B 1864

ADATOK AZ EXOBIOLÓGIA NÉHÁNY KÉRDÉSÉHEZ

Soós József

EGYETEMI DOKTORI DOLGOZAT

Készült a Szegedi Biológiai Központ
Biofizikai Intézetében

B E V E Z E T É S

Van élet a földön kivül, vagy egyedül vagyunk a világegyetemben? Nagyon valószinü, hogy néhány fényéven belül mi vagyunk az egyetlen fejlett technológiai civilizáció /PAPAGIANNIS, 1978/, de a kérdés alapvetően megválaszolatlan.

Joshua Lederberg, a Stanford egyetem munkatársa adta az exobiológia nevet a földön kivüli élettel kapcsolatos kutatások összefoglaló elnevezéseként, amely a földi élővilág kifejlődését megelőző evolúciós folyamatokra is általánositható.

A.I. Oparin által vázolt evolúciós lépések a következők:

1. a periódusos rendszer elemeinek evolúciója,
2. egyszerü vegyületek létrejötte a kozmikus térben /a későbbi élet szempontjából fontos szénhidrogének, cianidok és származékaik stb./, amit a Föld kialakulása alatt a szilárd felszin, az atmoszféra és a hidroszféra kialakulása követ,
3. a Föld felületén a kezdeti széntartalmu vegyületek egyre összetettebb szerves strukturákat formálnak - monomereket és egyszerübb polimereket -, létrejön az un. ősleves,
4. ezen ősleves alkotóinak "önformálódása" hoz létre polimolekuláris nyilt rendszereket, amelyek alkalmasak a környezethez való alkalmazkodásra, birnak a

SZEGED

növekedés és szaporodás képességével.

Oparin szerint polipeptidek, zsirszerü vegyületek, polinukleotidok egyaránt létrehoztak a környezetükből fázishatárral elkülönülő strukturákat /un. koacervátumokat/, akár külön-külön, akár párban, de a fejlődés során azok a rendszerek voltak kedvezményezettek, amelyek fehérjéket /végrehajtás/, nukleinsavakat /információtárolás/, és lipideket /membránképzés/ egyaránt tartalmaztak.

5. a létrejött probionták további fejlődése egyre tökéletesebb anyagcseréjü, egyre tökéletesebb molekuláris és szuper-molekuláris strukturáju rendszerek prebiológiai kiválogatódása eredményeként jelentek meg az első ősi organizmusok.

Az itt vázolt logikai menet sok szempontból igazoltnak látszik /PONNANPERUMA, 1972a/, a részleteket és főként az "utolsó lépést" illetően azonban nagyon sok kérdés megválaszolatlan.

A Föld kb. 4.6 milliárd éves, mig a legöregebb datált kőzetek kb. 3.6 milliárd évesek. A legöregebb mikrofossziliákat Dél-Afrikában találták /3.2 milliárd évesek/ és kb. ilyen koru közetekből mutattak ki élőre jellemzőnek tartott izoprenoidokat, szteránokat, porfirineket, aminosavakat és cukrokat. Ennek megfelelően a rádiócsillagászati módszerekkel a csillagközi térben

is kimutatott egyszerü vegyületekből /BUHL, 1974/ kb. 500 millió éven belül alakult ki a mai élet ősе és ezt követte a napjainkban is tartó, hosszu biológiai evolució.

Filozófiai szempontból vizsgálva: az anyag önfejlődésének utján az élőszervezetek kialakulása alkalmas körülmények között szükségszerü. Ennek a ténynek bizonyitása azonban nagyon sok feltételezést tesz szükségessé, mivel a prebiotikus jellemzők /redukáló légkör, ősleves stb./, napjainkra megfordithatatlanul megváltoztak, igy ezeknek a paraméterek-nek becslése csak indirekt módon lehetséges, több-kevesebb hibával.

Nagyon fontosak az un. Miller-kisérletek, amelyek közül az első néhányat 1954-ben publikálták. Ezekben az őslégkörnek megfelelő atmoszférában /CH_4, NH_3, H_2O, H_2/ elektromos kisülésre aminosavakat kaptak. Ugyanebben a rendszerben később szerves savakat is kimutattak. Az energia fajtákat változtatva /pl. hő, fény, radioaktiv sugárzás/ hasonló termékeket kaptak. Sokan az őslégkörből levezethető, de az adott kisérletben elkülönitett anyagokon végeztek vizsgálatokat /pl. HCN - adenin, SCN - metionin, paraformaldehid + hidroxilamin - szerin, stb./.

A nagyszámu ilyen témáju dolgozatból /CALVIN, 1969; PONNANPERUMA, 1972b; MILLER, 1976/ azt a következtetést vonhatjuk le, hogy az élőben előforduló anyagok összes tipusa előállitható prebiotikus körülményeket modellezve. Fontos tény, hogy az adott körülmények között többnyire a mai élőkre jellemző vegyületek jönnek létre, annak ellenére, hogy a kiindulási anyagokból sokkal több fajtáju termék létrejöhetne formálisan. Ez az irányitott jelleg és ennek jellemzői jelentik az exobiológia egyik alapkérdését.

A kémiai evolució a modellkisérletek tanusága szerint szimmetrikus termékeket produkált, azaz a lehetséges optikai izomerek ekvimolekuláris keverékét. Ha azonban a mai élőket vizsgáljuk, teljes aszimmetriát találunk: nukleinsavakban csak D-cukrokat, fehérjékben L-aminosavakat. Vajon miért nincsenek tükörképi élőlények, amelyek tehát L-cukrokat és D-aminosavakat tartalmaznak? Az optikai izomer párok tagjainak azonos tulajdonságai alapján azonos eséllyel kellene előfordulniuk.

Bizonyos, hogy optikailag tiszta rendszerek fontos paraméterekben /polimerizáció sebesség, oldékonyság, stb./ előnyösebbek a racem rendszereknél. A mai élők makromolekuláinak jobbos helicitása a monomerek szimmetria sajátságaiból következik, tehát a D-cukrok és L-aminosavak ily módon megfeleltethetők egymás-

nak. Az is bizonyos, hogy egy magára hagyott optikailag tiszta anyag racemizálódik, tehát bármely rendszerben az optikai tisztaság fenntartása energiaigényes folyamat.

Az élők különböző enzimeket müködtetnek a nem-természetes izomerek eltávolitására. D-aminosav megjelenése az élőszervezetben általában kóros folyamatokat jelez. D-aminosavakat mutattak ki daganatokban, öregedéssel kapcsolatosan állatokban, emberi vonatkozásban az anyagcsere erőteljes zavara miatt szemfehérjékben, a katarakta nevü kórképban. Ritka kivételként normális körülmények között is előfordulhatnak D-aminosavak élőben /pl. antibiotikumokban, vagy baktérium sejtfalban/, azonban ezeknek nincs közvetlen kapcsolata a riboszómális fehérjeszintézissel.

Gyakorlatban is kihasználható az optikai tisztaság: pl. bizonyos peptidek /enkefalinok/ stabilitása és biológiai aktivitása nagyságrendekkel megnövelhető, ha alkalmas pozicióba D-aminosavakat épitenek, mert a kötést bontó peptidáz az L-L aminosav kapcsolatra specifikus, a D-L párt nem ismeri fel.

Az élővilágra azonban mindenképpen az L-aminosavak és D-cukrok jellemzők. Valamilyen aszimmetriát okozó faktort kell találnunk, ami a prebiológiai evolució idején a mai élőkre jellemző optikai izomereket

tette kedvezményezetté és a ma "nem-természetes"-nek mondott izomereket kiszelektálta. Legnagyobb eséllyel az alább felsorolt okok játszhattak szerepet ebben:

1/ Az optikai izomerek nem azonos energiatartalmuak. Rein /REIN, 1974/ szerint 10^{-13} eV különbség lehet D és L izomerek között. Megbizható kisérlettel nem igazolták.

2/ Statisztikus ok. Decker /DECKER, 1975/ dolgozott ki használható modellt magyarázatként. D és L enantiomer prekurzorok reakciótermékei a D' és L' antipódok, amelyek saját képződésüket katalizálják. További feltétel, hogy az enantiomer produktumok sztereospecifikusan fogyasszák egymást. Egy ilyen nyilt rendszer lehet instabil és az egyik konfigurációt teljesen elnyomhatja, ha kibillen egyensulyi helyzetéből. Pusztán statisztikai alapon azonban a D és L szelekció azonos valószinüségü, tehát az optikai tisztaság kialakulására a modell önmagában nem magyarázat. Viszont valamely aszimmetrikus hatás felerősitésében lehetett reális szerepe.

3/ Cirkulárisan poláros fény hatását szintézis és degradativ folyamatokban is igazolták. Problémát jelent azonban, hogy nem sikerült kisérletileg kimérni a Földre érkező fény cirkuláris polarizációját /kisebb mint 0.5 %/.

4/ 1956-ban Lee, Wu és Yang kapott Nobel-dijat a gyengekölcsönhatásokban megnyilvánuló aszimmetria igazolásáért. Már ebben az évben felmerült a kérdés, hogy lehet-e kapcsolat a fizikai és biológiai aszimmetria között. Az első ilyen irányu vizsgálat negativ eredményt hozott /ULBRICHT, 1975/. 1964-ben D- és L-tirozin alkalikus oldatában Sr^{90}-ből kilépő spinpolarizált elektronok aszimmetrikus degradáló hatását irta le Garay András. Több mint egy évig tartó kisérletben több mint 10 %-os különbséget talált a két izomer bomlásában. A nem-természetes D-izomer mennyisége csökkent nagyobb mértékben. Ezt a kisérletet nem ismételték meg eredeti formájában, de leucinon is igazolták /BONNER, 1975a/, hogy a bomlás nagyobb hatáskeresztmetszetü D-izomeren balos spinü elektronokat használva. Nem természetes elektronforrásból kilépő jobbos spinü elektronokkal forditott előjelü eredményt kaptak. Általánosságban az ebben a témában végzett kisérletek bizonytalanok, az eredmények szórása nagy. D L-nátrium-ammónium-tartarát telitett vizes oldatát részlegesen kristályositva béta-bomló P^{32} izotóp jelenlétében a levált anyag optikai aktivitása a bevitt dózis logaritmusával arányosan jelent meg /KOVÁCS, 1979/. Ez a legmegbizhatóbb kisérletsorozat, amelynek eredményei sejteni

Szeged

engedik, hogy a béta-sugárzás képviselte aszimmetriának valóban lehetett evolúciós szerepe az optikai izomerek szelekciójában.

Az evolucióban jelentős polarizált elektronforrásként a K^{40} izotóp müködhetett.

Jelen dolgozat az exobiológia néhány konkrét kérdésének általunk is vizsgált aspektusával foglalkozik.

A természeti törvények érvényesülése az anyagfejlődés során az előző szintekre alapozva uj minőségü, magasabb szintü strukturákat, müködéseket eredményez.

Napjainkban nem áll még ugy a kvantumkémia, hogy az atomi alkotók paramétereit ismerve adott környezeti paramétereket figyelembe véve meghatározhatná az utat, amelyen bonyolult /élő/ strukturák kialakulhatnak. Bizonyos esetekben azonban talán egyszerübb módszerrel is lehet olyan információt kapni, amely a fejlődést meghatározó törvényszerüségek érvényesülése eredményeképpen nem-véletlen tendenciákat mutatnak. Ilyen részismeretek birtokában összeállhat a kép, amelynek alapján az élők kialakulását is megmagyarázhatjuk.

I. fejezet: Aminosavak nem-véletlen eloszlása termális peptidekben és néhány fehérjében /13 - 30 oldal/

* Megvizsgáltuk, hogy a Fox-féle termális peptidek esetében hogyan válik tanulmányozhatóvá a monomerek sajátságaiból következő nem-véletlen eloszlás a kialakuló polimerek szekvenciájában.
* Optikailag aktiv kvarc jelenlétében állitottunk elő termális peptideket DL-aminosavakból, a termékben aszimmetriát remélve.
* 10 különböző fehérje aminosav sorrendjében kerestünk nem-véletlen jellemezőket.

Az anyagi rendszerek aszimmetriája a gyenge kölcsönhatások aszimmetriája miatt a balos kitüntetettség általános. Antianyagot a töltés-paritás kapcsolat miatt jobbos aszimmetria jellemez. Ez azt jelenti, hogy egy izotópból kilépő elektron az energiájától függő mértékben balos perdületü, mig pozitronok esetében a jobbos spinü részecskék aránya nagyobb.

Az előbbi jellemző a következő összefüggést követi:

$$\frac{\sqrt{1 + \left(1 - \left(\frac{1}{1 + \frac{E_k}{E_o}}\right)\right)^2}}{50} = N_+$$

ahol E_k - kinetikus energia, E_o - az elektron nyugalmi energiája /$E_o = m_o c^2 = 0.5117$ MeV/, N_+ - a balos spinü elektronok aránya.

