

POLSKA AKADEMIA NAUK  
INSTYTUT CHEMII ORGANICZNEJ  
ZAKŁAD STEREOCHEMII PRODUKTÓW NATURALNYCH

SYNTEZA, STRUKTURA I WŁASNOŚCI  
TRANSFEROWYCH  
KWASÓW RYBONUKLEINOWYCH

(Oddziaływanie tRNA z enzymami, izolacja  
rzadkich nukleozydów, chemiczna synteza  
i rozdział kwasów nukleinowych)

MATERIAŁY KONFERENCJI NAUKOWEJ W POZNANIU  
W LISTOPADZIE 1972 ROKU

POZNAŃ 1976

KIEROWNIK NAUKOWY

Maciej Wiewiórowski

REDAKTORZY NAUKOWI

Kazimierz Grześkowiak

Jacek Stawiński

WYDAWNICTWO NAUKOWE UNIWERSYTETU IM. ADAMA MICKIEWICZA W POZNANIU

Wydanie I. Nakład 200+80 egz.  
Papier włkłodruk., V kl., 65 g  
Zamówienie 102/74/75/76-F-4/861a

Ark. wyd. 17,25, ark. druk. 13,75  
Oddano do druku w listopadzie 1974  
Druk ukończono w maju 1976

Wykonano w ZAKŁADZIE GRAFICZNYM UAM, Poznań, Al. Stalingradzka 1

Spis ośrodków, których pracownicy uczestniczyli  
w Seminariach Naukowych w Poznaniu w 1972/73 r.

1. Uniwersytet im. A. Mickiewicza w Poznaniu - Instytut Chemii
2. Uniwersytet im. A. Mickiewicza w Poznaniu - Międzyuczelniany Instytut Biochemii
3. Instytut Chemii Organicznej PAN w Poznaniu
4. Akademia Medyczna w Poznaniu
5. Zakład Genetyki Roślin PAN w Poznaniu
6. Akademia Rolnicza w Poznaniu - Międzyuczelniany Instytut Biochemii
7. Instytut Biochemii i Biofizyki PAN w Warszawie
8. Uniwersytet Warszawski - Katedra Biofizyki
9. Politechnika Łódzka - Instytut Chemii Organicznej
10. Wojskowa Akademia Medyczna w Łodzi

Spis treści, który zawiera:  
w Skierunkach naukowych i specjalnościach

1. Uniwersytet im. A. Mickiewicza w Poznaniu - Instytut Biologii
2. Uniwersytet im. A. Mickiewicza w Poznaniu - Instytut Fizyki
3. Instytut Górnictwa i Geologii w Katowicach
4. Instytut Matematyki w Warszawie
5. Instytut Fizyki w Warszawie
6. Instytut Fizyki w Warszawie
7. Instytut Fizyki w Warszawie
8. Instytut Fizyki w Warszawie
9. Instytut Fizyki w Warszawie
10. Instytut Fizyki w Warszawie

## WSTĘP

Zrozumienie kolejnych etapów procesu przekazywania informacji genetycznej otwiera przed nauką wiele nowych perspektyw, opartych o możliwość bezpiecznego, planowego ingerowania w strukturę kodu genetycznego.

Realizując to trudne zadanie trzeba pokonać wiele problemów, które potrafimy już sformułować i wiele innych, które się dopiero pojawią.

Obecnie konieczne jest poznanie przestrzennej struktury kwasów nukleinowych w roztworze, ich oddziaływań z enzymami, które to zjawiska odgrywają dużą rolę w czytaniu i tłumaczeniu kodu genetycznego. Ze względu na skomplikowany charakter zagadnienia, konieczne jest przeprowadzanie wielu reakcji na układach modelowych z użyciem fragmentów kwasów nukleinowych. Stąd też duża rola syntetycznych polinukleotydów w tego typu badaniach.

Konferencja Naukowa w Zielonce w 1971 roku miała na celu zapoznanie członków zespołów zajmujących się syntezą i biochemią kwasów nukleinowych, z bogatą literaturą poświęconą tym problemom. Wielka ilość prac ukazujących się co roku z zakresu chemii kwasów nukleinowych, skłoniła organizatorów do kontynuowania tego typu prezentacji materiału literaturowego.

Niniejszy tom obejmuje cykl referatów wygłoszonych w 1972/73 roku na ogólnopolskich seminariach zorganizowanych przez Zespół Problemowy Syntezy i Fotochemii Kwasów Nukleinowych Instytutu Chemii UAM i Zakład Stereochemii Produktów Naturalnych Instytutu Chemii Organicznej PAN w Poznaniu. Zawarte artykuły, których autorami są pracownicy wspomnianych Zakładów, są kontynuacją materiałów Konferencji Naukowej w Zielonce z listopada 1971 roku pt. Synteza, struktura i własności transferowych kwasów rybonukleinowych (tom I), które ukazały się w Wydawnictwie Naukowym Uniwersytetu im. A. Mickiewicza w Poznaniu w 1972 roku.

Wśród artykułów obecnego tomu II, dotyczących oddziaływania tRNA z enzymami, chemicznej syntezy polinukleotydów, itp., znajduje się jeden obszerny artykuł przeglądowy, nie związany tematycznie z pozostałymi, a poświęcony chromatografii powinowactwa (A. Rafalski, J. Barciszewski).

Chromatografia powinowactwa jest metodą niezwykle obiecującą w frakcjonowaniu enzymów, kwasów nukleinowych i innych związków bioorganicznych. Ze względu na charakter poruszanych w nim problemów, wydawało się celowe włączenie tego referatu do niniejszego tomu.

WSTĘP

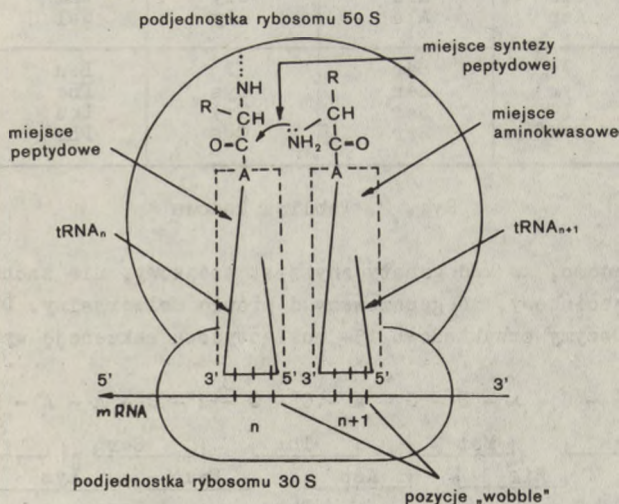
Wstęp do książki poświęcony jest omówieniu najważniejszych zagadnień z zakresu fizyki. W tym celu w pierwszej części omówiono podstawowe pojęcia i definicje, a następnie przebiegają one przez kilka rozdziałów poświęconych omówieniu różnych zagadnień z fizyki. W tym celu w drugiej części omówiono zagadnienia z fizyki, a następnie przebiegają one przez kilka rozdziałów poświęconych omówieniu różnych zagadnień z fizyki.

## BADANIE STRUKTURY KODU GENETYCZNEGO

### Streszczenie

Jednym z fascynujących zjawisk przyrody jest kod genetyczny - szyfr kierujący syntezą białka na poziomie komórkowym. W ostatnim dziesięcioleciu poznano już wszystkie słowa kodu, ale jego głębiej pojęta struktura i zasada działania pozostaje nadal sprawą niejasną. Ten przegląd, to konfrontacja dwóch różnych metod badania struktury kodu: analitycznych rozważań opartych często na obliczeniach oraz doświadczalnego badania aktywności zmodyfikowanych słów kodu.

Termin kod genetyczny lub kod aminokwasowy odnosi się do biologicznej syntezy białek i można go zdefiniować jako zależność między nukleotydową sekwencją mRNA a sekwencją aminokwasową odpowiednich polipeptydów. Nie ma jednak bezpośredniej biochemicznej zależności między kodonem w mRNA, a aminokwasem. Rolę pośrednika, a zarazem tłumacza na język aminokwasowy spełnia cząsteczka tRNA.



Ryc. 1. Rola tRNA w procesie translacji informacji genetycznej

tRNA spełnia zatem dwie specyficzne funkcje: szyfrowanie aminokwasu i rozpoznawanie kodonu. Te dwie funkcje to jednocześnie dwa fundamentalne problemy w badaniach kodu genetycznego. Można więc stwierdzić z pewnym



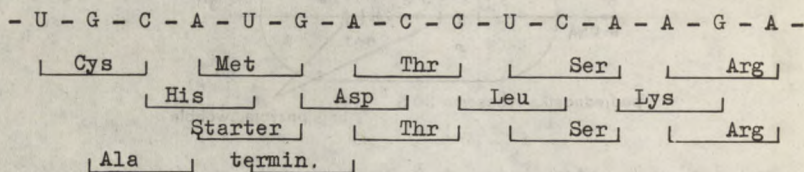
uproszczeniem, że translacja informacji genetycznej polega na wzajemnym oddziaływaniu czynnika aminokwasowego z czynnikiem nukleotydowym za pośrednictwem silnie zmodyfikowanego czynnika nukleotydowego jakim jest cząsteczka tRNA. Proces translacji odbywa się na rybosomie, czynnika mieszanym, aminokwasowo-nukleotydowym.

Od historycznego doświadczenia Nirenberga i Matthei, które umożliwiło bezpośrednie zaatakowanie problemu kodu genetycznego, do opublikowania pierwszej wersji kodu, upłynął zaledwie rok. W ciągu następnych kilku lat kod był systematycznie uzupełniany i obecnie podawana jest następująca tablica kodowa.

X	Y				Z
	A	C	G	U	
A	Liz Asn Liz Asn	Tre Tre Tre Tre	Arg Ser Arg Ser	Ileu Ileu Met Ileu	A C G U
C	Gln His Gln His	Pro Pro Pro Pro	Arg Arg Arg Arg	Leu Leu Leu Leu	A C G U
G	Glu Asp Glu Asp	Ala Ala Ala Ala	Gly Gly Gly Gly	Wal Wal Wal Wal	A C G U
U	? Tyr ? Tyr	Ser Ser Ser Ser	? Cys Try Cys	Leu Phe Leu Phe	A C G U

Ryc. 2. Tablica kodowa

Obecnie wiadomo, że kod genetyczny jest trójkowy, nie zachodzący na siebie, bezprzecinkowy, zdegenerowany i prawie uniwersalny. Dla poparcia tych cech rozważymy przykładowo 15-nukleotydową sekwencję wyciętą z mRNA.



Ryc. 3. Analiza własności kodujących fragmentu mRNA

Jeśli pierwsze trzy litery wyciętej sekwencji obrazują pełny kodon (kodon w fazie) to ten wycinek mRNA posiada odpowiednik w pentapeptydzie

-Cys-Met-Tyr-Ser-Arg. Jeżeli dwie pierwsze litery są częścią poprzedzającego kodonu to przedstawiona sekwencja odpowiada tetrapeptydowi -His-Asp-Leu-Liz. Gdy pierwsza litera jest ostatnią literą poprzedzającego kodonu to wybrana sekwencja koduje tylko jeden aminokwas - Ala -, ponieważ po kodonie alaniny następuje kodon terminator i brak jest po nim kodonu inicjującego. Jest również możliwe, że przykładowa sekwencja będzie częścią regionu inicjującego syntezę białka. W tym przypadku możliwe jest czytanie jako f-Met-Thr-Ser-Arg.

Jeżeli przyjrzymy się bliżej kodowi genetycznemu to okazuje się, że:

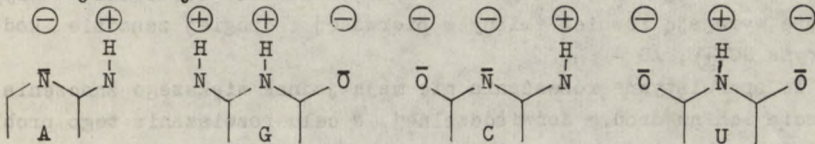
1. 61 trypletów spośród 64 możliwych wykazuje zdolność kodowania aminokwasów, natomiast trzy tryplety UAG, UAA, UGA nie kodują żadnego aminokwasu, ale w biosyntezie białka spełniają rolę terminatorów.

2. Trzy aminokwasy (seryna, leucyna i arginina) kodowane są każdy sześcioma trypletami. Pięć aminokwasów (walina, prolina, treonina, alanina i glicyna) posiada po cztery tryplety. Każdy z dziewięciu aminokwasów (fenyloalanina, tyrozyna, histydyna, glutamina, asparagina, lizyna, kwas asparaginowy, kwas glutaminowy, cysteina), jest kodowany dwoma trypletami. Dwa aminokwasy: metionina i tryptofan posiadają po jednym tryplecie. Dane te wskazują na silną degenerację kodu, gdyż jednemu aminokwasowi może odpowiadać kilka kodonów różniących się nie tylko w trzeciej literze.

3. Każdy z dziewięciu aminokwasów kodowanych dwoma trypletami ma kodony zawierające na trzeciej pozycji albo dwie puryny (A lub G), albo dwie pirymidyny (U lub C). Innymi słowy, jeśli jakiś aminokwas jest kodowany trypletami XYU, kodowany jest również trypletem XYC. Podobnie jeśli aminokwas jest kodowany trypletem XYA to kodowany jest również trypletem XYG.

4. Charakterystyczna jest również struktura kodonów terminujących. W każdym przypadku zaczynają się one na U mając na drugiej i trzeciej pozycji dwie puryny (ale nie dwie guanozyny). Układ uracylu z dwoma purynami posiada więc własności odróżniające go zdecydowanie od innych trypletów. Posiada strukturę nie mogącą oddziaływać z żadnym z istniejących antykodonów.

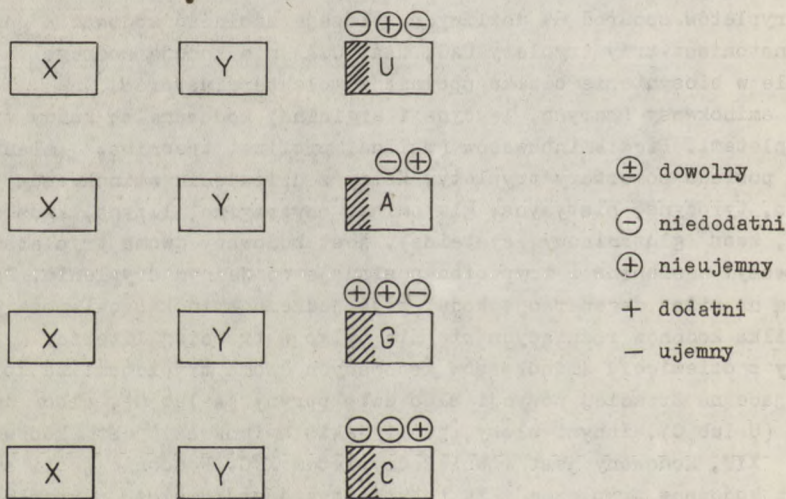
Jeżeli ten sam aminokwas jest kodowany kilkoma trypletami to te tryplety prawdopodobnie są do siebie podobne. Ale na czym to podobieństwo polega, jakie własności układu trzech zasad wpływają na to podobieństwo? Podjęto interesującą próbę powiązania kodonu genetycznego ze strukturą elektronową kodujących trypletów. Poszczególnym grupom atomów zasad kodowanych przypisano odpowiednie ładunki. Wynikają one z obliczeń gęstości elektronowych dla pojedynczych zasad, ale potwierdzane są wynikami uzyskanymi dla trójnukleotydów.



Ryc.4. Rozkład ładunków na atomach uczestniczących w wiązaniu wodoro-

wym

W wiązaniu wodorowym kodonu z antykodonom uczestniczą przedstawione na schemacie atomy zasad purynowych i pirymidynowych, gdzie dwie kropki przy atomie oznaczają wolną parę elektronową, a dwie kropki między atomami oznaczają dwuelektronowe wiązanie sigma. Na podstawie analizy struktury elektronowej zasad wchodzących w skład kodonów przypisano poszczególnym aminokwasom uproszczone tryplety. Zasadniczą ideą tego uproszczonego modelu jest rozpatrywanie obok dwóch pierwszych zasad, jedynie ładunku w pierwszym położeniu trzeciej zasady.



Ryc. 5. Schemat przedstawiający istotę uproszczenia Fragi i Waldemoro

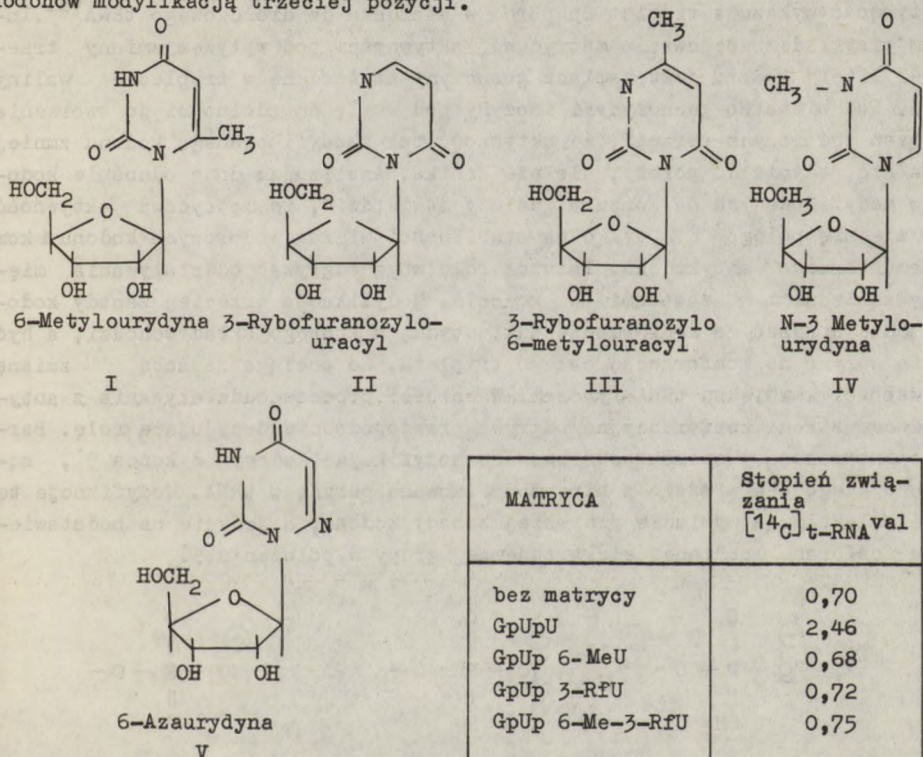
Okazuje się, że prawie wszystkie aminokwasy można jednoznacznie określić, podając dwie pierwsze litery trypletów oraz symbol określający ładunek w pierwszym położeniu trzeciej litery kodonu.

W ten sposób dwóm aminokwasom posiadającym tylko po jednym kodonie (metionina, tryptofan), odpowiada ładunek dodatni w pierwszej pozycji trzeciej litery kodonu. Aminokwasom posiadającym po dwa kodony zakończone pirymidyną do jednoznacznego ich określenia wystarcza ładunek ujemny na pierwszej pozycji trzeciej litery. W przypadku aminokwasów kodowanych czterema trypletami ładunek ten może być dowolny.

Trzech aminokwasów nie udaje się określić takim uproszczonym trypletem. Są to arginina, leucyna i seryna, kodowane sześcioma trypletami, które wymagają również zmiany w pierwszej i drugiej zasadzie kodonu np. seryna UC  $\oplus$ , AG -

Te spekulatywne rozważania nie mają jednak większego znaczenia bez poparcia ich na drodze doświadczalnej. W celu rozwiązania tego problemu należałoby zbudować szereg alternatywnych modeli i sprawdzić ich aktywność

w procesie wiązania z antykodonem. W ostatnich latach ukazało się kilka prac (4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11), których autorzy referują syntezę i własności kodujące analogów trójnukleotydów, różniących się od naturalnych kodonów modyfikacją trzeciej pozycji.



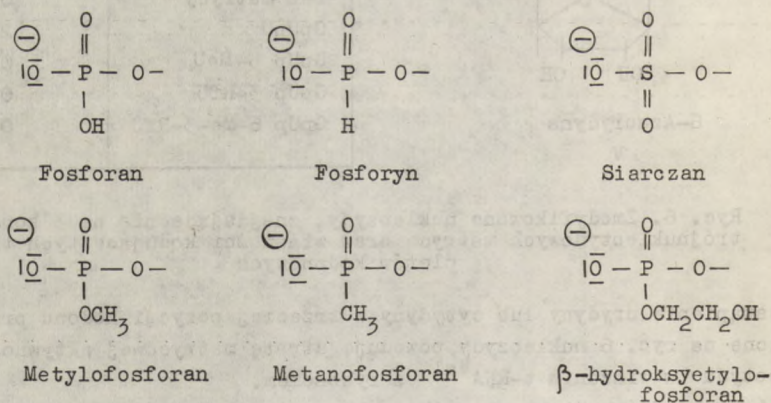
Ryc. 6. Zmodyfikowane nukleozydy, znajdujące się na 3'końcu trójnukleotydowych matryc oraz własności kodujące tych trypletów kodonowych

Zastąpienie urydyny lub cytydyny w trzeciej pozycji kodonu przez przedstawione na ryc. 6 nukleozydy, powoduje utratę matrycowej aktywności oligonukleotydu w wiązaniu t-RNA<sup>Val</sup> z rybosomem.

Zmiana konformacji w przypadku nukleozydu (I), jak również zmiana systemu heterocyklicznego w nukleozydach (II i III) w stosunku do urydyny są więc odczuwalne podczas syntezy białek "in vitro". W przypadku 6-metylourydyny (I) przyczyn nieaktywności można się doszukać we wspomnianej zmianie konformacji nukleozydu, ponieważ te części zasady, które uczestniczą w komplementarnym parowaniu N-H i C=O pozostały niezmienione.

Również zastąpienie cytydyny i urydyny przez ich 6-aza analogi prowadzi do utraty matrycowej aktywności. Tutaj interesujący jest fakt, że trzecia litera kodonu jest naprzeciw inozyny w pierwszej literze antykodonu tRNA. Inozyna jest jak wiadomo bardzo tolerancyjną zasadą, jeśli cho-

dzi o możliwość parowania z trzecią literą kodonu, jednak w stosunku do tych analogów pozostaje bierna. Znacznie mniej jest przykładów wzrostu aktywności matrycowej, po modyfikacji trzeciej litery kodonu. Zwiększoną aktywność wykazuje tryplet GpUpBrU w stosunku do drożdżowego tRNA<sup>val</sup>. Innym przykładem zachowania matrycowej aktywności pod wpływem zmiany trzeciej litery kodonu jest zamiana guanozyny na inozynę w tryplecie waliny GUG. Podobieństwo guanozyny i inozyny pod względem zdolności do tworzenia wiązań wodorowych sprawia, że aktywność tak zmodyfikowanego kodonu zmniejsza się jedynie do połowy, ale nie zanika. Analizując dane odnośnie kodonów modyfikowanych na końcu 3' należy stwierdzić, że matrycowa aktywność wydaje się polegać nie tylko na stabilności wiązań wodorowych kodonu i komplementarnego antykodonu. Istotną rolę mogą odgrywać oddziaływania między sąsiednimi zasadami w kodonie. Modyfikacja trzeciej zasady kodonu może wpływać na konformację nukleotydu, w którego skład wchodzi, a być może wpływa na konformację całego trypletu, co pociąga za sobą zmianę trwałości kompleksu tRNA-rybosom. W całości procesu oddziaływania z antykodonom strona konformacyjna odgrywa prawdopodobnie decydującą rolę. Bardzo interesujący efekt zaobserwowano modyfikując kodony od końca 5', sąsiadującego jak wiadomo z hipermodyfikowaną puryną w tRNA. Modyfikacje te nie polegały na wymianie pierwszej zasady kodonu, a jedynie na podstawieniu fosforanu lub innej elektroujemnej grupy w położeniu 5':



Ryc. 7. Grupy podstawione w końcu 5' matryc dwu i trójnukleotydocyowych

Badano wpływ podstawienia w końcu 5' na matrycową aktywność, czyli na zdolność wiązania tRNA do rybosomów. Uzyskano dane odnośnie aktywności serii zmodyfikowanych oligonukleotydów, stanowiących kodony dla waliny, alaniny, kwasu glutaminowego, kwasu asparaginowego, seryny i argininy. Wykazano, że oligonukleotyd pGpUpU posiada znacznie wyższą aktywność w wiązaniu tRNA do rybosomów aniżeli kodon waliny GpUpU. Aby wyjaśnić mechanizm tego efektu zsyntetyzowano kilka innych 5' podstawionych pochodnych

GpUpU, zawierających obojętne i ujemnie naładowane podstawniki. Wprowadzenie obojętnej 5' acetylowej grupy do kodonowego trypletu waliny GpUpU, nie zmienia jego aktywności. Z drugiej strony, 5' podstawienie resztą kwasu fosforowego, zwiększa aktywność matrycową w wyraźny sposób. Aby wyeliminować specyficzny efekt grup fosforanowych, jeśli taki istnieje, rozpatrywano również inne podstawniki, które nie zawierają wiązania fosforoestrowego.

MATRYCA	Stopień związania [ $^{14}\text{C}$ ] tRNAval		
	p mole	$\Delta$ p mole	%
bez matrycy	0,37	-	-
GpUpU	2,97	2,42	100
pGpUpU	6,15	5,78	230
piGpUpU	4,95	4,58	194
Metylo GpUpU	3,65	3,28	136
Metano p GpUpU	3,29	2,92	119
sulf GpUpU	3,79	3,42	141
HO-Et pGpUpU	4,47	4,10	170
AcGpUpU	2,82	2,35	97

Ryc. 8. Tablica własności kodujących matryc trójnukleotydowych zmodyfikowanych na końcu 5'

Pochodna 5'-O-siarczanowa (sulf GpUpU), która jest analogiczna z 5'-O-fosforynem (pi GpUpU), zawiera tylko jeden ładunek ujemny i wykazuje większą aktywność matrycową niż GpUpU. Z tych doświadczeń wynikałoby, że obecność jednego dodatkowego ładunku jest wystarczająca, aby podnieść aktywność matrycy. Badanie dwóch następnych podstawników nie potwierdziło tych przypuszczeń. Oligonukleotydy zawierające na końcu 5' metylofosforan i metanofosforan wywierają bardzo mały wpływ na aktywność matrycową.

Aby wytłumaczyć znikomy wpływ tych grup, które jednak zawierają ładunek ujemny, zaproponowano dwie możliwości:

1. przeszkody steryczne spowodowane objętością grupy metylowej
2. własności hydrofobowe tej grupy

W celu sprawdzenia tych możliwości zbudowano nowy model zawierający na końcu 5'  $\beta$ -hydroksyetylofosforan. Podstawnik ten zawiera ładunek ujemny i objętościową, ale nie hydrofobową grupę  $\beta$ -hydroksyetylową. W tym przypadku zaobserwowano znaczny wzrost aktywności matrycy.

W świetle dotąd przedstawionych faktów wydawałoby się że do odczytywania kodonu przez antykodon niezbędne są wszystkie trzy zasady kodonu. Stwierdzono jednak, że aktywność matrycową posiadają również pierwsze dwie litery kodonu (tzw. dublety kodonowe), ale warunkiem jest występowanie ładunku ujemnego na końcu 5'.

MATRYCA	Stopień związania [ $^{14}\text{C}$ ] tRNA val		
	p mole	$\Delta$ p moli	%
bez matrycy	0,41	-	-
GpU	0,29	-0,12	-
pGpU	1,33	0,92	100
piGpU	0,97	0,56	61
sulf GpU	1,07	0,66	72
Metylo pGpU	0,43	0,02	-
Metano pGpU	0,37	-0,04	-
HOEt-pGpU	0,92	0,51	55
AcGpU	0,38	-0,03	-
GpUpU	2,76	2,35	255

Ryc. 9. Tablica własności kodujących matryc dwunukleotydomodowych zmodyfikowanych na końcu 5'

Dwunukleozydomonofosforan GpU stanowiący dwie pierwsze litery kodonu waliny nie wykazuje żadnej aktywności. W przypadku dubletów wzrost aktywności spowodowany 5'-O-fosforylacją nie jest wystarczająco duży, aby wyrównać utratę oddziaływań zasada-zasada, ale ich aktywność matrycowa jest godna uwagi.

Stwierdzono również, że dublet pUpC zawierający dwie litery kodonu seryny wykazuje aktywność matrycową podobnie jak 5'fosforan dubletu kodonowego alaniny. Walina, seryna i alanina są aminokwasami kodowanymi przez przynajmniej 4 tryplety, gdzie trzecią pozycję kodonu może zajmować dowolna z czterech zasad. Zbadano więc dla porównania układy, w których decydującą rolę w rozpoznawaniu odgrywa 3-cia litera. Dla kwasu glutaminowego i asparaginowego stwierdzono, że nie następuje wzrost aktywności po 5'-O-fosforylacji pełnego kodonu, a 5'-O-fosforany dubletów kodonowych nie wykazują żadnej aktywności. Podobnie we wszystkich zbadanych układach fosforylacja w pozycji 3' kodonu (w pozycji wobble) nie prowadzi do wzrostu matrycowej aktywności, a nawet ją obniża.

Z dużym prawdopodobieństwem sądzi się, że wpływ opisanych wyżej podstawników w pozycji 5' da się sprowadzić do oddziaływań natury elektrostatycznej. Ten dodatkowy ładunek elektryczny, odgrywający tak istotną rolę, musi oddziaływać z ładunkiem dodatnim zlokalizowanym gdzieś w kompleksie kodon-ribosom-tRNA. Brak efektu ze strony 3'fosforanowych matrycy jest dogodnym argumentem na poparcie tezy, że ładunek dodatni jest precyzyjnie zlokalizowany w okolicy 5' końca kodonu albo w cząsteczce tRNA, albo w rybosomie.

## Literatura

- [1] J u k e s H. Thomas, G a t h i n L.; Progress in Nucleic Acid Research and molecular Biology, 11, (1971), 307.
- [2] F r a g a S., W a l d e m o r o C.; Structure and Bonding, vol. IV; Springer Verlag, Berlin 1968, s. 1 za W. Kołosem, Kwantowe Teorie w chemii i biologii, W-HAN, 1971, s. 149.
- [3] P u l l m a n A., P u l l m a n B.; Soc. Chim. France, 594, 1959. za W. Kołosem, Kwantowe teorie w chemii i biologii, W-HAN, (1971), s. 121.
- [4] G r u n b e r g e r D., H o l y A., S o r m F.; Biochimica et Biophysica Acta 149, (1967), 246.
- [5] G r u n b e r g e r D., H o l y A., S o r m F.; ibid. 152, (1968), 439.
- [6] L i s y V., S k o d a J., R y c h l i k, S m r t J., H o l y A., S o r m F.; Collection Czechoslov. Chem. Comm., Vol. 33(1968), 4111.
- [7] G r u n b e r g e r D., H o l y A., S m r t J., S o r m F.; ibid., Vol. 32, (1968), 3858.
- [8] H o l y A., G r u n b e r g e r D., S o r m F.; Biochimica et Biophysica Acta, 217, (1970), 332.
- [9] H o l y A., S o r m F.: Collection Czechoslov. Chem. Comm., Vol. 36, (1971), 3282.
- [10] G a s s e n H.G.; HEBS Letters, Vol. 14, (1971), 225.
- [11] H o l y A.; Collection Czechoslov. Chem. Comm. 37, (1972), 592.



LITERATURE

[1] J. K. H. Thomas, *Journal of Biological Chemistry*, **11**, 1937, 307.

[2] F. G. A. Stone, *Journal of Biological Chemistry*, **11**, 1937, 307.

[3] P. J. Flory, *Journal of Biological Chemistry*, **11**, 1937, 307.

[4] G. V. Schulz, *Journal of Biological Chemistry*, **11**, 1937, 307.

[5] H. A. Scheraga, *Journal of Biological Chemistry*, **11**, 1937, 307.

[6] A. S. D. Khalil, *Journal of Biological Chemistry*, **11**, 1937, 307.

[7] H. A. Scheraga, *Journal of Biological Chemistry*, **11**, 1937, 307.

[8] H. A. Scheraga, *Journal of Biological Chemistry*, **11**, 1937, 307.

[9] H. A. Scheraga, *Journal of Biological Chemistry*, **11**, 1937, 307.

[10] H. A. Scheraga, *Journal of Biological Chemistry*, **11**, 1937, 307.

[11] H. A. Scheraga, *Journal of Biological Chemistry*, **11**, 1937, 307.

Piotr Barczyński, Włodzimierz Krzyżosiak

## KOD GENETYCZNY - ODDZIAŁYWANIA KODON - ANTYKODON

### Streszczenie

W artykule przedstawiono w sposób syntetyczny wyniki prac dotyczących natury oddziaływań kodonu z antykodonom oraz przegląd hipotez dotyczących reguł parowania.

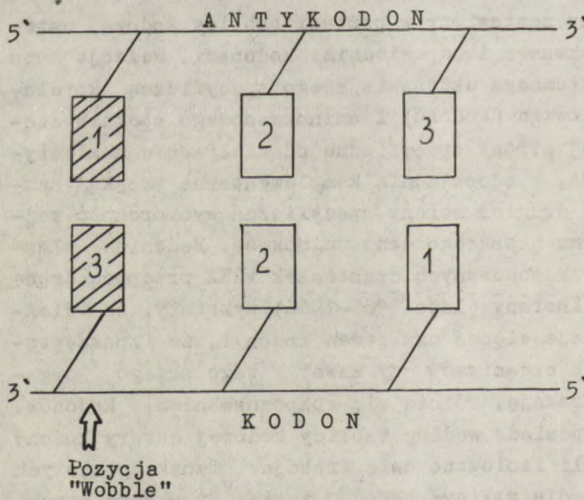
Aminokwasowy kod genetyczny zestawiony w postaci tablicy kodowej ustala relację między danym aminokwasem i odpowiednimi kodonami. Relacja ta nie jest bezpośrednia. Rolę tłumacza ustanawiającego specyficzną korelację terminów języka nukleotydowego (kodonu) i aminokwasowego spełnia cząsteczka tRNA. Jest to z jednej strony specyficzne oddziaływanie nukleotydowej trójki antykodonu w tRNA, z odpowiednią komplementarną trójką nukleotydową kodonu w mRNA, a z drugiej strony specyficzna wybiórczość tejże cząsteczki tRNA wobec enzymu niosącego dany aminokwas. Badania własności kodujących czystych frakcjonowanych cząsteczek tRNA przeprowadzone w laboratoriach Nirenberga i Khorany (lata 1965-1966) wykazały, że większość cząsteczek tRNA rozpoznaje więcej niż jeden kodon i, że izoakceptorowe cząsteczki tRNA z różnych organizmów czy nawet z tego samego organizmu, lecz stanowiące inną frakcję, różnią się rozpoznawaniem kodonów. Na przykład aminokwas walina posiada według tablicy kodowej cztery kodony GUU, GUC, GUA i GUG. Z *E. Coli* izolowano dwie frakcje izoakceptorowych cząsteczek tRNA specyficznych dla waliny: tRNA<sup>Val</sup><sub>I</sub> i tRNA<sup>Val</sup><sub>II</sub>, które rozpoznawały kodony odpowiednio GUU, GUA i GUG oraz GUU i GUC. Podobnie z drożdży izolowano dwie frakcje tRNA specyficznych dla waliny: tRNA<sup>Val</sup><sub>1</sub> i tRNA<sup>Val</sup><sub>2</sub>, które różniły się rozpoznawaniem kodonów (rozpoznając odpowiednio GUU, GUC i GUA oraz GUG) (tablica I).

Tablica I

Przykłady rozpoznawania kodonów przez różne frakcje izoakceptorowych tRNA (1)

Frakcja tRNA	Kodony	Antykodony
Val I (drożdże)	GUU	IAC
Val 2 ( <i>E.coli</i> )	GUC	GAC
Val 1 ( <i>E.coli</i> )	GUA	aco UAC
Val II (drożdże)	GUG	CAC

Zebrany materiał doświadczalny pozwolił ustalić, że pojedyncza cząsteczka tRNA jest zdolna rozpoznawać dwa, a nawet trzy różne kodony, ale takie, które różnią się między sobą jedynie trzecią literą. To zjawisko „niejednoznaczności” odczytywania kodonów przez cząsteczkę tRNA przeczy „hipotezie adaptora” (Crick 1955), która dopuszczała jedynie możliwość parowania się zasad typu A:U (względnie U:A) i G:C (względnie C:G). Dla wyjaśnienia wielorakiego rozpoznawania kodonów przez antykodon, Crick zaproponował hipotezę „wobble” (1966), która zakłada możliwość niekanonicznego parowania trzeciej litery kodonu z pierwszą literą antykodonu<sup>x)</sup>. Na podstawie rozważań teoretycznych Crick założył (2) możliwość tworzenia niekanonicznych wiązań wodorowych między pierwszą parą zasad asocjatu kodon-antykodon oraz ustalił prawa parowania się zasad w tej tzw. pozycji „wobble” (ryc. 1) (patrz Tablica II).



Ryc. 1. Określenie pozycji "WOBBLE" w asocjacji Kodon-antykodon

wanego z drożdży. Określenie pierwszorzędowej struktury szeregu cząsteczek tRNA izolowanych z różnych organizmów (3, 4, 5) oraz poznanie ich własności kodujących potwierdziło słuszność założeń Cricka.

A zatem cząsteczka tRNA, która rozpoznaje kodony typu XZU, XZC i XZA (gdzie X, Z = U, A, C lub G) posiada zawsze na pierwszej pozycji w antykodonie inozynę i na odwrot, jeśli sekwencja nukleotydowa antykodonu rozpoczyna się od inozyny to dana cząsteczka tRNA rozpoznaje trzy kodony

W ten sposób przy oddziaływaniu kodon-antykodon pierwsza litera antykodonu może parować dwie, albo nawet trzy różne zasady podstawowe w miejsce trzeciej litery kodonu. Niewątpliwie sukcesem teorii "wobble", była możliwość przewidywania składu nukleotydowego antykodonu dla większości cząsteczek tRNA. W chwili bowiem, gdy Crick podawał swoją hipotezę znana była pierwszorzędowa struktura jednego tRNA alaninowego izolo-

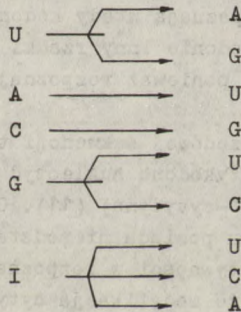
<sup>x)</sup> Parowanie trypletów kodon-antykodon zachodzi analogicznie do powstawania par w podwójnej spirali DNA; łańcuch idący w kierunku 5'-3' jest komplementarny z łańcuchem idącym w odwrotnym kierunku (parowanie antyrównoległe). Stąd 5' koniec (pierwsza litera) antykodonu znajduje się naprzeciw trzeciej litery (koniec 3') kodonu i odwrotnie, koniec 3' (trzecia litera) antykodonu paruje się z końcem 5' (pierwsza litera kodonu - ryc. 1).

różniące się trzecią literą w sposób przedstawiony powyżej. Podobnie jeśli pierwszą literą w antykodonie jest cytozyna, zachodzi rozpoznawanie tylko jednego kodonu kończącego się na literę G; jeśli adenzyna - rozpoznawany jest kodon kończący się na U; jeśli guanozyna-rozpoznawane są kodony typu XZU i XZC; i wreszcie jeśli urydyna, następuje odczytywanie kodonów XZA i XZG.

Tablica II  
Reguły parowania zasad wg hipotezy "wobble" (Crick, 1960)

ZASADA NA PIERWSZEJ  
POZYCJI W ANTYKODONIE

ZASADA NA TRZECIEJ  
POZYCJI W KODONIE



W niektórych przypadkach zaobserwowano jednak, że rozpoznawanie kodonów przez pewne cząsteczki tRNA było inne, niż wynikało to z prawideł podanych przez Cricka. Określenie struktury pierwszorzędowej tych cząsteczek tRNA pozwoliło ustalić, że na pierwszej literze ich antykodonów znajdują się zmodyfikowane zasady G, C i U, których własności parowania odpowiednich zasad kodonu są inne niż zasad macierzystych. Okazuje się, że istnieje ścisła relacja między występowaniem zmodyfikowanych zasad w antykodonie, a wyborem kodonu przez te cząsteczki tRNA. W cząsteczkach tRNA izolowanych z *E.coli* (6), które rozpoznawały kodony typu XAU i XAC (tzn. kodony w których na trzeciej literze znajduje się urydyna względnie cytydyna, a na drugiej adenzyna) znajdowano zawsze na pierwszej pozycji w antykodonie zasadę Q (modyfikowana guanozyna). Wykazano, że w parowaniu kodon-antykodon, zasada Q wykazuje większe powinowactwo do U niż do C i prawdopodobnie występuje wyłącznie lub prawie wyłącznie w tRNA izolowanych z *E.coli*.

Dość powszechne są modyfikacje urydyny w antykodonie. W cząsteczce tRNA<sup>Glu</sup><sub>III</sub> izolowanego z drożdży występuje na pierwszej literze w antykodonie ester etylowy kwasu 2-tio-5-acetylourydynowego (7). W pozycji 1 antykodonu cząsteczek tRNA<sub>II</sub> wydzielonego z wątroby szczura oraz tRNA<sup>Glu</sup><sub>2</sub> z *E.coli* zlokalizowano odpowiednio 5-metylo-2-tiourydyne (8) oraz 5-metylo-aminometyleno-2-tiourydyne (9). Obecność takich pochodnych 2-tiourydyny zamiast macierzystej urydyny na 1-szej pozycji antykodonu prowadzi do roz-

poznawania przez te cząsteczki tRNA jedynie kodonu XZA, podczas gdy nie zachodzi odczytywanie kodonu kończącego się na literę G. Tak więc podstawienie atomu tlenu w pozycji C-2 uracylu przez atom siarki (SU) może być odpowiedzialne za specyficzne parowanie A, a nie G na trzeciej literze kodonu. Destabilizacja pary SU-G jest spowodowana zapewne tworzeniem się wiązania S...H, które jest dużo słabsze niż wiązanie wodorowe typu O...H występujące w niepodstawionym uracylu. Może natomiast tworzyć się stabilna para z A, ponieważ w wiązaniu wodorowym między SU i A bierze udział jedynie atom tlenu przy węglu C-4 i atom wodoru przy azocie N-3 w uracylu (7).

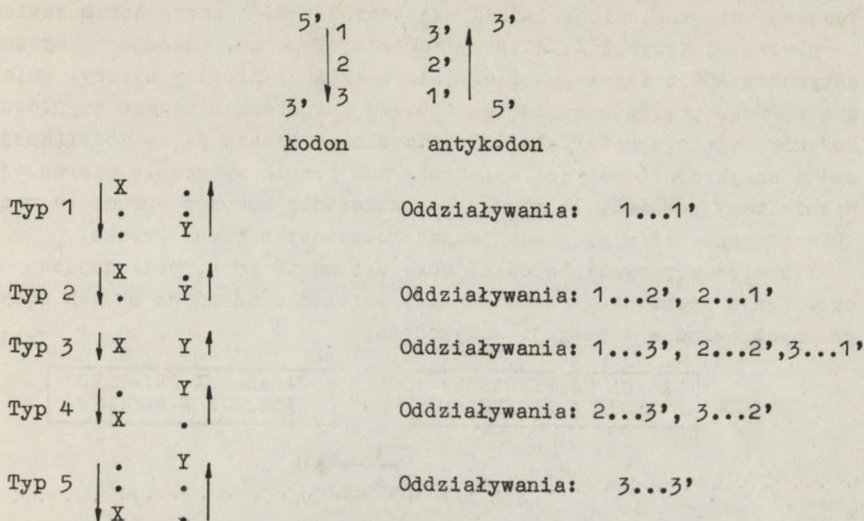
Innym przykładem modyfikacji urydyny jest kwas 5-urydino-oksyoctowy (acoU). Cząsteczki tRNA rozpoznają wtedy kodony XZU, XZA i XZG (10). W tRNA<sup>Ser</sup><sub>II</sub> występuje w antykodonie inny rzadki nukleotyd „Ψ”. Wykazuje on ciekawe własności kodujące, ponieważ rozpoznaje kodony kończące się na literę U i A (4).

Przy ustalaniu pierwszorzędowej sekwencji tRNA<sup>Met</sup><sub>2</sub> z E.coli zlokalizowano w pierwszej pozycji antykodonu nukleotyd ac<sup>4</sup>C, który jest zmodyfikowaną cytydyną (N<sup>4</sup>-acetylo -cytydyna) (11). Cząsteczka tRNA<sup>Met</sup> izolowanego z tego samego organizmu posiada niepodstawioną cytydynę w 1 pozycji antykodonu. Z porównania aktywności w rozpoznawaniu trypletów AUG przez te cząsteczki tRNA wynika, że modyfikacja cytydyny powoduje zmniejszenie siły wiązania antykodonu z kodonem AUG (12).

Wśród różnych prac teoretycznych traktujących o oddziaływaniach w kwasach nukleinowych znalazły się również prace rozpatrujące oddziaływania zachodzące między zasadami w kompleksach kodon-antykodon. Z punktu widzenia energetycznego parowanie zasad w sposób zaproponowany przez Cricka w pozycji "wobble" zostało potwierdzone przez Pollak'a i Rein'a (1968), którzy obliczyli energię oddziaływań elektrostatycznych, polaryzacyjnych i dyspersyjnych między takimi parami zasad. Nash i Bradley (1965) wskazali natomiast na istotny udział w oddziaływaniu kodon-antykodon sił działających poza płaszczyznę między zasadami leżącymi na przeciwległych niemiach (oddziaływania diagonalne).

Inne siły działające w kompleksie kodon-antykodon są siłami pionowymi działającymi między zasadami tego samego trypletu. Oddziaływania kodon-antykodon można zatem z punktu widzenia energetycznego rozważać jako sprawę wyłącznie swobodnej energii wyzwalanej w wyniku powstawania asocjacji kodonu z antykodonom. Przy takim założeniu proces kodowania sprowadza się do problemu rozróżniania między pewną liczbą poziomów energetycznych, których liczba zależy od liczby kodonów, liczby antykodonów i degeneracji kodu aminokwasowego.

Claŕerie (13) uwzględnił w swoich obliczeniach pięć typów rozmieszczenia zasad w asocjacji kodon-antykodon. Energie oddziaływań między wszystkimi możliwymi trypletami (utworzonymi z kombinacji zasad U, G, A i C) obliczono jako sumę dziewięciu dwuskładnikowych oddziaływań (ryc. 2).



Ryc. 2. Rodzaj rozmieszczenia zasad w asocjacji kodon-antykonon i typy oddziaływań między tymi zasadami (wg Claverie)

Wkład pionowych oddziaływań między umieszczonymi nad sobą zasadami tego samego trypletu nie jest brany pod uwagę, ponieważ jest on według założeń taki sam w stanie początkowym jak i końcowym kompleksu.

Rozpatrywano różne układy (sekwencje) antykononów oddziałujących z tym samym kodonem. W każdym przypadku najbardziej stabilnym energetycznie było oddziaływanie antykononu komplementarnego z danym kodonem, ale również asocjaty utworzone z niekomplementarnych trypletów (w których w pewnym miejscu asocjatu parowały się zasady niekomplementarne) w około 50% przypadków niewiele różniły się energetycznie od normalnych asocjatyw (nie więcej niż 4 kcal/mol). Tego typu różnice energetyczne są zbyt małe, aby proces rozpoznawania kodonu przez antykonon był całkowity, a to prowadziłoby do błędów w biosyntezie białka.

Jednym słowem kod genetyczny byłby dwuznaczny. Jak wiadomo kod genetyczny nie jest dwuznaczny. I tutaj dochodzimy do głównego wniosku „hipotezy błędnego trypletu” (The Missing Triplet Hypotheses) podanej przez J. Nino (1971), (14), która głosi, że kod genetyczny nie jest dwuznaczny, ponieważ wiele z możliwych antykononów nie może istnieć, a wiele innych jest zmodyfikowanych. Teoria ta stara się zatem wytłumaczyć konieczność występowania modyfikowanych zasad w antykononie (również inozyny, którą można uważać za zmodyfikowaną adenozyne) w celu wyeliminowania możliwych dwuznaczności w kodzie genetycznym. W swoich rozważaniach, których nie będziemy tutaj przytaczać „hipoteza błędnego trypletu” odrzuca np. możliwość występowania większości antykononów rozpoczynających się na A. Do-

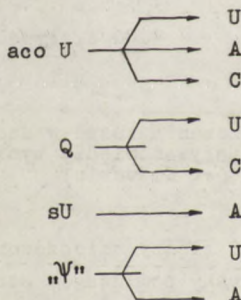
tychczas nie znaleziono żadnej cząsteczki tRNA z antykodonem zawierającym na pierwszej pozycji A. Autorzy zakładają, że np. mutacja wytwarzająca antykodon ACG w istotnych ilościach w tRNA z drożdży byłaby śmiertelna (z tego powodu nazwano tę hipotezę „hipotezą błędnego trypletu”). Przebadanie bogatego materiału doświadczalnego wykazuje, że modyfikacje zasad w antykodonie dotyczą wyłącznie lub prawie wyłącznie pierwszej litery. Widzieliśmy również, że reguły rozpoznawania kodonów przez te cząsteczki tRNA są inne niż w przypadku zasad rozważanych przez Cricka.

Tak więc w pozycji "wobble" może zachodzić inne, podlegające również określonym prawidłom (tablica III) parowanie zasad na skutek modyfikacji głównych zasad w 1 pozycji antykodonu.

Tablica III

ZASADA NA PIERWSZEJ  
POZYCJI W ANTYKODONIE

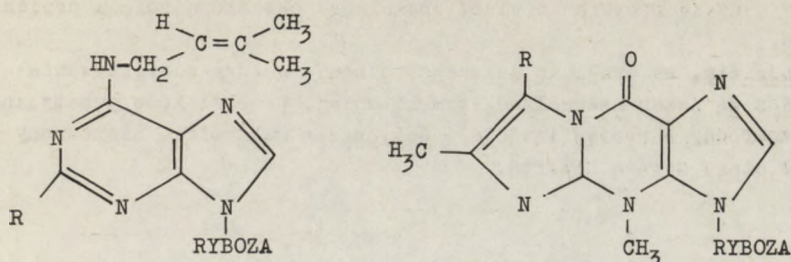
ZASADA NA TRZECIEJ  
POZYCJI W KODONIE



Inne reguły parowania zasad

Dotychczasowe rozważania dotyczyły bezpośrednio oddziaływania antykodonów z kodonami, nie uwzględniały natomiast możliwości wpływu na tego typu oddziaływania zasad sąsiadujących z antykodonem od końca 5' i 3'. Być może fakt występowania w cząsteczce tRNA silnie zmodyfikowanych nukleotydów sąsiadujących z końcem 3' (trzecia litera) antykodonu odgrywa znaczącą rolę w oddziaływaniu między trzecią zasadą antykodonu, a pierwszą zasadą kodonu. Są to przeważnie purynowe nukleotydy zawierające długie łańcuchy boczne lub dodatkowe pierścienie z grupami funkcyjnymi takimi jak grupa karboksylowa, hydroksylowa, estrowa, czy podwójne wiązanie alilowe (ryc. 3). Ostatnio wykazano, że występowanie tych tzw. hipermodyfikowanych zasad w cząsteczce tRNA jest w jakiś szczególny sposób związane z własnościami rozpoznawania kodonu przez tę cząsteczkę tRNA.

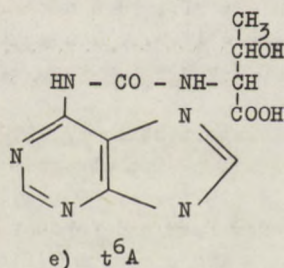
Mianowicie te cząsteczki tRNA, które rozpoznają kodony rozpoczynające się od U, czyli posiadają antykodony kończące się na A, zawierają z reguły (z wyjątkiem tRNA<sup>Phe</sup>) N<sup>6</sup>- ( $\Delta^2$ -izopentenylo) adenozyne (i <sup>6</sup>A; ryc. 3a), (15) albo w przypadku tRNA z E.coli jej 2-tiometylową pochodną (ryc. 3b, ms<sup>2</sup> i <sup>6</sup>A) (16) w pozycji sąsiadującej z końcem 3' antykodonu. W tRNA specyficznych dla fenyloalaniny izolowanych z różnych organizmów (drożdże,



- a) R = H;  $i^6A$   
 b) R =  $-SCH_3$ ;  $ms^2 i^6A$

- c) R = H  
 d) R =  $-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\underset{\text{COOCH}_3}{\text{CH}}-\text{NHCOOCH}_3$

## ZASADA Y



Ryc. 3. Przykłady zasad hipermodyfikowanych

ziarno pszenicy, wątroba szczura, wątroba wołu, ziarno fasoli, z wyjątkiem *E. coli*) w tych samych warunkach występuje w sąsiedztwie 3' antykodonu inna tzw. zasada Y (ryc. 3c,d) (17). Te cząsteczki tRNA, których antykodony kończące się na U rozpoznają kodony rozpoczynające się od A mają z reguły N-[9- $\beta$ -D-rybofuranozylo (puryno-6-yl-karbamoylo] - treoninę ( $t^6A$ ) (ryc. 3e) (15) przy końcu 3' antykodonu.

W przypadku cząsteczek tRNA rozpoznających kodony rozpoczynające się od C lub G nie udało się ustalić podobnej zależności w występowaniu określonej zasady w pozycji sąsiadującej z końcem 3' antykodonu, a rozpoznawaniem kodonu przez te cząsteczki tRNA. W przypadku tych cząsteczek tRNA spotykamy raczej tylko nieznacznie zmodyfikowane zasady purynowe w pozycji charakterystycznej dla zasad hipermodyfikowanych. Są to takie nukleozydy purynowe jak 1-metyloguanozyna,  $N^6$ -metyloadenozyna, 1-metyloinozyna, 2-metyloadenozyna czy sama adenozyna (18). Obecnie trudno jest odpowiedzieć na pytanie w jaki sposób enzymy uczestniczące w biosyntezie modyfikowanych zasad rozpoznają odpowiednie typy cząsteczek tRNA.

Być może istnieje jakaś wspólna sekwencja nukleotydowa wokół hipermodyfikowanych zasad w okolicy antykodonu rozpoznawana przez te enzymy.

Przytoczony powyżej materiał doświadczalny sugeruje, że być może obecność hipermodyfikowanych zasad w jakiś specyficzny sposób wpływa na kie-



rowanie syntezą protein in vivo, spełniając określoną rolę w procesie kodowania.

Wydaje się, że drogi do dalszego poznania natury oddziaływania kodon-antykodeon są jasno nakreślone, tym niemniej, problem kodu genetycznego tak różnorodny w swojej istocie i dotychczas całkowicie niepoznany jest w dalszym ciągu sprawą otwartą.

#### L i t e r a t u r a

- [1] Gupta N.K., Woodley C.I.; J. Scien. Ind. Res. 30, (1971) 513.
- [2] Crick F.H.C.; J. Mol. Biol., 19 (1966) 548.
- [3] Ebel I.P., Bonnet I., Gangloff I., Keith G., Krebs B., Kuntzel B., Roy A., Weissenbach I., Werner C., Dirheimer G.; Biochimie 54, (2) (1972), 127.
- [4] Staehelin M.; Experientia 27, (1971), 1.
- [5] Yukes T.H., Gatlin L.; Progres in Nucleic Acid Research an Molecular Biology 11, (1971), s. 305, edited by J.N. Davidson, W.E.Cohn, Acad. Press, New York and London.
- [6] Harada F., Nishimura S.; Biochemistry 11, (1972), 301.
- [7] Yoshida M., Takeismi K., Ukita T.; Biochem. Biophys. Res. Comm. 39 (5), (1970), 852.
- [8] Liu L.P., Ortwerth B.J.; Biochemistry, 11, (1972), 12.
- [9] Ohashi Z., Saneyoshi M.; Biochem. Biophys. Res. Comm. 40, (1970), 866.
- [10] Marao K., Saeyoshi M., Harada F., Nishimura S.; ibid. 38, (1970), 657.
- [11] Ohashi Z. in.; Biochim. Biophys. Acta 262, (1972), 209.
- [12] Høgenauer G., Turnowsky F., Unger F.H.; Biochem. Biophys. Res. Comm., 46, (1972), 2100.
- [13] Claverie D.; J. Mol. Biol. 56, (1971), 75.
- [14] Nino J.; ib'd., 56 (1971), 63.
- [15] Schweizer M.P., Chheda G.B., Baczynskyj L., Hall R.H.; Biochemistry 8, (1969), 8283.
- [16] Yamada Y., Nishimura S., Ishikura H.; Biochim. Biophys. Acta, 247, (1971), 170.
- [17] Yoshikami D., Keller E.B.; Biochemistry 10, (1971), 2969.
- [18] Saneyoshi M., Ohashi Z., Harada F., Nishimura S.; Biochim. Biophys. Acta, 262, (1972), 1.

Jan Barciszewski, Antoni J. Rafalski

## ROZPOZNAWANIE TRANSFEROWYCH KWASÓW RYBONUKLEINOWYCH PRZEZ AMINOACYLO - tRNA - SYNTETAZY

### Streszczenie

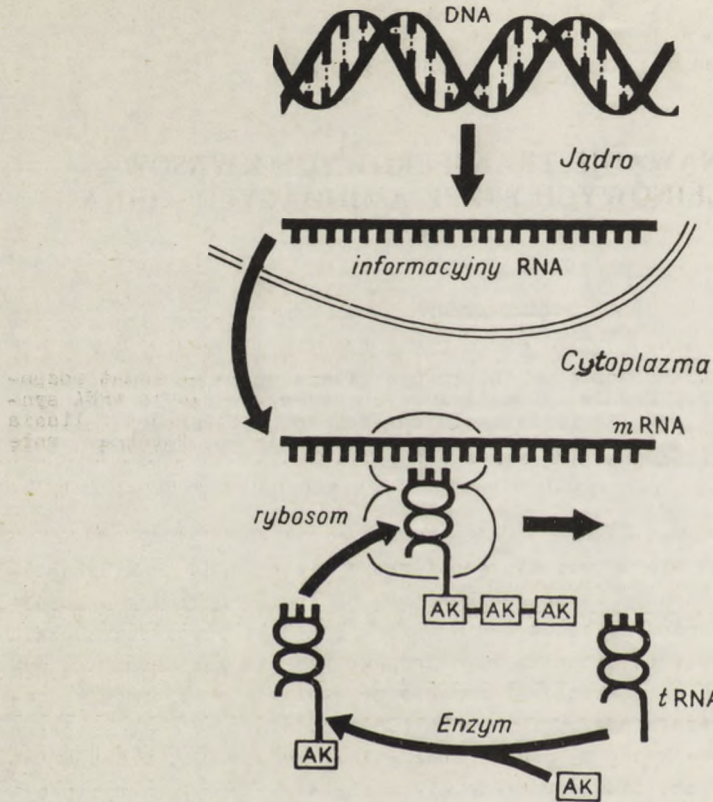
W opracowaniu zebrano dostępne informacje literaturowe na temat rozpoznawania transferowych kwasów rybonukleinowych przez aminoacylo tRNA syntetazy. Przedstawiono udział poszczególnych fragmentów struktury liścia koniczyny w tym procesie. Przedstawione fakty wskazują na istotną rolę struktury trzeciorzędowej w procesie rozpoznania.

### W s t ę p

Badanie korelacji między strukturą a funkcją biologiczną makrocząsteczek jest jednym z głównych zadań współczesnej biologii. Dokładny mechanizm odczytujący zakodowane genetycznie informacje jest bezpośrednio związany z subtelną strukturą biopolimeru, a do jego badania potrzebne są wyrafinowane metody. Kluczową rolę w procesie przekazywania informacji genetycznej z kwasu dezoksyrybonukleinowego (DNA) na tworzące się białko odgrywają transferowe kwasy rybonukleinowe (tRNA) ryc. 1 (1). Podczas tego procesu tRNA wiązane są z odpowiednimi aminokwasami przy pomocy specyficznych enzymów, a następnie oddziałują z odpowiednimi miejscami na rybosomach. Poprawna synteza wiązań peptydowych zachodzi z udziałem informacyjnego RNA (mRNA, messenger RNA) o strukturze komplementarnej do DNA.

W ostatnich latach wiele uwagi poświęcono procesowi oddziaływania między kwasem nukleinowym a białkiem. Specyficzność tych związków jest wykorzystywana w wielu procesach rozdzielania, między innymi w metodzie chromatografii powinowactwa (ang. affinity chromatography). Oddziaływania między tymi makrocząsteczkami są bardzo skomplikowane i prawdopodobnie angażują różne typy sił działających w różnych centrach wzdłuż łańcuchów białkowych i kwasów nukleinowych (np. siły elektrostatyczne, oddziaływania hydrofobowe, wiązania wodorowe). Oddziaływania hydrofobowe są szczególnie interesujące ponieważ zauważono, że proces interkalacji między parami zasad w kwasach nukleinowych sprowadza się do oddziaływań aromatycznych fragmentów tych cząsteczek, co zaobserwowano w wiązaniu się amin steroidowych z kwasami nukleinowymi (2).

Proces rozpoznawania białek przez makrocząsteczki kwasów nukleinowych mimo, że jest szeroko badany, to w dalszym ciągu nie jest dokładnie wyjaśniony. Jednym z najlepszych systemów modelowych do poznania tego oddziaływania jest rozpoznawanie transferowych kwasów rybonukleinowych przez

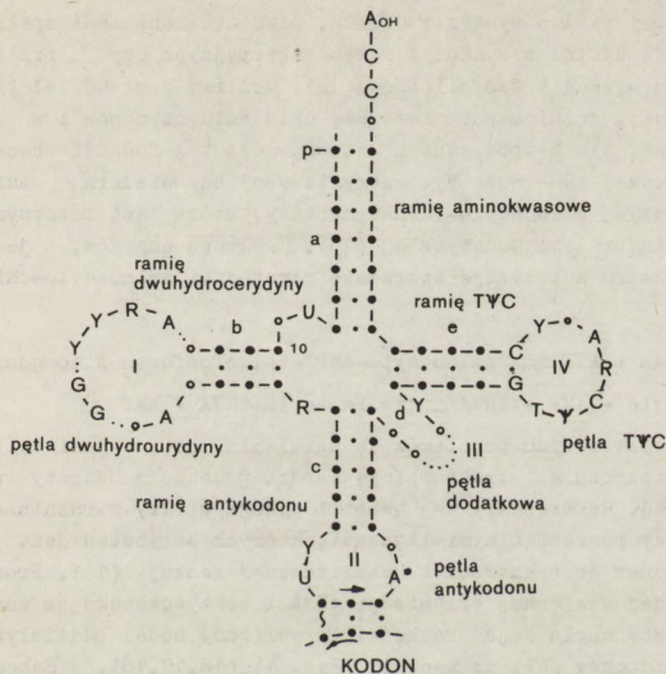


Ryc. 1. Schemat procesu biosyntezy białka

aminoacylo-tRNA-syntetazy (ligazy, E.C. 6.1.1.-). Reakcja aminoacylacji tRNA przebiega z udziałem specyficznego enzymu, który w swoisty sposób rozróżnia strukturalnie bardzo podobne cząsteczki specyficznych tRNA, a tym samym zapewniając poprawność przekazywanej informacji. Mimo uzyskania wielkiego postępu w oznaczaniu sekwencji kwasów nukleinowych oraz mimo zgromadzenia wielu interesujących wiadomości o strukturze pierwszo-, drugo- i trzeciorzędowej tRNA (3,4) to w dalszym ciągu brak jest ogólnej teorii rozpoznawania transferowych kwasów rybonukleinowych przez aminoacylo-tRNA ligazę (ang. specific recognition).

#### TRANSFEROWE KWASY RYBONUKLEINOWE

Cząsteczka tRNA składa się z około 80 nukleotydów. Ogólny model struktury kwasu widoczny jest na ryc. 2. Z modelu tego widać szereg ogólnych prawidłowości i analogii występujących w znanych tRNA (3, 4, 5, 6, 7), podobna liczba nukleotydów od 75 do 87, zbliżona struktura pętli antykodonu, identyczne nukleozydy w określonych miejscach struktury pierwszorzędowej, zawartość rzadkich zasad aż do około 20% (8,9). Aby zrozumieć ich



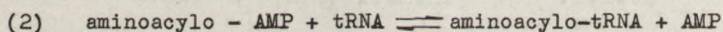
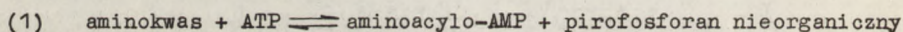
Ryc. 2. Ogólny model cząsteczki tRNA

istotę i znaleźć dalsze podobieństwa należy dokonywać porównań w następujących grupach kwasów nukleinowych (10):

- specyficzne tRNA z tych samych organizmów, dla tego samego aminokwasu, z tym samym antykodonem i różniące się dwoma lub trzema nukleozydami,
- tRNA z tym samym antykodonem z dwóch różniących się organizmów eukariotycznych np. serynowe tRNA z wątroby szczura i drożdży oraz fenyloalaninowe tRNA z wątroby szczura i drożdży,
- tRNA dla tego samego aminokwasu z organizmu eukariotycznego i prokariotycznego,
- tRNA specyficzne dla różnych aminokwasów. Charakteryzują się one podobieństwami, które są reprezentatywne dla wszystkich znanych tRNA.

Większość poznanych transferowych kwasów rybonukleinowych bierze udział w biosyntezie białka (ryc.1). Proces ten jest niezwykle skomplikowany, przebiega z udziałem ponad 100 rodzajów makrocząsteczek jak tRNA, aminoacylo-tRNA-syntetazy, inne enzymy syntetyzujące, komponenty rybosomalne oraz enzymy dla inicjacji, elongacji, transllokacji i terminacji łańcucha polipeptydowego (1). Transferowe RNA są tą klasą makrocząsteczek, która odgrywa kluczową rolę w procesach komórkowych. Każda komórka zawiera około 60 różnych rodzajów tRNA (12). Zasadniczą rolę odgrywa ten rodzaj kwasów nukleinowych w syntezie białka, gdzie aminoacylo-tRNA zapewniają poprawne przeniesienie aminokwasu na tworzący się polipeptyd (11). Oprócz

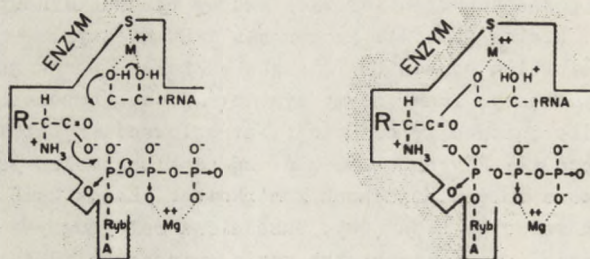
zasadniczej roli tRNA w syntezie białka, niektóre inne tRNA spełniają takie funkcje jak udział w syntezie ścian bakteryjnych czy przeniesienie aminokwasów do białek i fosfolipidów (12). Możliwy jest udział tRNA w infekcji wirusowej, różnicowaniu komórek, działaniu hormonów i w mechanizmach regulacji, ale bezpośrednich dowodów dla tej funkcji obecnie brak (11). Każdy rodzaj tRNA może być estryfikowany odpowiednim aminokwasem przy pomocy enzymu aminoacylo-tRNA-syntetazy, która jest istotnym ogniwem w translacji informacji genetycznej (13). Ta grupa enzymów, jeden dla każdego aminokwasu katalizuje tworzenie cząsteczki aminoacylo-tRNA w dwóch etapach (14).



Jednym z podstawowych problemów do ustalenia jest, w jaki sposób białka są zdolne rozróżnić strukturalnie bardzo podobne substraty z wysoką specyficznością. Rozwiązanie tej kwestii wymaga wiedzy o różnicach, które istnieją między poszczególnymi ligazami, których atrybutem jest specyficzność w stosunku do substratu i katalizowanej reakcji (15). Proces ten wymaga dokładnej wzajemnej orientacji tRNA i zaktywowanego na enzymie aminokwasu, tak aby mogła zajść reakcja. Przybliżony model oddziaływania ligazy z tRNA widoczny jest na ryc. 3 (Ryc. 4) (16,17,18). Schemat ten przedstawia reakcję prowadzącą do aminoacylo-tRNA. Transferowy RNA poprzez wolne grupy hydroksylowe końcowej adenozyliny oddziałuje z dwuwartościowym metalem ściśle związanym z enzymem. Jedna grupa hydroksylowa przyjmuje proton pochodzący od drugiej.

Istnieje wiele metod badania specyficznego oddziaływania tRNA z aminoacylo-tRNA syntetazą (19). Są to:

- specyficzna chemiczna i genetyczna modyfikacja zasad tRNA,
- inhibicja procesu aminoacylacji poprzez oligo- i polinukleotydy,
- badanie zdolności akceptorowej z fragmentów tRNA,
- porównywania drugorzędowej struktury tRNA,
- chronienie kompleksu syntetaza - tRNA i ochrona tRNA przed atakiem rybonukleazy,
- rentgenografia kompleksu enzymu z tRNA.



Ryc. 3. Model oddziaływania enzymu (aminoacylo-tRNA-syntetazy) z tRNA

Wydaje się, że najpełniejsze informacje powinna dostarczyć analiza danych rentgenostrukturalnych. Na podstawie tych badań będzie można stwierdzić, które atomy leżą najbliżej siebie oraz tworzą niekowalentne wiązania. Nie wykluczone jednak, że nie można wyróżnić grupy wiązań „unikalnych” dających w rezultacie kompleks tRNA-ligaza, czyli nie można określić specyficznego miejsca rozpoznania (ang. specific recognition site).

Transferowe kwasy rybonukleinowe mogą występować co najmniej w dwóch zasadniczych formach: natywnej i zdenaturowanej, które wyraźnie muszą różnić się konformacją. Strukturalne cechy tRNA są niewątpliwie bardzo istotne dla poprawnego rozpoznania. Syntetaza może tylko przyłączyć aminokwas do natywnej formy tRNA. W związku z tym zachodzi pytanie, jakie cechy strukturalne kwasu i jakie cechy strukturalne enzymu są istotne dla procesu rozpoznania. Na pierwszą część tego pytania pragniemy odpowiedzieć w niniejszym opracowaniu. Ponieważ w literaturze można znaleźć wiele poglądów na ten temat, omawiać będziemy kolejno udział poszczególnych fragmentów cząsteczki tRNA (ryc.2) w tym procesie. Szczególną uwagę zwrócimy na te propozycje, które próbują ten problem ująć w sposób najbardziej ogólny. Informacje literaturowe na temat cech strukturalnych enzymu decydujących o specyficzności są skąpe ze względu na niedostateczną znajomość budowy tych białek.

#### RAMIĘ AMINOKWASOWE I SPECYFICZNA SEKWENCJA NUKLEOZYDÓW

Specyficzność zakodowaną w oddziaływaniu aminoacylo-tRNA-ligazy z tRNA można przypisać (20):

- konformacji cząsteczki tRNA,
- specyficznej sekwencji nukleotydów.

Dostępne dowody nie pozwalają dokonać jednoznacznego podziału między tymi dwoma możliwościami, ale następujące obserwacje przemawiają przeciwko pierwszej koncepcji i dostarczają niebezpośredniego poparcia dla drugiego stanowiska:

- wszystkie tRNA są podobne do siebie zarówno jeśli chodzi o rozmiar cząsteczki jak i całą strukturę. W ten sposób jeśli sekwencje nukleotydów we wszystkich tRNA, których pierwszorzędowa struktura jest znana, ułożyć tak, że maksymalna liczba zasad jest zaangażowana w wiązania wodorowe zasad, otrzymuje się model liścia koniczyny (ryc. 2),
- kryształy otrzymane z mieszaniny specyficznych tRNA sugerują, że może zaistnieć podobna symetria konformacyjna w komponentach tRNA,
- zniszczenie wiązania fosforodwuestrowego w tRNA, a szczególnie w ramieniu i pętli antykodonu nie powoduje zmniejszenia aktywności akceptorowej.

Bezpośrednich dowodów dla tezy, że syntetaza rozpoznaje specyficzną sekwencję nukleozydów w tRNA dostarczają następujące fakty:

- przyłączenie aminokwasu do tRNA przez odpowiednią syntetazę katalizowane jest przez pewne, ale nie wszystkie oligonukleotydy,

- bromowanie pojedynczych cząsteczek pirymidyn w tRNA<sup>Fen</sup> z drożdży powoduje zmniejszenie zdolności akceptorowej,
- fotodimeryzacja pirymidyn w drożdżowym tRNA<sup>Ala</sup> nie powoduje zmniejszenia zdolności akceptorowej. Jeśli jednak nukleotydy w sekwencjach pCpUpC w pozycjach 5,6,7 i 9,10,11 od końca 3' (ramię aminokwasowe) są zaangażowane w tworzenie fotodimerów, wówczas następuje wyraźne zmniejszenie aktywności.

Przesłanki te pozwoliły na sformułowanie twierdzenia, że syntetaza rozpoznaje specyficzną sekwencję nukleotydów w cząsteczce tRNA (ang. synthetase recognition code word, SR - code word). Podobny pogląd znany był wcześniej w literaturze i pochodził od Starra i Sellsa (21). Pewne potwierdzenie stanowi fakt, że enzym rozpoznaje miejsce metylacji poprzez określony ciąg nukleotydów (22,23,24). Podobnie jak w przypadku kodu genetycznego, pojedyncza wymiana zasady w specyficznym sekwencji może powodować punktową mutację w wyniku której otrzymuje się w zależności od miejsca wymiany:

- tRNA, który może w dalszym ciągu akceptować ten sam aminokwas,
- tRNA, który nie będzie przyjmował żadnego aminokwasu,
- tRNA, w którym specyficzna sekwencja będzie odpowiadała innemu aminokwasowi, niż przewidzianej przez kod rozpoznający syntetazę.

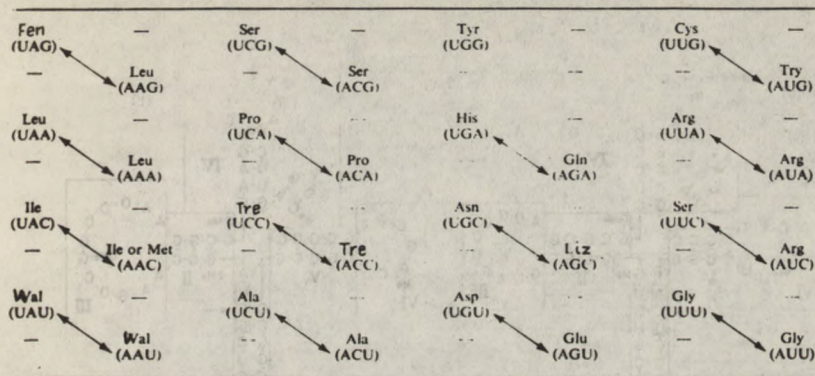
W dwóch ostatnich przypadkach mutacja może być letalna, jeżeli znany jest tylko jeden gen dla poszczególnego tRNA. Jednakże dla tRNA w wyższych organizmach istnieje kilka genów i nowy rodzaj tRNA bardzo rzadko może powodować błędy w translacji. Można przypuszczać, że niektóre z tych pomyłek powstających przez zastąpienie jednego aminokwasu przez inny w tworzącym się białku mogą być bardziej szkodliwe niż inne podczas ewolucji i specyficzny kod rozpoznający może powodować, że ilość szkodliwych efektów takiego podstawienia będzie minimalna. Kod dla syntetazy (tabela 1) powinien więc spełniać następujące warunki:

- nie powinien być znaleziony w żadnym innym tRNA niż ten, który rozpoznaje dana syntetaza,
- pojedyncze podstawienie zasady w specyficznym sekwencji prowadzi do kodu (ryc.4), który w dalszym ciągu programuje włączanie tego samego aminokwasu do nonsensownej sekwencji albo też do kodu, który umożliwia nowemu tRNA przyjmować tylko jeden inny aminokwas podobnie jak w kodzie genetycznym Khorany (25).

Tabela 1

Proponowany kod dla rozpoznawania tRNA przez syntetazy (20)

Pierwsza zasada	Druga zasada				Trzecia zasada
	A	C	G	U	
U	Fen	Ser	Tyr	Cys	G
A	Leu	Ser	-	Try	
U	Leu	Pro	His	Arg	A
A	Leu	Pro	Gln	Arg	
U	Ile	Tre	Asn	Ser	C
A	Ile lub Met	Tre	Iiz	Arg	
U	Wal	Ala	Asp	Gly	U
A	Wal	Ala	Glu	Gly	



Ryc. 4. Zależności między aminokwasami w proponowanym kodzie dla aminoacylo-tRNA syntetaz

Z przedstawionego rysunku wynika, że pojedyncza zmiana w kodzie np. dla fenyloalaniny powoduje powstanie kodu dla tyrozyny ale nie np. dla glicyny. Jeżeli powyższe założenia są poprawne, to staje się oczywiste, że kod dla syntetazy powinien zawierać trzy nukleotydy. Został on opracowany przez P.M. Bhargawa, T. Pallaiiah i E. Premkumar (20). Jeżeli zawierałyby więcej niż trzy, wówczas jednemu aminokwasowi odpowiadałoby kilka kodów podobnie jak w kodonach, co byłoby zjawiskiem niepożądanym. Specyficzna sekwencja dla rozpoznania ligazy powinna występować w regionie tRNA dobrze dostępnym dla enzymu w natywnej konformacji transferowych RNA. Po przeanalizowaniu sekwencji nukleotydów w drożdżowych tRNA wyznaczono trójnukleotydy odpowiedzialne prawdopodobnie za kodowanie procesu aminoacylacji. W ten sposób zaproponowano sekwencje nukleotydów występujące w ramieniu aminokwasowym, które pokazano w tabeli 1.

