

Biofizyka

(1100-114BFIZ11)

Jan M. Antosiewicz

**Zakład Biofizyki
Instytut Fizyki Doświadczalnej
Wydział Fizyki**

Wykład 15

3 czerwca, 2025

Homochiralność cząsteczek życia

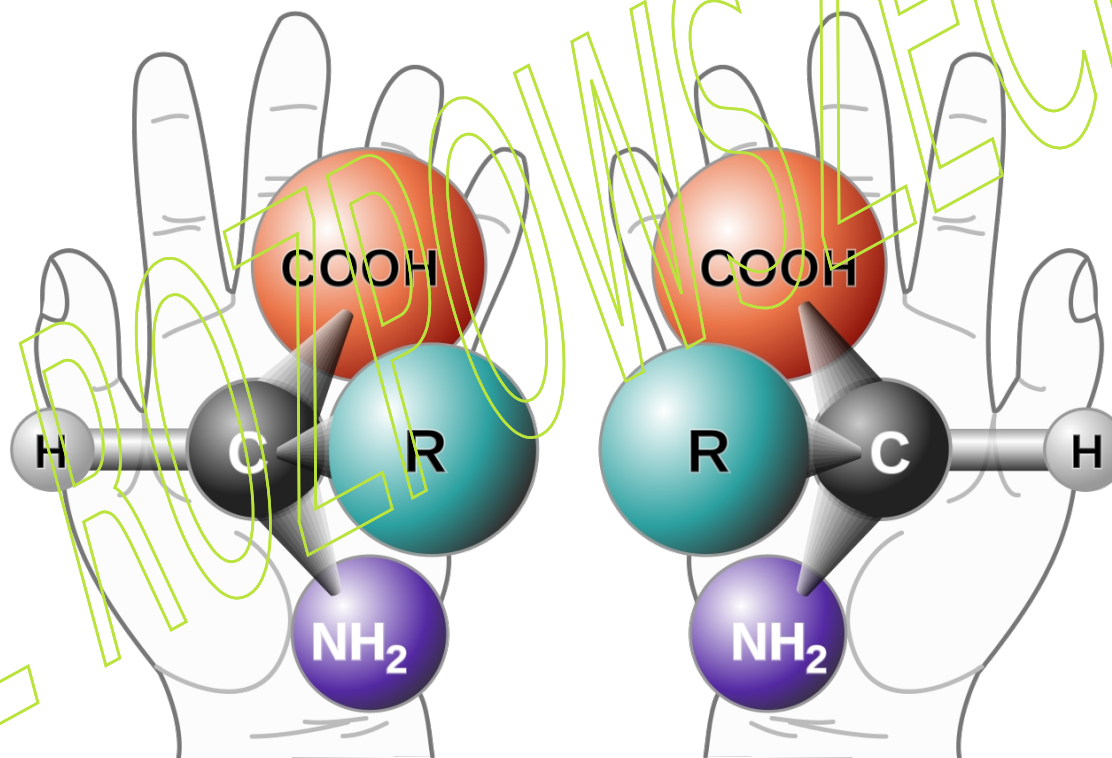
<http://www.fuw.edu.pl/~jantosi/>

jantosi@fuw.edu.pl

Chiralność jest właściwością asymetrii ważną w kilku gałęziach nauki. Słowo chiralność pochodzi od greckiego χείρ (kheir), „ręka”, znanego przedmiotu chiralnego.

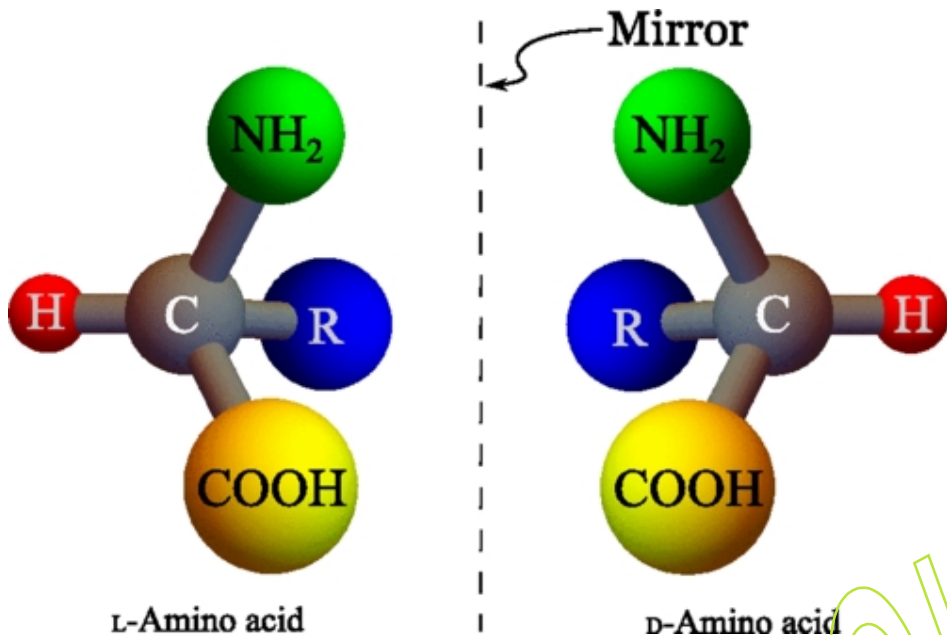
Obiekt lub układ jest chiralny, jeśli można go odróżnić od jego lustrzanego odbicia; to znaczy, że nie można go na to odbicie nałożyć. Lustrzanego odbicia obiektu achiralnego, takiego jak kula, nie można odróżnić od obiektu. Obiekt chiralny i jego lustrzane odbicie nazywane są **enancjomorfikami** (po grecku „formy przeciwne”) lub, w odniesieniu do cząsteczek, **enancjomerami**. Obiekt niechiralny nazywany jest achiralnym (czasami także amfichiralnym) i można go nałożyć na swoje lustrzane odbicie.

Termin ten został po raz pierwszy użyty przez Lorda Kelvina* w 1893 r. w drugim wykładzie Roberta Boyle'a wygłoszonym w Junior Scientific Club Uniwersytetu Oksfordzkiego, opublikowanym w 1894 r.



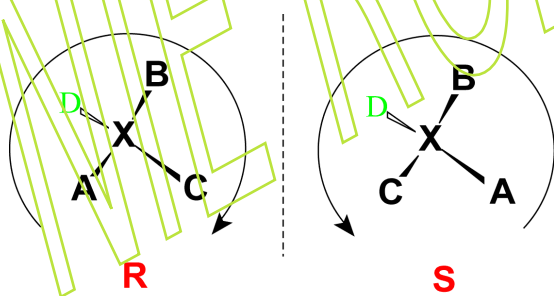
Ludzkie dłonie są prawdopodobnie najbardziej powszechnie znanym przykładem chiralności. Lewa ręka jest nienakładalnym lustrzanym odbiciem prawej ręki; bez względu na to, jak zorientowane są obie ręce, niemożliwe jest, aby wszystkie główne cechy obu rąk pokrywały się we wszystkich osiach.

*William Thomson, 1-szy baron Kelvin (1824-1907), został nobilitowany w 1892 r. w uznaniu jego osiągnięć w termodynamice i sprzeciwu wobec irlandzkiej zasady wewnętrznej, stając się baronem Kelvinem.



Phys. Rev. E, 2017, 95, 032407

Aminokwasy proteinogenne i cukry naturalne są zwykle wymieniane jako L-aminokwasy i D-cukry, zgodnie z deskryptorami wprowadzonymi przez **Emila Fischera** [Chem. Soc. Rev. 2022, 51:3436-3476]. Wszystkie aminokwasy są chiralne, z wyjątkiem glicyny, której łańcuch boczny to H.



Alternatywnie, deskryptory stereochemiczne (R) (od łac. rectus = prawy) i (S) (od łac. sinister = lewy) są używane do opisu absolutnej konfiguracji stereocentrum (zwykle chiralnego atomu węgla). Nie będziemy się tym zajmować. Wikipedia

Źródła chiralności

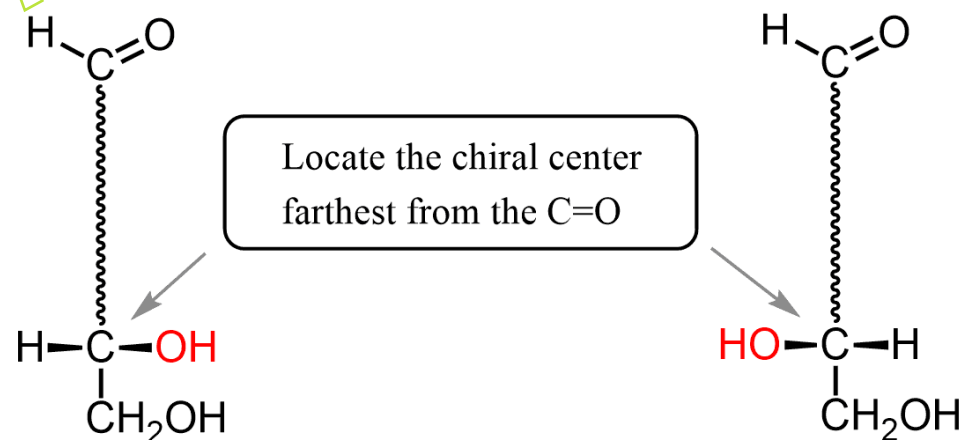
(w sensie istnienia chiralnych molekuł)

Jeśli chodzi o chiralność, aminokwasy i cukry można postrzegać jako pochodne metanu, CH_4 .

Chiralność występuje we wszystkich skalach materii, od cząstek elementarnych po wąsy ogórka, od śrub po galaktyki spiralne, w układach żywych i nieożywionych.

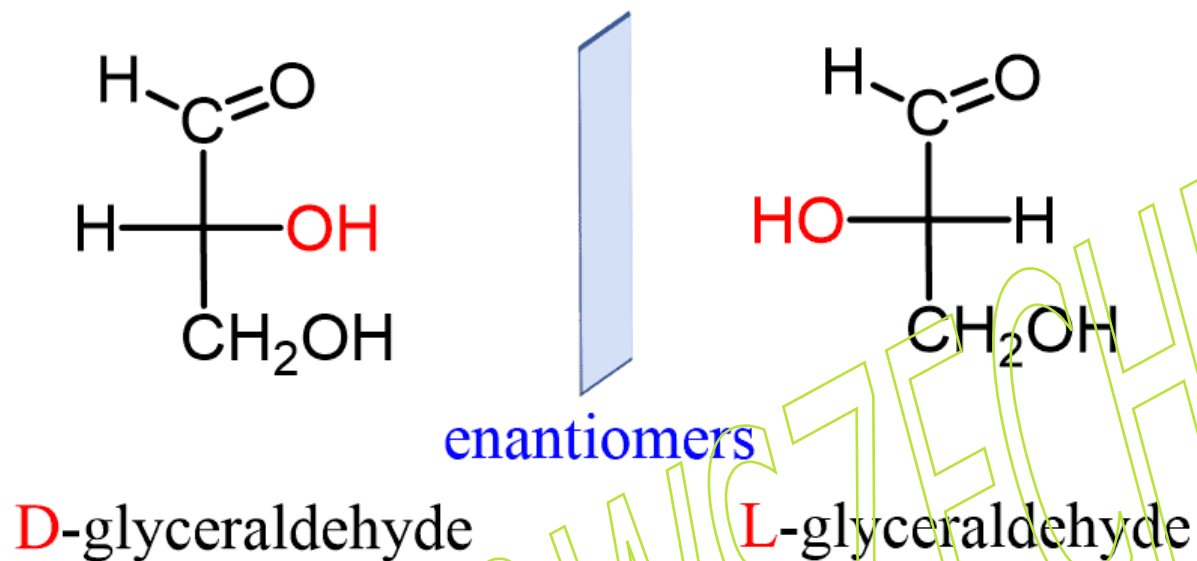
[Chem. Soc. Rev. 2022, 51:3436-3476]

D and L Configuration of Carbohydrates



OH on the right
D-sugar

OH on the left
L-sugar



DR. NICOLA TAZZINI: W 1906 roku rosyjsko-amerykański chemik Martin André Rosanoff, pracujący wówczas na Uniwersytecie Nowojorskim, wybrał aldehyd glicerynowy, monosacharyd, jako standard do oznaczania stereochemii węglowodanów i innych cząsteczek chiralnych, stosując system nazewnictwa znany obecnie pod nazwą konwencją Fischera-Rosanoffa lub konwencja Rosanoffa lub system D-L.

