

POLSKA AKADEMIA NAUK
KOMITET BIOCHEMICZNY I BIOFIZYCZNY

POLISH ACADEMY OF SCIENCES
COMMITTEE OF BIOCHEMISTRY AND BIOPHYSICS

ACTA
BIOCHIMICA POLONICA

QUARTERLY

Vol. VIII

Nos. 1-4

WARSZAWA 1961
PAŃSTWOWE WYDAWNICTWO NAUKOWE

<http://rcin.org.pl>

EDITORS

Irena Mochnacka, Włodzimierz Mozolowski

EDITORIAL BOARD

Committee of Biochemistry and Biophysics,
Polish Academy of Sciences

ADDRESS

Warszawa 64, Krakowskie Przedmieście 26/28.
Poland

P. 1015



K 213/65
<http://rcin.org.pl>

A. 1-9
1200.-

CONTENTS

(Volume VIII, Nos. 1-4, 1961)

W. Drabikowski , The proteolytic activity of actin preparations	3
Ewa Lenartowicz , The effect of low temperature upon phosphorus metabolism in <i>Galleria mellonella</i> larvae	15
J. Buchowicz and I. Reifer , The conversion of orotic acid to pyrimidine derivatives in plant material	25
T. Wilczok , The transaminase activity in isolated cell structures of normal rat liver (Aktywność enzymów transaminujących w izolowanych strukturach komórkowych prawidłowej wątroby szczura)	35
J. Oleksy , Halina Szafran and Z. Szafran , Studies on hydrolases of digestive juices. VI. Esterases of canine intestinal juice (Badania nad hydrolazami soków trawiennych. VI. Esterazy soku jelitowego psa)	43
M. Wiewiórowski and J. Augustyniak , Studies on lupin proteins. IV. N-terminal amino acids in conglutin β (Z badań nad białkiem łubinowym. IV. N-końcowe aminokwasy w konglutynie β)	55
P. Szafranski and T. Golaszewski , Further characteristics of cytoplasmic nucleopeptides from the guinea pig liver	65
Mirosława Weber , T. W. Szczepkowski and B. Skarżyński , The role of thio-sulphate in the formation of sulphate in animal organism (Udział tiosiarczczanu w powstawaniu siarczczanu w organizmie zwierzęcym)	71
K. Ostrowski , J. Komender and K. Kwarecki , Quantitative investigations on the solubility of proteins extracted from tissues fixed with various chemical and physical methods	83
S. Angielski and J. Rogulski , The influence of kidney homogenate upon the reaction between glutathione and maleic acid (Wpływ homogenatu nerki na reakcję glutationu z kwasem maleinowym)	89
T. Chojnacki and T. Korzybski , The incorporation of ^{32}P labelled phosphoric esters of glycerol, choline, ethanolamine and serine into phospholipids of guinea pigs tissues <i>in vitro</i>	111
J. M. Zgliczyński and Teresa Stelmaszyńska , Sulphinic compounds as biological acceptors of bivalent sulphur	123
J. Pawelkiewicz , B. Bartosiński and W. Walerych , Enzymic synthesis of light-sensitive cobalto (II) corrins	131
W. Niemierko , W. Drabikowski and Hanna Strzelecka-Golaszewska , A new procedure of ultrafiltration and its adaptability in studies on binding	

of nucleotides by proteins. Passage of ATP through celophane membranes in presence and absence of protein	143
T. Chojnacki and Maria J. Piechowska , Biosynthesis of phospholipids in insects. I. Incorporation of ³² P-phosphocholine into phospholipids in <i>Celerio euphorbiae</i> (Biosynteza fosfolipidów u owadów. I. Włączanie ³² P-fosfocholiny w fosfolipidy u <i>Celerio euphorbiae</i>)	157
T. Chojnacki , Biosynthesis of phospholipids in insects. II. Studies on the incorporation of ³² P-orthophosphate in <i>Celerio euphorbiae</i> moths (Biosynteza fosfolipidów u owadów. II. Badania nad włączaniem ³² P-ortofosforanu u motyla <i>Celerio euphorbiae</i>)	167
S. Angielski, J. Rogulski and Jadwiga Baściak , Aminoaciduria induced with maleic acid. VIII. The effect of progesterone upon the picture of intoxication with maleic acid in rats on galactose diet (Aminoacyduria wywołana kwasem maleinowym. VIII. Wpływ progesteronu na obraz zatrucia kwasem maleinowym szczurów karmionych dietą galaktozową)	177
M. Orłowski and A. Szewczuk , Colorimetric determination of γ -glutamyl transpeptidase activity in human serum and tissues with synthetic substrates	189
A. Szewczuk, Elżbieta Wolny, M. Wolny and T. Baranowski , A new method for the preparation of D-glyceraldehyde-3-phosphate (Nowa metoda otrzymywania D-gliceraldehydo-3-fosforanu)	201
R. Krauze, K. Naimski and K. Zakrzewski , Isolation of γ -globulins by means of zinc and aluminium salts	209
K. L. Wierzchowski and D. Shugar , Photochemistry of cytosine nucleosides and nucleotides. II.	219
W. Szer and D. Shugar , The preparation and properties of high molecular weight polymers of N-methyluridylic acid	235
T. W. Szczepkowski , The role of rhodanase in metabolic formation of thio-sulphate (Udział rodanazy w metabolicznym powstawaniu tiosiarczanu)	251
T. W. Szczepkowski , Model reactions of the mechanism of rhodanase action (Modelowe reakcje mechanizmu działania rodanazy)	265
P. Szafrński, Hanna Wehr and T. Gołaszewski , Studies on protein synthesis in the cell nuclei	279
W. Drabikowski , Binding of ATP by human serum albumin in solution	289
Hanna Strzelecka-Gołaszewska , Some properties of complexes of muscle proteins with the nucleotides present in the muscle	301
Bronisława Morawiecka , Changes in proteins of yellow lupin (<i>Lupinus Luteus</i> L.) during germination	313
✓ Paulina Włodawer , Incorporation of ³² P into the phosphorus compounds of the wax moth larvae (<i>Galleria mellonella</i>)	321
Celina Janion and D. Shugar , Thymidine phosphorylase and other enzymes in regenerating rat liver	337
Wl. Ostrowski and Z. Walczak , Nucleolytic enzymes of <i>Thiobacillus thio-parus</i> . Purification and properties of ribonuclease	345
W. Szer and D. Shugar , Synthesis and physico-chemical and enzymatic properties of 5-bromo derivatives of uridine phosphates and their polymers	363
J. Buchowicz, I. Reifer and J. Makowski , Metabolism of ¹⁴ C-L-carbamylaspartic acid to pyrimidine derivatives in excised wheat blades	377

Maria Sarnecka-Keller , The peptide structure of proteic acids	389
R. Pakula, W. Walczak and D. Shugar , Inactivation of the streptomycin resistance markers of three species of bacteria by ionizing radiation . . .	413
Halina Sierakowska and D. Shugar , Gross histochemical localization of tissue nuclease enzymes	427
Ludmila Szarkowska and J. Heller , Studies on coenzyme Q reduction . . .	437
R. Niemi and J. Przyjemski , The quantitative studies on rat tissues lysolecithin	449
Daniela Barszcz and D. Shugar , Radiation chemistry of nucleic acids and their derivatives. I. Some pyrimidines, dihydropyrimidines and hydrated pyrimidines	455

INDEX OF AUTHORS

- Angielski S. & Rogulski J.**, The influence of kidney homogenate upon the reaction between glutathione and maleic acid 89
- Angielski S., Rogulski J. & Baściak J.**, Aminoaciduria induced with maleic acid. VIII. The effect of progesterone upon the picture of intoxication with maleic acid in rats on galactose diet 177
- Augustyniak J.** *see* **Wiewiórowski M.** 55
- Baranowski T.** *see* **Szewczuk A., Wolny E. & Wolny M.** 201
- Barszcz D. & Shugar D.**, Radiation chemistry of nucleic acids and their derivatives. I. Some pyrimidines, dihydropyrimidines and hydrated pyrimidines 455
- Bartosiński B.** *see* **Pawelkiewicz J. & Walerych W.** 131
- Baściak J.** *see* **Angielski S. & Rogulski J.** 177
- Buchowicz J. & Reifer I.**, The conversion of orotic acid to pyrimidine derivatives in plant material 25
- Buchowicz J., Reifer I. & Makowski J.**, Metabolism of ^{14}C -L-carbamylaspartic acid to pyrimidine derivatives in excised wheat blades 377
- Chojnacki T.**, Biosynthesis of phospholipids in insects. II. Studies on the incorporation of ^{32}P -orthophosphate in *Celerio euphorbiae* moths 167
- Chojnacki T. & Korzybski T.**, The incorporation of ^{32}P labelled phosphoric esters of glycerol, choline, ethanolamine and serine into phospholipids of guinea pigs tissues *in vitro* 111
- Chojnacki T. & Piechowska M. J.**, Biosynthesis of phospholipids in insects. I. Incorporation of ^{32}P -phosphocholine into phospholipids in *Celerio euphorbiae* 157
- Drabikowski W.**, Binding of ATP by human serum albumin in solution 289
- Drabikowski W.**, The proteolytic activity of actin preparations 3
- Drabikowski W.** *see* **Niemierko W. & Strzelecka-Golaszewska H.** 143
- Golaszewski T.** *see* **Szafrański P.** 65
- Golaszewski T.** *see* **Szafrański P. & Wehr H.** 279
- Heller J.** *see* **Szarkowska L.** 437
- Janion C. & Shugar D.**, Thymidine phosphorylase and other enzymes in regenerating rat liver 337

- Komender J.** *see* **Ostrowski K. & Kwarecki K.** 83
- Korzybski T.** *see* **Chojnacki T.** 111
- Krauze R., Naimski K. & Zakrzewski K.,** Isolation of γ -globulins by means of zinc and aluminium salts 209
- Kwarecki K.** *see* **Ostrowski K. & Komender J.** 83
- Lenartowicz E.,** The effect of low temperature upon phosphorus metabolism in *Galleria mellonella* larvae 15
- Makowski J.** *see* **Buchowicz J. & Reifer I.** 377
- Morawiecka B.,** Changes in proteins of yellow lupin (*Lupinus Luteus* L.) during germination 313
- Naimski K.** *see* **Krauze R. & Zakrzewski K.** 209
- Niemierko W., Drabikowski W. & Strzelecka-Golaszewska H.,** A new procedure of ultrafiltration and its adaptability in studies on binding of nucleotides by proteins. Passage of ATP through celophane membranes in presence and absence of protein 143
- Niemiro R. & Przyjemski J.,** The quantitative studies on rat tissues lysolecithin 449
- Oleksy J., Szafran H. & Szafran Z.,** Studies on hydrolases of digestive juices. VI. Esterases of canine intestinal juice 43
- Orłowski M. & Szewczuk A.,** Colorimetric determination of γ -glutamyl transpeptidase activity in human serum and tissues with synthetic substrates 189
- Ostrowski K., Komender J. & Kwarecki K.,** Quantitative investigations on the solubility of proteins extracted from tissues fixed with various chemical and physical methods 83
- Ostrowski Wl. & Walczak Z.,** Nucleolytic enzymes of *Thiobacillus thioparus*. Purification and properties of ribonuclease 345
- Pakuła R., Walczak W. & Shugar D.,** Inactivation of the streptomycin resistance markers of three species of bacteria by ionizing radiation 413
- Pawelkiewicz J., Bartosiński B. & Walerych W.,** Enzymic synthesis of light-sensitive cobalto (II) corrins 131
- Piechowska M. J.** *see* **Chojnacki T.** 157
- Przyjemski J.** *see* **Niemiro R.** 449
- Reifer I.** *see* **Buchowicz J.** 25
- Reifer I.** *see* **Buchowicz J. & Makowski J.** 377
- Rogulski J.** *see* **Angielski S.** 89
- Rogulski J.** *see* **Angielski S. & Baściak J.** 177
- Sarnecka-Keller M.,** The peptide structure of proteic acids 389
- Shugar D.** *see* **Barszcz D.** 455
- Shugar D.** *see* **Janion C.** 337
- Shugar D.** *see* **Sierakowska H.** 427
- Shugar D.** *see* **Szer W.** 235
- Shugar D.** *see* **Szer W.** 363

- Shugar D.** *see* **Wierzchowski K. L.** 219
- Shugar D.** *see* **Pakula R. & Walczak W.** 413
- Sierakowska H. & Shugar D.,** Gross histochemical localization of tissue nuclease enzymes 427
- Skarżyński B.** *see* **Weber M. & Szczepkowski T. W.** 71
- Stelmaszyńska T.** *see* **Zgliczyński J. M.** 123
- Strzelecka-Golaszewska H.,** Some properties of complexes of muscle proteins with the nucleotides present in the muscle 301
- Strzelecka-Golaszewska H.** *see* **Niemierko W. & Drabikowski W.** 143
- Szafran H.** *see* **Oleksy J. & Szafran Z.** 43
- Szafran Z.** *see* **Oleksy J. & Szafran H.** 43
- Szafrański P. & Golaszewski T.,** Further characteristics of cytoplasmic nucleopeptides from the guinea pig liver 65
- Szafrański P., Wehr H. & Golaszewski T.,** Studies on protein synthesis in the cell nuclei 279
- Szarkowska L. & Heller J.,** Studies on coenzyme Q reduction 437
- Szczepkowski T. W.,** Model reactions of the mechanism of rhodanase action 265
- Szczepkowski T. W.,** The role of rhodanase in metabolic formation of thiosulphate 251
- Szczepkowski T. W.** *see* **Weber M. & Skarżyński B.** 71
- Szer W. & Shugar D.,** Synthesis and physico-chemical and enzymatic properties of 5-bromo derivatives of uridine phosphates and their polymers 363
- Szer W. & Shugar D.,** The preparation and properties of high molecular weight polymers of N-methyluridylic acid 235
- Szewczuk A., Wolny E., Wolny M. & Baranowski T.,** A new method for the preparation of D-glyceraldehyde-3-phosphate 201
- Szewczuk A.** *see* **Orlowski M.** 189
- Walczak W.** *see* **Pakula R. & Shugar D.** 413
- Walczak Z.** *see* **Ostrowski Wl.** 345
- Walerych W.** *see* **Pawelkiewicz J. & Bartosiński B.** 131
- Weber M., Szczepkowski T. W. & Skarżyński B.,** The role of thiosulphate in the formation of sulphate in animal organism 71
- Wehr H.** *see* **Szafrański P. & Golaszewski T.** 279
- Wierzchowski K. L. & Shugar D.,** Photochemistry of cytosine nucleosides and nucleotides. II 219
- Wiewiórowski M. & Augustyniak J.,** Studies on lupin proteins. IV. N-terminal amino acids in conglutin β 55
- Wilczok T.,** The transaminase activity in isolated cell structures of normal rat liver 35
- Włodawer P.,** Incorporation of ^{32}P into the phosphorus compounds of the wax moth larvae (*Galleria mellonella*) 321
- Wolny E.** *see* **Szewczuk A., Wolny M. & Baranowski T.** 201
- Wolny M.** *see* **Szewczuk A., Wolny E. & Baranowski T.** 201
- Zakrzewski K.** *see* **Naimski K. & Krauze R.** 209
- Zgliczyński J. M. & Stelmaszyńska T.,** Sulphinic compounds as biological acceptors of bivalent sulphur 123

INDEX OF SUBJECTS

- Actin preparations, proteolytic activity of (Drabikowski W.) 3
- Albumin, human serum, binding of ATP by (Drabikowski W.) 289
- Aluminium, and zinc salts, isolation of γ -globulins by means of (Krauze R., Naimski K. & Zakrzewski K.) 209
- Aminoaciduria, induced with maleic acid, in rats on galactose diet, effect of progesterone on (Angielski S., Rogulski J. & Baściak J.) 177
- Antimycin A., ubiquinone reduction insensitive to (Szarkowska L. & Heller J.) 437
- ATP, binding by human serum albumin in solution (Drabikowski W.) 289
- ATP, passage through cellophane membranes in presence and absence of protein (Niemierko W., Drabikowski W. & Strzelecka-Golaszewska H.) 143
- 5-Bromo derivatives, of uridine phosphates, and their polymers, synthesis and physico-chemical and enzymatic properties (Szer W. & Shugar D.) 363
- ^{14}C -L-Carbamylaspartic acid, metabolism to pyrimidine derivatives, in excised wheat blades (Buchowicz J., Reifer I. & Makowski J.) 377
- Celerio euphorbiae*, incorporation of ^{32}P -orthophosphate into phospholipids of (Chojnacki T.) 167
- Celerio euphorbiae*, incorporation of ^{32}P -phosphocholine into phospholipids of (Chojnacki T. & Piechowska M. J.) 157
- Cell nuclei, protein synthesis in (Szafranski P., Wehr H. & Golaszewski T.) 279
- Cobalto(II)corrins, light-sensitive, enzymic synthesis of (Pawelkiewicz J., Bartosiński B. & Walerych W.) 131
- Coenzyme Q *see* Ubiquinone
- Conglutin β , N-terminal amino acids in (Wiewiórowski M. & Augustyniak J.) 55
- Cytosine nucleosides and nucleotides, photochemistry of (Wierzchowski K. L. & Shugar D.) 219
- Esterases, in canine intestinal juice (Oleksy J., Szafran H. & Szafran Z.) 43
- Galactose diet, effect of progesterone on aminoaciduria induced with maleic acid, in rats on (Angielski S., Rogulski J. & Baściak J.) 177
- Galleria mellonella*, incorporation of ^{32}P into phosphorus compounds in (Włodawer P.) 321

- Galleria mellonella* larvae, effect of low temperature upon phosphorus metabolism of (Lenartowicz E.) 15
- γ -Globulins, isolation by means of zinc and aluminium salts (Krauze B., Naimski K. & Zakrzewski K.) 209
- γ -Glutamyl transpeptidase, determination of activity in human serum and tissues, with synthetic substrates (Orłowski M. & Szewczuk A.) 189
- Glutathione, influence of kidney homogenate upon the reaction with maleic acid (Angielski S. & Rogulski J.) 89
- D-Glyceraldehyde-3-phosphate, new method for the preparation of (Szewczuk A., Wolny E., Wolny M. & Baranowski T.) 201
- Intestinal juice, canine, esterases of (Oleksy J., Szafran H. & Szafran Z.) 43
- Ionizing radiation, inactivation of streptomycin resistance markers of bacteria (Pakuła R., Walczak W. & Shugar D.) 413
- Kidney homogenate, influence upon the reaction between glutathione and maleic acid (Angielski S. & Rogulski J.) 89
- Liver, guinea pig, cytoplasmic nucleopeptides from (Szafranski P. & Golaszewski T.) 65
- Liver, rat, thymidine phosphorylase and other enzymes in regenerating (Janion C. & Shugar D.) 337
- Liver, rat, transaminase activity in isolated cell structures of (Wilczok T.) 35
- Lupin proteins, N-terminal amino acids in conglutin β (Wiewiórowski M. & Augustyniak J.) 55
- Lupinus luteus* L., changes in proteins during germination (Morawiecka B.) 313
- Lysolecithin, in rat tissues (Niemiro R. & Przyjemski J.) 449
- Maleic acid, effect of progesterone on aminoaciduria induced with, in rats on galactose diet (Angielski S., Rogulski J. & Baściak J.) 177
- Maleic acid, influence of kidney homogenate upon the reaction with glutathione (Angielski S. & Rogulski J.) 89
- N-Methyluridylic acid, high molecular weight polymers of, preparation and properties of (Szer W. & Shugar D.) 235
- Muscle proteins, properties of complexes of, with nucleotides present in the muscle (Strzelecka-Golaszewska H.) 301
- Nucleases, gross histochemical localization of, in tissue (Sierakowska H. & Shugar D.) 427
- Nucleic acids, and their derivatives, radiation chemistry of (Barszcz D. & Shugar D.) 455
- Nucleopeptides, cytoplasmic, from guinea pig liver (Szafranski P. & Golaszewski T.) 65

- Nucleotides, binding of, by proteins; a new procedure of ultrafiltration (Niemierko W., Drabikowski W. & Strzelecka-Golaszewska H.) 143
- Nucleotides, present in muscle, properties of complexes with muscle proteins (Strzelecka-Golaszewska H.) 301
- Orotic acid, conversion to pyrimidine derivatives in plant material (Buchowicz J. & Reifer I.) 25
- ³²P-Orthophosphate, incorporation into phospholipids, in *Celerio euphorbiae* (Chojnacki T.) 167
- ³²P-Phosphocholine, incorporation into phospholipids in *Celerio euphorbiae* (Chojnacki T. & Piechowska M. J.) 157
- Phospholipids, incorporation of ³²P-labelled phosphoric esters of glycerol, choline, ethanolamine and serine, in guinea pig tissues *in vitro* (Chojnacki T. & Korzybski T.) 111
- Phospholipids, incorporation of ³²P-orthophosphate into, in *Celerio euphorbiae* (Chojnacki T.) 167
- Phospholipids, incorporation of ³²P-phosphocholine into, in *Celerio euphorbiae* (Chojnacki T. & Piechowska M. J.) 157
- ³²P-Phosphoric esters of glycerol, choline, ethanolamine and serine, incorporation into phospholipids, in guinea pig tissues *in vitro* (Chojnacki T. & Korzybski T.) 111
- Phosphorus compounds, incorporation of ³²P into, in wax moth larvae (Włodawer P.) 321
- Phosphorus metabolism, effect of low temperature upon, in *Galleria mellonella* (Lenartowicz E.) 15
- Photochemistry, of cytosine nucleosides and nucleotides (Wierzchowski K. L. & Shugar D.) 219
- Progesterone, effect in aminoaciduria induced with maleic acid, in rats on galactose diet (Angielski S., Rogulski J. & Baściak J.) 177
- Proteic acids, in urine, peptide structure of (Sarnecka-Keller M.) 389
- Protein, synthesis in the cell nuclei (Szafranski P., Wehr H. & Golaszewski T.) 279
- Proteins, extracted from tissues fixed with various chemical and physical methods, solubility of (Ostrowski K., Komender J. & Kwarecki K.) 83
- Proteins, lupin, N-terminal amino acids in conglutin β (Wiewiórowski M. & Augustyniak J.) 55
- Proteins, muscle, properties of complexes of, with nucleotides present in the muscle (Strzelecka-Golaszewska H.) 301
- Proteins, yellow lupin, changes during germination (Morawiecka B.) 313
- Pyrimidine derivatives, conversion of orotic acid to, in plant material (Buchowicz J. & Reifer I.) 25
- Pyrimidine derivatives, metabolism of ¹⁴C-L-carbamylaspartic acid to, in excised wheat blades (Buchowicz J., Reifer I. & Makowski J.) 377
- Pyrimidines, dihydropyrimidines and hydrated pyrimidines, radiation chemistry of (Barszcz D. & Shugar D.) 455

- Radiation chemistry, of nucleic acids and their derivatives (Barszcz D. & Shugar D.) 455
- Rhodanase, in metabolic formation of thiosulphate (Szczepkowski T. W.) 251
- Rhodanase, model reaction of the mechanism of action (Szczepkowski T. W.) 265
- Ribonuclease, purification and properties of, in *Thiobacillus thioparus* (Ostrowski W. & Walczak Z.) 345
- Serum albumin, binding of ATP by (Drabikowski W.) 289
- Serum, human, determination of γ -glutamyl transpeptidase activity with synthetic substrates (Orłowski M. & Szewczuk A.) 189
- Streptomycin resistance markers, inactivation of, by ionizing radiation (Pakuła R., Walczak W. & Shugar D.) 413
- Succinic dehydrogenase, ubiquinone reduction by (Szarkowska L. & Heller J.) 437
- Sulphinic compounds, as biological acceptors of bivalent sulphur (Zgliczyński J. M. & Stelmaszyńska T.) 123
- Thiobacillus thioparus*, purification and properties of ribonuclease in (Ostrowski W. & Walczak Z.) 345
- Thiosulphate, in formation of sulphate, in animal (Weber M., Szczepkowski T. W. & Skarżyński B.) 71
- Thiosulphate, rhodanase in metabolic formation of (Szczepkowski T. W.) 251
- Thymidine phosphorylase, and other enzymes in regenerating rat liver (Janion C. & Shugar D.) 337
- Transaminase, activity in isolated cell structures of normal rat liver (Wilczok T.) 35
- Ubiquinone, reduction by succinic dehydrogenase (Szarkowska L. & Heller J.) 437
- Ultrafiltration, a new procedure of, in studies on binding of nucleotides by proteins (Niemierko W., Drabikowski W. & Strzelecka-Golaszewska H.) 143
- Uridine phosphates, 5-bromo derivatives of, and their polymers, synthesis and physico-chemical and enzymatic properties of (Szer W. & Shugar D.) 363
- Wheat blades, excised, metabolism of ^{14}C -L-carbamylaspartic acid to pyrimidine derivatives in (Buchowicz J., Reifer I. & Makowski J.) 377
- Zinc, and aluminium salts, isolation of γ -globulins by means of (Krauze R., Naimski K. & Zakrzewski K.) 209

W. DRABIKOWSKI

THE PROTEOLYTIC ACTIVITY OF ACTIN PREPARATIONS

Department of Biochemistry, Nencki Institute of Experimental Biology, Warsaw
Head of the Department: Prof. Dr. W. Niemierko

In the course of our investigations dealing with the actin ability to bind nucleotides it was observed that actin underwent hydrolysis on storage in a slightly acid medium. The process seemed to be the enzymatic one, since it did not occur when actin was heat denaturated. Several authors reported earlier the presence in actin preparations of enzymes such as creatine phosphokinase [11, 18, 6, 3], deaminase [10, 3] and myokinase [17, 3]. They also described some attempts to separate these enzymes from actin [11, 6, 3]. The proteolytic activity of actin itself, however, had not been demonstrated, as yet. Thus we wanted in our experiments to investigate some properties of the enzyme responsible for the actin hydrolysis, as well as to establish which of the known methods for actin purification allows to obtain actin preparations free from the proteolytic activity.

MATERIAL AND METHODS

Actin was obtained from rabbit muscles. The muscle pulp was extracted with salt solutions according to Tsao and Bailey [19] and the muscle powder was prepared of the residue in one of the following ways: treatment with butanol followed by acetone [19] — such a powder is further called “the butanol powder” or treatment with acetone only [3] — “the acetone powder”. Materials of both kinds were extracted with water (if not mentioned otherwise). The actin preparations obtained from the acetone powder corresponded to those yielded by classical Straub's procedure [3], and they have been designated in this paper as “crude actin”.

The purification of these preparations by precipitation with magnesium ions was carried out according to Barany *et al.* [3]. The ultracentrifugation of actin was performed after Mommaerts [12] in the preparative Spinco ultracentrifuge type L.

The KCl (2%) extracts of rabbit muscles dialysed against the same KCl solution, according to Snoke and Neurath [16], served as check preparations of muscle proteinase. Myosin was prepared according to Perry [14] and tropomyosin according to Bailey [1]. The human serum albumin (the Cohn 5-th fraction) and the human haemoglobin were provided by the Institute of Haematology, Warsaw.

The acetate or sometime citrate buffer was used when the enzymatic activity was followed in an acid medium, while the glycine buffer was applied to keep an alkaline pH.

The actin solutions were incubated with buffer (final $\mu = 0.1$) toluen being added as antiseptic. The enzymic reaction was stopped usually by addition of 60% perchloric acid in an amount equal to 0.1 of the volume of the incubation mixture. After removing of the precipitated protein by centrifugation the optical density was measured in the supernatant at 280 m μ in Unicam spectrophotometer. The increase in optical density at this wave length calculated for 1 cm. cuvette was considered as the measure of the enzyme activity. This enabled to eliminate the influence of the adenine nucleotides, present in actin and liberated during the deproteinization, upon the extinction at 280 m μ . In some experiments the increase in non protein nitrogen was also determined by micro-Kjeldahl method. The value of ΔE_{280} calculated per 1 g. protein was considered as the enzyme specific activity. The initial amounts of actin, as well as of other proteins, and sometimes also those of the undecomposed proteins precipitated with perchloric acid, were determined by the biuret method according to Gornall *et al.* [7] or by the micro-Kjeldahl method. The nucleotide content in actin was calculated from the pentose determinations according to Mejbaum [11a].

RESULTS

The pH value about 3.9 was found to be the optimum for the activity of the proteolytic enzyme present in actin preparations (Fig. 1). This pH optimum corresponded to that found by Snoke and Neurath [16] for the muscle proteinase. Koszalka and Miller [9] found a second pH optimum for muscle proteinase at pH 9. It could be demonstrated in the present investigation that actin preparations at this pH were not active.

Fig. 2 presents the spontaneous splitting of actin during its storage at pH 3.9 both at 37° and 0°. The rate of the hydrolysis decreases gradually and after several hours of incubation at 37° the hydrolysis is stopped completely. The rate of the hydrolysis was considerably lower at 0° and its inhibition was observed only after several days. After cessation of the reaction the quantity of protein in perchloric acid precipitates was lower by 40 to 50 per cent as compared to the initial value.

It should be assumed that the inhibition of the actin proteolysis was not due to the enzyme inactivation at pH about 4, since the actin preparations autolyzed for a long period of time still showed high proteolytic activity towards haemoglobin, when added (Table 1).

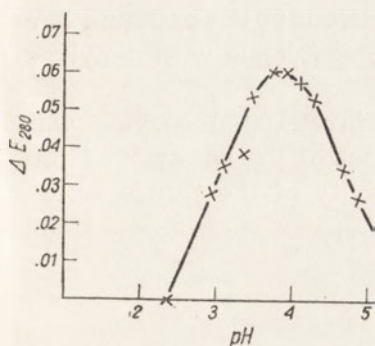


Fig. 1. Optimum pH of autolytic splitting of actin. 5 ml. samples of actin solution (water extract from "butanol powder") were incubated 3 hrs. in citrate buffer at various pH, at 37°. Reaction was stopped by addition of 0.5 ml. 60% perchloric acid, and the optical density at 280 m μ was determined in the supernatants

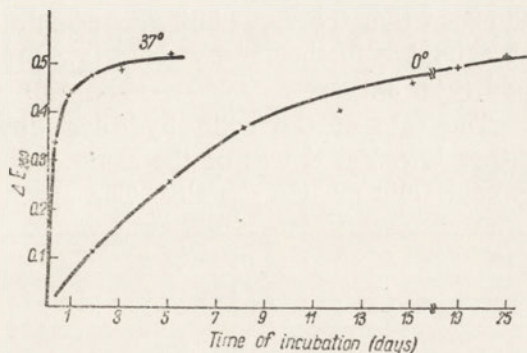


Fig. 2. Autolysis of actin. Actin (water extract from "butanol powder") was incubated in acetate buffer, pH 4.0, at 0° or at 37°. At various time intervals 5 ml. samples (each containing 8.5 mg. of actin) were deproteinized by addition of 0.5 ml. 60% perchloric acid, and the optical density at 280 m μ was determined in the supernatants

Trichloroacetic acid precipitated the amounts of unhydrolyzed actin equal to those as perchloric acid did. Thus it might be supposed that molecular weight of the hydrolysis product present in the supernatant was lower than 4000 [5]. When actin was incubated at 0° it was possible,

Table 1

The inactivation of actin-proteinase at pH 3.9

Actin (water extract from "butanol powder") was incubated in acetate buffer at pH 3.9: A — at 0°, B — at 37°. Control sample remained during this time at pH 7.0, at 0°. After 3 days autolysis haemoglobin was added, and all samples were further incubated during 20 hrs. at 37° at pH 3.9. Volume of the samples 5 ml. Reaction was stopped by addition 0.5 ml. 60% perchloric acid and the optical density at 280 m μ was determined in supernatants

Sample	Preincubation		Incubation with haemoglobin	
	temp.	pH	ΔE_{280}	enzymic activity %
Control	0°	7.0	1.230	100
A	0°	3.9	1.160	95
B	37°	3.9	0.960	78

after precipitation of the actin by TCA, to precipitate from supernatant some peptides by means of molybdic acid (2.5% solution of ammonium molybdate in 3 N-H₂SO₄ were used). The amount of such peptides depended upon the pH at which the autolysis was carried out. At pH 4 it was much lower than after incubation at pH 2.5. Thus it might be admitted that the degradation of protein at pH close to the optimum one was running further and yielded low peptides precipitable with molybdic acid (Fig. 3).

The rate of the actin hydrolysis by the investigated enzyme was rather low. Yet it was of the same order as that of the autolysis of the sarcoplasmic muscle proteins. The specific activity of the "crude actin"

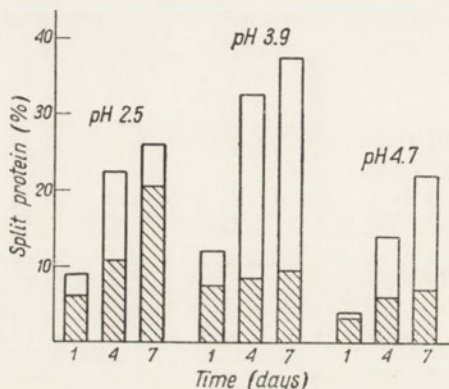


Fig. 3. The size of the peptide molecules formed during the autolysis of actin at various pH. The heights of the columns indicate the percentage of the content of decomposed protein, nonprecipitated with perchloric acid, after incubation. The dark areas of the columns show that part of splitting products which were precipitable with molybdic acid. Actin (water extract from "butanol powder") was incubated at 0° in acetate buffer at pH 3.9 and 4.7, or after acidification with HCl at pH 2.5. At various time intervals 5 ml. samples (each containing 9.9 mg. of actin) were deproteinized by adding 0.5 ml. 60% perchloric acid. After centrifugation, the optical density at 280 m μ was determined in the supernatants and the amount of protein was estimated in the precipitates. To 3 ml. samples of the supernatants 1 ml. solution of 2.5% (NH₄)₂MoO₄ in 3.0N-H₂SO₄ was added and in the precipitates, separated by centrifugation, the biuret reaction was done

in experiment presented in Table 4 was 0.0363, while that of the proteinase present in 2% KCl extract deriving from the same rabbit muscle pulp was 0.0345, both performed under identical conditions.

The analogous experiments performed on other muscle proteins such as myosin and tropomyosin did not reveal any proteolytic activity in these proteins. The addition of myosin to the actin preparation did not exert any appreciable influence upon the rate of hydrolysis. The serum albumin, however, lowered considerably the reaction rate when added

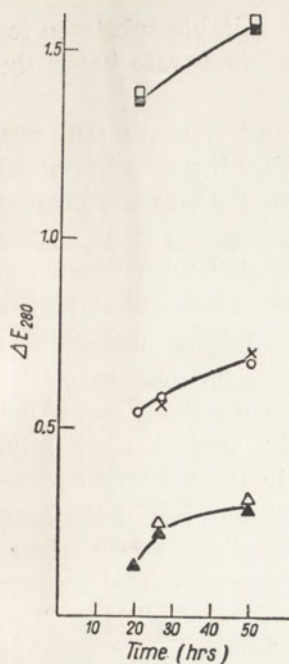


Fig. 4.

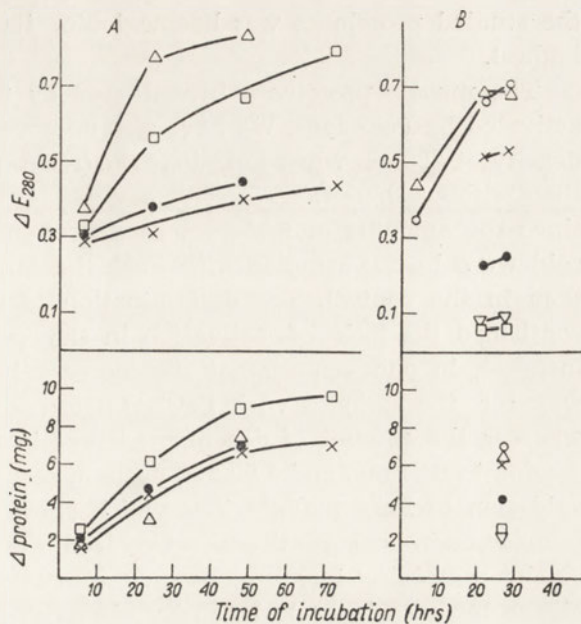


Fig. 5.

Fig. 4. The hydrolysis of various proteins by the proteinase present in actin. Actin (water extract from "butanol powder") was incubated at 37° with addition of various proteins, native or denaturated. Final volume 5 ml. (○), actin alone (16.6 mg.); (□), actin + 11.1 mg. native haemoglobin; (■), actin + 11.1 mg. heat denaturated haemoglobin; (×), actin + 12.8 mg. myosin; (Δ), actin + 8.2 mg. native serum albumin; (▲), actin + 8.2 mg. heat denaturated albumin. Denaturation was carried out by heating the solutions of the proteins in acetate buffer at pH 4.0 in the boiling water bath during 10 min. At various time intervals the samples were deproteinized by addition of 0.5 ml. 60% perchloric acid and the optical density at $280\text{ m}\mu$ was determined in the supernatants

Fig. 5. The influence of activators and inhibitors on the proteolytic activity of actin. Actin (water extract from "butanol powder") was incubated at 37° in acetate buffer, pH 3.9 in the presence of one of the following substances:

- A. (□) 5.10^{-4} M-KCN
 (×) 1.10^{-3} M-DFP
 (Δ) 1.10^{-2} M- $\text{Fe}(\text{NH}_4)_2(\text{SO}_4)_2$
 (●) Actin alone

- B. (×) 1.10^{-3} M-cysteine
 (Δ) 1.10^{-3} M-glutathione
 (□) 1.10^{-4} M-iodoacetic acid
 (Δ) 1.10^{-3} M- CuSO_4
 (○) 1.10^{-3} M-EDTA
 (●) Actin alone

Each 5 ml. sample contained
 14.1 mg. actin

Each 5 ml. sample contained
 11.7 mg. actin

At various time intervals the samples were deproteinized by addition of 0.5 ml. 60% perchloric acid. After centrifugation, the optical density at $280\text{ m}\mu$ was determined in the supernatants and the amount of protein was estimated in the precipitates. Ordinate: upper part, the increase of optical density in the supernatants; lower part, the decrease of amounts of protein in the precipitates

either native or heat denaturated (Fig. 4). The most suitable substrate for the studied proteinase was haemoglobin, its degradation rate being the highest.

The muscle proteinase investigated by Snoke and Neurath [16] was activated by Fe^{2+} ions. We have also observed a higher increase in optical density at 280 $m\mu$ when Fe^{2+} ions ($\text{Fe}(\text{NH}_4)_2(\text{SO}_4)_2$ or FeCl_2) were present than without them (Fig. 5). This activation, however, seemed to be untrue since the amounts of undecomposed protein precipitated with perchloric acid were in the samples with Fe^{2+} the same or even somewhat higher than in the control. The determination of nitrogen in the supernatants confirmed the lack of activation in the presence of ferrous ions. (For instance, in one experiment the increase in optical densities at 280 $m\mu$ was for the samples with FeCl_2 1.625 and for the control 0.169 only, whereas the amount of decomposed protein found in supernatant corresponded to 0.91 mg. and 1.02 mg, protein, respectively). In view of the easy oxidation of Fe^{2+} to Fe^{3+} ions which show an absorption in UV all the samples examined for the effect of iron were always determined against blanks containing ferrous ions incubates under identical conditions. The higher increase in optical density observed during incubation of protein with Fe^{2+} was due, perhaps, to the higher rate of the oxidation of ferrous ions in the presence of protein.