A molekuláris aszimmetria eredetének magyarázatára sok esetben vizsgálták polarizált elemi részek /főként elektronok és pozitronok/ kölcsönhatását optikailag aktiv anyagokkal, vagy racem rendszerekkel. Pozitronannihilációs vizsgálatokban eltérő triplet pozitrónium képzést találtak aminosavak optikai izomerjeire vonatkozóan /a triplet intenzitás D-izomerekben nagyobb, mint L párjaikban/, ami többek között spinpolarizációt jelezhet optikai izomerekben. Ennek elméleti magyarázatára dolgozta ki Hraskó Péter az un. helikális elektrongáz modellt. Bizonyitására optikailag aktiv molekulákba épitettünk béta-bomló Br^{82} izotópot, remélve, hogyha az elmélet helyes, az aszimmetrikus környezet befolyásolja az izotóp bomlási paramétereit.

II. fejezet: Spinpolarizáció optikailag aktiv molekulákban /31 - 35 oldal/

* Vizsgáltuk, hogy optikailag aktiv környezet befolyásolja-e a radioaktiv béta-bomlást.

Optikai izomerek között az aszimmetriát kialakitó hatások közül a cirkulárisan poláros fényé a legtisztább. Ezzel "csak" az a probléma, hogy természetben nem mérhető. Az előbbi "nem mérhető" jelző azt jelenti, hogy a polarizáció kisebb, mint 0.5 %, tehát egyelőre nem kizárható az evolucióban játszott szerepe.

A cirkulárisan poláros fény aszimmetriát okozó hatásának vizsgálatára nagyon jó modellanyag a kámfor /bár közvetlen evolúciós jelentősége nincs/.

III. fejezet: Kámfor fotolizisének vizsgálata /36 - 41 oldal/

* ESR-rel detektáltuk, hogy optikailag aktiv kámfort cirkulárisan poláros fénnyel megvilágitva hogyan alakul az α-kámfoleinaldehidhez vezető gyök koncentrációja.

Az optikai aktivitás meghatározására kidolgozott legérzékenyebb módszerek közül a cirkuláris dikroizmus spektroszkópiát használtuk. Külön fejezetben foglalkozunk egy másik igen érzékeny technika alkalmazásával, amellyel optikai izomerek gázkromatográfiás elválasztása válik lehetővé. Ennek külön előnye, hogy nanogram nagyságrendü anyagmennyiség elegendő az izomerarány meghatározáshoz.

IV. fejezet: Aminosav optikai izomerek elválasztása gázkromatográfiával /42 - 48 oldal/

* N-TFA-aminosav optikai izomereket szeparáltunk két uton: 1. L-mentil-észter formában szimmetrikus, ill. 2. alkil-észter formában aszimmetrikus /diamid/ megosztófázison.

A csak biológiai rendszereket jellemző optikai tisztaság egy felhasználásával foglalkozunk az utolsó önálló fejezetben, az előzőekben ismertetett gázkromatográfiás technikára alapozva.

V. fejezet: Kormeghatározás aminosav racemizációs adatok alapján /49 - 57 oldal/

* Termodinamikailag a racem rendszerek stabilak. Az élők optikailag aktiv alkotói a halál után magukra hagyva szintén racemizálódnak. Ennek ismerete kor- vagy paleotemperature meghatározást tesz lehetővé, vagy - mint ismertetjük - esetleg mindkettőét.

Mivel minden fejezetben megtalálható következtetés, ezért az ÖSSZEFOGLALÁS / 58- 62 oldal/ csak ezek felsorolását tartalmazza, esetleg némi megjegyzéssel együtt.

A dolgozatot az IRODALOMJEGYZÉK zárja /63 - 65 oldal/.

I. AMINOSAVAK NEM-VÉLETLEN ELOSZLÁSA TERMÁLIS PEPTIDEKBEN ÉS NÉHÁNY FEHÉRJÉBEN

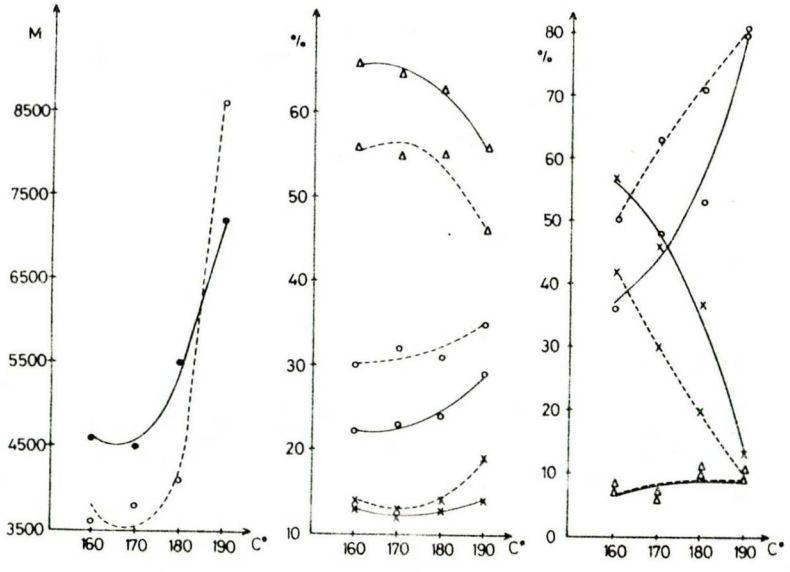
A modellkisérletekben egyszerü molekulákból /pl. CH_4, NH_3, H_2O, H_2S, HCHO, HCN stb./ gyakorlatilag azok a molekulák keletkeznek, amelyek jórészt élőben is előfordulnak és amelyeknek száma jóval kisebb, mint a kiindulási anyagokból levezethető vegyületek száma. Mindez gyakorlatilag független az alkalmazott energiafajtától.

A kémiai evolució a kismolekulák egymáshoz való kapcsolódási hajlama, a keletkező termékek termodinamikai stabilitása, a környezeti tényezők ismeretében elméletileg leirható volna. Természetesen bonyolultabb, összetett rendszerekre vonatkozóan még várat magára a kvantumkémiai értelmezés, de történtek már ilyen vizsgálatok /LOEW, 1975/.

Amennyiben feltételezzük, hogy a kapcsolódás irányitott jellege makromolekulákra is általánositható, nem érdektelen ezzel kapcsolatban is kisérleteket végezni.

Fox és munkatársai találtak nem-véletlen hatásokra utaló adatokat termális peptidekben /FOX, 1960/. Általánosan ezen peptidek preparálása ugy történt, hogy 2:2:1 vagy 1:1:1 arányban kevertek aszparaginsavat,

glutaminsavat és 16 egyéb aminosav ekvimolekuláris keverékét, majd ezt néhány órán keresztül magas hőmérsékleten tartották /160-190 °C/. A kihült olvadék vizes oldatát néhány napig dializálták, tisztitás céljából. Ilyen tipusu termális peptidekre kapott adatokat ábrázolva /1. ábra/ - a görbeillesztéseket a legkisebb négyzetek módszerével végezve -, a következőket állapithatjuk meg:



a./ b./ c./

1. ábra

a./ Molekulasuly átlagok a hőmérséklet függvényében
b./ Aminosav összetétel az össz peptid mennyiségre vonatkoztatva
c./ Az N-terminális aminosavak megoszlása

——— 2:2:1
----- 1:1:1 glutaminsav:aszparaginsav:16 egyéb
Δ aszparaginsav o glutaminsav x egyéb aminosav

a./ A polimerek átlagos molekulasulyának hőmérsékleti függvénye 170 ^{o}C körüli hőmérsékleten minimumon megy át.

b./ Emelkedő hőmérséklettel nő a peptidbe épülő glutaminsav mennyisége az aszparaginsav rovására. Egyéb aminosavak növekvő beépülési aránya csak 190 ^{o}C körül számottevő mértékü és ez a növekedés is az aszparaginsav ellenében mutatkozik.

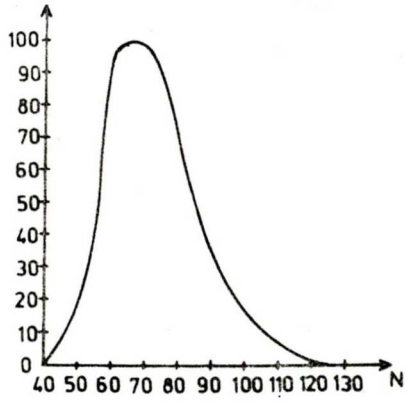
c./ Az aszparaginsav aránya N-terminális helyzetben nem változik számottevően a hőmérséklettel. Növekvő hőmérséklet a glutaminsav arányát növeli ebben a pozicióban, az egyéb aminosavakkal szemben.

Szekvenciavizsgálat alapvető feltétele a peptid vagy fehérje homogenitása, vagyis, hogy a vizsgált anyagban minden molekula azonos sorrendben tartalmazza az aminosavakat. Természetesen ez nem teljesül a termális peptidekre, melyek mint izomerek bonyolult keverékei jönnek létre. Azonban speciális esetekben a belső strukturáról is szerezhető információ.

A tripszin a lizin vagy arginin menti peptidkötéseket hasitja. Modellrendszerünkben erre épitve polimerizáltattunk két aminosavat, glutaminsavat és lizint, 1:1 arányban, 170 ^{o}C-on 3 órán keresztül, N_2 atmoszférában. 2g polimert 5 ml vizben oldottunk, majd a tisztitást Sephadex G-10-es oszlopon végeztük, ami

József Attila Tudományegyetem Könyvtára SZEGED

után az anyagot liofilizáltuk. A molekulasuly-meghatározás Sephadex G-50 oszlopon történt inzulin és lizozim standardra vonatkozóan /pH = 8.33/. Három független kisérletből 9640 ± 120 molekulasuly átlagot határoztunk meg. Az eloszlási görbe a 2. ábrán látható.



2. ábra

Az aminosav tagszám eloszlása lizin:glutaminsav = 1:1 arányu termális peptidben, Sephadex G-50-en történő molekulasuly meghatározás alapján. /Polimerizáció: 170 °C, 3 óra, N_2 atmoszféra; N - aminosavtagszám, Y-tengelyen a maximumra normált előfordulás/.

A polimerbe épült aminosav arányt sósavas hidrolizissel, majd ezt követően ioncserélő réteg-kromatográfiával, Fixion 50 x 8 rétegen a hibahatáron belül 1:1-nek határoztuk meg.

A tripszines hidrolizis során 10 mg peptidet oldottunk 1 ml 0.1 M ammóniumhidrokarbonát oldatban, majd ehhez 0.5 mg tripszint adva 3 órán keresztül inkubáltuk az elegyet 37 °C-on. Ezután ujabb 0.5 mg

tripszint adtunk a rendszerhez és további 1 órán át tartottuk az oldatot 37 °C-on. Ezt követően triklór-ecetsavval csaptuk ki a tripszint, majd szürtük az oldatot. A hasitási termékek elválasztása Fixion 50 x 8 ioncserélő rétegen történt.

Ekvilibráló oldat:

14.1 g citromsav /H O/
8.0 g NaOH
12.3 ml HCl /d = 1.19/
vizzel feltöltendő
1000 ml-re

Eluáló oldat:

14.1 g citromsav /H O/
8.0 g NaOH
8.4 ml HCl /d = 1.19/
35.0 g NaCl
vizzel feltöltendő
1000 ml-re
pH = 4.25 c_{Na^+} = 0.8 N

A futtatás 15-18 cm magasságig történt, szobahőmérsékleten. Az előhivást ninhidrinnel végeztük /105 °C, 10 perc/.

A kapott foltok azonositása a következő megfontolások alapján történt:

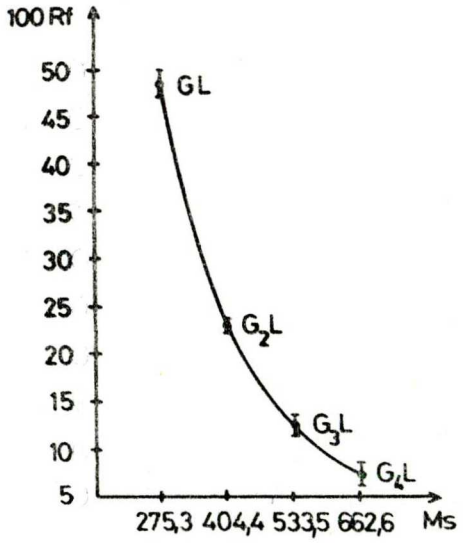
1./ Szabad glutaminsavra és lizinre ioncserés hatások érvényesülnek /Rf_{glu} = 0.66, Rf_{lys} = 0.32/.

2./ A glu-lys dipeptidre az Rf érték 0.49 körül várható ((Rf_{glu} + Rf_{lys})/2).

3./ A tripszin specifitásának megfelelően a hasitási peptidek olyan homológok, amelyek $glu_i lys$ /i = 0, 1, 2, 3, .../ formulával irhatók le. Ennek megfelelően a molekulasuly - Rf összefüggésnek exponenciálisnak kell lenni. A 3. ábra szerint a mért Rf értékekre és valószinü molekulasulyokra teljesül ez a feltétel /100 Rf = 93.528 exp -0.6722i ; r = 0.998/.