Ponieważ Rosanoff nie znał konfiguracji absolutnej aldehydu glicerynowego, przypisał w sposób całkowicie arbitralny:

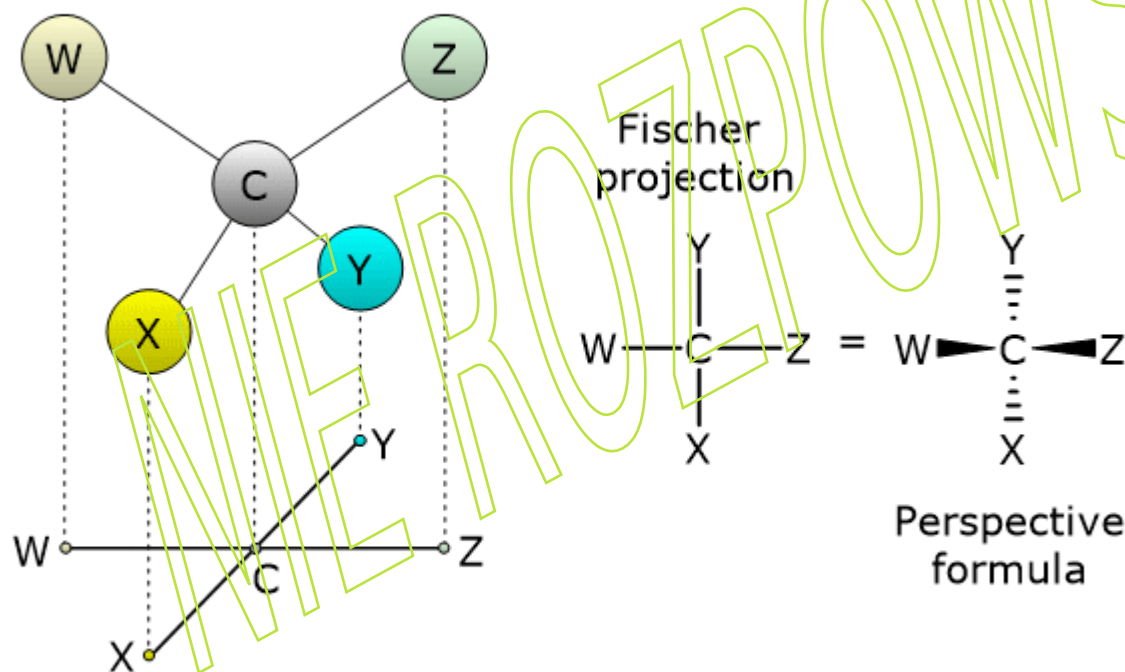
- przedrostek D od łacińskiego dexter, oznaczającego „prawy”, do (+)-gliceryny, enancjomeru prawoskrętnego, zakładając w ten sposób, że konfiguracja w projekcjach Fischera była taka, jak z grupą hydroksylową (–OH) przyłączoną do centrum chiralnego po prawej stronie cząsteczki;
- przedrostek L, od łacińskiego laevus, oznaczającego „lewy”, do (–)-aldehydu glicerynowego, enancjomeru lewoskrętnego, zakładając w ten sposób, że konfiguracja w projekcjach Fischera była taka, jak z grupą hydroksylową przyłączoną do centrum chiralnego po lewej stronie cząsteczki.

Chociaż Fischer odrzucił ten system nazewnictwa, został on powszechnie zaakceptowany i zastosowany do uzyskania względnych konfiguracji cząsteczek chiralnych. Konwencja Fischera pozwala na podzielenie cząsteczek chiralnych, takich jak aminokwasy i monosacharydy, na dwie klasy, znane jako serie D i serie L, w zależności od tego, czy konfiguracja grup wokół centrum chiralnego jest powiązana z konfiguracją D-aldehydu glicerynowy czy L-aldehydu glicerynowy. System D-L nie określa znaku rotacji światła spolaryzowanego liniowo spowodowanego przez chiralną cząsteczkę, ale po prostu koreluje konfigurację cząsteczki z konfiguracją aldehydu glicerynowego.

Projekcja Fischera

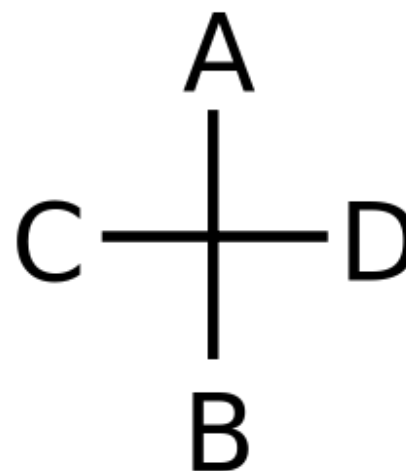
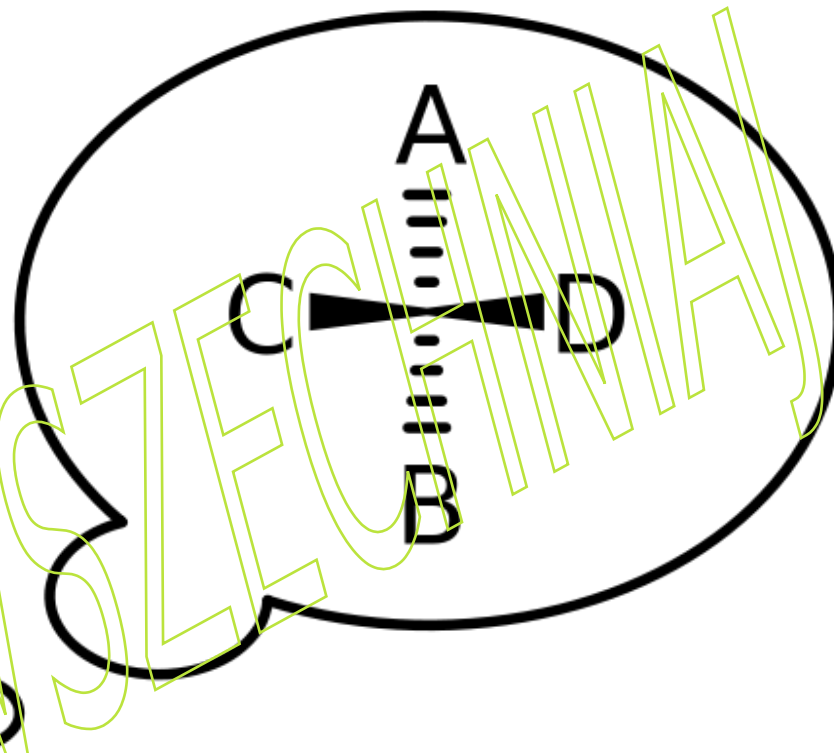
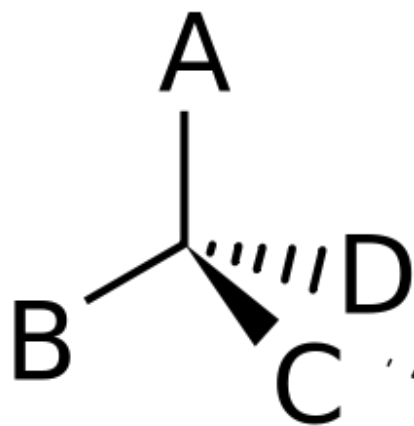
W 1891 roku Hermann Emil Fischer, niemiecki chemik, laureat Nagrody Nobla w dziedzinie chemii w 1902 roku, opracował systematyczną metodę dwuwymiarowego przedstawiania cząsteczek chiralnych, tzw. projekcję Fischera lub wzory na projekcję Fischera.

Pomimo tego, że są to struktury dwuwymiarowe, projekcje Fischera zachowują informacje o stereochemii cząsteczek i chociaż nie odzwierciedlają tego, jak cząsteczki mogą wyglądać w roztworze, są nadal szeroko stosowane przez biochemików do definiowania stereochemii aminokwasów, węglowodanów, kwasów nukleinowych, terpenów, sterydów i innych cząsteczek o znaczeniu biologicznym.



Rozważając cząsteczkę z pojedynczym centrum chiralnym, np. atom węgla, do rysowania projekcji Fischera, struktura tetraedyczna jest obracana tak, że dwie grupy są skierowane w dół, podczas gdy dwie grupy są skierowane w górę.

W projekcji Fischera wiązania poziome są wiązaniami wychodzącymi przed płaszczyzną, a wiązania pionowe są wiązaniami za płaszczyzną.



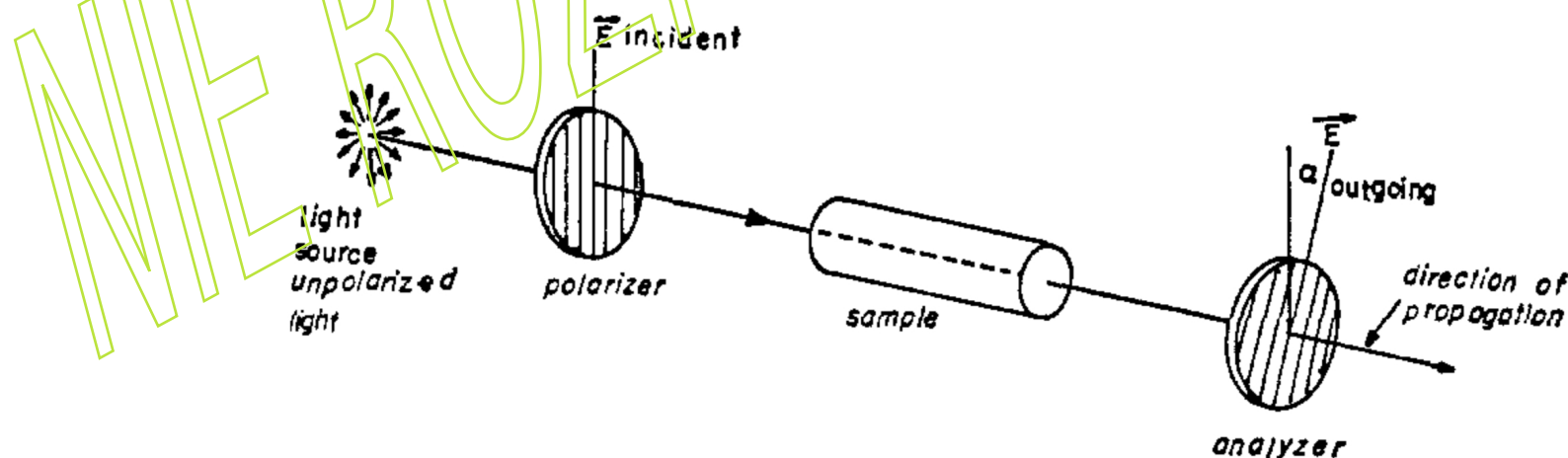
Z pojęciem chiralności zetknęliśmy się już w Wykładzie 7, choć z użyciem nazwy “optycznie czynny” a nie “chiralny”.

OPTICAL ROTATORY DISPERSION AND CIRCULAR DICHROISM

H. Eyring, H.-C. Liu, and D. Caldwell

Chemical Reviews, 68, 525-540 (1968)

Istnieją pewne substancje, dla których płaszczyzna polaryzacji przepuszczanego światła spolaryzowanego liniowo będzie się obracać. Substancje te określa się jako optycznie czynne. Zjawisko to zostało odkryte przez Arago dla kwarcu (ciała stałego) w 1811 r. i Biota dla cieczy w 1815 r. i jest powszechnie nazywane skręcalnością optyczną. W pomiarach skręcalności optycznej przez płaszczyznę polaryzacji rozumie się płaszczyznę wyznaczoną przez wektor elektryczny i kierunek propagacji.



