

Jacek Twardowski, Pavel Anzenbacher, Zbigniew Grelak

BADANIA WŁAŚCIWOŚCI KWAŚNEJ FOSFATAZY I CYTOCHROMU P-450
Z WĄTROBY SZCZURA METODAMI SPEKTROSKOPII KLASYCZNEJ
I REZONANSOWEJ RAMANA*

1. WSTĘP

W ostatnich latach nastąpił gwałtowny rozwój badań eksperymentalnych w biologii. Jedną z rozwijających się metod umożliwiających te badania jest spektroskopia ramanowska, zarówno klasyczne jak i rezonansowa. Umożliwia ona uzyskanie dokładnych danych o drganiach wibracyjnych makromolekuł biologicznych, które są ściśle związane z ich strukturą molekularną.

Badania ramanowskie można ogólnie podzielić na dwa rodzaje: klasyczne i rezonansowe. Klasyczna spektroskopia ramanowska umożliwia badanie biochemiczne systemów, które można pogrupować w następujące typy: białka, lipidy i błony komórkowe, kwasy nukleinowe, tkanki i mikropróbki biologiczne, wirusy itp. Widmo ramanowskie takich układów jest złożeniem pasm oscylacyjnych drgających grup molekularnych całego badanego układu, który nie absorbuje promieniowania przy długości fali odpowiadającej promieniowaniu wzbudzającemu. Dzięki zastosowaniu specjalnego wyposażenia spektrofotometrów można badać w oparciu o ten efekt oddziaływania między biologicznymi makromolekułami, takimi jak np.: białko-lipid, antybiotyk-kwas nukleinowy, enzym-substrat itp.

Rezonansowy efekt Ramana jest stosowany do badania drgań oscylacyjnych tylko tych grup molekularnych biosystemów, które są chromoforami i posiadają pasma absorpcyjne przy długości fali odpowiadającej promieniowaniu wzbudzającemu lasera. Istnieją dwa typy chromoforów, te które występują naturalnie (np. hem w hemoglobinie), i te które są wprowadzane do biosystemu (np. barwny substrat reagujący z centrum aktywnym enzymu). Pasma w widmie rezonansowego efek-

* Praca została wykonana w ramach problemu resortowego R-III-14.

tu Ramana są ok. 1000 razy silniejsze niż w klasycznym efekcie rozpraszania światła, co powoduje konieczność badania znacznie rozrzedzonych roztworów biomolekuł. W tych warunkach intensywność widma odcylacyjnego całej badanej próbki jest porównywalna z tłem luminescencyjnym, nad którym dominują silne pasma ramanowskie związane z drganiami oscylacyjnymi tylko tych grup molekularnych, które są związane z chromoforem.

Szczegółowe omówienia zastosowań spektroskopii Ramana do badań biomolekuł zostało przedstawione w licznych publikacjach przeglądowych [1-12]. W tej pracy przedstawiono zastosowanie klasycznej spektroskopii Ramana (R) do badania struktury izoenzymów kwaśnej fosfatazy i rezonansowej spektroskopii Ramana (RR) do badań nad cytochromem P-450. Oba enzymy pochodzą z wątroby szczura. Przedstawione wyniki są przykładem zastosowania badań ramanowskich prowadzonych w Polsce i Czechosłowacji.

2. MATERIAŁY I METODY

Kwaśna fosfataza z wątroby szczura. Biochemiczne badania kwaśnej fosfatazy z wątroby szczura były przedstawione w kilku pracach [13-15]. Enzym ten należy do grupy hydrolaz lizosomalnych i występuje głównie w lizosomach komórek. Stwierdzono, że występują dwa typy tego enzymu, izoenzym I o masie molekularnej 92 000 D i izoenzym II o masie molekularnej 93 000 D. Oba izoenzymy są dimerami, a masy podjednostek określono na 51 000 i 52 000 D [14]. Zbadano także skład aminokwasowy obu izoenzymów [14, 15]. Oba izoenzymy są glikoproteidami, lecz ich skład cukrowy nie został dotychczas zbadany. Przez analogię do badań nad innymi kwaśnymi fosfatazami, np. z prostaty ludzkiej [16] lub psiej [14] można uweźać, że w składzie obu izoenzymów występuje galaktoza, mannoza, fukoza, N-acetyloglukozamina i kwas sialowy. Głównym kryterium oznaczania izoenzymów jest ich powinowactwo do kolumny wypełnionej DEAE celulozą. Izoenzym I jest otrzymywany podczas przepłukiwania tej kolumny buforem tris-HCl o pH = 7,1, podczas gdy izoenzym II schodzi z tej kolumny przy jej przepłukiwaniu tym samym buforem z gradientem NaCl, przy stężeniu ok. 0,15 M soli.

Niniejsza praca dotyczy badań homogennej kwaśnej fosfatazy otrzymanej na podstawie zmodyfikowanej metody I g a r a s h i e g o i H o l l a n d e r a [13]. Szczegółowy opis tej metody oczyszczania białka podaje praca [17].

Cytochrom P-450 z wątroby szczura. Cytochrom P-450 jest enzymem utleniającym, funkcjonującym w mikrosomalnym łańcuchu oddechowym wielu zwierząt i roślin [18-21]. Jego główna rola polega na modyfikacji mniej polarnych eubetancji w bardziej polarne, często przez dołączenie atomu tlenu do molekuly. Metoda otrzymywania tego enzymu polega na uenieniu frakcji mikrosomalnej z homogenatu wątroby szczura, z której na kolumnach chromatograficznych (DEAE celulozy, hydroksylepatytu itp.) otrzymuje się czysty anzym [22, 23]. W celu stabilizacji enzymu podczas jego oczyszczania dodaje się do jego roztworu substratów: dwufenylometanu (próbka A) lub fenantrenu (próbka B). Przed wykonaniem widm ramanowskich substraty te są usunięte, a enzym zostaje umieszczony w odpowiednim buforze. Szczegółowe omówienie tej procedury podaje praca [24].