Table 2

The influence of ATP concentration on the autolytic activity of actin

Actin (water extract from "butanol powder") was incubated at 0° in acetate buffer, pH 3.6, with various amounts of ATP. Two ml. samples (containing 3,3 mg. of actin) was deproteinized with perchloric acid. After removing of the precipitate the volume was adjusted to 5 ml. and the optical density at 280 $m\mu$ was determined

Sample	Incubation time (days)	Nucleotides (μ moles/g. protein)		ΔE_{280}
		present in actin	added	
I	7	62	—	0.202
	9	62	—	0.220
II	7	62	72	0.188
	9	62	72	0.178
III	7	62	144	0.185
	9	62	144	0.200
IV	7	62	216	0.200

The proteinase present in the actin preparations was activated by CN ions as well as by cysteine and glutathione and by EDTA. Diisopropylfluorophosphate (DFP) inhibited the proteolytic activity to a slight degree only, while a considerable inhibitory effect was exerted by monoiodoacetic acid and by CuSO_4 (Fig. 5).

The influence of the ATP concentrations upon the proteolytic activity was investigated since the actin preparations contained always some

Table 3

The influence of repeated precipitation of actin at the isoelectric point on its autolytic activity

The solution of "crude actin" was precipitated using acetate buffer at pH 4.7. After centrifugation the precipitate was dissolved using few drops of 5% NaHCO₃. The volume was adjusted to the initial value and the precipitation procedure was repeated. Four ml. samples were incubated at 37° in acetate buffer at pH 4.1 during 17 hrs. Afterwards 1 ml. water was added and the reaction was stopped by addition of 0.5 ml. 60% perchloric acid. After centrifugation the optical density at 280 m μ was determined in the supernatants

	ΔE_{280} in the sample	Protein in the sample (mg.)	Specific activi- ty (ΔE_{280} /mg. protein)	Nucleotide re- maining (%)
Crude actin	0.100	15.7	0.0064	100.0
Precipitated once	0.073	13.9	0.0053	54.5
Precipitated twice	0.084	13.3	0.0063	38.7
Precipitated three times	0.059	11.0	0.0054	33.0

adenine nucleotides. It could be seen in Table 2 that no effect upon the autolytic activity of the actin preparations was observed when ATP was added to the reaction mixture, nor when its concentration was lowered (Table 3).

Table 4

The influence of various methods of purification of actin on its autolytic activity

I. Actin from "the acetone powder": A — crude water extract, B — water extract purified by threefold precipitation with 0.025 M-MgCl₂ [3]. II. Actin from "the butanol powder": A — water extract, B — 30% acetone, ATP and ascorbic acid extract, precipitated at isoelectric point and dialysed against ATP and ascorbic acid solution [19]. Crude actin (IA) was centrifuged after polymerisation during 2 hrs. at 105 000 g [12]. The pellets were dissolved in 0.1 M-KCl. 5 ml. samples were incubated at 37° in acetate buffer at pH 4.0. The reaction was stopped by addition of 0.5 ml. 60% perchloric acid, and after centrifugation the optical density at 280 m μ was determined in the supernatants

Actin preparation	Incubation time (hours)	ΔE_{280} in the sample	Protein in the sample (mg.)	Specific activity (ΔE_{280} /mg. protein)	Enzymic activity (%)
I A	24	0.522	14.5	0.0363	100
B	24	0.145	16.5	0.0088	24
II A	24	0.522	11.0	0.0473	131
B	24	0.705	14.6	0.0485	133
IA	18	0.155	15.2	0.0102	100
IA ultracentri- fuged once	18	0.128	14.8	0.0086	84
IA ultracentri- fuged twice	18	0.061	10.9	0.0056	55

It seemed to be of interest to investigate whether it was possible to remove the autolytic activity from the actin preparations during their purification. The repeated precipitation of actin at its isoelectric point (pH 4.7) resulted in an only insignificant decrease of the activity although nucleotides contained in actin were removed to a considerable degree under such conditions (Table 3).

The effects of some other methods of the actin purification upon its autolytic activity are presented in Table 4. All activities were referred to the activity of "crude actin", i.e. that of the water extract from "acetone powder". As it was shown in Table 4 the method of actin purification after Tsao and Bailey [19] resulted even in some increase of activity what might be due to the withdrawal of some part of the enzymically inert material. The method of Mommaerts [12] consisting in ultracentrifugation of the F-actin allowed to decrease the autolytic activity, to a smaller degree, however, than did the method of Barany *et al.* [3] consisting in the precipitation of F-actin with magnesium ions.

DISCUSSION

Several authors have shown that the actin preparations contained various enzymes bound to them and deriving from the protein fraction extracted with salt solutions of low ionic strength from muscles. There is no consistence, however, in opinions concerning the possibility of the separation of these enzymes from actin. Lubimowa and Popowa [11] have easily succeeded in removing creatine phosphokinase activity by precipitation of actin at its isoelectric point, whereas Szörenyi and Degtár [18] as well as Feuer and Wollemann [6] have reported that creatine phosphokinase was bound very tightly to actin. Szent Györgyi [17] has stated that myokinase, contrary to deaminase, was not liberated by isoelectric precipitation. Barany *et al.* [3] have succeeded, however, in withdrawal of the activities of all these enzymes by means of repeated precipitation of F-actin with $MgCl_2$, while ultracentrifugation applied by these authors according to Mommaerts [12] resulted only in a partial removing of the creatine phosphokinase activity.

Using several methods of actin purifications, we were able to state that the proteolytic activity was very strongly bound to this protein. Only an insignificant decrease in this activity was obtained by the precipitation of actin at its isoelectric point. The Tsao and Bailey method [19] allowing to obtain electrophoretically homogenous, tropomyosin-free, preparations of actin led in our experiments even to a slight increase in autolytic activity. The ultracentrifugation of F-actin lowered only partially the proteinase activity. The best purification, however, was obtained when method of Barany *et al.* [13] was applied.

It was of interest that this enzyme was bound to actin so tightly, whereas none of the other structural muscle proteins revealed any proteolytic activity. Nardone [13] has reported some observations on the distribution of proteolytic enzymes in various fractions of muscle proteins. On the contrary to the data presented by Snoke and Neurath [16] and to the results obtained in the present paper, Nardone has not found any cathepsin activity in the fraction extracted with solutions of low ionic strength. A proteolytic activity found by Nardone in the myosin fraction was probably due to the presence of actin in his preparations of myosin because the method applied by Nardone (extraction with Weber-Edsall solution for 2 hours) led to the extraction of some actomyosin and not of pure myosin. Therefore, the preparations obtained by Nardone might exhibit some proteolytic activity, due to the presence of actin, because pure myosin did not contain any proteolytic enzyme as it was proved by the present observations.

Muscle proteinases have been rather scarcely investigated, as yet. The enzyme we have found in actin corresponded in its optimum pH value to that discovered by Balls [2] and isolated by Snoke and Neurath [16] from the fraction of muscle proteins soluble at low ionic strength. Cathepsins present in stomach juice, as well as in pepsin preparations, were also characterized by nearly the same optimum pH [4, 8, 15]. The Balls muscle proteinase was resistant to CN^- [2], while we have observed a very distinct activation of the enzyme in the presence of these ions just as it has been found with other cathepsins [4, 8, 15].

The enzyme we have found in actin was not inhibited with 10^{-3} M-DFP behaving in this aspect like papain [8]. The enzyme activation by cysteine and glutathione as well as its inhibition by iodoacetate and Cu^{2+} ions proved that it belonged to typical enzymes requiring free SH groups for their action.

According to Snoke and Neurath [16], as well as to Koszalka and Miller [9], the muscle proteinase was activated by Fe^{2+} ions. This activation, however, seems to be apparent, and it was probably due to some difference in the oxidation rate of Fe^{2+} to Fe^{3+} between the samples containing the enzyme and the blank ones without protein. The parallel measurements of the increase in optical density at 280 m μ in the supernatants and of the decrease in protein content proved that Fe^{2+} ions did not increase and even somewhat diminish the rate of protein degradation by the examined proteinase.

The proteinase present in actin split the muscle proteins at a rather low rate. Our results have been consistent with the observations of other authors [9, 16] that the rate of haemoglobin degradation by muscle proteinase was considerably higher than that of the muscle proteins.

It may be noted that the addition of serum albumin, both native and heat denaturated, to actin decreased considerably the reaction rate. It should be elucidated whether this phenomenon was due to the presence of some proteolysis inhibitor in albumin.

The actin degradation at pH about 4 is delayed after some period of time, but this phenomenon is not due to the enzyme inactivation since the enzyme incubated even for several days at 37° and pH 3.9 retained its nearly unaltered activity towards haemoglobin added (Table 1). Snoke and Neurath [16], however, stated that the activity of the muscle proteinase decreased as much as by 31% after 1 hour incubation at pH 4.

Some part of the products of actin hydrolysis appears to be substances of a rather high molecular weight. Perchloric acid does not precipitate them but molybdic acid does so. The content of such peptides is higher when the reaction has been carried out at pH 2.5. Some other authors have also observed the occurrence of some intermediates of a high molecular weight on the action of proteolytic enzymes at low pH [8].

It seems possible that the proteolytic activity bound so tightly to actin might modify somewhat its properties in acid pH values. It is generally admitted that the loss of the specific properties of actin (the ability to polymerize and to combine with myosin) on precipitation at isoelectric point (pH 4.7) is due to the removal of the nucleotides contained in actin. The results of this work do not exclude, however, another possibility, namely that the irreversible loss of those properties at pH 4.7 may be due to an even slight proteolysis caused by the proteinase acting at this pH. This problem will be the object of further studies.

I wish to thank Prof. W. Niemierko for advice and criticism in the course of this work, and Mrs. A. Jurowska and Mgr. L. Nowak for technical assistance.

SUMMARY

The presence of a proteolytic enzyme strongly bound to actin was demonstrated. The method of actin purification after Tsao and Bailey [19] led even to a slight increase of the enzyme activity. The precipitation at isoelectric point did not result in any loss of proteolytic activity. The ultracentrifugation of F-actin according to Mommaerts [12] allowed to withdraw partially the proteinase. The best method for actin purification, however, seemed to be the precipitation with Mg^{2+} ions [3].

The proteolytic enzyme present in actin is characterized by pH optimum 3.9. KCN, EDTA, cysteine and glutathione do activate the

enzyme. Fe^{2+} ions do not activate the proteolytic activity, while DFP inhibited it only to a very slight degree. Monoiodoacetic acid and Cu^{2+} ions appeared to be strong inhibitors of the proteinase. Haemoglobin was split at the highest reaction rate as compared to such substrates as myosin and actin itself. The proteolytic activity of actin was decreased in the presence of serum albumin.

REFERENCES

- [1] Bailey K., *Biochem. J.* **43**, 271, 1948.
 [2] Balls A. K., *Ice and Cold Storage* **41**, 143, 1938 (cit. after [16]).
 [3] Barany M., Biro N. A., Molnar J., Straub F. B., *Acta Physiol. Acad. Sci. Hung.* **5**, 369, 1954.
 [4] Buchs S., *Enzymologia* **13**, 208, 1949.
 [5] Butler J. A. V., Dodds E. C., Phillips D. M. P., Stephen J. M. L., *Biochem. J.* **42**, 116, 1948.
 [6] Feuer G., Wollemann M., *Acta Physiol. Acad. Sci. Hung.* **3**, 277, 1952.
 [7] Gornall A. G., Bardanill C. J., David H. M., *J. Biol. Chem.* **177**, 751, 1949.
 [8] Green M. N., Neurath H., in *The proteins* (H. Neurath, K. Bailey eds.) vol. IIB p. 1174, Academic Press, New York, 1954.
 [9] Koszalka T. R., Miller L. L., *Feder. Proc.* **17**, 257, 1958.
 [10] Laki K., Clark A. M., *J. Biol. Chem.* **191**, 599, 1951.
 [11] Lubimowa N. M., Popowa G. M., *Doklady Akad. Nauk SSSR* **66**, 433, 1949.
 [11a] Mejbaum W., *Z. Physiol. Chem.* **258**, 117, 1939.
 [12] Mommaerts W. F. H. M., *J. Biol. Chem.* **198**, 445, 1952.
 [13] Nardone R. M., *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* **80**, 756, 1952.
 [14] Perry S. V. in *Methods in Enzymology* (Colowick S. P., Kaplan N. O. eds) Vol. 2, p. 582, Academic Press, New York, 1955.
 [15] Ramer Z., *Z. Physiol. Chem.* **296**, 73, 1954.
 [16] Snoke J. E., Neurath H., *J. Biol. Chem.* **187**, 127, 1950.
 [17] Szent-Györgyi A. G., *Arch. Biochem. Biophys.* **31**, 97, 1951.
 [18] Szörenyi E. T., Degtar R. G., *Ukrain. Biochim. Žurn.* **22**, 135, 1950.
 [19] Tsao T. C., Bailey K., *Biochim. Biophys. Acta* **11**, 102, 1953.

PROTEOLITYCZNA AKTYWNOŚĆ PREPARATÓW AKTYNU

Streszczenie

W preparatach surowego aktynu wykazano obecność silnie związanego z nim enzymu proteolitycznego. Metoda oczyszczania aktynu wg Tsao i Bailey'a [19] prowadzi nawet do niewielkiego zwiększenia aktywności enzymu. Strącenie w punkcie izoelektrycznym nie pozbawia aktynu aktywności proteolitycznej. Ultrawierowanie F-aktynu wg Mommaerts [12] pozwala na częściowe usunięcie proteiny, najlepszą jednak wydaje się być metoda oczyszczania aktynu przez strącanie jonami magnezu [3].

Proteolityczny enzym obecny w aktynie posiada optimum działania w pH 3.9. KCN, EDTA, cysteina i glutation aktywują enzym. Jony Fe^{2+} nie aktywują proteinazy, a DFP hamuje ją w bardzo nieznacznym stopniu. Silnymi inhibitorami enzymu są kwas monojodooctowy i jony Cu^{2+} . Z badanych białek: — aktyn, miozyn, hemoglobina — najszybciej ulega rozkładowi ta ostatnia. W obecności albuminu surowicy proteolityczna aktywność aktynu jest zmniejszona.

Otrzymano 17.3.1960

EWA LENARTOWICZ

**THE EFFECT OF LOW TEMPERATURE UPON PHOSPHORUS
METABOLISM IN *GALLERIA MELLONELLA* LARVAE**

Department of Biochemistry, Nencki Institute of Experimental Biology, Warsaw
Head of the Department: Prof. Dr. W. Niemierko

It was observed earlier in this laboratory (S. Niemierko, unpublished data) that when *Galleria mellonella* larvae were kept at a low temperature the content of inorganic phosphate in the body highly increased. Thus it seemed to be of interest to elucidate the source of the additional orthophosphate and to follow the influence of low temperature upon the content of other acid soluble phosphorus compounds in these animals.

The influence of low temperature upon phosphorus metabolism in insects was not investigated as yet, whereas it was stated in homiothermic animals that ATP and sometimes phosphocreatine were split off on chilling [1, 8, 16, 20].

MATERIAL AND METHODS

Wax moth larvae (*Galleria mellonella* L.) were bred at 30°, the optimum temperature for this species. The experiments were performed on fully grown larvae, weighing 150 to 200 mg. The effect of chilling was investigated at 4°, 0° and -6°. Three to six parallel experiments of each kind were performed. The tested groups of larvae were composed of 10 to 100 individuals depending on the amount of material which was necessary for analyses.

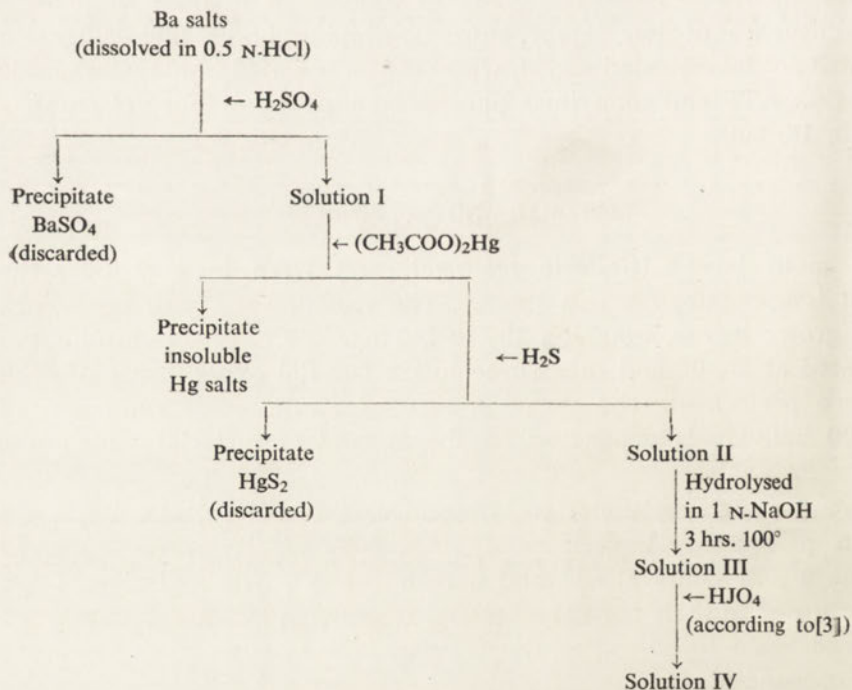
The rather high resistance to low temperature of the wax moth was stated in preliminary experiments. Thus, 50% of the larvae survived 5 days at 0°, 24 hours at -4° and 8 hours at -6°. The majority of the larvae returned to their normal state and underwent metamorphosis when transferred again to 30° after the chilling periods slightly shorter than those mentioned above.

The larvae were extracted with 10% TCA (trichloroacetic acid) at 0° (10 ml. of 10% TCA per ten individuals). In the extract there were

estimated inorganic phosphate, phosphates split off after 1 minute, 10 minutes and after 3 hours hydrolysis with 1 N-HCl at 100°, as well as the total amount of the acid soluble phosphorus after digestion with concentrated HNO₃ and H₂SO₄ [12]. The difference between the total amount of the acid soluble phosphorus and that of inorganic phosphorus contained in the sample after 3 hours of hydrolysis gave the value for the phosphorus of compounds which did not liberate orthophosphate on hydrolysis ("non-hydrolysable phosphorus compounds"). Orthophosphate was determined according to the Fiske and Subbarow method [9].

The fraction of "non-hydrolysable phosphorus compounds" was further examined by means of chemical methods, as well as by column chromatography.

Chemical methods. In order to isolate "non-hydrolysable phosphorus compounds" the TCA extract was hydrolysed for 3 hours with 1 N-HCl at 100°, following which the whole orthophosphate was precipitated with calcium salts according to Fiske and Subbarow [10]. Thus only "non-hydrolysable compounds" remained in the solution. They were separated after Umbreit *et al.* [17] into three following fractions: 1) water insoluble



Scheme of fractionation of phosphorus compounds giving water soluble, alcohol insoluble barium salts. After Kaplan and Greenberg [11], slightly modified

barium salts, 2) water soluble, alcohol insoluble barium salts, and 3) water and alcohol soluble barium salts.

The second fraction was further separated after Kaplan and Greenberg [11] according to the scheme given. The following groups of compounds were estimated:

1. Compounds producing the insoluble mercury salts — calculated from the difference between the total phosphorus contents of the solutions I and II.

2. The sugar phosphates — calculated from the amount of orthophosphate in solution III.

3. Glycerophosphates — calculated from the difference between the amounts of orthophosphate in the solution IV and III.

4. Other phosphorus compounds — calculated from the difference between the total and the inorganic phosphorus in the solution IV.

Chromatographic procedure. The TCA extract of the larvae was heated at 100° for 4 hours and the trichloroacetic acid was removed by repeated extraction with ether. The solution, adjusted to pH 8 with ammonium hydroxide, was fractionated on the column filled with Amberlite IRA 400 (formate form). The gradient elution with formic acid was performed; the applied concentrations of the acid was from 0.05 N up to 2 N; finally, the column was eluted with 2 N-ammonium formate; fraction volume was 15 ml. In each of the fractions orthophosphate and total phosphorus were determined which enabled to calculate the amount of the organic phosphorus compounds.

The fractions corresponding to individual "peaks" were combined together. In order to identify the compounds present in these fractions some qualitative tests were performed (ninhydrine and anthrone reactions and alkaline hydrolysis), as well as an ascending paper chromatographic separation was made. The following 3 solvent systems were employed in each case: 1) methanol - formic acid - water (16 : 3 : 1) [2], 2) ethanol - acetic acid - water (83 : 1 : 16) [6], and 3) acetic acid - ethyl acetate - water (3 : 3 : 1) [18]. Whatman No. 1 filter paper was used. Chromatograms were developed for 18 hours. Phosphorus containing spots were detected according to Bandurski and Axelrod [2].

RESULTS

Changes in the content of acid soluble phosphorus compounds

It can be seen from Table 1 that under influence of low temperature an increase in inorganic phosphate in the larval body takes place, while the content of "non-hydrolysable compounds" (P_{nh}) appears to decrease, indicating thus that some splitting of these compounds does occur.

Although the variations in the "non-hydrolysable compounds" content found in different experiments are considerable (as indicated by values for standard deviation of the mean) nevertheless, the differences found between the amounts of this fraction in the control larvae and the larvae chilled during 7 hours at -6° , 3 days at 0° and 4 days at 4° are statistically significant ($P < 0.01$), as stated by means of the "t" test for the differences between the groups. Changes induced by a shorter chilling are not statistically significant and point only to some tendency to a decrease in the content of these compounds. The changes, however, occurring in the amount of orthophosphate during all the short chilling periods, mentioned in the Table, are statistically significant ($P < 0.01$). The lower was the temperature at which the larvae were kept, the earlier the increase in the orthophosphate was observed.

Table 1

Effect of low temperature on the content of acid soluble phosphorus compounds in Galleria mellonella larvae

Mean values and standard deviations expressed as mg% P of the fresh body weight. P in — inorganic phosphorus; P₁, P₁₀, P₁₈₀ — phosphorus liberated after 1, 10 and 180 minutes of hydrolysis in 1 N-HCl at 100° ; P_{nh} — phosphorus of "non-hydrolysable compounds"; P_{a.s.} — total acid soluble phosphorus

Temp.	Duration of chilling	No of expts	P _{in}	P ₁	P ₁₀	P ₁₈₀	P _{nh}	P _{a.s.}
-6°	0	9	14,1±1,1	6,3±1,1	20,0±2,2	7,9±2,1	76,0± 8,7	124,0±7,2
	1 hour	4	17,0±1,6	5,6±0,8	21,4±3,8	8,6±3,1	73,1± 5,8	125,7±7,8
	3 hours	4	18,0±2,8	6,0±1,2	17,8±2,2	8,5±3,0	70,9± 5,8	121,2±4,5
	5 hours	6	23,4±2,5	5,6±1,0	17,9±2,0	8,9±1,5	66,6±11,2	122,4±8,6
	7 hours	6	26,0±1,7	4,6±1,6	18,0±1,6	10,3±0,7	64,5± 5,5	123,4±7,5
0°	0	4	14,3±1,8	5,4±1,3	22,9±1,0	10,0±2,4	76,0± 4,5	128,6±6,3
	1 day	2	20,9					
	2 days	2	25,2					
	3 days	4	28,3±2,1	6,9±1,7	21,2±1,3	10,1±1,9	61,1± 6,5	127,6±7,1
$+4^{\circ}$	0	4	13,8±1,3	6,4±1,7	17,7±2,2	9,4±0,6	69,8±7,9	117,1±4,9
	1 day	4	17,8±2,5	9,4±1,7	17,1±1,8	12,4±0,8	63,3±5,4	120,0±7,9
	2 days	4	25,9±2,9	6,9±1,0	15,4±0,7	10,8±1,4	53,5±5,0	112,5±7,8
	4 days	4	27,1±2,2	5,9±0,8	15,3±0,8	10,8±1,1	55,2±6,9	114,3±6,0

On the other hand, as proved by statistical analysis of the results, the amount of hydrolysable phosphorus compounds and the amount of the total acid soluble phosphorus do not show any significant changes.

When after three days of chilling at 0° the larvae were kept at 30° during 24 hours the content of the phosphorus compounds appeared

Table 2

Acid soluble P compounds in Galleria mellonella larvae kept at 30° after 3 days of chilling at 0°

Mean values of 4 experiments expressed as mg% P of the fresh body weight, \pm standard deviations. Symbols as in Table 1

	P _{in}	P ₁	P ₁₀	P ₁₈₀	P _{nh}	P _{a.s.}
Control	14,5 \pm 0,8	6,2 \pm 1,0	18,5 \pm 1,4	8,9 \pm 1,6	75,0 \pm 8,5	123,1 \pm 9,3
Immediately after chilling	26,2 \pm 2,6	8,8 \pm 2,1	18,4 \pm 1,7	8,6 \pm 1,3	57,4 \pm 4,3	119,9 \pm 5,2
Kept, after chilling during 1 day at 30°	14,6 \pm 1,1	5,7 \pm 1,3	18,3 \pm 1,1	9,6 \pm 1,3	73,5 \pm 5,3	121,1 \pm 6,4

to be quite normal (Table 2). These results indicate that the changes which take place during chilling are reversible.

Changes in the "non-hydrolysable phosphorus compounds"

In order to establish which substances present in the fraction of "non-hydrolysable phosphorus compounds" are split during chilling for 3 days at 0° the fraction was further separated by chemical and by chromatographical methods.

Table 3

Content of different fractions of "non-hydrolysable phosphorus compounds" in Galleria mellonella larvae chilled during 3 days at 0°

Fractionation according Umbreit *et al.* Mean values of 4 experiments and expressed as mg% P of the fresh body weight, \pm standard deviations

Larvae	"Non-hydrolysable compounds"	Ba salts		
		Water insoluble	Water soluble, alcohol insoluble	Water and alcohol soluble
Control	68,3 \pm 8,0	1,9 \pm 0,9	62,0 \pm 8,1	3,1 \pm 2,4
Chilled	55,8 \pm 8,7	1,1 \pm 0,6	49,3 \pm 7,7	4,8 \pm 2,8

The results of the fractionation performed according to Umbreit *et al.* [17] are presented in Table 3. It can be seen that approximately 90% of this phosphorus fraction constitutes of "barium soluble alcohol insoluble compounds" and that the amount of just this fraction is considerably lowered on chilling.

It was possible to achieve some general characteristics of the composition of this fraction by means of the Kaplan and Greenberg method [11]. The results presented in Table 4 indicate that in the control larvae nearly one half of this fraction is not precipitated with mercury and is resistant to an alkaline hydrolysis as well as to oxidation with periodate (the fraction is indicated in the Tables as "other compounds"). The next, as to the size, group of substances constitutes of glycerophosphate and of compounds precipitated by mercury salts, while the amount of sugar phosphates is fairly small.

The main difference between the chilled larvae and the control ones was found in the amount of glycerophosphate. After 3 days of chilling at 0° the quantity of this compound diminished to one third of the initial value.

Table 4

Effects of chilling Galleria mellonella larvae during 3 days at 0° on the content of different fractions of phosphorus compounds giving water soluble, alcohol insoluble barium salts

Fractionation according Kaplan and Greenberg. Mean values of 4 experiments expressed as mg% P of the fresh body weight, \pm standard deviations

Larvae	Water soluble, alcohol insoluble Ba salts	Insoluble Hg salts	Sugar-phosphate esters	Glycero-phosphate	Other compounds
Control	71,1 \pm 4,7	15,2 \pm 3,7	3,7 \pm 1,6	18,2 \pm 1,9	32,4 \pm 1,7
Chilled	55,1 \pm 5,9	13,0 \pm 3,5	3,3 \pm 2,4	5,8 \pm 2,7	30,0 \pm 1,7

The column chromatographic separation of the phosphorus fractions was performed as described in Material and Methods. According to the manner of preparation the only phosphorus compounds which were present in solution used for separation consisted of "non-hydrolysable compounds" and orthophosphate. Most of organic phosphorus compounds (80%) and all the inorganic phosphate were adsorbed on Amberlite IRA 400. The results of the fractionation are presented in Fig. 1.

The first eluted component (A), containing nearly 40% of phosphorus of the "non-hydrolysable fraction" was highly resistant both to acid and alkaline hydrolysis and gave a positive ninhydrine reaction. This fraction was identified as phosphoethanolamine by means of paper chromatography after comparison with phosphoethanolamine prepared after Outhouse [13]. The high content of phosphoethanolamine in the larvae explains the finding of large amount of "other phosphorus compounds" obtained by a chemical fractionation (Table 4).

The second component (B) was resistant to acid and alkaline hydrolysis and was easily oxidized in the presence of periodate. It was identified as glycerophosphate by comparison with standard glycerophosphate (BDH preparation) by means of paper chromatography.

In addition, two other phosphorus compounds were eluted (D and E) which did not undergo any change on chilling and were present in considerable smaller amounts. They were not identified, as yet.

It can be seen in Fig. 1 that the composition of the phosphorus compounds in chilled larvae differs from that of the control ones in its much

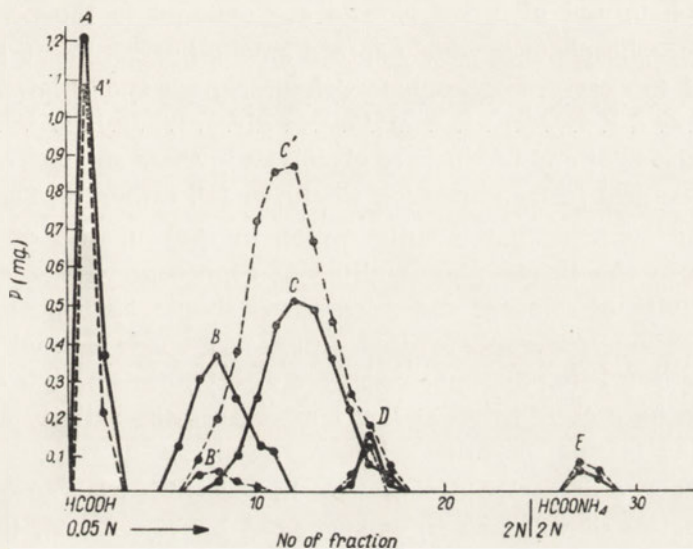


Fig. 1. "Non-hydrolysable phosphorus compounds" and orthophosphate in *Galleria mellonella* larvae. Chromatographic separation on Amberlite IRA 400 (formate), gradient elution with HCOOH followed by HCOONH₄. Fraction volume — 15 ml. (A), phosphoethanolamine, (B), glycerophosphate, (C), orthophosphate from the control larvae. (A'), (B'), (C'), the same compounds from the larvae chilled for 3 days at 0°. (D) and (E) — unidentified compounds

lower content of glycerophosphate and respectively higher content of inorganic phosphorus (C).

In order to elucidate whether the investigated compounds were not artificial products formed during heating of the extract similar analyses were performed with a nonhydrolysed TCA extract. Since phosphoethanolamine and glycerophosphate were found also in this case, in approximately the same amounts as previously, one can suppose that these compounds were not artefacts.

By means of Burmaster method [3] it was possible to demonstrate that the glycerophosphate present in the larvae is α -glycerophosphate.

DISCUSSION

The results presented above indicate that under the influence of low temperature on *Galleria mellonella* larvae an alteration of phosphorus metabolism occurs. The content of α -glycerophosphate present in the body decreases considerably and a corresponding amount of orthophosphate is accumulated. Other acid soluble phosphorus compounds do not show any significant change under these conditions. When the chilled larvae are again transferred to the optimum temperature (30°) the content of orthophosphate and glycerophosphate are restored to the normal level.

α -Glycerophosphate is widely spread among insects. Because of a high activity of the α -glycerophosphate dehydrogenase and a low activity of the lactic acid dehydrogenase in insects glycerophosphate is considered as one of the chief end products of glycolysis in these animals, corresponding to lactic acid in mammals (cf. Chefurka [4], Chino [5], Sacktor [14]).

One can suppose that the diminution in the quantity of α -glycerophosphate in the larvae after chilling is connected with a disturbance in the activity of some of the enzymes. It should be believed that the cleavage of glycerophosphate does occur also under normal conditions of temperature, being accompanied by the resynthesis of this compound. It seems to be probable that at low temperature the activity of enzymes participating in this resynthesis is suppressed.

The cleavage of α -glycerophosphate in the chilled larvae could be of some biological significance if, as suggested by Wyatt [19], this process would result in the liberation of free glycerol. The appearance of a large amount of free glycerol, reaching up to 10% of body weight was observed in ants *Camponotus pennsylvanicus* [7] and in wasps *Bracon cephi* [15] on chilling. Since free glycerol lowers considerably the freezing point of the cytoplasm it is suggested [7, 15] that accumulation of glycerol may increase the resistance of insects to low temperature. The amounts of glycerol found in ants and in wasps at low temperature exceed, however, considerably the amount of α -glycerophosphate present in insects under normal conditions. It may be therefore supposed that α -glycerophosphate would be only an intermediate in the process of the glycerol formation.

The author would like to express her gratitude to Docent Dr. Stella Niemierko for suggesting and supervising this investigation, and to Professor Dr. W. Niemierko for his helpful discussions and advice in writing this paper.

SUMMARY

1. Effect of low temperature (4° , 0° and -6°) on various acid soluble phosphorus compounds in *Galleria mellonella* larvae has been studied.

2. After chilling a diminution of the content of α -glycerophosphate and a corresponding increase of the amount of orthophosphate has been observed, whereas other soluble phosphorus compounds remain unchanged. When, after chilling the larvae are again kept at their optimum temperature (30°) the content of the acid soluble phosphorus compounds returns to the normal value.

3. It has been stated that phosphoethanolamine forms about 20% of the total quantity of acid soluble phosphorus compounds.

REFERENCES

- [1] Albaum H., Milch W., *Am. J. Physiol.* **181**, 269, 1955.
- [2] Bandurski R., Axelrod B., *J. Biol. Chem.* **193**, 405, 1951.
- [3] Burmaster C., *J. Biol. Chem.* **164**, 233, 1946.
- [4] Chefurka W., *Proc. IV Int. Congress Biochem., Vienna*, **12**, 115, Pergamon Press, London, 1958.
- [5] Chino H., *J. Insect Physiol.* **2**, 1, 1958.
- [6] Cohen S., Scott D., *Science* **111**, 2890, 1950.
- [7] Dubach P., Pratt D., Smith F., Stewart C., *Nature* **184**, 288, 1959.
- [8] Fedorowa N., *Vaprosy Med. Chimii* **3**, 301, 1957.
- [9] Fiske C., Subbarow Y., *J. Biol. Chem.* **66**, 375, 1925.
- [10] Fiske C., Subbarow Y., *J. Biol. Chem.* **81**, 629, 1929.
- [11] Kaplan N., Greenberg D., *J. Biol. Chem.* **156**, 511, 1944.
- [12] Lohmann K., *Biochem. Z.* **194**, 306, 1928.
- [13] Outhouse E., *Biochem. J.* **31**, 1495, 1937.
- [14] Sacktor B., *Proc. IV Int. Congress Biochem., Vienna*, **12**, 138, Pergamon-Press, London, 1958.
- [15] Salt R., *Nature* **181**, 1281, 1958.
- [16] Szentkiralyi E., *Arch. Biochem. Biophys.* **67**, 298, 1957.
- [17] Umbreit W., Burris R., Stauffer J., *Manometric Techniques*, Minneapolis, Burgess Publishing Co, 270, 1957.
- [18] Wyatt G., Loughheed T., Wyatt S., *J. General Physiol.* **39**, 853, 1956.
- [19] Wyatt G., Meyer W., *J. General Physiol.* **42**, 1005, 1959.
- [20] Zimny M., Gregory R., *Science* **129**, 1363, 1958.

WPLYW NISKICH TEMPERATUR NA METABOLIZM FOSFOROWY U GĄSIENIC
GALLERIA MELLONELLA

Streszczenie

1. Przebadano wpływ ziębienia gąsienic *Galleria mellonella* w temperaturach 4° , 0° i -6° na różne frakcje związków fosforowych rozpuszczalnych w kwasach.

2. Stwierdzono, że pod wpływem ziębienia gąsienic następuje zmniejszenie zawartości α -glicerofosforanu i pojawienie się odpowiadającej ilości ortofosforanu. Pozostałe frakcje związków fosforowych nie wykazują w tych warunkach istotnych różnic. Powstające podczas ziębienia zmiany zostają cofnięte po przeniesieniu gąsienic do optymalnej dla nich temperatury (30°).

3. Stwierdzono występowanie u gąsienic *Galleria mellonella* dużych ilości fosfoetanolaminy, około 20% wszystkich związków fosforowych rozpuszczalnych w kwasach.

Otrzymano 5.5.1960

J. BUCHOWICZ and I. REIFER

THE CONVERSION OF OROTIC ACID TO PYRIMIDINE DERIVATIVES IN PLANT MATERIAL

*Zakład Biochemii Roślin, Instytut Biochemii i Biofizyki PAN, Warszawa
(Department of Plant Biochemistry, Institute of Biochemistry and Biophysics, Polish
Academy of Sciences, Warsaw)*

Many workers have shown in recent years (see Ref. [9] and [3] for review) that orotic acid (OA)¹ is an intermediate product in the biosynthesis of pyrimidine nucleotides in microorganisms as well as in animal tissue. In our previous studies [10] we were able to show that higher plants may also utilize L-carbamylaspartic acid for the biosynthesis of substances containing the pyrimidine ring, namely OA and uridine.

When it became apparent that OA may arise in considerable quantities from CA, the idea was entertained to investigate its possible further path, particularly as the metabolism of this substance into other pyrimidines, nucleosides and nucleotides has thus far not been investigated in the higher plants.

In this paper we report about the influence of feeding of OA into young plants and excised blades of wheat seedlings, with the view of providing some information regarding the normal metabolic intermediates in the biosynthesis of the pyrimidine nucleotides.

MATERIALS AND METHODS

In the following experiments, wheat seedlings Variety "Ostka Chłopicka" were used throughout. Two different methods of feeding were employed: (a) short-term feeding of young excised blades not exceeding 8 hours of incubation (Exp. 1 and 2) and (b) long-term incubation under sterile conditions of whole plants, starting from the seed up to the sixth day of growths (Exp. 3).

¹ The following abbreviations are used: CA, L-carbamylaspartic acid; CMP, cytidine-5'-monophosphate; OA, orotic acid; UMP, uridine-5'-monophosphate.

