätter W. A., Knowles J. R., (1978), *J. Amer. Chem. Soc.*, **101**, 510–511.
90. Mehdi S., Gerlt J. A., (1982), *J. Amer. Chem. Soc.*, **104**, 3223–3235.
91. Blätter W. A., Knowles J. R., (1980), *Biochemistry*, **19**, 738–743.
92. Potter B. V. L., Connolly B. A., Eckstein F., (1983), *Biochemistry*, **22**, 1369–1377.
93. Jarvest R. L., Lowe G., Potter B. V. L., (1981), *Biochem. J.*, **199**, 427–429.
94. Sani M. S., Buchwald S. L., van Etten R. L., Knowles J. R., (1981), *J. Biol. Chem.*, **256**, 10453–10455.
95. Coderre J. A., Gerlt J. A., (1980), *J. Amer. Chem. Soc.*, **102**, 6594–6597.
96. Agren G., Zetterqvist O., Orjamae M., (1959), *Acta Chem. Scand.*, **13**, 1047.
97. Engström L., Agren G., (1958), *Acta Chem. Scand.*, **12**, 357.
98. Morton R. K., (1955), *Discussions Faraday Soc.*, **20**, 149–153.
99. Bernardi G., (1971), *The Enzymes*, wyd. Boyer P. D., wyd. 3, t. 4, str. 271–287, Academic Press, New York.
100. Niewiarowski W., Stec W. J., Zieliński W. S., (1980) *J. Chem. Soc., Chem. Commun.*, 524–525.
101. Leśnikowski Z. J., Niewiarowski W., Zieliński W. S., Stec W. J., (1984), *Tetrahedron*, **40**, 15–32.
102. Uznański B., Niewiarowski W., Stec W. J., (1982), *Tetrahedron Lett.*, **23**, 4289–4292.
103. Stec W. J., Zon G., Egan W., Stec B., (1984), *J. Amer. Chem. Soc.*, **106**, 6077–6079.



WOJCIECH NIEWIAROWSKI\*

## P-Chiralne fosforany – narzędzie do badania stereochemii enzymatycznych reakcji przeniesienia grupy fosforanowej lub nukleotydylowej

P-chiral phosphates – tools for studying the stereochemistry of the enzymatic phosphoryl – and nucleotidyl transfer

### Spis treści:

- I. Wstęp
- II. Chiralne fosforany nukleozydów
  - II-1. Wprowadzenie
  - II-2. 4-Nitrofenylofosforany nukleozydów
  - II-3. Tiofosforany nukleozydów
  - II-4. Chiralne [ $^{16}\text{O}$ ,  $^{17}\text{O}$ ,  $^{18}\text{O}$ ]-fosforany nukleozydów
    - II-4.1. [ $^{16}\text{O}$ ,  $^{17}\text{O}$ ,  $^{18}\text{O}$ ]-fosforany monoalkilowe
    - II-4.2. Diestry kwasu [ $^{16}\text{O}$ ,  $^{18}\text{O}$ ]-fosforowego
- III. Oznaczenie konfiguracji absolutnych na atomach fosforu w chiralnych [ $^{16}\text{O}$ ,  $^{17}\text{O}$ ,  $^{18}\text{O}$ ]-fosforanach nukleozydów za pomocą metod spektroskopowych
  - III-1. Zastosowanie  $^{31}\text{P}$ -MRJ
    - III-1.1. [ $^{16}\text{O}$ ,  $^{17}\text{O}$ ,  $^{18}\text{O}$ ]-Fosforany monoalkilowe
    - III-1.2. Diestry kwasu [ $^{16}\text{O}$ ,  $^{18}\text{O}$ ]-fosforowego
    - III-1.3.  $\alpha$ -[ $^{16}\text{O}$ ,  $^{18}\text{O}$ ]-Difosforany nukleozydów
  - III-2. Zastosowanie spektrometrii masowej
- IV. Uwagi końcowe

### Contents:

- I. Introduction
- II. p-Chiral nucleoside phosphates
  - II-1. Introduction
  - II-2. Nucleoside 4-nitrophenylphosphates
  - II-3. Nucleoside phosphorothioates
  - II-4. Nucleoside [ $^{16}\text{O}$ ,  $^{17}\text{O}$ ,  $^{18}\text{O}$ ]-phosphates
    - II-4.1. [ $^{16}\text{O}$ ,  $^{17}\text{O}$ ,  $^{18}\text{O}$ ]-Phosphate monoesters
    - II-4.2. [ $^{16}\text{O}$ ,  $^{18}\text{O}$ ]-Phosphate diesters

\* Dr., Zakład Chemii Bioorganicznej, Centrum Badań Molekularnych i Makromolekularnych PAN, ul. Boczna 5, 90-362 Łódź

### III. Determination of the absolute configuration at phosphorus atom in nucleoside [ $^{16}\text{O}$ , $^{17}\text{O}$ , $^{18}\text{O}$ ]-monophosphates by spectroscopic methods

#### III-1. Application of $^{31}\text{P}$ -NMR spectroscopy

##### III-1.1. [ $^{16}\text{O}$ , $^{17}\text{O}$ , $^{18}\text{O}$ ]-Phosphate monoesters

##### III-1.2. [ $^{16}\text{O}$ , $^{18}\text{O}$ ]-Phosphate diesters

##### III-1.3. Nucleoside $\alpha$ -[ $^{16}\text{O}$ , $^{18}\text{O}$ ]-diphosphates

#### III-2. Application of mass spectroscopy

### IV. Concluding remarks

Wykaz stosowanych skrótów: DCC – dicykloheksylokarbodiimid;  $T_P T$  – tymidylylotymidyna;  $GTP\beta S$  – 5'-( $\beta$ -tio)-trifosforan guanozyny;  $ATP\beta S$  – 5'-( $\beta$ -tio)-tiofosforan adenozy; MRJ – magnetyczny rezonans jądrowy; HPLC – wysokociśnieniowa chromatografia cieczowa; svPDE – fosfodiesteraza z jadu węża; –  $ADP\alpha S$  – 5'-( $\alpha$ -tio)-difosforan adenozy;  $ATP\alpha S$  – 5'-( $\alpha$ -tio)-trifosforan adenozy; AMPS – 5'-tiofosforan adenozy;  $TTP\alpha S$  – 5'-( $\alpha$ -tio)-trifosforan tymidyny; DEAE – dietyloaminoetylo;  $dCTP\alpha S$  – 5'-( $\alpha$ -tio)-trifosforan deoksycytydyny;  $ATP\gamma S$  – 5'-( $\gamma$ -tio)-trifosforan adenozy; TPSCl – chlorek 2,4,6-triizopropylbenzenosulfonowy;  $A_{P(S)}A$  – tiofosforan adenilo(3'-5')adenozy;  $T_{P(S)}T$  – tiofosforan tymidylo(3'-5')tymidyny;  $d[G_{P(S)}A]$  – tiofosforan deoksyguanozylo(3'-5')deoksyadenozy;  $d[C_{P(S)}T]$  – tiofosforan deoksycytydylo(3'-5')tymidyny;  $d[G_{P(S)}T]$  – tiofosforan deoksyguanozylo(3'-5')tymidyny;  $d(G_P A)$  – deoksyguanozylo(3'-5')deoksyadenozy; FAB – fast atom bombardment; cPDE – fosfodiesteraza z serc wołowych; PEP – fosfoenolopirogronian; Tr – grupa trifenyloetylowa; MMTr – grupa monometoksytrifenyloetylowa; DMTr – grupa dimetoksytrifenyloetylowa; Me – grupa metylowa; Bz – grupa benzoilowa; Ph – grupa fenylowa; tBu – grupa tert-butylova; Py – pirydyna; Ac – grupa acetylowa; B – zasada pirymidynowa lub purynowa; Thy – tymina; Ade – adenina; Cyt – cytozyna; Gua – guanina; Ura – uracyl; A – adenozy; T – tymidyna; Pi – nieorganiczny fosforan; PPI – nieorganiczny pirofosforan; Sp – konfiguracja absolutna „S” na atomie fosforu; Rp – konfiguracja absolutna „R” na atomie fosforu;  $S_N2(P)$  – dwucząsteczkowe podstawienie nukleofilowe przy atomie fosforu.

## I. Wstęp

Od ponad 10 lat za pomocą metod stereochemicznych prowadzi się badania nad mechanizmami reakcji enzymatycznych, w których następuje przeniesienie grupy fosforanowej lub nukleotydylowej. Do chwili obecnej badanych było kilkadziesiąt enzymów. Stwierdzono, że na ogół oddziałują one z cząsteczkami substratów poprzez wiązania wodorowe; rzadko zaś tworzą z nimi trwałe produkty pośrednie w formie kowalencyjnych kompleksów z udziałem grup centrów aktywnych, takich jak  $-\text{NH}_2$  lizyny,  $-\text{OH}$  seryny, czy imidazolowej grupy histydyny (1, 2, 3). Identyfikacja natury oddziaływań biokatalizator-substrat, możliwa dzięki użyciu metod stereochemicznych, determinowana jest odpowiednią budową cząsteczki substratu. Konieczne jest bowiem wywołanie chiralności grupy fosforanowej, co możliwe jest poprzez zastąpienie niemoistkowego atomu tlenu siarką lub izotopem  $^{18}\text{O}$  w przypadku diestrów (DNA, RNA, fosfoglicerydy) oraz przez zastąpienie dwóch atomów tlenu siarką i  $^{18}\text{O}$  lub  $^{17}\text{O}$  i  $^{18}\text{O}$  w monoestrach (np. w grupie  $\gamma$ -fosforanowej ATP i GTP). Powstały po reakcji enzymatycznej produkt także musi zawierać chiralną grupę fosforanową. Po oznaczeniu konfiguracji absolutnych na atomach fosforu w substracie i produkcie możliwe jest określenie stereochemii reakcji.

Inwersja konfiguracji w grupie fosforanowej świadczy o występowaniu tylko wiązań wodorowych pomiędzy resztami aminokwasów centrum aktywnego i substratem. Retencja zaś będąca wynikiem dwóch kolejnych podstawień nukleofilowych typu  $S_N2(P)$  dowodzi, że tworzy się pośredni kowalencyjny kompleks enzym-substrat (1, 4).

Zastosowanie stereochemii jako narzędzia do badania mechanizmów reakcji enzymatycznych spowodowało duże zainteresowanie chiralnymi fosforanami i doprowadziło do syntezy wielu nowych połączeń, które okazały się także użyteczne w rozwiązywaniu innego rodzaju problemów, np. oddziaływań DNA-białko (5, 6) lub badanie konformacji DNA (7). Otrzymano diastereoizomeryczne analogi nukleotydów – tiofosforany (deoksy)rybonukleotydów (1, 8) i znaczone izotopami tlenu  $[^{16}O, ^{18}O]$ -,  $[^{16}O, ^{17}O, ^{18}O]$ -fosforany (deoksy)rybonukleotydów (9, 10, 11), których konfiguracje absolutne na atomach fosforu oznaczono technikami  $^{31}P$ -MRJ (3, 12), spektrometrii masowej (9, 13) lub stosując enzymy o znanej stereoselektywności substratowej (14).

W artykule przedstawiono metody syntezy zmodyfikowanych nukleotydów oraz sposoby oznaczania ich konfiguracji absolutnych na chiralnych atomach fosforu.

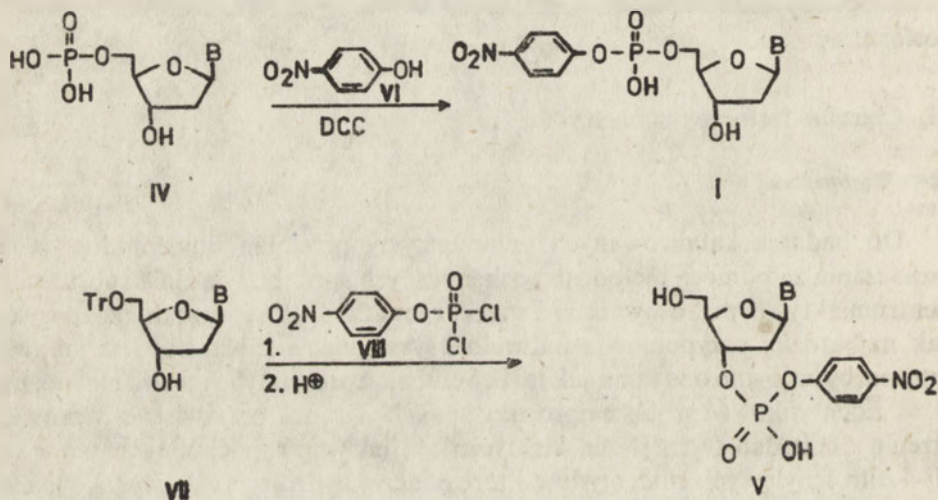
## II. Chiralne fosforany nukleotydów

### II-1. Wprowadzenie

Do badania katalizowanych przez enzymy przemian nukleotydów oraz oznaczania za pomocą metod stereochemicznych sposobu wiązania substratu z centrum aktywnym stosowane są związki chemiczne, które w miarę możliwości jak najbardziej przypominają naturalnie występujące substraty. Jest sprawą istotną, by zarówno one same, jak też i ewentualne produkty ich trawienia można było zidentyfikować w jak najprostszy sposób. Ta idea przyświecała wprowadzeniu do badań (szczególnie kinetycznych) enzymów pochodnych mono- i di-4-nitrofenylowych nukleotydów, które podczas hydrolizy tworzyły jako jeden z produktów łatwy do ilościowego, spektrofotometrycznego oznaczenia 4-nitrofenol (15, 16). Jakkolwiek estry 4-nitrofenylowe fosforanów nukleotydów stosunkowo wcześniej znalazły zastosowanie do szybkiej charakterystyki aktywności szeregu grup enzymów nukleolitycznych, dopiero w końcu lat siedemdziesiątych wykazano również ich przydatność do badania stereochemii reakcji enzymatycznych. O powodzeniu przedsięwzięcia zdecydowała modyfikacja grupy fosforanowej, w której jeden z atomów tlenu, nie tworzący wiązania estrowego, zastąpiono atomem siarki, a nieco później trwałymi izotopami tlenu. W wyniku syntezy chemicznej otrzymano 4-nitrofenylotiofosforany nukleotydów, które zarówno drogą enzymatyczną, jak i fizykochemiczną, rozdzielono na związki diastereoizomeryczne. Pochodne te okazały się, jak dotąd, najwygodniejszymi obiektami w badaniach stereochemii przeniesienia grupy fosforanowej lub nukleotydylowej (12, 17).

## II-2. 4-Nitrofenylofosforany nukleozydów

4-Nitrofenylofosforany nukleozydów, takie jak 5'-(4-nitrofenylo)-fosforany nukleozydów (I), 5'-di(4-nitrofenylo) fosforany nukleozydów (II) i 4-nitrofenylofosforan benzylu (III) po raz pierwszy były użyte jako substraty nukleaz przez Razzella i Khoranę w 1959 roku (18). Pierwszy z nich otrzymano działając na 5'-fosforan nukleozydu (IV) 4-nitrofenolem (VI) w obecności DCC. W przypadku syntezy 3'-(4-nitrofenylo)fosforanu nukleozydu (V) fosforylowano nukleozyd z zablokowaną funkcją 5'-hydroksylową (VII) za pomocą 4-nitrofenyldichlorofosforanu (VIII). Obie reakcje przedstawiono na Ryc. 1. Autorzy wyznaczyli wartości szybkości maksymalnych i stałych Michaelisa ( $K_m$ ) dla svPDE, obliczone na podstawie krzywych Lineweavera-Burka sporządzonych wg równania Michaelisa-Mentena (Tabela 1) (18). Z ich badań wynikało, że szybkości enzymatycznej hydrolizy estrów 4-nitrofenylowych i występującego w naturze substratu, jakim jest TpT (IX) są porównywalne.



Tr = trifenylometyl

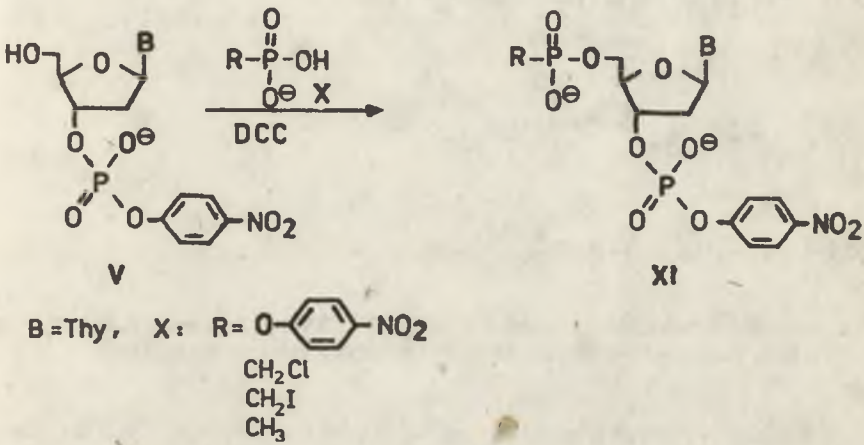
Ryc. 1. Synteza 5'- i 3'-(4-nitrofenylo)fosforanów deoksyrybonukleozydów (I, V) wg. Khorany i wsp. (18).

W czasie ostatnich dwudziestu lat zsyntetyzowano wiele różnych pochodnych 4-nitrofenylofosforanów nukleozydów lub też związków chemicznych o zbliżonej do nich budowie. W roku 1971 Gliński i wsp. przedstawili procedury syntezy serii pochodnych 3',5'-difosforanu tymidyny (XI) (prezentowanych na Ryc. 2), oraz otrzymywania związku I drogą fosforylacji 2'-acetylotymidyny (XII) za pomocą di-(4-nitrofenylo)chlorofosforanu (XIII) (Ryc. 3.) (19).