3. ábra

Triptikus hasitási termékek elválasztása Fixion 50 x 8 ioncserélő rétegen szolgáltatta az Rf értékeket. A vizszintes tengelyen a feltételezett komponensek molekulasulyai szerepelnek.
G: glutaminsav
L: lizin



Mivel a Fixion 50 x 8 rétegekben nagymértékben térhálósitott kationcserélőt használnak, nem alkalmas 5-6-nál nagyobb tagszámu peptidek elválasztására. Fixion 50 x 2 rétegen igazoltuk, hogy termális peptidek tripszines hidrolizátuma nem tartalmaz kimutatható mennyiségben 5-ösnél nagyobb tagszámu hasitási terméket.

Ha teljesen véletlenszerüen állnak össze a monomerek a polimer képzéskor, akkor a következő eloszlást kellene kapni tripszines hidrolizis után:

$$p\{L\} = 0.5$$

$$p\{G^i\} = \frac{r_i}{2^{i-1}(i+1)} + \frac{1}{2^i} \sum_{N=i+1}^{\infty} \frac{r_N}{N+1}$$

, r_i = (i+1) hosszúságu polimerek részaránya

$$p\{G^iL\} = \frac{1}{2^{i+1}} \sum_{N=i+1}^{\infty} r_N\left(1 - \frac{i}{N+1}\right), \qquad i = 1, 2, \ldots$$

Peptid	Elméleti arány*	Talált arány*
L	0.257	0.255
GL	0.255	0.482
G^2L	0.189	0.184
G^3L	0.124	0.060
G^4L	0.076	0.020
G	0.004	---

*tömeg arány

Mivel a kiindulási anyagokat ellentétes jellemünek választottuk /glutaminsav: monoamino-dikarbonsav, lizin: diamino-monokarbonsav/, egymáshoz való nagymértékü affinitásuk értelmezhető. Ennek megfelelően kapható a tripszines hasitási termékek között csaknem 50 %-os arányban glu-lys dipeptid.

Ez a módszer bonyolultabb, 3 esetleg 4 komponensü rendszerek analizisére is alkalmas, illetve más enzimek felhasználásával még szélesebb körben is használható. Hasonló kisérletek alapján evolueiós szempontból információkat kaphatunk az aminosav-aminosav kapcsolódások irányitott jellegére vonatkozóan.

Racem aminosavak antipódjainak aszimmetrikus adszorpcióját figyelték meg vizmentes szerves oldószerből /piridin/ optikailag aktiv kvarcot, mint abszorbenst alkalmazva /BONNER, 1975b/. Ugyanezek a kisérletek vizes oldatból negativ eredményt hoztak, tehát a D- és L-izomerek azonos arányban adszorbeálódtak.

Bizonyos agyagásványok /Na-montmorillonit/ optikailag aktivak lévén elvileg szintén számitásba jöhettek a szerves rendszerek evolueiójában, amikor az optikai tisztaság kialakult. Azonban az ezeken végzett szintézisek nem mutattak sztereoszelektivitást aminosavakat illetően /SHIMOYAMA, 1978/. Sőt a Na-montmorillonit racemizációt gyorsitó hatását is leirták /cf. AKIYAMA, 1978/. Meg kell emliteni, hogy Akiyama kisérletei szerint vizmentes körülmények között az L-izoleucin stabilizálódik Na-montmorillonitra adszorbeáltatva. A csökkent racemizációs sebességi

állandó miatt /$10^{-13}h^{-1}$, 20 ^{o}C/ lehetőséget lát arra, hogy prekambriumi kőzetekben/ből/ kimutatható, optikai aktivitást jelző racemizációs arányok prekambriumi eredetüek, tehát nem szennyeződések okozták. Egyébként 2 milliárd éven tul már csak egyensulyba jutott rendszereket találhatnánk.

10 független cikk alapján /FRONDEL, 1962/, több mint 16800 /amerikai, európai, ázsiai eredetü/ kvarc egykristályt véletlenszerüen véve 1 %-kal gyakoribbnak találták a balos kvarc kristályokat. Tény, hogy ez az eredmény nem áll ki szigoru statisztikai próbát, - eszerint a differencia nem szignifikáns-, de feltétlenül megemlitendő: minden cikkben /külön-külön/ balos kristályokat irtak le többségben. Eszerint alacsonyabb értékü ellenőrzés /pl. előjel teszt/ alapján a különbség nem véletlen eredetü.

Az eddig végzett kisérletek tanusága szerint az optikailag aktiv ásványi templátok /legalábbis aminosavakat illetően/, mint evolueiós aszimmetria források nem jöhettek számitásba, mivel ezek a folyamatok vizes közegben folytak.

Ha azonban elfogadjuk a Fox-féle termális peptidek evolueiós létjogosultságát, akkor ebben a rendszerben /magas hőmérséklet, vizmentes környezet/ nem kizárt az optikailag aktiv ásványok aszimmetria okozó szerepe.

Glicint és DL-lizint polimerizáltattunk balos és jobbos kvarc felületén, illetve kontrollképpen kvarc nélkül. Körülmények: D- és L-lizin HCl /Fluka, CHR/ 3-3 g-ját oldottuk 8 ml vizben, majd kb. 50 %-át kikristályositottuk. Továbbiakban a levált DL-lizin 75 mg-ját kevertük 25 mg glicinnel és 100 mg optikailag aktiv kvarcporral, illetve a kontroll kisérletben ez utóbbi nélkül. A mintákat N_2 atmoszférában ampullázztuk és 5 órán keresztül hőkezeltük 190 ^{o}C-on. A gyantaszerü anyagok vizben való oldása után szürés, majd Sephadex G-10-en gélszürés következett, ahol a fronttal érkező nagy molekuláju polimereket gyüjtöttük. A mintákat UV-abszorpció és cirkuláris dikroizmus alapján kivántuk jellemezni. Az abszorpció ellenőrzés UNICAM SP 1800 spektrofotométeren, a CD mérés JASCO gyártmányu J-40c tipusu cirkuláris dikroizmus spektrométeren történt /érz. 0.5 m^{o}/cm, rés szél. 2 nm, időáll. 16 sec/. A CD mérésben a jel/zaj viszony optimalizálása céljából ugy higitottuk a mintákat, hogy az abszorpciós spektrum alapján kiválasztott 222 nm-es hullámhosszon, 1 mm-es küvettában 0.8 körüli legyen az abszorpció. Azért, hogy a koncentráció abszolut ismeretére ne legyen szükség a generálódott optikai aktivitást a Kuhn-féle anizotrópia faktorral /g/ szerettük volna megadni /$g = \Delta\varepsilon/\varepsilon$, ahol $\Delta\varepsilon$ a cirkulárisan poláros fényre vonat-

koztatott abszorpció differencia $\Delta\varepsilon = \varepsilon_{bal} - \varepsilon_{jobb}$, ε a polarizálatlan abszorpciót jelzi/. Az adott kisérleti körülmények között $g \geq 7.5 \times 10^{-7}$ lett volna jól mérhető. A kontroll minták $2(1) \times 10^{-7}$, az optikailag tiszta kvarcon kristályositott minták $7(17) \times 10^{-8}$ illetve $3(14) \times 10^{-8}$ értéket adtak az anizotrópia faktorra. Tehát ebben az irodalmilag elfogadott evolueiós modellrendszerben sem lehet kimutatni optikailag aktiv kvarcok aszimmetria okozó szerepét.

A másik megközelitési mód, a cimben jelzettek vizsgálatára, hogy a már ismert aminosavsorrendü enzimek, fehérjék szer kezetében keresünk általános összefüggéseket.

Aminosav-párok eloszlásáról fehérjékben már jelentek meg dolgozatok /HOPFINGER, 1972; PTITSYN, 1969; FINKELSTEIN, 1971/. Hopfinger definiált egy un. szerkezeti faktort /S/, amely mértéke aminosav-párokra vonatkozóan a véletlen alapon várható eloszlástól való eltérésnek. Adott X aminosavra az X-Y pár megtalálásának valószinüsége:

$$P(X\text{-}Y/X) = \frac{N(X\text{-}Y)}{\sum_i N(X\text{-}A_i)}$$

A kifejezésben $N(X\text{-}Y)$ a talált X-Y párok száma, $\sum N(X\text{-}A_i)$ az összes aminosav-párok száma, amiben X baloldali.

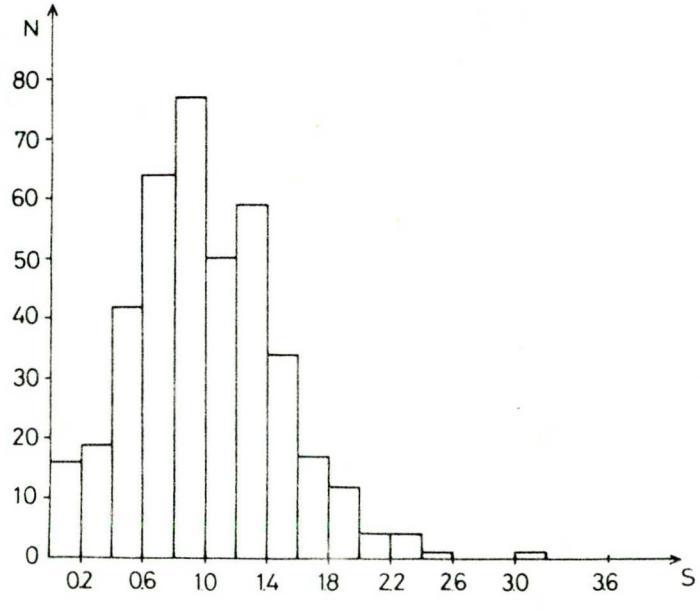
Y aminosav megtalálásának valószinüsége véletlen alapon:

$$P(Y) = \frac{N(Y)}{\sum_i N(A_i)}.$$

N(Y) az összes Y aminosav száma a mintában, $\sum N(A_i)$ az összes aminosav száma. A hányados mértéke a véletlen eloszlástól való eltérésnek:

$$S(X\text{-}Y/X) = \frac{P(X\text{-}Y/X)}{P(Y)}.$$

Hopfinger számos fehérjét és peptidet vizsgált meg az előbbi formula alapján a közvetlen szomszédokra. A közölt eloszlás a 4. ábrán látható.



4. ábra

Aminosav-párok eloszlása nagyszámu fehérjére és peptidre vonatkozóan /HOPFINGER, 1972/

József Attila Tudományegyetem Könyvtára SZEGED

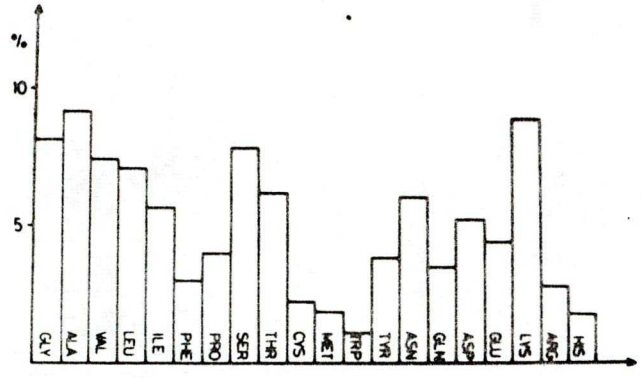
Problémát jelenthet, hogy a vizsgálat szekvenciák válogatás nélkül kerültek feldolgozásra, igy enzimek /azonosak is különböző fajokból, pl. 18 citokróm/, peptidhormonok, egyéb fehérjék.

Érdekesnek tartottuk megvizsgálni, hogy enzimműködésre specializálódott fehérjékben milyen eloszlás adódik, ha nemcsak a közvetlen szomszédokat nézzük, hanem távolabbi párok között is keresünk összefüggést.

10 enzimet vizsgáltunk meg, melyek szekvenciáját a CRC /The Chemical Rubber Co./ "Handbook of Biochemistry, Selected Data for Molecular Biology" c. könyvének második kiadásából vettük át /1970/. Ezek a következők voltak:

citokróm c /ember, csimpánz/,
kimotripszinogén /szarvasmarha/ A
gliceraldehid-3-foszfát-dehidrogenáz /sertés/
lizozim /T_4 fág/
nukleáz /Staphylococcus aureus V8/
penillináz /Staphylococcus aureus PC1/
ribunukleáz /szarvasmarha pancreas/
ribunukleáz T_1
tripszinogén /szarvasmarha/
triptofán-szintetáz, A protein /E. coli/

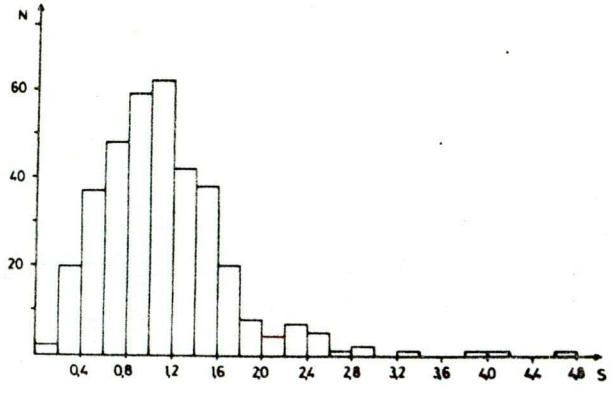
Az összes aminosav száma 1974-nek adódott, az egyes aminosavak előfordulási arányát az alábbi hisztogram mutatja /5. ábra/.