In the case of short-term feeding the plant material was prepared as already described [10]. 3 g. of six day old plants were immersed with the cut ends in 2 ml. of a solution, containing 10 μ moles of OA. During the entire period of incubation, the blades were exposed to direct sunlight in order to hasten transpiration. In the long-term experiments, about 5 g. of seeds were germinated on a 1% agar medium, containing 250 μ moles of OA per 50 ml. of tap water. After 2 days of germination in the dark, the seedlings were transferred to an illuminated thermostat, incubated for another 4 days at 26° and harvested. The control plants were grown exactly under the same conditions, except that agar medium contained no OA.

The preparation of the plant material for further treatment was different in each of the three experiments. The blades in exp. 1 were exhaustively washed with water to remove all traces of externally adhering substrate. In exp. 2 the blades together with the non-absorbed remaining solution of OA were employed for further evaluation, while the extracts from the control plants were supplemented with 10 μ moles of OA, corresponding to the initial concentration of the substrate in the treated plants. Finally in exp. 3, samples containing 3 g. of blades were cut off the plants for further treatment. The plant material was then extracted with 100 ml. of cold 0.6 N-HClO₄ [10].

Optical densities were measured in 1 cm. quartz cuvettes using the Soviet type SF-4 spectrofotometer. Ureides were determined by the method of Reifer and Toczko [12] and by the Lazariiev method, as modified by Kleczkowski [6]. Total amino acids were determined by the method of Reifer and Buraczewska [11]. For the estimation of pentoses the method of Mejbaum, modified by Paegge and Schlenk [7] for the determination of ribose in pyrimidine nucleotides was employed. Total phosphorus was determined by the method of Fiske and Subbarow [4] after wet combustion in conc. HClO₄.

OA, CMP, UMP, uridine and uracil were obtained from commercial sources (Nutritional Biochemicals Corporation).

RESULTS

Preliminary tests. Aliquots of acid extracts from the plants fed with OA and the controls were preliminary tested for their content of substances absorbing in ultraviolet light, for ureides and for amino acids.

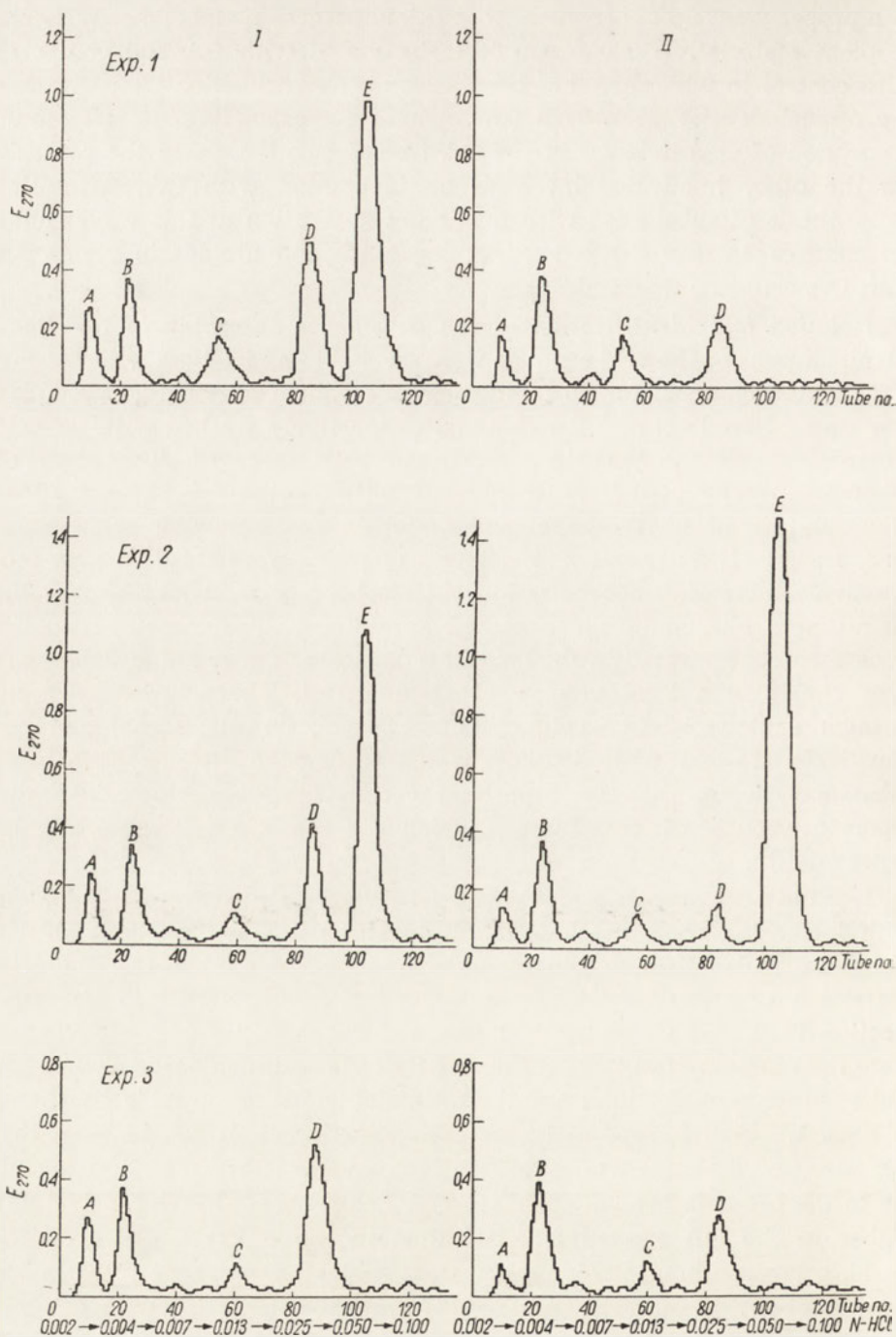
Raw plant extracts are not very suitable for the purpose of ascertaining possible metabolic changes of OA on the path of pyrimidine synthesis, because OA itself shows equally strong absorption in UV light as the pyrimidine nucleotides themselves. Nevertheless it is possible to prove

in a properly set up experiment that OA undergoes metabolic conversions in plant material. When a sample is incubated with OA and compared with control to which OA has been added after incubation (Exp. 2), then the optical density at $280 m\mu$ (wavelength corresponding to maximum absorption of OA) is lower in the OA treated plants than in the controls. On the other hand E_{260} increases on incubation with OA, suggesting biosynthesis of substances with maximum absorption at this wavelength. No changes in the content of amino acids and ureides in plants fed with OA could be detected.

Isolation and identification of the substances absorbing in UV light.

90 ml. aliquots of the acid extracts were treated in an ice-bath with 300 mg. of activated charcoal for 15 minutes with frequent stirring. The solution was then filtered off and the charcoal exhaustively washed with ice-cold water until all the perchloric acid had been removed. The absorbed substances were eluted from the charcoal with 5 successive 50 ml. portions of a mixture of 96% ethanol and water in the following proportions: 1:3, 1:2, 1:1, 2:1, and 3:1. (It was empirically established that progressively increasing concentrations of alcohol are most suitable for the quantitative elution of the absorbed substances). The combined eluates were then concentrated in the cold in a desiccator under reduced pressure over NaOH to a total volume of about 10 ml. The solution was put through a Dowex-1-Cl⁻ column (1.5 × 35 cm., 50-100 mesh) and exhaustively washed with distilled water to remove all non absorbable substances. Thus the UV absorbing products were divided into two separate groups of compounds, which are or are not absorbed on Dowex-1-Cl⁻.

1. Substances absorbed on Dowex-1-Cl⁻ were eluted from the column with increasing concentrations of dilute HCl using the gradient elution technique and collecting 140 separate fractions of 5 ml. each. The concentration of the eluent was increased from 0.002 N-HCl in the first fraction to 0.2 N-HCl in the last one. Optical densities of each fraction were then measured at $270 m\mu$ (mean between maximum absorption of OA and pyrimidine nucleotides) and the results obtained are graphically shown in Figs. 1, 2 and 3, separately for each experiment. It can be seen that the adsorbed material was separated into several substances, corresponding to the peaks in the various diagrams. Peak A was always considerably higher in the OA treated material than in the controls. The fractions 7-14, corresponding to this peak were combined and concentrated in the cold, to about 0.1 ml. The solutions from the plants fed with OA and from the controls were applied in a narrow band of about 0.5 cm. in length on a sheet of Whatman No. 1 filter paper against a reference sample of pure CMP. Descending chromatograms were run at room



Figs. 1, 2 and 3. Grafts of gradient elution of substances absorbed and Dowex-1-Cl⁻. (I), plants feed with orotic acid; (II) control plants. Exps. 1, 2 and 3 see Methods

temperature using Wyatt liquid phase [13]. After drying the chromatograms were cut into horizontal strips of 2 cm. each. The strips were then eluted separately with 5 ml. of 0.1N-HCl and optical densities measured at 280 μ . The reference sample of CMP was recovered from the eluates of two neighbouring strips, corresponding to R_F 0.48 - 0.56 (strips 13 - 14).

Table 1

Optical densities of eluates from chromatograms obtained from peaks of raw plant extracts (Exp. 1) and from reference samples

Strip No.	Fraction of peak A		CMP standard 0.6 μ moles E ₂₈₀	Fraction of peak D		UMP standard 1.0 μ mole E ₂₆₀	Non adsorbed fraction on Dowex-1-C1		Uridine standard 0.25 μ moles E ₂₆₀	Uracil standard 1.5 μ moles E ₂₆₀
	OA fed plants E ₂₈₀	Control E ₂₈₀		OA fed plants E ₂₆₀	Control E ₂₆₀		OA fed plants E ₂₆₀	Control E ₂₆₀		
	1	0.030	0.025	0.020	0.035	0.030	0.020	0.050	0.050	0.040
2	0.015	0.020	0.015	0.025	0.025	0.010	0.040	0.045	0.035	0.030
3	0.020	0.020	0.010	0.020	0.020	0.010	0.065	0.050	0.060	0.035
4	0.020	0.015	0.010	0.025	0.020	0.010	0.785	0.390	0.360	0.030
5	0.015	0.015	0.005	0.030	0.025	0.015	0.065	0.025	0.050	0.025
6	0.020	0.020	0.010	0.025	0.025	0.015	0.020	0.010	0.015	0.180
7	0.020	0.020	0.010	0.015	0.020	0.010	0.150	0.060	0.020	1.100
8	0.025	0.020	0.005	0.020	0.020	0.010	0.110	0.040	0.015	0.900
9	0.025	0.030	0.005	0.030	0.025	0.010	0.025	0.020	0.020	0.035
10	0.030	0.030	0.005	0.030	0.030	0.010	0.015	0.015	0.020	0.020
11	0.035	0.045	0.010	0.025	0.030	0.010	0.020	0.020	0.010	0.020
12	0.070	0.030	0.080	0.020	0.020	0.015	0.015	0.020	0.010	0.015
13	0.230	0.120	0.490	0.060	0.025	0.020	0.010	0.020	0.010	0.010
14	0.395	0.290	0.840	0.110	0.080	0.075	0.015	0.015	0.010	0.010
15	0.040	0.040	0.020	0.990	0.470	0.610	—	—	—	—
16	0.035	0.035	0.015	1.650	0.850	0.950	—	—	—	—
17	0.035	0.035	0.015	0.220	0.080	0.160	—	—	—	—
18	—	—	—	0.035	0.035	0.030	—	—	—	—
19	—	—	—	0.035	0.030	0.030	—	—	—	—

As may be seen from table 1, the fractions of peak A contain considerable quantities of a substance which may be recovered from strips 13 - 14, from which the reference sample of CMP was also recovered. The plant fed with OA contains about 50% more of this compound than does the control. This substance was temporarily called product No. 1.

The substances of peaks B and C were not investigated, because they were of no interest, as no differences between the OA treated plants and the controls could be observed. Peak D, on the other hand, was always considerably higher in the plants fed with OA than in the controls, therefore the fractions 80 - 92 from the gradient elution were combined and

treated exactly in the same manner as compounds of peak A and chromatographed against a reference sample of pure UMP. On this treatment a substance was recovered which like UMP, could be eluted from strips 15 - 16, with an R_F 0.62 - 0.71. The plants fed with OA contained over 100% more of this compound than did the controls (product No. 2).

The highest peak in figs. 1 and 2, designated with the letter E corresponds to orotic acid and represents the adsorbed part of OA, which was not metabolised by the plant.

2. The substances which were not absorbed by Dowex-1-Cl⁻, were again put through a column, this time containing Dowex-50-H⁺ (1 × 10 cm, 50 - 100 mesh) in order to remove all cations from the solution. After washing the column exhaustively with water, the effluent was concentrated and chromatographed as described before. The bulk of the substances was recovered in the eluates from three neighbouring strips, corresponding to an R_F of 0.58 - 0.71. These eluates were combined, concentrated and again chromatographed against reference samples of pure uridine and uracil, using water-saturated butanol as the liquid phase [2]. After drying, the chromatograms were cut into strips, and eluted as before. Measurements of optical density on the eluates from these strips at 260 μ have shown that the solution applied on the filter paper contained two substances, one with an R_F of 0.14 - 0.19 (product No. 3) and the other one with an R_F of 0.28 - 0.36 (product No. 4). Compared with the controls, the OA treated plants contained about 100% more of product No. 3 and about 130% more of product No. 4. All four compounds were then chemically and spectrophotometrically analysed.

Table 2 summarises some spectrophotometric characteristics of the isolated compounds in terms of absorption maxima and minima in acid and in alkali as well as in terms of absorbance ratios. The table shows also the analyses of pentoses and of phosphorus. The presented results permit to identify product No. 1 as CMP, product No. 2 as UMP, product No. 3 as uridine and product No. 4 as uracil.

Balance sheet of orotic acid and the products of its metabolism. The quantities of OA absorbed by the plant, as well as the metabolised and non metabolised quantities of OA recovered after incubation of the 3 g. samples of wheat blades are summarised in table 3. The amount of OA absorbed by the plant in exp. 1 was calculated from the difference between the known amount of OA introduced into the medium and the non-absorbed remainder left in the solution after incubation for 8 hours. E_{280} of the combined fractions of peak E (Fig. 1, fractions 97-114) after dilution to 100 ml. amounted to 0.490. The millimolar extinction coefficient for OA at 280 μ is equal to 6.86, therefore the amount found was equal to 7.1 μ moles of OA. As only 90 ml. of the original 100 ml. of solution were

Table 2

Data on absorption spectra, phosphorus, and ribose content of pyrimidine derivatives obtained by rechromatography of fractions from acid-soluble extracts of plant material

Conditions of chromatography as described in text

Pro- duct No.	Ultraviolet absorption												Total P μmoles per μmole of base	Identified as		
	in 0.1N-HCl						in 0.1N-KOH								Total pentoses	Total sum of μmax in alk. μmax in acid
	λ max (mμ)	λ min (mμ)	E ₂₅₀ E ₂₆₀	E ₂₈₀ E ₂₆₀	E ₂₉₀ E ₂₆₀	λ max (mμ)	λ min (mμ)	E ₂₅₀ E ₂₆₀	E ₂₈₀ E ₂₆₀	E ₂₉₀ E ₂₆₀						
	1	2	3	4	1	2	3	4	1	2	3	4				
1	280	241	0.46	2.05	1.51	273	251	0.84	1.00	0.35	1.50	0.91	0.96	CMP		
2	261	231	0.75	0.39	0.05	261	242	0.82	0.33	0.03	1.29	0.85	0.93	UMP		
3	262	231	0.73	0.35	0.04	262	243	0.82	0.31	0.07	1.32	1.13	0.00	uridine		
4	260	229	0.85	0.17	0.02	284	242	0.72	1.42	1.23	1.28	0.00	0.00	uracil		

Table 3

Balance sheet of orotic acid and the products of its metabolism in the plant

Experiment No.	Increase of synthesised substances from OA metabolism										Total sum of iden- tified substances μmoles	
	μmoles of OA					μmoles of OA metabolism						
	Total uptake	Reco- vered	Metabo- lised	CMP		UMP		Uridine		Uracil		
				μmoles	%	μmoles	%	μmoles	%	μmoles		%
1	9.6	7.9	1.7	0.1	0.8	120	0.2	110	0.1	150	1.2	
2	—	—	1.9	0.2	0.7	130	0.3	120	0.1	170	1.3	
3	—	—	—	0.3	0.6	110	0.2	95	—	—	—	

used for the isolation, therefore the actual amount found in the 3 g. sample of plant material was 7.9 μ moles of OA. The plant has absorbed 9.6 μ moles of OA and 7.9 μ moles were recovered not metabolised; therefore only 1.7 μ moles of OA were converted into other substances. In exp. 2 the amount of metabolised OA was calculated from the difference between the quantities added to the control plant after incubation and the quantities recovered in the plant fed with OA for 8 hours. The combined fractions from peak E (Fig. 2, fractions 98-116) after dilution to 100 ml. showed E_{280} 0.595 for control and 0.480 for the treated plant. On calculation as above it was shown that the controls contained 9.7 μ moles of OA per 3 g. samples and the treated plants 7.8 μ moles of OA. Thus 1.9 μ moles of OA were metabolised by the plant. In exp. 3 the amounts of absorbed OA were not determined.

The quantities of CMP, UMP, uridine and uracil in the plants were calculated on the basis of optical densities of the final eluates, obtained as described before, which contained the pure substance, dissolved in 0.1 N-HCl. For the calculation, the extinction coefficients as proposed by Beaven *et al.* [1] were applied. The synthesis of CMP, UMP, uridine and uracil from the added orotic acid were calculated from the differences between their content in the plants treated with OA and the controls incubated with water.

As may be seen from table 3, UMP is the main product of OA metabolism, followed by uridine and then by CMP and uracil. The sum of the recovered four known pyrimidine derivatives amounts to about 70% of the total metabolised OA. The increase of uracil expressed in percent in the OA treated plants is greater than the corresponding increases of UMP and of uridine. The increase of CMP is considerably smaller and reaches the level of the other compounds only on long-term incubation lasting for 6 days.

DISCUSSION

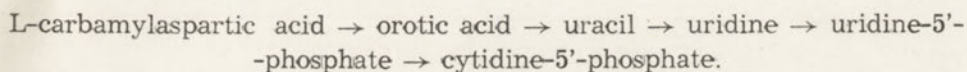
It was shown in this paper that OA undergoes metabolic changes in plant material and experimental evidence for the biosynthesis of pyrimidines, nucleosides and nucleotides was described. Plants incubated with OA for relatively short periods of time show a distinct decrease of this compound, whereas after long periods of incubation, the OA disappears entirely from the plant. At the same time CMP, UMP, uridine and uracil appear at the expense of OA.

The reported results suggest not only many similarities, but also certain differences in metabolism of OA in the higher plant as compared with the already well known changes that take place in animal tissue and in microorganisms. For example, the rate of OA metabolism in wheat blades is much slower than in animal tissue. In 8 hours, less than 20%

of the intake is metabolised, whereas in the rat, about 70% of the ingested OA is metabolised within 2 hours [5]. Furthermore, ureides and amino acids arise from OA as a result of catabolic changes in animal tissue and in microorganisms and no such changes could be observed in plant material.

The presented results do not as yet make it possible to draw conclusions regarding the mechanism of biosynthesis of pyrimidine nucleotides in higher plants. However it is not easy to resist the suggestion, that this mechanism may in certain ways depart from the basic scheme of synthesis of pyrimidine nucleotides in animals and in microorganisms [3, 9],

The distinct increase in the content of uracil in plant material after short-term incubation with OA may be resulting from a process of decarboxylation. Ribosidation of uracil may lead to uridine, which is always found in plant material fed with OA, and which was never described as a product of OA metabolism in animal tissue. Phosphorylation of uridine would then lead to the synthesis of UMP. Thus temporarily the following scheme of the synthesis of pyrimidine nucleotides in plant material could be suggested:



The synthesis of CMP from uridine nucleotides has recently been denied [8]. This suggestion was not confirmed in our work, on the contrary it would appear from long-term experiments that CMP may be synthesised at the expense of UMP (Table 3).

Finally we would like to mention that the slow rate of utilization of OA in plant material is in sharp contrast with its quick and efficient synthesis from CA [10]. This fact may be due to a lack of high energy compounds, necessary for the conversion of OA into the nucleotides. This problem is now investigated in our laboratory.

SUMMARY

The conversion of orotic acid to pyrimidine derivatives in blades of wheat seedlings has been investigated. The major components of cold perchloric acid extracts have been isolated by anion exchange and by paper chromatography.

The data presented provide evidence that orotic acid is utilised for the synthesis of uridine-5'-monophosphate, cytidine-5'-monophosphate, uridine, and uracil and that these compounds are normal constituents of plant.

On the basis of these data a tentative scheme of the mechanism of the synthesis of pyrimidine derivatives from orotic acid in plant material has been suggested.

REFERENCES

- [1] Beaven G. H., Holiday E. R., Johnson E. A., in *The Nucleic Acids*, (E. Chargaff and J. N. Davidson, eds.) V. 1, p. 493, Acad. Press, New York, 1955.
- [2] Buchanan J. G., *Nature* **168**, 1091, 1951.
- [3] Buchowicz J., *Postępy Biochemii* **6**, 301, 1960.
- [4] Fiske C. H., SubbaRow Y., *J. Biol. Chem.* **66**, 375, 1925.
- [5] Hurlbert R. B., Potter V. R., *J. Biol. Chem.* **195**, 257, 1952.
- [6] Kleczkowski K., *Acta Biochim. Polon.* **5**, 155, 1958.
- [7] Paegle L. M., Schlenk F., *Arch. Biochem.* **28**, 348, 1950.
- [8] Price T. D., Tsuboi K. K., Hinds H. A., Hudson P. B., *Nature* **186**, 158, 1960.
- [9] Reichard P., *Adv. Enzym.* **21**, 263, 1959.
- [10] Reifer I., Buchowicz J., Toczko K., *Acta Biochim. Polon.* **7**, 29, 1960.
- [11] Reifer I., Buraczewska L., *Acta Biochim. Polon.* **6**, 219, 1959.
- [12] Reifer I., Toczko K., *Bull. Acad. Polon. Sci. Ser. Biol.* **7**, 131, 1959.
- [13] Wyatt R. G., in *The Nucleic Acids* (E. Chargaff and J. N. Davidson, eds.) **1**, p. 243, Acad. Press, New York, 1955.

PRZEMIANA KWASU OROTOWEGO DO POCHODNYCH PIRYMIDYNOWYCH
W MATERIALE ROŚLINNYM

Streszczenie

Stwierdzono, że źdźbła pszenicy pobierają i metabolizują kwas orotowy. Produkty przemiany kwasu orotowego ekstrahowano z roślin zimnym kwasem nadchlorowym i izolowano stosując metody adsorpcji na jonitach i rozdzielczej chromatografii bibułowej.

W wyniku opisanych badań stwierdzono, że kwas orotowy ulega przemianie do urydyno-5'-jednofosforanu, cytydyno-5'-jednofosforanu, urydyny i uracylu oraz wykazano, że substancje te są normalnymi składnikami wyższych roślin.

Na podstawie przedstawionych wyników podano przypuszczalny schemat mechanizmu przemian kwasu orotowego do pochodnych pirymidynowych w materiale roślinnym.

Otrzymano 8.7.1960

T. WILCZOK

AKTYWNOŚĆ ENZYMÓW TRANSAMINUJĄCYCH W IZOLOWANYCH STRUKTURACH KOMÓRKOWYCH PRAWIDŁOWEJ WĄTROBY SZCZURA *

Zakład Biologii Nowotworów, Instytut Onkologii, Gliwice
Dyrektor: Dr med. Jeremi Świącki

Mimo licznych prac dotyczących enzymów transaminujących [4, 8, 9] brak bliższych danych o lokalizacji tych enzymów w izolowanych strukturach komórkowych jak jądra, mitochondria, mikrosomy i plazma podstawowa.

Bierzowska [2] na podstawie własnych badań nad bezpośrednią aminacją kwasu pirogronowego oraz powołując się na publikacje innych autorów [5, 10] stwierdza, że enzymy transaminujące zlokalizowane są przede wszystkim w mitochondriach. Jednak spostrzeżenia Hirda [5] dotyczą tylko transaminacji fenyloalaniny i tyrozyny wobec kwasu α -ketoglutarowego, a badania Nakady i Weinhausa [10] także nie precyzują problemu lokalizacji. Badania histochemiczne Shanka i wsp. [20] oraz Lowry i wsp. [7] nad transaminacją glutaminowo-pirogronową i glutaminowo-szczawiowoocetową w wątrobie nie dotyczą izolowanych struktur komórkowych; opisują one jedynie aktywność enzymatyczną w zraziku wątrobowym a prace Rowsella [16, 17] traktują o łącznej aktywności enzymatycznej wszystkich wewnątrzkomórkowych struktur i płynu nad osadu.

Obecny stan wiadomości o wewnątrzkomórkowej lokalizacji enzymów transaminujących wymaga zbadania ich aktywności w poszczególnych frakcjach uzyskanych z homogenatów tkankowych.

Ponieważ duże praktyczne znaczenie znalazły transaminazy katalizujące reakcje pomiędzy: (1) Kwas L-glutaminowy - kwas szczawiowoocetowy, (2) kwas L-asparaginowy - kwas α -ketoglutarowy, (3) kwas L-glutaminowy - kwas pirogronowy, (4) kwas α ketoglutarowy - L-alanina, (5) kwas L-asparaginowy - kwas pirogronowy, (6) L-alanina - kwas szczawiowoocetowy, było celowe zbadanie ich wewnątrzkomórkowej lokalizacji przede wszystkim w bogatej w te enzymy tkance wątrobowej.

* Praca została wykonana w ramach prac Komitetu Biologii Nowotworów Polskiej Akademii Nauk.

MATERIAŁ I METODA

Badania przeprowadzono na izolowanych frakcjach homogenatów wątrobowych 16 szczurów samców szczepu Wistar w wieku około 5 miesięcy i średniej wadze 180 g.

Szczura zabijano przez dekapitację bez uprzedniej narkozy i przepłukiwano wątrobę 0,25 M-roztw. sacharozy o temp. 2-4°. Homogenaty sporządzano przez rozcieranie tkanki wątrobowej w teflonowym homogenizatorze typu Pottera-Elvehjema w temp. 0°, przy szybkościach głowicy około 1000 obr/min. w 0,25 M-roztworze sacharozy. Końcowe rozcieńczenie homogenatu wynosiło 1:10. Z otrzymanego homogenatu izolowano w probówkach plastikowych jądra, mitochondria, mikrosomy i plazmę podstawową w oparciu o metodę Schneidera i Hogebooma [19] przy użyciu chłodzonej wirówki MSE z głowicą Super Speed w temp. 0°. Po pierwszym odwirowaniu jąder komórkowych przy 2000 obr/min. bardzo ostrożnie usuwano pipetą pozostałą część krwinek, które zgromadzone są na dnie próbówki i kolorem wyraźnie różnią się od frakcji jądrowej. Frakcję jądrową po pierwszym odwirowaniu poddawano kolejnej homogenizacji, w wyniku której część pozostałych komórek uległa rozbiciu. Po dwukrotnym powtórzeniu homogenizacji i wirowaniu kontrolowano czystość frakcji jądrowej badając rozmaz pod mikroskopem. Pomimo zastosowania omówionego oczyszczania stwierdzono w rozmazie obecność całych komórek w ilości kilku na sto jąder. Celem otrzymania czystszej frakcji jądrowej przeprowadzono kilka badań przy pomocy metody dwuwarstwowej (0,25 i 0,34 M-roztw. sacharozy) [6]. Otrzymane wyniki Q_{TN} nie różniły się w granicach błędu pomiaru od wyników otrzymanych poprzednio. Wyniki uzyskane po przeprowadzeniu izolowania jąder metodą zmodyfikowaną przez Zbarskiego [26] także nie odbiegały poza przedziały dużego stosunkowo rozrzutu dla wartości Q_{TN} . Frakcję mitochondrialną przemywano dwukrotnie zimnym roztworem 0,25 M sacharozy. Czystość frakcji mikrosomalnej sprawdzono przez mierzenie w niej aktywności glukozy-6-fosfatazy. Enzym ten zlokalizowany jest w mikrosomach. Stwierdzono, że aktywność tego enzymu w mikrosomach była 12-krotnie wyższa niż w płynie znad mikrosomów, zwanym przez nas plazmą podstawową.

Użyte do badań odczynniki: Kwas L-glutaminowy f-my BDH, kwas L-asparaginowy, kwas szczawiooctowy i L-alanina f-my Dajac USA, kwas α -ketoglutarynowy, kwas pirogronowy f-my Schuchardt, $Na_2HPO_4 \cdot 12 H_2O$ i KH_2PO_4 o czystości „Alanar“ f-my BDH. Sacharoza specjalnie czysta f-my Sigma USA. W odczynnikach tych nie wykryto metodą chromatograficzną zanieczyszczeń mogących wpływać na wynik reakcji.

Ilość powstałych w wyniku reakcji produktów rozdzielono i oznaczono przy pomocy chromatografii wstępującej na bibule Whatman 1 w układzie fenol — woda. Oczyszczenie fenolu przeprowadzono wg metody zmodyfikowanej przez Pashinę [13]. Po wywołaniu chromatogramów odczynnikiem ninhydrynowym (0,25% roztwór ninhydryny (BDH) w acetonie cz.d.a. FOCH) eluowano powstałe plamy produktów i substratów w sposób opisany szczegółowo poprzednio [22, 23] i oznaczano ekstynkcję na spektrofotometrze typu Coleman USA przy długości fali 510 m μ .

Skład mieszaniny inkubowanej: 0,25 ml (10 μ moli) roztworu L-aminokwasu; 0,25 ml (10 μ moli) roztworu α -ketokwasu, 1 ml 0,15 M-buforu fosforanowego (Na₂HPO₄, KH₂PO₄) o pH 7,5, i 0,5 ml izolowanej frakcji w rozcieńczeniu 1 : 60 w 0,25 M-roztworze sacharozy, w stosunku do mokrej masy danej frakcji.

Na podstawie uprzednio sporządzonych krzywych zależność ilości powstałego produktu od czasu inkubacji i stężenia enzymu (rozcieńczenie frakcji) dla badanych sześciu reakcji inkubowano w naczyniach szklanych w warunkach areobowych w ciągłym ruchu przez 2 godz. w temp. 37°. Warunki te wybrano jako optymalne, gdyż uzyskane wartości ekstynkcji mieściły się na proporcjonalnym odcinku uzyskanej krzywej. Reakcję przerywano dodając 0,5 ml 1% roztworu kwasu octowego, ogrzewano przez 10 minut w temp. 100°, (probówki o ϕ 16 mm i długości 24 cm), odsączano od wytrąconego białka i chromatografowano. Równoległe z każdą próbą rozwijano standardowe ilości wzorcowych aminokwasów i każdorazowo wykreślano krzywą zależności ekstynkcji od stężenia dodanego aminokwasu. W każdej izolowanej frakcji w końcowym rozcieńczeniu 1 : 60 oznaczano zawartość całkowitego azotu częściowo metodą mikro-Kjeldahla¹ i częściowo metodą opisaną poprzednio [21], uzyskując dużą zgodność wyników.

Wyniki doświadczeń podano w μ molach powstałego podczas inkubacji aminokwasu oraz w Q_{TN}. W tablicy podano również aktywność pełnych homogenatów, z których izolowano poszczególne frakcje komórkowe.

WYNIKI BADAŃ

We wszystkich izolowanych frakcjach komórkowych wątroby stwierdzono obecność enzymów transaminujących katalizujących reakcje oznaczone 1 do 4. Reakcje 5 i 6 zachodzą tylko w homogenacie i plazmie podstawowej. Jedynie we frakcji mitochondrialnej obserwuje się śladowe ilości produktów reakcji o wartościach leżących jednak poniżej granicy czułości reakcji przy stosowanej metodzie. Porównując bezwzględne war-

¹ Wszystkie oznaczenia azotu metodą mikro-Kjeldahla wykonała asystentka techniczna Zakładu Biologii Nowotworów Kazimiera Choraży.

T a b l i c a 1

Aktywność transaminaz homogenatu i frakcji komórkowych wątroby szczura

Skład inkubatu: 10 μ mol L-aminokwasu (0,25 ml), 10 μ mol α -ketokwasu (0,25 ml), 1 ml 0,15 M-buforu fosforanowego o pH 7,5 i 0,5 ml frakcji komórkowej rozcieńczonej 0,25 M-sacharozą 1:60 w stosunku do mokrej masy danej frakcji. Inkubacja 2 godz., 37°. Wyniki, średnie z 16 zwierząt, podano w μ molach powstałego aminokwasu, oraz w Q_{TN}^* , \pm odchylenie standardowe

Nr reakcji	Rodzaj substratu	Homogenat		Jądra		Mitochondria		Mikrosomy		Plazma podstawowa	
		Q_{TN}	μ mole	Q_{TN}	μ mole	Q_{TN}	μ mole	Q_{TN}	μ mole	Q_{TN}	μ mole
1	kw. L-glutaminowy + kw. szczawiooocowy	42,1 \pm 2,63	4,2 \pm 0,0450	135,2 \pm 3,17	5,8 \pm 0,0384	72,4 \pm 7,14	5,1 \pm 0,0084	93,4 \pm 4,12	3,8 \pm 0,0123	98,7 \pm 5,08	4,6 \pm 0,0094
2	kw. L-asparaginowy + kw. α -ketoglutaryowy	63,2 \pm 6,12	7,2 \pm 0,0051	172,9 \pm 7,53	5,6 \pm 0,0082	147,0 \pm 5,11	6,2 \pm 0,0041	114,2 \pm 5,24	3,9 \pm 0,0188	99,6 \pm 5,84	5,2 \pm 0,0253
3	kw. L-glutaminowy + kw. pirogronowy	44,8 \pm 0,97	4,5 \pm 0,0046	54,6 \pm 3,28	1,8 \pm 0,054	63,3 \pm 4,87	3,34 \pm 0,0453	49,9 \pm 4,43	1,7 \pm 0,0089	87,5 \pm 5,13	1,6 \pm 0,0094
4	L-alanina + kw. α -ketoglutaryowy	61,9 \pm 3,27	7,0 \pm 0,0053	100,3 \pm 3,89	3,2 \pm 0,0076	110,0 \pm 0,89	5,2 \pm 0,0064	44,7 \pm 0,76	5,6 \pm 0,0037	145,9 \pm 8,44	7,4 \pm 0,0243
5	kw. L-asparaginowy + kw. pirogronowy	25,7 \pm 3,54	3,1 \pm 0,024	brak aktywności	brak aktywności	aktywność śladowa	aktywność śladowa	brak aktywności	brak aktywności	27,6 \pm 3,96	2,3 \pm 0,0273
6	L-alanina kw. szczawiooocowy	13,8 \pm 3,16	1,5 \pm 0,0321	brak aktywności	brak aktywności	aktywność śladowa	aktywność śladowa	brak aktywności	brak aktywności	24,6 \pm 2,20	1,2 \pm 0,0301

* Wartość Q_{TN} obliczono przez przeliczenie μ mol na mikrolitry i podzielenie otrzymanej wartości przez ilość azotu N w mg przypadającą na 0,5 ml użytego materiału, pomnożoną przez czas trwania reakcji w godzinach wg wzoru

$$Q_{TN} = \frac{\mu l}{N \times h}$$

tości Q_{TN} , które wyrażają aktywność enzymów transaminujących w odniesieniu do całkowitego azotu można stwierdzić, że maksymalna aktywność enzymu katalizującego układ kwas L-glutaminowy - kwas szczawio-woocetowy przejawia się we frakcji jądrowej. Pomimo dwukrotnego oczyszczenia frakcji jądrowej istnieje możliwość zanieczyszczenia jej całymi niezhomogenizowanymi komórkami. Mitochondria i mikrosomy o dużej aktywności enzymatycznej zawarte w całych komórkach mogą wpływać na aktywność frakcji jądrowej, przy minimalnym wpływie na zawartość całkowitego azotu. Dlatego Q_{TN} jako funkcja całkowitego azotu jest dla frakcji jądrowej cechującej się najniższą zawartością azotu [6] liczbą stosunkowo wysoką.

Jak wynika z tablicy maksymalne wartości Q_{TN} prawie nigdy nie odpowiadają maksymalnym wartościom mikromoli powstałych aminokwasów. Reakcja 2 będąca odwrotnością reakcji 1 przebiega najenergiczniej w jądrach. Bardziej wiarygodne wydają się być wyniki przedstawione w μM , gdzie maksymalna aktywność przesunięta jest do frakcji mitochondrialnej. Wyższe wartości reakcji 2 przewyższają jednak wartości Q_{TN} reakcji 1, co świadczy o przesunięciu równowagi w kierunku syntezy kwasu glutaminowego. To samo zjawisko obserwujemy w reakcji 3 i 4. Podobne przesunięcia równowagi chemicznej układów transaminujących w kierunku syntezy kwasu glutaminowego obserwowano w homogenatach szeregu nowotworów przeszczepialnych [22].

Aktywność enzymatyczną obserwuje się także w wyniku katalizowania reakcji 5 pomiędzy kwasem L-asparaginowym i kwasem pirogronowym oraz reakcji 6 pomiędzy L-alaniną i kwasem szczawiowoocetowym, jest ona jednak wielokrotnie mniejsza w porównaniu z aktywnością enzymów transaminujących katalizujących reakcje 1-4. Istnienie oddzielnego enzymu katalizującego reakcje 5 i 6 jest przez wielu autorów dyskutowane [12]. Przypuszcza się, że zachodzenie tych reakcji uwarunkowane jest przez obecność obu pozostałych enzymów, tj. enzymu katalizującego reakcję 1 i 2 oraz enzymu katalizującego reakcję 3 i 4.

Ze względu na inaktywujące działanie jonów wapnia [22] nie można było w przeprowadzonych badaniach zastosować metody Hogebooma i wsp. [6] lub Allfrey'a i wsp. [1] dla izolowania jąder komórkowych. Zwracano uwagę [15], że przy izolowaniu struktur komórkowych, np. jąder w środowiskach wodnych pewna część składników chemicznych (nukleotydy, jony itp.) zostaje z nich wypłukana. Prawdopodobnie fosforan pirydoksalu może przedostać się w czasie izolowania struktur komórkowych do środowiska. Tym samym, zgodnie z mechanizmem reakcji transaminacji, część enzymów transaminujących zostaje pozbawiona koenzymu i aktywność danego enzymu obniża się. Enzymy proteolityczne, które dostają się do środowiska reakcji z rozbitych mitochondrów (lub innych

struktur komórkowych) mogą także wywierać wpływ na aktywność enzymów transaminujących [15, 26]. Dotychczas brak danych o aktywności enzymów transaminujących w izolowanych frakcjach komórkowych otrzymanych przez wydzielenie z niewodnego środowiska, dane takie byłyby cennym materiałem porównawczym.

Za słuszością wniosku, że enzymy transaminujące występują we wszystkich izolowanych frakcjach komórkowych przemawiają badania Piatnickiej [14] nad lokalizacją enzymów katalizujących bezpośrednią syntezę aminokwasów z soli amonowych i ketokwasów. Autorka stwierdziła, że enzymy te występują także we wszystkich frakcjach komórkowych.

