

Krystyna Bystra

BADANIA SPEKTRALNE FLAWINOWYCH GRUP PROSTETYCZNYCH1. WSTĘP

Od dawna znana jest grupa oksydoreduktaz, zawierających jako grupy prostetyczne nukleotydy flawinowe. Nazwa flawin pochodzi od słowa „flavus” - żółty. Enzymy flawoproteinowe mogą mieć grupę prostetyczną mono-, bądź dwunukleotydową [41, 95]. Oba rodzaje nukleotydów zawierają układ ryboflawiny (rys. 1).

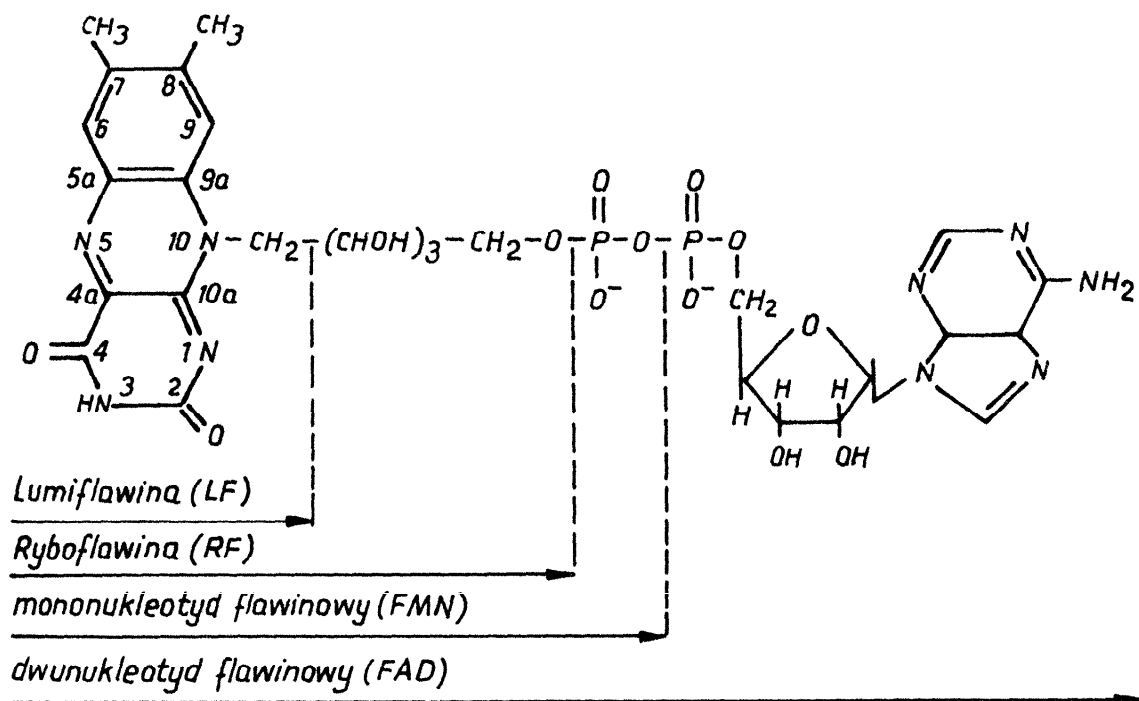
Odwracalne reakcje utleniania i redukcji ryboflawiny (RF), mononukleotydu flawinowego (FMN), dwunukleotydu flawinowego (FAD) zachodzą w ich pierścieniu izoalloksazynowym.

Enzymy flawinowe mogą być dostosowane do różnych substratów w dużej rozpiętości potencjału oksydo-redukcyjnego, tj. od -350 mV do niskich dodatnich. Rozpiętość potencjałów w układach flawinowych jest uzależniona od obecności FMN, FAD lub obydwu koenzymów, jonów metali (Fe^{3+} , Mo^{2+} , być może i Zn^{2+}) i sposobu ich powiązania z białkiem, jak też zmian konformacyjnych samych białek [44, 71].

Obok flawoprotein zawierających FMN lub FAD jako grupę prostetyczną, występują białka specyficznie wiążące RF. Kompleksy te spełniają funkcję magazynującą i uczestniczącą w rozprowadzaniu witaminy B_2 (RF) w organizmach dojrziałych oraz w czasie rozwoju embrionalnego [6]. Białka specyficznie wiążące RF nie wykazują właściwości enzymatycznych, są proteinami niskocząsteczkowymi [108].

Pokażna ilość procesów biochemicznych, w których biorą udział enzymy flawinowe, związana jest z emisją i absorpcją światła - ze zjawiskami bioluminescencji, fotolizy, fotoutleniania, fotoredukcji i fotoodbarwiania (photofading). Udział flawin w procesach działania fotodynamicznego, fototropii, fototaksji i fotomorfogenezy jest dobrze znany biologom [101, 104, 105]. Jednak jest jeszcze wiele nie rozwiązanych problemów: np. krewetka *Processa vobusta* ma na stronie grzbietowej białą plamę utworzoną z chromoforów zawierających granulki białego pigmentu, które przemieszczają się

zgodnie z rytmem-rozkurcz w dzień, skurcz w nocy [71]; przemieszczenia te mogą być wywołane przez stymulatory hormonalne [11, 43] lub świetlne zarówno *in vivo* [61], jak i *in vitro* [22]. Dotychczas stwierdzono, że w skład białego pigmentu wchodzi RF i izo-



Rys. 1. Chemiczna struktura flawin [20]

ksantopteryna. Powstaje pytanie, w jakiej formie występuje flawina, czy flawoproteina w białym pigmentcie i czy ten związek spełnia rolę substancji światłoczułej? Jest to jeden z wielu przykładów ujawniających ile zagadnień należy rozwiązać, aby poznać funkcje pełnione przez flawiny oraz mechanizm działania flawoenzymów. Eksperymentalne prace nad tymi zagadnieniami prowadzone są wg następujących kierunków metodologicznych:

- 1) badania modelowych układów symulujących oddziaływanie flawin z biopolimerami,
- 2) obserwacje różnic we właściwościach fizykochemicznych flawiny lub apoproteiny w porównaniu z ich kompleksem czyli flawoproteina,
- 3) badania wiązań strukturalnych analogów ryboflawiny oraz białka,
- 4) próby określenia specyficznej roli różnych bocznych reszt aminokwasowych łańcucha polipeptydowego w tworzeniu kompleksu z flawiną [46].

Dzięki chromoforowym i fluoroforowym właściwościom flawin podstawowym narzędziem w badaniach flawoprotein stały się metody spektroskopowe.

W pracy tej przedstawiono i przedyskutowano wyniki badań flawin i flawoprotein (ze szczególnym uwzględnieniem flawoproteiny z białka jaja kury) otrzymane dzięki wykorzystaniu metod spektroskopowych.

2. UKŁADY SYMULUJĄCE ODDZIAŁYWANIE FLAWIN Z BIOPOLIMERAMI

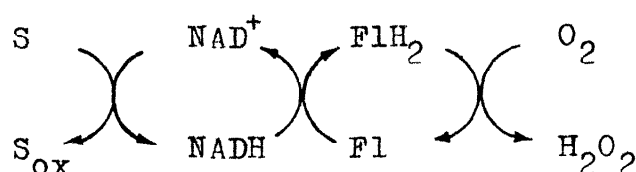
Modelowe badania biologicznych funkcji flawin powinny uwzględniać fakt, że w naturalnych strukturach biologicznych flawiny tworzą połączenia z białkami o specyficznej stereostrukturze. Biologiczne działanie flawin można rozpatrywać jako działanie flawoprotein w błonach komórkowych, będących układami anizotropowymi, w których pole molekularne cząsteczek otaczających cząsteczkę flawiny może wpływać na jej strukturę stereoskopową i reaktywność biochemiczną [18]. Podobne efekty oddziaływań molekularnych można osiągnąć przez wprowadzenie flawin do układów o specyficznych właściwościach strukturalnych.

Układy stosowane do otrzymywania struktur modelowych symulujących pewne cechy struktur biologicznych można w zasadzie podzielić następująco: a) micle roztworów koloidalnych, b) powierzchnie ciał stałych o silnych właściwościach sorpcyjnych, c) matryce polimerowe w postaci izotropowych i anizotropowych folii, d) monowarstwy i warstwy podwójne (dwuwarstwy), e) syntetyczne błony lipidowe, f) roztwory makrocząsteczek, w których wytworzono gradient prędkości, g) ciekłe kryształy.

S c h m i d t [81] badał flawiny osadzone atomami N(3), C(7), i C(10) w membranie, co miało symulować specyficzne wiązanie koenzymu z apoproteina. Najbardziej efektywnymi parametrami pomiarowymi takich układów są polaryzacyjne widma fluorescencji i polaryzacyjne widma wzbudzenia. W tym przypadku chromofory były prawdopodobnie modyfikowane wyłącznie przez sposób „zakotwiczenia” wewnątrz membrany [81]. Zaobserwowano również wzrost wydajności kwantowej fluorescencji flawin w fazie przejściowej żel-ciekły kryształ. Z rezultatów przedstawionych w pracy S c h m i d t a wynika, że polaryzacja fluorescencji flawin związanych w membranach jest znacznie wyższa niż dla izotropowo rozłożonych flawin.