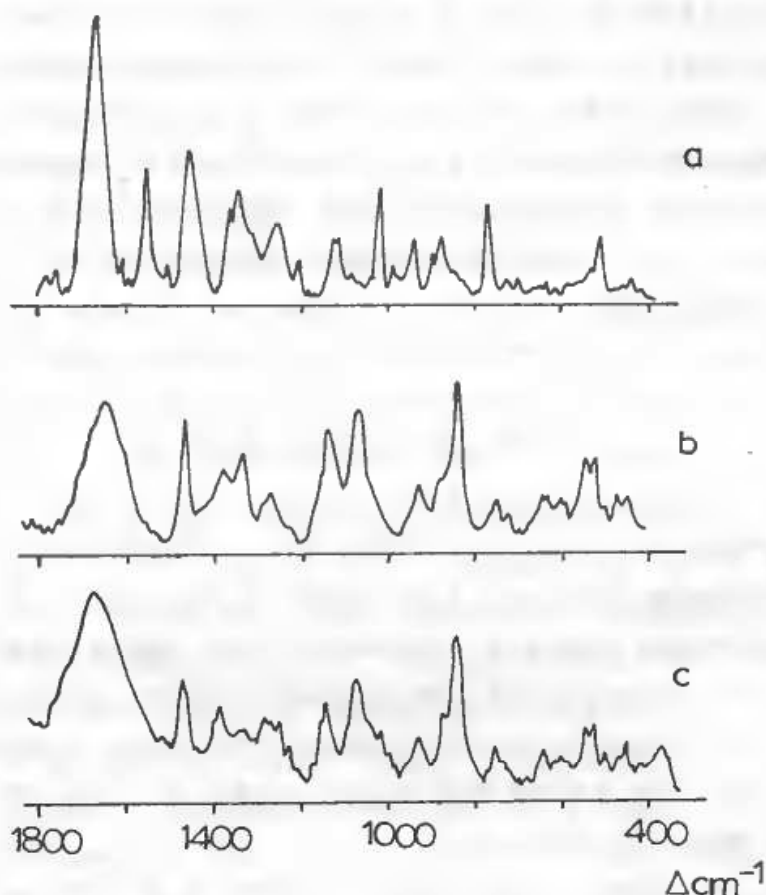
Pomiary ramanowskie. Spektroskopia ramanowska jest bardzo przydatną metodą badania roztworów wodnych białka, gdyż polaryzowalność wody jest stosunkowo mała. W związku z tym widma ramanowskie kwaśnej fosfatazy otrzymaną z 3-10% roztworów enzymu w H_2O , umieszczonych w cienkich kapilarach o średnicy ok. 1 mm ze szkła pyreksowego. Widma wykonywano na spektrofotometrze ramanowskim Cary 82 sprzężonym z jonowym laserem argonowym firmy Spectra Physics, dającym linie monochromatyczne o długości fali 488 i 514,5 nm. Obie te linie były wykorzystywane do otrzymywania widm enzymu z analogicznymi rezultatami. Rozpraszanie ramanowskie było mierzone fotopowielaczem ustawionym pod kątem 90° w stosunku do laserowej wiązki wzбудzającej o mocy 30-80 mW.

Cytowane w tej pracy widma były poddane procesowi odcinania tła fluorescencyjnego. Metoda ta nie ma wpływu na kształt widma Ramana i jest powszechnie stosowana w tego typu badaniach [25].

Rezonansowe widma ramanowskie cytochromu P-450 były mierzone na spektrofotometrze Jeol JRS S1 (próbka A) oraz na Codergu LR DH 8000 (próbka B) wyposażonymi w system komputerowy Tracor PDP 1105, umożliwiający odcinanie tła i gromadzenie danych. Próbki A o stężeniu ok. 10^{-5} M były wzбудzone jonowym laserem argonowym CR 2 lub CR 3 (Coherent Radiation), promieniowaniem o długości fali 488 lub 514,5 nm. Próbki B o stężeniu ok. 2×10^{-5} M naświetlano laserem CR 3 przy długości fali 514,5 nm. Rozproszone promieniowanie badano pod kątem 90° względem wiązki wzбудzającej o mocy ok. 100 mW. W celu ograniczenia ryzyka denaturacji próbek używano zawsze świeżych roztworów o znanej stabilności enzymu.

3. WIDMA RAMANOWSKIE KWAŚNEJ FOSFATAZY Z WĄTROBY SZCZURA

Widma ramanowskie izoenzymu I i II kwaśnej fosfatazy z wątroby szczura w roztworze H_2O zostały przedstawione na rys. 1. Na tym samym rysunku przedstawiono dla porównania widmo wodnego roztworu lizozymu, białka prostego. Oba izoenzymy są glikoproteidami, dlatego też różnice między ich widmami a widmem lizozymu są znaczne.



Rys. 1. Widma ramanowskie wodnych roztworów
a) lizozymu, b) izoenzymu kwaśnej fosfatazy II, c) izoenzymu I

Wynika to zarówno z różnego składu aminokwasowego obu enzymów (np. kwaśna fosfataza prawie nie ma tryptofanu, który daje silne pasma w widmie lizozymu), jak też z obecności słabych pasm cukrowych w widmach glikoproteidów. Położenia pasm i ich pochodzenie zostało podane w tab. 1.

Szczegółowe omówienie obu widm, oraz widm ramanowskich zliofizowanych izoenzymów i ich roztworów w D_2O podaje praca [26]. Widma ramanowskie izoenzymów I i II różnią się między sobą, co jest wynikiem różnej budowy obu glikoproteidów. Oba te izoenzymy posiadają silne pasma związane z co najmniej dwoma typami konformacji mostków

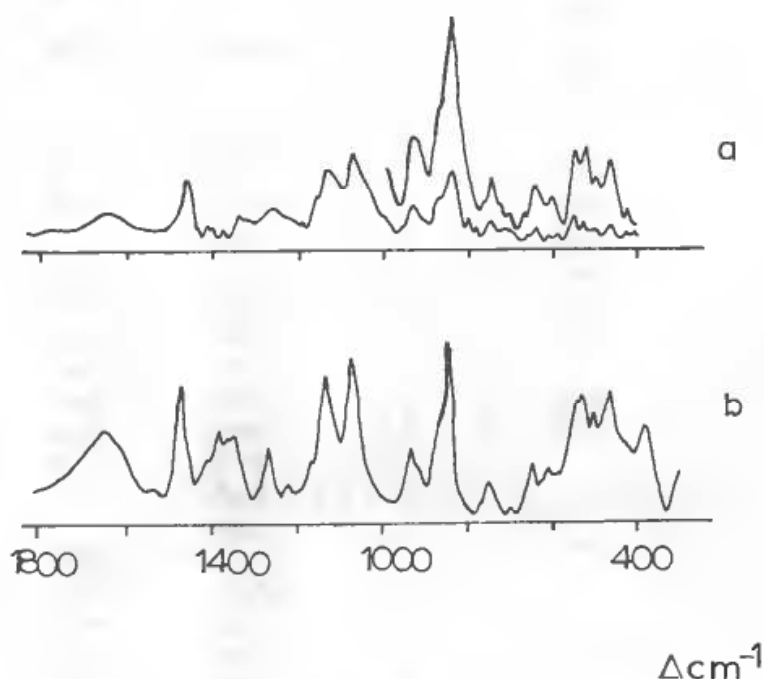
T a b e l a 1

Położenia pasm ramanowskich w widmach roztworów wodnych izoenzymu I i II kwaśnej fosfatazy z wątroby szczura i lizozymu w cm^{-1}

Izoenzym I		Izoenzym II	Lizozym	
1		2	3	
458		455		
475	C=O	474		
506	S-S	505	509	S-S
			518	
528	S-S	525	527	
			540	Trp
553	S-S	552		
		590	577	Trp
			624	Phe
601	Amid VI	602		
620				
633	Tyr	634	645	Tyr
646	C-S	646	661	C-S
692	C-S	692	698	C-S
		700	718	
		724	724	
763	Trp	750	761	Trp
845	Tyr	840	833	Tyr
			836	Tyr
880	Tyr	872	854	Tyr
928	C-C	928	900	C-C
			933	C-C
			960	
			980	
			1005	Phe
			1012	Trp
			1030	Phe
1080	{ C-N }	1070	1078	{ C-N
1104	{ C-C }		1105	{ C-N
1150	C-OH	1138	1128	{ C-N
1230	Tyr, Phe	1220	1206	Tyr, Phe
1255	} Amid III {		1210	} Amid III
1280	} Amid III {	1270	1233	} Amid III
			1247	} Amid III
			1260	} Amid III
1330	Trp	1338	1300	
			1304	Trp
1385	C-H	1370	1338	Trp, C-H
		1435	1428	N-H
1465	C-H ₂	1462	1448	C-H ₂
1520		1528	1553	Trp ²
			1582	Trp
			1622	
1650	H ₂ O, Amid I	1650	1660	H ₂ O, Amid I
			1670	
1750	COOH	1735		

siarczkowych w H_2O i D_2O oraz trzema w przypadku białek zliofilizowanych. Pasma tyrozyny wskazują na słaba oddziaływanie jej reszty aminokwasowej z rozpuszczalnikiem polarnym. Zmiana rozpuszczalnika z H_2O na D_2O nie powoduje istotnych zmian w strukturze obu izoenzymów.