Possible chemical and physical scenarios towards biological homochirality

Quentin Sallembien, Laurent Bouteiller, Jeanne Crassous, Matthieu Raynal

Chem. Soc. Rev. 2022, 51:3436-3476

Homochiralność życia odnosi się do faktu, że Natura wybrała określoną ręczność*.

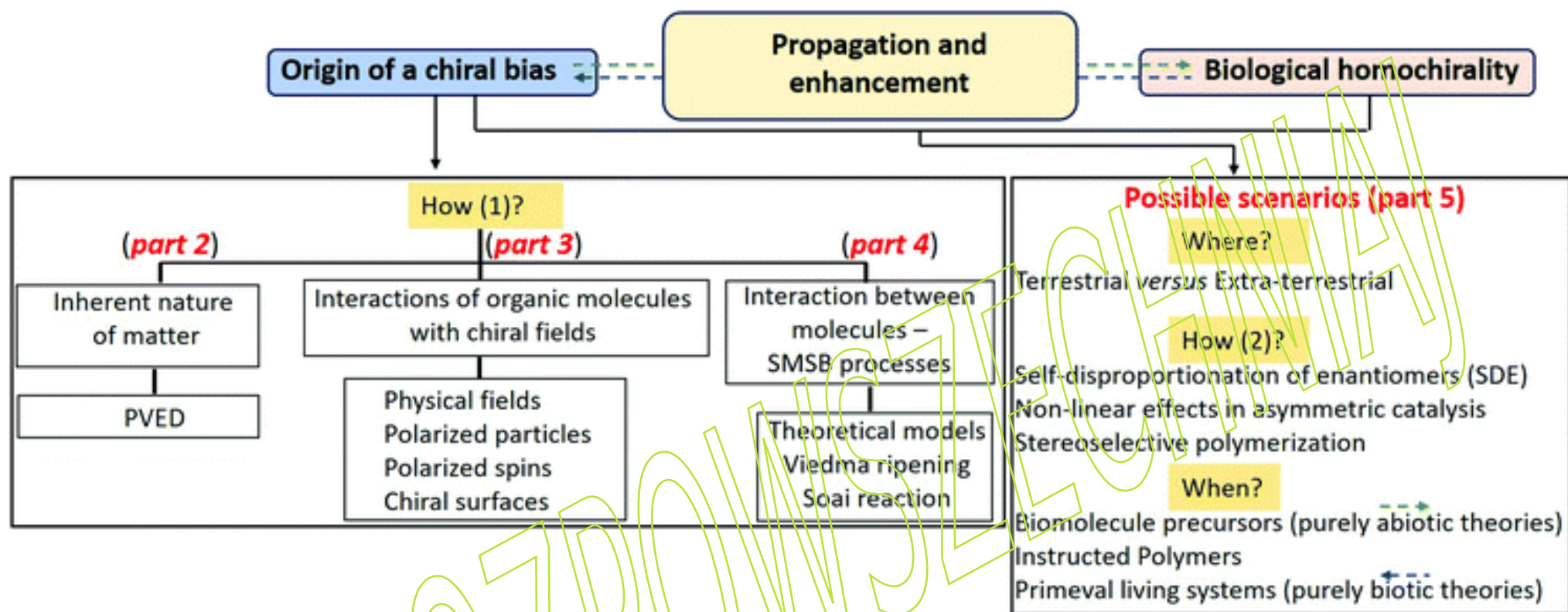
Homochiralność to fascynujący aspekt biologii ziemskiej: wszystkie organizmy żywe składają się z L-aminokwasów i D-cukrów w tak dużym stopniu, że występowanie cząsteczek życia o odmiennych konfiguracjach (np. D-aminokwasów) jest postrzegane jako osobliwość.

Homochiralność i życie są ze sobą tak ściśle powiązane, że występowanie homochiralności w Naturze uważa się za imperatyw stereochemiczny.

Pojedyncza chiralność cząsteczek biologicznych w biologii ziemskiej rodzi wiele pytań co do jej pochodzenia.

Biologiczna Homochiralność (BH)

*ang. Handedness. używane np. w odniesieniu do pojęć leworęczność, praworęczność



Pomimo obszernej literatury pojawienie się homochiralności biologicznej (BH) pozostaje zagadką. Kluczowe punkty tego zawiłego tematu można podsumować w następujący sposób: jak, kiedy i gdzie pojawiła się pojedyncza chiralność i ostatecznie doprowadziła do pojawienia się życia (patrz rysunek powyżej). Idąc tym tropem, kwestia powstania pierwotnego odchylenia chiralnego wydaje się krytyczna (ramka „jak?” na rysunku).

Dodatkowe podstawowe wyzwania, takie jak pozaziemskie lub ziemskie pochodzenie cząsteczek prekursorów życia (ramka „gdzie?”), mechanizm(y) propagacji i wzmacniania pierwotnego odchylenia chiralnego (ramka „jak 2?” „) oraz szlaki chemiczne/biologiczne prowadzące do funkcjonalnych cząsteczek o znaczeniu biologicznym to kluczowe aspekty umożliwiające zaproponowanie wiarygodnego scenariusza.

Sekwencja czasowa pomiędzy homochiralnością chemiczną, BH i pojawieniem się życia to kolejny skomplikowany punkt (ramka „kiedy?”).

Słowniczek: PVED=parity-violating energy difference; SMSB=spontaneous mirror symmetry breaking; Viedma ripening=a reliable crystallisation method to reach single chirality; Soai reaction= the alkylation of pyrimidine-5-carbaldehyde with diisopropylzinc; part # refers to sections in this review

Richard A Rosenberg, Electrochirogenesis: The Possible Role of Low-Energy Spin-Polarized Electrons in Creating Homochirality, Symmetry, 11:528/1-13 (2019)

niskoenergetyczne elektrony spolaryzowane spinowo, które mogą promować chemię enancjoselektywną

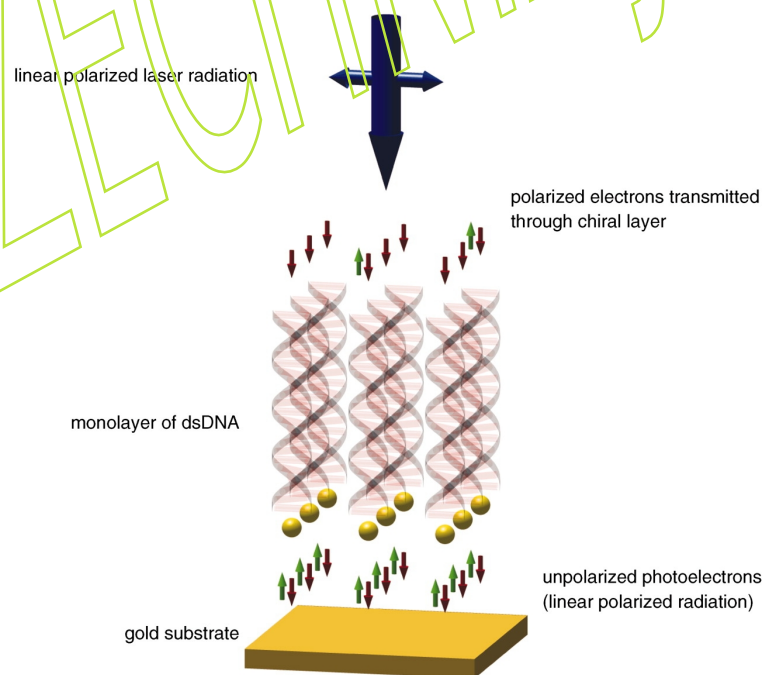
Podstawy:

Elektrochirogeneza zajmuje się indukcją chiralności przez spolaryzowane elektrony, z których te o niskiej energii (<15 eV) są uważane za najbardziej skuteczne.

Oddziaływanie elektronów spolaryzowanych wzdłużnie (longitudinally spin-polarized electrons, SPE od ang. spin-polarized electrons) od dawna uważane jest za możliwy określony mechanizm tworzenia nierównowagi chiralnej (nadmiaru enancjomerycznego, ee od ang. an enantiomeric excess) poprzez ich interakcję z racemiczną mieszaniną chiralnych cząsteczek. Chociaż elektrony spolaryzowane spinowo nie są cząstkami chiralnymi, elektrony spolaryzowane podłużnie są chiralne, ponieważ podczas propagacji kreślą spiralną ścieżkę. Kierunek wirowania określa śrubowość.

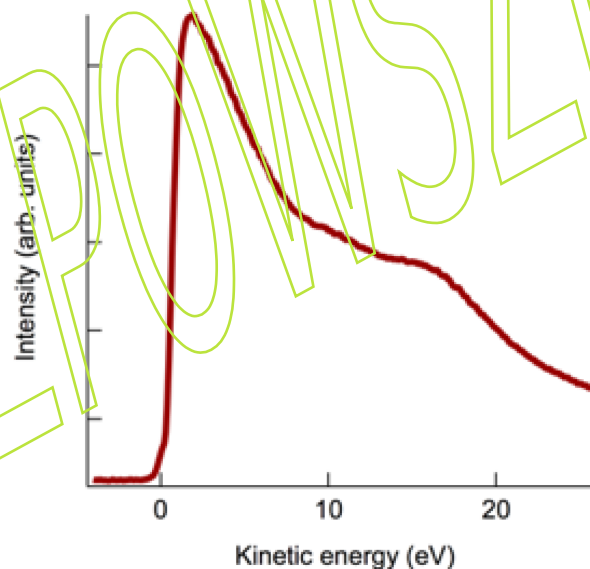
W artykule omówiono najnowsze postępy w zrozumieniu roli niskoenergetycznych SPE w tworzeniu ee w zespole cząsteczek chiralnych zaadsorbowanych na powierzchni.

Science 2011, 11, 528



Schemat opisujący monowarstwę dsDNA jako filtr spinowy. Niespolaryzowane elektrony są wyrzucane ze złotego podłoża przez liniowo spolaryzowane światło. Większość elektronów przesyłanych przez DNA jest spolaryzowana z ich spinem ustawionym antyrównoległe do ich prędkości. Elektrony, które nie są przesyłane, są wychwytywane przez DNA i tunelowane z powrotem do uziemionego podłoża w okresie czasu między dwoma impulsami laserowymi.

Każda forma promieniowania jonizującego (fotony, elektrony lub jony) oddziałująca z ciałem stałym spowoduje wytworzenie elektronów. Elektrony pierwotne są emitowane bez utraty energii, ale większość elektronów traci energię w wyniku licznych zderzeń. Powstałe elektrony wtórne (SE) mają bardzo niską energię, w zakresie 0–10 eV, jak widać na typowej krzywej rozkładu energii pokazanej na rysunku. Ogólnie rzecz biorąc, elektrony są niespolaryzowane, ale wysoki stopień polaryzacji można osiągnąć, jeśli materiał jest ferromagnetyczny. Dyskusja na temat sposobu osiągnięcia tego celu jest zbyt skomplikowana, aby ją tutaj przedstawić. Pomiary z użyciem czystego żelaza i promieniowania synchrotronowego o energii 110 eV wykazały polaryzację sięgającą 45%.



Krzywa wydajności elektronów wtórnych permalloyu po wzbudzeniu promieniami rentgenowskimi o energii 1190 eV. Permalloy to magnetyczny stop niklu i żelaza zawierający około 80% niklu i 20% żelaza.

PRZYPOMNIENIE: 1 electron volt = $1.60217662 \times 10^{-19}$ dżuli; Ferromagnetyzm to podstawowy mechanizm, dzięki któremu pewne materiały (takie jak żelazo) tworzą magnesy trwałe lub są przez nie przyciągane.