Zakres badań modelowych można znacznie rozszerzyć poprzez dobór miceli o odpowiednich właściwościach fizykochemicznych. S h i-

n a k i i współprac. [85, 86] stosując różne micelle kationowe do badania właściwości oksydo-redukcyjnych pochodnych flawin, zbadali wpływ wielofazowych środowisk, takich jak micelle i polimery rozpuszczalne w wodzie, na reaktywność koenzymów. Syntetyzowano również polimery, które „rdzeniem” polistyrenu łączyły się z flawiną w pozycji N(3). Okazało się, że flawina w takim układzie może być doskonałym czynnikiem utleniającym tiol czy karboanion [87]. Wydajność tego procesu można znacznie poprawić przez utworzenie pojedynczej struktury molekularnej lub agregatu miceli, wewnątrz których znajduje się flawina i jon tiazolowy [87]. Molekuła zawierająca kombinacje różnych koenzymów wykazuje interesujące właściwości katalityczne. Wysoka wydajność intramolekularnej katalizy wskazuje, że układ micelarny może stanowić modelowy system katalizy enzymatycznej [88]. S h i n k a i i in. [88] udowodnili, że 5-dezaizooaloksazyna i flawina mogą tworzyć układ utleniający, który będzie modelem mostu elektronowego od NAD^+ do flawiny (schemat 1).



Schemat 1 [88]

Inny model flawinowych struktur biologicznych stanowią matryce polimerowe w postaci izotropowych i anizotropowych folii z wbudowanymi flawinami. Badania spektroskopowe RF w takich układach wykazały, że cząsteczki RF wbudowane w krystality mają inne właściwości absorpcyjne i emisyjne niż RF w amorficznych obszarach folii polimerowej [19, 20]. Można więc przypuszczać, że w RF w matrycach z alkoholu poliwinylowego (PVA) tworzy dwa rodzaje centrów różniących się właściwościami spektroskopowymi. Przyjmując folie PVA za bardzo uproszczony model białka, badanie flawin w anizotropowych foliach polimerów organicznych można traktować jako badanie wpływu konformacji biopolimerów na właściwości flawin. W naszych ostatnich badaniach [10] zaobserwowano, że flawina z polimerem tworzy kompleksy stabilizowane wiązaniami wodorowymi. Rezultatem tego oddziaływania mogą być zmiany geometrii (planarności) oraz zmiany rozkładu ładunku (polarności) w podstawowym i wzbudzonym stanie elektronowym flawiny. Zmiany te zazwyczaj wpływają na rozkład przejść wibronowych oraz na orientację emi-

syjnych i absorpcyjnych momentów przejść [19]. Potwierdzeniem tego faktu jest hipsochromowe przesunięcie (w stosunku do roztworów wodnych) II pasma absorpcji flawin w matrycach PVA. Efekt ten jest porównywalny z przesunięciem II pasma absorpcji uzyskanym z obliczeń metodą orbitali molekularnych [19, 90]. Z obliczeń tych wynika, że II pasmo absorpcji flawiny w matrycy PVA zmienia położenia po utworzeniu się wiązań wodorowych atomów polimeru z atomami N(5), N(3)H, O(14) i/lub O(12) izoalloksazyny. W pozycjach N(3) i O(12) i/lub O(14) długa oś rdzenia izoalloksazynowego ma możliwość orientacji pod kątem ostrym w stosunku do łańcucha PVA. Taką orientację potwierdzają wyniki otrzymane z badań FMN w anizotropowych filmach PVA w podczerwieni (IR), obszarze widzialnym (Vis) i w nadfiolecie (UV), oszacowana wartość tego kąta jest bliska 40° [10, 19]. Z drugiej strony niebieskie przesunięcie II pasma absorpcji obserwowano także dla flawin związanych z innymi polimerami. Fakt ten tłumaczy się unieruchomieniem flawin prawdopodobnie w hydrofobowym obszarze polimeru [17, 10], dlatego filmy PVA powinny być traktowane jako fazy dyspersyjne mniej polarne niż woda. Na podstawie pomiarów różnicowych widm absorpcji, stwierdzono specyficzne oddziaływanie między flawinami (RF, FMN) a matrycą PVA, w wyniku których następuje wzrost natężenia przejść wibronowych w obszarze absorpcji ok. 330, 400 i 500 nm. Wzrost absorpcji w obszarze 330 i 400 nm można traktować jako aktywację dwóch przejść $n \rightarrow \pi^*$ pod wpływem matrycy PVA lub jako zmiany rozkładu prawdopodobieństwa przejść wibronowych elektronowego przejścia odpowiadającego pasmu II i (lub) pasmu I. Obserwowana zmiana rozkładu przejść wibronowych w obszarze I pasma absorpcji flawin w filmach PVA odpowiada efektom widmowym kompleksów flawin i funkcyjnych grup protein [18].

Heelis i współprac. badali fotochemiczne właściwości butyrylowej pochodnej RF (RFTB) w układach liposomowych i micelarnych [32]. RFTB w tych układach wykazuje małą wydajność fosforescencji w stosunku do FMN w roztworze wodnym lub RFTB w EtOH. Efekt ten, występujący w układach micelarnych, można traktować jako wynik wygaszania promieniowania flawiny przez jon Br^- - zlokalizowany na powierzchni miceli (jon Br^- jest znanym wygaszaczem stanów singletowych i trypletowych flawiny). W tych układach modelowych mała wydajność fosforescencji flawin może odpowiadać oddziaływaniu w stanie podstawowym, tak jak obserwuje się to pomiędzy cząsteczkami flawin dla wysokich lokalnych stężeń barwnika w matrycach.

3. WŁAŚCIWOŚCI ABSORPCYJNE FLAWIN WE FLAWOPROTEINACH

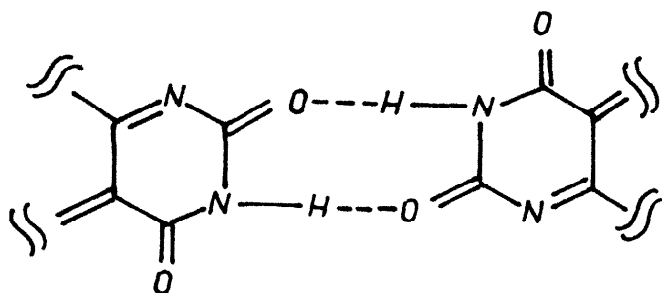
Wiele parametrów fizykochemicznych analogów RF zmienia się po utworzeniu kompleksu z apoproteiną. Zmiany tych parametrów można obserwować poprzez pomiary absorpcji flawin i ich kompleksów.

Widma absorpcyjne flawin są wynikiem występowania w ich strukturze pierścienia izoalloksazyny. Najczęściej bada się położenie maksimum trzech pasm absorpcyjnych RF: 445 nm (I), 373 nm (II) i 268 nm (III). Podstawniki w pierścieniu izoalloksazynowym w niewielkim stopniu wpływają na kształt widma absorpcji. Widmo absorpcji FMN jest prawie identyczne z widmem absorpcji RF, natomiast w widmie FAD maksima są nieco przesunięte w kierunku czerwieni; odpowiedzialny za to jest wewnątrzcząsteczkowy kompleks utworzony między pierścieniami izoalloksazyny i adeniny [27].

Poprzez badanie efektów temperaturowych uzyskano informacje o mikrootoczeniu flawin. W zakresie niskich temperatur, w rozpuszczalnikach o wysokiej lepkości i niskiej polarności - gdzie następuje obniżenie fluktuacji lokalnych pól elektrycznych - obserwuje się wyraźny wpływ temperatury na widma absorpcji [10, 62]; szczególnie widać ten efekt w tzw. różnicowych widmach absorpcji w różnych temperaturach (TDS). TDS flawin podobne są do widm flawoprotein. Obserwowane niewielkie zmiany widmowe przypisuje się redukcji rotacji flawiny poprzez związanie jej z apoproteiną i możliwości odkształcenia wiązania koenzymu [62]. Ten wniosek potwierdzono wynikami badań dichroizmu kołowego (CD) [23]. Widma TDS można interpretować jako wynik oddziaływania przez obszar "through space" i przez łańcuch "through chain" zachodzącego między centrami chiralnymi łańcuchów bocznych i flawinowym chromoforem, które w różny sposób wpływają na dwa pierwsze przejścia $\pi-\pi^*$.

W roztworach wodnych większość flawin (z wyjątkiem FAD) wykazuje stężeniową zależność widm różnicowych [21, 28]. Prawdopodobnie zjawisko to spowodowane jest tworzeniem się kompleksów między drobinami flawiny (fakt tworzenia się dimerów dla FMN⁺ opisał G i p s o n [29] już w 1962 r.). Z naszych badań wynika, że flawiny w roztworach wodnych, począwszy od stężenia 5×10^{-5} M w temperaturze pokojowej, mogą być traktowane jako roztwory monomerów. Przy stężeniach flawiny powyżej 5×10^{-5} M obserwuje się obecność i monomerów, i dimerów flawin w roztworze [21]. Dimery nie występują w rozpuszczalnikach organicznych, np. w chloroformie. Obecność protomu w położeniu N(3') izoalloksazyny jest ważnym czynnikiem w procesie tworzenia się kompleksów. Kompleksy flawina-

-flawina, które mają proton w centrum N(3) mogą zmniejszać prawdopodobieństwo oddziaływania hydrofobowego, czy wiązania wodorowego z molekułami wody. Kiedy pozycja N(3) jest alkiowana lub składowe związków nie posiadają w pozycji N(3) żadnego protonu, wówczas zaznacza się tendencja do powstawania kompleksów międzymolekularnych [62]. W rozpuszczalnikach o niskiej polarności możliwy jest jeszcze inny rodzaj wzajemnego oddziaływania flawin - przez atom N(3)H. To oddziaływanie dotyczy wiązań wodorowych z grupą karbonylową C(2) lub C(4) dwóch molekuł flawinowych (rys. 2), które są odwrócone w stosunku do siebie [52, 62]. Wniosek powyższy potwierdzono wynikami badań magnetycznego rezonansu jądrowego (NMR) dla kompleksów FMN⁺ [40, 45, 77] oraz metodami fluorescencyjnymi dla FMN [17].