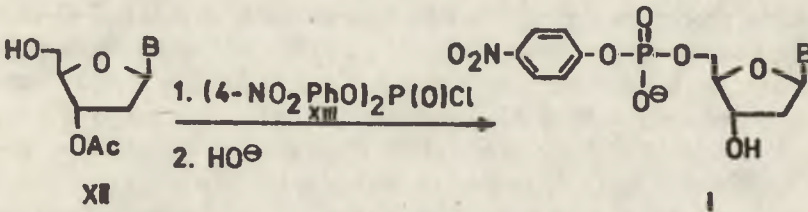
Tabela 1

Wartości szybkości maksymalnych ( $V_{max}$ ) i stałych Michaelisa ( $K_m$ ) dla fosfodiesterazy z jadu węża (18).

Substrat	$V_{max}$ [ $\mu\text{M} \times \text{godz.}^{-1} \times$ $\times \text{mg białka}^{-1}$ ]	$K_m$ [M]
5'-(4-nitrofenylo)fosforan tymidyny (B = Thy, I)	36 500	$5.0 \times 10^{-4}$
fosforan tymidylo(3'-5')tymidyny (TpT, IX)	278	$5.3 \times 10^{-4}$
5'-[di(4-nitrofenylo)]fosforan tymidyny (B = Thy, II)	39	$7.7 \times 10^{-4}$
4-nitrofenylofosforan benzylu (III)	315	$6.8 \times 10^{-3}$

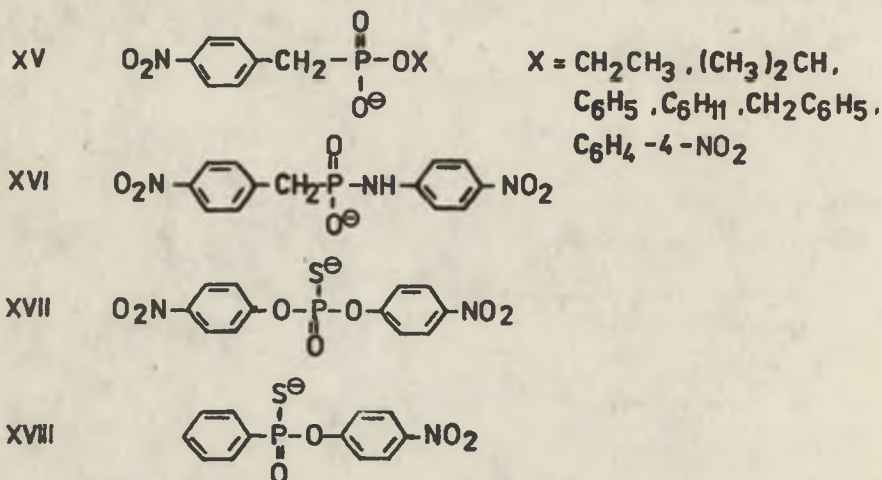


Ryc. 2. Synteza 5'-pochodnych 3'-(4-nitrofenylo)fosforanu deoksyrybonukleozydu (XI) wg Glin-skiego i wsp. (19).



Ryc. 3. Synteza 5'-(4-nitrofenylo)fosforanu deoksyrybonukleozydu (I) wg. Glin-skiego i wsp. (19).

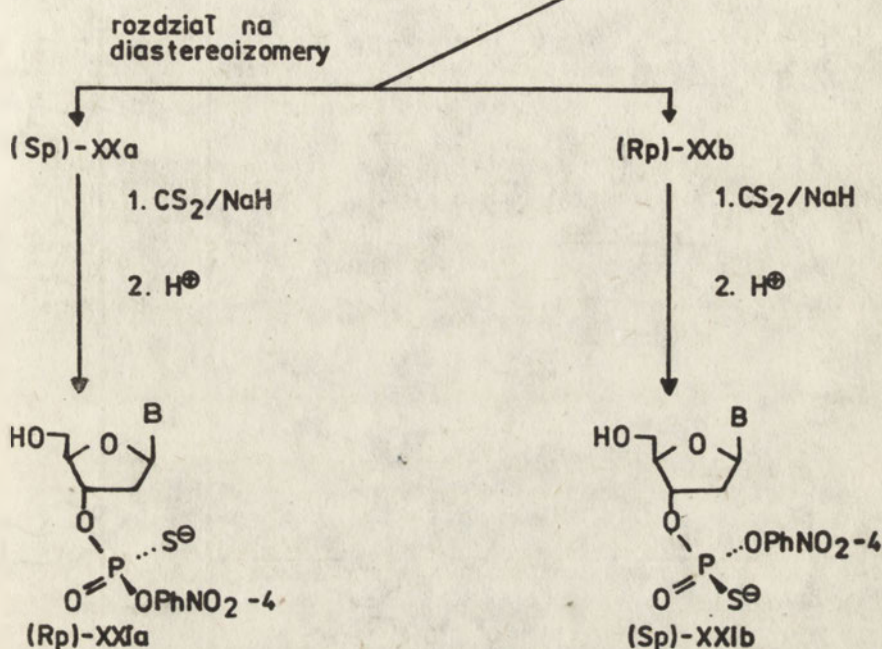
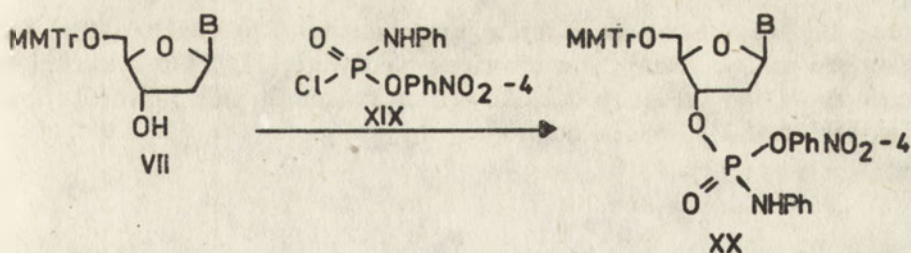
Kontynuując badania nad fosfodiesterazami (18, 20, 21) Kelly i wsp. użyli jako substratu związku otrzymane po estryfikacji kwasu 4-nitrobenzylfosforowego (XIV), które posłużyły im do wykrycia trwałego produktu pośredniego typu enzym-substrat (22, 23, 24). W tym celu zsyntetyzowali pochodne 4-nitrofenylowe XV – XVIII przedstawione na Ryc. 4. Zwraca uwagę, że związek XVIII zawiera w swej strukturze asymetryczny atom fosforu.



Ryc. 4. Pochodne 4-nitrofenylofosforanu (XV, XVI, XVII, XVIII) użyte przez Kelly'ego i wsp. do badania oddziaływań centrum aktywnego 5'-nukleotydu z substratem (22, 23, 24).

Od końca lat 70-tych obserwuje się rozwój badań zmierzających do syntezy i wyodrębniania P-chiralnych związków fosforu użytecznych w badaniach reakcji enzymatycznych. Korzystając z opracowanej w Zakładzie Chemii Bioorganicznej CBMM PAN metody pozwalającej na stereospecyficzną konwersję anilidofosforanów do odpowiednich tiofosforanów (9, 25, 26, 27, 81) zaproponowano procedurę syntezy diastereoizomerycznie czystych 3'-(4-nitrofenylo)tiofosforanów deoksyrybonukleozydów (XXIa, XXIb). Jej istota polega na użyciu odczynnika – (4-nitrofenylo)anilidochlorofosforanu (XIX), którym fosforylowano funkcję 3'-hydroksylową nukleozydu, zablokowanego w pozycji 5'. Powstałą mieszaninę 3'-(4-nitrofenylo)N-fenylaminofosforanów 5'-monometoksytrytylotymidyny (XX) można stosunkowo łatwo rozdzielić na diastereoizomery (XXa i XXb). Następnie każdy z nich można przeprowadzić stereospecyficznie (w wyniku reakcji z  $\text{CS}_2/\text{NaH}$ ) w tiofosforan (XXIa lub XXIb); syntezę tę prezentuje Ryc. 5. Konfiguracje absolutne na atomach fosforu w związkach XXIa i XXIb zostały oznaczone przez Gerlta i wsp., którzy zsyntetyzowali diastereoizomery 5'-(4-nitrofenylo)tiofosforanu tymidyny (XXIIa i XXIIb) używając opisaną wyżej metody via anilidofosforany (28). Obydwa diastereoizomery poddano hydrolizie wobec svPDE i zaobserwowano, że degradacji uległ tylko jeden z nich – związek XXa, któremu przypisano konfigurację Rp (29).

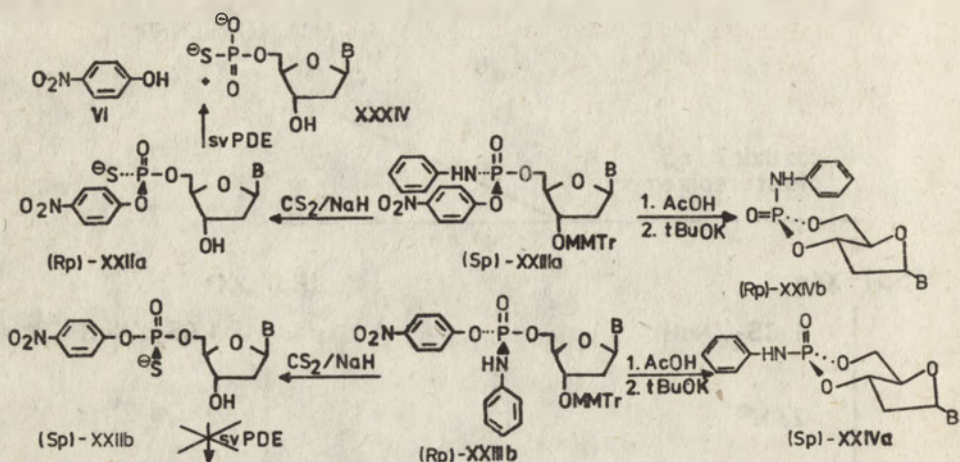




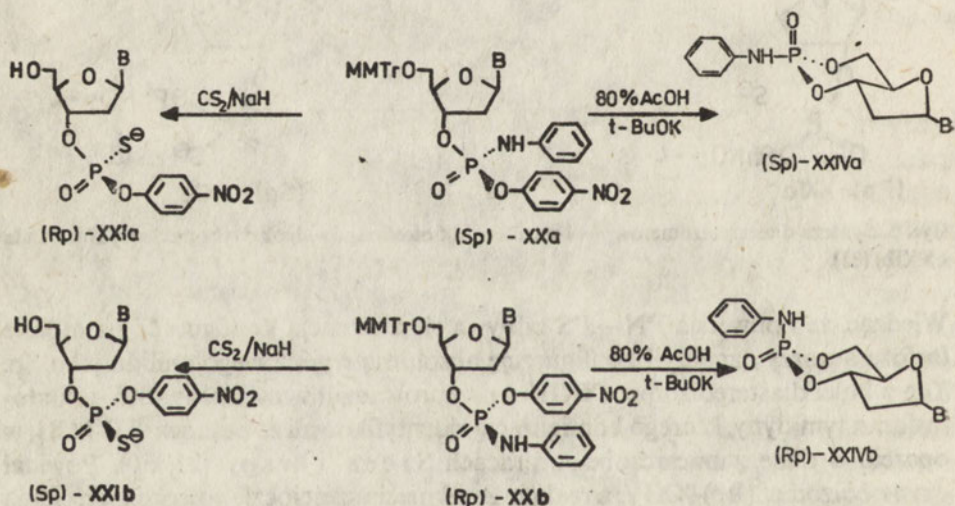
Ryc. 5. Synteza diastereoizomerów 3'-(4-nitrofenylo)tiofosforanów deoksyrybonukleozydów (XXIa i XXIb) (81).

Wiedząc, że konwersja PN → PS odbywa się z retencją konfiguracji na atomie fosforu autorzy oznaczyli konfigurację absolutną wyjściowego anilidu jako Sp. Ten z kolei diastereoizomer (XXIIIa) przeprowadzili w cykliczny -3',5'-anilidofosforan tymidyny, którego konfigurację zidentyfikowali za pomocą <sup>31</sup>P-MRJ, w oparciu o dane zamieszczone w pracach Steca i wsp. (25, 30). Powstał diastereoizomer (Rp)-XXIV, a reakcja zamknięcia sześcioczłonowego pierścienia przebiega z inwersją konfiguracji na atomie fosforu. Autorzy założyli, że cyklizacja 3'-(4-nitrofenylo)anilidofosforanu tymidyny (XX) także przebiega z inwersją, co oznacza, że substratem związku (Rp)-XXIVb jest 3'-(4-nitrofenylo)anilidofosforan tymidyny o konfiguracji Rp (XXb). Ponieważ konwersja PN → PS odbywa się z retencją konfiguracji, zatem z (Rp)-XXb musi powstać (Sp)-3'-(4-nitrofenylo)tiofosforan tymidyny (XXIb). Analogicznie przypisano konfigurację absolutną pozostałym diastereoizomerom (Sp)-XXIIb i (Rp)-XXIa

oraz anilidofosforanom, z których je otrzymano (Rp)-XXIIIb i (Sp)-XXa. Powyższe reakcje zostały przedstawione na Ryc. 6 (28). Etap cyklizacji był każdorazowo poprzedzony odblokowaniem funkcji 3'- lub 5'-hydroksylowej deoksyrybozy 80% kwasem octowym.



B = Thy



B = Thy

Ryc. 6. Oznaczenie konfiguracji absolutnych diastereoizomerów 5'- i 3'-(4-nitrofenylo)tiofosforanów deoksyrybonukleozydów (XXIIa, XXIIb oraz XXIa i XXIb) (28).

Kolejnym etapem w rozwoju koncepcji zastosowania stereochemicznego podejścia w badaniach enzymatycznych za pomocą pochodnych (4-nitrofenylo)-fosforanów nukleozydów było wywołanie ich P-chiralności przez podsta-

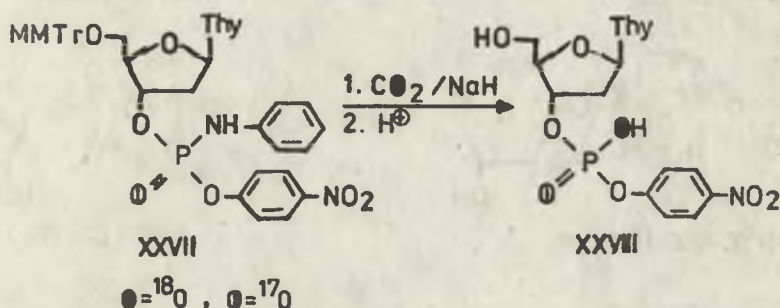
wienie fosforanowych atomów tlenu jego izomerami. Eliminowało to ujemne działanie atomu siarki polegające w przypadku badania fosfodiesteraz na:

1° znacznym zwolnieniu reakcji enzymatycznych,

2° możliwości stereoselektywnej hydrolizy objawiającej się trawieniem przez svPDE tylko diastereoizomerów o konfiguracji absolutnej na atomie fosforu Rp.

Etapem pośrednim w rozwoju powyższej koncepcji były badania stereochemii reakcji katalizowanej przez fosfodiesterazę z jadu węża. Substratem był 5'-(4-nitrofenylo)[ $^{18}\text{O}$ ]tiofosforan adenozy (XXVI) otrzymany poprzez hydrolizę 5'-[di(4-nitrofenylo)]tiofosforanu 2',3'-propylidenoadenozyny (XXV) za pomocą wodorotlenku potasowego zawierającego izotop tlenu  $^{18}\text{O}$ . Fakt, że powstała trudna do rozdzielenia mieszanina diastereoizomerów, nie stanowił problemu syntetycznego, gdyż tylko jeden z nich o konfiguracji absolutnej Rp na atomie fosforu, był trawiony przez enzym (29).

Dwa lata później Gerlt i wsp. zakomunikowali o syntezie 3'-(4-nitrofenylo)[ $^{17}\text{O}$ ,  $^{18}\text{O}$ ]fosforanu tymidyny (XXVIII) z konfiguracją absolutną Rp na atomie fosforu. Otrzymali go posługując się metodą opracowaną przez Steca i wsp., tj. w wyniku stereospecyficznej konwersji diastereoizomerycznie czystego 3'-(4-nitrofenylo)N-feniloamino[ $^{17}\text{O}$ ]fosforanu 5'-monometoksytrytylotymidyny (XXVII) do produktu, XXVIII poprzez reakcję z [ $^{18}\text{O}$ ]— $\text{CO}_2$ , która przebiega z retencją konfiguracji; syntezę związku XXVIII prezentuje Ryc. 7 (103).

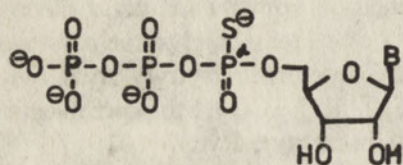
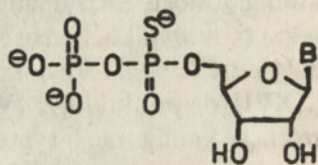
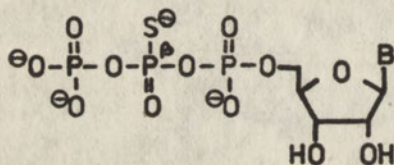
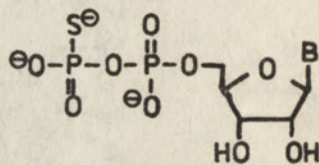
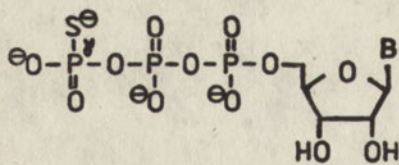
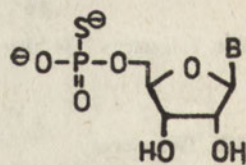


Ryc. 7. Synteza 3'-(4-nitrofenylo)[ $^{17}\text{O}$ ,  $^{18}\text{O}$ ]fosforanu tymidyny (XXVIII) (87).