5. ábra

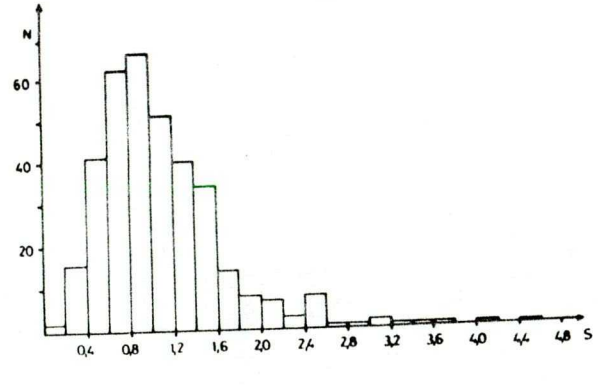
10 enzim 1974 aminosavának eloszlása az aminosavak minősége szerint

Az alábbiakban azok az ábrák láthatók, amelyeken az S(X-Y/X) eloszlását tüntettük fel, ugy,hogy változtattuk a párok közötti távolságot. Ezt jelöltük az ábrák mellett /6. ábra/.



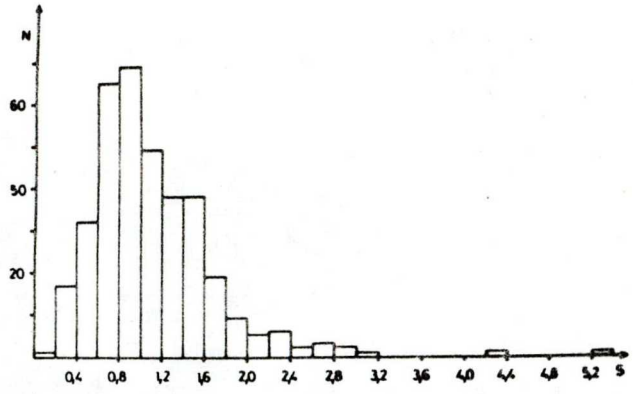
6/a. ábra

1-2



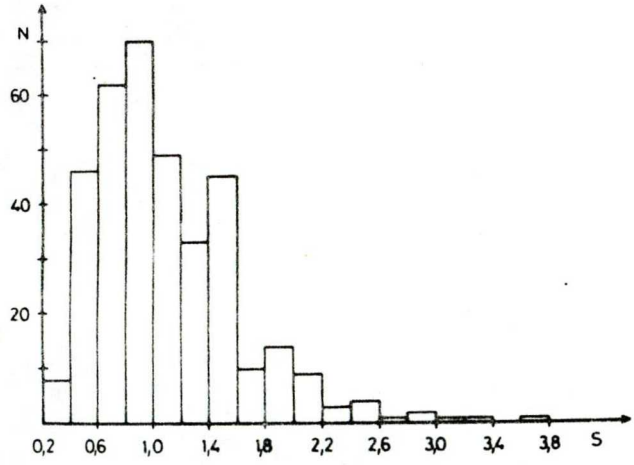
6/b. ábra

1-3



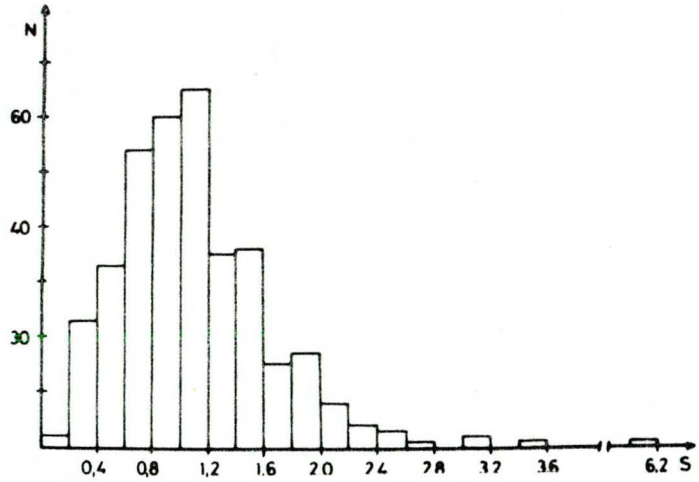
6/c. ábra

1-4



6/d. ábra

1-5



6/e. ábra

1-6

Finkelstein és munkatársai csoportositását elfogadva megvizsgáltuk többek között azt, hogy milyen arányban fordulnak elő potenciálisan helikális részek a szerkezetben. Ez a csoportositás a következő:

helikális aminosavak: ala, glu, his, leu
anti-helikális aminosavak: asn,cys, gly, pro, ser, tyr
neutrális aminosavak: arg, asp, gln, ile, lys, met, phe, thr, trp, val

Azzal a feltétellel, hogy helikális egy szakasz fehérjén belül, ha minimum három kifejezetten helikálisnak mondott aminosav és maximum két neutrális aminosav képzi a kérdéses peptidrészletet, a helikális szakaszok aránya 7.35 %. A helikális aminosavak össz előfordulásának mintegy negyedében állapitható meg, hogy helikális szakaszban találhatók.

Következtetések:

* Közvetlen szomszédok közül legnagyobb "affinitásu" párok:

his-phe, trp-trp, trp-gly, arg-trp, his-met, ser-trp, met-phe, gln-cys, arg-gln, his-glu, his-cys, phe-arg, trp-tyr, leu-met

* Nem fordulnak elő:

val-trp, leu-cys, leu-tyr, phe-phe, phe-pro, phe-met, phe-trp, pro-cys, pro-arg, ser-his, cys-ile, cys-cys, cys-trp, met-pro, met-cys, met-trp, met-arg, met-his, trp-ala, trp-leu, trp-phe, trp-cys, trp-met, trp-asn, trp-glu, trp-lys, trp-his, tyr-phe, tyr-trp, tyr-arg, his-gln, his-arg, his-his

Sok esetben sztérikus okokkal magyarázható, hogy meglehetősen nagy az elő nem forduló aminosavpárok száma, de ez nem általánositható minden esetre. Vegyük alapul az alábbi csoportositást:

Negativan töltött aminosavak /N/: asp, glu
Pozitivan töltött aminosavak /P/: arg, his, lys
Dipólus jellegü aminosavak /D/: asn, gln, ser, thr
Dipól-hidrofób jellegü aminosavak /Dh/: cys, met, trp, tyr
Rövid láncu alifás aminosavak /a/: ala, gly
Hosszu láncu alifás aminosavak /A/: ile, leu, phe, val

33 esetből 24 % került ki az A-Dh ill. Dh-A csoportból, 21 % a Dh-Dh csoportból, 15 % a Dh-P csoportból. A nagy affinitásu párokra nem mutatkozik kiugró érték az előbbi csoportositásban.

Általánosságban megfigyelhető összefüggések, az előző csoportositásnak megfelelően:

S < 0.8	S > 1.2
N-Dh	N-a
P-D	P-N
P-a	P-Dh
D-A	P-A
A-a	D-Dh

Nem szabad megfeledkezni az aminosavakra vonatkozó genetikai háttérről sem, mivel még korántsem eldöntött kérdés, hogy a nukleinsavak elsődlegesek, vagy a fehérjék, esetleg valamilyen módon kapcsolva alakultak ki az első elemi rendszerek. Tervezzük megvizsgálni, hogy az adott fehérjékre visszairható genetikai kódban meg vannak-e a fentiekkel összefüggésbe hozható nem-véletlen tendenciák /a kód degenáltságból eredően ez nem következik egyértelmüen/.

II. SPINPOLARIZÁCIÓ OPTIKAILAG AKTIV MOLEKULÁKBAN

Pozitron annihilációs vizsgálatokban aminosav optikai izomerekre azt találták, hogy a triplet pozitrónium képzés valószinüsége a D-izomerekben nagyobb, mint párjaikban /GARAY, 1974/. Szinglet pozitróniumban a pozitron - elektron spinek antiparallel, triplet pozitróniumban pedig parallel állnak. Mivel a pozitronok /a paritás-sértés miatt/ mozgásiránnyal párhuzamosan spinpolarizáltak, a fentiek alapján eltérő spinmegoszlás várható a D-, illetve L-izomerekben.

Az előzőek elméleti magyarázatára Hraskó Péter dolgozta ki az un. helikális elektrongáz modellt /HRASKÓ, 1973/, mely szerint

$$n_+ - n_- = \frac{mwc}{\pi\hbar} (3\pi^2 n)^{2/3}, \text{ ahol}$$

$[n_+]=[n_-]=[n]$ $1/cm^3$

$n_+ + n_- = n$ = totális elektronsürüség

[m] g /elektron tömeg/

$c = 3 \cdot 10^{10}$ cm/sec

n_+ = a pozitiv helicitásu elektronok sürüsége /mozgásiránnyal párhuzamos spin állás/

[w] dimenzió nélkül, az optikai antipódok közötti különbséget jellemzi

n_- = a negativ helicitásu elektronok sürüsége /mozgásirányhoz képest antiparalle spin állás/

[$\hbar$] gcm^2/sec

$$\left(\frac{mc}{\pi\hbar} = 1.294952 \cdot 10^{10}\right),$$

$$w\ F/x/ = \frac{k_1 - k_2}{2k_o}\ , \text{ ahol}$$

k_1 és k_2 optikai antipódokba ágyazott béta-bomló izotóp bomlási állandói

k_o bomlási állandó ugyanerre az izotópra, szimmetrikus környezetben

F/x/: függvény, amely az izotópból kilépő elektronok energiájából eredő eltérést hivatott kompenzálni. Számitott értéke néhány izotópra:

Izotóp	E_{max}/MeV/	F/x/
^{3}H	0.018	63671.340
^{14}C	0.156	871.931
^{32}P	1.710	15.425
^{35}S	0.167	763.618
^{82}Br	0.450	119.472
^{131}I	0.608	71.165

Abban az izomerben, amelyben a bomlási állandó nagyobb értéknek adódik /k_1/, mint a másik izomerben /k_2/, a pozitiv helicitásu elektronok sürüsége nagyobb, mint a negativ helicitásu elektronoké /w>0/.

Kisérleteket végeztünk w értékének becslésére /SOÓS, 1976 a/.Béta-bomló ^{82}Br izotópot épitettünk optikailag aktiv molekulákba, majd meghatároztuk a bomlási valószinüséget ezekben a vegyületekben és kristályos KBr-ban.

/+/-p-bróm-α-feniletilamin

/-/-p-bróm-α-feniletilamin

A Norse gyártmányu anyagokat vákum desztillálással tisztitottuk. A ^{82}Br beépitése heterogén izotópcserével történt.

3,5-dibróm-L-tirozin

3,5-dibróm-D-tirozin

Merck gyártmányu L- és D-tirozinból állitottuk elő a fenti anyagokat direkt brómozással. A ^{82}Br beépülést Fixion 50 x 8 ioncserélő rétegen radiokromatográfiával ellenőriztük. /Halogénezett tirozin származékok elválasztására ekvilibrálás nélkül alkalmas a következő puffer: citromsav = 14.1 g, NaCl = 14.0 g, NaOH = 8.0 g, cc.HCl = 4.0 ml, végtérfogat = 1 l/.

$K^{82}Br$

A fenti formában szállitotta az Izotóp Intézet.

A minták tisztaságát UV-abszorpció és CD mérésekkel is ellenőriztük.

József Attila Tudományegyetem Könyvtára SZEGED

A bomlási valószinüség meghatározása Philips gyártmányu γ-spektrométerrel történt, a ^{82}Br elektron kibocsátását követő γ foton detektálása alapján. A spektrométer 40 mintahelyes automatikus mintaváltóval volt kapcsolva. Ezekben helyeztük el szimmetrikusan 2 γ-sugárzó standardot, 6 K^{82}Br mintát, az antipódokból pedig 3-3 mintát, erre a célra kialakitott légmentesen záró teflon mintatartóban. A ^{82}Br által kibocsátott γ fotont Berthold gyártmányu NaI/Tl/ szcintillációs detektor érzékelte.

A mérési adatokra a háttér korrekció után exponenciális görbét illesztettünk a legkisebb négyzetek módszerével. A bomlási állandókat és az ezekből számitható w értékeket az alábbi táblázatban foglaljuk össze:

I. Táblázat

Átlagos bomlási állandó és w értékek különböző optikai izomerekben

Minta	Bomlási állandó k /10^{-9}sec^{-1}/	w /10^{-6}/
/+/-p-^{82}Br-α-feniletilamin	5425 ± 4	7 ± 4
/-/-p-^{82}Br-α-feniletilamin	5416 ± 4	
3,5-di-^{82}Br-L-tirozin	5424 ± 4	6 ± 4
3,5-di-^{82}Br-D-tirozin	5416 ± 4	
K^{82}Br	5408 ± 4	

Kristályos $K^{82}Br$-ban a ^{82}Br felezési idejét 35.61 $\pm$ 0.02 órának határoztuk meg.

A kisérleti eredmények értékelése alapján w felső értékére tudunk becslést adni: $w \leq 1.5 \cdot 10^{-5}$.

A p-bróm-feniletilaminban a vegyérték elektronok száma 45.