Rys. 2. Przykład kompleksu flawina-flawina [62]

Także porównanie wyników NMR [79] i obliczonych gęstości π -elektronowych dowodzi, że utleniona flawina w stanie podstawowym dołącza preferencyjnie nukleofile (SO_3^{2-} , $\text{P}(\text{C}_6\text{H}_5)_3$) w centrach N(5) i C(10a). Centra C(2) i C(8) są chemicznie mniej reaktywne, lecz również ulegają reakcjom podstawień nukleofilowych. W przypadku reakcji elektrofilowych nukleofile występują w C(9) [80].

Z kolei obliczenia metodą orbitali molekularnych wskazują na występowanie wiązań wodorowych w pozycjach N(1) lub N(5), co w znacznym stopniu modyfikuje widma absorpcji izoalloksazyny, natomiast wiązania wodorowe w innych pozycjach izoalloksazyny dają małe zmiany w widmie absorpcji [69]. Badania widmowe oraz obliczenia teoretyczne pozwoliły wykazać, że wiązanie wodorowe w N(5) powoduje nieznaczne zmniejszenie gęstości elektronowej w tej pozycji. Jeżeli jednak zachodzi dodatkowe wiązanie wodorowe w O(12), N(3)H i O(14), np. we flawodoksynie czy oksydazie D-aminokwasów, to powinowactwo elektronowe rdzenia izoalloksazyny wzrasta i azot N(5) zachowuje wysoką możliwość akceptowania elektronu. Wiazania wodorowe zachodzące w O(12), N(3)H, O(14) są zawsze rozpatrywane jako najważniejsze czynniki wpływające na katalityczną aktywność flawo-

protein. Y a g i i in. [70, 102] na podstawie przesunięć I i II pasma absorpcji flawiny zasugerowali możliwość powstawania wiązań wodorowych wg następującej kolejności: nie ma wiązania wodorowego $\rightarrow N(1)$ wiązanie wodorowe $\rightarrow N(1)$, $O(12) \rightarrow N(1)$, $O(12), O(14) \rightarrow N(1)$, $O(12)$, $N(3)H$, $O(14) \rightarrow N(1)$, $O(12)$, $N(3)H$, $O(14)$, $N(5)$ [70]. Według obliczeń przesunięcie II pasma absorpcji $\pi \rightarrow \pi^*$ flawin jest większe niżeli pierwszego. Ten fakt częściowo można wyjaśnić silniejszym wiązaniem wodorowym w drugim wzbudzonym stanie singletowym S_2 niż w stanie S_1 . Co więcej, stan S_2 flawiny jest bardziej polarny w jego strukturze elektronowej. Różnica pomiędzy momentami dipolowymi w stanach S_2 i S_0 dla 7,8-dwumetyloizoalloksazyny wynosi 10,47 D, natomiast w przypadku stanów S_1 i S_0 - 5,4 D [90]. Jest to zgodne z obserwacjami, że wiązanie wodorowe wywołuje większe zaburzenie w II paśmie absorpcji niżeli w I [49, 96, 102].

Generalnie (zgodnie z Becvarem [4]) widma absorpcji flawin w kompleksach białkowych w stosunku do roztworów wodnych flawin wykazują batochromowe przesunięcie z rozdzielaniem struktury wibronowej w paśmie I i hipochromizm w paśmie II. Rozdzielenie struktury wibronowej pasma widzialnego flawoprotein wydaje się być charakterystyczne dla flawin w roztworze apolarnym; intuicyjnie jest to zgodne z hydrofobowością miejsc wiązania, ale trudne do zinterpretowania [12].

Przykładem, odzwierciedlającym powyższe sugestie może być sposób połączenia flawiny z apoproteiną (RBP) we flawoproteinie białka jaja kury. Już Becvar [4] wykazał, że flawoproteina z białka jaja kury toleruje strukturalne modyfikacje izoalloksazyny; wymieniona apoproteina wiąże się z RF. Te właściwości białka były przyczyną używania go do asocjacji z analogami flawin [99].

Na podstawie badań spektralnych stwierdzono, że utlenioną formę flawoproteiny charakteryzują maksima absorpcji przy 458, 375, 276 nm [106, 108]. Pasma absorpcji przy 458 i 375 nm są przesunięte w kierunku fal dłuższych w porównaniu z wolną RF, obserwuje się również wzrost absorpcji w zakresie 480-490 nm. Stosunek absorpcji A_{276} do A_{458} wynosi 6,5. Apoproteina wykazuje jedno maksimum pasma absorpcji w 280 nm o 45% niższym od maksimum pasma absorpcji flawoproteiny. W widmach absorpcji UV flawoprotein obserwuje się niezbyt wyraźne minimum w 265 nm, gdzie przypadają maksimum pasma absorpcji RF. Dodatnia dewiacja w obszarze 285-310 nm może być przypisana absorpcji aromatycznych aminokwasów omawianej proteiny, ponieważ barwnik w tym obszarze wykazuje słabą absorpcję.

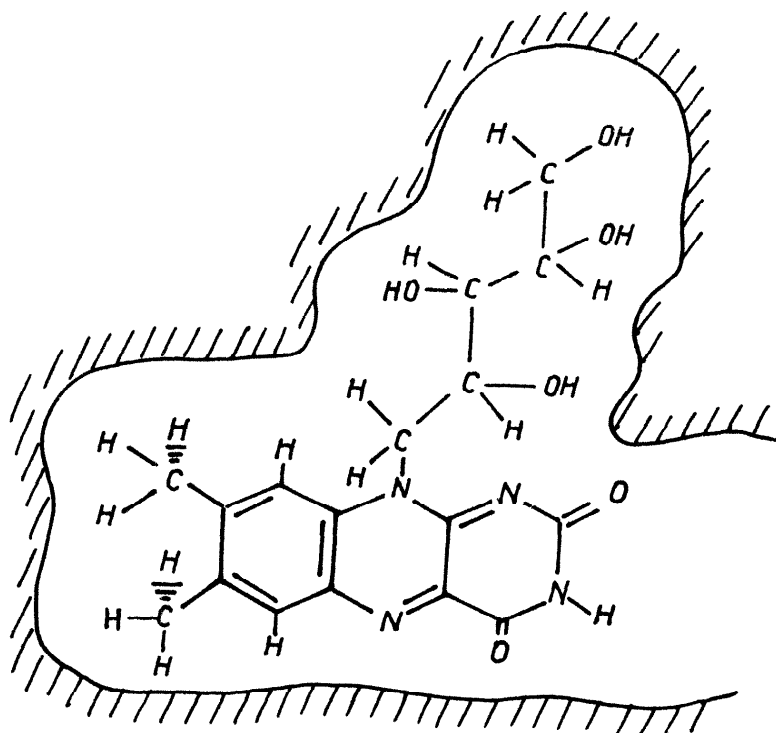
Nasze badania [20] wykazują istnienie dodatkowego przejścia elektronowego dla flawin w obszarze 300–310 nm. Z porównania prac [106 i 20] wynika, że dotychczas zmiany widmowe w tym obszarze nie są tłumaczone jednoznacznie. Ogólnie widmo kompleksu nie odpowiada sumie widm apoproteiny i nie związanej RF.

Na podstawie badań modelowych stwierdzono, że przeniesienie flawin z rozpuszczalników polarnych do niepolarnych powoduje pojawienie się struktury wibronowej pasma 450 nm oraz obniżenie natężenia pasma II [63]. W przypadku RBP brak przesunięcia hipsochromowego w II pasmie absorpcji tłumaczy się wynikiem kompensacji dwóch efektów: hydrofobowości miejsca wiążącego oraz bardziej specyficznego oddziaływania RF z aromatycznymi resztami aminokwasowymi cząsteczki białka.

W przeciwieństwie do tych wyników T o l l i n i E d m o n d s o n [23, 24, 26] stwierdzili, że w Shethna flawoproteinie wskutek oddziaływania proteiny z flawiną obserwuje się tylko nieznaczne zmiany widma reszt tryptofanu, mimo że nastąpiły poważne zmiany w konformacji grzbietu polipeptydowego.

Zlokalizowane maksima, a szczególnie minima w widmie różnicowym kompleksu izoalloksazyna-10-metylowy ester aminokwasu, są przesunięte w kierunku fal dłuższych (w rzędzie tryptofan > tyrozyna > fenyloalanina), im krótszy jest most alkilowy w pozycji 10 [30].