### II-3. Tiofosforany

Równoległe z rozwojem badań nad przydatnością pochodnych 4-nitrofenylo- wych nukleotydów do badań enzymatycznych prowadzono intensywne prace nad rozwojem metod syntezy tiofosforanowych analogów biofosforanów. Z biochemicznego punktu widzenia mają one także i ujemne cechy, o których napisałem w rozdziale II-2. Ze względu jednak na dużą możliwość modyfikacji, polegających na wprowadzeniu siarki w różne położenia mono-, di- i trifosforanów nukleozydów oraz oligo- i polinukleotydów, nadają się do badania mechanizmów większości enzymów przenoszących grupy fosforanową lub nukleotydową.

Do chwili obecnej otrzymano już prawie wszystkie monotiofosforanowe analogi 5'-mono-, di- i trifosforanów nukleozydów (Ryc. 8); ich synteza chemiczna jest stosunkowo prosta, ale wydajności niewysokie. Dlatego też chętniej stosuje się enzymy, które cechują stereospecyficzność działania i wysoka wydajność katalizowanych reakcji (1). P-chiralne di- i trifosforany nukleozydów z terminalną grupą tiofosforanową (XXXIII i XXXI) najłatwiej otrzymać fosforylując nukleotyd (XXXVI) lub di-fosforan nukleozydu odczynnikiem otrzymanym w wyniku aktywacji S-( $\beta$ -cyjanoetylo)tiofosforanu (XXXVII) difenylochlorofosforanem (XXXVIII). Usunięcie grupy  $\beta$ -cyjanoetylowej następuje w warunkach zasadowych (Ryc. 9) (31). Fosforylacja ADP $\beta$ S (XXXIII) przy użyciu kinazy pirogronianowej lub kinazy octanowej prowadzi do diastereoizomerów ATP $\beta$ S (XXX) o konfiguracji na  $\beta$ -atomie fosforu odpowiednio Sp lub Rp (32–35) (Ryc. 10). W podobny sposób można otrzymać GTP $\beta$ S (XXX, B=Gua) (36).

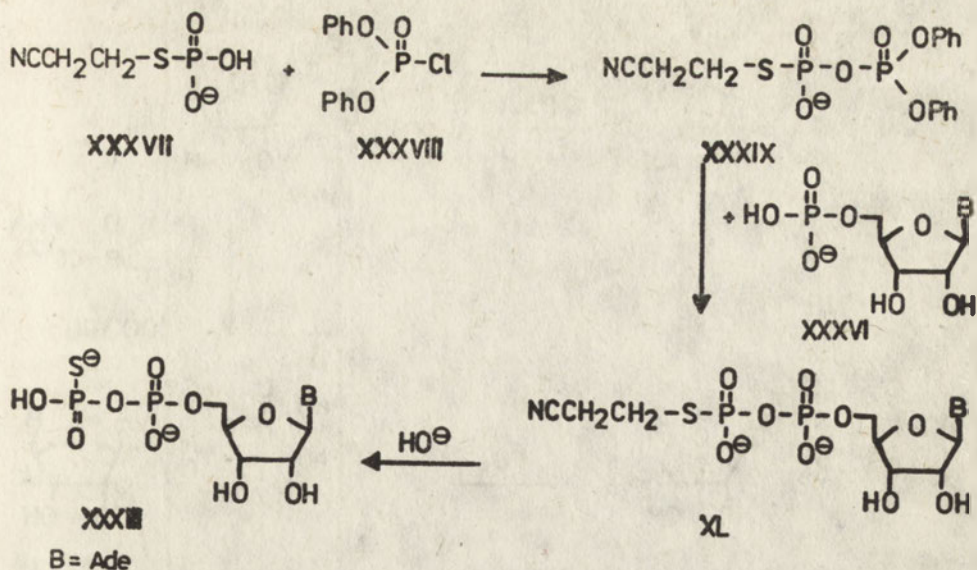
ATP $\alpha$ S (XXIX)ADP $\alpha$ S (XXXI)ATP $\beta$ S (XXX)ADP $\beta$ S (XXXIII)ATP $\gamma$ S (XXXI)

AMPS (XXXV)

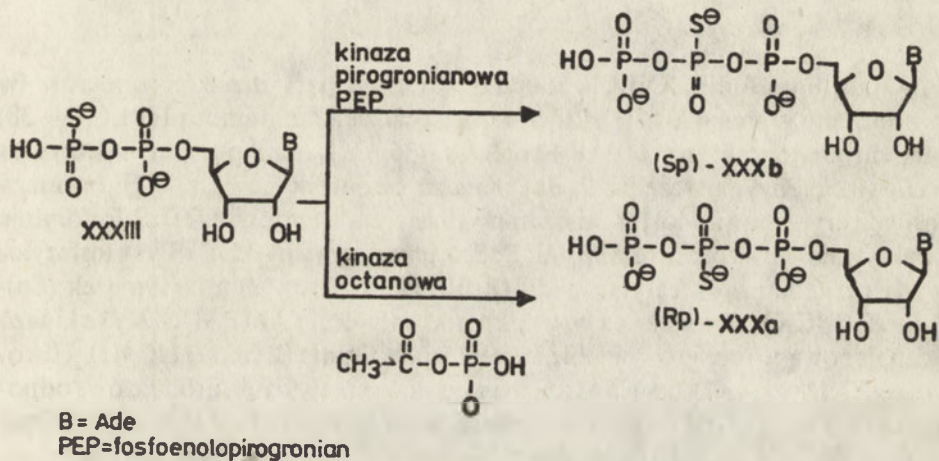
B = Ade

Ryc. 8. Tiofosforanowe pochodne nukleotydów (XXIX – XXXIII, XXXV) (1).

Synteza di- i trifosforanów nukleozydów z grupą  $\alpha$ -tiofosforanową (XXXII i XXIX) możliwa jest przy zastosowaniu dwóch metod. Ich wspólnym punktem wyjścia jest synteza tiofosforanu nukleozydu (XXXV). Pierwsza z metod polega na adaptacji procedury Michelsona (37) – tiofosforan nukleozydu (XXXV) jest

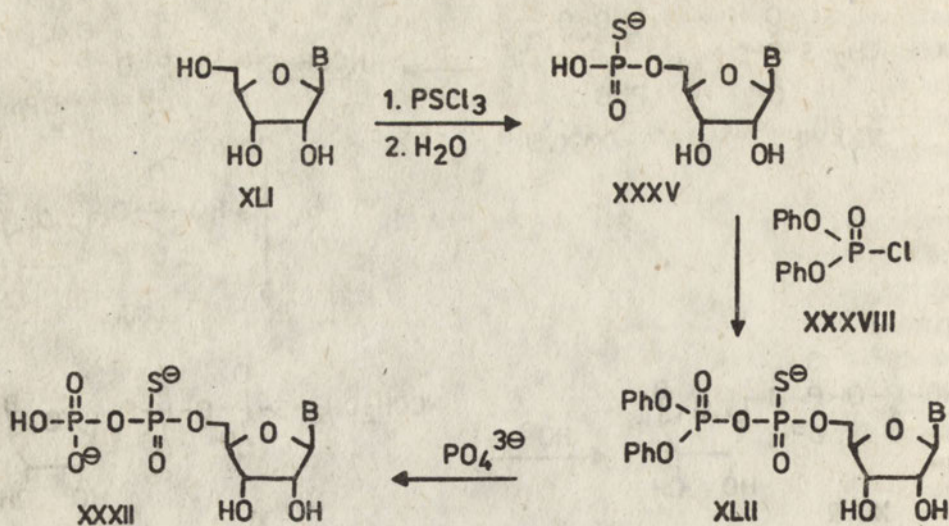


Ryc. 9. Synteza (β-tio)difosforanu nukleozydu (XXXIII) (31).



Ryc. 10. Synteza (Rp)- i (Sp)-diastereoizomerów (β-tio)trifosforanu nukleozydu (XXXb i XXXa) (36).

aktywowany za pomocą difenylchlorofosforanu (XXXVIII) dając niesymetryczny tiopirofosforan XLII, a więc cząsteczkę, w której fragment difenylfosforanowy stanowi dobrą grupę opuszczającą. Jeżeli związek XLII zostanie potraktowany nieorganicznym fosforanem, w wyniku ataku nukleofilowego na atom α-fosforu obserwuje się odejście grupy difenylfosforanowej z utworzeniem [α-tio]difosforanu nukleozydu (XXXII). Użycie nieorganicznego pirofosforanu zamiast fosforanu pozwala na otrzymanie pożądanego [α-tio]-trifosforanu nukleozydu (XXIX) (31, 32). Adaptację metody Michelsona prezentuje Ryc. 11.

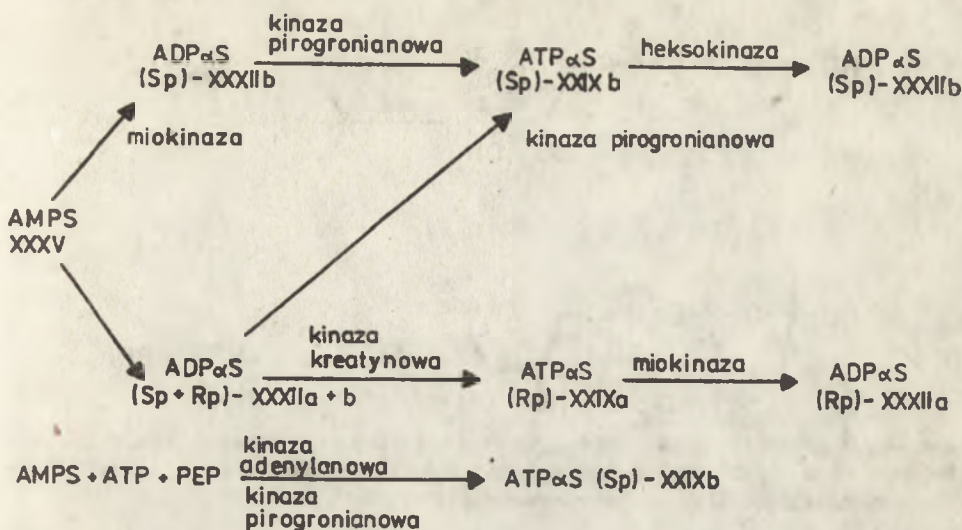


B = Ade

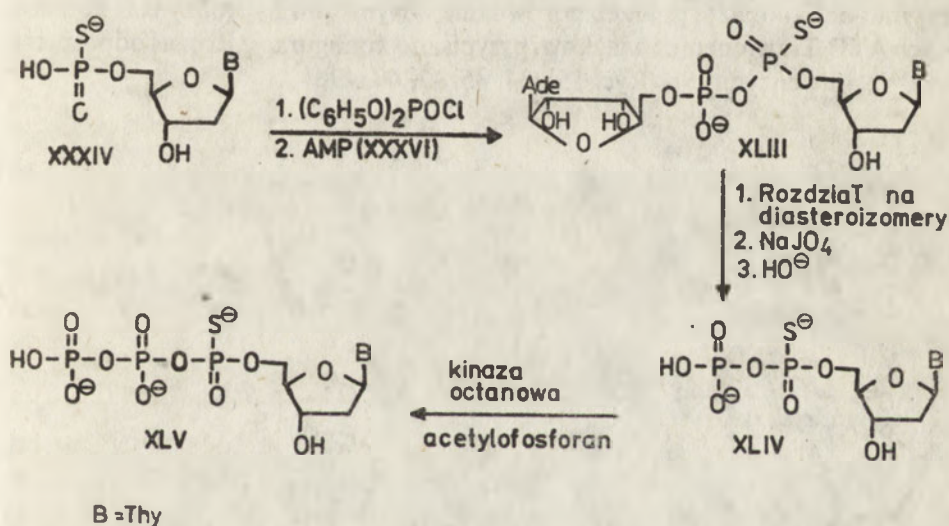
Ryc. 11. Synteza ( $\alpha$ -tio)difosforanu nukleozydu (XXXII) (31)

Powstały tiofosforan XXIX występuje w formie pary diastereoizomerów (w przybliżeniu w stosunku 1:1), które można rozdzielić za pomocą HPLC (36, 38) lub chromatografii na DEAE-Sephadex (36, 39) oraz poprzez selektywną fosforylację enzymatyczną (32, 36). Kinaza pirogronianowa (32) [lub kinaza fosfoglicerynianowa (40)] z mieszaniny diastereoizomerów  $\text{ADP}\alpha\text{S}$  fosforyluje selektywnie (Sp)-izomer do (Sp)- $\text{ATP}\alpha\text{S}$ , a powstały (Rp)- $\text{ADP}\alpha\text{S}$  jest fosforylowany przez kinazę kreatynową do (Rp)- $\text{ATP}\alpha\text{S}$  (Ryc. 12) (32). Związek (Sp)- $\text{ATP}\alpha\text{S}$  (XXIXa) powstaje też w wyniku oddziaływania AMPS (XXXV) z kinazą adenylanową. Proces ten przebiega stereospecyficznie (Ryc. 12) (40, 41). Utworzone XXIXa i XXIXb są hydrolizowane do wymaganych produktów, odpowiednio XXXIIa i XXXIIb. Także diastereoizomery  $\text{GTP}\alpha\text{S}$  (XXIX, B=Gua) można otrzymać w wyniku użycia odpowiedniej kombinacji enzymów (36).

Drugą metodą syntezy  $\alpha$ -tiofosforanów nukleozydów, szczególnie użyteczną w chemii fosforanów deoksyrybonukleozydów, jest kondensacja tiofosforanu deoksyrybonukleozydu zaktywowanego chlorofosforanem difenylowym (XLII) z AMP (XXXVI, B=Ade), którego grupy hydroksylowe reszty cukrowej zostały uprzednio zablokowane. Otrzymany 5'-(5'-adenozyl)-[ $\alpha$ -tio]difosforan tymidyny (XLIII) można łatwo rozdzielić na diastereoizomery na kolumnie z DEAE-Sephadex. Po odblokowaniu rybozy, w warunkach reakcji z  $\text{NaJO}_4$  następuje rozszczepienie związanego z adenozyńskim pierścieniem cukru oraz zasadowo katalizowana  $\beta$ -eliminacja reszty adenozyńowej. Następnie każdy z diastereoizomerów typu XLIV poddaje się enzymatycznej fosforylacji jak przedstawiono na Ryc. 13, na przykładzie syntezy  $\text{TTP}\alpha\text{S}$  (XLV) (42). Dla uproszczenia

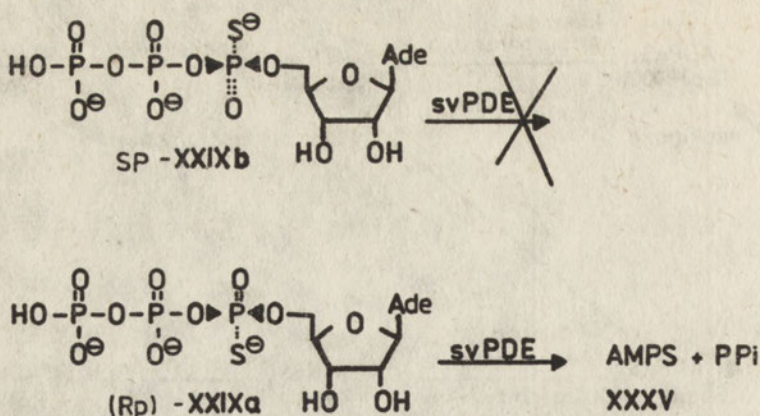


Ryc. 12. Enzymatyczna synteza (Rp)- i (Sp)-diastereoizomerów  $\alpha$ -tio)trifosforanów i difosforanów nukleozydów (XXIXa i XXIXb oraz XXXIIa i XXXIIb) (40, 41).



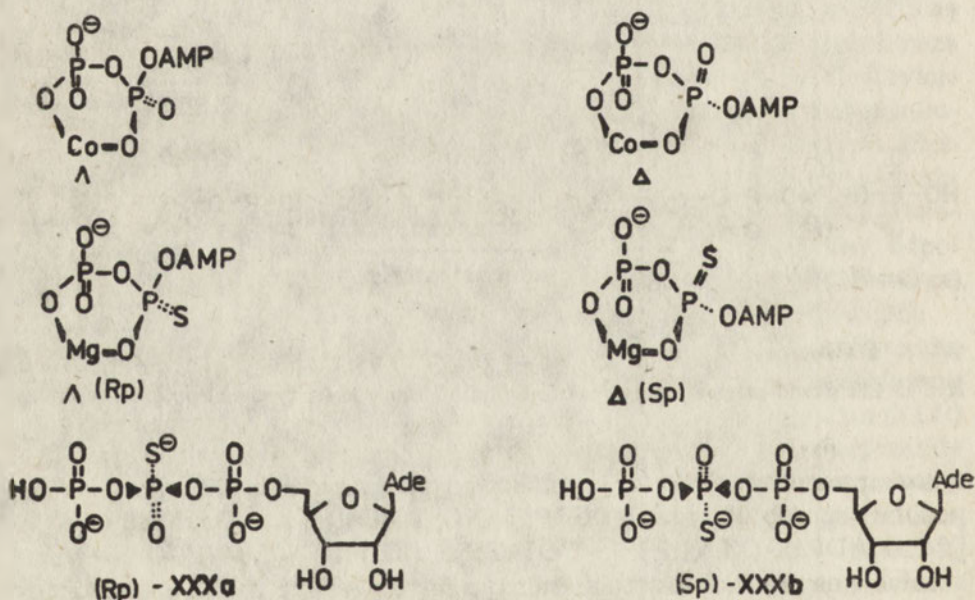
Ryc. 13. Chemiczno-enzymatyczna synteza  $\alpha$ -tio)trifosforanów deoksyrybonukleozydów (XLV) (42).

ryboza prezentowana jest z nieblokowanymi grupami hydroksylowymi. W podobny sposób otrzymano dCTP $\alpha$ S (XL, B=Cyt), [ $\alpha$ - $^{18}$ ]OADP $\alpha$ S (XLVI), [ $\beta$ - $^{18}$ ]ADP $\alpha$ S (XLVII) i [ $\gamma$ - $^{18}$ ]ATP $\gamma$ S (XLVIII) (43, 44). Konfiguracje absolutne na atomach fosforu diastereoizomerów ATP $\alpha$ S zostały oznaczone w wyniku trawienia obu związków za pomocą svPDE. Hydrolizowanemu izomerowi – XXIXa przypisano konfigurację Rp, zaś nieulegającemu trawieniu XXIXb – Sp (45, 46) (Ryc. 14).