Specyficzne sekwencje trójnukleotydów kodujące aminokwasy dla tRNA z drożdży *Saccharomyces cerevisiae* specyficznych dla fenyloalaniny, tyrozyny, seryny, waliny i alaniny zaznaczono na ryc. 5. Na tej podstawie przewidziano przypuszczalnie specyficzne sekwencje rozpoznające w transferowych RNA, specyficznych dla innych aminokwasów. Zależność między tymi sekwencjami przedstawiono na ryc. 4. W zaproponowanym kodzie występują trójnukleotydy (tryplety) rozpoczynające się od adenozyliny lub urydyny i nie zawierające rzadkich zasad. Sekwencje te mogą być czytane w jednym kierunku tj. 3' do 5'. Dla zrealizowania specyficznego rozpoznawania powinien być spełniony jeden z dwóch następujących warunków. Warunki te są następujące:

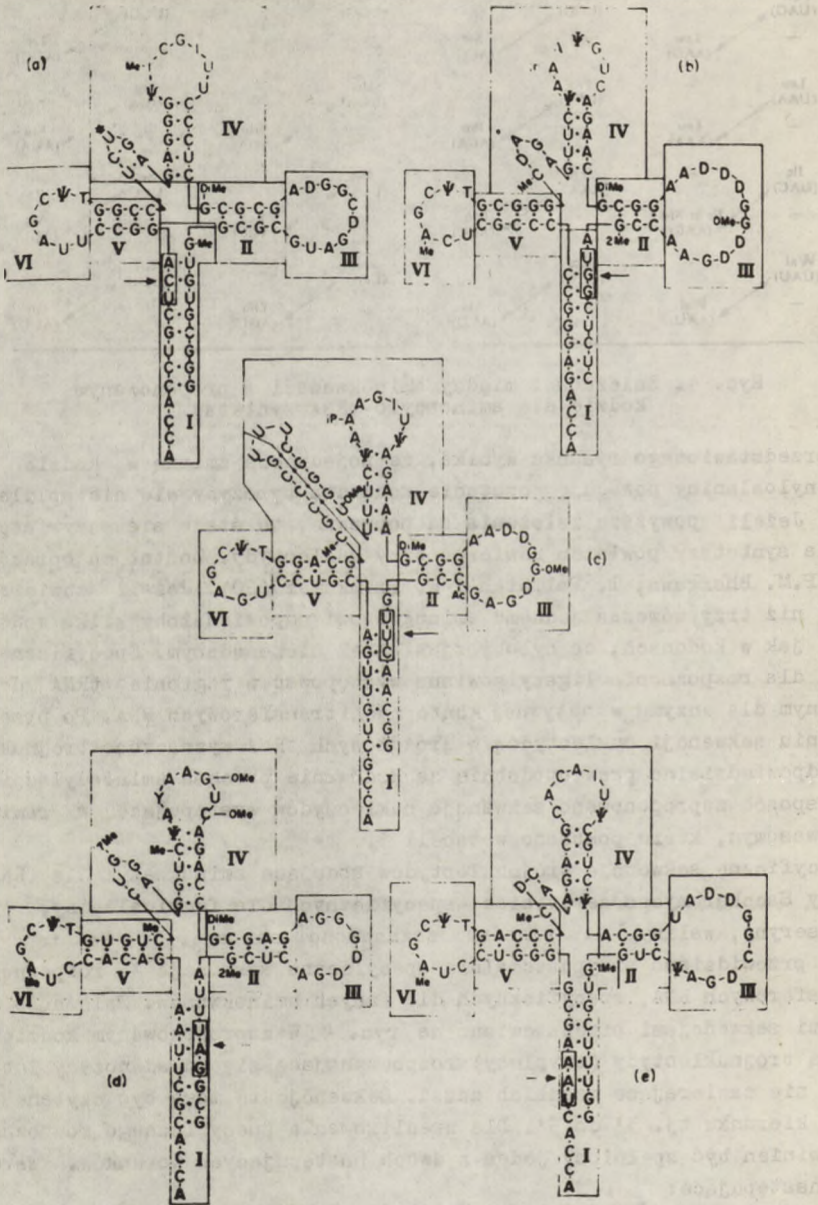
#### Warunek 1

- e - zasada wodorowo związana
- d - zasada nie związana wodorowo
- c) - jedna lub obie zasady
- b) - związane wodorowo
- a - zasada związana wodorowo

#### Warunek 2

- e - } jedna lub obie zasady
- d - } związane wodorowo
- c - zasada nie związana wodorowo
- b - zasada nie związana wodorowo
- a - zasada związana wodorowo





Ryc. 5. Sekwencje tRNA z drożdży z zaznaczonym kodem dla aminoacylo-tRNA syntetazy: a - tRNA<sup>Ala</sup>, b - tRNA<sup>Tyr</sup>, c - tRNA<sup>Ser</sup>, d - tRNA<sup>Phe</sup>, e - tRNA<sup>Val</sup>

Warunek 1 - trzecia zasada nie jest związana wodorowo, podczas gdy jedna lub dwie pierwsze zasady są wodorowo związane. Dwie zasady nie należące do kodu czyli poprzedzające kod i następna za kodem są wodorowo związane.

Warunek 2 - pierwsza zasada kodu nie jest związana wodorowo, a jedna z dwóch pozostałych jest zaangażowana w wiązanie wodorowe. Poprzedzająca kod zasada nie jest związana wodorowo, która z kolei jest poprzedzona przez zasadę związaną wodorowo.

Jak już wcześniej pokazano, kod trójkowy dla syntetazy występuje w tym samym regionie w pięciudrożdżowych tRNA, których struktura jest znana. Ta część struktury tRNA wykazuje największą homologiczność. Dowodem poprawności przyjętego założenia odnośnie rozpoznawania tej części cząsteczki tRNA przez syntetazę są spostrzeżenia Shulmana i Chambersa (26), że fotodimeryzacja pirymidyn w pozycjach 5,6,7 lub 9,10,11 od końca 3' powoduje zmniejszenie aktywności biologicznej drożdżowego tRNA dla alaniny. Fotchemiczna reakcja w innych częściach cząsteczki tRNA nie powoduje obniżenia zdolności akceptorowej. Na podstawie tych doświadczeń Shulman i Chambers przypisali miejsce rozpoznania sekwencji nukleotydów 5,6,7. Interesującym dowodem na poparcie specyficznego kodu jest również rekombinacja dwóch fragmentów cząsteczki tRNA. Oligonukleotyd zawierający 15 nukleotydów od końca 5' oraz dziewiętnastonukleotyd od końca 3' rekombinują dając ramię aminokwasowe wykazujące zdolność przyłączenia aminokwasów.

Specyficzny kod dla syntetazy potwierdzają dodatkowo następujące doświadczenia:

a. naświetlanie światłem UV tRNA<sup>Fen</sup>, tRNA<sup>Val</sup>, tRNA<sup>Gli</sup> w warunkach, które powodują, że tylko urydyna jest odpowiedzialna za deaktywację,

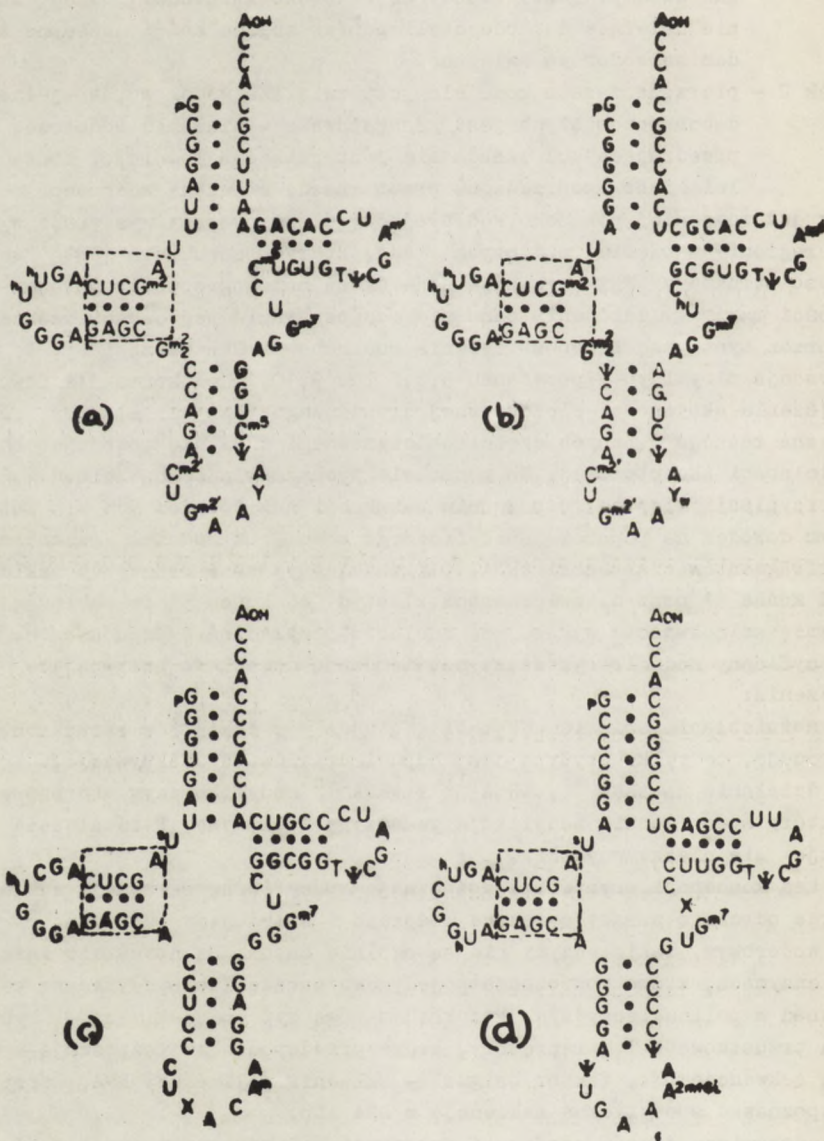
b. działanie na tRNA<sup>Liz</sup>, tRNA<sup>Gli</sup> i tRNA<sup>Fen</sup> modyfikowanym karbonydem, który specyficznie modyfikuje guanozynę i urydynę. W rezultacie otrzymuje się nieaktywny tRNA.

Wg tej koncepcji, syntetaza rozpoznaje specyficzną sekwencję nukleotydów oraz odróżnia zasady związane wodorowo i niebiorące udziału w wiązaniu wodorowym. Takie enzymy nie są ogólnie znane. Są natomiast informacje o enzymach, które rozpoznają pojedynczą zasadę lub specyficzną sekwencję zasad w polinukleotydzie. Przykładem mogą być endonukleazy - rybonukleaza trzuskowa i T<sub>1</sub>, represory, które prawdopodobnie rozpoznają specyficzną sekwencję DNA, czynnik „sigma” - składnik polimerazy RNA, który może rozpoznawać specyficzną sekwencję w DNA itp.

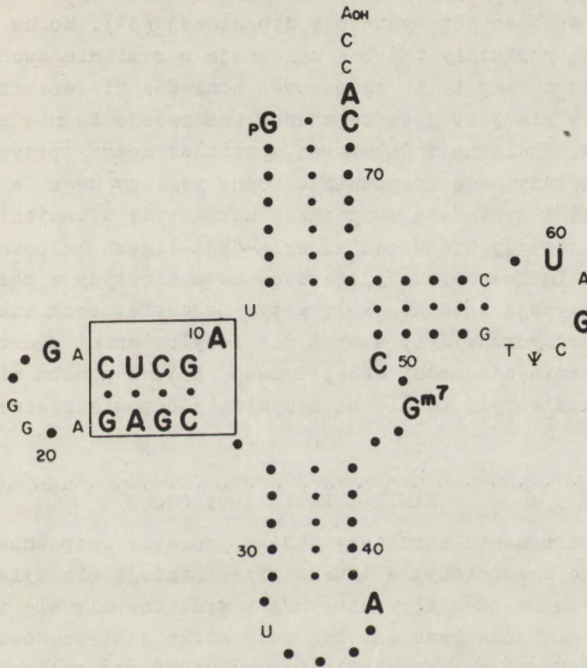
Przedstawione dowody zdają się wskazywać jednoznacznie, że o rozpoznaniu tRNA decyduje specyficzna sekwencja nukleotydów.

#### RAMIĘ DWUHYDROURYDYN

Ramię i pętla dwuhydrourydyny znajdują się obok ramienia aminokwasowego i w strukturze trzeciorzędowej tRNA możliwe jest oddziaływanie między tymi fragmentami, a szczególnie między dwoma nukleozydami guanozynowymi



Ryc. 6. Pierwszorzędowe struktury tRNA dla fenyloalaniny z drożdży, kielków pszenicy i *E. coli* oraz dla walin z *E. coli*



Ryc. 7. Miejsce rozpoznawania proponowane przez Dudocka

z pętli dwuhydrourydyny oraz nukleozydami cytozynowymi z ramienia aminokwasowego (27). Do rozwiązania problemu udziału tej części cząsteczki w procesie rozpoznawania wykorzystano głównie metody chemicznej modyfikacji oraz aminoacylacji. Wiadomo, że przecięcie pętli antykodonu, dwuhydrourydyny, rybotymidyny i ramienia dodatkowego nie powoduje zmniejszenia aktywności akceptorowej (28). Dudock dla znalezienia miejsca rozpoznania stosował aminoacylację tRNA w układzie heterologicznym (aminoacylo-tRNA syntetaza i transferowy kwas rybonukleinowy pochodzą z różnych źródeł). Zauważył on, że fenyloalaninowy tRNA z drożdży, kielków pszenicy, *E.coli* oraz tRNA dla waliny z *E.coli* (29,30), można acylować syntetazą z drożdży. Ponieważ struktury pierwszorzędowe tych kwasów są znane, można było ustalić analogie strukturalne dotyczące występowania określonych nukleotydów w tych samych miejscach pierwszorzędowej struktury tRNA. Z porównania sekwencji zasad w rozważanych cząsteczkach wynika (ryc. 6), że wspólną ich cechą jest charakterystyczna sekwencja występująca w ramieniu dwuhydrourydyny (ryc. 7) (ryc.10).

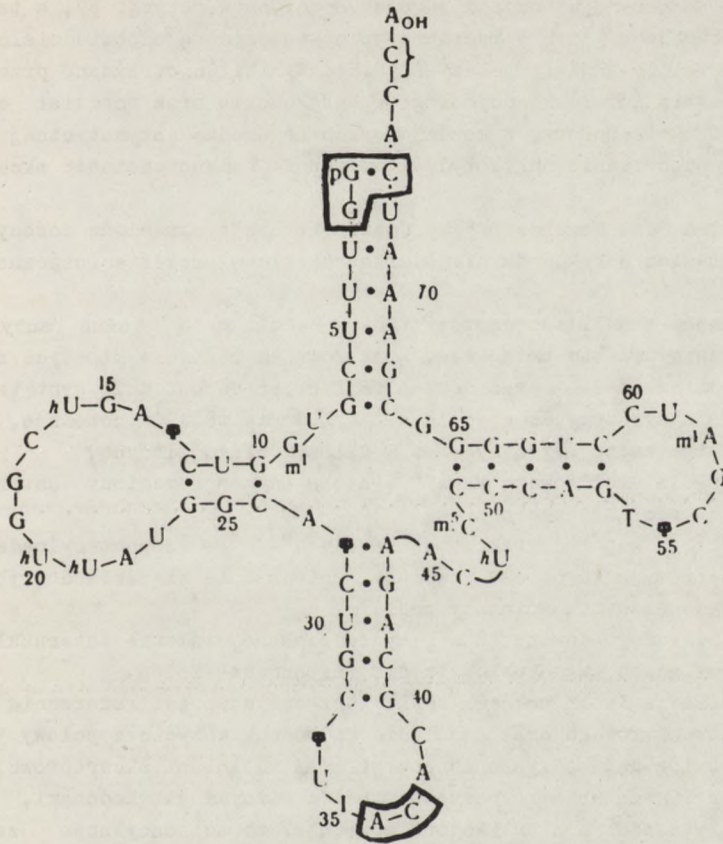
W związku z tym wysunięto hipotezę, że jest ona miejscem rozpoznania syntetazy. Podobna struktura ramienia dwuhydrourydyny istnieje w kwasach Ile<sub>1</sub>, Ile<sub>2</sub>, Gli<sub>3</sub>, Met z *E.coli*. Nie ma jednak w literaturze danych o reakcji aminoacylacji tych kwasów przez fenyloalanylo-tRNA-ligazę. Znaleziono

również, że tRNA dla lizyny oraz alaninowy<sub>2</sub> i walinowy<sub>2</sub> z *E.coli* reagują z aminokwasami w obecności syntetazy drożdżowej (31). Można przypuszczać, że te kwasy będą posiadały podobną sekwencję w ramieniu dwuhydrourydyny. O strukturze tej możemy tylko wnioskować ponieważ pierwszorzędowa struktura tych kwasów nie jest jeszcze znana. Obserwacje te nie są w sprzeczności z wynikami Shulmana i Chambersa, ponieważ można przypuszczać, że różne tRNA syntetazy mogą rozpoznawać różne regiony kwasu w ten sposób np. fenyloalanyno-tRNA syntetaza rozpoznaje nukleotydy w ramieniu dwuhydrourydynowym podczas gdy drożdżowa alanylo-tRNA-ligaza rozpoznaje nukleotydy w ramieniu aminokwasowym. Wydaje się, że nukleotydy w sąsiednich położeniach nie odgrywają istotnej roli w tym procesie. Brak nukleozydów G<sub>19</sub> i G<sub>20</sub> w pętli dwuhydrourydyny w tRNA dla fenyloalaniny z drożdży nie powoduje zmniejszenia zdolności akceptorowej (32). Z punktu widzenia propozycji Dudocka nukleotydy te nie są oczywiście odpowiedzialne za aminoacylację.

#### RAMIĘ I PĘTLA ANTYKODONU

Udział tego fragmentu struktury tRNA w procesie rozpoznawania nie jest jeszcze zupełnie wyjaśniony. W literaturze istnieją nie tylko wyraźnie dowody braku wpływu na oddziaływanie tRNA z syntetazami, ale także doświadczenia zdające się wskazywać istotną rolę kilku nukleozydów. Rozpatrując struktury pierwszorzędowe fenyloalaninowych tRNA z drożdży i *E.coli* oraz walinowego tRNA z *E.coli* można zauważyć, że w pozycjach 20 i 34 od końca 5' występują guanozyny. Wykorzystując selektywną reakcję z ketoksalem ( $\beta$  etoksy  $\alpha$  keto aldehyd butyrylowy) można wnioskować o wpływie modyfikacji oraz udziale nukleozydu w pozycji 34 (guanozyna) w procesie rozpoznawania tRNA przez ligazę.

Rezultaty reakcji z ketoksalem (33,34) dla walinowego tRNA z *E.coli* potwierdzają założenia Dudocka o braku istotnego wpływu nukleozydów w pętli dwuhydrourydyny w tym procesie. Ani guanozyna w pozycji 20 od końca 5' ani obok niej leżąca guanozyna 19 nie są odpowiedzialne za aminoacylację. Stosunkowo niższy procent aminoacylacji zmodyfikowanego tRNA spowodowany jest prawdopodobnie odpowiednią orientacją grupy  $\beta$  etoksylowej adduktu ketoksalu z guanozyną. Z propozycji Dudocka wynika, że guanozyna w pozycji 34 w fenyloalaninowym tRNA z *E.coli* nie może brać udziału w specyficznym rozpoznawaniu, ponieważ brak jest tego fragmentu w walinowym tRNA z *E.coli*. Te dwa kwasy w równym stopniu są rozpoznawane przez aminoacylo-tRNA-syntetazę. Spadek aktywności w fenyloalaninowym tRNA modyfikowanym ketoksalem może być spowodowany sterycznym niespecyficznym oddziaływaniem między tRNA, a syntetazą. Odmienne zachowanie się tRNA<sup>Fen</sup> z drożdży jest właściwe dla odmiennej konformacji antykodonu. Różnica między tymi fragmentami jest taka, że tRNA<sup>Fen</sup> z *E. coli* może posiadać pętlę antykodonu składającą się z 5 nukleozydów, a tRNA<sup>Fen</sup> z drożdży ma 7 nukleozydów w tym fragmencie. Z badań tych wynika, że usunięcie kilku nukle-



Ryc. 8. Miejsce rozpoznawania w tRNA<sup>Val</sup> z drożdży

ozydów z regionu antykodonu lub pętli dwuhydrourydyny nie powoduje zmniejszenia zdolności akceptorowej i dlatego można wnioskować o braku wpływu tych fragmentów cząsteczki na rozpoznanie tRNA przez syntetazę. Zmniejszenie aktywności biologicznej (35) jednocześnie z wycianiem nukleotydów 19 i 21 w pętli dwuhydrourydyny oraz pozycji 34 w pętli antykodonu w tRNA dla fenyloalaniny tłumaczy się zmianami w strukturze III rzędowej i nie może być atrybutem do ważności poszczególnych nukleotydów w tym procesie. Rezultaty te są zgodne z wynikami modyfikacji ketoksalem nukleotydów w pozycjach 20 i 34. Niektóre doświadczenia mogą być interpretowane w ten sposób, że tRNA z jednym modyfikowanym komponentem są aktywne podczas gdy podwójnie modyfikowany kwas jest nieaktywny. Zdolność tRNA do przyłączenia aminokwasu była mniejsza gdy część ramienia dwuhydrourydyny lub regionu TYC były usunięte. Nie może to jednak świadczyć przeciwko hipotezie Dudocka. Nukleotydy w pętli antykodonu nie są istotne dla rozpoznania drożdżowego tRNA dla fenyloalaniny, natomiast w walinowym tRNA z drożdży zdaje się odgrywać ważną rolę (36). Wg Bayeva (36) dwa nukleotydy w pętli

antykononu: adenozyzna w pozycji 36 oraz cytozyna w pozycji 37, a także guanozyna w pozycjach 1 i 2 w ramieniu aminokwasowym są odpowiedzialne za rozpoznanie walilo-tRNA-syntetazy (ryc.8). Wyniki te otrzymano przez hydrolizę wiązania internukleotydu w antykononie oraz rozdział cząsteczki tRNA na dwie połowy. Z każdej z nich na drodze enzymatycznej odhydrolizowano odpowiednie nukleotydy i następnie badano zdolność akceptorową.

Problem ten jest kontrowersyjny, bowiem istnieją określone dowody wskazujące, że region antykononu nie bierze udziału w procesie rozpoznania (20):

- tyrozynowy tRNA i supresorowy tRNA z *E.coli* mają różne antykodony ale przyłączają ten sam aminokwas. Brak również różnic w kinetyce reakcji aminoacylacji  $Su^+$  i  $Su^-$  tyrozynowych tRNA przez odpowiednią syntetazę,
- konwersja cytozyny do uracylu w antykononie tRNA<sup>Gly</sup> powoduje, że ten tRNA rozpoznaje kodon argininy oraz w dalszym ciągu glicynę,
- dimeryzacja drożdżowego tRNA<sup>Ala</sup>, która angażuje regiony antykononu, nie wpływa na zdolność akceptorową,
- modyfikacja supermodyfikowanej zasady  $N^6-\Delta^2$  - izopentenyladenozyny wodnym roztworem jodku potasu powoduje zmniejszenie wiązania do rybosomów ale nie wpływa na wynik aminoacylacji,
- częściowo zdegradowany tRNA (zhydrolizowane wiązanie internukleotydu) może przyłączać aminokwas, ale nie rozpoznawać kodon,
- rekombinacja dwóch połówek tRNA, otrzymanych przez rozerwanie wiązania fosforodwuestrowego oraz usunięcie kilku nukleotydów z połowy 5' przy antykononie, powoduje odzyskanie początkowej zdolności akceptorowej,
- ta sama ligaza może rozpoznawać tRNA z różnymi antykononami,
- wycięcie zasady Y z antykononu powoduje, że aminoacylacja zachodzi tylko z enzymem drożdżowym, a nie z *E.coli*.

#### RAMIĘ RYBOTYMIDYNY TVC

Dla określenia udziału poszczególnych nukleotydów w procesie rozpoznania tRNA przez syntetazę stosuje się często „wycinanie” podstawowych jednostek struktury tRNA - nukleotydów z określonej części makrocząsteczki. Stosując to podejście H.G. Zachau (35) doszedł do wniosku, że ramię TVC jest istotne dla procesu rozpoznawania, ponieważ po usunięciu fragmentu ramienia rybotymidyny zdolność akceptorowa wyraźnie zmniejsza się. Tą istotną rolę przypisał Zachau wspólnej sekwencji GTVC w tym ramieniu (37). W literaturze nie brak przeciwnych i niekiedy być może bardziej wiarygodnych informacji o braku wpływu ramienia TVC na aktywność akceptorową. W tym celu przeprowadzono badania na transferowym kwasie rybonukleinowym nie posiadającym rybotymidyny, z *Mycoplasma sp* (Kid) (38). Aminoacylacja izoleucyną w układzie homo- i heterologicznym z użyciem syntetazy z *E.coli* nie wskazywała na ilościowe różnice między aktywnością tRNA *Mycoplasma sp* (Kid) i *E.coli*. Ten tRNA był również aktywny w tworzeniu po-

lizoleucyny przez poli r(A-U-C) w układzie bezkomórkowym. Po działaniu enzymem metylującym uracyl (metylaza) nie zauważono większej aktywności akceptorowej. Wysłunięto stąd wniosek, że rybotymidyna nie jest konieczna dla rozpoznania tRNA przez ligazę.

#### RAMIĘ DODATKOWE

W chwili obecnej brak wyraźnych dowodów na udział ramienia dodatkowego (ang. extra arm) w rozpoznawaniu tRNA przez ligazę.

#### KWESTIA MIEJSCA DISKRYMINUJĄCEGO W STRUKTURZE tRNA

Jak ogólnie wiadomo, wszystkie znane tRNA mają podobną budowę „liścia koniczyny” (3,4,5,6). Szczególną cechą charakterystyczną są podobieństwa w ramieniu aminokwasowym. Struktura końcowego fragmentu końcówki 3' widoczna jest na rycinie 2.

Jak widać z ryc. 2, wszystkie tRNA zawierają nukleozyd purynowy (R) nie związany wodorowo w czwartej pozycji od końca 3'. Jedynym wyjątkiem jak dotąd okazał się histydynowy tRNA z *E. coli* B (39), który nie posiada takiego nukleozydu. W tej pozycji znajduje się cytozyna związana wiązaniem wodorowym z guanozyną stanowiącą koniec 5'. Wykorzystując tą prawidłowość Crothers, Seno i Still (40) zaproponowali, że natura tego nukleozydu może różnicować wszystkie tRNA na grupy, w których mechanizm rozpoznawania byłby zdeterminowany innymi czynnikami. Taki kod mógłby być poprawny i stanowiłby sekwencję etapów rozpoznawania począwszy od głównej klasyfikacji, aż do szczegółowego przypisania jednego tRNA jednemu aminokwasowi. Jeżeli istnieje takie miejsce dyskryminujące, to sekwencje zasad w tRNA muszą zawierać proste prawidłowości w tej pozycji. Nukleozydy w tym miejscu powinny decydować o podziale wszystkich tRNA na grupy. Obecnie znane są sekwencje ponad 60 tRNA i dlatego można dokonywać analizy występowania tych specyficznych nukleotydów w zależności od specyficzności danego tRNA. Z analizy występowania nukleotydów w czwartej pozycji od końca 3' wynika zasadniczy wniosek, że jeżeli dwa aminokwasy mają chemicznie podobne łańcuchy boczne, ich specyficzne tRNA są bardzo podobne i zawierają ten sam nukleozyd. Inaczej mówiąc istnieje korelacja między naturą chemiczną aminokwasu, a określonym nukleozydem. Wynik tej zależności przedstawiono w tabeli 2. W tabeli tej przedstawiono podział na pięć grup, ponieważ tRNA<sup>Arg</sup> i tRNA<sup>Lis</sup> z drożdży zawierają guanozynę lub urydynę w tej pozycji. Wszystkie inne tRNA specyficzne dla danego aminokwasu mają jeden określony nukleozyd „dyskryminujący”. Regularność między tymi grupami jest dość duża. Wyjątkami są arginina, lizyna i tryptofan, które różnią się w tRNA z drożdży i *E. coli*. Można znaleźć jeszcze inne odstępstwo od zasady, że chemicznie podobne aminokwasy są połączone w grupy. Cysteina, seryna i treonina posiadają wiele cech podobnych, ale cysteina posiadająca nukleozyd dyskryminujący - adenozyne, występuje w grupie razem z metioniną. Rozważania oparte na ograniczonej liczbie znanych sekwencji



Zależności między naturą aminokwasu, a czwartym nukleozydem

A	G	C	U	G/U
Ala	Ser	His	Gly	Arg } drożdże Liz }
Ile	Tre	Pro		
Leu	Glu Asp			
Wal				
Fen <sub>1</sub>	Gln Asn			
Tyr				
Met				
Cys	Try (E.coli)			
Arg				E.coli Try (drożdże)
Liz				

tRNA i dlatego trudno uzyskać dokładną statystyczną informację, ponieważ w dalszym ciągu wiele czynników takich jak względne prawdopodobieństwo występowania nukleozydów A, G, C i w czwartej pozycji nie jest znana ani nie jest jasne do jakiego stopnia sekwencje zasad w tRNA są podobne w izoakceptorowych tRNA. Koncepcja „czwartego nukleozydu” jest o tyle słuszna, że ten nukleozyd może oddziaływać z aminokwasem w procesie rozpoznawania z udziałem enzymu. Wydaje się naturalne, że chemicznie podobne aminokwasy powinny wymagać obecności tego samego nukleozydu w tej pozycji.

Niemniej interesującym spostrzeżeniem jest fakt, że wszystkie tRNA, które mają adenozyne jako środkowy nukleozyd w antykodonie występują w grupie A (Tabela 2). Te zgodności nie potwierdzają się w innych przypadkach.

Istotne znaczenie dla „czwartego nukleozydu” wykazał również Dudock (40). Jego rezultaty wskazują, że fenyloalanylo-tRNA syntetaza z drożdży rozpoznaje oprócz 9 nukleotydów w ramieniu dwuhydrourydyny (29,30), również adenozyne, a miejscu 4 od końca 3'. tRNA które posiadały w swej strukturze sekwencję nukleozydów w ramieniu dwuhydrourydyny, a nie posiadały adenozyne w czwartej pozycji nie ulegały aminoacylacji przez fenyloalanylo-tRNA syntetazę (np. tRNA<sub>F</sub><sup>Met</sup> z E.coli i tRNA<sub>1</sub><sup>Gly</sup> z kielków pszenicy) (40).

Z przedstawionych hipotez i koncepcji wynika, że obecnie nie można preferować udziału określonego fragmentu w procesie rozpoznawania tRNA przez aminoacylo-tRNA syntetazę. Zebrane fakty są niewątpliwie warunkiem koniecznym do wykreślenia ogólnych zależności, ale prawdopodobnie niewystarczającym. Mimo tendencji lokalizowania miejsc rozpoznawania w określonym

fragmentcie struktury tRNA coraz częściej można spotkać pogląd, że o przebiegu procesu rozpoznawania decyduje niewątpliwie struktura trzeciorzędowa kwasu, podobnie jak w przypadku innych reakcji zachodzących w układach biologicznych. Nie można jednak nie zauważyć faktu, że kilka różnych i niezależnych podejść do rozwiązania tego zagadnienia wskazuje na istotną rolę ramienia aminokwasowego. Należy również pamiętać, że w modelach struktur trzeciorzędowych tRNA (27, 41) ramię aminokwasowe jest stosunkowo najlepiej dostępne.

Stosowane porównywania sekwencji dla określenia, które nukleotydy i które regiony cząsteczki tRNA są zaangażowane w rozpoznawanie syntetaz zawiera pewne niebezpieczeństwo. Jakiegokolwiek kompensujące zmiany (tj. zmiany w nukleotydach w dwóch regionach) inne zmiany kompensujące w innych częściach cząsteczki mogą być pominięte.

W dotychczasowych rozważaniach nie brano pod uwagę udziału modyfikowanych nukleozydów w tym procesie.

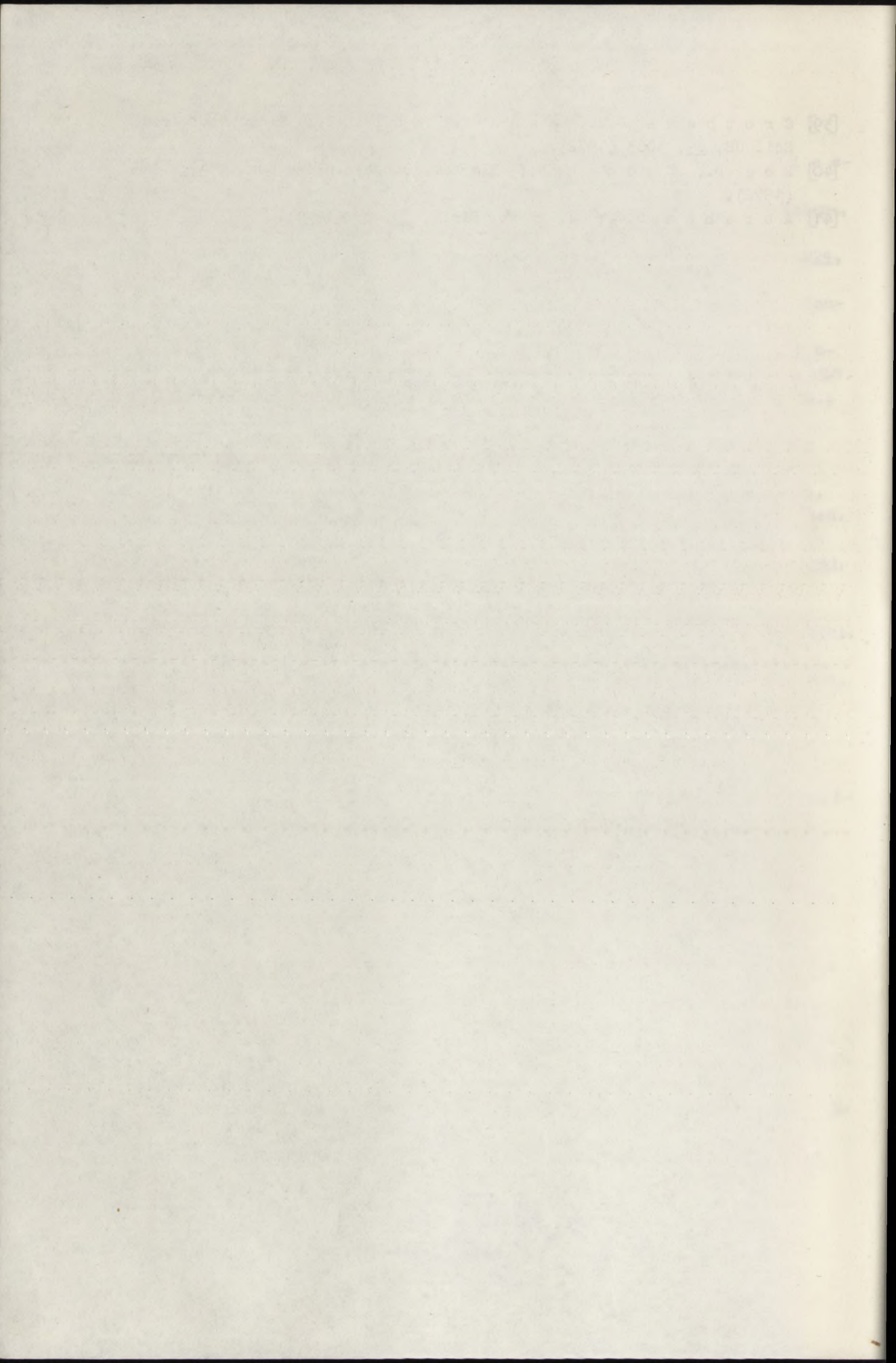
Ważną rolę w rozpoznawaniu tRNA mogą posiadać inne nukleozydy, wielkości różnych pętli modyfikowane zasady, drugo i trzeciorzędowa struktura. Wszystkie te czynniki wymagają dalszych badań.

#### L i t e r a t u r a

- [1] Blackburn G.M.; Ann. Reports 1970, 489,
- [2] Gabbay E.J., Sanford K., Baxter C.S.; Biochem., 11, 3429 (1972).
- [3] Staehelin M.; Experientia 27, 1 (1971).
- [4] Cramer F.; Progress in Nucleic Acid Research and Molecular Biology 11, 391 (1971) eds. J.N. Davidson i W.E. Cohn, Academic Press.
- [5] Dirheimer G., Ebel J.P., Bonnet J., Gangloff J., Keith G., Krebs B., Kuntzel B., Roy A., Weissenbach J., Werner C.; Biochimie, 54, 127 (1972).
- [6] Madison J.T.; Ann. Reports Biochem., 37, 131 (1968).
- [7] Levitt M.; Nature 224, 759 (1969).
- [8] Hall R.H.; The Modified Nucleosides in Nucleic Acid, Columbia University Press, 1971.
- [9] Zachau H.G.; Angew. Chem., 81, 645 (1969).
- [10] Jukes T.H., Gatlins J.; Progress in Nucleic Acid Research and Molecular Biology 11, 303 (1971) eds. J.N. Davidson i W.E. Cohn, Academic Press.
- [11] Lengyel P., Söll D.; Bacteriol. Rev., 33, 264 (1969).
- [12] Söll D.; Science, 173, 293 (1971).

- [13] Novelli G.D.; *Ann. Rev. Biochem.*, 30, 449 (1967).
- [14] Berg P., Bergmann F.H., Ofengang E.J., Dieckman M.; *J. Biol. Chem.*, 236, 726 (1961).
- [15] Santi D.V., Deneberg P.V., Satley P.; *Biochem.*, 10, 4804 (1971).
- [16] Loftfield R.B., Eigner E.A.; *J. Biol. Chem.*, 224, 1746 (1969).
- [17] Loftfield R.B.; w Protein Synthesis. Vol. 1 ed. E.Mc. Conkey New York, 1971.
- [18] Chambers R.W.; *Progress in Nucleic Acid and Molecular Biology* 11, 489, (1971) ed. J.N.Davidson, W.E. Cohn, Academic Press 1971.
- [19] Hashimoto S., Takemura S., Miyazaki M.; *J. Biochem.*, 72, 123 (1972).
- [20] Bhargawa P.M., Pallaiach T., Premkumar E.; *J. Theor. Biol.*, 29, 447 (1970).
- [21] Starr J.L., Sells B.H.; *Physiol. Rev.*, 49, 623 (1969).
- [22] Kuchino Y., Nishimura S.; *Biophys. Biochem. Res. Comm.*, 40, 306 (1970).
- [23] Streeter D.G., Lane B.G.; *Biochem. Biophys. Acta*, 199, 394 (1970).
- [24] Pegg A.E.; *FEBS Letters*, 22, 339 (1972).
- [25] Morgan A.R., Wells R.D., Khorana H.G.; *Proc. Natl. Acad. Sci. US*, 56, 1899 (1966).
- [26] Shulman L.H.; Chambers R.W.; *Proc. Natl. Acad. Sci. US*, 61, 308 (1968).
- [27] Danchin A.; *FEBS Letters* 13, 152 (1971).
- [28] Schmidt J., Buchardt B., Reid B.R.; *J. Biol. Chem.*, 245, 5743 (1970).
- [29] Dudock B.S., DiPeri C., Scileppi K., Reszelbach R.; *Proc. Natl. Acad. Sci. US*, 68, 681 (1971).
- [30] Roe B., Sirover M., Williams R., Dudock B.S.; *Archiv. Biochem. Biophys.*, 147, 176 (1971).
- [31] Samuelson G., Keller E.B.; *Biochem.*, 11, 30 (1972).
- [32] Litt M.; *Biochem.*, 10, 2223 (1973).
- [33] Litt M., Greenspan C.M.; *Biochem.*, 11, 1437 (1972).
- [34] Thiebe R., Harbers K., Zachau H.G., *Eur J. Biochem.*, 26, 144 (1972).
- [35] Mirzabekov A.D., Lastity D., Levina E.S.; Undritzov I.M., Bayev A.A.; *Mol. Biol.* 6, 87, (1972).
- [36] Zamir A., Holley R.W., Marquisee M.; *J. Biol. Chem.*, 240, 1267 (1965).
- [37] Johnson L., Hayashi H., Sull D.; *Biochem.*, 9, 2823 (1970).
- [38] Harada F., Sato S., Nishimura S.; *FEBS Letters*, 19, 352 (1972).

- [39] Crothers D.M., Seno T., Söll D.; Proc. Natl. Acad. Sci. US, 69, 3063 (1972).
- [40] Roe B., Dudock B.; Biochem. Biophys. Res. Comm., 49, 399 (1972).
- [41] Abraham D.J.; J. Theor. Biol., 30, 83 (1971).



## TRANSFEROWE KWASY RYBONUKLEINOWE, W KTÓRYCH WYSTĘPUJE 4-TIOURYDYNA, A ROZPOZNAWANIE tRNA PRZEZ AMINOACYLOSINTETAZĘ

### Streszczenie

Przedstawiono poglądy na rolę 4-tiourydyny - rzadkiego nukleozydu występującego w niektórych tRNA pochodzenia bakteryjnego. Podejrzenia, że może ona bezpośrednio uczestniczyć w rozpoznawaniu tRNA przez enzym nie zostały potwierdzone w przypadku najlepiej zbadanego tRNA<sup>Phe</sup> z *E.coli*. Obecnie sugeruje się, że 4-tiourydyna odgrywa dużą rolę w utrzymywaniu struktury trzeciorzędowej, głównie dlatego, że wiąże jony magnezu. Prawdopodobnie miejscem rozpoznania jest 5,6-dwuhydrourydyna.

### W s t ę p

4-tiourydynę znaleziono dotychczas w kilkunastu transferowych kwasach rybonukleinowych bakteryjnych (tabl. I).

Tablica I

tRNA <sup>Tyr</sup> <sub>1</sub>	<i>E.coli</i> (1,2,3,4,5,7)	tRNA <sup>Val</sup> <sub>2</sub>	<i>E.coli</i> (2)
tRNA <sup>Tyr</sup> <sub>2</sub>	<i>E.coli</i> (3)	tRNA <sup>Phe</sup>	<i>E.coli</i> (1,2,3)
tRNA <sup>Met</sup> <sub>1</sub>	<i>E.coli</i> (1,2,5,6)	tRNA <sup>Ser</sup> <sub>1</sub>	<i>E.coli</i> (2)
tRNA <sup>Met</sup> <sub>2</sub>	<i>E.coli</i> (3)	tRNA <sup>Trp</sup>	<i>E.coli</i> (2,5)
tRNA <sup>f</sup> <sub>1Met</sub>	<i>E.coli</i> (1,2,5,6)	tRNA <sup>Hys</sup>	<i>Salmonella typhimurium</i> (2,8)
tRNA <sup>f</sup> <sub>2Met</sub>	<i>E.coli</i> (3)	tRNA <sup>Gly</sup> <sub>1</sub>	<i>Staphylococcus ep.</i> (2,3)
tRNA <sup>Val</sup> <sub>1</sub>	<i>E.coli</i> (1,4,5)		

Nie znaleziono jej w kwasach transferowych innego pochodzenia. 4-tiourydyna zajmuje we wszystkich kwasach, w których ją wykryto, zawsze miejsce 8 licząc od końca 5', a ponadto w tRNA<sup>Tyr</sup><sub>1</sub> dodatkowo pozycję 9. W innych kwasach transferowych w miejscu 8 znajduje się urydyna. W związku z tym nasuwa się pytanie, jakie konsekwencje ma istnienie tionukleozydu w tym właśnie miejscu. Celem referatu jest przedstawienie prób odpowiedzi na to pytanie. Będzie to jednocześnie pretekstem do rozważań na temat rozpoznawania tRNA przez aminoacylosyntetazę.

Badacze pracujący nad problemem roli 4-tiourydyny są w tej szczęśliwej sytuacji, że jej absorpcyjne widmo nadfioletowe ma m.in. charakterystyczne dla wiązania C=S w układzie 4-tiouracylu, maksimum w rejonie 330-340nm (9), przejrzystym dla innych nukleozydów. Oprócz tego, grupa tiokarbonylowa jest bardziej reaktywna niż C=O (10) dzięki czemu można łatwo mody-

fikować 4-tiourydynę w tRNA w sposób selektywny. Jest to poważny atut w badaniach roli samej 4-tiourydynę w tRNA, pomocny także dla śledzenia zachowania się całej cząsteczki kwasu nukleinowego, ponieważ umożliwia łatwe doczepianie grup zwiększających fluorescencję, co pozwala na obserwację cząsteczek tRNA w mikroskopie fluorescencyjnym (11,12,13); przyłączanie grup dysocjujących na rodniki, co ma znaczenie dla analizy za pomocą elektronowego rezonansu paramagnetycznego, atomu ciężkiego - np. rtęci (14) - dla celów analizy rentgenowskiej, albo atomu promieniotwórczego (13). Odwracalne doczepianie grup zmieniających własności chromatograficzne (13) ułatwia rozdzielenie tRNA.

#### 4-TIOURYDYNA W TRANSFEROWYCH KWASACH NUKLEINOWYCH A ROZPOZNANIE tRNA PRZEZ ENZYM

Stulberg i Isham (15) badali zdolność fragmentów tRNA<sup>Phe</sup> o różnej długości do ulegania aminoacylacji. W zależności od stosowanej temperatury, trawienie tRNA za pomocą fosfodiesterazy z jadu węża dawało fragmenty kwasu o różnej długości łańcucha. Inaczej mówiąc, trawienie zatrzymywało się na pewnej granicy charakterystycznej dla danej temperatury do 26°, powyżej której trawienie było całkowite. Następnie badano hamowanie ładowania fenyloalaniny przez natywny tRNA w obecności 20-krotnego nadmiaru jego fragmentów o określonej długości. Stwierdzono:

- zahamowanie ładowania w ponad 60% przez fragmenty zhydrolizowane w 4,6% (co odpowiada utracie końcowych CCA),
- zahamowanie ładowania w ok. 40% przez fragmenty zhydrolizowane w 46 i 56%, co sugeruje, że fragment między 46 a 56% cząsteczki tRNA (zawierający m.in. antykodon) nie ma wpływu na rozpoznawanie przez aminoacylosyntetazę.

W identycznych warunkach badano konkurencję fragmentów tRNA<sup>Phe</sup> z natywnym tRNA<sup>Val</sup> w obecności walilosyntetazy. Nie zaobserwowano obniżenia zdolności przyłączania aminokwasu przez tRNA<sup>Val</sup>, co potwierdza specyficzność enzymu i miejsca rozpoznania.

Z tych faktów narzucał się najpierw najprostszy wniosek - rozpoznanie tRNA przez enzym zależy od specyficznej budowy pierwszorzędowej, a może nawet od kilku lub od jednego nukleozydu charakterystycznego dla danego kwasu transferowego, p r z y n a j m n i e j w p r z y p a d k u tRNA<sup>Phe</sup> E. c o l i. Miejsca rozpoznania lub chociaż jedno z miejsc rozpoznania, znajduje się we fragmencie obejmującym 44% cząsteczki od końca 5'. W rejonie tym znajdują się dwa rzadkie nukleotydy: 5,6-dwuhydrourydyna i 4-tiourydyna, które nie występują w pozostałych częściach cząsteczki. Stąd powstało przypuszczenie, że obydwa to nukleotydy lub jeden z nich, są odpowiedzialne za rozpoznanie tRNA przez syntetazę.

Kwestię tę rozstrzygnęłyby badania wpływu modyfikacji obu nukleotydów, a zwłaszcza każdego z nich z osobna na przyłączanie aminokwasu do tRNA. W następnej pracy Stulberg i Shugart (16) wykazali, że modyfikacja 5,6-

dwuhydrourydyny i 4-tiouryidyny w tRNA<sup>Phe</sup> E.coli za pomocą borowodoru sodu powoduje całkowitą utratę podatności tego tRNA na aminoacylowanie. Zatem zdawało się, że dla rozstrzygnięcia problemu wystarczy zaprojektować doświadczenie, które pozwoli na selektywną modyfikację tylko jednego z tych nukleozydów.

Podobne doświadczenia przeprowadzono tymczasem z innymi transferowymi kwasami rybonukleinowymi. I tak Cerutti (17) wykrył utratę zdolności ładowania aminokwasu tRNA<sup>Val</sup> nie zawierającego 4-tiouryidyny, w wyniku działania NaBH<sub>4</sub>, co wskazywałoby na dwuhydrourydnę jako miejsce rozpoznania. Jednak wiele innych transferowych RNA nie mających w swym składzie 4-tiouryidyny, a zawierających dwuhydrourydnę, po potraktowaniu NaBH<sub>4</sub> nie traciło zdolności akceptorowej (17,18). Może to być wynikiem reakcji, ale bardziej prawdopodobne jest tłumaczenie, że miejsce rozpoznania przez syntetazę jest różne dla różnych kwasów transferowych. Pogląd ten potwierdzałby fakt, że tRNA<sup>Val</sup> i dwie odmiany tRNA<sup>fMet</sup> zredukowane w podobnych warunkach, jak tRNA<sup>Phe</sup> E.coli (16), tracą tylko 17-20% aktywności akceptorowej. Wszystkie te kwasy mają w pozycji 8 4-tiouryidnę oraz dwuhydrourydnę w podobnym miejscu w cząsteczce. Fotochemiczne przekształcenie reszt 4-tiouryidyny do urydyny w tRNA<sup>Val</sup> powodowało 22% utratę zdolności przyłączania waliny (19). Pleiss i Cerutti (19) uważają, że 4-tiouryidyna nie jest tutaj specyficznym miejscem rozpoznania, ale jej rola polega prawdopodobnie na utrzymywaniu odpowiedniej struktury trzeciorzędowej.

Inny typ modyfikacji fotochemicznej 4-tiouryidyny tRNA<sup>Val</sup>, w wyniku czego tworzy się „dimer” 4-tiouryidyna-cytydyna, zmniejsza 3-krotnie (21), a niekiedy nawet 6-krotnie (22) ładowanie aminokwasu. Wskazywałoby to, że zakłócenie struktury trzeciorzędowej tRNA<sup>Val</sup> E.coli jest w tym wypadku szczególnie duże, jeżeli przyjąć, że budowa przestrzenna odgrywa decydującą rolę w procesie rozpoznawania syntetazy i ładowania aminokwasu.

tRNA<sup>Tyr</sup> E.coli modyfikowany bromocyjanem, co powoduje przekształcenie jego dwu reszt 4-tiouryidyny w urydnę, traci ok. 15% swej aktywności akceptorowej, przy czym CNBr działa tylko na 4-tiouryidnę (20).

Wracając do tRNA<sup>Phe</sup> - selektywne utlenianie reszt 4-tiouryidyny w sposób fotochemiczny do urydyny, powoduje tylko 9% utraty zdolności akceptorowej (14), co mogłoby z jednej strony wskazywać, że istotną rolę w rozpoznawaniu przez enzym odgrywa raczej dwuhydrourydyna. Jednak z drugiej strony zastanawiające jest większe zmniejszenie ładowania w przypadku modyfikacji chemicznej - za pomocą CNBr (35%) - również do urydyny. Może sposób modyfikacji wpływa na konformację tRNA? Mimo to Shugart uważa, że decydującą rolę w procesie rozpoznawania odgrywa dwuhydrourydyna.

W nowszej pracy grupy Shugarta (23) stwierdzono, że poniżej pewnego stężenia jonów magnezu zdolność akceptorowa tRNA gwałtownie spada, skąd wyciągnięto wniosek, że Mg<sup>++</sup> współdziała w utrzymywaniu odpowiedniej struktury przestrzennej. Za jedno z najbardziej prawdopodobnych miejsc wiązania metalu uznano właśnie 4-tiouryidnę.



Mimo, że niektóre typy modyfikacji 4-tiourydyny wpływają nieznacznie na zdolność ładowania fenyloalaniny, uważamy, że nie należy jeszcze zupełnie odrzucać możliwości, że tionukleozyd uczestniczy czynnie w procesie rozpoznania przez enzym obok dwuhydrourydyny. Problem rozwiązałaby być może selektywna modyfikacja tej ostatniej, czego jak dotąd nie dokonano.

Na marginesie warto dodać, że modyfikacje dwuhydrourydyny i 4-tiourydyny wskazują na ich nieosłonięte położenie w cząsteczce tRNA.

#### U w a g i   k o ń c o w e

1) Doświadczenie Stulberga i Ishama (15) sugeruje istnienie miejsca rozpoznania tRNA<sup>Phe</sup> E.coli przez fenyloalaninosyntetazę. Miejszem tym może być dwuhydrourydyna lub 4-tiourydyna. Dalsze eksperymenty grupy Sgurgarta wskazują na dwuhydrourydynę jako odpowiedzialną za ten proces.

2) Większość doświadczeń z różnymi tRNA wymaga założenia, że do rozpoznania konieczna jest konkretna specyficzna struktura trzeciorzędowa, a nieraz wręcz sugeruje się, że struktura trzeciorzędowa jest głównie odpowiedzialna za rozpoznanie. Wydaje się nam, że najsiłowniejszy jest pogląd głoszący istnienie kilku miejsc rozpoznania i konieczność określonej struktury przestrzennej.

3) Właśnie ta konieczność określonej struktury trzeciorzędowej tRNA w procesie rozpoznania powoduje, że modyfikacje 4-tiourydyny i dwuhydrourydyny mogą zakłócać ten proces z powodu zaburzenia budowy, a nie dlatego, że bezpośrednio w nim uczestniczą. Można by pójść jeszcze dalej i podejrzewać, że większość modyfikacji większości nukleozydów mogłaby ujemnie wpłynąć na rozpoznanie.

4) Sprzeczność między poszukiwaniem konkretnych miejsc rozpoznania, a wymogiem odpowiedniej struktury trzeciorzędowej można by rozwiązać przez założenie, że:

- albo we fragmentach tRNA<sup>Phe</sup> (15) zachowana jest struktura przestrzenna w rejonie pętli dwuhydrourydyny,
- albo istnieje możliwość odbudowy tej struktury na cząsteczce enzymu.

5) Wreszcie uwaga najbardziej trywialna - dość wysoka specyficzność procesu rozpoznania wymaga przyjęcia tezy, że dla każdego układu tRNA - jego aminoacylosyntetaza proces ten wygląda inaczej i może zatrudniać różne czynniki.

#### L i t e r a t u r a

- [1] Z a c h a u H.G.; *Angew. Chem.* 81, 645 (1969).
- [2] D r i e i m e r G.; *Biochemie* 54, 127 (1972).
- [3] D u n n D.B., H a l l R.H.: w: *Handbook of Biochemistry*" (red. A. Sober) The Chemical Rubber Co, Cleveland, Ohio, 1970 (wyd. II), s.H 128.

- [4] Janion C.; Post Biochem. 17, 631 (1971).
- [5] Staehlin M.; Experientia 27, 1 (1971).
- [6] Neelon F.A., Molinaro M., Ishikura H., Sheiner L.B. i Cantoni G.L.; J. Biol. Chem. 242, 4515 (1967).
- [7] Cramer F., Doepner H., Haar F.v.d., Schimme E. i Seidel H.; Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 61, 1384 (1968).
- [8] Singer C.E., Smith G.R.; J. Biol. Chem. 247, 2989 (1972).
- [9] Lipset M.N.; J. Biol. Chem. 240, 3975 (1965).
- [10] Nenitescu C.D.; Chemia organiczna t. I, PWN, Warszawa 1967 s. 707.
- [11] Favre A., Michelson A.M. i Yaniv M.; J. Mol. Biol. 58, 367 (1971).
- [12] Secrist J.A. III, Barrio J.R. i Leonard N.J.; Biochem. Biophys. Res. Commun. 45, 1262 (1971).
- [13] Saneyoshi M.; Biochem. Biophys. Res. Commun. 40, 1501 (1970).
- [14] Shugart L.; Archiv. Biochem. Biophys. 148, 488 (1972).
- [15] Stulberg M.P., Isham K.R.; Proc. Nat. Acad. Sci. USA 57, 1310 (1967).
- [16] Shugart L., Stulberg M.P.; J. Biol. Chem. 244, 2806 (1969).
- [17] Cerutti P.A.; Biochem. Biophys. Res. Commun. 30, 434 (1968).
- [18] Molinaro M., Sheiner L.B., Neelon F.A. i Cantoni G.L.; J. Biol. Chem. 243, 1277 (1968).
- [19] Pleiss M.G., Cerutti P.A.; Biochemistry 10, 3093 (1971).
- [20] Walker R.T., Rajbhandary U.L.; Biochem. Biophys. Res. Commun. 38, 907 (1970).
- [21] Favre A., Yaniv M. i Michelson A.M.; Biochem. Biophys. Res. Commun. 37, 266 (1969).
- [22] Yaniv M., Chestier A., Gros F. i Favre A.; J. Mol. Biol. 58, 381 (1971).
- [23] Pal B.C., Shugart L.R., Isham K.R. i Stulberg M.P.; Archiv. Biochem. Biophys. 150, 86 (1972).

- [4] ...
- [5] ...
- [6] ...
- [7] ...
- [8] ...
- [9] ...
- [10] ...
- [11] ...
- [12] ...
- [13] ...
- [14] ...
- [15] ...
- [16] ...
- [17] ...
- [18] ...
- [19] ...
- [20] ...
- [21] ...
- [22] ...
- [23] ...
- [24] ...
- [25] ...
- [26] ...
- [27] ...
- [28] ...
- [29] ...
- [30] ...
- [31] ...
- [32] ...
- [33] ...
- [34] ...
- [35] ...
- [36] ...
- [37] ...
- [38] ...
- [39] ...
- [40] ...
- [41] ...
- [42] ...
- [43] ...
- [44] ...
- [45] ...
- [46] ...
- [47] ...
- [48] ...
- [49] ...
- [50] ...

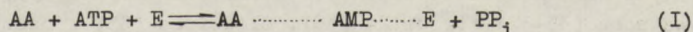
## AMINOACYLO - tRNA SYNTETAZY. IZOLACJA, CHARAKTERYSTYKA I UDZIAŁ W REAKCJI AMINOACYLACJI tRNA

### Streszczenie

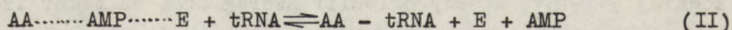
Przedmiotem artykułu jest charakterystyka statyczna i dynamiczna aminoacylo-tRNA syntetaz - enzymów odpowiedzialnych za łączenie tRNA z właściwymi aminokwasami. Charakterystykę dynamiczną połączono z omówieniem wpływu różnych czynników na reakcję aminoacylacji tRNA i dyskusją dwóch głównych propozycji mechanizmu tej reakcji. Szeroko omówiono metodykę izolacji syntetaz z materiału biologicznego, ze szczególnym uwzględnieniem metod specyficznej izolacji. Opis procedury oczyszczania zakończono przedstawieniem kryteriów czystości.

### I W s t ę p

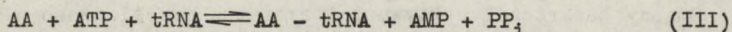
Pierwszą reakcją, rozpoczynającą biosyntezę białka *in vivo*, jest aminoacylacja tRNA. Proces ten polega na wyborze odpowiednich aminokwasów przez specyficzne tRNA i przeniesieniu ich na rybosomy, gdzie aminokwasy stają się substratami do budowy łańcucha polipeptydowego. Wyjaśnienie podstaw aminoacylacji tRNA stanowi wstęp do poznania mechanizmu biosyntezy białka. Badania nad aminoacylacją tRNA, podjęte w połowie lat pięćdziesiątych (1-3) wykazały, że jest to proces enzymatyczny i obejmuje reakcję aktywacji aminokwasu z udziałem ATP (reakcja I)



a następnie przeniesienie zaktywowanego aminokwasu na tRNA i wytworzenie wiązania estrowego z wolną grupą 2'-hydroksylową adenozyiny (4), znajdującą się na końcu 3' cząsteczki tRNA (reakcja II).



Ten etap nosi nazwę reakcji przeniesienia. Sumarycznie proces aminoacylacji tRNA obejmuje reakcja III (5).



Dokładny przebieg reakcji zostanie przedyskutowany w dalszej części artykułu.

Celem artykułu jest przedstawienie aktualnego stanu wiedzy na temat własności enzymów uczestniczących w tym procesie, metod ich izolacji i mechanizmu aminoacylacji tRNA.

Omawiane enzymy aktywujące (E.C.6.1.1.-) należą do grupy ligaz a ich nazwa systematyczna brzmi następująco: aminokwas: tRNA ligaza (AMP). Po-

\* obecny adres: Zakład Genetyki Człowieka PAN, ul. Święcickiego 6, 60-781 POZNAŃ

\*\* obecny adres: Międzywydziałowy Instytut Ochrony Pracy UAM, ul. Kantaka 4, 61-812 POZNAŃ

nieważ w absolutnie przeważającej większości prac używa się nadal nazwy aminoacylo-tRNA syntetazy, toteż w toku artykułu będzie stosowana nazwa dawna lub jej forma skrócona „syntetazy”.

## II WYSTĘPOWANIE I IZOLACJA SYNTETAZ

### II.1. Przegląd źródeł oczyszczonych syntetaz

Ponieważ dotąd nie stwierdzono nieenzymatycznej aminoacylacji *in vivo* więc zakłada się, że syntetazy występują we wszystkich organizmach syntetyzujących białko (6), a duże ich ilości zawierają tkanki o intensywnej biosyntezie białka (7).

Dotychczas wyizolowano cały szereg syntetaz o różnym stopniu oczyszczenia, przy czym najwięcej prac wykonano na materiale bakteryjnym. I tak najliczniejsza grupa syntetaz pochodzi z *Escherichia coli* (8-16); ponadto syntetazy izolowano z *Bacillus subtilis* (17), *Salmonella typhimurium* (18, 19), *Bacillus stearothermophilus* (20,21) i *Halobacterium cutirubrum* (22). Wyższymi w hierarchii ewolucyjnej organizmami, z których izolowano syntetazy są glony. Niefrakcjonowaną mieszaninę syntetaz otrzymano z *Anacystis nidulans* (23).

W ścisłym związku przyczynowym z badaniami nad strukturą i funkcją tRNA pozostaje grupa syntetaz izolowanych z drożdży piekarniczych (24-31) i browarnianych (32). Szerokiego materiału porównawczego dostarczyły syntetazy pochodzenia zwierzęcego. Opisano syntetazy izolowane z owadów (33, 34) i tkanek ssaków. Najczęściej źródłem enzymów były następujące organy: wątroba (35-37), trzustka (38), śledziona (35) i naczynia krwionośne (39).

Stosunkowo najmniej uwagi poświęcono syntetazom pochodzenia roślinnego. Badania wykonane przed rokiem 1972 omówili Lea i Norris (40). W Polsce badania nad syntetazami roślinnymi rozwinięli Pawełekiewicz i współpracownicy (41-45), którzy ogłosili szereg prac na temat izolacji i charakterystyki syntetaz z nasion łąbinu żółtego (*Lupinus luteus* L.). Źródłem syntetaz roślinnych oprócz nasion (41-46) były siewki (47), liścienie (48, 49) i korzenie (50,51).

Zmiany zawartości i aktywności syntetaz prześledzono w wybranych organach zwierzęcych (52) i roślinnych (51, 53). Syntetazy znajdowano głównie w cytoplazmie, co jest zgodne z dotychczasowymi ustaleniami na temat biosyntezy białka. Nie brak jednak prac, które wykazują obecność syntetaz w innych organellach komórkowych. I tak wykryto syntetazy w chloroplastach i mitochondriach komórek z różnych źródeł (54, 55). Vennegoor i Bloemendal (56) zlokalizowali syntetazy we frakcji mikrosomalnej i postmikrosomalnej homogenizatu wątroby szczura.

### II.2. Klasyczne metody izolacji i oczyszczania syntetaz

Wydzielanie syntetaz z materiału biologicznego w najogólniejszym schemacie jest podobne do izolacji większości produktów naturalnych i obejmuje:

- przygotowanie materiału biologicznego,
- ekstrakcję,
- odrzucenie substancji balastowych,
- frakcjonowanie.

Ze względu na termolabilność większości syntetaz oraz w celu obniżenia aktywności czynników proteolitycznych izoluje się je w temperaturze 0-4 st. C. Wyjątek stanowi izolacja syntetaz z bakterii termostabilnych (20). Punktem wyjścia do izolacji syntetaz z materiału biologicznego jest zniszczenie błon komórkowych osiągane na drodze homogenizacji (29,37), autolizy toluenowej (23, 28) lub acetonowej (36).

Z tak przygotowanego materiału ekstrahuje się syntetazy buforowanymi roztworami wodnymi. Najczęściej stosuje się bufor fosforanowy (15, 20, 24, 26, 43) i trisowy (28, 29, 48, 49) z dodatkiem EDTA, soli magnezu i związków z grupami sulfhydrylowymi jak 2-merkaptoetanol, glutation itp. Te ostatnie dzięki niskiemu potencjałowi redukcyjno-oksydacyjnemu zabezpieczają grupy sulfhydrylowe enzymu. Dodatkowo, w oparciu o spostrzeżenia Muencha i Berga (57), stosuje się dodatek 10-50% glicerolu, posiadającego zdolność stabilizowania enzymu.

Zwrócono uwagę na siłę jonową buforów ekstrakcyjnych, ustalając zależność między siłą jonową, a proporcjami syntetaz w ekstrakcie. W granicznych przypadkach możliwa jest selektywna ekstrakcja wybranej syntetazy. Wnioski dotyczą ekstraktów łubinowych, lecz niewykluczony jest ich ogólniejszy charakter (58). Surowy ekstrakt zawiera znaczne ilości materiału balastowego, do którego usuwania opracowano szereg metod. Większość substancji balastowych odrzuca się podczas frakcjonowania siarczanem amonu. Najwięcej kłopotów sprawia dokładne usunięcie kwasów nukleinowych, tworzących kompleksy z syntetazami. W celu usunięcia kwasów nukleinowych stosowano trawienie rybonukleazami (15, 24), wytrącanie objętościowymi kationami, np. streptomycyną (31, 34), rozdział na DEAE-celulozie (15, 26, 31). Niekiedy specyficzne własności materiału biologicznego pozwalały na oddzielenie kwasów nukleinowych. Charlier i Grosjean (20) wykorzystali termostabilność syntetaz z *B. stearothermophilus* i ogrzali ekstrakt do 65°C, co spowodowało denaturację i wypadnięcie z roztworu kwasów nukleinowych. Natomiast Norris i Fowden (59) oparli się na zjawisku chronienia syntetazy przed inaktywacją termiczną substratami (patrz niżej). W obecności wybranego aminokwasu, po podgrzaniu roztworu, następowała denaturacja syntetaz z wyjątkiem specyficznej dla dodanego aminokwasu.

Schemat otrzymywania indywidualnej syntetazy obejmował frakcjonowanie siarczanem amonu (większość cytowanych prac) lub acetonem (48, 49) oraz kombinacje różnych metod chromatografii kolumnowej i sączenia żelowego. Stosowano chromatografię jonowymienną na DEAE-celulozie (24, 30, 32, 43, 60), fosfocelulozie (24, 31, 37, 60), CM-celulozie (26), hydroksyloapatycie (15, 28, 29, 30, 60) i innych wymiennaczach a sączenie żelowe na siatach molekularnych typu Sephadex (29, 31, 37, 56) i Biorex (28). Do ostatecznego oczyszczenia posługiwano się elektroforezą żelową (30) i elektroogniskowaniem (electrofocusing) (7).

Stosowanie każdej z tych technik stwarza niebezpieczeństwo denaturacji enzymu poprzez usunięcie ewentualnych podjednostek białkowych, zmiany konformacyjne lub chemiczne (powstawanie artefaktów). Problem wyboru technik polega więc na odnalezieniu technik „bezpiecznych” dla badanego enzymu.

### II.3. Ostatnie osiągnięcia w dziedzinie oczyszczania syntetaz

W ostatnim okresie wiele uwagi poświęcono metodom pozwalającym na selektywną izolację wybranej syntetazy. W tym celu wykorzystano specyficzne oddziaływania między syntetazą a jej substratami. Metoda rozdzielania oparta na specyficznych oddziaływaniach z substratami przyjęła nazwę chromatografii powinowactwa (affinity chromatography). Technikę rozdzielania syntetaz metodą chromatografii powinowactwa opracowali Cuatrecasas i wsp. (61, 62). Zaproponowali, by na nierozpuszczonym podłożu (np. Sepharozie) osadzić aminokwas w sposób eksponujący grupę aminową. Aminokwas związany z podłożem grupą karboksylową za pośrednictwem polimetylenodwuaminy służył do zatrzymywania własnej syntetazy także w doświadczeniach Robert-Gero i Wallera (63) oraz Forrestera i Hancocka (64). Cramer i wsp. (26) stosowali modyfikowaną tyrozyne, osadzoną na kopolimerze kwasu maleinowego i eteru dwuwinylowego butanodiolu. Natomiast Bartkowiak i Pawełekiewicz (44) oraz Nelidowa i Kisielew (65) użyli specyficznych tRNA osadzonych na nośniku, do wydzielania odpowiednich syntetaz. Pewne szczegóły eksperymentalne wymienionych prac, umożliwiające porównanie metod pracy i wyników, zebrano w tablicy nr 1.

Tablica I

Oczyszczanie syntetaz metodami chromatografii powinowactwa

Enzym	Pochodzenie	Stopień oczyszczenia	Nośnik	Modyfikacja nośnika	Literatura
Met	E.coli	31 ×	Sepharoza 4B	$\sim\text{NH}-(\text{CH}_2)_6\text{-NH-Met}$	63
Ile	E.coli	27, 5 ×	Sepharoza 4B	$\sim\text{NH}-(\text{CH}_2)_4\text{-NH-tRNA}^{\text{Ile}}$	44
Tyr	S.serevisiae	5 ×	Kopolimer handlowy	$\sim\text{NH}-(\text{CH}_2)_6\text{-NH-Tyr}^*$	26
Fen	S.serevisiae	~100%	Sepharoza 4B	$\sim\text{NH}-(\text{CH}_2)_2\text{-NH-tRNA}^{\text{Fen}}$	67
Fen	E.coli	~90%	Sepharoza 4B	$\sim\text{NH}-(\text{CH}_2)_5\text{CO-NH-NH-CO-}(\text{CH}_2)_5\text{-NH-CO-Fen}$	64
Liz	E.coli	90 ×	Agarozą		65
Wal	E.coli	30 ×	Agarozą		65

Metoda chromatografii powinowactwa pozwala na kilku do kilkudziesięciokrotne oczyszczenie syntetazy, przy czym krotność wzbogacenia zależy m.in. od stopnia dotychczasowego oczyszczenia (44, 63, 66).

Wadą metody jest obecność wielu grup polarnych, co nadaje wypełnieniu niepożądany charakter wymiennacza jonowego (26, 66). Bardziej szczegółowe badania na ten temat podjęto w pracowni Ebela (67), gdzie stwierdzono, że mogą istnieć trzy rodzaje oddziaływań między tRNA a rozdzielanymi enzymami:

- oddziaływania wspólne dla wszystkich RNA (decydują o zatrzymaniu na kolumnie enzymów, rozpoznających ogólne własności RNA, np. rybonukleaz),
- oddziaływania wspólne dla wszystkich tRNA (zatrzymują enzymy rozpoznające ogólne własności tRNA, np. ATP-CTP-nukleotydylotransferazy, metylazy),
- oddziaływania charakterystyczne dla określonego tRNA.

W przypadku tRNA<sup>Fen</sup> z drożdży piekarniczych nawet ta ostatnia grupa oddziaływań może spowodować pozostanie na kolumnie, oprócz Fen-tRNA, także innych enzymów, np. odpowiedzialnych za syntezę zasady Y.

W rezultacie takich rozważań autorzy prowadzili dwustopniową chromatografię. Najpierw posługiwali się kolumną zawierającą Sepharozę związaną z pulą tRNA, pozbawioną tRNA<sup>Fen</sup> i dopiero w drugim etapie używali kolumny wypełnionej Sepharozą związaną z tRNA<sup>Fen</sup>.

Monograficzne opracowanie na temat chromatografii powinowactwa podali Cuatrecasas i Anfinsen (66).

Poszukiwanie doskonalszych metod oczyszczania syntetaz przyniosło kolejne rozwiązanie. Von der Haar (68) zaproponował technikę, którą nazwał "affinity elution". Podstawą metody jest naniesienie na kolumnę mieszaniny syntetaz i innych enzymów, wiążących się niespecyficznie z podłożem i następnie wymywanie wybranego enzymu roztworem jego substratów (AA, tRNA<sup>AA</sup>, AA-tRNA<sup>AA</sup>). Silniejsze oddziaływanie syntetazy z substratami niż z podłożem zdecydowało o skuteczności metody. Metoda Von der Haara, która w cytowanym przypadku pozwoliła na około trzydziestokrotne podczyszczenie niektórych syntetaz, jest rutynowo stosowana w pracowni Cramera (4). Jakubowski i Pawełekiewicz (45) wprowadzili chromatografię hydrofobową, nie stosowaną dotychczas w tej grupie związków, do oczyszczania szeregu syntetaz z nasion łubinu żółtego. Wykazali, że syntetazy oddziałują z aminoalkilo-Sepharozą na zasadzie sił hydrofobowych, a siła wiązania zależy m.in. od długości ramienia alkilowego i od struktury syntetazy. Łącznie z frakcjonowaniem siarczanem amonu osiągnięto 20-370-krotne oczyszczenie w stosunku do surowego ekstraktu. Metoda jest szczególnie przydatna do oczyszczania Fen-tRNA syntetazy z nasion łubinu, wobec której zawiody inne metody izolacji.

#### II.4. Kryteria czystości syntetaz

Bezpośrednie porównanie stopnia oczyszczenia różnych syntetaz jest utrudnione ze względu na brak jednolitego kryterium czystości.

Większość prac podaje krotność oczyszczenia syntetazy w stosunku do materiału wyjściowego, która dla wysokooczyszczonych preparatów ma war-



tość od 350 do ponad 2000. Wielkość ta wskazuje stopień wzbogacenia preparatu w syntetazę i jest w oczywisty sposób zależna od jej pierwotnej zawartości w materiale biologicznym. Znaczy to, że nie tylko nie charakteryzuje czystości preparatu lecz także jest całkowicie nieporównywalna.

Ilościowe testy służące do oceny czystości syntetaz opierają się na pomiarach kinetycznych jednej z trzech reakcji:

- tworzenia aminoacylo-tRNA,
- wymiany  $PP_i \rightleftharpoons ATP$ ,
- tworzenia aminoacylo-hydroksamatów.

Praktycznie stosuje się znaczone trytem,  $^{14}C$  i  $^{32}P$  aminokwasy oraz ATP, a pomiar sprowadza się do określenia radioaktywności końcowego produktu reakcji. Aktywność specyficzną indywidualnej syntetazy, w oparciu o reakcję tworzenia aminoacylo-tRNA, definiuje się jako ilość moli aminokwasu włączonych do określonej ilości tRNA w jednostce czasu wobec jednostkowej ilości syntetazy.

W celu porównania aktywności specyficznej różnych syntetaz Loftfield (7, 69) obliczał liczbę obrotów. Gangloff i Dirheimer (30) zwrócili jednak uwagę, że liczba obrotów jest wartością niepewną wskutek nieznanomości optymalnych, dla danego układu, warunków aminoacylacji. Wymóg ten został spełniony tylko w nielicznych warunkach (patrz niżej).

Niezależnym ale koniecznym kryterium czystości jest wynik elektroforezy dyskowej. Metoda ta dostarcza ocenę jednorodności preparatu i pozwala na wykrycie ewentualnych związków zanieczyszczających. Należy przy tym pamiętać, że w warunkach elektroforezy dyskowej na żelu poliakrylamidowym następuje dysocjacja enzymu a ilość prążków zależy od ilości i wielkości podjednostek białkowych. W niektórych przypadkach otrzymanie pojedynczego pasma na elektroforegramie świadczy nie o wysokiej czystości preparatu lecz o denaturacji enzymu (24).

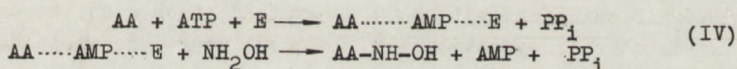
Część autorów sceptycznie odnosi się do deklarowanej w pracach wysokiej czystości syntetaz. Chambers i wsp. (70, 71) dowodzą obecności nukleaz nawet w wysoko-oczyszczonych preparatach. Ponieważ obecność nukleaz uniemożliwia precyzyjne pomiary kinetyczne, to opracowali oni metodę izolacji z drożdży syntetazy tyrozylowej wolnej od nukleaz (31). Z kolei Deutscher i Bandyopadhyay (72, 73) zbadali surowe ekstrakty syntetaz z wątroby szczura i stwierdzili, że występowały one w postaci stosunkowo trwałych kompleksów z lipidami, które stanowiły 20-25% całości kompleksu. Uwolnienie syntetazy od lipidów następowało dopiero podczas wyższych etapów oczyszczania.

### III CHARAKTERYSTYKA SYNTETAZ

#### III.1. Specyficzność syntetaz

Funkcja syntetaz polegająca na rozpoznaniu właściwego aminokwasu i przeniesieniu go na odpowiedni tRNA wyznacza daleko posuniętą specyficzność, dotyczącą zarówno aminokwasu, jak i tRNA.

W niektórych organizmach udało się ustalić obecność kilku frakcji enzymatycznych, różniących się własnościami a wykazujących aktywność biologiczną dla tego samego aminokwasu. Cowless i Key (50) wykazali obecność dwóch form Tyr-tRNA syntetazy w korzeniach grochu, różniących się ciężarem cząsteczkowym. Baturina (70, 74), pracując nad wysoko-oczyszczonym preparatem Liz-tRNA syntetazy z *E. coli* wykryła obecność dwóch form o identycznym ciężarze cząsteczkowym lecz różniących się własnościami chromatograficznymi na hydroksyloapatycie oraz reaktywnością wobec ATP. Tak więc różnice między formami tej samej syntetazy dotyczą nie tylko własności fizycznych lecz także reaktywności chemicznej. Następnego przykładu dostarczyła, konkurencyjna w stosunku do aminoacylacji tRNA, reakcja rozkładu enzymatycznego ATP wobec hydroksyloaminy (reakcja IV)



Część syntetaz katalizowała to przejście tylko wobec tRNA. Okazało się, że syntetazy tego typu można rozdzielić na dwie formy, z których jedna istotnie działa tylko wobec tRNA, a druga jest aktywna także pod nieobecność tRNA (75). Odkrycie degeneracji kodu genetycznego i izoakceptorowych tRNA postawiło problem, jak daleko posunięta jest heterogenność syntetaz. Spowodowało to podjęcie badań nad aminoacylacją izoakceptorowych tRNA; najczęściej opierano się na 6 leucynowych tRNA i ich syntetazach. Anderson i Cherry (47) izolowali tRNA i syntetazy specyficzne dla leucyny z siewek soi. Stwierdzili, że oczyszczony preparat Leu-tRNA syntetazy katalizuje włączenie leucyny tylko do tRNA<sup>Leu</sup><sub>1-4</sub>, podczas gdy tRNA<sup>Leu</sup><sub>5,6</sub> nie są aminoacylowane. Wynik ten potwierdzili Bick i Strehler (46) dla leucynowych tRNA syntetaz z nasion soi. Natomiast we frakcji Leu-tRNA syntetazy z *E. coli* nie wykryto różnic pod względem aminoacylacji tRNA z tego źródła (76). tRNA<sup>Met</sup> i tRNA<sup>Met</sup> z *E. coli*, różniące się w sposób istotny funkcją aminoacyluje ta sama syntetaza (77,78). Również u innych tRNA w większości przypadków stwierdzono aminoacylację izoakceptorowych tRNA tą samą syntetazą (15, 79, 80, 81). Na podstawie licznych przykładów Kissielew i Baturina (74) postawili hipotezę o występowaniu jednej syntetazy dla izoakceptorowych tRNA w organizmach prokariotycznych i zróżnicowaniu syntetaz w organizmach eukariotycznych.