Wiązanie flawiny do apoproteiny głównie jest przypisywane hydrofobowemu oddziaływaniu pierścieni flawiny z niepolarnymi grupami proteiny i stereoselektywnemu ułożeniu łańcucha bocznego N(10) poprzez wodorowe wiązania grup hydroksylowych tego łańcucha [55, 56]. Na podstawie przytoczonych wyników opisano cząsteczkę RBP [12, 46]. Droбина RBP składa się z hydrofilowej warstwy zewnętrznej oraz obszaru wewnętrznego, którego najgłębsze regiony mają charakter silnie hydrofobowy. Ponadto na powierzchni tego białka znajduje się hydrofobowa szczelina, stanowiąca centrum wiążące RF (rys. 3). „Kieszka” wiążąca utworzona jest głównie z reszt takich aminokwasów, jak: walina, leucyna, izoleucyna czy fenyloalanina. Posługując się metodą chemicznej modyfikacji, nie wykryto w tym obszarze reszt tyrozylowych. Niereaktywne reszty tyrozylowe (6–7) są prawdopodobnie ukryte w hydrofobowym wnętrzu makrocząsteczki. Ich modyfikacja po wcześniejszym traktowaniu 4 M chlorowodorkiem guanidyny prowadzi do całkowitej inaktywacji flawoproteiny. Rola tych reszt polega głównie na zaangażowaniu się w oddziaływanie hydrofobowe warunkujące prawidłową strukturę trze-

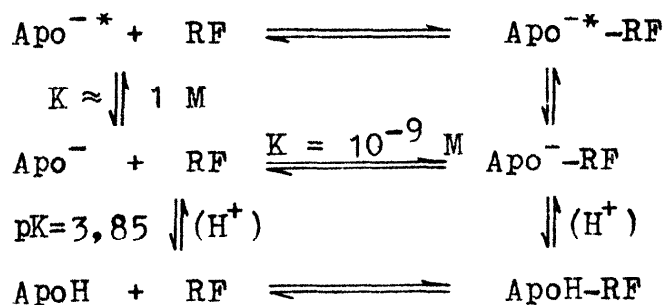


Rys. 3. Schematyczne przedstawienie miejsca wiązania flawiny w RBP [12]

ciorzędową tego białka [92]. Na dnie szczeliny znajdują się 1-2 reszty tryptofanyłowe (spośród 7) tworzące kompleksy π - π z dwumetylochinoksalinowym fragmentem cząsteczki flawiny. W warstwie powierzchniowej białka zlokalizowana jest przeważająca większość grup najsilniej zjonizowanych, zatem najbardziej hydrofilowych. Wszystkie grupy fosforanowe (7 grup na cząsteczkę białka) znajdują się na samej powierzchni białka, również wszystkie grupy N-aminowe zlokalizowane są prawdopodobnie w pobliżu powierzchni białka [46]. Ponadto w centrum wiążącym występuje pojedyncza grupa karboksylowa. Jest ona istotna dla wiązania RF w tym sensie, że jej modyfikacja powoduje całkowitą utratę powinowactwa białka do flawin [47]. Wydaje się, że istotne dla wiązania RF przez apoproteinę jest jedno z ośmiu wiązań dwusiarczkowych w cząsteczce apoproteiny [48].

B l a n k e n h o r n [5] zaproponował schemat równowagi pomiędzy różnymi formami flawoproteiny białka jaja kury (schemat 2).

We flawodoksynie z *Desulfovibrio vulgaris* flawina (RF, FMN) związana z molekułą białka jest zorientowana przeciwnie niż w przypadku flawoproteiny z białka jaja kury, tzn. część molekuły - dwumetylobenzen - jest wystawiona do roztworu, natomiast część piry-



Schemat 2 [5]

midynowa „zagrzebana” w proteinie [15]. Dowodzi to, że apoproteiny stanowią istotną bazę dla aktywnych konformacji białek (holoprotein). Jednocześnie badania kinetyczne wskazują, iż pozycja 8 flawiny związanej z apoproteina w oksydazie D-aminokwasów, starym żółtym enzymie i flawodoksynie jest dostępna dla roztworu, podczas gdy w oksydazie glukozy i RBP wydaje się być niedostępna. W oksydazie ksantyny wszystkie dane sugerują ekspozycję centrum 8 izoalloksazyny do roztworu, jednak dotychczasowe wyniki nie są przekonujące.

Z badań CD [75, 100] flawoprotein z kowalennie związanym koenzymem orientacje momentów przejść flawiny i jej otoczenia mogą być różne dla dwóch enzymów. Przypuszczalnie różnice te wynikają z następujących przesłanek: 1) orientacje geometrii flawiny w miejscach aktywnych są różne, chociaż kierunki elektrowegetnego momentu przejścia flawiny podobne; 2) kierunki momentu przejścia samej flawiny różne w wyniku modyfikacji pierścienia izoalloksazyny.

Jak wcześniej wspomniano, próbuje się określić specyficzną rolę aromatycznych aminokwasów łańcucha polipeptydowego w tworzeniu kompleksu z flawiną. Dzięki badaniom przy wykorzystaniu promieni X, wyznaczono modelowe struktury kompleksów flawina-tyrozyna i flawina-tryptofan we flawoproteinach [37-39]. Z badań tych wynika, że izoalloksazynowy pierścień jest w przybliżeniu planarny (maksimum dewiacji dla C(2) wynosi 0,09 Å). Dla pochodnych utlenionej flawiny wyznaczony kąt dwuścienny między płaszczyzną benzenu i pirymidyny wynosi 4,7°, również występuje niewielka deformacja dla purazynowej części. Tak ustawione pierścienie tworzą „łódkową” konformację izoalloksazyny [37]. Kompleksy flawina-tryptofan mają charakter „stosowy” (stacked) z odległością międzypłaszczyznową ok. 3,4 Å. Kompleksy te są stabilizowane oddziaływaniami van der Waalsa i wiązaniami wodorowymi z czterema cząsteczkami wody występującymi w takich stosach.

W omawianych kompleksach płaszczyzny pierścieni indolu i fenolu są zawsze równoległe do płaszczyzny izoalloksazyny. Kompleksy te zalicza się do asocjatów z przeniesieniem ładunku (CT) z pierścienia donora - reszty aromatycznej aminokwasu - do najniższego, nie zajętego orbitalu izoalloksazyny w stanie podstawowym. Fakt ten znajduje odzwierciedlenie w widmie absorpcji flawiny. Na przykład obecność donorów w roztworze wodnym ryboflawiny nie wpływa zasadniczo na zmianę poziomów elektronowych RF, powoduje tylko niewielkie przesunięcie i rozszerzenie pasm. Utworzony kompleks CT zmienia mikrootoczenie RF w stosunku do wody i wykazuje stałą równowagi $K_{AD} = 68,8 \text{ M}^{-1}$ [76, 97].

Stosowe oddziaływanie pomiędzy resztą tyrozyny i pierścieniem izoalloksazyny FMN obserwowano w strukturach flawodoksyny z *Desulfovibrio vulgaris* i *Clostridium MP* [103]. Poza tym potwierdzono, że flawoproteiny większości oksydaz (tak jak kilku innych enzymów) stabilizują chinonową formę flawiny. To odkrycie dostarcza argumentów do podtrzymania tezy, że natywna flawina we flawoproteinie oksydazy utrwała ujemny ładunek umiejscowiony w N(1)-C(2a) podczas biegu normalnej redukcji [31]. Flawiny zarówno wolne, jak i związane z białkiem ulegają także nieodwracalnej fotoredukcji połączonej z tworzeniem się związków addycyjnych. W powstawaniu tych połączeń uczestniczy podwójne wiązanie między N(5) i C(4a) izoalloksazyny [59]. Modyfikacje wszystkich pierścieni RF powodują zwykle obniżenie energii wiązania.

Udowodniono [59], że reszty tryptofanu i tyrozyny spełniają te same funkcje w wiązaniu z koenzymem flawinowym oraz w reakcjach redox we flawoproteinie. Poza tymi dwoma aminokwasami inne nie tworzą z flawiną tak trwałych kompleksów [59]. W wielu przypadkach wiązanie kowalentne flawiny z resztą histydyny lub cysteiny łańcucha polipeptydowego nie wyklucza oddziaływań niskoenergetycznych między flawiną a aminokwasami otaczającymi flawinę.

4. REZONANSOWE WIDMA RAMANA POCHODNYCH RYBOFLAWINY

Rezonansowe widma Ramana (RR) dostarczają metod do obserwowania widm wibracyjnych selektywnych grup chromoforowych biomolekuł; m.in. można obserwować flawoproteiny. W widmie CARS (spójne antystokesowskie rozproszenie ramanowskie) FAD-u występuje pasmo w ok. 1260 cm^{-1} związane z drganiami deformacyjnymi N(3)H [22]. Częstość tego pasma obniża się o 10 cm^{-1} po utworzeniu kompleksu

flawiny z apoproteiną RBP. Znaleziono również pasmo (1252 cm^{-1}) dla formy $N(3)H$; może być ono używane jako indykator dla stanu oddziaływania $N(3)H$ --- proteina [67]. Prawdopodobnie różne położenia pasma odzwierciedlają zmiany w charakterze wiązań wodorowych, w których zaangażowany jest proton w pozycji $N(3)$ i akceptorowa grupa białka lub cząsteczka wody w przypadku wolnego FAD-u [22].