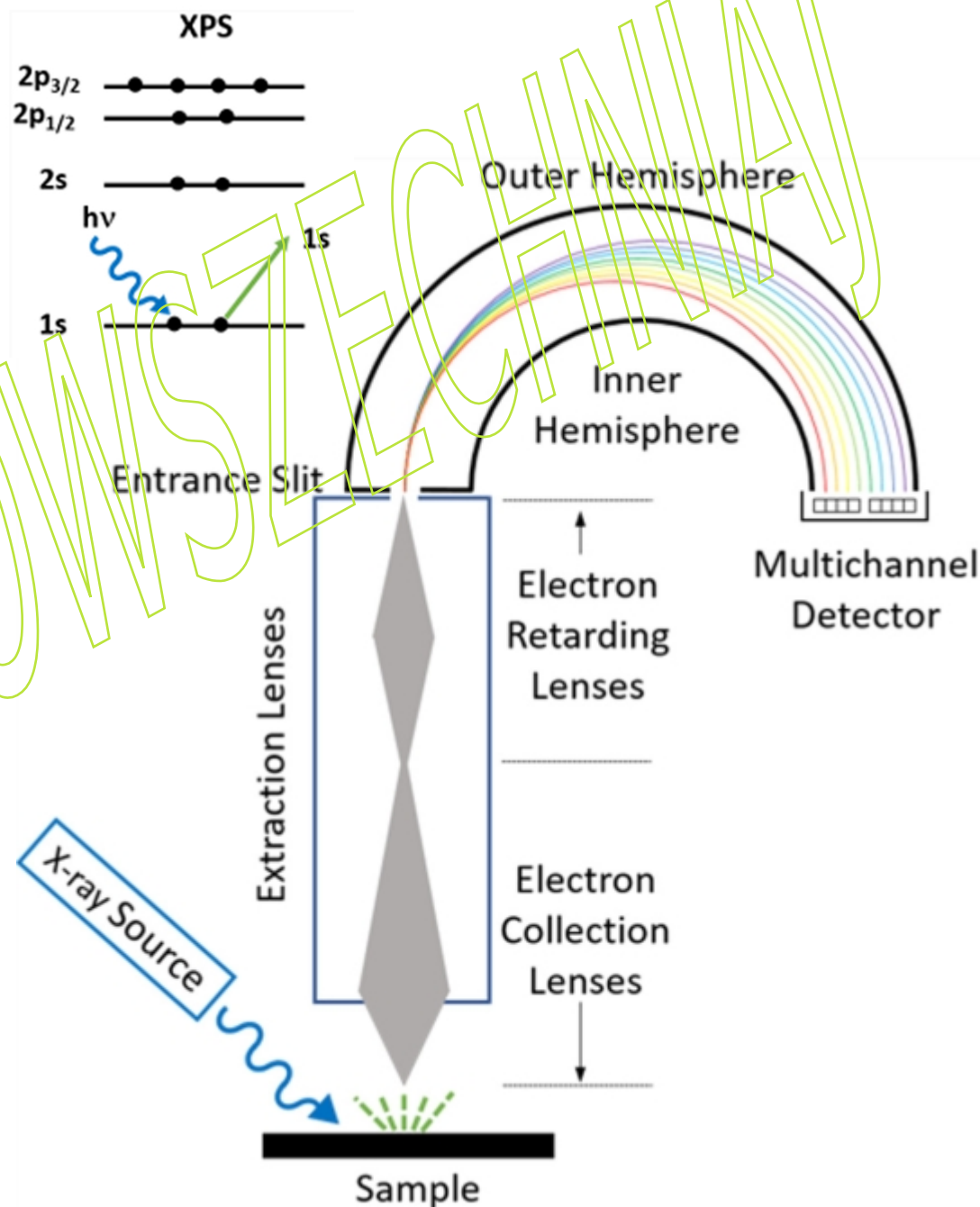
Rentgenowska Spektroskopia Fotoelektronów (XPS, X-ray Photoelectron Spectroscopy)

Ponieważ znana jest energia promieniowania rentgenowskiego o określonej długości fali i ponieważ mierzone są energie kinetyczne emitowanych elektronów, energię wiązania elektronu każdego z wyemitowanych elektronów można wyznaczyć za pomocą równania efektu fotoelektrycznego:

$$E_{\text{binding}} = E_{\text{photon}} - (E_{\text{kinetic}} + \Phi)$$

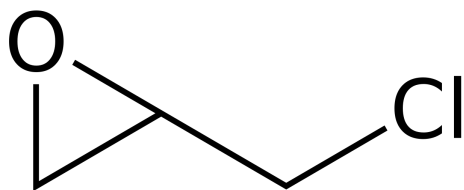
Wyraz Φ może być traktowany jako instrumentalny współczynnik korekcji, który uwzględnia kilka eV oddanej energii kinetycznej przez fotoelektron, gdy jest on emitowany z próbki i absorbowany przez detektor.

Typowe widmo XPS to wykres liczby elektronów wykrytych przy określonej energii wiązania. Każdy pierwiastek wytwarza zestaw charakterystycznych pików XPS. Piki te odpowiadają elektronowi konfiguracji elektronów w atomach, np. 1s, 2s, 2p, 3s itd. Liczba wykrytych elektronów w każdym pikie jest bezpośrednio powiązana z ilością pierwiastka w objętości próbkowania XPS.

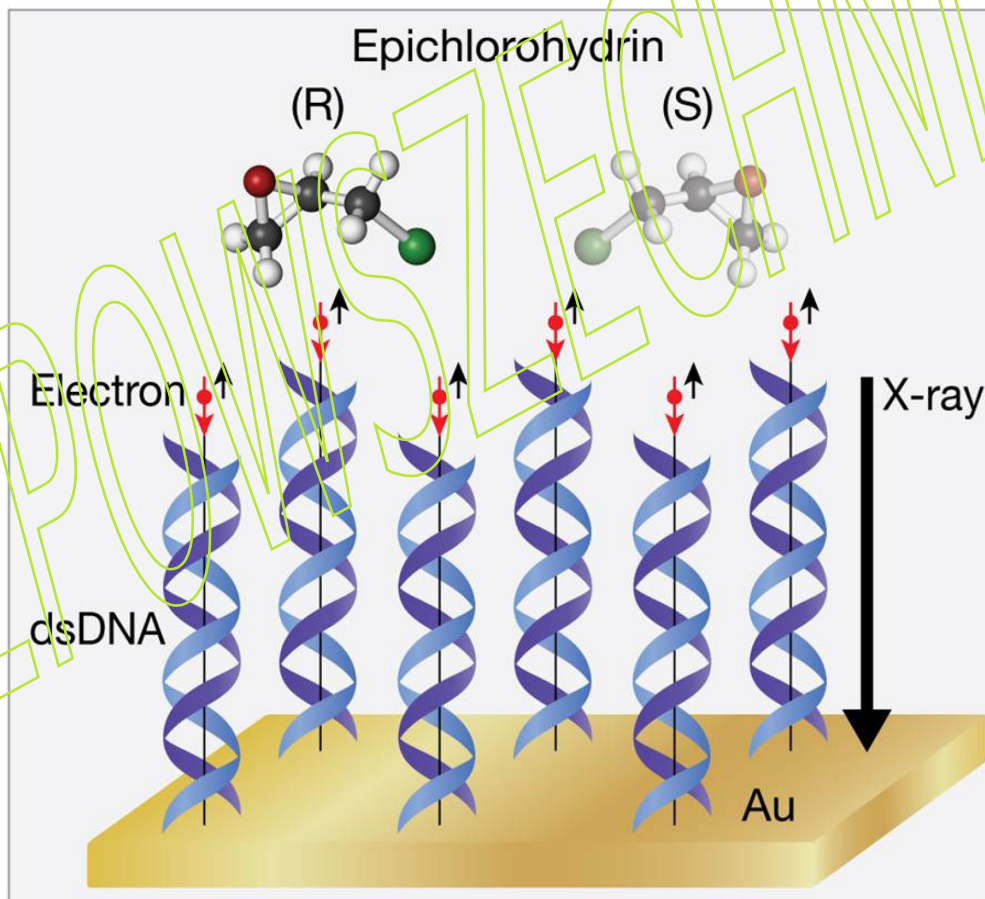


Mechanizm selektywności spinowej indukowanej chiralnie (CISS): jeśli chiralne cząsteczki zostaną zaadsorbowane na powierzchni, mogą działać jako filtr spinowy dla początkowo niespolaryzowanych elektronów wtórnych, wytwarzanych przez padające promieniowanie jonizujące. Jeśli na tej warstwie zaadsorbowane zostaną dodatkowe cząsteczki chiralne, wówczas SPE powinny indukować chiralno-specyficzne reakcje w tych dodanych cząsteczkach. Rysunek przedstawia schematyczny diagram eksperymentu mającego na celu przetestowanie tego pomysłu.

CISS=Chiral-Induced Spin Selectivity

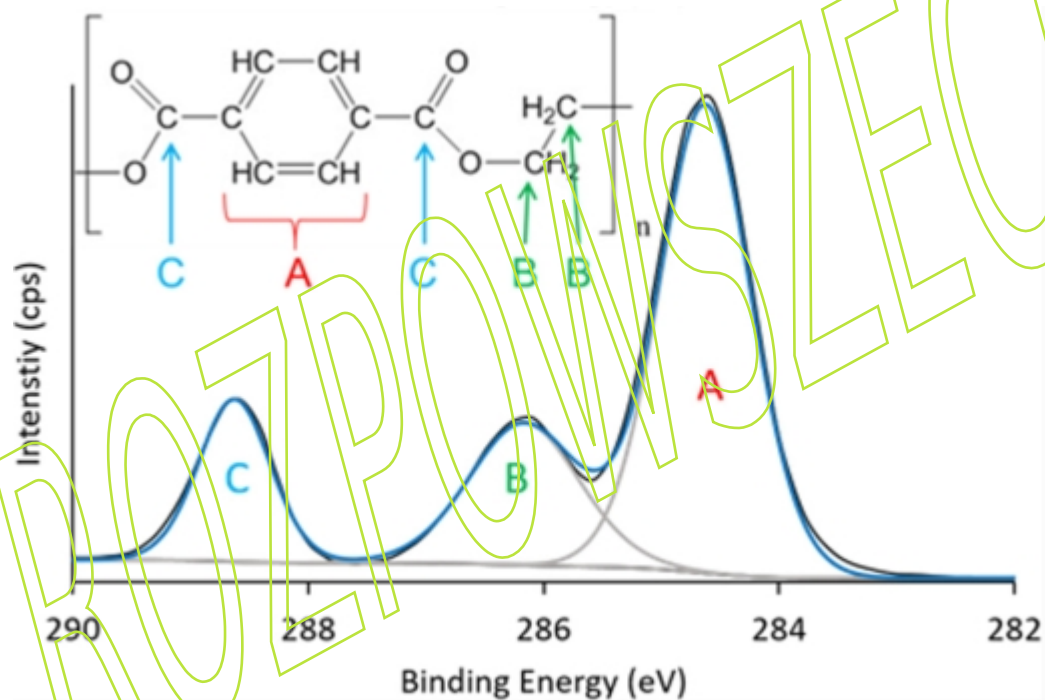


Dysocjacja epichlorohydryny indukowana przez elektrony o niskiej energii wytwarza anion chloru związany z neutralnym rodnikiem (ECH-Cl)•