$n = 1.364 \cdot 10^{24}\ e^-/cm^3$ Molekula térfogat = 33 $Å^3$

$n_+ - n_- = 2.229 \cdot 10^{22}\ e^-/cm^3$ $w \leq 1.5 \cdot 10^{-5}$

$n_+ = 7.047 \cdot 10^{23}\ e^-/cm^3$ 51.68 %

$\Delta \leq 3.36$ %

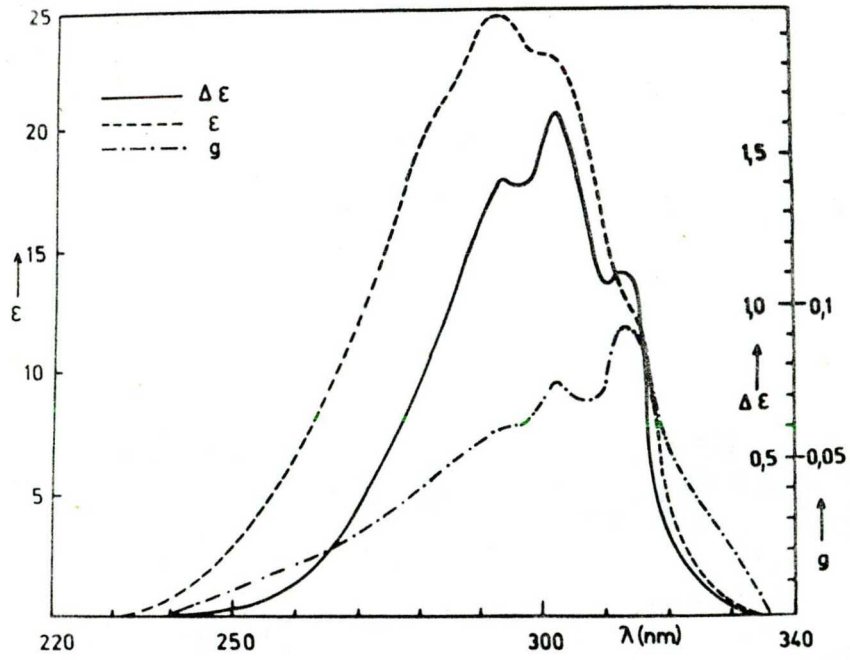
$n_- = 6.590 \cdot 10^{23}\ e^-/cm^3$ 48.32 %

Következésképpen, ha optikailag aktiv molekulákban van spinpolarizáció, akkor ennek mértéke ≤ 3.36 %.

III. KÁMFOR FOTOLIZISÉNEK VIZSGÁLATA

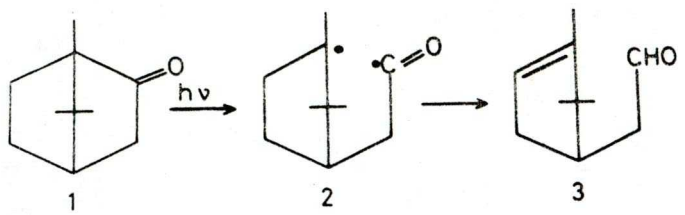
Valószinü, hogy a kémiai evolució 1.5 milliárd éve alatt felhalmozódott nagy mennyiségü szerves anyagban az optikai izomerek aránya 1:1 volt. Elsődleges aszimmetria faktor lehetett többek között a radioaktiv β-bomlásból származó elektronok gyengekölcsönhatásból eredő spinpolarizációja, vagy a cirkulárisan poláros fény. Ez utóbbi hatásának vizsgálatára optimális modell anyagnak tünik a kámfor, elsősorban az optikailag tiszta forma nagy optikai aktivitása miatt.

Ha a /+/-kámfor spektroszkópiai sajátságait vizsgáljuk /7. ábra/, megállapitható, hogy az UV-abszorpciós és CD-spektrumból számitható anizotrópia faktor ($g = \Delta\varepsilon/\varepsilon$) 317 nm-nél éri el maximumát 0.09 értékkel.



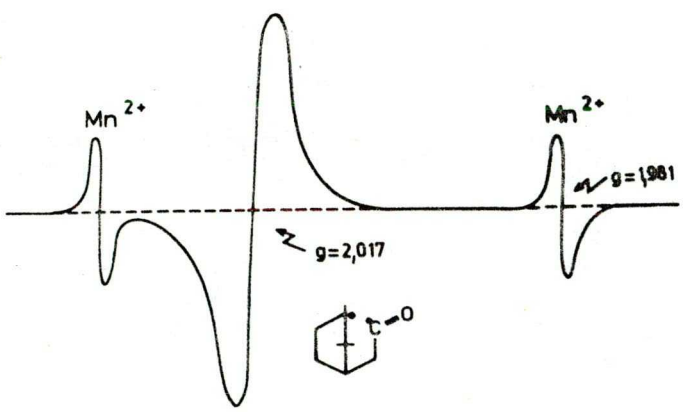
7. ábra A /+/-kámfor spektroszkópiai tulajdonságai

A kámfort 317 nm körül megvilágitva a fotolizis primer terméke az α-kámfoleinaldehid, amely egy ESR-rel kimutatható gyök terméken keresztül jön létre, az alábbi sémának megfelelően:



1: kámfor 2: átmeneti gyök 3: α-kámfoleinaldehid

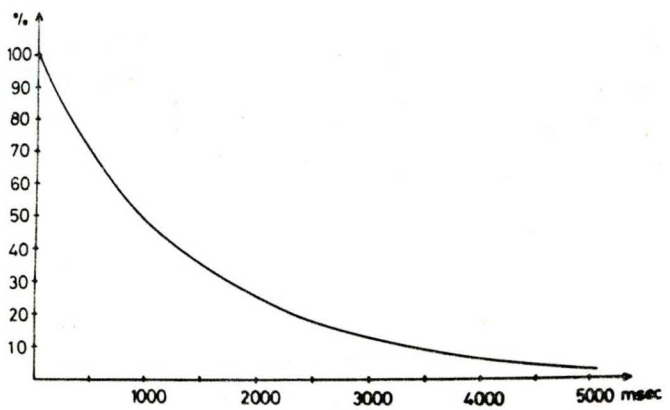
A 2 jelzetü gyök ESR spektruma a 8. ábrán látható /a Mn^{2+} vonalakat standardként használtuk/.



8. ábra

A kámfor fotolizisekor mérhető ESR jel
/c = 2 %, n - hexán/

Az analóg ESR jelet ICA 70 sokcsatornás analizátorba vezetve, a fotolizis során keletkező gyökökre 990 msec felezési időt határoztunk meg /9. ábra/.



9. ábra

A gyök élettartam mérés során
kapott adatokra illesztett exponenciális görbe

Osram gyártmányu 500 W-os xenon-lámpa fényét Glan-prizmán, majd 290 nm-re készült $\lambda/4$ lemezen vezettük át. A Glan-prizmát elforditva állitottunk elő balra illetve jobbra cirkulárisan poláros fényt. A polarizációfokot egy második Glan-prizma körbeforgatásakor mérhető fényintenzitás maximum és minimum alapján 90 %-nak határoztuk. Abszolut intenzitást nem határoztunk meg, de vigyáztunk arra, hogy a fotolitikus produktummal /gyök/ ne kerüljünk telitésbe. Ellenőriztük, hogy a balos illetve jobbos cirkulárisan poláros fény

azonos intenzitásu volt az ESR rezonátorban. A minta: 0.3 % Fluka gym. /+/-kámfor, purum, n-hexánban, kvarc-csőbe zárva. A derivált ESR abszorpció pozitiv csucsán figyeltük a megvilágitó fény polaritás váltására bekövetkező abszorpció differenciát. 15 %-os különbség adódott a mérések átlagában /SOÓS, 1976b/. Ez jelzi, hogy egy ilyen nagy optikai aktivitásu anyag esetében is, mint a kámfor, a kémiai evolució idején ható fény legalább 0.3 %-os cirkuláris polarizációját feltételezve maximum 0.05 % különbség mutatkozhatott a közvetlen terméket figyelve.

Néhány szóban a természetes fény esetleges cirkuláris polarizációjáról: Adott n törésmutatóju közegre Brewster szögben /tg n/ eső fény lineárisan polarizálódik. A lineáris polarizáció elliptikussá válhat a lineárisan polarizált fény reflexiójakor, rendezett csillagközi poron való Mie szórással, Faraday-effektus, vagy mágneses cirkuláris dikroizmus révén. Mörtberg /MÖRTBERG, 1971/ szerint a földmágneses tér indukálta Faraday-effektus lehetséges forrása a cirkulárisan poláros fénynek. Az egyenlitő hajlása és a Föld Nap körüli pályájának ellipticitása miatt a két félteke ebből a szempontból nem azonos és az északi illetve déli féltekén mérhető /feltételezhető/ ellentétes előjelü

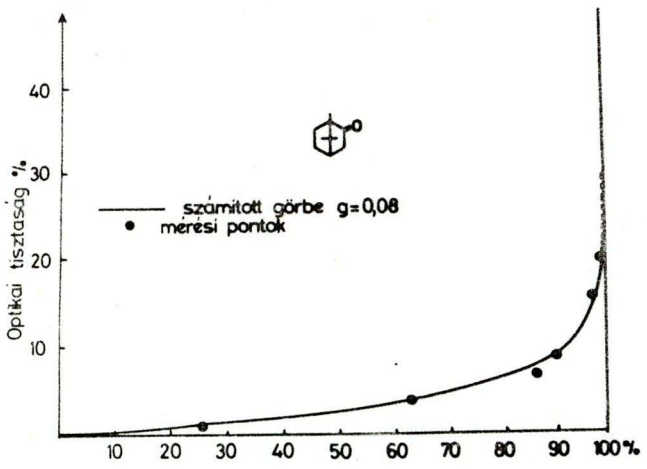
cirkuláris polárosság abszolut értékben nem azonos mértékü, tehát nem egyenlitődik ki. A földmágneses tér ismételt polaritás váltásai miatt a Mörtberg hipotézisnek idő korlátai vannak. Nem tudott, hogy a Nap mágneses tere hasonló polaritásváltásokat mutatott volna, ezért munkahipotézisként elfogadható a napatmoszférában Faraday-effektus által produkált cirkuláris polarizáció. Lineáris polarizációt sok esetben detektáltak, cirkuláris polarizáció kimérése azonban eddig nem sikerült különböző kisérleti nehézségek miatt. Egyedül Martin /MARTIN, 1972/ jelzett a Rák-ködben mérhető mértékü cirkuláris polarizációt.

A prebiológiai evolucióban jelentős kismolekulák optikai aktivitása általában jóval kisebb a kámforénál, tehát a cirkulárisan poláros fény hatása miatti különbség is kisebb lehetett, ezenkivül fontos tényezőként emlitendő a Napból rendelkezésre álló fény spektrális összetétele, intenzitás eloszlása az adott kismolekulák abszorpciós sajátságait, fotolizisre való hajlamát figyelembe véve.

Összességében ugy tünik, hogy a cirkulárisan poláros fény és a radioaktiv béta-bomlás jelentette aszimmetria közül a prebiológiai evolucióban az utóbbi nagyobb eséllyel lehetett valódi aszimmetria forrása.

Kámforra vonatkozóan fotodestrukciós vizsgálatokat Kagan és munkatársai végeztek /BALAVOINE, 1974/.

A racem kámfort cirkulárisan poláros fénnyel megvilágitva a lebomlás hatáskeresztmetszete a két izomerre eltérő értékü, és ennek megfelelően a maradékban növekvő optikai aktivitás figyelhető meg. 99 %-os lebomlásnál a maradék optikai aktivitása 20 %-a az optikailag tiszta anyagénak /10. ábra/.



10. ábra

Racem kámfor fotolizise cirkulárisan poláros fénnyel. Az optikai tisztaság alakulása a maradékban, a %-os lebomlás függvényében.

Bár a cirkulárisan poláros fény szelektiv hatása degradativ folyamatokban a legnagyobb, megemlitem, hogy szintézis során is igazolták optikai aktivitást indukáló hatását /BERNSTEIN, 1972/, ujabban pedig aminosavakra vonatkozóan mutatták ki a cirkulárisan poláros fény fotorezolueiós szerepét /NORDÉN, 1977/.

IV. AMINOSAV OPTIKAI IZOMEREK ELVÁLASZTÁSA GÁZKROMATOGRÁFIÁVAL

Két lehetőség van a cimben jelzett feladat megoldására /GIL-AV, 1975/:

/1/ Aszimmetrikus reagenssel teszünk különbséget a D- és L-izomer között. Ekkor az elválasztás optikailag inaktiv töltetü oszlopon történik.

/2/ Optikailag aktiv oszloptöltet alkalmazása leegyszerüsiti az anyagelőkészitést és pontosabbá teszi az elválasztást.

Általánosságban N-trifluoracetil-aminosav-észter származékok kerülnek oszlopra. Az /1/ pontban ismertetettek szerint az észter valamely optikailag aktiv alkohollal képzett terméket jelent /pl. 2-butil-, 2-oktil--észtert/, mig a /2/ ponthoz történő származékképzéshez egyszerü alkoholok /pl. metil-, n-butil- vagy i-propilalkohol/ használhatók.

Alifás aminosavak /alanin, leucin, valin/ optikai izomerjeit jó hatásfokkal választottuk el /II. Táblázat, 11. ábra/ szimmetrikus oszlopon, L-mentil--észterek formájában /TAI, 1976/.