Ostatnio opublikowano również klasyczne rezonansowe widma Ramana dla kompleksów apoproteiny z RF i kilkoma innymi flawinami [22, 42, 66-68]. Porównanie z analogicznymi danymi dotyczącymi oksydazy glukozy [22] i dehydrogenazy kwasów tłuszczowych [2] prowadzi do wniosku, że właśnie pasmo w ok. 1250 cm^{-1} może dostarczyć informacji o oddziaływaniu $N(3)$ --- białko w różnych flawoproteinach. Położenie tego pasma jest identyczne dla lumiflawiny wolnej oraz związanej z apo-RBP [7, 67]. Widma RR lumiflawiny różnią się bardzo od widm RF w zakresie $1200\text{--}1300\text{ cm}^{-1}$. Różnice te nie wynikają z różnego oddziaływania flawina-proteina, ale z natury samej flawiny. Dlatego struktura wibracyjna efektu podstawienia w izoalloksazynie może wiązać się z chemiczną reaktywnością flawiny [67].

Mierzono również widma RR 7,8- Cl_2 -RF, 8- Cl -RF, 8- Br -RF w kompleksach z RBP. Dla powyższych pochodnych RF zarejestrowano nie zauważone dotąd przesunięcie pasm pierścienia II i III izoalloksazyny, co może odpowiadać selektywnemu oddziaływaniu flawiny z proteiną. Ta możliwość była testowana przez porównanie widma Ramana każdej flawiny z jej widmem IR (flawina wbudowana w kryształ KBr), tab. 1 [82].

Dla kilku flawin dokładne położenie (w cm^{-1}) każdego pasma w widmie Ramana różni się od odpowiedniego pasma w IR. Różnica ta wynika z faktu, że otoczenie flawiny w badaniach w podczerwieni (ośrodek krystaliczny) różni się od otoczenia w badaniach ramanowskich (proteina tworzy hydrofobowe domeny) [4], przy czym różnica w położeniu pasm zasadniczo jest stała dla różnych flawin. Natomiast obserwowane różnice w położeniach pasm pochodnych RF w stosunku do RF prawdopodobnie odpowiadają wewnątrzcząsteczkowym właściwościom odpowiednich pochodnych RF [82].

Widma Ramana 8-merkaptoflawiny związanej z apoproteiną w starym żółtym enzymie lub oksydazie glukozy różnią się od widm 8-pochodnych RF i samej RF. Dzięki tej różnicy można wyznaczyć elektronową strukturę benzochinonu flawiny związanej z apoproteiną. Również widma RR 8- NH_2 -RF i 8- OCH_3 -RF różnią się od widma RF. Po-

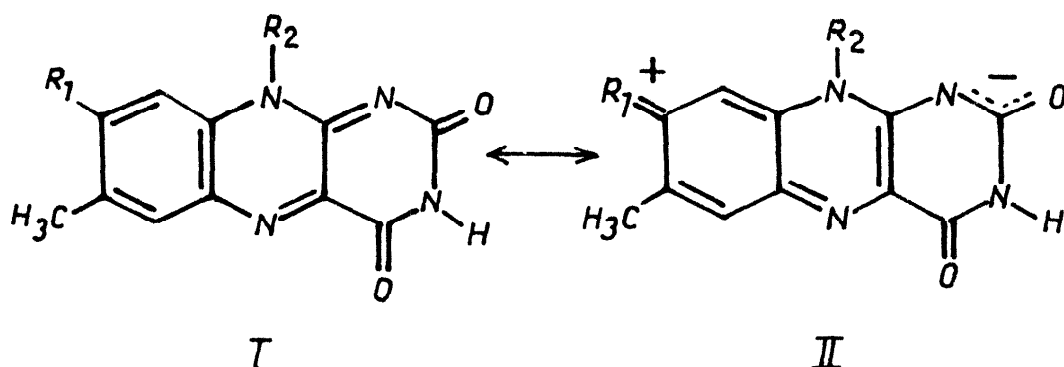
T a b e l a 1

Położenia pasm RR i IR w cm^{-1} dla kompleksów pochodna RF + RBP z białka jaja kury* [82]

RF		7,8-Cl ₂ -RF		8-Cl-RF		8-Br-RF		7-Cl-LF		8-SCH ₃ -RF		3-CH ₂ COOH-LF	
RR	IR	RR	IR	RR	IR	RR	IR	RR	IR	RR	IR	RR	IR
1631	1620	1608	1600	1621	1613	1618	1608	1616	1609	1624	1615	1631	
1582	1576	1582	1574	1582	1576	1581	1577	1580	1577	1564	1558	1587	
1547		1552		1545		1545				1533			
1501		1518		1510		1508				1505		1505	
1462		1472		1456				1488		1476			
1407	1401	1397	1388	1404	1399	1403	1395	1395	1388	1405	1398	1410	
1354	1346	1350	1348	1348	1347	1350	1340	1352	1348	1343	1348	1358	
1304				1296		1298							
1281													
1250	1255	1260	1257	1247	1252	1247	1250	1266	1260	1246	1248	1226	
1228	1227	1187	1189	1205	1207	1207	1203	1232	1228	1194	1199	1206	
1178		1152		1177		1175						1190	
1161		1120		1154		1156		1106		1150			
1072		1084		1086		1075		1019		1084		1094	
		1010								1014			

* Pozycje pasm Ramana normalizowano do pasma 981 cm^{-1} siarczanu; położenie pasm IR normalizowano do polistyrenu.

wyższe różnice widmowe mogą być rezultatem zmian w strukturze π -elektronowej, odpowiadającej podstawieniu grupy aminowej i metoksyłowej w pozycji 8 izoalloksazyny. Poprzez podstawienie w pozycji 8 grupy, będącej silnym donorem elektronu, rezonansowa forma (rys. 4) w istotny sposób zmienia elektronową struk-



Rys. 4. Rezonansowa struktura flawin [67]

ture izoalloksazyny i powoduje zmiany natury podwójnego wiązania C(4a)-N(5). Fakt ten można zauważyć w przesunięciu pasma Ramana 1583 cm^{-1} [67]. Oprócz widm RR form utlenionych flawiny obserwowano również rezonansowe widma Ramana semichinonu i całkowicie zredukowanej flawiny. Dla neutralnego semichinonu RF + RBP pojawia się dodatkowe pasmo w 1617 cm^{-1} . Właśnie to pasmo może być używane jako pasmo informujące o stanie redox flawiny w pośredniej reakcji flawoproteiny lub kompleksu flawina-ligand [68].

Badania RR bazują na efektach widmowych selektywnych podstawień chemicznych w danym obszarze molekuly, co można zaobserwować poprzez zmiany położenia pasm w widmie RR dla różnych flawoprotein w wyniku oddziaływania proteiny z izoalloksazyną.

5. WIDMA REZONANSU PARAMAGNETYCZNEGO (EPR) POCHODNYCH RF

Pewne właściwości biofizyczne flawiny zmieniają się po utworzeniu kompleksu z apoproteiną. Na przykład RF w holoproteinie jest stosunkowo oporna na fotolizę w porównaniu z wolną RF [106]. Występują również zmiany w widmie EPR flawoproteiny [72]. Rozszerzenie linii rezonansu protonów atomu węgla C(6) i grup metylo- wych w pozycjach C(7) i C(8) świadczy o hydrofobowym oddziaływaniu między składnikami kompleksu. Natomiast znaczne wysokopolowe przesunięcie chemiczne, obserwowane dla protonu C(9) sugeruje two-

rzenie się kompleksów π - π między izoalloksazyną a tryptofanem. Znacznej zmianie ulegają właściwości oksydo-redukcyjne RF w RBP. Liczne czynniki, które redukują RF wolną, np. NADH, kwas liponowy i kropłowa elektroda rtęciowa są nieaktywne w przypadku holoproteiny [107]. Jednak naświetlanie roztworu kompleksów RF + RB1 w obecności EDTA lub pod wpływem dwutlioninu sodu pozwala otrzymywać dwie zredukowane formy flawoproteiny: semichinonową i hydrochinonową. Rodzaj semichinonu flawinowego stabilizowanego przez cząsteczkę białka zależy ściśle od natury miejsca wiążącego [34]. W przypadku flawoproteiny z białka jaja kury jest to obojętny, "niebieski" wolny rodnik [33, 34, 57, 58, 68, 107], dający w widmie rezonansu paramagnetycznego sygnał o $g = 2,003$ i szerokości 19 gaussów [106]. Stabilizacja obojętnego semichinonu jest zgodna z hipotezą o hydrofobowym charakterze centrum wiążącego, a ponadto wskazuje na silne oddziaływanie cząsteczki apoproteiny z atomem azotu w pozycji 5 pierścienia izoalloksazynowego [99].

Dla porównania mierzono również widma proteiny związane z neutralnym semichinonem FMN 8α -podstawienie (w kompleksach „Azotobacter” apoflawodoksyny) i uzyskano szerokość sygnału ok. 20~23 G. Natomiast semichinon flawinowy 8α -N(3)histydylo FAD dehydrogenazy wykazuje dużo węższy sygnał (~12 G) stąd wniosek, że ten semichinon flawinowy występuje w dehydrogenazie w formie anionowej (czerwonej) [14].