Prowadzone na szeroką skalę badania nad aktywnością enzymów transaminujących w surowicy krwi w różnych stanach patologicznych wykazują, że w szeregu przypadków już po kilkunastu minutach po zadziałaniu bodźca obserwuje się wzmożoną aktywność tych enzymów w surowicy [11, 18, 24]. Podwyższoną aktywność enzymów transaminujących w surowicy krwi tłumaczy Wróblewski i La Due [25] uwalnianiem enzymu z komórki patologicznej (np. rakowej) i przenikaniem jego do krwi. Hipotezę tę wydaje się potwierdzać praca Brauna [3], który po podwiązaniu woreczka żółciowego u psa stwierdził po 15 minutach wzrost aktywności enzymów transaminujących w surowicy a przede wszystkim w surowicy krwi pobranej z naczyń wnekowych wątroby.

Wydaje się, że wykazana w tej pracy obecność transaminaz we wszystkich strukturach wewnątrzkomórkowych może w pewnym stopniu tłumaczyć łatwość przenikania tych enzymów z komórek do krwi.

Dziękuję asystantkom technicznym Zakładu Biologii Nowotworów Pani Kazimierze Chorąży i Pani Lucji Góral za pomoc przy wykonywaniu analiz.

STRESZCZENIE

Zbadano lokalizację enzymów transaminujących katalizujących reakcje: (1) kwas L-glutaminowy - kwas szczawiowoocetowy, (2) kwas L-asparaginowy - kwas α -ketoglutazarowy, (3) kwas glutaminowy - kwas pirogronowy, (4) L-alanina - kwas α -ketoglutazarowy, (5) kwas L-asparaginowy - kwas pirogronowy, (6) L-alanina - kwas szczawiowoocetowy, w izolowanych strukturach komórkowych (jądra, mitochondria, mikrosomy i plazma podstawowa) w wątrobie prawidłowej szczura. Rozdzielając produkty reakcji przy pomocy chromatografii na bibule wykazano, że enzymy katalizujące reakcje: kwas glutaminowy - alanina oraz kwas glutaminowy - kwas asparaginowy są aktywne we wszystkich frakcjach komórkowych. Reakcje w układzie kwas asparaginowy - alanina zachodzą tylko w plazmie podstawowej. Maksymalna aktywność enzymatyczna zlokalizowana jest we frakcji mitochondrialnej i jądrowej. Obserwuje się wyraźne przesunięcie równowagi reakcji w kierunku syntezy kwasu glutaminowego.

L I T E R A T U R A

- [1] Allfrey V. G., Mirsky A. E., Osawa S., *J. Gen. Physiol.* **40**, 451, 1957.
- [2] Bierezowska N. N., *Biochimia* **21**, 733, 1956.
- [3] Braun P., Papp M., *Nature* **183**, 48, 1959.
- [4] Braunstein A. E., *IV-th International Congress of Biochemistry* — Transactions of the Plenary Sessions T. XIV. str. 63.
- [5] Hird F. J. R., Rowsell E. V., *Nature* **166**, 517, 1950.
- [6] Hogeboom G. H., Schneider W. C., Striebich M. J., *J. Biol. Chem.* **196**, 111, 1952.
- [7] Lowry O. H., Roberts N. S., Chang M. W., *J. Biol. Chem.* **222**, 97, 1956.
- [8] Meister A., *Biochemistry of the Amino Acid*, Acad. Press N. Y. 1957.
- [9] Meister A., *Symposium on Amino Acid Metabolism*, Baltimore — 3, 1955.
- [10] Nakada H., Weinhouse S., *J. Biol. Chem.* **187**, 663, 1950.
- [11] Nydich I., Wróblewski F., La Due J. *Circulation* **12**, 161, 1955.
- [12] O'kane D. E., Gunsalus I. C., *J. Biol. Chem.* **170**, 433, 1947.
- [13] Pashina T. S., *Biochimia* **19**, 702, 1954.
- [14] Piatnickaja I. I., *Biochimia* **25**, 86, 1960.
- [15] Płatowa T. P., *Usp. Sowr. Biologii* **47**, 168, 1959.
- [16] Rowsell E. V., *Biochem. J.* **64**, 235, 1956.
- [17] Rowsell E. V., *Biochem. J.* **64**, 246, 1956.
- [18] Reugsegger P., Nydich I., *Circulation* **7**, 4, 1959.
- [19] Schneider W. C., Hogeboom G. H., *J. Biol. Chem.* **183**, 123, 1951.
- [20] Shank R. E., Georg Norrison, Chuan Huan Chong, Karl J., Schwartz R., *J. Histochem. Cytochem.* **7**, 4, 1959.
- [21] Wilczok T., *Chemia analityczna* **4**, 981, 1959.
- [22] Wilczok T., *Nowotwory* **10**, 91, 1960.
- [23] Wilczok T., *Ztschr. f. Physiol. Chem.* (w druku).
- [24] Wróblewski F., La Due J., *Am. Internat. Med.* **43**, 345, 1955.
- [25] Wróblewski F., La Due J., *Cancer Res.* **8**, 1155, 1955.
- [26] Zbarskij I. B., Georgiew G. P., *Biochimia* **24**, 192, 1959.

THE TRANSAMINASE ACTIVITY IN ISOLATED CELL STRUCTURES
OF NORMAL RAT LIVER

S u m m a r y

The localization of the following transaminases was investigated: (1) L-glutamate - oxaloacetate, (2) L-aspartate - α -keto glutarate, (3) glutamate - pyruvic acid, (4) L-alanine - α -keto-glutarate, (5) L-aspartate - pyruvic acid, (6) L-alanine - oxaloacetate. The cell structures under investigation were: nuclei, mitochondria, microsomes, and cytoplasm. The reaction products being separated on paper chromatography, the presence of the glutamate - alanine transaminase was found in all the fractions as well as that of the glutamate - aspartate transaminase. The reactions between aspartate and alanine occurred only in cytoplasm. The maximum enzymatic activity was localised in the mitochondrial fraction and in the nucleic one. The reaction equilibrium was distinctly shifted towards the glutamate synthesis.

Otrzymano 24. 7. 1960

J. OLEKSY, HALINA SZAFRAN i Z. SZAFRAN

BADANIA NAD HYDROLAZAMI SOKÓW TRAWIENNYCH

VI. ESTERAZY SOKU JELITOWEGO PSA*

Zakład Chemii Fizjologicznej AM w Krakowie, Kierownik: Prof. Dr B. Skarżyński
Zakład Fizjologii AM w Krakowie, Kierownik: Prof. Dr J. Kaulbersz

Od dawna już znana jest rola jaką spełnia w procesie trawienia sok jelitowy — wydzielina gruczołów błony śluzowej jelita — jednak skład enzymatyczny tego soku trawienego nie został dotąd szczegółowo zbadany. Nieco dokładniej poznano enzymy biorące udział w końcowych etapach trawienia białek i węglowodanów, natomiast bardzo niewiele danych spotyka się w piśmiennictwie na temat występowania w soku jelitowym enzymów hydrolizujących wiązania estrowe.

Chociaż obecność lipazy w soku jelitowym psa stwierdził Boldyreff jeszcze w roku 1907 [5], później jednak Reale [23] wykazał, że sok pochodzący z przetok Thiry-Vella nie zawiera tego enzymu i że występuje on tylko w komórkach błony śluzowej jelita i może uwalniać się wskutek autolizy. W ostatnich latach dwie prace, w których użyto sok jelitowy owcy [21] i konia [2] potwierdzają pogląd, że lipaza nie występuje w soku jelitowym tych zwierząt.

Zasadowa fosfataza jest innym enzymem z tej grupy, którego obecność w błonie śluzowej jelita znana była od dawna [17, 18]. Własności tego enzymu zostały dokładniej zbadane po wyizolowaniu go z błony śluzowej jelita cielęcia przez Portmanna [22].

Oprócz dwóch wymienionych enzymów nie spotyka się w literaturze żadnych doniesień na temat obecności innych esteraz w soku jelitowym. Biorąc pod uwagę fakt, że różne esterazy są enzymami rozpowszechnionymi w organizmie zwierzęcym, mało prawdopodobnym wydał się ich zupełny brak w soku jelitowym. W poprzednich doniesieniach tej serii stwierdzono, że sok trzustkowy psa zawiera co najmniej sześć różnych esteraz [29, 30]. Przedmiotem obecnie przedstawionych badań jest zagadnienie występowania enzymów esterolitycznych w soku jelitowym psa pochodzącym z przetok Thiry-Vella.

* Poprzednie prace tej serii [13, 29, 14, 30, 28].

METODY

Sok jelitowy otrzymywano z przetok Thiry-Vella wykonanych u psów z różnych odcinków jelita cienkiego. Do doświadczeń używano psy wagi 16-18 kg. Średnia długość jelita cienkiego u tych psów wynosiła około 3 m. Odległość wyizolowanych odcinków od odźwiernika była następująca: odcinek I, 40-50 cm (ok. 1/6 długości jelita), odcinek II, 150-200 cm (1/2 długości jelita), odcinek III, końcowa część jelita cienkiego (ok. 9/10 długości jelita). Długości wyizolowanych odcinków wynosiły 20 - 30 cm. Zbierano sok wydzielany pod wpływem drażnienia mechanicznego, odrzucając pierwszą porcję (ok. 5 ml) zawierającą duże ilości śluzu i nabłonka. Dopiero następną porcję (ok. 10 ml) przeznaczano do doświadczeń po usunięciu skrawków nabłonka i komórek przez wirowanie w ciągu 30 min. przy 3000 obr./min. Uzyskany w ten sposób sok jelitowy jest cieczą opalizującą o żółtawym zabarwieniu. Sok przechowywano w temperaturze 4° aż do wykonania oznaczeń enzymatycznych.

Stężenie białka w próbkach soku jelitowego oznaczano metodą Folina i Ciocalteu [9] według procedury opisanej poprzednio [14] i wyniki wszystkich oznaczeń enzymatycznych przeliczano na 1 mg białka.

Substratami użytymi do oznaczeń enzymatycznych były następujące estry: oliwa (spożywcza oliwa nicejska), trójbutyryna (Lachema), octan cholesterolu, octan *p*-nitrofenolu otrzymany według Hugginsa i Lapidesa [15], octan indoksyłu (Light), bromek acetylocholin (Light), fosforan fenolftaleiny (Light) i 2-hydroksy-5-nitrofenylosiarczan dwupotasowy (siarczan nitrokatecholu) otrzymany według Roy'a [25]. Ponadto zastosowano ezerynę (fizostygminę) (Merck) i dwuizopropylodifluorofosforan (DFP) dostarczony uprzejmie przez Dr E. Chodorowskiego, jako inhibitory esteraz kwasów karboksylowych. Pozostałe odczynniki użyte do doświadczeń były analitycznie czyste.

Aktywność enzymatyczną soku jelitowego oznaczano według następujących metod: hydrolizę oliwy i trójbutyryny metodą Overbeeka i Van der Viesa [20], hydrolizę octanu cholesterolu według zbioru metod analitycznych H. Fistera [8], hydrolizę octanu *p*-nitrofenolu metodą Hugginsa i Lapidesa [15], hydrolizę octanu indoksyłu zmodyfikowaną metodą Holta [12, 30], hydrolizę bromku acetylocholin metodą Hestrina [11], hydrolizę fosforanu fenolftaleiny według Hugginsa i Talalaya [16]. Procedurę wszystkich tych oznaczeń enzymatycznych opisano dokładnie w poprzednich doniesieniach tej serii [14, 28, 29, 30].

Hydrolizę siarczanu nitrokatecholu oznaczano według metody Roy'a [25] inkubując 0,8 ml odpowiednio rozcieńczonego soku jelitowego z 0,8 ml roztworu substratu w 0,5 M buforze octanowym o pH 5,6. Stężenie końcowe siarczanu nitrokatecholu wynosiło 0,05 M. Po odpowiednim czasie inku-

bowania w temperaturze 37° reakcję zatrzymywano przez dodanie 0,5 ml 1 N-HCl i następnie dodawano w celu wywołania zabarwienia 3,5 ml odczynnika chinonowego wg Roy'a. Barwę uwolnionego podczas hydrolizy nitrokatecholu odczytywano po 30 min. przy długości fali 520 m μ na spektrofotometrze Coleman Junior.

Przed wykonaniem niektórych oznaczeń sok jelitowy dializowano w woreczku celofanowym względem wody potrójnie destylowanej lub względem roztworu wersenianu sodu w temperaturze 4°. Stosowano czas trwania dializy od 12 do 40 godzin.

Aktywność enzymatyczną wyrażano w jednostkach podanych w metodach lub ustalonych dowolnie. Jednostki te przedstawiają ilości enzymu, które w określonym czasie w temperaturze 37° i w warunkach oznaczenia rozkładają z prędkością początkową określoną ilość substratu lub odczczepiają określoną ilość produktu hydrolizy. Dla hydrolizy oliwy i trójbutyryny jest to czas 2 godzin i 10 μ moli rozłożonego estru, dla hydrolizy octanu cholesterolu — 2 godziny i 1 μ mol odszczepionego cholesterolu, dla hydrolizy octanu indoksyli — 20 minut i przyrost gęstości optycznej o 0,100 przy 600 m μ , dla hydrolizy acetylocholin — 1 godzina i 1 mg rozłożonego substratu, dla zasadowej fosfatazy (hydroliza fosforanu fenolftaleiny) — 1 godzina i 0,1 mg uwolnionej fenolftaleiny [16] i dla hydrolizy siarczanu nitrokatecholu — 1 godzina i 0,1 μ mola rozłożonego estru.

WYNIKI

Do doświadczeń użyto dwa psy z przetoką w odcinku I, dwa psy z przetoką w odcinku II i jednego psa z przetoką w odcinku III. Pobrano ogółem 60 próbek soku jelitowego, oznaczając w każdej stężenie białka. W tabelicy 1 zestawiono średnie wartości stężenia białka w próbkach soku pochodzącego z różnych odcinków jelita i od różnych psów. Jakkolwiek próbki soku pochodzące z odcinka III wykazywały najniższą średnią zawartość białka, to jednak biorąc pod uwagę różnice między poszczególnymi psami z tym samym rodzajem przetoki (np. psy 1 i 2 z przetoką I) nie można stwierdzić wyraźnego wpływu położenia odcinka jelita na stężenie białka w soku.

W tabelicy 2 zebrano wyniki oznaczeń enzymatycznej hydrolizy estrów kwasów karboksylowych z uwzględnieniem wpływu zastosowanych inhibitorów — ezeryny i DFP. We wszystkich badanych przypadkach sok jelitowy nie wykazywał, przy zastosowanych warunkach oznaczenia, aktywności enzymatycznej względem oliwy, natomiast obserwowano hydrolizę trójbutyryny. Aktywność względem tego substratu jest częściowo hamowana przez ezerynę. Również octan cholesterolu jest rozkładany w pewnym stopniu przez sok jelitowy. Aktywności tej nie dało się

T a b l i c a 1

Stężenie białka w soku jelitowym pochodzącym z trzech różnych odcinków jelita cienkiego psa

Położenie odcinków jelita: odcinek I, 40 - 50 cm od odźwiernika (ok. 1/6 długości jelita), odcinek II, 150 - 200 cm (1/2 długości jelita), odcinek III, końcowy odcinek jelita cienkiego (ok. 9/10 długości jelita). Wyniki podano w procentach wag./obj. \pm średni błąd

Odcinek jelita	Nr psa	Ilość ozn.	Stężenie białka (%)
I	1	14	0,86 \pm 0,11
	2	12	1,07 \pm 0,12
	1+2	26	0,96 \pm 0,08
II	3	16	1,24 \pm 0,08
	4	2	0,46 \pm 0,05
	3+4	18	1,16 \pm 0,09
III	5	16	0,74 \pm 0,07
I+II+III	1 do 5	60	0,96 \pm 0,05

zaobserwować w przypadku soku pochodzącego z odcinka III, ponieważ sok ten zawiera dość duże ilości wolnego cholesterolu (ok. 50 mg⁰/o w porównaniu z wartością 3 mg ⁰/o w soku z odcinka I) dającego zbyt wysokie wartości w oznaczeniach kontrolnych. Hydroliza octanu *p*-nitrofenolu jest tylko nieznacznie hamowana przez ezerynę i nieco silniej przez DFP.

T a b l i c a 2

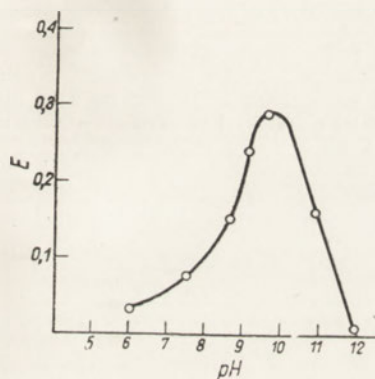
Aktywność enzymatyczna soku jelitowego psa względem estrów kwasów karboksylowych oraz wpływ ezeryny i DFP na tę aktywność

Podane liczby są wartościami średnimi oznaczeń wykonanych na soku pochodzącym z różnych odcinków jelita. Wartości te podano wraz ze średnim błędem. Inhibitory używano w następujących stężeniach: ezeryna od 10⁻⁶ do 2•10⁻⁶ M, dwulizopropylodifluorofosforan (DFP), 5•10⁻⁶ M

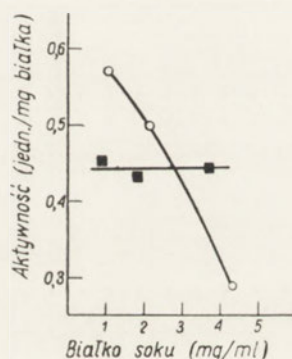
Substrat	Aktywność bez inhibitora		Ezeryna		DFP	
	ilość ozn.	jedn/mg białka	ilość ozn.	% hamowania	ilość ozn.	% hamowania
Oliwa	6	0	—	—	—	—
Trójbutyryna	8	1,96 \pm 0,51	3	33,3 \pm 7,2	—	—
Octan cholesterolu	5	0,023 \pm 0,008	—	—	—	—
Octan <i>p</i> -nitrofenolu	27	0,117 \pm 0,010	4	5,1 \pm 1,3	16	29,3 \pm 2,4
Octan indoksyłu	20	0,34 \pm 0,02	7	46,2 \pm 7,1	12	75,6 \pm 3,6
Acetylocholina	23	0,145 \pm 0,012	10	93,9 \pm 2,2	7	74,9 \pm 4,3

Sok jelitowy wykazuje również wyraźną aktywność względem octanu indoksyli i bromku acetylocholinu. Oba te substraty zachowują się podobnie w stosunku do użytych inhibitorów, przy czym hydroliza octanu indoksyli jest mniej wyraźnie hamowana przez ezerynę. DFP hamuje w równie silnym stopniu hydrolizę obu tych substratów. Hydroliza zastosowanych tutaj estrów kwasów karboksylowych, jakkolwiek wyraźna, jest jednak znacznie słabsza niż w przypadku soku trzustkowego psa [14, 29, 30].

Zupełnie inaczej przedstawia się aktywność względem estrów kwasów nieorganicznych. Fosforan fenoltaleiny jest substratem rozkładanym bardzo intensywnie przez sok jelitowy. Ponieważ wiadomo, że komórki błony śluzowej jelita charakteryzują się bardzo wysoką zawartością zasadowej fosfatazy, występowanie tego enzymu w soku jelitowym nie jest niespodzianką. Zasadowa fosfataza występująca w soku jelitowym rozkłada fosforan fenoltaleiny z optymalną szybkością przy pH ok. 9,8 (Rys. 1). Wartość ta jest zgodna z danymi przedstawionymi przez innych autorów w odniesieniu do zasadowej fosfatazy błony śluzowej jelita [19, 22, 24].



Rys. 1. Zależność aktywności zasadowej fosfatazy od pH środowiska. Oznaczenia w buforze uniwersalnym według Brittona i Robinsona [27a]. Na osi rzędnych przedstawiono wartości gęstości optycznej fenoltaleiny uwolnionej w czasie 30 min. w temperaturze 37°. Stężenie białka w mieszaninie reagującej wynosiło 0,06 mg/ml



Rys. 2. Zależność aktywności arylosulfatazy od rozcieńczenia soku jelitowego. Na osi odciętych przedstawiono stężenie białka w mg/ml jako miarę rozcieńczenia soku jelitowego, na osi rzędnych aktywność w jednostkach aktywności na 1 mg białka. (O) sok niedializowany. (■) sok dializowany 17 godz. względem wody potrójnie destylowanej

Brak drugiego maksimum na krzywej pH pozwala przypuszczać, że w soku jelitowym nie występuje fosfataza kwaśna. W tablicy 3 przedstawiono aktywność soku jelitowego względem fosforanu fenoltaleiny uwzględniając wpływ dializy i niektórych jonów. Aktywność enzymu obniża się wskutek dializy względem wody i względem roztworu werse-

nianu sodu. Inaktywująco działają także jony fosforanowe i cyjankowe. Jony fluorkowe w stężeniu 10^{-2} M mają tylko niewielki wpływ aktywujący natomiast w stężeniu 10^{-1} M podwyższają aktywność enzymu w dość znacznym stopniu. Aktywująco działają również jony Mg^{2+} i słabiej jony Ca^{2+} .

Drugi z zastosowanych estrów nieorganicznych — siarczan nitro-katecholu — jest również rozkładany przez sok jelitowy z dość dużą aktywnością. Zbadano również wpływ niektórych czynników na aktywność arylosulfatazy odpowiedzialnej za hydrolizę tego substratu (Tabl. 3). Dializa soku jelitowego względem wody wyraźnie podwyższa aktywność arylosulfatazy. Już nawet samo rozcieńczanie soku niedializowanego powoduje wzrost aktywności w przeliczeniu na 1 mg białka, podczas gdy rozcieńczanie soku dializowanego nie zmienia już wcale jego aktywności właściwej (Rys. 2). Można to wyjaśnić obecnością jakiegoś czynnika działającego hamująco, którego działanie zmniejsza się przy rozcieńczaniu

T a b l i c a 3

Wpływ różnych czynników na aktywność zasadowej fosfatazy i arylosulfatazy soku jelitowego psa

Podane liczby są wartościami średnimi oznaczeń wykonanych na soku pochodzącym z różnych odcinków jelita. Aktywność enzymatyczną wyrażono w jednostkach aktywności na 1 mg białka, \pm średni błąd. Wpływ dializy i jonów przedstawiono jako procent hamowania (—) lub aktywacji (+) w stosunku do analogicznej ilości oznaczeń kontrolnych

	Zasadowa fosfataza (hydroliza fosforanu fenoltaleiny)		Arylosulfataza (hydroliza siarczanu nitrokatecholu)	
	ilość ozn.	aktywność	ilość ozn.	aktywność
Sok jelitowy	16	19,1 \pm 2,6 jedn.	39	0,56 \pm 0,06 jedn.
Dializa względem wody	4	—11,3 \pm 3,8 %	6	+49,2 \pm 21,8 %
Dializa względem roztworu wersenianu sodu (20 mg%)	2	—50,7 \pm 4,3 %	7	+82,7 \pm 12,0 %
PO_4^{3-} (10^{-2} M)	12	—59,9 \pm 5,0 %	9	—74,5 \pm 7,9 %
F^- (10^{-2} M)	6	+ 2,4 \pm 3,6 %	5	—45,8 \pm 4,4 %
F^- (10^{-1} M)	12	+40,6 \pm 8,0 %	6	—85, 2 \pm 7,6 %
Cl^- (10^{-1} M)	—	—	4	—42,3 \pm 2,5 %
CN^- ($5 \cdot 10^{-2}$ M)	5	—99,0 \pm 0,5 %	—	—
Mg^{2+} ($1,6 \cdot 10^{-1}$ M)	6	+25,0 \pm 2,8 %	—	—
Ca^{2+} ($1,6 \cdot 10^{-1}$ M)	3	+14,1 \pm 3,4 %	—	—

i który zostaje usunięty w czasie dializy. Być może są to jony fosforanowe, które jak stwierdzono, nawet w stężeniu 10^{-2} M działają silnie hamująco. Dializa soku jelitowego względem wersenianu sodu podwyższa

T a b l i c a 4

Aktywność esterolityczna soku jelitowego psów z przetokami w różnych odcinkach jelita cienkiego

Aktywność enzymatyczną przedstawiono w jednostkach aktywności na 1 mg białka, \pm średni błąd. Położenie odcinków jelita jak w tabelicy 1

Odcinek jelita	Nr psa	Octan <i>p</i> -nitro-fenolu		Octanindoksyłu		Acetylocholina		Fosforan fenol-faleiny		Siarczan nitro-katecholu	
		ilość ozn.	aktywność	ilość ozn.	aktywność	ilość ozn.	aktywność	ilość ozn.	aktywność	ilość ozn.	aktywność
I	1	2	0,124 $\pm 0,070$	4	0,37 $\pm 0,05$	7	0,116 $\pm 0,018$	6	12,42 $\pm 1,14$	10	0,50 $\pm 0,05$
	2	—	—	—	—	—	—	7	29,08 $\pm 2,18$	10	0,99 $\pm 0,10$
II	3	12	0,128 $\pm 0,017$	10	0,31 $\pm 0,03$	8	0,168 $\pm 0,023$	—	—	9	0,38 $\pm 0,04$
	4	2	0,051 $\pm 0,008$	—	—	—	—	—	—	—	—
III	5	11	0,116 $\pm 0,013$	4	0,32 $\pm 0,07$	8	0,148 $\pm 0,018$	3	9,25 $\pm 1,46$	10	0,36 $\pm 0,06$

aktywność enzymu w znacznie silniejszym stopniu niż dializa względem wody. Podobnie jak jony fosforanowe, silnie hamująco działają jony fluorkowe. Również hamująco, jakkolwiek w słabszym stopniu, działają jony chlorkowe.

Aktywność enzymatyczna soku jelitowego zarówno wobec estrów kwasów karboksylowych jak i nieorganicznych, podobnie jak stężenie białka, nie zależy w widoczny sposób od położenia odcinków jelita. Zebrane w tabelicy 4 wartości wykazują większe różnice dla dwóch różnych psów z tym samym rodzajem przetoki niż dla psów z przetokami w różnych odcinkach jelita.

DYSKUSJA

Doświadczenia przeprowadzone na soku jelitowym psa uzyskanym z przetok Thiry-Vella wykazały, że zawiera on enzymy hydrolizujące szereg różnych estrów kwasów karboksylowych i nieorganicznych. W dostępnej literaturze zajmującej się tym zagadnieniem wymieniano z grupy esteraz tylko lipazę [5, 23] i zasadową fosfatazę [17, 18, 22] jako enzymy występujące w błonie śluzowej jelita. Reale [23] stwierdził jednak, że lipaza obecna w komórkach błony śluzowej jelita jest nierozpuszczalna i dopiero po autolizie może przejść do roztworu. Zagadnienie pochodzenia enzymów w soku jelitowym nie zostało dotąd jednoznacznie wyjaśnione, większość badaczy jednak skłania się do poglądu, że enzymy te oddzielane są od błony śluzowej jelita wraz ze złuszcającym się nabłonkiem [10, 33].

W przedstawionej obecnie pracy zagadnienie to nie było jednak przedmiotem specjalnego zainteresowania, a tylko chodziło o stwierdzenie jakie enzymy z grupy esteraz znajdują się aktualnie w soku jelitowym uwolnionym od komórek i skrawków nabłonka.

Na podstawie doświadczeń z użyciem oliwy i trójbutyryny jako substratów można stwierdzić, że sok jelitowy psa nie zawiera lipazy w znaczeniu enzymu hydrolizującego trójglicerydy w stanie emulsji, odpornego na działanie związków organofosforowych [6, 27]. Świadczy o tym brak hydrolizy oliwy i fakt, że hydroliza trójbutyryny jest częściowo hamowana przez ezerynę. Ponieważ trójbutyryna rozkładana jest nie tylko przez lipazę trzustkową ale także przez inne esterazy, nawet przez esterazę cholinową [3, 29, 30], hydrolizę tego substratu należy przypisać raczej działaniu jakiejś innej esterazy a nie lipazy. Sok jelitowy zawiera również enzym lub enzymy hydrolizujące octan *p*-nitrofenolu, octan indoksyli i acetylocholinę. Obserwując różnice w działaniu ezeryny i DFP w stosunku do hydrolizy wyżej wymienionych substratów można by wnioskować o obecności dwóch enzymów tego typu. Jednym z nich może być esteraza cholinowa silnie hamowana przez DFP, a szczególnie przez ezerynę i temu enzymowi można przypisać całą obserwowaną hydrolizę acetylocholinę, znaczną część hydrolizy octanu indoksyli, a także tę część hydrolizy trójbutyryny i octanu *p*-nitrofenolu, która jest hamowana przez ezerynę i DFP. Hydrolizę tych estrów odporną na działanie ezeryny i DFP można by przypisać innej esterazie, prawdopodobnie typu A według Aldridge'a [1, 30]. Podobna esteraza znajduje się także w soku trzustkowym psa [30] i w surowicy ssaków [4]. Trudno jest stwierdzić, czy słaba hydroliza octanu cholesterolu spowodowana jest obecnością małej ilości specyficznej esterazy, czy też działaniem któregoś z poprzednio wymienionych enzymów.

Aktywność esteraz występujących w soku jelitowym jest bardzo niska w porównaniu z tego typu aktywnością soku trzustkowego i trudno przypuścić aby odgrywała ona jakąś poważniejszą rolę w procesach trawienia. Problem roli fizjologicznej tych enzymów, a także mechanizm ich wytwarzania pozostaje nadal sprawą otwartą.

Sok jelitowy zawiera znaczną ilość zasadowej fosfatazy, co jest zgodne z wysoką zawartością tego enzymu w błonie śluzowej jelita [18, 22]. Zaobserwowane własności tego enzymu pokrywają się z wynikami innych badaczy uzyskanymi przy użyciu oczyszczonych preparatów zasadowej fosfatazy z błony śluzowej jelita. Optimum pH enzymu równe około 9,8 nie odbiega od wartości podawanych przez innych autorów [19, 22, 24]. Sok jelitowy psa nie zawiera fosfatazy kwaśnej.

Interesująco przedstawia się fakt obecności w soku jelitowym enzymu hydrolizującego siarczan nitrokatecholu. Związek ten jest jednym ze spe-

cyficznych substratów dla arylosulfataz. Znane są trzy typy arylosulfataz, różniące się specyficznością i wrażliwością na działanie niektórych jonów. Obserwowane własności enzymu zawartego w soku jelitowym sugerują, że jest to arylosulfataza B, należąca do typu II [7, 31, 32]. Definitywne ustalenie jaki typ arylosulfatazy występuje w soku jelitowym będzie możliwe dopiero po przeprowadzeniu szczegółowych badań nad własnościami tego enzymu. W dostępnej literaturze nie znaleziono danych o obecności arylosulfatazy w soku jelitowym ssaków, a w błonie śluzowej jelita psa zaobserwowano tylko ślady tego enzymu [26].

Porównując aktywność enzymatyczną próbek soku pochodzących z różnych odcinków jelita cienkiego nie można było zaobserwować różnic wykraczających znacznie poza granice błędu, przeciwnie, wyniki oznaczeń charakteryzują się względnie dużą stałością pomimo trudności w utrzymaniu niezmiennych warunków pobierania soku. Wydaje się, że jelito cienkie psa, przynajmniej w granicach długości, w których były założone przetoki, wydziela sok o względnie stałym składzie w odniesieniu do stężenia białka i aktywności badanych enzymów.

Panu Prof. Dr B. Skarżyńskiemu pragniemy złożyć podziękowanie za życzliwą opiekę i pomoc przy wykonywaniu pracy.

STRESZCZENIE

Zbadano aktywność esterolityczną soku jelitowego psa uzyskanego z przetok Thiry-Vella względem ośmiu substratów, a mianowicie: oliwy, trójbutyryny, octanu cholesterolu, octanu *p*-nitrofenolu, octanu indoksyli, acetylocholino, fosforanu fenoltaleiny i siarczanu nitrokatecholu.

Sok jelitowy wykazuje słabą aktywność względem użytych estrów kwasów karboksylowych z wyjątkiem oliwy, która nie ulega hydrolizie. Na podstawie rodzaju rozkładanych substratów oraz wpływu ezeryny i kwasu dwuizopropylodifluorofosforowego (DFP) na ich hydrolizę przedyskutowano możliwość występowania dwóch czynników hydrolizujących estry kwasów karboksylowych, a to: esterazy cholinowej i esterazy aromatycznej typu A. Sok jelitowy nie zawiera lipazy.

Wysoka aktywność hydrolizy fosforanu fenoltaleiny spowodowana jest obecnością zasadowej fosfatazy. W soku jelitowym występuje również arylosulfataza rozkładająca siarczan nitrokatecholu.

L I T E R A T U R A

- [1] Aldridge W. N., *Biochem. J.* **53**, 110, 1953.
- [2] Alexander F., Chowdhury A. K., *Nature* **181**, 190, 1958.
- [3] Augustinsson K. B., w *Methods of Biochemical Analysis* (wyd. D. Glick) Interscience Publishers, New York-London 1957, tom V.
- [4] Augustinsson K. B., *Nature* **181**, 1786, 1958.
- [5] Boldyreff W., *Z. physiol. Chem.* **50**, 394, 1907.
- [6] Desnuelle P., Constantin M. J., Sarda L., *Bull. Soc. Chim. Biol.* **38**, 625, 1956.
- [7] Dodgson K. S., Spencer B. w *Methods of Biochemical Analysis* (wyd. D. Glick), Interscience Publishers, New York, London 1957, tom IV.
- [8] Fister H., *Manual of Standardized Procedures for Spectrophotometric Chemistry*, Standard Scientific Supply Corporation, New York 1950.
- [9] Folin O., Ciocalteu V., *J. Biol. Chem.* **73**, 627, 1927.
- [10] Fomina L. S., *Fizjologiczeskij Žurnal S.S.S.R.* **42**, 963, 1956.
- [11] Hestrin S., *J. Biol. Chem.* **180**, 249, 1949.
- [12] Holt S. J., *J. Histochem. Cytochem.* **4**, 541, 1956.
- [13] Homańska-Szafranowa H., Oleksy J., *Acta Biochim. Polon.* **3**, 663, 1956.
- [14] Homańska-Szafranowa H., Oleksy J., Szafran Z., *Acta Physiol. Polon.* **9**, 233, 1958.
- [15] Huggins C., Lapidus J., *J. Biol. Chem.* **170**, 467, 1947.
- [16] Huggins C., Talalay P., *J. Biol. Chem.* **159**, 399, 1945.
- [17] Levene P. A., Medigreceanu F., *J. Biol. Chem.* **9**, 65, 1912.
- [18] Macfarlane M. G., Patterson L. M. B., Robison R., *Biochem. J.* **28**, 720, 1934.
- [19] Morton R. K., *Biochem. J.* **60**, 573, 1955.
- [20] Overbeek G. A., Van der Vies J., *Biochem. J.* **60**, 665, 1955.
- [21] Phaneuf L. P., *Rept. N.Y. State Vet. Coll. Cornell. Univ.*, 1957-58, str. 31.
- [22] Portmann P., *Z. physiol. Chem.* **309**, 87, 1957.
- [23] Reale L., *Boll. Soc. Ital. Biol.* **9**, 793, 1934.
- [24] Roche J., Bouchilloux S., *Bull. Soc. Chim. Biol.* **32**, 732, 1950.
- [25] Roy A. B., *Biochem. J.* **53**, 12, 1953.
- [26] Rutenburg A. M., Seligman A. M., *Arch. Biochem. Biophys.* **60**, 193, 1956.
- [27] Sarda L., Desnuelle P., *Biochim. Biophys. Acta* **30**, 513, 1959.
- [27a] Steiner M. w *Die Methoden der Fermentforschung* (wyd. Bamann E., Myrbäck K.), Georg Thieme Verlag, Leipzig 1941, tom 1, str. 788.
- [28] Szafran H., Szafran Z., Oleksy J., *Acta Biochim. Polon.* **7**, 51, 1960.
- [29] Szafran Z., Homańska-Szafranowa H., Oleksy J., *Acta Biochim. Polon.* **5**, 189, 1958.
- [30] Szafran Z., Szafran H., Oleksy J., *Acta Biochim. Polon.* **6**, 205, 1959.
- [31] Webb E. C., Morrow P. F. U., *Biochem. J.* **73**, 7, 1959.
- [32] Webb E. C., Morrow P. F. U., *Biochim. Biophys. Acta* **39**, 542, 1960.
- [33] Wright R. D., Jennings M. A., Florey H. W., Lium R., *Quart. J. Exper. Physiol.* **30**, 73, 1940.

STUDIES ON HYDROLASES OF DIGESTIVE JUICES

VI. ESTERASES OF THE DOG INTESTINAL JUICE

S u m m a r y

The esterolytic activity of the dog intestinal juice obtained from the Thiry-Vella fistula has been examined against eight substrates, namely: olive oil, tributyrin, cholesterol acetate, *p*-nitrophenyl acetate, indoxyl acetate, acetylcholine, phenolphthalein phosphate and nitrocatechol sulphate.

The intestinal juice shows a slight activity towards the employed esters of carboxylic acids, olive oil being not hydrolyzed at all.

Basing upon the kinds of hydrolyzed substrates and on the effect of eserine and diisopropylfluorophosphoric acid (DFP) on their hydrolysis, the possible presence of two enzymes hydrolyzing the carboxylic acids esters has been discussed, namely the presence of cholinesterase and aromatic esterase, type A. Intestinal juice does not contain any lipase.

The high rate of phenolphthalein phosphate hydrolysis is due to the presence of alkaline phosphatase. Arylsulphatase acting on nitrocatechol sulphate is also present in intestinal juice.

Otrzymano 25. 7. 1960

M. WIEWIOROWSKI i J. AUGUSTYNIAK

Z BADAŃ NAD BIAŁKIEM ŁUBINOWYM

IV. N-KOŃCOWE AMINOKWASY W KONGLUTYNYE β *Zakład Hodowli Roślin PAN, Poznań**Kierownik: Prof. Dr S. Barbacki*

Kontynuując nasze prace nad kompleksem białek występujących w nasionach łubinu [18, 19, 20], przystąpiliśmy do preparatywnego frakcjonowania jego składników i do możliwie dokładnego poznania ich budowy. W pierwszym rzędzie zajęliśmy się konglutyną β i niniejszy komunikat przedstawia wyniki określające, jakie aminokwasy zajmują N-końcowe pozycje w tym białku. Określenie to wykonano metodą Sangera [15].