Ryc. 14. Oznaczenie konfiguracji absolutnych na atomach fosforu w diastereoizomerach ( $\alpha$ -tio)trifosforanu adenozy (XXIXa i XXIXb) za pomocą trawienia fosfodiesterazą z jadu węża (svPDE); diastereoizomer (Rp)-XXIXa jest hydrolizowany zaś (Sp)-XXIXb nie (45, 46).

Oznaczenie konfiguracji absolutnych na atomach fosforu diastereoizomerów ATP $\beta$ S (XXX) w postaci soli magnezowych, także zostało wykonane za pomocą enzymu-heksokinazy, poprzez porównanie z wynikami hydrolizy soli kobaltowych ATP. Trawionemu związkowi przypisano konfigurację Rp, zaś odpornemu na działanie enzymu Sp (Ryc. 15) (34, 35, 47, 48, 49).



Ryc. 15. Ustalenie konfiguracji absolutnych na atomach fosforu w diastereoizomerach ( $\beta$ -tio)trifosforanu nukleozydu (XXXa i XXXb) poprzez porównanie struktur soli kompleksowych z  $\text{Co}^{++}$  i  $\text{Mg}^{++}$  ATP i ATP $\beta$ S (48, 49).

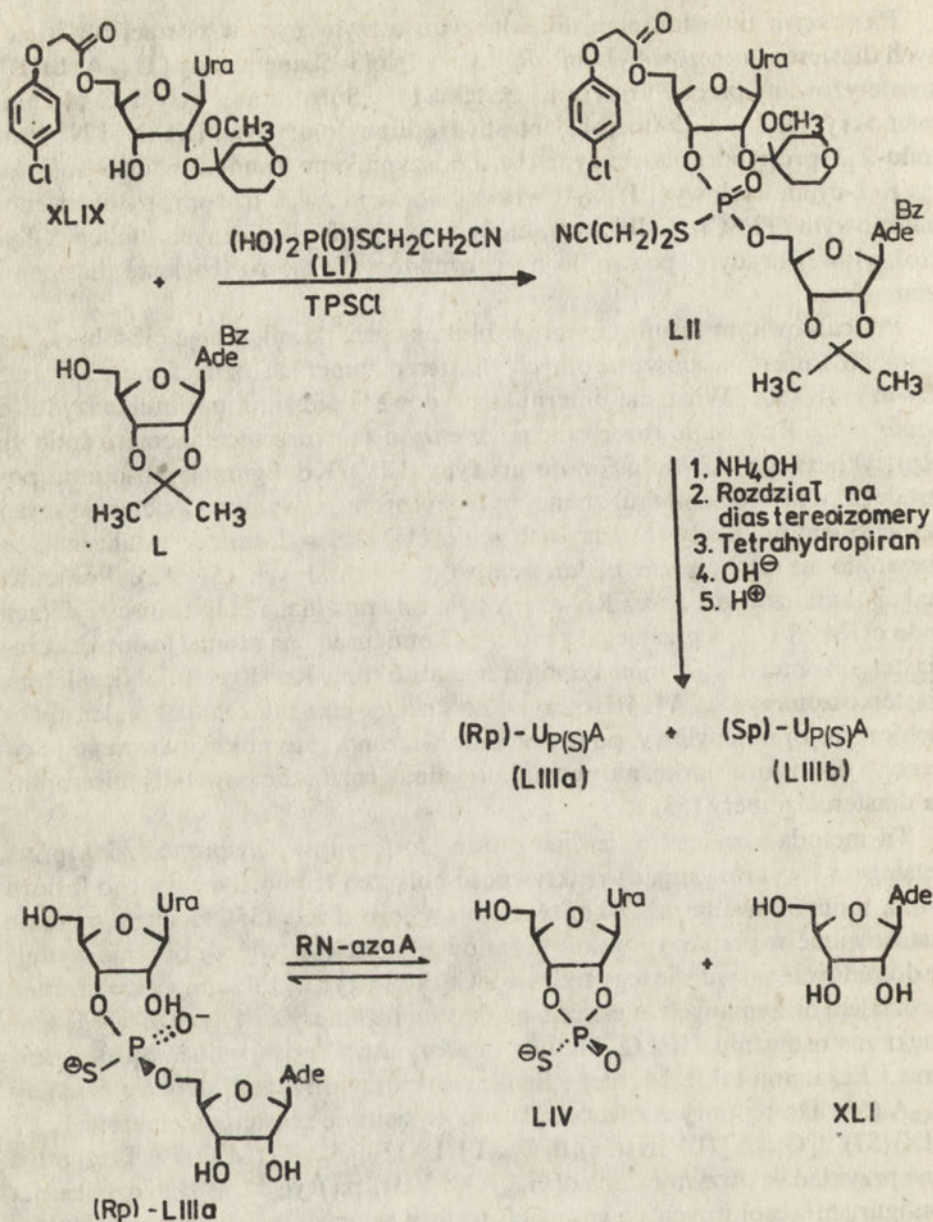


Pierwszym tiofosforanem dinukleozydu otrzymanym w postaci rozdzielonych diastereoizomerów był tiofosforan urydylo(3'-5')adenozyny [ $U_{P(S)}A$  (LIII)], zsyntetyzowany przez Burgersa i Ecksteina (45). Substratami były 5'-O-(4-chlorofenoksyacetylo)-2'-O-(metoksytetrahydropiranylo)urydyna (XLIX) i N<sup>6</sup>-benzoilo-2',3'-propylidenoadenozyna (L), a odczynnikiem kondensującym tiofosforan S-2-cyanoetylowy (LI) użyty wraz z chlorkiem 2, 4, 6-triizopropylbenzenosulfonowym (TPSCl). Odblokowanie w warunkach alkalicznych funkcji 5'-hydroksylowej urydyny pozwoliło na chromatograficzne rozdzielenie diastereoizomerów.

Po całkowitym usunięciu grup blokujących, konfiguracje absolutne na atomach fosforu w poszczególnych diastereoizomerach oznaczono używając RN-azy A (50). Wiązanie internukleotydu tiofosforanu dinukleozydu o konfiguracji Rp zostało rozerwane przez enzym z utworzeniem izomeru endo, tj. (Rp)-cyklicznego 2',3'-tiofosforanu urydyny (LIV). Konfiguracja absolutna powstałego diastereoizomeru znana była autorom z wyników wcześniejszych eksperymentów, kiedy to otrzymali endo cUMPS w formie krystalicznej, co pozwoliło na wykonanie badań rentgenostrukturalnych (51, 52). Ponieważ reakcja katalizowana przez RN-azę A była odwracalna, a etap transestryfikacji endo cUMPS  $U_{P(S)}A$  przebiegał z inwersją konfiguracji na atomie fosforu, także i diastereoizomer  $U_{P(S)}A$  miał konfigurację absolutną Rp (Ryc. 16). Niezależnie, diastereoizomery  $U_{P(S)}A$  (LIII) otrzymano stosując jako odczynnik kondensujący dichlorofosforan fenylowy; po utworzeniu wiązania internukleotydu przyłączono do fosforu siarkę, nie potrafiono jednak rozdzielić powstałej mieszaniny na diastereoizomery (53).

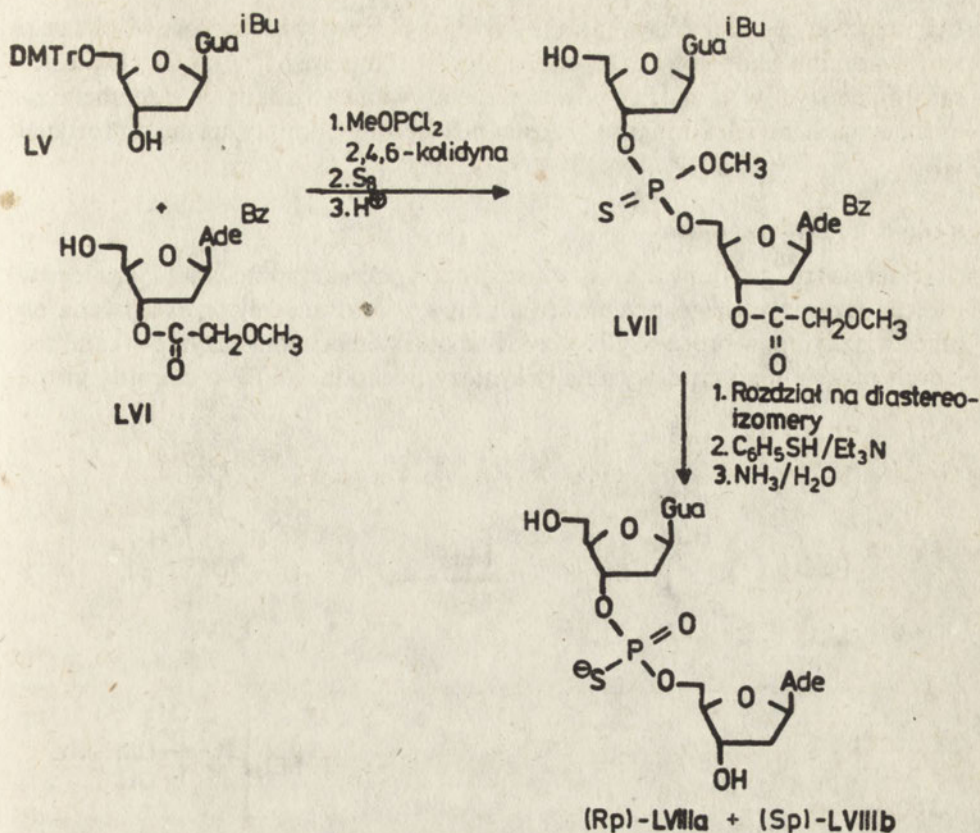
Ta metoda kondensacji zwana często „fosforynową”, wprowadzona przez Letsingera i wykorzystująca reaktywność połączeń trikoordynacyjnego fosforu (54), a modyfikowana przez kontynuatorów jego dzieła (55), znalazła szerokie zastosowanie w preparatyce tiofosforanów oligonukleotydów i obecnie wydaje się dominować w syntezie tego rodzaju związków (Ryc. 17). Trudności związane z rozdziałem otrzymanych mieszanin na diastereoizomery zostały przezwyciężone dzięki zastosowaniu HPLC. Metodą „fosforynową” posłużyli się oprócz Burgersa i Ecksteina także Marlier i Benkovic, którzy otrzymali diastereoizomery  $A_{P(S)}A$  (56). Do tej pory zaowocowała ona w syntezie diastereoizomerów  $T_{P(S)}T$  (LIX) (57),  $d[G_{P(S)}A]$  (LVIII) (58),  $d[C_{P(S)}T]$  (LX) i  $d[G_{P(S)}T]$  (LIX) (59). Prezentują ją na przykładzie otrzymywania  $d[G_{P(S)}A]$  (LVIII), na Ryc. 17. W celu oznaczenia konfiguracji absolutnych na atomach fosforu w zsyntetyzowanych diastereoizomerach poddano je działaniu fosfodiesterazy z jadu węża. Zaobserwowano, że trawieniu uległ tylko jeden ze związków, a więc w oparciu o posiadane dane na temat stereospecyficzności działania enzymu, hydrolizowanemu diastereoizomerowi przypisano Rp-konfigurację absolutną na atomie fosforu; zatem drugi z diastereoizomerów musiał mieć konfigurację Sp (58).

Celem syntezy  $d[G_{P(S)}A]$  było otrzymanie tiofosforanowego analogu dinukleotydu  $d(G_pA)$ , który stanowiłby specyficzne miejsce cięcia przez enzym restrykcyjny Eco RI w obrębie kwasu deoksyrybonukleinowego. Każdy z



Ryc. 16. Synteza i oznaczanie konfiguracji absolutnych na atomach fosforu w diastereoizomerach U<sub>P(S)</sub>A (LIIIa i LIIIb) (45, 50).

diastereoizomerów d[G<sub>P(S)</sub>A], tj. (Rp)-LVIIIa lub (Sp)-LVIIIb może być włączony, na drodze syntezy chemicznej, do oktameru GGAATTC, będącego najkrótszą sekwencją DNA stanowiącą substrat dla Eco RI i w ten sposób użyty do badania stereochemii działania enzymu.



Ryc. 17. Synteza diastereoizomerów  $d[G_{P(S),A}]$  (LVIIIa i LVIIIb) metodą fosforową (58).

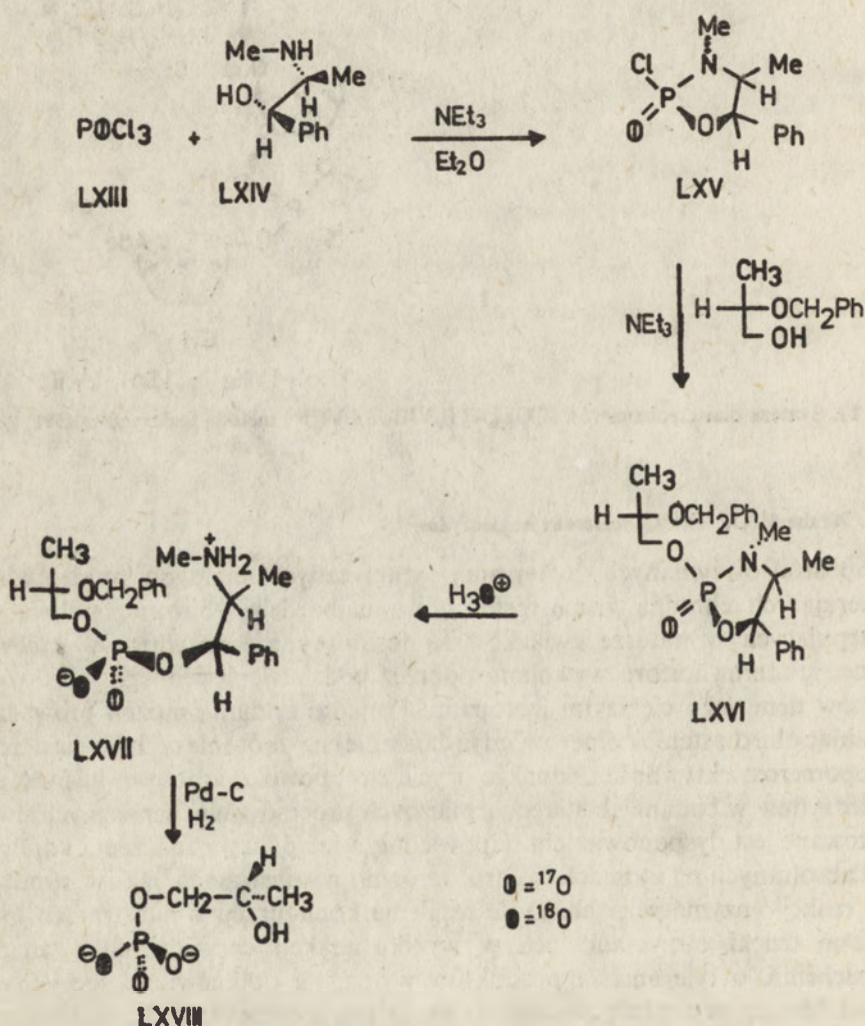
#### II-4. Chiralne [<sup>16</sup>O, <sup>17</sup>O, <sup>18</sup>O]-fosforany nukleozydów

Spośród otrzymanych do tej pory syntetycznych analogów nukleotydu zawierających chiralną grupę fosforanową najbardziej zbliżone budową do występujących w naturze związków są fosforany nukleozydów, w których asymetrię atomu fosforu wywołano poprzez podstawienie jednego lub dwóch atomów tlenu jego cięższymi izotopami. Ponadto badania można prowadzić używając obu diastereoizomerów, gdyż działanie enzymów nie cechuje diastereoizotoposelektywność. Jednakże użycie izotopowo znaczonego fosforanu nukleozydów w badaniach stereochemicznych procesów biochemicznych warunkowane jest dysponowaniem odpowiednimi metodami oznaczenia konfiguracji absolutnych na atomach fosforu, zarówno w substratach, jak i w produktach reakcji enzymatycznych. O ile ustalenie konfiguracji w substratach było możliwe dzięki otrzymaniu ich w wyniku reakcji chemicznych o znanej stereochemii, o tyle analiza produktów wymagała opracowania specjalnych metod. Metody te zrodziły się dopiero wtedy, gdy techniki analityczne (spektrometria masowa i <sup>31</sup>P-MRJ) osiągnęły odpowiedni poziom rozwoju, tzn. możliwy

był precyzyjny pomiar masy jonów (FAB) oraz wzrosła rozdzielczość MRJ dzięki wprowadzeniu nadprzewodzących magnesów. Ponieważ [ $^{16}\text{O}$ ,  $^{17}\text{O}$ ,  $^{18}\text{O}$ ]-fosforany nukleozydów są obecnie powszechnie używane w badaniach stereochemicznych, oznaczeniu ich konfiguracji został poświęcony odrębny, następny rozdział III.