Oba izoenzymy kwaśnej fosfatazy poddano trawieniu neuraminidazą, enzymem który odcina kwasy sialowe od glikoproteidu. Te aminocukry znajdują się na końcach cukrowych glikoproteidów i decydują o wartości punktu izoelektrycznego pK białka oraz o powinowactwie takiego glikoproteidu do kolumny wypełnionej DEAE celulozą. Widma ramanowskie roztworów wodnych obu izoenzymów kwaśnej fosfatazy po działaniu neuraminidazy przedstawiono na rys. 2 [27].



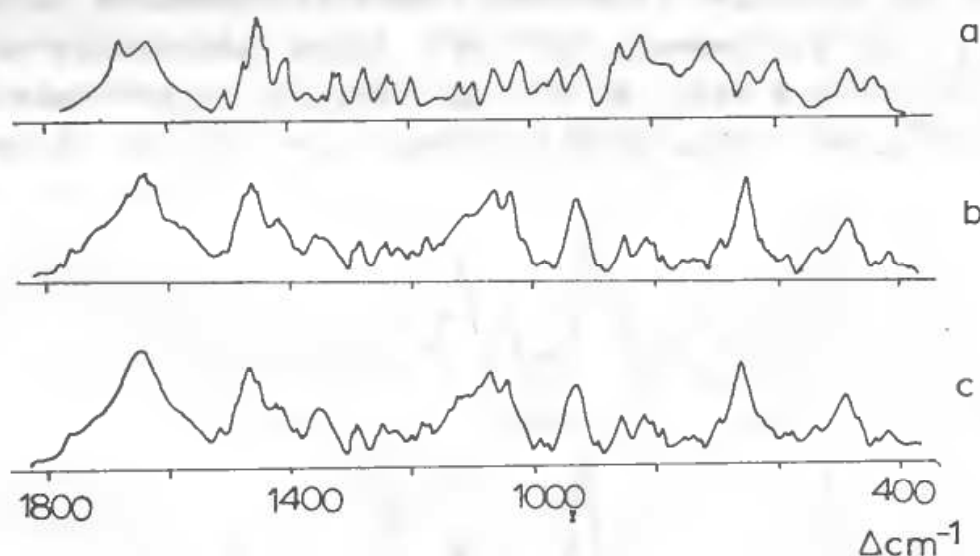
Rys. 2. Widma ramanowskie wodnych roztworów izoenzymów kwaśnej fosfatazy
a) I po działaniu neuraminidazy - I, b) II po działaniu neuraminidazy - II

Widma roztworów wodnych tych izoenzymów w dalszym ciągu wykazują różnice między sobą (rys. 2). Różnice te dotyczą struktury drugorzędowej, w nieznacznym stopniu struktury mostków siarczkowych i występują jeszcze w innych miejscach widm. Różnice te można wiązać z wpływem pozostałych cukrów na budowę obu białek.

Aktywność właściwa obu izoenzymów była po tym traktowaniu podobna do tej, jaką otrzymano dla izoenzymów z kwasami sialowymi i wynosiła dla obu $18-20 \mu g \min^{-1} mg^{-1}$.

Inkubacja kwaśnej fosfatazy w obecności enzymu β -galaktozydazy z wątroby wołu (E.C.3.2.1.23) powoduje odcięcie od obu izoenzymów znacznej ilości cukrów. Enzym ten odcina łańcuch cukrowy w miejscu, gdzie znajduje się galaktoza. Eksperyment [17, 28] przeprowadzono na izoenzymach kwaśnej fosfatazy otrzymanych z 6-miesięcznych szczurów, podczas gdy wcześniej przedstawione wyniki pochodziły z izoenzymów szczurów 4-miesięcznych.

Widma izoenzymów po działaniu β -galaktozydazy, oznaczonych tutaj symbolami I" i II" przedstawia rys. 3. Jednocześnie na tym samym rysunku przedstawiono widmo jednego tylko izoenzymu, oznaczonego symbolem I", który otrzymuje się po całkowitym odcięciu cukrów od obu izoenzymów, traktując je np. homogenatem wątroby szczura.



Rys. 3. Widma ramanowskie wodnych roztworów izoenzymów kwaśnej fosfatazy

a) po działaniu homogenatem z wątroby szczura - I", b) I po działaniu β -galaktozydazy - I", c) II po działaniu β -galaktozydazy - II"

Widmo izoenzymu I" posiada zmienione intensywności wielu pasm ramanowskich w stosunku do widm izoenzymów zawierających składnik cukrowy. Struktura mostków siarczkowych i tyrozyny pozostaje bez zmian w stosunku do widm izoenzymów I" i II", chociaż można zaobserwować minimalne przesunięcia pasm ramanowskich związanych z tymi drganiami [17]. W tym widmie obserwuje się nieznaczne zmiany w pasmach związanych ze strukturą helikalną i wzrost pasma pochodzącego od β struktury przy 1235 cm^{-1} i 1680 cm^{-1} .

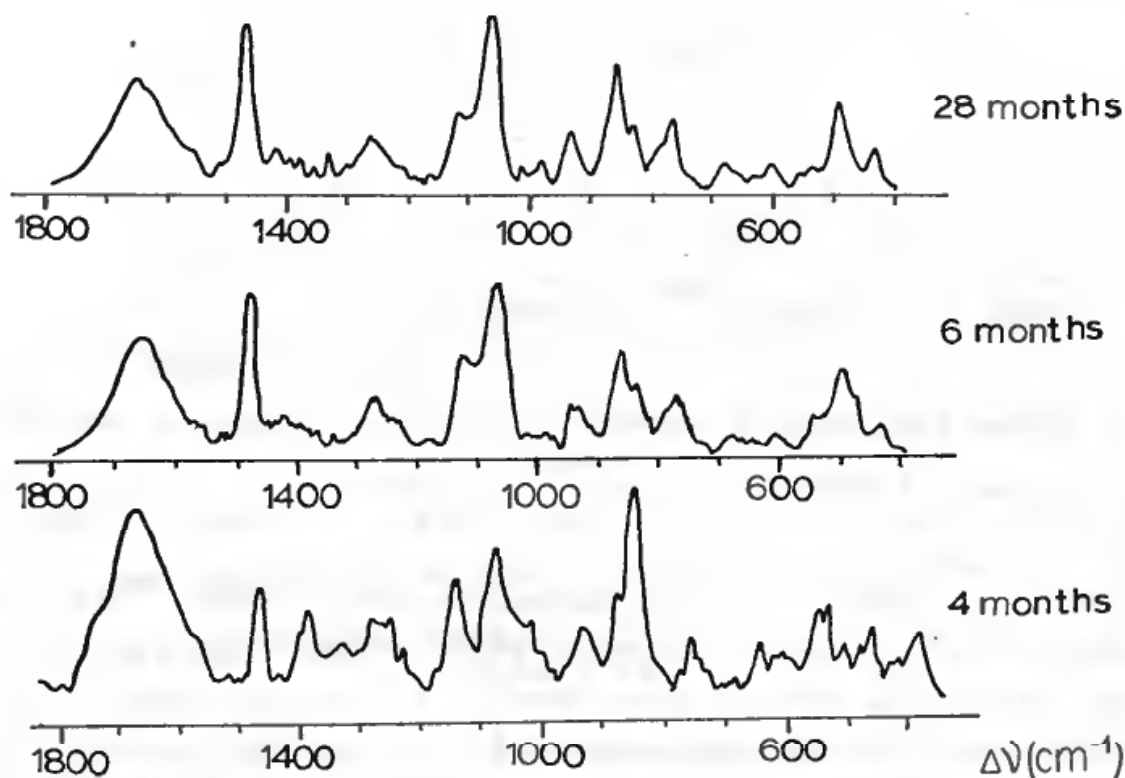
Najważniejszym wynikiem tej części eksperymentu było otrzymanie po inkubacji w homogenacie jednego tylko izoenzymu kwaśnej fosfata-

zy pozbawionego cukrów. Wynik ten sugeruje, że cukry odgrywają ważną rolę we właściwościach związanych z heterogennością tego enzymu.