MATERIAŁ I METODY

Przedmiot badań

Obiektem naszych badań była konglutyna β wyizolowana z nasion łubinu wąskolistnego odmiany „Obornicki“. Preparat tego białka otrzymano zmodyfikowaną metodą Jouberta [7] w następujący sposób: zmiecioną i odtłuszczoną mączkę z nasion łubinu ekstrahowano 10% NaCl,



Rys. 1. Zdjęcie elektroforogramu. (A) mieszanina globulin z nasion łubinu wąskolistnego, (B) preparat konglutyny β . 0,2 M-bufor weronalowy pH 8,6, 200 V. 0,8 mA/cm. szer. paska, czas 6 godz.; na pasek nakładano ca 10 μ l 6% roztworu białka

ekstrakt po odwirowaniu poddano dializie do wody w temp. pokojowej do zaniku reakcji na chlorki. Wytrącone w wyniku dializy globuliny (silnie zabarwione na żółto) rozpuszczono w 10% NaCl, a roztwór poddano dializie do buforu octanowego o sile jonowej 0,25 i pH 4,7. Analiza elek-

troforetyczna wykazała, że w tych warunkach wytrącała się konglutyna α wraz z zaadsorbowanymi barwnikami i częścią konglutyny β , a część konglutyny β pozostawała w roztworze. Po dializie tego roztworu do wody w temp. 0° wytrącał się biały osad konglutyny β . W celu możliwie dokładnego oczyszczenia preparatu cały cykl powtórzono 5 razy.

Elektroforeza bibułowa przeprowadzona w buforze weronalowym o pH 8,6 [20] wykazała elektroforetyczną czystość otrzymanego preparatu (Rys. 1).

Zliofilizowany preparat badanego białka był przechowywany w temp. -5° nad P_2O_5 .

Odczynniki

1. 1-fluoro-2,4-dwunitrobenzen (DNFB) — f-my L. Light, Anglia;
2. 2,4-dwunitrofenylo (DNF)-aminokwasy syntetyzowano z aminokwasów f-my LaRoche, Szwajcaria i DNFB, wg Levy i Chung [10], z wyjątkiem ϵ -DNF-lizyny, którą otrzymano z miedziowego kompleksu wg Portera i Sangera [14]. Pozostałe odczynniki — B.O.O., Gliwice.

Przygotowanie 2,4-dwunitrofenylo (DNF)-konglutyny β

Reakcję pomiędzy konglutyną β a DNFB przeprowadzano jak podaje Fraenkel-Conrat i Porter [5]. Surowy preparat DNF-konglutyny przemywano 3 razy wodą, 3 razy etanolem i 3 razy eterem etylowym, a następnie suszono w próżni nad P_2O_5 .

Sposób obliczenia masy cząsteczkowej DNF-konglutyny β

Podstawą tego obliczenia było porównanie zawartości azotu amidowego w preparacie konglutyny β oraz DNF-konglutyny β . Azot amidowy oznaczano wg Chibnalla i wsp. [3]. Masa cząsteczkowa „frakcji B“ globulin z nasion łubinu wąskolistnego wyznaczona przez Jouberta [7] na podstawie pomiarów sedymentacji, wynosi 181 000. Rząd wielkości posiadanego przez nas preparatu konglutyny β , wyznaczony dyfuzyjną metodą Northropa i Ansona wg Krawczyka i wsp. [8], wynosił około 200 tys. (Tabl. 1). Ponieważ wartość ta stosunkowo dobrze zgadza się z danymi Jouberta, dlatego przy dalszych obliczeniach przyjęto masę cząsteczkową konglutyny β równą 181 tys.

Hydroliza DNF-konglutyny β i ekstrakcja hydrolizatu

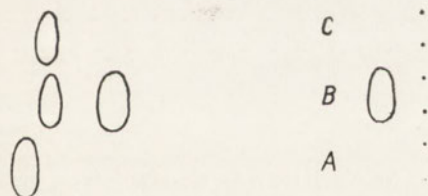
DNF-białko hydrolizowano HCl o stałej temp. wrzenia, dodając na każde 3 mg białka 1 ml kwasu. Chcąc wybrać optymalny czas hydrolizy, DNF-białko gotowano z kwasem przez 12, 16 i 24 godz., po czym uznano, że hydroliza 24-godzinna jest najlepsza, gdyż przy jej stosowaniu uzyskano największą wydajność kwasu DNF-glutaminowego (Tabl. 2).

W celu oddzielenia DNF-aminokwasów rozpuszczalnych w eterze od DNF-aminokwasów rozpuszczalnych w wodzie, hydrolizat rozcieńczano wodą (doprowadzając stężenie kwasu do około 1 N [17] i ekstrahowano trzema porcjami eteru. Połączone ekstrakty eterowe przemywano 1 N-HCl, eter odparowywano i suchą pozostałość przejmowano do acetonu.

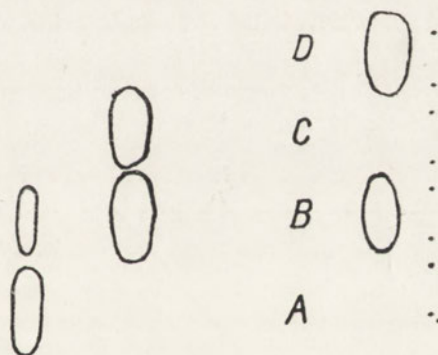
Również warstwę wodną odparowywano pod próżnią, a pozostałość przejmowano do małej objętości wody.

Identyfikacja DNF-pochodnych w hydrolizacie

Orientacyjne określenie charakteru DNF-związków we frakcji eterowej hydrolizatu DNF-konglutyny β przeprowadzono przy pomocy chromatografii dwukierunkowej, przy czym chromatogram (na bibule Whatman nr 3) rozwijano w pierwszym kierunku butanolem nasyconym 1% (wag./obj.) amoniakiem [2], a w drugim — 1,5 M-buforem fosforanowym o pH 6,0 [9]. W obu kierunkach chromatogram rozwijano techniką wstępującą. W tych warunkach mieszanina rozdzielała się na 3 plamy, z których pierwsza zajmowała pozycję dwunitroaniliny (DNF-NH₂), druga — dwunitrofenolu (DNF-OH), a trzecia pozycję kwasu dwunitrofenyloglutaminowego (DNF-glu) lub dwunitrofenyloasparaginowego (DNF-asp).



Rys. 2. Schemat elektroforogramu. (A) kwas DNF-asparaginowy; (B) frakcja eterowa hydrolizatu DNF-konglutyny β ; (C) kwas DNF-glutaminowy. 0,05 M-boraks, 200 V, 6 godz. 1,2 mA/cm szer. paska



Rys. 3. Schemat elektroforogramu. (A) kwas DNF-glutaminowy; (B) frakcja eterowa hydrolizatu konglutyny β ; (C) dwunitrofenol; (D) dwunitroanilina. 0,2 M-bufor weronałowy pH 8,6, 200 V, 0,8 mA/cm szer. paska, czas 4 godz.

Ponieważ w opisanych warunkach 2 ostatnie związki nie rozdzielają się dobrze, dlatego przeprowadzono próby ich rozdziału przy pomocy elektroforezy bibułowej, gdyż podobnie jak chromatografia jednokierunkowa, umożliwia ona proste, bezpośrednie porównanie badanej substancji z substancją wzorcową. Zadawalający wynik uzyskano przy wykonywaniu

elektroforezy w 0,05 M-roztworze boraksu. Jak widać na rys. 2, w hydrolizacie DNF-konglutyny β znajduje się związek zajmujący na elektroforogramie pozycję DNF-glu. DNF-asp posiada nieco większą ruchliwość niż DNF-glu.

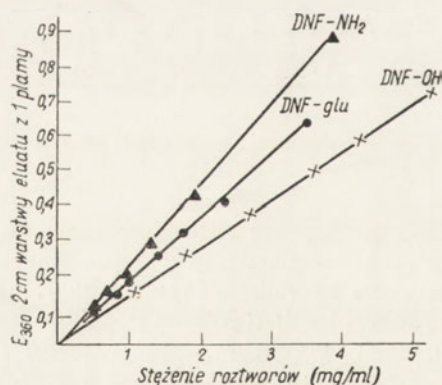
Obecność DNF-glu we frakcji eterowej potwierdzono dodatkowo hydrolizując pozostałość po odpędzeniu eteru nasyconym $\text{Ba}(\text{OH})_2$ [13]. W otrzymanym hydrolizacie stwierdzono obecność kwasu glutaminowego przy pomocy wysokonapięciowej elektroforezy bibułowej, przeprowadzonej w buforze pirydynowym wg Masłowskiego [12].

Charakter pozostałych 2 związków potwierdzono przy pomocy elektroforezy bibułowej w 0,2 M-buforze weronalowym o pH 8,6 (Rys. 3). Dodatkowym dowodem obecności DNF-OH był fakt odbarwienia się odpowiedniej plamy po zadaniu elektroforogramu gazowym HCl [14].

Frakcja wodna hydrolizatu DNF-konglutyny zawierała tylko ϵ -DNF-lizynę. Zarówno na chromatogramie rozwijanym mieszaniną butanol-kwas octowy - woda (4 : 1 : 5) [16], jak i na elektroforogramie wykonanym w 1 N- NH_4OH [1] obserwowano tylko jedną plamę, odpowiadającą ϵ -DNF-lizynie.

Ilościowe oznaczenie DNF-glu, DNF-OH i DNF-NH₂

Przy ilościowym oznaczaniu wymienionych związków wykorzystano fakt, że rozdzielają się one bardzo dobrze w buforze weronalowym (Rys. 3). Oznaczenia te wykonano w następujący sposób: Pipetką o pojemności około 18 μl nakładano na pasek bibuły wzorcowe roztwory



Rys. 4. Krzywe standardowe kwasu DNF-glutaminowego, dwinitrofenolu i dwinitroalaniny. Ekstynkcje eluatów plam otrzymanych po elektroforezie bibułowej standardów kwasu DNF-glutaminowego, dwinitrofenolu i dwinitroalaniny. Nakładano po 18 μl . Szczegóły w tekście

DNF-glu, DNF-OH i DNF-NH₂ o stopniowo wzrastającym stężeniu i przeprowadzono elektroforezę przez 4 godz. Po tym czasie paski suszono na powietrzu, wycinano plamy i eluowano je 10 ml (z wyjątkiem plam DNF-OH, które eluowano 20 ml) 1% NaHCO_3 w temp. 55 - 60° przez 15 min. [4]. Po ostygnięciu eluaty kolorymetrowano na spektrofotometrze

uniwersalnym Zeissa przy 360 m μ [9]. Zależności pomiędzy stężeniem a ekstynkcją warstwy 2 cm, przedstawione na rys. 4, wyrażały się równaniami: dla DNF-glu $E = 0,1816 \cdot c - 0,0033$, dla DNF-OH $E = 0,1380 \cdot c - 0,0082$, dla DNF-NH₂ $E = 0,2280 \cdot c - 0,0018$, gdzie c oznacza stężenie roztworów wzorcowych w mg/ml. Równania obliczono metodą najmniejszych kwadratów.

Analogicznie jak przy roztworach wzorcowych oznaczano ekstynkcję poszczególnych DNF-pochodnych frakcji eterowej hydrolizatu DNF-konglutyny β , z tym że na pasek bibuły nakładano po 6 - 10 „pipetek“ acetonowego roztworu tej frakcji, otrzymanego przez uzupełnienie pozostałości po odpędzeniu eteru acetonem do obj. 1 ml, oraz, że plamy eluowano w 2 przypadkach mniejszą objętością 1% NaHCO₃ (Tabl. 2).

Po oznaczeniu ekstynkcji obliczano na podstawie równań krzywych standardowych stężenie substancji w mg/ml.

Wyznaczenie współczynnika poprawkowego na straty DNF-glu podczas hydrolizy

Chcąc się przekonać, jaki procent DNF-glu ulega rozkładowi podczas hydrolizy, gotowano pod chłodnicą zwrotną przez 18 godz. znaną ilość białka z dodatkiem znanej ilości DNF-glu, a także hydrolizowano DNF-glu bez białka. Po hydrolizie oznaczano zawartość tego związku jak w przypadku hydrolizatu DNF-konglutyny β .

WYNIKI

Wyznaczenie rzędu wielkości masy cząsteczkowej konglutyny β przedstawione jest w tabl. 1. Oznaczono, że konglutyna β zawiera 2,082%,

T a b l i c a 1

Wyznaczenie rzędu wielkości masy cząsteczkowej konglutyny β

Metoda dyfuzyjna Northropa i Ansona wg Krawczyka i wsp. [8]. Do badań użyto roztwór o stężeniu 500 μ g białka/1 ml 1 M-NaCl

Nr dośw.	Pojemność sączka (ml)	Stała sączka	Dyfuzyjat do reakcji Folina* (ml)	E dyfuzyjatu	Q^{**} (ml)	t w tys. sek.	$D_{0^\circ} C \cdot 10^{-7}$	$r \cdot 10^{-7}$ (cm)	$M \cdot 10^3$
1	20,5	0,133	2	0,167	1,110	525,6	2,809	3,93	199
2	20,5	0,133	2	0,057	0,205	97,2	2,804	3,94	200
3	10,5	0,379	5	0,073	0,070	97,2	2,730	4,05	217

* Przy oznaczaniu ilości przedyfundowanego białka posługiwano się kolorymetryczną metodą Lowry i wsp. [11]. Po dodaniu koniecznych odczynników objętość każdej próby doprowadzono do 13 ml.

** Obliczono na podstawie krzywej standardowej $E = 0,025 \cdot c + 0,032$, gdzie c = stężenie białka w μ g/ml.

T a b l i c a 2

Zawartość kwasu DNF-glutaminowego, dwunitrofenolu i dwunitroaniliny w 2 frakcjach eterowej hydrolizatu DNF-konglutyny β

DNF-K β = DNF-konglutyna β . Podane wyniki ekstynkcji (E) stanowią średnią z 4 równoległych oznaczeń. Odchylenie poszczególnych wyników od średnich wynosiło od 1 do 9%

Nr dośw.	Hydrolizowano DNF-K β (mg)	Czas hydrolizy (godz.)	Elektrof. acetonowy roztwór μ l	Objętość eluatu z płamy (ml)	DNF-glu		DNF-OH		DNF-NH ₂				
					E ₃₆₀	DNF-po-chodna (mg)	mole/mol DNF-K β	E ₃₆₀	DNF-po-chodna (mg)	mole/mol DNF-K β	E ₃₆₀	DNF-po-chodna (mg)	mole/mol DNF-K β
1	46,55	12	144	3,5	0,233	0,057	0,78	0,158	0,026	0,6	0,250	0,048	1,1
2	68,51	16	108	7,0	0,146	0,096	0,90	0,067	0,032	0,5	0,095	0,048	0,8
3	128,08	24	144	10,0	0,272	0,189	0,94	0,132	0,063	0,5	0,190	0,104	0,9
4	85,05	24	180	10,0	0,234	0,131	0,98	0,129	0,049	0,6	0,122	0,054	0,7

$\pm 0,006$ ¹ N-amidowego, wobec czego w 1 molu białka znajduje się 3768 g N-amidowego, co stanowi 269 grup amidowych na cząsteczkę. W wyniku reakcji białka z DNFB ilość N-amidowego nie ulega zmianie, a ponieważ DNF-konglutyna β zawiera 1,91%, $\pm 0,04$ ² N-amidowego, więc jej masa cząsteczkowa wynosi 197,2 tys. Dzielać różnicę mas cząsteczkowych pomiędzy konglutyną β a jej DNF-pochodną przez 166 (przyrost masy cząsteczkowej białka po reakcji z 1 cząsteczką DNFB) obliczono, że w konglutynie β w reakcję z DNFB wchodzi około 100 grup funkcjonalnych.

Wyniki oznaczeń kolorymetrycznych zawartości DNF-glu, DNF-OH i DNF-NH₂ w hydrolizacie DNF-konglutyny β są przedstawione w tabelicy 2.

Analizy chromatograficzne i elektroforetyczne frakcji eterowej i wodnej hydrolizatu DNF-konglutyny β zgodnie wykazały, że jedynym N-koń-

T a b l i c a 3

Odzyskanie kwasu DNF-glutaminowego po hydrolizie

Podane wyniki ekstynkcji (*E*) stanowią średnią z 4 równoległych oznaczeń. Odchylenie poszczególnych wyników od średnich wynosiło 2%

Nr dośw.	DNF-glu (mg)	Hydroli-zowano z dodat-kiem	Elektrof. acetonowy roztwór* (μ l)	Eluat z plamy (ml)	<i>E</i> ₃₆₀	DNF-glu odzyskany	
						(mg)	(%)
1	1,75	białka	54	10	0,260	0,49	28,0
2	1,75	białka	54	10	0,295	0,55	31,4
3	3,50	—	18	10	0,196	1,10	31,5
4	3,50	—	18	10	0,200	1,12	32,0

* Po odparowaniu eteru suchą pozostałość uzupełniono acetonem do objętości 1 ml.

cowym aminokwasem tego białka jest kwas glutaminowy. Uwzględniając procentowy rozkład DNF-glu w czasie stosowanej przez nas hydrolizy (Tabl. 3) obliczono, że w konglutynie β znajdują się 3 N-końcowe reszty tego kwasu.

DYSKUSJA

Przedstawione wyniki sugerują, że cząsteczka konglutyny β składa się z 3 łańcuchów polipeptydowych, z których każdy posiada jako resztę N-końcową — resztę kwasu glutaminowego. Obecność tego samego aminokwasu jako reszty N-końcowej w 3 łańcuchach polipeptydowych świadczy o pewnej analogii w budowie tych łańcuchów. Z tego też

¹ Średnia z 2 oznaczeń.

² Średnia z 3 oznaczeń.

punktu widzenia bardzo ciekawe będzie stwierdzenie, czy wszystkie 3 łańcuchy posiadają również jednakowe reszty C-końcowe.

Ilościowe oznaczenie reszt C-końcowych wydaje się konieczne również i z tego względu, że wniosek o obecności 3 łańcuchów polipetydowych w cząsteczce konglutyny β opiera się na uwzględnieniu około 70 procentowego rozkładu kwasu DNF-glutaminowego w czasie stosowanej hydrolizy. Należy żałować, że nie ma w literaturze dokładnych danych na temat rozkładu DNF-glu w warunkach hydrolizy 20% HCl. Sanger w swej metodycznej pracy [15] zajmował się szczególnie stabilnością DNF-glicyny, DNF-lizyny i DNF-feniloalaniny i wykazał, że najmniej odporna na działanie 20% HCl jest DNF-glicyna, która po 24 godz. hydrolizie rozkłada się nawet w 95%, podczas gdy DNF-feniloalanina w tym samym czasie w 10%. Na marginesie tych badań Sanger wspomina, że kwas DNF-asparaginowy ulega w czasie 20-godzinnej hydrolizy rozpadowi nie przekraczającemu 20%. Na tej podstawie sądziliśmy, że zachowanie się kwasu DNF-glutaminowego będzie podobne, przeprowadzone jednak przez nas oznaczenia wykazały, że kwasy te różnią się stabilnością bardzo wyraźnie.

Bardzo duży rozkład DNF-glu w czasie długotrwałej hydrolizy winien powodować tendencję do maksymalnego skrócenia jej czasu, badania nasze wykazały jednak, że największe ilości DNF-glu pojawiają się dopiero po 24 godz., i dlatego ten okres hydrolizy uznaliśmy za konieczny do zastosowania do celów obliczeń molowych. Niewątpliwie, że gdyby w konglutynie β były również łańcuchy z N-końcową glicyną, to po 24-godzinnej hydrolizie trudno byłoby ją dostrzec na tle dużych ilości DNF-OH, DNF-NH₂ i DNF-glu. Tę ewentualność odrzucamy jednak, gdyż hydrolizaty DNF-konglutyny β były po różnych okresach hydrolizy szczegółowo jakościowo przeszukane w oparciu o technikę chromatograficzną i elektroforetyczną.

Jak wynika z różnicy pomiędzy masą cząsteczkową konglutyny β a masą cząsteczkową jej DNF-pochodnej, w reakcję z 1 cząsteczką białka wchodzi około 100 cząsteczek DNFB. Na podstawie składu aminokwasowego konglutyny β , określonego przez Gerritsena [6] (konglutyna β odpowiada frakcji L. a. S_{7,8}), można by się spodziewać, że w białku tym reagować będzie 54 grup ϵ -aminowych lizyny, 27 grup imidazolowych histydyny, 48 grup wodorotlenowych tyrozyny i ewentualnie 23 grup tiolowych cysteiny (łącznie 154 + x N-końcowych). Ponieważ jednak reakcja pomiędzy grupą imidazolową histydyny a DNFB przebiega bardzo wolno [15], czego wyraźnym dowodem jest znaleziona przez nas bardzo mała ilość dwunitroaniliny, a dalej, ponieważ nie znaleziono w hydrolizatach tiolowych DNF-pochodnych cysteiny (przed reakcją z DNFB konglutyna β nie była poddana redukcji), dlatego po odjęciu od łącznej ilości 154 grup funkcjonalnych teoretycznie zdolnych do reakcji z DNFB,

52 grup praktycznie bardzo mało aktywnych, uzyskujemy liczbę 102 (+ x), na podstawie której uważamy nasz wynik (100) za zgodny z danymi Gerritsena. Zgodna z wynikami tego autora jest również oznaczona przez nas ilość grup amidowych w cząsteczce konglutyny β (264 wg Gerritsena, 269 wg naszych oznaczeń).

Przedstawione wyniki wskazują, że konglutyny badane przez nas i przez Gerritsena [6] oraz Jouberta [7] o ile nie są w pełni tymi samymi związkami, to co najmniej bardzo podobnymi.

STRESZCZENIE

Przy pomocy fluorodwunitrobenzenowej metody Sangera stwierdzono, że jedyne N-końcowymi resztami aminokwasowymi w konglutynie β z nasion łubinu wąskolistnego są reszty kwasu glutaminowego.

Oznaczenia ilościowe wykazały, że cząsteczka badanego białka zawiera 3 N-końcowe reszty tego kwasu. Na tej podstawie przypuszcza się, że w skład konglutyny β wchodzi 3 łańcuchy polipeptydowe.

Potwierdzono obserwację Gerritsena [6], że w cząsteczce badanego białka znajduje się około 265 grup amidowych.

L I T E R A T U R A

- [1] Anfinsen C. B., Sela M., Tritch H., *Arch. Biochem. Biophys.* **56**, 156, 1956.
- [2] Braunitzer G., *Chem. Ber.* **88**, 2025, 1955.
- [3] Chibnall A. C., Mangan J. L., Rees M. W., *Biochem. J.* **68**, 111, 1958.
- [4] Fraenkel-Conrat H., Harris J. I., Levy A. L., *Methods of Biochemical Analysis* **2**, 359, 1955.
- [5] Fraenkel-Conrat H., Porter R. R., *Biochim. Biophys. Acta* **9**, 557, 1952.
- [6] Gerritsen T., *Biochim. Biophys. Acta* **22**, 269, 1956.
- [7] Joubert F. J., *Biochim. Biophys. Acta* **16**, 370, 1955.
- [8] Krawczyk A., Ostrowski W., Skarżyński B., *Acta Biochim. Polon.* **3**, 401, 1956.
- [9] Levy A. L., *Nature* **174**, 126, 1954.
- [10] Levy A. L., Chung D., *J. Am. Chem. Soc.* **77**, 2899, 1955.
- [11] Lowry O. H., Rosenbrough N. J., Farr A. L., Randall R. J., *J. Biol. Chem.* **193**, 265, 1951.
- [12] Masłowski J., *Chemia Anal.* **4**, 611, 1959.
- [13] Mills G. L., *Nature* **185**, 403, 1950.
- [14] Porter R. R., Sanger F., *Biochem. J.* **42**, 287, 1948.
- [15] Sanger F., *Biochem. J.* **39**, 507, 1945.
- [16] Sanger F., Tuppy H., *Biochem. J.* **49**, 463, 1951.
- [17] Schroeder W. A., *J. Am. Chem. Soc.* **74**, 5118, 1952.
- [18] Wiewiórowski M., Augustyniak J., *Acta Biochim. Polon.* **3**, 345, 1956.
- [19] Wiewiórowski M., Augustyniak J., Skrzypińska H., *Roczn. Nauk Roln.* **79-A-1**, 19, 1958.
- [20] Wiewiórowski M., Augustyniak J., Skrzypińska H., Przybylska J., Kocialkowski Z., *Acta Biochim. Polon.* **6**, 143, 1959.

STUDIES ON LUPIN PROTEINS

IV. N-TERMINAL AMINO ACIDS IN CONGLUTIN β

S u m m a r y

The glutamic acid residues were found to be the only N-terminal ones in conglutin β , by means of the Sanger's fluorodinitrobenzene method.

The quantitative studies revealed, that the molecule of examined protein contained 3 N-terminal residues of this amino acid. Thus it was supposed that conglutin β contained 3 polypeptide chains.

The Gerritsen's observation [6] was confirmed, that there was about 265 amido groups in one molecule of the protein under investigation.

Otrzymano 30. 7. 1960.

P. SZAFRAŃSKI and T. GOŁASZEWSKI

FURTHER CHARACTERISTICS OF CYTOPLASMIC NUCLEOPEPTIDES FROM THE GUINEA PIG LIVER

*Department of Evolutionary Biochemistry, Institute of Biochemistry & Biophysics
and Department of Physiological Chemistry, School of Medicine, Warsaw*

Director: Prof. Dr. J. Heller

In the previous papers [10, 11], isolation and some characteristics of nucleopeptides from the liver of guinea pig were described. It was demonstrated that the nucleotides in these compounds are linked with peptides through the carboxyl group. In this paper further procedure for purification of nucleopeptides is given, as well as a more precise characteristic both of peptide and nucleotide parts.

EXPERIMENTAL

Isolation of nucleopeptides, separation on triethylaminethylcellulose (TEAE) column, and paper electrophoresis were carried out as before [11]. The general diagram of purification of these compounds is given in the scheme. The electrophoretic fractions visible in ultraviolet light were cut out, eluted with 0.01 N-hydrochloric acid, concentrated at room temperature and chromatographed on Whatman filter paper No. 1, in a system: butanol - acetic acid - water (4 : 1 : 5) [8]. The electrophoretically homogeneous material separated into a series of spots, visible in ultraviolet light. Pictures A in Fig. 1, taken in ultraviolet light present an example of chromatograms of electrophoretic fractions. Chromatograms were sprayed with 1 N salt-free hydroxylamine, dried at room temperature for 2 days and developed with acidified ferric chloride [6]. Pink-brown spots of hydroxamic acids appeared (Fig. 1, Picture B), generally in the same position as those obtained in ultraviolet light. However, some of spots absorbing at 260 m μ did not have any correspondents in hydroxamic acids (Fig. 1, Fraction 5).

Our previous investigations with electrophoretic fractions of nucleopeptides suggested that 2 to 4 peptides may join the nucleotide part. We

decided to verify it after further separation of electrophoretic fractions by chromatography. The chromatograms were sprayed with 1 N-hydroxylamine, thus transforming the peptides into hydroxamic derivatives and splitting them from nucleotides. The surplus of hydroxylamine was allowed to evaporate, spots visible in ultraviolet light were cut out from the chromatogram and eluted with 0.01 N-hydrochloric acid. The extracts were concentrated *in vacuo* over KOH, and chromatography of hydro-

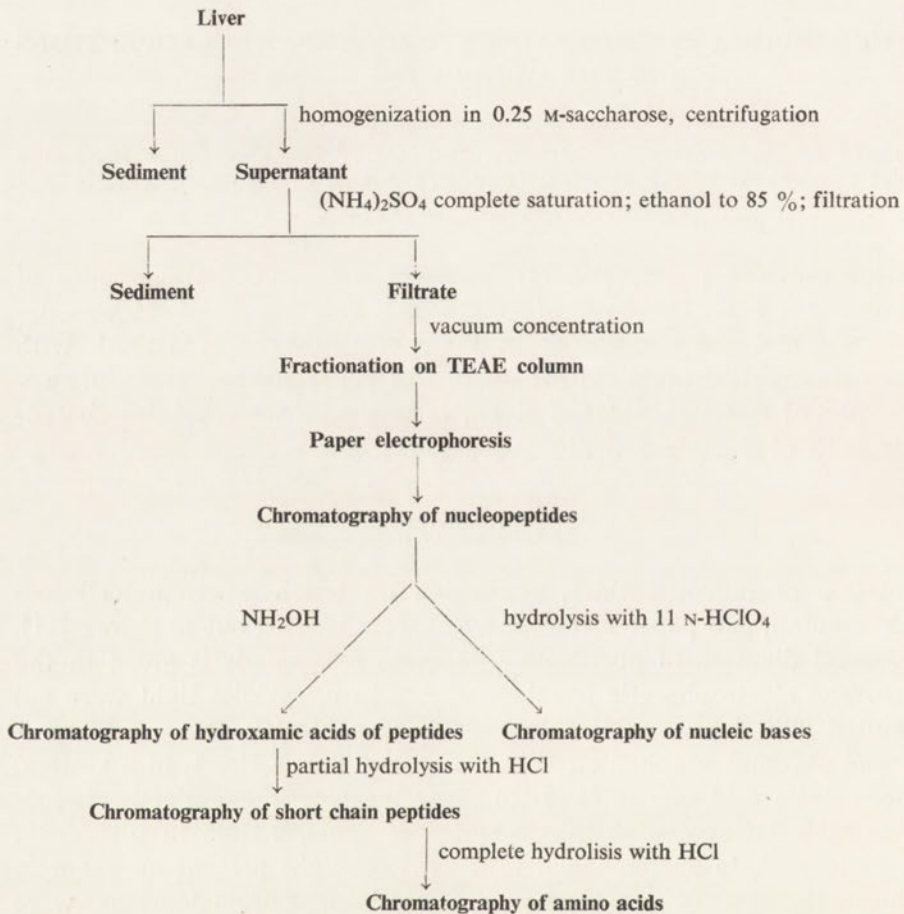


Diagram of isolation of nucleopeptides from the liver of guinea pig. Details concerning the first stages of purifying, including electrophoresis are given in the previous paper [11]

xamic derivatives of peptides was made in a butanol-acetic acid-water system (9 : 1 : 1) [6]. The spots were developed with acidified ferrum chloride. Fig. 2 shows examples of these chromatograms. In most cases chromatography displayed the presence of one spot, like for instance

on picture 2 and 3. In some cases, however, several spots appeared (Pictures 6, 7, 8). This should prove, that the nucleotide part could combine with one or more peptides, assuming that the chromatographically separated nucleopeptides were homogeneous. This leads to the conclusion that the peptides were linked to nucleotide moiety through the phosphate groups, and not through 2' or 3'-OH groups of ribose. We checked it by means of a periodate reaction [4], carried out on paper with electrophoretically separated nucleopeptides. In all cases the reaction was positive, indicating the presence of free 2', 3' OH groups. Though the periodate reaction is not sufficiently specific, it shows, in connection with the previously described results of chromatography that peptides form an anhydric linkage with phosphate groups of the nucleotide.

In previous experiments [10, 11] while applying complete hydrolysis we were unable to demonstrate any differences between peptides of nucleopeptides. Paper chromatography of these hydrolyzates indicated the presence of the same group of amino acids. To investigate more closely the differences or similarity of peptide the partial acid hydrolysis was applied [2]. Chromatographically separated and developed with FeCl_3 hydroxamic peptides were cut out (spots marked a, b, c, in Fig. 2), eluted with 0.01 N-hydrochloric acid. After removal of HCl and iron a partial hydrolysis was carried out in 10 N-hydrochloric acid at 37° during 3 days. After eliminating HCl, paper chromatography was made, in the system butanol - acetic acid - water (4 : 1 : 5), and developed with 0.25 per cent solution of ninhydrin in acetone. The pictures (Fig. 3) illustrated that partial hydrolyzates of peptides distinctly differ from one another. To confirm these differences, spots stained with ninhydrin were cut out, eluted with water, surplus of ninhydrin was eliminated using H_2O_2 [7], and complete hydrolysis was carried out by 6 N-HCl during 16 hours at 105° in sealed tubes. After elimination of hydrochloric acid, amino acids were chromatographed as previously. The results obtained (Fig. 4) indicate that peptides differ by their amino acids composition.

Earlier experiments indicated [10] that in the nucleotide part of nucleopeptides more than one base is represented. As the electrophoretic fractions used in these experiments were non-homogeneous, we tested them once more using chromatographically separated nucleopeptides. Spots, visible in ultraviolet light were cut out at different levels, eluted with 0.01 N-HCl, evaporated to dryness in small tubes, then 0.02 ml of 11 N-perchloric acid was added, sealed and hydrolyzed for 1 hour at 100° . The content of the tube was then diluted with the equal volume of water, instilled on Whatman paper No. 1, and chromatographed for 3 - 4 hours, in the system isopropanol - hydrochloric acid - water [12]. This preliminary chromatography allowed to eliminate perchloric acid, which remained

at the start line. The material absorbing in ultraviolet light was then cut out, eluted with 0.01 N-HCl, and rechromatographed in the same system. Chromatography of standard samples of five nucleic bases was carried out in the same manner. An example of the results is presented in Fig. 5.

The results obtained confirm our previous suggestions [10, 11] as to the complex character of nucleopeptides. They are compounds containing oligonucleotides linked with peptides by means of the carboxyl group probably to the phosphate group. Peptidic parts differ by their contents of different amino acids.

DISCUSSION

The results of numerous recent works on nucleopeptides point to a wide distribution of these compounds. They were isolated from animals [9, 10], plants [5] and microorganisms [1]. If we compare the nucleopeptides isolated from the liver of guinea pigs with similar compounds from other biological material, it has to be stated that the former are more complex. Nucleopeptides from microorganisms or plants contain 3 to 7 amino acids and one or a couple of nucleic bases, whereas those we have isolated are composed of several bases and more than ten amino acids. It was at first suspected that they were artefacts arising during preparation. This view is no more tenable nowadays although the metabolic significance of nucleopeptides is not yet sufficiently elucidated. Synthesis of these compounds was obtained *in vitro* with bacterial preparations [1]. We ascertained in our laboratory that they originate in cell-free preparations from guinea pig liver, which are able to synthesise proteins (Szafranski & Bagdasarian in preparation). There was also an incorporation of radioactive nucleopeptides into proteins.

It is now admitted that the nucleopeptides play a part in biosynthesis of protein, but the evidence for this is not yet convincing. If we admit that nucleopeptides take part in protein biosynthesis, their localization in the actually accepted scheme of this process presents further difficulties. We have suggested that they may be precursors of the soluble ribonucleic acid peptide complex. However, s-RNA isolated by Zamecnik *et al.* [13] is linked with amino acids by means of 2' or 3'-OH group of ribose, whereas our experiments using the periodate reaction indicate that in nucleopeptides these groups are free, and that peptides are rather linked by means of phosphate groups. Similar results were obtained by Davies & Harris [3] with nucleopeptides isolated from yeast. These divergences constitute an important difficulty in figuring the role and the significance of these compounds.

Although much more experimental work is still needed to elucidate this problem, the great heterogeneity of nucleopeptides and the wide

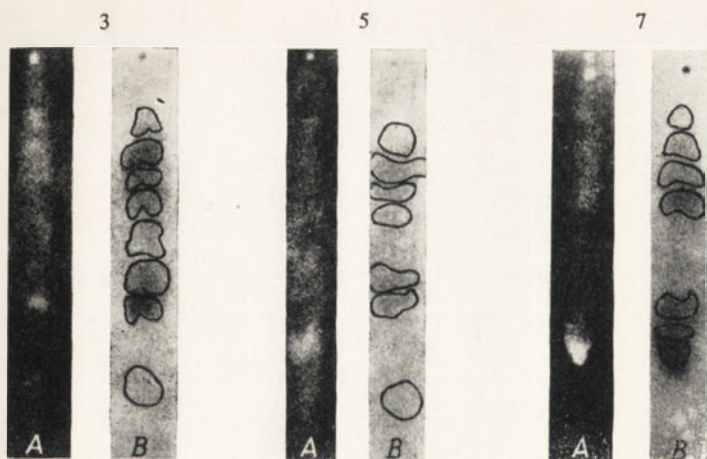


Fig. 1. Chromatograms of nucleopeptides. System: butanol-acetic acid-water (4:1:5). A — picture taken in ultraviolet light, B — picture in visible light after spraying with hydroxylamine and FeCl_3 . 3, 5, 7 — Nos. of fraction from TEAE column from which the samples for chromatography were taken

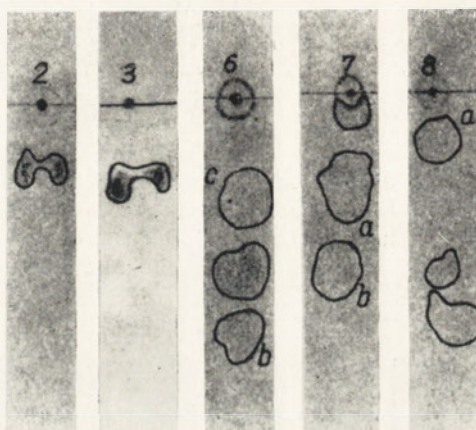


Fig. 2. Chromatography of hydroxamic acids of peptides, in a system butanol-acetic acid-water (9:1:1). Chromatograms were developed with acidified FeCl_3 . 2, 3, 6, 7, 8 — Nos. of fractions from TEAE column from which the samples, were taken, a, b, c — spots later cut out for partial acid hydrolysis

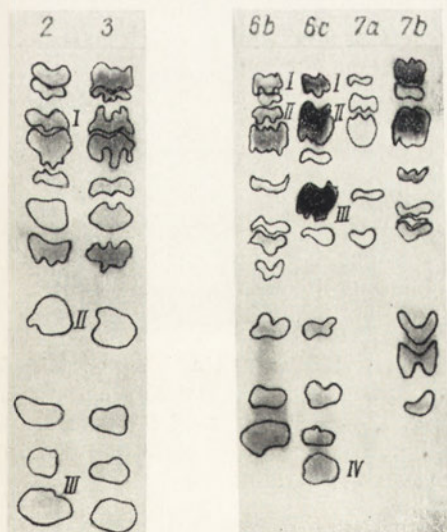


Fig. 3. Chromatography of partial acid hydrolyzates of peptides in a system butanol-acetic acid-water (4:1:5). 2, 3, 6b, 6c, 7a, 7b, 8a — spots of hydroxamic acids of peptides (Fig. 2), which were submitted to a partial hydrolysis. I, II, III, IV — spots cut out for complete acid hydrolysis

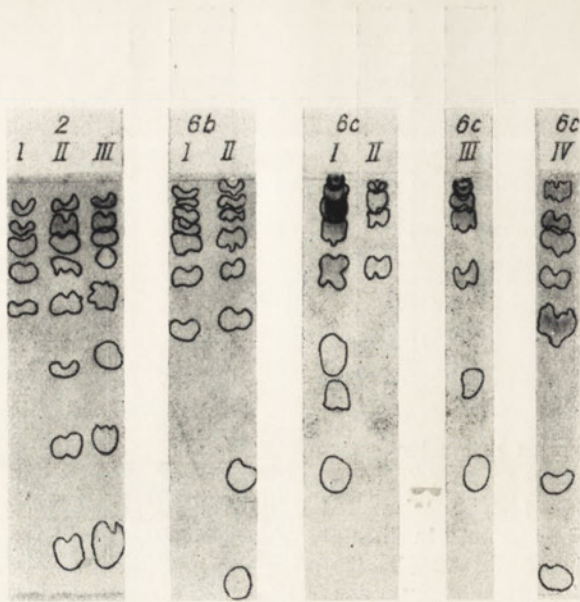


Fig. 4. Chromatography of amino acids after complete acid hydrolysis of short-chain peptides, in a system butanol-acetic acid-water (4:1:5). 2-I, II, III; 6b-I, II; 6c-I, II, II, IV — spots of small peptides (Fig. 3), which were submitted to complete acid hydrolysis

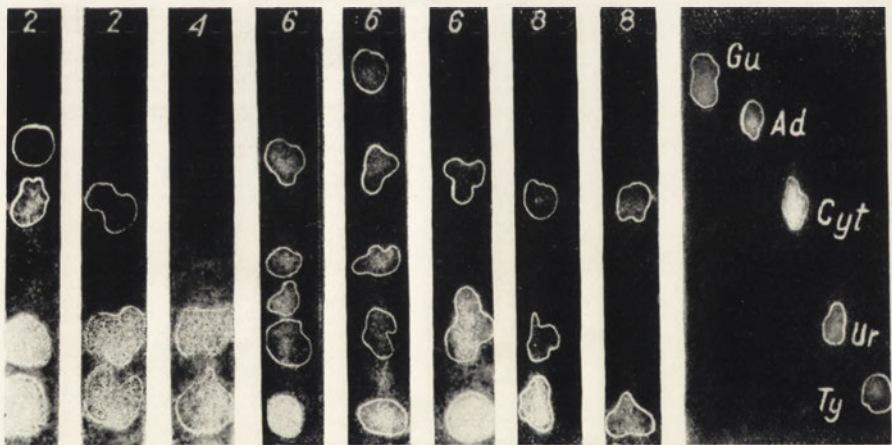


Fig. 5. Pictures in ultraviolet light of chromatograms of nucleic bases, obtained from hydrolysis of nucleopeptides in 11 N-HClO₄. Chromatographically separated nucleopeptides were taken from different places. 2, 4, 6, 8 — Nos. of fractions from TEAE column from which the material was taken. Standards: Gu, guanine; Ad, adenine; Cyt, cytosine; Ur, uracil; Ty, thymine

range of their occurrence plead for their importance in biosynthesis of proteins.