Badania nad specyficznością syntetaz poszły również w kierunku poszukiwań różnic pomiędzy syntetazami z różnych tkanek tego samego organizmu. Wykazano między innymi, że tRNA<sup>Leu</sup> z wątroby królika (82) reaguje w sposób ograniczony z syntetazą z serca królika. Podobne fakty odnotowano też wśród syntetaz roślinnych (40). Znaleziono również istotne różnice pomiędzy syntetazami izolowanymi z różnych organellów komórki. Epler i wsp. (83, 84) wykazali specyficzność mitochondrialnej syntetazy właściwej dla metioniny w reakcji z mitochondrialnym tRNA z *Neurospora crassa* i *E. coli*.

Specyficzność organellową syntetaz potwierdzili Guderian i wsp. (54), którzy badali szereg syntetaz i tRNA z liści *Nicotiana tabacum*, oraz Kislev i wsp. (55) dla syntetaz i tRNA z *Euglena gracilis*. W pracy Kisleva wykazano ponadto, że poszczególne syntetazy z tego samego źródła różnią się własnościami katalitycznymi w układzie heterologicznym. Wykrycie specyficzności syntetaz spowodowało podjęcie badań nad aminocylacją tRNA w układzie heterologicznym tzn. aminoacylacją tRNA przez obcą syntetazę. Wyniki badań opublikowanych przed rokiem 1971 zebrał Jacobson w pracy przeglądowej (85). Po odkryciu wysokiej specyficzności syntetaz stwierdzenie aminoacylacji w układzie heterologicznym było nieoczekiwane.

O ile początkowo w pracach na temat aminoacylacji w układzie heterologicznym ograniczono się do rejestracji faktu oraz pomiaru stałych szybkości i stopnia aminoacylacji, to w ostatnich latach opublikowano szereg prac krytycznych i syntetycznych. Zwrócono uwagę, że wiele doświadczeń wykonano w środowisku różnym od fizjologicznego a odpowiedni dobór warunków umożliwia aminocylację w dowolnym układzie heterologicznym (86-88).

Próbie wytłumaczenia zjawiska aminoacylacji w układzie heterologicznym z punktu widzenia mechanizmu biosyntezy białka podjął Yarus (89, 90). Badając Ile - i Fen-tRNA syntetazy z *E. coli* stwierdził m.in. możliwość powstania Ile-tRNA<sup>Fen</sup>.

Okazało się jednak, że w obecności Fen-tRNA syntetazy następuje odaminocylowanie izoleucyny i wtórna aminoacylacja fenyloalaniną. Tak więc *in vivo* syntetaza rozpoznaje błędy w aminoacylacji, likwiduje niewłaściwe połączenia i współdziała w kierunku tworzenia prawidłowych. Zdaniem Yarusy cecha ta może mieć charakter powszechny. Doświadczenia i wnioski Yarusy są częściowo zbieżne ze spostrzeżeniami Kondo i Woesea (91), którzy odkryli, że Leu-tRNA syntetaza z *E. coli* reaguje nie tylko z leucyną lecz także z izoleucyną i waliną, ale tylko kompleks z leucyną jest przenoszony do cząsteczki tRNA.

Z drugiej strony odkrycie i interpretacja zjawiska deaminoacylacji nieprawidłowych połączeń, podane przez Yarusę, stoją w sprzeczności z wynikami badań Ritlera i Jacobsona (92) również opublikowanymi w roku 1972. Badania wykonane na kilku syntetazach oraz tRNA z *Neurospora crassa* i *E. coli* wykazały, że syntetazy w rozmaity sposób kierują reakcją odwrotną (deaminoacylacją)

Fen-tRNA syntetaza z *E. coli* rozkładała Fen-tRNA<sup>Wal</sup> i Wal-tRNA<sup>Fen</sup> a Wal-tRNA syntetaza powodowała tylko rozkład prawidłowego połączenia Wal-tRNA<sup>Wal</sup>. W świetle odkryć Ritlera i Jacobsona hipotezę Yarusy należy uznać za przedwczesne uogólnienie.

Badania nad aminoacylacją w układzie heterologicznym przyniosły także wnioski o charakterze ewolucyjnym. Anderson (35) wykazując aminoacylację tRNA<sup>Ala</sup> przez Ala-tRNA syntetazy z różnych organizmów sugerował niezmienną ewolucyjną miejsca rozpoznawania Ala-tRNA syntetazy na tRNA. Jak dotąd brak jest prac, które by potwierdziły lub negowały dosyć nieoczekiwane odkrycie Andersona. Podobny wniosek sformułowali Migita i Doi (93),

którzy badali tRNA<sup>fMet</sup> z prokariotów i z mitochondriów eukariotów. Dalszym ich wnioskiem była hipoteza o niezmienności ewolucyjnej mechanizmu inicjacji biosyntezy białka. Jeszcze dalsze wnioski wyprowadzili Merrich i Dure (53) po serii doświadczeń nad aminoacylacją roślinnych, chloroplastowych tRNA bakteryjnymi syntetazami. Zaproponowali, by stopień aminoacylacji w takim układzie uznać za ilościowy miernik dystansu ewolucyjnego między organizmami.

### III.2. Budowa syntetaz

Syntetazy wykazują znaczne zróżnicowanie budowy, uwidaczniające się zarówno w wielkości cząsteczek, jak i w budowie IV-rzędowej. Dane charakteryzujące budowę wybranych syntetaz zebrano w tablicy 2.

Tablica II

Informacje o budowie wybranych syntetaz

Enzym	Pochodzenie	Ciężar cząsteczkowy	Typ budowy	Literat.
Asp	drożdże piek.	100 000	$\alpha$	30
Asp	"	113 000		28
Asp	wątroba królika	70/76 000	$\alpha_2$	36
Fen	E.coli	181 000	$\alpha_4$	99
Fen	Euglena gracilis	65 000		99
Fen	drożdże piek.	236/276 000	$\alpha_2\beta_2$	29
Fen	Drosophila melanogaster	181/200 000		34
Fen	wątroba szczura	180 000	$\alpha_4$	37
Glu	E.coli	102 000	$\alpha\beta$	12
Ile	E.coli	112 000		8,94
Ile	E.coli	105 000	$\alpha$	11
Ile	B.stearothermophilus	110 000	$\alpha$	20
Leu	drożdże piek.	120 000	$\alpha_2$	95
Leu	Drosophila melanogaster	75 000		34
Liz	E.coli	100 000		10
Liz	drożdże piek.	112 000	$\alpha$	96
Met	E.coli	43 000	$\alpha\beta$	13
Met	E.coli	172 000	$\alpha_4$	97,98
Ser	drożdże piek.	115-120 000	$\alpha_2$	24
Try	trzustka wołu	108 000	$\alpha_2$	38
Tyr	E.coli	95/ 97 000	$\alpha_4$	14,16
Tyr	B.subtilis	88 000		14
Tyr	drożdże piek.	40/46 000	$\alpha$	26
Tyr	drożdże piek.	116 000	$\alpha_4$	31
Wal	E.coli	110 000	$\alpha$	11

Ciężary cząsteczkowe wahają się w granicach od ok. 40 000 do prawie 300 000. Wzrost wielkości nie powoduje równoczesnego skomplikowania budo-

wy IV-rzędowej. Met-tRNA syntetaza z *E.coli* ma ciężar cząsteczkowy zaledwie 43 000 a mimo to składa się z dwóch łańcuchów o ciężarach cząsteczkowych 32 000 i 11 000 (13), podczas gdy trzykrotnie większe syntetazy: walinowa i izoleucynowa z *E.coli* składają się tylko z jednego łańcucha peptydowego (11).

Należy tutaj zaznaczyć, że wartości ciężarów cząsteczkowych publikowane przez różne zespoły często znacznie różnią się. Częściowo jest to powodowane stosowaniem różnych technik (sączenie żelowe, wirowanie w gradiencie stężeń, elektroforeza dyskowa), częściowo różnicami w preparatyce i stopniu oczyszczania syntetaz. Niejednolicie ocenia się także agregację cząsteczek, np. w przypadku Met-tRNA syntetazy z *E.coli* część autorów uważa, że aktywna jest jednostka o ciężarze cząsteczkowym 43 000 (13), podczas gdy inne prace dowodzą, że dopiero tetramer jest właściwym enzymem (97, 98).

Syntetazy wykazują skłonność do dalszej agregacji bez utraty aktywności (69, 73). Przytoczone w tabeli II ciężary cząsteczkowe dotyczą najmniejszych, biologicznie aktywnych indywidualów. Nie udało się znaleźć ścisłej korelacji między budową a pochodzeniem i specyficznością syntetaz.

W składzie aminokwasowym przeważają aminokwasy z dodatkowymi grupami karboksylowymi, które nadają syntetazom kwaśny charakter (14, 28, 60).

### III.3. Miejsca katalityczne

Jak wspomniano wyżej określenie składu aminokwasowego zastępuje się często tylko oznaczeniem niektórych aminokwasów aromatycznych (zwłaszcza tryptofanu i tyrozyny) oraz grup sulfhydrylowych, ze względu na ich możliwe zaangażowanie w miejscach aktywnych enzymu. Tryptofan i tyrozyna są odpowiedzialne za fluorescencję syntetaz. W rezultacie powstania kompleksu tRNA z syntetazą następuje częściowe wygaszenie fluorescencji syntetazy. Podjęto liczne próby wykorzystania tego efektu do określenia, które aminokwasy zaangażowane są w wiązaniu substratu (100-102) oraz ustalenia w jakich stosunkach molowych występują związki tworzące kompleks przejściowy (101, 104-106). Metody fluorescencyjne mogą również znaleźć zastosowanie w badaniach aminoacylacji w układzie heterologicznym, gdyż ustalono, że tRNA niespecyficzne powodują również wygaszenie fluorescencji w zmniejszonym w charakterystyczny sposób stopniu (107). Badania wykonane przez C. Hélené (109) w układzie modelowym (DNA-aminy aromatyczne) wykazały, że wiązanie następuje na zasadzie przeniesienia ładunku (charge - transfer) a powodem wygaszania fluorescencji jest lokowanie się planarnych aromatycznych aminokwasów między zasadami DNA. Jest to sprzeczne z poglądem zespołu Cramera (101), który uważa, że oddziaływanie tRNA-syntetaza ma głównie charakter sił elektrostatycznych. Chociaż pogląd Cramera podzielany jest także przez innych autorów (69, 108), to nie można tym samym wykluczyć racji Hélené, a zwłaszcza łącznego występowania obu typów oddziaływania.

Zwrócono uwagę na rolę grup sulfhydrylowych w miejscach katalitycznych odpowiedzialnych za przyłączenie tRNA (110-112). Kuo i De Luca (118) stosując technikę selektywnego blokowania wykazali, które z grup sulfhydrylowych enzymu są odpowiedzialne za jedno z jego miejsc aktywnych. Nie można jednak uogólniać założenia o konieczności występowania grup sulfhydrylowych w miejscach katalitycznych, bo w niektórych przypadkach wykazano nieistotność grup sulfhydrylowych (114).

Niejednolicie przedstawia się ułożenie miejsc aktywnych dla tRNA na powierzchni syntetazy. Syntetazy zbudowane z jednego łańcucha peptydowego mają po jednym miejscu aktywnym (11, 20, 30, 104, 115). Met - (13) i Glu (12) - tRNA syntetaza z *E.coli* (enzymy należące do klasy  $\alpha\beta$ ) posiadają pojedyncze miejsce aktywne dla tRNA na łańcuchu o mniejszym ciężarze cząsteczkowym. Met-tRNA syntetaza ma dodatkową, swoistą cechę stwierdzoną tylko w tym przypadku: w obecności jonów  $Mg^{+2}$  po nasyceniu pierwszego miejsca aktywnego rozpoczyna działalność drugie, nowe miejsce aktywne. Wyjaśnienie wiąże się z pełnym zrozumieniem roli jonów  $Mg^{++}$  w procesie aminoacylacji tRNA (97). W grupie syntetaz dwułańcuchowych typu  $\alpha_2$  ustalono istnienie dwóch miejsc aktywnych, po jednym na każdym łańcuchu m.in. dla Ser-tRNA syntetazy z drożdży (52, 101), Tyr-tRNA syntetazy z *E.coli* (16) i Trp-tRNA syntetazy z trzustki wołu (29). Bardziej skomplikowany jest układ miejsc aktywnych wśród syntetaz tetramerycznych. Fen-tRNA syntetaza z *E.coli* (enzym typu  $\alpha_4$ ) ma tylko jedno miejsce aktywne (116, 117), podczas gdy Fen-tRNA syntetaza z drożdży piekarniczych ( $\alpha_2\beta_2$ ) ma dwa miejsca aktywne (52). Autorzy traktujący Met-tRNA syntetazę *E.coli* jako tetramer typu  $\alpha_4$  dowodzą istnienia dwóch miejsc aktywnych dla tRNA, a więc są zdania, że enzym ten zbudowany z czterech podjednostek identycznych pod względem strukturalnym wykazuje dysymetrię podjednostek z punktu widzenia ułożenia miejsc aktywnych (97, 98). Zaprezentowano szereg dowodów na to, że miejsce aktywne dla tRNA należy rozumieć jako dwa osobne centra: centrum rozpoznawcze i centrum katalityczne.

Udostępnienie centrum katalitycznego następuje prawdopodobnie dopiero w wyniku zmian konformacyjnych po przyłączeniu tRNA i aminokwasu (20, 109, 118, 119).

Istnieje zgodność co do poglądów o istnieniu odrębnych miejsc katalitycznych dla tRNA i aminokwasu. Przyłączenie aminokwasów do syntetazy następuje za pośrednictwem protonowanych grup  $\alpha$ -aminowych aminokwasu i anionowych miejsc na powierzchni enzymu (14). Sugestia ta zyskała poparcie dzięki udowodnieniu nieistotności grup karboksylowych aminokwasu (115, 116, 120, 121).

W niektórych przypadkach udowodniono udział sił hydrofobowych w wiązaniu syntetazy z aminokwasem. Santi i Danenberg (122) stwierdzili, że na powierzchni Fen-tRNA syntetazy z *E.coli* tworzy się „kieszka hydrofobowa”, zdolna pomieścić pierścienie fenyłowe; pozostała część cząsteczki łączy się z syntetazą w wyżej opisany sposób. Podobnie Holler i wsp. (127) wykazali obecność miejsc hydrofobowych na powierzchni Ile-tRNA syntetazy z

E.coli, oddziaływujących z grupami metylowymi i etylowymi łańcucha alifatycznego izoleucyny.

Większość autorów postuluje istnienie odrębnego miejsca katalitycznego dla ATP (7, 69, 117, 121, 123). W nielicznych przypadkach stwierdzono, że ilość miejsc aktywnych dla ATP przewyższa ilość miejsc aktywnych dla aminokwasu (52, 98). Przypuszcza się, że w przypadku Met-tRNA syntetazy z E.coli tylko 2 cząsteczki ATP są zaangażowane w tworzeniu adenilanu, podczas gdy rola pozostałych dwóch jest niejasna (98). Charakter wiązania pomiędzy ATP a syntetazą nie został całkowicie wyjaśniony. Zakłada się, że opiera się ono na siłach elektrostatycznych i wiązaniach wodorowych (117). Yarus i Berg (95) postawili hipotezę o oddziaływaniu miejsc katalitycznych dla tRNA i aminokwasu na powierzchni Ile-tRNA syntetazy z E.coli. Miejsce katalityczne dla tRNA jest, ich zdaniem, niedostępne i dopiero po przyłączeniu izoleucyny następuje zmiana konfiguracji syntetazy ekspozująca miejsce wiązania tRNA. Sugestię tę potwierdzono dla tego samego układu na podstawie obserwacji widm fluorescencyjnych kompleksu tRNA - syntetaza (76). Poparcie dla hipotezy Yarusa i Berga stanowią wyniki doświadczeń Charliera (118) wykonanych na Ile-tRNA syntetazie z B.stearothermophilus.

#### IV MECHANIZM AMINOACYLACJI tRNA

Chociaż przedstawiony na początku artykułu schemat dwuetapowej aminoacylacji tRNA, obejmujący reakcję aktywacji aminokwasu i przeniesienie zaktywowanego aminokwasu na tRNA, nie został powszechnie zaakceptowany, to stał się punktem wyjścia do podjęcia szeregu prac szczegółowych.

##### IV.1. Wpływ jonów

Praca wielu laboratoriów skoncentrowała się na wpływie jonów na reakcję aminoacylacji. Mimo dużego nakładu pracy istnieją sprzeczne dane na temat roli jonów, a zwłaszcza jonów magnezu ( $Mg^{+2}$ ). Wcześniejsze publikacje przyjmowały jako warunek konieczny aminoacylacji tRNA obecność jonów  $Mg^{+2}$  w środowisku reakcji (7, 69).

Cole i Schimmel (124) przebadali wpływ szeregu związków zawierających magnez na reakcję aminoacylacji i stwierdzili, że jony  $Mg^{+2}$  są aktywatorami reakcji. Niezależnie od tych ustaleń podjęto próby zastąpienia jonów  $Mg^{+2}$  nieobjętościowymi kationami jedno- (103, 126-128), dwu- (129) i trójwartościowymi (130) oraz aminami (101, 125, 131, 132). Chociaż celem większości wymienionych prac było wykazanie możliwości zastąpienia jonów  $Mg^{+2}$  innymi jonami, to wyniki nie dały jednoznacznej odpowiedzi. W niektórych doświadczeniach z powodzeniem przeprowadzono reakcję aminoacylacji przy użyciu innych jonów (126, 129, 130), a nawet postulowano konieczność równoczesnej obecności jonów  $Mg^{+2}$  i jonów jednowartościowych (127). Jednocześnie inne prace dowodziły, że jony  $Mg^{+2}$  grają istotną rolę i nie można

ich zastąpić (124, 151). Dalsze badania poszły więc w kierunku określenia wpływu jonów, niezależnie, na reakcję aktywacji i przeniesienia. Jednak i tutaj wyniki były rozbieżne. W kilku pracach wykazano, że podczas acetylacji tRNA można zastąpić jony  $Mg^{+2}$  aminami, twierdząc jednocześnie, że etap aktywacji jest całkowicie uzależniony od obecności jonów  $Mg^{+2}$  (16, 125, 131). Tymczasem Chousterman i Chapeville (16, 133) zaobserwowali tworzenie adenilanu tyrozyny bez udziału jakichkolwiek jonów.

Rozbieżność wyników dotyczących udziału jonów w procesie aminoacylacji tRNA spowodowała różnorodne interpretacje funkcji jonów. Sugerowano, że obecność jonów umożliwia ostateczne przyjęcie natywnej struktury przez tRNA i syntetazę (127, 134). Sugestia ta zyskała poparcie Robinsona i Zimmermana, którzy stwierdzili zmiany widm fluorescencyjnych syntetaz i ich kompleksów z tRNA w obecności i pod nieobecność jonów magnezowych (135). Słuszność takich założeń negują Yarus i Rashabaum (129) na podstawie precyzyjnych pomiarów kinetycznych. Inaczej wyjaśniają rolę jonów magnezu Hohler i wsp. Po odkryciu wpływu stężenia jonów magnezu na kolejność przyłączania substratów do syntetazy w dalszych badaniach potwierdzili wcześniejszą sugestię Cole'a i Schimmela (124), że ATP reaguje w postaci soli magnezowej (125, 136).

Niektórzy autorzy negują celowość badań nad wpływem jonów na reakcję aminoacylacji, twierdząc, że obecność jonów  $Mg^{+2}$  jest jednym z szeregu czynników, tworzących środowisko reakcji. W pewnych więc warunkach ich obecność jest niezbędna dla przebiegu reakcji, a w innych można je wyeliminować (129, 134).

#### IV.2. Wpływ temperatury

Wiele uwagi poświęcono określeniu wpływu temperatury na syntetazy, zarówno w stanie statycznym, jak i dynamicznym.

Większość syntetaz traci aktywność enzymatyczną w temperaturze 40–45°C znacznie większa stabilność cechuje Tre-tRNA syntetazę ze zmutowanego szczepu E.coli, gdyż dezaktywacja następuje dopiero w temperaturze 60°C (15). Do temperatury 68°C zachowuje aktywność Leu-tRNA syntetaza z B. stea-thermophilus (127).

Wielokrotnie donoszono o efekcie chronienia syntetazy substratami przed inaktywacją termiczną (43, 59, 102, 137–139). Efekt chronienia występuje zarówno w przypadku substratów specyficznych a więc aminokwasu (120, 146) lub tRNA (12, 43, 137), jak też dotyczy substratów niespecyficznych (ATP) które czasami chronią syntetazę efektywniej niż właściwe aminokwasy (59, 139).

Szczególnie silny efekt chronienia stwierdził Parfait (139) wobec wszystkich substratów. Efekt chronienia substratami nie ma charakteru ogólnego (140) a nawet w nielicznych przypadkach stwierdzono, że substraty powodują termolabilizację syntetazy (15, 141).

Badania nad wpływem temperatury na syntetazy w stanie dynamicznym polegały na określeniu termozależności reakcji aminoacylacji. James i wsp.



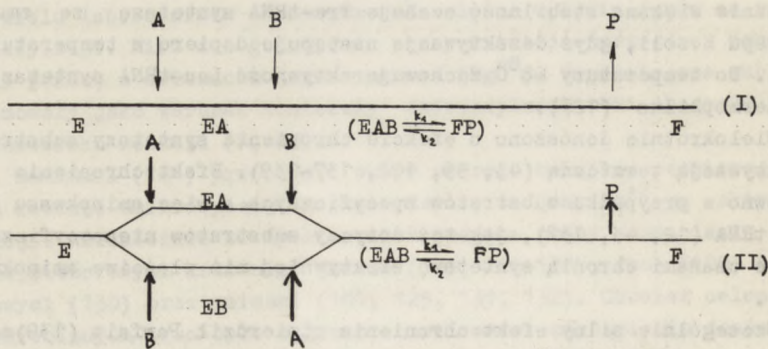
(138) porównywali inaktywację cieplną reakcji aktywacji i przeniesienia. Stwierdzili, że we wszystkich badanych przypadkach z wyjątkiem Tyr - tRNA syntetazy z drożdży piekarniczych reakcja przeniesienia była mniej odporna na wysokie temperatury niż reakcja aktywacji. Do identycznych rezultatów doszli Buckel i wsp. (141). Termostabilność szeregu kompleksów AA AMP E przebadali Charlier i wsp. (140). Nieoczekiwanym rezultatem było stwierdzenie braku różnic między syntetazami z układów termofilowych i mezofilowych. Mimo to syntetazy z materiałów termostabilnych, jak *Thermus aquaticus* (142) i *B. stearothermophilus* (138, 140) w dalszym ciągu stanowią dogodny obiekt badań mechanistycznych.

Zeikus i Brock (142) zasugerowali, że zmniejszenie aktywności aminoacylacji w podwyższonych temperaturach w układach termostabilnych nie jest wynikiem zmian struktury II-rzędowej syntetaz lecz degradacji struktury I-rzędowej tRNA i modyfikacji nukleotydów.

#### IV.3. Szczegółowy mechanizm aminoacylacji

Badania nad szczegółowym mechanizmem aminoacylacji dotyczyły m.in. kolejności łączenia się substratów. Przyjęcie dwuetapowego przebiegu reakcji nie rozstrzygało tej kwestii, bowiem aktywację aminokwasu przedstawiono jako reakcję trójcząsteczkową, co z kinetycznego punktu widzenia jest mało prawdopodobne. Podjęto próbę odpowiedzi na pytanie, które z trzech substratów (AA, ATP i enzym) wchodzi najpierw w reakcję. Znalaziono zarówno takie układy, w których najpierw aminokwas reagował z syntetazą (116, 143, 144), jak i takie, w których pierwszeństwo miała reakcja ATP z syntetazą (39, 96, 123). Żadne z tych doświadczeń nie dało podstaw do uogólnienia wniosków.

Stwierdzenie dwóch możliwości odnośnie kolejności reagowania substratów postawiło następną, ogólniejszą pytanie: Czy ma miejsce układ reakcji następczych (I), czy konkurencyjnych (II)?



E = enzym  
A, B = substraty  
P = produkt reakcji  
F = produkt uboczny

Schemat 1

Na podstawie przebadania parametrów reakcji w różnych warunkach Santi i wsp. (108) przychylają się do drugiej możliwości. Sugestie grupy Santie'go potwierdzili Holler i Calvin (136), którzy badali kinetykę reakcji aminoacylacji metodą fosforoscencji i znaleźli, że o kolejności reagowania z syntetazą decyduje stężenie jonów magnezu.

Próbie rozwiązania tego problemu, z punktu widzenia przemian energetycznych podjęła grupa Atkinsona (145) oraz Penzer i wsp. (146). Ci ostatni określili wolną energię szeregu reakcji potencjalnie zachodzących podczas aktywacji aminokwasu (tablica 3).

Tablica III

Lp.	Reakcja	G <sub>0</sub> (Kcal/mol)
1	$E + Ile \longrightarrow E - Ile$	- 7
2	$E + ATP \longrightarrow E - ATP$	- 6
3	$E - ATP + Ile \longrightarrow E - ATP - Ile$	- 6
4	$E + Ile + ATP \longrightarrow E - AMP - Ile + PP_i$	- 9
5	$ATP + Ile \longrightarrow AMP - Ile + PP_i$	+ 2
6	$E + AMP - Ile \longrightarrow E - AMP - Ile$	- 11

Z tablicy wynika, że tylko piąta reakcja jest zdecydowanie mniej prawdopodobna, a pozostałe mają porównywalne wartości wolnych energii.

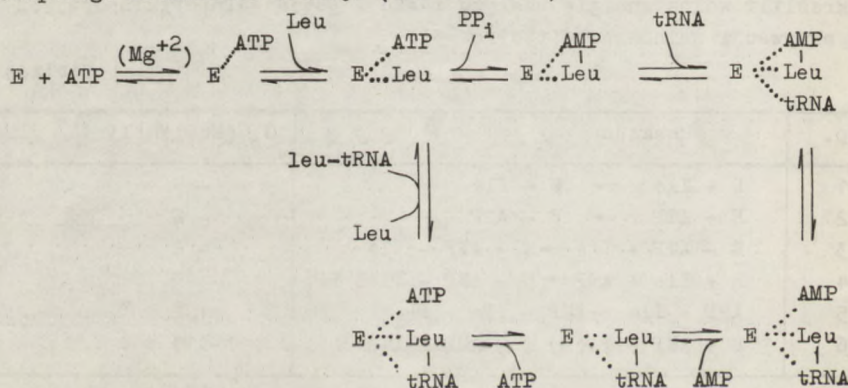
Istotny na tym etapie jest wpływ tRNA. Wyjaśnienie jego udziału w aktywacji aminokwasu może zdecydować o przyjęciu jedno lub dwuetapowego przebiegu aminoacylacji. Doniesienia dotyczące wpływu tRNA są sprzeczne; można je podzielić na 3 grupy:

- 1) Układy, w których tRNA jest niezbędny dla aktywacji aminokwasu (139, 147),
- 2) Układy, w których aktywacja aminokwasu zachodzi bez udziału tRNA (148, 149).
- 3) Układy, w których tRNA jest inhibitorem syntetazy (150).

W celu określenia roli tRNA Deutscher (151) przeprowadził badania modelowe reakcji aminoacylacji. tRNA zastąpił szeregiem syntetycznych polinukleotydów i stwierdził, że polinukleotydy mogą specyficznie przyłączać się do miejsc katalitycznych syntetazy i blokować reakcję oraz, że istnieje zależność między sekwencją polinukleotydów a zdolnością inhibicji reakcji. Zasugerowano jednakże, że inhibicja aktywacji aminokwasu wobec dużych stężeń tRNA jest wynikiem działania nie tRNA lecz towarzyszących mu niezidentyfikowanych związków. Dotyczy to układu z *B. stearothermophilus* (152) i *B. subtilis* (153).

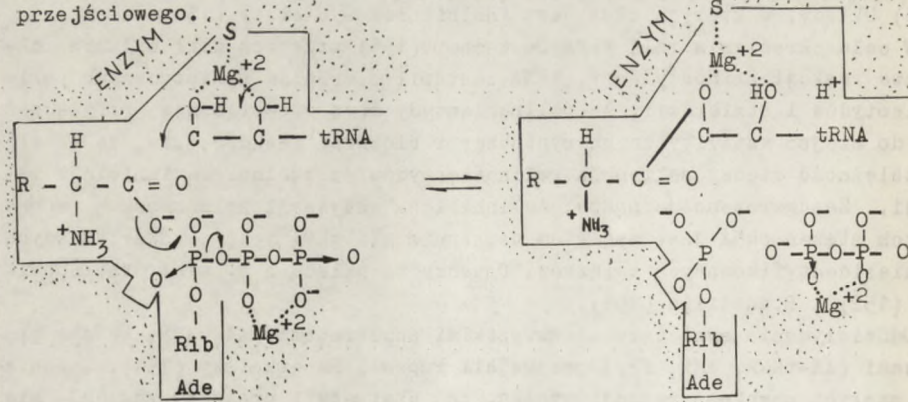
Oddziaływania syntetazy ze wszystkimi substratami (AA, ATP, tRNA) i produktami (AA-tRNA, AMP, PP<sub>i</sub>) przebadali Papas i Peterkofsky (154). Z pomiarów stałych szybkość reakcji wynika, że substraty i produkty znajdują się w nieustannej interakcji z syntetazą a o szybkości i postępie reakcji aminoacylacji decydują konkretne, aktualne parametry środowiska. Dalszym

wnioskiem jest konieczność obecności wszystkich trzech substratów w środowisku przed powstaniem któregokolwiek z produktów. Część eksperymentalną pracy oparto o doświadczenia z Arg-tRNA syntetazą z *E. coli*. Na podstawie szeregu danych literaturowych oraz własnych doświadczeń wykonanych w toku pracy z Leu-tRNA syntetazą z *E. coli* Rouget i Chapeville (123) podali propozycję pełnego mechanizmu aminoacylacji tRNA, będącego rozwinięciem dwuetapowego mechanizmu reakcji (schemat nr 2).



Schemat 2. Mechanizm aminoacylacji wg Rougeta i Chapevilla (123)

Całkowicie odmienne stanowisko reprezentuje Loftfield (7, 69,148,155). Za punkt wyjścia do rozważań nad mechanizmem aminoacylacji przyjął pogląd Stulberga i Novelli'ego (156), że izolacja i identyfikacja kompleksu przejściowego AA····AMP····E niekoniecznie dowodzi, iż in vivo pełni on istotnie rolę kompleksu przejściowego. Na podstawie licznych eksperymentów kinetycznych Loftfield (155) zaproponował jednoetapowy mechanizm, pokazany na schemacie nr 3. Mechanizm ten nie uwzględnia istnienia kompleksu przejściowego.



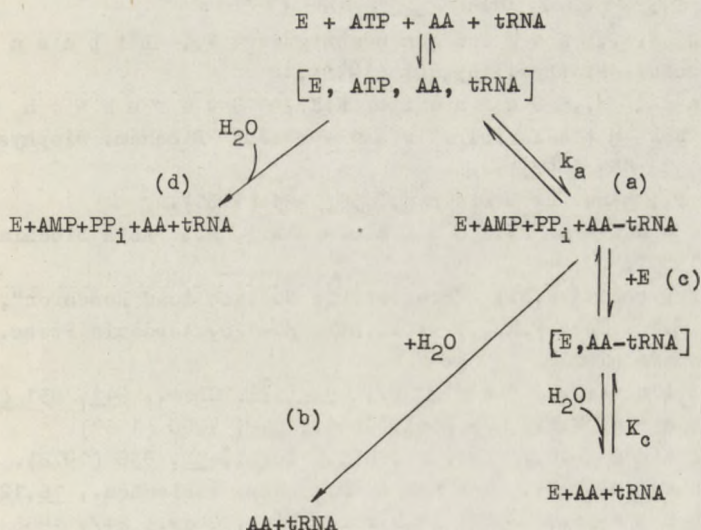
Schemat 3. Mechanizm aminoacylacji wg Loftfielda (155)

Zestawienie faktów eksperymentalnych, otrzymanych do roku 1972, stanowiących podbudowę i krytykę mechanizmu jedno- i dwu-etapowego, znajduje się w pracach przeglądowych (9,69). Kwestia pozostaje otwarta, bowiem nadal wykonuje się eksperymenty dostarczające argumentów dla obydwóch propozycji. Na podstawie doświadczeń z poliaminami, użytymi w miejsce jonów magnezu, Matsuzaki i Takeda (157) wypowiadają się za mechanizmem jednoetapowym. Badania nad rolą magnezu i przejściami energetycznymi prowadzone przez Hollera i wsp. (125, 136) sugerują prawidłowość mechanizmu dwuetapowego. Częściowe potwierdzenie dla hipotezy Loftfielda uzyskał Parfait (139) na podstawie badań nad efektem chronienia substratami syntetaz z *B.stearothermophilus*.

#### V UŻYTECZNY ASPEKT BADAŃ

Przedstawione wyżej ustalenia na temat syntetaz dotyczyły badań poznawczych. Równolegle opublikowano szereg prac mających na celu aspekt praktyczny. Wiązało się to z koniecznością precyzyjnego ustalenia optymalnych warunków aminoacylacji stosowanej do oceny czystości preparatów tRNA (26, 34, 128, 158). Również rozdział tRNA na benzoilowanej DEAC-celulozie metodą Tenera wymagał określenia optymalnych warunków aminoacylacji (159).

W obu przypadkach dążono do osiągnięcia maksymalnej aminoacylacji. Jednakże Bonnet i Ebel (160) wykazali, że niemożliwością jest uzyskanie stu-procentowej aminoacylacji. Równocześnie z główną reakcją, tworzenia tRNA, przebiega szereg konkurencyjnych reakcji dekompozycyjnych (schemat 4).



Schemat 4. Wykaz reakcji zachodzących podczas aminoacylacji tRNA (160)

- 1) Nieenzymatyczna hydroliza AA-tRNA (reakcja b).
- 2) Hydroliza AA-tRNA wobec syntetazy (reakcja c).
- 3) Hydroliza ATP wobec tRNA, aminokwasu i syntetazy (reakcja d).

W tych warunkach, przy dodatkowym założeniu nadmiaru ATP, stopień maksymalnej aminoacylacji wyznacza równowaga wszystkich reakcji w sposób określony poniższym wzorem:

$$[\text{aa-tRNA}]_{\text{max}} = \frac{[\text{tRNA}_o]}{1 + \frac{K_b + K_c}{K_a}} \quad (1)$$

Rozważania Bonneta i Ebela zostały potwierdzone przez Eldreda i Schimela (161). Wykazali oni, że izoleucyna, izoleucylo-adenylan oraz tRNA<sup>Ile</sup> z *E.coli* powodują hydrolizę końcowego produktu reakcji w postaci Ile-tRNA<sup>Ile</sup>.

Badania nad syntetazami, zarówno w nurcie poznawczym jak i użytecznym pozostają w ścisłym powiązaniu z badaniami nad strukturą i funkcją tRNA a ustalenia uzupełniają się wzajemnie (15, 40, 79-81).

#### L i t e r a t u r a

- [1] Hoagland M.B.; *Biochem. Biophys. Acta* 16, 288. (1955).
- [2] Berg P.; *J. Biol. Chem.*, 222, 1025 (1956).
- [3] Davis E.W., Koningsberger V., Lipman F.; *Arch. Biochem. Biophys.*, 65, 21 (1956).
- [4] Sprinzl M., Schneit K.H., Sternbach H., Von der Haar F., Cramer F.; *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 51, 881 (1973).
- [5] Berg P.; *Ann. Rev. Biochem.*, 30, 293 (1961).
- [6] Szafrański P., Sułkowski E.; *Acta Biochim. Pol.*, 6, 133 (1959).
- [7] Loftfield R.B.; "Progress in Nucleic Acid Research", red.: Davidson J.N., Cohn W.E., t. XII. str. 87-128, Academic Press. Nowy Jork - Londyn (1972).
- [8] Baldwin A.N., Berg P.; *J. Biol. Chem.*, 241, 831 (1966).
- [9] Stulberg M.P.; *J. Biol. Chem.*, 242, 1060 (1967).
- [10] Baturina L.D.; *Ukr. Biochim. Żurn.*, 30, 338 (1972).
- [11] Berthelot F., Yaniv M.; *Eur. J. Biochem.*, 16, 123 (1970).
- [12] Lapointe J., Söll D.; *J. Biol. Chem.*, 247, 4966 (1972).
- [13] Calendar R., Berg P.; *Biochemistry*, 5, 1681 (1966).
- [14] Waller J.P., Risler J.L., Monteibelt C., Zelwer Ch.; *FEBS Lett.*, 16, 186 (1971).

- [15] Paetz W., Nass G.; Eur. J. Biochem. 35, 331 (1973).
- [16] Chousterman S., Chappelleville F.; Eur. J. Biochem., 35, 51 (1973).
- [17] Yamane T., Sueoka N.; Proc. Natl. Ac. Sci. USA, 50, 1093 (1963).
- [18] De Lorenzo F., Ames B.N.; J. Biol. Chem., 245, 1710 (1970).
- [19] De Lorenzo F., Straus D.S., Ames B.N.; J. Biol. Chem. 247, 4966 (1972).
- [20] Charlier J., Grosjean H.; Eur. J. Biochem., 25, 163 (1972).
- [21] Vanhubeck J., Lurquin P.; Eur. J. Biochem., 10, 213 (1969).
- [22] Griffiths E.; Canad. J. Biochem., 48, 944 (1970).
- [23] Baeauchemin N., Larue B., Cedergren R.J.; Arch. Biochem. Biophys., 156, 17 (1973).
- [24] Heider H., Gottschalk E., Cramer F.; Eur. J. Biochem. 20, 144 (1971).
- [25] Robinson B., Zimmerman T.P.; J. Biol. Chem., 246, 4664 (1971).
- [26] Beikirch H., Von der Haar F., Cramer F.; Eur. J. Biochem., 26, 182 (1972).
- [27] Mirzabekow A.D., Kazarinowa L.Ja., Lastit' D., Bajew A.A.; Molek. Biologia, 2, 909 (1969).
- [28] Diller R.F.B., Tener G.M.; Canad. J. Biochem., 49, 822 (1971).
- [29] Schmidt J., Warry R., Stanfield S., Reid B.R.; Biochemistry, 10, 3264 (1971).
- [30] Gangloff J., Dirheimer G.; Biochim. Biophys. Acta 294, 263 (1973).
- [31] Kučan Ž., Chambers R.W.; J. Biochem. (Tokyo), 73, 811 (1973).
- [32] Dirheimer G., Ebel J.P.; Bull. Soc. Chim. Biol., 49, 1679 (1967).
- [33] Szafranski P., Sułkowski E., Heller J.; Acta Biochim. Pol., 2, 151 (1960).
- [34] Christopher C.W., Jones M.E., Stafford D.W.; Biochim. Biophys. Acta., 228, 682 (1971).
- [35] Anderson W.S.; Biochemistry, 8, 3687 (1969).
- [36] Davies M.R., Marshall R.D.; Biochem. Biophys. Res. Commun., 47, 1386 (1971).
- [37] Lanks K.W., Sciscenti J., Weinstein B., Cantor R.Ch.; J. Biol. Chem., 246, 3494 (1971).
- [38] Dorizzi M., Labousse B., Labousse J.; Eur. J. Biochem. 10, 563 (1971).

- [39] Zinowiew W.W., Kisielew L.L., Knorre D.G., Koczkin L.L., Małygin E.N., Faworowa O.O.; *Biochimja*, 37, 443 (1972).
- [40] Lea P.J., Norris R.D.; *Phytochem.*, 11, 2897 (1972).
- [41] Legocki A.B., Pawełkiewicz J.; *Acta Biochim.Pol.* 14, 313 (1967).
- [42] Legocki A.B., Pawełkiewicz J.; *Bull. l'Acad.Sci. Pol.*, 15, 435 (1967).
- [43] Kędzierski W., Pawełkiewicz J.; *Acta Bioch. Pol.*, 17, 41 (1970).
- [44] Bartkowiak S., Pawełkiewicz J.; *Biochim. Biophys. Acta*, 272, 137 (1972).
- [45] Jakubowski H., Pawełkiewicz J.; *FEBS Lett.* 34, 150 (1973).
- [46] Bick M.D., Strehler B.L.; *Proc. Natl. Ac. Sci, USA*, 68, 224 (1971).
- [47] Anderson H.B., Cherry J.H.; *Proc. Natl. Ac. Sci. USA* 62, 202 (1969).
- [48] Anderson J.W., Fowden L.; *Biochem. J.*, 119, 667 (1970).
- [49] Anderson J.W., Fowden L.; *Biochem. J.*, 119, 691 (1970).
- [50] Cowless J.R., Key J.L.; *Biochim. Biophys. Acta* 281, 33 (1972).
- [51] Cowless J.R., Key J.L.; *Plant. Physiol.*, 51, 22 (1973).
- [52] Spadafora C., Igo-Kemens T., Zachau H.G.; *Biochim. Biophys. Acta.*, 312, 674 (1973).
- [53] Merrich W.C., Dure L.S.; *Biochemistry* 12, 629 (1973).
- [54] Guderian R.Ch., Pulliam R.L., Gordon M.P.; *Biochim. Biophys. Acta*, 262, 50 (1972).
- [55] Kislew N., Selsky M.J., Norton G., Eisenstadt J.M.; *Biochim. Biophys. Acta*, 287, 256 (1972).
- [56] Vennegoor C., Bloemendal H.; *Eur. J. Biochem.*, 26, 462 (1972).
- [57] Muench K.Ch., Berg P.; w "Progress in Nucleic Acid Research", t. I, str. 375, red.: Cantoni G.L., Davis D.R., Academic Press, Nowy Jork (1966).
- [58] Pawełkiewicz J., Jakubowski H.; dane nieopublikowane.
- [59] Norris R.D., Fowden L.; *Biochim. Biophys. Acta.* 312, 695 (1973).
- [60] Chousterman S., Chapeville F.; *Eur. J. Bioch.*, 35, 46 (1973).
- [61] Cuatrecasas P., Wilcheck M., Anfinsen C.B.; *Proc. Natl. Ac. Sci., USA*, 61, 636 (1968).
- [62] Cuatrecasas P.; *Nature*, 228, 132 (1970).

- [63] Robert-Gero M., Waller J.P.; *Eur. J. Biochem.*, 31, 315 (1972).
- [64] Forrester P.J., Hancock R.L.; *Canad. J. Biochem.*, 51, 231 (1973).
- [65] Nelidowa O.D., Kissielew L.L.; *Molek. Biologia*, 2, 60 (1968).
- [66] Cuatrecasas P., Anfinsen C.B.; *Ann. Rev. Bioch.*, 40, 753 (1971).
- [67] Remy P., Birmele C., Ebel J.P.; *FEBS Lett.*, 27, 134 (1972).
- [68] Von der Haar F.; *Eur. J. Bioch.*, 34, 84 (1973).
- [69] Loftfield R.B.; w "Protein Synthesis", wyd. E. Mc Conkey. t.I, str.1, M. Dekker, Nowy Jork (1971).
- [70] Kućan Ž., Freude K.A., Chambers R.W.; *Nature New Biol.*, 232, 177 (1971).
- [71] Kućan Ž., Chambers R.W.; *FEBS Lett.*, 25, 156 (1972).
- [72] Bandyopahyay A.K., Deutscher M.P.; *J. Mol. Biol.* 60, 113 (1971).
- [73] Bandyopadhyay A.K., Deutscher M.P.; *J. Mol. Biol.*, 74, 257 (1973).
- [74] Kissielew L.L., Baturina J.D.; *FEBS Lett.*, 22, 231 (1972).
- [75] Hele P.; *Biochim. Biophys. Acta*, 294, 273 (1973).
- [76] Kan J., Sueoka N.; *J. Biol. Chem.*, 246, 2207 (1971).
- [77] Brouton C.J., Martley B.S.; *Biochem. J.*, 108, 281 (1968).
- [78] Casie D., Waller J.P.; *Eur. J. Biochem.*, 5, 33 (1968).
- [79] Zachau H.G.; *Angew. Chemie*, 81, 645 (1969).
- [80] Chambers R.W.; w "Progress in Nucleic Acid Research", red.: Davidson J.N., Cohn W.E., t. XI, str. 489, Academic Press, Nowy Jork - Londyn (1971).
- [81] Gupta N.K., Woodley C.L.; *J. Scientific Industrial Research*, 30, 1 (1971).
- [82] Strehler B.R., Hendley D.D., Hirsch G.P.; *Proc. Natl. Ac. Sci USA* - 52, 1751 (1967).
- [83] Epler J.L., Shugart L.R., Barnett W.E.; *Biochemistry* 9, 3575 (1970).
- [84] Barnett W.E., Brown D.H., Epler J.L.; *Proc. Natl. Ac. Sci. USA*, 57, 1775 (1967).
- [85] Jacobson K.B.; w "Progress in Nucleic Acid Research", red.: Davidson J.N., Cohn W.E., t. XI, str. 461, Academic Press, Nowy Jork - Londyn (1971).
- [86] Yarus M.; *Biochemistry*, 1, 2050 (1972).
- [87] Yarus M.; *Biochemistry*, 11, 2353 (1972).



- [88] Mertes M., Peters M.A., Mahoney W., Yarush M.; *J. Mol. Biol.*, 71, 671 (1972).
- [89] Yarush M.; *Proc. Natl. Ac. Sci. USA*, 69, 1915 (1972).
- [90] Yarush M.; *Nature New Biology*, 239, 106 (1972).
- [91] Kondo M., Woese C.R.; *Biochemistry*, 8, 4177 (1969).
- [92] Ritler F.O., Jacobson K.B.; *J. Biol. Chem.*, 247, 7803 (1972).
- [93] Migita L.K.; Doi R.H.; *Arch. Biochem. Biophys.*, 138, 457 (1970).
- [94] Norris A.T., Berg D.; *Proc. Natl. Ac. Sci. USA*, 52, 330 (1964).
- [95] Chirikjian J.G., Wright H.T., Fresco J.R.; *Proc. Natl. Ac. Sci. USA*, 69, 1638 (1972).
- [96] Berg A.S., Grunberg-Manago M.; *Biochim. Biophys. Acta* 217, 83 (1970).
- [97] Blanquet S., Iwatsubo M., Waller J.P.; *Eur. J. Biochem.* 36, 213 (1973).
- [98] Blanquet S., Fayat G., Waller J.P., Iwatsubo M.; *Eur. J. Biochem.*, 24, 461 (1972).
- [99] Kossakowski H.M., Bück A.; *Eur. J. Biochem.*, 24, 190 (1971).
- [100] Hélène C.; *FEBS Lett.*, 17, 73 (1971).
- [101] Engel G., Heider H., Maelicke A., Von der Haar F., Cramer F.; *Eur. J. Biochem.*, 29, 257 (1972).
- [102] Seifert W., Nass G., Zilling W.; *J. Mol. Biol.*, 33, 507 (1968).
- [103] Lawrence F., Blanquet S., Poiret M., Robert-Gero M., Waller J.P.; *Eur. J. Biochem.*, 36, 234 (1973).
- [104] Hélène C., Brun F., Yaniv M.; *J. Mol. Biol.*, 58, 349 (1971).
- [105] Ringel R., Cronwall E., Hirsch R., Packmann U., Zachau H.G.; *FEBS Lett.*, 11, 320 (1970).
- [106] Farely J.G., Lengworth W.J., Stulberg M.P.; *J. Biol. Chem.* 246, 1266 (1971).
- [107] Blanquet S., Petrissant G., Waller J.P.; *Eur. J. Biochem.*, 36, 227 (1973).
- [108] Santi D.V., Dannenberg P.V., Satterly F.; *Biochemistry*, 10, 4804 (1971).
- [109] Hélène C.; *Nature New Biology*. 234, 120 (1971).
- [110] De Luca M., McRoy W.D.; *Arch. Biochem. Biophys.*, 116, 103 (1966).
- [111] Lawrence F.; *Eur. J. Biochem.*, 15, 436 (1970).
- [112] Rouger P., Chapeville F.; *Eur. J. Biochem.*, 23, 452 (1971).

- [113] Kuo T., DeLuca M.; *Biochemistry*, 8, 4762 (1968).
- [114] Stern R., DeLuca M., Mehler A.H., McElreay W.D.; *Biochemistry*, 5, 126 (1966).
- [115] Cassie D., Lemoine F., Waller J.P., Sandrin E., Boisannas R.A.; *Biochemistry*, 6, 829 (1967).
- [116] Rouget P., Chapeville F.; *Eur. J. Biochem.*, 4, 305 (1968).
- [117] Santi D.V., Danneberg P.V., Montgomery K. A.; *Biochemistry*, 10, 4821 (1971).
- [118] Charlier J.; *Eur. Biochem.*, 25, 175 (1972).
- [119] Yarus M., Berg P.; *J. Mol. Biol.*, 42, 171 (1969).
- [120] Rouget P., Chapeville F.; *Eur. J. Biochem.*, 4, 310 (1968).
- [121] Holler E., Reiney P., Orme A., Bernet E. L., Calvin M.; *Biochemistry*, 12, 1150 (1973).
- [122] Santi D.V., Danneberg B.V.; *Biochemistry*, 10, 4813 (1971).
- [123] Rouget P., Chapeville F.; *Eur. Biochem.*, 23, 443 (1971).
- [124] Cole F.X., Schimmel P.R.; *Biochemistry*, 9, 3143 (1970).
- [125] Holler E.; *Biochemistry*, 12, 1142 (1973).
- [126] Igarashi K., Yoh M., Takeda Y.; *Biochim. Biophys. Acta*, 238, 314 (1971).
- [127] Mitra S.K., Smith Ch.J.; *J. Biol. Chem.*, 247, 925 (1972).
- [128] Sein K.T., Bečarevič A.; *Arch. Biochem. Biophys.*, 142, 164 (1971).
- [129] Yarus M., Rashbaum S.; *Biochemistry*, 11, 2043 (1972).
- [130] Steinmetz M., Cohn M.; *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 46, 1285 (1972).
- [131] Igarashi K., Matsuzaki K., Takeda Y.; *Biochem. Biophys. Acta*, 262, 476 (1972).
- [132] Jakubowicz T., Junosza-Wolska T., Chmielewski T. - *Acta Microbiol. Pol.*, 2, 69/1973/
- [133] Chousterman S., Chapeville F.; *FEBS Lett.*, 17, 153 (1971).
- [134] Zimmerman T.P., Robinson B.; *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 47, 1138 (1972).
- [135] Robinson B., Zimmerman T.P.; *J. Biol. Chem.*, 246, 4664 (1971).
- [136] Holler E., Calvin M.; *Biochemistry*, 11, 3741 (1972).
- [137] Lurquin P.S.; *Experientia*, 27, 131 (1971).
- [138] James J.L., Morrison J.C., Schiflet R.N., Tras T.C., Whybrew W.D., Bucovaz E.T.; *Biochem. Biophys. Commun.*, 83, 574 (1968).
- [139] Parfait R.; *FEBS Lett.*, 29, 323 (1973).
- [140] Charlier J., Grosjean H., Lurquin P.,

- Vanhunbeeck J., Werne J.; *FEBS Lett.*, 4, 239 (1969).
- [141] Buckel P., Lubitz W., Bück A.; *J. Bacteriol.*, 108, 100 (1971).
- [142] Zeikus J.G., Broch T.D.; *Biochim. Biophys. Acta.*, 228, 736 (1971).
- [143] Allende C.C., Cahimovich K., Catina M., Allende J.E.; *J. Biol. Chem.*, 245, 93 (1971).
- [144] Myers G., Blank H.U., Suppl D.; *J. Biol. Chem.*, 246, 4955 (1971).
- [145] Atkinson M.R., Morton R.K.; w "Comprehensive Biochemistry", red. Florkin M., t. II, str. 5, Academic Press, Nowy Jork (1964).
- [146] Penzer G.R., Bennet E.L., Calvin M.; *Eur. J. Biochem.* 20, 1 (1971).
- [147] Mehler A.H., Mitra S.K.; *J. Biol. Chem.*, 242, 5495 (1969).
- [148] Loftfield R.B., Eigner E.A.; *J. Biol. Chem.*, 240, 1482 (1965).
- [149] Baldwin A.N., Berg P.; *J. Biol. Chem.*, 241, 839 (1966).
- [150] Buoncore B., Schlesinger S.; *J. Biol. Chem.*, 247, 1346 (1972).
- [151] Deutscher M.; *Biochim. Biophys. Res. Commun.*, 19, 283 (1965).
- [152] Okamoto T.; *Biochem., Biophys., Acta*, 138, 198 (1967).
- [153] Migita L.K., Hau Y.P., Doi R.H.; *Biochim. Biophys. Acta*, 195, 50 (1969).
- [154] Papas T.S., Peterkofsky A.; *Biochemistry*, 11, 4602 (1972).
- [155] Loftfield R.B., Eigner E.A.; *J. Biol. Chem.*, 244, 1746 (1969).
- [156] Stulberg M.P., Novelli G.D.; w "The Enzymes", red.: Boyer P.D., Lardy H., Myrbæk K., t. IV. str. 401, Academic Press, Nowy York (1962).
- [157] Matsuzaki K., Takeda Y.; *Biochim. Biophys. Acta*, 308, 339 (1973).
- [158] Keith G., Gangloff J., Dirheimer G.; *Biochimio* 53, 661 (1971).
- [159] Gillam J., Blew D., Warrington R.C., von Tigerstrom M., Tener G.M.; *Biochemistry*, 7, 3459 (1968).
- [160] Bonnet J., Ebel J.P.; *Eur. J. Biochem.*, 31, 335 (1972).

Antoni J. Rafalski, Jan Barciszewski

## RZADKIE ZASADY TYPU „Y” WYSTĘPUJĄCE W TRANSFEROWYCH KWASACH RYBONUKLEINOWYCH\*

### Streszczenie

W artykule przedstawiono informacje literaturowe na temat występowania, struktury, własności oraz roli biologicznej zasad typu „Y”, najbardziej skomplikowanych spośród dotychczas poznanych komponentów transferowych kwasów rybonukleinowych.

Cząsteczkę kwasów nukleinowych można rozpatrywać jako biopolimer zbudowany z czterech głównych monomerów nukleozydowych: adenozy, guanozy, cytydiny i urydiny w przypadku kwasów rybonukleinowych (RNA) oraz deoksyadenozy, deoksyguanozy, deoksytydiny i deoksytymidyny w przypadku kwasów deoksyrybonukleinowych (DNA). Podstawowa struktura polimeru może być modyfikowana przez przyłączenie lub podstawienie odpowiedniej grupy funkcyjnej monomeru. Takie zmiany strukturalne prowadzą do powstania grupy komponentów kwasów nukleinowych nazywanych rzadkimi, zmodyfikowanymi lub dziwnymi (ang. minor, odd, rare, modified). Określenie tej grupy związków jako rzadkie nie jest zbyt ścisłe, ponieważ występują one dosyć często w kwasach nukleinowych.

Obecność zmodyfikowanych nukleozydów w kwasach nukleinowych stwierdził po raz pierwszy w roku 1948 Hotchkiss, znajdując 5-metylocytozynę w preparacie DNA. Interesującym zagadnieniem w tej klasie związków jest ich wpływ na funkcję cząsteczek w których występują. Liczba i typy modyfikowanych nukleozydów w określonej makrocząsteczce będą odbiciem stopnia skomplikowania oddziaływań, w których cząsteczka bierze udział. Grupy modyfikujące powodują zmianę fizycznych, chemicznych i biologicznych własności cząsteczki kwasu nukleinowego. Badania związków modelowych pokazały, że modyfikacje chemiczne powodują subtelne zmiany w drugo- i trzeciorzędowej strukturze cząsteczek kwasów nukleinowych. Zmiany w budowie fizycznej mogą wpływać na specyficzność substratową w reakcjach enzymatycznych i być użyteczne w badaniach biochemicznych do ustalenia położenia danego nukleozydu w RNA.

Występowanie rzadkich nukleozydów w różnych typach kwasów nukleinowych jest diametralnie różne. W DNA występuje głównie 5-metylocytydina, w informacyjnym ("messenger") RNA nie znaleziono modyfikowanych nukleozydów, w rybosomalnym RNA występują tylko pochodne metylowane. Miejscem wystę-

\*Zasadniczą część niniejszej pracy napisano w listopadzie 1972 r.

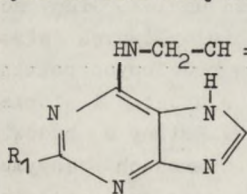
powania dużych ilości rzadkich nukleozydów są transferowe kwasy rybonukleinowe (tRNA). Dotychczas znaleziono w tRNA przeszło 30 modyfikowanych nukleozydów (1,2). Przypisano im nipoślednią rolę w strukturze i funkcji tRNA (3). Wszystkie poznane dotychczas rzadkie nukleozydy niekiedy ogólnie dzieli się na dwie grupy:

- nukleozydy zmodyfikowane w sposób „prosty”,
- nukleozydy supermodyfikowane.

Do grupy „prostych modyfikacji” zaliczyć można:

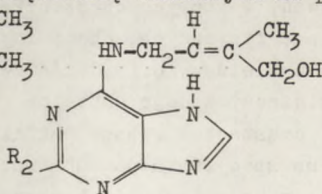
- metylowanie heterocyklicznej zasady lub rybozy w nukleozydzie,
- redukcja wiązania podwójnego 5,6 w cząsteczce pirymidyny (dwuhydrouracyl),
- podstawienie grupy hydroksylowej siarką (np. tiouracyl),
- podstawienie grupy aminowej grupą hydroksylową (inozyna),
- przemieszczenie zasady w stosunku do cząsteczki cukru (pseudorydyna).

Własności modyfikowanych nukleozydów w niektórych wypadkach różnią się zasadniczo od macierzystych cząsteczek np. zmiana systemu elektronów  $\pi$  w dwuhydrourynie zmienia zasadniczo asocjację warstwową (ang. stacking), w oligonukleotydach zawierających urydynę, a 5-rybozylouracyl w przeciwieństwie do urydyny jest źródłem kwaśnego protonu i stanowi aktywne centrum tRNA. Niektóre modyfikacje polegają na przyłączeniu dużego łańcucha bocznego do cząsteczki zasady heterocyklicznej. Są to tzw. nukleozydy supermodyfikowane (ang. hipermodified), (ryc.1). Modyfikowane zasady, gdy przyjmujemy dla tRNA budowę liścia koniczyny (ryc. 2), są na ogół rozmieszczone w miejscach, gdzie nie ma sparowania między zasadami oraz w pętlach. Cechą charakterystyczną jest fakt, że „supermodyfikowane” zasady występują w pętli antykodonu, w miejscu przyległym do antykodonu od strony końca 3' cząsteczki. Z tą pozycją związana jest istotna rola tych zasad w oddziaływaniu tRNA z rybosomami. Pojawienie się modyfikowanych zasad jest wynikiem działania odpowiednich enzymów, które w świetle najnowszych ustaleń modyfikują cząsteczkę nukleozydu na poziomie polimeru (25).

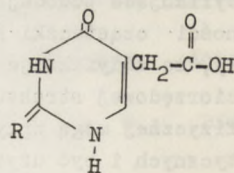


(1)  $R_1 = H$

(2)  $R_1 = SCH_3$

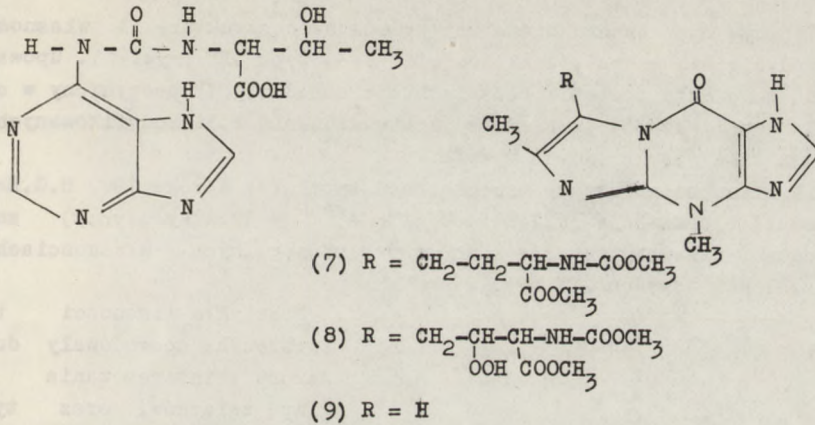


(3)

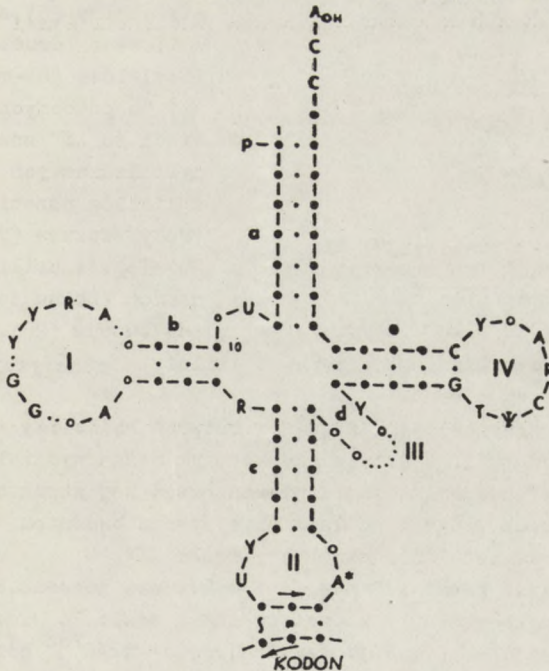


(4)  $R = O$

(5)  $R = S$



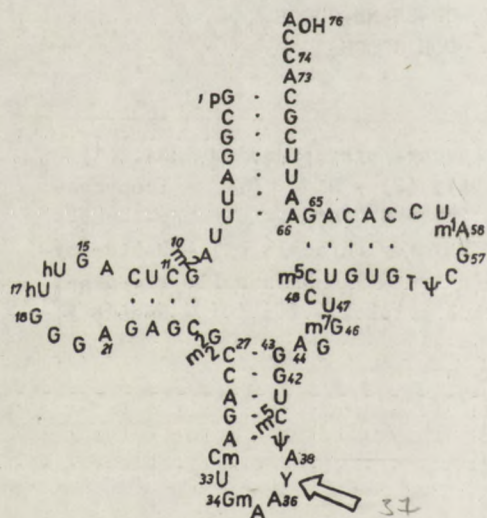
Ryc. 1. Niektóre zasady supermodyfikowane, występujące w tRNA. (1) -  $\text{N}^6$  - ( $\Delta^2$ - izopentylo) adenina (ipA); (2) -  $\text{N}^6$  - ( $\Delta^2$  - izopentylo (2-metylotioadenina)  $\text{m}^2$  SipA); (3) -  $\text{N}^6$  (cis 4-hydroksy-3-metylobuten-2-yloadenina; (4) - 5-karboksymetylouracyl; (5) - 2-tiometylo-5-karboksymetylouracyl; (6) - N-(puryn-6-ylo-karbamoilo)treonina, ( $\text{t}^6\text{A}$ ); (7) - zasada  $\text{Y}^+$ ; (8) - zasada peroksy -  $\text{Y}^+$ ; (9) - zasada  $\text{Y}_t^+$



Ryc. 2. Model „liścia koniczyny” dla tRNA. a - ramię aminokwasowe; b - ramię dwuhydrourydyny; c - ramię antykodonu; d - ramię dodatkowe; e - ramię TΨC; I - pętla dwuhydrourydyny, II - pętla antykodonu; III - pętla dodatkowa, IV - pętla TΨC; A - miejsce występowania supermodyfikowanych zasad w strukturze pierwszorzędowej; R - puryna, Y - pirymidyna; A - adenina; G - guanina; U - uracyl.

W niniejszym opracowaniu pragniemy przedstawić strukturę i własności jednego rodzaju tych zasad, a mianowicie zasad typu „Y” (ryc. 1). Upoważnia nas do tego duży postęp w badaniach nad zasadami „Y” poczyniony w ostatnich latach i ważność problemu z punktu widzenia roli modyfikowanych komponentów tRNA w organizmach żywych.

Obecnie znane są struktury trzech zasad typu „Y”. W roku 1967 H.G.Kho-rana oznaczając sekwencje nukleotydów w tRNA<sup>Fen</sup> z drożdży (ryc.3) znalazł niezidentyfikowany wówczas komponent o szczególnych własnościach, który nazwał nukleotydem „Y” (4).



Ryc. 3. Model „liścia koniczyny” dla fenyloalaninowego tRNA z drożdży. W pozycji 37 nukleotydy Y

Niezwykłe własności tej cząsteczki spowodowały duży wzrost zainteresowania tą grupą związków, oraz tymi tRNA, które zawierały zasady podobne do „Y”.

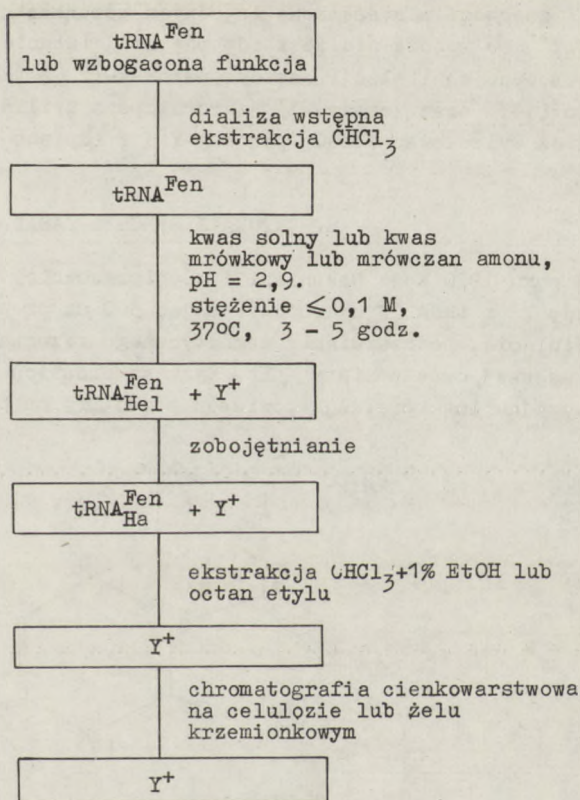
Wykorzystując własność tRNA zawierających nukleotydy „Y”, Tener w roku 1967 opracował prostą metodę wyodrębniania tych kwasów z mieszaniny (5), stosując benzoiłowaną dwuetyloaminoetylcelulozę (BD-celulozę). Związki o podobnych własnościach do „Y” znaleziono w fenyloalaninowych tRNA (tRNA<sup>Fen</sup>) z kiełków pszenicy (6), wątroby szczura (7), drożdży *Torulopsis utilis* (8) oraz z nasion łubinu żółtego, *Lupinus luteus* (26). Prace te u-

łatwił fakt, że wszystkie zasady typu Y silnie fluoryzują przy ok. 440 nm, wzbudzone przy 310 nm.

Niezwykle cenną własnością okazała się łatwość hydrolizy wiązania glikozydowego nukleotydu „Y”. W środowisku kwaśnym można wydzielić modyfikowaną zasadę typu „Y” bez zniszczenia pierwszorzędowej struktury tRNA (9). Otrzymane w ten sposób związki poddano precyzyjnym badaniom spektralnym, które doprowadziły do ustalenia struktury zasad „Y”.

Funkcja biologiczna zasad „Y” nie jest dokładnie poznana. Usunięcie tej zasady w fenyloalanylo-tRNA<sup>Fen</sup> z drożdży znosi zdolność wiązania z rybosomami w obecności poli-U (9, 10). Fenyloalanylo-tRNA<sup>Fen</sup> bez zasady „Y” nie rozpoznaje kodonu UUU, ale w dalszym ciągu może rozpoznawać kodon UUC. Kodon UUU może być rozpoznawany tylko przy wyższym stężeniu Mg<sup>+2</sup> (11).

Metodę izolacji rzadkiej zasady „Y” opracowali Thiebe i Zachau (9). Po niewielkiej modyfikacji (12) jest ona obecnie stosowana do otrzymywania tego związku z tRNA.



Ryc. 4. Schemat procesu izolacji zasad Y<sup>+</sup> z tRNA

Ogólny schemat postępowania przedstawiony jest na rysunku (ryc. 4).

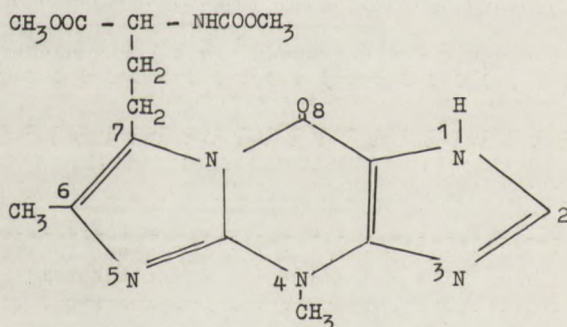
Roztwór wodny tRNA<sup>Fen</sup> (lub frakcji tRNA wzbogaconej w tRNA<sup>Fen</sup>) dializuje się oraz ekstrahuje chloroformem w celu usunięcia zanieczyszczeń hydrofobowych. Następnie doprowadza się do pH 2,9 i przeprowadza inkubację w 37°C przez 3-5 godzin. Całkowite stężenie soli nie może być większe niż 0,1 M, ponieważ wpływa to niekorzystnie na szybkość reakcji. Reakcję hydrolizy wiązania N-glikozydowego w nukleozydzie „Y” można przyspieszyć przez ogrzanie roztworu tRNA. W takich warunkach aktywność akceptorowa może ulegać zmianie. Po inkubacji doprowadza się roztwór do pH = 6,9 i zasadę „Y<sup>+</sup>” ekstrahuje się chloroformem lub octanem etylu. Po odparowaniu rozpuszczalnika surowy preparat oczyszcza się metodą chromatografii bibułowej lub cienkowarstwowej w układzie rozpuszczalników octan etylu - n-propanol - woda 4:1:2 (12). Silnie fluoryzujące pasmo o Rf około 0.70 wymywa się octanem etylu nasyconym wodą. Ze względu na nietrwałość zasady „Y” w czystym chloroformie, używa się octanu etylu lub chloroformu z do-



datkiem 1% alkoholu etylowego (13). Hydroliza nukleozydu „Y” do zasady „Y<sup>+</sup>” zachodzi w stosunkowo łagodnych warunkach, ponieważ wiązanie pomiędzy „Y<sup>+</sup>” a rybozą nie jest odporne na działanie kwasów. Procedurę tę zastosowano do izolacji zasady „peroksy-Y” z tRNA<sup>P<sub>en</sub></sup> wątroby wołu i cielęcia (14) oraz zasady Y<sub>t</sub><sup>+</sup> z *Torulopsis utilis* (8). Ostatnio udało się również wyizolować zasadę peroksy-Y<sup>+</sup> z *Lupinus luteus* (26).

### STRUKTURA I SYNTEZA ZASAD „Y<sup>+</sup>”

W roku 1970 Koji Nakanishi i współpracownicy (15) oznaczyli strukturę zasady Y<sup>+</sup> z tRNA<sup>P<sub>en</sub></sup> z drożdży. Mając 300 μg preparatu wykonali widma w nadfiolecie, podczerwieni, magnetycznego rezonansu jądrowego, spektroskopii masowej oraz pomiary pK<sub>a</sub>. Synteza prostych związków modelowych oraz precyzyjna interpretacja pomiarów pozwoliły na oznaczenie struktury (ryc.5).



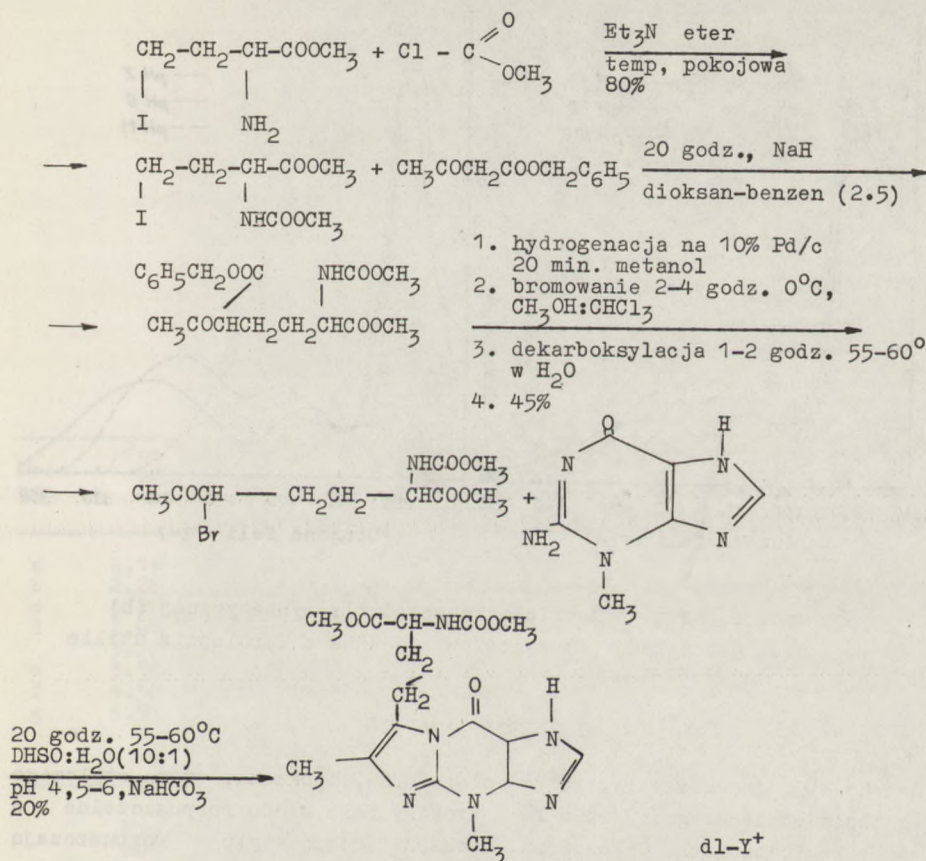
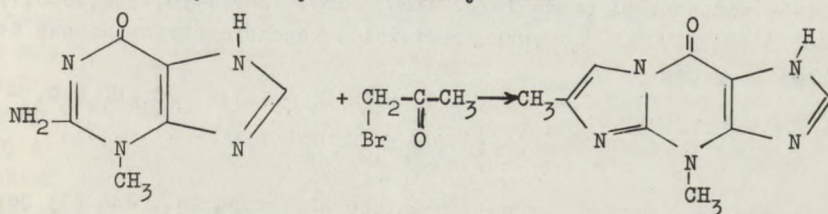
ester dwumetylowy kwasu α-(karboksyamino)-4,9-dwuhydro-4,6-dwumetylo-9-okso-1H-imidazo [1,2-a]-puryno-7-masłowego

Ryc. 5. Zasada Y<sup>+</sup> z drożdży oraz jej nazwa systematyczna

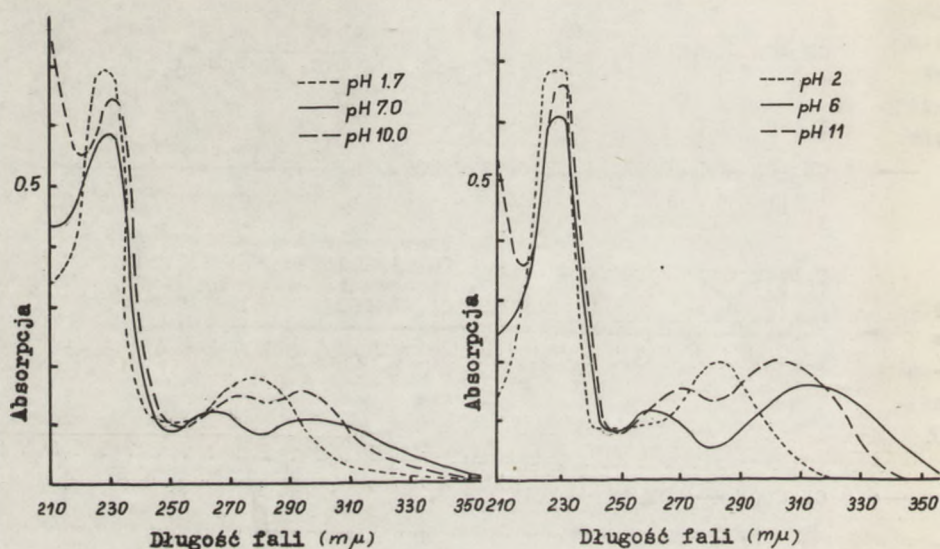
Strukturę zasady Y<sup>+</sup> potwierdzono na drodze syntezy (17). Etapy syntezy dl-Y<sup>+</sup> przedstawiono na ryc.6. Na podstawie analizy związków modelowych konfigurację Y<sup>+</sup> określono jako S.

Drugą zasadą typu „Y”, której budowę potwierdzono na drodze syntetycznej była zasada Y<sub>t</sub><sup>+</sup> z *Torulopsis utilis* (8). Izolowano ją z frakcji tRNA wzbogaconej w specyficzny tRNA<sup>P<sub>en</sub></sup>. Dysponując 180 μg czystej substancji wykonano pomiary spektroskopowe, na podstawie których oznaczono strukturę Y<sub>t</sub><sup>+</sup> (związek 10 na ryc. 1). Poprawność określenia budowy tego związku S. Takemura (8) potwierdził na drodze syntezy. Wychodząc z 3-metyloguaniny i bromoacetonu otrzymano związek o własnościach spektralnych podobnych do Y<sub>t</sub><sup>+</sup> (ryc. 7).

Identyczność naturalnej i syntetycznej zasady Y<sub>t</sub><sup>+</sup> można stwierdzić m.in. przez porównanie widm w ultrafiolecie (ryc. 8).

Ryc. 6. Synteza zasady dl-Y<sup>+</sup>Ryc. 7. Synteza zasady Y<sub>t</sub><sup>+</sup> (*Torulopsis utilis*)

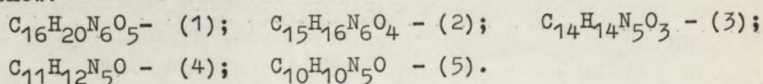
Znana jest również struktura zasady „peroksy-Y” (związek (9) na ryc.1). Duże podobieństwa między (8) i (9) nasuwały przypuszczenie że „peroksy-Y” może być artefaktem po działaniu enzymu peroksydazy podczas izolacji. Próby konwersji obu zasad nie potwierdziły wątpliwości (14).