Przedstawione w pracy [17] widma podczerwone wszystkich omawianych tu izoenzymów posiadają w zakresie $800\text{--}1500\text{ cm}^{-1}$ silne pasma cukrowe, dominujące nad pasmem amidu I. W miarę odcinania cukrów od izoenzymów pasma te zanikają, by ostatecznie izoenzym I" cechował się widmem bardzo zbliżonym do widma podczerwonego białek prostych, np. albuminy.

W miarę odcinania cukrów od izoenzymów zauważa się modyfikację widm ramanowskich i podczerwonych oraz wzrost podobieństwa między oboma izoenzymami.

Innym problemem, badanym na podstawie spektroskopii ramanowskiej jest zależność struktury izoenzymu I od wieku szczurów, z których ten izoenzym był otrzymywany [28, 29]. Widma ramanowskie tego izoenzymu ze szczurów w wieku 4, 6 i 28 miesięcy, przedstawione na rys. 4, oraz widma podczerwone [29] tego izoenzymu ze szczurów

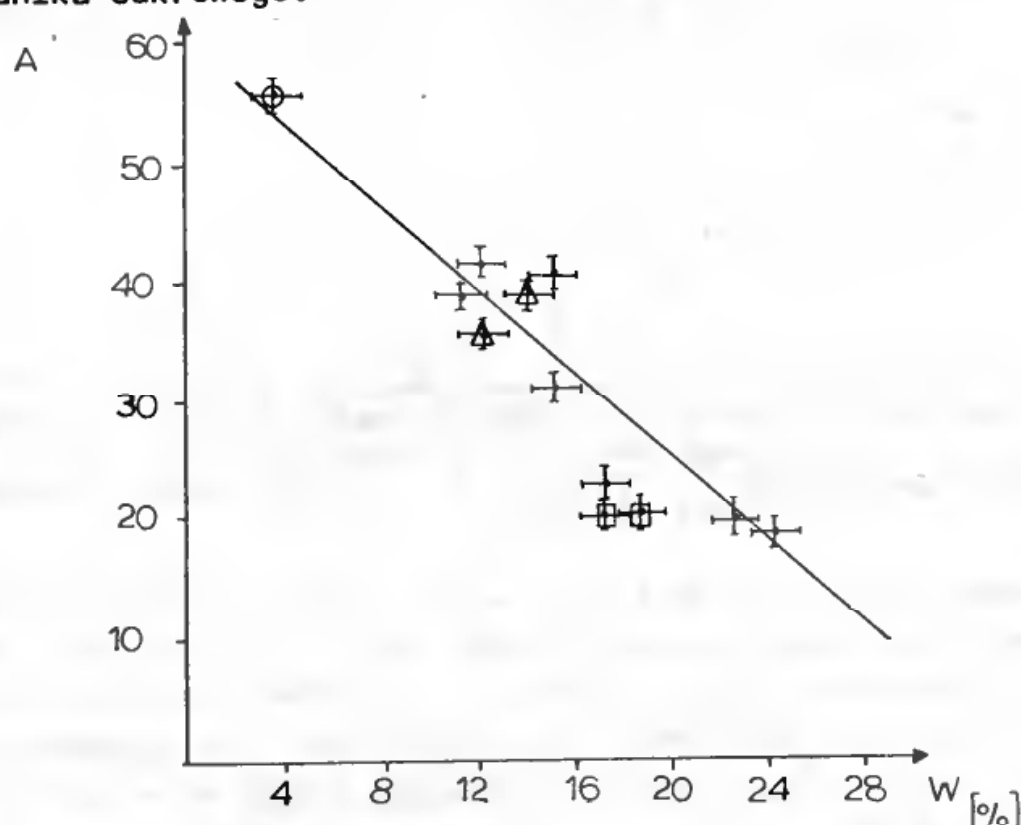


Rys. 4. Widma ramanowskie wodnych roztworów izoenzymu I kwaśnej fosfatazy otrzymanego ze szczurów w wieku 4, 6 i 28 miesięcy

w wieku 4, 6, 8, 16 i 28 miesięcy pokazały zmienność jego budowy w funkcji wieku zwierzęcia. Zawartość cukrów w tym glikoproteidzie jest duża u młodych szczurów, maleje w wieku dojrzałym i ponownie

wzrasta u starych zwierząt. Zmiany te są odwrotnie proporcjonalne do zmiany aktywności właściwej enzymu, która osiąga maksimum dla szczurów 6-miesięcznych, dla których zawartość cukrów w izoenzymie jest najmniejsza. Obserwowane w widmach ramanowskich zmiany struktury tego izoenzymu są najprawdopodobniej wynikiem modyfikacji głównego łańcucha białka związanej z różną zawartością cukrów w tym glikoproteidzie w funkcji wieku.

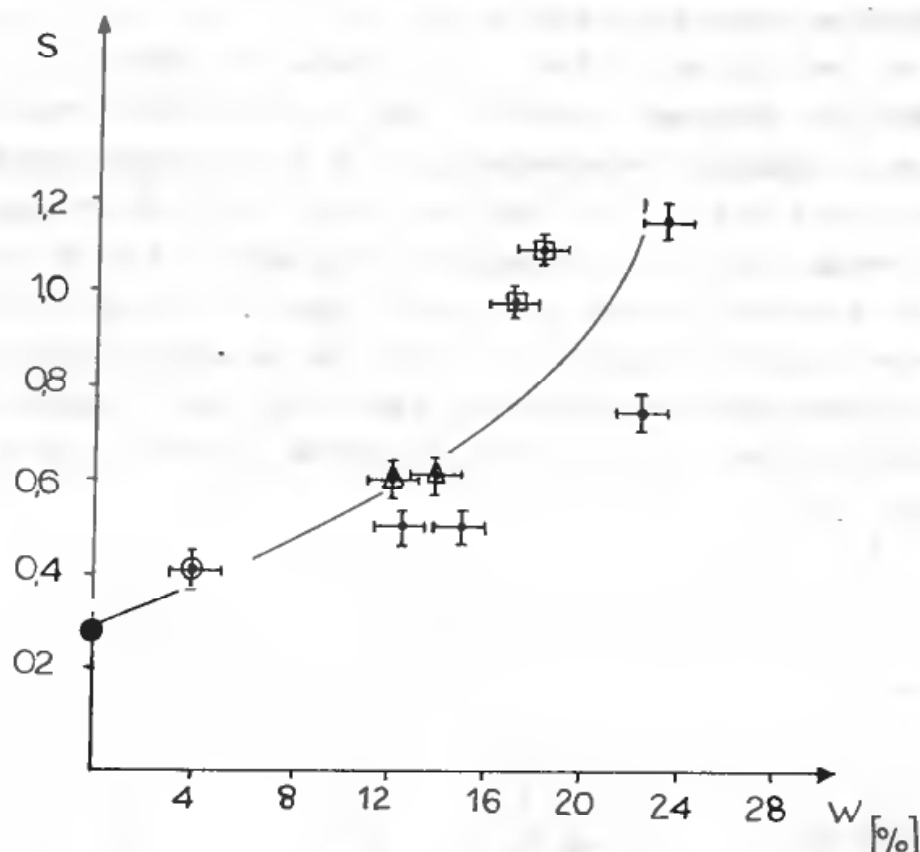
Związek aktywności właściwej obu izoenzymów kwaśnej fosfatazy z wątroby szczura, tych natywnych ze szczurów w różnym wieku, jak i poddanych modyfikacjom biochemicznym, z procentową zawartością cukrów przedstawia rys. 5. Procentowa zawartość cukrów jest tu podana na podstawie wzoru, wyznaczonego na podstawie widm podczerwonych albuminy z różną mieszaniną cukrów jako standardów [30]. Z tego wykresu wynika, że w miarę odcinania od izoenzymu cukrów jego aktywność właściwa rośnie. Warto tu zaznaczyć, że obserwowano również wzrost labilności białka zawierającego mniejsze zawartości składnika cukrowego.