We wish to express our thanks to Miss Zofia Grodzieńska M. Sci. for her collaboration at some stages of this work.

SUMMARY

Further ways of isolation, purification and characterisation of cytoplasmic nucleopeptides from guinea pig liver have been assayed. The compounds were separated by paper electrophoresis, then by paper chromatography. The separated nucleopeptides were hydrolyzed with 11 N -HClO₄ and chromatographic identification of nucleic bases were made. Peptide moiety was characterized by paper chromatography after partial and complete hydrolysis. The nature of linkage of peptides with the nucleotide part was investigated; 2', 3'-OH groups in ribose has been found free using periodate reaction.

Recent results have confirmed our previous suggestion; the nucleopeptides contain oligonucleotides and peptides linked through the carboxyl and probably the phosphate group. They differ from one another not only by their peptide but also by their nucleotide moieties.

REFERENCES

- [1] Beljanski M., *C. R. Acad. Sci.* **250**, 624, 1960.
- [2] Brown H., Sanger F., Kitai R., *Biochem. J.* **60**, 556, 1955.
- [3] Davies J. W., Harris G., *Proc. Royal Soc. B.* **151**, 537, 1960.
- [4] Gordon H. T., Thornburg W., Werum L. N., *Anal. Chem.* **28**, 849, 1956.
- [5] Hase E., Mihara S., Otsuka H., Tamiya H., *Arch. Biochem. Biophys.* **83**, 170, 1959.
- [6] Koningsberger V. V., Van Der Grinten Chr. O., Overbeek J. Th. G., *Biochim. Biophys. Acta* **26**, 483, 1957.
- [7] Markovitz A., Steinberg D., *J. Biol. Chem.* **228**, 285, 1957.
- [8] Partridge S. M., *Biochem. J.* **42**, 238, 1948.
- [9] Steinberg D., Vaughan M., Sherman F., O'Dell B., *Biochim. Biophys. Acta* **40**, 225, 1960.
- [10] Szafranski P., Sułkowski E., Gołaszewski T., *Nature* **184**, 1940, 1959.
- [11] Szafranski P., Sułkowski E., Gołaszewski T., Heller J., *Acta Biochim. Polon.* **7**, 151, 1960.
- [12] Wyatt G. R., *Biochem. J.* **48**, 584, 1951.
- [13] Zamecnik P. C., Stephenson M. L., Scott J. F., *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A.* **46**, 811, 1960.

DALSZA CHARAKTERYSTYKA CYTOPLAZMATYCZNYCH NUKLEOPEPTYDÓW
Z WĄTROBY ŚWINKI MORSKIEJ

Streszczenie

Opracowano dalsze sposoby oczyszczania cytoplazmatycznych nukleopeptydów oraz przeprowadzono ich charakterystykę. Po rozdzieleniu tych związków za pomocą elektroforezy bibulowej, wykonano ich chromatografię bibulową. Rozdzielone nukleopeptydy hydrolizowano 11 N-HClO₄ i chromatograficznie identyfikowano zasady nukleinowe. Fragmenty peptydowe oddzielano od nukleotydydowych, przeprowadzono ich częściową hydrolizę, a następnie całkowitą i chromatografowano. Badano sposób powiązania peptydów z fragmentami nukleotydydowymi, reakcją nadjodanową stwierdzono, że 2', 3'-OH grupy rybozy są wolne.

Rezultaty potwierdzają nasze poprzednie przypuszczenia, że są to związki składające się z oligonukleotydydów połączonych z peptydami za pośrednictwem grupy karboksylowej i prawdopodobnie fosforanowej. Różnią się one między sobą zarówno częścią peptydową jak i nukleotydydową.

Otrzymano 8.8.1960.

MIROSLAWA WEBER, T. W. SZCZEPKOWSKI i B. SKARŻYŃSKI

UDZIAŁ TIOSIARCZANU W POWSTAWANIU SIARCZANU W ORGANIZMIE ZWIERZĘCYM

*Zakład Chemii Fizjologicznej Akademii Medycznej w Krakowie
Kierownik: Prof. Dr B. Skarżyński*

W poprzednich naszych pracach [1, 2] zajmowaliśmy się problemem utleniania tiosiarczanu w organizmie szczura dochodząc do wniosku, że losy metaboliczne obu atomów siarki tego związku są odmienne. Tak zwany atom wewnętrzny bardzo szybko ulega wydaleniu w postaci nieorganicznego siarczanu, natomiast atom zewnętrzny zostaje włączony w łańcuch pośrednich przemian kończący się ostatecznie również zamianą na nieorganiczny siarczan wydalany jednak przez okres czasu znacznie dłuższy. Doświadczenia nasze wykazały, że organizm zwierzęcy posiada wybitnie rozwiniętą zdolność utleniania tiosiarczanu i potrafi przetworzyć w jednostce czasu ilości tiosiarczanu kilkaset razy większe aniżeli te, jakie są normalnie wydalone z moczem. Fakt ten był punktem wyjścia dla sformułowania przez nas hipotezy, w myśl której tiosiarczan byłby nie ilościowo skromnym ubocznym produktem przemiany siarki, ale głównym metabolitem pośrednim, poprzez stadium którego przechodziłaby siarka w swój końcowy etap utlenienia.

Za słuszością naszej hipotezy przemawiał fakt niewątpliwie stwierdzonego endogennego wytwarzania tiosiarczanu [3, 4]. Według Sörbo [5] tiosiarczan powstaje w następstwie reakcji między siarczynem i grupą tiolową kwasu merkaptopirogronowego, a więc między dwoma ustalonymi produktami pośrednimi przemiany siarki w żywych ustrojach. W myśl naszej hipotezy siarczyn nie ulegałby utlenianiu bezpośrednio, lecz dopiero poprzez wytworzenie tiosiarczanu.

Gdyby nasz tok rozumowania był słuszny, to należałoby się spodziewać powstawania w ustroju zwierzęcym względnie dużych ilości tiosiarczanu, a więc co za tym idzie egzystencji pojemnej puli tiosiarczanowej. Poniżej opisane nasze doświadczenia miały na celu wykazanie egzystencji takiej puli. W tym celu wstrzykiwaliśmy szczurom cystynę znakowaną siarką radioaktywną oraz równocześnie duże ilości nieradioaktywnego

tiosiarczanu. Spodziewaliśmy się, że nadmiar egzogenego tiosiarczanu utrudni utlenianie tiosiarczanu endogenego powstającego z radioaktywnej cystyny i, że w tym przypadku tiosiarczan wydalany w niezmięnionej postaci będzie zawierał siarkę radioaktywną powstającą z rozkładu znakowanej cystyny. Przewidywania nasze sprawdziły się, a odpowiednia analiza wyników liczbowych pozwala w pewnej mierze ocenić rozmiary udziału tiosiarczanu w powstawaniu końcowego produktu utlenienia siarki — siarczanu.

MATERIAŁ I STOSOWANE METODY

Doświadczenia przeprowadzono na szczurach białych, albinosach, samcach o wadze ok. 200 g. Zwierzęta w czasie trwania doświadczenia znajdowały się w klatce metabolicznej, pozwalającej na ilościowe zbieranie moczu.

Ilościowe oznaczanie tiosiarczanu przeprowadzono metodą Spacu i Spacu [6], zastosowaną do moczu przez Gasta i wsp. [4], polegającą na wytrącaniu kompleksu z azotanem trój(dwuaminoetylo)-niklawym i jodometrycznym miareczkowaniu tiosiarczanu zawartego w kompleksie.

Radioaktywność oznaczano umieszczając 0.5 ml badanego roztworu lub zawiesiny na miseczkach bakelitowych, wyłożonych krążkami z bibuły. Po wysuszeniu bibuły w podczerwieni, mierzono aktywność licznikiem z okienkiem z miki, o gęstości 1,4 mg/cm².

Radioaktywna D,L-cystyna pochodziła z Radiochemical Centre, Amer-sham. Aktywność właściwa czystyny wynosiła 181 mC/g.

Sposób przeprowadzania doświadczeń

Szczurom wstrzykiwano równocześnie podskórnie, w dwóch różnych miejscach powierzchni ciała 0,8 mg D,L-cystyny-³⁵S, rozpuszczonej w 0,5% roztworze węglańcu sodu, oraz 200 mg nieradioaktywnego Na₂S₂O₃·5H₂O rozpuszczonego w wodzie. Po 24 godzinach wstrzykiwano ponownie 200 mg tiosiarczanu. Poza tym wykonano dwie serie doświadczeń różniących się od powyżej opisanych tym, że zamiast 200 mg tiosiarczanu wstrzykiwano szczurom 100 lub 300 mg tej substancji, przy tej samej dawce radioaktywnej D,L-cystyny. Jako badania kontrolne służyły doświadczenia ze szczurami, którym wstrzykiwano tylko radioaktywną cystynę (0,8 mg), bez równoczesnego podawania tiosiarczanu.

W określonych odstępach czasu po rozpoczęciu doświadczenia, tzn. po 6, 24, 48 i 72 godzinach, przenoszono ilościowo mocz do cylindrów miarowych i uzupełniano wodą do znanej objętości, zasadniczo do 10 ml. Oznaczano: a) całkowitą aktywność moczu, b) zawartość tiosiarczanu w moczu, c) aktywność tiosiarczanu, d) aktywność wydalonych z moczem siarcza-

nów, e) aktywność, tzw. reszty siarkowej (RS), tzn. siarki zawartej w moczu, nie należącej do tiosiarczanu i do siarczanów.

Sposób frakcjonowania moczu będący podstawą powyżej wymienionych oznaczeń opisaliśmy obszernie w poprzedniej pracy [2]. Na tym miejscu podajemy tylko zasadniczy schemat postępowania.

Z moczu wytrącano całkowitą zawartość tiosiarczanu z pewną domieszką siarczanów, za pomocą azotanu trój(dwuaminoetylo)-niklawego. Zbierano płyn pozostający nad osadem, z którego wytrącano pozostałe siarczany dodając 30% roztworu octanu baru. Siarka znajdująca się w roztworze wolnym od tiosiarczanu i siarczanów reprezentowała resztę siarkową (RS). Zawartość tiosiarczanu oznaczano miareczkowaniem jodometrycznym kompleksu niklawego. Z płynu pozostałego po zmiareczkowaniu tego kompleksu, w którym cały uprzednio zawarty tiosiarczan przeszedł w tetrationian, wytrącano domieszkę siarczanów przez dodanie octanu baru. Aktywność przypadającą na tiosiarczan oznaczano w roztworze powstałego przez miareczkowanie tetrationianu. Aktywność siarczanów oznaczano w osadzie otrzymanym przez dodanie octanu baru, zarówno z miareczkowanego roztworu kompleksu niklawego, jak i z płynu pozostałego po wytrąceniu tego kompleksu. Wszystkie uzyskane wartości przeliczano na całkowitą ilość wydalonego moczu.

W moczu pochodzącym od zwierząt kontrolnych, tj. od tych, którym wstrzyknięto tylko radioaktywną D,L-cystynę bez tiosiarczanu, zawartość tiosiarczanu oznaczano w ten sposób, że przed dodaniem do badanego moczu alkoholu absolutnego i azotanu trój(dwuaminoetylo)-niklawego, dodawano znaną ilość tiosiarczanu nośnikowego, tj. 5 mg. Równocześnie przygotowywano ślepą próbę zawierającą tylko odczynniki wyżej wspomnianego i 5 mg tiosiarczanu. Ilość mililitrów 0,01 N roztworu jodu użyta do zmiareczkowania ślepej próby odejmowano od ilości mililitrów zużytych do zmiareczkowania badanych prób moczu.

CZĘŚĆ DOSWIADCZALNA

Stosując powyżej opisane postępowanie mogliśmy stwierdzić, że po podaniu niewielkiej ilości D,L-cystyny znakowanej ^{35}S zawartość radioaktywnego tiosiarczanu w moczu szczurów utrzymuje się na niskim poziomie zarówno w stosunku do dawki wprowadzonej, jak i do aktywności równocześnie wydalanego siarczanu. Wartości liczbowe zestawiliśmy w tablicach 1 i 2. Wyniki przedstawione w tablicy 2 wskazują, że stosunek aktywności siarki wydalonego tiosiarczanu do aktywności siarczanu wyraża się wartością 0,02, a więc taką, jaką ma oznaczony przez nas uprzednio chemicznie stosunek ilości siarki tiosiarczanu (0,05 - 0,08 mg) do ilości siarki siarczanu (3 mg).

T a b l i c a 1

Aktywność wydalonego z moczem tiosiarczanu, siarczanu i reszty siarkowej (RS) w procentach aktywności wprowadzonej, po podaniu do organizmu szczura 0,8 mg cystyny⁻³⁵S

The activities of excreted thiosulphate, sulphate and residual sulphur (RS), in percentage of total activity introduced, after injection of 0.8 mg. of cystine⁻³⁵S

Wyniki z doświadczeń na 4 zwierzętach

Czas (godziny)	Całkowita aktywność moczu (%)		Aktywność S ₂ O ₃ ⁼ (%)		Aktywność SO ₄ ⁼ (%)		Aktywność RS (%)	
	zakres	średnio	zakres	średnio	zakres	średnio	zakres	średnio
0—6	6,1—7,2	6,7	0,12—0,15	0,13	4,1—5,3	4,85	1,3—2,0	1,72
6—24	4,3—6,3	5,64	0,08—0,23	0,15	2,3—4,8	3,89	1,3—1,9	1,6
24—48	0,6—2,4	1,67	0,02—0,06	0,04	0,3—1,6	1,12	0,3—0,7	0,51
48—72	0,5—1,2	0,9	0,01—0,02	0,02	0,3—0,8	0,56	0,2—0,5	0,32

T a b l i c a 2

Aktywność wydalonego z moczem tiosiarczanu, siarczanu i reszty siarkowej (RS) w procentach aktywności całkowitej moczu, po podaniu do organizmu szczura 0,8 mg cystyny⁻³⁵S

The activities of excreted thiosulphate, sulphate and residual sulphur (RS), in percentage of total activity of urine, after injection of 0.8 mg. of cystine⁻³⁵S

Wyniki z doświadczeń na 4 zwierzętach

Czas (godziny)	Aktywność S ₂ O ₃ ⁼ (%)		Aktywność SO ₄ ⁼ (%)		Aktywność RS (%)	
	Zakres	Średnio	Zakres	Średnio	Zakres	Średnio
0—6	1,8—2,3	2,1	46,5—78,5	71,8	19,3—31,4	26,0
6—24	1,9—3,2	2,47	53,7—77,0	67,4	20,7—44,5	30,1
24—48	2,5—3,0	2,64	51,2—68,8	62,6	28,1—45,5	34,2
48—72	1,7—2,7	2,36	53,0—72,0	60,8	26,4—43,5	36,5

T a b l i c a 3

Aktywność wydalonego z moczem tiosiarczanu, siarczanu i reszty siarkowej (RS) w procentach aktywności wprowadzonej, po podaniu do organizmu szczura 0,8 mg cystyny⁻³⁵S i 200 mg Na₂S₂O₃ · 5 H₂O oraz powtórnie 200 mg Na₂S₂O₃ · 5 H₂O po upływie 24 godzin

The activities of excreted thiosulphate, sulphate and residual sulphur (RS), in percentage of total activity introduced after injection of 0.8 mg. cystine⁻³⁵S and 200 mg. Na₂S₂O₃ · 5 H₂O. The dose of Na₂S₂O₃ · 5 H₂O was repeated after 24 hours

Wyniki z doświadczeń na 6 zwierzętach

Czas (godziny)	Całkowita aktywność moczu (%)		Aktywność S ₂ O ₃ ⁼ (%)		Aktywność SO ₄ ⁼ (%)		Aktywność RS (%)	
	Zakres	Średnio	Zakres	Średnio	Zakres	Średnio	Zakres	Średnio
0—6	4,8—12,4	8,82	2,6—6,1	3,76	1,5—4,8	4,01	0,7—1,1	1,05
6—24	2,0—6,6	3,24	0,04—1,3	0,32	1,1—3,8	2,03	0,5—1,5	0,89
24—48	0,4—1,8	1,29	0,13—0,37	0,32	0,4—1,0	0,62	0,2—0,5	0,35
48—72	0,5—1,2	0,80	0,02—0,06	0,042	0,3—0,6	0,46	0,2—0,36	0,305

T a b l i c a 4

Aktywność wydalonego z moczem tiosiarczanu, siarczanu i reszty siarkowej (RS) w procentach aktywności całkowitej moczu, po podaniu do organizmu szczura 0,8 mg cystyny-³⁵S i 200 mg Na₂S₂O₃ · 5 H₂O oraz powtórnie 200 mg Na₂S₂O₃ · 5 H₂O po upływie 24 godzin

The activities of excreted thiosulphate, sulphate and residual sulphur (RS), in percentage of total activity of urine, after injection of 0,8 mg. cystine-³⁵S and 200 mg. Na₂S₂O₃ · 5 H₂O. The dose of Na₂S₂O₃ · 5 H₂O was repeated after 24 hours

Wyniki z doświadczeń na 6 zwierzętach

Czas (godziny)	Aktywność S ₂ O ₃ ⁼ (%)		Aktywność SO ₄ ⁼ (%)		Aktywność RS (%)	
	Zakres	Średnio	Zakres	Średnio	Zakres	Średnio
0—6	38,5—53,2	43,6	31,7—51,8	44,0	12,0—15,0	13,5
6—24	1,9—19,5	7,6	56,7—77,0	65,5	21,2—30,0	25,4
0—24	29,0—41,0	33,0	47,0—52,0	49,0	12,0—19,0	18,0
24—48	10,2—30,9	18,95	30,0—60,4	51,0	19,7—39,2	28,0
48—72	2,5—7,3	5,3	42,5—57,7	52,0	37,0—52,5	42,2

Tablice 3 i 4 przedstawiają zebrane wartości uzyskane z oznaczeń wydalania radioaktywności po równoczesnym podaniu cystyny-³⁵S (0,8 mg) i nieaktywnego tiosiarczanu (200 mg). W tabelicy 3 przedstawiono aktywność frakcji w stosunku procentowym do radioaktywności wprowadzonej, a w tabelicy 4 w stosunku procentowym do radioaktywności wydalonej w odpowiednich odstępach czasu, a oznaczonej bezpośrednio w próbce moczu. Jak widać z porównania tablic 1 i 3, podanie tiosiarczanu nie

T a b l i c a 5

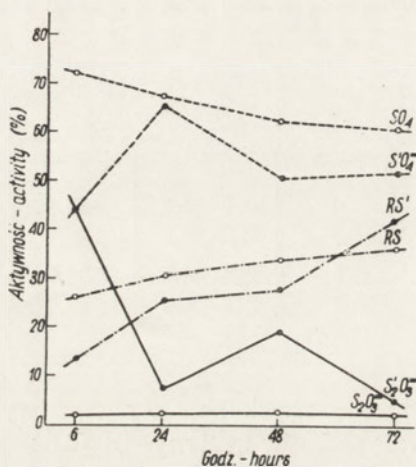
Aktywność wydalonego z moczem tiosiarczanu, siarczanu i reszty siarkowej (RS) w procentach aktywności całkowitej moczu, po podaniu 0,8 mg cystyny-³⁵S oraz 100 mg względnie 300 mg Na₂SO₃ · 5H₂O

The activities of excreted thiosulphate, sulphate and residual sulphur (RS), in percentage of total activity of urine, after injection of 0.8 mg. cystine-³⁵S and 100 mg. or 300 mg. Na₂S₂O₃ · 5H₂O

Poszczególne dawki stosowano dwóm zwierzętom

Dawka Na ₂ S ₂ O ₃ · 5H ₂ O	Czas (godziny)	Aktywność S ₂ O ₃ ⁼	Aktywność SO ₄ ⁼	Aktywność RS
		średnio %	średnio %	średnio %
100 mg	0—6	28,0	67,4	4,3
	6—24	3,8	80,7	15,5
	0—24	18,6	73,0	8,4
300 mg	0—6	70,5	21,5	7,9
	6—24	7,6	71,3	24,9
	0—24	62,0	27,7	10,3

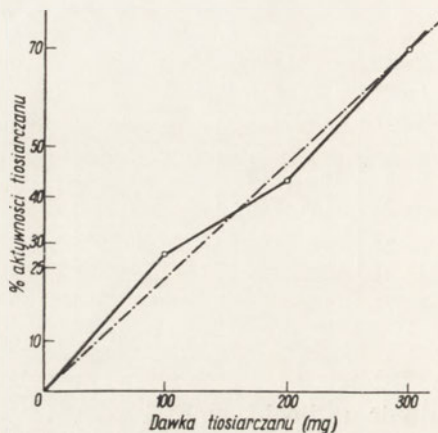
wpływa w większym stopniu na zmianę ilości aktywności wydalonej w stosunku do radioaktywności wprowadzonej. Z tablic 2 i 4 wynika wyraźnie, że wprowadzenie tiosiarczanu posiada wybitny wpływ na wzajemny stosunek aktywności we frakcjach siarkowych moczu, przy czym obserwuje się znamienny wzrost aktywności wydalonej w postaci tiosiarczanu. Zmiany aktywności poszczególnych frakcji ilustruje rysunek 1.



Rys. 1. Rozkład aktywności we frakcjach siarkowych moczu. (○) aktywność tiosiarczanu ($S_2O_3^{2-}$), siarczanu (SO_4^{2-}) i reszty siarkowej (RS) po podaniu 0,8 mg cystyny radioaktywnej; (●) aktywność tiosiarczanu ($S_2'O_3^{2-}$), siarczanu ($S'O_4^{2-}$) i reszty siarkowej (RS') po podaniu 0,8 mg cystyny ^{35}S i 200 mg nieradioaktywnego tiosiarczanu, po 24 godzinach dawkę tiosiarczanu powtórzono

Fig. 1. The distribution of activities in urine. (○) activities of thiosulphate ($S_2O_3^{2-}$), sulphate (SO_4^{2-}) and residual sulphur (RS) after injection of 0.8 mg of radioactive cystine, (●) activities of thiosulphate ($S_2'O_3^{2-}$), sulphate ($S'O_4^{2-}$) and residual sulphur (RS') after injection of 0.8 mg of cystine- ^{35}S and 200 mg nonradioactive thiosulphate, the dose of thiosulphate was repeated after 24 hours

Tablica 5 przedstawia średnie wartości wydalania aktywności we frakcjach moczu po podaniu radioaktywnej cystyny oraz tiosiarczanu w ilości 100 mg wzgl. 300 mg $Na_2S_2O_3 \cdot 5H_2O$.



Rys. 2. Zmiana względnej aktywności tiosiarczanu wydalonego z moczem po wstrzyknięciu cystyny- ^{35}S i tiosiarczanu nieradioaktywnego w dawkach 100, 200 i 300 mg. Aktywność oznaczano w moczku wydalanym w ciągu 6 godzin po zastrzykach

Fig. 2. The change of relative activity of thiosulphate excreted in urine after injection of radioactive cystine- ^{35}S and nonradioactive thiosulphate in amounts of 100, 200 and 300 mg. Activity was estimated in urine excreted during 6 hours after injections

Tablica 6

Wydalenie tiosiarczanu w moczu szczurów po wstrzyknięciu 0,8 mg radioaktywnej cystyny—³⁵S oraz odpowiednio 100, 200 i 300 mg nieradioaktywnego Na₂S₂O₃ · 5 H₂O
 The excretion of thiosulphate in rat urine after injection of 0.8 mg. cystine—³⁵S and respectively 100, 200 and 300 mg. non-radioactive Na₂S₂O₃ · 5H₂O

Czas (godziny)	Ilość wprowadzonego Na ₂ S ₂ O ₃ · 5H ₂ O					
	100 mg		200 mg		300 mg	
	Ilość wydalonego Na ₂ S ₂ O ₃ · 5H ₂ O					
	mg	% dawki	mg	% dawki	mg	% dawki
0—6	17,35	17,35	49,2	24,6	85,50	28,5
6—24	2,27	2,27	4,0	2,0	1,62	0,54
0—24	19,62	19,62	54,0	27,0	87,12	29,1

Ilości tiosiarczanu oznaczone chemicznie w moczu po podaniu 100, 200 i 300 mg Na₂S₂O₃ · 5H₂O zebrano w tablicy 6. Rysunek 2 przedstawia rozkład aktywności we frakcji tiosiarczanu w moczu po podaniu różnych ilości tiosiarczanu.

OMÓWIENIE WYNIKÓW

W normalnych warunkach tiosiarczan wydalany jest z moczem szczurów w niewielkich ilościach i siarka w nim zawarta odpowiada zaledwie 1 - 2% siarki wydalanej w postaci siarczanów. Po wstrzyknięciu dużej dawki (200 mg) Na₂S₂O₃ · 5H₂O zawartość tiosiarczanu w moczu wzrasta i osiąga wartość ok. 25% wprowadzonej dawki. Gdyby przyjąć założenie, że wstrzyknięty tiosiarczan miesza się dokładnie z pulą endogennego tiosiarczanu, to wtedy endogenne tiosiarczan powinien być wydalany i metabolizowany w podobny sposób, jak tiosiarczan wstrzyknięty. W niniejszej pracy podawaliśmy szczurom cystynę—³⁵S oraz jednocześnie dawkę tiosiarczanu nieaktywnego, rozumując, że jeżeli z siarki cystyny powstaje endogenne tiosiarczan, to będzie się on zachowywał tak, jak tiosiarczan wstrzyknięty, stosownie do schematu przedstawionego na rys. 3.

Dla przeprowadzenia rozważań ilościowych wprowadziliśmy następujące symbole:

*Ao — siarka endogennego tiosiarczanu;

*A — siarka endogennego tiosiarczanu wydalona z moczem w postaci tiosiarczanu;

*B — siarka siarczanu pochodząca z radioaktywnej cystyny;

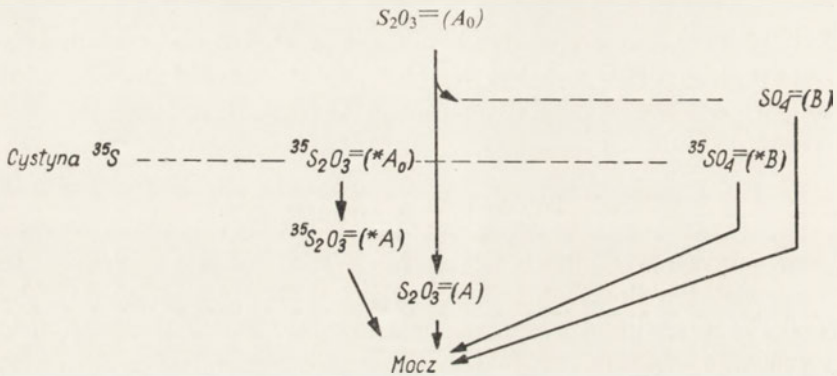
Ao — siarka wstrzykniętego tiosiarczanu;

A — siarka wstrzykniętego tiosiarczanu wydalona w moczu w postaci tiosiarczanu;

B — siarka w siarczanie pochodzącym z wstrzykniętego tiosiarczanu, wydalona w moczu.

Punktem wyjścia dla naszego rozumowania będą dwa założenia. Jednym z nich jest, że tiosiarczan pełni rolę fizjologicznego pośredniego metabolitu pomiędzy siarką cystyny rozkładaną w tkankach a siarczanem wydalany z moczem. Wobec tego musi istnieć pewna pula endogennego tiosiarczanu w ustroju, której wielkość będzie zależała od szybkości powstawania tiosiarczanu i od szybkości jego dalszego utleniania na siarczan. Ponieważ zdolność utleniania tiosiarczanu w ustroju zwierzęcym jest bardzo wybitna, nie dochodzi nigdy do gromadzenia się większych ilości tiosiarczanu w tkankach i cieczach ustrojowych.

Drugim naszym założeniem jest przypuszczenie, że tiosiarczan wprowadzony do ustroju zwierzęcego z zewnątrz miesza się równomiernie z tiosiarczanem endogennym, a ponieważ jest wprowadzony w bardzo



Rys. 3. Schemat wydalania z moczem tiosiarczanu i siarczanu powstałego z wstrzykniętej radioaktywnej cystyny i z wstrzykniętego nieradioaktywnego tiosiarczanu

Fig. 3. The general picture of excretion in urine of thiosulphate and sulphate originating from injected radioactive cystine and from injected nonradioactive thiosulphate

znacznym nadmiarze, zdolność utleniania tego związku jest niewystarczająca dla zmetabolizowania nadmiaru w równie szybkim tempie, jak to ma miejsce w warunkach fizjologicznych, tzn. wówczas, gdy utlenianiu ulega tylko tiosiarczan endogenny. W warunkach naszego doświadczenia musi wzrosnąć więc ogólna pula tiosiarczanu w ustroju, przy czym na ten przyrost składa się zarówno tiosiarczan egzogenny, jak i tiosiarczan powstający endogennie. Po podaniu tiosiarczanu z zewnątrz część tiosiarczanu reprezentowana przez wymieszany wzajemnie tiosiarczan endogenny i egzogenny zostaje wydalona z moczem w postaci niezmienionej, przy czym wydalony zostaje zarówno tiosiarczan doprowadzony z zewnątrz, jak i endogenny.

Jeżeli oba nasze założenia są słuszne, to aktywność tiosiarczanu powstałego z siarki radioaktywnej cystyny powinna pozostawać w określo-

nej zależności z aktywnością siarczanu powstającego z endogennego tiosiarczanu. Stosunek ten zmieni się po podaniu nieradioaktywnego tiosiarczanu z zewnątrz na skutek zahamowania utleniania tiosiarczanu endogennego, gdyż mniej tiosiarczanu endogennego ulegnie w określonym odstępie czasu utlenieniu na siarczan. W tym przypadku stosunek aktywności siarczanu do aktywności tiosiarczanu będzie określony wartością, jaka cechuje stosunek ilości siarczanu do ilości tiosiarczanu wydalonych z moczem a pochodzących z tiosiarczanu egzogenego.

Po wykorzystaniu wartości opublikowanych przez nas uprzednio [1, 2] a uzyskanych z badań nad metabolizmem tiosiarczanu znakowanego ^{35}S w pozycji wewnętrznej i zewnętrznej możemy przeprowadzić odpowiednie obliczenia. Z tych dawniejszych naszych oznaczeń wynika, że po zastrzyku 200 mg $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ wydalą się w moczu szczura w postaci siarczanu (B) w okresie 0-6 godzin 24,7% metabolizowanej siarki zewnętrznej oraz 81,7% metabolizowanej siarki wewnętrznej. Dla okresu 6-24 godzin wydalanie to wyraża się wartościami 11,4% i 16,8%. Równocześnie w tych okresach czasu zostaje wydalone z moczem średnio 24,4% i 2,1% siarki dawki wstrzykniętego tiosiarczanu (A_0) w postaci nie zmiennej (A). Wprowadzając podane powyżej symbole i wartości oraz pamiętając, że w tiosiarczanie jeden atom siarki wewnętrznej przypada na jeden atom siarki zewnętrznej, czyli że każda z nich stanowi połowę ogólnej ilości siarki tiosiarczanu, uzyskamy następujące zależności:

dla czasu 0-6 godzin

$$B = \frac{(A_0 - A) \cdot 0,247}{2} + \frac{(A_0 - A) \cdot 0,817}{2} = (A_0 - A) \cdot 0,532,$$

dla czasu 6-24 godzin

$$B = \frac{(A_0 - A) \cdot 0,114}{2} + \frac{(A_0 - A) \cdot 0,168}{2} = (A_0 - A) \cdot 0,141.$$

Przyjmując oznaczone wartości dla A i podstawiając A zamiast A_0 otrzymamy dla czasu 0-6 godzin: $B = 1,6A$; dla czasu 6-24 godzin: $B = 6,5A$; dla czasu 0-24 godzin: $B = 1,8A$.

Jeżeli endogeny i egzogeny tiosiarczan zachowują się w identyczny sposób, to powinna się spełnić następująca zależność: $*A_0/*A = A_0/A$. Również stosunek tiosiarczanu wydalonego z moczem do siarczanu powinien wyrażać się wartościami tego samego rzędu: $*A/*B = A/B$.

Stosunek A/B można określić na podstawie naszych poprzednich badań, stosunek $*A/*B$ można obliczyć na podstawie oznaczeń przedstawionych w tabelicy 4. Wartości A/B obliczone w sposób powyżej podany wynoszą: 0,62, 0,15 i 0,55 dla okresów czasu 0-6, 6-24 i 0-24 godzin. Obliczone stosunki $*A/*B$ z tabelicy 4 przyjmują wartości: 0,99, 0,11, 0,67 dla okresów czasu 0-6, 6-24, 0-24 godzin.

Porównanie ze sobą wartości A/B i $*A/*B$ prowadzi do wniosku, że są one zgodne ze sobą w granicach odchyień doświadczalnych, a co za tym idzie stanowi dowód na to, że tiosiarczan jest prekursorem siarczanu w organizmie szczura.

Wprowadzenie ponownej dawki tiosiarczanu po upływie 24 godzin sprawia, że znowu w moczu wzrasta aktywność przypadająca na tiosiarczan. W tym przypadku nie znamy wprawdzie dokładnie metabolizmu tiosiarczanu wprowadzonego, ale możemy z dużym prawdopodobieństwem przyjąć, że jest on podobny do tego, jaki oznaczyliśmy po wstrzyknięciu pierwszej dawki, a wartości tablicy 6 pozwalają określić ilość wydalanego niezmienionego tiosiarczanu. Po odpowiednim obliczeniu otrzymamy, że stosunek A/B powinien wyrażać się liczbą 0,66, natomiast obliczony stosunek z tablicy 4 wynosi dla $*A/*B = 0,37$. Porównanie wartości A/B i $*A/*B$ wykazuje wprawdzie większą ich rozbieżność niż w przypadku analogicznych wartości po pierwszej dawce tiosiarczanu, ale rozbieżność ta może być wynikiem nieco innego metabolizmu drugiej dawki tiosiarczanu, a wtedy stosunek A/B miałby również inną wartość.

Analogicznych obliczeń dla doświadczeń, w których tiosiarczan stosowany był w dawkach 100 i 300 mg nie możemy przeprowadzić, gdyż w poprzednich doświadczeniach nie stosowaliśmy tych dawek, nie znamy więc procentowej ilości metabolizowanej siarki. W każdym razie w myśl powyższego rozumowania należałoby się spodziewać, że po zastosowaniu mniejszych dawek tiosiarczanu aktywność wydalonego z moczem tiosiarczanu powinna być mniejsza, a po zastosowaniu większych odpowiednio wzrastać. Uzyskane wyniki potwierdzają słuszność takiego założenia.

Ewentualny zarzut jaki można by wysunąć przeciw rozumowaniu przedstawionemu w tej pracy mógłby polegać na tym, że wprowadzenie tiosiarczanu zmienia metabolizm cystyny i, że zmniejsza się w jego obecności produkcja siarczanu. Zarzut ten staje się jednak nieistotny w świetle wartości przedstawionych w tablicach 1 i 3, z których wynika, że wydalanie aktywności pochodzącej z siarki cystyny nie zmienia się po wprowadzeniu tiosiarczanu. Zmienia się jedynie rozkład aktywności przypadający na tiosiarczan i siarczan.

W długiej historii badań nad metabolizmem siarki tiosiarczan budził raczej uboczne zainteresowanie. Obecnie w świetle faktów doświadczalnych przedstawionych w tej pracy, tiosiarczan wysuwa się do rangi głównego metabolitu siarkowego w toku powstawania siarczanu.

STRESZCZENIE

Autorzy rozdzielali związki siarki wydalane z moczem szczura na trzy frakcje — tiosiarczan (A), siarczan nieorganiczny (B) i frakcję zawierającą pozostałe związki siarkowe (RS). Po wstrzyknięciu D,L-cysty-

ny-³⁵S oznaczali rozkład aktywności w moczu przypadający na te trzy frakcje stwierdzając, że w ciągu 24 godzin ok. 70% radioaktywności przypada na nieorganiczny siarczan a zaledwie ok. 2% na tiosiarczan. Jeżeli równocześnie z podaniem cystyny została wstrzyknięta duża ilość (200 mg $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$) nie znakowanego tiosiarczanu, zmniejsza się ilość aktywności wydalanej w postaci siarczanu, natomiast znacznie wzrasta odsetek aktywności (33%) wydalanej w postaci tiosiarczanu.