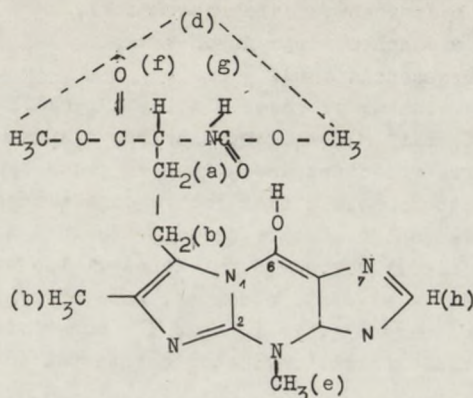
Ryc. 8. Widma w nadfiolecie zasad  $Y^+$ ; syntetycznej (b) oraz naturalnej (a) wyizolowanej tRNA z *Torulopsis utilis*

#### WŁASNOŚCI ZASAD $Y^+$

Zasadę  $Y^+$  można krystalizować z chloroformu, dioksanu, eteru etylowego lub glikolu etylenowego. Zasada  $Y^+$  z drożdży jest słabo rozpuszczalna w wodzie i węglowodorach. Chloroform, dioksan i octan etylu rozpuszczają ten związek w ilości około 1 mg/ml. Widmo dichroizmu kołowego wykonane w wodzie charakteryzuje się ujemnym efektem Cottona przy 237 nm. W widmie IR (13) widoczne są pasma 1070, 1120, 1260, 1285, 1430, 1950, 1680, 1725, 2850, 2920, 3140, 3290  $\text{cm}^{-1}$ . Wysoko rozdzielcza spektrometria masowa daje sygnały dla jonów:



Obserwowano ponadto sygnały różniące się grupą  $\text{CH}_2$ . Jon (1) jest prawdopodobnie jonem molekularnym. Mała zawartość atomów wodoru w jonie (5) wskazuje na możliwość istnienia 8 pierścieni lub wiązań podwójnych i wolnych wartościowości (13). Fragment ten powinien stanowić aromatyczną część cząsteczki i tworzyć się przez rozerwanie wiązania C-C-Ar. Obecność pięciu atomów azotu i jednego atomu tlenu w jonie (5) sugeruje układ guaniny. Istnienie jonów  $\text{C}_{14}\text{H}_{14}\text{N}_5\text{O}_3$  i  $\text{C}_{11}\text{H}_{12}\text{N}_5\text{O}$  wskazuje na fragmenty łańcucha bocznego bogatego w heteroatomy. Zastosowanie reakcji trójmetrylosilowania pozwoliło stwierdzić istnienie wolnych grup karboksylowych w niearomatycznej części związku. W widmach spektrometrii masowej można za-



Proton	( <sup>2</sup> H) chloroform	( <sup>2</sup> H) chloroform + H <sup>2</sup> O	( <sup>2</sup> H) pirydyna	( <sup>2</sup> H) pirydyna + H <sup>2</sup> O	( <sup>2</sup> H) acetonitryl
a	2,18 (2) m	2.1	2.3 (2)	2.4	
b	2.26 (3) s	2.3	2.3 (3)	2.3 (3)	
c	3.20 (2) m				3.30 (2) m
d	3.68 (3) s	3.7	3.84 (6)	3.7 (3)	3.84 (6) s
e	3.70 (3) s!			3.6 (3)	
f	3.96 (3) s	4.08	4.14 (3)	3.9	4.00 (3) s
g	4.38 (1) m	4.4	4.4 (1)	4.4 (1)	4.34 (1) m
h	5.9 (1) b		6.0 (1)	5.7 (1)	7.45 (1) b
					7.7 (1) s
					8.00 (1) s

Ryc. 9. Przesunięcia chemiczne protonów (w ppm) w widmie magnetycznego rezonansu jądrowego zasady Y<sup>+</sup>. s = singlet; m = multiplet, b = sygnał szeroki

obserwować przesunięcie odpowiednich sygnałów po silylowaniu o 72 jednostki masy. Stwierdzono również, że układ zawiera grupę metoksyową.

Dane magnetyczne rezonansu jądrowego otrzymane przez Koji Nakanishi i H.G. Zachau są podobne i zgodne z zaproponowaną strukturą. Niewielkie różnice są spowodowane efektem rozpuszczalnika. Przesunięcie protonu „n” (ryc. 9) w widmie NMR wykonanym w pirydynie spowodowane jest prawdopodobnie efektem prądu kołowego w rozpuszczalniku (13). Protonowi „e” odpowiadają dwa sygnały, które są prawdopodobnie wynikiem przegrupowania grupy metylowej. Nie udało się przypisać sygnałów dla protonów łatwo ulegających wymianie (N-7 i C-6). Z pomiarów stałej sprzężenia między protonami „a” i „f” wynika, że istnieje ograniczona rotacja w łańcuchu bocznym, którą można również obserwować na modelach atomowych.

Z ogólnej charakterystyki zasad Y<sup>+</sup> wynika, że będą one wpływały na własności kwasu nukleinowego, w którym się znajdują. Obecność supermodyfikowanej zasady będzie również miała związek z funkcją tRNA. Wydaje się oczywiste, że zasady typu Y<sup>+</sup> będą decydowały o:

- charakterze hydrofobowym całej cząsteczki,
- różnicach w widmach absorpcyjnych tRNA,
- widmach fluorescencji tRNA.

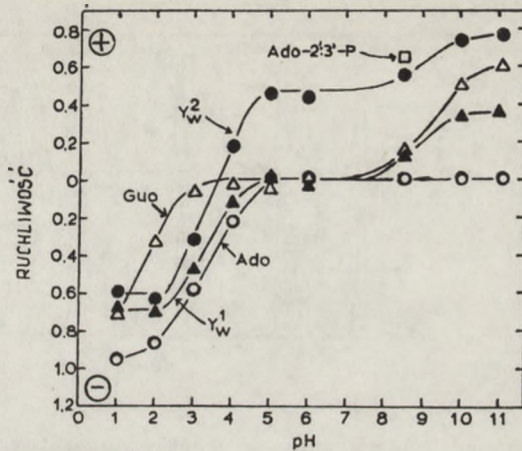
Różnice między widmami wzbudzenia wolnych zasad  $Y^+$  otrzymanych z drożdżowego tRNA<sup>Fen</sup> i tRNA<sup>Fen</sup> z wątroby szczura, a widmami zasad  $Y^+$  zaangażowanych w strukturze trzeciorzędowej tRNA są dwóch typów:

- przesunięcie batochromowe w tRNA jest zgodne z oczekiwanym przejściem  $n \rightarrow \pi$  dla fluorescencji. Przyczyną tego zjawiska może być efekt asocjacji warstwowej między sąsiadującymi zasadami lub między dwoma zasadami niezaangażowanymi w wiązanie wodorowe. Dane otrzymane z depolaryzacji fluorescencyjnej sugerują, że rotacja  $Y^+$  może być ograniczona przez oddziaływanie z niektórymi regionami cząsteczki tRNA (18),
- oprócz przesunięcia batochromowego, widmo wzbudzenia  $Y^+$  w tRNA posiada bardziej intensywne pasmo w regionie 280 nm niż oczekiwano. Przyczyną może być przeniesienie energii z sąsiedniego nukleozydu absorbującego w pobliżu 280 nm na Y lub charakterystyczne lokalne otoczenie może wzmożnić aktywność fluorescencji obserwowanej przy wzbudzeniu 280 nm w stosunku do 310 nm.

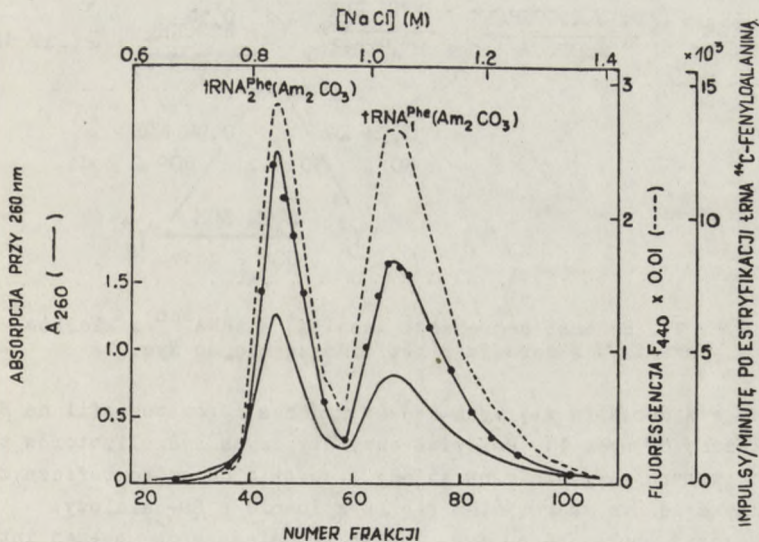
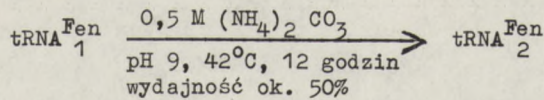
Nukleozyd Y znaleziono tylko w transferowych RBA specyficznych dla fenyloalaniny. Oprócz trzech zasad Y o znanej strukturze (8,9,10, -  $\bar{Y}yc$ , 1), wyodrębnionych z tRNA<sup>Fen</sup>, inne fenyloalaninowe tRNA zawierają związki o bardzo podobnej charakterystyce widmowej, ale struktura ich nie jest ustalona. Mimo tego, funkcję tych zasad można badać na drodze chemicznej modyfikacji.

D. Yoshikami i E.B. Keller (19), wykonując chromatografię tRNA<sup>Fen</sup> z kiełków pszenicy, otrzymali trzy frakcje, które nazwali tRNA<sup>Fen</sup><sub>1</sub>, tRNA<sup>Fen</sup><sub>2</sub>, tRNA<sup>Fen</sup><sub>3</sub>. Po rechromatografii na BD-celulozie oczyszczone frakcje tRNA<sup>Fen</sup><sub>1</sub> i tRNA<sup>Fen</sup><sub>2</sub> miały maksimum emisji przy 440 nm (wzbudzenie 310 nm), świadczące o obecności nukleozydu Y. Zauważono, że tRNA<sup>Fen</sup><sub>2</sub> ma mniejsze powinowactwo do BD-celulozy. Zmiana wielkości oddziaływania z podłożem mogła być spowodowana modyfikacją nukleozydu Y w tRNA<sup>Fen</sup><sub>1</sub>. Dla potwierdzenia tej hipotezy kwasy te poddano łagodnej hydrolizie w celu uwolnienia zasad  $Y^+$ . Zachowanie chromatograficzne i elektroforetyczne tych zasad jest różne. Przez zastosowanie miareczkowania elektroforetycznego wykazano, że  $Y_1^+$  ma pojedynczą protonoakceptorową grupę o pKa 3.3 i słabokwaśną grupę o pKa około 9 ( $\bar{Y}yc$ , 10). Krzywa dla  $Y_1^+$  jest podobna do guaniny ale pKa 1 dla  $Y_1^+$  jest wyższe. Porównanie krzywych dla  $Y_2^+$  i  $Y_1^+$  wskazuje, że  $Y_2^+$  ma dodatkową grupę o pKa około 4 i w naturalnym zakresie pH (5-7.5), posiada ładunek ujemny.  $Y_1^+$  w tym zakresie pH nie ma ładunku. Te dane zdają się wyraźnie wskazywać na obecność grupy karboksylowej w łańcuchu bocznym fluorescencyjnego chromoforu  $Y_2^+$ . Ujemny ładunek  $Y_2^+$  w neutralnym pH może być powodem zmniejszenia się hydrofobowości tRNA<sup>Fen</sup><sub>2</sub> w stosunku do BD-celulozy. Modyfikacja  $Y_1^+$  do  $Y_2^+$  może zajść podczas izolacji surowego tRNA lub w czasie chromatografii na DEAE, celulozie, w zbyt alkalicznych

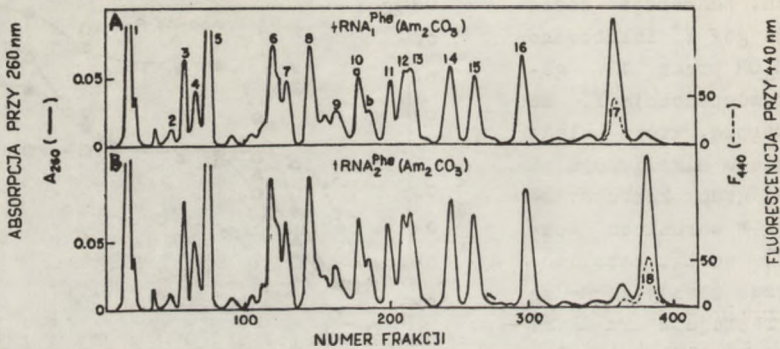
warunkach. Konwersja zasad występuje gdy  $Y_1^+$  inkubowano w 5 n  $\text{NH}_4\text{OH}$  przez 12 godzin. Prawdopodobnie  $Y_1^+$  ma grupę estrową, która ulega hydrolizie w alkalicznym pH do wolnej grupy karboksylowej w  $Y_2^+$ . W warunkach konwersji  $Y_1^+$  do  $Y_2^+$ , katalizowanej przez zasady, zachodzą uboczne reakcje z rzadkimi nukleozydami (19). Alkaliczne środowisko może powodować otwarcie pierścienia imidazolowego w 7-metyloguanozynie, przegrupowanie 1-metyloadenozyny do  $N^6$ -metyloadenozyny lub otwarcie pierścienia w dwuhydrourydyne. Specyficzna modyfikacja zasady  $Y_1^+$  in situ w  $\text{tRNA}_{\text{Fen}}^{\text{Fen}}$  powoduje powstanie około 50%  $\text{tRNA}_{\text{Fen}}^{\text{Fen}}$ .



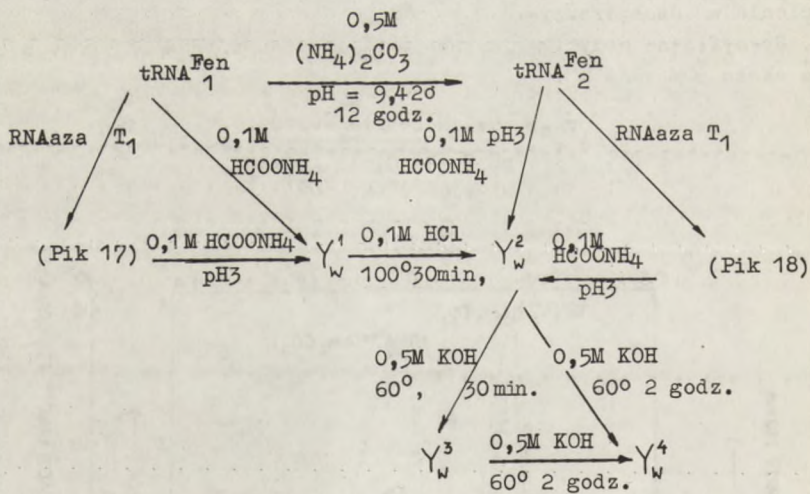
Ryc. 10. Krzywe elektroforetyczne miareczkowania zasad w różnych zakresach pH. Ado - adenina; Guo - guanina; Ado-2'3'-P - adenozylna 2'3' fosforan  $Y_1^+$ ,  $Y_2^+$  - zasady Y z  $\text{tRNA}_{\text{Fen}}^{\text{Fen}}$  kielków pszenicy



Ryc. 11. Chromatografia na benzoilowanej dwuetyloaminoetylo celulozie  $\text{tRNA}_{\text{Fen}}^{\text{Fen}}$  po modyfikacji węglanem amonu ( $\text{Am}_2\text{CO}_3$ ).  $F_{440}$  - fluorescencja przy 440 nm



Ryc. 12. Różnice w obrazie chromatograficznym hydrolizatów  $tRNA_1^{Fen}$  i  $tRNA_2^{Fen}$  po trawieniu rybonukleazą  $T_1$ : A -  $tRNA_1^{Fen}$  po działaniu  $Am_2CO_3$  (ryc.11), B -  $tRNA_2^{Fen}$  po działaniu  $Am_2CO_3$  (ryc. 12)



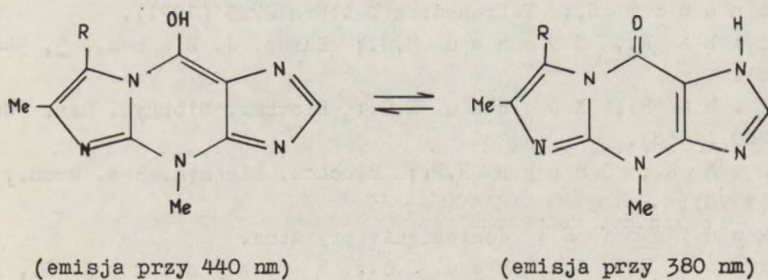
Ryc. 13. Schemat degradacji zasad  $Y^+$  w  $tRNA^{Fen}$  z kielków pszenicy. Numeracje pików odnoszą się do Ryc. 12

Różnice w zachowaniu się tych kwasów podczas chromatografii na BD-celulozie pokazano na ryc. 11. Rozdział enzymatycznych hydrolizatorów  $tRNA_1^{Fen}$  i  $tRNA_2^{Fen}$  wskazuje wyraźnie na zmiany w obrazie chromatograficznym (ryc. 12), zgodne z różnym zachowaniem się na kolumnie z BD-celulozy. Dalsze przemiany zasad, pokazane na ryc. 13, są trudniejsze do pełnej interpretacji, ale będą one niewątpliwie pomocne przy określaniu struktury zasady  $Y^+$  z kielków pszenicy. Ponieważ znana jest struktura zasady  $Y^+$  z drożdży, można zaobserwować pewne analogie. W cząsteczce  $Y^+$  z drożdży fluorescenc-

cyjny chromofor związany jest z bocznym łańcuchem zawierającym aminokwas. Grupa aminowa blokowana jest podstawnikiem karbometoksy- a grupa karboksylowa występuje jako ester metylowy. W przypadku konwersji  $Y_1^+$  do  $Y_2^+$  zostaje odblokowana grupa karboksylowa, a utworzenie  $Y_4^+$  oznacza powstanie wolnej aminy. Na tej podstawie można przypuszczać, że zasada  $Y^+$  z kiełków pszenicy ma podobny łańcuch boczny, z zablokowanym aminokwasem.

Jak podano wyżej, w warunkach łagodnej hydrolizy powstaje  $tRNA_2^{Fen}$  specyficznie modyfikowany w regionie przyległym do antykodonu. Aktywność akceptorowa  $tRNA_1^{Fen}$  i  $tRNA_2^{Fen}$  były porównywalne, natomiast reakcja polimeryzacji fenyloalaniny kodowana przez poli-U w przypadku  $tRNA_2^{Fen}$  przebiega z wydajnością tylko 70%. Wyniki te są zgodne z wcześniejszymi poglądami o braku wpływu struktury antykodonu na aktywność tRNA w reakcji aminacylacji.

Interesujące wnioski można uzyskać na podstawie widm fluorescencji. Widma takie obserwuje się w przypadku cząsteczki tRNA przy wzbudzeniu 310nm. Obserwowana subtelna struktura widm emisji wskazywać może na mieszaninę różnych stanów zasady  $Y^+$ , która może również dysocjować z polimeru. W przypadku  $tRNA^{Fen}$  z myszy emisja przy 390 nm może być dowodem zmian struktury zasady  $Y^+$ . Zasady  $Y^+$  z drożdży i wątroby myszy ekstrahowane rozpuszczalnikami organicznymi dają widma fluorescencji przesunięte hipsochromowo (16). Fink (16) znalazł, że przesunięcie maksimum emisji z 430 nm do 380 nm zachodzi w pH 7-8. Efekt ten może być spowodowany przeniesieniem protonu (ryc. 14). Formie enolowej przypisano absorpcję przy 440 nm ze względu na obecność skoniugowanego systemu elektronów. Fluorescencja zasady  $Y^+$  zmienia się ze stężeniem jonów  $Mg^{++}$ . Przy przejściu od stężenia  $10^{-5}M Mg^{++}$  do  $0,1 M Mg^{++}$  intensywność fluorescencji wzrasta 250 razy (21). Fluorescencja zasady  $Y^+$  jest około sześć razy większa w niepolarnych rozpuszczalnikach niż  $H_2O$ . Przy nieobecności jonów magnezu,  $D_2O$  powoduje wzrost fluorescencji o 50% (21).



Ryc. 14. Tautometria zasady  $Y^+$

Interesującym zagadnieniem pozostaje wpływ zasad typu  $Y^+$  na różnicowanie i wzrost komórek. Do połowy roku 1970 uważano, że fenyloalaninowe tRNA nie zawierają substancji cytokininowych (22). N.J. Leonard (23) stwierdził, że  $Y^+$  spełnia odpowiednie warunki strukturalne i powinna być cytokininą lub prekursorem cytokiny.



Przedstawiony materiał nagromadzony w ciągu krótkiego czasu wskazuje na duże zainteresowanie zagadnieniem modyfikowanych komponentów w transferowych kwasach rybonukleinowych. Dalsze struktury zasad Y z innych źródeł są obecnie w trakcie ustalania. Znajomość tych związków pozwoli na dokładniejsze zbadanie funkcji jaką spełniają one w tRNA, a także na uogólnienie cech strukturalnych i sprecyzowanie korelacji między strukturą, a funkcją biologiczną.

#### L i t e r a t u r a

- [1] Hall R.H.; Progress in Nucleic Acid Research and Molecular Biology, Academic Press Inc., red. J.N. Davidson, W.E. Cohn New York 9, 57 (1970).
- [2] Hall R.H.; Modified Nucleosides in Nucleic Acid, Columbia University Press 1971.
- [3] Janion C.; Post. Bioch., 17, 631 (1971).
- [4] Raj Bhandary U.L., Chang S.H., Stuart A., Faulkner R.D., Hoskinson R.M., Khorana H.G.; Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 57, 751 (1967).
- [5] Wimmer E., Maxwell I.H., Tener G.M.; Biochem, 7, 2623 (1968).
- [6] Dudock B.S., Katz G., Taylor E.K., Holley R.W.; Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 62, 941 (1969).
- [7] Fink L.M., Goto T., Frankel F., Weinstein I.B.; Biochem. Biophys. Res. Comm., 32, 963 (1968).
- [8] Kasai H., Goto M., Takamura S., Goto T., Matsuura S.; Tetrahedron Letters 2725 (1971).
- [9] Thiebe R., Zachau H.G.; Europ. J. Biochem., 5, 546 (1968).
- [10] Thiebe R., Zachau H.G.; Biochem. Biophys. Res. Comm., 33, 260 (1968).
- [11] Ghosh K., Ghosh H.P.; Biochem. Biophys. Res. Comm., 40, 135 (1970).
- [12] Nakanishi K.; doniesienie prywatne.
- [13] Thiebe R., Zachau H.G.; Baczynskyj L., Bie-man K., Sonnenbichler J.; Biochem. Biophys. Acta 240, 163 (1971).
- [14] Nakanishi K., Blobstein S., Funamizu M., Furutachi N., Lear G.U., Grunberger D.; Lanks K.W., Weinstein I.B.; Nature, New Biology 234, 107 (1971).

- [15] Nakanishi K., Furutachi N., Funamizu M., Grunberger D., Weinstein I.B.; J. Amer. Chem. Soc., 92, 7617 (1970).
- [16] Hancock R.L., Chertner L., Dougan D.; Physiol. Chem. and Phys. 3, 559 (1971).
- [17] Funamizu M., Terahara A., Feinberg A.M., Nakanishi K.; J. Amer. Chem. Soc., 93, 6706 (1971).
- [18] Fink L.M., Lanks K.W., Goto T., Weinstein I.B.; Biochem., 10, 1873 (1971).
- [19] Yoshikami D., Keller E.B.; Biochem., 10, 2969 (1971).
- [20] RajBhandary U.L., Faulkner R.D., Stewart A.; J. Biol. Chem., 243, 5757 (1968).
- [21] Berdsley K., Tao T., Cantor C.R.; Biochem., 9, 3524 (1970).
- [22] Armstrong D.J., Skoog F., Kirkegaard L.H., Hempel A.E., Bock R.M., Gillam I., Tener G.M.; Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 63, 504 (1969).
- [23] Hecht S.M., Bock R.M., Leonard N.J., Schmitz R.Y., Skoog F.; Biochem. Biophys. Res. Comm., 41, 435 (1970).
- [24] Kimura-Harada F., von Minden D.L., McCloskey J.A., Nishimura S.; Biochem., 11, 3910 (1972).
- [25] Söll D.; Science 173, 293 (1971).
- [26] Feinberg A.M., Nakanishi K., Barciszewski J., Rafalski A.J., Augustyniak H., Wiewiórowski M., Van Lear G.; J. Amer. Chem. Soc., 96, 7797 (1974).

[28] ...  
[29] ...  
[30] ...  
[31] ...  
[32] ...  
[33] ...  
[34] ...  
[35] ...  
[36] ...  
[37] ...  
[38] ...  
[39] ...  
[40] ...  
[41] ...  
[42] ...  
[43] ...  
[44] ...  
[45] ...  
[46] ...  
[47] ...  
[48] ...  
[49] ...  
[50] ...  
[51] ...  
[52] ...  
[53] ...  
[54] ...  
[55] ...  
[56] ...  
[57] ...  
[58] ...  
[59] ...  
[60] ...  
[61] ...  
[62] ...  
[63] ...  
[64] ...  
[65] ...  
[66] ...  
[67] ...  
[68] ...  
[69] ...  
[70] ...  
[71] ...  
[72] ...  
[73] ...  
[74] ...  
[75] ...  
[76] ...  
[77] ...  
[78] ...  
[79] ...  
[80] ...  
[81] ...  
[82] ...  
[83] ...  
[84] ...  
[85] ...  
[86] ...  
[87] ...  
[88] ...  
[89] ...  
[90] ...  
[91] ...  
[92] ...  
[93] ...  
[94] ...  
[95] ...  
[96] ...  
[97] ...  
[98] ...  
[99] ...  
[100] ...

## METODY BADANIA STRUKTURY TRZECIORZĘDOWEJ TRANSFEROWYCH KWASÓW RYBONUKLEINOWYCH

### Streszczenie

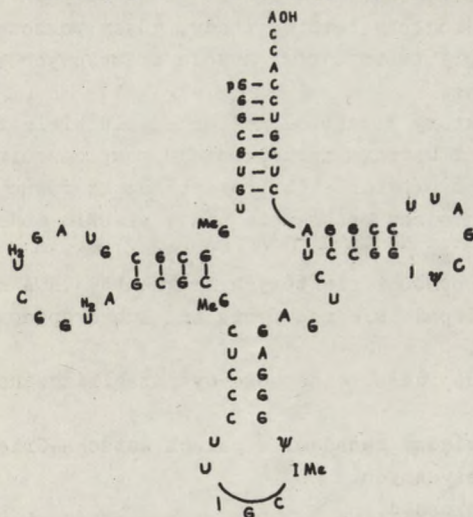
W artykule podano przegląd metod fizycznych i chemicznych używanych do badania struktury trzeciorzędowej transferowych kwasów rybonukleinowych. Jednocześnie przedstawiono w skrócie literaturowy przegląd obecnego stanu wiedzy na temat modeli struktury trzeciorzędowej tRNA.

### W s t ę p

Transferowe kwasy nukleinowe, zwane dalej w skrócie tRNA, są najmniejszymi z dotychczas poznanych rodzajów kwasów nukleinowych. Ich ciężar cząsteczkowy wynosi 25 000 - 30 000, co odpowiada 75-85 nukleotydom (1).

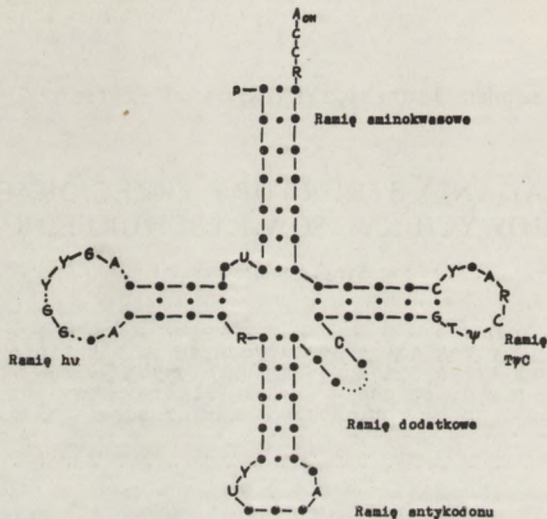
Odgrywają one kluczową rolę w translacji polinukleotydomowej sekwencji mRNA na polipeptydową sekwencję białek (2). W roku 1965 Holley i jego współpracownicy ustalili sekwencję alaninowego tRNA z drożdży i ułożyli konformację „liścia koniczyny”, w której znajdują się cztery sparowane regiony ramion związanych z pętlami (ryc. 1) (3).

Obecnie znanych jest około 40 cząsteczek tRNA z różnych źródeł, dla których ustalono strukturę pierwszorzędową, czyli sekwencję nukleotydów (1).



Ryc. 1. Drugorzędowa struktura tRNA<sup>ala</sup> z drożdży wg Holley'a

\*\* Międzywydziałowy Instytut Ochrony Pracy UAM.  
Zakład Genetyki Człowieka PAN.



Ryc. 2. tRNA przedstawiony w postaci „liścia koniczyny” wg Cramera (4)  
(Duże kropki przedstawiają zasady, małe - wiązania wodorowe, Y - zasada pirymidynowa, a R - purynowa)

Mimo dużej różnorodności, wszystkie dotychczas poznane tRNA dadzą się ułożyć w postaci uogólnionego modelu struktury drugorzędowej, czyli w postaci „liścia koniczyny” (ryc. 2).

Zachodzi pytanie, czy oprócz płaskiej struktury drugorzędowej istnieje struktura przestrzenna transferowych kwasów rybonukleinowych, zwana inaczej strukturą trzeciorzędową?

Powyższa struktura mogłaby istnieć wtedy, gdyby poszczególne elementy „liścia koniczyny” mogły tworzyć przy użyciu dodatkowych sił jednoznacznie strukturę trójwymiarową.

Za istnieniem struktury przestrzennej przemawia wiele faktów doświadczalnych, między innymi badania niskokątowego rozproszenia rentgenowskiego, które dają wielkość promienia obrotu cząsteczki równą  $24 \text{ \AA}$  w  $20^\circ\text{C}$ , co wskazuje na duże ciaśniejsze upakowanie niż w płaskim modelu „liścia koniczyny”.

Również różnica odporności niektórych fragmentów tRNA na enzymy nukleolityczne wynika prawdopodobnie z ukrycia ich lub eksponowania w strukturze przestrzennej (4).

Określona struktura przestrzenna może być stabilizowana następującymi siłami:

1. Wiązania wodorowe między zasadami w parach Watsona-Cricka lub w parach czy trójkach nieklasycznych.
2. Asocjacja warstwowa zasad.
3. Przyciąganie lub odpychanie coulombowskie anionów rdzenia fosforo-cukrowego i związanych kationów.
4. Ograniczenie rotacji w ramach rdzenia i wokół wiązania glikozydowego.

## 1. Metody badania struktury przestrzennej tRNA

Metody pozwalające badać strukturę trzeciorzędową tRNA można podzielić na dwie grupy:

- a) metody fizyczne - dostarczające informacji o pewnych cechach struktury cząsteczki, np. promień rotacji, odległość antykodon-końcówka CCA, itp.
- b) metody informujące o stopniu ukrycia lub eksponowania pewnych fragmentów w ramach struktury przestrzennej.

Do pierwszej grupy należą:

- krzywe topnienia
- spektroskopia IR, NMR
- spektroskopia rezonansu paramagnetycznego związanych jonów
- technika znaczenia spinowego
- optyczna dyspersja rotacyjna
- dichroizm kołowy
- widma fluorescencji
- sedymentacja ultrawirówkowa
- rentgenografia niskokątowa roztworów
- rentgenografia kryształów
- mikroskopia elektronowa

Do drugiej grupy można zaliczyć:

- wymianę wodoru na deuter
- kinetykę trawienia endonukleazami
- modyfikacje chemiczne

## 2. Zastosowanie metod fizycznych do badania struktury przestrzennej tRNA

### A. Krzywe topnienia

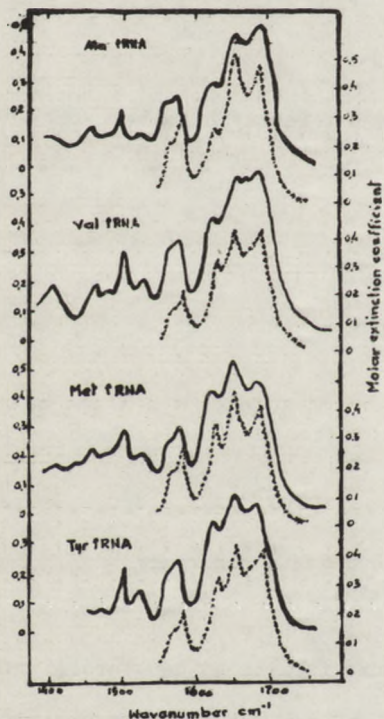
„Krzywe topnienia” zostały użyte do badania termicznej denaturacji tRNA (16, 17).

Uzyskuje się je podczas ogrzewania kwasów nukleinowych w rozcieńczonych roztworach wodnych; następuje wtedy rozsuniecie zwiniętego heliksu cząsteczki tRNA, co uwidacznia się gwałtownym efektem hipochromowym przy 260 nm. Temperatura, której efekt hipochromowy jest równy połowie wielkości maksymalnej nazywa się „temperaturą topnienia”  $T_m$  polinukleotydu. „Temperatura topnienia” kwasów nukleinowych jest określona średnią energią wiązania przypadającą na parę zasad. Ponieważ różne pary A-U i G-C mają różne energie wiązania, „temperatura topnienia” zależy od składu nukleotydowego.

Przebieg „krzywych topnienia” dla tRNA wskazuje na dużą złożoność reakcji denaturacji termicznej. Obliczone teoretycznie entalpie przejścia i aktywacji są zgodne z obserwowanymi dla „topnienia” podwójnie skręconych polinukleotydów. Profile „topnienia” wykonane w ultrafiolecie dla tRNA<sup>ser</sup> można było skorelować z reakcją aminoacylacji (18).

### B. Metody spektroskopowe

Spektroskopia w podczerwieni została użyta do określenia ilości sparowanych i nie sparowanych zasad w całej cząsteczce tRNA (5) lub w poszczególnych rejonach pętli (6), jak również do pomiarów profili „temperatury topnienia”, które są bardzo podobne do obserwowanych w nadfiolecie przy 260 nm (7).



Ryc. 3. Widma absorpcyjne w podczerwieni filmów tRNA przy 92% wilgotności względnej. Linie przerywane odpowiadają widmom obliczonym przy założeniu:

ala tRNA = 2 AU+17GC+6A+9U+8G+6C  
 val tRNA = 7AU+13GC+8A+4U+4G+8C  
 met tRNA = 2AU+17GC+13A+5U+6G+8C  
 tyr tRNA = 7AU+17GC+11A+6U+4G+10C

netyczny o wysokim stopniu rozdzielczości przy 220 MHz wykonany dla tRNA<sup>ala</sup> pozwolił wykryć grupy metylowe i protony dwuhydrourydyłowe oraz badać wpływ temperatury i pH na otrzymane sygnały (14). Badano również oddziaływanie pomiędzy Na<sup>23</sup>, który ma charakter jądra kwadrupolowego, a drożdżowym tRNA w roztworach wodnych techniką Na<sup>23</sup> NMR (15).

Pod wieloma względami dane spektralne wymienionych czterech tRNA są bardzo podobne, występują jednak pewne różnice w rejonach 1750-1400 cm<sup>-1</sup> i 840-760 cm<sup>-1</sup> (8). Analizowane tutaj dane spektralne odzwierciedlają ilość par AU i GC oraz ilość nie sparowanych zasad A, U, G i C w każdym tRNA. Widma teoretyczne wymienionych kwasów tRNA obliczono wg metody Thomasa (9). Pewne wyniki strukturalne uzyskane również podczas badania wpływu promieniowania między innymi UV, X,  $\gamma$ , na aktywność akceptorową tRNA (10, 11). W wyniku naświetlania światłem nadfioletowym uzyskano 50% inaktywację formylometioninowego tRNA z E. coli, spowodowaną modyfikacją urydyn w pętli antykodonowej i ramieniu dodatkowym oraz 4 - tiourydyny i pirymydydnu w ramieniu dwuhydrourydyłowym (12).

Zastosowanie techniki magnetycznego rezonansu jądrowego do badania struktury cząsteczki tRNA jest mniej użyteczne niż w przypadku białek, ponieważ cztery główne nukleozydy mają bardzo podobne przesunięcia chemiczne, zaś duża ich liczba w cząsteczce tRNA powoduje poszerzenie sygnałów (13). Protonowy rezonans magnetyczny

### C. Zastosowanie widm fluorescencji do badań strukturalnych tRNA

W badaniach struktury przestrzennej kwasów nukleinowych zaczynają odgrywać coraz większą rolę metody oparte na badaniu charakterystyki luminescencji. Metoda powyższa stwarza możliwość fluoryzowania cząsteczek tRNA zarówno *in vitro*, jak i *in vivo*. Poza tym, fakt łatwości tworzenia kompleksów kwasów nukleinowych z fluoryzującymi cząsteczkami (barwnikami) może znaleźć zastosowanie w wyjaśnianiu budowy tych biopolimerów (19).

Zasady purynowe i pirymidynowe wykazują fluorescencję i fosforescencję tylko przy pobudzeniu światłem nadfioletowym w niskich temperaturach (20, 21). Natomiast rzadkie nukleozydy, takie jak: 7-metyloguanozyna, 7-metyloinozyna,  $N^4$ -acetylocytydina, 4-tiourdyna i nukleozyd Y wykazują luminescencję w normalnej temperaturze (22, 23, 24),

Efekt ten wykorzystano do badania przyłączenia jonów metali (25) oraz przybliżonego wyjaśnienia trzeciorzędowej struktury tRNA przez pomiar energii przejścia singlet-singlet (26).

W tym celu do cząsteczki tRNA<sup>fen</sup>, która zawiera już fluoryzujący nukleozyd Y, wprowadzono od końca 3' chemicznie trzy różne akceptory energii: akryflawinę, hydrazyd kwasu paraflawinylooctowego lub 9-hydrazynoakrydynę (ryc. 4).

Odległość między końcem CCA i antykodonem można było określić poprzez pomiar energii fluorescencji i wynosi ona około 40 Å. Jednocześnie pomiary energii fluorescencji pozwoliły wykluczyć lub potwierdzić pewne schematy modelowe tRNA.

Wysoce fluoryzujące analogi adenozyne - formycynę i proflawinę - użyto do badań fizycznych, między innymi profili temperaturowych (27). Szczególnie formycyna okazała się najlepszym analogiem adenozyne w wielu reakcjach enzymatycznych.

Końcowa adenozyne w cząsteczce tRNA może być podstawiona formycyną przy użyciu CCA pyrofosforylasy i trójfosforanu formycyny, zamiast ATP (28). Wykazano w ten sposób, że tak podstawiona formycyna wykazuje interakcję z pozostałymi częściami cząsteczki tRNA, co znajduje potwierdzenie w niektórych modelach przestrzennych.

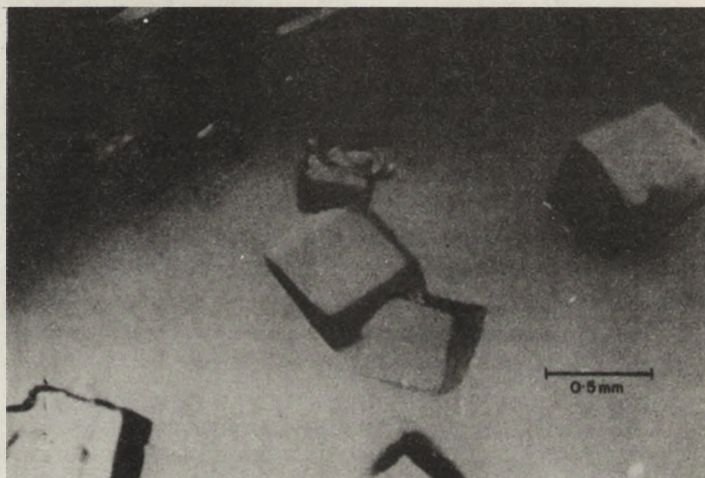
### D. Rentgenografia niskokątowa roztworów tRNA

Niskokątowa rentgenografia daje informację o kształcie i wymiarach makrocząsteczek w roztworze. Powyższą metodę zastosowano do badania mieszaniny tRNA (29), tRNA<sup>ala</sup> (30), tRNA<sup>fen</sup> (31), tRNA<sup>fmet</sup> (32) z drożdży, tRNA<sup>tyr</sup> (32), tRNA<sup>wal</sup><sub>I</sub> (33) i tRNA<sup>fen</sup> (32) z *E. coli*.

Analiza otrzymanych wyników wykazuje, że promień obrotu ( $R_G$ ) cząsteczki tRNA waha się od 23,5 Å do 25 Å, przy czym nie zależy od zawartości jonów  $Mg^{+2}$  w roztworze. Przy wzroście temperatury powyżej  $T_m$  promień obrotu  $R_G$  wzrasta do wartości odpowiadającej formie kłębkowej tRNA (31).

Z podobieństwa wartości  $R_G$  dla różnych tRNA można wnioskować, że kształty cząsteczek w roztworze są bardzo podobne.





Ryc. 4. Romboedryczne kryształy tRNA<sup>fen</sup> z drożdży

Wymiary cząsteczek tRNA w roztworze obliczone na podstawie niskokątowej rentgenografii przez różnych autorów są następujące: 22 x 36 x 92 Å (31), 25 x 35 x 85 Å (32) i 40 x 40 x 100 Å (30).

#### E. Analiza rentgenograficzna tRNA

Od czasu otrzymania pierwszych kryształów tRNA w 1968 roku, wzbogacił się arsenał metod określania struktury przestrzennej tych cząsteczek o analizę rentgenograficzną (ryc.4) (34).

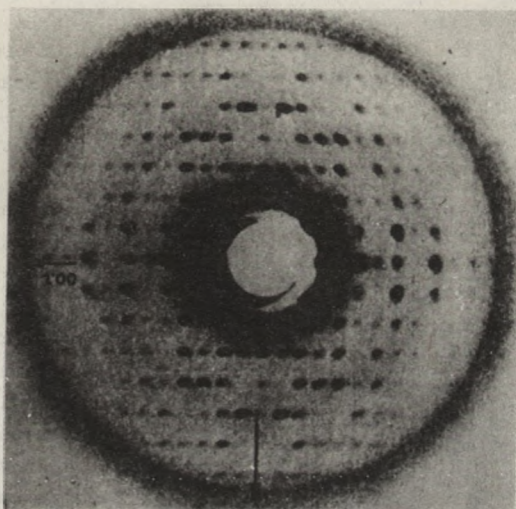
Do krystalizacji używano różnych rozpuszczalników, np. woda - dioksan, chloroform lub etanol, 2-metylopentanodiol-2,4 lub butanol-2 (35, 36). Również siarczan amonowy może być użyty do krystalizacji.

Otrzymane kryształy posiadają różny kształt i zawartość RNA, która waha się pomiędzy 12% i 64% (36).

Okazuje się, że stabilność kryształów w zależności od temperatury i naswietlania wzrasta ze wzrostem zawartości kwasów nukleinowych w kryształach. Zdumiewiający jest fakt, że również mieszanina wszystkich tRNA może tworzyć kryształy o wysokiej jakości (37). Rozdzielczość dotychczasowych analiz dochodzi do 2,5 Å. Dla tRNA<sup>fen</sup> z drożdży zdołano zebrać 350 refleksów (ryc. 5) na automatycznym reflektometrze (36).

Wykonano również syntezy Pattersona, z których wynika, że wielkość cząsteczki wynosi ok. 25x35x80 Å. W komórce elementarnej mogą one występować jako dimery. Okazuje się, że w pewnych kryształach przypadają 4 cząsteczki na komórkę elementarną, inne tworzą olbrzymie komórki zawierające 36 cząsteczek tRNA. Ostatnio udało się wykrystalizować tRNA<sup>fen</sup> z drożdży zawierający w pozycji 75 cytydynę podstawioną jodem (38). Pozwoli to na określenie struktury z dużą rozdzielczością, metodą atomów ciężkich.

Na zakończenie nasuwa się pytanie, czy tRNA w sieci krystalicznej występują w formie aktywnej. O zachowaniu własności biologicznych świad-



Ryc. 5. Obraz dyfrakcyjny kryształu tRNA<sup>fen</sup> z drożdży (36)

czy fakt, że krystaliczny tRNA po rozpuszczeniu może być aminoacylowany. Należy jednak pamiętać, że konformacja w stanie krystalicznym może być inna niż w roztworze.

#### 4. Zastosowanie modyfikacji chemicznej do badania struktury przestrzennej tRNA

Celem chemicznej modyfikacji tRNA jest rozróżnienie reaktywnych i nie-reaktywnych pozycji odpowiadających przestrzennej strukturze cząsteczki oraz badanie biologicznych funkcji zmodyfikowanych cząsteczek. Tylko niewiele odczynników spełnia w rzeczywistości to zadanie, bowiem reakcja musi być specyficzna, przy czym nie może ona zmieniać konformacji, parowania zasad, długości łańcucha tRNA oraz jednocześnie produkt reakcji musi być stabilny.

W celu uzyskania pełnej informacji wymagana jest analiza sekwencji.

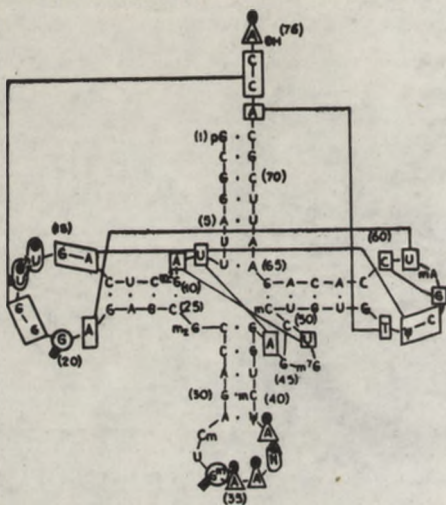
Zmodyfikowane kwasy nukleinowe można otrzymać na dwóch drogach:

1. poprzez chemiczną modyfikację pojedynczego nukleotydu działaniem odpowiedniego odczynnika, a następnie inkorporację tego nukleotydu do cząsteczki polimeru na drodze enzymatycznej,
2. na drodze bezpośredniego modyfikowania makrocząsteczki.

Kwasy nukleinowe, w skład których wchodzi trojaki rodzaj komponenty, a mianowicie: heterocykliczna zasada azotowa, cukier - pentoza, oraz kwas fosforowy, stanowią dogodny obiekt do zastosowania w celu ich modyfikacji szerokiej gamy różnego typu reakcji chemicznych i reagentów.

W zasadzie mówi się o czterech głównych grupach reakcji:

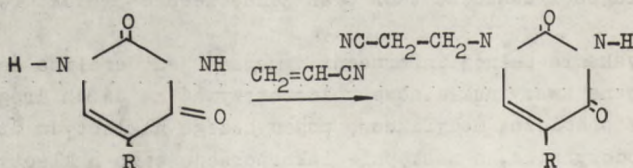
- a) reakcje na resztach zasad heterocyklicznych,
- b) reakcje na składniku cukrowym,



Ryc. 6. Miejsca ataku niektórych odczynników modyfikujących na tRNA<sup>fen</sup> (4)

- odczynniki metylujące
- borowodurek sodowy
- jod
- światło.

Chemiczne modyfikacje wykazały, że pętla antykononowa i koniec 3' części tRNA są dostępne dla odczynników modyfikujących i muszą być dlatego wyeksponowane, podczas gdy pętla TYC jest niedostępna. Akrylonitryl, który wprowadza grupę cyanoetylową, reaguje szczególnie wybiórczo z inozyną, pseudourydyną, 4-tiourydyną, dając N 1 lub S podstawione nukleozydy.



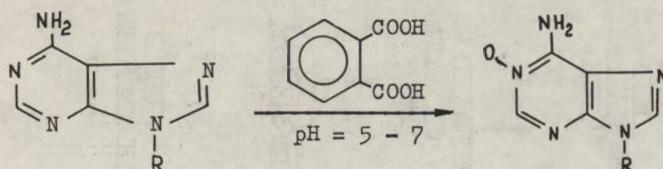
Reakcja 1

Staranne dobranie warunków pozwala obserwować zdecydowany atak na antykonon, brak natomiast reakcji z pętlą TYC (39, 30). Działanie kwasu azotowego powoduje głównie deaminację cytydyny. Reakcja tRNA<sup>ala</sup> z drożdży z kwasem azotowym i N-bromoimidem kwasu bursztynowego (NBS) wskazuje, że pętla TYC jest mniej reaktywna niż należało się spodziewać (41). Kwas mononadftalowy utlenia niesparowaną adenozyne do 1-N-tlenku adenozyne(42).

- c) reakcje na grupie fosforanowej,
- d) rozerwanie wiązania N-glikozydowego.

Rozważając reaktywność makrocząsteczek należy pamiętać, że grupa funkcyjna związana z polimerem wielkocząsteczkowym nie zawsze wykazuje taką samą reaktywność, jak ta sama grupa związana z małą cząsteczką. W przypadku kwasów nukleinowych i ich monomerów, te dwie reaktywności są zbliżone, występują tylko pewne różnice w szybkości reakcji. Najczęściej stosowane odczynniki modyfikujące:

- akrylonitryl
- hydroksyloamina
- karbowuimid
- kwas azotawy
- kwas mononadftalowy



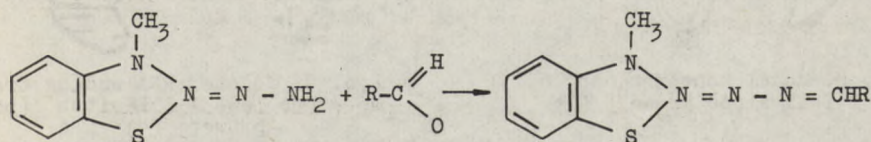
Reakcja 2

Przy utlenianiu tRNA<sup>fen</sup> i tRNA<sup>ser</sup> okazało się, że tylko pętla antykononowa i koniec 3' były wrażliwe na ten odczynnik (42, 43). Metylowanie tRNA można prowadzić za pomocą DMSO lub dwumetyloformamidu w roztworze wodnym (44). Podczas modyfikacji chemicznej tymi odczynnikami atakowany był koniec 3', pętla antykononowa i pętla dwuhydrourydylowa, natomiast nie naruszona pozostaje pętla TYC (45).

W przypadku acetylowania tRNA za pomocą bezwodnika kwasu octowego w dwumetyloformamidzie, reakcja zachodzi szczególnie na grupie aminowej cytydyny (46), natomiast w roztworze wodnym modyfikacji ulega grupa 2'-hydroksylowa (47). W ten sposób zmodyfikowany tRNA inhibuje reakcję wiązania do rybosomu (48).

Modyfikacja chemiczna może zachodzić również szczególnie selektywnie, gdy reakcji ulega tylko jeden rzadki nukleocyd w cząsteczce tRNA. W ten sposób izopentenyloadenozyna może być w pewnych warunkach modyfikowana za pomocą jodu lub KMnO<sub>4</sub> (51).

4-tiourydyna może być utleniona za pomocą nadjodanu, czterotlenku azotu, nadmanganianu potasowego lub fotochemicznie (49, 50). Ostatnio Cramer (54) wprowadził selektywną modyfikację w pętli antykononowej tRNA - mianowicie zamiast zasady Y wprowadził hydrazon 3-metylo-2-benzotiazolanu:



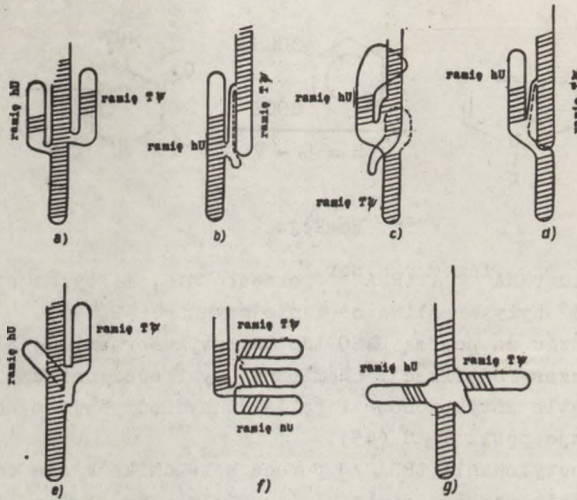
Reakcja 3

Okazuje się, że po takiej selektywnej modyfikacji nie stwierdzono zmian w strukturze przestrzennej tRNA, który zachował jednocześnie pełną aktywność.

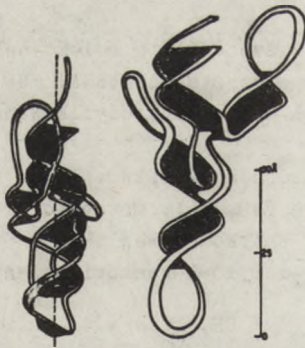
### 5. Modele przestrzenne tRNA

Wszystkie modele przestrzenne tRNA muszą zmieścić się w ramach wymogów nałożonych przez biochemiczną funkcję tRNA, a mianowicie:

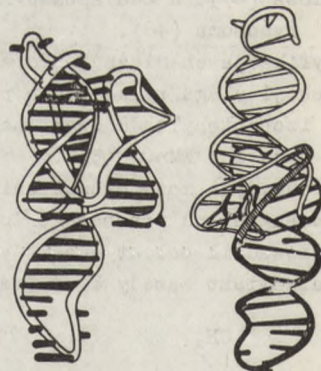
- oddziaływanie z kodonem wymaga, aby rejon antykononu był wyeksponowany,



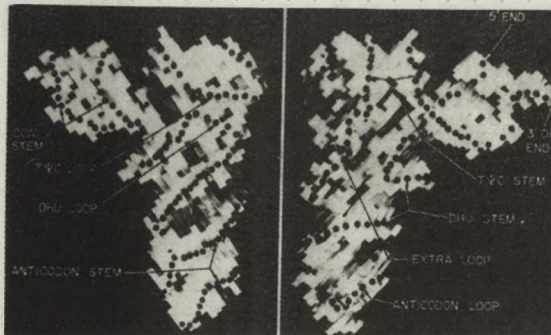
Ryc. 7. Modele struktury trzeciorzędowej tRNA



Ryc. 8. Model Connorsa (po lewej) i Yaniva (po prawej) (4)



Ryc. 9. Modele tRNA według Cramera (po lewej) i Levitta (po prawej) (4)



Ryc. 10. Model tRNA<sup>fen</sup> z drożdży wg Kima (47)

- warunki biosyntezy białka na rybosomie wymagają, aby odległość antykodon - CCA była jednakowa,
- wszystkie tRNA muszą mieć identyczny fragment sekwencji odpowiedzialny za wiązanie z rybosomem.

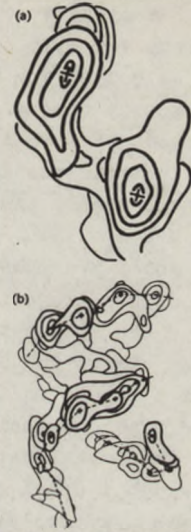
Na podstawie dostępnym danych biochemicznych, chemicznych i fizycznych zaproponowano kilka modeli struktury przestrzennej tRNA (4). Większość propozycji wychodziła ze struktury „liścia koniczyny” (ryc. 7). Ryc. 7 przedstawia schematyczne rysunki modeli: A) Cramera, B) Levitta, C) Connorsa, D) Fullera, E) Yaniva, F) Melchera. Szczegóły modelu Connorsa i Yaniva przedstawia ryc. 8, a Cramera i Levitta - (ryc. 9).

Ostatnio pojawiły się dwie następne propozycje modeli struktury trzeciorzędowej, mianowicie model Kima (52) i Janga (53).

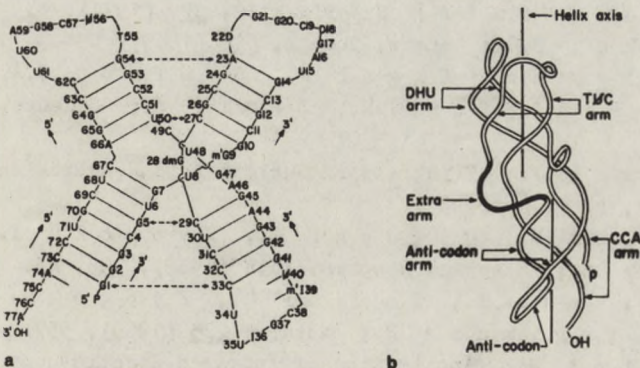
#### Model Kima

Powyższy model uzyskano na podstawie mapy gęstości elektronicznej otrzymanej w wyniku dyfrakcji rentgenograficznej z rozdzielczością  $4 \text{ \AA}$ , co pozwoliło określić położenie większości grup fosforanowych w tRNA<sup>fen</sup> z drożdży. Do badań użyto trzy typy pochodnych kwasów nukleinowych z ciężkim atomem metalu - platyna, osm lub samar.

Z modelu wynika, że cząsteczka tRNA ma kształt litery L i składa się z dwóch segmentów. Ramię CCA jest związane z ramieniem T $\Psi$ C, zaś pętla T $\Psi$ C występuje w roku litery L. Bezpośrednio do niej przylega pętla DHU, której ramię połączone jest z ramieniem CCA poprzez krótki segment łańcucha zawierającego dwie grupy fosforanowe. Pętla antykodonowa ulokowana jest na końcu cząsteczki. Odległość antykodon - pętla T $\Psi$ C wynosi  $77 \text{ \AA}$ .



Ryc. 11. Mapa gęstości elektronicznej tRNA<sup>fen</sup> wg Kima



Ryc. 12. Model Janga dla tRNA<sup>ala</sup> z drożdży, w którym interakcje zasada-zasada przedstawiono za pomocą pętli przerywanej

Z mapy gęstości elektronowej (ryc. 11) odległość między resztami fosforanowymi 8,13 jest rzędu  $10 \text{ \AA}$ , co wystarcza do utworzenia fotodimeru.

We wszystkich dotychczas poznanych tRNA zasada 15 jest komplementarną do zasady znajdującej się między ramieniem T $\Psi$ C i dodatkowym ramieniem (zasada 48 w tRNA<sup>fen</sup>). Z modelu Kima wynika, że reszty fosforanowe tych nukleotydów znajdują się w odległości  $16 \text{ \AA}$ , co wystarcza do utworzenia wiązań między zasadami.

#### Model Janga

Model ten powstaje w wyniku odpowiedniego parowania dwóch ramion wychodząc z drugorzędowej struktury „liścia koniczyny”.

W ten sposób tworzą się dwa czteroniciowe helikalne segmenty rozciągające się w tym samym kierunku, przy czym osie ich są przemieszczone o  $7,5 \text{ \AA}$ . W ten sposób ramiona T $\Psi$ C i DHU znajdują się z jednego końca, natomiast z drugiego - koniec CCA i antykodon.

Autor zakłada, że rozpoznawanie syntetaz może odbywać się na całej powierzchni cząsteczki. Rozważany model nie wymaga wielkich zmian podczas reakcji aminoracytacji tRNA. Wg tego modelu rozpoznanie kodonu mRNA i tworzenie peptydu może zachodzić na jednym końcu cząsteczki, podczas gdy drugi koniec (pętla DHU i T $\Psi$ C) uczestniczą podczas przyłączania się do rybosomów.

Model ten jest zgodny z reakcją fotodimeryzacji (odległość między C13 i U8 wynosi  $4-5 \text{ \AA}$ ) i danymi fluorescencji.

Żadna z dotychczas przedstawionych propozycji modelowych nie jest jednak całkowicie zgodna z eksperymentem i dlatego kwestia ustalenia struktury przestrzennej tRNA pozostaje otwarta.

#### L i t e r a t u r a

- [1] Staehelin M.; *Experimentia*, 27 (1971), 1.
- [2] Zachau H.G.; *Angew. Chemie*, 81 (1969), 654.
- [3] Holley R.W., Apgar J., Everett G.A., Maison J.T., Penswick J.R., Zamir A.; *Science*, 147 (1965), 1462.
- [4] Cramer F.; "Progress in Nucleic Acid Research and Molec. Biol." (1971), t. XI, str. 391.
- [5] Tsuboi M., Higuchi S., Kyogoku Y., Nishimura S.; *Biochim. Biophys. Acta* (1969), 195, 23.
- [6] Morikawa K., Tsuboi M., Kyogoku Y., Seno T., Nishimura S.; *Nature*, 223 (1969), 537.
- [7] Tsuboi M.; *Application of Infrared Spectroscopy to Structure Studies of Nucleic Acids*.
- [8] Kawada M., Myiazaki M., Takemura S.; *J. Biochem. (Tokyo)*, 62 (1967), 287.

- [8] Kawada M., Miyazaki M., Takemura S.; J. Biochem. (Tokyo), 62 (1967), 287.
- [9] Thomas V.J.; Jr. - Biopolymers, 2 (1969), 325.
- [10] Skinner L.G.; J. Physiol., 197 (1968), 519.
- [11] Ekert B., Monier R., Tordjman A.; Bull. Soc. Chim. Biol., 50 (1968), 1875.
- [12] Schulman L.H.; Proc. Natl. Ac. Sci. USA, 66 (1970), 507.
- [13] Gauss D.H., F. von der Haar, Maelicke A., Cramer F.; Recent Results of tRNA Research (1971).
- [14] Smith J.C.P., Yamane T., Shulman R.G.; Science, 159 (1968), 1360.
- [15] James T.J., Nogle J.H.; Proc. Natl. Ac. Sci, USA, 62 (1969), 644.
- [16] Rümer R.; et. al. FEBS Lett., 5 (1969), 15.
- [17] Riesner D., Rümer R., Maass G.; Europ. J. Biochem. 15 (1970), 85.
- [18] Schlimme E., F. von de Haar, Cramer F.; Z. Naturforsch., B 24 (1969), 631.
- [19] „Fizyczne metody badania białek i kwasów nukleinowych": W-wa 1972.
- [20] Helene C., Michelson A.M.; Biochim. Biophys. Acta, 142 (1967), 12.
- [21] Guesan M., Eisinger J., Shulman R.G.; J. Chem. Phys., 47 (1967), 4077.
- [22] Pochon F.; Bull, Soc. Chim. Biol., 51 (1969), 1542.
- [23] Eisinger J., Feuer B., Yamane T.; Proc. Natl. Ac. Sci. USA, 65 (1970), 638.
- [24] Fink L.M., Goto T., Frankel F., Weinstein J.B.; Biochim. Biophys. Res. Commun., 32 (1968).
- [25] Steiner R.F., Millar D.B., Hoermank C.; Arch. Biochim. Biophys., 120 (1967), 464.
- [26] Berdsley K., Cantor Ch.; Proc. Natl. Ac. Sci. USA, 65 (1970), 39.
- [27] Ward D.C., Cerami A., Reich E., Altwerger L.; J. Biol. Chem., 244 (1969), 3243.
- [28] Ward D.C., Reich E., Stryer L.; J. Biol. Chem., 244, (1969), 1228.
- [29] Lake J.A., Beeman W.W.; J. Molec. Biol., 31 (1968), 115.
- [30] Krigbaum W.R., Godwin R.W.; Science, 154 (1966), 423.
- [31] Kratky O., Pilz J., Cramer F., von der Haar F.; Schlimme E.; Europ. J. Biochem., 15 (1970), 401.
- [32] Connors P.G., Labanauskas M., Beeman W.W.; Science, 166 (1969), 1528.
- [33] Ninio J., Favre A., Yaniv M.; Nature, 223(1969), 1333.
- [34] Clark B.F.C. et al. - Nature, 219 (1968), 1222.



- [35] Kim S.H., Rich A.; Science, 162 (1968), 381.
- [36] Cramer F.; et al. - J. Molec. Biol., 51 (1970), 523.
- [37] Fresco J.R., Blake R.D., Langridge R.; Nature, 220 (1968), 1285.
- [38] von der Haar F., Schlimme E., Cramer F.; Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chemie, 351 (1970), 113.
- [39] Yoshida M., Furmichi Y., Ukita T., Kaziro Y.; Biochim. Biophys. Acta, 149 (1967), 308.
- [40] Wagner L.P., Ofengand J.; Biochim. Biophys. Acta, 204 (1970), 620.
- [41] Nelson J.A., Ristow S.C., Holley R.W.; Biochem. Biophys. Acta, 149 (1967), 590.
- [42] Cramer F.; et al. - Proc. Natl. Ac. Sci. USA, 61 (1968), 1384.
- [43] Gangloff J., Ebel J.P.; Bull. Soc. Chim. Biol., 50 (1969), 2335.
- [44] Pillinger D.J., Hay J., Borek E.; Biochem. J., 114 (1969), 429.
- [45] Bollack C., Dirheimer G., Ebel J.P.; FEBS Meet., 127 (1969).
- [46] Keith G., Ebel J.P.; C.R. Acad. Sci. D 266 (1968), 1066.
- [47] Knorre D.G., Pustoshilova N.M., Sevastyanov I.P.; Biokhimiya, 33 (1968) 56.
- [48] Stefanovich L.E.; Mol. Biol., 3 (1969), 528.
- [49] Ziff E.B., Fresco J.R.; J. Am. Chem. Soc., 90 (1968), 7338.
- [50] Pleiss M., Ochiai H., Cerutti P.A.; Biochim. Biophys. Res. Commun., 34 (1969), 70.
- [51] Hirsch R., Zachau H.G.; Z. Physiol. Chem., 351 (1970), 563.
- [52] Kim S.H.; et al. - Proc. Natl. Ac. Sci. USA, 69 (1972), 3746.
- [53] Jang Ch.G.; Biochim. Biophys. Res. Commun., 50 (1973), 612.

Józef Bujarski

## BADANIE STRUKTURY tRNA METODĄ ASOCJACJI KRÓTKICH OLIGONUKLEOTYDÓW

### Streszczenie

W referacie przedstawiono jedną z metod badania niesparowanych, przestrzennie wyeksponowanych obszarów cząsteczki transferowych kwasów rybonukleinowych. Stopień asocjacji komplementarnych, krótkich oligonukleotydów z tym obszarami może być tak duży, że istnieje możliwość jego badania metodą dializy równowagowej. Metodę omówiono na przykładzie t-RNA<sup>Phe</sup> z *E. coli*.

Badanie przestrzennej czyli tzw. trzeciorzędowej struktury specyficznych transferowych kwasów rybonukleinowych napotyka dotychczas na duże trudności. Żaden z zaproponowanych modeli struktury trzeciorzędowej tych kwasów nie zgadza się ze wszystkimi faktami doświadczalnymi. Wynika to z wielu przyczyn. Między innymi nie wiadomo dokładnie, które fragmenty obszarów pętlowych struktury drugorzędowej (w modelu liścia koniczyny) są zaangażowane w tworzenie i stabilizację struktury wyższego rzędu. Jednym z głównych czynników odpowiedzialnych za istnienie określonego połańdowania przestrzennego cząsteczki tRNA jest asocjacja na zasadzie komplementarności (poprzez wiązania wodorowe) niesparowanych w strukturze drugorzędowej fragmentów pochodzących z różnych pętli w modelu liścia koniczyny. Ten typ sparowania nie obejmuje jednak całych pętli.

Ostatnio pojawiła się nowa metoda badania niesparowanych obszarów tRNA. Okazało się, że krótkie oligonukleotydy (zwykle trój- lub czteronukleotydy) oddziałują z dostępnymi (a więc nieosłoniętymi i niesparowanymi) komplementarnymi obszarami cząsteczki tRNA do tego stopnia, że można łatwo zmierzyć stałą asocjacji powstałego kompleksu tRNA - oligonukleotydu. Można więc w ten sposób określać te obszary, które nie są zaangażowane w tworzenie struktur wyższego rzędu.

Metodę tę można jednak stosować po uwzględnieniu pewnych warunków:

- 1) Trzeba znać dokładnie sekwencję nukleotydów badanego tRNA.
- 2) Na podstawie innych metod (m.in. selektywna modyfikacja chemiczna) należy określić najbardziej prawdopodobną strukturę drugorzędową.
- 3) Badana (trypletowa czy tetrapletowa) sekwencja nie może się zasadniczo powtórzyć w pozostałej części cząsteczki tRNA. W przeciwnym razie nie widzielibyśmy, który fragment tRNA badamy.
- 4) Konformacja danego fragmentu tRNA musi być na tyle swobodna w ogólnej strukturze przestrzennej, aby umożliwić wytworzenie podwójnej spirali z komplementarnym trój lub czteronukleotydem.

Doty i Uhlenbeck (1) opracowali konkretną metodę badania tego typu asocjacji. Oparli się oni na dializie równowagowej. W specjalnym naczyniu przedzielonym błoną półprzepuszczalną umieszcza się:

- w jednej komorze znaczone trytem dany oligonukleotyd w ilości 10-50 nM,
- w drugiej części badany tRNA (40-100 μM).

Oba komponenty są rozpuszczone w specjalnym buforze zapewniającym pH=7. Układ pozostawiamy do osiągnięcia równowagi w niskiej temperaturze. Ze stosunku radioaktywności w obu komorach znajdujemy tzw. „wartość R”:

$$R = \frac{\text{Stężenie wolnego oligonukleotydu} + \text{stęż. oligon. związanego}}{\text{Stężenie wolnego oligonukleotydu}}$$

Ponieważ stężenie tRNA jest dużo większe od stężenia oligomeru (około 1000 razy) eksperymentalną wielkość R można powiązać ze stałą asocjacji K następującym równaniem:

$$R = 1 + K \cdot c_{\text{tRNA}}$$

gdzie  $c_{\text{tRNA}}$  oznacza wyjściowe stężenie  $t_{\text{RNA}}$

Stała asocjacji K charakteryzuje siłę asocjacji. Jej wartość (wyrażona w l/mol) zależy głównie od długości łańcucha oligomeru, od rodzaju zawartych w nim zasad oraz od dostępności komplementarnego fragmentu łańcucha tRNA. Przy założeniu pełnej dostępności, wartości K w zależności od składu (np.: od ilości wytworzonych par zasad G-C) dla trójnukleotydów przedstawia tablica I. Zakładamy, że zgodnie z hipotezą Wastona - Cricka tworzą się wyłącznie komplementarne pary zasad G-C oraz A-U.

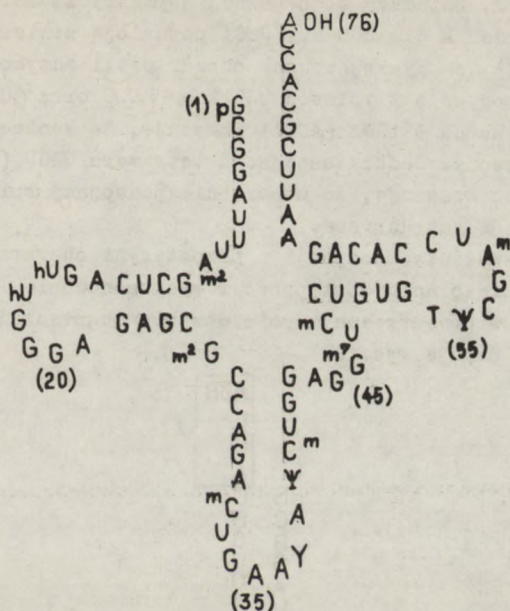
Tablica I

Ilość par G-C	K [1/M]	Przykład
0	1000	UUU
1	1000 - 2000	UUC
2 (niesąsiednie)	2000 - 5000	GAC
2 (przy końcu 3')	10 000	UGG
2 (przy końcu 5')	20 000	GGU

Tetramery posiadają K większe niż pięciokrotna suma stałych asocjacji ich składowych trójnukleotydów. A więc np.: dla UUCG K = 20 000, dla UUUU K = 50 000. Taką asocjację określamy ogólnie jako dodatnią (+). Wartości K mniejsze od przewidywanych na podstawie tablicy 1 świadczą, że asocjacja jest utrudniona, ograniczona lub nie występuje wcale.

Asocjacji dwunukleotydów do tRNA nie można badać ze względu na zbyt małą wartość R, leżącą w granicach błędu pomiarów (błędu metody).

Przebadano dotychczas tą metodą kilka specyficznych tRNA. Korzyści, jakie ona daje, najlepiej zobrazuje zreferowanie przykładowych badań tRNA<sup>Phe</sup> z E.coli (6). Drugorzędowa struktura tego kwasu przedstawia się następująco:



Ryc. 1

Rozpatrując tutaj powtarzanie się tych samych sekwencji trójkowych stwierdzamy, że takich trójek jest zaledwie kilka. W związku z tym można z powodzeniem zastosować do badań trójnukleotydy. Autorzy przebadali asocjację trój- i czteronukleotydów komplementarnych do sekwencji zawartych tak w obszarach trzonowych, jak i w pętlach poszczególnych ramion tRNA<sup>Phe</sup>. Nie będziemy tutaj omawiać szczegółowo wszystkich danych odnośnie wartości  $K$  dla poszczególnych oligomerów oraz interpretacji ich w aspekcie stopnia trudności asocjacji. Wnioski ogólne są następujące:

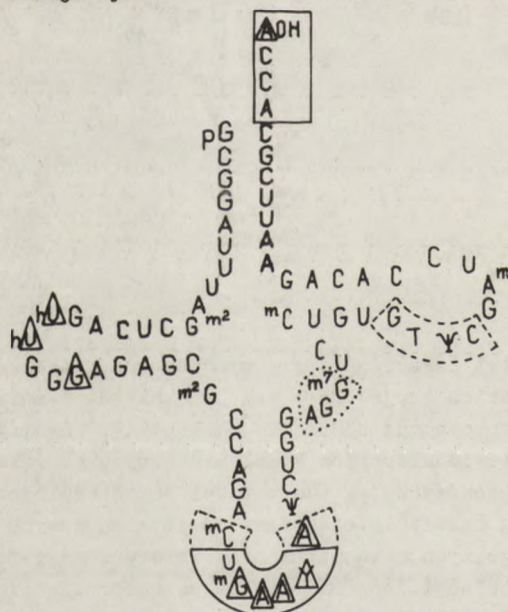
1) Sekwencje: 1-7i66-72 (ramię akceptorowe), 10-13 i 22-25(ramię dhU), 27-31 i 39-43 (ramię antykodonowe) oraz 49-53 i 61-65 (ramię TΨC) znajdują się w podwójnie skręconych rejonach trzonowych, a więc nie powinny asocjować z komplementarnymi oligonukleotydami. Wyniki badań całkowicie zgadzają się z przewidywaniami (całkowity brak asocjacji). Pozwala to silnie potwierdzić model struktury drugorzędowej tRNA<sup>Phe</sup>.

2) Sekwencja pętli antykodonowej w tRNA<sup>Phe</sup> jest następująca: (3'→5')-C<sub>m</sub>-U-G<sub>m</sub>-A-A-Y-A. Tryplet kodonowy UUC wiąże się silnie z antykodonom G<sub>m</sub>AA ( $K = 2000$ ). Kodony ze zmienioną trzecią literą (zasada) również asocjują, lecz około 5 razy słabiej. Tetramery zawierające w stosunku do trypletu UUC dodatkowy nukleozyd po stronie 5' (np.: UUCA) wiążą się znacznie silniej ( $K = 75000$ ) niż tetramery posiadające dodatkową zasadę po stronie 3' (np.: GUUC,  $K = 4000$ ). Dotyczy to również trójnukleotydów (np.: UCA czy UGU) i nie jest spowodowane wyłącznie obecnością mody-

fikowanej zasady Y. Świadczy to o pewnej asymetryczności pętli antykodonowej. Duże wartości K dla UUC czy UUCA pozwalają stwierdzić, że sekwencja 33-37 (UG<sub>m</sub>AA<sub>m</sub>Y) to wyeksponowany obszar pętli antykodonowej.

3) Dodatnia asocjacja trypletów UGG K = 45 000 oraz GGU K = 30 000 komplementarnych do końca 3'tRNA (ACCA) wskazuje, że koniec aminoakceptorowy jest w pełni dostępny. Jednak asocjacja tetrameru UGGU (K = 90 000) ma wartość pośrednią, co wskazuje, że utworzenie podwójnej spirali z tetramerem jest w pewnym sensie utrudnione.

4) Podobne rozważania asocjacji z pozostałymi obszarami pętlowymi pozwoliły ostatecznie ocenić dostępność i wyeksponowanie wszystkich pętli oraz końca - CCA w przestrzennym połażdowaniu cząsteczki. Wyniki tych wszystkich badań sumuje ryc. 2.



Ryc. 2

Otoczone linią ciągłą fragmenty wskazują sekwencje niesparowane i w pełni dostępne. Są to przede wszystkim niewątpliwie miejsca funkcji biologicznej tRNA: koniec - CCA i pętla antykodonowa. Otoczone trójkątem poszczególne zasady są podatne na selektywną modyfikację chemiczną. Pozostałe sekwencje zarysowane linią przerywaną to obszary częściowo dostępne do asocjacji z komplementarnymi nukleotydami, lecz nie podatne na modyfikację chemiczną. Nasuwają się tu pewne wnioski odnośnie rozbieżności obu tych metod. G<sup>m7</sup> (46) i A (73) nie poddają się chemicznej modyfikacji, co świadczyło o ich sparowaniu. Są natomiast częściowo dostępne do asocjacji. Nie można jednak zdecydowanie powiedzieć, czy wyniki asocjacji są tutaj odbiciem rzeczywistości. Nie mamy bowiem pewności, że asocjacja z oligo-

merem nie zmienia lokalnej konformacji badanej sekwencji. Gdyby takie zmiany zachodziły, wiązanie oligomerów do końca - CCA i ramienia dodatkowego mogą tak zniekształcić wyjściową strukturę, że wymienione wyżej nukleotydy ( $G^{m7}$  - 46 i A-73) staną się dostępne do asocjacji. Wyniki przedstawionych tu badań nie dadzą się również pogodzić z modelem trzeciorzędowej struktury tRNA<sup>Phe</sup> zaproponowanym przez Cramera. W modelu tym zakłada się, że zasady G (18) i G (19) tworzą dodatkowe pary z C(74) i C(75). Z ryciny 2 wynika, że zasady C74 i C75 są dostępne do asocjacji.

Na podstawie prac szeregu autorów (2-6) można już teraz ocenić zalety i wady metody asocjacyjnej. Pozwoliła ona niewątpliwie potwierdzić model liścia koniczyny oraz wyciągnąć pewne wnioski o ogólnej strukturze przestrzennej tRNA.

1) Pętla antykodonowa i koniec ramienia akceptorowego są zawsze wyeksponowane i niesparowane.

2) Pętłe różniące się długością w różnych tRNA, a więc ramię dodatkowe i pętla TVC wykazują różną dostępność do asocjacji. Np.: w tRNA<sup>Tyr</sup> całe ramię dodatkowe oraz trzy zasady po stronie 3' pętli dhU (CAA) są dostępne do asocjacji. W tRNA<sup>Val</sup><sub>E.coli</sub> dostępne są trzy zasady po stronie 5' pętli dhU, a ramię dodatkowe jest niedostępne.