#### II-4.1. [ $^{16}\text{O}$ , $^{17}\text{O}$ , $^{18}\text{O}$ ]-Fosforany monoalkilowe

Energia zmagazynowana jest w komórce przede wszystkim w ATP i z niego w trakcie enzymatycznego przeniesienia grupy  $\gamma$ -fosforanowej przekazywana na inne związki (np. w procesie glikolizy). Badania stereochemii enzymów katalizujących reakcje tego typu wymagały syntezy pochodnej ATP z chiralną grupą

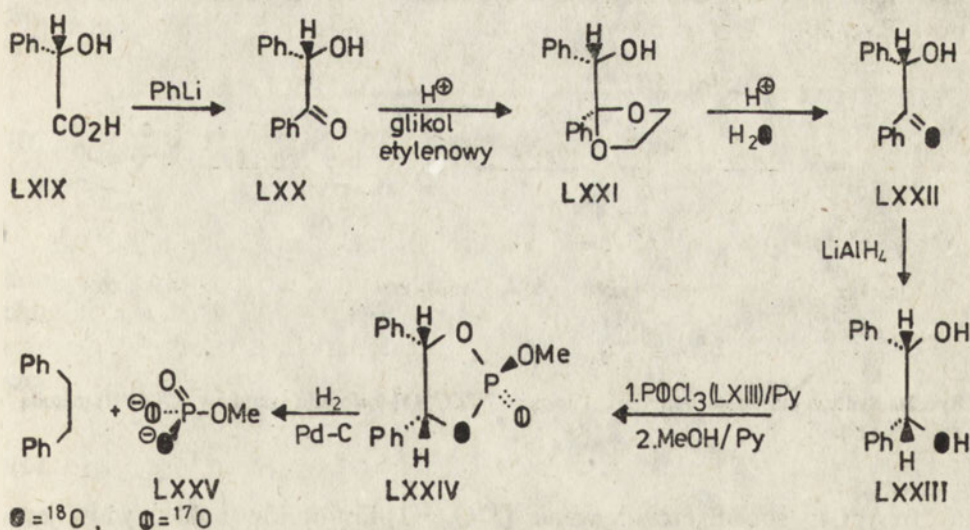


Ryc. 18. Otrzymywanie [ $^{16}\text{O}$ ,  $^{17}\text{O}$ ,  $^{18}\text{O}$ ]-fosforanu propandiolu (LXVIII) wg. Knowlesa i wsp. (11).

$\gamma$ -fosforanową i w tym też celu otrzymano [ $\gamma$ - $^{18}\text{O}$ ]ATP $\gamma$ S (XLVIII) (43, 44) oraz [ $\gamma$ - $^{16}\text{O}$ ,  $^{17}\text{O}$ ,  $^{18}\text{O}$ ]ATP (LXII) (11, 60, 61, 62). Synteza drugiego z wyżej wymienionych związków możliwa jest przy zastosowaniu dwu niezależnie opracowanych metod (11, 60).

Metoda syntezy P-chiralnych izotopomerycznych fosforanów monoalkilowych (arylowych) przedstawiona po raz pierwszy przez Knowlesa (11), polegała na fosforylacji alkoholu lub fenolu za pomocą cyklicznego chlorofosforanu LXV. Cechą wyróżniającą ten chlorofosforan spośród wielu innych cyklicznych halobezwodników kwasu fosforowego jest jego łatwa dostępność w postaci pojedynczego diastereoizomeru (z efedryny oraz znaczonego izotopem tlenu tlenochlorku fosforu). Pożądaný tlenochlorek LXIII otrzymuje się w reakcji pięciochlorku fosforu z izotopowo znakowaną wodą [ $^{17}\text{O}$ ]H $_2$ O. Drugą cechą wyróżniającą związek LXV jest zdolność do fosforylacji alkoholi lub fenoli – reakcja ta przebiega z retencją konfiguracji na atomie fosforu (Ryc. 18). Dla celów analitycznych istotna była fosforylacja propandiolu-1,2 gdyż jego dalsze przemiany doprowadziły do 2-hydroksy-2-okso-4-metylo-1,3,2-dioksa-fosfolanu – połączenia, na którym opracowano metodę analizy stereochemicznej fosforanów monoalkilowych (patrz rozdz. III-1.1.). Zaslęgą Knowlesa było zarówno opracowanie enzymatycznej konwersji dowolnego fosforanu monoalkilo(arylo)wego w fosforan propandiolu, jak i wyjaśnienie stereochemii tej przemiany.

Metoda Lowe'a (60) została po raz pierwszy zademonstrowana w syntezie monoestru metylowego kwasu [ $^{16}\text{O}$ ,  $^{17}\text{O}$ ,  $^{18}\text{O}$ ]-fosforowego; sekwencja reakcji prowadząca do tego produktu została zaprezentowana na Ryc. 19. W odróżnieniu od procedury Knowlesa polegającej na otrzymaniu chiralnego alkilofosforanu w wyniku reakcji hydrolizy wprowadzającej izotop tlenu, Lowe zapropono-

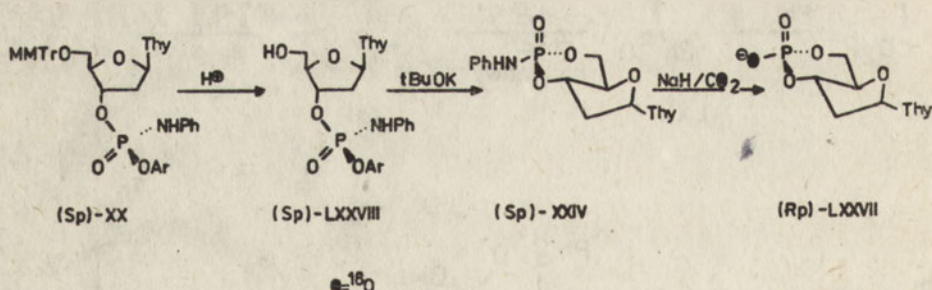


Ryc. 19. Synteza [ $^{16}\text{O}$ ,  $^{17}\text{O}$ ,  $^{18}\text{O}$ ]-fosforanu metylowego (LXXV) wg. Lowe'a i wsp. (60).

wał syntezę fosfotriestrowej, znakowanej izotopowo, pochodnej benzoiny o znanej konfiguracji na atomie fosforu. Jej wodoroliza prowadziła do [ $^{16}\text{O},^{17}\text{O},^{18}\text{O}$ ]-fosforanu monoalkilowego, który tworzył się z zachowaniem konfiguracji absolutnej na atomie fosforu wyjściowego substratu, bowiem żadne z wiązań przy fosforze nie uległo zerwaniu (63–65). Metoda Lowe'a, w zależności od użytego alkoholu w procesie solwolizy LXXIII → LXXIV, pozwoliła na otrzymanie dowolnego [ $^{16}\text{O},^{17}\text{O},^{18}\text{O}$ ]-fosforanu alkilowego, w tym także (Sp)- $\gamma$ -[ $^{16}\text{O},^{17}\text{O},^{18}\text{O}$ ]-ATP (LXIIB).

#### II-4.2. Diestry kwasu [ $^{16}\text{O},^{18}\text{O}$ ]-fosforowego

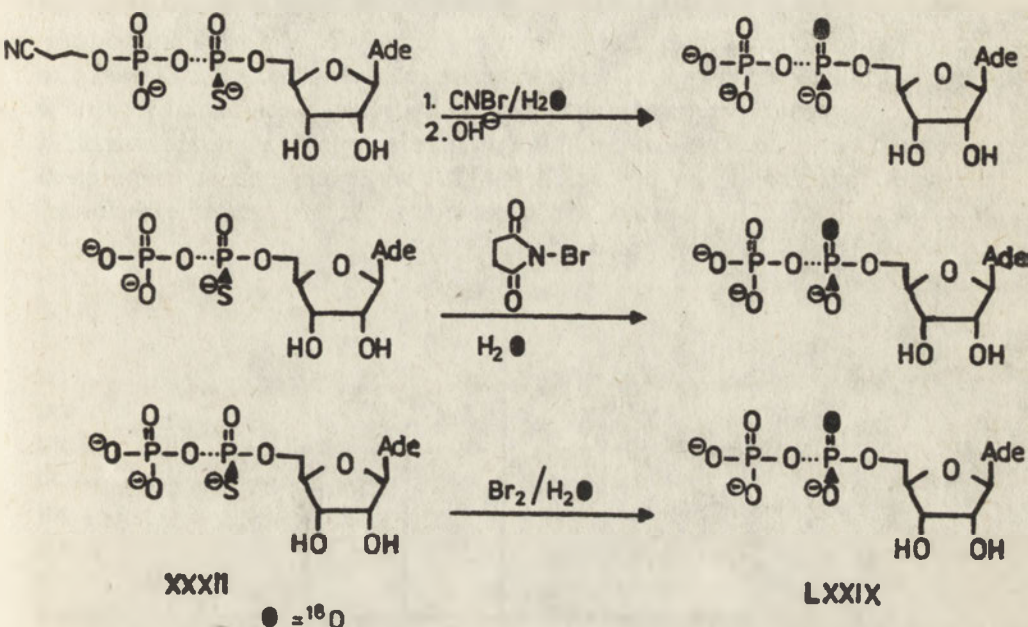
Diestry fosforanowe, w których chiralność grupy fosforanowej wywołano obecnością dwóch różnych izotopów tlenu otrzymano po raz pierwszy w 1980 r. w laboratoriach Steca (9) i Gerlta (10). Pierwszy z nich doniósł o syntezie (Sp)-cyklicznego 3',5'-[ $^{16}\text{O},^{18}\text{O}$ ]-fosforanu adenozyiny [ $^{18}\text{O}$ ]-cAMP (LXXVI), a drugi o otrzymaniu obu diastereoizomerów cyklicznego 3',5'-[ $^{16}\text{O},^{18}\text{O}$ ]-fosforanu deoksyadenozyiny [ $^{18}\text{O}$ ]-cdAMP (LXXVII). W obu przypadkach preparatyka chemiczna opierała się na reakcji Wittiga-Staudingera, której stereochemię dokładnie zbadano w zespole Steca (25, 30). Konfiguracje absolutne otrzymanych związków oznaczono w przypadku [ $^{18}\text{O}$ ]-cAMP za pomocą spektrometrii masowej, zaś w przypadku [ $^{18}\text{O}$ ]-cdAMP posługując się  $^{31}\text{P}$ -MRJ. Metoda otrzymywania wymienionych związków polega na syntezie 3'-(arylo)-N-fenylamino fosforanów 5'-monometoksytrytonukleozydów (lub deoksytrybonukleozydów, aryl = 2-chlorofenyl lub 4-nitrofenyl), które po odblokowaniu funkcji 5'-hydroksylowej rybozy (lub deoksyrybozy) są cyklizowane za pomocą tert-butanolanu potasowego. Powstałe cykliczne anilidosforany deoksytrybonukleozydów (XXIV) są stereospecyficznie przeprowadzone w warunkach reakcji Wittiga-Staudingera w cykliczne [ $^{16}\text{O},^{18}\text{O}$ ]-fosforany nukleozydów (Ryc. 20).



Ryc. 20. Synteza diastereoizomerów cyklicznego [ $^{16}\text{O},^{18}\text{O}$ ]-fosforanu tymidyny (LXXVII) metodą anilidową (9).

Innym sposobem otrzymywania [ $^{16}\text{O},^{18}\text{O}$ ]-fosforanów nukleozydów jest stereospecyficzna konwersja tiofosforanów do fosforanów (66–69). Jedną z metod polega na aktywacji atomu siarki tak, że staje się on dobrą grupą

opuszczającą, zastępowaną w procesie podstawienia przez atom tlenu pochodzący z cząsteczki [ $^{18}\text{O}$ ]- $\text{H}_2\text{O}$ . Odczynnikami aktywującymi mogą być bromocyan (66), N-bromoimid kwasu bursztynowego (67) i brom (68). Reakcja ta przebiega z wysoką stereospecyficznością i wydajnością (ok. 80%), zaś produkt powstaje z inwersją konfiguracji na atomie fosforu. Umożliwia ona wykorzystanie tiofosforanów, których metody syntezy zostały opisane w rozdziale II-3. Różne warianty utlenienia tiofosforanów XXXII do [ $^{18}\text{O}$ ]-fosforanów LXXIX są zaprezentowane na Ryc. 21.



Ryc. 21. Otrzymywanie  $\alpha$ -[ $^{18}\text{O}$ ]-difosforanów nukleozydów (LXXIX) z  $\alpha$ -tio-difosforanów nukleozydów (XXXII) (66–69).

### III. Oznaczenie konfiguracji absolutnych na atomach fosforu w chiralnych [ $^{16}\text{O}$ , $^{17}\text{O}$ , $^{18}\text{O}$ ]-fosforanach za pomocą metod spektroskopowych

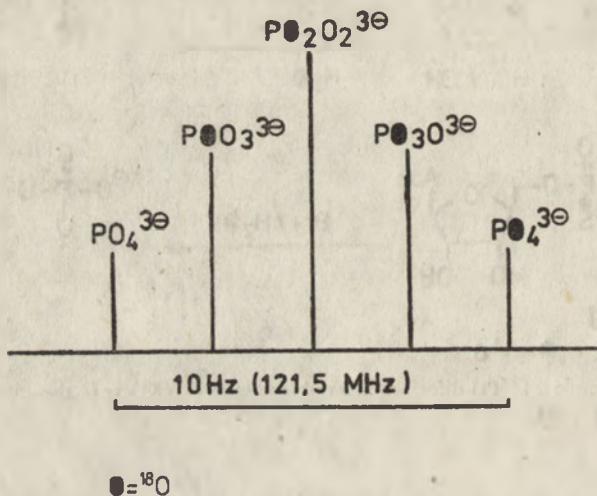
Do chwili obecnej opracowano dwie metody pozwalające na ustalenie konfiguracji absolutnych na atomach fosforu w związkach zawierających chiralną grupę [ $^{16}\text{O}$ ,  $^{17}\text{O}$ ,  $^{18}\text{O}$ ]-fosforanową. Obie polegają na identyfikacji cyklicznych estrów otrzymanych z badanych substancji chemicznych, w pierwszej przy użyciu  $^{31}\text{P}$ -MRJ, a w drugiej spektrometrii masowej.

#### III-1. Zastosowanie $^{31}\text{P}$ -MRJ

##### III-1.1. [ $^{16}\text{O}$ , $^{17}\text{O}$ , $^{18}\text{O}$ ]-Fosforany monoalkilowe

Metoda pozwalająca na ustalenie konfiguracji absolutnej na atomie fosforu w monoalkilo [ $^{16}\text{O}$ ,  $^{17}\text{O}$ ,  $^{18}\text{O}$ ]-fosforanie za pomocą  $^{31}\text{P}$ -MRJ opiera się na dwóch

eksperymentalnie stwierdzonych faktach. Po pierwsze,  $^{17}\text{O}$  mając liczbę spinową  $5/2$  posiada nuklearny, elektryczny moment kwadrupolowy. Oddziaływaniu spinowemu pomiędzy jądrami  $^{17}\text{O}$  i  $^{31}\text{P}$  towarzyszy szybka relaksacja tych drugich powodująca, że sygnał w widmie  $^{31}\text{P}$ -MRJ ulega tak znacznemu poszerzeniu, iż obserwowanym efektem wiązania  $^{17}\text{O}$  z  $^{31}\text{P}$  jest zanik linii rezonansowych, co umożliwia łatwiejszą analizę sygnałów pochodzących od fosforanów nie zawierających izotopu  $^{17}\text{O}$  (63–65). Po drugie  $^{18}\text{O}$  związany z fosforem wywołuje efekt przesunięcia izotopowego w kierunku wyższego pola, w stosunku do sygnału nieznanego fosforanu (79, 80). Wynosi on od 0.01 do 0.04 ppm i jest ściśle związany z charakterem wiązania P-O. W przypadku podwójnego wiązania osiąga większą wartość w ramach ww. przedziału. Zjawisko to ilustruje w sposób przejrzysty eksperyment hydrolizy pięciotlenku fosforu w wodzie zawierającej 50% izotopu  $^{18}\text{O}$ . Powstałe izotopowo znaczone związki są łatwe do odróżnienia za pomocą  $^{31}\text{P}$ -MRJ; występują one w proporcjach 1:4:6:4:1 (Ryc. 22). Ponadto widoczne jest także, że znaczone fosforany



Ryc. 22. Schematyczny obraz widma  $^{31}\text{P}$ -MRJ (121,5 MHz) fosforanów zawierających izotop tlenu  $^{18}\text{O}$  w różnych ilościach (63).

absorbują w wyższym polu niż nieznanne (widmo zostało wykonane przy częstotliwości 121.5 MHz). W tym przypadku każdy z izotopów  $^{18}\text{O}$  związany z atomem fosforu powoduje zwiększenie wartości przesunięcia chemicznego w kierunku wyższego pola o 0.02 ppm. Wielkość przesunięcia zależy od rodzaju podstawników i sposobu ich związania z fosforem. Ilustruje to zastosowanie wartości przesunięć chemicznych wybranych estrów  $^{18}\text{O}$ -fosforanowych, przedstawione w Tabeli 2 (63).