Na podstawie danych liczbowych opublikowanych w poprzednich pracach [1, 2] oraz wartości uzyskanych w toku niniejszej pracy autorzy dochodzą do wniosku, że tiosiarczan jest normalnym głównym pośrednikiem metabolicznym między siarką cystyny a końcowym produktem utleniania — siarczanem. Właściwa organizmowi zwierzęcemu wybitna zdolność utleniania tiosiarczanu usuwa jednak natychmiast powstający z cystyny siarczan. Po podaniu znacznego nadmiaru egzogenego tiosiarczanu w ilościach przekraczających zdolność utleniania tego związku, część endogenego tiosiarczanu zmieszanego z tiosiarczanem wprowadzonym z zewnątrz zostaje wydalona z ustroju.

L I T E R A T U R A

- [1] Skarżyński B., Szczepkowski T. W., Weber M., *Nature* **184**, 994, 1959.
- [2] Skarżyński B., Szczepkowski T. W., Weber M., *Acta Biochim. Polon.* **7**, 105, 1960.
- [3] Fromageot Cl., Royer A., *Enzymologia* **11**, 361, 1945.
- [4] Gast J. H., Arai K., Aldrich F. L., *J. Biol. Chem.* **196**, 875, 1952.
- [5] Sörbo B., *Biochim. Biophys. Acta.* **24**, 324, 1957.
- [6] Spacu G., Spacu P., *Z. anal. Chem.* **89**, 192, 1932.

THE ROLE OF THIOSULPHATE IN THE FORMATION OF SULPHATE IN ANIMAL ORGANISM

S u m m a r y

The authors separated the sulphur compounds excreted in rat urine into three fractions: thiosulphate (A), inorganic sulphate (B), and a fraction containing the residual sulphur compounds (RS). After injecting D,L-cystine-³⁵S they determined the activity of each fraction, finding that during 24 hours ca. 70 per cent of the urine radioactivity is in the inorganic sulphate and only ca. 2 per cent in the thiosulphate. If at the same time as cystine is administered a large quantity of unlabelled thiosulphate (200 mg. $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$) is injected, the amount of radioactivity excreted in the form of sulphate is decreased, while the percentage excreted in the form of thiosulphate becomes markedly higher (33%).

On the basis of the data published in previous papers [1, 2] and of the values obtained during the present research, the authors have come

to the conclusion that thiosulphate is the normal main metabolic intermediary between the sulphur of the cystine and the end product of oxidation, i.e. sulphate. The remarkable ability possessed by the animal organism of oxidizing thiosulphate, however, immediately removes the thiosulphate formed from cystine. After administration a considerable excess of exogenic thiosulphate in quantities exceeding the ability of oxidation of this substance, a part of the endogenic thiosulphate mixed with the thiosulphate introduced is excreted from the organism.

Otrzymano 8.8.1960

K. OSTROWSKI, J. KOMENDER and K. KWARECKI

QUANTITATIVE INVESTIGATIONS ON THE SOLUBILITY OF PROTEINS EXTRACTED FROM TISSUES FIXED WITH VARIOUS CHEMICAL AND PHYSICAL METHODS

Department of Histology and Embriology, School of Medicine, Warsaw

The development of quantitative histochemistry gave rise to a series of investigations dealing with the eventual loss of some substances in the tissues on the histological procedure. The knowledge of the extent of such a losses in reference to various substances, tissues and techniques is necessarily needed for the choice of the most suitable procedure for a given case, as well as for the critical evaluation of the obtained results.

The purpose of this study was to investigate the eventual losses of proteins in tissues on the various fixation methods. The effect of fixation was only investigated, the changes caused by the other steps of histological procedure being omitted in our considerations.

Similar investigations were already carried out, the results were, however, contradictory or incomparable because of differences in histological procedure or methods of chemical determinations of proteins and/or nucleic acids. Sylven, 1951 [19, 20] found a considerable loss of the tissue nitrogen in lipids and nucleic acids, following the fixation in Carnoy's liquid, formaline and ethanol. Sandritter & Hartleib, 1955 [17], and in 1956 Hartleib *et al.* [7] did not confirm these findings. Kaufmann *et al.*, 1948 [8], presented the opinion that only negligible losses of proteins occurred following the treatment with formaline or Carnoy's liquid. Harbers & Neumann, 1955 [6], affirmed the loss of proteins and polipeptides in the liver fixed with these liquids did not exceed 1% of fresh weight. According to Stenram, 1958 [18], Carnoy's liquid denaturated the proteins of lyophilized tissues to a lower degree than those of fresh tissues. Burstone, 1958 [4], discussed the extraction of enzymatically active proteins. Merriam, 1958 [12], found a loss of 2.4% of liver proteins during fixation with formaline. The loss of the liver dry weight following formaline was determined by this authors as 20%, while that following Carnoy's liquid as 27% and after lyophilization as 18%. The main loss

on histological procedure occurred into fixing fluids and in lyophilized material during hydration. Berenbom & Yokohama, 1952 [2], found that freezing, lyophilization with subsequent heating or immersion in xylene did not change the N and P contents in the mice liver. On the other hand proteins and the products of their degradation might be more easily washed out after freezing and lyophilization. Acetone removed considerable quantities of material from tissues.

Many authors investigated the possibility of extraction of nucleic acids from fixed tissues (Sandritter & Hartleib, 1955 [17], Harbers & Neumann, 1955 [6], Edström, 1953 [5], Lagerstaedt, 1956 [10], and 1957 [11]). Owing to the application of histoautoradiography, the extraction of labelled substances could be investigated, too. The bibliography of this problem was presented by Brachet & Mirsky, 1959 [3]. The report on this matter was published in our laboratory too (Ostrowski [14]).

The problem of influence of lyophilization upon the proteins solubility was discussed in numerous papers. Sylven maintained that this procedure decreased the solubility of proteins, what was confirmed by Ambrose, 1956 [1]. According to Neumann, 1958 [13], the solubility of soluble proteins did not undergo any change, certain lipoproteins, however, lose their solubility because of disruption of bonds between α - or β -globulines and lipids. This author quoted the reports of Masucci, 1949, Lahiri 1949, Mirsky 1936, and Lindvall *et al.* who observed the decrease of solubility of proteins after lyophilization. The Berenbom's investigations on this matter were already mentioned.

No information concerning the solubility of proteins following freeze-substitution were found.

MATERIAL AND METHODS

The liver and kidneys of white rats were used. Immediately after killing the tissues were cut with a special instrument into cylinders 2.0 - 2.5 mm. in diameter and ca. 3 mm. high. This cylinder was weighed and divided into portions ranging from 85 to 220 mg. \pm 1 mg. These were fixed with one of the following methods: (1) absolute alcohol — 24 hrs., (2) acetone — 24 hrs., (3) 10% formaline — 24 hrs., (4) Carnoy's fluid — 24 hrs., (5) freeze-substitution — the tissues were placed on thin aluminium strips and immersed in liquid air for 2 minutes afterwards placed in butanol, refrigerated to -40° for 48 hrs., then the material was dried on filter paper and placed at room temperature, (6) lyophilization (freeze-drying) — the tissues were freezed in isopentane refrigerated with liquid nitrogen or in liquid air, and afterwards dried in an apparatus described earlier [15], the average time of drying being 10 hrs. per 100 mg. of tissue. Then the drying chamber was warmed up to room temperature for

40 minutes, the tissue was weighed once more to determine the degree of drying. Unfixed tissue was examined as control.

After fixation each tissue sample was shaken with 5 ml. of distilled water for 2 hrs. The fluid was filtered and nitrogen content was determined with the micro-Kjeldahl's method, according to Parnas & Wagner [16]. The sensitivity of this method permits the determination of nitrogen with an accuracy to 0.01 mg. To determine the content of non-protein nitrogen, analogous series of experiments was carried out in extract, from which the proteins were removed with phenole (Kirby, 1956 [9]). An equal volume of 90% phenole was added to the filtrate, shaken for 1 hr. and centrifuged at 15 000 g. In the supernatant (water phase) the nitrogen content was determined as above. The supernatant contained RNA and some low-molecule substances.

Moreover, the nitrogen content in the fixing fluids was determined after fixation of the known quantities of liver tissue. The nitrogen content was determined also in the other fixatives, i.e. in formaline and ethanol. Formaline contained 0.14 mg. of nitrogen for 100 mg. of liver tissue at average, while ethanol 0.20 mg. of nitrogen for 100 mg. of liver tissue.

RESULTS AND DISCUSSION

The results presented in the table 1, show that the extraction of proteins into water from the fresh material and the lyophilized tissues were comparable.

We considered as necessary to obtain data concerning the method of freeze-substitution, which was hitherto not investigated from this point of view. The results were the same as in case of lyophilization. This seemed to indicate that the refrigerated butanol did not denaturate tissues, which were congealated previously. Therefore we believe that freeze-substitution deserves more frequent application to histochemical investigation, when there is no possibility to lyophilize the tissues.

Generally, the extraction of proteins after chemical fixation is negligible. The highest values have been obtained following acetone fixation, which was consistent with Berenbom's findings that this substance caused the greatest losses in weight during fixation. The lowest values, below the sensitivity of the method used for nitrogen determination, were found after formaline fixation. In the fixing fluid, however some nitrogen was present. This was so low, that even considering total nitrogen found in formaline-fixative as protein nitrogen, the loss of protein during fixation was lower than 1% of fresh weight.

The comparison between liver and kidneys did not reveal any essential differences between the protein extraction from these organs.

Table 1

Total N and protein content of water extracts of rat liver and kidney fixed by different methods

Mean results expressed as mg. of nitrogen or proteins per 100 mg. fresh weight of tissue \pm standard deviation

Method of fixation	Number of experiments	Total N	Non-protein N	Protein (N-6.25)
Liver				
Controls (unfixed)	10	1.02 \pm 0.18	0.06 \pm 0.04	6.04 \pm 1.36
Absolute ethanol	10	0.34 \pm 0.06	0.05 \pm 0.03	1.78 \pm 0.79
Acetone	10	0.49 \pm 0.06	0.04 \pm 0.05	2.82 \pm 0.09
10% formaline	10	0.00 \pm 0.00	0.00 \pm 0.00	0.00 \pm 0.00
Carnoy's fluid	10	0.05 \pm 0.02	0.00 \pm 0.00	0.30 \pm 0.15
Freeze-substitution	10	1.15 \pm 0.17	0.07 \pm 0.03	6.78 \pm 1.23
Freeze-drying	9	1.30 \pm 0.41	0.06 \pm 0.04	8.15 \pm 2.54
Kidney				
Controls (unfixed)	10	1.11 \pm 0.27	0.13 \pm 0.03	6.14 \pm 1.86
Absolute ethanol	10	0.34 \pm 0.06	— —	— —
Acetone	10	0.79 \pm 0.13	— —	— —
10% formaline	10	0.00 \pm 0.00	0.00 \pm 0.00	0.00 \pm 0.00
Carnoy's fluid	10	0.05 \pm 0.01	0.00 \pm 0.00	0.30 \pm 0.08
Freeze-substitution	10	1.22 \pm 0.32	0.13 \pm 0.03	6.86 \pm 2.19
Freeze-drying	10	1.33 \pm 0.32	0.13 \pm 0.03	7.53 \pm 2.19

The proteins were extracted with water since the water or water solution were commonly used in histological procedure, moreover no special reasons seemed to recommend the use of some of the various buffer solutions.

To determine the non-protein nitrogen, the proteins were removed according to Kirby's method. The other commonly used methods removed also nucleic acids, which constituted the main source of non-protein nitrogen. The method of Kirby, however, did not allow to determine the content of DNA nitrogen, since it remained in phenole fraction. The extracted DNA did not exceed 1% of fresh tissue weight, so that we could admit that total non-protein nitrogen was determined.

SUMMARY

1. The amounts of proteins extracted from lyophilized material and from controls were equal, differences observed being statistically insignificant.

2. The extent of protein extraction after the method of freeze-substitution is comparable to that found after lyophilization as well as in controls.

3. The extraction of proteins following chemical fixation, i.e. with formaline and Carnoy's fluid is negligible, being lower than 1% of fresh tissue weight. The amount of proteins extracted following the absolute alcohol or acetone fixation may reach up to 2-3% of fresh tissue weight.

4. No significant differences were found between liver and kidney tissue.

REFERENCES

- [1] Ambrose E. J., *Progr. Biophys. Biol. Chemistry*, **6**, 25, 1956.
- [2] Berenbom M., Yokohama H., *Proc. Soc. Exp. Med.* **81**, 125, 1952.
- [3] Brachet J., Mirsky A., *The Cell* **1**, 72, 1955.
- [4] Burstone M. S., *J. Histochem. Cytochem.* **6**, 322, 1958.
- [5] Edström J. F., *Biochim. Biophys. Acta* **12**, 361, 1953.
- [6] Harbers E., Neumann K., *Z. Naturforsch.* **10b**, 377, 1955.
- [7] Hartleib J., Diefenbach H., Sandritter W., *Acta Histochem.* **2**, 196, 1956.
- [8] Kaufmann B. D., McDonald M. R., Gay H., Wilson K., Wymmann K., Okuda N., *Carnegie Year Book* **47**, 144, 1948.
- [9] Kriby K. S., *Biochem. J.* **64**, 405, 1956.
- [10] Lagerstaedt S., *Experientia* **12**, 425, 1956.
- [11] Lagerstaedt S., *Z. Zellforsch.* **45**, 472, 1957.
- [12] Merriam R. W., *J. Histochem. Cytochem.* **6**, 43, 1958.
- [13] Neumann K., *Handbuch der Histochemie* Bd. I, G. Fischer, Stuttgart 1958.
- [14] Ostrowski K., Barański S., Kawiak J., *Rozpr. Wydz. VI PAN* p. 103, 1958.
- [15] Ostrowski K., Komender J., *Bull. Acad. Polon. Sci., Cl. VI*, **7**, 415, 1959.
- [16] Parnas J. K., Wagner R., *Biochem. Z.* **125**, 253, 1921.
- [17] Sandritter W., Hartleib J., *Experientia* **11**, 313, 1955.
- [18] Stenram U., *Exp. Cell. Res.* **15**, 174, 1958.
- [19] Sylven B., *Extrait de Acta Union Int. Contre Le Cancer* **7**, 700, 1951.
- [20] Sylven B., *Freezing and Drying* p. 169, Inst. Biol. London 1951.

BADANIA NAD ROZPUSZCZALNOŚCIĄ BIAŁEK Z TKANEK UTRWALONYCH RÓŻNYMI CHEMICZNYMI I FIZYCZNYMI METODAMI

Streszczenie

1. Stwierdzono, iż ilość białka ekstrahowanego z materiału liofilizowanego oraz kontrolnego jest taka sama. Różnice mieściły się w granicach błędów statystycznych.

2. Ilość wypłukiwanych białek z materiału utrwalonego metodą "freeze-substitution" jest porównywalna z ilościami białka dającymi się ekstrahować z materiału liofilizowanego oraz kontrolnego.

3. Po utrwaleniu chemicznym, np. formaliną lub płynem Carnoy'a, ilość białek dających się ekstrahować jest znikoma, niższa od 1% świeżej wagi tkanki. Po utrwaleniu alkoholem absolutnym lub acetonem ilość ta może sięgać 2-3% świeżej wagi tkanki.

4. Nie stwierdzono istotnych różnic w badaniach pomiędzy tkanką wątroby i nerki.

Otrzymano 23.9.1960.

S. ANGIELSKI i J. ROGULSKI

**WPLYW HOMOGENATU NERKI NA REAKCJĘ GLUTATIONU
Z KWASEM MALEINOWYM**

*Pracownia Biochemii Patologicznej Instytutu Biochemii i Biofizyki PAN,
i Zakład Chemii Fizjologicznej, AM, Gdańsk
Kierownik: Prof. Dr Wł. Mozołowski*

Kwas maleinowy wywołuje u szczurów zespół wielokierunkowego uszkodzenia kanalików nerkowych [19, 26, 3]. Towarzyszy temu znaczny spadek zawartości grup SH nerki, tak białkowych, jak i niebiałkowych [29]. Grupy sulfhydrylowe innych tkanek, np. wątroby nie ulegają przy tym istotnemu zmniejszeniu. Przyjmuje się, że przeszło 90% niebiałkowych grup SH różnych tkanek stanowi glutation [22]. Mniej niż 10% przypada na cysteinę. Reaktywność obu tych drobnocząsteczkowych związków tiolowych, jak wykazali Morgan i Friedmann [25], różni się znacznie. Cysteina tworzy z kwasem maleinowym proste produkty przyłączenia z dużą szybkością i wydajnością reakcji. Natomiast szybkość reakcji glutationu z kwasem maleinowym jest znacznie mniejsza. Ponadto glutation ma zdolność izomeryzacji kwasu maleinowego na kwas fumarowy. W związku z tym wydajność reakcji przyłączenia glutationu do kwasu maleinowego jest znacznie mniejsza. Z drugiej strony wiadomo, że inkubacja glutationu z homogenatem nerki szczura powoduje rozkład glutationu i uwolnienie cysteiny [9, 28]. W związku z tym podjęto prace zmierzające do zbadania *in vitro* wpływu homogenatów nerki oraz innych tkanek szczurów na reakcję kwasu maleinowego z glutationem i z cysteiną.

METODY

Do doświadczeń używano białe szczury obu płci, wagi 200 - 340 g. Szczury karmione były dietą mleczną [2]. Zwierzęta zabijano przez odcięcie głowy. Tkanki po wypreparowaniu wrzucano do zimnego, izotonicznego KCl, cięto na małe skrawki, a po osuszeniu i zważeniu homogenizowano w szklanym homogenizatorze Pottera chłodzonym wodą z lodem. Zwykle sporządzano 20% homogenat. Dla uzyskania frakcji komórko-

wych homogenat wirowano w około 600 g przez 5 min. w wirówce umieszczonej w chłodni o temp. 0°. Osad odrzucano, a płyn wirowano ponownie przez 15 min. w około 16 000 g w wirówce chłodzonej wodą wodociągową. Otrzymany po tym wirowaniu osad zawieszano w izotonicznym KCl (w objętości równej objętości homogenatu użytego do wirowania) i nazywano frakcją mitochondrialną. Płyn z nad osadu nazywano frakcją cytoplazmatyczną.

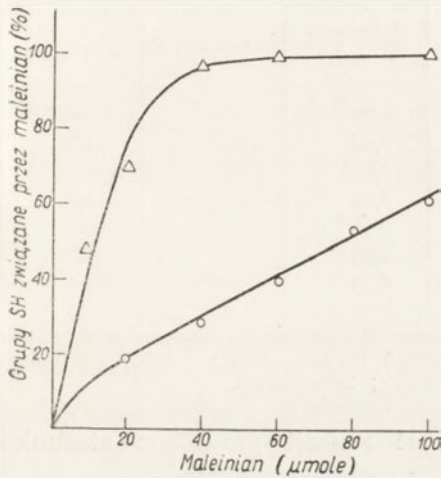
Reakcję glutationu lub cysteiny badano w układzie: 1 ml 0,1 M-buforu tris o pH 7,5, 0,5 ml roztworu maleinianu sodu, 0,5 ml roztworu glutationu lub cysteiny (świeżo sporządzone), 0,25 ml 20% homogenatu, woda do objętości 3 ml. Inkubowano w temp. 38° zwykle przez okres 60 minut, który okazał się najdogodniejszy. Odbiałczano kwasem sulfosalicylowym o końcowym stężeniu 2,5%. W tym stężeniu przerywa on również reakcję kwasu maleinowego ze związkami tiolowymi. W próbach kontrolnych inkubowano same związki tiolowe, związki tiolowe z dodatkiem homogenatów lub z dodatkiem kwasu maleinowego. W odbiałczonych przesączach oznaczano grupy SH metodą Grunerta w modyfikacji Becka i wsp. [8]. Cysteinę wraz z cysteinoglicyną oznaczano wg Sullivana w modyfikacji Waelscha [16] (zamiast kwasu trójchlorooctowego używano do odbiałczania kwas sulfosalicylowy). Azot całkowity w preparatach glutationazy oznaczano metodą Kjeldahla. Proszek acetonowy mitochondriów nerki preparowano wg Corwina [15]. Glutationazę otrzymano wg Binkleya i wsp. [10], używając jako materiału wyjściowego nerki szczura lub świni. W większości doświadczeń glutation stosowano w stężeniu $3 - 4 \cdot 10^{-3}$ M, a więc odpowiadającym w przybliżeniu średniej zawartości glutationu w tkankach szczura.

Stosowano odczynniki: Glutation (Merck) otrzymany od Dr Sokołowskiej, za co składamy jej w tym miejscu podziękowanie. Cysteina cz. firmy Fluka przep. Gliwice. Kwas maleinowy cz.d.a. (import ZSRR), przep. Gliwice. Tris-(hydroksymetyl)-aminometan cz. (Fluka). Glutamina cz.d.a. (Light). Pozostałe odczynniki ch. cz., otrzymane głównie z F.O.Ch. w Gliwicach.

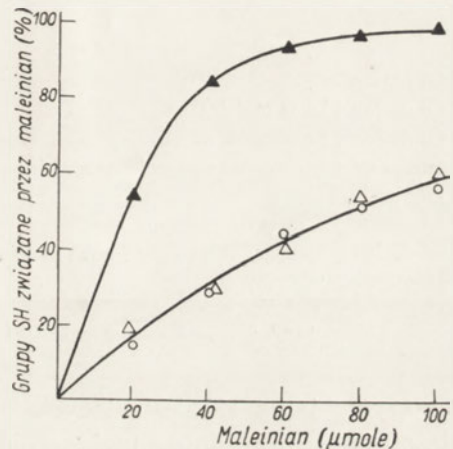
WYNIKI

Szybkość reakcji kwasu maleinowego z glutationem jest znacznie mniejsza niż szybkość reakcji z cysteiną. Przy stałych ilościach związków tiolowych zależy ona od stężenia użytego do reakcji kwasu maleinowego. Zależność tę podaje rys. 1. Jak widać w obecności trzykrotnego nadmiaru kwasu maleinowego, w ciągu 60 min. inkubacji zostaje związane blisko 90% cysteiny i zaledwie około 20% glutationu. Rys. 2 podaje wpływ homogenatów nerki i wątroby na szybkość reakcji glutationu z kwasem maleinowym. Z porównania rys. 1 i 2 oraz z danych tablicy 1 widać, że

homogenat wątroby jest zupełnie bez wpływu na szybkość reakcji glutationu z kwasem maleinowym, natomiast homogenat nerki zwiększa ją w sposób znaczny. Przy trzykrotnym nadmiarze kwasu maleinowego wydajność reakcji z glutationem w obecności homogenatu wątroby wynosi około 25% (wobec 20% wydajności kontroli). Natomiast wydajność reakcji z glutationem w obecności homogenatu nerki wynosi około 70%, a więc osiąga wartości bliskie wydajności reakcji cysteiny z kwasem



Rys. 1. Szybkość reakcji kwasu maleinowego z glutationem oraz z cysteiną, mierzona procentem związanych grup SH, w zależności od stężenia kwasu maleinowego. Skład mieszaniny inkubacyjnej: 1 ml 0,1 M-buforu tris o pH 7,5, 10 μmoli glutationu (○) lub cysteiny (△), 10 do 100 μmoli maleinianu sodu. Całkowita objętość 3 ml. Inkubacja 60 min. w 38°



Rys. 2. Wpływ homogenatów nerki i wątroby na szybkość reakcji kwasu maleinowego z glutationem. Skład mieszaniny inkubacyjnej: 1 ml 0,1 M-buforu tris o pH 7,5, 10 μmoli glutationu, 10 do 100 μmoli maleinianu sodu, 0,25 ml 20% homogenatu nerki (▲) lub wątroby (△). Kontrola bez dodatku homogenatu (○). Całkowita objętość 3 ml. Inkubacja 60 min. w 38°

maleinowym. Jak widać z danych tablicy 2 oraz rys. 3, homogenat nerki, podobnie jak homogenat wątroby, jest bez wpływu na szybkość reakcji cysteiny z kwasem maleinowym. Wskazuje to, że homogenat nerki specyficznie zwiększa wydajność reakcji tylko w układzie zawierającym glutation i kwas maleinowy.

W dalszych doświadczeniach badano reakcję glutationu względnie cysteiny z kwasem maleinowym przy stosunku stężeń 1:3 (10 μmoli grup SH i 30 μmoli maleinianu). Przy tym stosunku stężeń obu substratów występuje największa różnica w reaktywności między cysteiną a glutationem. Ilość grup SH glutationu związana przez kwas maleinowy w obecności homogenatu nerki wynosi 70%. Wpływ czynników zarówno zwią-

Tablica 1

Wpływ homogenatów nerki i wątroby na wydajność reakcji wiązania grup sulfhydrylowych w układzie: kwas maleinowy, glutation

Warunki reakcji: mieszanina inkubacyjna zawierała 1 ml buforu tris o pH 7,5, 10 μ moli glutationu, 30 μ moli maleinianu sodu, 0,25 ml 20% homogenatu. Całkowita objętość 3 ml. Inkubacja 60 min. w 38°

	Grupy SH		
	pozostałe po inkubacji (μ mole)	związane przez kwas maleinowy	
		(μ mole)	(%)
Glutation	8,00	—	—
Glutation + kwas maleinowy	6,40	1,60	20,0
Glutation + homogenat nerki	10,64*	—	—
Glutation + homogenat nerki + kwas maleinowy	2,94	7,70	73,0
Homogenat nerki	0,15	—	—
Glutation + homogenat wątroby	8,00	—	—
Glutation + homogenat wątroby + kwas maleinowy	6,20	1,80	22,5
Homogenat wątroby	0,20	—	—

* Wzrost grup sulfhydrylowych roztworu glutationu inkubowanego z homogenatem nerki można by tłumaczyć działaniem reduktazy glutationowej homogenatu.

szających, jak i zmniejszających szybkość reakcji przy tym stosunku stężeń substratów może uwidocznic się w sposób wyraźny.

Rysunek 4 przedstawia zależność szybkości reakcji glutationu z kwasem maleinowym od stężenia homogenatu nerki. Wydajność reakcji mierzona procentem związanych przez kwas maleinowy grup SH, w ciągu pierwszych 20 min., wykazuje prostą zależność od ilości dodanego homogenatu.

Homogenat nerki po zagotowaniu traci całkowicie zdolność zwiększania szybkości reakcji glutationu z kwasem maleinowym. Natomiast

Tablica 2

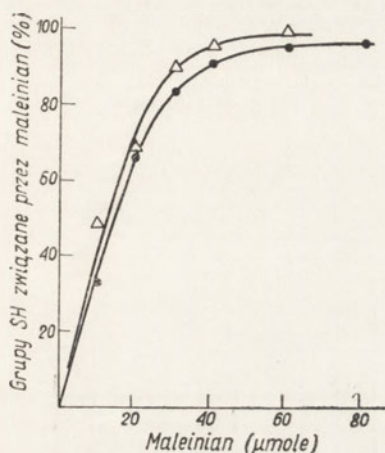
Wpływ homogenatów nerki i wątroby na wydajność reakcji wiązania grup sulfhydrylowych w układzie: kwas maleinowy, cysteina

Warunki doświadczenia jak w tablicy 1. Zamiast glutationu dano 10 μ moli cysteiny

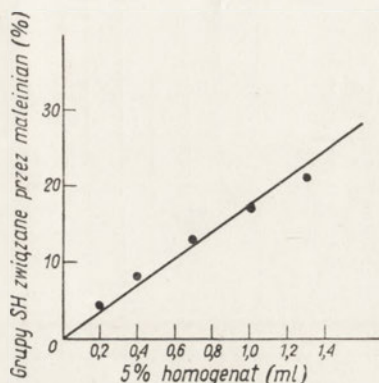
	Grupy SH związane przez kwas maleinowy (%)
Kwas maleinowy + cysteina	79,0
Kwas maleinowy + cysteina + homogenat nerki	78,5
Kwas maleinowy + cysteina + homogenat wątroby	81,0

24-godzinna dializa wobec wody jest bez wpływu. Doświadczenia te świadczą o obecności w tkance nerkowej czynnika o charakterze białkowym, enzymatycznym posiadającego zdolność zwiększania wydajności reakcji wiązania grup SH w układzie: glutation, kwas maleinowy.

Oprócz nerki i wątroby badano również wpływ homogenatów innych tkanek na tę reakcję. Wyniki doświadczeń przedstawia rys. 5. Jak widać,



Rys. 3. Wpływ homogenatu nerki na szybkość reakcji kwasu maleinowego z cysteiną. Skład mieszaniny inkubacyjnej: 1 ml 0,1 M-buforu tris o pH 7,5, 10 μmoli cysteiny, od 10 do 100 μmoli maleinianu sodu (Δ), to samo z dodatkiem 0,25 ml 20% homogenatu nerki (●). Całkowita objętość 3 ml. Czas 60 min., temp. 38°



Rys. 4. Zależność szybkości reakcji wiązania grup sulfhydrylowych w układzie: glutation, kwas maleinowy, od ilości homogenatu nerki. Skład mieszaniny inkubacyjnej: 1 ml 0,1 M-buforu tris o pH 7,5, 10 μmoli glutationu, 30 μmoli maleinianu sodu, 0,2 do 1,3 ml 5% homogenatu nerki. (Całkowita objętość 3 ml. Inkubacja 20 min. w 38°

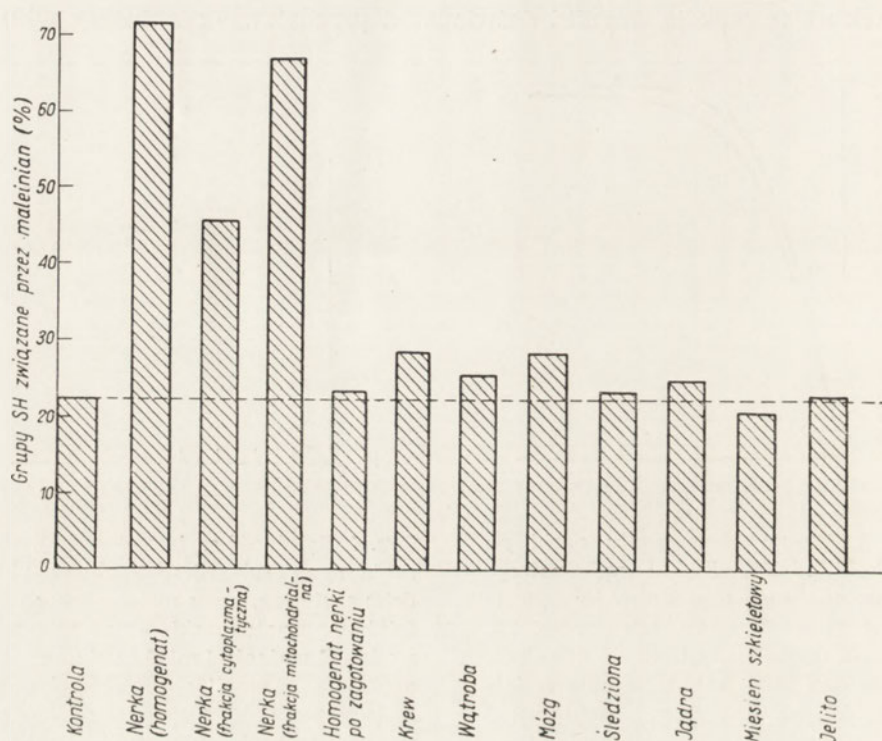
Tablica 3

Wpływ frakcji komórkowych homogenatu nerki na wydajność reakcji wiązania grup sulfhydrylowych w układzie: kwas maleinowy, glutation

Warunki doświadczenia jak w tabelicy 1. Frakcje komórkowe dodano w ilościach odpowiadających 0,25 ml pełnego homogenatu

	Grupy SH związane przez kwas maleinowy (%)
Kwas maleinowy + glutation	20,0
Kwas maleinowy + glutation + homogenat nerki	71,5
Kwas maleinowy + glutation + frakcja cytoplazmatyczna nerki	45,5
Kwas maleinowy + glutation + frakcja mitochondrialna nerki	66,5

żadna z badanych tkanek nie wykazuje własności podobnych do nerki. Rozmieszczenie aktywności, mierzonej procentem związanych przez kwas maleinowy grup SH, we frakcjach komórkowych homogenatu nerki przedstawiają dane zawarte w tabelicy 3 oraz częściowo rys. 5. Frakcja



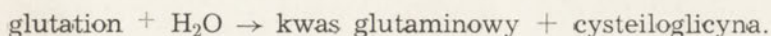
Rys. 5. Porównanie wpływu homogenatów różnych tkanek oraz frakcji komórkowych homogenatu nerki na szybkość reakcji wiązania grup sulfhydrylowych w układzie: kwas maleinowy, glutation. Warunki reakcji we wszystkich doświadczeniach takie jak w tabelicy 1. Frakcje komórkowe homogenatu nerki dodano w ilościach odpowiadających 0,25 ml pełnego homogenatu. Próba kontrolna bez dodatku homogenatu

mitochondrialna wykazuje aktywność bliską aktywności pełnego homogenatu. Frakcja cytoplazmatyczna posiada mniejszą, jednak znaczną aktywność.

Opierając się na tych spostrzeżeniach, sporządzono proszek acetonowy mitochondriów nerki. Okazało się, że wyciąg wodny lub wyciąg 0,1 M-buforem tris o pH 7,5 tego proszku jest zupełnie pozbawiony aktywności. Natomiast wodna zawiesina proszku odznacza się znaczną aktywnością. Na podstawie tych danych można było przypuszczać, że czynnik enzymatyczny występujący w ziarnistościach komórkowych i po-

siadający zdolność zwiększania szybkości reakcji wiązania grup SH w układzie glutation, kwas maleinowy jest związany ze strukturą tych ziarnistości.

Z porównania danych rys. 1 i 2 widać, że szybkość reakcji glutationu z kwasem maleinowym w obecności homogenatu nerki osiąga wartości bliskie szybkości reakcji cysteiny z kwasem maleinowym. Można przypuszczać, że w nerce istnieje enzym bądź przyspieszający reakcję glutationu z kwasem maleinowym, bądź też rozszczepiający glutation do wolnej cysteiny, która następnie reagowałaby z kwasem maleinowym ze znacznie większą szybkością. Być może chodzi tu o glutationazę, czyli γ -glutamylotransferazę. Jest to enzym występujący u szczura wyłącznie w nerce i w trzustce i odszczepiający z glutationu resztę γ -glutamylową [9, 18, 5, 28]. Akceptorem tej grupy może być cząsteczka wody według równania:



Powstająca w reakcji cysteiloglicyna ulega następnie rozpadowi pod wpływem cysteinoglicynazy, uwalniając wolną cysteinę [9, 27, 21]. W takim przypadku jednak, w układzie: glutation, kwas maleinowy, homogenat nerki zachodziłoby naraz kilka reakcji. (1) Wiązanie glutationu przez kwas maleinowy, (2) rozpad glutationu poprzez cysteiloglicynę do wolnej cysteiny, (3) wiązanie cysteiny, (4) wiązanie cysteiloglicyny przez kwas maleinowy, (5) być może rozpad produktu addycji glutationu i kwasu maleinowego. Szybkość reakcji w takim układzie byłaby wypadkową szybkości tych wszystkich reakcji.

Tablica 4

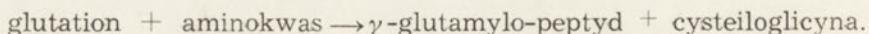
Wpływ wstępnej inkubacji glutationu z homogenatem nerki na wydajność reakcji z kwasem maleinowym

10 μ moli glutationu inkubowano z homogenatem nerki (0,25 ml) w buforze tris o pH 7,5 przez 30 min. w temperaturze 38°. Następnie wstawiono próbówki do wrzącej łaźni wodnej na okres 5 min. Po doprowadzeniu temperatury do około 38° dodawano maleinian (30 μ moli) i inkubowano przez godzinę. Na koniec przerywano reakcję kwasem sulfosalicylowym. W próbach kontrolnych nie dodano kwasu maleinowego po zagotowaniu

	Grupy SH		
	pozostałe po inkubacji	związane przez kwas maleinowy	
		(μ mole)	(μ mole)
Glu ation	10,50	—	—
Glutation + kwas maleinowy;	8,25	2,25	21,5
Glutation + homogenat nerki; inkubowano 30 min. i zagotowano	10,70	—	—
Glutation + homogenat nerki; inkubowano 30 min. i zagotowano + kwas maleinowy	3,50	7,00	67,0

Aby stwierdzić, czy chodzi o enzym przyspieszający reakcję glutationu z kwasem maleinowym, czy też o enzym rozkładający glutation, wykonano doświadczenie, którego wyniki przedstawia tablica 4. 10 μ moli glutationu inkubowano przez 30 min. z homogenatem nerki w buforze tris o pH 7,5 w temperaturze 38°. Następnie wstawiono probówki do wrzącej łaźni wodnej na okres 5 min. Po doprowadzeniu temperatury do około 38° dodano 30 μ moli maleinianu i inkubowano przez godzinę, po czym przerwano reakcję kwasem sulfosalicylowym. Okazało się, że wydajność reakcji osiągnęła 67%, a więc wartość bliską wydajności reakcji kwasu maleinowego z cysteiną. Pozwala to wnioskować, że w czasie wstępnej inkubacji glutationu z homogenatem nerki nastąpił rozpad glutationu. Według Binkleya i Nakamury [9] hydroliza glutationu przebiega w ten sposób, że początkowo uwalnia się tylko cysteiloglicyna. Dopiero gdy osiągnie ona pewne określone stężenie podlega działaniu cysteino-glicynazy, uwalniając cysteinę. Nawet po całkowitej hydrolizie glutationu stwierdza się zwykle około 5% cysteiloglicyny [21]. Nieznana jest reaktywność cysteiloglicyny w stosunku do kwasu maleinowego. Nie wiadomo więc, jaki jest jej udział, obok glutationu i cysteiny, w wiązaniu kwasu maleinowego. W następnym doświadczeniu inkubowano, w podobnych warunkach, glutation z homogenatem nerki i oznaczono metodą Sullivana sumę cysteiny i cysteiloglicyny powstałych w wyniku rozkładu glutationu. Okazało się, że po godzinie inkubacji pozostało około 20% glutationu, reszta, tj. blisko 80% uległa rozkładowi (Tabl. 5). Wyniki tych doświadczeń zdają się wskazywać, że zwiększoną wydajność reakcji wiązania grup sulfhydrylowych w układzie kwas maleinowy, glutation, w obecności homogenatu nerki przypisać należy działaniu glutationazy. Powstająca w wyniku rozkładu glutationu cysteina zostaje wiązana przez kwas maleinowy znacznie szybciej i z większą wydajnością.

Znany jest fakt aktywacji glutationazy przez niektóre aminokwasy i dwupeptydy [18, 24, 16, 21, 28, 4]. Związki te są, podobnie jak cząsteczka wody, akceptorami grupy γ -glutamylowej. W wyniku przeniesienia tej grupy na cząsteczkę aminokwasu lub peptydu powstaje nowy γ -glutamyl-peptyd, według równania:



Szybkość tej reakcji transpeptydacji jest w porównaniu z prostą hydrolizą glutationu znacznie większa. Zależy przy tym od stężenia dodanego akceptora. W związku z tym wykonano doświadczenie, w którym do zwykłego układu: glutation, kwas maleinowy, homogenat nerki dodano 40 μ moli glutaminy. Wyniki przedstawia tablica 6. Okazuje się, że glutamina, która sama jest bez wpływu na reakcję kwasu maleinowego z glutationem, w układzie zawierającym homogenat nerki wyraźnie, choć nieznacznie, zwiększa wydajność reakcji. Stosunkowo niewielki wpływ

aktywujący glutaminy tłumaczyć należy tym, że znaczne ilości aminokwasów zawiera prawdopodobnie sam homogenat.