3) Porównanie sekwencji dostępnych i niedostępnych w różnych tRNA sugeruje, że nie można wyprowadzić jakiegoś ogólnego modelu struktury trzeciorzędowej. Nie istnieje więc jakiś ogólny schemat, zgodnie z którym pętle tRNA zaginają się i poprzez komplementarne parowanie zasad budują strukturę przestrzenną - wynika to między innymi w sposób oczywisty z różnic w sekwencji zasad, a więc w strukturze pierwszorzędowej.

4) Pętla antykodonowa ma budowę asymetryczną. We wszystkich badanych metodą asocjacji tRNA oligomery komplementarne do sekwencji obejmującej antykodon i jedną zasadę po stronie 5' wiązały się o wiele silniej, niż gdy ta zasada była po stronie 3'. Model Fullera i Hodgsona pętli antykodonowej, w którym pirymidyna po stronie 5' posiada napiętą konformację (7), nie zgadza się z tymi obserwacjami.

5) Badanie asocjacji trimerów i tetramerów z sekwencją antykodonową dostarcza bezpośredniego dowodu, że istnieją stabilne pary zasad po stronie 5' trypletu antykodonowego przewidziane hipotezą "wobble". Np.: silne wiązanie czterech trimerów ze zmienioną trzecią literą tj. GUU, GUC, GUG, GUA z sekwencją antykodonową YAC w tRNA<sup>Val</sup><sub>1</sub> potwierdza tę degenerację kodu.

Oceniając ogólnie tę metodę badania struktury kwasów nukleinowych, należy podkreślić, że jest ona metodą uzupełniającą do innych wcześniej opracowanych. Tylko łączne rozwiązanie zagadnień strukturalnych może dać obraz jak najbardziej zbliżony do rzeczywistości. Interpretacja asocjacji do poszczególnych miejsc cząsteczki kwasu wymaga dobrej znajomości zagadnień z tym związanych i często nie jest jednoznaczna. Nie można jej stosować do wykrywania sekwencji niesparowanych krótszych niż trzy nukleotydy oraz sekwencji niedostępnych z przyczyn sterycznych czy też z naprężeń konformacyjnych.

## Literatura

- [1] Doty P.; Lewis J.B., Uhlenbeck O.C.; Nature 225, 510, (1970).
- [2] Pongs O., Reinwald E.; FEBS Letters 16, 275, (1971).
- [3] Gupta N.K., Woodley C.L.; J. Sci. Ind. Res., 30, 513, (1971).
- [4] Pongs O., Griese K.; FEBS Letters 26, 217, (1972).
- [5] Schimmel P.R., Uhlenbeck O.C.; Biochemistry 11, 642, (1972).
- [6] Pongs O., Bald R., Reinwald E.; Eur. J. Biochem. 32, 117, (1973).
- [7] Fuller W., Hodgson A.; Nature 215, 817 (1967).

Józef Bujarski, Tadeusz Brukwicki

## FOTOCHEMIA 4-TIOURYDYNY W TRANSFEROWYCH KWASACH RYBONUKLEINOWYCH

### Streszczenie

Fotocchemiczna reakcja dimeryzacji „liniowej” między 4-tiourydyną i cytydyną, dwoma nukleozydami niesąsiednimi w drugorzędowej strukturze wielu t-RNA pochodzenia bakteryjnego, dostarcza ważnego kryterium poprawności proponowanych modeli przestrzennych tych kwasów. W referacie omówiono niektóre reakcje fotocchemiczne izolowanej 4-tiourydyny i zawartej w t-RNA. Przedyskutowano znaczenie tych reakcji dla badań strukturalnych t-RNA.

### I. W s t ę p

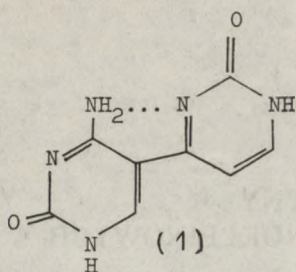
W ostatnich latach zbudowano szereg modeli trzeciorzędowej struktury tRNA w mniej lub bardziej ścisły sposób opisującej budowę przestrzenną tych kwasów. Spośród wielu metod określania i uściślenia modeli struktury przestrzennej szczególnie dobrze nadają się takie, w których bada się wpływ specyficznych modyfikacji rzadkich nukleozydów na funkcje biologiczne tRNA, co w określonych wypadkach odzwierciedla zaburzenia struktury trzeciorzędowej. W wielu bakteryjnych tRNA stwierdzono występowanie rzadkiego nukleozydu - 4-tiourydyny. Występuje ona zawsze w tym samym położeniu w cząsteczce tRNA: pozycja 8 licząc od końca 5'. W 1969 roku Favre i Yaniv (11) stwierdzili, że 4-tiourydyna łączy się z niesąsiednią w strukturze drugorzędowej cytydyną leżącą w pozycji 13, gdy naświetlić natywny tRNA w określonych warunkach. Fakt ten dostarczył ważnego kryterium uściślenia trzeciorzędowej struktury.

### II. F o t o c h e m i a   i z o l o w a n e j 4 - t i o u r y d y n y

Do 1971 roku nie znano reakcji fotodimeryzacji zachodzącej między 4-tiourydyną (lub 4-tiouracylem) i cytydyną (cytozyną) w roztworze. Leonard i Bergström (9,10) naświetlali rozcieńczony roztwór wodny 4-tiouracylu, 4-tiouracylu i cytozyny oraz 4-tiouracylu i uracylu. Okazało się, że w warunkach zastosowanych przez autorów we wszystkich przypadkach tworzyły się podobne produkty fotodimeryzacji. I np.: wodny roztwór 4-tiouracylu i cytozyny po naświetleniu światłem ultrafioletowym o długości fali ok. 335 nm w temperaturze 4°C dawał fotoprodukt scharakteryzowany jako 5-(4'-pirymidyno-2'-on)-cytozynę:

Związek ten prawdopodobnie, jak wynika z badań widm NMR (10), występuje w takiej postaci (formie) tautomerycznej, jak został napisany - stwier-

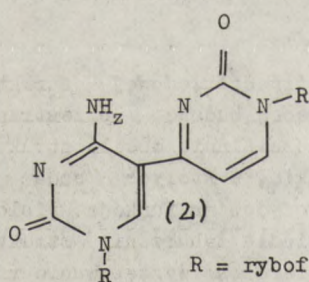




Ryc. 1

warunkach uzyskano związek analogiczny do związku 1 z niezmiennymi resztami rybozy. Na podstawie poprzednich wszystkich tych faktów, które tu przedstawiliśmy, fotoprodukt tworzący się podczas naświetlania promieniowaniem o długości fali 335 nm zidentyfikowano jako

5-(-1'-β-D-rybofuranozyl-4'-pirymidyno-2'-on)-cytydynę (ryc. 2).



R = rybofuranaza

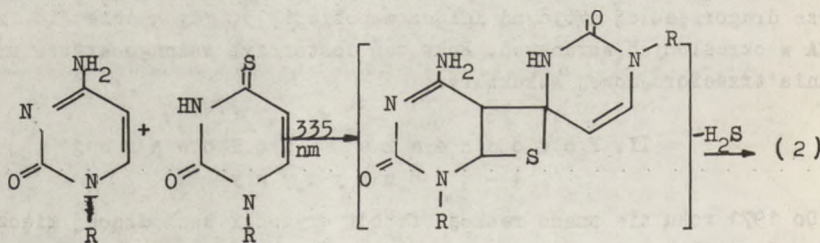
Ryc. 2

dzono mianowicie istnienie wiązania wodorowego N(4)-H...N(3'). Redukcja tego związku za pomocą NaBH<sub>4</sub> dawała produkt, który wykazywał silną fluorescencję (3); taką fluorescencję obserwuje się również po redukcji za pomocą NaBH<sub>4</sub> wyizolowanego z naświetlonego tRNA. Widma absorpcji w zakresie UV są zgodne z widmami dimeru wydzielonego z tRNA.

Przeprowadzono analogiczną fotoreakcję z 4-tiourydyną i cytydyną i w tych samych

Istotnym zagadnieniem okazało się poznanie mechanizmu zachodzącej fotoreakcji. Przez analogię do fotocykloadycji tiobenzofenonu do akrylonitrylu (12) można założyć, że reakcja idzie poprzez wzbudzony stan  $\pi \rightarrow \pi^*$  grupy  $>C=S$  4-tiourydyny z przejściowym tworzeniem cyklicznego tietanu. Następne otwarcie pierścienia i wydzielenie cząsteczki H<sub>2</sub>S prowadzi do związku 2.

Zachodzi to zgodnie ze schematem:



Ryc. 3

Kierunek addycji siarki jest zgodny z polarnością wzbudzonego stanu  $\pi \rightarrow \pi^*$  grupy  $>C=S$ . W takim wypadku bogata w elektrony siarka łączy się z bardziej elektrofilowym węglem cytydyny. Jak wynika z obliczeń rozkładu gęstości elektronów (13) i z obserwacji kierunku podstawienia elektrofilowego (14) cytozyna posiada C<sub>6</sub> uboższy w elektrony niż C<sub>5</sub>. Znaczenie postulowanego mechanizmu dla określenia odpowiedniej orientacji obu zasad, z czym wiąże się nowe ograniczenie dla budowanych modeli struktury przestrzennej tRNA, omówimy później.

Inną drogą idą badania nad możliwością łatwego, selektywnego przekształcenia fotochemicznego 4-tiourydyny w tRNA do jej pochodnych. Cel takiej modyfikacji jest jasny: badanie zależności specyficznego działania biologicznego tRNA od jego struktury przestrzennej. Każda modyfikacja jakiegokolwiek zasady w pewnym stopniu zawsze powoduje pewne zmiany w przestrzennej budowie układu. Pleiss i Cerutti (15) badają takie przekształcenia od kilku lat. Okazało się, że naświetlenie promieniowaniem o długości fali większej od 300 nm zarówno monomerowej 4-tiourydyny jak i soli cetylotrójamoniowej natywnego tRNA<sup>Val</sup><sub>1</sub> z E. Coli w tert-butanolu nasyconym powietrzem prowadzi do wybiórczej i ilościowej reakcji utleniania 4-tiourydyny do urydyny. W obecności amoniaku tworzy się mieszanina urydyny i cytydyny, a przy udziale metyloaminy obok urydyny tworzy się N<sup>4</sup>-metylo-urydyna. Reakcje są bardzo selektywne i dlatego dobrze nadają się do modyfikacji 4-tiourydyny w natywnych tRNA.

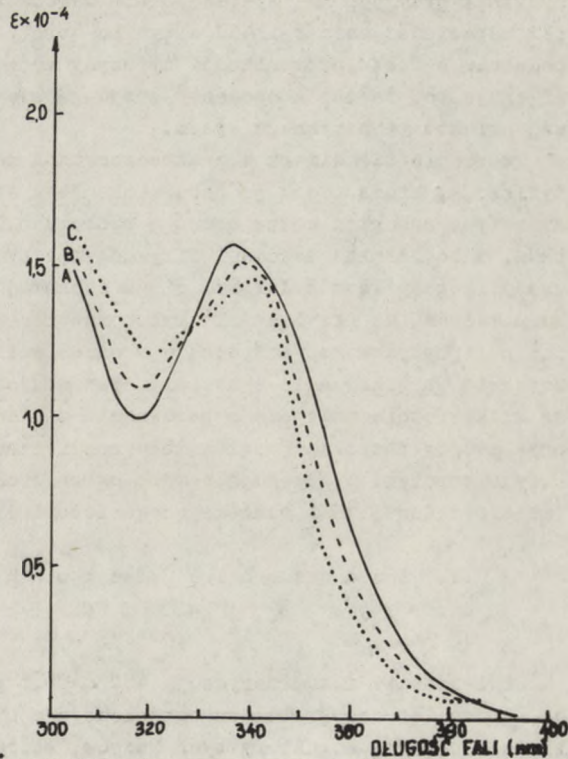
### III. Fotochemia 4-tiourydyny w natywnych tRNA

Naświetlanie natywnego tRNA<sup>Val</sup><sub>1</sub> z E. Coli promieniowaniem o długości fali około 335 nm powoduje selektywną fotoreakcję 4-tiourydyny z pozycji 8 z cytydyną w pozycji 13. Istnieje szereg dowodów na taką reakcję.

1) Widmo UV 4-tiourydyny (4-tiourydyna posiada maksimum absorpcji w rejonie ok. 330 nm, tak że można obserwować ją niejako oddzielnie od pozostałych nukleozydów) zmienia się podczas naświetlania (1):

2) Po redukcji naświetlonego tRNA<sup>Val</sup><sub>1</sub> za pomocą NaBH<sub>4</sub> pojawia się silna fluorescencja, czego nie stwierdzono dla tRNA nie-naświetlonego.

3) Analiza sekwencyjna naświetlonego tRNA (1, 11) (trawienie rybonukleazą T<sub>1</sub>,



Ryc. 4. tRNA<sup>Val</sup><sub>1</sub> w 0,05 M kakodylanie sodu (pH=7.0) naświetlany  $\lambda=334$  nm w następujących czasach: A - przed naświetlaniem, B - po 30 min., C - po 6 godz.

pankreatyczną rybonukleazą oraz kwaśną hydrolizą) daje dimer uzyskany przez Leonarda.

Tworzenie się identycznych dimerów między 4-tiourydyną-8 i cytydyną-13 - niesąsiednimi w strukturze liścia koniczyny - stwierdzono dla wielu tRNA z *E. Coli* zawierających oba te komponenty w tych samych pozycjach. Były to między innymi: tRNA Val 2a, tRNA Val 2b, tRNA Phe, tRNA Met-f. Można sobie teraz postawić pytanie czy rzeczywiście warunkiem tworzenia dimeru jest odpowiednia struktura przestrzenna. Odpowiedź jest pozytywna na podstawie następujących obserwacji:

1) Nie stwierdzono fotodimeryzacji, gdy w tych samych warunkach naświetlano tRNA po jego trawieniu rybonukleazą  $T_1$ , po dializie od jonów  $Mg^{++}$  czy po ogrzaniu do temperatury wyższej od punktu topnienia lokalnej konformacji wokół obszaru 4-tiourydyny. Wszystkie te czynniki powodują naruszenie natywnej konformacji tRNA (1).

2) Ofengand i współpracownicy (3,4) wykazali, że po specyficznym podzieleniu cząsteczki tRNA f-Met i tRNA Val-1 z *E. Coli* poprzez rozszczepianie  $T_1$ -RNA-zą na dwie części - naświetlanie części 5' zawierającej 4-SU i C nie powodowało tworzenia dimerów. Dopiero dodatek części 3' i skompleksowanie obydwu w jedną całość, pomimo braku wiązania w miejscu rozszczepienia, przywracało zdolność do dimeryzacji.

3) Miareczkowanie spektrofotometryczne (1,6,11) 4-tiourydyny w natywnym tRNA przy 330 nm wykazało dwie wartości pK:  $pK_1 = 9,6$  oraz  $pK_2 = 4,3$ .  $pK_1$  odpowiada jonizacji 4SU w wyniku utraty protonu, a  $pK_2$  wynika prawdopodobnie z faktu protonizacji cytozyny będącej w ścisłym związku z 4SU. Sugeruje to, że oba komponenty znajdują się blisko siebie w trzeciorzędowej strukturze natywnego kwasu.

Tworzenie się dimeru w cząsteczce tRNA można traktować jako swoistą modyfikację, która powoduje zaburzenie jego struktury przestrzennej. Rozmiar tych zaburzeń można badać w oparciu o zmiany biologiczne działania tRNA, albo oceniać metodami fizykochemicznymi. Okazało się (2,6), że tak zmodyfikowany kwas w dalszym ciągu zachowuje zdolność do łączenia się z aminokwasem, do przyłączania rybosomu oraz wbudowywania waliny do łańcucha polipeptydowego. Rozpoznaje również walilo - syntetazę tRNA, jednak szybkość rozpoznawania syntetazy oraz wbudowywania aminokwasu do białka są kilkakrotnie mniejsze w porównaniu z nienaświetlonym tRNA. Fakt ten oraz metody fizyczne (niskokątowe rozpraszanie promieni X, widma CD oraz krzywe topnienia) sugerują bardzo ograniczony rozmiar zmian w strukturze trzeciorzędowej tRNA zawierającego fotodimer.

#### IV. Z n a c z e n i e f o t o c h e m i c z n e j d i m e r y z a c j i 4 S U z C d o b a d a ń t R N A

Stwierdzenie fotodimeryzacji 4SU z C i poznanie jej mechanizmu narzuca bardzo istotne kryterium ograniczające przy wyborze właściwych modeli trzeciorzędowej struktury tych kwasów, które oba te komponenty zawierają.

Budując takie modele należy mieć na względzie nie tylko fakt bezspornego sąsiedztwa obu nukleozydów w przestrzeni, lecz również uwzględniać właściwe wymogi mechanistyczne. W związku z tym Leonard (10) zbudował model fragmentu tRNA<sup>Val</sup><sub>1</sub> z E. Coli złożony z nukleozydów od 7 do 15, uwzględniając przestrzenne wymagania fotodimeryzacji oraz zachowując kąty między poszczególnymi zasadami takie, jakie zwykle postuluje się dla kwasów nukleinowych.

4-tiourydynę używa się często ze względu na jej „zawiasowe” położenie między dwoma ramionami (ramię akceptorowe i ramię dhU) jako spektralne narzędzie badania rozmiaru zaburzeń konformacyjnych, spowodowanych czynnością biologiczną. Np.: badanie zmiany konformacji spowodowanej przyłączeniem aminokwasu do tRNA (8). Zmiany w widmie CD czy zmiany hipochromizmu 4-tiourydyny świadczą o zmianie jej konformacji, co z kolei odzwierciedla różnice w strukturze trzeciorzędowej. Można by również prowadzić kontrolę stabilności trzeciorzędowej struktury tRNA badając zdolność do dimeryzacji próbek tRNA pobieranych w różnych etapach jego biologicznego działania. Celowe byłoby opracowanie metody selektywnego przekształcania urydyny-8 do 4-tiourydyny bez denaturacji tRNA. Rozszerzyłoby to możliwość stosowania metody dimeryzacji dla tych tRNA, które nie posiadają w pozycji 8 4SU, a mają cytydynę w pozycji 13 (10).

#### L i t e r a t u r a

- [1] Favre A., Michelson A.M., Yaniv M.; J.Mol.Biol. 58, 367, 1971.
- [2] Favre A., Yaniv M., Chestier A.; J. Mol. Biol. 58, 381, (1971).
- [3] Siddiqui M.A.Q., Ofengand J.; FEBS Lett. 15 (2), 105, (1971).
- [4] Krauskopf M., Ofengand J.; FEBS Lett. 15(2), 111, (1971).
- [5] Krauskopf M., Siddiqui M.A.Q.; BBRC 38,156,(1970).
- [6] Favre A., Yaniv M.; BBRC 37 (2), 266 (1969).
- [7] Pochon F., Cohen S.S.; BBRC 47, 720, (1972).
- [8] Watanabe K., Imahori K.; BBRC 45, 488 (1971).
- [9] Leonard N.J., Bergstrom D.E.; BBRC 44 (6), 1524, (1971).
- [10] Leonard N.J., Bergstrom D.E.; Biochemistry 11 (1), 1-8, (1972).
- [11] Favre A., Yaniv M.; Nature 223, 1331,(1969).
- [12] Ohno A., Ohnishi Y.; JACS 91, 5038,(1969).

- [13] Pullman B., Pullman A.; *Progr. Nucl. Acids Res. Mol. Biol.* 9, 327.
- [14] Brown J.D.; *The Pyrimidines*, New York, N.Y., Wiley Inter. str. 10, 257, 346.
- [15] Pleiss M.G., Cerutti F.A.; *Biochemistry*, 10, 3093, (1971).
- [16] Nino J., Favre A., Yaniv M.; *Nature* 223, 1333(1969).
- [17] Favre A., Roques B., Fourvey J.L.; *FEBS Letters* 24 (2), 209, (1972).

Kazimierz Grześkowiak, Jacek Stawiński

## CHEMICZNA SYNTEZA POLIDEZOKSYRYBONUKLEOTYDÓW WEDŁUG H. G. KHORANY I S. A. NARANGA

### Streszczenie

W referacie przedstawiono przegląd metod syntetycznych stosowanych obecnie przez zespoły H.G. Khorany i S.A. Naranga. Opracowano metody syntetyczne pozwalające otrzymać oligodezoksyrybonukleotydy o określonej sekwencji z dużą wydajnością. Zastosowanie nowych grup blokujących dla funkcji 5'-fosforanowej i 3'-hydroksylowej, prowadzi do uproszczenia rozdziałów chromatograficznych lub zastąpienia w niektórych przypadkach metod chromatograficznych - metodami ekstrakcyjnymi.

### W s t ę p

Syntetyczne polidezoksyrybonukleotydy odgrywają kluczową rolę w badaniach nad kodem genetycznym, biosyntezą białka, polimerazą DNA i RNA.

Związki te otrzymuje się obecnie syntetycznie, stosując metody chemiczne i enzymatyczne.

Otrzymanie długiego łańcucha polinukleotydowego, składa się z trzech etapów:

1) Chemiczna synteza bloków polinukleotydowych, zawierających około 20 jednostek nukleotydowych.

2) Enzymatyczna fosforylacja grupy 5'-hydroksylowej przy pomocy ATP, w obecności  $T_4$  - kinazy.

3) Łączenie odpowiednich fragmentów polinukleotydowych przy pomocy  $T_4$  - ligazy polinukleotydowej.

Wyżej opisana metodyka była z powodzeniem zastosowana w syntezie genu, odpowiadającemu tRNA alaninowemu z drożdży (1). Etapem limitującym badania nad syntezą DNA, jest etap 1 tj. chemiczna synteza polinukleotydów.

### I. Synteza wiązania internukleotydowego oraz stosowane grupy blokujące

Do syntezy najprostszego dwunukleozydomonofosforanu stosuje się następujące komponenty:

1) Komponent nukleozydowy z grupą trytylową w pozycji 5' i wolną grupą 3'-hydroksylową.

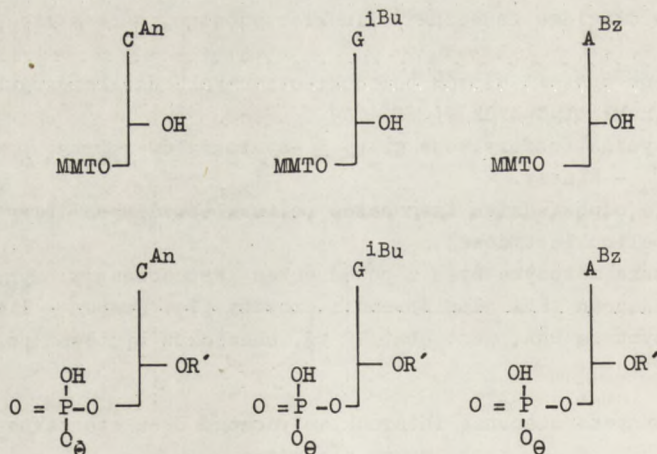
2) Komponent nukleotydowy, którym jest 5'-fosforan z zasadolabilną blokadą w położeniu 3'.

Jako związki aktywujące funkcję fosforanową używa się DCC, TFS, MS, itp. W przypadku dA, dG, dC, powstaje konieczność dodatkowego blokowania funkcji aminowych. Blokowanie tych grup funkcyjnych zapobiega tworzeniu się N-fosforylowanych produktów, oraz podwyższa rozpuszczalność nukleozydów w medium reakcyjnym. Przy doborze grup blokujących kierowano się następującymi kryteriami:

- grupa blokująca funkcję 3'-hydroksylową powinna być łatwa do usunięcia bez naruszenia blokady funkcji aminowej i 5'-hydroksylowej,
- grupa blokująca funkcję aminową powinna być trwała w warunkach stosowanych do usuwania blokady 3'-hydroksylowej,
- warunki przy usuwaniu blokady funkcji 5'-hydroksylowej, nie powinny naruszać wiązania glikozydowego i internukleotydu (co oczywiście odnosi się również do grup w p.a i b), ponadto grupa ta powinna być stabilna na wszystkich etapach syntezy.

Powszechnie stosowanymi grupami do blokowania funkcji 5'-hydroksylowej są trytyl i monometoksytrytyl, przy czym użycie tej ostatniej jest bardziej korzystne, ze względu na łagodniejsze warunki potrzebne do jej usunięcia (2). Funkcję 3'-hydroksylową zazwyczaj blokuje się grupą acetylową, rzadziej natomiast beta-benzoilopropionoilowa lub metoksyacetylową.

Funkcje aminowe blokuje się różnymi grupami, w zależności od rodzaju nukleozydu. I tak, dla dC najodpowiedniejszą jest grupa anizoilowa, dla dA - benzoilowa, dla dG - izobutyrylowa lub 2-metylobutyrylowa.



MMT - grupa p-metoksytrytylowa, An - anizoil, iBu - izobutynol, Bz - benzoil, R' - acetyl

Ryc. 1.

W 1972 r. Narang i współ. stwierdzili, że blokowanie funkcji aminowej konieczne jest tylko w przypadku dC, natomiast dA i dG można używać bez blokowania, na skutek mniejszej reaktywności ich grup aminowych (3).

## II. Synteza wyższych polidezoksyrybonukleotydów o zadanej sekwencji

Celem chemicznej syntezy jest otrzymanie polinukleotydów o ściśle określonej sekwencji.

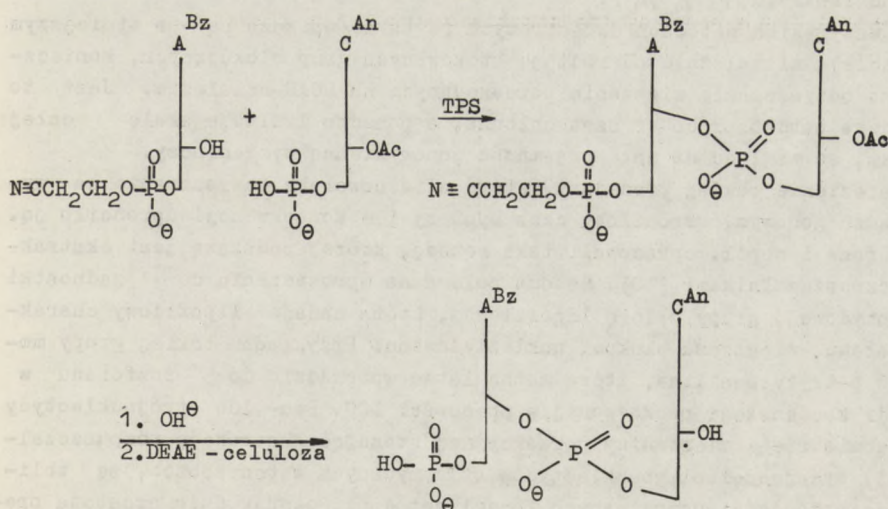
Można sobie wyobrazić dwa podejścia w tego typu syntezie:

1) kolejne przyłączanie pojedynczego nukleotydu do rosnącego łańcucha polinukleotydowego,

2) użycie uprzednio przygotowanych większych bloków polinukleotydowych i łączenie ich z sobą (metoda blokowa).

Pierwszy sposób wymaga dużej liczby etapów syntetycznych i rozdzielń chromatograficznych. Zaletą tej metody jest jednak stosunkowo wysoka wydajność poszczególnych etapów kondensacji. Druga droga jest szybsza, pozwala na stosowanie wygodniejszych systemów chromatograficznych, jednak wydajność przy kondensacji długich łańcuchów są z reguły małe.

Obecnie w chemicznej syntezie stosuje się kombinację obu metod. Stosując metodę blokowej kondensacji wychodzi się z dwu lub trójnukleotydów, zawierających grupę fosforanową w pozycji 5'-rybozy. Takie małe bloki otrzymuje się z dwóch, odpowiednio zablokowanych 5'-fosforanów, z których jeden posiada niezablokowaną grupę fosforanową, a drugi - wolną grupę 3'-hydroksylową (Ryc. 2).

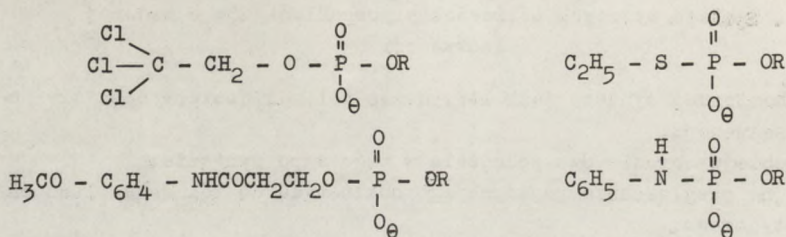


Ryc. 2

Grupa cyanoetylowa, blokująca funkcję fosforanową, usuwana jest po zakończeniu kondensacji w środowisku zasadowym. Powtórzenie operacji - cyanoetylowanie, kondensacja - prowadzi do otrzymania większych bloków.

Ważną sprawą w chemicznej syntezie oligonukleotydów jest odpowiedni dobór grup blokujących dla funkcji fosforanowej. Różne rodzaje takich grup przedstawiono na ryc. 3.





Ryc. 3

Grupa 2,2,2-trójchloroetylowa użyta została po raz pierwszy przez Woodwarda (4) i wprowadzona do chemii nukleotydów przez Ecksteina (5). Grupę tę usuwa się działaniem pary Zn/Cu w DMF. Użycie podstawionych tiofosforanów proponuje Nussbaum (6). Niepodstawiony fosforan z takiego związku można otrzymać przez traktowanie go roztworem jodu w wodzie. Trzecim typem jest zasadolabilna grupa p-metoksyfenylokarbamioetylowa wprowadzona przez Naranga (7). I wreszcie czwartym rodzajem grupy blokującej jest aromatyczny fosfoamid, otrzymany po raz pierwszy przez Khoranę i Moffata (8). Ohtsuka (9) zastosował tę grupę do blokowania funkcji fosforanowej i stwierdził, że można ją usuwać w bardzo łagodnych warunkach działaniem azotynu izoamylu przy pH 7.

We wszystkich metodach dwustopniowych (a takie opisane są w niniejszym referacie), niezależnie od rodzaju stosowanych grup blokujących, konieczne jest oczyszczanie mieszanin poreakcyjnych na DEAE-celulozie. Jest to procedura bardzo pracochłonna i czasochłonna, a ponadto limituje skalę całej syntezy, ze względu na małą pojemność jonowymienną wymienniczy.

Znalezienie takiej procedury, która eliminowałaby oczyszczanie na wymienniczu jonowym, skróciłoby czas syntezy i w konsekwencji uprościło ją.

Khorana i współ. opracowali taką metodę, której podstawą jest ekstrakcja rozpuszczalnikami (10). Metoda polega na wprowadzeniu do jednostki nukleotydowej, grupy silnie lipofilowej, która nadaje lipofilowy charakter całemu, większemu blokowi nukleotydowemu. Przykładem takiej grupy może być p-trytyloanilina, którą można łatwo wprowadzić do 5'-fosforanu w reakcji kondensacji prowadzonej w obecności DCC. Dwu- lub trójnukleotydy wyodrębnia się z mieszaniny poreakcyjnej stosując ekstrakcję rozpuszczalnikami. Wydajności oligonukleotydów otrzymywanych w ten sposób, są zbliżone do wydajności uzyskiwanych innymi metodami, jednak duża prostota preparatywna przemawia zdecydowanie na korzyść metody ekstrakcyjnej.

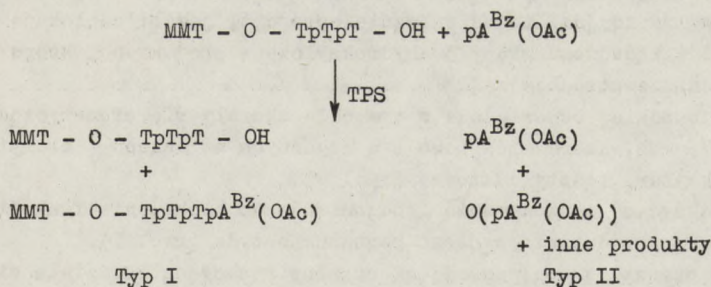
W nieco innym kierunku poszły prace Naranga i współ., którzy przebadali szereg nowych grup blokujących dla funkcji fosforanowej (11-14). Są to podstawione fenole i tiofenole, które po przyłączeniu do odpowiedniej części, podwyższają jej powinowactwo do benzoilowanego Sephadexu lub celulozy. W ten sposób, komponenty niezawierające grup aromatycznych można wymyć z kolumny przy niskim stężeniu buforu, natomiast elucja komponentów zablokowanych na funkcji fosforanowej następuje po zwiększeniu

stężenia buforu. Z ww. odczynników blokujących, najbardziej użyteczny okazał się 2-fenylomerkaptoetanol (14). Grupę tę można wprowadzić stosując standartowe warunki kondensacji z DCC, i co jest ważne, grupa ta jest bardzo stabilna. Np. wytrzymuje ona działanie 2N NaOH przez 4 godz., st.  $\text{NH}_4\text{OH}$  w  $50^\circ$  przez 2 godz., wodnej pirydyny przez tydzień, rozcieńczonego HCl przez 3 dni. Usuwanie jej następuje dwuetapowo: utlenianie nadjodanem wiązania siarczkowego do sulfotlenku, a następnie eliminacja w 2N NaOH przez 30 min. w temp. pokojowej (15). Ostatnio ukazała się praca Khorany i współ. (16), w której autorzy donoszą, że grupę fenylomerkaptoetylową można usuwać w łagodniejszych warunkach niż to proponuje Narang. Zamiast utleniania nadjodanem, Khorana stosuje N-chlorosukcynimid do utleniania wiązania siarczkowego, a następnie usuwa grupę feniloetylosulfotlenkową w roztworze 1N wodorotlenku sodu (5 min.,  $0^\circ\text{C}$ ). Zastosowanie łagodniejszych warunków zmniejsza niebezpieczeństwo jednoczesnego odblokowania innych grup funkcyjnych.

### III. Zastosowanie zmodyfikowanych celuloz do rozdziału związków trytylowanych

Równoległe z pracami syntetycznymi, postępują prace nad rozdziałem mieszanin poreakcyjnych. Z wielu zmodyfikowanych celuloz bardzo użyteczne okazały się trytylo i naftoiloceluloza (17), które pozwalają na prosty rozdział produktów trytylowanych od nietrytylowanych.

Przykładem może służyć synteza tetranukleotydu TpTpTpA. W wyniku kondensacji w mieszaninie reakcyjnej znajdują się następujące produkty:

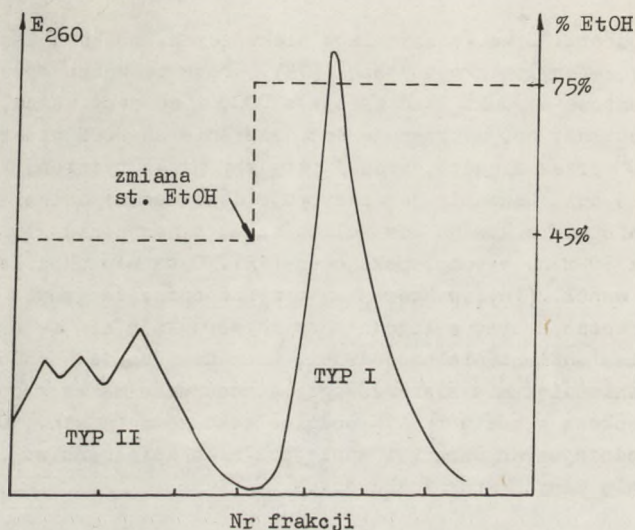


Ryc. 4

Typ I zawiera nieprzereagowany trójnukleotyd i zablokowany tetranukleotyd.

Typ II zawiera nieprzereagowany nukleotyd, sym. pirofosforan i inne uboczne produkty.

Po naniesieniu całej mieszaniny na kolumnę z trytylocelulozą, adsorpcji ulegają pochodne trytylowane, podczas gdy składniki nietrytylowane obecne są w eluacie. Komponenty trytylowane można wymyć z kolumny zwiększając stężenie etanolu. Typowy profil elucji przedstawia ryc. 5.



Ryc. 5

#### IV. Selektywne blokowanie końcowej grupy 3'-hydroksylowej w zablokowanych dezoksyrybonukleotydach (18)

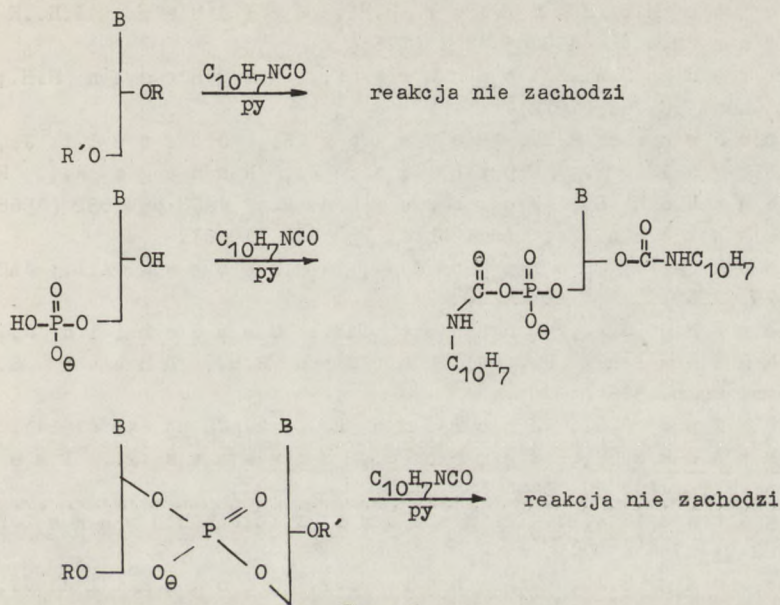
Główną trudnością w syntezie oligonukleotydów jest fakt, że poszczególne etapy kondensacji nie przebiegają ilościowo. Powoduje to konieczność stosowania długotrwałych rozdzielaczy chromatograficznych substratów, od rosnącego łańcucha oligonukleotydowego. Stwierdzono, że rozdział mieszaniny reakcyjnej można znacznie uprościć, jeżeli zablokuje się selektywnie i ilościowo grupy 3'-hydroksylowe w produktach, które występują w mieszaninie poreakcyjnej.

Najbardziej odpowiednie w tym celu okazały się aromatyczne izocyjaniany (17, 18), które ilościowo i w łagodnych warunkach estryfikują grupy hydroksylowe reszty cukrowej (ryc. 6).

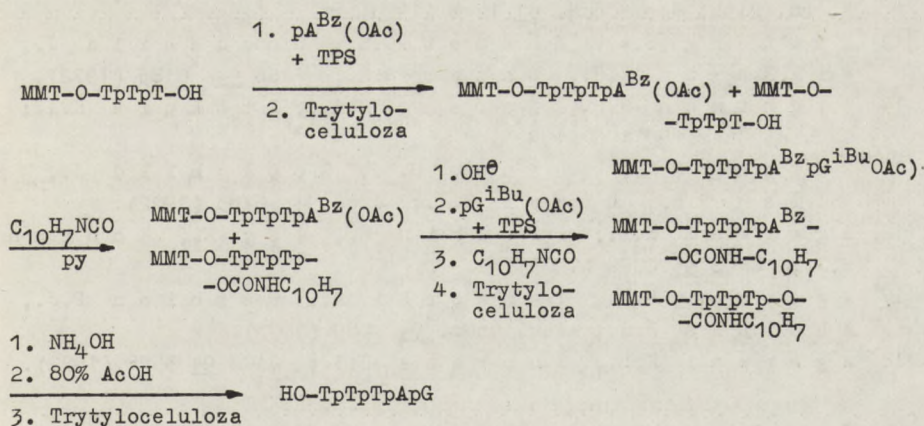
Praktyczne zastosowanie izocjanianów do blokowania funkcji 3'-hydroksylowej przedstawia synteza pentanukleotydu (ryc. 7).

Po pierwszej kondensacji mieszaninę reakcyjną rozdziela się na trytylocelulozie i frakcję zawierającą produkty trytylowane, traktuje się izocyjanianem. Wychodząc z trójnukleotydu, cykl - dodanie odpowiedniego monofosforanu, rozdział na trytylocelulozie, dodanie izocyjanianu - powtórzono dwa razy, otrzymując pentanukleotyd. Po zakończeniu syntezy usunięto grupy blokujące (z wyjątkiem grup naftoilokarbamylowych) i mieszaninę naniesiono na kolumnę z trytylocelulozą. Oligonukleotydy zawierające grupę 3'-naftoilokarbamyłową były zatrzymywane na kolumnie, podczas gdy pożądaný produkt, pentanukleotyd obecny był w eluacie.

Wydaje się, że szczegółowe rozpracowanie tej metody uczyni ją bardzo pożyteczną w syntezie polinukleotydów w roztworze, jak również na podłożu polimerowym.



Ryc. 6



Ryc. 7

## Literatura

- [1] Agarwal K.I., Buchi H., Caruthers M.H., Gupta N., Khorana H.G., Kleppe K., Kumar A., Ohtsuka E., RajBhandary U.L., van de Sande J.H., Sgarabela V., Weber H., Yamada Y.; Nature, 227, 27 (1970).

- [2] Smith M., Rammler D.H., Goldberg I.H., Khorana H.G.; JACS 85 3821 (1963).
- [3] Narang S.A., Itakura K., Wightman R.H.; Can. J. Chem. 50 769 (1972).
- [4] Woodward R.B., Heusler K., Gosteli J., Naegeli P., Oppolzer W., Ramage R., Ramganathan S., Vorbrugen H.; JACS 88 852 (1966).
- [5] Eckstein F.; Ang. Chem. 78 682 (1966).
- [6] Cook A.F., Holman M.J., Nussbaum A.L.; JACS 91 6479 (1969).
- [7] Narang S.A., Bhanot O.S., Goodchild J., Michniewicz J., Wightman R.H., Dheer S.K.; Chem. Comm. 516 (1970).
- [8] Moffat J.G., Khorana H.G.; JACS 83 649 (1961).
- [9] Ohtsuka E., Murao K., Ubasawa M., Ikehara M.; JACS 92 3441 (1970).
- [10] Agarwal K.L., Yamazaki A.Y., Khorana H.G.; JACS 93 2754 (1971).
- [11] Narang S.A., Bhanot O.S., Goodchild J., Michniewicz J.; Chem. Comm. 91 (1970).
- [12] Narang S.A., Bhanot O.S., Michniewicz J.; Bioch. Biph. Res. Comm. 41 1248 (1970).
- [13] Narang S.A., Bhanot O.S., Goodchild J., Wightman R.H., Dheer S.K.; JACS 94 6183 (1972).
- [14] Wightman R.H., Narang S.A., Itakura K.I.; Can. J. Chem. 50 456 (1972).
- [15] Narang S.A., Bhanot O.S., Goodchild J., Wightman R.H., Dheer S.R.; JACS 94 6183 (1972).
- [16] Agarwal K.L., Fridkin M., Jay E., Khorana H.G.; JACS 95 2020 (1973).
- [17] Agarwal K.L., Yamazaki A., Cashion P.J., Khorana H.G.; Ang. Chem. 84 489 (1972).
- [18] Agarwal K.L., Khorana H.G.; JACS 94 3578 (1972).

Paweł Serafinowski

## NOWE PRZYKŁADY PODŁOŻY POLIMEROWYCH DO SYNTEZY OLIGONUKLEOTYDÓW

### Streszczenie

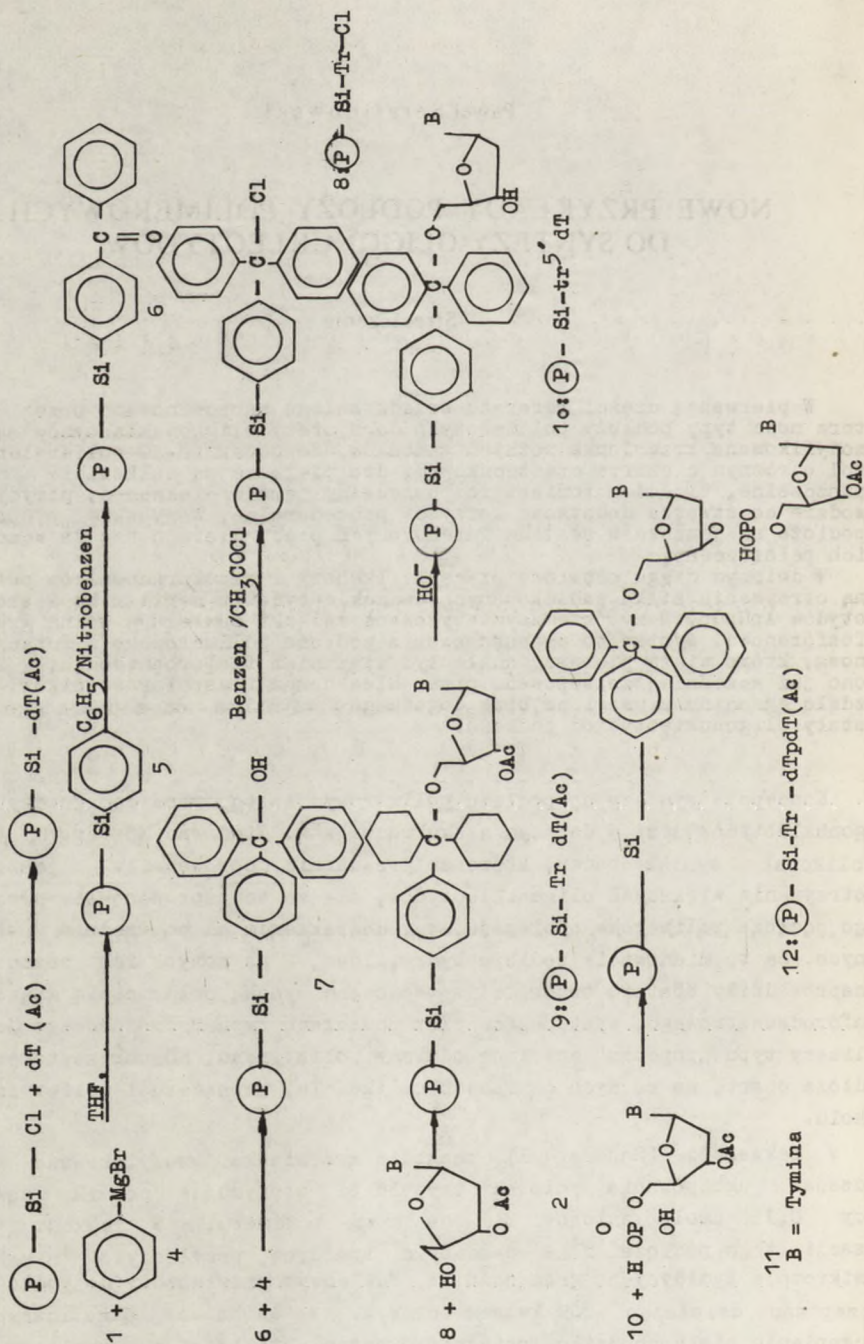
W pierwszej części referatu przedstawiono zaproponowane przez Küstera nowe typy podłoża polimerowych do syntezy oligonukleotydów są to: modyfikowana krzemionka różnych gatunków, Sephadex LH-20-polietylenoglikol o różnym ciężarze cząsteczkowym; dwa pierwsze są całkowicie nierozpuszczalne, trzeci natomiast rozpuszczalny jest w dioksanie, pirydynie i wodzie co stwarza dodatkowe korzyści proceduralne. Wszystkie proponowane podłoża są jeszcze w stadium intensywnych prób, dlatego też za wcześnie na ich pełną ocenę.

W dalszym ciągu omówiono pracę A. Ikehary i współpracowników poświęconą otrzymaniu kilku zablokowanych dwunukleotydów z serii ribo i trójnukleotydów ApUpGp. Wszystkie zsyntetyzowane związki zawierają wolną grupę 3'-fosforanową. Wynika to z zastosowania podłoża polimerowego z funkcją aminową, która wiąże pierwszy nukleotyd wiązaniem fosforoamidowym. Zostało ono już wcześniej zastosowane przez Blackburna i współpracowników, ale nie zdało egzaminu z uwagi na brak dogodnego czynnika odczepiającego powstały oligonukleotyd od podłoża.

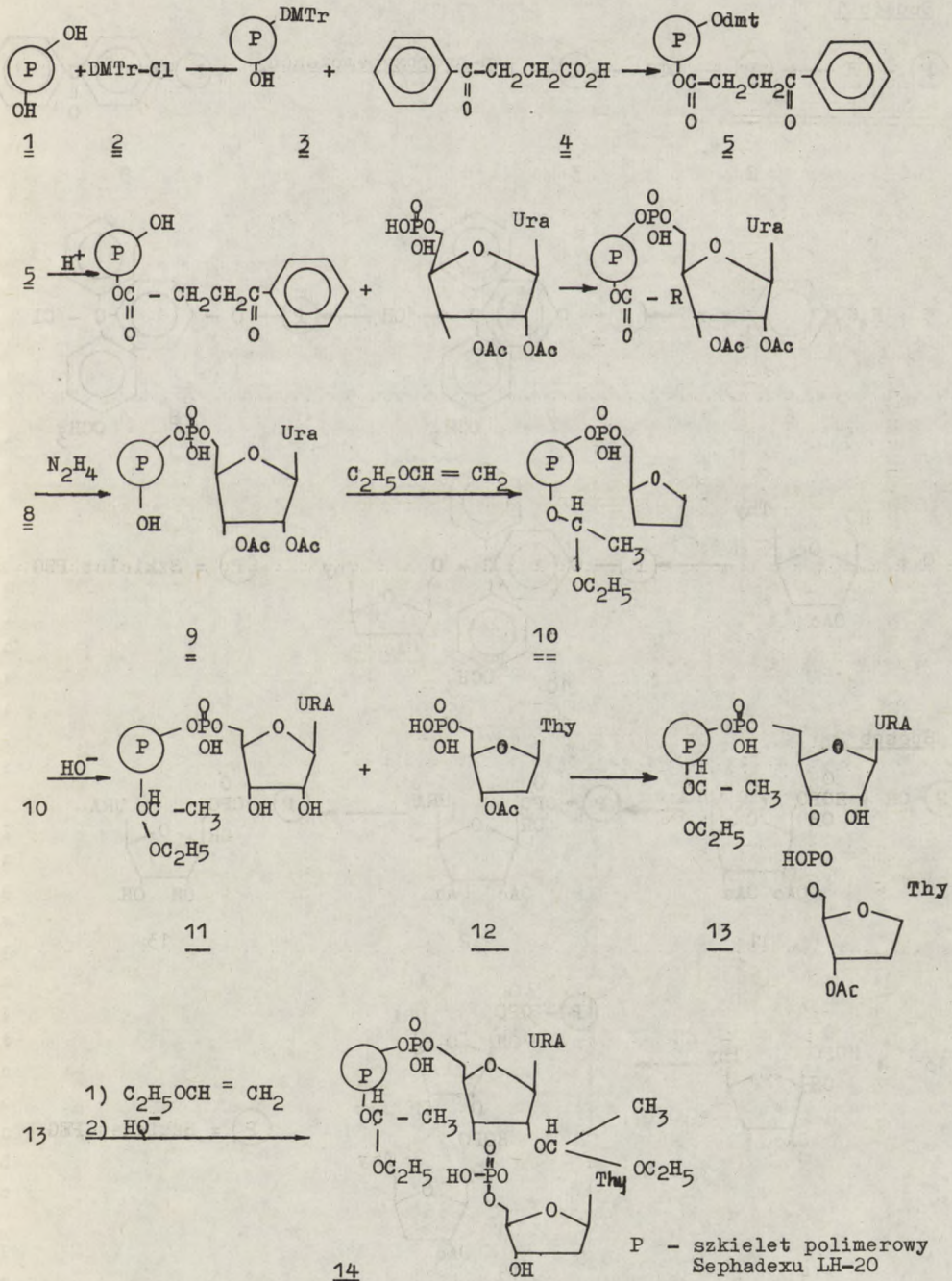
Koncepcja syntezy na podłożu polimerowym zastosowana do syntezy oligonukleotydów jest w dalszym ciągu rozwijana. Niedawno Küster (1,2,3) opublikował wyniki badań, które co prawda nie doprowadziły go jeszcze do otrzymania większych oligonukleotydów, ale za to zaproponowane przez niego podłoża polimerowe odbiegają swym charakterem od poprzednio stosowanych. Są to mianowicie podłoża hydrofilowe, a na pomysł ich zastosowania naprowadziły Küstera trudności spowodowane wysoką polarnością wiązania fosforodwuestrowego, występujące przy podłożach typu hydrofobowego jak polimery typu „popcorn” czy inne odmiany polistyrenu. Küster zastosował podłoża oparte na różnych odmianach silikażelu, sephadexu i polietylenoglikolu.

W sekwencji (Schemat I) reakcji krzemionkę zmodyfikowano wprowadzając ugrupowania chlorku trytylu i otrzymując nośnik zawierający 0,19 mmola anionów  $\text{Cl}^-$  na gram polimeru. W reakcji kondensacji tego podłoża z 3'-o-acetylo tymidyną przyłączyło się 10,7 mikromola tymidyny na gram nośnika. Nukleozyd przyłączony do podłoża odczepiano działając 80% kwasem octowym. W warunkach alkalicznych odczepienie nie zachodziło, osiągnięto natomiast ilościowe usunięcie grup acetylowych tymidyny i dalej kondensowano związek 10(P-Si-Tr dT), z 5'-fosforanem 3'-o-acetylotymidyny wobec TPS. Z uwagi na fakt, że fosforan re-

Schemat I  
Użycie nośników nieorganicznych



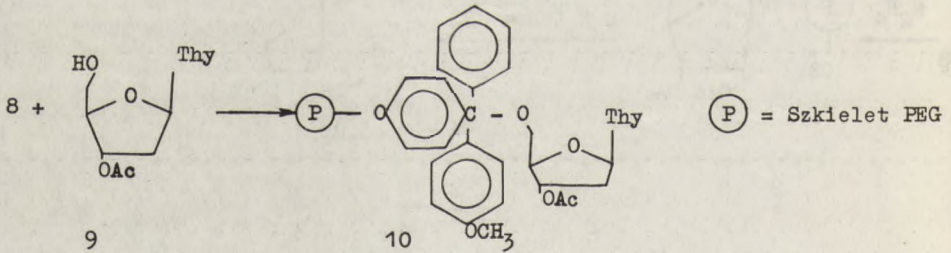
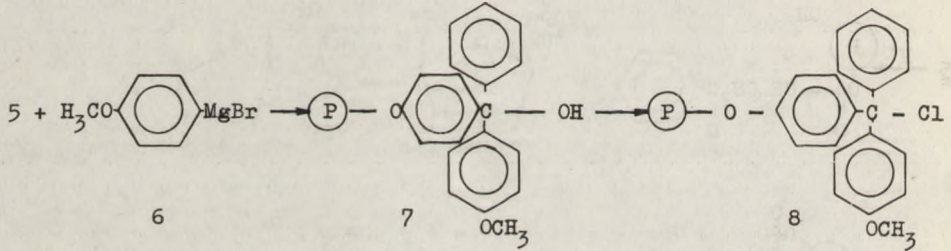
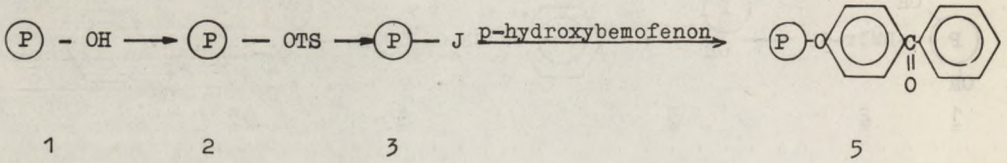
Schemat II  
Zastosowanie Sephadexu LH 20



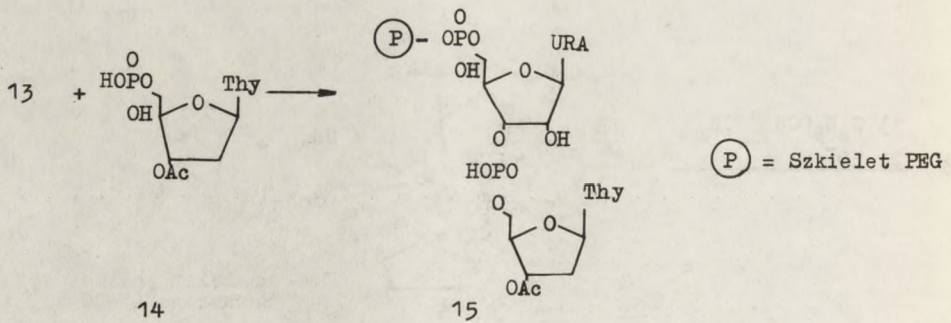
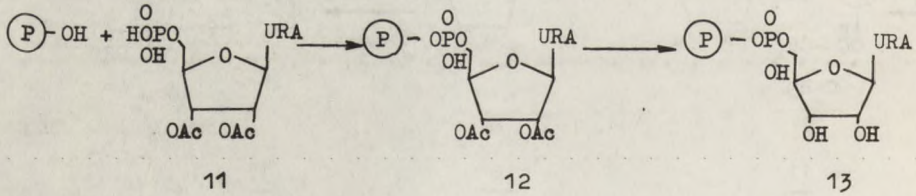


Schemat III  
Użycie polietylenoglikolu (PEG)

Sposób 1



Sposób 2



aguje ubocznie z wolnymi grupami OH silikażelu, wydajność kondensacji wynosi tylko 54%. Tej niepożądaney reakcji można uniknąć, zabezpieczając uprzednio grupy OH krzemionki p-bromometylo-fenylotrójchlorosilanem. Przy syntezie dłuższych łańcuchów, a zwłaszcza takich, które zawierają nukleozydy purynowe, autorzy zalecają stosowanie zamiast grupy trytylowej, grupy mono lub dwumetoksytrytylowej, które są bardziej czułe na kwaśną hydrolizę. Pozwoliłoby to na uniknięcie ewentualnego rozpadu nukleozydów purynowych w warunkach hydrolizy stosowanych dla grup trytylowych.

Kolejnym przykładem hydrofilowego podłoża, będącego przedmiotem badań Köstera i wsp.<sup>2)</sup> jest Sephadex LH-20 zawierający cis-diolowe grupy OH. W reakcjach pokazanych na schemacie II polimer zmodyfikowano grupami  $\beta$ -benzoilopropionowymi blokując nimi bardziej zatłoczone sterycznie grupy OH w ugrupowaniach cis-diolowych. Jako cząsteczki kotwiczącej będącej jednocześnie początkiem łańcucha oligonukleotydu użyto 5'-fosforanu 2'3'-O-acetylo-urydyny, który kondensowano wobec TPS z podłożem zawierającym ugrupowanie  $\beta$ -benzoilo-propionowe, uzyskując przyłączenie 95 mikromoli fosforanu na gram polimeru. Działaniem hydrazyny usunięto następnie blokady  $\beta$ -benzoilo-propionylowe i wprowadzono na ich miejsce etoksyetylidenowe (kwasolabilne). Po usunięciu z pozycji 2'3'-urydyny grup acetylowych, prowadzono kondensację z 5'-fosforanem 3'-o-acetylo-tymidyny w obecności TBS.

Ze względów sterycznych reagowała tylko jedna grupa OH urydyny. Po kolejnej reakcji z eterem etylowo-winylowym i działaniu alkaliu kondensację można było prowadzić dalej, a po ich zakończeniu usunąć grupy etoksyetylidenowe i w środowisku alkalicznym odczepić powstały oligonukleotyd od podłoża. Rezultaty swych badań nad użyciem Sephadeksu LH-20, Köster określił ja-wstępnie i prawdopodobnie z tego powodu nie informuje o wydajnościach poszczególnych etapów syntezy, końcowych jej rezultatach, a także niezbyt jasno precyzuje warunki odczepienia powstałego oligonukleotydu od podłoża.

Dwa uprzednio opisane przykłady hydrofilowych podłoży polimerowych przedstawiały podłoża nierozpuszczalne. W ich przypadku problemy dyfuzyjne i względy steryczne mogą powodować zmniejszenie wydajności poszczególnych etapów. Na częściowe ominięcie tych wad pozwala zastosowanie rozpuszczalnego w dioksanie, pirydynie i wodzie nośnika polimerowego opartego na polietylenoglikolu (PEG), spełniającego równocześnie rolę makromolekularnej grupy blokującej. Rozpuszczalność PEG umożliwia przeprowadzanie kondensacji i usuwania blokad w fazie homogennej; można też przez pomiar absorpcji UV łatwo i szybko określać wydajność tych reakcji. Stosowane zwykle w nadmiarze niskocząsteczkowe reagenty można łatwo oddzielić przez dializę, a polimer wraz z przyczepionym doń materiałem nukleotyduowym pozostaje w tubce dializyjnej i po liofilizacji jest gotowy do dalszych kondensacji. Schemat III ilustruje przebieg syntezy z użyciem PEG.

Jako grupę kotwiczącą zastosowano chlorek trytylu i tak zmodyfikowany PEG kondensowano z 3'-o-acetylotymidyną uzyskując przyłączenie 28,7 mikromola tymidyny na gram polimeru.

Innym sposobem może być użycie urydyny spełniającej rolę grupy funkcyjnej podłoża i dalsze postępowanie analogiczne jak opisano w przypadku Sephadexu LH-20. Przyłączyło się 78,2 mikromola urydyny na gram polimeru, a kolejne kondensacje z 3'-acetylo-tymidyną zachodziły z wydajnością 98%.

Podobnie jak poprzednio, prawdopodobnie z uwagi na niezakończone jeszcze badania, nie podano finalnych produktów i nie sprecyzowano warunków odczepienia powstałego oligonukleotydu od podłoża.

Kolejną nową publikacją z dziedziny syntezy oligonukleotydów na podłożu polimerowym, jest praca Ikehary (5), która doprowadziła do otrzymania trójnukleotydu ApUpGp. Warta jest ona odnotowania głównie dlatego, że dotyczy serii „rybo”, co jest nadal rzadkością w syntezie na podłożach polimerowych. Ostatnią pracą z tej serii opublikowali Yip i Tso'u (6), otrzymując na izotaktycznym polistyrenie modyfikowanym bezwodnikiem bursztynowym, trójnukleozyddwufosforan UpUpU.

Ikehara do syntezy swoich oligonukleotydów zastosował podłoże polimerowe przedstawione jeszcze w 1967 r. przez Blackburna (4). Sieciowany p-dwuwinylobenzenem polistyren otrzymano w sposób przedstawiony na schemacie IV. Jego grupą funkcyjną jest grupa aminowa. Blackburn otrzymał pđTpdTpdT z 5% wydajnością i miał kłopoty z odczepieniem bez strat powstałego oligonukleotydu od nośnika. Warunki kwasowej hydrolizy wiązania fosforoamidowego były zbyt ostre dla wiązań N-glikozydowych nukleozydów. Ikehara badając aromatyczne fosforoamidy nukleozydów stwierdził, że hydroliza fosforoamidów do odpowiednich fosforanów zachodzi łatwo pod wpływem azotynu izoamylu bez naruszania jakichkolwiek innych wiązań.

Stosując swoje stwierdzenia Ikehara przebadał gruntownie kinetykę tworzenia wiązania fosforoamidowego w modelowej reakcji żywicy zawierającej 1,19 milimola grup aminowych na gram żywicy z 3'-acetylo-5'-fosforanem tymidyny (II) wobec DCC. Co pewien czas pobierano próbki polimeru i wyniki przedstawiono na wykresie (ryc. 4). Badania kinetyki odczepiania oligonukleotydu od podłoża pokazały, że po 4 godz. działania azotynu izoamylu w temperaturze pokojowej, uwalnia się 96% materiału oligonukleotydu. Podobnie działano na żywicę I zablokowanymi fosforanami guanozyny, urydyny i cytydyny uzyskując odpowiednio 9,40 i 18% przereagowania grup aminowych żywicy. Działanie na żywicę azotynem izoamylu uwalniało nukleotydy ilościowo bez naruszania grup blokujących.

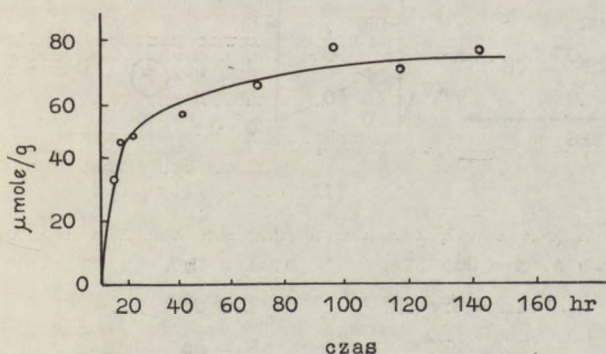
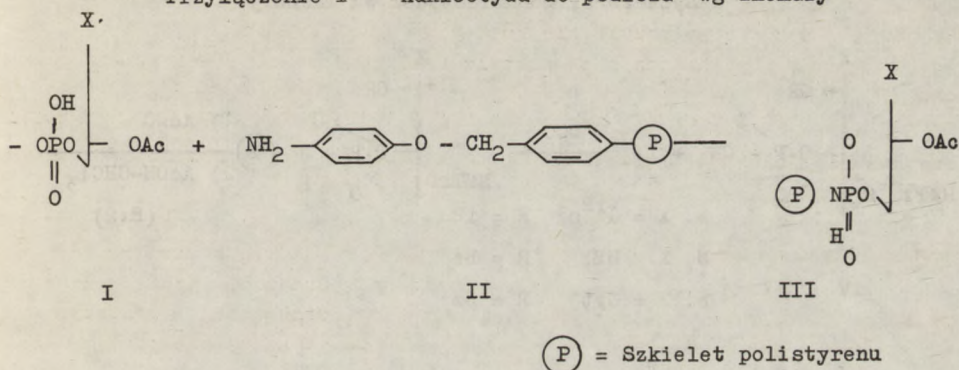
Dalsze etapy syntezy przedstawiono na schemacie V.

Polimery (V) zawierające po jednej cegiełce nukleotydujowej, acetylowano wyczerpująco bezwodnikiem octowym (zabezpieczenie wolnych grup aminowych żywicy), a następnie usuwano kwasem octowym grupy monometoksytrytylowe z położenia 5'.

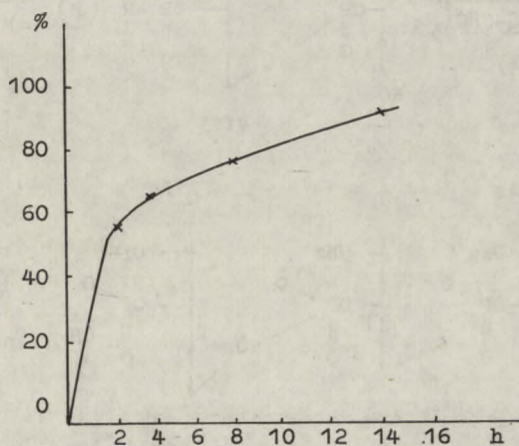
Detrytylowane żywice VI, stosowano do przedłużania łańcucha.

Odpowiednio zablokowane mononukleotydy reagowały z VI w obecności TPS-u dając z wydajnością 20-40% dwunukleotydy. Zablokowane „dwójki” uwolnione

Schemat IV  
Przyłączenie I nukleotydu do podłoża wg Ikehary

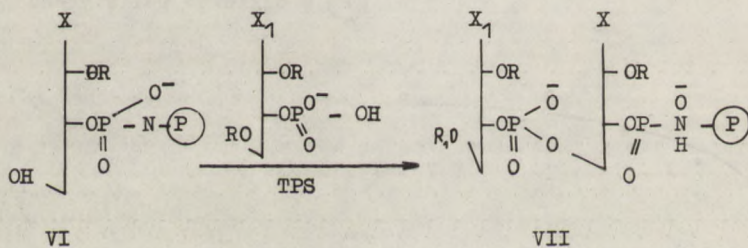
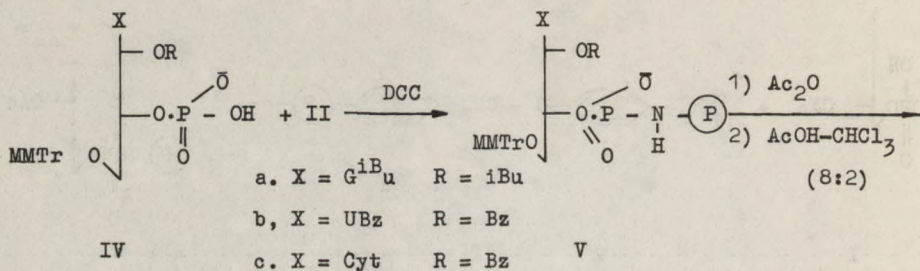


Zależność stopnia przyłączenia I nukleotydu do podłoża od czasu wg Ikehary



Wykres przedstawiający procent uwolnienia nukleotydu od podłoża działaniem azotynu izoamylu w funkcji czasu

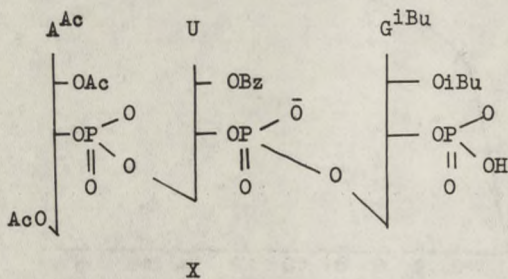
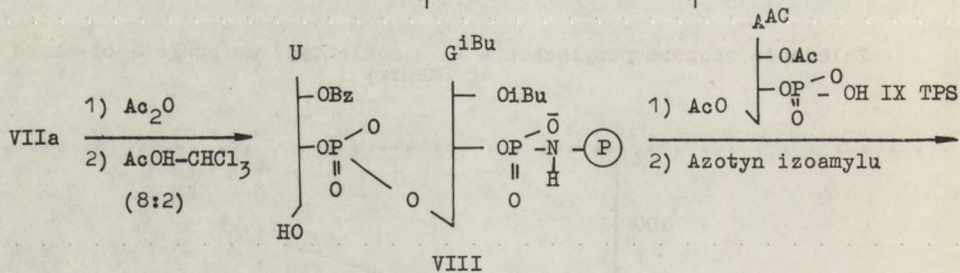
Schemat V  
 Synteza oligonukleotydów wg Ikehary



a. X = Gua<sup>i</sup>Bu  
 b. x = Ura

a. x = Gua<sup>i</sup>Bu  
 X<sub>1</sub> = Ura  
 R<sub>1</sub> = MMTr

b. X = Ura  
 X<sub>1</sub> = C<sup>Bz</sup>  
 R<sub>1</sub> = Bz



Ⓟ = Szkielet polistyrenu  
 R = Acyl

Tabela I

Warunki reakcji i wydajności w syntezie dwunukleotydów

Nukleozyd związany z polimerem [μmol]	Nukleotyd, [μmol]	Produkt	Pirydyna [ml]	TPS [ml]	Czas reakcji [godz.]	Wydajność [%]
U(Bz)-p, 25	mmt-G <sup>i</sup> -Bu(-i, Bu)-p, 125	mmt-G <sup>i</sup> -Bu(-i-Bu)-p- u(Bz)-p	1,5	250	46	40
G <sup>i</sup> -Bu(-i-Bu)-p- 50	mmt-U(Bz)-p, 250	mmt-U(Bz)-p- G <sup>i</sup> -Bu(-i-Bu)-p	1,5	550	49	36
G <sup>i</sup> -Bu(-i-Bu)-p, 6,0	mmt-G <sup>i</sup> -Bu(-i-Bu)-p, 90	mmt-G <sup>i</sup> -Bu(-i-Bu)-p- G <sup>i</sup> -Bu(-i-Bu)-p	0,5	480	49	5
C <sup>Bz</sup> (Bz)-p, 4	mmt-G <sup>i</sup> -Bu(-i-Bu)-p, 50	mmt-G <sup>i</sup> -Bu(-i-Bu)-p- G <sup>Bz</sup> (Bz)-p	0,5	110	36	20
U(Bz)-p, 73	Bz-C <sup>Bz</sup> (Bz)-p, 52	Bz-C <sup>Bz</sup> (Bz)-p-U(Bz)-p	0,5	295	8	38

z polimeru VII, charakteryzowano chromatograficznie i elektroforetycznie po usunięciu grup blokujących. Szczególnie przydatne w rozdziale mieszanin poreakcyjnych okazało się sączenie żelowe na Sephadexie LH-20, pozwalające łatwo oddzielić pirofosforany nukleozydów. Sączenie żelowe jest proste i krótkotrwałe, dlatego metoda Ikehary nadaje się dobrze do otrzymywania zablokowanych dwunkleotydu. Warunki reakcji i wydajności w syntezie dwójek podano w tabeli I.

W celu otrzymania trójnukleotydu ApUpGp żywicę VII poddano działaniu bezwodnika octowego, a grupę monometoksytrytylową usunięto jak wyżej. Żywicę VIII kondensowano wobec TPS-u z N,2'3'-trójacetylo-5'-fosforanem adenozy (IX). Otrzymany zablokowany trójnukleotydu (X) uwolniono od podłoża azotynem izoamylu i odblokowano amoniakiem. Produkt oczyszczano, stosując chromatografię bibułową.

Wydajność etapów VII-X wyniosła 10%.

#### L i t e r a t u r a

- [1] K i s t e r H.: Tetrahedron Lett. 16 1527 (1972).
- [2] K i s t e r H.; K e y n s K.; *ibid.*, 16 1527 (1972).
- [3] K i s t e r H.; *ibid.* 16 1535, (1972).
- [4] B l a c k b u m G.M.; J. Chem. Soc., C. 2438 (1967).
- [5] I k e h a r a M.; J. Am. Chem. Soc., 94 3229 (1972).
- [6] Y i p W.C., T s o n C.F.; *ibid.* 93 3272 (1971).

Wojciech Markiewicz

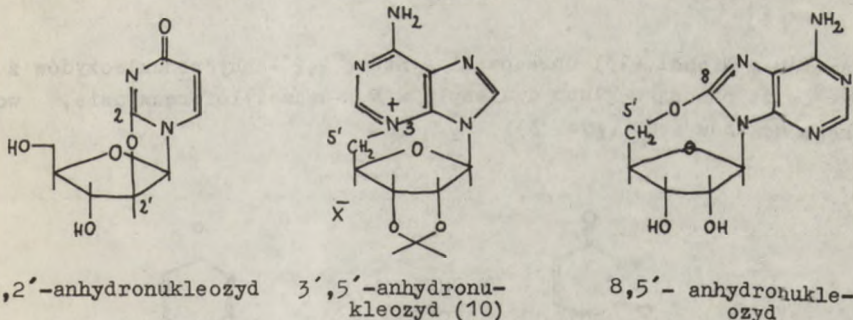
## WYBRANE ASPEKTY CHEMII ANHYDRONUKLEOZYDÓW PIRYMIDYNOWYCH

### Streszczenie

Przedstawiono niektóre metody otrzymywania anhydronukleozydów, głównie 2,2'-anhydronukleozydów pirymidynowych. Omówiono reakcje cykliczacji nukleozydów do anhydronukleozydów i bezpośrednią syntezę tego układu z cukru i cyjanamidu. Zwrócono uwagę na zastosowania omawianych związków w syntezie aldopentofuranozydowych epimerów nukleozydów i ich pochodnych.

### 1. W s t ę p

Przedstawiono niektóre metody otrzymywania anhydronukleozydów (ryc.1), czyli układów cyklicznych powstałych formalnie z nukleozydów poprzez eliminację cząsteczki wody.



Ryc. 1

Omówiono głównie 2,2'-anhydronukleozydy pirymidynowe.

Anhydronukleozydy są użytecznymi związkami przejściowymi w syntezie nukleozydów, 1-β-D-aldopentozofuranozydowych epimerów nukleozydów, dezoksynukleozydów. Są również prawdopodobnie związkami tworzącymi się w warunkach przedbiologicznych (7). Podkreślono znaczenie syntezy anhydronukleozydów z cukru i cyjanamidu dla laboratoryjnego otrzymywania nukleozydów. Zastosowanie anhydronukleozydów do syntezy różnych pochodnych pokazano na kilku przykładach.



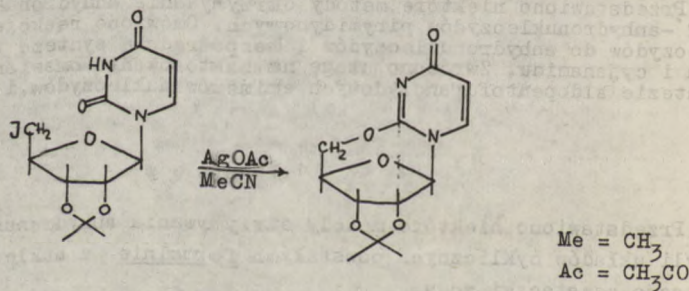
## 2. Metody otrzymywania anhydronukleozydów pirymidynowych

Metody otrzymywania anhydronukleozydów pirymidynowych można podzielić na: po pierwsze metody, w których cyklizuje się nukleozyd, i po drugie, metody, w których dokonuje się syntezy anhydronukleozydu z cukru i cyjanamidu.

### 2.1. Cyklizacja nukleozydów

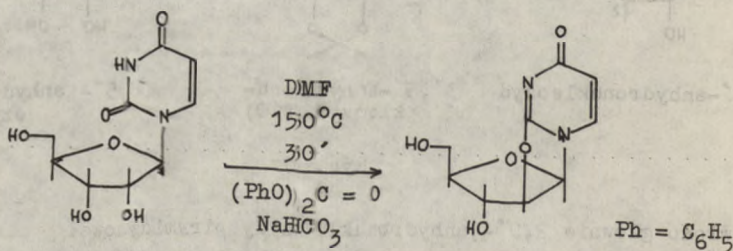
Łatwość otrzymywania cyklonukleozydów pirymidynowych zmniejsza się w kolejności:  $2,2' > 2,3' > 2,5'$  (9).

Najstarsze metody polegały na cyklizacji za pomocą soli srebrnych pochodnych halogenowych nukleozydów (ryc. 2), lub pochodnych tosylowych, mezylowych za pomocą zasad (11,12).



Ryc. 2

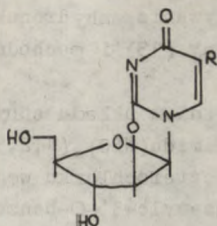
Hampton i Nichol (13) opracowali syntezę 2,2'-anhydronukleozydów z nukleozydów za pomocą węglań dwufenyłu w N,N-dwumetyloformamidzie, wobec kwaśnego węglań sodu (ryc. 3).



Ryc. 3.

Tą metodą przeprowadzono syntezę 2,2'-anhydro-1-β-D-arabinofuranosylo-5-metoksyuracylu (14) z wydajnością 83% (ryc. 4).

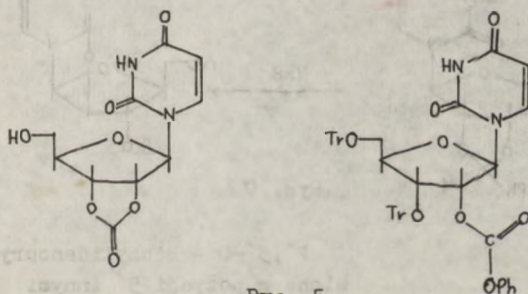
Verheyden, Wagner, Moffatt (6) otrzymali zmodyfikowaną metodą Hamptona 2,2'-anhydro-1-β-D-arabinofuranosylouracyl (ryc. 4) w heksametylofosforamidzie (HMPT) z wydajnością wyższą (88%) i przy skróconym czasie reakcji.