Aminosavra számitva 50-szeres feleslegben melegitettünk 120 ^{o}C-on L-mentolt, 1.5 órán keresztül

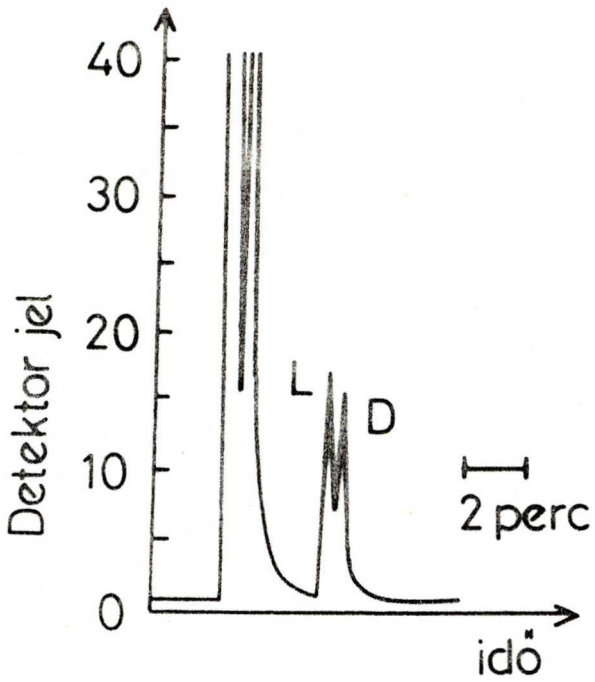
száraz sósav-gáz atmoszférában. A rendszert 110 ^{o}C-ra hütve, 20 Hgmm-en távolitottuk el a visszamaradt mentolt, majd szobahőmérsékleten, a kiindulási aminosav mennyiségre számitva, 20-szoros feleslegben adtunk trifluorecetsavanhidridet az aminosav-L-mentilészter származékhoz. Az acetileződés néhány perc alatt végbement.

1 nmol aminosav még izomerjeire választható ezzel a technikával. /Oszlophossz: 160 cm, hordozó: Gas Chrom P 100-120 mesh, megosztó fázis: 15 % EGSSX, hőmérséklet: 180 ^{o}C, vivőgáz-nyomás: 1 atm., detektor: H_2 lángionizációs detektor/.

II. Táblázat

N-trifluoracetil-DL-aminosav-L-mentil-észterek enantiomerjeinek elválasztása

Aminosav		Retenciós idő /perc/	$r_{L/D}$
Alanin	D	3.78	0.884
	L	3.34	
Leucin	D	3.74	0.882
	L	3.30	
Valin	D	2.78	0.885
	L	2.46	



11. ábra

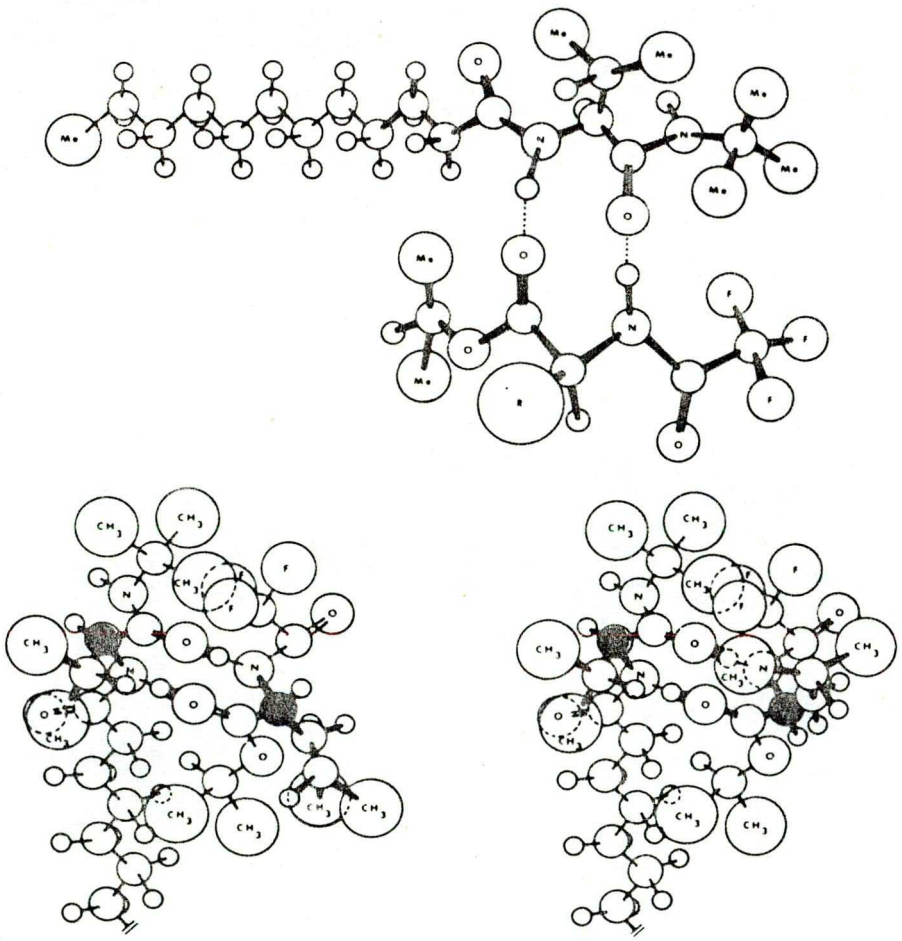
N-trifluoracetil-DL-alanin-L-mentilészter gázkromatogramja /elválasztási adatok: lásd 43. oldalon/

Megjegyzendő, hogy különböző aminosavak izomerjei meglehetősen átfedik egymást, ezért valamely aminosav elegyet analizálva, az optikai izomer arány meghatározása előtt az aminosavakat el kell választani egymástól.

Optikailag aktiv töltetek alkalmazása az előzőekhez képest sok előnyt jelent. Ilyen megosztó fázisok pl. az N-trifluoracetil-L-dipeptid-észterek vagy az optikailag aktiv diamidok. Az utóbbiak

Attila Tudományegyetem Könyvtár SZEGED

különösen jó hatásfokkal használhatók /CHARLES, 1975/. N-trifluoracetil-aminosav-me til- vagy i-propil-észterek vizsgálhatók ezeken az oszlopokon. Az egyes aminosavak és izomerjeik is elválnak rövid /2-4 m/ töltelékes kolonnákon. Hasonló elválasztásokat végeztünk N-lauroil-L-valil-t-butilamid megosztó fázissal.



D L

12. ábra

Az N-lauroil-L-valil-t-butilamid /LVBA/ és a kialakuló komplex szerkezete:LVBA - N-trifluoracetil-aminosav--izopropilészter

Az L-aminosav - LVBA komplex energetikailag stabilabb lévén: $r_{L/D}>1$ /GIL-AV, 1975/.

A munkát JEOL 20K gázkromatográffal végeztük /oszlop hőmérséklet = 110 °C, H_2 lángionizációs detektor, 10 % LVBA 100/120 Chromosorb WAW hordozón, üvegkolonna ID = 3 mm, N_2 vivőgáz/. Az aminosavakat metil-, vagy izopropil-észter formában vizsgáltuk. Mint a III. táblázatból látható, izopropil-észter használata javitja az izomer elválasztás jóságát.

III. Táblázat

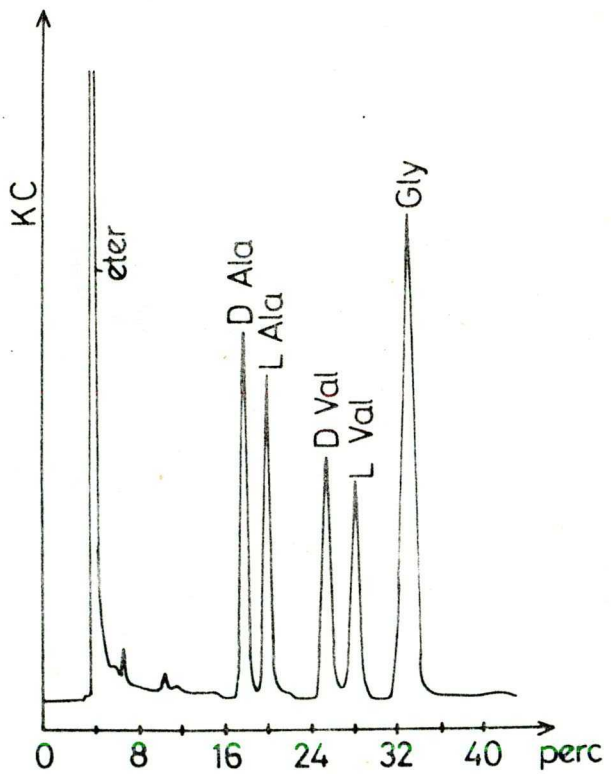
Alifás aminosav optikai izomerek gázkromatográfiája N-lauroil-L-valil-t-butilamid megosztó fázison

Aminosav	Izomer	t_R/perc/ ± S.E.	$r_{L/D}$ ± S.E.
Ala iP	D	13.8/1/	1.163/3/
	L	16.1/2/	
Val iP	D	21.4/1/	1.126/2/
	L	24.1/1/	
Gly iP		29.2/2/	
Leu Me	D	37.0	1.172
	L	43.4	
Ser Me	D	37.6	1.064
	L	40.0	
Leu iP	D	52.7	1.217
	L	64.1	
nor-Leu iP	D	61.2	1.181
	L	72.3	

Röv.: iP - izopropil-észter, Me - metil-észter, t_R - retenciós idő /korrigált/, $r_{L/D} = t_R(L)/t_R(D)$, S.E. - standard error

A gázkromatográfiás paramétereket ld. a szövegben. Az "Aminosav" N-TFA-aminosav-metil/izopropil-észtert jelent.

Az O-észter előállitása száraz HCl gázzal telitett metanollal vagy izopropilalkohollal történt. Az ebben felvett aminosav-mintát /1-5 mg/3 ml/ 100 ^{o}C-on tartottuk 2 órát N_2 vagy Ar atmoszférában. Ezután az oldószert bepárlással eltávolitva a mintához feleslegben /200 µl/ adtunk trifluorecetsav anhidridet. Az acetileződés szobahőmérsékleten néhány percen belül végbement. N_2 árammal távolitottuk el a TFA feleslegét. A mintákat éterben vagy diklórmetánban oldva kromatografáltuk /1 µg N-TFA-aminosav-észter/1 µl/ /13. ábra/.



13. ábra

N-TFA-aminosav-izopropil-észterek gázkromatográfiája N-lauroil-L-valil-t-butilamid fázison /részletek a szövegben/

Alkalmas /elektronbefogási/ detektorral ng alatti aminosav mennyiségek is vizsgálhatók. Itt emlitem meg, hogy hasonló /diamid/ tipusu gázkromatográfiás megosztó fázist használtak az amerikai Viking programban. Mivel az élet egyik jellemzője az optikai tisztaság, a marsi élet fontos bizonyitéka lett volna, ha aszimmetriát találnak az egyébként kimutatható menynyiségü aminosavak optikai aktivitását illetően. A kisérleti rendszer jól müködött ugyan, de az eredmények negativak.

József Attila Tudományegyetem Könyvtára SZEGED

V. KORMEGHATÁROZÁS AMINOSAV RACEMIZÁCIÓS ADATOK ALAPJÁN

Az élő biológiai rendszerek jellemzően optikailag tiszták, L-aminosavakat és D-cukrokat tartalmaznak. Mivel az optikailag tiszta anyagokkal szemben a racémek termodinamikailag stabilabbak, az élők számára az optikai tisztaság fenntartása energiaigényes folyamat. Ha az élő elpusztul, megkezdődik az entrópia növekedés, az optikailag aktiv anyagok racemizálódása, ami az egyensulyi állandóval jellemezhető aránynál jut dinamikus egyensulyba.

Aminosav racemizációs adatok alkalmasak lehetnek paleontológiai, paleoantropológiai leletek kormeghatározására az átlagos paleotemperature ismeretében, illetőleg ha más módszer szolgáltatja a kort, becsülhető az átlagos paleotemperatura.

Egyszerü metodikáról van szó, amelynek alapjai az alábbiakban foglalhatók össze /CRAM, 1965/.

Az optikailag aktiv karbonsavakból képződött karbanionok reakciói jól tanulmányozhatók proton-deutérium csere alapján:

$$-\overset{|}{\underset{|}{{}^{*}C}} - H/D + B - D/H \rightleftharpoons -\overset{|}{\underset{|}{{}^{*}C}} - D/H + B - H/D, \text{ ahol}$$

az izotópcsere sebességi állandója k_e illetve a racemizáció sebességi állandója k_α.