Analiza konfiguracji monoestru 6- $^{16}\text{O},^{17}\text{O},^{18}\text{O}$ - $\alpha$ -fosforanu glukozy (LXXX) polega na jego przekształceniu w dwa cykliczne, sześcioczłonowe triestry kwasu fosforowego. W tym celu niezbędna jest aktywacja grupy fosforanowej



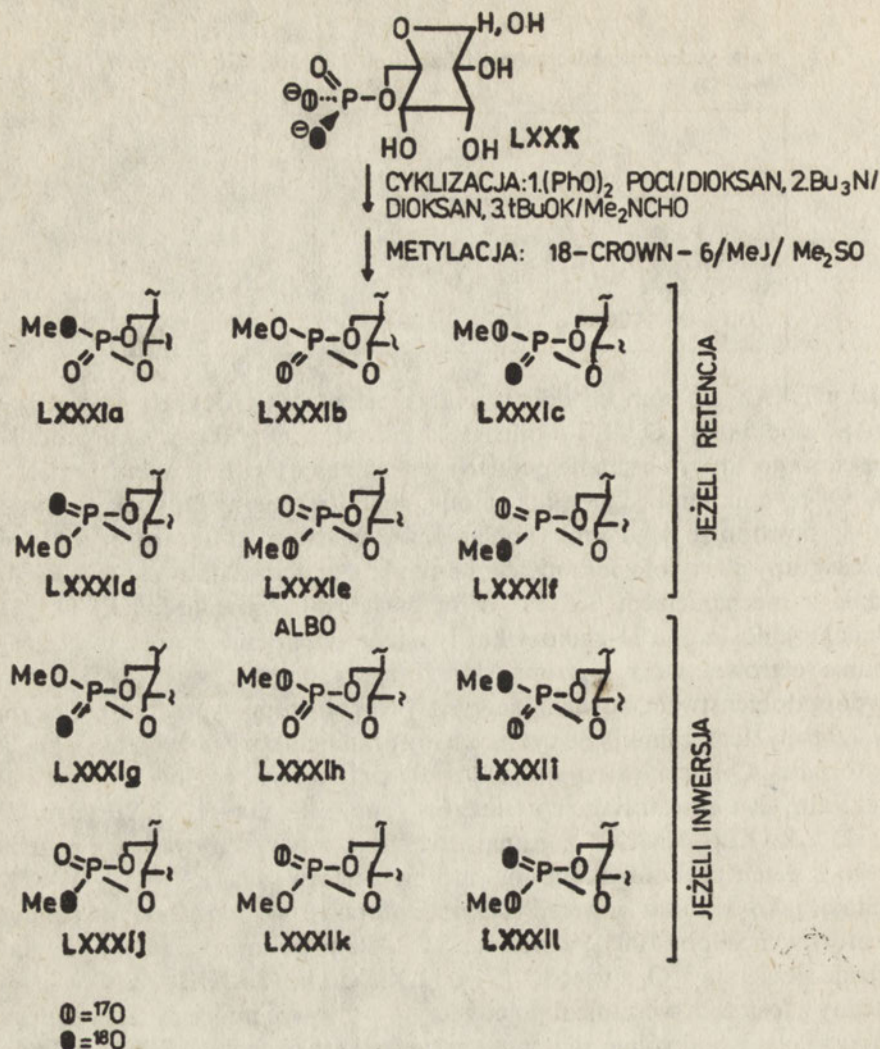
Tabela 2

Wartości przesunięć chemicznych dla estrów [ $^{18}\text{O}$ ]-fosforanowych (63) (● =  $^{18}\text{O}$ ).

Badany ester	Wartość $\Delta\delta$ (162 MHz)	
	Hz	ppm
$(\text{MeO})_3\text{P}=\text{●}$	5.83	0.036
$(\text{MeO})_2\text{P}(\text{●})\text{O}^\ominus$	4.74	0.029
$\text{MeOP}(\text{O})\text{●}^{2\ominus}$	3.72	0.023
$^{2\ominus}\text{O}_3\text{P}-\text{●}-\text{ADP}$	3.38	0.021

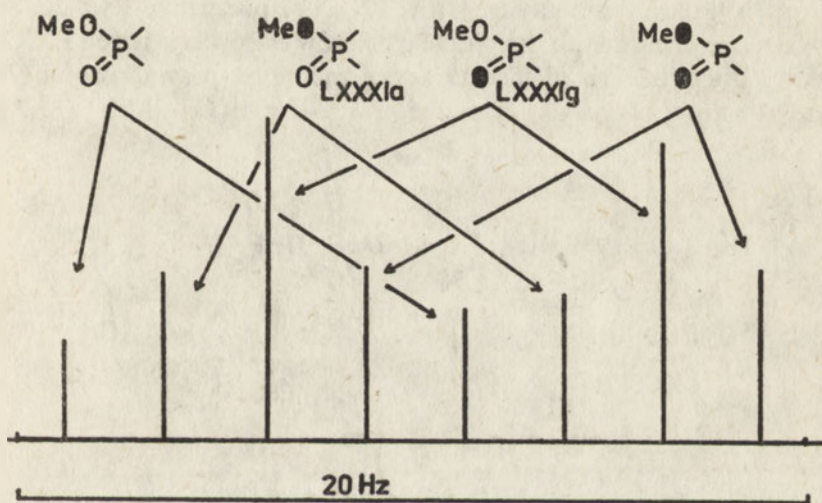
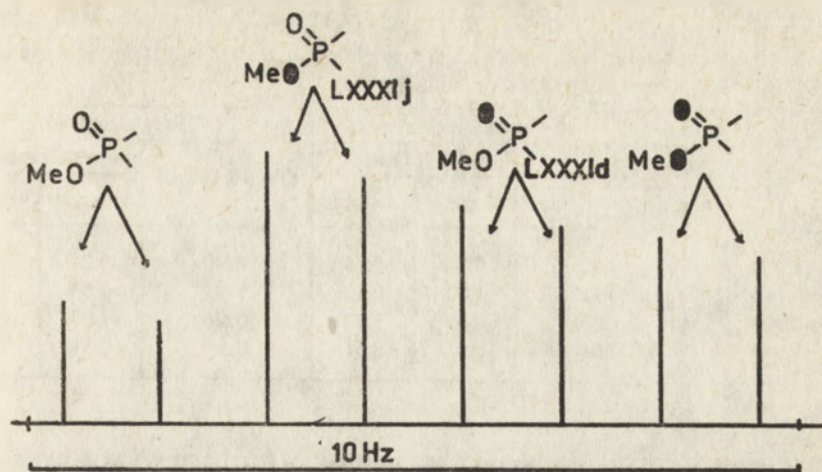
związku LXXX za pomocą difenylchlorofosforanu (XXXVIII), powodująca powstawanie 6-( $\alpha$ -[ $^{17}\text{O}$ ,  $^{18}\text{O}$ ]- $\beta$ -difenyl)difosforanu D-glukozy jako produktu przejściowego, który następnie poddany jest reakcji z tert-butanolanem potasowym. Odczynnik ten będący silną zasadą, generuje ujemny ładunek na atomie tlenu-4, powodując jego atak nukleofilowy na atom  $\alpha$ -fosforu wywołujący odejście grupy difenylfosforanowej i zamknięcie sześciocząłowego pierścienia, zgodnie z mechanizmem  $\text{S}_{\text{N}}2(\text{P})$ . W etapach cyklizacji 6-( $\alpha$ -[ $^{16}\text{O}$ ,  $^{17}\text{O}$ ,  $^{18}\text{O}$ ]- $\beta$ -difenyl)difosforanu D-glukozy każdy z izotopów tlenu (oprócz tworzącego wiązanie estrowe) wraz z grupą opuszczającą odrywa się z tym samym prawdopodobieństwem, bowiem kinetyczny efekt izotopowy jest bardzo nieznaczny. Izotopy tlenu zajmują po cyklizacji fosforanu glukozy pozycję aksjalną lub ekwatorialną. Cykliczne diestry są następnie metylowane, co powoduje powstanie aksjalnych i ekwatorialnych triestrów typu LXXXIa – LXXXII (Ryc. 23). Związki LXXXIa – LXXXIf zostaną utworzone w wyniku cyklizacji przebiegającej z retencją konfiguracji na atomie fosforu, zaś LXXXIg – LXXXII powstają jako rezultat inwersji. Jeżeli izotopowe wzbogacenie powstałych izomerów wynosiłoby 100%, w widmie  $^{31}\text{P}$ -MRJ widoczne będą tylko te z nich, które nie zawierają  $^{17}\text{O}$ , a więc LXXXIa i LXXXId lub LXXXIg i LXXXIj.  $^{18}\text{O}$  związany z fosforem wiązaniem pojedynczym wywołuje mniejszy efekt izotopowy niż związany podwójnie, dlatego też przesunięcie chemiczne LXXXIa będzie mniejsze, niż LXXXIg. Na tej samej zasadzie także LXXXIj będzie się charakteryzował niższą wartością efektu izotopowego, niż LXXXId. Różnica pomiędzy triestrami ekwatorialnymi i aksjalnymi wynosi ok. 2 ppm. Oznacza to, że zidentyfikowanie konfiguracji nie wymaga wcześniejszego rozdzielenia izomerów metodami fizycznymi. Widmo  $^{31}\text{P}$ -MRJ (121.5 MHz) otrzymanych po cyklizacji i metylacji związków typu LXXXI przedstawiono niżej (Ryc. 24.). Każdy z triestrów występuje w konfiguracji cis- lub trans-, odpowiadają mu więc dwa sygnały. Z zaprezentowanego widma widać, że LXXXIg i LXXXIj są izomerami, które powstają w wyniku cyklizacji przebiegającej z inwersją konfiguracji na atomie fosforu (stereospecyficzność ponad 94%) (12).

Identyfikatorną analizę stereochemiczną można przeprowadzić cyklizując 5'-[ $^{16}\text{O}$ ,  $^{17}\text{O}$ ,  $^{18}\text{O}$ ]-AMP (LXXXIII) i metylując powstałe diestry. Graficzny obraz utworzonych, sześciocząłowych pierścieni będzie taki sam jak Ryc. 23.



Ryc. 23. Oznaczenie konfiguracji absolutnej [<sup>16</sup>O, <sup>17</sup>O, <sup>18</sup>O]-fosforanu monoalkilowego, na przykładzie 6-[<sup>16</sup>O, <sup>17</sup>O, <sup>18</sup>O]-fosforanu glukozy (LXXX) – otrzymywanie triestrów metylowych (LXXXIa-1) (12).

Przykładem takiego postępowania było badanie stereochemii reakcji katalizowanej przez kinazę polinukleotydową wyizolowaną z komórek *Escherichia coli* B, zainfekowanych bakteriofagiem T<sub>4</sub>. Jarvest i Lowe otrzymali 5'-[<sup>16</sup>O, <sup>17</sup>O, <sup>18</sup>O]-fosforan 3'-fosforan adenozy (LXXXIII), który zdegradowali nukleazą P-1 do 5'-[<sup>16</sup>O, <sup>17</sup>O, <sup>18</sup>O]-AMP (LXXXIV) (Ryc. 25) (68). Produkt LXXXIV poddano kolejnym reakcjom cyklizacji i metylacji, zaś strukturę utworzonych triestrów LXXXV badano za pomocą <sup>31</sup>P-MRJ. Obliczone teoretycznie i uzyskane wielkości względne sygnałów dla cyklicznych diestrów prezentowane są w Tabeli 3.



Ryc. 24. Analiza  $^{31}\text{P}$ -MRJ (121,5 MHz) mieszaniny triestrów metylowych (LXXXIa-1), których otrzymywanie prezentuje Ryc. 23; izotop  $^{18}\text{O}$  położony jest ekwatorialnie gdyż głównymi produktami reakcji są izomery LXXXIg i LXXXIj (12).

### III-1.2. Diestry kwasu $^{16}\text{O}$ , $^{18}\text{O}$ -fosforowego

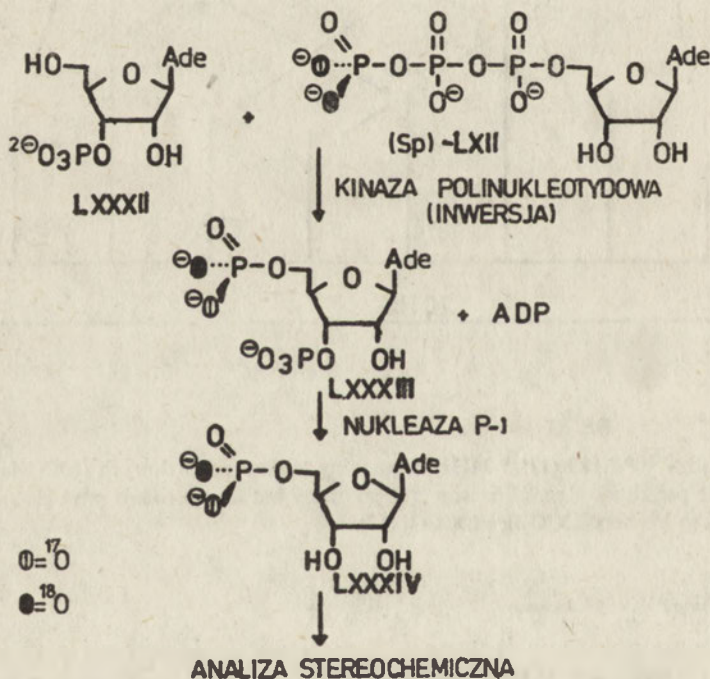
Oznaczenie położenia izotopu  $^{18}\text{O}$  w grupie fosforanowej w diastereoizomerach cyklicznego 3',5'-[ $^{16}\text{O}$ ,  $^{18}\text{O}$ ]-dAMP (LXXVII) możliwe jest dopiero po metylowaniu powodującym utworzenie mieszaniny triestrów aksjalnych i ekwatorialnych (LXXXVI). Proces ten wymusza nowe rozmieszczenie ładunków na

Tabela 3

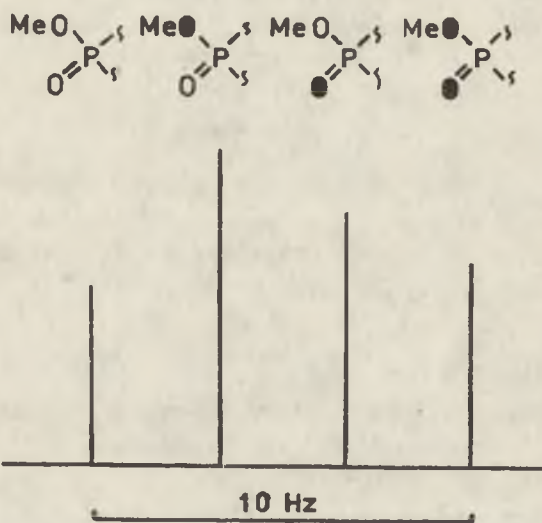
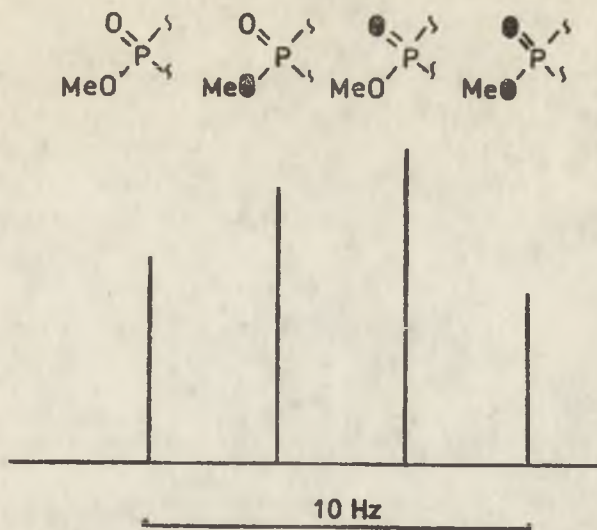
Teoretyczne i obserwowane wielkości względne sygnałów dla estrów metylowych cyklicznego 3',5'-[ $^{18}\text{O}$ ]-fosforanu adenozy (LXXXV) (68) (● =  $^{18}\text{O}$ ).

Typ wiązania	Estry ekwatorialne			Estry aksjalne		
	Obserwowano	Obliczono		Obserwowano	Obliczono	
		retencja	inwersja		retencja	inwersja
Me○—P=○	0.62	0.24	0.24	0.58	0.24	0.24
Me●—P=○	0.71	1.00	0.65	1.00	0.65	1.00
Me○—P=●	1.00	0.65	1.00	0.69	1.00	0.65
Me●—P=●	0.54	0.51	0.51	0.55	0.51	0.51

atomach tlenu, identyfikowane poprzez pomiar perturbacji wywołanych obecnością  $^{18}\text{O}$ , tj. wzrost wartości przesunięcia chemicznego dla fosforu związanego podwójnie z tym atomem. Idealizowane widmo  $^{31}\text{P}$ -MRJ (50% wzbogacenia izotopem  $^{18}\text{O}$ ) dla mieszaniny triestrów-LXXXVI prezentuje Ryc. 26. Stwierdzono także, że przesunięcia chemiczne izomerów estrów etylowych LXXXVII i benzytowych są różne a różnice te noszą znamiona prawidłowości (70). W przypadku estrów etylowych cyklicznego 3',5'-[ $^{16}\text{O},^{18}\text{O}$ ]-dAMP (LXXXVII)

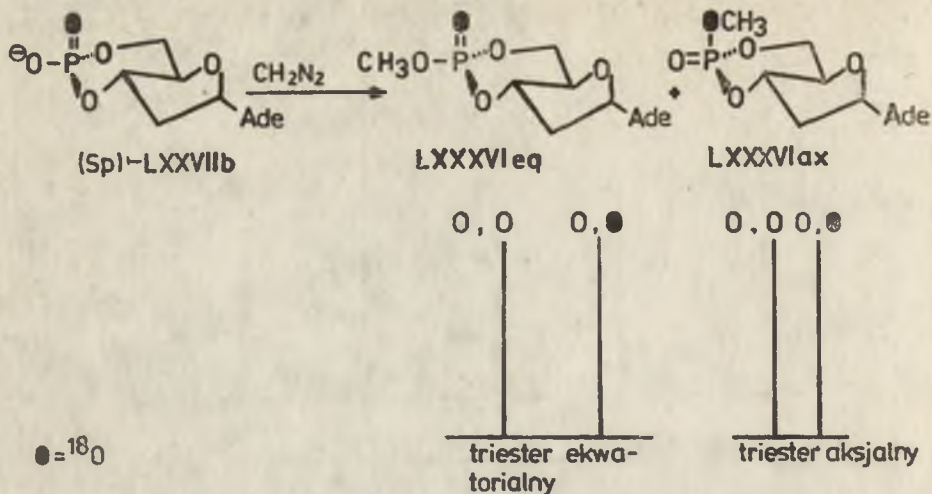


Ryc. 25. Objaśnienie na str. 107



$\text{O} = ^{18}\text{O}$

Ryc. 25. Badanie stereochemii reakcji fosforylacji katalizowanej przez kinazę polinukleotydomową; produkt LXXXIII po hydrolizie nukleazą P-1 aktywowano difenylochlorofosforanem (XXXVIII), a następnie w wyniku reakcji z tBuOK, przeprowadzono w mieszaninę cyklicznych [ $^{16}\text{O}, ^{17}\text{O}$ ]-[ $^{16}\text{O}, ^{18}\text{O}$ ]-[ $^{17}\text{O}, ^{18}\text{O}$ ]-fosforanów adenozy (LXXVI), które metylowano za pomocą  $\text{CH}_3\text{I}$  powodując utworzenie mieszaniny estrów metylowych cyklicznego [ $^{16}\text{O}, ^{17}\text{O}$ ]-, [ $^{16}\text{O}, ^{18}\text{O}$ ]- i [ $^{17}\text{O}, ^{18}\text{O}$ ]-fosforanu adenozy (LXXXV). Opis reakcji aktywacji, cyklizacji i metylowania znajduje się w tekście; ich głównym produktem jest triester aksjalny co widoczne jest na schematycznym obrazie widma  $^{31}\text{P}$ -MRJ (68).