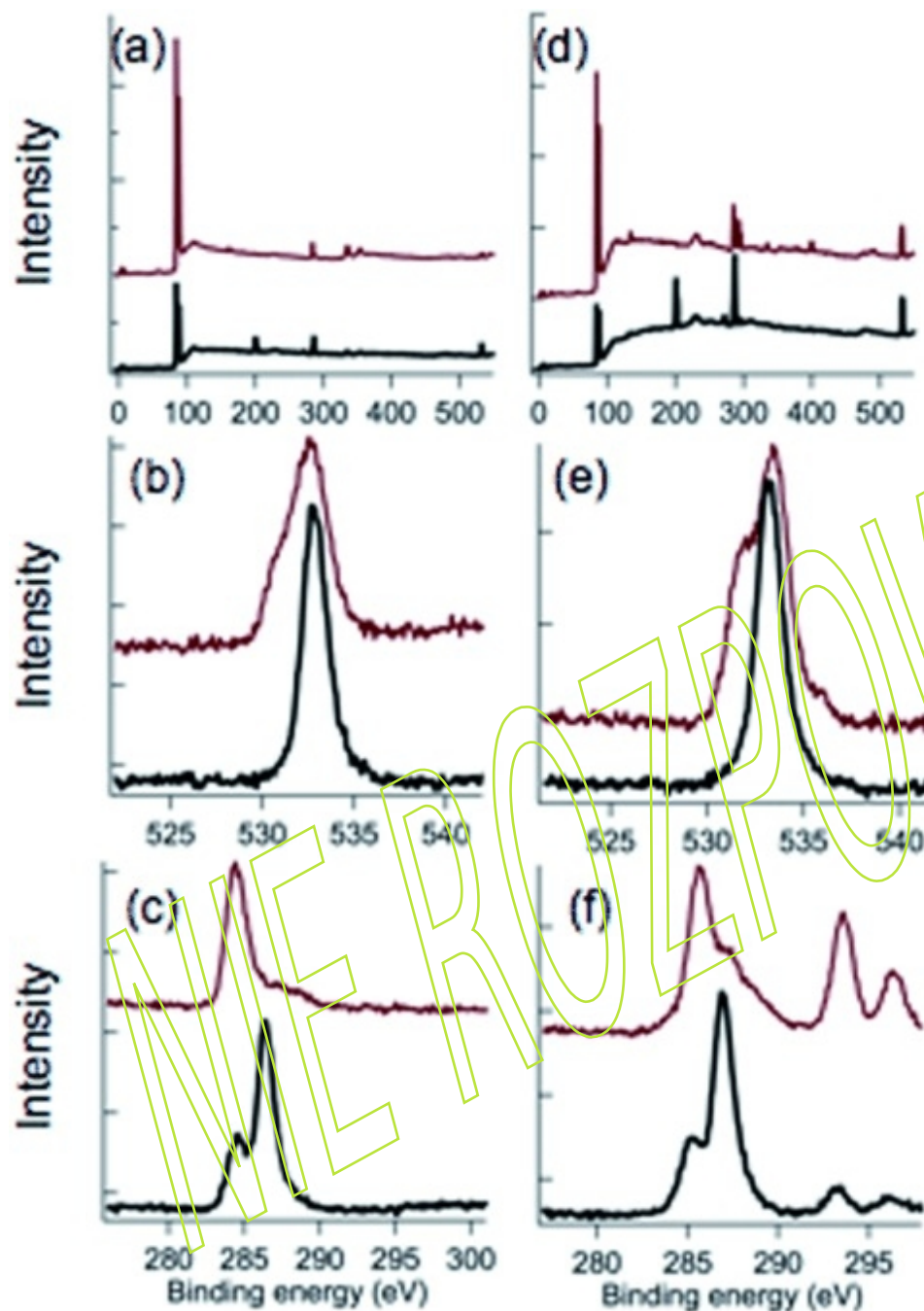


Schematyczny diagram przedstawiający, w jaki sposób elektrony wtórne Au wytwarzane przez napromienianie promieniami rentgenowskimi stają się spolaryzowane spinowo, z ich spinami ustawionymi antyrównoległe do ich prędkości i indukują chiralną selektywną chemię w zaadsorbowanej (R) - lub (S) -epichlorohydrydynie (C_3H_5ClO , Epi).

Wtórą reakcję indukowaną elektronami monitorowano poprzez śledzenie zmian w widmach rentgenowskiej spektroskopii fotoelektronów (XPS, X-ray photoelectron spectroscopy) Cl 2p.



Widmo widmo XPS C 1s o wysokiej rozdzielczości, pokazujące intensywność wybijania elektronów w orbitalu 1s atomu węgla w funkcji energii wiązania

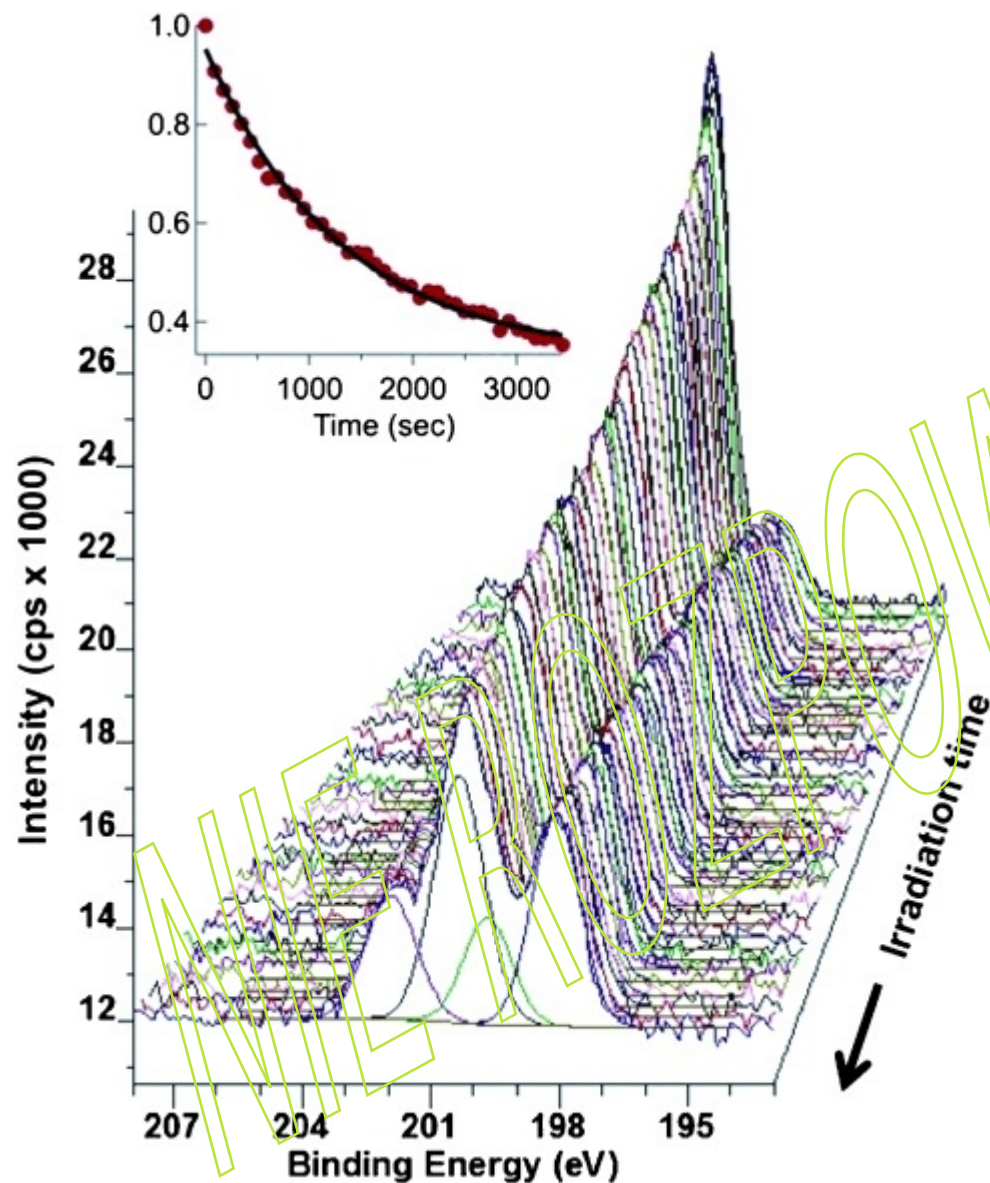


Badanie, czy niskoenergetyczne elektrony wtórne, wytwarzane przez napromienianie promieniami rentgenowskimi złotego podłoża, oraz przenoszone przez chiralną monowarstwę, indukują enancjomeryczną selektywną chemię w zaadsorbowanej warstwie "adlayer". Aby to przetestować, (R) - lub (S) - epichlorohydrynę (C_3H_5ClO , Epi) zaadsorbowano na samoorganizującej się monowarstwie dsDNA o długości 70 par zasad

Widma XPS zarówno próbek czystego Au, jak i Au/dsDNA zarejestrowane przed i po nałożeniu Epi. Charakterystyczne piki obserwuje się przy 84 eV (Au $4f_{7/2}$), 200 eV (Cl 2p), 285 eV (C 1s) i około 532 eV (O 1s). Widma XPS bez nałożonego Epi są koloru czerwonego, z nałożonym Epi – koloru czarnego. Widma dla próbek bez DNA są pokazane na rysunkach a – c, a z dsDNA na rysunkach d – f.

Po nałożeniu Epi na czyste złoto nowe piki się pojawiają w widmach: C 1s (286,4 eV) i O 1s (532,7 eV) (rys. a). Dla Epi zaadsorbowanego na złocie pokrytym dsDNA te same piki pojawiają się przy energii wiązania wyższej o 0,5 eV (rys. d). Dwa atomy węgla w Epi są związane z O, podczas gdy drugi jest związany z Cl, więc można się spodziewać, że dwa chemicznie przesunięte piki C 1s byłoby widać. Jednakże przesunięcia chemiczne C–Cl i C–O są w przybliżeniu takie same i wynoszą 1,3–1,4 eV, więc obserwuje się tylko jeden pik. Tlen jest związany tylko z węglem, więc w rzeczywistości istnieje tylko jeden pik O 1s. Rysunki b, c i e, f, pokazują szczegóły z rysunków a i d, odpowiednio.

Dane były uzyskane przy użyciu promieni rentgenowskich o energii 740 eV.



Podczas naświetlania zaadsorbowanego Epi zaobserwowano istotne zmiany w widmach C 1s, O 1s i Cl 2p XPS. Ponieważ w podłożu znajdują się również C i O, skoncentrowano się na monitorowaniu zmian piku Cl 2p.

Dla każdego układu uzyskano serię widm XPS. Rysunek przedstawia serię 41 widm Cl 2p XPS dla S-Epi/DNA, w funkcji czasu naświetlania promieniami rentgenowskimi o energii 740 eV. Główny pik widoczny przy energii wiązania 200,6 eV pochodzi od nieprzereagowanego Epi. Promieniowanie rentgenowskie wytwarza zdysocjowany Cl (fotoliza) związany z podłożem, z energią wiązania niższą o 2 eV niż w EPI nieprzereagowanym.

Czas pomiędzy kolejnymi widmami wynosi 86 sekund. Wstawka pokazuje zanik znormalizowanego obszaru piku Cl 2p_{3/2} w funkcji czasu (czerwone kropki) z dopasowaniem funkcji wykładniczej (linia ciągła).

Kinetyka fotolizy Cl obserwowana dla S-Epi/DNA jest inna niż dla R-Epi/DNA, ale autorzy nie pokazali szczegółów.

Trwałość homohiralności biologicznej wskazuje, że procesy syntezy biomolekuł są specyficzne pod względem chiralności substratów.

Chiral-Selective Aminoacylation of an RNA Minihelix

Koji Tamura and Paul Schimmel
SCIENCE, 305:1253-1253 (2004)

Chiral-selective aminoacylation of an RNA minihelix: Mechanistic features and chiral suppression

Koji Tamura and Paul R. Schimmel
Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 103:13750-13752 (2006)

Wykazano, że chiralność cukrów tworzących minihelise RNA o strukturze spinki do włosów (D-ryboza lub L-ryboza) decyduje czy aminokwas załadowany do RNA na etapie przed włączeniem do nowego peptydu jest prawo- czy lewo-skrętny.