Rys. 5. Zależność aktywności właściwej A w $\mu\text{mol min}^{-1} \text{mg}^{-1}$ izoenzymów kwaśnej fosfatazy od procentowej zawartości W cukrów w tych glikoproteidach

O - izoenzym I''', Δ - izoenzymy I'' i II'', $\square$ - izoenzymy I' i II'. Pozostałe dane dotyczą izoenzymu I otrzymanego ze szczurów w różnym wieku

Na rys. 6 przedstawiono zależność stosunku pasma ramanowskiego leżącego przy ok. 1150 cm^{-1} , związanego z drganiami grup cukrowych typu -C-OH , rozciągającego się do pasma standardowego przy ok. 1460 cm^{-1} (drżenia deformacyjne grup CH_2) dla izoenzymów o różnych zawartościach cukrów. Jak widać, stosunek obu tych pasm maleje wraz z obniżaniem się zawartości cukrów w glikoproteidzie.

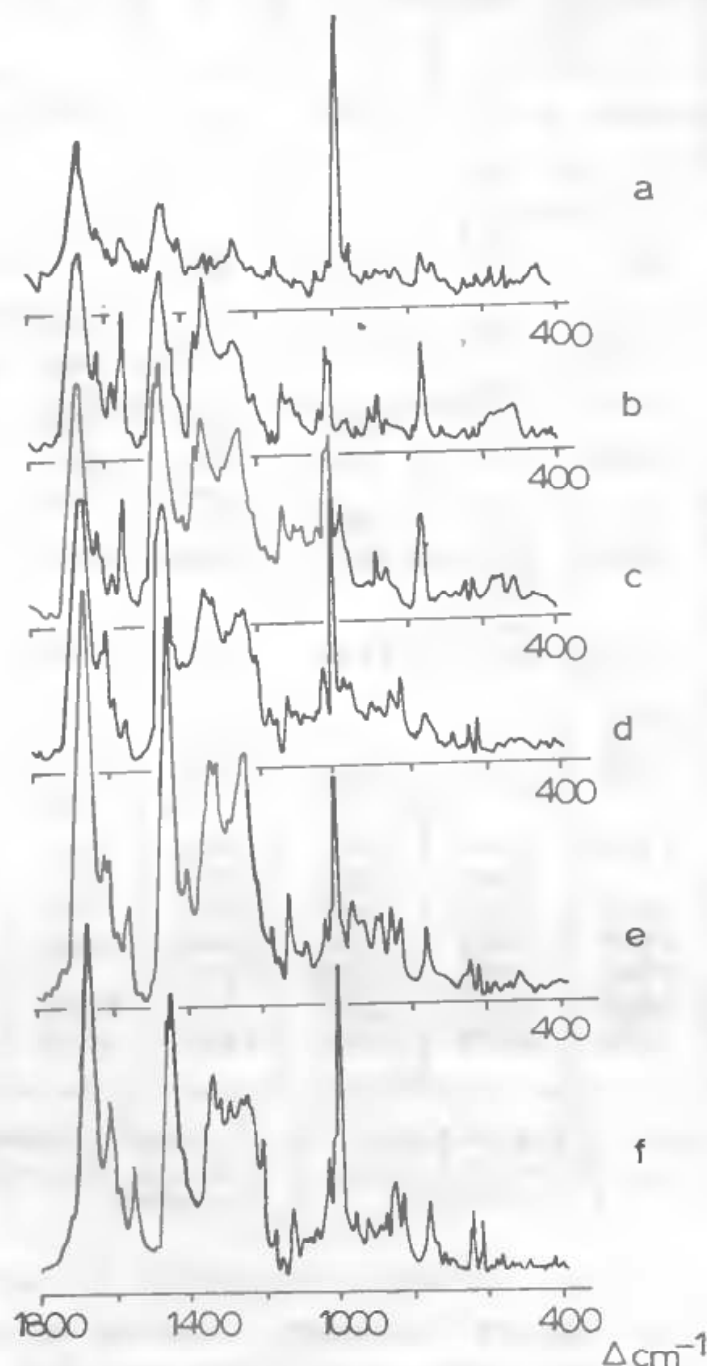


Rys. 6. Zależność stosunku S pasma ramanowskiego przy 1150 cm^{-1} do pasma przy 1460 cm^{-1} od zawartości procentowej W cukrów w glikoproteidach kwaśnej fosfatazy. Oznaczenia analogiczne jak na rys. 5; ● - wartość tego stosunku dla białka prostego lizozymu

Widma ramanowskie były wykorzystane do badania zależności wielkich białek także przez innych autorów. E a s t i in. [31] badali względną koncentrację grup S-S i -SH w jądrach soczewek szczurów w wieku 28 dni i 7 miesięcy. Porównanie tych widm pokazało, że dla starszych szczurów występowało w badanej próbce mniej grup -SH , a więcej grup S-S . Podobne badania są prowadzone dla arylosulfatazy B z wątroby szczura (Proniewicz, Twardowski).