Ryc. 26. Schematyczny obraz widma  $^{31}\text{P}$ -MRJ (81 MHz) równomolowej mieszaniny estrów metylowych cyklicznego [ $^{16}\text{O}$ ,  $^{18}\text{O}$ ]-fosforanu deoksyadenozyny (LXXXVI) (3).

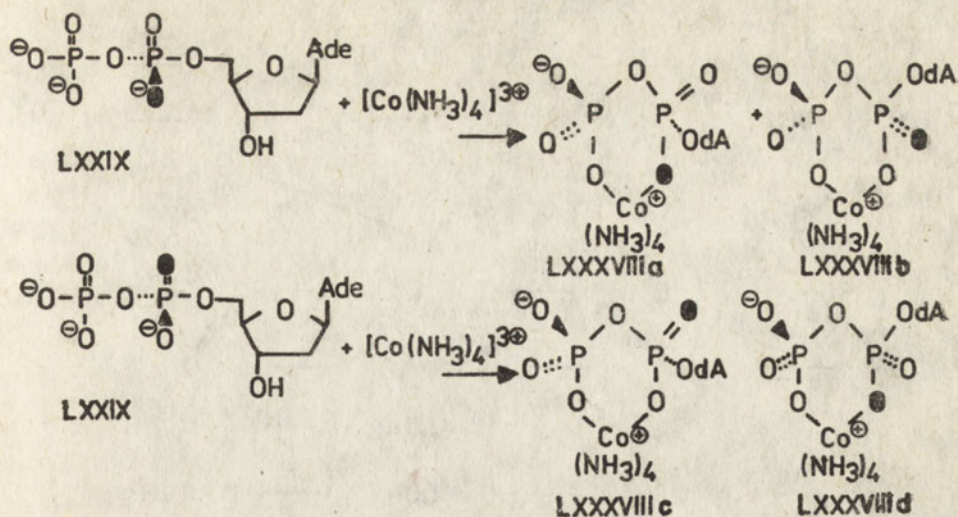
izotop tlenu-18 pojedynczo związany z fosforem, a więc estrowy powoduje przesunięcie w górę pola o 0.015 ppm, a związany podwójnie o 0.040 ppm (81 MHz). Otrzymane dane dotyczące przepisania absolutnej konfiguracji konfrontowano z wynikami syntezy chemicznej o znanym przebiegu stereochemicznym, prowadzącej do tych samych produktów (71, 72).

### III-1.3. $\alpha$ -[ $^{16}\text{O}$ , $^{18}\text{O}$ ]-Difosforany nukleozydów

Oznaczenie konfiguracji absolutnych na atomie fosforu w grupie  $\alpha$  fosforanowej diastereoizomerów  $\alpha$ -[ $^{16}\text{O}$ ,  $^{18}\text{O}$ ]-difosforanów nukleozydów opierało się na regułach zaprezentowanych w rozdziale III-1.2. Związek  $\alpha$ -[ $^{18}\text{O}$ ]-ADP (LXXIX) reaguje z  $\text{Co}(\text{NH}_3)_4(\text{H}_2\text{O})_2^{3+}$  i tworzy dwa diastereoizomery będące  $\alpha$ ,  $\beta$ -podstawionymi kompleksami kobaltu (LXXXVIII) (Ryc. 27). Powstałe produkty są trwałe i można je izolować chromatograficznie (48). Ich konfiguracje absolutne oznaczono za pomocą metod krystalograficznych (49).

### III-2. Zastosowanie spektrometrii masowej

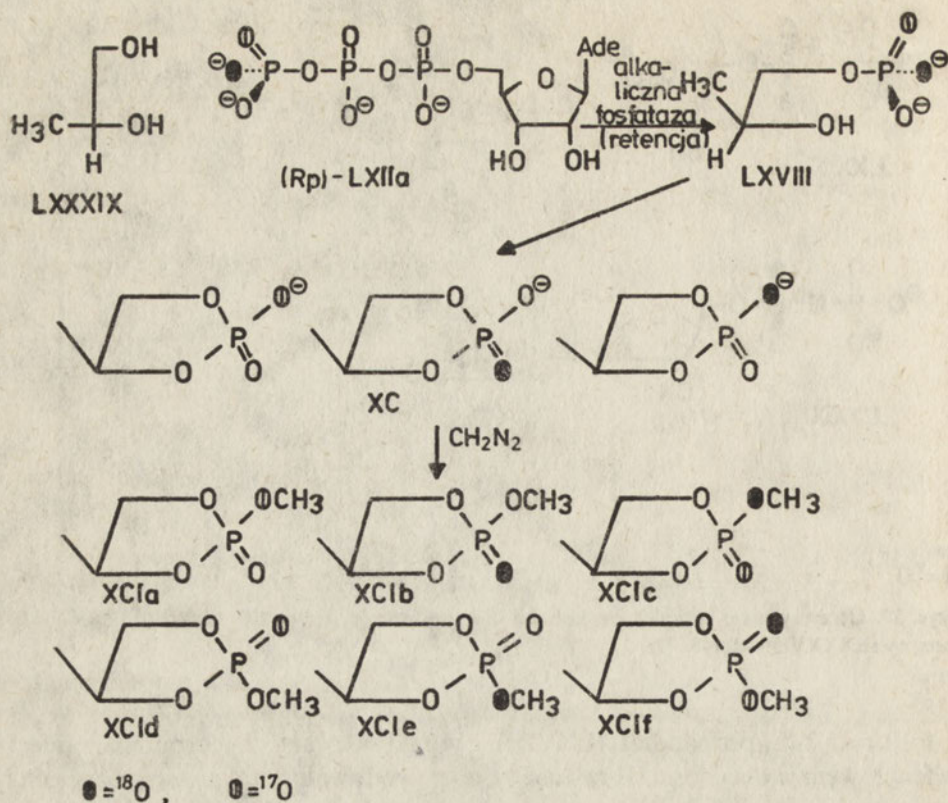
Konfiguracje absolutne izotopomerycznych fosforanów wzbogaconych  $^{18}\text{O}$  oznaczono za pomocą spektrometrii masowej metodami Knowlesa (13) i Steca (9). Pierwsza z nich polegała na otrzymaniu 1-fosforo-1,2-(S)-propandiolu (LXVIII), który po cyklizacji był metylowany. Utworzenie produktu LXVIII było możliwe gdyż 1,2-(S)-propandiol (LXXXIX) był substratem dla alkalicznej fosfatazy katalizującej reakcję transfosforylacji poprzez przeniesienie grupy fosforanowej z każdego chiralnego monoestru kwasu fosforowego (73). Proces ten przebiegał z retencją konfiguracji na atomie fosforu. Po zsyntetyzowaniu,



Ryc. 27. Otrzymywanie kompleksów kobaltu diastereoizomerów  $\alpha$ - $^{18}\text{O}$ -difosforanu deoksyadenozyny (LXXXVIIIa-d) (48, 49).

1-fosforo-1,2-(S)-propaniol (LXVIII) był aktywowany fosforoimidazolidem difenylowym w obecności III rz. zasady, co powodowało zamknięcie pierścienia i utworzenie z inwersją konfiguracji trzech pięcioczłonowych, cyklicznych fosforanów (XC). Kolejnym etapem było metylowanie diazometanem w celu utworzenia triestrów syn i anti, a następnie po ich rozdzieleniu zbadanie składu za pomocą spektrometrii masowej jonów metastabilnych. Tylko ta technika umożliwiła określenie masy jonów, gdyż mieszanina triestrów złożona była z równej ilości związków metylowanych na każdym z izotopów tlenu (Ryc. 28). Analiza triestrów jest prostsza, jeżeli diestry po potraktowaniu diazometanem rozdzieli się chromatograficznie, a następnie oznaczy się wzbogacenie izotopowe odpowiednich fragmentów.

Procedurę taką zastosowano w zespole Steca w celu oznaczenia konfiguracji cyklicznego 3',5'- $^{16}\text{O}$ ,  $^{18}\text{O}$ -AMP (LXXVI) (9). W badaniach modelowych nad stereochemią konwersji PN  $\rightarrow$  PO posłużono się izomerami cis- i trans-2-fenylamino-2-okso-4-metylo-1,3,2-dioksafosforinanu (XCII). Wiadomo było bowiem, z wcześniejszych prac, iż 2-hydrokso-2-okso-4-metylo-1,3,2-dioksafosforinan ulega alkilowaniu za pomocą fenylodiazometanu z utworzeniem izomerycznych trans-XCII ( $\delta 31_{\text{P}} - 4.5$ ) oraz cis-XCII ( $\delta 31_{\text{P}} - 1.0$ ) 2-benzylkso-2-okso-4-metylo-1,3,2-dioksafosforinanów. Geometrię tych związków ustalono na niezależnej drodze. Wiadomo było również, iż fragmentacja trans-XCII oraz cis-XCII w spektrometrii masowej pod wpływem wiązki bombardującej elektronów przebiega z rozpadem macierzystego jonu do benzaldehydu oraz jonu pochodnego  $\text{M-C}_7\text{H}_6\text{O}^+$ . Skoro więc możliwy był rozdział izomeru cis- od trans- za pomocą

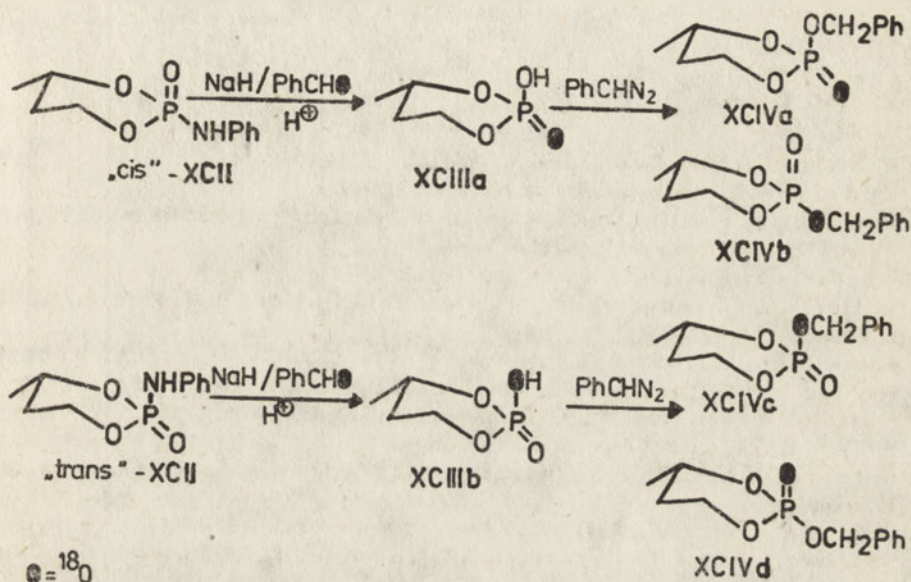


Ryc. 28. Badania stereochemii reakcji fosforylacji 1,2-propandiolu katalizowanej przez alkaliczną fosfatazę – otrzymywanie mieszaniny cyklicznych triestrów XCIa-f, której skład analizowano stosując spektrometrię masową jonów metastabilnych (13).

chromatografii cienkowarstwowej, na podstawie analizy widma fragmentacji masowej można było ustalić, jaką pozycję zajmował w alkilowanym za pomocą fenyldiazometanu produkcie konwersji  $\text{PN} \rightarrow \text{PO}$  izotop  ${}^{18}\text{O}$ . W warunkach konwersji  $\text{PN} \rightarrow \text{PO}$  przeprowadzono 2-fenyloamino-2-okso-4-metylo-1,3,2-dioksafosforinany (XCII) cis- i trans- w odpowiadające im  $[{}^{18}\text{O}]$ -2-hydroksy-2-okso-4-metylo-1,3,2-dioksafosforinany (XCIII), które następnie alkilowano fenyldiazometanem. Powstałe z każdego związku XCIIIa i XCIIIb dwie pary izomerycznych triestrów XCIVa i XCIVd rozdzielono chromatograficznie i analizowano za pomocą spektrometrii masowej. I tak produkt reakcji cis-XCII z wodorkiem sodowym oraz  $[{}^{18}\text{O}]$ -benzaldehydem, XCIII poddany alkilowaniu za pomocą fenyldiazometanu utworzył dwa diastereoizomeryczne triestry – jeden z aksjalnie usytuowaną w stosunku do pierścienia dioksafosforianowej grupą benzyloksy- ( $\delta_{31\text{P}} - 7.45$  ppm, XCIVa) oraz drugi z ekwatorialnie zorientowaną grupą benzyloksy- ( $\delta_{31\text{P}} - 5.44$  ppm, XCIVb). Związek XCIVa w wyniku fragmentacji masowej uległ rozpadowi do jonu  $\text{M-C}_7\text{H}_6\text{O}^+$ ,  $m/z = 138$  co oznaczało, że izotop  ${}^{18}\text{O}$  został wbudowany w produkt XCIVa, jak i w



XCIIIa w pozycję ekwatorialną. Wniosek ten popierał zarazem wynik fragmentacji masowej związku XCIVb – w jego widmie masowym występował  $M-C_7H_6O^+$ ,  $m/z$  136 (Ryc. 29). Analogiczna analiza pary związków XCIVc i XCIVd otrzymanej w wyniku benzylowania związku XCIIIb wykazała, że konwersja PN→PO przebiega z około 90% retencją konfiguracji na atomie fosforu. Uogólniając ten wynik autorzy mogli postulować przyjęcie absolutnej konfiguracji Sp dla cyklicznego 3',5'-[ $^{18}O$ ]-fosforanu adenozyiny tworzącego się w wyniku reakcji (Rp)-cyklicznego 3',5'-anilidofosforanu N<sup>6</sup>,N<sup>6</sup>,O<sup>2</sup>-tribenzoilo-adenozyny z NaH/[ $^{18}O$ ]-C<sub>6</sub>H<sub>5</sub>CHO (74).



Ryc. 29. Oznaczenie konfiguracji absolutnych [ $^{18}O$ ]-2-hydroksy-2-okso-4-metylo-1,3,2-dioksafo-sforinanów (XCIIIa i XCIIIb); produkty XCIVa–XCIVb powstałe po reakcji związków XCIIIa i XCIIIb z PhCHN<sub>2</sub> identyfikowano za pomocą spektrometrii masowej (9).

#### IV. Uwagi końcowe

Przedstawiony powyżej przegląd metod syntezy oraz stereochemicznej analizy P-chiralnych fosforanów ze szczególnym uwzględnieniem fosforanów nukleozydów, stanowi, zdaniem autora, istotne uzupełnienie poprzedniego opracowania dotyczącego wykorzystania tego typu połączeń do badań mechanizmów enzymatycznego przenoszenia grupy fosforanowej lub nukleotydylowej (75). Metoda stereochemiczna, obok rentgenografii strukturalnej, dostarcza najpewniejszych dowodów na udział bądź brak udziału kowalencyjnego kompleksu enzym-substrat w przebiegu reakcji enzymatycznej.

W wielu przypadkach jest to jedyna metoda uzyskania informacji o naturze oddziaływań pomiędzy centrum aktywnym enzymu i substratem fosforanowym. Posiada to szczególną wymowę z uwagi na wagę jaką enzymatyczne reakcje przeniesienia grup fosforanowych spełniają w metabolizmie żywych organizmów.