Principles of chemical geometry underlying chiral selectivity in RNA minihelix aminoacylation

Tadashi Ando, Shunichi Takahashi and Koji Tamura
Nucleic Acids Research, 46:11144-11152 (2018)

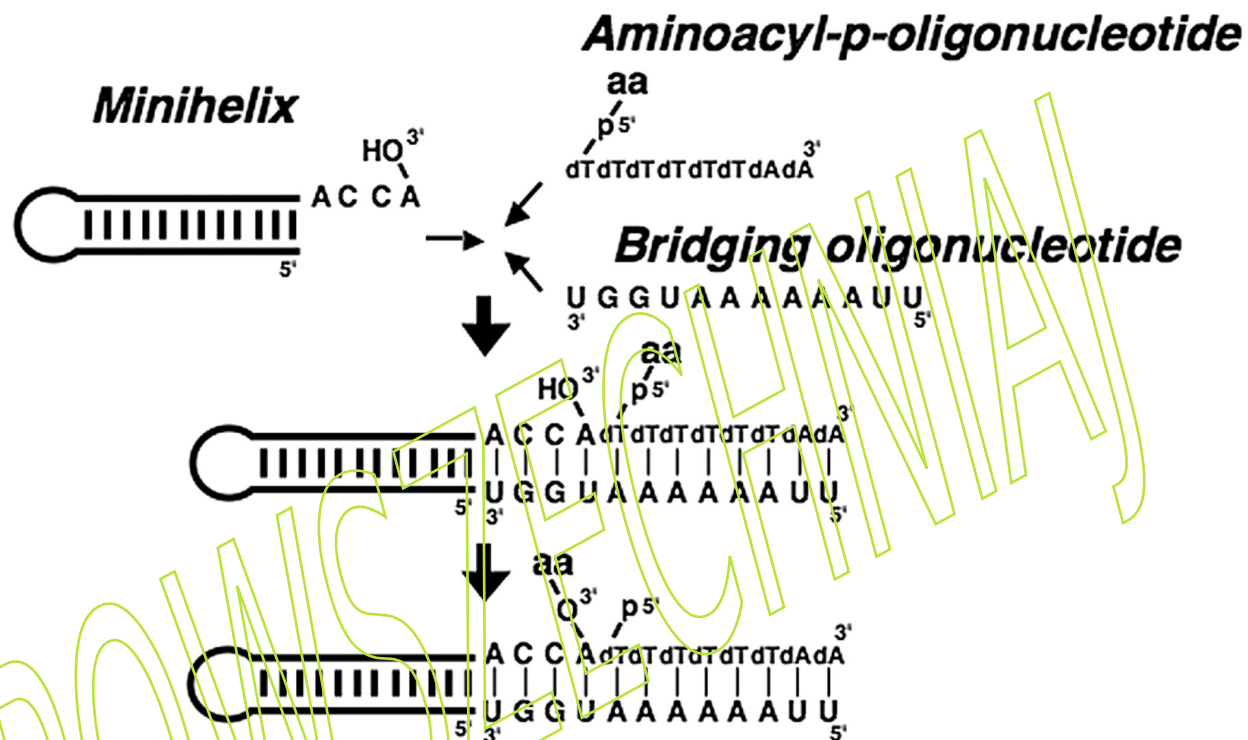
Aminoacylowanie to proces dodawania grupy aminoacylowej do związku.

Aminoacylacja RNA jest pierwszym etapem syntezy białek i dlatego ma kluczowe znaczenie dla przejścia od domniemanego świata RNA do życia opartego na białkach.

Aby zbadać selekcję chiralną w aminoacylacji RNA, zaczęliśmy od minihelisy RNA, która ma formę domeny w tRNA, która zawiera miejsce przyłączenia aminokwasu.

[Science, 305:1253-1253 (2004)]

W celu zbadania chiralnej selekcji aminokwasów pod kątem pochodzenia aminoacylacji tRNA, zaprojektowano eksperyment nieenzymatycznego aminoacylowania minihelisy RNA. Minihelix i oligonukleotyd mostkujący preinkubowano razem przez 1 godzinę w temperaturze 0°C w tych samych warunkach buforowych, i następnie dodano 5'-[¹⁴C]aminoacylo-p-dT₆dA₂.



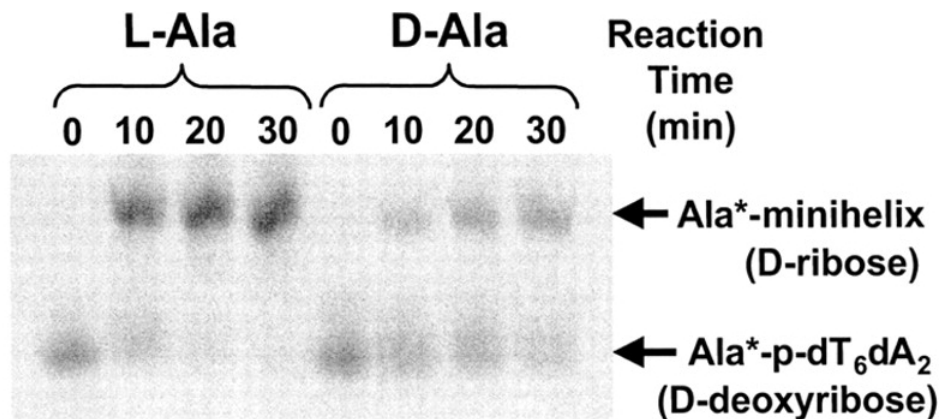
Schemat reakcji aminoacylowania zastosowany w tej pracy.

Minihelisę^{Ala} (opartą na sekwencji tRNA^{Ala} z *E. coli*), oligonukleotyd mostkujący, i 5'-[¹⁴C] L-Ala-p-dT₆dA₂ (5'-aminoacylo-p-(dT)₆(dA)₂) mieszało razem w celu przeniesienia reszty aminoacylowej z 5'-fosforanu dT oligonukleotydu do grupy 3'-hydroksylowej A, gdzie dT i dA oznaczają odpowiednio deoksytyminę i deoksyadenozynę; „aa” oznacza aminokwas, czyli w celu uzyskania nieenzymatycznej aminoacylacji minihelisy^{Ala}.

Minihelisę^{Ala} hybrydyzowano* poprzez jednoniciowy koniec 3' z oligonukleotydem 5'-aminoacylofosforanowym. [Oligonukleotyd aminoacylofosforanowy przypomina współczesne systemy, które wykorzystują mononukleotydy 5'-aminoacylofosforanowe (adenylany).] Hybrydyzację tę uzyskano poprzez oligonukleotyd mostkujący (szablon), który uzależnił reakcję od matrycy.

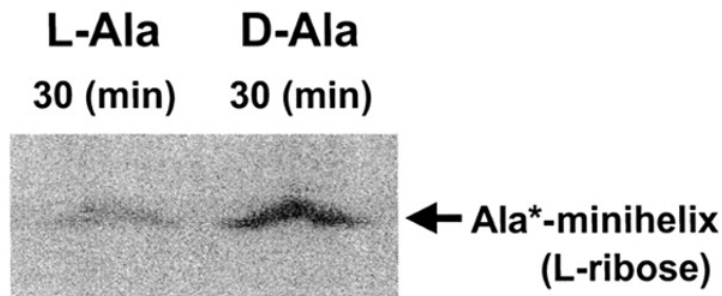
Aminoacylowanie było ściśle specyficzne dla 3'-OH, najprawdopodobniej dlatego, że w wydłużonej helisie Watsona-Cricka kompleksu hybrydyzacyjnego 3'-OH jest bliżej (niż 2'-OH) reszty 5'-aminoacylowej oligonukleotydu aminoacylofosforanowego. Tutaj cechą, która może być ważna przy określaniu chiralnej selektywności aminoacylowania, jest wiązanie wodorowe pomiędzy grupą aminową Ala i tlenem fosforanowym końcowej adenozyminy minihelisy^{Ala}.

*W biologii molekularnej hybrydyzacja to zjawisko, w którym jednoniciowe cząsteczki kwasu dezoksyrybonukleinowego (DNA) lub kwasu rybonukleinowego (RNA) przyłączają się do komplementarnego DNA lub RNA (wikipedia).



(Góra) Analiza PAGE aminoacylowania minihelisy zmieszanej z oligonukleotydem mostkującym i 5'-[¹⁴C]-labeled-L- or D alanyl-p-dT₆dA₂. (PAGE=polyacrylamide gel electrophoresis = elektroforeza w żelu poliakryloamidowym – technika szeroko stosowana w biochemii, biologii molekularnej, biotechnologii itp., służąca do rozdzielania makrocząsteczek biologicznych, najczęściej białek lub kwasów nukleinowych, ze względu na ich ruchliwość elektroforetyczną).

W chwili “zero” mamy 5'-[¹⁴C]L-Ala-p-dT₆dA₂, ale nie ma L-Ala-mini-helix. Potem pojawia się rosnąca ilość L-Ala-mini-helix. Dla D-Ala reakcja praktycznie “nie idzie”.



(Dół) To samo co na górze, ale z L-ribose RNA.

Zsyntetyzowaliśmy 5'-[¹⁴C]L-Ala-p-dT₆dA₂ and 5'-[¹⁴C]D-Ala-p-dT₆dA₂ i stwierdziliśmy, że wydajność tworzenia [¹⁴C]L-Ala-mini-helix przewyższała wydajność tworzenia [¹⁴C]D-Ala-mini-helix w stosunku około **4 :1** (górny rysunek i rys. A na następnym slajdzie).

Przygotowaliśmy także składniki RNA o przeciwnej chiralności i przetestowaliśmy zarówno L-, jak i D-aminokwasy. Naturalne cząsteczki RNA zawierają wyłącznie D-rybozę. Zsyntetyzowaliśmy oligonukleotyd fosforanu aminoacylu, oligonukleotyd mostkujący i minihelix^{Ala}, z których wszystkie zawierają L-rybozę.

Minihelix^{Ala}, oligonukleotyd mostkujący i albo 5'-[¹⁴C]L-Ala-p-dT₆dA₂ albo 5'-[¹⁴C]D-Ala-p-dT₆dA₂ (oba zawierające L-deoksyrybozę) połączono i analizowano pod kątem aminoacylowania minihelisy^{Ala}. Tworzenie [¹⁴C]D-Ala-mini-helix przewyższało tworzenie [¹⁴C]L-Ala-mini-helix (rysunek dolny). Stosunek [¹⁴C]L-Ala-mini-helix do [¹⁴C]D-Ala-mini-helix oszacowano na **1:3.6**, co jest mniej więcej odwrotnością tego, co określono, gdy użyliśmy RNA zawierającego D-rybozę.

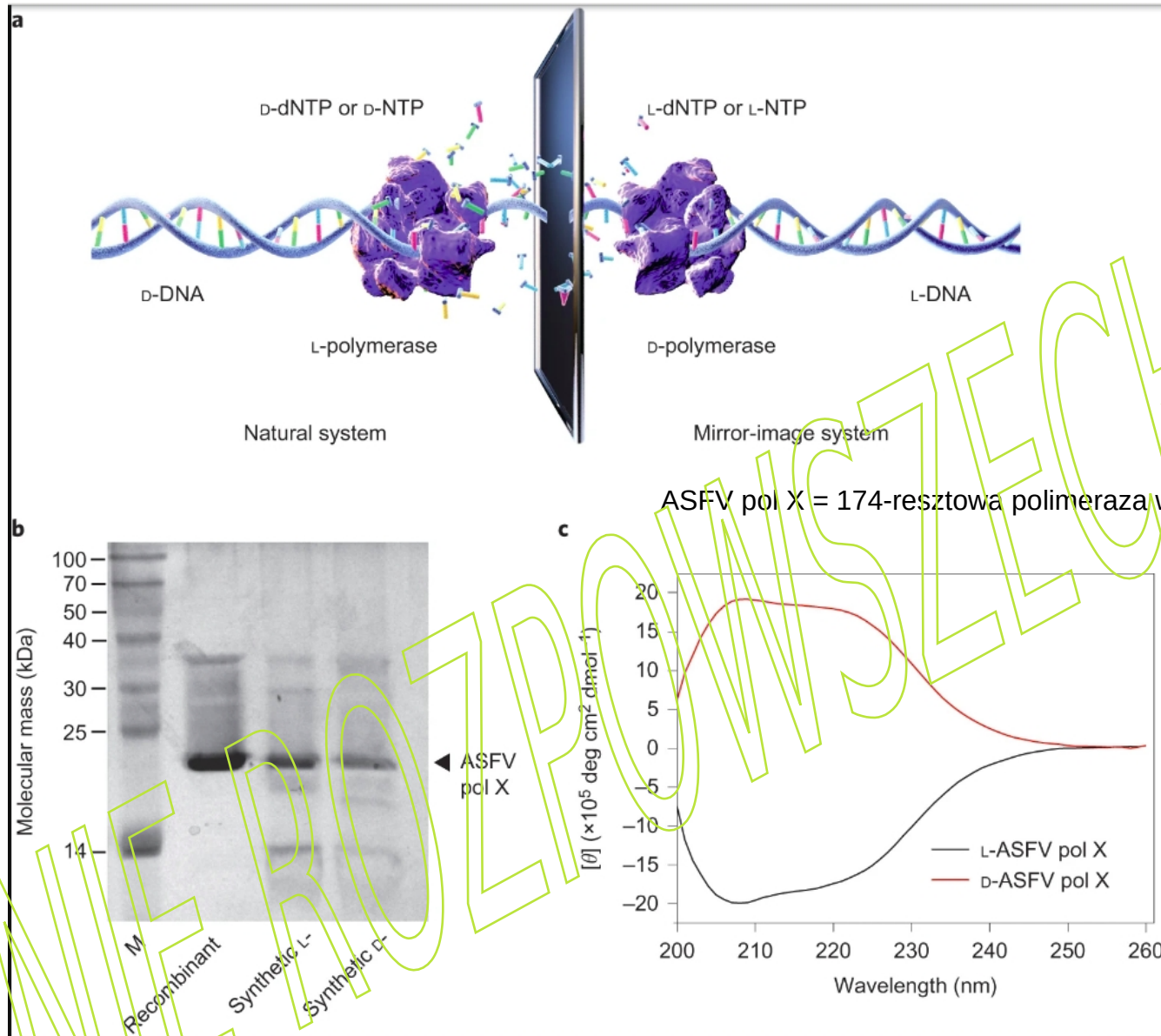
A synthetic molecular system capable of mirror-image genetic replication and transcription