R = OMe (14) wydajność 83%

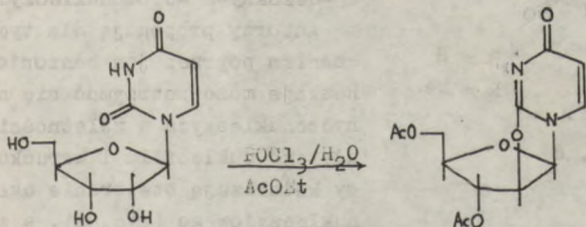
R = H (6) wydajność 88%

Ryc. 4

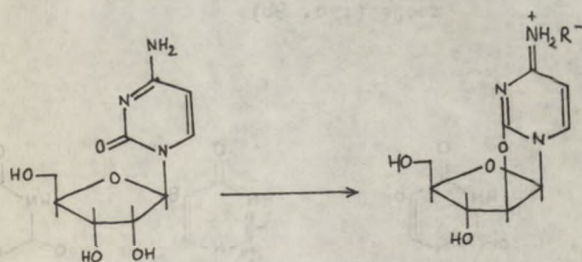


Ryc. 5

Tr = (C<sub>6</sub>H<sub>5</sub>)<sub>3</sub>C



(15)



Ryc. 6

R<sup>-</sup> = Cl<sup>-</sup>  
POCl<sub>3</sub>(H<sub>2</sub>O w AcOEt)

(16)

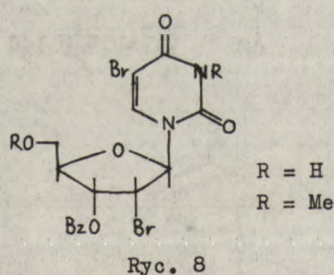
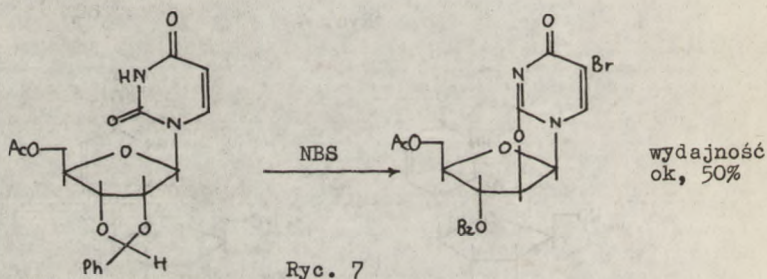
R<sup>-</sup> = HCO<sub>2</sub><sup>-</sup>  
SOCl<sub>2</sub>/DMF

(17)

Ogilvie i Iwacha (3) badali mechanizm cyklizacji z węglanem dwufenyłu i stwierdzili, że reakcja ta jest katalizowana zasadami (NaHCO<sub>3</sub>, Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>). Cykliczny 2', 3'-węglan urydyny nie tworzył anhydronukleozydu podczas ogrzewania w N, N-dwumetyloformamidzie w nieobecności zasad. Pochodne 3',5'-i 2', 5'-blokowane, np. 3', 5'-dwo-O-trytylourydyna, reagują prawdopodobnie poprzez węglan nukleozydowo-fenylowy (ryc. 5).

Innymi przykładami otrzymywania anhydronukleozydów mogą być reakcje otrzymywania pochodnych urydyny (15) i pochodnych cytydyny wg Ichino (15, 17) (ryc. 6).

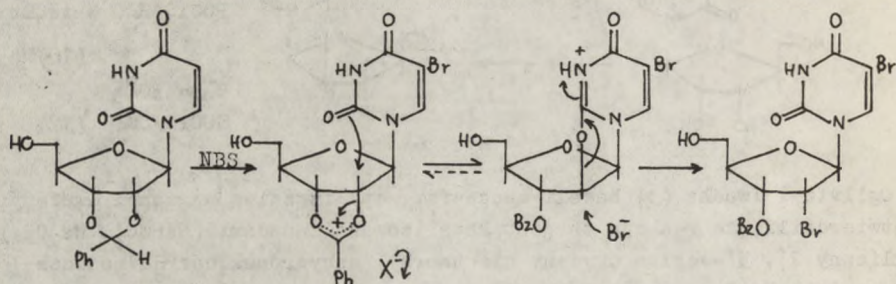
Ciekawe reakcje z wytworzeniem układu anhydronukleozydowego zachodzą pod wpływem N-bromo-5-sukcynimidu (NBS) (1,2,5). 5'-O-Acetylo-2', 3'-O-benzylidenourydyna z NBS w czterochlorku węgla i 1,1,2,2 - czterochloroetanem tworzy głównie 5'-O-acetylo-3'-O-benzoilo-5-bromo-2,2 - anhydrourydynę (ryc. 7).



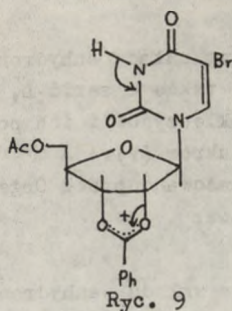
2',3'-O - Benzylidenourydyny podstawione w pozycji 5' innymi podstawnikami reagują w tych warunkach z wytworzeniem 2'-dezoksy-2'-bromonukleozydu (ryc. 8).

Autorzy proponują dla tych reakcji mechanizm poprzez jon benzoniowy (ryc. 9). Reakcja może zatrzymać się na etapie anhydronukleozydu w zależności od rodzaju użytego nukleofilu i warunków reakcji. Kwasy katalizują otwieranie układu anhydronukleozydowego (ryc. 9a), a zasady cyklizację (ryc. 9b).

a)

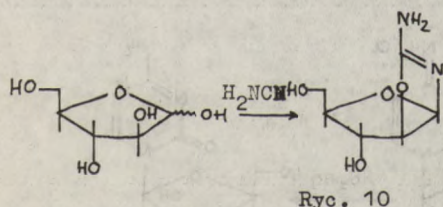


b)



## 2.2. Bezpośrednia synteza układu anhydronukleozydu z cukru i cyjanamidu

Sanchez i Orgel (7) stwierdzili, że aldopentozy takie jak ryboza, arabinoza, reagują z cyjanamidem w wodnym amoniakalnym roztworze z utworzeniem pochodnych aminooksazoliny (ryc. 10).

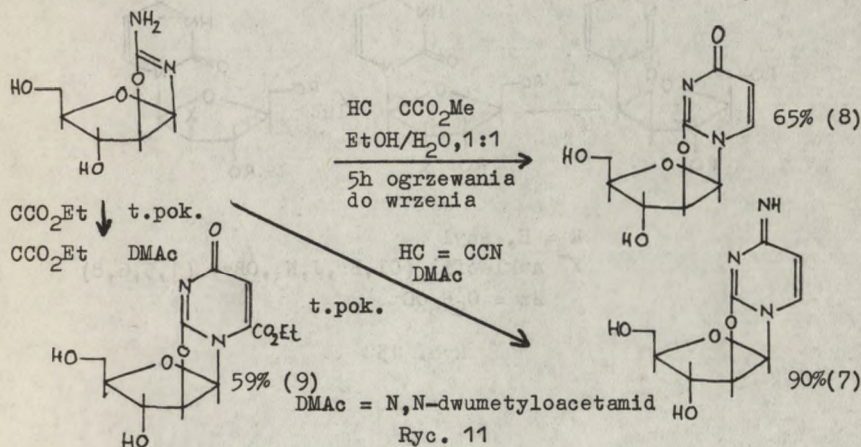


2-amino- $\beta$ -D-arabinofurano- $[1',2':4,5]$ -2-oksazolina

Pochodne te powstają z wysokimi wydajnościami powyżej 60% (69% - 72%) i łatwo można je wydzielić w czystej postaci krystalicznej ze środowiska reakcji.

A. Holy zmodyfikował warunki otrzymywania oksazoliny (8,18) i niezależnie zrobił to również Whetcher (19).

Pochodne oksazoliny poddaje się reakcji z pochodną acetylenową i otrzymuje się z wysoką wydajnością w postaci krystalicznej anhydrobukleozydy (7,8,9) (ryc. 11).



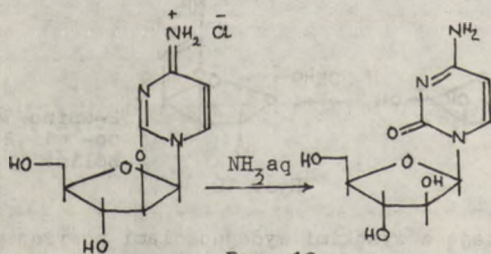
Metoda bezpośredniej syntezy układu anhydronukleozydowego może być stosowana do różnych aldopentoz, także z serii L, a więc umożliwia prostą i wydajną syntezę analogów L-nukleozydów i ich pochodnych. W reakcji mogą być również użyte fosforany cukrów (7).

Wydaje się, że reakcja opracowana przez Orgela i Sancheza znajdzie zastosowanie w chemii nukleozydów.

### 3. Otwieranie układu anhydronukleozydowego; zastosowania syntetyczne

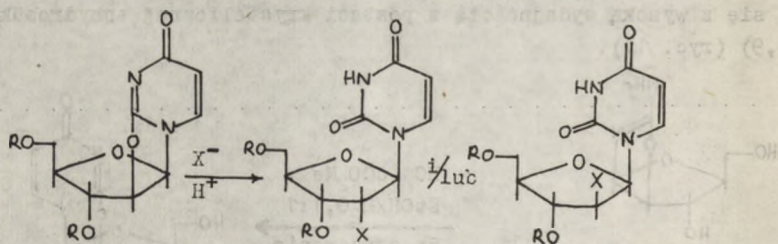
Anhydronukleozydy są ważnymi związkami przejściowymi w chemii nukleozydów. Przedstawiono kilka zastosowań tych związków w syntezie.

Fox i Miller stwierdzili, że reakcja nukleofilowego otwierania anhydronukleozydów jest katalizowana przez kwasy (6). Otwieranie układu w roztworze wodnym prowadzi do pochodnej arabinofuranozydu w przypadku 2,2'-andrynonukleozydów (7,16) (ryc. 12).



Ryc. 12

Użycie innych nukleofilów w rozpuszczalnikach aprotycznych faworyzujących atak nukleofilowy, wobec kwasów prowadzi do 2'-dezoxy-2'-podstawionych nukleozydów (ryc. 13) (1,5,6,8).



R = H, acyl

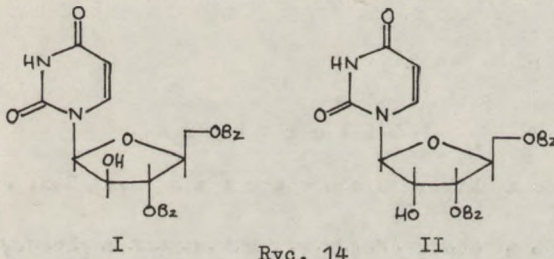
X<sup>-</sup> nukleofil (Cl, Br, J, N<sub>3</sub>, OBz) (1,5,6,8)

Bz = C<sub>6</sub>H<sub>5</sub>CO

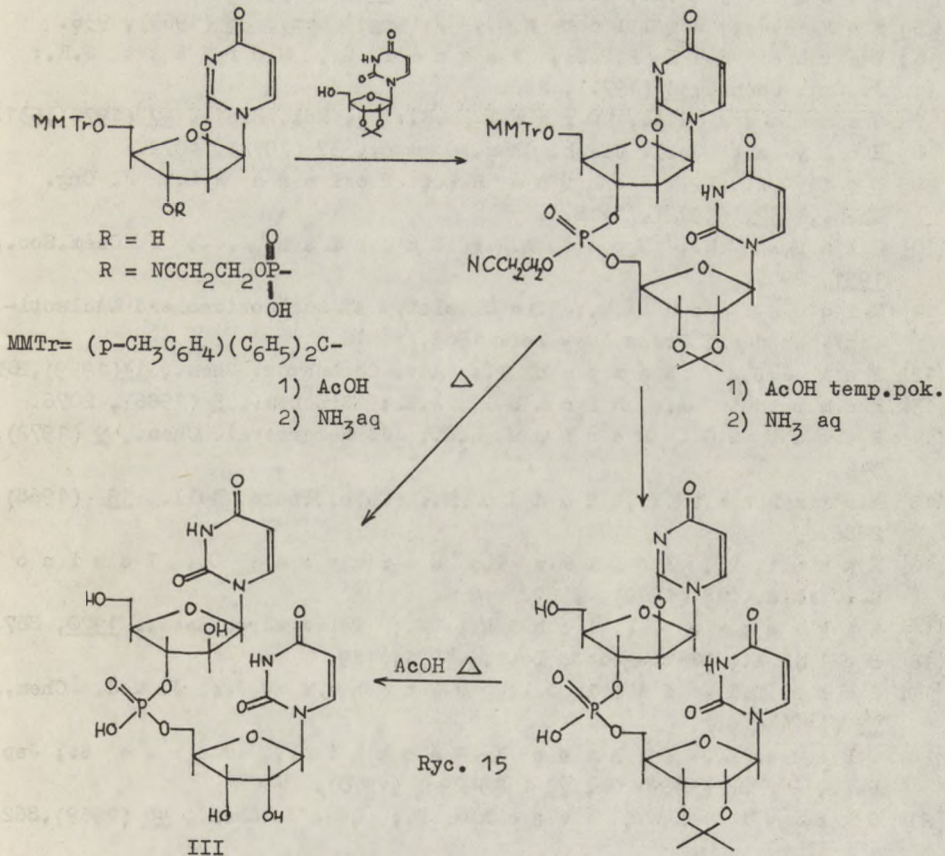
Ryc. 13

W ten sposób Fox (5) otrzymał z 2,2'-anhydro-3',5'-dwo-0-benzoilourydy-ny 2',3',5'-trój-0-benzoilourydyne z wydajnością ok. 79%.

Reakcję prowadzono w DMF z benzoianem sodu wobec kwasu benzoesowego. Z tego samego substratu, ale w serii L, Holy (8) otrzymał w DMF wobec jodku litowego i katalizatorów kwaśnych (kwas trójfluorooctowy w jednym przypadku i eterat trójfluorku boru w drugim) mieszaninę nukleozydów I i II (ryc. 14) z przewagą izomeru arabino (I).



Ryc. 14



Pochodne azydkowe po wodorowaniu tworzą odpowiednie dezoksyaminonukleozydy (6), a hydrogenoliza pochodnych halogenowych otrzymanych z otwarcia anhydronukleozydów prowadzi do dezoksynukleozydów. Holy otrzymał na tej drodze L-2'-dezoksyurydynę i L-2'-dezoksytydynę (8,19). Opracowano również wygodne syntezy 2'-dezoksyurydyny (2,20).

Anhydronukleozydy zastosowano również do syntezy dwunukleozydomonofosforanu (III) (21) (ryc. 15).

#### L i t e r a t u r a

- [1] Ponpipom M.M., Hanessian S.; *Can. J. Chem.* 50 (1972), 253.
- [2] Ponpipom M.M., Hanessian S.; *ibid.*, 246.
- [3] Ogilvie K.K., Iwacha D.O.; *Can. J. Chem.* 47 (1969), 495.
- [4] Winkley M.W.; *Carbohydr. Res.* 16 (1971), 462.
- [5] Fox J.J., Miller N.C.; *J. Org. Chem.*, 28 (1963), 936.
- [6] Verheyden I.P.H., Wagner D., Moffatt J.E.; *J. Org. Chem.*, 36 (1971), 250.
- [7] Sanchez R.A., Orgel L.E.; *J. Mol. Biol.*, 47 (1970), 531.
- [8] Holý A.; *Coll. Czech. Chem. Commun.*, 37 (1972), 4072.
- [9] Holý A.G.V., Robins R.K., Tolman R.L.; *J. Org. Chem.*, 37, (1972), 1418.
- [10] Clark V.M., Todd A.R.; Zussman J.J.; *J. Chem. Soc.*, 1951, 2952.
- [11] Michelson A.M.; "The Chemistry of Nucleosides and Nucleotides" Academic Press. New York 1963, p. 16.
- [12] Fox J.J., Wempfen I.; *Adv. Carbohydr. Chem.*, 14(1959), 283.
- [13] Hampton A., Nichol A.W.; *Biochem.*, 5 (1966), 2076.
- [14] Stout M.G., Robins R.K.; *J. Heterocycl. Chem.*, 9 (1972), 545.
- [15] Furukawa Y., Honjo M.; *Chem. Pharm. Bull.*, 16 (1968), 2286.
- [16] Kanai T., Kojima T., Maruyama O., Ichino M.; *ibid.*, 18 (1970), 2569.
- [17] Kikugawa K., Ichino M.; *Tetrahedron Lett.*, 1970, 867.
- [18] Holý A.; *Tetrahedron Lett.*, 1971, 189.
- [19] Gish D.T., Neil G.L., Wetcher W.J.; *J. Med. Chem.*, 15 (1971), 882.
- [20] Okada K., Ichino M., Araki Y., Furue S.; *Jap. Pat.*, 27 908 (1969) CA, 72: 79429 q (1970).
- [21] Ogilvie K.K., Iwacha D.; *Can. J. Chem.*, 48 (1969), 862.

Andrzej W. Sokalski, Henryk Chojnacki

## ODDZIAŁYWANIA 6-TIOGUANINY W DNA A MECHANIZM JEJ MUTAGENNEGO DZIAŁANIA

### Streszczenie

Stosując metodę perturbacyjną podano wyniki obliczeń energii oddziaływań międzycząsteczkowych dla normalnych par zasad komplementarnych oraz dla układu 6-tioguanina-cytozyna, wskazujące na istnienie silniejszych oddziaływań poziomych i słabszych pionowych w przypadku zastąpienia guaniny 6-tioguaniną. Na podstawie uzyskanych wyników mutagenne działanie 6-tioguaniny wbudowanej do DNA tłumaczy się hamowaniem procesów replikacji i w większym stopniu transkrypcji wynikającym z deficytu energetycznego w obrębie replikazy i transkryptazy.

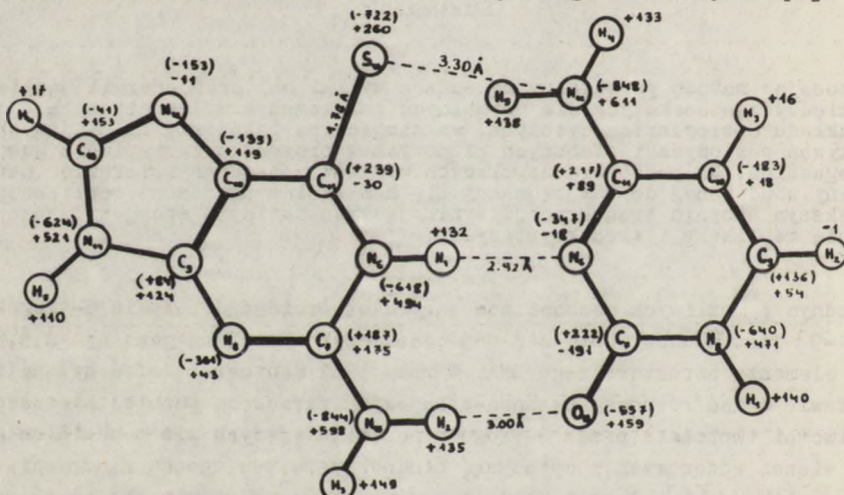
Jednym z możliwych mechanizmów antyrakotwórczego działania 6-tioguaniny [1-9] jest wbudowywanie się jej cząsteczek w miejsce guaniny [2,3,5-8], jako elementu strukturalnego DNA. W roku 1961 Mautner i Jaffé wysunęli na podstawie badań równowag kwasowo-zasadowych zarzuconą później hipotezę o możliwości tworzenia przez 6-tioguaninę, silniejszych niż z udziałem guaniny wiązań wodorowych z cytozyną, tłumaczącą w ten sposób zaburzenie procesu replikacji [4]. Bugg i Thewalt natomiast na podstawie badań krystalograficznych 6-tioguaniny, 6-tioguanozyny i guaniny sugerują, że mutagenne działanie 6-tioguaniny wbudowanej do kwasów nukleinowych polega jedynie na zwiększeniu długości wiązań wodorowych i zaburzeniu w ten sposób II rzędowej struktury, tak, że zmiany w oddziaływaniach pionowych odgrywają jedynie drugorzędą rolę [10-11]. Niekiedy przyjmuje się również [12-17] za Donohue [18] hipotezę o mniejszej energii wiązań wodorowych typu  $N-H \cdots S$  w porównaniu z krótszymi wiązaniami typu  $N-H \cdots O$  interpretując znane przypadki silniejszych oddziaływań siarkowych analogów zasad komplementarnych silniejszymi oddziaływaniami pionowymi [13,14].

W tym świetle interesujące wydawało się porównanie teoretycznych wartości energii oddziaływań w izolowanych układach par zasad komplementarnych guanina-cytozyna i 6-tioguanina-cytozyna oraz oddziaływań pionowych pomiędzy sąsiadującymi ze sobą zasadami purynowymi, zwłaszcza, że dla ostatniego układu brak jest odpowiednich informacji doświadczalnych. W przypadku gdyby nawet informacje takie były dostępne, prawdopodobnie trudno byłoby je jednoznacznie zinterpretować ze względu na ewentualną rolę rozpuszczalnika i nieznaną geometrii oddziałujących układów.

Obliczenia energii oddziaływań międzymolekularnych przeprowadzono przy pomocy rachunku zaburzeń II rzędu z półempiryczną parametryzacją



[19]. Odpowiednie wartości i wektory własne dla izolowanych zasad komplementarnych obliczono z uwzględnieniem wszystkich elektronów walencyjnych stosując metodę CNDO/2 [20]. W obliczeniach uwzględniono oddziaływania elektrostatyczne  $E^{(1)}$  oraz składową odpowiadającą procesowi międzycząsteczkowego przeniesienia ładunku (charge transfer)  $E^{(2)}$  pomijając, ze względu na duże rozmiary układów, wyraz oddziaływań wymiennych, a także znikome dla płaskich układów z wiązaniem wodorowym, oddziaływania dyspersyjne i polaryzacyjne [21-23]. W przeprowadzonym rachunku nie uwzględniono explicite orbitali wzbudzonych  $d$  dla atomu siarki, nie wnoszących prawdopodobnie istotnego udziału do całkowitej energii oddziaływań [24].

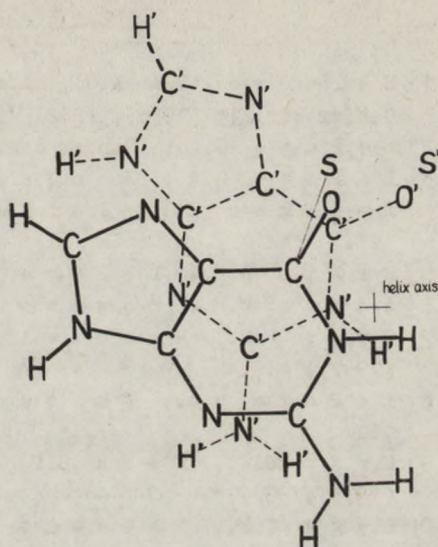


Ryc. 1. Geometria pary zasad komplementarnych 6-tioguanina-cytozyna [19] z rozkładem ładunku obliczonym metodą CNDO/2 dla izolowanych składników (w tysięcznych częściach ładunku protonu). Wielkości w nawiasach odnoszą się do elektronów  $\Pi$ , zaś liczby bez nawiasów do elektronów  $\sigma$ .

Dla układu 6-tioguanina-cytozyna (ryc.1) przyjęto geometrię analogiczną jak dla układu guanina-cytozyna w konfiguracji Watsona-Cricka [19], zmieniając jedynie położenie atomu siarki tak, by długość wiązania  $N-H \cdots S$  była równa  $3.30 \text{ \AA}$ , a długość wiązania  $C=S$  wynosiła  $1.78 \text{ \AA}$ . W parze guanina-cytozyna analogiczne odległości wynosiły odpowiednio  $2.90 \text{ \AA}$  i  $1.24 \text{ \AA}$ . Dla oszacowania roli oddziaływań pionowych pomiędzy sąsiadującymi kolejnymi zasadami purynowymi w B-DNA wykonano obliczenia dla układów guanina-guanina oraz 6-tioguanina-6-tioguanina (ryc. 2), oddalonych od siebie o  $3.38 \text{ \AA}$  i obróconych wokół osi spirali B-DNA o kąt  $36^\circ$  [25].

Wyniki przeprowadzonych w niniejszej pracy obliczeń (tabela 1) wskazują na istotną rolę oddziaływań poziomych w B-DNA, jakkolwiek w przypadku oddziaływań pionowych większą rolę powinny odgrywać nie uwzględnione w proponowanym modelu oddziaływania dyspersyjne i polaryzacyjne oraz trudny do określenia wpływ rozpuszczalnika. Wniosków tych nie należy jednakże uogólniać na inne układy bez uwzględnienia różnic w ich strukturze elek-

tronowej i geometrii. Istotnym wynikiem przeprowadzonych obliczeń jest otrzymanie największej energii oddziaływań dla pary zasad 6-tioguanina-cytozyna oraz znikomego udziału oddziaływań typu  $\pi - \pi$  dla płaskich układów z wiązaniem wodorowym [19]. Wnioskuje się zatem, że większa energia oddziaływań poziomych w układzie 6-tioguanina-cytozyna może hamować procesy replikacji i transkrypcji związane z rozrywaniem wiązań wodorowych. Decydujące znaczenie w tym wypadku może odgrywać wystąpienie deficytu energetycznego w obrębie replikazy, tak, iż energia uzyskana z przyłączenia nukleozydotrójfosforanu do nowo powstającego polinukleotydu może okazać się niewystarczająca do rozerwania silniejszych wiązań wodorowych pomiędzy 6-tioguaniną i cytozyną. Bardziej prawdopodobne wydaje się występowanie deficytu energii w procesie transkrypcji, gdzie w pojedynczym etapie konieczne jest rozerwanie dwóch grup wiązań wodorowych. Nie oznacza to jednak, że każde zastąpienie guaniny w DNA 6-tioguaniną prowadzi do mutacji letalnej. Hipoteza ta znajduje potwierdzenie w badaniach nieodpornych na działanie 6-tioguaniny szczepów komórek nowotworowych, dla których stwierdzono większą zawartość 6-tioguaniny w DNA w porównaniu ze szczepami odpornymi [28]. Mechanizm ten potwierdza również fakt hamowania przez 6-tioguaninę w większym stopniu syntezy RNA niż DNA [29].



Ryc. 2. Wzajemna orientacja sąsiadujących zasad purynowych w B-DNA [24] w obliczeniach oddziaływań pionowych

Tabela I  
Składowe energie oddziaływań międzycząsteczkowych w kcal mol<sup>-1</sup>

Układ	E(1)	E(2)			E(1) <sub>+</sub> E(2)	E <sub>exp</sub>
		G - G	$\pi - \pi$	G - $\pi$		
adenina-tymina 19	-1.29	-13.25	-0.0010	-	-14.54	-6.2*
guanina-cytozyna 19	-7.19	-13.74	-0.0007	-	-20.93	-10.75*
6-tioguanina-cytozyna	-9.34	-18.76	-0.0011	-	-28.11	-5.8**
guanina	+2.60	-0.159	-0.116	-0.258	+ 2,07	
6-tioguanina	+6.08	-0.166	-0.125	-0.290	+5,49	

\* IR, CHCl<sub>3</sub> [26]

\*\* NMR, DMSO [27]

## Literatura

- [1] Sartorelli A.C., LePage A.G., Moore E.C.; Cancer Res. 18 (1958), 1232.
- [2] LePage G.A.; Cancer Res. 21 (1960), 403.
- [3] LePage G.A., Jones M.; Cancer Res. 21 (1961), 1590.
- [4] Mautner H.G., Jaffe J.J.; Biochem. Pharmacol. 5(1961), 343.
- [5] Ellis D.D., LePage G.A.; Cancer Res. 23 (1963), 436.
- [6] Adams D.H., Bowman B.M.; Cancer Res. 23 (1963), 883.
- [7] Gray P.N., Rachmeler M.; Biochem. Biophys. Acta 138 (1967), 432.
- [8] LePage G.A., Whitecar J.P.; Cancer Res. 31(1971), 1627.
- [9] Kwan S.W., Kwan S.P., Mandel H.G.; Cancer Res. 33 (1973), 950.
- [10] Bugg C.E., Thewalt U.; J. Am. Chem. Soc. 92 (1970), 7441.
- [11] Thewalt U., Bugg C.E.; J. Am. Chem. Soc. 94 (1972), 8892.
- [12] Saenger W., Suck D.; J. Mol. Biol., 60 (1971), 87.
- [13] Scheit K.H., Faerber P.; Eur. J. Biochem., 24 (1971), 385.
- [14] Faerber P., Scheit K.H.; Sommer H.; Eur. J. Biochem., 27 (1972), 109.
- [15] Saenger W., Suck D.; Eur. J. Biochem. 32 (1973), 473.
- [16] Saenger W.; Angew. Chem. Int. Ed. 12 (1973), 591.
- [17] Bahr W., Faerber P., Scheit K.H.; Eur. J. Biochem. 33 (1973), 535.
- [18] Donohue J.; J. Mol. Biol. 45 (1969), 231.
- [19] Chojnacki H., Sokalski A.W.; J. Mol. Struct. 15 (1973), 263.
- [20] Pople J.A., Segal G.A.; J. Chem. Phys. 41 (1966), 3289.
- [21] Kollman P.A.; J. Am. Chem. Soc. 94 (1972), 1837.
- [22] Bertran J.; J. Theor. Biol. 34 (1972), 353.
- [23] Danilov V.I., Zheltovsky N.V., Kudritskaja Z.G.; Preprint ITP-73-109R, Kiev 1973.
- [24] Cuimon C., Gonbeau D., Pfister-Guillouzo G.; J. Mol. Struct. 16 (1973), 271.
- [25] Arnott S., Dover S.D., Wonacott A.J.; Acta Cryst. 25 (1969), 2192.
- [26] Kyogoku Y., Lord R.C., Rich A.; Biochim. Biophys. Acta 179 (1969), 10.
- [27] Newmark R.A., Cantor C.R.; J. Am. Chem. Soc. 90 (1968), 5010.
- [28] LePage G.A., Junga I.G.; Cancer Res. 23 (1963), 739.
- [29] Mandel H.G., Latimer R.G., Riis M.; Biochem. Pharmacol. 14 (1965), 661.

Piotr Górnicki

## CHARAKTERYSTYKA WYSOKOCIŚNIENIOWEJ CHROMATOGRAFII CIECZOWEJ (HPLC) JAKO METODY ROZDZIAŁU KWASÓW NUKLEINOWYCH

### Streszczenie

W referacie przedstawiono teoretyczne podstawy wysokociśnieniowej chromatografii ciekowej (HPLC) i praktyczne zastosowanie tej metody do rozdziału komponentów kwasów nukleinowych. HPLC pozwala na szybkie określenie składu jakościowego i ilościowego mieszanin zasad, nukleozydów, nukleotydów i polinukleotydów.

Pierwsza połowa lat 60-tych przyniosła rozwiązania teoretyczne, które stały się podstawą nowoczesnej chromatografii ciekowej. Zwrócono wówczas uwagę na możliwość zastosowania teorii chromatografii gazowej (GC) do chromatografii ciekowej (LC). Szczególnie silny rozwój praktycznych zastosowań HPLC przypada na lata 1969-1973 (w roku 1969 Kirkland zastosował wypełnienie typu Zipax, w 1970 - Kirkland i De Stefano (1) zastosowali fazy stacjonarne, chemicznie związane z podłożem). Współczesna LC jest metodą szybką, o wysokiej rozdzielczości i bardziej uniwersalną od GC.

W celu znalezienia optymalnych warunków procesu chromatograficznego, przeanalizowano procesy zachodzące w kolumnie i ustalono ich wpływ na wartość wysokości równoważnej półce teoretycznej -  $H$  (2,3). Zmniejszenie  $H$  wyraża zbliżenie się procesu do warunków równowagi, co daje zwężenie pików - poprawę rozdzielczości. W ujęciu teorii kinetycznej wartość wysokości równoważnej półce teoretycznej określa równanie:

$$H = \frac{B}{u} + \frac{1}{\frac{1}{A} + \frac{1}{C_m u}} + C_m' u + C_s u \quad (1)$$

gdzie:  $u$  - szybkość liniowa przepływu

$B, A, C_m, C_m', C_s$  - charakteryzują udział procesów zachodzących w różnych częściach kolumny:

- w swobodnie płynącej części fazy ruchomej
- w fazie stacjonarnej, która związana jest z podłożem lub sama jest podłożem
- w stojącej w miejscu części fazy ruchomej, która wypełnia wolne miejsca podłoża.

oraz na ich granicy.

1. Na skutek występowania w strumieniach płynącej cieczy gradientu stężenia, zachodzi dyfuzyjny ruch cząsteczek - zgodny i przeciwny z kierunkiem przepływu, powodujący obustronne rozmycie pasma. Dyfuzja osiowa zależy od szybkości przepływu - jej udział wzrasta z czasem pozostawiania substancji w kolumnie. Wyrażenie charakteryzujące ten proces:

$$B = 2 \gamma D_m \quad (2)$$

gdzie:  $D_m$  - współczynnik dyfuzji w fazie ruchomej

$\gamma$  - czynnik labiryntowy zależny od rozmiarów cząstek wypełnienia - rośnie do 1, gdy zwiększa się wielkość cząstek.

2. W związku ze zmiennością średnic torów przepływu, powstają lokalne obszary małej szybkości przepływu i wysokiego ciśnienia i odwrotnie. Jeżeli między tymi obszarami istnieją połączenia, zachodzi przepływ zmniejszający różnicę ciśnień - powodujący rozproszenie substancji i zachwianie równowagi. Wyrażenie charakteryzujące ten proces - dyfuzję wirową:

$$A = 2 \lambda d_p \quad (3)$$

gdzie:  $d_p$  - średnica cząstek

$\lambda$  - współczynnik charakteryzujący jednorodność wypełnienia (wzrasta ze wzrostem niejednorodności) - współczynnik ten wskazuje na znaczenie techniki pakowania kolumn.

3. Pomiedzy nie mieszającymi się strumieniami cieczy i poprzez kanały boczne zachodzi dyfuzja cząsteczek substancji. Powoduje ona zmniejszenie rozproszenia spowodowanego dyfuzją wirową i odwrotnie, dyfuzja wirowa przeciwdziała rozproszeniu substancji spowodowanemu dyfuzją poprzeczną. Procesy te są sprzężone. Wyrażenie charakteryzujące dyfuzję poprzeczną:

$$C_m = s \frac{d_p^2}{D_m} \quad (4)$$

gdzie:  $s$  - czynnik strukturalny opisujący różne drogi przepływu (stała doświadczalna).

4. Podczas przechodzenia pasma nad fragmentem fazy stacjonarnej zachodzi po stronie czołowej dyfuzja cząsteczek w głąb warstewki fazy stacjonarnej. Jest ona jednak stosunkowo powolna i powoduje powstanie gradientu stężenia uniemożliwiającego szybkie ustalenie się równowagi (w fazie ruchomej pozostaje więcej substancji niż wynikałoby to z warunków równowagi). Po przejściu pasma nad tym fragmentem fazy stacjonarnej zachodzi proces odwrotny. Cząsteczki nie dyfundują z wnętrza z szybkością zapewniającą zachowanie równowagi. Następuje obustronne rozmycie pasma. Wyrażenie charakteryzujące ten proces:

$$C_s = q \frac{k'}{(k'+1)^2} \frac{d^2}{D_s} \quad (5)$$

gdzie:  $q$  - czynnik opisujący fazę stacjonarną

$k'$  - współczynnik podziału

$d$  - grubość warstwy fazy stacjonarnej (w przypadku L-LC - grubość filmu cieczy, w L-SC głębokość porów, w chromatografii jonowymiennej grubość warstwy żywicy),

$D_s$  - współczynnik dyfuzji w fazie stacjonarnej,

Zależność ta daje ważne wskazówki dotyczące budowy cząstek wypełnienia - dobre wypełnienie musi charakteryzować się małą wartością  $d$  (dla cząstek o  $d_p > 20 \mu\text{m}$  stosuje się nieporowate kuleczki pokryte warstwą fazy stacjonarnej, dla cząstek o  $d_p < 20 \mu\text{m}$  kuleczki całkowicie porowate).

5. Podobnie zachodzi przenoszenie masy w nieruchomej części fazy ruchomej. Wyrażenie charakteryzujące ten proces:

$$C'_m = w \frac{d^2}{D_m} \quad (6)$$

gdzie  $w$  - współczynnik zależny od ilości zatrzymywanej fazy ruchomej.

Zestawienie wyrażeń charakteryzujących poszczególne procesy wskazuje na silną zależność  $H$  od  $d_p$  - zmniejszanie wielkości cząstek wypełnienia stało się głównym kierunkiem rozwoju LC. Dla danego typu kolumny  $H$  zależy tylko od liniowej szybkości przepływu i współczynnika podziału. Równanie (1) można zapisać (1):

$$H = Du^n \quad 0 < n < 1 \quad (7)$$

gdzie:  $n, D$  - charakteryzują daną kolumnę.

Korzystnie jest przedstawić powyższe zależności w parametrach zredukowanych (4):

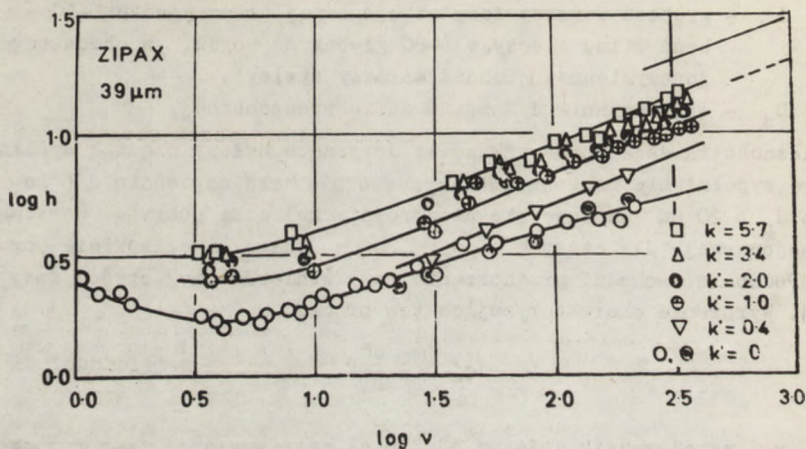
$$h = \frac{H}{d_p}; \quad v = \frac{udp}{D_m} \quad (8)$$

Zależność  $h$  od  $v$  przybiera postać:

$$h = \frac{2x}{v} + \frac{1}{\frac{1}{a} + \frac{1}{c'v^n}} + Cv \quad (9)$$

Część I reprezentuje dyfuzję osiową, część II odstępstwa od równowagi w fazie ruchomej, część III odstępstwa od równowagi pomiędzy fazą ruchomą a nieruchomą, w nieruchomej części fazy ruchomej, w fazie stacjonarnej. Okazało się, że dla kolumn różniących się tylko rozmiarem cząstek wypełnienia,  $h$  nie zależy od  $d_p$  (4). Doświadczalne potwierdzenie tego wniosku - otrzymanie bardzo zbliżonych wykresów zależności  $h$  od  $v$  ( $\log h$  od  $\log v$ ) - świadczy o dobrej technice pakowania kolumn (takie efekty uzyskano dla różnych frakcji Zipaxu).

Na podstawie wykresu (ryc. 1) można określić optymalną szybkość przepływu tzn. taką, dla której  $h = \min$ . Wzrost  $h$  przy małych szybkościach jest wynikiem wzrostu udziału dyfuzji osiowej. Zależność natomiast  $h$  od  $k'$  jest wynikiem różnego udziału procesów zachodzących w fazie stacjonarnej i ruchomej.



Ryc. 1. Wykres zależności  $\log h$  od  $\log v$  dla różnych wartości  $k'$  (4)

Spadek ciśnienia w kolumnie [4]:

$$\Delta p = \frac{u \varphi' \eta L}{d_p^2} = \frac{u \eta L}{K^0} \quad (10)$$

gdzie:  $\eta$  - lepkość cieczy

$L$  - długość kolumny

$K^0$  - przepuszczalność

$\varphi'$  - stała oporu przepływu - zależna od porowatości materiału, od kształtu cząstek, szerokości frakcji i jednorodności wypełnienia. Opór przepływu również wpływa na wydajność kolumny - cząstki sferyczne o wąskiej frakcji wykazujące małą wartość  $\varphi'$  (dużą wartość  $K^0$ ) dają najlepsze efekty (4,5).

- WNIOSKI: 1. Zasadniczy wpływ na wydajność kolumny ma wielkość cząstek wypełnienia.
2. Proces musi być prowadzony przy pewnej optymalnej szybkości przepływu (szybkość przepływu wpływa z jednej strony na wydajność kolumny, z drugiej na czas analizy). Ponieważ  $u \sim \Delta p d_p^2$  (równ. 4), to stosowanie cząstek o małych średnicach wymaga stosowania odpowiednio wysokich ciśnień.
3. Znaczny wpływ na wydajność kolumny posiada budowa cząstek i jednorodność wypełnienia.
4. Temperatura wpływa na wydajność kolumny na skutek zmiany stałej dyfuzji, lepkości cieczy i współczynnika podziału wraz ze zmianą temperatury (w HPLC stosuje się zwykle temp. 5-60°C).

W celu scharakteryzowania wydajności kolumny z uwzględnieniem wszystkich wyżej wymienionych parametrów wprowadzono tzw. współczynnik wydajności ("Performance Factor") (5):

$$P.F. = (K\eta/0,5) \frac{1-n}{2} / D; \quad K = \frac{uL}{\Delta P} \quad (11)$$

Wielkością, która charakteryzuje rozdzielczość i szybkość analizy (można ją określić na podstawie chromatogramu) jest liczba efektywnych półek teoretycznych na sekundę -  $N_{ef}/\text{sek.}$

$$N_{ef} = N \left( \frac{k'}{k'+1} \right)^2 \quad (12)$$

gdzie  $N$  - liczba półek teoretycznych.

Aktualny stan techniki przedstawiają ryc.2 i tabl.I. Stosowane w HPLC kolumny charakteryzują się wydajnością porównywalną z kolumnami GC (5). Ekstrapolacja danych doświadczalnych w kierunku małych cząstek pozwala przewidzieć dla  $d_p = 2,5 \mu\text{m}$  ok. 100  $N_{ef}/\text{sek.}$  Wymagać to będzie jednak zastosowania ciśnień rzędu 15 000 psi (ok. 1000 at) (6).

Tablica I (5)

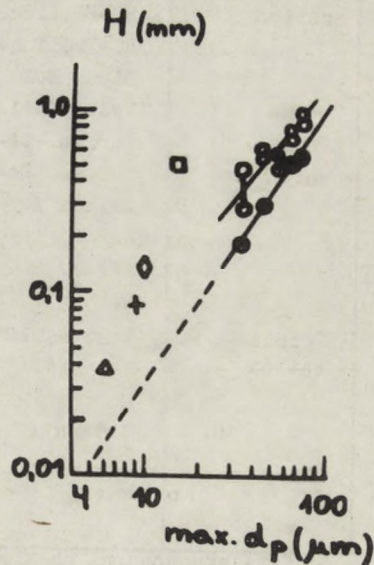
Typ kolumny	$d_p (\mu\text{m})$	$k'$	$N_{ef}/\text{sek.}$	P.F.
Zipax 2,1 mm*	< 37	2,3	10	37
Zipax 7,9 mm*	< 37	3,3	16	82
Silica gel	5-10	11	11	28
Kieselguhr	5-10	3,5	-	16
Porous silica microspheres	8-9	10	14	126
Porous silica microspheres	5-6	11	23	170

\*zob. objaśnienia do ryc. 2 i str. 152.

Ryc. 2. Wpływ średnicy cząstek wypełnienia ( $d_p$ ) na wysokość równoważną półce teoretycznej ( $H$ ) (5):

- - CSP(forma Zipaxu), kolumna o średnicy 2,1 mm, pakowana na sucho - „ręczne stukanie” (Hand Tap). Wzrost rozrzutu otrzymanych wartości wskazuje na niemożliwość zastosowania tej techniki pakowania dla małych cząstek.
- - CSP kolumna 7,9 mm pakowana na sucho. Kolumna o średnicy 7,9 mm - tzw. kolumna o nieokreślonej średnicy - działa w ten sposób, że cząsteczki substancji nigdy nie osiągną ścianek. Ponieważ wypełnienie jest najbardziej niejednorodne w pobliżu ścianek, to kolumny takie wykazują większą wydajność.
- ◇ - Silica gel - pakowany w postaci zawiesiny (Balanced-Density Slurry Packed).
- - Kieselguhr - pakowany na sucho
- +△ - Porous Silica Microspheres - pakowane w postaci zawiesiny (Stabilized Slurry-Packed).

Linia przerywana wskazuje wartości  $H$  jakie będzie można uzyskać przez poprawę techniki pakowania kolumn.





W badaniach komponentów kwasów nukleinowych stosuje się głównie chromatografię jonowymienną. Do rozdzielania oligo- i polinukleotydów można zastosować filtrację żelową (7):

#### Wypełnienie

Tablica II przedstawia przegląd wypełnień stosowanych w jonowymiennej HPLC. Można je podzielić na dwie grupy:

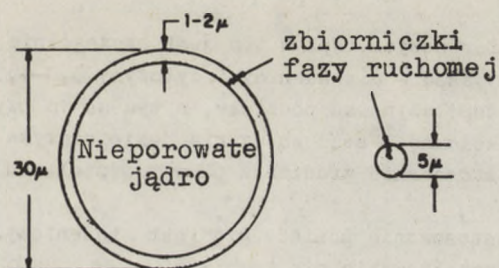
- tzw. powierzchniowo porowate o średnicy 25-50  $\mu\text{m}$ . Nieporowate kuleczki szklane pokryte są porowatą warstwą krzemionki o grubości około 1  $\mu\text{m}$  i polimerem-jonitem np. Zipax, WAX, SAX i SCX. Stosuje się również fazy o charakterze jonitu związane chemicznie z podłożem (wiązanie Si-O-Si) (9) np. Zipax AAX. Wypełnienia te charakteryzują się małą pojemnością. Łatwo dają się pakować na sucho.
- tzw. całkowicie porowate o średnicy 5-20  $\mu\text{m}$ , charakteryzujące się większą pojemnością lecz wymagające pakowania na mokro.

Tablica II (8)

Wypełnienie stosowane w jonowymiennej HPLC

Typ	Nazwa	Grupa funkc.	$\bar{d}_p$ ( $\mu\text{m}$ )	Pojemność ( $\mu$ równ/g)
Pellicular anion	"Pellicular anion"	-NR <sub>4</sub> <sup>+</sup>	40	10
	AS-Pellionex-SAX	-NR <sub>4</sub> <sup>+</sup>	44-53	10
	Zipax AAX*	-NR <sub>4</sub> <sup>+</sup>	25-37	12
	Zipax WAX	-NH <sub>2</sub>	25-37	12
	Vydac Anion Exch.*	-NR <sub>4</sub> <sup>+</sup>	30-44	100
Pellicular cation	"Pellicular Cation"	-SO <sub>3</sub> H	40	10
	HS-Pellionex-SCX	-SO <sub>3</sub> H	44-53	8-10
	HC-Pellionex SCX	-SO <sub>3</sub> H	44-53	60
	Zipax SCX	-SO <sub>3</sub> H	25-37	3,2
	Vydac Cation Exch.*	-SO <sub>3</sub> H	30-44	100
Porous anion	Durrum DA-X4	-NR <sub>4</sub> <sup>+</sup>	25±5	2000
	DA-X2	-NR <sub>4</sub> <sup>+</sup>	20±5	2000
	Aminex A A14	-NR <sub>4</sub> <sup>+</sup>	17-23	3400
	A25		17,5±2	3200
	A27		12-15	3200
	A28		7-11	3200
Porous cation	Durrum DC 1A	-SO <sub>3</sub> H	18±3	5000
	2A		12±3	
	4A		8±2	
	Aminex A A4	-SO <sub>3</sub> H	13±2	5000
	A5		17,5±2	
	A6		17,5±2	
	A7		7-11	

\* faza stacjonarna chemicznie związana



Cząstki porowate    Cząstki całkowicie  
powierzchniowo      porowate

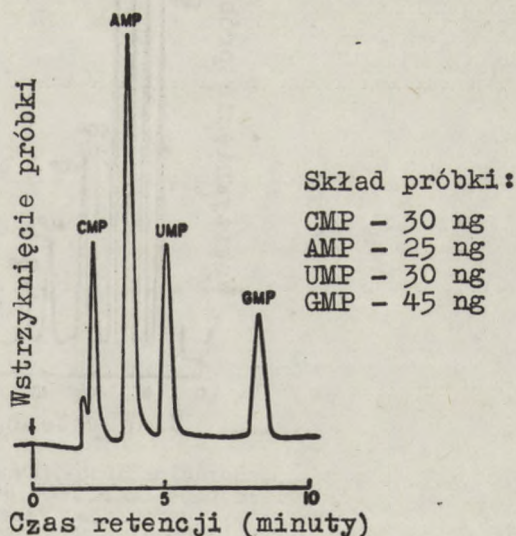
Ryc. 3. Budowa cząstek wypełnienia

### Detektory

W badaniach omawianej grupy związków stosuje się detektory UV przy długości fali 254 nm (najczęściej) lub 280 nm. Czułość ich pozwala na wykrycie związku w ilości rzędu 1 pmola (1-10 ng) (10) - ryc. 3.

Przy rozwiązywaniu praktycznych zagadnień, ważnym problemem jest określenie parametrów zapewniających z jednej strony dobrą rozdzielczość, z drugiej - krótki czas analizy. W tym celu (obok rozwiązań omówionych w pierwszej części) stosuje się programowanie prędkości przepływu eluentu oraz jego własności - siły jonowej i pH.

1. Zmiany szybkości przepływu (programowanie przepływu) stosuje się w przypadku dużych różnic czasów retencji. Odpowiednie zwiększenie szybkości po wymyciu pierwszego związku powoduje szybsze wymycie drugiego, przy zachowaniu dobrej rozdzielczości. Zgodnie z prze-



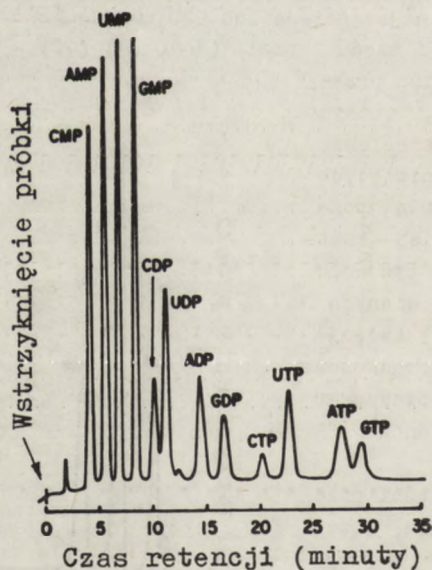
Ryc. 4. Wykrywalność 5' nukleotydów. Detektor UV 254 nm, czułość 0.01 AUFS (10)

widywaniami, wzrost szybkości przepływu powoduje jednak zmniejszenie wydajności kolumny (równ. 1 i 9, ryc. 1).

2. Stężenie jonów wodorowych wywiera znaczny wpływ na ładunek efektywnej cząsteczki, wpływając z jednej strony na protonację zasad; z drugiej na

desocjację grup fosforanowych. Wpływ ten jest szczególnie silny w zakresie zbliżonym do pK zasad - dla adeniny i cytozyny 3,0-4,5 (10). Zmiany pH powodują zmiany współczynnika podziału, a tym samym szybkości wędrowania związków przez kolumnę - stąd znaczenie jakie odgrywa określenie optymalnego pH lub zastosowanie gradientu pH w rozdzielaniu złożonych mieszanin.

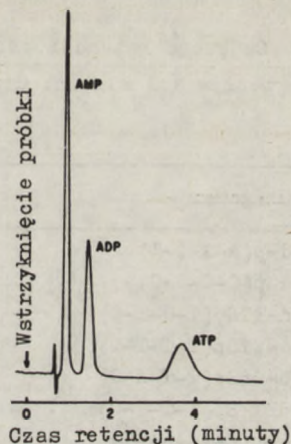
3. Największe zastosowanie posiada gradient stężeniowy. Siła jonowa eluentu wpływa na kształtowanie się równowagi na jonicie - wpływa na współczynnik podziału. Zastosowanie gradientu o odpowiednim kształcie pozwala na uzyskanie optymalnych wyników rozdzielania. Zmiany kształtu gradientu w jednej części chromatogramu prowadzi do zwiększenia rozdzielczości, w innej do skrócenia czasu analizy. Stosowana w HPLC aparatura pozwala na różnorodne programowanie stężenia - najczęściej stosuje się gradient liniowy, ewentualnie o zmieniającym się kącie nachylenia, oraz gradient wykładniczy (11).



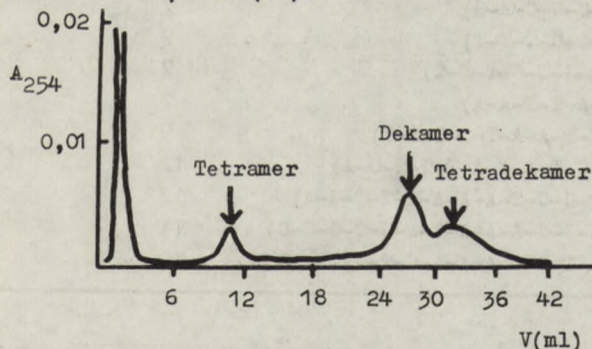
Ryc. 5. Rozdział mono-, dwu- i trójfosforanów. Kolumna - Permaphase AAX. Temp. otoczenia. Próbkę - 5 ul roztw. mieszaniny fosforanów. Faza ruchoma - gradient wykładniczy 0,002M  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  (pH 3) do 0,5M  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ . Ciśnienie 1200 psi, przepływ 1 ml/min. Detektor UV, czułość 0,08AUFS (10)

Ryc. 5 przedstawia chromatogram otrzymany przy zastosowaniu gradientu wykładniczego (stężeniowego) przy pH równym 3,0. Najkrótsze czasy retencji mają pochodne adeniny i cytozyny, co jest wynikiem silniejszej protonacji części zasadowych, natomiast dwu- i trójfosforany posiadają większe ładunki ujemne i dłuższe czasy retencji w porównaniu z odpowiednimi monofosforanami. Porównanie tego chromatogramu z ryc. 6 pozwala w pewnym stopniu ocenić znaczenie optymalizacji.

Zastosowanie jonowymiennej HPLC pozwala na rozdzielanie zasad (oraz ich pochodnych), nukleozydów, nukleotydów i oligonukleotydów na anionitach lub kationitach. W pracach nad syntezą dłuższych łańcuchów szczególne znaczenie ma rozdzielanie oligomerów. Tablica III przedstawia objętości retencji dla różnych oligonukleotydów i ich pochodnych. Rozdzielenie zachodzi ze względu na długość łańcucha, skład zasad i obecność grup blokujących. Ryc. 7 przedstawia chromatogram mieszaniny otrzymanej podczas syntezy tetradekameru z dekameru i tetrameru. Zastosowanie HPLC pozwala na śledzenie kierunków i postępów reakcji. Przewiduje się również, że zastosowanie kolumn o dużej średnicy pozwoli na otrzymanie oligomerów w ilości 10-100  $\mu\text{moli}$  (12).



Ryc. 6. Rozdział AMP, ADP, ATP. Faza ruchoma 0,25 M  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ . Ciśnienie 1500 psi. Przepływ 1,5 ml/min. Pozostałe warunki - ryc. 4 (10)



Ryc. 7. Rozdział mieszaniny otrzymanej podczas syntezy tetradekameru. Kolumna Zipax WAX, 1,2 mm x 50 cm. Temp. 50°C. Faza ruchoma gradient liniowy 0,001M-1M  $\text{K}_2\text{SO}_4$  pH 4,4, (12)

Do rozdziału nukleozydów zastosowano wypełnienia całkowicie porowate o małej średnicy - Aminex A7. Uzyskane wyniki (krótki czas analizy i dobry rozdział) są zgodne z przewidywaniami - ryc. 8 (13).

Interpretacja chromatogramów dostarcza informacji na temat składu jakościowego (porównanie czasów retencji) i ilościowego (metody analogiczne jak w GC). Zastosowanie integratorów pozwala na szybkie i dokładne określenie składu molowego mieszanin. Wyniki takiej analizy dla różnych mieszanin wzorcowych przedstawia tablica IV. Badania tą metodą polinukleotydów wymagają około 1  $\mu\text{mola}$  związku, który poddaje się hydrolizie i oznacza skład zasad chromatograficznie - dokładność rzędu 2% (14).

Tablica III (12)

Objętość retencji oligonukleotydów. Kolumna 1,2x500 mm. Zipax  
WAX. Przepływ 1,1 ml/min. Gradient liniowy 0,001 do 1 M  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  pH 4,4

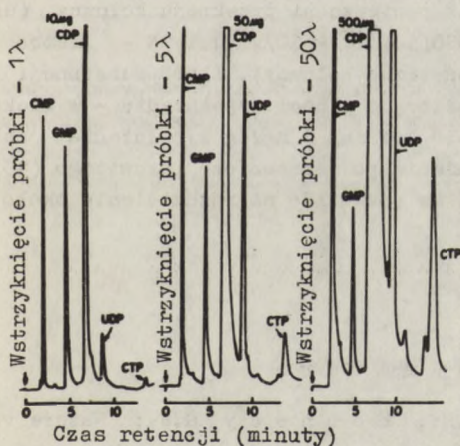
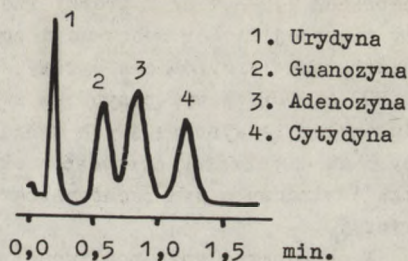
Temp. 50°C

Oligomer	dł. łańcucha	objętość retencji
d-p(A-A-T-T)	4	8,7 ml
d-p(C-G-G-C)	4	9,9 "
d-ETSp(T-G-T-C)	4	10,3 "
d-ETSp(T-T-T-T)	4	11,1 "
d-EtSp(T-T-A-G)	4	11,9 "
dET Sp(T-T-T-C)	4	12,8 "
d-p(C-A-A-A-T)	5	10,2 "
d-p(C-T-G-T-C)	5	10,7 "
d-EtSp(C-T-G-T-C)	5	11,3 "
d-p(T-G-A-A-T-T)	6	14,4 "
d-EtSp(T-T-A-G-C-A)	6	15,0 "
d-EtSp(T-T-A-A-T-C)	6	15,3 "
d-p(G-C-C-G-C-A-G)	7	15,2 "
d-p(T-G-T-C-T-T-T)	7	17,9 "
d-EtSP(T-G-T-C-T-T-T)	7	20,1 "
d-p(G-G-A-T-T-A-A)	7	19,9 "
d-EtSp(T-T-A-A-T-C-C-A-T)	9	19,5 "
d-p(T-G-C-T-A-A-A-T-T-T-G-A)	12	25,7 "
d-EtSp(T-G-C-T-A-A-A-T-T-T-G-A)	12	28,2 "
d-EtSp(A-G-G-A-A-A-C-T-G-C-G-G-C)	14	32,1 "
d-EtSp(A-T-G-G-A-A-A-C-T-G)	10	26,1 "

Tablica IV (14)

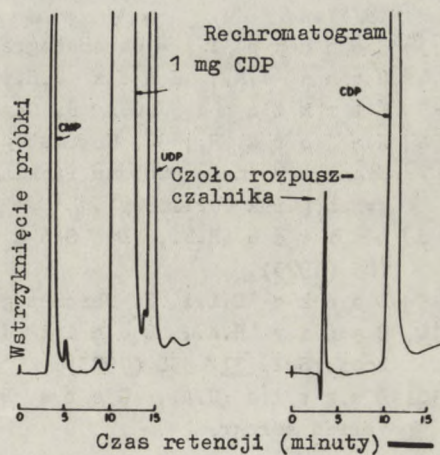
Oligomer	Molowy skład % - znaleziony				Molowy skład % - teoretyczny			
	d-pT	d-pA	d-pC	d-pG	d-pT	d-pA	d-pC	d-pG
A <sub>3</sub> ,T <sub>3</sub>	50,9	49,2	-	-	50,0	50,0	-	-
A <sub>4</sub> ,G <sub>2</sub> ,C <sub>2</sub>	-	49,8	24,8	25,3	-	50,0	25,0	25,0
A <sub>3</sub> ,T <sub>4</sub> ,C <sub>2</sub>	45,2	31,5	23,3	-	44,4	33,3	22,2	-
A,T <sub>5</sub> ,C <sub>2</sub> ,G	55,3	12,8	21,6	10,3	55,6	11,1	22,2	11,1
A <sub>4</sub> ,T <sub>5</sub> ,C,G <sub>2</sub>	41,7	33,3	8,9	16,2	41,7	33,3	8,3	16,7
A <sub>6</sub> ,T <sub>2</sub> ,C <sub>2</sub> ,G <sub>2</sub>	17,8	49,2	17,0	15,8	16,7	50,0	16,7	16,7

Ryc. 8. Rozdział nukleozydów.  
Kolumna Aminex A7, 25cmx2,4mm.  
Temp. 55°C, faza ruchoma 0,4M  
HCOONH<sub>4</sub> pH4,75. Ciśnienie  
4.800 psi, przepływ 80 ml/godz.  
(13)



Ryc. 9. Kolumna Permaphase  
AAX, 1mx2,1mm. Temp. otocze-  
nia. Faza ruchoma - gra-  
dient liniowy 0,005 M  
KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (pH 3,0) do 0,5 M  
KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>. Ciśnienie 1200 psi,  
przepływ 1 ml/min (10)

Ryc. 10. Kolumna Permap-  
hase AAX 1mx3mm. Tempe-  
ratura otoczenia. Ci-  
śnienie 900 psi, prze-  
pływ 1,5 ml/min. Faza  
ruchoma jak ryc.9 (10)



Dla celów analitycznych stosuje się zwykle kolumny o średnicy wewnętrznej 1,2-2,1 mm i próbki rzędu kilku  $\mu$  gramów. Wprowadzenie do kolumny większej ilości substancji powoduje znaczne rozszerzenie pików. Ryc. 8 przedstawia trzy chromatogramy, w których główny pik reprezentuje 10,50 i 500  $\mu$ g GDP. W tym przypadku zwiększenie ilości próbki zastosowano w celu wykrycia występujących zanieczyszczeń. Zastosowanie kolumny o średnicy 3 mm pozwala otrzymać około 1 mg czystego chromatograficznie związku (świadczy o tym rechromatogram 1/2 ilości otrzymanej frakcji) (10) - ryc. 10.

W celu określenia możliwości zastosowania HPLC na skalę preparatywną przebadano (16) kolumny o średnicy wewnętrznej 7,7 mm do 23,6 mm (50 cm długości, wypełnienie Permaphase ODS 10-40  $\mu$ m). Liczba pól teoretycznych wzrasta ze wzrostem średnicy kolumny przy objętościowej szybkości przepływu proporcjonalnej do pola powierzchni przekroju kolumny (ustalono doświadczalną zależność  $N = 500(id)^{1/2} - 107$ , gdzie N - liczba pól teoretycznych, id - średnica wewnętrzna kolumny). Ilość substancji jaką można rozdzielić jest proporcjonalna do ilości wypełnienia - w większości przypadków przyjmuje się pojemność kolumny 1 mg/lg wypełnienia całkowite porowatego i 0,1 mg/g wypełnienie powierzchniowo porowatego (15). Zastosowanie kolumny o średnicy 23 mm pozwoliło na rozdzielenie około 1 g mieszaniny (16).

#### L i t e r a t u r a

- [1] Done J.N., Knox J.H., Kennedy G.J.; Nature vol 237 no 5350 (1972).
- [2] Ashby J.D.; Wprowadzenie do wysokociśnieniowej chromatografii cieczej (konferencja zorganizowana przy Fye Unicam, W-wa 26.03. 1973).
- [3] Schupp III - Chromatografia gazowa - PWN, W-wa 1972.
- [4] Done J.N., Knox J.H.; J. Chromatogr. Sci, 10 606 (1972).
- [5] Kirkland J.J.; J. Chromatogr. Sci 10 593 (1972).
- [6] Major R.; J. Chromatogr. Sci. 11 88 (1973).
- [7] High Performance Column Packings Liquid Chromatography" Varian Aerograph (druk reklamowy).
- [8] Leitch R.E., DeStefano J.J.; J. Chromatogr. Sci. 11 105 (1973).
- [9] Locke D.L.; J. Chromatogr. Sci. 11 120 (1973).
- [10] Henry R.A., Schitt J.A., Williams R.C.; J. Chromatogr. Sci. 11 358 (1973).
- [11] Burtis C.A., Gere D.R.; Nucleic Acid Constituents by 2C Varian Aerogr.

- [12] Thomas, Gabriel F., Michalewsky E.; J. Chromatogr. 80 263 (1973).
- [13] Varian Aerograph Series 4100/4200 Liquid Chromatographs.
- [14] Thomas, Gabriel F., Michalewsky E.; J. Chromatogr. 67 309 (1972).
- [15] Baker D.R., Henry R.A., Williams R.C., Hudson D.R.; J. Chromatogr. 83 233 (1973).
- [16] Wolf III J.P.; Anal. Chem. 45 1248 (1973).



1921  
1922  
1923  
1924  
1925  
1926  
1927  
1928  
1929  
1930  
1931  
1932  
1933  
1934  
1935  
1936  
1937  
1938  
1939  
1940  
1941  
1942  
1943  
1944  
1945  
1946  
1947  
1948  
1949  
1950  
1951  
1952  
1953  
1954  
1955  
1956  
1957  
1958  
1959  
1960  
1961  
1962  
1963  
1964  
1965  
1966  
1967  
1968  
1969  
1970  
1971  
1972  
1973  
1974  
1975  
1976  
1977  
1978  
1979  
1980  
1981  
1982  
1983  
1984  
1985  
1986  
1987  
1988  
1989  
1990  
1991  
1992  
1993  
1994  
1995  
1996  
1997  
1998  
1999  
2000  
2001  
2002  
2003  
2004  
2005  
2006  
2007  
2008  
2009  
2010  
2011  
2012  
2013  
2014  
2015  
2016  
2017  
2018  
2019  
2020  
2021  
2022  
2023  
2024  
2025

## ZASTOSOWANIA STAŁYCH NOŚNIKÓW I CHROMATOGRAFII POWINOWACTWA W BIOCHEMII

### Streszczenie

#### 1. Przygotowanie i własność stałych nośników

- nośniki do kowalentnego wiązania enzymów i chromatografii powinowactwa
- nośniki dla celów syntezy na podłożach polimerowych
  - podłoża polimerowe do syntezy peptydów
  - podłoża polimerowe do syntezy oligonukleotydów
  - podłoża polimerowe do syntezy oligosacharydów

#### 2. Zastosowanie stałych nośników

- uwagi ogólne
- reakcje enzymatyczne na stałych nośnikach
  - metody immobilizacji enzymów
  - przykłady zastosowań
- chromatografia powinowactwa
  - charakterystyka metody i przykłady zastosowań
  - zastosowania chromatografii powinowactwa i specyficznej elucji substratowej do oczyszczania amino-acylo-tRNA-syntetaz
  - zastosowania chromatografii powinowactwa i metod zbliżonych do rozdzielania kwasów nukleinowych i ich pochodnych
- synteza i degradacja na stałych nośnikach
  - synteza peptydów
  - synteza oligonukleotydów
  - synteza oligosacharydów
  - degradacja peptydów
  - degradacja nukleotydów
- zastosowania stałych nośników do izolacji specyficznych transferowych tRNA.

W artykule tym omówimy niektóre zastosowania podłoży polimerowych w biochemii, w szczególności do oczyszczania makrocząsteczek biologicznych metodami chromatografii powinowactwa. Dość szeroko potraktowane zostanie także zagadnienie przygotowania odpowiednich polimerów zawierających aktywne grupy funkcyjne. Taki wybór problematyki podyktowany został bezpośrednio związkiem tych problemów z prowadzonymi przez nas pracami eksperymentalnymi. Wobec istnienia szeregu doskonałych prac przeglądowych, nie mamy natomiast ambicji pełnego omówienia całości problematyki zastosowań stałych nośników i chromatografii powinowactwa (Silman 1966; Melrose 1971; Goldstein 1969; Cuatrecasas 1971, 1971a, 1972; Katchalski 1971; Porter 1962; Katchalski 1970; Friedberg 1972; Epton 1971; Mosbach 1971; Szewczuk 1973; Stewart 1969; Rony 1972; Felb 1972; Serafinowski 1971; Feinstein 1971).

## W s t ę p

Znaczną część procesów chemicznych w laboratorium oraz reakcji biochemicznych *in vitro* prowadzi się w fazie homogennej. Fakt ten tłumaczyć należy m.in. tym, że w warunkach homogennej kinetyka procesów jest na ogół prostsza, są one łatwiejsze do przeprowadzenia w sposób powtarzalny, do kontroli i regulacji parametrów. Przeciwnie, w naturze, a w szczególności w żywej komórce wiele reakcji związanych jest z granicą faz ciało stałe - ciecz lub ciało stałe - ciało stałe. Np. większość enzymów w komórkach znajduje się na powierzchni ciała stałego. Są one przyłączone do międzyfazy, w postaci ścian komórkowych lub błon jądrowych i innych. Izolacja takich enzymów wiąże się więc ze sztucznym przeniesieniem ich do roztworu.

Procesy na granicy faz, podczas gdy jeden z substratów jest związany z ciałem stałym, mają wiele ważnych zalet w porównaniu z warunkami homogennymi, co zaczęto ostatnio szeroko wykorzystywać w biochemii. Między innymi łatwo jest oddzielić produkt od substratu, można precyzyjnie kontrolować warunki mikrootoczenia, zmieniając w ten sposób kierunki i parametry przebiegających reakcji. Dzięki zagęszczeniu reagentów w monomolekularnych warstwach międzyfazowych oraz wpływowi mikrośrodowiska, wiele reakcji ulega przyspieszeniu, co równa się dodatkowemu efektowi katalitycznemu. Od dawna wykorzystuje się te zjawiska w katalizie heterogennej. Nie nowe jest też zastosowanie procesów międzyfazowych w chromatografii i wymianie jonowej. Dzięki rozwojowi technik syntezy i modyfikacji polimerów, w celu wprowadzenia odpowiednich aktywnych grup funkcyjnych, opracowano w ostatnich latach metody przyłączania białek, kwasów nukleinowych, koenzymów i innych substratów do podłoża w postaci nierozpuszczalnych naturalnych polisacharydów lub polimerów syntetycznych np., agarozy, dekstranu, poliakryloamidu. W ten sposób rozwinęła się z jednej strony technika wykorzystania enzymów na stałym podłożu, z drugiej strony technika tzw. chromatografii powinowactwa, w której te same enzymy, substraty enzymów lub ich inhibitory, kwasy nukleinowe lub inne aktywne w specyficznych oddziaływaniach cząsteczki przyłączone do stałego nośnika wykorzystuje się do selektywnego zaadsorbowania z roztworu oddziaływujących z nimi cząsteczek biologicznych i innych. W wyniku tego rozwinęła się dalej technika przygotowania stałych podłoży (zwanym w j.angielskim *solid support*, *insoluble carrier*), któremu to zagadnieniu poświęcimy pierwszą część naszego przeglądu. Osobne zagadnienie stanowi technika syntezy biopolimerów na stałych nośnikach, zapoczątkowane pionierskimi pracami Merrifielda nad syntezą peptydów, a następnie zastosowana do oligonukleotydów, a nawet oligosacharydów.

## 1. PRZYGOTOWANIE I WŁASNOŚCI STAŁYCH NOŚNIKÓW

Największe znaczenie mają obecnie nośniki umożliwiające wiązanie substratów przy pomocy wiązań kowalentnych, i te zostaną omówione poniżej. Inne grupy nośników, znajdujące ograniczone zastosowanie do unieruchamiania enzymów, scharakteryzowane będą w podrozdziale drugim.

### Nośniki wiążące kowalentnie do celów chromatografii powinowactwa i unieruchamiania (immobilizacji) enzymów

Kowalentne związanie różnych substratów ze stałą matrycą (nośnikiem) możliwe jest zazwyczaj przy pomocy grup aminowych, hydroksylowych, sulfhydrylowych lub karboksylowych substratu. Substrat często zawiera odpowiednie reaktywne grupy funkcyjne, których zaangażowanie w wiązanie kowalentne nie zmienia jego aktywności w interesujących nas oddziaływaniach. W przeciwnym przypadku konieczne jest wprowadzenie takich grup. Np. enzymy i inne białka przyłącza się do matrycy przy pomocy końcowych grup aminowych lub grup aminowych lizyny, grup imidazolowych histydyny, guanidylowych argininy, a także grup karboksylowych kwasu glutaminowego i asparaginowego. Również stosuje się grupy fenolowe tyrozyny oraz sulfhydrylowe cysteiny.

Grupy aktywne podłoża muszą odpowiadać grupom funkcyjnym substratu, z którym chcemy przeprowadzić reakcję. Mimo że ilość różnych reakcji sprzężenia substratów z podłożem jest bardzo duża, aktywne grupy matrycy można za Falbem (1972) podzielić na następujące 3 kategorie:

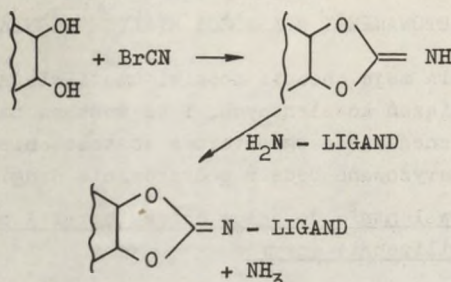
1) Grupy reagujące z nukleofilami - należą tu zaktywowane grupy karbonylowe (chlorki kwasowe, azydki kwasowe, bezwodniki kwasowe, estry aktywne, grupy karbonylowe zaktywowane karbodwuimidami lub odczynnikami Woodwarda), zaktywowane pierścienie aromatyczne, takie jak pochodne dwunitrochlorofenylowe, izocyjaniany, izotiocyjaniany, cykliczne iminowęglany i pochodne dwuchlorotriazyny.

2) Grupy nukleofilowe. Najczęściej grupy aminowe lub hydroksylowe i sulfhydrylowe.

3) Sole dwuazoniowe. Stałe matryce, zwane też podłożami lub nośnikami, powinny spełniać następujące warunki:

- minimalne niespecyficzne oddziaływanie z substratem,
- dobre własności przepływowe, w przypadku stosowania w upakowanym złożu,
- stabilność chemiczna i mechaniczna w warunkach sprzężenia i dalszego stosowania,
- duża porowatość i małe usieciowanie, pozwalające na niezakłócony wpływ i wpływ makrocząsteczek,
- równomierna granulacja, kształt najlepiej sferyczny i sztywność mechaniczna,
- właściwy stopień rozwinięcia powierzchni aktywnej.

Koszt i dostępność matrycy jest również nie bez znaczenia. Bardzo ważna jest możliwość łatwego tworzenia odpowiednich pochodnych aktywnych.



Ryc. 1. Sprzęganie ligandów zawierających grupy aminowe z iminowęglanowymi estrami polimerów hydroksylowych

Spośród polimerów naturalnych jako matryce najczęściej stosowano modyfikowane pochodne celulozy (karboksymetylo-, bromoacetylo-, dwuetyloaminoetylo-, dwuazobenzyl-, izocyjaniano-), pochodne agarozy i skrobi oraz dekstranu. Do polimerów syntetycznych należą modyfikowane żywice styrenowe, akrylowe i silikonowe, niekiedy poliaminokwasy. Rzadziej stosuje się takie materiały jak szkło, krzemionka, sole nieorganiczne.

W opinii Cuatrecasasa, jednego z twórców omawianych metod, usieciowany dekstran o nazwie handlowej Sephadex (Pharmacia AB), a szczególnie perełkowana agaroz - Sepharose (Pharmacia AB) są najlepszymi materiałami do syntezy różnorodnych matryc o pożądanym właściwościach. Do aktywacji agarozy i innych polisacharydów najczęściej stosuje się metodę bromocyjanową, opracowaną przez Poratha (1967). Aktywacja polega na poddaniu polisacharydu reakcji z bromocyjanem, w temperaturze pokojowej, w środowisku wodnym, w pH=11 (ryc.1). Otrzymany nośnik natychmiast używa się do reakcji z odpowiednim ligandem, który musi zawierać grupy aminowe pierwszorzędowe, alifatyczne lub aromatyczne.

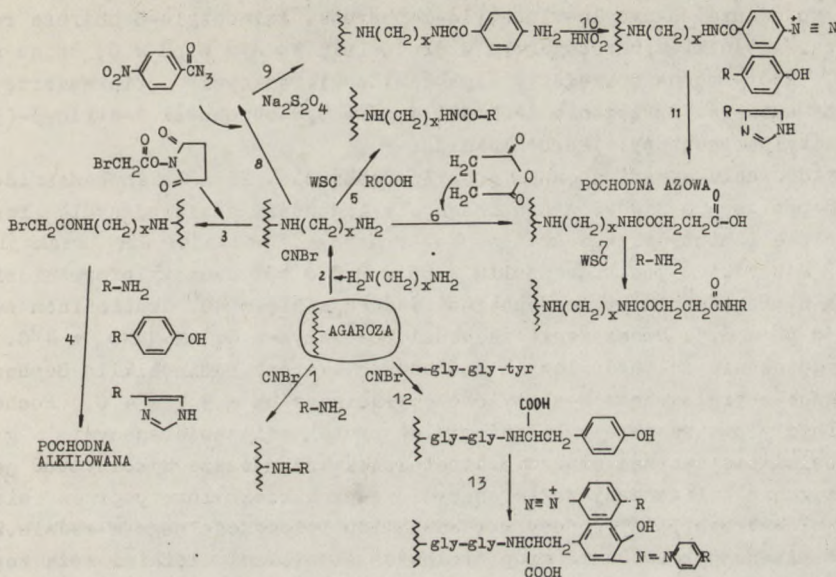
Cuatrecasas w swej podstawowej pracy (1970) opisał szereg metod modyfikowania agarozy, polegających na:

- przyłączaniu ligandów poprzez alifatyczny łańcuch węglowy, co pozwala na odsunięcie ich od stałego nośnika na określoną odległość,
- przyłączanie kowalencyjne ligandów zawierających grupy aminowe, karboksylowe, fenolowe lub imidazolowe,
- przygotowanie adsorbentów, w których ligand przyłączony jest wiązaniami podatnymi na rozerwanie specyficznymi metodami chemicznymi. Adasorbenty takie umożliwiają odłączanie nienaruszonego kompleksu ligand - substrat od podłoża.