*Autor dziękuje Pani Prof. dr hab. Zofii Zielińskiej i Panu Prof. dr hab. Wojciechowi J. Stecowi za pomoc przy opracowaniu artykułu.*

*Artykuł otrzymano 4 grudnia 1986 r.*

*Zaakceptowano do druku 7 września 1987 r.*

#### PIŚMIENNICTWO:

1. Eckstein F., (1983), *Angew. Chem. Int. Ed.*, **22**, 423–439.
2. Knowles R.R., (1980), *Ann. Rev. Biochem.*, **49**, 877–919.
3. Westheimer F.H., (1981) w: *Rearrangement in Ground and Excited States*, red. de Mayo P., t. 2, str. 229–241; Academic Press, New York.
4. Westheimer F.H., (1968), *Accts. Chem. Res.*, **1**, 70–87.
5. Miller R.S., Chandrasegaran S., Dow D.L., Pulford S.H., Kan L.J. (1982), *Biochemistry*, **21**, 5468–5473.
6. Jovin T.M., McIntosh L.P., Arndt-Jovin D.J., Zarling D.A., Robert-Nicoud M., (1983), *J. Biomolecular Structure and Dynamics*, **1**, 21–57.
7. Cosstick R., Eckstein F., (1985), *Biochemistry*, **24**, 3630–3638.
8. Frey P.A., (1982), *New Comp. Biochem.*, **3**, 210–215.
9. Baraniak J., Lesiak K., Sochacki M., Stec W.J., (1980), *J. Amer. Chem. Soc.*, **102**, 4533–4534.
10. Gerlt J.A., Coderre J.A., (1980), *J. Amer. Chem. Soc.*, **102**, 4531–4533.
11. Abbott S.J., Jones S.R., Weinman S.A., Knowles J.R., (1978), *J. Amer. Chem. Soc.*, **100**, 2558–2560.
12. Lowe G., Cullis P.M., Jarvest R.L., Potter B.V.L., Sproat B.S., (1981), *Phil. Trans. Roy. Soc. Lond. B*, **293**, 75–92.
13. Abbott S.A., Jones S.R., Weinman S.A., Backhof F.M., McLafferty F.W., Knowles J.R., (1979), *J. Amer. Chem. Soc.*, **101**, 4323–4332.
14. Eckstein F., Romaniuk P.L., Connolly B.A., (1982), *Methods Enzymol.*, **87**, 197–212.
15. Razzell W.E., (1961), *J. Biol. Chem.*, **263**, 3028–3030.
16. Hynie L., Zbarsky S.H., (1970), *Can. J. Biochem.*, **48**, 1141–1150.
17. Frey P.A., (1982), *Tetrahedron*, **38**, 1541–1567.
18. Razzell W.E., Khorana H.C., (1959), *J. Biol. Chem.*, **234**, 2105–2113.
19. Glinski R.P., Ash A.B., Stevens C.L., Sporn M.B., Lazarus M.M., (1971), *J. Org. Chem.*, **36**, 245–249.
20. Reis J.L., (1934), *Bull. Soc. Chim. Biol.*, **16**, 385–394.
21. Heppel L.A., (1961), *The Enzymes*, **5**, 49–53.
22. Landt M., Butler L.G. (1978), *Biochemistry*, **17**, 4130–4135.
23. Kelly S.J., Dardinger D.E., Butler L.G., (1975), *Biochemistry*, **14**, 4983–4988.
24. Landt M., Evererd P.A., Butler L.G., (1980), *Biochemistry*, **19**, 138–143.
25. Stec W.J., Okruszek A., Lesiak K., Uznański B., Michalski J., (1976), *J. Org. Chem.*, **41**, 227–233.

26. Zieliński W.S., Leśnikowski Z.J., Stec W.J., (1976), *J. Chem. Soc., Chem. Commun.*, 772–773.
27. Zieliński W.S., Stec W.J., (1977), *J. Amer. Chem. Soc.*, **99**, 8365–8366.
28. Gerlt J.A., Mehdi S., Coderre J.A., Rogers W.O., (1980), *Tetrahedron Lett.*, **21**, 2385–2388.
29. Burgers P.M.J., Eckstein F., Hunneman D.H., (1979), *J. Biol. Chem.*, **254**, 7476–7478.
30. Lesiak K., Stec W.J., (1978), *Z. Naturforsch.*, **33b**, 782–785.
31. Eckstein F., Goody R.S., (1971), *J. Amer. Chem. Soc.*, **93**, 6252–6257.
32. Eckstein F., Goody R.S., (1976), *Biochemistry*, **15**, 1685–1691.
33. Yee D., Armstrong V.W., Eckstein F., (1979), *Biochemistry*, **18**, 4116–4120.
34. Jaffe B.K., Cohn M., (1978), *J. Biol. Chem.*, **253**, 4823–4825.
35. Cornelius R.D., Cleland W.W., (1978), *Biochemistry*, **17**, 3279–3236.
36. Connolly B.A., Romaniuk P.J., Eckstein F., (1982), *Biochemistry*, **21**, 1983–1989.
37. Michelson A.M., (1964), *Biochim. Biophys. Acta*, **91**, 1–13.
38. Bryant F.R., Benkovic S.J., Sammons D., Frey P.A. (1981), *J. Biol. Chem.*, **256**, 5965–5966.
39. Gupta A., deBrosse C., Benkovic S.J., (1982), *J. Biol. Chem.*, **257**, 7689–7693.
40. Jaffe E.K., Nick J., Cohn M., (1982), *J. Biol. Chem.*, **257**, 7650–7653.
41. Sheu K.-F.R., Frey P.A., (1979), *J. Biol. Chem.*, **252**, 4445–4448.
42. Bartlett P.A., Eckstein F., (1982), *J. Biol. Chem.*, **257**, 8879–8892.
43. Richard J.P., Ho M.-T., Frey P.A., (1978), *J. Amer. Chem. Soc.*, **100**, 7756–7757.
44. Richard J.P., Frey P.A., (1982), *J. Amer. Chem. Soc.*, **104**, 3476–3481.
45. Burgers P.M.J., Eckstein F., (1979), *Biochemistry*, **18**, 592–596.
46. Bryant F.R., Benkovic S.J., (1979), *Biochemistry*, **18**, 2825–2829.
47. Stingelein J., Boyle D.W., Kaiser E.T., (1980), *J. Biol. Chem.*, **255**, 2022–2025.
48. Cornelius R.D., Hart P.A., Clewland W.W., (1977), *Inorg. Chem.*, **16**, 2799–2805.
49. Merritt E.A., Sundaralingam M., Cornelius R.D., Clewland W.W., (1978), *Biochemistry*, **17**, 3274–3278.
50. Burgers P.M.J., Eckstein F., (1978), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **75**, 4798–4800.
51. Saenger W., Suck, Eckstein F., (1974), *Eur. J. Biochem.*, **46**, 559–565.
52. Usher D.A., Erenrich E.S., Eckstein F., (1972), *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, **69**, 115–118.
53. Burgers P.M.J., Eckstein F., (1978), *Tetrahedron Lett.*, **19**, 3835–3838.
54. Letsinger R.L., Finnau J.M., Heavner G.A., Iunsford W.B., (1975), *J. Amer. Chem. Soc.*, **97**, 3278–3279.
55. Matteucci M.D., Caruthers M.H., (1981), *J. Amer. Chem. Soc.*, **103**, 3185–3187.
56. Marlier J.F., Benkovic S.J., (1980), *Tetrahedron Lett.*, 1121–1124.
57. Uznański B., Niewiarowski W., Stec W.J., (1982), *Tetrahedron Lett.*, **23**, 4289–4292.
58. Potter B.V.L., Eckstein F., Uznański B., (1983), *Nucleic Acid Res.*, **11**, 7087–7103.
59. Connolly B.A., Potter B.V.L., Eckstein F., Pingoud A., Grotjahn L., (1984), *Biochemistry*, **23**, 3443–3453.
60. Jarvest R.L., Lowe G., Baraniak J., Stec W.J., (1982), *Biochem. J.*, **203**, 461–470.
61. Cullis P.M., Lowe G., (1981), *J. Chem. Soc., Perkin Trans.*, **1**, 2317–2319.
62. Lowe G., Potter B.V.L., (1981), *Biochem. J.*, **199**, 227–229.
63. Lowe G., Potter B.V.L., Sproat B.S., Hull W.E., (1979), *J. Chem. Soc., Chem. Commun.*, 733–735.
64. Tsai M.-D., (1979), *Biochemistry*, **18**, 1468–1472.
65. Tsai M.-D., Huang S.C., Kozlowski J.F., Chang C.C., (1980), *Biochemistry*, **19**, 3531–3536.
66. Sammons R.D., Frey P.A., (1982), *J. Biol. Chem.*, **257**, 1138–1140.
67. Connolly B.A., Eckstein F., Fuldner H.H., (1982), *J. Biol. Chem.*, **257**, 3382–3387.

68. Lowe G., Transley G., Cullis P.M., (1982), *J. Chem. Soc., Chem Commun.*, 595–596.
69. Guga P., Okruszek A., (1984), *Tetrahedron Lett.*, **25**, 2897–2900.
70. Engels J., Schlaeger E.-J., (1977), *J. Med. Chem.*, **20**, 907–911.
71. Coderre J.A., Mehdi S., Gerlt J.A., (1981), *J. Amer. Chem. Soc.*, **103**, 1872–1874.
72. Gorenstein D.G., Rowell R., (1980), *J. Amer. Chem. Soc.*, **102**, 6165–6166.
73. Blattler W.A., Knowles J.R., (1979), *J. Amer. Chem. Soc.*, **101**, 510–511.
74. Mehdi S. Gerlt J.A., (1981), *J. Amer. Chem. Soc.*, **103**, 7018–7020.
75. Niewiarowski W., (1988), *Postępy Biochemii*, **34**,

## RECENZJE

### Jurgen Lasch

„Enzymkinetik“; Eine Einführung für Biochemiker, Mediziner, Biologen, Chemiker und Pharmaceuten; Seria „Bausteine der modernen Physiologie“. Veb Gustav Fischer Verlag Jena, 1987, 148 stron, 62 ilustracje, 18 tabel.

Książka Jurgena Lascha jest podręcznikiem kinetyki enzymatycznej, mającej wypełnić lukę między podręcznikami omawiającymi ten temat bardzo pobieżnie i obszernymi opracowaniami monograficznymi, które duża ilość rozważań teoretycznych czyni trudnym materiałem do nauki dla początkujących. Autor proponuje zwięzły opis podstaw kinetyki, koncentrujący się na przygotowaniu czytelnika do praktycznego prowadzenia badań kinetycznych. Wprowadzenie poprzedza cztery rozdziały, z których pierwszy omawia zasady kinetyki chemicznej, dwa następne poświęcone są enzymatycznej kinetyce hiperbolicznej (także enzymów wielosubstratowych) i niehiperbolicznej, charakterystycznej dla zjawisk kooperatywności i allosterii, a ostatni wprowadza w kinetykę enzymów unieruchomionych w fazie stałej, kinetykę niestacjonarną, kinetykę prestacjonarną (badaną metodami szybkiego mieszania) oraz kinetykę relaksacyjną. W rozdziale poświęconym kinetyce hiperbolicznej autor poświęca wiele miejsca kinetyce inhibicji enzymów przez inhibitory odwracalne i nieodwracalne.

Dużą zaletą omawianej pozycji jest jasność wykładu, bogato ilustrowanego rysunkami i przykładami konkretnych badań. Autor potrafił uczynić kinetykę enzymatyczną, opartą na modelowaniu matematycznym, dostępną dla czytelników posiadających podstawową tylko znajomość matematyki. Tę starannie wydaną książkę można polecić studentom i badaczom różnych dziedzin biologii, a zwłaszcza biochemii, oraz medycyny i farmakologii. Z uwagi na zupełny brak podręczników kinetyki enzymatycznej na naszym rynku, życzyć by sobie należało, aby książka J. Lascha mogła być wydana w języku polskim. Aby ocenić zapotrzebowanie na taki podręcznik warto zwrócić uwagę na fakt, że konieczność wykonywania pomiarów enzymatycznych występuje dziś zarówno w badaniach naukowych (bióchemia, fizjologia, medycyna, farmakologia) oraz w medycznych badaniach diagnostycznych, jak i w produkcji przemysłowej (biotechnologia).

*Wojciech Rode*



## SPRAWOZDANIA

W dniu 18 maja 1987 roku odbyło się w sali wykładowej im. W. Mozołowskiego w Akademii Medycznej w Gdańsku uroczyste posiedzenie Gdańskiego Oddziału Polskiego Towarzystwa Biochemicznego poświęcone pamięci honorowego członka PTBioch. prof. Włodzimierza Mozołowskiego. Zaproszonym prelegentem i Gościem Towarzystwa był prof. dr med. dr fil. Robert Ammon, emerytowany profesor z Uniwersytetu Saary w Hamburgu, RFN.

Prelekcja prof. Ammona składała się z dwóch części. W pierwszej zatytułowanej „Moje spotkania z Włodzimierzem Mozołowskim” usłyszeliśmy wspomnienia o osobistych kontaktach prof. Ammona z prof. Mozołowskim datującym się od roku 1927. Wtedy to, przed 60 laty spotkali się oni w laboratorium Ernesta Józefa Lessera jako młodzi biochemicy zaangażowani w pionierskie badania nad glikolizą i metabolizmem nukleotydów purynowych. Jeden z nich – uczeń Jakuba Karola Parnasa ze Lwowa, a drugi – współpracownik czołowych ówczesnych biochemików niemieckich zbliżyli się do siebie nader serdecznie. Tak ułożyły się dalsze losy, że Robert Ammon będąc od 1939 roku profesorem chemii fizjologicznej w Królewcu, w okresie od 1944 do 1945 roku wykładał chemię fizjologiczną w ówczesnej „Medicinische Akademie” w Gdańsku. To właśnie tę placówkę naukową, już w polskiej „Akademii Lekarskiej” objął w 1945 roku Włodzimierz Mozołowski po opuszczeniu USB w Wilnie. Osobiste i listowne kontakty pomiędzy Robertem Ammonem i Włodzimierzem Mozołowskim utrzymały się także i w latach powojennych, o czym ciekawie opowiadał prof. Ammon.

Drugą część prelekcji stanowił wykład p.t. „Naturalne trucizny w pożywieniu człowieka”. Była to interesująca opowieść o chemii i działaniu niektórych związków zawartych w naturalnych pokarmach, jak toksyny bakteryjne i mykotosyny, występujący w miodzie z kwiatów azalii i rododendronu, glukozyd andromedotoksyna (Turcja) lub tetrotoksyna i saksytoksyna z pewnych gatunków ryb i małży (Japonia). Szczególne zainteresowanie zebranych wzbudziły obserwacje współpracowników prof. Ammona poczynione w Królewcu nad tzw. „chorobą zalewową” występującą u ludzi spożywających węgorze wylawiane w Zalewie Kurońskim. Objawem tego schorzenia była mioglobinuria, ale patogenesa tego objawu nie została zidentyfikowana. Wykład zawierał ponadto wiele historycznych przykładów zatruc toksynami pokarmowymi, a także problemy związane z truciznami obecnymi we współczesnych pokarmach i używkach.

Był to pierwszy z wykładów dedykowanych pamięci profesora Włodzimierza Mozołowskiego, które to wykłady Oddział Gdański postanowił organizować corocznie.

*doc. dr hab. Wiesław Makarewicz*





SPIS TREŚCI

WSPOMNIENIE

Profesor Janina Opińska-Blauth 3

ARTYKUŁY

A. Góździcka-Józefiak, U. Karwowska – Geny genomu plastydowego, ich organizacja, struktura i transkrypcja 7

G. Korzus, B. Turyna – Proteinazy cysteinowe i ich endogenne inhibitory 23

R. Mikstacka – Rola transferaz glutationowych w inaktywacji związków kancerogen-nych 47

W. Niewirowski – Badania oddziaływań centrum aktywnego enzymu z substratem za pomocą metody stereochemicznej 59

W. Niewirowski – P-Chiralne fosforany – narzędzie do badania stereochemii enzymatycznych reakcji przeniesienia grupy fosforanowej lub nukleotydylowej 81

RECENZJE

Jurgen Lasch: Enzymkinetik (W. Rode) 115

SPRAWOZDANIA

Zebranie Gdańskiego Oddziału Polskiego Towarzystwa Biochemicznego 117

CONTENTS

OBITUARY

Professor Janina Opińska-Blauth 3

ARTICLES

- A. Goździcka-Józefiak, U. Karwowska – Genes of plastid genomes, their organization, structure and transcription (Dept. of Biopolimer Biochemistry, A. Mickiewicz University, Poznań) 7
- G. Korzus, B. Turyna – Cysteine proteinases and their endogenous inhibitors (Dept. of Clinical Chemistry and Clinic of Metabolic Diseases, Medical Academy, Kraków and Dept. of Animal Biochemistry, The Jan Zurzycki Institute of Molecular Biology, Jagiellonian University, Kraków) 23
- R. Mikstacka – The role of glutathione transferases in inactivation of carcinogenic compounds (Institute of Human Genetics, Polish Academy of Sciences, Poznań) 47
- W. Niewiarowski – A study of interaction of the active centre of enzyme with substrate by stereochemical approach (Dept. of Bioorganic Chemistry, Centre of Molecular and Macromolecular Studies, Polish Academy of Sciences, Łódź) 59
- W. Niewiarowski – P-Chiral phosphates – tools for studying the stereochemistry of the enzymatic phosphoryl – and nucleotidyl transfer (Dept. of Bioorganic Chemistry, Centre of Molecular and Macromolecular Studies, Polish Academy of Sciences, Łódź) 81

BOOK REVIEWS

Jurgen Lasch: Enzymkinetik (W. Rode) 115

REPORTS

A report of a local Meeting 117



## **Postępy Biochemii**

Prenumeratę na kraj przyjmują i informacji o cenach udzielają urzędy pocztowe i doręczyciele na wsi oraz Oddziały RSW „Prasa — Książka — Ruch” w miastach.

Prenumeratę ze zleceniem wysyłki za granicę przyjmuje RSW „Prasa — Książka — Ruch”, Centrala Kolportażu Prasy i Wydawnictw, ul. Towarowa 28, 00-958 Warszawa, konto NBP XV Oddział w Warszawie Nr 1153-201045-139-11. Wysyłka za granicę pocztą zwykłą jest droższa od prenumeraty krajowej o 50% dla zleceniodawców indywidualnych i o 100% dla zlecających instytucji i zakładów pracy.

### **Terminy przyjmowania prenumerat na kraj i za granicę:**

- do dnia 10 listopada na I półrocze roku następnego i na cały rok następny,
- do dnia 1 czerwca na II półrocze roku bieżącego.

Bieżące i archiwalne numery można nabyć lub zamówić we Wzorcowni Ośrodka Rozpowszechniania Wydawnictw Naukowych PAN, Pałac Kultury i Nauki, 00-901 Warszawa.

Subscription orders for all the magazines published in Poland available through the local press distributors or directly through the

Foreign Trade Enterprise

**ARS POLONA**

00-068 Warszawa, Krakowskie Przedmieście 7, Poland

Our bankers:

**BANK HANDLOWY WARSZAWA S.A.**

Postępy Biochemii, 34, z. 1—2, s. 1—120

**Indeks 36969**