A k_e/k_α arány alapján a reakciók négy csoportját különböztethetjük meg:

∞ - 100 % retenció

1 - " racemizáció

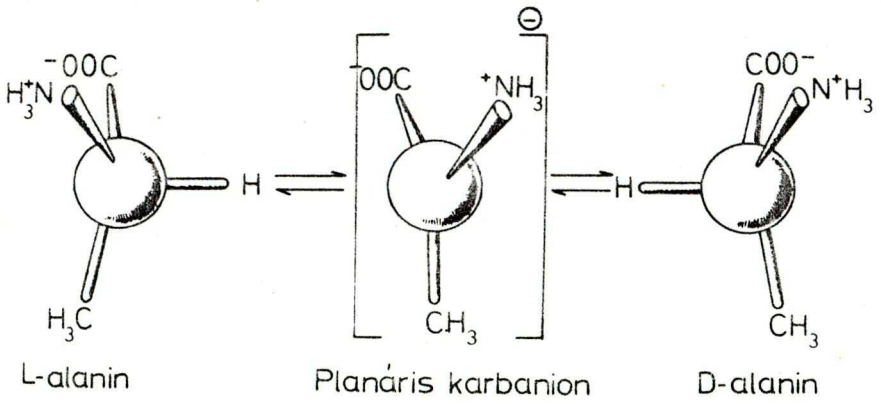
0.5 - " inverzió

0 - " izoracemizáció

Ha a csere teljes retencióval jelentkezik, az eredeti konfiguráció marad. Ha a csere komplett racemizációt eredményez, akkor minden karbanion elől- ről és hátulról azonos valószinüséggel köthet protont. Ha a csere teljes inverzióval történik, minden karbanion a hátoldalon fog protont és invertált konfigurációt produkál. Mivel a termék optikailag aktiv, de a kiindulási anyag optikai aktivitásával ellentett előjelü, abszolut értékben azonos forgatást mutat, a csere a racemizációra kapható érték felét adhatja, igy k_e/k_α 0.5-hez tart. Ha a racemizáció csere nélkül jelentkezik izoracemizációról beszélünk. Ez utóbbi két uton valósulhat meg: 1. intramolekuláris protontranszferrel, amikor megfelelően erős külső proton donor jelenlétében egy aszimmetrikus karbonsav szemközti oldaláról a hátoldalára bázis által hidrogén vihető át; 2. intermolekuláris protontranszferrel /amely jobban rokon a közönséges racemizációs folyamattal/, amikor az

eredetileg a karbonsavval asszociált hidrogén reasszociálódik a karbanionokkal és racem anyagot formál izotópcsere nélkül.

Aminosavak esetén a karbanionok racemizációs reakcióban vesznek részt. Az alanin példáját láthatjuk a 14. ábrán.



14. ábra

Optikailag aktiv alanin racemizációjának mechanizmusa

6 neutrális aminosav /ala, α-aminovajsav, val, leu, phe, phe-gly/ N-benzoilezett anilid-származékának báziskatalizált racemizációját vizsgálva a sebességi állandók összehasonlitása eredményeképpen a tesztelt aminosavak racemizációra való hajlama kifejezhető az

α-szénatomon lévő alkil, aralkil vagy aril oldallánc elektronegativitásának viszonyában az α-proton savasságával:

val < avs<leu < ala <phe < phe-gly

R = i-prop.< et<i-but.<me.<ϕCH_2 < ϕ

Ha $K = \frac{1}{t} \ln D_o/D_t = 2.303/t \lg D_o/D_t$, akkor $\lg K/K_{ala}$ ábrázolása aminosavanként a Taft-féle szubsztituens polaritási állandóval szemben /σ^*/ lineáris összefüggést ad /Chem. Pharm. Bull. 18(9)(1970) 1794-1798/, (D_o = forgatás a t = 0 időpontban, D_t = a minta forgatása t időpontban). A $2.2x\sigma^* = \lg K/K_{ala}$ összefüggésnek megfelelően az α-szubsztituens /R/ elektronegativitásával kapcsolt racemizációs hajlam kifejezhető, kivéve, ha az α-szubsztituens szterikus hatásu. Ez utóbbit jelzi a valin /R = i-propil/ esetében a $\lg K_{val}/K_{ala}$ és a σ^*_{val} által definiált pont eltérése a fenti egyenestől.

Fontos kiemelni, hogy az R-szubsztituens az α-szénatomon, illetve bizonyos sztérikus gátlások befolyásolják a racemizációs paramétereket, mert ezzel szemben - egyes szerzők /pl. Bada/ minden aminosavra azonos aktiválási energiát feltételeznek racemizációs reakciókban /ld. később/.

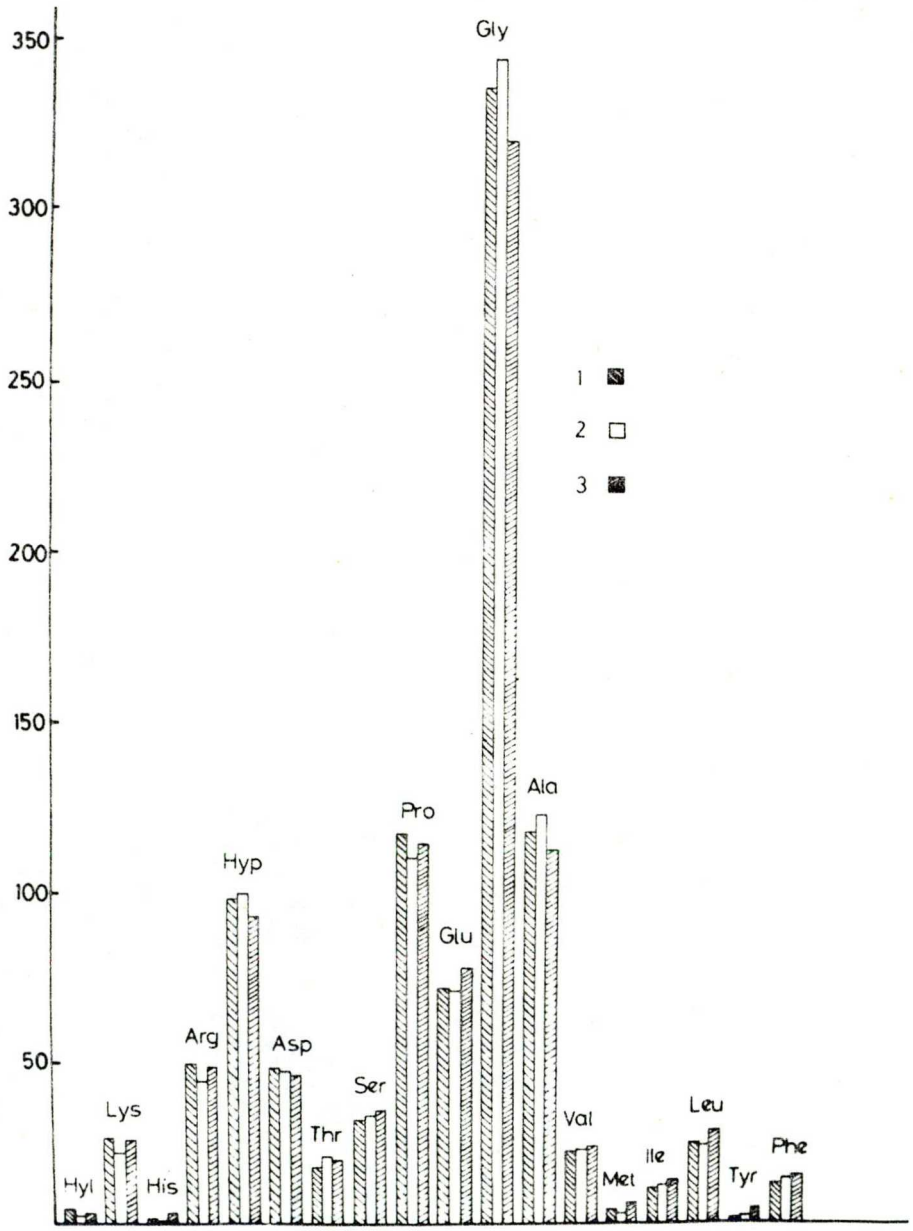
Tehát az aminosav racemizáció interkonverzióval történik, ugy, hogy az optikailag tiszta aminosavak α-protonjainak leadásával keletkező planáris karbanionok proton felvétele L- és D-aminosavakat is szolgáltathat,

$$\text{L-aminosav} \underset{k_D}{\overset{k_L}{\rightleftharpoons}} \text{D-aminosav.}$$

Egy aszimmetria centrumot tartalmazó aminosavaknél $k_L = k_D$ = elsőrendü sebességi állandó. Peptid kötésben részt vevő aminosavak racemizációjának sebességi állandói nem térnek el számottevően a szabad aminosavak azonos értékeitől /BADA, 1975/.

Recens és fosszilis csontok kollagénjeinek aminosav összetételét vizsgálva /15. ábra/ azt találjuk, hogy minden aminosav - néhány százalékos ingadozással - azonosan degradálódik /HO, 1967/.

Nem térünk ki a kollagén preparálás, hidrolizis és aminosav elválasztás lehetséges körülményeire. Az optikai izomer arány meghatározására optimálisak a gázkromatográfiás módszerek, amelyeket már ismertettünk a dolgozatban /IV. fejezet/.

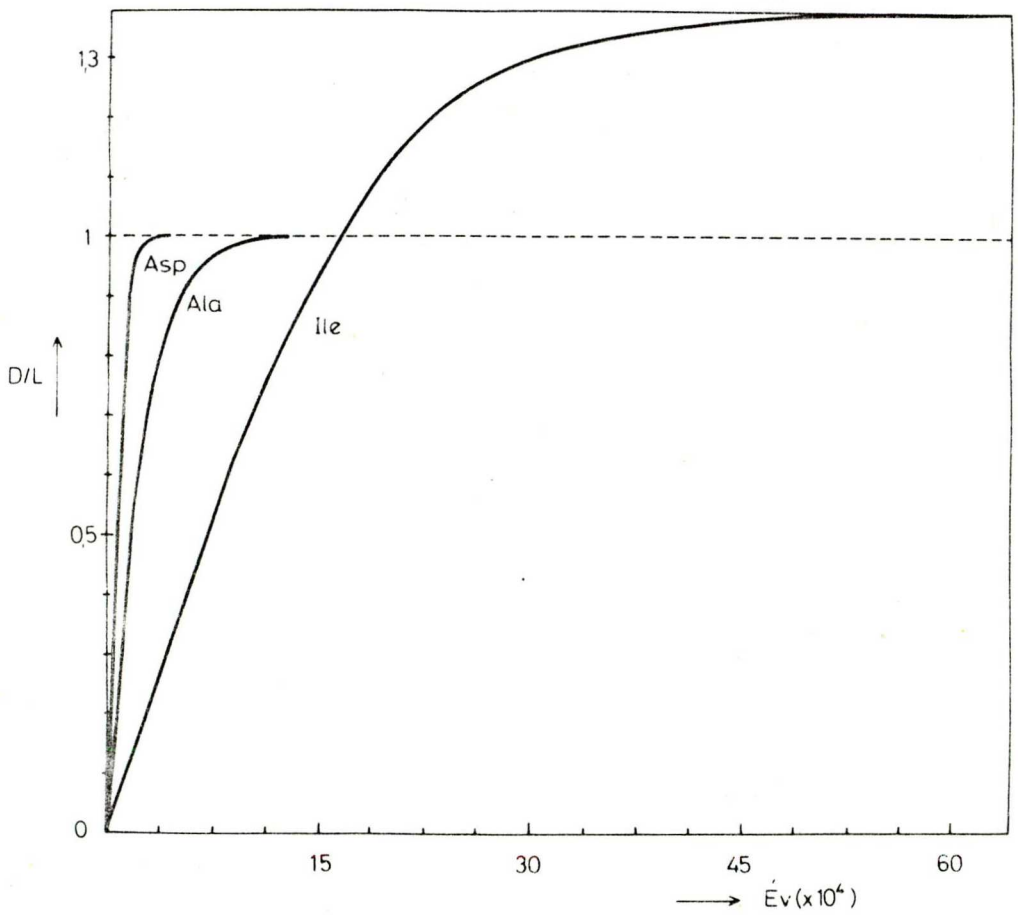


15. ábra

Aminosav eloszlás recens és fosszilis csontok kollagénjében /azonos faj/

1 - Bison antiquus, 2 - Bison antiquus, 3 - Bison bison bison
Az adatok 1000 rész szárazmaradék arányában feltüntetve.

A várható kornak megfelelően kell kiválasztani az optikai aktivitás szempontjából analizálandó aminosavat, vagy aminosavakat /16. ábra/.



16. ábra

L-aminosavak optikai tisztaságának alakulása 25 °C-on, az idő függvényében

Adott aminosavra vonatkozó optikai izomer arány a következőképpen függ a reakciósebességi állandótól és az időtől /IV. táblázat/:

Attila József Tudományegyetem Könyvtára SZEGED

$$\ln \left\{\frac{1 + D/L}{1 - K' D/L}\right\} - \text{konstans} = (1 + K')k\ t$$

D/L = enantiomer arány

k = sebességi állandó

t = idő

$K' = 1/K_{D/L}$, ahol a $K_{D/L}$ az egyensulyi állandó. /Egy aszimmetria centrumos molekulákra értéke 1. Az L-izoleucin racemizációja D-alloizoleucint produkál, $K_{D/L} = 1.38$/.