Badania struktur i ruchów molekularnych centrów paramagnetycznych są prowadzone dzięki zastosowaniu techniki spektroskopii podwójnych rezonansów, elektronowo-jądrowego (ENDOR) i elektronowo-elektronowego (ELDOR). Charakter obserwowanych widm zależy od różnorodnych procesów relaksacyjnych, kontrolujących przepływ energii w obrębie układu spinów oraz między spinami i ich molekularnym otoczeniem, tzw. siecią uogólnioną [78]. Dlatego bada się dostępność molekuł wody do wolnorodnikowych miejsc makrocząsteczek. Znalezione, że FMN charakteryzuje się niemal całkowitą wymienialnością oddziałujących protonów ośrodka po wymianie izotopowej $H_2O \rightarrow D_2O$, stąd flawoproteiny wykazują znacznie mniejszą dostępność centrów FMN [25, 78]. Również dzięki tej metodzie pomiarowej potwierdzono hydrofobowość miejsca wiązania RF i apoproteiny z żółtka jaja kurzego [106].

6. FLUORESCENCJA FLAWOPROTEIN

Większość flawoprotein nie fluoryzuje lub bardzo słabo fluoryzuje, z czego wynika ciągle otwarty problem wygaszania fluorescencji flawin poprzez oddziaływanie z proteinami.

Próbuje się różnymi, niezależnymi metodami mierzyć czasy życia fluorescencji flawin wolnych, jak i związanych z proteiną [98]. Z porównania tych czasów możliwe jest obliczenie czasu korelacji, który odzwierciedla dynamiczne procesy oddziaływania fluoroforu.

Słabą fluorescencję oksydazy D-aminokwasów, dehydrogenazy liponianu i wielu innych flawoprotein [90, 91] charakteryzują krótkie czasy życia (tab. 2), jednak są one dłuższe niż należałoby się spodziewać z dynamicznego wygaszania, czy relacji zachodzącej między czasem gaśnięcia fluorescencji a wydajnością kwantową ($Q_{fl} = \frac{\tau_{fl}}{\tau_0}$, gdzie τ_0 - naturalny czas życia [30]).

S o n g i współprac. [90] badali modelowe fotoprocessy flawin. Flawina w singletowym stanie wzbudzonym może ulegać fotoreakcji (np. hormon wzrostowy - auksyna stanowi doskonały przykład modelu endogenicznego donora). Stąd autorzy sugerują, iż krótki fluorescencyjny czas życia flawiny związanej z membraną odzwierciedla dynamiczne wygaszanie fluorescencji flawiny w jej mikrootoczeniu.

T o l l i n i in. [16] badają oddziaływanie flawiny z proteiną w Shethna flawoproteinie. Obserwują oni takie same szybkości wygaszania fluorescencji proteiny, jak i flawiny, co prawdopodobnie jest rezultatem identycznego procesu. Autorzy wnioskują, że bezpośrednie molekularne nakrywanie się pierścieni aminokwasu aromatycznego i flawiny powoduje försterowskie przekazywanie energii do flawiny.

Wiele prac poświęcono badaniom fluorescencji flawoproteiny białka jaja kury. Naświetlanie roztworu RF w zakresie I pasma absorpcji wywołuje zieloną fluorescencję z maksimum natężenia w 535 nm. Przy łączeniu się RF z apoproteiną zachodzi wygaszanie fluorescencji; przy stosunku molowym 1 : 1 (flawina : proteina) natężenie fluorescencji RF zmniejsza się o ponad 90% [106]; w innych pracach przyjmuje się kompletne wygaszenie fluorescencji flawiny oraz zmniejszenie natężenia fluorescencji proteiny w 83-86% [12, 64, 72].

Badania te pozwoliły wyznaczyć stałe asocjacji lub dysocjacji flawoproteiny [60]. Ryboflawina jest najbardziej specyficzną gru-

T a b e l a 2

Czasy gaśnięcia fluorescencji flawin i flawoenzymów w temperaturze pokojowej (średnie z 20-30 wartości)

Flawina	Środowisko (Medium)	τ_f (ns)
4-butyryl-RF FMN FAD	EtOH	5,65
	CCl ₄	6,94
	CCl ₄ + 3 mM TCA (kwas trójchlorooctowy)	4,27
	CCl ₄ + 20 mM TCA	2,55 [90]
	H ₂ O	4,65
	90% glicerol: H ₂ O	5,40
	H ₂ O	2,35
	33% sacharoza: H ₂ O	3,40
	90% glicerol: H ₂ O	5,00
RF RF Alloksazyna Izoalloksazyna 3-metylolumichrom	etanol	5,65
	etanol: pirydyna (1 : 1)	5,63
	etanol: pirydyna (1 : 1)	1,71 [93]
	etanol: pirydyna (1 : 1)	5,85
	etanol: pirydyna (1 : 1)	1,25
Dehydrogenaza liponianu Oksydaza D-aminokwasowa	bufor pH 7,2; 0,3 mM EDTA	3,50
	bufor pH 8,5	2,10
	bufor pH 8,5 + 10 nM - pirogronian	0,44 [90]
	bufor pH 8,5 + 20 mM indol	2,65
	- kwas karboksylowy	

pą prostetyczną dla apoproteiny z żółtka jaja kury. Stałe dysocjacji (apoproteina - RF, FMN, FAD: odpowiednio $2,6 \times 10^{-9}M$, $6,3 \times 10^{-7}M$, $2,5 \times 10^{-6}M$) wykazują kilkaset razy większe powinowactwo apoproteiny do RF w porównaniu z FMN czy FAD. Dla lumiflawiny stała dysocjacji jest ok. 20 razy mniejsza niż dla RF - jako wynik braku udziału łańcucha rybitolowego w interakcji z apoproteina [64].

Za fluorescencję apoproteiny odpowiedzialny jest głównie tryptofan, którego 8 reszt przypada na cząsteczkę białka [74]. Widmo emisyjne apoproteiny jest identyczne po wzbudzeniu światłem o długości 280 lub 295 nm [65]. Nakładanie się widm fluorescencji tyrozyny i tryptofanu jest regułą w przypadku białek posiadających oba te aminokwasy [13]. Maksimum natężenia widma emisyjnego apoproteiny z białka jaja kury przypada na 343 nm [65], natomiast

z żółtka na 366 nm [108], różnica położenia maksimum natężenia pasma fluorescencji wynika z nieco odmiennego składu globuli RBP.

Obserwacje zmian fluorescencji białek pod wpływem różnych substancji obecnych w roztworze dostarczają niekiedy cennych informacji o rozmieszczeniu reszt tryptofanowych w makrocząsteczce [46]. N i s h i n a i współprac. [65] badali wygaszanie fluorescencji RBP przez jony jodkowe i cezowe w obecności czynnika denaturującego apoproteinę - chlorku guanidyny. Autorzy przyjmują, że w wyniku intermolekularnych zderzeń następuje wygaszanie fluorescencji proteiny. Fluorescencja tryptofanu (o dużym natężeniu) odpowiada „zagrzebanym” resztom wewnątrz apoproteiny w przypadku natywnej RBP, ponieważ reszty tryptofanu wewnątrz proteiny nie mogą zderzać się z jonami jodkowymi. W wyniku denaturacji cząsteczki białka, reszty tryptofanu już mogą zderzać się z jonami, co powoduje wygaszanie ich fluorescencji. Stąd wniosek, że o fluorescencyjnych właściwościach RBP decydują reszty tryptofanowe. Obserwuje się bardzo małe natężenie lub całkowite wygaszenie fluorescencji kompleksu RF-apoproteina, co m.in. może być spowodowane udziałem tryptofanu w wiązaniu RF-RBP.

Po odszczepieniu flawiny i odkryciu reszt tryptofanu natężenie fluorescencji wzrasta wielokrotnie. Udowodniono [44], że wzrostowi natężenia promieniowania po odszczepieniu RF od kompleksu flawoproteiny towarzyszy spadek struktury helikalnej białka - to również przemawia za udziałem reszt tryptofanowych w wiązaniu flawiny z apoproteiną.

Mikrootoczenie miejsca wiązania RF z apoproteiną wykazuje niższą stałą dielektryczną niżeli woda. Prawdopodobnie, niepolarne mikrootoczenie w „kieszeni” apoproteiny stwarza możliwość przystosowania konformacyjnego RBP [65]; w ten sposób próbuje się tłumaczyć zdolność apoproteiny do wiązania barwników o różnych strukturach [93]. W roztworach o obojętnym zakresie pH cząsteczki barwników wykazują charakter lipofilowy i ich oddziaływanie z apoproteiną powinno być zgodne z oczekiwaniem natury hydrofobowej. Z drugiej strony, nie można wykluczyć innych oddziaływań na skutek obecności jonizujących grup funkcyjnych w cząsteczkach barwników. W bakterii lucyferazy koenzym flawinowy jest również ulokowany w bardzo hydrofobowej i niepolarnej „kieszeni” - centrum aktywnym [51].