Osobnym, bardzo złożonym zagadnieniem jest badanie widm ramanowskich białek krystalicznych lub zliofilizowanych. Porównanie takich widm z widmami roztworów białek pokazuje jak daleko liofiliza-

cja może zmieniać strukturę tych białek. Na rys. 7 przedstawiono kilka przykładów takich widm ramanowskich białek prostych oraz dla porównania widma izoenzymu I' (izoenzymu kwaśnej fosfatazy I po działaniu neuraminidazy) po zliofilizowaniu. Interpretacja najważniejszych pasm została podana w tab. 2. Widma białek prostych, wy-



Rys.7 Widma ramanowskie krystalicznych białek prostych
a) trypsyna, b) lizozym, c) α -chymotrypsynogen, A, d) owoalbumina, e) β -laktoglobulina, f) pepsyna

konanych na spektrofotometrze Cary 82 w podobnych warunkach w jakich była badana kwaśna fosfataza, wykazują ogólne podobieństwa

T a b e l a 2

Pasma ramanowskie niektórych białek prostych (położenia pasm podane w cm^{-1})

Pochodzenie pasma	1	2	3	4	5	6	7
S-S		511	511	436 510	505		450
S-S		565					542
	622	622			622	622	622
Tyr	643	644			642	645	645
C-S	687			697			730
Trp	760	761	762	763	760	759	760
Tyr	828				829	829	
Tyr	855	860			854	852	
Trp		880	879	882	878	880	
C-C	900	902	902	903	898		
C-C				940	960	960	955
C-C	974	978	987	978			986
Trp, Phe	1003	1007	1013	1020	1004	1005	1009
Phe		1080					
C-N		1102					
C-N	1127	1128	1130	1125	1128	1130	1150
Tyr	1175				1173	1178	
Tyr, Phe	1242			1210		1208	
Amid III	1242	1250	1255	1270	1240	1250	1282
					1315	1297	1320
Trp	1342	1340	1340	1342	1335	1340	1335
		1380	1382	1383	1400		1405
CH	1450	1450	1450	1455	1450	1450	1450
Trp	1555	1553	1555	1555	1552	1552	1552
Trp	1583	1581	1580	1588			
	1605	1619	1618		1616	1618	1618
H ₂ O, Amid I	1670	1669	1665	1650	1655	1670	1670

1 - ovoalbumina krystaliczna, 2 - α -chymotrypsynogen A krystaliczny, 3 - lizozym krystaliczny, 4 - wodny roztwór lizozymu, 5 - β -laktoglobulina, 6 - pepsyna, 7 - trypsina.

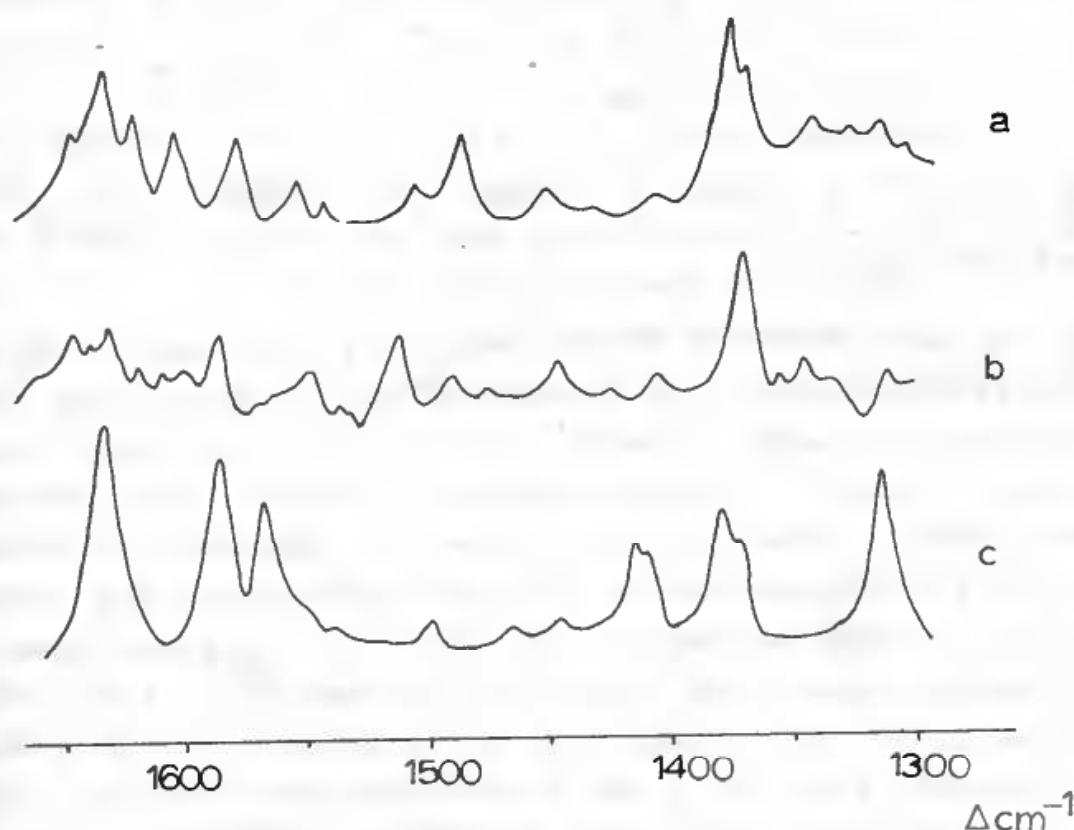
między sobą. Różnią się jednak z omówionych uprzednio powodów od widm glikoproteidu kwaśnej fosfatazy. Podobną sytuację obserwuje się dla innego glikoproteidu - arylosulfatazy z wątroby szczura [32, 33].

Innym przykładem zastosowania spektroskopii ramanowskiej do badania kwaśnej fosfatazy było wykonanie widm Ramana i rezonansowych Ramana dla p-nitrofenolu (produkt reakcji enzymatycznej kwaśnej fosfatazy) oddziałującego z centrum aktywnym tego enzymu [34]. Bada-

nia te wykazały występowanie ok. 2 centrów aktywnych w makrocząsteczce enzymu oraz zaproponowano hipotetyczny model oddziaływania p-nitrofenolu z histydyną w centrum aktywnym enzymu.

4. REZONANSOWE WIDMA RAMANOWSKIE CYTOCHROMU P-450

Rezonansowe widma ramanowskie hemoproteidów otrzymuje się z selektywnym podwyższeniem intensywności pasm pochodzących od molekularnych drgań oscylacyjnych związanych z ich grupą prostetyczną, jaką jest w tym przypadku układ porfirynowy [11, 35, 36]. Widma RR cytochromu P-450 są podobne do wielu innych widm hemoproteidów i zostały przedstawione na rys. 8. Na tym rysunku przedstawiono także widmo RR ferrytochromu C [37]. W zakresie $1300\text{--}1700\text{ cm}^{-1}$ obserwuje się charakterystyczne pasma ramanowskie tych enzymów. Są one związane ze stanem utlenienia i stanem spinowym centralnego atomu żelaza w hemie. Interpretacja tych pasm, zaproponowana przez S p i r o [38], pozwala określić związek pasm przy 1500, 1580



Rys. 8. Rezonansowe widma ramanowskie cytochromu P-450
a) próbka A - wzbudzenie promieniowaniem o długości fali 488 nm,
b) próbka B - 514,5 nm. c) ferrytochromu C - 514,5 nm

i 1620 cm^{-1} ze stanem spinowym żelaza oraz wiąże położenie pasma przy ok. 1360 cm^{-1} ze stanem jego utlenienia. Wszystkie te pasma występują dla widma RR cytochromu P-450 z frakcji mikrosomalnej

T a b e l a 3

Położenie rezonansowych pasm ramanowskich cytochromów (w cm^{-1})

Ferrocytochrom C (wzbudzenie linią 514,5 nm)	Cytochrom P-450		Opis stanu
	próbka A (wzbudzenie linią 488 nm)	próbka B (wzbudzenie linią 514,5 nm)	
1316 s	1310 w	1313 w	OSM OSM
	1340 w	1341 w	
	1368 s		
1373 e	1370 s	1370 s	SSM SSM SSM
1409 s	1401 w	1400 w	
1443 w	1448 m	1443 w	
	1489 s x	1484 m	SSM
1504 s	1501 m	1505 s x	
	1520 w		
1563 s	1552 w	1543 w	SSM
1585 s	1578 s x	1580 s x	
	1602 s	1602 w	
	1628 m		SSM
1637 s	1638 s	1634 m	
	1648 w	1646 w	

s - silny, m - średni, w - słaby, OSM - pasmo opisujące stan utlenienia, SSM - pasmo opisujące stan spinowy, x - pasma opisujące stan wysokospinowy.