Wszystkie przedstawione doświadczenia wykonywane były w środowisku o pH 7,5. Natomiast optimum działania glutationazy wynosi około 8,5 [9, 27, 5, 28]. W tabelicy 7 przedstawione są dane, z których wynika,

T a b l i c a 5

Rozkład glutationu pod wpływem homogenatu nerki

10 μ moli glutationu inkubowano przez godzinę z homogenatem nerki (0,25 ml) w buforze tris o pH 7,5, w temperaturze 38°

Po inkubacji stwierdzono					
(a)		(b)		(a-b)	
Grup SH		Cysteiny z cysteinoglicyną		Glutationu	
(μ mole)	(%)	(μ mole)	(%)	(μ mole)	(%)
10,64	100	8,24	77,5	2,40	22,5

że istotnie, wpływ homogenatu nerki na szybkość reakcji wiązania grup sulfhydrylowych w układzie glutation, kwas maleinowy jest przy pH 8,6 wyraźnie większy.

Opierając się na tych spostrzeżeniach, otrzymano z nerek szczurzych oraz z nerek świni preparat glutationazy [10], który jak się okazało,

T a b l i c a 6

Wpływ glutaminy na szybkość reakcji wiązania grup sulfhydrylowych w układzie: kwas maleinowy, glutation z dodatkiem homogenatu nerki

Warunki doświadczenia jak w tabelicy 1. Glutaminę dodano w ilości 40 μ moli

	Grupy SH		
	pozostałe po inkubacji	związane przez kwas maleinowy	
	(μ mole)	(μ mole)	(%)
Glutation	7,50	—	—
Glutation+kwas maleinowy	5,80	1,70	22,5
Glutation+glutamina	7,50	—	—
Glutation+glutamina+kwas maleinowy	5,80	1,70	22,5
Gluta ion+homogenat nerki	8,90*	—	—
Glutation+homogenat nerki+kwas maleinowy	2,90	6,00	67,5
Glutation+homogenat nerki+glutamina	9,00*	—	—
Glutation+homogenat nerki+glutamina+ +kwas maleinowy	2,30	6,70	74,5

* Wzrost grup sulfhydrylowych roztworu glutationu inkubowanego z homogenatem nerki można by tłumaczyć działaniem reduktazy glutationowej homogenatu.

Tablica 7

Wpływ pH na szybkość reakcji wiązania grup sulfhydrylowych w układzie: kwas maleinowy, glutation, homogenat nerki

Warunki doświadczenia jak w tablicy 1, z tą tylko różnicą, że stężenia substratów były trzykrotnie większe (30 μ moli glutationu i 90 μ moli maleinianu sodowego)

	Grupy SH związane przez kwas maleinowy (%)	
	pH 7,5	pH 8,6
Glutation+kwas maleinowy	45,5	50,0
Glutation+kwas maleinowy+homogenat nerki	81,5	97,5

posiada również zdolność zwiększania szybkości reakcji wiązania grup sulfhydrylowych w układzie: kwas maleinowy, glutation. Wyciąg wodny otrzymanego preparatu, podobnie jak wyciąg wodny acetonowego proszku mitochondriów nerki, nie wykazuje aktywności. Natomiast wodna zawiesina lub wyciąg 0,1M-buforem węglanowym, pH 9,7, wykazują znaczną aktywność. Wyniki te są zgodne z danymi Binkleya i wsp. [10, 12], którzy stwierdzili, że glutationaza ma charakter lipoproteidu i jest nierozpuszczalna w oddziaływaniu obojętnym. Jak było do przewidzenia, aktywność otrzymanego preparatu zależy w dużej mierze od stężenia glutaminy dodanej do środowiska (Tabl. 8). Zależność ta jest znacznie wyraźniejsza niż w przypadku homogenatu, co było już wyżej uzasadnione. Jak była

Tablica 8

Wpływ glutationazy na szybkość reakcji wiązania grup sulfhydrylowych w układzie: kwas maleinowy, glutation

Warunki doświadczenia jak w tablicy 1. Glutationazę otrzymaną z nerek świni dodano w ilościach odpowiadających 0,61 mg azotu

	Grupy SH związane przez kwas maleinowy (%)
Glutation+kwas maleinowy	19,5
Glutation+kwas maleinowy+glutacionaza	35,5
Glutation+kwas maleinowy+glutacionaza +40 μ moli glutaminy	49,5
Glutation+kwas maleinowy+glutacionaza +80 μ moli glutaminy	67,0
Glutation+kwas maleinowy+glutacionaza* +40 μ moli glutaminy	47,5

* Preparat otrzymany z nerek szczurzych, dodany w ilości odpowiadającej 0,57 mg azotu.

o tym mowa w rozdziale dotyczącym metod, wszystkie doświadczenia przeprowadzano w środowisku buforowanym buforem tris. Binkley i Nakamura [9] wykazali, że rodzaj użytego buforu ma istotne znaczenie tak dla aktywności glutationazy, jak i cysteinoglicynazy. W związku z tym wykonano doświadczenie, w którym bufor tris zastąpiono buforem fosforanowym, w którym według wspomnianych autorów aktywność enzymów rozkładających glutation jest największa. Jak widać z danych tablicy 9, w środowisku fosforanowym wydajność reakcji kwasu maleinowego z glu-

Tablica 9

Rodzaj użytego buforu a wydajność reakcji w układzie: kwas maleinowy, glutation, homogenat nerki

Warunki doświadczenia jak w tablicy 1 lub 2. Bufor fosforanowy 0,1 M o pH 7,5 dodano, podobnie jak bufor tris, w ilości 1 ml

	Grupy SH związane przez kwas maleinowy (%)	
	Bufor tris	Bufor fosforanowy
Kwas maleinowy+glutation	20,0	20,0
Kwas maleinowy+glutation+homogenat nerki	70,5	82,0
Kwas maleinowy+cysteina+homogenat nerki	79,5	81,5

tationem w obecności homogenatu nerki wyraźnie wzrasta i osiąga wartości całkowicie równe wydajności reakcji kwasu maleinowego z cysteiną.

Na podstawie przeprowadzonych doświadczeń można więc wnioskować, że istotnym czynnikiem w homogenacie nerki, zwiększającym wydajność reakcji wiązania grup SH w układzie glutation, kwas maleinowy jest glutationaza.

DYSKUSJA

Przemiana glutationu jest bardzo żywa; jego okres półtrwania wynosi u szczurów około 2 - 4 godzin [20, 6]. Cystyna wprowadzona do ustroju zostaje wbudowana w glutation w czasie krótszym niż 3 godziny [1]. Przyjmuje się też ogólnie, że przeszło 90% niebiałkowych grup SH tkanek ssaków stanowi glutation. Przeświadczenie to opiera się na wynikach uzyskanych metodą glioksalazową, specyficzną dla glutationu. Zwykle są one niewiele tylko niższe od wyników uzyskanych innymi metodami i odpowiadających zatem całości niebiałkowych grup SH. Na ogół porównuje się jednak wyniki uzyskane przez różnych autorów, co przy szerokim zakresie normalnej zmienności może prowadzić do błędnych wniosków. Jest chyba prawdopodobne, że w niektórych tkankach wza-

jemny ilościowy stosunek glutationu i cysteiny może być inny. Może to mieć duże znaczenie w różnego rodzaju zatruciach, wobec znanych faktów niejednakowej reaktywności glutationu i cysteiny w stosunku do różnych trucizn, działających na grupy sulfhydrylowe [25, 7, 13].

Istotne znaczenie dla utrzymania stałego poziomu glutationu w tkankach ma fakt, że glutation nie jest wrażliwy na działanie enzymów proteolitycznych i nie ulega rozkładowi pod wpływem peptydaz tkankowych [23]. Właściwość tę przypisuje się obecności grupy γ -glutamylowej, która ma stabilizować, ochraniać wiązania peptydowe glutationu przed działaniem peptydaz. Pierwszym więc i koniecznym etapem rozkładu glutationu jest odszczepienie grupy γ -glutamylowej. Enzym katalizujący tę reakcję, czyli γ -glutamylotranspeptydaza występuje u szczura wyłącznie w nerce i w trzustce. Według Revela i Balla [28] również u innych ssaków (prawdopodobnie u wszystkich) tylko te dwa narządy wykazują znaczną aktywność glutationazy. Natomiast u niższych zwierząt nawet nerka pozbawiona jest aktywności.

Hird i Springel w 1954 roku stwierdzili, że glutationaza jest związana z ziarnistościami komórkowymi i daje się wyciągnąć butanolem. Ostatnio Binkley i wsp. [12] oraz Avi-Dor [4] stwierdzili, że enzym ten znajduje się wyłącznie w mikrosomach. Według Binkleya ma on charakter lipoproteidu i jest nierozpuszczalny w oddziaływaniu obojętnym.

Wyniki naszych doświadczeń są zgodne z przedstawionym wyżej stanem wiedzy o występowaniu, własnościach i działaniu glutationazy. Pozornie sprzeczne rezultaty dotyczące wewnątrzkomórkowego rozmieszczenia enzymu spowodowane są względami technicznymi. Przy użyciu dostępnej nam wirówki nie byliśmy w stanie oddzielić mikrosomów od frakcji cytoplazmatycznej. Duża aktywność związana z frakcją mitochondrialną spowodowana jest zapewne wpływem środowiska jonowego, które jest, według Schneidera, przyczyną agregacji mikrosomów wokół mitochondriów [30]. Biologiczną rolę γ -glutamylotranspeptydazy łączy się zwykle z biosyntezą białek [17, 31, 4], za czym przemawiać miałyby lokalizacja w mikrosomach. Odmienny pogląd reprezentuje Binkley [11], według którego enzym ten posiada związek z transportem aminokwasów przez błony komórkowe. Przemawiać ma za tym inhibicja aktywności glutationazy przez związki czynnie wydzielane w kanalikach nerkowych, takie jak czerwień fenolowa, bromosulfoftaleina, kwas *p*-aminohippurowy, diodrast [10].

Z drugiej strony Bray i wsp. [14] stwierdzili udział glutationazy w procesach detoksykacji prekursorów kwasów merkapturowych. Mianowicie, bierze ona udział w rozkładzie powstającego w wątrobie S-*p*-(chlorobenzyl)-glutationu do S-*p*-(chlorobenzyl)-cysteiny, przy tym rozkład zachodzi z większą szybkością niż rozkład samego glutationu.

Na podstawie przeprowadzonych doświadczeń, wydaje się nam, że glutationaza może mieć pierwszorzędne znaczenie w zatruciu kwasem maleinowym. U podstaw tego rozumowania jest fakt znacznej różnicy w reaktywności glutationu i cysteiny w stosunku do kwasu maleinowego. Jak wykazano w części doświadczalnej, dodatek homogenatu nerki lub preparatu glutationazy zwiększa wybitnie wydajność reakcji wiązania grup sulfhydrylowych. Jest to skutkiem tego, że cysteina uwolniona w wyniku rozpadu glutationu reaguje z kwasem maleinowym ze znacznie większą szybkością i wydajnością.

Na podstawie tych faktów przypuszczamy, że po wstrzyknięciu szczurom kwasu maleinowego następuje jego powolne wiązanie przez glutation krwi oraz innych tkanek. Część kwasu maleinowego ulega przy tym izomeryzacji na kwas fumarowy. Natomiast w nerce kwas maleinowy natrafiałby na wolną cysteinę, która reaguje z nim znacznie szybciej. W rozumowaniu tym zakładamy aktywność glutationazy *in vivo*, w warunkach fizjologicznych, w nieuszkodzonej komórce. Stały rozkład glutationu w nerce przez glutationazę i stałe wiązanie uwolnionej cysteiny przez kwas maleinowy jest, być może, jedną z przyczyn wybitnego i raptownego spadku niebiałkowych grup SH w nerce. Być może wpływa to pośrednio na stan grup SH białek, doprowadzając do wybitnego obniżenia.

Być może, podobnie jak w przypadku kwasów merkapturowych, działaniu glutationazy ulega również produkt przyłączenia glutationu do kwasu maleinowego (S-glutationylobursztynian). Wówczas w moczu zwierząt zatrutych kwasem maleinowym powinno się spotykać wyłącznie lub przede wszystkim S-cysteilobursztynian, czyli produkt przyłączenia cysteiny do kwasu maleinowego. Wyniki doświadczeń Avi-Dor z fluoropirogronianem [4] potwierdzają taką możliwość. Okazało się, że glutationylopirogronian (związek o budowie bardzo podobnej do S-glutationylobursztynianu) jest rozkładany przez glutationazę, przy czym aktywność enzymu wobec glutationu i glutationylopirogronianu jest podobna.

STRESZCZENIE

Szybkość reakcji glutationu z kwasem maleinowym jest znacznie mniejsza w porównaniu z szybkością reakcji cysteiny z kwasem maleinowym. W warunkach stosowanych w przedstawionych doświadczeniach kwas maleinowy wiąże, w ciągu 60 min. inkubacji, blisko 90% grup SH cysteiny, a tylko około 20% grup SH glutationu. Dodatek homogenatu nerki zwiększa wydajność reakcji wiązania grup SH w układzie: glutation, kwas maleinowy do około 70% (a więc wartości bliskiej wydajności reakcji z cysteiną). Homogenaty żadnej z innych badanych tkanek nie wykazują podobnej właściwości. Stwierdzono, że pod wpływem homo-

genatu nerki dochodzi do rozkładu glutationu, a uwolniona cysteina zostaje wiązana przez kwas maleinowy ze znacznie większą szybkością i wydajnością. Otrzymany z nerek szczura lub świni preparat glutationazy wykazuje, podobny do homogenatu nerki, wpływ na reakcję wiązania grup SH w układzie: glutation, kwas maleinowy. Przedyskutowano znaczenie glutationazy *in vivo*, w zatruciu kwasem maleinowym.

L I T E R A T U R A

- [1] Anderson E. I., Mosher W. A., *J. Biol. Chem.* **188**, 717, 1951.
- [2] Angielski S., Rogulski J., Janowicz E., Madońska L., *Acta Biochim. Polon.* **6**, 295, 1959.
- [3] Angielski S., Rogulski J., Madońska L., *Acta Biochim. Polon.* **7**, 269, 1960.
- [4] Avi-Dor Y., *Biochem. J.* **76**, 371, 1960.
- [5] Ball E. G., Revel J. P., Cooper O., *J. Biol. Chem.* **221**, 895, 1956.
- [6] Barnes M. M., James S. P., Wood P. B., *Biochem. J.* **71**, 680, 1959.
- [7] Barron E. S. G., *Adv. Enzymology* **11**, 201, 1951.
- [8] Beck L. V., Rieck V. D., Duncan D., *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* **97**, 229, 1958.
- [9] Binkley F., Nakamura K., *J. Biol. Chem.* **173**, 411, 1948.
- [10] Binkley F., Olson C. K., *J. Biol. Chem.* **188**, 451, 1951.
- [11] Binkley F., w *Glutathione* (red. S. Colowick, A. Lazarow, E. Racker, D. R. Schwarz, E. Stadtman, H. Waelsch), str. 160, Academic Press. New York 1954.
- [12] Binkley F., Davenport J., Eastall F., *Biochem. Biophys. Res. Comm.* **1**, 206, 1959.
- [13] Boyer P. D., *The Enzymes* (red. P. D. Boyer, H. Lardy, K. Myrback), tom I, str. 511, Academic Press, New York 1959.
- [14] Bray H. G., Franklin T. J., James S. P., *Biochem. J.* **71**, 690, 1959.
- [15] Corvin M. L., *J. Biol. Chem.* **234**, 1333, 1959.
- [16] Fodor P. J., Miller A., Waelsch H., *J. Biol. Chem.* **202**, 551, 1953.
- [17] Hanes C. S., Hird F. J. R., Isherwood F. A., *Nature* **166**, 288, 1950.
- [18] Hanes C. S., Hird F. J. R., Isherwood F. A., *Biochem. J.* **51**, 25, 1952.
- [19] Harrison H. E., Harrison H. C., *Science* **120**, 606, 1954.
- [20] Henriques O. B., Henriques S. B., Mandebaum F. R., *Biochem. J.* **66**, 222, 1957.
- [21] Hird F. J. R., Springel P. H., *Biochem. J.* **56**, 417, 1954.
- [22] Jocelyn P. C., *Clin. Chim. Acta* **3**, 401, 1958.
- [23] Jocelyn P. C., w *Glutathion* (red. E. M. Crook), str. 43, University Press Cambridge 1959.
- [24] Kinoshita E. J., Ball E. G., *J. Biol. Chem.* **200**, 609, 1953.
- [25] Morgan E. J., Friedmann E., *Biochem. J.* **32**, 733, 1938.
- [26] Mudge G. H., *Amer. J. Med.* **24**, 785, 1958.
- [27] Olson C. K., Binkley F., *J. Biol. Chem.* **186**, 731, 1950.
- [28] Revel J. P., Ball E. G., *J. Biol. Chem.* **234**, 577, 1959.
- [29] Rogulski J., *Acta Biochim. Polon.* **7**, 239, 1960.
- [30] Schneider W. C., *Adv. Enzymology* **21**, 1, 1959.
- [31] Waelsch H., w *Glutathione* (red. S. Colowick i inni), str. 151, Academic Press New York 1954.

THE INFLUENCE OF KIDNEY HOMOGENATE UPON THE REACTION
BETWEEN GLUTATHIONE AND MALEIC ACID

S u m m a r y

The rate of the reaction between glutathione and maleic acid is considerably lower as compared to the rate of the cysteine reaction with this acid. Under conditions applied in the presented experiments maleic acid binds nearly 90% of SH groups of cysteine, during the 60-min. incubation, while only 20% of SH groups of glutathione. The addition of kidney homogenate rises the efficiency of the binding SH groups reaction within the system: glutathione - maleic acid up to about 70% (thus up to the value close to that of the cysteine reaction).

No homogenates of any other examined tissues show any ability of this kind. It has been stated that the addition of kidney homogenat leads to degradation of glutathione, and cysteine so liberated is bound by maleic acid at the considerably higher velocity and efficiency. The glutathionase preparation, obtained from rat or swine kidneys, exercees the effect upon the reaction of binding SH groups of glutathione by maleic acid, similar to that observed when kidney homogenate has been used. The role of glutathionase *in vivo*, in intoxication with maleic acid, is discussed.

Otrzymano 10. 10. 1960

RECENZJE KSIĄŻEK

Z TAJEMNIC BIOCHEMII. Bronisław Filipowicz. Warszawa 1960. Państwowe Wydawnictwo Naukowe. Stron 535. Cena zł 34.—

Szczególnością wartością ocenianej książki jest to, że ukazując ogrom zagadnień biochemicznych i nie kryjąc trudności, jakie studia biochemiczne przedstawiają, omawia je tak, że czytelnik nie przeraża się ich zawilnością; pozwala mu to na wyciągnięcie wniosku, że zrozumienie tych spraw, w ogólnych oczywiście zarysach, jest możliwe także dla czytelnika, który nie posiada fachowego, chemicznego przygotowania. A dobra książka popularna ma takie właśnie zadanie; ma zaciekawić czytelnika, a także przedstawić, że trudności jakie zjawiają się w zrozumieniu omawianych zagadnień, są do pokonania przy dobrej woli czytelnika i przy odpowiednim nakładzie jego pracy umysłowej.

W dwudziestu dziewięciu rozdziałach książki toczy się dialog między biochemikiem i jego kolegą, który chciałby się czegoś dowiedzieć o tej, tak żywo ostatnio się rozwijającej, nauce. Po przedstawieniu podstawowych wiadomości o budowie atomów i cząsteczek, omówieniu właściwości wody, elektrolitów i prostych związków organicznych, przechodzi rozmowa na zagadnienia biochemiczne. Książka omawia niemal wszystkie ważniejsze działy biochemii; a więc: budowę białka i kwasów nukleinowych, istotę enzymów, hormonów i witaminów, przemianę cukrowców i kwasów tłuszczowych, cykl kwasów trójkarboksylowych i spalanie wodorów, transaminacje i przemiany niektórych aminokwasów, hemoglobinę i krew, odżywianie i choroby przemiany materii.

Zrozumiałe, że w omówieniu tak licznych zagadnień znajdują się miejsca lepiej i lub gorzej ujęte. Szczegółowej dyskusji nie można przeprowadzić w ramach tej krótkiej oceny. Oceniający nie może jednak pominąć usterek dotyczących ujęcia historycznego poszczególnych zagadnień, a w szczególności chciałby zwrócić uwagę na następujące sprawy: krzywdzącą, zdaniem oceniającego, charakterystykę osobistości Lavoisiera (str. 33); nie dość wnikliwą ocenę tego, co zawdzięcza nauka o promieniotwórczości Marii Skłodowskiej-Curie (str. 418); w dziejach nauki o witaminach pominięcie Hopkinsa, a wymienienie autorów o znacznie mniejszych zasługach (rozdział 28); podawanie badań, wprawdzie bardzo sensacyjnych, które jednak nie wytrzymały kontrolnych prac innych laboratoriów (str. 275). Prócz tego w książce można znaleźć jeszcze inne pomyłki i błędy drukarskie; te ostatnie są szczególnie niebezpieczne w książkach popularyzujących wiedzę.

Oceniający dobrze zdaje sobie sprawę z tego, jak trudno uniknąć wszelkich pomyłek, zwłaszcza w książce takiej, która ujmuje całość bardzo rozległej nauki; dlatego chciałby ocenę zakończyć stwierdzeniem, że książka stanowi cenną pozycję wydawniczą, jest napisana zajmująco i zrozumiale. Państwowe Wydawnictwo Naukowe dało jej ładną postać zewnętrzną: interesującą okładkę, bardzo dobry papier i dobrze wykonane ryciny.

Włodzimierz Mozolowski

KURZES LEHRBUCH DER BIOCHEMIE. P. Karlson. Georg Thieme Verlag, Stuttgart, 1961. 331 stron, 53 rysunków, 1 składana tablica. DM. 29,70.

Podręcznik Karlsona zrywa z dotychczasowymi utartymi sposobami ujmowania całości biochemii. Rezygnuje on z wielu wiadomości dotyczących chemicznych właściwości substancji budujących żywe ustroje, aby całkowicie uwagę czytelnika skierować ku głównemu celowi dzisiejszej biochemii, tj. przedstawieniu zjawiska życia przy pomocy pojęć chemicznych. W pierwszych słowach wstępu, oraz ostatnich słowach zakończenia wyraźnie stwierdza, że objaśnienie zjawisk biologicznych jest możliwe jedynie na molekularnym, cząsteczkowym poziomie; na tym poziomie, na którym morfologia, fizjologia i biochemia nie dają się od siebie odróżnić.

Autor przedstawia w sposób zrozumiały i bardzo interesujący całość przemian biochemicznych. Wykład ten ujęty jest bardzo zwięźle, mieści się on na około 250 stronach, chociaż liczba ilustracji, wzorów i schematów jest bardzo duża. Mniej aniżeli 50 ostatnich stron jest poświęcone topochemii komórki, hormonom, odżywianiu oraz specjalnym funkcjom narządów. Szczególną wartość dla czytelnika ma to, że w podręczniku są przedstawione postępy biochemii prawie do ostatnich miesięcy. Ta cecha powoduje, że książka Karlsona będzie bardzo mile widziana przez wszystkich biochemików, którym przecież nie łatwo śledzić postępy wiedzy we wszystkich gałęziach biochemii.

Za zwięźłość wykładu, i za to, że podręcznik obejmuje zaledwie 300 stron, zapłacił autor dość wysoką cenę, a mianowicie pominął doświadczalne dowody przedstawianych wyników. Ze słów wstępu widać, że autor zdaje sobie sprawę z wielkości tej ofiary, ale dzięki temu uzyskał podręcznik nowego typu, za który będą mu czytelnicy wdzięczni.

Dla przejrzystego ujęcia całości przemian przyczynia się z pewnością duża składana tablica dołączona do książki, przedstawiająca najważniejsze ciągi reakcji biochemicznych. Zestawienie skrótów, używanych w biochemii, oraz bardzo interesujące tablice zestawiające chronologicznie najważniejsze odkrycia biochemiczne kończą to pożyteczne wydawnictwo.

Pewne wątpliwości budzi w czytelniku to, że jako pierwszy rozdział podał autor zestawienie podstawowych wiadomości z chemii organicznej. Wydaje się, że byłoby właściwiej umieścić je na końcu książki. Byłoby to dobitniej wyrażonym poglądem, że dla zrozumienia biochemii potrzebna jest znajomość podstaw chemii organicznej, a umieszczone w książce zestawienie ma za zadanie przypomnienie szczegółów, które mogły być zapomniane.

Irena Mochnacka

A BIOCHEMICAL APPROACH TO PATHOLOGY: M. J. Dawkins and K. R. Rees. Edward Arnold (Publishers) Ltd., London 1959. s. 128 + viii. 18 s.

Znaczenie biochemii w śledzeniu i zrozumieniu zjawisk nie tylko fizjologicznych, ale i patologicznych jest powszechnie uznawane, chociaż nie znajduje należytego odbicia w programach nauczania na Wydziałach Lekarskich. Z tym większym zadowoleniem należy przyjąć ukazanie się książki Dawkinsa i Reesa. Autorzy starają się

w sposób przystępny przedstawić biochemiczny pogląd na wybrane zagadnienia patologii zwierzęcej i ludzkiej. Pierwsze dwa rozdziały są poświęcone normalnym przemianom biochemicznym komórki i jej wewnętrznej organizacji. W pozostałych pięciu rozdziałach pobieżnie omówiono eksperymentalnie wywoływane stany patologiczne, mechanizm działania niektórych czynników toksycznych, stany niedoborów pożywienia, genetycznie uwarunkowane stany chorobowe, oraz biochemiczne problemy carcinogenezy.

Książka przeznaczona jest dla studentów medycyny, i ma im ułatwić przyswojenie sobie poglądu, że postępy patologii w coraz większym stopniu opierają się na biochemicznych metodach badania przemiany komórkowej. Słusznie więc zrobili autorzy, że dokonali wyboru niektórych zagadnień, które przedstawili w sposób bardzo ogólny, ale ciekawy i zrozumiały nawet dla niezbyt dobrze chemicznie przygotowanego czytelnika. Można by dyskutować słuszność dokonanego wyboru; nie uwzględniono problemów patologii ludzkiej, które ułatwiły zrozumienie pewnych procesów biochemicznych. Cukrzycy np. poświęcono zaledwie kilka zdań w związku z powstawaniem ciał ketonowych.

Pobieżny charakter przedstawienia wielu tematów jest skompensowany odsyłaczami do bardziej szczegółowych podręczników i artykułów przeglądowych.

Książka jest bardzo wartościową lekturą nie tylko dla studentów, ale także dla lekarzy i dla tych biochemików, którzy chcą poznać zagadnienia patologii biochemicznej.

M. Żydowo

В. ДРАВИКОВСКИ

ПРОТЕОЛИТИЧЕСКАЯ АКТИВНОСТЬ ПРЕПАРАТОВ АКТИНА

стр. 3—14

Резюме

В „сырых” препаратах актина найден сильно связанный с ним протеолитический фермент. Метод очистки актина по Тсао и Бэйл [19] дает даже небольшое увеличение активности фермента. Осаждение в изоэлектрической точке не лишает препарата протеолитической активности. Ультрацентрифугирование F-актина по методу Моммертса [12] позволяет частично удалить протеиназу, наилучшим образом является, по видимому, метод очистки актина путем осаждения ионами магния [3].

Оптimum действия протеолитического фермента, присутствующего в препарате актина лежит при pH 3,9. KCN, EDTA, цистеин и глутатион активируют этот фермент. Ионы Fe^{2+} не активируют протеиназы, а DFP тормозит ее в незначительной степени. Сильными ингибиторами фермента являются моноиодускусная кислота и ионы Cu^{2+} . Из исследованных белков (актин, миозин, гемоглобин) быстрее всего разлагается последний. В присутствии альбумина сыворотки, протеолитическая активность препарата актина уменьшена.

ЕВА ЛЕНАРТОВИЧ

ВЛИЯНИЕ НИЗКИХ ТЕМПЕРАТУР НА ОБМЕН ФОСФОРА
У ГУСЕНИЦ *GALLERIA MELLONELLA*

стр. 15—24

Резюме

1. Исследовалось влияние охлаждения гусениц *Galleria mellonella* до температуры 4° , 0° и -6° на различные фракции кислоторастворимых соединений фосфора.

2. Установлено, что под влиянием охлаждения гусениц происходит уменьшение содержания α -глицерофосфата и появление соответствующего количества ортофосфата. Остальные фракции фосфорных соединений не изменяются в этих условиях существенным образом. Изменения, возникающие при охлаждении исчезают при переведении гусениц в оптимальную для них температуру (30°).

3. Установлено наличие у гусениц *Galleria mellonella* значительных количеств фосфоэтаноламина (приблизительно 20% всех кислоторастворимых фосфорных соединений).

Е. БУХОВИЧ и И. РЕЙФЕР

ПРЕВРАЩЕНИЕ ОРОТОВОЙ КИСЛОТЫ В ПИРИМИДИНОВЫЕ ПРОИЗВОДНЫЕ В РАСТИТЕЛЬНОМ МАТЕРИАЛЕ

стр. 25—34

Резюме

Установлено, что стебли пшеницы присваивают и метаболизируют оротовую кислоту. Продукты обмена оротовой кислоты экстрагировали из растений холодной хлорной кислотой и выделяли при помощи адсорбции на ионитах и хроматографии на бумаге.

В результате описанных исследований установлено, что оротовая кислота подвергается превращению в уридин-5'-монофосфат, цитидин-5'-монофосфат, уридин и урацил и показано, что эти вещества являются нормальными составными частями высших растений.

На основании приведенных результатов, авторы составили предположительную схему превращения оротовой кислоты в пиримидиновые производные в растительном материале.

Т. ВИЛЬЧОК

АКТИВНОСТЬ ТРАНСАМИНАЗ В ИЗОЛИРОВАННЫХ КЛЕТОЧНЫХ СТРУКТУРАХ НОРМАЛЬНОЙ ПЕЧЕНИ КРЫСЫ

стр. 35—41

Резюме

Исследовалась локализация трансаминаз катализирующих реакции:
1) L-глутаминовая кислота - щавелевоуксусная кислота, 2) L-ас-

парагиновая кислота — α -кетоглутаровая кислота, 3) L-глутаминовая кислота — пировиноградная кислота, 4) L-аланин — α -кетоглутаровая кислота, 5) L-аспарагиновая кислота — пировиноградная кислота, 6) L-аланин — щавелевоуксусная кислота, в изолированных клеточных структурах (ядра, митохондрии, микросомы и основная цитоплазма) в нормальной печени крысы. Разделяя продукты реакции при помощи хроматографии на бумаге, автор показал, что ферменты, катализирующие реакции: глутаминовая кислота — аланин и глутаминовая кислота — аспарагиновая кислота активны во всех клеточных фракциях. Реакция аспарагиновая кислота—аланин протекает только в цитоплазме. Максимальная ферментативная активность локализована во фракции митохондрий и в ядерной фракции. Наблюдается заметное смещение равновесия реакции в сторону синтеза глутаминовой кислоты.

Я. ОЛЕКСЫ, ГАЛИНА ШАФРАН и З. ШАФРАН

ИССЛЕДОВАНИЯ НАД ГИДРОЛАЗАМИ ПИЩЕВАРИТЕЛЬНЫХ СОКОВ

VI. ЭСТЕРАЗЫ КИШЕЧНОГО СОКА СОБАКИ

стр. 43—53

Резюме

Исследовалась эстеразная активность кишечного сока собаки, полученного из фистул Тири-Велля, по отношению к восьми субстратам, а именно: подсолнечному маслу, триглицериду масляной кислоты, ацетату холестерина, ацетату *p*-нитрофенола, ацетату индоксила, ацетилхолину, фосфату фенолфталеина и сульфату нитрокатехола.

Кишечный сок обладает слабой активностью по отношению ко всем исследованным эфирам карбоновых кислот за исключением подсолнечного масла, которое не подвергается гидролизу. На основании химического строения субстратов и влияния эзерина и диизопропилфторфосфорной кислоты (DFP) на их гидролиз обсуждается возможность наличия двух ферментов, разлагающих эфиры карбоновых кислот, а именно: холинэстеразы и ароматической эстеразы типа А. Кишечный сок не содержит липазы.

Высокая активность гидролиза фосфата фенолфталеина вызвана наличием основной фосфатазы. В кишечном соке находится также арилсульфатаза, разлагающая сульфат нитрокатехола.

ИЗ ИССЛЕДОВАНИЙ НАД БЕЛКАМИ ЛЮПИНА

IV. N-КОНЦЕВЫЕ АМИНОКИСЛОТЫ В КОНГЛЮТИНЕ β

стр. 55—64

Резюме

При помощи фтординитрофенильного метода Сенгера установлено, что единственными N-концевыми аминокислотными остатками конглютина β из семян узколистного люпина являются остатки глютаминовой кислоты.

Количественные определения показали, что молекула исследуемого белка содержит 3 N-концевые остатки этой кислоты. На этом основании авторы предполагают, что конглютин β состоит из 3 полипептидных цепей.

Авторы подтвердили наблюдения Герритсена [6] о том, что в молекуле исследуемого белка содержится приблизительно 265 амидных групп.

П. ШАФРАНЬСКИ и Т. ГОЛАШЕВСКИ

ДАЛЬНЕЙШАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА ЦИТОПЛАЗМАТИЧЕСКИХ
НУКЛЕОПЕПТИДОВ ИЗ ПЕЧЕНИ МОРСКОЙ СВИНКИ

стр. 65—70

Резюме

Разработаны дальнейшие методы очистки цитоплазматических нуклеопептидов и проведена их характеристика. После разделения этих веществ при помощи электрофореза на бумаге, была проведена их хроматография на бумаге. Разделенные нуклеопептиды гидролизовали $11N-HClO_4$ и хроматографически определяли нуклеиновые основания. Пептидные фрагменты отделяли от нуклеотидных, производили их частичный гидролиз, а затем полный гидролиз и хроматографировали. Определялась природа связи пептидов с нуклеотидными фрагментами; при помощи периодатной реакции установлено, что группы 2', 3' —ОН рибозы являются свободными.

Результаты подтверждают наши предварительные предположения о том, что эти соединения являются олигонуклеотидами, соединенными с пептидами посредством карбоксильной и, повидимому, фосфатной группы. Установлены различия, как между пептидными, так и между нуклеотидными фрагментами этих соединений.

УЧАСТИЕ ТИОСУЛЬФАТА В ОБРАЗОВАНИИ СУЛЬФАТА В ЖИВОТНОМ
ОРГАНИЗМЕ

стр. 71—82

Резюме

Авторы разделили соединения серы, выделяемые с мочой на три фракции: тиосульфат (А), неорганический сульфат (В) и фракцию, содержащую остальные соединения серы (RS). После введения D, L-цистина $-^{35}\text{S}$ авторы определяли распределение радиоактивности между вышеупомянутыми тремя фракциями в моче. Установлено, что в течение 24 часов приблизительно 70% радиоактивности выделяется в виде неорганического сульфата, а лишь 2% в виде тиосульфата. Если одновременно с цистином вводилось значительное количество (200 мг $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3 \cdot 5 \text{H}_2\text{O}$) нерадиоактивного тиосульфата, то уменьшалось количество радиоактивности, выделяемое в виде сульфата, а значительно увеличивался процент активности (33%), выделяемой в виде тиосульфата.

На основании числовых данных, опубликованных в предыдущих работах (1, 2), а также, полученных при настоящей работе, авторы приходят к выводу, что тиосульфат является нормальным главным промежуточным метаболитом между серой цистина и конечным продуктом окисления — сульфатом. Свойственная животным организмам способность быстрого окисления тиосульфата тотчас-же удаляет образующийся из цистина тиосульфат. При введении значительного избытка экзогенного тиосульфата в количествах, превышающих способность окисления этого соединения, часть эндогенного тиосульфата, смешанного с экзогенным тиосульфатом, введенным извне, выделяется из организма.

К. ОСТРОВСКИ, Я. КОМЕНДЕР и К. КВАРЕЦКИ

КОЛИЧЕСТВЕННЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ РАСТВОРИМОСТИ БЕЛКОВ, ЭКСТРАГИРУЕМЫХ ИЗ ТКАНЕЙ, ФИКСИРОВАННЫХ РАЗЛИЧНЫМИ ХИМИЧЕСКИМИ И ФИЗИЧЕСКИМИ МЕТОДАМИ

стр. 83—87

Резюме

1. Установлено, что количества белка, экстрагируемого из лиофилизированного материала и из контрольного материала не отличаются существенным образом. Различия не превышали статистической ошибки.

2. Количество экстрагируемых белков из материала фиксированного методом „freeze-substitution“ приблизительно равно количеству белка, экстрагируемого из лиофилизированного и контрольного материала.

3. После фиксации химическими методами, напр. формалином или жидкостью Карнойя экстрагируется ничтожное количество белков — меньше, чем 1% мокрого веса ткани. После фиксации абсолютным спиртом или ацетоном, это количество может достигать 2—3% мокрого веса ткани.

4. Не было найдено существенных различий в определениях между тканью печени и почки.

С. АНГЕЛЬСКИ и Я. РОГУЛЬСКИ

ВЛИЯНИЕ ГОМОГЕНАТОВ ПОЧКИ НА РЕАКЦИЮ ГЛЮТАТИОНА С МАЛЕИНОВОЙ КИСЛОТОЙ

стр. 89—103

Резюме

Скорость реакции глутатиона с малеиновой кислотой значительно меньше, чем скорость реакции цистеина с малеиновой кислотой. В условиях опытов, описанных в настоящей работе, малеиновая кислота связывает в течение 60 мин. инкубации почти 90% групп SH цистеина, а лишь 20% групп SH глутатиона. Добавление гомогената почки увеличивает выход реакции связывания групп SH в системе: глутатион, малеиновая кислота, приблизительно до 70% (т.е. до значения близкого выходу реакции с цистеином).

Ни один из исследованных гомогенатов в других тканях не обладал подобными свойствами. Установлено, что под влиянием гомогената почки происходит разложение глутатиона, а освобожденный цистеин связывается с малеиновой кислотой со значительно большей скоростью и выходом. Полученный из почек крысы или почек свиньи препарат глутатионазы, обладает таким же влиянием на реакцию связывания групп SH в системе: глутатион, малеиновая кислота, как и гомогенат почки. Обсуждается значение глутатионазы *in vivo* при отравлении малеиновой кислотой.