Metody te przedstawiono schematycznie na ryc. 2.

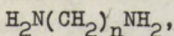
Dla wszystkich metod podstawowa jest reakcja agarozy (najczęściej jako produkt handlowy Sepharose 4B, Pharmacia AB) z bromocyjanem (ryc.1). Otrzymany iminowęglanowy ester Sepharose może być następnie, w zależności od potrzeb, poddany następującym reakcjom:

- z enzymami, koenzymami, substratami zawierającymi grupy aminowe, według Poratha (1967). Dobra się pH reakcji w zależności od pK<sub>a</sub> sprzężonej grupy aminowej, pamiętając, że reaguje grupa nieprotonizowana,
- z alifatycznymi dwuaminami, jak np. etylenodwuaminą, w celu otrzymania pochodnych omega - aminoalkilowych. Te pochodne można stosować do przy-



Ryc. 2. Preparatyka pochodnych agarozy nadających się do przygotowywania biospecyficznych adsorbentów

łączenia innych ligandów, grup funkcyjnych lub białek, w określonej odległości od podłoża, w zależności od rodzaju użytej aminy typu



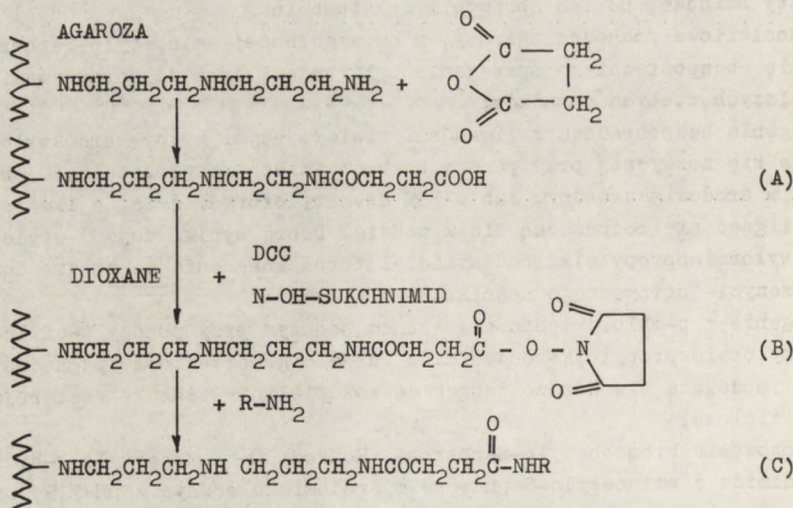
- z peptydami zawierającymi końcówką tyrozyne, np. Gly-Gly-Tyr. W ten sposób otrzymaną Sepharose zawierającą reszty tyrozytowe używa się do sprzęgania przez wiązanie azowe z ligandami zawierającymi aromatyczne reszty aminowe, po ich uprzednim dwuazowaniu.

Aminoalkilowe pochodne agarozy, w szczególności aminoetylo-Sepharose używa się bezpośredniego sprzęgania z ligandami oraz do otrzymywania szeregu dalszych stałych nośników:

- sprzęganie bezpośrednie z ligandami zawierającymi grupy karboksylowe wykonuje się zazwyczaj przy pomocy karbodwuimidów rozpuszczalnych w wodzie, w środowisku wodnym lub w 50% dwumetyloformamidzie, o ile sprzęgany ligand nie rozpuszcza się w wodzie. Dobre wyniki daje 1-etylo-3-(3-dwumetyloaminopropyl)karbodwuimid. Istotne znaczenie ma bardzo dokładne przemycie otrzymanego nośnika.
- sprzęganie z p-chlorortęciobenzoesanem sodowym przy pomocy 1-etylo-2-(3-dwumetyloaminopropyl)karbodwuimidu daje organortęciową pochodną agarozy, nadającą się bardzo dobrze do rozdzielania białek zawierających grupy tiolowe,
- przygotowanie bromoacetylo-Sepharose. Reakcja O-bromoacetylo-N-hydroksysukcynimidu z aminoetylo-Sepharose w środowisku wodnym w pH=7,5 prowadzi do otrzymania reaktywnego nośnika, nadającego się do sprzęgania z wieloma typami ligandów, zawierających grupy aminowe, fenolowe i imidazolowe,

- Przygotowanie sukcyloaminoetylo-Sepharose. Aminoetylo-Sepharose reaguje z bezwodnikiem bursztynowym w środowisku wodnym w pH = 6, dając nośnik, który można sprzęgać z ligandami zawierającymi pierwszorzędowe grupy aminowe. Sprzężanie zachodzi w pH = 5 w obecności 1-etylo-3-(3-dwumetyloaminopropyl)karbodwuimidu.
- Przygotowanie -p-aminobenzamidoetylo-Sepharose. Para -aminobenzamidoetylo-Sepharose po zdwuazowaniu reaguje z ligandami zawierającymi reszty fenolowe i histydylowe. Aminoetylo-Sepharose poddaje się reakcji z 0,07 M azydkiem p-nitrobenzoilu w pH = 9,3 w 40% dwumetyloformamidzie. Para nitrobenzamidoetylo-Sepharose redukuje się w 40° dwutinionem sodowym w pH = 8,5. Dwuazowanie zachodzi pod wpływem 0,1 M NaNO<sub>2</sub> w 4°C.
- Przygotowanie sulfhydrylowych pochodnych agarozy. Aminoalkilo Sepharose reaguje z tiolaktonem N-acetylohomocysteiny w pH = 9,7 w 4°C. Pochodna sulfhydrylowa reaguje z lifandami lub proteinami zawierającymi grupy haloalkilowe tworząc wiązania tioeterowe. Można także wykorzystać ją do sprzężania z ligandami zawierającymi grupy karboksylowe poprzez wiązania tioestrowe, przy pomocy karbodwuimidu rozpuszczalnego w wodzie. Również własność reagowania grup tiolowych z metalami ciężkimi może zostać wykorzystana w chromatografii powinowactwa.

Niektóre z opisanych wyżej pochodnych agarozy umożliwiają chemiczne oderwanie ligandu wraz ze związanym substratem, co czasami konieczne jest w celu uniknięcia denaturacji substratu podczas wymywania w ekstremalnych warunkach pH i stężenia soli. Pochodne azowe mogą być poddane redukcji ditioninem sodu w pH = 8,5. Pochodne kwasów karboksylowych można hydrolizować w pH = 14,5 w 4°C. W podobnych warunkach rozerwaniu ulegają tioestry. Tioestry można też rozkładać działaniem hydroksyloaminy w pH = 7.



Ryc. 3. Schemat reakcji prowadzących do otrzymania N-hydroksysukcynimidowych pochodnych agarozy

W oparciu o opisane powyżej sukcyńlowe pochodne agarozy przygotować można nośnik o charakterze estru aktywnego, nadający się do sprzęgania z proteinami i innymi ligandami zawierającymi wolne grupy aminowe, w bardzo łagodnych warunkach, w środowisku wodnym.

Sukcyńlowaną 3,3'-dwuaminodwupropyloamino agarozę przygotowuje się przez reakcję 3,3'-dwuaminodwupropyloaminy z agarozą aktywowaną bromocyjanem, a następnie reakcję powstałej 3,3'-dwuamino-dwupropyloamino-agarozy z bezwodnikiem bursztynowym. Z kolei przeprowadza się kondensację sukcyńlowanej 3,3'-dwuaminodwupropyloamino-agarozy z N-hydroksysukcynimidem w bezwodnym dioksanie, w obecności N,N'-dwucykloheksylokarbodwuimidu. Powstały ester aktywny reaguje z wolnymi grupami aminowymi w pH = 6-9, w środowisku wodnym. Aktywne pochodne mogą być przechowywane w stanie suchym po usunięciu dioksanu (Cuatrecasas, 1972a). Dostępne są również handlowe odmiany modyfikowanej Sepharose, a mianowicie:

- AH-Sepharose 4B, otrzymana przez dołączenie do Sepharose 4B 1,6-dwuaminoheksanu, metodą bromocyjanową,
- CH-Sepharose 4B, otrzymana przez dołączenie do Sepharose 4B kwasu 6-a-minoheksanowego.

Wytwórnia (Pharmacia AB) poleca sprzęganie przy użyciu 1-etylo-3-(3-dwumetyloaminopropyl)karbodwuimidu. W przypadku Sepharose korzystne może być przygotowanie aktywnego estru z N-hydroksysukcynimidem.

Pochodne agarozy opisane powyżej, przygotowane przez Cuatrecasas znajdują rosnące zastosowanie do chromatografii powinowactwa oraz immobilizacji enzymów. Dają one możliwość wiązania w większości typowych ligandów. Mimo to nadal stosuje się inne, dawniej opracowane, metody wiązania i typy polimerów. Polimery zawierające grupy karboksylowe, np. CM-Celuloza, CM-Sephadex, kopolimery akryloamidu z kwasem akrylowym, mogą bezpośrednio przyłączać ligandy zawierające grupy aminowe, pod wpływem rozpuszczalnych w wodzie karbodwuimidów, np. 1-etylo-3-(3-dwumetyloaminopropyl)karbodwuimidu lub 1-cykloheksylo-3-(2-morfolinoetylo)karbodwuimidu (Mosbach, 1970 i in.). Te same polimery karboksylowe mogą służyć do otrzymywania hydrazydów, które po przekształceniu w azydy pod wpływem kwasu azotawego, reagują z grupami aminowymi ligandów. W ten sposób wykorzystano CM-Celulozę, Bio-Gel CM, kolagen i inne (Mitz, 1961; Inman, 1969; Julliard, 1971).

Do przyłączania ligandów zawierających aktywne reszty aromatyczne stosowano często polimery dwuazowane. Pochodne aminoetylowe nośników karboksylowych mogą być poddawane reakcji z chlorkiem p-nitrobenzoilu. Powstała pochodna nitrowa po redukcji podsiarczynem sodowym może być dwuazowana (Avremeas 1969). Reakcja celulozy z 1,2-epoksy-3-(p-nitrofenoksy) propa-nem pozwala na otrzymanie pochodnych p-nitrowych, które po redukcji dają się dwuazować (Baker, 1968). Ze skrobi utlenionej nadjodanem oraz p,p'-dwuaminodwufenylometanu można otrzymać metylenodwuanailinioskrobię również nadającą się do sprzęgania z ligandami po dwuazowaniu (Goldstein, 1970). Polistyren po nitrowaniu, redukcji i dwuazowaniu bywał też używany do wiązania enzymów (Grubhofer, 1954; Filippuson, 1970).

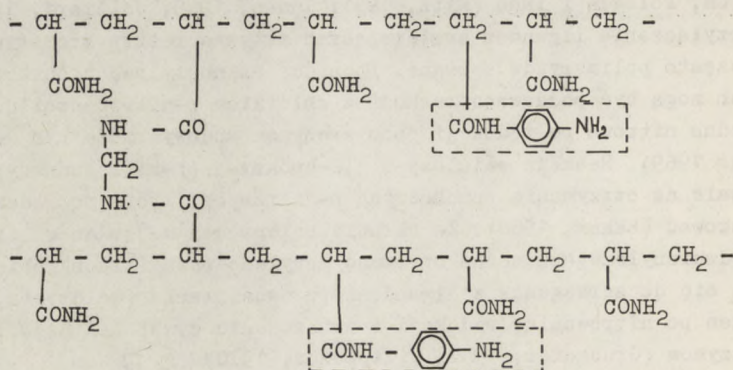


Pochodne p-aminofenyłowe mogą służyć do otrzymania w reakcji z tiofosgenem izotiocyanianów, reagujących łatwo z grupami aminowymi. W ten sposób otrzymano bardzo aktywne pochodne kopolimerów akrylowych oraz dekstranu (Manecke, 1967; Patel; 1969). Z grupami aminowymi reagują także proste pochodne halogenoacetylowe celulozy (Sato, 1971). Celuloza i dekstran w różnych postaciach i inne polisacharydy oraz DEAE-celuloza były niekiedy modyfikowane przy pomocy 2,4-dwuchloro-6-karboxymetyloamino-s-triazyny, 2,4,6-trójchloro-triazyny lub 2-amino-4,6-dwuchloro-s-triazyny. Takie pochodne triazynowe reagują z grupami aminowymi ligandów (Sharp, 1969; Neill, 1971; Surinov, 1966; Kay, 1967; Wilson, 1969).

Z wieloma polimerami, np. agarozą, dekstranem, celulozą wiąże się często ligandy bezpośrednio opisaną wyżej metodą bromocyjanową. Niemodyfikowane polisacharydy mogą reagować z niektórymi komponentami kwasów nukleinowych w pirydynie w obecności karbodwuimidu (patrz dalej).

Pośród polimerów syntetycznych największe zastosowanie znajdują pochodne akryloamidu, jednak mniejsza porowatość od pochodnych agarozy i dekstranu czyni je w wielu przypadkach mniej użytecznymi (Cuatrecasas, 1970; Inman, 1969). Żele poliakryloamidowe mogą przyłączać dużo większą ilość ligandu niż polimery naturalne, nie zawsze jednak cała jego ilość jest biologicznie aktywna ze względu na niedostępność dla dużych makrocząstek (Cuatrecasas, 1970; Inman, 1969). Żele poliakryloamidowe mogą przyłączać dużo większą ilość ligandu niż polimery naturalne, nie zawsze jednak cała jego ilość jest biologicznie aktywna ze względu na niedostępność dla dużych makrocząstek (Cuatrecasas, 1971).

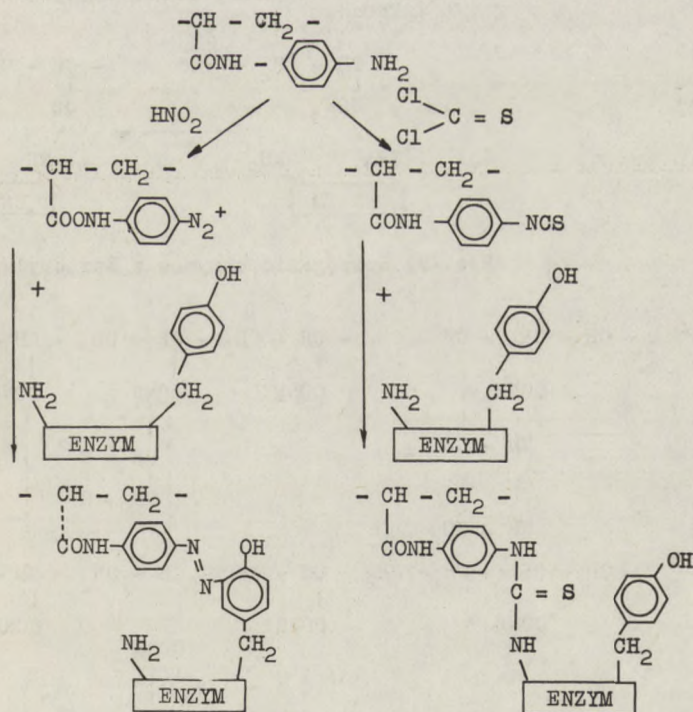
Szereg pochodnych poliakryloamidu dostępne jest pod nazwą firmową Enzacryl - Koch-Light Labs. (Epton, 1971). Enzacryl to kopolimer akryloamidu, N,N'-metylenowduakryloamidu oraz odpowiednio podstawionego akryloamidu, który dostarcza aktywnych grup funkcyjnych. Taki polimer charakteryzuje się minimalną adsorpcją fizyczną. Proporcja grup aktywnych dobrana jest tak, aby ligand związany był na bardzo dużej powierzchni. Duże rozdrobnienie zapewnia odpowiednią powierzchnię właściwą. Enzacryl AA (ryc. 4) zawiera aromatyczne grupy aminowe. Mogą one być aktywowane przez dwuazowanie. W warunkach dwuazowania grupy amidowe polimeru nie reagują.



Ryc. 4. Struktura polimeru Enzacryl AA

Grupa dwuazowa podczas sprzęgnięcia z polipetydami reaguje głównie z grupami fenolowymi tyrozyny, a także w pewnym stopniu z pierścieniem imidazowym histydyny i indolowym tryptofanu. Enzacryl AA można także aktywować tiosfogenem. W wyniku tego procesu powstają grupy izotiocyanianowe, reagujące z pierwszorzędowymi grupami aminowymi łańcucha bocznego lizyny, wiążąc polipeptyd poprzez wiązanie tiomocznikowe. Można tymi metodami wiązać także inne ligandy o aktywnym pierścieniu aromatycznym lub zawierające pierwszorzędowe grupy amidowe (ryc. 5). W celu uniknięcia zbytnej hydrofobizacji nośnika nie produkuje się Enzacrylu AA o dużej proporcji grup aktywnych.

Enzacryl AH (ryc. 6) zawiera grupy hydrazynu kwasowego. Może on być aktywowany działaniem kwasu azotowego, który przekształca hydrazyn kwasowy w azyd kwasowy. Grupy azydowe nadają się do sprzęgnięcia z ligandami zawierającymi wolne grupy aminowe (ryc. 7). Polimer ten jest silnie hydrofilowy. Pod tym względem przypomina azyd CM-celulozy, nośnik od dawna wypróbowany w wiązaniu enzymów.

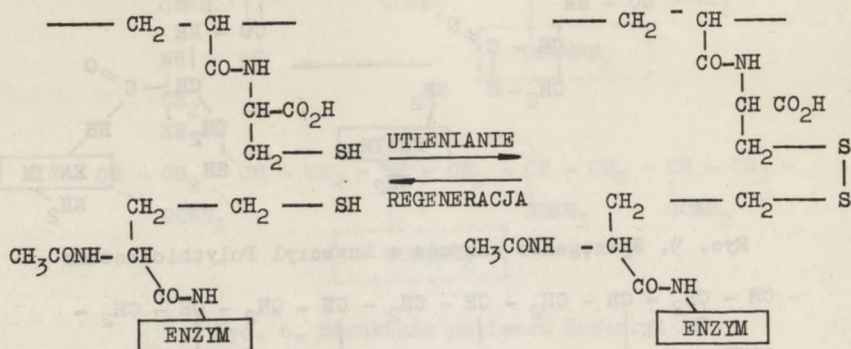


Ryc. 5. Sprzęgnięcie enzymów z Enzacryl AA

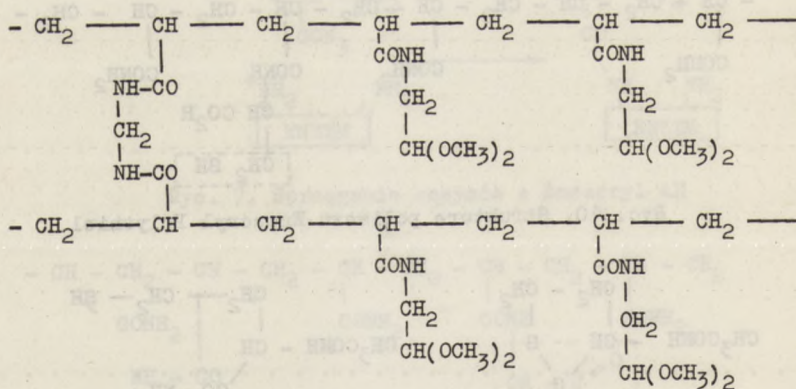
Enzacryl Polytiolactone (ryc. 8). zawiera pierścień tiolaktonowy, który bezpośrednio bez uprzedniej aktywacji może wiązać ligandy zawierające wolne grupy aminowe i hydroksylowe, np. przypadku polipeptydów - lizynę, serynę, tyrozynę (ryc. 9).





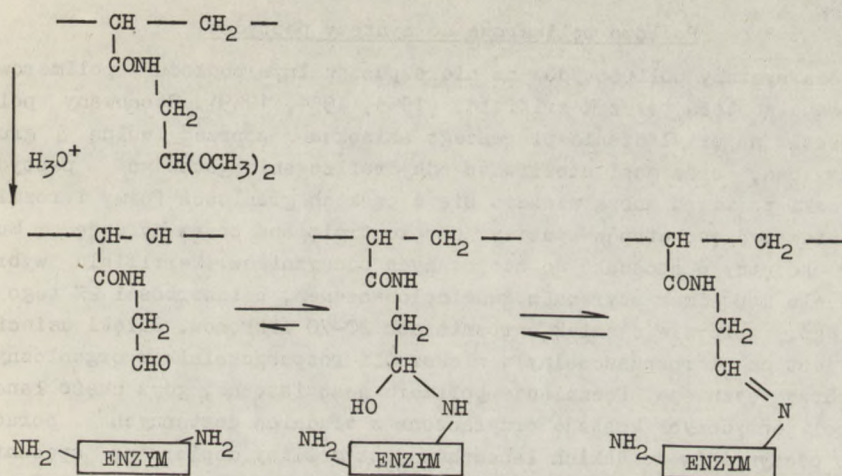


Ryc. 12. Odwracalne sprzężenie enzymów z Enzacyrl Polythiol



Ryc. 13. Struktura Enzacyrl Polyacetal

Prócz naturalnych i syntetycznych nośników o charakterze polimerów organicznych do wiązania różnych ligandów stosowano także szkło. Zaletą takich podłoży jest niewrażliwość na atak mikroorganizmów, odporność na działanie rozpuszczalników organicznych oraz brak wpływu pH i składu buforu na konformację powierzchni nośnika. Poważnym problemem jest jednak niespecyficzna adsorpcja na powierzchni szkła oraz niedostateczna porowatość, nie pozwalająca na przenikanie większych makrocząsteczek. Pewne trud-



Ryc. 14. Aktywacja i sprzężanie enzymów z Enzacyl Polyacetal

ności związane są też z małymi przepływami przez kolumny wypełnione perełkami szklanymi, oraz z zatrzymywaniem przez nie zanieczyszczeń mechanicznych (Cuatrecasas 1971). Szkło porowate wiązano z epsilon - aminopropylotrójetoksyloksysilanem. Grupę aminową można następnie przekształcić w izotiocyanianową, z którą można wiązać ligandy jak opisano powyżej. Można także przeprowadzić reakcję z chlorkiem para-nitrobenzoilu, otrzymany związek zredukować i po dwuazowaniu sprzęgać z ligandami o odpowiedniej reaktywności (Weetall, 1969; 1969a; 1970). Bezwodnik bursztynowy reaguje z aminoalkilowanym szkłem dając pochodne nadające się do wiązania ligandów w obecności karbodiimidów (Cho, 1972). Podobnie można otrzymać nośniki o takich grupach, jak opisano dla agarozy (Cuatrecasas, 1971).

Prócz nośników o zastosowaniu ogólnym stosuje się też często nośniki przygotowane specjalnie do konkretnych zastosowań. Niektóre z nich będą omówione w następnych podrozdziałach.

#### Nośniki dla celów syntezy na podłożach polimerowych

Podłoża polimerowe znajdują zastosowanie głównie do syntezy dwóch rodzajów polimerów sekwencyjnych:

- oligo- i polipeptydów
- oligonukleotydów

Znacznie mniej popularne jest stosowanie podłoża polimerowych do syntezy oligosacharydów. W tej też kolejności omówimy stosowane w syntezie polimery.

Szersze informacje na ten temat znaleźć można w literaturze przeglądowej (np. Stewart, 1969, Serafinowski, 1972).

Podłoża polimerowe do syntezy peptydów

Metoda syntezy polipeptydów na nierozpuszczalnym podłożu polimerowym opracowana została przez Merrifielda (1963, 1964, 1969). Stosowany polimer pozwala na przyłączanie pierwszego aminokwasu poprzez wolną grupę karboksylową, oraz musi umożliwiać odhydrolizowanie gotowego peptydu. Cząsteczki polimeru muszą mieścić się w wąskich granicach formy i rozmiaru, ponieważ część etapów syntezy jest kontrolowana przez dyfuzję. Musi on być obojętny w stosunku do stosowanych odczynników. Merrifield wybrał w tym celu kopolimer styrenu z dwuwinylobenzenem, o zawartości 2% tego ostatniego, w formie cząstek o rozmiarach 20-70 mikronów. Dzięki usiecianiu jest on nierozpuszczalny w większości rozpuszczalników organicznych, ale dobrze pęcznieje. Pęcznienie polimeru jest istotne, gdyż część łańcuchów polipeptydowych zostaje przyłączona w trudniej dostępnych porach. Dostęp odczynników do takich łańcuchów jest możliwy dopiero po spęcznieniu. Handlowo dostępny produkt (Dow Chemical Co) pęcznieje w chloroformie, chlorku metylenu, dioksanie, dwumetyloformamidzie i benzenie, a gorzej w alkoholach, octanie etylu i kwasie octowym. Niekiedy stosowano też kopolimer o zawartości 1% dwuwinylobenzenu.

Taki nośnik poddaje się modyfikacji przez przyłączenie grup chlorometylowych w reakcji Friedel-Craftsa w obecności chlorku cynowego. Substratem jest eter chlorometylowo-metylowy. Z reguły do syntezy peptydów używa się żywicy chlorometylową o zawartości 1-2 milimole chlorku na gram polimeru. Stopień podstawienia oznacza się przez analizę chloru metodą Volharda, po uprzednim uwolnieniu go aminą trzeciorzędową. Nadmierna zawartość grup chlorometylowych jest szkodliwa, gdyż prowadzi do przyłączenia aminokwasu w trudno dostępnych fragmentach polimeru. Odpowiednie żywice produkowane są również komercyjnie. Żywica chlorometylowa przyłącza aminokwasy blokowane na grupie aminowej, w obecności trójetyloaminy, tworząc wiązanie estrowe. Po zakończeniu syntezy peptydu odłącza się go od żywicy działając gazowym chlorowodorem w środowisku kwasu trójfluorooctowego w czasie 90 min. Niekiedy stosuje się także bezwodny fluorowodór (Stewart, 1969).

Ostatnio zaczęto stosować tzw. żywice pelikularne, w celu zmniejszenia kontroli dyfuzyjnej procesu. Pozwala to znacznie skrócić czas większości operacji. Żywice takie stanowią mikroperełki szklane pokryte cienką warstwą polimeru. W ten sposób grupy aktywne znajdują się głównie na powierzchni (Jung, 1970).

Dobre rezultaty uzyskano wiążąc cząsteczki organiczne kowalentnie do szkła. W ten sposób powstają aktywne warstwy monomolekularne (Bayer, 1970a; 1970b). Jeżeli przyłączanie następuje jednak przez wiązanie Si-O-C nośniki takie bardzo łatwo rozkładają się pod wpływem substancji zawierających wolne grupy hydroksylowe, a szczególnie wody. Dlatego ostatnio zsyntetyzowano nośniki pelikularne, zawierające grupy p-bromometylowe przyłączone poprzez wiązania Si-O-Si-C, które są bardziej stabilne. W tym celu przygotowano p-bromometylo-fenilo-trójchlorosilan, który poddano reakcji grupami silanolowymi na powierzchni szkła Bio-Glass 2500.

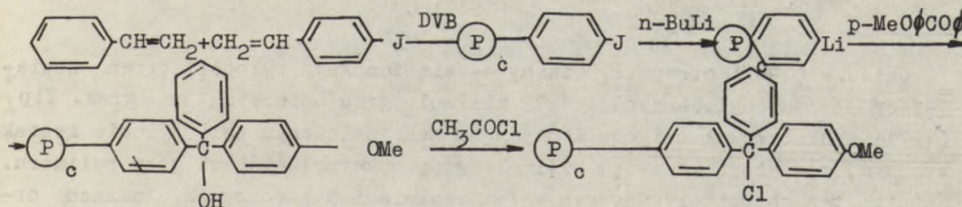
Produkt zawierał 0,08 milimola bromu na gram. Sprawdzono przydatność nośnika do syntezy peptydów. Niestety, hydroliza produktu końcowego zachodzi tylko w ok. 50% (Parr 1971).

Sądzi się, że nośniki typu pelikularnego po pełnym opanowaniu ich zastosowania zrewolucjonizują syntezę papydów na podłożu stałym i pozwolą na zastosowanie jej w skali przemysłowej (Rony, 1972).

Opisano także przygotowanie i zastosowanie polimerów zawierających grupy funkcyjne, inne niż chlorometylowe, np. fenylochlorometylostyren - 2% dwuwinylobenzen, p-metoksyfenylochlorometylostyren - 2% dwuwinylobenzen (Southard, 1971). Prócz syntezy Merrifielda stosowana jest także metoda Szmjakina, (1965), oparta o podłoże rozpuszczalne. Z tego względu metoda ta znajduje się poza zakresem niniejszego przeglądu.

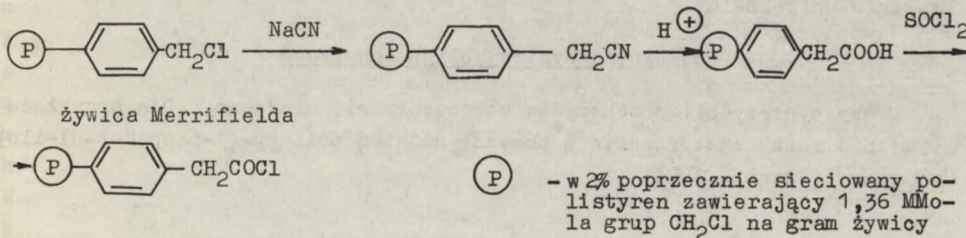
#### Podłoża polimerowe do syntezy oligonukleotydów

Podobnie, jak w przypadku peptydów rozróżnić można podłoża rozpuszczalne i nierozpuszczalne. Niżej scharakteryzujemy niektóre podłoża nierozpuszczalne. Większość nośników tego typu to kopolimery styrenowe zawierające grupy aktywne przypominające odczynniki stosowane do blokowania nukleotydów lub nukleozydów. Melby (1967, 1969, 1969a) stosował polistyren sieciowy dwuwinylobenzenem (1%), do którego wprowadzono grupy monometoksytrytylowe, w ilości 70-760 mikromoli/g polimeru (ryc. 15).



(P)<sub>c</sub> - poprzecznie sieciowany polistyren

Ryc. 15. Otrzymanie podłoża polimerowego wg Melby (1967)



Ryc. 16. Modyfikacja żywicy Merrifielda wg Hayatsu (1970)





- przygotowania enzymów insolubilizowanych nadających się do prowadzenia reakcji enzymatycznych na powierzchni ciała stałego,
- przygotowania adsorbentów do chromatografii powinowactwa, specyficznej elucji substratowej i metod zbliżonych,
- przygotowania substratów do dalszej syntezy oligomerów bez konieczności stosowania pracochłonnych metod rozdzielczych,
- przygotowania materiału wyjściowego do ustalania sekwencji poli i oligomerów metodą degradacji na stałym podłożu.

Metody te zostaną kolejno omówione poniżej.

### Reakcje enzymatyczne na stałych nośnikach

#### Metody immobilizacji enzymów

##### - adsorpcja

Zjawisko adsorpcji enzymu beta-fruktofuranozydazy na świeżo strąconym wodorotlenku glinu zauważono już w roku 1916 (Nelson). Później stosowano do adsorpcji enzymów także węgiel aktywny (Nelson, 1921), szkło (Arnold, 1966), kaolin (Mc Laren, 1957), celulozę (Reese, 1958), i inne nośniki. Mimo, że zaadsorbowane nośniki nie tracą na ogół aktywności, stosowanie tej metody jest bardzo niepopularne, gdyż łatwo następuje desorpcja enzymu pod wpływem zmiany pH, siły jonowej, lub przemycania roztworami substratów.

##### - wiązania jonowe

Do wiązania jonowego enzymów stosowano różne anionity i kationity, oparte najczęściej celulozę, np. DEAE-celulozę, fosfocelulozę, CM-celulozę (Mitz, 1959). Z przyczyn podanych powyżej dla adsorpcji metoda wiązania jonowego jest stosowana bardzo rzadko.

##### - wiązanie chelatowe

Niektóre nośniki, jak celuloza, nylon, szkło, po ich zaktywowaniu roztworami soli tytału, cyny, cyrkonu, wanadu, żelaza mogą wiązać chelatowo enzymy (Barker, 1971).

##### - fizyczne unieruchamianie enzymu w matrycy żelowej

Najczęściej stosuje się polimeryzację akryloamidu sieciowanego N,N'-metyloenobisakryloamidem w roztworze zawierającym enzym (Bernfeld, 1964). W ten sposób molekuly białkowe zostają mechanicznie unieruchomione w powstającym żelu. Zaletą są łagodne warunki reakcji i brak modyfikacji samego enzymu. Niestety, w trakcie użytkowania żelu następuje powolne wymywanie enzymu. Nie można stosować tej metody do unieruchamiania enzymów, których makromolekularne substraty nie są w stanie dyfundować przez żel. Nawet w przypadku niewielkich cząsteczek substratów dyfuzyjna kontrola kinetyki nie jest zjawiskiem korzystnym. Metoda ta jednak jako jedna z nielicznych pozwala na wiązanie złożonych struktur biologicznych, nawet komórek (Mosbach, 1970).

##### - wiązanie odczynnikami dwufunkcyjnymi

Odczynniki dwufunkcyjne, takie jak aldehyd glutarowy (Quioco, 1964) lub inne (Fasold, 1971) mogą służyć do sprzęgania enzymów z nośnikami

zawierającymi grupy aminowe, np. aminoetylocelulozę (Habeeb, 1967; Green, 1969). Możliwe jest także wiązanie enzymów odczynnikami dwufunkcyjnym w obecności porowatego, ale nieaktywnego podłoża (Silman, 1966), jak bibuła, celofan lub nawet krzemionka (Haynes, 1966). W tym przypadku związane odczynnikami cząsteczki enzymu tworzą większe agregaty, mechanicznie związane z podłożem. Szczególnie dobre wyniki uzyskuje się, wiążąc w ten sposób enzym z błonami (Silman, 1966). Niekiedy zachodzi jednak nieodwracalna dezaktywacja enzymu. Stosuje się także łączenie aldehydem glutarowym enzymów bez nośnika, w stanie krystalicznym lub w roztworze. W ostatnim przypadku enzym wytrąca się w postaci nierozpuszczalnego osadu (Quiocho, 1964; Avrameas, 1969). Aktywność katalityczna takich preparatów jest często niewysoka, wydajność reakcji jest mała oraz wymagana jest duża ilość enzymów, co czyni metodę tą mało popularną (Habeeb, 1967).

- wiązanie kowalencyjne

Metoda ta, najczęściej obecnie stosowana, opisana została dokładniej w podręczniku omawiającym typy podłoży stałych.

- mikroenkapsulacja

Mikroenkapsulacja nie jest w ścisłym tego słowa znaczeniu metodą unieruchamiania enzymów na stałym podłożu. Polega ona na zamknięciu enzymu w miniaturowych woreczkach kolodionowych lub nylonowych, przez które mogą przenikać substraty i produkty, ale nie sam enzym. Mikroenkapsulowane enzymy mają niewiele zalet w porównaniu z enzymami na stałym podłożu i stosowane są na ogół w celach klinicznych, gdzie chodzi o uniknięcie bezpośredniego enzymu z organizmem żywym (Chang, 1969).

#### Zastosowania stałych enzymów

Jak zauważono już dawno, enzymy charakteryzują się wieloma takimi właściwościami, które czynią je idealnymi katalizatorami, zarówno w łagodnych warunkach pH i temperatury, reakcje katalizowane będą bardzo szybko, są nadzwyczaj specyficzne. Specyficzność enzymów umożliwia zastosowanie ich do katalizowania wielu reakcji niemożliwych do przeprowadzenia w inny sposób, nawet przy użyciu zwykłych katalizatorów chemicznych. Różnorodność tych reakcji jest prawie nieograniczona, ponieważ enzymy biorą udział we wszystkich przemianach chemicznych w żywym organizmie.

Mimo to enzymy były przez długi okres czasu stosowane bardzo rzadko w przemyśle i klasycznej chemii. Przyczyną takiego stanu był wysoki koszt, mała stabilność i trudność oddzielenia enzymów od produktów reakcji. Dopiero w ciągu ostatnich 6-7 lat technika unieruchamiania enzymów na stałym podłożu pozwoliła pokonać te trudności. Zalety stałych enzymów są następujące:

- łatwe oddzielanie od produktów i substratów, przez odsączenie,
- możliwość wielokrotnego stosowania,
- dzięki dostępności w różnych formach - perełek, mikrokapsulek, arkuszy, membran, mikro rur - możliwość stosowania różnych reaktorów - ze stałym złożem, fluidyzowanych, mieszanych i innych.

- większa stabilność i odporność termiczna. Wiele enzymów pozwala na kilka miesięcy nieprzerwanego użytkowania,
- możliwość zmiany optimum pH, stałej Michaelisa i specyficzności substratowej, przez zmianę mikrootoczenia enzymów na podłożu,
- możliwość stosowania w systemach wieloenzymowych. Szereg enzymów, katalizujących kolejne reakcje może być umieszczone na podłożu, pozwalając na prostą syntezę skomplikowanych połączeń.

Melrose (1971) porównując stabilność 50 enzymów na podłożu stałym, z ich odpowiednikami w roztworze stwierdził co następuje: 30 z nich w stanie stałym okazało się bardziej stabilne, 8 - mniej stabilne, a w przypadku 12 nie wykryto różnicy. Mechanizm zwiększenia stabilności nie jest jasny. W przypadku enzymów proteolitycznych przypuszczalnie insolubilizacja zapobiega samotrąwieniu. Możliwe jest też chronienie steryczne enzymu na podłożu przed atakiem czynników dezaktywujących. Prawdopodobnie także przyczepienie do podłoża utrudnia niekorzystne zmiany konformacyjne. Aktywność stałego enzymu, charakteryzowana w jednostkach aktywności na gram, zależy od ilości enzymu przyczepionego do podłoża, która waha się pomiędzy kilkoma a kilkoma tysiącami miligramów na gram nośnika, oraz od stopnia zachowania aktywności, który w przeliczeniu na jednostkę masy enzymu wynosi od kilku do 100%. Niekiedy nawet enzym na podłożu jest aktywniejszy niż w roztworze (Manecke, 1972).

Często obserwuje się także zmienioną reaktywność enzymu na podłożu, a więc zmiany stałych kinetycznych wynikające ze zmian energii aktywacji, zmiany optimum pH, stałej Michaelisa, specyficzności. O ile stałe podłoża zawiera grupy zjonizowane, mikrootoczenie centrum aktywnego jest zmienione przez pole elektrostatyczne. Pole to wpływa na stężenie jonów wodorowych w otoczeniu enzymu i w ten sposób zmienia pozorne optimum pH. Kierunek zmiany zależy od tego, czy matryca ma charakter kationowy, czy anionowy. Podłoża niejonowe nie wpływają na optimum pH. O ile substraty mają również charakter jonowy, ładunek podłoża wpływa na stałą Michaelisa. Na przykład pozorna stała Michaelisa wzrasta, o ile matryca i substrat mają jednakowe ładunki, gdyż wtedy zachodzi odpychanie. W przypadku ładunków o przeciwnych znakach stała Michaelisa maleje, gdyż substrat jest przyciągany i stężenie jego rośnie w mikrootoczeniu enzymu. Wzrost lub zmniejszenie stałej może być nawet dziesięciokrotne. Zmiany specyficzności substratowej prawdopodobnie związane są ze zmianami konformacyjnymi enzymu. Stąd wynika obserwowana niekiedy zależność od rodzaju podłoża. (Falb, 1972). Efekty te analizowane są również ostatnio na drodze teoretycznej (np. Shuler, 1972). Takie zmiany własności enzymu, z chwilą gdy będziemy umieli świadomie nimi kierować, pozwolą w przyszłości na jeszcze szersze wykorzystanie stałych enzymów.

Obecnie zastosowanie stałych enzymów obejmuje głównie następujące dziedziny:

- zastosowanie przemysłowe

Opracowano szereg zastosowań enzymów stałych w ciągłych procesach przemysłowych, np. de-N-acylaza alfa-aminokwasowa używana jest do selektywnej

hydrolizy acetylo-L-aminokwasów w mieszaninie DL (Tosa, 1966). Alfa-amylaza stosowana jest w procesie ciągłej degradacji częściowych hydrolizatów skrobi. Także konwersja glukozy do fruktozy (Wilson, 1969), hydroliza penicyliny (Self, 1969) i produkcja steroidów (Mosbach, 1970) może być prowadzona przy użyciu enzymów nierozpuszczalnych. Planuje się ciągłą produkcję antybiotyków przy wykorzystaniu seryjnych reakcji na nierozpuszczalnych podłożach (Self, 1969; Mosbach, 1970a).

- zastosowania analityczne

Stałe enzymy mogą być stosowane w systemach automatycznej analizy do oznaczania różnych substratów. Zaproponowano użycie w tym celu m.in. oksydazy glukozy, dehydrogenazy kwasu mlekowego, dehydrogenazy alkoholowej. Większa trwałość stałych enzymów pozwala na stosowanie ich jako standardów analitycznych (fosfokinaza kreatynowa, esteraza cholinowa, enzymy proteolityczne i in.). Ostatnio popularne stało się wykorzystanie enzymów osadzonych na błonach półprzepuszczalnych w elektrodach enzymatycznych (Guilbault, 1971).

- zastosowania kliniczne

Enzymy stałe oraz mikroenkapsulowane stosuje się w leczeniu defektów enzymatycznych takich, jak Lymphosarcoma (Chang 1969; Haselberger, 1970), a także różnych konstrukcjach sztucznej nerki (Mosbach, 1971).

- inne

Prowadzi się badania nad zastosowaniem stałych enzymów do wykrywania i usuwania zanieczyszczeń środowiska (Falb, 1972).

- zastosowanie w chromatografii powinowactwa  
zostaną omówione w następnym podrozdziale.

Dzięki szybkiemu rozwojowi badań nad metodami uzyskiwania stałych enzymów, obecnie enzymy wszystkich głównych klas zostały otrzymane w aktywnej postaci na stałym podłożu. Szczególnie duże zainteresowanie wiąże się z enzymami proteolitycznymi, amylolitycznymi, nukleolitycznymi, dehydrogenazami, oksydazami, hydroksylazami, enzymami glikolitycznymi i innymi (Falb, 1972). Spośród enzymów metabolizmu tRNA interesująca jest immobilizacja nukleotydylotransferazy tRNA (Litvak 1971), i niektórych syntez.

Szczegółowe omawianie poszczególnych przedstawicieli stałych enzymów spośród wymienionych grup nie wydaje się tutaj celowe. Zainteresowani znajdą te informacje w licznych pracach przeglądowych (np. Silman, 1966; Melrose, 1971; Goldstein, 1969).

## Chromatografia powinowactwa

### Charakterystyka metody i przykłady zastosowań\*

Opracowanie łagodnych metod przyłączania różnych cząsteczek biologicznych do stałych podłoży, oraz lepsze poznanie w ostatnich latach specyficzności oddziaływań charakterystycznych dla makrocząsteczek występujących w organizmach żywych, pozwoliło na opracowanie nowych technik roz-

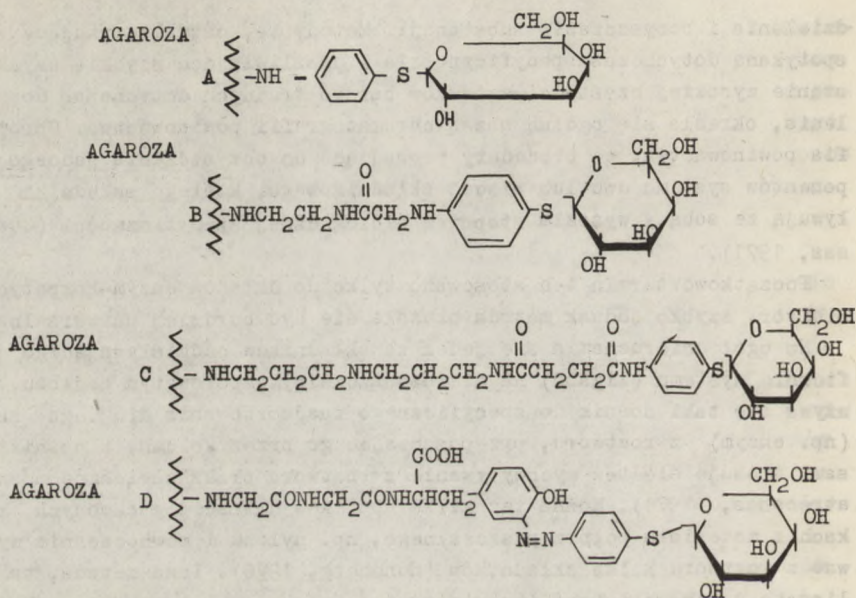
dzielenia i oczyszczania substancji. Metody te, charakteryzujące się niespotykaną dotychczas specyficznością i umożliwiające szybkie uzyskanie w stanie wysokiej czystości związków bardzo trudnych dotychczas do wydzielenia, określa się ogólną nazwą chromatografii powinowactwa. Chromatografia powinowactwa, to procedury prowadzące do oczyszczenia jednego z komponentów systemu dwu lub więcej składnikowego, którego składniki oddziałują ze sobą z wysokim stopniem biologicznej specyficzności (Cuatrecasas, 1971).

Początkowo termin ten stosowano tylko do układów enzym-kompetycyjny inhibitor, szybko jednak metoda okazała się być bardziej uniwersalna.

Na ogół unieruchamia się jeden ze składników oddziałującego specyficznie systemu (ligand) na nierozpuszczalnym, porowatym podłożu, po czym używa się taki nośnik do specyficznego zaadsorbowania drugiego składnika (np. enzym) z roztworu, przepuszczając go przez kolumnę z nośnikiem. Czasami stosuje się też wychwytywanie z roztworu przez zawieszinę nośnika (Cuatrecasas, 1971). Można też kilka nośników umieścić w osobnych woreczkach z materiału półprzepuszczalnego, np. nylonu i równocześnie wychwytywać z roztworu kilka składników (Sundberg, 1970). Inna metoda, także zaliczana do chromatografii powinowactwa, nosi nazwę specyficznej elucji substratowej. W tym przypadku jeden ze składników systemu oddziałującego osadza się odwracalnie, np. na wymienniaczu jonowym, po czym selektywnie wymywa drugim składnikiem. Przy odpowiednim doborze warunków zanieczyszczenia nie zostaje wymywane.

Wymywanie cząsteczek oddziałujących ze stałych nośników przeprowadza się przez zmianę pH lub siły jonowej buforu przemywającego, lub wymywanie prowadzi się roztworem zawierającym cząsteczki konkurencyjnie oddziałujące ze stałym podłożem. Nawet jeżeli konkurencyjne oddziaływanie jest słabe, właściwe stężenie umożliwi elucję. Warunkiem zastosowania chromatografii powinowactwa jest więc możliwość dysocjacji kompleksu oddziałujących cząsteczek biologicznych przy pomocy wyżej wymienionych czynników. O ile dysocjacja taka zachodzi bardzo trudno, czasami stosuje się odszczepianie kowalentnie związanego składnika, a tym samym całego kompleksu od podłoża. Opracowano odpowiednie podłoża nadające się do tego celu.

Początkowy powolny rozwój chromatografii powinowactwa związany był z trudnościami w takim przyłączeniu jednego ze składników do podłoża, aby zachować możliwość specyficznego oddziaływania. Badania Cuatrecasasa, podsumowane w niedawnym przeglądzie (1971) pozwoliły ustalić, że w przypadku oczyszczania substancji o niewielkim powinowactwie, a dużym ciężarze cząsteczkowym bardzo duże znaczenie dla powodzenia eksperymentu ma wprowadzenie na nośnik stały kilkuwęglowy łańcuch, odsuwającego ligand na odległość 10–20 Å. Unika się w ten sposób niekorzystnych oddziaływań sterycznych. Przykładu dostarcza oczyszczanie betagalaktozydazy bakteryjnej na agarozie zawierającej stosunkowo słaby inhibitor kompetycyjny – beta-D-tiogalaktopyranozyd p-aminofenolu. O ile ligand przyłączony jest bezpo-



Ryc. 18. Adsorbenty agarozowe przygotowane dla selektywnego oczyszczania beta-galaktozydazy z różnych źródeł przy pomocy chromatografii powinowactwa (Steers, 1971)

średnio - nie obserwuje się wiązania enzymu. Podłoża z ligandem w odległości około 10 Å słabo wiążą. Natomiast przyłączenie ligandu w odległości ok. 20 Å od matrycy daje nośnik doskonale adsorbujący betagalaktozydazę (Cuatrecasas 1971), (ryc. 18).

Podobne wyniki uzyskuje się w przypadku oczyszczania nukleazy ze *Staphylococcus* na matrycy zawierającej pdTp-aminofenyl (Cuatrecasas, 1969). Opracowano kilka ogólnych metod otrzymywania nośników wyposażonych w odpowiedni łańcuch węglowy zakończony grupą aktywną (Cuatrecasas, 1970; 1972). Zjawisko to wyjaśnia się zmniejszeniem ograniczeń sterycznych narzuconych przez matrycę oraz zwiększeniem swobody i ruchliwości ligandu bardziej wysuniętego w warstwę rozpuszczalnika. Cechy, jakimi powinny charakteryzować się nośniki wyszczególniono poprzednio (str. 163).

#### Zastosowanie chromatografii powinowactwa

Metody powinowactwa stosowano dotychczas do oczyszczania następujących specyficznie oddziaływujących układów:

- enzymy - inhibitory kompetycyjne
- enzymy - substraty
- białka - inne białka lub peptydy
- białka - kwasy nukleinowe
- kwasy nukleinowe - inne kwasy nukleinowe

- białka wiążące witaminy - witaminy
- białka wiążące hormony - hormony
- antygeny i antyciała
- rybosomy, komórki i inne złożone układy biologiczne

Zastosowaniom do rozdzielania i oczyszczania kwasów nukleinowych i ich komponentów oraz do rozdzielania aminoacylo-tRNA-syntetaz poświęcone będą osobne podrozdziały, natomiast pozostałe grupy substancji omówione zostaną w skrócie poniżej według Cuatrecasas (1971).

#### E n z y m y

Próby zastosowania specyficznych oddziaływań enzym - substrat czynione były od dawna. Już w 1919 r. Starckenstein stwierdził wiązanie amylazy do substratu w postaci nierozpuszczalnej skrobi. Wymycie enzymu następowało pod wpływem rozpuszczalnej skrobi. Podobnie syntetaza glikogenu wiąże się z glikogendem (Leloir, 1962), a syntetaza skrobi do skrobi (Leloir, 1961). Nukleazę z trzustki kurczęcia oczyszczono przez specyficzne wymywanie z fosfocelulozy przez roztwory RNA (Eley, 1969). Za jeden z pierwszych przykładów chromatografii powinowactwa uznać należy za Cuatrecasas oczyszczanie tyrozynazy na celulozie zawierającej eterowo związane reszty rezorcylowe, z którymi sprzęgnięto dwuazowany p-aminofenol (Lerman, 1953). Wiele enzymów oczyszczono na pochodnych agarozy zawierających związane substraty lub inhibitory. Nukleazę ze *Staphylococcus* oczyszczono na agarozie związanej z pT-p-aminofenolem (Cuatrecasas, 1968). Alfa-chymotrypsyna wiąże się z agarozą zawierającą enancjomer substratu - ester metylowy D-tryptofanu (Cuatrecasas, 1968). Karboksypeptydaza A adsorbuje się na kolumnach z agarozy -L-tyrozylo-D-tryptofan (Cuatrecasas 1968). Biotyna-agarozą została zastosowana do wydzielenia z wydajnością 70% awidyny białka jaja (Cuatrecasas, 1962). Hemoglobino-Sepharose nadaje się do oczyszczania proteaz (Czua 1969). Rybonukleaza trzustkowa daje się wydzielić na agarozie-aminofenyl-pU-cyliczny fosforan. Chromatografia powinowactwa beta-galaktozydazy z *E. coli* była opisana powyżej (Ryc. 18). W podobny sposób oczyszczano dehydrogenazę glicerolu, L-asparaginazę, acetylocholinesterazę, aminotransferazę tyrozynową i bardzo wiele innych enzymów. Pełniejszą ich listę znaleźć można w uprzednio cytowanej literaturze przeglądowej.

#### I n n e b i a ł k a

Oczyszczono między innymi awidynę - białko wiążące witaminę biotynę (Cuatrecasas, 1962), białka wiążące hormony takie jak estradiol, testosteron (Vonderhaar, B. 1969). Pokrewną metodę stanowi zastosowanie agarozy lub innego nośnika zawierającego grupy p-chlorortęciofenylowe do wiązania białek lub innych związków z grupami sulfhydrylowymi, jak np. papainy (Sluyterman, 1970; Cuatrecasas 1970).

#### B i a ł k a w i ą ż a c e b i a ł k a i p e p t y d y

Zasadę metody stanowi wiązanie z podłożem jednego białka, które może oddziaływać specyficznie z innym białkiem lub peptydem. Przeprowadzono eksperymenty z resocjacją na podłożu stałym pewnych enzymów dwukomponen-



towych, np. rybonukleazy S (Kato, 1969) oraz nukleazy T (Ontjes, 1969).

#### A n t y c i a ł a i a n t y g e n y

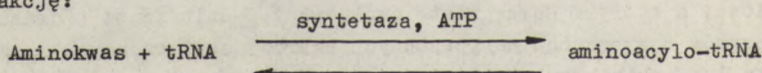
Pochodne agarozy znajdują duże zastosowanie do przygotowania immuno-adsorbentów. Adsorbenty takie używa się do oczyszczania antyciał i antygenów. Zagadnieniu temu poświęcona jest obszerna literatura specjalistyczna (Silman 1966).

#### Z ł o ż o n e s t r u k t u r y b i o l o g i c z n e

Technika chromatografii powinowactwa może być stosowana do oczyszczania elementów membran biologicznych, kompleksów rybosomowych, struktur receptorowych dla hormonów, kompleksów multienzymowych, a nawet całych komórek. W tej właśnie dziedzinie, jak się przypuszcza, chromatografia powinowactwa znajdzie szerokie zastosowanie, gdyż brak wydajnych klasycznych metod oczyszczania.

#### Zastosowania chromatografii powinowactwa do rozdziału aminoacylo- tRNA syntetaz

Do izolacji aminoacylo-tRNA syntetaz, enzymów katalizujących następującą reakcję:



można z punktu widzenia zasady chromatografii powinowactwa stosować stałe pochodne substratów i inhibitorów tej reakcji, a więc aminokwasów, aminoacyloadenylianów, ich strukturalnych analogów oraz tRNA. Metody te zastosowano po raz pierwszy do syntetaz w roku 1968 (Nelidova), szerszą popularność zyskały dopiero w latach 1972-1973. Będziemy prawdopodobnie obserwować wzrost ich zastosowania do szybkiego i prostego wydzielenia stosunkowo labilnych i niełatwych do izolacji w stanie czystym enzymów, jakimi są aminoacylo-tRNA-syntetazy.

W dotychczasowych pracach wykorzystano:

- stałe pochodne tRNA (Nelidova, 1968; Bartkowiak, 1972; Remy 1972),
- stałe pochodne aminokwasów (Beikirch, 1972; Forrester, 1973, Robert-Gero, 1972),
- specyficzną elucję substratową syntetazy przez tRNA (von der Haar, 1973).

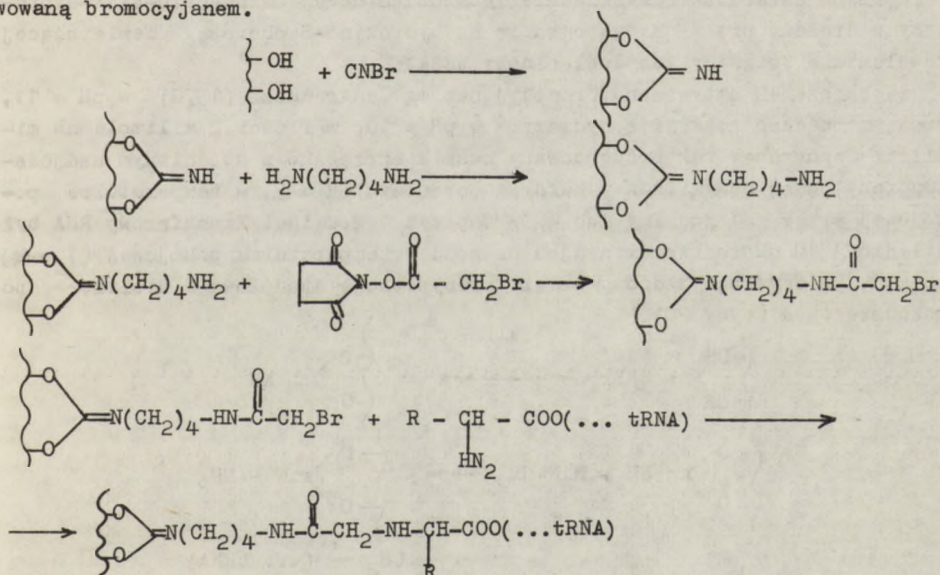
#### Zastosowanie stałych pochodnych tRNA

Oczyszczanie izoleucylo-tRNA-syntetazy z *E. coli* wg Bartkowiaka i Pawełkiewicza (1972)

Opracowano prostą metodę otrzymywania czystej izoleucylo-tRNA-syntetazy przez chromatografię na Sepharose zawierającej kowalently związane izoleucylo-tRNA<sup>Ile</sup>. Sepharose poddano aktywacji bromocyjanem i sprzęgnięciu z czterometylenodwuaminą wg. Cuatrecasas (1970, 1970a). Następnie po-

chodną tą traktowano estrem kwasu bromooctowego i sukcyimidu. W ten sposób uzyskano bromoacetamidobutylo-Sepharose. 20 ml tego nośnika poddano reakcji z 30 mg tRNA z *E. coli* aminoacylowanego izoleucyną, w buforze fosforanowym w pH = 7,5. (ryc. 19). Reakcja przebiegała 3 dni w 4°C.

Nieprzereagowane grupy bromoacetylowe zablokowano w reakcji z etanoloaminą i nośnik starannie przemyto. Ilość przyłączonego tRNA wynosiła 25 ug, na ml Sepharose, w oparciu o pomiar spektrofotometryczny hydrolizatu. Bromoacetamidobutylo-Sepharose nie reaguje z nieaminoacylowanym tRNA, co wskazuje iż grupa alfa-aminowa aminokwasu jest aktywna w tej reakcji. Nie udało się wiązać tRNA ani aminoacylo-tRNA bezpośrednio z Sepharose aktywowaną bromocyjanem.



Ryc. 19. Wiązanie aminoacylo-tRNA z Sepharose wg Bartkowiaka i Pawełkiewicza (1972)

Częściowo oczyszczoną izoleucylo-tRNA-Syntetazę z *E. coli*, przygotowaną według procedury Yaniv i Gross (1969) poddano chromatografii na kolumnie z izoleucylo-tRNA-Sepharose, w buforze fosforanowym pH = 5,5 stosując gradient NaCl. Syntetaza izoleucynowa wymywała się w jednym pikie. Uzyskano 28-krotne wzbogacenie, w przeliczeniu na aktywność. Elektroforeza na żelu poliakrylamidowym wykazała obecność dwóch pasm. Zaletą tej metody jest brak konieczności otrzymania specyficznego tRNA. Nanoszone białka powinny być jednak całkowicie pozbawione aktywności rybonukleazowej, gdyż w przeciwnym przypadku nośnik ulega degradacji. Metodę tę zastosowano z powodzeniem do izolacji syntetaz z materiału roślinnego.

Oczyszczanie fenyloalanylo-tRNA-syntetazy z jęczmienia metodą Bartkowiaka i Pawełkiewicza

Niedawno T. Haertle, U. Karwowska i J. Augustyniak (1973) zastosowali metodę Bartkowiaka i Pawełkiewicza do oczyszczania syntetazy fenyloalaninowej z jęczmienia (1973).

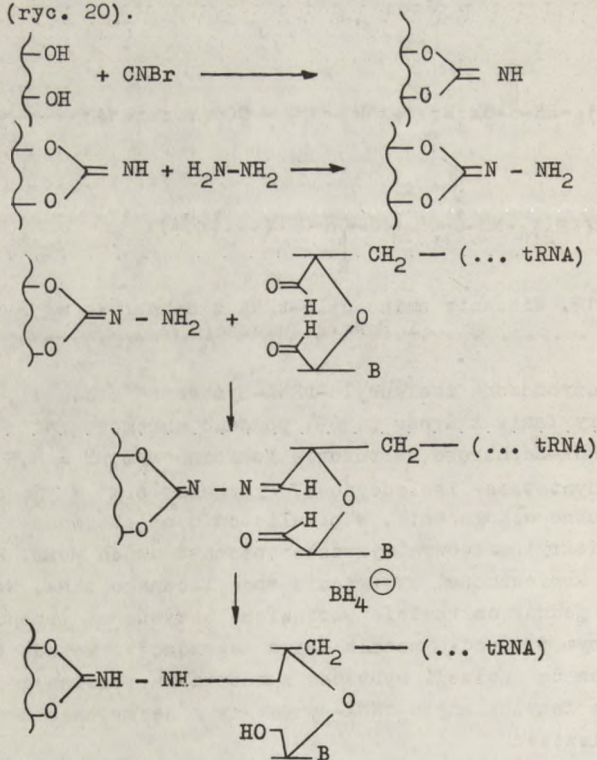
Oczyszczania izoleucylo-tRNA syntetazy z jęczmienia metodą Bartkowiaka i Pawełkiewicza

Niedawno M. Rudzińska, E. Zaradniak i J. Augustyniak (1973) zastosowali metodę Bartkowiaka i Pawełkiewicza do oczyszczania syntetazy izoleucynowej z jęczmienia.

Oczyszczanie fenyloalanylo-tRNA-syntetazy z drożdży na kolumnie z tRNA<sup>Fen</sup>-Sepharose wg Remy (1972)

Opisano całkowite oczyszczenie fenyloalaninowej aminoacylo-tRNA-syntetazy z drożdży przez chromatografię na hydrazyno-Sepharose zawierającej kowalently związane fenyloalaninowy tRNA.

Sepharose 4B aktywowano bromocyanem wg Cuatrecasas (1970) w pH = 11, po czym poddano reakcji z hydrazyną w pH = 10, w ilości 2 milimole na mililitr Sepharose. Tak przygotowany nośnik sprzęgano z utlenionym nadjodanem fenyloalaninowym tRNA w buforze octanowym pH = 5, w temperaturze pokojowej przez 24 godziny lub w 37°C przez 1 godzinę. Transferowy RNA był utleniony 10 mM roztworem nadjodanu sodu w temperaturze pokojowej (1 godz) pH = 5, po czym oczyszczony przez precypitację etanolową i dializę po rozpuszczeniu (ryc. 20).



Ryc. 20. Wiązanie utlenionego nadjodanem tRNA z Sepharose wg Remy (1972)

Stwierdzono, że Sepharose wiąże około 90% aldehydo - tRNA, podczas gdy tylko około 5% niemodyfikowanego tRNA. Ponieważ wiązanie hydrazonowe ulegać może hydrolizie, nośnik poddano dodatkowej redukcji borowodorkiem sodowym, co zmniejszyło wymywanie tRNA z kolumny. Tak przygotowany nośnik zawierał do 10 mg tRNA/ml Sepharose, chociaż na ogół stosowane żele miały 2,5-4 mg tRNA/ml Sepharose.

Frację surowego ekstraktu enzymatycznego z drożdży, wytrącającą się pomiędzy 50 a 70% nasycenia siarczanem amonu rozpuszczano w buforze octanowym lub fosforanowym 0,05 M, zawierającym 10 mM  $MgCl_2$ , 0,1 mM EDTA, 5 mM beta - merkaptoetanolu i 10% glicerolu. Warunki takie były optymalne dla kompleksacji enzymu z tRNA. Rozpuszczony enzym po przefiltrowaniu przez Sephadex G-25 nałożono na kolumnę z tRNA<sup>Fen</sup>-Sepharose. Większość białka wymywała się w pojedynczym pikie, nie zawierającym aktywności syntetazowej dla fenyloalaniny. Syntetazę fenyloalaninową wymywano buforem 0,1 M TRIS-HCL pH = 8 zawierającym 0,2 M KCL, 10 mM  $MgCl_2$ , 0,1 mM EDTA, 5 mM beta - merkaptoetanolu i 10% glicerolu. Otrzymano frakcję zawierającą fenyloalanylo-tRNA-syntetazę. Chromatografia na żelu poliakryloamidowym wykazała jednak zanieczyszczenia co najmniej trzema innymi białkami. Zanieczyszczenia te najprawdopodobniej powstały w wyniku specyficznych oddziaływań z nośnikiem innych białek, a mianowicie:

- białek rozpoznających specyficzne tRNA<sup>Fen</sup> - np. enzym modyfikujący zasadę „Y”,
- białek rozpoznających tRNA w ogóle, np. metylazy lub nukleocydylotransferazy,
- białek rozpoznających RNA, np. rybonukleazy.

W celu usunięcia tych zanieczyszczeń przygotowano kolumnę z tRNA Sepharose otrzymaną z tRNA pozbawionego tRNA<sup>Fen</sup>. Na kolumnie takiej winny się zatrzymać zanieczyszczenia dwóch ostatnich grup. Surowy ekstrakt enzymatyczny z 140 g drożdży, frakcjonowany siarczanem amonu i przepuszczony przez Sephadex G-25 poddano sączeniu na kolumnie 5 cm razy 4 cm naładowanej tRNA (bez Fen) Sepharose, zawierającej 330 mg tRNA, a następnie na kolumnie 5 cm razy 2 cm z tRNA<sup>Fen</sup> - Sepharose zawierającej 125 mg tRNA<sup>Fen</sup>. Po wymyciu enzymu z drugiej kolumny wg poprzednio opisanej procedury otrzymano frakcję zawierającą homogenną fenyloalanylo-tRNA syntetazę oceniając na podstawie elektroforezy na poliakryloamidzie. Preparat ten nie zawierał innej aktywności syntetazowej. Aktywność właściwa wynosiła 1800-2000 jednostek/mg.

Autorzy sądzą, że niepowodzenia innych badaczy, którzy nie uzyskali homogennego preparatu wynikają z faktu, że nie tylko syntetazy, ale i inne białka zatrzymują się na kolumnie z tRNA-Sepharose.

Wadą tej metody jest konieczność posiadania dużej ilości oczyszczonych i specyficznych tRNA oraz konieczność oczyszczania ekstraktu enzymatycznego od aktywności nukleazowej.

Oczyszczanie walinowej i lizynowej aminoacylo-tRNA-syntetazy z wątroby szczura na kolumnach z tRNA-żelem wg Nelidovej (1968)

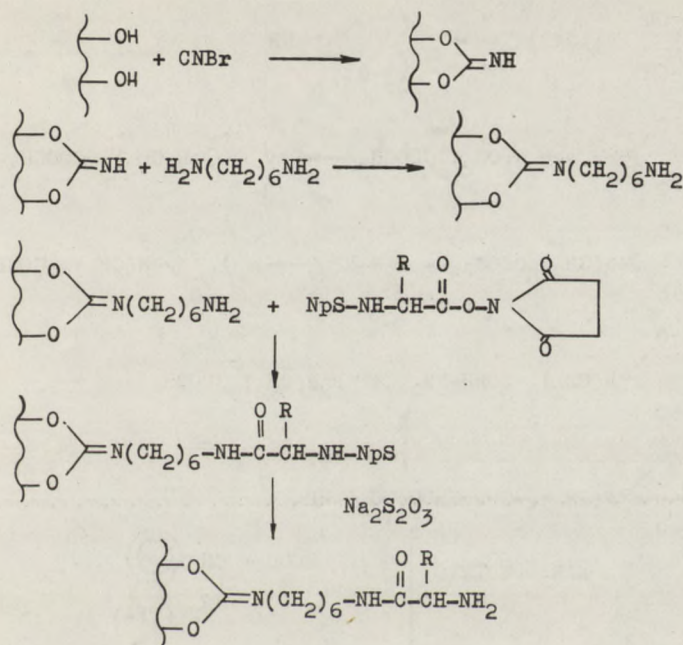
Nelidova i Kiselev przygotowali żel składający się z poliakrylohydrydu i agaru, który zastosowali do sprzęgania z utlenionym tRNA. Chromatografia na takim nośniku pozwoliła oczyścić walinową z lizynową aminoacylo-tRNA - syntetazę z wątroby szczura 30-90-krotnie.

Zastosowanie stałych pochodnych aminokwasów  
Oczyszczanie metionylo-tRNA-syntetazy z *E. coli* na kolumnach z metionylo-Sepharose wg Robert - Gero (1972)

Z badań nad mechanizmem działania aminoacylo-tRNA-syntetaz wynika jasno, że wolna grupa alfa-aminowa jest konieczna dla oddziaływania aminokwas-enzym, natomiast grupa karboksylowa nie jest istotna. Na tej obserwacji oparta jest metoda oczyszczania metionylo-tRNA-syntetazy na metionylo-Sepharose, opracowana przez Robert-Gero i Wallera (1972). W przypadku jednak zastosowania do chromatografii powinowactwa podłoża zawierającego wolne grupy aminowe, oddziaływanie z enzymem będzie komplikowane przez niespecyficzną adsorpcję jonową. Inny problem, który autorzy musieli rozwiązać to dobór przy syntezie podłoża łatwej do usunięcia grupy ochronnej.

Sepharose 4B aktywowano bromocyjanem w ilości 5-250 mg/ml żelu, w zależności od wymaganego stopnia podstawienia, w pH = 10,5. Następnie przeprowadzono sprzęganie z sześciometylenodwuaminą, w stężeniach 0,1-0,2 mM/ml żelu. Otrzymano trwały produkt, nadający się do przechowywania, w którym stopień podstawienia oznaczono spektrofotometrycznie w reakcji z 2, 4,6-trójnitrobenzenosulfonianem lub metodą analizy elementarnej. Nośnik ten poddano reakcji z estrem o-nitrofenylosulfenylometioniny i N-hydroksysukcynimidu, otrzymanym standardowymi metodami. W ten sposób uzyskany nośnik o-nitrofenylosulfenylometioniowy po usunięciu grupy ochronnej przez reakcję z trisoiarczanem sodowym i przemyciu stosowano do rozdzielania frakcji enzymatycznych w buforze fosforanowym o pH = 7,5, o stężeniu 200 mM. Chromatografii poddawano surowy ekstrakt, po uprzednim zaadsorbowaniu i wymyciu z DEAE-celulozy (ryc. 21).

W wyniku chromatografii na nośniku zawierającym 12 uM metioniny na mililitr żelu, ponad 90% enzymu było zatrzymywane na kolumnie i można go było wymyć roztworem metioniny o stężeniu 20 mM. Uzyskano 32-krotne wzbogacenie, jednakże takie postępowanie okazało się niepraktyczne, ze względu na duże rozcieńczenie enzymu. Lepsze wyniki uzyskano zmniejszając stopień podstawienia Sepharose. Porównawczo przeprowadzono eksperymenty z różnym stopniem podstawienia i stwierdzono, że przy aktywacji Sepharose przy pomocy 80 mg bromocyjanu na mililitr, co daje stężenie 4,5 uM metioniny/ml żelu enzym nie jest całkowicie zatrzymywany na kolumnie, ale



Ryc. 21. Otrzymywanie metionilo-Sepharose wg Robert-Gero i Waller (1972)

wymywa się w osobnym pikcie za główną frakcją białka. O ile zastosuje się taki rozdział po etapie oczyszczania enzymu na DEAE-Sephadex, pik ten zawiera całkowicie oczyszczoną metionilo-tRNA-syntetazę, co wykazano metodą elektroforezy na żelu poliakryloamidowym. Kolumna może być używana wielokrotnie, po zregenerowaniu 500 mM buforem fosforanowym.

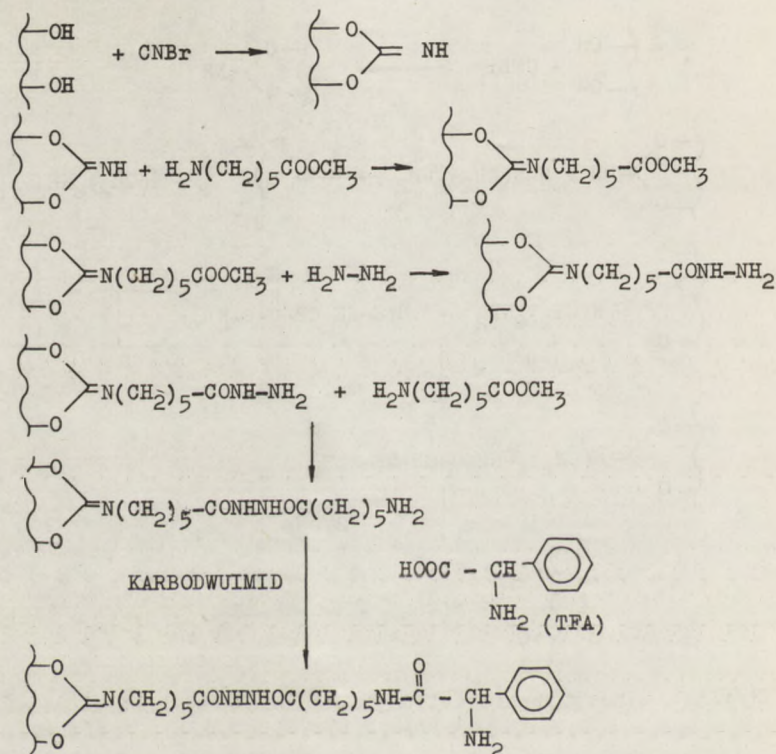
Zaletą opisanej metody jest możliwość rozdziału enzymu czynnego od zdeaktywowanego, a więc nie wiążącego aminokwasu. Zasadnicze znaczenie dla adaptacji rozdziału na aminokwaso-Sepharose innych enzymów ma dobór optymalnego stopnia substytucji.

#### Oczyszczanie fenyloalanylo-tRNA-syntetazy z jęczmienia

Niedawno T. Haertle, U. Karwowska i J. Augustyniak zastosowali metodę Robert-Gero i Waller do oczyszczania fenyloalaninowej syntetazy z jęczmienia (1973).

#### Oczyszczanie fenyloalanylo-tRNA-syntetazy na kolumnach z Sepharose-fenyloalaniny wg Forrester, Hancock (1973)

Amidy fenyloalaniny są stosunkowo dobrymi specyficznymi inhibitorami fenyloalanylo-tRNA-syntetazy z *E. coli*. Próbowano wykorzystać ten fakt do izolacji syntetazy na Sepharose zawierającej związaną kowalentlym wiązaniem amidowym fenyloalaninę. Ponieważ enzym ten wyizolowany z *E. coli* ma



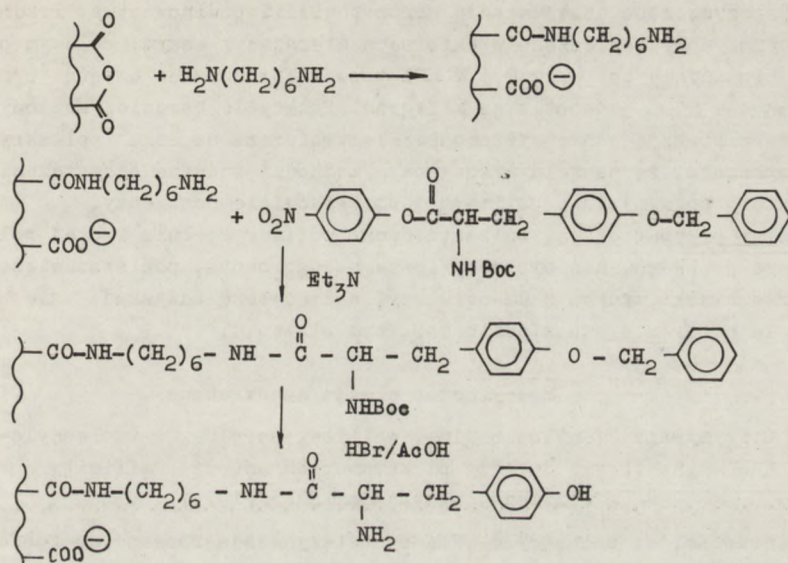
Ryc. 22. Otrzymywanie fenylalanylo-Sepharose wg Forrester (1973)

ciężar cząsteczkowy 180 000, konieczne było wprowadzenie długiego „ramienia”, aby odsunąć fenylalaninę od podłoża.

Sepharose 4B aktywowano bromocyanem, w ilości 100 mg/ml, w pH = 11, wg Cuatrecasas (1968), a następnie sprzęgano z estrem metylowym kwasu epsylon-aminokapronowego. Produkt sprzęgano następnie z trójfluoroacetylofenylalaniną przy pomocy 1-cykloheksylo-3-(2-morfolinoetylo/karbodwuimido-meto-p-toluenosulfonianu. Po usunięciu grupy trójfluoroocetowej w wodorotlenku amonu uzyskano gotowy nośnik do chromatografii powinowactwa (ryc. 22).

Profil elucji frakcji postrybosomalnej enzymów z *E. coli* wskazuje na fakt, że fenylalanylo-tRNA-synteza nie jest całkowicie zatrzymywana na kolumnie (Bufor TRIS 0,01 M, pH = 7,5), ale wpływa w osobnym pikie, niezależnie od długości „ramienia”. Elektroforeza poliakryleamidowa pozwala oceniać czystość tak otrzymanego preparatu na 90%.

Dobór odpowiedniego inhibitora enzymu jest trudny, gdyż syntetaza jest bardzo specyficzna i toleruje tylko niewielkie modyfikacje substratu. Grupa aminowa nie może być modyfikowana, a substraty modyfikowane na karbonylu są jedynie słabymi inhibitorami.



Ryc. 23. Sprzężenie kopolimeru eteru dwuwinylowego i bezwodnika maleinowego z tyrozyną wg Beikirch (1972)

Wybrano pochodną amidową, między innymi dlatego, że można ją łatwo otrzymać w postaci stałej pochodnej Sepharose. Gdyby znana była struktura centrum aktywnego enzymu, możliwy byłby także lepszy dobór inhibitora.

#### Oczyszczanie treonylo tRNA-syntetazy z drożdży piekarniczych wg Beikirch (1972)

Autorzy wykorzystali polimer zawierający tyrozynę w ostatnim etapie oczyszczania tyrozylo-tRNA-syntetazy. Nośnik ten przygotowano w sposób następujący:

Kopolimer bezwodnika maleinowego i eteru dwuwinyliwego butanodiolu, produkcji Merck, poddano reakcji z 1,6-heksanodwuamina w dioksanie. Po przemyciu i wysuszeniu produkt zawieszono w dwumetyloformamidzie i mieszano z estrem 4-nitrofenylowym t-butoksykarbonylo-O-benzyl-L-tyrozyny, w obecności trójetyloaminy. Grupy blokujące usunięto przy pomocy bromowodoru w kwasie octowym (ryc. 23).