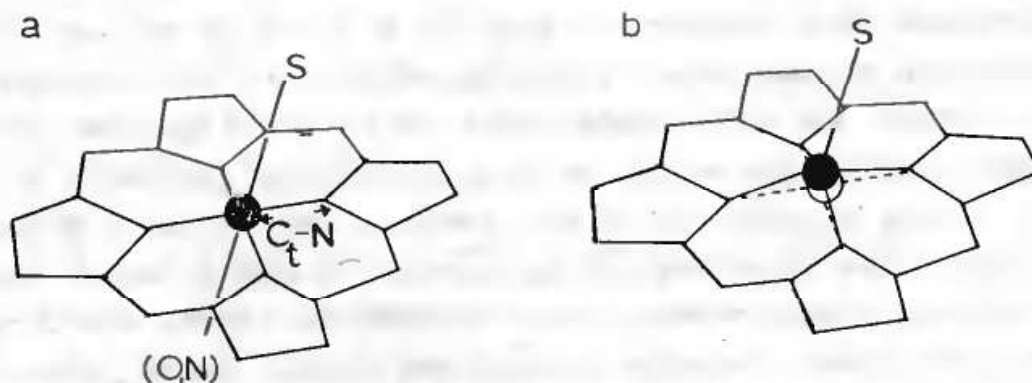
wątroby szczura. W tab. 3 podano położenia tych pasm wraz z interpretacją stanów spinowych i utlenienia [38]. Dominującym pasmem widma RR cytochromu P-450 z frakcji mikrosomalnej wątroby szczura jest pasmo przy 1370 cm^{-1} , którego położenie odzwierciedla stan utlenienia tego enzymu. Położenie tego pasma jest związane ze stopniem utlenienia (Fe III) hemoproteidów i ulega przesunięciu dla stanu (Fe II) do niższej częstotliwości przy ok. 1350 cm^{-1} . Czasami obserwuje się także rozszczepienie tego pasma, np. dla próbki A. Takie rozszczepienia dla stanu utlenionego może być przypisane zarówno wysokospinowym drganiom (1368 cm^{-1}) jak i niskospinowym (1370 cm^{-1}) [39]. Widmo próbki A wykazuje wysokospinowy charakter, który jest związany z pasmami przy 1448 i 1578 cm^{-1} . W niskospinowym ferro-hemoproteidzie, pasma te są przesunięte do wyższych częstotliwości. Taki charakter widma demonstrowa próbka B posiadająca w widmie „niespinowe”

pasmo przy 1370 cm^{-1} oraz silne pasmo przy 1505 cm^{-1} (które jest przesunięte dla stanu wysokospinowego próbki A do 1489 i 1490 cm^{-1}).

Obecność częściowo zdenaturowanego cytochromu P-450 (tzw. cytochromu P-420) jest manifestowana w widmie przez słabe pasmo przy 1520 cm^{-1} w próbce A i złożony charakter szerokiego pasma przy 1630 cm^{-1} .

Z położenia głównych pasm widm RR hemoproteidów można także określić warunki stereochemiczne i koordynacyjne hemu. Porównanie położenia pasm dla stanu utlenionego daje jakościową informację o możliwości małych różnic w budowie pierścienia porfirynowego dla różnego pochodzenia cytochromu P-450 (np. $1370, 1368\text{ cm}^{-1}$ - wątroby szczure; $1371, 1372\text{ cm}^{-1}$ - królika [40]; $1372, 1368\text{ cm}^{-1}$ - *Pseudomonas putida* [39]).

Pokazano, że istnieje liniowa zależność między częstotliwością pasm związanych ze stanem spinowym i wymiarami pierścienia porfirynowego [41, 42]. Na podstawie położenia tych pasm może być określona liczba koordynacyjna centralnego atomu żelaza w hemie w stanie wysokospinowym hemoproteidu. Taka metoda została również zastosowana do badania cytochromu P-450 [43]. W oparciu o równanie $\nu = KA - Kd$ [42, 44], gdzie ν jest częstotliwością położenia pasma przy ok. $1490\text{--}1500\text{ cm}^{-1}$, K równa się $375,5\text{ cm}^{-1}/\text{\AA}$ oraz A równa się $6,01\text{ \AA}$, a d jest badaną odległością $C_t\text{--}N$ (C_t - atom centralny) wyliczono odległości od centrum układu porfirynowego do atomów azotu pierścieni pirolowych ($C_t\text{--}N$) - rys. 9. Dla pasma ramanowskiego przy ok. 1580 cm^{-1} stałe K i A mają wartości odpowiednio $555,5\text{ cm}^{-1}/\text{\AA}$ i $4,8\text{ \AA}$.



Rys. 9. Schemat budowy hemu cytochromu P-450 uwzględniający stan niskospinowy - a, oraz wysokospinowy - b. W przypadku (a) liczba koordynacyjna atomu centralnego wynosi 6, a w przypadku (b) równa się 5. O, N, S - atomy tlenu, azotu, siarki; $C_t\text{--}N$ - odległość atomu centralnego od atomów azotu

Dla próbki A odległości $C_t - N$ były obliczone w oparciu o pasma przy 1489 i 1578 cm^{-1} i wynosiły 2,04 i 2,02 Å oraz dla próbki B (dla pasm przy 1505 i 1580 cm^{-1}) wynosiły 2,00 i 2,01 Å.

Podane tu wyniki pozoetają w dobrej zgodności z danymi uzyskanymi metodą dyfrakcji promieni rentgenowskich [45] dla niskospinowego cytochromu P-450 (próbka B) z królika, które wynoszą 2,00 Å.

Wyniki uzyskane dla wysokospinowej formy cytochromu pokazują powiększanie się pierścienia porfirynowego, podobnie jak dla innych wysokospinowych stanów hemów. Otrzymane wartości są zgodne z obliczeniami modelowymi [46]. Dokładność pomiarów ramanowskich wynosząca $\pm 2 \text{ cm}^{-1}$ w tym przypadku daje błąd ustalenia odległości atomów $C_t - N$ wynoszący $\pm 0,004 \text{ Å}$.

T a b e l a 4

Położenia pasm w widmie RR różnych wysokospinowych hemów zawierających żelazo w cm^{-1} i liczba koordynacyjna atomu centralnego Fe III

Związek	Pasma ramanowskie w cm^{-1}		Liczba koordynacyjna
Chlorhemin	1495	1572	5
HRP	1500	1575	5
Cytochrom C	1500	1578	5
$(\text{Me}_2\text{SO})_2 \text{Fe}(\text{OEP})$	1481	1563	6
Fluoro-HRP	1482	1555	6
Aquomethb	1482	1562	6
Cytochrom P-450	1489	1578	5

HRP - natywna "horseradish" peroksydaza, aquomethb - uwodniona methemoglobina, $(\text{Me}_2\text{SO})_2 \text{Fe}(\text{OEP})$ - bis (dwumetylo-sulfotlenek) oktaetyloporfinat Fe III. Liczba koordynacyjna wyliczona wg [44].