IV. Táblázat

Aminosav racemizációs adatok

Aminosav	k^{25} 1/év	lnA	E_a kcal/mol
aszparaginsav	$9.795 \cdot 10^{-5}$	43.4481	
alanin	$2.857 \cdot 10^{-5}$	42.2159	~ 31.2
izoleucin	$7.056 \cdot 10^{-6}$	40.8175	

k = elsőrendü sebességi állandó
A = akciókonstans
E_a = aktiválási energia

25 ^{o}C-tól való eltérés esetén vagy éppen paleotemparatura meghatározás esetén a számolást az Arrhenius-összefüggés alapján végezhetjük:

$$\ln k = \ln A - \frac{E_a}{RT}, \quad \text{ahol}$$

A = akciókonstans

E_a = aktiválási energia

R = egyetemes gázállandó

T = absz. hőmérséklet

Megjegyzendő, hogy rézionok jelenléte k értékét nagymértékben befolyásolhatja /növelheti/.

Bada szerint az aminosav racemizáció alapján meghatározott korok ± 15 %-on belül egyeznek a minták C^{14} tartalmának mérésével nyert értékekkel.

Ö S S Z E F O G L A L Á S

Adott fehérjebontó enzim specifitását kihasználva a nem homogén szekvenciáju termális peptidek aminosav eloszlásában megnyilvánuló nem-véletlen tendenciák tanulmányozhatóvá válnak bizonyos esetekben. Ezt igazoltuk glutaminsav-lizin aminosav párt polimerizáltatva, a tripszin specifitására épitve.

Mivel optikailag aktiv ásványok evolueiós aszimmetria forrásként a modellkisérletek tanusága szerint nem-vizes közegben müködhettek, megvizsgáltuk jelentkezik-e az optikailag aktiv kvarc ilyen hatása termális peptidekben. A DL-lizin-glicin-optikailag aktiv kvarc rendszerben a keletkező termális peptidnek nem volt kimutatható optikai aktivitása /az anizotrópia faktor értéke kisebb, mint 10^{-7}/.

10 különböző fehérje szekvenciáját vizsgálva ugy találtuk, hogy a közvetlen aminosav szomszédok közül a legnagyobb gyakorisággal azok a párok fordulnak elő, amelyeknek egyik, vagy mindkét tagja gyürüs aminosav. Az elő nem forduló aminosav párok közül a dipól-hidrofób jellegü aminosavak /cys, met, trp, tyr/ nem /szivesen/ kapcsolódnak hosszu láncu alifás aminosavakkal, vagy egymással illetve dipól-karakterü társaikkal. Az összesen 1974 db aminosav nem elegendően

nagyszámu ahhoz, hogy teljesen általános következtetéseket vonhassunk le, de módszerünk alkalmas arra, hogy vizsgálatainkat kiterjesszük.

Béta-bomló izotópokból kilépő elektronok a kinetikus energiájukkal kifejezhetően balos spinpolarizációjuak. A K^{40} béta-bomlása jelentette aszimmetria lehet oka a biológiai rendszerek optikai tisztaságának, ha sikerül igazolni, hogy a fizikai és biológiai aszimmetria között van kapcsolat. Spinpolarizált elektronok illetve pozitronok egy molekula-fajta optikai izomerjeire való eltérő hatásának egyik lehetséges elméleti háttere, hogy az optikai izomerek elektronrendszere spinpolarizált elektronokat tartalmaz /helikális elektrongáz modell/. Ennek bizonyitására béta-bomló Br^{82}-t épitettünk optikai izomer párokba, és meghatároztuk a bomlási állandót aszimmetrikus és kontrollként szimmetrikus környezetben /KBr/. Bár a felezési időt nagy pontossággal sikerült meghatároznunk /35.61 $\pm$ 0.02 óra/, az optikai izomerek közötti különbség jellemzésére csak felső becslést tudtunk tenni: $w \leq 1.5 \times 10^{-5}$. Eszerint, ha van spinpolarizáció optikailag aktiv molekulában, akkor ez a vegyérték elektronokra számitva nem nagyobb, mint 3 %.

A Földre érkező fény cirkuláris polarizációját nem sikerült kimérni /kisebb, mint 0.5 %/, de egyelőre kizárni sem lehet. Optikailag aktiv kámfort választottunk modell anyagként, és ennek cirkulárisan poláros fénnyel való fotolizisét követtük ESR-rel. 90 % körüli polarizáció 15 % különbséget eredményezett az α-kámfoleinaldehidhez vezető gyök koncentrációjában azonos intenzitásu balra, illetve jobbra cirkulárisan fényt használva. Ha azonban az evolueiós körülmények között feltételezett /kb. 0.3%/ polarizációt és az evolucióban jelentős kismolekulák optikai aktivitását vetjük össze, lecsökken annak esélye, hogy cirkulárisan poláros fény lehessen közvetlen oka a biológiai rendszerek optikai tisztaságának.

A dolgozat legfontosabb metodikai része aminosav optikai izomerek gázkromatográfiás elválasztásával foglalkozik. N-TFA-DL-aminosav izomereket választottunk el L-mentil-észter formában szimmetrikus /EGSSX/, illetve alkil-észter formában aszimmetrikus /N-lauroil-L-valil-t-butilamid/ megosztófázison. Ez utóbbi egyes aminosavak elválasztását is lehetővé teszi illetve a csucsok megduplázódnak az optikai izomereknek megfelelően. Alifás aminosavakat vizsgálva a legjobb eredményeket i-propil-észter formában kaptuk.

A biológiai rendszerek optikai tisztasága csak az élőkre, mint nyilt rendszerekre jellemző. A halál után megindulo aminosav racemizáció a környezeti hőmérséklet ismeretében kormeghatározást, vagy ha más módszer /pl. izotóp/ szolgáltatja a kort, paleotemperature meghatározást tesz lehetővé. Irodalmi adatok szerint az aminosav racemizáció alapján becsült korok $\pm$ 15 %-on belül egyeznek a C^{14}-es kormeghatározások adataival. Egyes szerzők szerint az aminosavak racemizációs aktiválási energiája minden aminosavra gyakorlatilag azonos, mig mások /DUNGWORTH, 1976/ bizonyos aminosavak esetében 1-3 Kcal/mol különbséget is leirtak. Amennyiben az utóbbit fogadjuk el igaznak, lehetőség van arra, hogy egy mintából az eltérő aktiválási energiáju aminosavak racemizációs arányait meghatározva kijelölhessünk egy intervallumot /kor és hőmérséklet koordináta rendszerben/ amelyen belül kell lenni a mintát jellemző kornak, illetve átlagos hőmérsékletnek:

$$\ln t = \ln \frac{-\ln a}{2 k_o} + \frac{1}{R}, \qquad a = \frac{[L] - [D]}{[L] + [D]} .$$

Ennek alkalmazása irodalmi adatokra /BADA, Nature 245(1973)310/ nem hozott használható eredményeket. Saját, tarpai és zsákai temetőkből származó

fosszilis illetve recens emberi csont anyagon való vizsgálataink szerint sok paraméter szerencsés összejátszása szükséges ahhoz, hogy az aminosav racemizációt kormeghatározásra használhassuk. Problémát jelent, hogy racemizációt jellemző adatokat magas hőmérsékleten mértekből /100 ^{o}C felett/ extrapolálják. Nem tudni, hogy a csontokban kötött fehérjéket stabilizáló erők, hogyan befolyásolják a felépitő aminosavak racemizációs jellemzőit. Nagyon fontos, hogy a fosszilizálódás során vagy után milyen fémionok kapcsolódtak a kollagénlánc aminosavaihoz. Pl. a réz jelenléte nagyon meggyorsitja a racemizációt, jóval idősebbnek mutatva a szóbanforgó csontot. Bizonyos agyagásványok /Na--montmorillonit/ jelenléte stabilizáló hatásu, igy ez fiatalabbá maszkirozhatja a mintát. Összességében az aminosav racemizációs adatok felhasználása kor és/vagy paleotemperature meghatározásra csak inert körülmények közé került kollagénre egyértelmü, de még ehhez is szükség lenne szobahőmérséklet közelében meghatározott, pontos racemizációs sebességi állandókra és aktiválási energiákra /NMR, H-D csere/. "Valódi", fosszilis csontok analizise nem hozhat megbizható eredményt a környezeti hatások alapos elemzése nélkül.*

* Bada ezt ugy kerüli meg, hogy valamely, C^{14}-módszerrel datált, csontminta adott aminosavára meghatározza az izomer arányt, a sebességi állandót pedig a C^{14} kor és izomer arány ismeretében számitja. Ezt érvényesnek veszi a C^{14}-módszerrel jellemzett csont környezetében talált mintákra.

I R O D A L O M

AKIYAMA, M. /1978/, Origin of Life /2nd ISSOL Meet./, 541

BADA, J.L., Schroeder, R.A. /1975/, Naturwissenschaften, 62, 71

BALAVOINE, G., Moradpur, A., Kagan, H.B. /1974/, J.Am.Chem.Soc. 96, 5152

BERNSTEIN, W.J., Calvin, M., Buchardt, O. /1972/, J.Am. Chem.Soc. 94, 494

BONNER, W.A., Vandort, M.A., Yearian, M.R. /1975a/, Nature, 258, 419

BONNER, W.A., Kravasmaneck, P.R., Martin, F.S., Floris, J.J. /1975b/, Origins of Life, 6, 367

BUHL, D. /1974/, Origins of Life, 5, 29

CALVIN, M. /1969/, Chemical Evolution, Oxford University Press

CHARLES, R., Beitler, U., Feibush, B., Gil-Av, E. /1975/, J.Chrom., 112, 121

CRAM, D. /1965/, Fundamentals of Carbanoid Chemistry, N.Y., III., 85

DECKER, P. /1975/, Origins of Life, 6, 211

FINKELSTEIN, A.V., Ptitsyn, O.B. /1971/, J.Mol.Biol., 62, 613

FOX, S.W., Harada, K. /1960/, J.Am.Chem.Soc., 82, 3745

József Attila Tudományegyetem Könyvtára SZEGED

FRONDEL, C. /1962/, Dana's The System of Mineralogy, 7th ed., III., 16

GARAY, A.S., Keszthelyi, L., Demeter, I., Hraskó, P. /1974/, Nature 250, 332

GIL-AV, E. /1975/, J.Mol.Evol., 6, 131

HO,T-Y. /1967/, Biochem.Biophys. Acta, 133, 568

HOPFINGER, A.J. /1972/, Currents in Modern Biology, 5, 38

HRASKÓ, P. /1973/, KFKI 73-40

KOVÁCS, K.L. /1979/, Kandidátusi értekezés

LOEW, G.H., Chang, S., Berkowitz, D. /1975/, J.Mol.Evol., 5, 131

MARTIN, P.G. /1972/, Mon.Not.R.astr.Soc., 159, 179

MILLER, S.L., Urey, H.C., Oró, J. /1976/, J.Mol.Evol., 9, 59

MÖRTBERG, K. /1971/, Nature, 232, 105

NORDÉN, B. /1977/, Nature, 266, 567

PAPAGIANNIS, M.D. /1978/ Fizikai Szemle, 6, 210

PONNANPERUMA, C. /1972a/, Exobiology, North Holland Res. Monogr., 23

PONNANPERUMA, C., Gabel, N.W. /1972b/, Chemistry in Space Research, Elsevier, 45-82

PTITSYN, O.B. /1969/, J.Mol.Biol., 42, 501

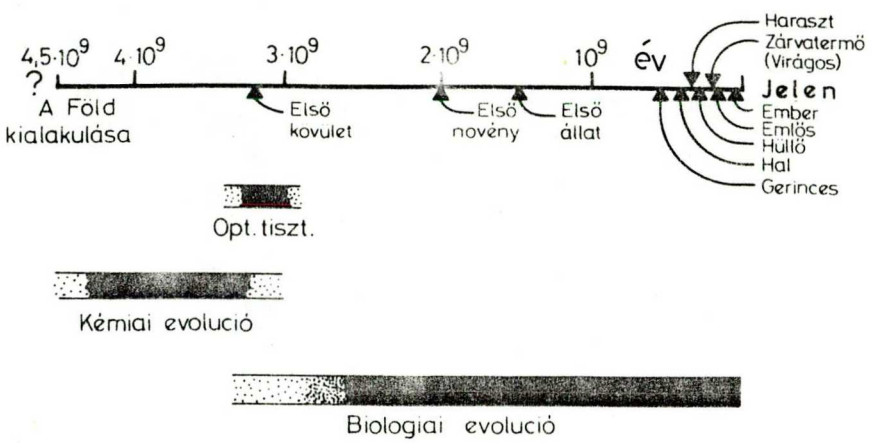
REIN, D.W. /1974/, J.Mol.Evol., 4, 15

SHIMOYAMA, A.S., Blair, N., Ponnanperuma, C. /1978/, Origin of Life /2nd ISSOL Meet./, 95

Attila József Tudományegyetem Könyvtára SZEGED

SOÓS, J., Bagyinka, Cs. /1976a/, Radiochem.Radioanal. Letters, 27, 169

SOÓS, J. /1976b/, MBFT Vándorgyülés

TAI, A., Okada, K., Masuda, T., Izumi, Y. /1976/, Bull. Chem.Soc.Jap., 49, 310

ULBRICHT, T.L.V. /1975/, Origins of Life, 6, 303