Zimou Wang, Weiliang Xu, Lei Liu and Ting F. Zhu

Nature Chemistry 8, 698-704 (2016)

W przeważającej mierze homochiralna natura życia pozostawiła zagadkę, czy mogły również istnieć systemy biologiczne będące lustrzanym odbiciem, oparte na chiralnie odwróconej wersji maszynarii molekularnej. Tutaj podajemy, że dwa kluczowe etapy centralnego dogmatu biologii molekularnej, kierowana na matrycę polimeryzacja DNA i transkrypcja do RNA, mogą być katalizowane przez chemicznie syntetyzowaną polimerazę D-aminokwasów na matrycy L-DNA. Zwróciliśmy się do najmniejszej znanej polimerazy DNA, polimerazy X wirusa afrykańskiego pomoru świń składającej się ze 174 reszt (ASFV pol X).

Pokazaliśmy, że dwie chiralnie lustrzane wersje ASFV pol X mogą działać w mieszaninie racemicznej bez znaczącego enancjomerycznego hamowania krzyżowego swojej aktywności. Ponadto wykazaliśmy, że funkcjonalnie aktywny L-DNAzym można wytwarzać enzymatycznie przy użyciu polimerazy D-aminokwasu.

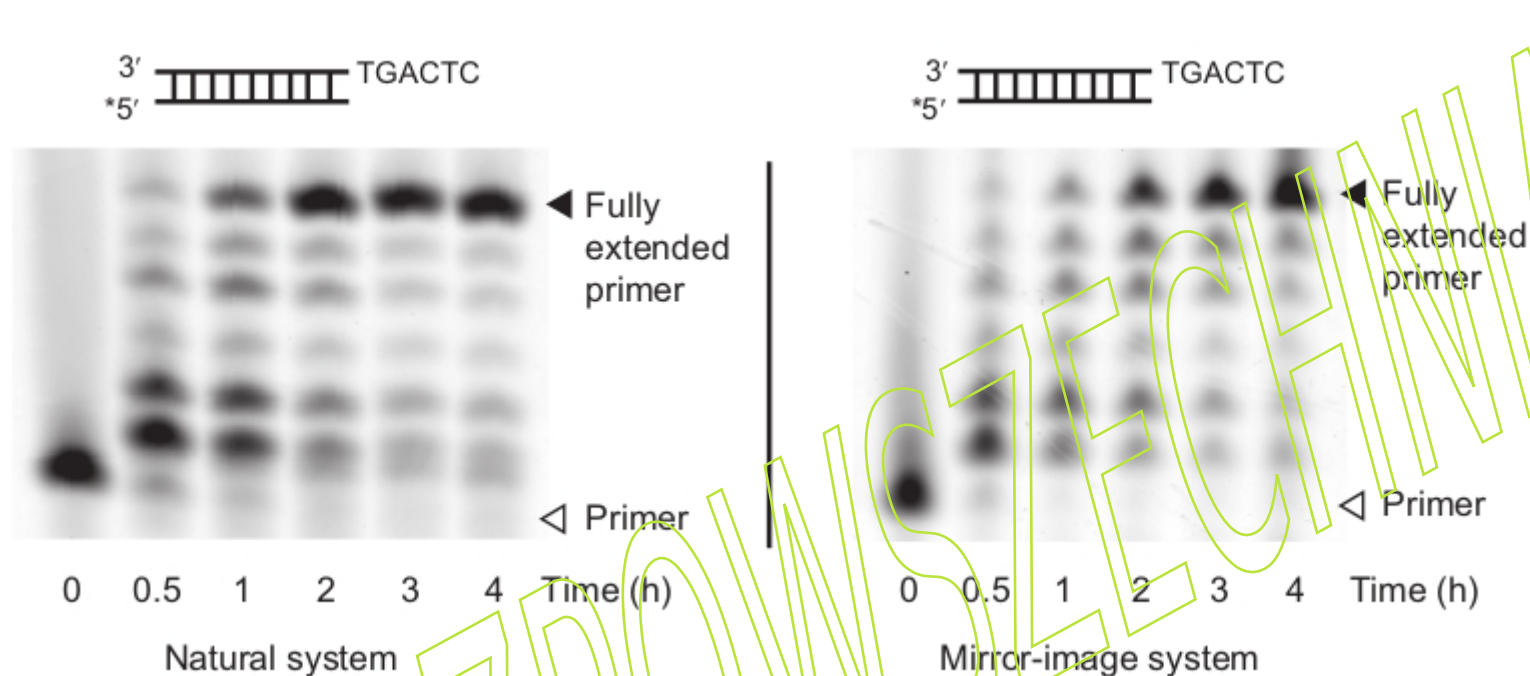


Dwa chiralnie lustrzane systemy polimerazy z syntetycznym L- i D-ASFV pol X.

a, Wydłużanie startera kierowane na matrycę przez L-polimerazę na matrycy D-DNA i jego system odbicia lustrzanego, wydłużanie startera kierowane na matrycę przez D-polimerazę na matrycy L-DNA.

b, Chemicznie zsyntetyzowany i złożony L- i D-ASFV pol X, jak również oczyszczony rekombinowany L-ASFV pol X ze szczepu E. coli BL21(DE3)pLySs, analizowano za pomocą 15% SDS-PAGE (barwionej srebrem) za pomocą frakcja niezwiązanych segmentów peptydowych obserwowana w syntetycznym markerze L- i D-ASFV pol X.M.

c, widma CD syntetycznego L- i D-ASFV pol X. Krzywe CD uśredniono z trzech niezależnych pomiarów i odjęto tło.



Ukierunkowane na szablon przedłużenie startera syntetycznym L-ASFV pol X (system naturalny) i D-ASFV pol X (system lustrzanego odbicia) w 50 mM Tris-HCl, pH 7,5, 20 mM MgCl₂, 1 mM DTT, 50 mM KCl, z odpowiednimi starterami, matrycami i dNTP D- i L-DNA, inkubowane przez maksymalnie 4 godziny w 37°C i analizowano za pomocą 20% PAGE w 8 M moczniku.

Pokazaliśmy, że zarówno system naturalny, jak i system odbicia lustrzanego wydłużył odpowiednie startery o długości 12 nukleotydów (12 nt) do pełnej długości 18 nt w około cztery godziny (ryc. 2a). Jednakże ilościowo określona wydajność polimeryzacji układu odbicia lustrzanego, przy zmierzonej wartości k_{obs} (obserwowana szybkość reakcji, określona na podstawie szybkości zanik starterów) wynoszący $3,3 \pm 0,3 \text{ h}^{-1}$, okazał się niższy od naturalnego ($k_{obs} = 6,0 \pm 0,8 \text{ h}^{-1}$), a częściowe zatrzymanie w pozycji +1 nt zaobserwowano zarówno w przypadku startera naturalnego, jak i systemy lustrzanego odbicia. Doszliśmy do wniosku, że wiele różnic w czystości L- i D-aminokwasów, matryc D i L-DNA, starterów i dNTP może przyczyniać się do różnic w obserwowanej szybkości reakcji. Rzeczywiście, w widmach HPLC i CD zaobserwowano różnice w czystości dostarczanych na rynku D- i L-DNA.

racemizacja i jej zastosowanie w datowaniu

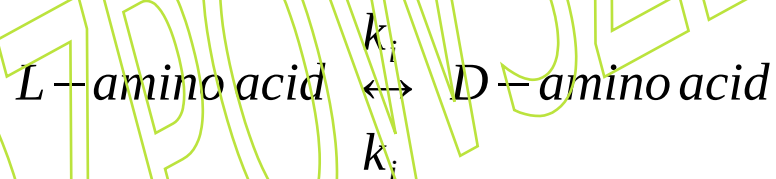
utrzymanie homochiralności aminokwasów i cukrów w komórkach wymaga aktywnego metabolizmu komórkowego

Racemization of Amino Acids in Nature

Jeffrey L. Bada

Interdisciplinary Science Reviews, 7, 30-46 (1982)

Aminokwasy w organizmach żywych są optycznie czynne. Jednakże, gdy biologicznie syntetyzowane aminokwasy zostaną wyizolowane z procesów biochemicznych, które zachowują ich aktywność optyczną, reakcje racemizacji stopniowo przekształcają aminokwasy w optycznie nieaktywną mieszaninę.



Racemizacja aminokwasów na Ziemi ma ważne zastosowania i implikacje. Do oszacowania wieku **skamielin** i **metabolicznie stabilnych białek*** w żywych ssakach można wykorzystać powolną racemizację aminokwasów w tych materiałach.

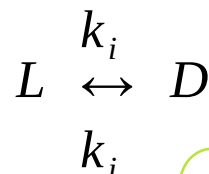
W chemii, mieszanina racemiczna lub racemat to taka, która ma równe ilości lewo- i prawoskrętnych enancjomerów chiralnej cząsteczki.

Metoda geochronologii skalibrowanej racemizacji aminokwasów (AAR, amino acid racemization) jako narzędzie datowania została opracowana dzięki wysiłkom Bady i współautorów w 1972 r., zwłaszcza w zastosowaniu do kości czwartorzędowych. Obejmuje zakres czasowy od ~20 lat wstecz do co najmniej 3 milionów lat temu, a zatem ma zastosowanie przez cały okres czwartorzędu aż do późnego pliocenu.

Ardith D. Bravenec, Karen D. Ward and Timothy J. Ward, Journal of Separation Science 41, 1849-1506 (2018)

*Nie ma haseł encyklopedycznych „**białka stabilne metabolicznie**”. Jednak termin ten spotykamy w niektórych publikacjach, m.in. w abstrakcie powyższego artykułu Bady.

Ogólną reakcję racemizacji aminokwasów można zapisać jako



gdzie L oznacza L-aminokwas, D oznacza D-aminokwas, a k_i oznacza stałą szybkości pierwszego rzędu dla wzajemnej konwersji enancjomerów L i D. Stała szybkości pierwszego rzędu dla racemizacji wynosi $2k_i$. Wyrażenie na szybkość reakcji pokazanej powyżej to

$$-\frac{d[L]}{dt} = k_i[L] - k_i[D]$$

Niejednorodne równanie różniczkowe o stałych współczynnikach

co, biorąc pod uwagę, że $[L] + [D] = \text{const} \equiv C_0$, jest równoważne

$$\frac{d[L]}{dt} + 2k_i[L] = k_i C_0$$

co po scałkowaniu daje

$$\ln\left(\frac{1 + D/L}{1 - D/L}\right) - \text{constant} = 2k_i t \quad (1)$$

gdzie t oznacza czas, a D/L oznacza stosunek enancjomerów aminokwasów. Stała integracji nie wynosi zero, ponieważ początkowo mogą występować małe ilości enancjomeru D, a także niewielka ilość racemizacji ma miejsce w procedurze izolowania podczas etapu hydrolizy kwasowej. Powyższe równanie jest równaniem kinetycznym odwracalnej reakcji pierwszego rzędu.