Najnowsze dane uzyskane w oparciu o widma RR wysokospinowych hemoproteidów żelaza dają liczbę koordynacyjną centralnego atomu żelaza, wynosi ona 5-6 w zależności od natury ligantów. Położenia pasm ramanowskich dla wyżej omówionych stanów spinowych i odpowiednie liczby koordynacyjne są podane w tab. 4 [44]. Z porównania położenia pasm ramanowskich cytochromu P-450 i innych związków można ustalić prawdopodobieństwo otrzymania liczby koordynacyjnej 5 w wysokospinowej odmianie cytochromu P-450. Takie stwierdzenie jest ważne dla wyjaśnienia molekularnego mechanizmu funkcjonowania cytochromu P-450.

LITERATURA

- [1] Lord R. C., Appl. Spectroscopy, 31, 3, 187-194 (1977).
- [2] Petricolas W. L., Biochemie, 57, 417-428 (1975).
- [3] Gaber B. P., Am. Laboratory, March, 15-24 (1977).
- [4] Forrest G., Lord R. C., J. Raman Spectroscopy, 6, 1, 32-37 (1977).
- [5] Wallach D. F. H., Winzler R.J., Infrared and Raman Spectroscopy. Envolving Strategies and Tactics in Membrane Research, Springer Verlag, New York 1974.
- [6] Frushour B. G., Koenig J. L., Advances in Infrared and Raman Spectroscopy, ed. R. J. H. Clark, R. E. Hester, vol. 1, 1-142 (1975).
- [7] Siemion I. Z., Metody spektroskopii oscylacyjnej, PWN, Warszawa 1979.
- [8] Twardowski J., Postępy Biochemii, 24, 3, 373-393 (1978).
- [9] Twardowski J., Proniewicz L.M., Skrzyński W., Zagad. Biof. Współcz., 5, 39-96 (1980).
- [10] Carey P. R., Salares V. R., Advances in Infrared and Raman Spectroscopy, ed. R. J. H. Clark, R. E. Hester, vol. 7, 1-58 (1980).
- [11] Carey P. R., Quarterly Reviews of Biophysics, II, 3, 309-370 (1978).
- [12] Anzenbacher P., Strauch B., Chemicke listy, 73, 496-516 (1979).
- [13] Igarashi H., Hollander V. P., J. Biol. Chem., 243, 23, 6084-6089 (1968).
- [14] Saini M. S., Van Etten R. L., Biochim. Biophys. Acta, 526, 469-478 (1978).
- [15] Igarashi M., Takahashi H., Tsuyama N., Biochim. Biophys. Acta, 220, 85-92 (1970).
- [16] Ostrowski W., Bhargava A. K., Dziembor E., Gizler M., Gryszkiewicz J., Barnard E. A., Biochim. Biophys. Acta, 453, 262-269 (1976).
- [17] Twardowski J., Rozprawy habilitacyjne UJ, 43, 1-52 (1980).
- [18] Orrenius S., Ernster L., Molecular Mechanisms of Oxygen Activation, ed. O. Hayashi, Academic Press, 6, 215-244 (1974).
- [19] Fleischer S., Packer L., Methods in Enzymology, 52, C, Academic Press, (1978).
- [20] Ruckpaul K., Pharmazie, 33, 308-309 (1978).
- [21] Proceedings of the Sci. Conf. Cytochrome P-450, Acta Biol. Med. Germ., 38 (1979).
- [22] Hagen D. A., Coon M. J., J. Biol. Chem., 251, 7929 (1976).
- [23] Chlumský J., Thesis, Charles University, Praga 1977.
- [24] Anzenbacher P., Sipal Z., Chlumský J., Strauch B., Studia Biophysica, 78, 73 (1980).
- [25] Loehr T. M., Keyes W. E., Pincus P. A., Anal. Biochem., 96, 456-463 (1979).
- [26] Twardowski J., Biopolymers, 17, 181-190 (1978).
- [27] Twardowski J., Biochim. Biophys. Acta, 578, 116-124 (1979).
- [28] Twardowski J., Proceedings of VIIth Int. Conf. on Raman Spectroscopy, Ottawa, Kanada, ed. W. F. Murphy, North-Holland, 602-603 (1980).

- [29] Twardowski J., w przygotowaniu.
- [30] Twardowski J., Proniewicz L. M., Zeszyty Naukowe UJ, Prace Chemiczne, t. 26, w druku.
- [31] East E. J., Chang R. C. C., Yu N. T., Kuck J. F. R., J. Biol. Chem., 253, 1436, (1978).
- [32] Twardowski J., Dejevska A., Acta Biochim. P Pol., 26, 4, 327-333 (1979).
- [33] Twardowski J., Proniewicz L. M., Zeszyty Naukowe UJ, Prace Chemiczne, t. 26, w druku.
- [34] Twardowski J., Proniewicz L. M., Zeszyty Naukowe UJ, Prace Chemiczne, t. 25, 93-101 (1980).
- [35] Spiro T. G., Biochim. Biophys. Acta, 416, 169 (1975).
- [36] Warshel A., Ann. Rev. Biophys. Bioeng., 6, 273 (1977).
- [37] Lanir A., Yu N. T., Felton R. H., Biochem. 18, 1656 (1979).
- [38] Spiro T. G., Burke J. M., J. Am. Chem. Soc., 98, 5482 (1976).
- [39] Champion P. M., Gunsalus I. C., Wagner G. C., J. Am. Chem. Soc., 100, 3743 (1978).
- [40] Ozaki Y., Kitagawa T., Kyogoku Y., Imai Y., Hashimoto-Yutsudo C., Sato R., Biochem., 17, 5826 (1978).
- [41] Spalding I. D., Chang C. C., Yu N. T., Felton R. H., J. Am. Chem. Soc., 97, 2517 (1975).
- [42] Huong P. V., Pommier J. C., C. R. Acad. Sci. Ser. C, 285, 519 (1977).
- [43] Anzenbacher P., Sipal Z., Strauch B., Abstracts I Int. Conf. on Xenobiochemistry, Bratysława 1980, czarwiec 9-13, p. 133.
- [44] Spiro T. G., Stong J. D., Stein P. J., J. Am. Chem. Soc., 101, 2648 (1979).
- [45] Cramer S. P., Dawson J. H., Hodgson K. O., Hager L. P., J. Am. Chem. Soc., 100, 7282 (1978).
- [46] Hoard J. L., Porphyrins and Metalloporphyrins, ed. K. M. Smith, Elsevier, Amsterdam, 8, 317 (1975).

Jacek Twardowski, Pavel Anzenbacher, Zbigniew Grelak

RAMAN AND RESONANCE RAMAN STUDIES OF ACID PHOSPHATASE AND CYTOCHROME P-450 FROM RAT LIVER

S u m m a r y

The Raman spectra of acid phosphatase isoenzymes I and II from rat liver and resonance Raman spectra of cytochrome P-450 from rat liver are reported. The results present the differences between both the enzymes and the changes in the isoenzyme I carbohydrate amount with the age. Some Raman spectra of proteins are presented and the structure of cytochrome P-450 heme is studied.

dr JACEK TWARDOWSKI
Instytut Zoologii
Uniwersytetu Jagiellońskiego
ul. Karasia 6
30-060 Kraków

dr PAVEL ANZENBACHER
Zakład Biochemii
Uniwersytetu Karola
ul. Albertov 2030
128-40 Praga 2

mgr ZBIGNIEW GRELAK
Pracownia Ramana
Środowiskowe Laboratorium Analiz
Fizykochemicznych i Badań Strukturalnych
Uniwersytetu Jagiellońskiego
ul. Karasia 3
30-060 Kraków