Komórki drożdży autelizowano toluenem. Po odwirowaniu autolizatu, frakcję enzymatyczną z surowego supernatantu wytrącono przy stężeniu siarczianu amonu równym 48% nasycenia. Odwirowany osad rozpuszczono i dializowano pięciokrotnie, a następnie zawieszono w nim DEAE-celulozę w celu zaadsorbowania kwasów nukleinowych. Supernatant z DEAE-celulozy chromatografowano na CM-celulozie w gradiencie 0,2-0,8 M KCl na fosfocelulozie. Frakcje zawierające aktywność syntetazową dla tyrozyny połączone i chromatografowano na CM-celulozie w gradiencie 0-0,33 M KCl. Aktywne frakcje z tej



kolumny oczyszczano dalej metodą chromatografii powinowactwa. Przemity polimer tyrozynowy zawieszono w buforze zawierającym enzym, po czym odwirowano. Przemycie polimeru 0,3 M KCl pozwoliło odzyskać czystą syntetazę o aktywności 1400 jednostek na miligram. Przemycie bardziej stężonym buforem dało frakcje zanieczyszczone. Elektroforeza na żelu poliakryloamidowym wykazała, że na żelu tyrozynowym zachodzi znaczne oczyszczenie enzymu, który po wymyciu z polimeru jest całkowicie homogeny.

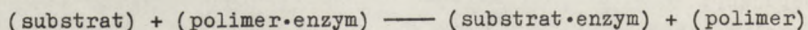
Autorzy przypuszczają, że zastosowany polimer spełnia raczej rolę wymienniczą jonowego, niż biospecyficznego adsorbentu, ponieważ wiąże on wszystkie białka wymyte z CM-celulozy, a syntetazę odzyskuje się przez przemycie buforem o odpowiednio dobranym stężeniu.

#### Specyficzna elucja substratowa

Otrzymywanie fenyloalanylo-, walilo-, serylo-, i izoleucylo-tRNA-syntetazy z drożdży piekarniczych metodą "affinity elution", wg van der Haar (1973)

Stwierdzono, że aminoacylo-tRNA-syntetazy zaadsorbowane na fosfocelulozie mogą być w sposób specyficzny wymywane przy pomocy czystych specyficznych tRNA. Metodę tę nazwano elucją powinowactwa, przez analogię do chromatografii powinowactwa. Zaletą tej metody jest wykorzystanie powinowactwa enzym-ligand, bez konieczności wiązania ligandu do podłoża.

Jak wiadomo, chromatografia powinowactwa wykorzystuje specyficzne oddziaływanie enzymu z jego inhibitorem lub analogiem substratu, przy czym ten ostatni jest związany ze stałym podłożem. Alternatywnie, można wykorzystać powinowactwo enzymu do ligandu w roztworze. W tym przypadku mieszaninę enzymów wiąże się niespecyficznie z polimerem zawierające odpowiednie grupy funkcyjne oddziaływujące z enzymem. Enzym będący obiektem zainteresowania może być wymywany specyficznie przy pomocy roztworu substratu lub inhibitora, który konkuruje o enzym z grupami funkcyjnymi polimeru, zgodnie z równaniem:



Wiele syntetaz wiąże się jonowo z fosfocelulozą. Zakładając, że ładunki dodatnie na powierzchni syntetazy są częściowo odpowiedzialne za wiązanie ujemnych ładunków tRNA, tRNA powinien wymywać syntetazę z celulozy.

Surową frakcję enzymu z drożdży przygotowano standardowymi metodami (Schmidt, 1971). Zebrano frakcję wytrącającą się pomiędzy 46 a 70% nasycenia siarczanem amonu. Po rozpuszczeniu i dializie enzym przepuszczano przez kolumnę z DEAE-celulozy, z której frakcje serylowej i walilowej syntetazy wymyto 0,1 M buforem fosforanowym, a następnie w dalszych frakcjach tego buforu wymyto syntetazę izoleucylową. Fenyloalanylo-tRNA-syntetazę wymyto 0,2 M buforem fosforanowym. Frakcje te wytrącono siarczanem amonu, rozpuszczono w buforze fosforanowym i stosowano do elucji powinowactwa wg następującej procedury:

Przemytą P-celulozę umieszczano w kolumnie i zaadsorbowano na niej odpowiednią frakcję syntetaz z buforu fosforanowego o dobranym stężeniu (0,2 M lub 0,03 M + 0,08 M KCl), pH = 7,2. Po przemyciu kolumny, elucję prowadzono tym samym buforem, zawierającym dodatkowo 2 jednostki  $A_{260}$  odpowiedniego specyficznego tRNA na mililitr. Regenerację kolumny prowadzono 0,5 M KCl. Odpowiednie enzymy po ich wymyciu z kolumny przepuszczano przez DEAE-celulozę, w celu zaadsorbowania tRNA. Czystą syntetazę wymyło 0,2 M buforem fosforanowym, a tRNA - 1 M NaCl. Odzysk tRNA wnosił 90%.

Jak wykazała elektroforeza na poliakryloamidzie, syntetazę fenyloalaninową i walinową otrzymane w stanie homogenym, o stopniu oczyszczenia odpowiednio 537 i 246. Czystość syntetazy fenyloalaminowej wynosiła 98%. Metoda ta nadaje się do dużej skali, do ok. 100 mg. Elucja powinowactwa jest więc metodą ogólną, nadającą się do izolacji różnych aminoacylo-tRNA - syntetaz. Do jej wad należy konieczność posiadania czystych specyficznych tRNA, oraz fakt, że z nieoczyszczonych frakcji enzymatycznych na P-celulozie tRNA wymywać może także inne enzymy z nim oddziaływujące (rybonukleazy, transferazy i in.). Metoda ta nadaje się również do badania oddziaływań tRNA z syntetazami. Na przykład stwierdzono, że 1 mol tRNA wymywa w przypadku fenyloalanylo-tRNA-syntetazy i walilo-tRNA-syntetazy około 1 mol enzymu, co świadczy o obecności jednego miejsca aktywnego na jednej cząsteczce enzymu o strukturze  $a_2b_2$ .

Wydaje się, że opisana metoda stanowi bardzo istotny postęp w metodach izolacji syntetaz, pozwalając obecnie na prostą preparatykę tych enzymów w stanie oczyszczonym.

#### I n n e

Niedawno Jakubowski i Pawełkiewicz podali nową metodę oczyszczania syntetaz na Sepharose zawierającej związany kowalentnie 1,6-dwuaminoheksan. W ten sposób oczyszczono walinową, leucynową i tryptofanową syntetazę z nasion łubinu. Używany przez tych autorów nośnik jest typowo podłożem stosowanym do unieruchomienia ligandów w chromatografii powinowactwa, jednak opisane jego zastosowanie wykorzystuje własności jonowymiennie raczej niż powinowactwo w ścisłym tego słowa znaczeniu. Autorzy ci przypuszczają, że własności hydrofobowe łańcucha aminoalkilowego mają decydujące znaczenie również w pozostałych opisanych tu metodach.

#### Zastosowanie chromatografii powinowactwa do rozdziału kwasów nukleinowych i ich komponentów

W chromatografii powinowactwa zastosowanie znaleźć mogą następujące oddziaływania między kwasami nukleinowymi, a innymi cząsteczkami:

- kwasy nukleinowe i ich komponenty - odpowiednie enzymy, np. syntetazy, polimerazy, rybonukleazy,
- kwasy nukleinowe, poli i oligonukleotydy - komplementarne sekwencje nukleotydowe (dzięki parowaniu zasad),

- zasady, nukleozydy, nukleotydy-oddziaływujące zasady, nukleozydy, nukleotydy (z wykorzystaniem możliwości tworzenia wiązań wodorowych i asocjacji warstwowej).

Nośniki stosowane do rozdziału kwasów nukleinowych podzielić można więc na następujące grupy:

- polimery naturalne zawierające związane kowalentnie
  - nukleotydy i nukleozydy
  - oligo- i polinukleotydy syntetyczne
  - kwasy nukleinowe
- polimery syntetyczne zawierające kowalentnie związane
  - zasady
  - nukleozydy
  - nukleotydy
  - oligo- i polinukleotydy syntetyczne
  - kwasy nukleinowe
- inne nośniki o zastosowaniu zbliżonym do chromatografii powinowactwa
  - polimery dwuhydroborylowane
  - polimery merkurowane
  - inne

Najczęściej są stosowane obecnie stałe pochodne kwasów nukleinowych, a w szczególności RNA-celulozy. W rozdziale tym omówimy reprezentatywne przykłady wybranych metod, spośród najbardziej popularnych. Technika hybrydyzacji, polegająca na asocjacji homologicznych sekwencji RNA do DNA unieruchomionego na filtrach nitrocelulozowych lub podobnych pozostaje poza zakresem tematycznym niniejszego przeglądu.

#### Polimery naturalne

Kwasy nukleinowe wiązano kowalentnie poprzez grupy hydroksylowe do acetylowanej fosfocelulozy przy pomocy dwucykloheksylokarbodwuimidu w pirymidynie i metanolu. Oligonukleotydy i kwasy nukleinowe przyłączono również przez końcową grupę fosforanową do niemodyfikowanej celulozy, przy pomocy karbodwuimidów rozpuszczalnych w wodzie. Tak otrzymane nośniki znalazły zastosowanie do frakcjonowania, oczyszczania i oznaczeń strukturalnych różnych rodzajów kwasów nukleinowych. Te same nośniki stosować można do oczyszczania enzymów metabolizmu RNA i DNA.

Badania Boscha (1961) nad rozdziałem rRNA na celulozie zawierającej kowalentnie związaną adenozyne, guanozyne, cytydynę i urydynę stanowią jeden z wcześniejszych przykładów zastosowania chromatografii powinowactwa. Stwierdzono, że dobry rozdział rRNA w gradiencie NaCl uzyskuje się na adenozyne-celulozie. U- i C-celuloza wykazywała bardzo silne powinowactwo do badanego rRNA, natomiast G-celuloza - mniejsze niż A-celuloza.

Rozpowszechnione jest stosowanie polinukleotydo-celulozy do frakcjonowania oligo-, polinukleotydów i homopolimerów. Gilham (1971) dokonał przeglądu metod stosowanych do wiązania komponentów kwasów nukleinowych z celulozą. W polimerach takich łańcuchach polinukleotydy winien być przyczepiony do matrycy określonymi wiązaniami kowalentnymi, tak aby punkt

przyczepienia i orientacja biopolimeru była znana. Zazwyczaj wybiera się wiązanie do końców łańcucha polinukleotydu. Zasadą rozdziału są różnice w stabilności sparowanych kompleksów między różnymi składnikami rozdzielanej mieszaniny, a nukleotydo-polimerem. Metody wiązania polinukleotydów z celulozą można podzielić na dwie zasadnicze grupy: kondensacja syntetycznego polinukleotydu na celulozie w warunkach bezwodnych (Gilham 1964), kowalencyjne wiązanie syntetycznych lub naturalnych polinukleotydów z celulożą w środowisku wodnym (Gilham 1968). Pierwsza metoda polega na polimeryzacji chemicznej nukleotydów w środowisku bezwodnym. Po dodaniu celulozy zaktywowane grupy fosforanowe powstałego łańcucha kondensują się z grupami hydroksylowymi celulozy. Produkt końcowy zawiera homopolimery długości do ok. 10 nukleotydów, związane z celulożą od końca 5' lub 3' w zależności od tego, czy substratem były 5' czy 3' monofosforany. Metoda ta jest jednak ograniczona faktem, że przyłączać można jedynie nukleotydy o takiej długości i sekwencji, jakie chemicznie dają się skondensować w stosowanych warunkach. Bardziej uniwersalna jest druga grupa metod, gdyż w ten sposób łączyć można z celulożą zarówno syntetyczne jak i naturalne polimery o dowolnej długości.

Według Gilhama (Nylol, 1966), nukleozyd łączy się z celulożą przy pomocy końcowej grupy fosforanowej, w środowisku wodnym, pod wpływem karbodiimidu rozpuszczalnego w wodzie. Końcowy produkt reakcji jest podobny, jak chodzi o sposób połączenia z matrycą, do produktu polimeryzacji w środowisku bezwodnym. Pewne ograniczenie stanowi konieczność blokowania grupy 2' lub 3' - hydroksylowej rybonukleotydu, o ile fosfor znajduje się odpowiednio w pozycji 3' lub 2', w celu zapobieżenia powstawaniu cyklicznego fosforanu. Inna metoda (Gilham 1971) przewiduje wiązanie nukleozydu utlenionego nadjodanem, w roztworze wodnym, do aminoetylocelulozy. Redukcja produktu borowodorkiem sodowym stabilizuje powstałe wiązania. Można także wiązać nukleozydy poprzez grupę hydroksylową z polimerem zawierającym grupy fosforanowe (np. z fosfocelulożą), przy pomocy dwucykloheksylokarbodiimidu w pirydynie (Adler 1962) lub metanolu (Bautz 1962). Saxinger (1972) opracował prosty sposób wiązania RNA do celulozy w postaci bibuły lub proszku przez sprzęganie w pirydynie przy pomocy karbonylodwuimidazolu. Przed umieszczeniem w pirydynie na celulożę nanosi się roztwór RNA i suszy. Podobną procedurę stosować należy do wiązania RNA z fosfocelulożą. Fosfocelulożę w formie soli trójbutyloaminiowej aktywuje się karbonylodwuimidazolem w formamidzie, przemywa i suszy. Po naniesieniu RNA na celulożę i wysuszeniu właściwą reakcję przeprowadza się w pirydynie.

Smith (1972) podaje sposób fotochemicznego wiązania RNA z celulożą. Na metylowanej celulozie suszy się roztwór RNA, poczym suchą celulożę zawieszają w absolutnym etanolu i naświetlają niskociśnieniową lampą rtęciową. Można w ten sposób uzyskać 96% związania tRNA w ilości 5 mg na 5g celulozy. Tak przygotowane nośniki celulozowe stosowano między innymi do: - izolacji RNA specyficznego dla DNA faga  $T_4$  na celulozie - DNA  $T_4$  (Adler, 1962), (Bautz, 1962),

- izolacji Poli-A z *E.coli*, *S.cerevisiae*, komórek rakowych i in. na poli-T-celulozie (Edmonds, 1963; 1969; 1970; 1970a; 1971; 1971a),
- rozdziału oligonukleotydów o różnej sekwencji i składzie nukleotydowym w gradiencie temperatury z celulozy zawierającej oligonukleotydy o określonej sekwencji (Astel 1971),
- frakcjonowania mRNA z komórek KB na poli-U-Sepharose) (Lindberg, 1972), Poli-U wiązano do Sepharose przy pomocy znanej procedury z bromocyjanem (Wagner, 1971),
- izolacji genów dla rRNA na rRNA-celulozie, (Smith, 1972),
- hybrydyzacji DNA z RNA na bibule zawierającej kowalentnie związany RNA (Saxinger, 1972),

Znane są także metody wiązania DNA i RNA do agaru (Wagner, 1971; Mc Carthy, 1964; Boulton, 1964; 1971).

Lamed (1973) przedstawił niedawno ogólną metodę sprzęgania nukleotydów z agarozą. Przy pomocy bromocyjanu sprzęga się z nośnikiem dwuhydrydów kwasu adypinowego, a następnie do powstałego w ten sposób hydrydu agarozy przyłącza się utleniony nadjodanem nukleotyd.

Robberson (1972) opisuje inną metodę przygotowania hydrydu agarozy do sprzęgania RNA przez koniec 3'. Z agarozą sprzęga się ester metylowy kwasu epsylon-aminokapronowego, przekształca ester w hydryd, oraz blokuje grupy karboksylowe powstałe podczas przez hydrolizę alkaliczną podczas sprzęgania z CNBr, przy pomocy amidu glicyny, stosując karbodwuimid rozpuszczalny w wodzie. Metodę bromocyjanową wg Cuatrecasas wykorzystuje się do sprzęgania RNA i DNA (Poonian). Można tak przyłączać kwasy nukleoinowe jedniniciowe. Dwiniciowe są nieaktywne. Ogólne metody przygotowania aktywnych pochodnych agarozy, opracowane przez Cuatrecasas mogą być także wykorzystane do przyłączania kwasów nukleinowych. Wiązanie kwasów nukleinowych z agarozą przebiega na ogół z większą wydajnością, niż z celulozą. Nośniki takie charakteryzują się także większą dostępnością ligandu dla innych makrocząsteczek.

#### P o l i m e r y   s y n t e t y c z n e

Kwasy nukleinowe i syntetyczne nukleotydy wiązano z żelem poliakryloamidowym (Wada, 1968; Cavalieri, 1970). Do tego celu mogą służyć ogólne metody przygotowywania pochodnych poliakryloamidu (Cuatrecasas, 1970), lub handlowe preparaty typu Enzacryl (Koch-Light), Pochodne te są jednak dotychczas mniej wykorzystane niż podobne polimery naturalne. Obszerne badania przeprowadzono natomiast nad otrzymywaniem polimerów całkowicie syntetycznych z pochodnych podstawionych grupami winylowymi resztami kwasu akrylowego lub innymi grupami zdolnymi do polimeryzacji. Polimery takie stanowią pewne analogi kwasów nukleinowych i nadają się niekiedy do rozdziału komponentów kwasów nukleinowych (Schott 1970, 1970a, 1971, 1972, Seita 1971, 1972, 1972a, 1973, 1973a, Gerber 1970, 1970a).

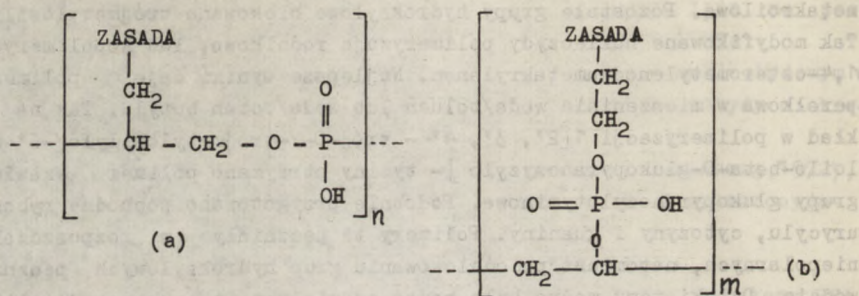
Schott ze współpracownikami opracował syntezę pochodnych nukleozydów zawierających jedną lub dwie grupy hydroksylowe cukru podstawione grupą

metakroilową. Pozostałe grupy hydroksylowe blokowano trójmetylosilylem. Tak modyfikowane nukleozydy polimeryzują rodnikowo, lub kopolimeryzują z 1,4-czterometylenodwumetakrylanem. Najlepsze wyniki daje polimeryzacja perełkowa w mieszaninie woda/toluen lub woda/octan butylu. Tak na przykład w polimeryzacji 1[2', 3', 4' - trój-O-/trójmetylosilylo/-6'-metakryloilo-beta-D-glukopyranozyzylo]- tyminy otrzymano polimer zawierający grupy glukopyranozylotyminowe. Podobnie przygotowano pochodne rybozydów uracylu, cytozyny i guaniny. Polimery te pęczniały w rozpuszczalnikach niepolarnych, natomiast po odblokowaniu grup hydroksylowych pęczniały w wodzie. Dzięki temu można było badać oddziaływanie „nukleozodożeli” z komponentami kwasów nukleinowych w różnych warunkach. Zastosowanie tych polimerów do chromatografii kolumnowej pozwoliło rozdzielać mieszaniny nukleozydów. Wykorzystano tu U, A, C i G - żele. Stwierdzono, że w obecności wody nukleozydy oddziałują silniej z żelem, umożliwiając rozdział nukleozydów od mononukleotydów i dwunukleozydofosforanów. W roztworach buforowych jednak nukleozydy i dwunukleozydofosforany wymywały się w jednym pikcie. W środowisku wodnym można także rozdzielać mieszaniny mono-dwu i trójnukleotydów. Stopień zatrzymywania nukleozydów na nukleozodożelach zwiększa się ze wzrostem udziału puryn. Autorzy wnioskują z tego, że oddziaływania mają głównie charakter asocjacji warstwowej zasad. Możliwe jest także parowanie odbiegające od koncepcji Watsona-Cricka. W roztworach wodnych natomiast dominujące jest klasyczne parowanie zasad z udziałem wiązań wodorowych.

Seita ze współpracownikami syntetyzował polimeryczne analogi kwasów nukleinowych, głównie w celu badań fizykochemicznych asocjacji z kwasami nukleinowymi i samoasocjacji. Były to polimery zawierające zasady purynowe i pirymidynowe, nie zawierające grupy cukrowej, rozpuszczalne w wodzie. Polimery te otrzymano przez kondensację związków typu 3-fosforanów 1-puryno/-2,3-dwuhydroksypropan, przy pomocy dwucykloheksylokarbodwuimidu w dwumetyloformamidzie. Na przykład w sposób ten przygotowano z 3'fosforanu 7-/2',3'-dwuhydroksypropylo/teofiliny odpowiedni oligomer o ciężarze cząsteczkowym ok. 1000, który oczyszczono przez chromatografię na Sephadex G-25 (ryc. 24a). Związek ten nie wykazywał hiperchromizmu w oddziaływaniu z DNA lub RNA.

Inny rodzaj polimerów autorzy ci otrzymali przez kondensację alkoholu poliwinylowego z N-/2'-dwuwodorofosforano-etylo/ uracylem lub odpowiednimi pochodnymi cytozyny, adeniny, hipoksantyny, tyminy a także z 5'-adenozynotrójfosforanem. Otrzymano również mieszane polimery zawierające równocześnie adeninę i tyminę oraz adeninę i uracyl. W tych polimerach, w odróżnieniu od poprzednio opisanych, grupa fosforanowa nie wchodzi w skład łańcucha alkoholu poliwinylowego, a dołączona jest do niego przez wiązanie fosfoestrowe (ryc. 24b).

Homopolimery tej grupy wykazywały hipochromizm rzędu 4%. Heteropolimery typu A-T i A-U wykazywały w oddziaływaniu z zdenaturowanym RNA hipochromizm rzędu 16%. Można było także zmierzyć temperaturę topnienia sa-



Ryc. 24. Polimeryczne analogi kwasów nukleinowych

nych polimerów (30–35°C). Nie wykonano prób zastosowania tych polimerów w chromatografii powinowactwa.

Niedawno Harpold (1973) związał adenozybonomofosforan z chlorometylowanym polistyrenem typu Merrifielda, poczym polimer poddano reakcji z odpowiednim blokowanym bezwodnikiem fenyloalaniny lub glicyny. Po usunięciu grup ochronnych otrzymano związek przypominający końcową adenozybę tRNA ze związanym aminokwasem. Podobnie otrzymano aminoacylo-CMP i aminoacylo-AMP na polimerze, nie badano natomiast możliwości zastosowania ich do chromatografii powinowactwa.

Ponieważ dobre syntetyczne nośniki polimerowe znane są od niedawna, literatura na temat ich zastosowania w chromatografii powinowactwa kwasów nukleinowych i ich komponentów jest mniej bogata, niż w przypadku pochodnych celulozy i agarozy. Niemniej jednak roszą one duże nadzieje na otrzymanie specyficznych sorbentów o ściśle sprecyzowanych własnościach.

#### Inne stałe polimery o zastosowaniu zbliżonym do chromatografii powinowactwa

Niepodstawione grupy 2', 3'-diolowe rybonukleozydów, 5'-rybonukleotydy oraz znajdujące się na końcu 3' kwasów rybonukleinowych, mają charakterystyczne własności, które można wykorzystać do rozdziału i badań strukturalnych kwasów nukleinowych. Między innymi mogą one tworzyć kompleksy z anionami boranowymi. Własność ta została wykorzystana do opracowania metod chromatograficznych i elektroforetycznych do rozdziału komponentów kwasów nukleinowych (Khym 1967). Obserwowane efekty polegają na zmianie charakterystyki fizycznej diolu w obecności jonu boranowego, a w szczególności dzięki dodatkowemu ładunkowi ujemnemu diolu w formie skompleksowanej. Stałe polimery dwahydroborylowe były znane od dawna (Solms, 1951; Letsinger, 1959), ale nie badano możliwości ich zastosowania do rozdziału związków diolowych. Gilham ze współpracownikami (Weith, 1970, Rosenberg 1971, 1971a, 1972) opracowali metody syntezy i zastosowania dwahydroborylowych pochodnych celulozy. Karboksymetylocelulozę przekształcono w hydrazyd, a następnie w azyd, który z kolei poddano reakcji z kwasem m-aminobenzenoborowym. W ten sposób otrzymano N-/m-dwahydroksybo-

rylofenylo/karbamylometylocelulozę, zawierającą 0,2 M grup borowych na gram suchej celulozy. Inną pochodną otrzymano w sposób następujący: Kwas m-aminobenzenoborowy przekształcono w kwas N-/m-dwuhydroborylofenylo/bursztynowy, przez reakcję z bezwodnikiem bursztynowym. Następnie kondensowano ten produkt z aminoetylo p--toluenosulfonianem N-cykloheksylo N'-beta -/4-metylomorfolino/ etylokarbodwuimidu. Otrzymano N - [ N'-/m-dwuhydroborylofenylo/sukcynamylo ] aminoetylocelulozę zawierającą 0,6 nM grup borowych na gram suchego polimeru. Następnie badano możliwości zastosowania nośników do rozdziału nukleozydów i cukrów, w pH = 7,5. Stwierdzono, że polimery nadają się dobrze do rozdziału nukleozydów oraz oligo- i polinukleotydy. Stwierdzono, że objętość retencji dla danego nukleotydu zależy od:

- dostępności niepodstawionych grup 2', 3'-diolowych
- natury zasady w sąsiedztwie grupy diolowej
- ilości ładunków w pobliżu grupy diolowej
- długości łańcucha i ogólnego ładunku nukleotydu
- pH roztworu elucyjnego
- siły jonowej i natury kationów w roztworze

Polinukleotydy zawierające końcową grupę fosforanową mogą być tak modyfikowane chemicznie, aby były zatrzymywane na kolumnach z dwuhydroborylo-celulozą, na przykład przez wprowadzenie na końcową grupę fosforanową łańcucha grupy sorbitolowej lub N-metyloglukaminy. Opracowaną metodę stosowano do izolacji końcowego 3'-fragmentu kwasu nukleinowego z hydrolizatów enzymatycznych, do rozdziału produktów enzymatycznej syntezy oligonukleotydy oraz do izolacji końcowych nukleozydów z dużych fragmentów kwasów nukleinowych, po uprzedniej modyfikacji końcowego fosforanu sorbitolem lub N-metyloglukaminą.

Schott (1972, 1973) znalazł prosty sposób otrzymywania syntetycznych polimerów metakrylowych postawionych resztami kwasu borowego. Przez reakcję chlorku kwasu metakrylowego z kwasem m-aminobenzenoborowym otrzymano odpowiedni monomer. Przeprowadzono polimeryzację rodnikową sieciując polimer czterometylenodwumetakrylanem.

Otrzymany żel borowy zastosowano do chromatografii komponentów nukleinowych. Ze względu na tworzenie kompleksu między grupami boranowymi a cis-diolowymi, 5-fosforany rybonukleozydów, oligodezoksynukleotydy zakończone rybonukleotydem oraz wolne tRNA są adsorbowane przy wysokim stężeniu soli przy pH = 8,5, podczas gdy dezoksyrybonukleozydy, dezoksynukleozydofosforany, 2' lub 3' fosforany rybonukleotydy, oligodezoksynukleotydy i aminoacylo-tRNA są wymywane w martwej objętości kolumny. Kompleksy dioli z grupą boranową mogą zostać zdysocjowane przez obniżenie pH i stężenia soli eluentu, co powoduje wymycie zaadsorbowanych związków z kolumny. Zjawisko to pozwala na łatwy rozdział rybo- od dezoksyrybonukleotydy, różnych izomerów fosforanów nukleozydów oraz dezoksy- oligomerów zakończonych rybonukleotydem, o różnej długości łańcucha. Duże możliwości metody ilustruje doskonały rozdział p/dT<sub>5</sub> od p/dT<sub>4</sub>-rU. Do



najciekawszych zastosowań należy oddzielanie aminoacylo-tRNA od wolnych tRNA, co pozwala na oczyszczenie specyficznych tRNA przez aminoacylację i chromatografię na polimerze boranowym.

Pojemność żelu zależy od długości łańcucha rozdzielanego związku i może wahać się w bardzo szerokich granicach. Prawdopodobnie wynika to z mniejszej dostępności grup boranowych wewnątrz polimeru dla dużej cząsteczki oligonukleotydu. Znaczna część grup boranowych wewnątrz polimeru jest w tych warunkach niedostępna, a czynne są jedynie grupy powierzchniowe. Różne konformacje tRNA o różnej dostępności grup hydroksylowych 3'adenozyny mogą także wpływać na pojemność dla tych cząsteczek. Zaletą polimeru w porównaniu z dwuhydroborylowaną celulozą jest możliwość kontroli stopnia usieciowania oraz odporność na degradację biologiczną.

#### P o l i m e r y   m e r k u r o w a n e

Nukleozydy w obojętnym lub alkalicznym pH reagują ze związkami rtęciowymi. Pierwszym centrum reakcji z jonem metylortęciowym jest wiązanie N/3/-H urydyny lub tymidyny, następnym wiązanie N/1/-H guanozyny. W wyższym stężeniu związku rtęcioorganicznego i w kwaśnym pH zachodzą także reakcje na atomach azotu guanozyny, adenozyne i cytydyny. Atomy tlenu, zasad i grup fosforanowych, jak się wydaje, nie oddziałują z wodorotlenkiem metylortęciowym, w stężeniu do 0,1 M. Należy więc oczekiwać, że w odpowiednich warunkach eksperymentalnych, przy pH większym od 8, zasady będą kompleksować się z grupą metylortęciową, w kolejności T/U > G > A > C. Chcąc wykorzystać ten fakt, Gruenwedel (1971) przygotowali polimery na bazie dekstranu zawierającego rtęć. Sephadex G-25 eteryfikowano 1-alliloksy-2,3-epoksypropanem, po czym traktowano octanem rtęciowym, zgodnie z procedurą Shainoffa (1968). Zawartość rtęci w polimerze po przemyciu wynosiła 0,2-0,3 mM/g suchego produktu. Kolumny chromatograficzne z merkurowanym Sephadexem równowagowano buforem boranowym o stężeniu 0,1 M, pH = 9,2. Wymywanie mononukleozydów prowadzono w gradiencie pH 9,2-12,5. Kolejność elucji zgadzała się z przewidywaniami. Zauważono także, że jednoniciowy DNA jest w martwej objętości. Autorzy proponują zastosować tę metodę do rozdzielania materiału genetycznego, w szczególności DNA i tRNA.

Zakavat (1972) wykorzystywał merkurowany Sephadex do izolacji cysteinylo-tRNA z drożdży piekarniczych. Nośnik przygotowano wg metody Eldjarna (1963), stosując Sephadex G-25 i 3,6-dwu/acetonomercuryetylo/dioksan. Mieszaninę tRNA aminoacylowano preparatywnie L-/35-S/cysteina, oczyszczono w celu usunięcia niezwiązanego aminokwasu, i w roztworze tego preparatu zawieszono merkurowany polimer. Polimer następnie przemyto kilkakrotnie wodą i poddano elucji wodą i buforem TRIS pH = 7,2, o stężeniu 0,02 M. Zastosowanie buforu o stężeniu 0,07 M odgrywa ligand rtęciowy od nośnika. Uzyskano preparat tRNA specyficznego dla cysteiny o stopniu wzbogacenia 43 razy. Metoda polega na wiązaniu cysteinylo-tRNA przez nośnik dzięki obecności grup sulfhydrylowych cysteiny. Inne tRNA w zastosowanych warunkach nie wiązały się z polimerem.

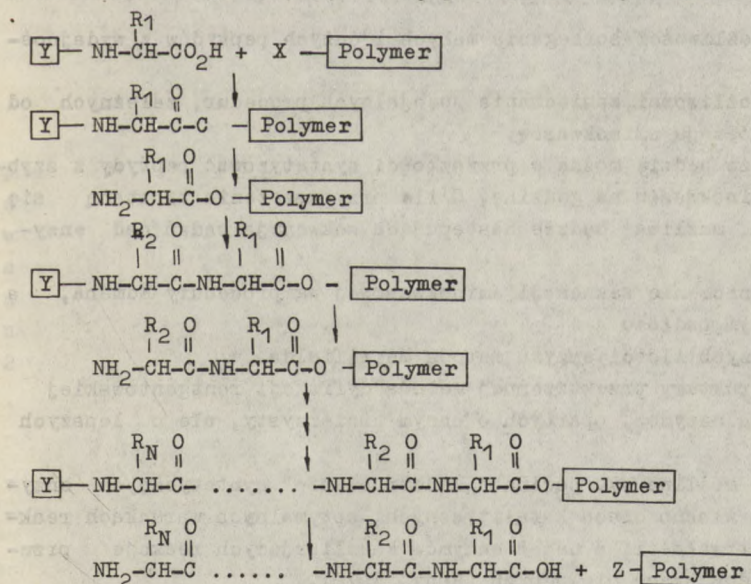
Kwasy nukleinowe szczególnie nadają się do rozdzielania metodą chromatografii powinowactwa, ze względu na bogactwo i różnorodność cząstek biologicznych, z którymi oddziałują. Sądzymy, że potencjał tych metod nie jest w pełni wykorzystany i będą one dalej rozwijać się szybko.

#### Synteza i degradacja na stałych nośnikach

Stale nośniki zostały dotychczas wykorzystane do syntezy peptydów, oligonukleotydów i oligosacharydów, a także do badań sekwencyjnych nukleotydów i peptydów.

#### Synteza peptydów na podłożu polimerowym

Synteza peptydów na stałym, nierozpuszczalnym podłożu opracowana została przez Merrifielda (1965). Od czasu jej odkrycia była wielokrotnie udoskonalana i obecnie pozwala na preparatywne otrzymywanie peptydów o stosunkowo długim łańcuchu, na przykład dekapeptydy można otrzymać w ilościach około 40 g. Zasadę metody przedstawia ryc. 25.



Ryc. 25. Schemat syntezy peptydów na podłożu stałym metodą Merrifielda

Blokowany na grupie aminowej aminokwas dołącza się do podłoża w postaci usieciowanego, chlorometylowanego polistyrenu. Po usunięciu grupy ochronnej Y, przyłącza się następny, również zablokowany aminokwas do grupy aminowej pierwszego aminokwasu. Z kolei reakcję odblokowywania i przyłączenia następnego aminokwasu prowadzi się aż do uzyskaniażądanego peptydu. W ostatnim etapie polipeptyd odblokowuje się i odłącza od podłoża. Minimalna ilość etapów w celu otrzymania peptydu o długości N

wynosi 2N. Dodatkowe etapy konieczne są w celu blokowania i odblokowywania aminokwasów wielofunkcyjnych, jak lizyna, histydyna, kwas asparaginowy. Prostota i dogodność metody wiąże się z faktem, że dzięki zastosowaniu stałego nośnika podczas syntezy wykonuje się jedynie operacje mieszania i sączenia polimeru. Nie są konieczne skomplikowane rozdziały produktów od substratów. Synteza Merrifielda została znacznie ulepszona dzięki zastosowaniu tzw. żywic pelikularnych (patrz wyżej), lepszych grup ochronnych, automatyzacji i kontroli procesu przy pomocy taśmy perforowanej lub minikomputera. Dzięki temu udało się zsyntetyzować liczne enzymy i białka, o ciężarze cząsteczkowym dochodzącym do kilkudziesięciu tysięcy. Wg Rony (1972) konieczne są jeszcze następujące dalsze ulepszenia:

- zmniejszenie czasu sprzęgania przy zachowaniu 99,95% wydajności i 0,00% recemizacji
- dalsze ulepszenie automatyzacji syntezy w małej i dużej skali
- ograniczenie kontroli dyfuzyjnej kinetyki procesu podczas sprzęgania i przemywania
- znalezienie możliwości sprzęgania małych i dużych peptydów z wydajnością 99,5%
- znalezienie możliwości zaniechania specjalnych procedur, zależnych od sekwencji i rodzaju aminokwasów.

Rony sądzi, że będzie można w przyszłości syntetyzować peptydy z szybkością do 20 aminokwasów na godzinę, o ile przypuszczenia te staną się rzeczywistością, możliwa będzie następująca sekwencja badań nad enzymami:

- izolacja i oznaczenie sekwencji aminokwasowej wg procedury Edmana, a także na stałym podłożu
- synteza większych ilości enzymu metodą Merrifielda
- oznaczenie struktury przestrzennej metodą dyfrakcji rentgenowskiej
- synteza nowych enzymów, opartych o enzym macierzysty, ale o lepszych własnościach.

W ten sposób możliwe być powinno „konstruowanie” syntetycznych enzymów o dobranych własnościach katalitycznych, optymalnych warunkach reakcji oraz dużej trwałości, a nawet enzymów katalizujących reakcje przebiegające w środowiskach niewodnych (Rony, 1972).

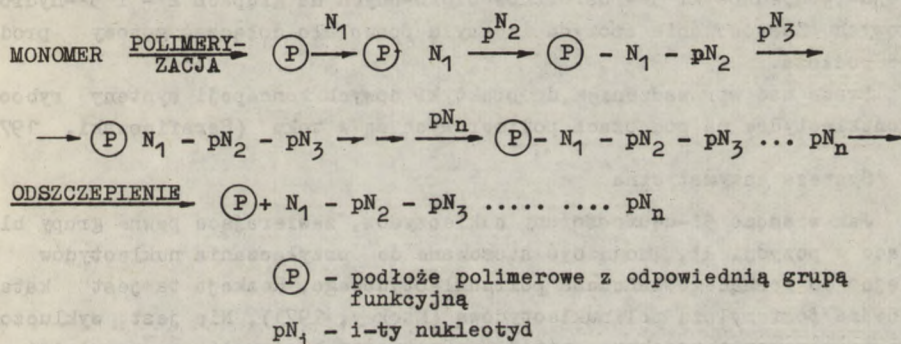
Szczególne informacje na temat syntezy peptydów na stałych podłożach znaleźć można w monografii Stewarta i Younga "Solid State Peptide Synthesis" (1969).

Chemiczna synteza oligonukleotydów na podłożu polimerowym

Wobec istnienia niedawno wydanego przeglądu na temat (Serafinowski, 1972) podamy tylko kilka podstawowych informacji. Podobnie, jak w przypadku peptydów, oligonukleotydy syntetyzowano zarówno na podłożach rozpuszczalnych i nierozpuszczalnych. Tematycznie wiąże się z tym opracowaniem jedynie druga metoda.

W syntezie wyróżnić można następujące etapy (Ryc. 26):

- przygotowanie podłoża z odpowiednią grupą funkcyjną
- przyłączenie pierwszego nukleozydu do podłoża
- etapy powiększania łańcucha
- oddzielenie łańcucha oligonukleotydowego od podłoża



Ryc. 26. Schemat syntezy oligonukleotydów na podłożu polimerowym

Przegląd rodzajów stosowanych podłoży podano powyżej. Podłoża nierozpuszczalne w stosunku do rozpuszczalnych charakteryzują się mniejszą szybkością reakcji (kontrola dyfuzyjna) i niższą wydajnością tworzenia wiązań internukleotydowych, ale ilościową regeneracją podłoża i łatwiejszym tworzeniem centrów inicjacji łańcucha przez przyłączenie pierwszego nukleozydu. Stosunkowo więcej wiadomo o syntezie dezoksyrybonukleotydów niż rybonukleotydów, ze względu na trudności związane z blokowaniem grup 2'-hydroksylowych w przypadku tych ostatnich.

#### Synteza dezoksyrybonukleotydów

Stosowane metody różnią się między sobą:

- rodzajem podłoża
  - miejscem przyłączenia pierwszego nukleozydu
    - przez grupę 5'-hydroksylową (np. Melby, 1967; 1969; 1969a; Kusam, 1970)
    - przez grupę aminową zasady (Letsinger, 1965, 1966),
    - przez grupę 5'-fosforanową (Blacburn, 1967),
  - sposobem przyłączenia następnych podjednostek
    - przyłączanie 5'-nukleozydofosforanów (Melby, 1967, 1969, 1969a),
    - fosforylacja, następnie przyłączanie nukleozydów (Letsinger, 1965).
- Wszystkie te metody pozwalają jedynie na syntezę krótkich oligomerów.

#### Synteza rybonukleotydów

Na temat ten w literaturze istnieje niewiele informacji. Yip (1971) stosował polistyren modyfikowany bezwodnikiem bursztynowym. Nukleozyd blokowany w pozycji 2', 3' przyłączono do polimeru przez grupę 5'-hy-

droksylową. Po odblokowaniu grupy 3'-hydroksylowej przyłączono kolejny 5'-fosforan nukleozydu, zablokowany w pozycji 2', 3', Ohtsuka (1972) syntetyzował zablokowane rybonukleotydy na polimerze 4'-aminofenoksymetylopolistyrenie. Przyłączanie pierwszej podjednostki nastąpiło poprzez grupę 3'-fosforanową. Po odblokowaniu grupy 5'-hydroksylowej przyłączano kolejne podjednostki 3'-fosforanów blokowanych na grupach 2'- i 5'-hydroksylowych. Zastosowanie azotynu izoamylu pozwalało dołączać gotowy produkt od podłoża.

Prace nad wprowadzeniem do praktyki nowych koncepcji syntezy rybooligonukleotydów na podłożach polimerowych są w toku (Serafinowski, 1972).

#### Synteza enzymatyczna

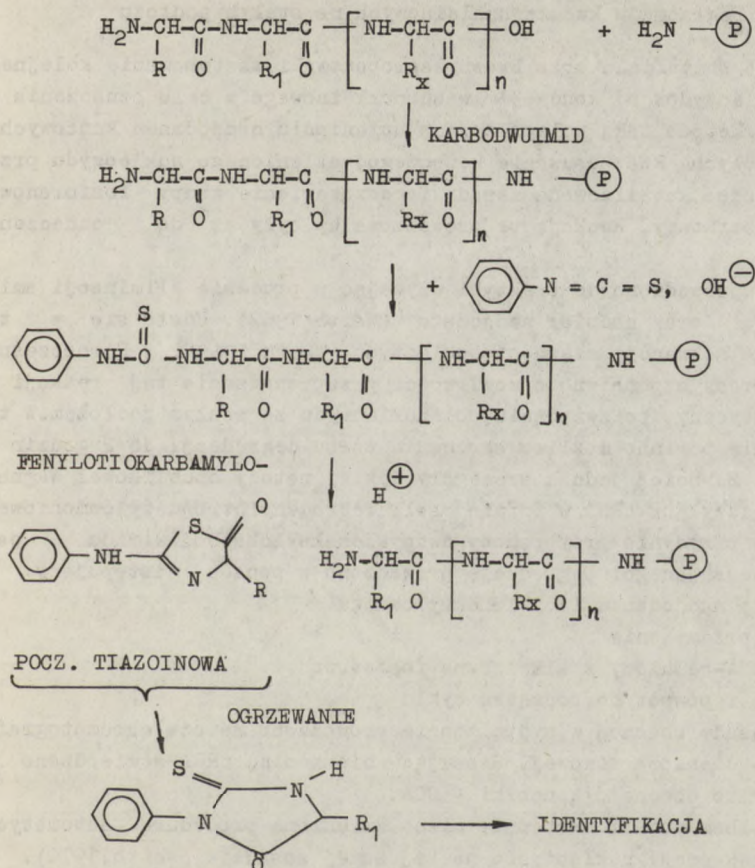
Jak wiadomo 5'-dwufosforany nukleotydów, zawierające pewne grupy blokujące w pozycji 2', mogą być stosowane do przyłączania nukleotydów kolejno do rosnącego łańcucha polinukleotydowego. Reakcja ta jest katalizowana fosforylazą polinukleotydową (Mackey, 1971), Nie jest wykluczone, że zastosowanie podobnych metod enzymatycznych pozwoli przezwyciężyć niektóre trudności związane z syntezą rybooligonukleotydów na stałym podłożu.

#### Oznaczenie sekwencji polipeptydów metodą degradacji Edmana na stałym podłożu

Metoda sekwencjonowania białek według Edmana, na stałym podłożu (Laurson 1971) polega na przyłączeniu badanego peptydu do nośnika, najlepiej typu polikularnego, a następnie kolejnym odrywaniu po jednym końcowych aminokwasów i identyfikowaniu ich chromatograficznie. Możliwe jest zastosowanie automatycznego analizatora sekwencji do przeprowadzenia całej procedury.

Pierwszym etapem jest przyłączenie peptydu do stałego podłoża zawierającego wolne, pierwszorzędowe grupy aminowe, poprzez zablokowanie końcowej grupy aminowej peptydu i zaktywowanie końcowej grupy karboksylowej (karbonylodwuimidazolem (Laurson, 1971) lub karbodwuimidem (Maher, 1971). Następnie po odblokowaniu grupy aminowej, przeprowadza się reakcję fenylotioizocyjanianu z peptydem na podłożu, w nieco zasadowym roztworze i w środowisku azotu. Otrzymany fenylotiokarbamyl-peptydo-polimer traktuje się bezwodnym kwasem, w celu oderwania pochodnej tiazolinowej ostatniego aminokwasu. Pochodną tą oddziela się przez odfiltrowanie od peptydo-polimeru i przekształca w pochodną fenylotiohydantoinową tego aminokwasu przez ogrzewanie w kwaśnym roztworze wodnym. Pochodną fenylotiohydantoinową identyfikuje się przy pomocy chromatografii bibułowej, cienkowarstwowej, lub elektroforezy. Następnie cały ciąg, począwszy od reakcji z fenylotioizocyjanianem powtarza się aż do oznaczenia sekwencji całego peptydu (ryc. 27).

Fenylotiohydantoinowe pochodne aminokwasów można też poddawać hydrolyzie do wolnych aminokwasów i charakteryzować w tej postaci standardowymi



Ryc. 27. Degradacja Edmana na stałym podłożu

metodami, na przykład przy pomocy analizatora aminokwasów. Pewne ograniczenie metody stanowi fakt, że grupy karboksylowe w łańcuchach bocznych kwasu asparaginowego i glutaminowego także ulegają aktywacji karbonyldwuimidazolem, co powoduje wiązanie z żywicą lub powstanie cyklicznego imidu, uniemożliwiającego dalszą degradację, w przypadku kwasu asparaginowego (Laursen, 1971). Opracowano procedury blokady bocznych grup karboksylowych (Mross, 1971), a również alternatywne metody wiązania peptydów z podłożem (Laursen, 1972).

Inną metodę degradacji peptydów na podłożu polimerowym w postaci nierozpuszczalnej żywicy izocyjanianowej opracował Dowling (1969).

## Degradacja kwasów nukleinowych na stałym podłożu

W roku 1953 Whitefield oraz Brown zaproponowali zastosowanie kolejnego odrywania nukleotydów od końca 3' kwasu nukleinowego w celu oznaczenia jego sekwencji. Metoda taka polegałaby na utlenianiu nadjodanem końcowych grup cis-diolowych RNA, usuwanie końcowego, utlenionego nukleozydu przez beta-eliminację katalizowaną zasadą i odszczepienie grupy fosforanowej przy pomocy fosfatazy. Reakcje te prowadzone by były aż do oznaczenia sekwencji.

Metodę tę wprowadzono do praktyki używając w procesie eliminacji aminy pierwszorzędowej oraz nadmiar nadjodanu (Weith 1967). Udało się w ten sposób ustalić sekwencję szesnastonukleotydu (Weith 1969). Równocześnie w tej samej pracy wspomniano o możliwości przeprowadzenia tej reakcji w sposób automatyczny, po związaniu polinukleotydu ze stałym podłożem. W ten sposób stać się powinno możliwe skrócenie czasu degradacji do 2 godzin na jedną zasadę. Szybciej jednak szczegóły takiej metody opublikował Wagner, (1969). Przyłączył on tRNA w formie soli tetradecylotrójmetyloamoniowej do celulozy w pirydynie przy pomocy dwucykloheksylokarbodwumidu jako czynnika kondensującego. Degradację prowadzono w sposób następujący:

- ogrzewanie z nadjodanem i cykloheksyloaminą
- sączenie i przemywanie
- inkubacja RNA-celulozy z alkaliczną fosfatazą
- przemywanie i powrót do początku cyklu

Analizę zasady obecnej w hydrolizacie prowadzono metodą chromatografii bibułowej lub cienkowarstwowej. Stosując mieszaninę tRNA stwierdzono oczywiście tylko obecność końcówki - CCA.

Weith i Gilham podali następnie nieco zmienioną procedurę automatycznej analizy sekwencji nukleotydów na tej samej zasadzie (Weith, 1970). Po przyłączeniu nukleotydów do polimeru przeprowadzono kolejno:

- utlenianie nadjodanem
- usuwanie nieprzereagowanego nadjodanu
- reakcję z aminą i fosfomonoesterazą w 45° w celu odszczepienia końcowego utlenionego nukleozydu przez beta-eliminację oraz usunięcie równocześnie powstałej końcowej grupy fosforanowej.

Automatyczny analizator wykorzystujący tę metodę mógł wykonać szereg cykli degradacyjnych z dużą wydajnością (powyżej 95%), na 40 nanomolach polinukleotydu, lub nawet na mniejszej ilości.

Pracując tą metodą zyskuje się na szybkości, czułości oraz istnieją możliwości całkowitej automatyzacji procesu. Nowsze badania mają na celu zwiększenie czułości metody, m.in. przez znakowanie trytem dwualdehydu powstającego przy utlenianiu nadjodanem, w drodze redukcji borotrytkiem sodu (Schwartz, 1972).

Obecnie jednak takie oznaczenie sekwencji oligonukleotydów znalazło znacznie mniejsze zastosowanie niż metoda Edmana w przypadku peptydów.

## Izolacja specyficznych tRNA przez wiązanie ze stałymi nośnikami

### Metody wykorzystujące własności chemiczne wolnych tRNA

W roku 1961 Von Poratius (1961) zmodyfikował metodę Zamecnika (1960), która polegała na sprzęganiu tRNA utlenionego nadjodanem z hydrazidem kwasu 2-hydroksy-3-naftoesowego, a następnie traktowaniu produktu tetrazowaną o-dwuazynydynam i rozdzielaniu na Sephadexie. Zastosował on sprzęganie dwualdehydu-RNA z hydrazidem kwasu poliakrylowego, który usuwano z kolei z roztworu przez wytrącenie n-butyloaldehydem. Usuwając w ten sposób niezaminoacylowane tRNA udało się wzbogacić waliny tRNA dziesięciokrotnie (wydajność 28%).

Taką samą metodę wykorzystał Zachau (1961) do częściowego oczyszczenia walilo-, leucylo-, i serylo-tRNA. Używał on jednak nierozpuszczalny hydrazyd kwasu poliakrylowego (Lewatite 5082 S).

Zastosowano także fenilo-hydrazido-celulozę otrzymaną przez dwuazowanie i redukcję borowodorkiem sodu p-aminobenzylcelulozy (Saponara, 1961).

Niedawno Vasilenko (1972) otrzymał hydrazynową pochodną żelu poliakryloamidowego, przez odpowiednią obróbkę Bio-Gel P. Z tym polimerem dwualdehyd tRNA wiąże się ilościowo. Znalaziono także metodę desorpcji tRNA z żelu. Metodę wykorzystano do dziesięciokrotnego wzbogacenia tRNA z drożdży.

Kolumna z aminoetylocelulozą (Zubay 1962) lub aminoetylodekstranem (Muench 1964) także nadaje się do wiązania utlenionego tRNA, pozwalając na uzyskanie preparatów aminoacylo-tRNA o czystości 60-70%.

Poważną wadą tych metod jest konieczność utlenienia nadjodanem wszystkich innych tRNA, z wyjątkiem tego, którego izolację się prowadzi. Istnieje także poważne niebezpieczeństwo utleniania nadjodanem innych fragmentów cząsteczki tRNA, np. niektórych rzadkich zasad (Hall 1971). Dlatego zmniejszyło się ostatnio zainteresowanie wiązaniem do stałych nośników nieaminoacylowanych tRNA.

### Metody wykorzystujące własności chemiczne aminoacylo-tRNA

W stosunkowo niewielkim stopniu wykorzystano dotychczas własności chemiczne aminoacylo-tRNA, a konkretnie przyłączonego aminokwasu, do selektywnego związania tych tRNA z podłożem.

Polidwuazostyren i dwuazobenzylcelulozę zastosowano do wiązania aminoacylo-tRNA - pochodnych aminokwasów dających się sprzęgać ze związkami dwuazowymi, a więc tyrozyny i histydy (Brown 1961, 1963). Po odmyciu nieprzereagowanych tRNA, wolny wzbogacony tRNA odzyskiwano przez hydrolizę wiązania estrowego. Próbowano również izolować specyficzne aminoacylo-tRNA przez wytrącanie ich pod wpływem kondensacji na końcowej grupie aminowej łańcucha poliaminokwasowego (polilizyny, poliasparaginy), (Mehler 1963), Simon 1964). Uzyskano serylo- treonylo- i alanylo-tRNA o czystości około 60% (Simon 1964).



Niedawno podano, że metoda wiązania tRNA do stałego podłoża opracowana do celów izolacji aminocylo-tRNA-syntetaz wg Bartkowiaka i Pawełkowicza (1972) nadaje się również do izolacji specyficznych tRNA (Bartkowiak 1972). Celulozę aktywowano bromocyjanem i modyfikowano wg Cuatrecasas (1970). Jako „ramię” przedłużające stosowano argininę. Wiązania tRNA przeprowadzano jak opisano wyżej w rozdziale poświęconym chromatografii powinowactwa aminocylo-tRNA syntetaz, z grupą bromoacetylową. Nieaminoacylowane tRNA w tych warunkach nie reagowały i można je było oddzielać przez odmycie. Transferowy tRNA uwolniony z nośnika przez hydrolizę alkaliczną zachowywał aktywność akceptorową w 95%.

Równocześnie opublikowano wstępny komunikat z prac nad zastosowaniem do tego celu aktywnego estru N-hydroksysukcynimidu i karbosymetylo-Sephadexu C-50 (Barciszewski, 1972). Wykonano próby zastosowania tych nośników na prostych modelach w postaci estrów aminokwasów, dobrano warunki dla reakcji transacylacji, oraz wykonano próby analityczne izolacji fenylalaninowego tRNA z *Kupinus luteus*.

Niedawno zakomunikowano o wykorzystaniu metody Bartkowiaka (Bartkowiak, 1972) do izolacji izoleucynowych tRNA z jęczmienia, stosując nośnik oparty o Sepharose. Po odhydrolizowaniu wzbogacony preparat poddano oczyszczeniu na DEAE-celulozie oraz chromatografii w odwróconej fazie RPC-5 (Zaradniak, 1973).

Jak sądzimy, wiązanie do stałych podłoży stanowić może doskonałą metodę szybkiej izolacji wzbogaconych preparatów specyficznych tRNA, pod warunkiem znalezienia prostych metod otrzymywania nośników, oraz optymalizacji warunków reakcji pod kątem uzyskania całkowitego przereagowania i zwiększenia stopnia wzbogacenia. Duże możliwości w tej dziedzinie rokuje zastosowanie estrów aktywnych N-hydroksysukcynimidu, np. w postaci pochodnych agarozy opisanych przez Cuatrecasas (1972). Mogą tu być również wykorzystane AH- i CH-Sepharose (Pharmacia AB).

Zaletą tych metod jest możliwość całkowitego odzysku nieprzereagowanych wolnych tRNA, natomiast nie można w ten sposób rozdzielić izoakceptorowych tRNA, a więc konieczne jest w ostatnim etapie zastosowanie np. chromatografii w odwróconej fazie.

#### L i t e r a t u r a

- [1] Adler A.J., Rich A.; (1972) - J. Amer. Chem. Soc. 84, 3977.
- [2] Astell C., Smith M.; (1971) - J. Biol. Chem. 246, 1944.
- [3] Avrameas S.; (1969) - Immunochemistry 6, 43.
- [4] Avrameas S.; (1969) - Immunochemistry 6, 53.
- [5] Axer R., Porath J.; (1966) - Nature 210, 367.
- [6] Baker S.A., Somers P.J., Epton R.; (1968) - Carbohydrate Research 8, 491.

- [7] Barciszewski J., Rafalski A.J., Wiewiórowski M.; (1972) - Materiały X Zjazdu P.T.Bioch. Referat B-14.
- [8] Barker S.A., Emery N.A., Norais J.M.; (1971) - *Process. Biochem.* 6, 10.
- [9] Bartkowiak S., Pawelkiewicz J.; (1972) - *Biochim. Biophys. Acta* 272, 137.
- [10] Bartkowiak S., Radłowski M., Augustyniak J.; (1972a) - Materiały X Zjazdu Polskiego Towarzystwa Biochemicznego, Referat B-13.
- [11] Bautz E.K.F., Hall B.D.; (1962) - *Proc. Nat. Acad. Sci. U. S.* 48, 400.
- [12] Bayer E., Jung G., Breitmeier E., Parr W.; (1970) - *Second. American Peptide Symposium*, Cleveland Ohio.
- [13] Bayer E., Jung G., Halasz I., Sebastian L.; (1970) - *Tetrahedron Letters* 4503.
- [14] Beikirch H., von der Harr F., Cramer F.; (1972) - *Eur. J. Biochem.* 26, 182.
- [15] Bernfeld P., Wan J.; (1964) - *Science* 142, 678.
- [16] Blackburn G.M., Brown M.J., Harris M.R.; (1967) - *J. Chem. Soc.* 2438.
- [17] Bolton E.T., McCarthy B.J.; (1964) - *J. Mol. Biol.* 8, 201.
- [18] Boulton M.G., Jones A.S., Walker R.T.; (1971) - *Biochim. Biophys. Acta.* 246 (197 ).
- [19] Bosch K., Vander Wende G., Blomendal H.; (1961) - *Nature* 191, 349.
- [20] Brown D.M., Fried M., Todd A.R.; (1953) - *Chem. Ind. (London)*, 352.
- [21] Brown G.L., Brown A.V.W., Gordon J.; (1961) - *Brookhaven Symp. Biol.* 12, 47, *Chem.* 236 197.
- [22] Brown G.L.; (1963) - *In Progress in Nucleic Acid Research*, I.J. Davidson W.E.Cohn. Editors, Academic. Press. New York 1963, 2, 259.
- [23] Chang T.M.S.; (1969) - *Science Tools* 16, 3.
- [24] Cho L.C., Swaisgood H.L.; (1972) - *Biochim. Biophys. Acta* 258, 675.
- [25] Chua G.K., Bushuk W.; (1969) - *Biochem., Biophys. Res. Commun.* 37, 545.
- [26] Cuatrecasas P.; (1970) - *Nature* 228, 132.
- [27] Cuatrecasas P.; (1970a) - *J. Biol. Chem.* 245, 3059.
- [28] Cuatrecasas P.; (1971) - in *Biochemical Aspects of Solid State Chemistry* G.S. Stark Ed. Acad. Press New York 1971.
- [29] Cuatrecasas P.; (1972) - *Adv. Enzymol.* 36
- [30] Cuatrecasas P.; (1972a) - *Biochemistry* 11, 2291.

- [31] Cuatrecasas P., Anfinsen C.B.; (1972b) - Ann.Rev. Biochem. 40, 259.
- [32] Cuatrecasas P., Anfinsen C.B.; (1971) - Meth.Enzymol. 22, 345.
- [33] Cuatrecasas P., Wilchek M.; (1968) - Biochem.Biophys. Res. Commun. 33, 235.
- [34] Cuatrecasas P., Wilchek M., Anfinsen C. B.; (1968a) - Proc. Nat. Acad. Sci U.S. 61, 636.
- [35] Cuatrecasas P., Wilchek M., Anfinsen C.B. (1969) - Biochemistry 8, 2277.
- [36] Dowling L.M., Stark G.R.; (1969) - Biochemistry 8, 4728.
- [37] Edmonds M., Abrams R.; (1963) - J. Biol. Chem. 238 1186, PC.
- [38] Edmonds M., Kopp D.W.; (1970) - Biochem. Biophys. Res. Commun. 41, 1531.
- [39] Edmonds M., Vaughan Jr.M.H.; (1970a) - Fed.Proc.Amer. Soc. Exptl. Biol. 29, 2397.
- [40] Edmonds M.; (1971) - Procedures in Nucleic Acid. Research. 2, 629.
- [41] Edmonds M., Vaughan Jr.M.H., Nakazatu H.; (1971a) - Proc. Nat. Acad. Sci. U.S. 68, 1336.
- [42] Eley J.; (1969) - Biochemistry 8, 1502.
- [43] Epton R., Thomas T.H.; (1971) - An Introduction to Water - Insoluble Enzymes Koch - Light Labs. Colonbrook.
- [44] Falb R.D.; (1972) - Biotechnol. Bioeng. Symp. 2, 177.
- [45] Fasold H., Klappenberger J., Meyer C.H.; Remold H.; (1971) - Angew. Chem. Int. Ed. 10, 795.
- [46] Feinstein G.; (1971) - Die Naturwissenschaften 58, 389.
- [47] Filippusson H., Hornby W.E.; (1970) - Biochem. J. 120, 215.
- [48] Forrester P.I., Hancock R.L.; (1972) - Can.J.Biochem. 51, 231.
- [49] Frechet J.M., Schuerch C.; (1971) - J. Amer. Chem. Soc. 93, 492.
- [50] Fridberg F.; (1971) - Chrom. Res. 14, 121.
- [51] Frischauf A.M., Eckstein F.; (1973) - Eur.J. Biochem. 32, 479.
- [52] Gerber G., Schott H.; (1970) - Angew Chem. Int. Ed. 9, 68.
- [53] Gerber G., Schott H.; (1970a) - Angew. Chem. 82, 82.
- [54] Gilham P.T.; (1964) - J. Amer. Chem. Soc. 86, 4982.
- [55] Gilham P.T.; (1968) - Biochemistry 7, 2809,
- [56] Gilham P.T.; (1971) - in Meth. Enzymol. 21 191, L. Grossman K. Moldave, Eds. Academic. Press, New York.

- [57] Goldstein L.; (1969) - Fermentation Advances, D. Perlman, Ed. Academic Press, N. York.
- [58] Goldstein L., Pecht M., Blumberg S., Atlas D., Lovin Y.; (1970) - Biochemistry 9, 2322.
- [59] Green M.L., Crutchfield G.; (1969) - J. 115, 183.
- [60] Grubhofer N., Sleith L.; (1954) - Z. Physiol. Chem. 297, 108.
- [61] Gruenwedel D.W., Fu J.C.C.; (1971) - Proc. Nat. Acad. Sci. US 68, 2002.
- [62] Habeeb A.F.S.A.; (1967) - Arch. Biochem. Biophys. 119, 264.
- [63] Haertle T., Karwowska U., Augustyniak J.; (1973) - Materiały XI Zjazdu Polskiego Towarzystwa Biochemicznego ref. B-20 s. 54.
- [64] Harbold M.A., Calvin M.; (1973) - Biochim. Biophys. Acta 308.
- [65] Hasselberger F.X., Brown H.D., Chattopadhyay S.K.; (1970) - Cancer Research 30, 2736.
- [66] Haynes R., Walsh K.A.; (1969) - Biochem. Biophys. Res. Commun. 36, 235.
- [67] Inman J.K., Dinitzis H.H.; (1969) - Biochemistry 8, 4074.
- [68] Jakubowski H., Pawelkiewicz J.; (1973) - Materiały XI Zjazdu Polskiego Towarzystwa Biochemicznego F-27, s. 21.
- [69] Jakubowski H., Pawelkiewicz J.; (1973a) - FEBS Letters 34, 150.
- [70] Julliard J.H., Coolinot C., Goutherson D.C.; (1971) - FEBS Letters 14, 185.
- [71] Jung G., Bayer E.; (1970) - Materiały 7-go Zjazdu Międzynarodowego Sympozjum Chemii Produktów Naturalnych.
- [72] Katchalski E.; (1970) - in Structure-Function Relations of Proteolytic Enzymes, Munksgaard, Copenhagen.
- [73] Katchalski E.; (1971) - in Biochemical Aspects of Solid State Chemistry G.R. Stark, Ed. Academic, Press. New York.
- [74] Kato I., Anfinsen C.B.; (1969) - J. Biol. Chem. 244, 1004.
- [75] Kay G., Crook E.M.; (1967) - Nature 216, 514.
- [76] Khyam J.X.; (1967) - In Meth. Enzymol. 12, 93, J. Grossman, K. Moldave, Eds. Academic. Press, New York.
- [77] Kusam K., Hayatsu H.; (1970) - Chem. Pharm. Bull. 18, 319.
- [78] Lamed R., Levin Y., Wilchek M.; (1973) - Biochem. Biophys. Acta 304, 231.
- [79] Laurson L.A.; (1971) - Eur. J. Biochem. 20, 89.
- [80] Laurson R.A., Horn M.J., Bonner A.G.; (1972) - FEBS Letters 21, 67.

- [81] Leoir L.F., Rougine DeFeKete M.A., Cardini E.C.; (1961) - J. Biol. Chem. 236, 636.
- [82] Leoir L.F., Goldenberg S.H.; (1962) - in Meth. Enzymol. 5, 145, L. Grossman, K. Moldave, Eds. Academic. Press. New York.
- [83] Lerman L.S.; (1953) - Proc. Natl. Acad. Sci. US 39, 232.
- [84] Letsinger R.L., Hamilton S.R.; (1959) - J. Amer. Chem. Soc. 81, 3009.
- [85] Letsinger R.L., Machadevan V.; (1965) - J. Amer. Chem. Soc. 87, 3526.
- [86] Letsinger R.L., Mechadevan V.; (1966) - J. Amer. Chem. Soc. 88, 5316.
- [87] Linderg U., Persson T.; (1972) - Eur. J. Biochem. 31, 246.
- [88] Litvak S., Tarrago-Litvak A., Carre D.S., Chapeville F.; (1971) - Eur. Biochem. 24, 249.
- [89] Mackey J.K., Gilham P.T.; (1971) - Nature (London), 233, 551.
- [90] Maher J.J., Furey M.E., Greenberg L.J.; (1971) - Tetrahedron Letters, 29
- [91] Manecke G.; (1972) - Biotechnol. Bioeng. Symp. 3, 185.
- [92] McCarthy B.J., Bolton E.T.; (1964) - J. Mol. Biol. 8, 184.
- [93] Mehler A.H., Bank A.; (1963) - J. Biol. Chem. 238, 2988 PC.
- [94] Melby L.R., Strobach D.R.; (1967) - J. Amer. Chem. Soc. 89, 450.
- [95] Melby L.R., Strobach D.R.; (1969) - J. Org. Chem., 34, 421.
- [96] Melby L.R., Strobach D.R.; (1969a) - J. Org. Chem. 34, 427.
- [97] Melrose G.J.H.; (1971) - Rev. Pure. Appl. Chem. 21, 83.
- [98] Merrifield R.B.; (1963) - J. Amer. Chem. Soc. 85, 2149.
- [99] Merrifield R.B.; (1964) - J. Amer. Chem. Soc. 86, 304.
- [100] Merrifield R.B.; (1969) - Adv. Enzymol. 32, 221.
- [101] Mitz M.A., Schlueter R.J.; (1959) J. Amer. Chem. Soc., 81, 4024.
- [102] Mitz M.A., Summaria L.J.; (1961) - Nature 189, 576.
- [103] Mosbach K.; (1970) - Acta. Chem. Scand. 24, 2084.
- [104] Mosbach K., Larsson P.; (1970a) - Biotech. Bioeng. 12, 19.
- [105] Mosbach K.; (1971) - Sci. Amer. 224, No 3, 26.
- [106] Mross G.A., Doolittle R.F.; (1971) - Fed. Proc. 30, 1241.
- [107] Muench K.H., Berg P.; (1964) - Fed. Proc. 23, 477.

- [108] Neldiova O.D., Kiselev L.L.; (1968) - Mol.Biol. 2, 60
- [109] Nelson J.M., Griffin E.G.; (1916) - J. Amer.Chem.Soc. 38, 1109.
- [110] Nylor R., Gilham P.T.; (1966) - Biochem. 5, 2722.
- [111] Ohtsuka E., Morioka S., Ikehara M.; (1972) - J. Amer. Chem. Soc. 94, 3229.
- [112] O'Neill S.P., Wykes J.R., Dunnill P., Lilly M.D.; (1971) - Biotechnol. Bioeng. 13, 319.
- [113] Ontjes D.A., Anfinsen C.B.; (1969) - J.Biol.Chem. 244, 6316.
- [114] Parr W., Grohmann K.; (1971) - Tetrahedron Letters 2633.
- [115] Patel R.P., Lopickes D.V., Brown S.P., Price S.; (1967) - Biopolymers 5, 577.
- [116] Patel A.B., Pennington S.N., Brown H.D.; (1969) - Biochim. Biophys. Acta 178, 626.
- [117] Poonian M.S., Schlabach A.J., Weissbach A.; Biochemistry
- [118] Porath J.; (1967) - Nature, 214, 1302.
- [119] Porath J.; (1972) - Biotechnol. Bioeng. Symp. 3, 145.
- [120] Porter R.R., Press E.M.; (1962) - Ann. Rev. Biochem. 31, 625.
- [121] Quiococho F.A., Richards M.; (1964) - Proc. Nat.Acad. Sci. US 52, 833.
- [122] Remy P., Birmele C., Ebel J.P.; (1972) - FEBS Letters 27, 134.
- [123] Robert-Gero M., Waller J.B.; (1972) - Eur.J. Biochem. 31, 315.
- [124] Rony P.R.; (1972) - Biotechnol. Bioeng. Symp. 3, 401.
- [125] Rosenberg M., Asteriadis G.T., Weith H.L., Gilham P.T.; (1971) - Fed. Proc. Amer. Soc. Exptl. Biol. 30, 1101.
- [126] Rosenberg M., Gilham P.T.; (1971a) - Biochem. Biophys. Acta 246, 337.
- [127] Rosenberg M., Wiebers J.L., Gilham P.T.; (1972) - Biochemistry 11, 3623.
- [128] Rudzińska M., Zaradniak E., Augustyniak J.; (1973) - Materiały XI Zjazdu Polskiego Towarzystwa Biochemicznego B-22, s. 55.
- [129] Saponara A., Bock R.M.; (1961) - Fed. Proc. 20, 356.
- [130] Saulek M.L., Aris R., Tsuchiya H.M.; (1972) - J. Theor. Biol. 35, 67.
- [131] Sato T., Mori T., Tosa T., Chibata I.; (1971) - Arch. Biochem. Biophys. 147, 788.

- [132] Saxinger W.C., Ponnampereuma C., Gillespie D.; (1972) - Proc. Nat. Acad. Sci. US 69, 2975.
- [133] Schmidt J., Wang R., Stanfield S., Reid B.R.; (1971) - Biochemistry 10, 3264.
- [134] Schott H., Gerber G.; (1970) - Angew. Chem. 82, 448.
- [135] Schott H., Gerber G.; (1970a) - Angew. Chem. Makromol Ed. 9, 465.
- [136] Schott H., Gerber G.; (1971a) - Die Makromol Chem. 149, 253.
- [137] Schott H., Gerber S.; (1971a) - Die Makromol Chem. 149, 261.
- [138] Schott H., Gerber G.; (1971) - Die Makromol Chem. 144, 333.
- [139] Schott H., Gerber G.; (1971a) - Die Makromol Chem. 145, 11.
- [140] Schott H.; (1972) - Angew. Chem. 84, 819.
- [141] Schott H., Rudolf E., Schmidt P., Roychoudhury R., Küssel H.; (1973) - Biochemistry 12, 932.
- [142] Schwartz D.E., Gilham P.T.; (1972) - J. Amer. Chem. Soc. 94, 8921.
- [143] Seita T., Yamauchi K., Kinoshita M., Souto M.; (1971) - Die Makromol Chem. 148, 239.
- [144] Seita T., Yamauchi K., Kinoshita M., Imoto M.; (1972) - Die Makromol Chem. 154, 255.
- [145] Seita T., Yamauchi K., Kinoshita M., Imoto M.; (1972a) - Die Makromol. Chem. 154, 263.
- [146] Seita T., Yamauchi K., Kinoshita M., Imoto M.; (1972a) - Bull. Chem. Soc. Japan 45, 926.
- [147] Seita T., Yamauchi K., Kinoshita M., Imoto M.; (1973) - Die Makromol. Chem. 164, 15.
- [148] Seita T., Kinoshita M., Imoto M.; (1973a) - Die Makromol. Chem. 164, 345.
- [149] Serafinowski S.; Synteza, struktura i własności transferowych kwasów rybonukleinowych, B. Golenkiewicz, H. Augustyniak red. UAM Poznań 1972.
- [150] Shainoff J.R.; (1968) - J. Immunol. 100, 187.
- [151] Sharp A.K., Kay G., Lilly M.D.; (1969) - Biotechnol. Bioeng. 11, 363.
- [152] Silman I.H., Albu Weissenberg M., Katchalski E.; (1966) - Biopolymers 4, 441.
- [153] Silman I.H., Katchalski E.; (1966a) - Ann. Rev. Biochem. 35, 873.
- [154] Simon S., Littauer UZ, Katchalski E.; (1964) - Biochem. Biophys. Acta 80, 169.

- [155] Sluyterman L.A., Wijdenes J.; (1970) - Biochim. Biophys. Acta 200, 593.
- [156] Smith L., Smith H., Pifko S.; (1972) - Anal. Biochem. 48, 27.
- [157] Solms J., Deuel H.; (1957) - Chimia 11, 311.
- [158] Southard G.L., Brooke G.S., Pettee J.M.; (1971) - Tetrahedron 27, 270.
- [159] Starckenstein E.; (1910) - Bioch. Z. 24, 210.
- [160] Stewart J.M., Young J.D.; (1969) - Solid Phase Peptide Synthesis W.A. Freeman and, Co San Francisco.
- [161] Sundberg L., Aspberg K., Porath J.; (1970) - Biochim. Biophys. Acta 221, 394.
- [162] Surinov B.P., Manoylov S.E.; (1966) - Biochimia, 32 387.
- [163] Szemjakin et. al. (1965) - Tetrahedron Letters 2323.
- [164] Szewczuk A.; (1973) - Wiadomości Chemiczne 27, 289.
- [165] Vanderhaar B., Mueller G.C.; (1969) - Biochim. Biophys. Acta 176, 626.
- [166] Vasilenko S.K., Obukhova L.V., Yamkovoy V.I.; (1971) - Biochimia 36, 1288.
- [167] Von der Haar F.; (1973) - Eur. J. Biochem. 34, 84.
- [168] Von Poratius H. Doty, Stephenson M.L.; (1961) - J. Amer. Chem. Soc. 83, 3351.
- [169] Wada A., Kishizaki A.; (1968) - Biochim. Biophys. Acta, 166, 29.
- [170] Wagner A.F., Bugianosi R.L., Shen T.Y.; (1971) - Biochem. Biophys. Res. Commun. 45, 184.
- [171] Wagner T.E., Chai H.G., Warfield A.S.; (1969) - J. Amer. Chem. Soc. 91, 2388.
- [172] Weetall H.H., Baum G.; (1970) - Biotechnol. Bioeng. 12, 399.
- [173] Weetall H.H.; Hersch L.S.; (1969) - Biochim. Biophys. Acta 185, 464.
- [174] Weetall H.H.; (1969a) - Science 615, 166.
- [175] Weith H.L., Gilham P.T.; (1967) - J. Amer. Chem. Soc. 89, 5473.
- [176] Weith H.L.; Gilham P.T.; (1970) - 160-th National Meeting of the American Chemical Society, Chicago Sept. 1970, Abstract Biol. 18.
- [177] Weith H.L., Weibers J.L., Gilham P.T.; (1970a) - Biochemistry 2, 4396.
- [178] Whitefeld P.R., Markham R.; (1953) - Nature (London) 171, 1151.
- [179] Wilson R.J.H., Lilly M.D.; (1969) - Biotechnol. Bioeng. 11, 349.



- [180] Yaniv M., Gross F.; (1969) - J. Mol. Biol. 44, 1.
- [181] Yip K.F., Tsou K.C.; (197 ) - J. Amer. Chem. Soc. 93, 3272.
- [182] Zachau H.G., Tada M., Lawson W.B.; Schweiger M.; (1961) - Biochim. Biophys. Acta 53, 221.
- [183] Zamecnik P.C., Stephenson M.L., Scott J.F.; (1960) - Proc. Nat. Acad. US 46, 811.
- [184] Zaradniak E., Rudzińska M., Augustyniak J.; (1973) - Materiały XI Zjazdu Polskiego Towarzystwa Biochemicznego, Ref. F-30.
- [185] Zakavat S.Y., James H.L., Morrison J.C., Whybren W.D., Bucovaz E.T.; (1972) - Biochemistry 11, 4344.
- [186] Zubay G.; (1962) - J. Mol. Biol. 4, 347.

## SPIS TREŚCI

	Str.
Wstęp . . . . .	5
W.Krzyżosiak, P. Barczyński - Badanie struktury kodu genetycznego	7
P.Barczyński, W. Krzyżosiak - Kod genetyczny - oddziaływania kodon -anty kodon . . . . .	17
J.Barciszewski, A.J.Rafalski - Rozpoznawanie transferowych kwasów rybonukleinowych przez aminoacylo-tRNA syntetazy . . . . .	25
T.Brukwicki, J.Bujarski - Transferowe kwasy rybonukleinowe, w któ- rych występuje 4-tiourydyna, a rozpoznawanie przez aminoacylosyn- tetazę . . . . .	45
K.Szyfter, K.Jędrzejczak - Aminoacylo-tRNA syntetazy. Izolacja, cha- rakteryстыka i udział w reakcji aminoacylacji tRNA . . . . .	51
A.J.Rafalski, J.Barciszewski - Rzadkie zasady typu Y występujące w transferowych kwasach rybonukleinowych . . . . .	75
K.Jędrzejczak, K.Szyfter - Metody badania struktury trzeciorzędowej transferowych kwasów rybonukleinowych . . . . .	91
J.Bujarski - Badanie struktury tRNA metodą asocjacji krótkich oligo- nukleotydów . . . . .	105
J.Bujarski, T.Brukwicki - Fotochemia 4-tiourydyny w transferowych kwasach rybonukleinowych . . . . .	111
K.Grześkowiak, J.Stawiński - Chemiczna synteza polidezoksyrybonu- kleotydów według H.G. Khorany i S.A. Naranga . . . . .	117
P.Serafinowski - Nowe przykłady podłoża polimerowych do syntezy oli- gonukleotydów . . . . .	125
W.Markiewicz - Wybrane aspekty chemii anhydronukleozydów pirymidyno- wych . . . . .	135
A.W.Sokalski, H.Chojnacki - Oddziaływania 6-tioguaniny w DNA, a me- chanizm jej mutagennego działania . . . . .	143
P.Górnicki - Charakterystyka wysokociśnieniowej chromatografii cie- czowej (HPLC) jako metody rozdzielania kwasów nukleinowych . . . . .	147
A.J.Rafalski, J.Barciszewski - Zastosowania stałych nośników i chro- matografii powinowactwa w biochemii . . . . .	161