Racemization of aspartic acid and phenylalanine in the sweetener aspartame at 100°C

Marcus F. Boehm and Jeffrey L. Bada, PNAS 81, 5263-5266 (1984)

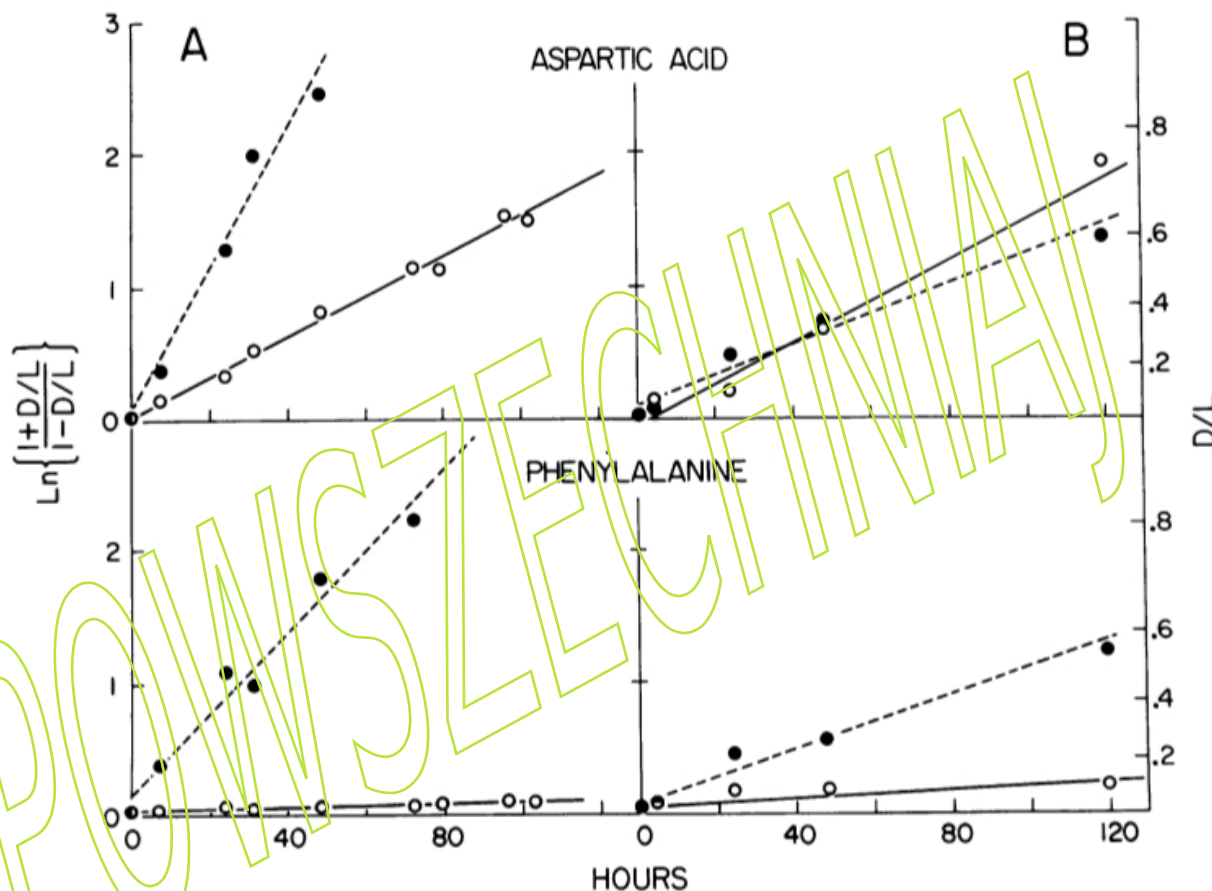
Kinetyka racemizacji kwasu asparaginowego i fenyloalaniny w roztworach czystego aspartamu (A) i equalu (B), w buforach bursztynianowym (pH 4, O) i fosforanowym (pH 6,8, ●), odpowiednio, ogrzanych do temperatury 100°C. Nachylenie linii (określone metodą najmniejszych kwadratów danych) jest równe 2 k_i (patrz równanie 1). Punkt $t = 0$ oznacza wielkość racemizacji zachodzącej podczas etapu hydrolizy HCl.

Aspartam – organiczny związek chemiczny, ester metylowy dipeptydu Asp-Phe. Na produktach spożywczych oznaczany jest kodem E951. Equal to jedna z marek aspartamu w USA.

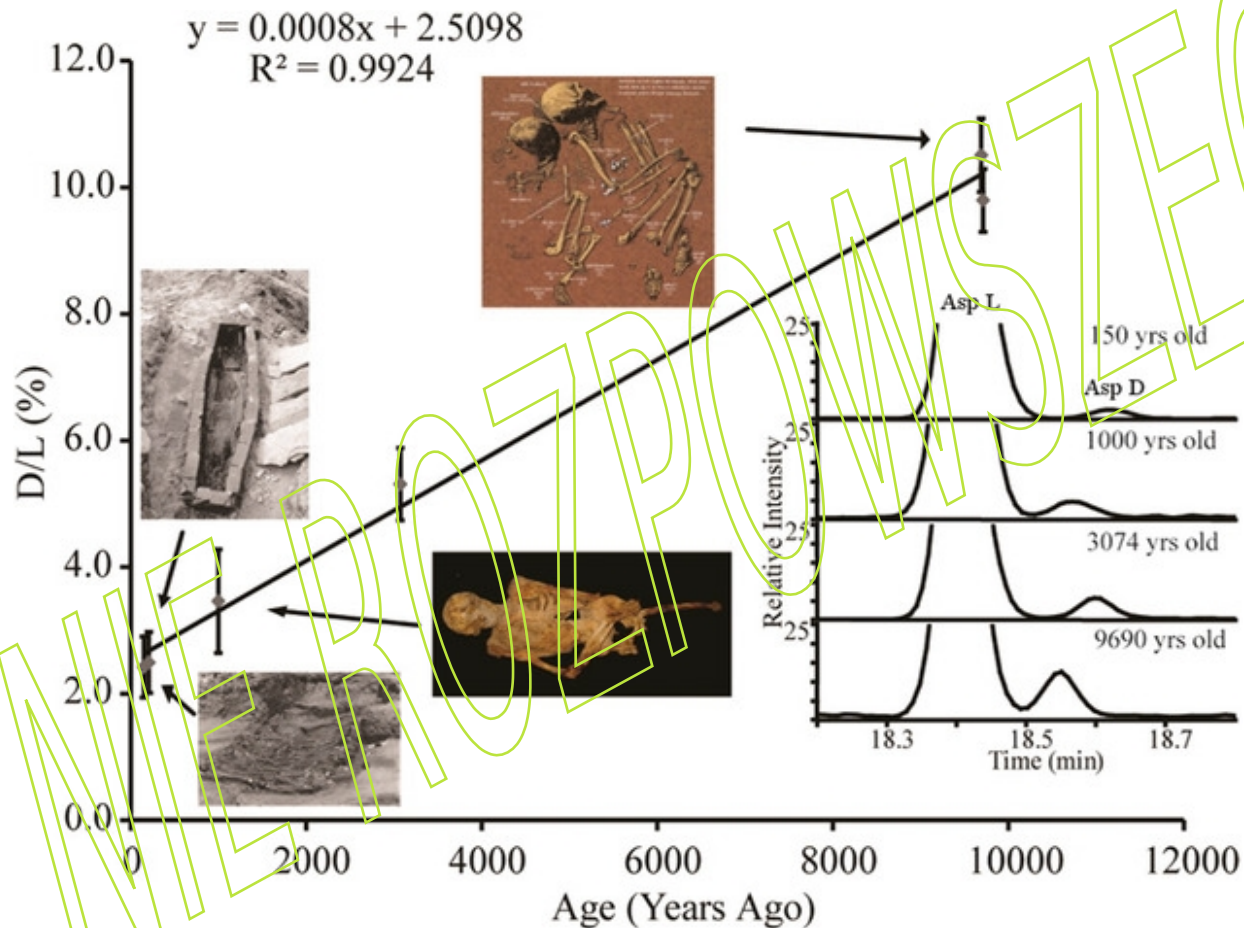
Zmniejszenie spożycia cukru przez ludzi zaleca się z wielu powodów, a prawdopodobnie najbardziej przekonującym jest zapobieganie próchnicy zębów i otyłości. Jednak wysiłki mające na celu znalezienie substytutu cukru na ogół nie zakończyły się sukcesem. Niedawno nowa substancja słodząca, aspartam, ester metylowy dipeptydu L-aspartylo-L-fenyloalaniny, została zatwierdzona przez Agencję ds. Żywności i Leków jako substytut cukru w niektórych produktach spożywczych i napojach.

W roztworze wodnym aspartam rozkłada się do diketopiperazyny. Wykazaliśmy, że reszty aminokwasowe w diketopiperazynach są bardzo podatne na racemizację zarówno przy obojętnym, jak i zasadowym pH. Ponieważ obecność aminokwasów D w diecie człowieka może mieć różnorodne konsekwencje, wiele z nich które są słabo poznane, ważne byłoby ustalenie szybkości racemizacji kwasu asparaginowego i fenyloalaniny w aspartamie i jego produkcie rozkładu diketopiperazyny. W związku z tym zbadaliśmy kinetykę racemizacji kwasu asparaginowego i fenyloalaniny w roztworach aspartamu ogrzewano w temperaturze 100°C i pH 4 i 7.

Szybkość racemizacji przy pH 4 jest powolna i podczas normalnego stosowania aspartamu nie powinna wystąpić żadna zauważalna racemizacja kwasu asparaginowego i fenyloalaniny.



Opracowano metody separacji, które wymagają mniejszej próbki i nie wymagają derywatywacji. Na przykład CE-MS (elektroforeza kapilarna – spektrometria mas, capillary electrophoresis–mass spectrometry) została zastosowana do podstawowego rozdziału i wykrywania mieszanin D/L aminokwasów z ludzkich kości przy użyciu gołej kapilary ze stopionej krzemionki i 18-korona kwasu (+)-tetrakarboksylowego-6 jako chiralny CE BGE. Elektroferogramy jonów* wykonane tą metodą przedstawiono na rysunku poniżej. Ponieważ ta metoda CE-MS jest prawie 1000 razy bardziej czuła niż datowanie radiowęglowe, wymagana jest tylko niewielka ilość próbki kości w porównaniu z ilością zużywaną przez technikę HPLC.



*intensywność sygnału obserwowana przy wybranej wartości m/z rejestrowana jako funkcja czasu elektroforezy.

(BGE=background electrolyte, CE BGE background electrolyte do CE)

Elektroferogram jonowy = Elektroferogram utworzony poprzez wykreślenie intensywności sygnału obserwowanego przy wybranej wartości m/z lub zestawie wartości w serii widm mas zarejestrowanych jako funkcja czasu elektroforezy.

Krzywa kalibracji D/L uzyskana głównie z kości Homo sapiens datowanych węglem ^{14}C . Wstawka pokazuje odpowiednie elektroferogramy jonów izomerów D i L kwasu asparaginowego. The results show a strong linear correlation ($R^2 \geq 0.99$) between the D/L ratio of aspartic acid and the age of the Homo sapiens bone. Jest to spodziewane dla stosunku D/L opisanego przez odwracalną reakcję pierwszego rzędu (cytują Anal. Chem. 2011, 83, 7577–7581, ale tam nie ma na to dowodu).