Obserwowane wygaszanie fluorescencji proteiny jest niezależne od struktury i względnych rozmiarów flawiny [12]. Chociaż L i

[53] przewidywał możliwości försterowskiego przekazywania energii z tryptofanu do flawiny (o promieniu krytycznym 35 Å) nie może to być jedyne zjawisko odpowiedzialne za wygaszanie fluorescencji. Inne aminokwasy, jak metionina, słabiej histydyna nie wykazują tendencji do tworzenia intermolekularnych kompleksów z flawiną w wodzie i dlatego obserwuje się bardzo słabe wygaszanie fluorescencji flawiny - nawet gdy aminokwas jest w znacznym molarnym nadmiarze. Wyniki wielu badań efektów rozpuszczalnikowych i temperaturowych obejmujących zmianę natężenia i polaryzacji fluorescencji flawiny wskazują, że wygaszanie fluorescencji kompleksu flawina-10-aminokwas odpowiada tworzeniu kompleksów w stanie podstawowym (szczególnie z tryptofanem lub tyrozyną) albo wygaszaniu dynamicznemu stanu wzbudzonego flawiny podczas zderzenia z resztami metioniny i histydyny. Różnice we właściwościach fluorescencyjnych flawin z podstawionymi w pozycjach 10- i 3-aminokwasami wskazują, iż wzajemna orientacja kompleksujących czynników wpływa na wielkość i typ wygaszania [8, 35, 54].

Przy wykorzystaniu fotolizy błyskowej (flash photolysis) badano efekt rozpuszczalnikowy środowiska reakcji redox różnych flawin; wykazano [1], że polarność środowiska może silnie wpływać na mechanizm procesów redox. W rozpuszczalnikach o wysokiej polarności prawdopodobny jest dwupolarny stan przejścia i mechanizm przeniesienia elektronu, natomiast w środowiskach o niskiej polarności - bardziej prawdopodobny neutralny stan przejścia i transfer atomu wodoru. Inni [84] natomiast sądzą, że wzrost szybkości reakcji z flawoproteina w stosunku do wolnej flawiny w tych samych warunkach odpowiada zmianie polarności otoczenia proteiny w sąsiedztwie pozycji 8 flawiny. W tym przypadku apoproteina może kontrolować szybkość reakcji redox katalizowanych przez flawoenzym poprzez zmiany właściwości dielektrycznych w otoczeniu. Autorzy sugerują, że wpływ środowiska o zmieniającej się stałej dielektrycznej na mechanizm reakcji przedstawia dotąd nie znane źródło działania w katalizie flawoenzymu.

Zupełnie innym, nie rozstrzygniętym problemem jest komórkowa autofluorescencja. Dla wielu typów komórek i tkanek (np. z neutrofilów szczerza czy jajnika chińskiego chomika) w obszarze widmowym 500-600 nm zaobserwowano komórkową autofluorescencję, która prawdopodobnie pochodzi od flawoprotein zaangażowanych w metaboliczne procesy wewnątrzkomórkowe [3].

7. PODSUMOWANIE

Na podstawie danych zawartych w piśmiennictwie, dotyczących flawinowych grup prostetycznych wynika, że flawiny mogą spełniać różnorodne funkcje biologiczne.

Flawiny są bardzo uniwersalnymi koenzymami funkcjonującymi z dużą wydajnością w różnych reakcjach enzymatycznych powodujących przeniesienie jednego lub dwóch elektronów [99]. Podstawowym problemem w badaniach mechanizmu działania flawoenzymów jest poznanie natury oddziaływania flawina-białko. Uogólnienia dotyczące tego zagadnienia mogą być tworzone w oparciu o wyniki szczegółowych badań nad stosunkowo prostymi flawoproteinami, które uznaje się za reprezentatywne dla znacznie szerszych grup. Pierwszym krokiem poznawczym jest śledzenie właściwości biopolimerów poprzez badanie widm absorpcji i emisji.

Obserwacje widmowe flawoprotein udowadniają istnienie oddziaływań hydrofobowych lub z przeniesieniem ładunku. Proteiny, które wiążą flawiny bez udziału mocnych kowalentnych wiązań [17, 18] tworzą kompleksy flawina-białko stabilizowane siłami van der Waalsa, wiązaniami wodorowymi, czyli wiązaniem z przeniesieniem ładunku [19]. Zdolność flawin do tworzenia kompleksu CT wynika z tego, że pierścień izoalloksazyny w formie utlenionej jest akceptorem, natomiast w formie zredukowanej - donorem.

Dotychczasowe wyniki eksperymentów i teoretyczne przewidywania, szczególnie z użyciem układów modelowych nie zawsze pozwalają na jednoznaczną interpretację obserwowanych zjawisk. Dlatego, by dokładniej poznać funkcje fotobiologiczne flawin *in vivo*, konieczne są dalsze badania tak układów naturalnych, jak i modeli.

Serdecznie dziękuję Pani doc. dr hab. R. Drabent za wiele cennych uwag podczas przygotowywania niniejszej pracy.

Artykuł wpłynął do Redakcji 25 II 1983

LITERATURA

- [1] Ahmad I., Tollin G., Biochemistry, 20, 5925 (1981).
- [2] Benecky M., Li T. Y., Schmidt J., Frerman F., Watters K. L., McFarland J., Biochemistry, 18, 3471 (1979).
- [3] Benson R. C., Meyer R. A., Zaruba M. E., Klittann G. M., J. Histochem. Cytochem., 27, 44 (1979).

- [4] Blankenhorn G., Osuga D. T., Lee A. S., Feeney R. E., *Biochim. Biophys. Acta*, 386, 470 (1975).
- [5] Blankenhorn G., [w:] *Flavins and Flavoproteins*, ed. K. Yagi, T. Yamano, Tokyo 1980.
- [6] Blum J. C., [w:] *Le Metabolisme de la Riboflavine Chez la Paule pondense*, ed. F. Hoffman, Paris 1967.
- [7] Bowman W. D., Spiro T. G., *Biochemistry*, 20, 3313 (1981).
- [8] Bruice T. G., *Prog. Biorg. Chem.*, 4, 1 (1976).
- [9] Bystra K., Drabent R., *Zesz. Nauk. ART Olszt.*, 17, 63 (1982).
- [10] Bystra K., Drabent R., Mirowicz L., Smyk B., (w druku).
- [11] Carlisle D. B., Knowles E. G. W., *Camb. Monogr. exp. Biol.*, 10, 10 (1959).
- [12] Choi J., McCormick D. B., *Arch. Biochem. Biophys.*, 204, 41 (1980).
- [13] Cowgill R. W., [w:] *Biochemical Fluorescence: Concepts*, ed. Chem. R. F., H. Edlöhoch, New York 1976.
- [14] Dale E., Edmondson, Ackrell BAC, Kearney E. B., *Arch. Biochem. Biophys.*, 208, 69 (1981).
- [15] D'Anna J. A., Tollin G., *Biochemistry*, 11, 1073 (1972).
- [16] D'Anna J. A., Tollin G., *Biochemistry*, 10, 57 (1971).
- [17] Drabent R., Laczko G., Mieloszyk J., Siódma J., Bystra K., *Komunikat - 4th Conference on Luminescence*, Szeged 1982.
- [18] Drabent R., *Zagad. Biof. Współcz.*, 5, 97 (1980).
- [19] Drabent R., *Acta Phys. Polon.*, 55, 371 (1979).
- [20] Drabent R., *Zesz. Nauk. ART Olszt.*, 11, 3 (1977).
- [21] Drabent R., Grajek H., (w druku).
- [22] Dutta P. K., Nestor J., Spiro T. G., *Biochem. Res. Comm.*, 83, 209 (1978).
- [23] Edmondson D. E., Tollin G., *Biochemistry*, 10, 113 (1971).
- [24] Edmondson D. E., Tollin G., *Biochemistry*, 10, 124 (1971).
- [25] Erikson L. E. G., Ehrenberg A., Hyda J. S., *Eur. J. Biochem.*, 17, 539 (1970).
- [26] Fleischman D. E., Tollin G., *Biochim. Biophys. Acta*, 94, 248 (1965).
- [27] Gabryś-Mizera H., *Post. Biochem.*, 20, 191 (1974).
- [28] Getoff N., Solar S., McCormick D. B., *Science*, 201, 616 (1978).
- [29] Gibson Q., Massey H., Alherton N. M., *Biochem. J.*, 85, 369 (1962).
- [30] Grande H. J., Müller F., van Schagen C., Scouten W. H., Veeger C., Visser A. J. W. G., [w:] *Catalysis in Chemistry and Biochemistry. Theory and Experiment*, ed. Pullman B., Reidel Publishing Company 1979.
- [31] Gutman M., Bonomi F., Pagani S., Cerletti P., Koneck P., *Biochim. Biophys. Acta*, 591, 400 (1980).
- [32] Heelis P. H., Parsons B. J., Philops G. O., Barghigiani C., Colombetti G., Lenzi F., McKellar J. F., *Photochem. Photobiol.*, 30, 507 (1979).
- [33] Hemmerich P., Ehrenberg A., Walker W. H., Erikson L. E. G., Salach J., Baden P., Singer T. P., *FEBS Lett.*, 3, 37 (1969).

- [34] Hemmerich P., Wessiak A., [w:] Flavins and Flavoproteins, ed. T. P. Singer, Elsevier, Amsterdam 1976.
- [35] Hemmerich P., Fortschr. Chem. Org. Naturst., 33, 451 (1976).
- [36] Hofsteenga J., Vereijken J. M., Weijer W. J., Beintema J. J., Wierenga R. K., Drent J., Eur. J. Biochem., 113, 141 (1980).
- [37] Inoue M., Shibata M., Kondo Y., Ishida T., Biochemistry, 20, 2936 (1981).
- [38] Inoue M., Shibata M., Ishida T., Biochem. Biophys. Res. Comm., 93, 2 (1980).
- [39] Ishida T., Inoue M., Senda S., Tomita K., Bull. Chem. Soc. Japan, 52, 2953 (1979).
- [40] Kainosho M., Kyogoku Y., Biochemistry, 11, 741 (1972).
- [41] Kimura T., Singer T. P., [w:] Methods in Enzymology, t. V, 562 (1962).
- [42] Kitagawa T., Nishina Y., Kyogoku Y., Ohishi N., Takai-Suzuki A., Yagi K., Biochemistry, 18, 1804 (1979).
- [43] Knowles F. G. W., Nature, 146, 131 (1940).
- [44] De Kok A., Spencer R. D., Weber G., Fed. Proc., 27, 298 (1968).
- [45] Kotowicz G., Teng N., Klein M. P., Calvin M., J. Biol. Chem., 244, 5656 (1969).
- [46] Kozik A., Praca doktorska, Kraków 1982.
- [47] Kozik A., Biochim. Biophys. Acta, 704, 542 (1982).
- [48] Kozik A., Eur. J. Biochem., 121, 395 (1982).
- [49] Kozioł J., Koziołowa A., Konarski J., Panek-Janc D., Dawidowski J., [w:] Flavins and Flavoproteins, ed. K. Yagi, T. Yamano, Tokyo 1980.
- [50] Kozioł J., [w:] Methods in Enzymology 18, cz. B., ed. B. D. McCormick, L. D. Wright, New York 1971.
- [51] Kurfürst M., Ghisla S., Presswood R., Hastings J. V., Eur. J. Biochem., 123, 355 (1982).
- [52] Lauterwein J., Ph. D. Thesis, Konstanz 1971.
- [53] Li T. M., Hok J. W., Biochemistry, 15, 3205 (1976 III).
- [54] MacKenzie R. E., Förty W., McCormick D. B., Biochemistry, 8, 1839 (1969).
- [55] Massey V., Hemmerich P., Biochem. Reviews, 8, 246 (1980).
- [56] Massey V., Hemmerich P., J. Biol. Chem., 252, 5612 (1977).
- [57] Massey V., Hemmerich P., Biochemistry, 17, 9 (1978).
- [58] Massey V., Stankowich M., Hemmerich P., Biochemistry, 17, 1 (1978).
- [59] McCormick D. B., Photochem. Photobiol., 26, 169 (1977).
- [60] McCormick D. B., Experientia, 26, 243 (1970).
- [61] Monzikoff A., Noël P., Experientia, 35, 179 (1979).
- [62] Müller F., Mayhew S., Massey V., Biochemistry, 12, 4654 (1973).
- [63] Nishikimi M., Yagi K., J. Biochem., 66, 427 (1969).
- [64] Nishikimi M., Kyogoku Y., J. Biochem., 73, 1233 (1973).
- [65] Nishina Y., Horike K., Shiga K., Yamano T., J. Biochem., 82, 1715 (1977).

- [66] Nishina Y., Kitagawa T., Shiga K., Horike K., Matsumara Y., Watari H., Yamano T., J. Biochem., 84, 925 (1978).
- [67] Nishina Y., Shiga K., Horike K., Tojo H., Kasai S., Yanase K., Matsui K., Watari H., Yamano T., J. Biochem., 88, 403 (1980).
- [68] Nishina Y., Shiga K., Horike K., Tojo H., Kasai S., Matsui K., Watari H., Yamano T., J. Biochem., 88, 411 (1980).
- [69] Nishimoto K., Watanabe Y., Yagi K., Biochim. Biophys. Acta, 526, 34 (1978).
- [70] Nishimoto K., Watanabe Y., Yagi K., [w:] Flavins and Flavoproteins, ed. K. Yagi, T. Yamano, Tokyo 1980.
- [71] Nagy J., Kenney W. C., Singer T. P., J. Biol. Chem., 254, 2684 (1979).
- [72] Ostrowski W., Zak Z., [w:] Flavins and Flavoproteins. Physicochemical Properties and Function, ed. W. Ostrowski, Warszawa-Kraków 1977.
- [73] Ostrowski W., Acta Chem. Scand., 17, suppl. 241, (1963).
- [74] Ostrowski W., Acta Biochim. Polon., 15, 241 (1968).
- [75] Otita-Fukuyama M., Miyake Y., Shiga K., Nishina Y., Watari H., Yamano T., J. Biochem., 88, 205 (1980).
- [76] Pereira J. F., Tollin G., Biochim. Biophys. Acta, 143, 79 (1967).
- [77] Sarma R. H., Darries P., Kapla N. O., Biochemistry, 7, 4359 (1968).
- [78] Sarna T., Zagad. Biof. Współcz., 4, 49 (1979).
- [79] Van Schagen C. G., Müller F., Eur. J. Biochem., 120, 33 (1981).
- [80] Van Schagen C. G., Müller F., Helv. Chim. Acta, 63, 2187 (1980).
- [81] Schmidt W., Photochem. Photobiol., 34, 7 (1981).
- [82] Schopfer L. M., Morrill M. D., Biochemistry, 19, 4932 (1980).
- [83] Schopfer L. M., Haushalter J. P., Schmidt M., Milad M., Morris M. D., Biochemistry, 20, 6734 (1981).
- [84] Schopfer L. M., Massey V., Al Claiborne, J. Biol. Chem., 256, 7329 (1981).
- [85] Shinkai S., Makrom. Chem., 179, 2637 (1978).
- [86] Shinkai S., Yamada S., Kunitake P., Macromolecules, 11, 65 (1978).
- [87] Shinkai S., Yamashita T., Kusano Y., Manabe O., J. Am. Chem. Soc., 104, 563 (1982).
- [88] Shinkai S., Kurada H., Manabe O., J.C.S., Chem. Comm. 391 (1981).
- [89] Song P. S., Choi J. D., Fugate R. D., Yagi K., [w:] Flavins and Flavoproteins, ed. T. T. Singer, Elsevier, Amsterdam 1976.
- [90] Song P. S., Fugate R. D., Briggs W. R., [w:] Flavins and Flavoproteins, ed. K. Yagi, T. Yamano, Tokyo 1980.
- [91] Song P. S., Photochem. Photobiol., 24, 634 (1976).
- [92] Steczko J., Ostrowski W., Biochim. Biophys. Acta, 393, 253 (1975).
- [93] Steczko J., Praca doktorska, Kraków 1975.
- [94] Sun M., Moore T. A., Song P. S., J. Am. Chem. Soc., 94, 1730 (1972).

- [95] Theorell H., Biochem. Z., 278, 263 (1935).
[96] Tillotson J. A., Bashor M. M., Anal. Bioch., 107, 214 (1980).
[97] Ulbrych K., Zesz. Nauk. ART Olszt., 15, 3 (1979).
[98] Veeger C., Visser T., Kees J. U., Grande H., de Abrem R., de Graaf-Hess, Müller F., [w:] Flavins and Flavoproteins, ed. K. Yagi, T. Yamano, Tokyo 1980.
[99] Walsh Ch., Fisher J., Spencer R., Graham D. W., Astoton W. T., Brown J. E., Rogers F. E., Biochemistry, 17, 1942 (1979).
[100] Warring M. G. P. J., Smith O. H., Ginditta A., Singer T. P., J. Biol. Chem., 97, 230 (1958).
[101] Wolken J. J., Photoprocesses, Photoreceptors and Evolution, Academic Press, New York-San Francisco-London 1975.
[102] Yagi K., Ohishi N., Nishimoto K., Choi J., Song P. S., Biochemistry, 19, 1553 (1980).
[103] Yagi K., [w:] Frontiers of Bioorganic Chemistry and Molecular Biology, ed. S. N. Anauchenko, Pergamon Press, Oxford-New York 1980.
[104] Zurzycki J., Post. Biol., 2, 61 (1975).
[105] Zurzycki J., Gabryś H., Acta Soc. Bot. Polon., 66, (1977).
[106] Zak Z., Ostrowski W., Steczko J., Weber M., Gizler M., Morawiecki A., Acta Biochim. Polon., 19, 307 (1972).
[107] Zak Z., Steczko J., Ostrowski W., Bull. Soc. Chim. Biol., 51, 1065 (1969).
[108] Zak Z., Folia Medica Cracoviensis, XV, nr 2, 175 (1973).

Krystyna Bystra

SPECTROSCOPIC STUDIES OF THE FLAVIN PROSTETIC GROUPS

Summary

In this paper a survey of the experimental data obtained from spectroscopic studies of flavins and flavoproteins is presented.

It is emphasized that spectroscopy methods are fundamental in studies of flavins and flavoproteins.

Flavins are the fundamental coenzymes which play an important role in various enzymatic reactions causing the transfer of one or two electrons.

Mgr KRYSTYNA BYSTRA
Instytut Fizyki i Chemii Żywności
Zakład Fizyki
Akademii Rolniczo-Technicznej
Kortowo bl. 43
10-957 Olsztyn