

P O L S K A   A K A D E M I A   N A U K  
KOMITET BIOCHEMICZNY

ACTA  
BIOCHIMICA POLONICA

KWARTALNIK

T O M   V I I

WARSZAWA 1960  
PAŃSTWOWE WYDAWNICTWO NAUKOWE

<http://rcin.org.pl>

KOMITET REDAKCYJNY

Irena Mochnacka, Włodzimierz Mozołowski

RADA REDAKCYJNA

Członkowie Komitetu Biochemicznego PAN

ADRES REDAKCJI

Warszawa, Pałac Kultury i Nauki, XX piętro, pokój 2022

P. 1015



K 213/65

SPIS TREŚCI

(Tom VII, 1960 r.)

Zeszyt 1

<b>P. Szafrński, M. Bagdasarian and L. Tomaszewski</b> , Vitamin B <sub>12</sub> and the activation of amino acids . . . . .	3
<b>P. Szafrński, Hanna Wehr and E. Sulkowski</b> , Comparative studies on proteins of microsomes and cytoplasmic soluble proteins deriving from Guinea pig liver . . . . .	11
<b>T. Kłopotowski i Zofia Śmietańska</b> , Zwiększenie syntezy lipidów w wątrobie szczura przez dietę zawierającą olej sojowy . . . . .	21
<b>I. Reifer, J. Buchowicz and K. Toczko</b> , The synthesis of the pyrimidine ring from L-carbamylaspartic acid in excised blades of wheat seedlings . . . . .	29
<b>L. Wojtczak and Wanda Chmurzyńska</b> , Inhibition studies on insect polyphenol oxidase . . . . .	39
<b>Halina Szafran, Z. Szafran i J. Oleksy</b> , Badania nad hydrolazami soków trawiennych. V. Enzymy proteolityczne soku trzustkowego psa . . . . .	51
<b>K. L. Wierzchowski and D. Shugar</b> , Further studies on the photochemistry of pyrimidines, with special reference to 5- and 6-substituted derivatives in relation to photoreactivation in the T-even bacteriophages . . . . .	63
<b>B. Bartosiński</b> , Nowa chromatograficzna metoda rozdzielania ryboflawiny od jej nukleotydów i możliwość zastosowania jej do oznaczania aktywności flawokinazy . . . . .	85

Zeszyt 2—3

<b>R. Niemiro</b> , Aminoacyduria wywołana kwasem maleinowym. IV. Ustalenie dawki trującej maleinianu <i>in vivo</i> i <i>in vitro</i> . . . . .	95
<b>B. Skarżyński, T. W. Szczepkowski and Mirosława Weber</b> , Investigations on the oxidation of thiosulphate in the animal organism . . . . .	105
<b>P. Poszwiński, K. Zakrzewski i Zofia May</b> , Zapobieganie denaturacji cieplnej albumin osoczowych przez dodatek kaprylanu sodu . . . . .	115
<b>W. Drabikowski</b> , The binding of ATP by native and by modified proteins . . . . .	127
<b>Janina Opieńska-Blauth, Halina Kowalska i Alina Dobrzańska</b> , Aminoacyduria u noworodków w pierwszym tygodniu życia . . . . .	137

<b>P. Szafrński, E. Sulkowski, T. Golaszewski and J. Heller,</b> Isolation and some characteristics of the cytoplasmic nucleopeptides from Guinea pig liver	151
<b>Kathleen M. Henry, S. K. Kon, Pamela E. E. Todd, Joyce Toothill and D. H. Tomlin,</b> Calcium and phosphorus metabolism in the rat: effect of age on rate of adaptation to a low calcium intake	167
<b>J. Heller, T. Chojnacki and Maria J. Piechowska,</b> On pyrophosphate in the Hawk-moth <i>Celerio euphorbiae</i>	187
<b>Krystyna Belżecka and Konstancja Raczyńska-Bojanowska,</b> Studies on transamination in insects. II. Enzyme-coenzyme connection and coenzyme requirement in aspartic- $\alpha$ -ketoglutaric transaminase in <i>Celerio euphorbiae</i>	193
<b>Maria Toczko, S. Niziołek, F. Ryszka, W. Brzeski i I. Reifer,</b> Biosynteza i przemiany alkaloidów w łubinie wąskolistnym. I. Zmiany składu alkaloidów we wczesnych stadiach rozwoju roślin	203
<b>M. Żydowo,</b> Dezaminazy kwasu adenilowego i adenozyiny w nerce szczura	215
<b>L. Żelewski,</b> Zależność oddychania mitochondriów od środowiska użytego do homogenizacji	227
<b>Alicja Grudzińska,</b> Porównanie wolnych aminokwasów moczu i śliny człowieka	235
<b>J. Rogulski,</b> Grupy sulfhydrylowe tkanek szczurów po zatruciu kwasem maleinowym	239
<b>M. Laskowski and Beatrice Kassel,</b> Chromatographic studies with chymotrypsinogen B and chymotrypsin B	253
<b>W. Rzczycki i M. Hillar,</b> Oddychanie ślinianki podszczękowej wołu a produkcja mucyny <i>in vitro</i>	261
<b>S. Angielski, J. Rogulski i Lucyna Madońska,</b> Aminoacyduria wywołana kwasem maleinowym. V. Porównanie zatrucia kwasem maleinowym z zatruciem wywołanym: salyrganem, chlorkiem rtęci, jodoocetanem, kwasem malonowym i florydzyną	269
<b>S. Angielski, J. Rogulski, P. Mikulski i J. Popinigis,</b> Aminoacyduria wywołana kwasem maleinowym. VI. Azot- $\alpha$ -aminowy i ketokwasy krwi	285
<b>S. Angielski, J. Rogulski i Jadwiga Baściak,</b> Aminoacyduria wywołana kwasem maleinowym. VII. Próby interpretacji wpływu diety i sposobu podania na obraz zatrucia	295
<b>Celina Janion and D. Shugar,</b> Absorption spectra, structure and behaviour towards some enzymes of dihydropyrimidines and dihydro-oligonucleotides	309
<b>Cecylia Lutwak-Mann,</b> O naturze i składzie chemicznym płynu w blastocystach królika	331
<b>Tadeusz Mann,</b> Zastosowanie analizy chemicznej płynu nasiennego do badań nad czynnością męskiego hormonu płciowego w ustroju zwierzęcym	341
<b>W. Brzeski,</b> Dynamik der Inkorporation der Glykokoll-Kohlenstoffatome in Chlorophyll <i>a</i> und <i>b</i>	351
<b>Joan Keilin,</b> The nature of the haemoprotein in the eggs of <i>Planorbis corneus</i>	367
<b>K. L. Wierzchowski and D. Shugar,</b> Photochemistry of model oligo- and polynucleotides. II. Homopolymers of adenylic, guanylic and cytidylic acids and several heteropolymers	377

<b>Wanda Mejbaum-Katzenellenbogen, Bronisława Morawiecka i Wanda Dobry- szycka, Badania nad regeneracją białek z nierozpuszczalnych połączeń biał- kowo-taninowych. III. Białka rozpuszczalne w kwasie sulfosalicylowym (glikoproteidy)</b>	401
<b>D. Keilin, Haemerythrin</b>	415
<b>A. Kaliciński, Glikozamina w krwi pępowinowej i w krwi matki</b>	425
<b>I. Chmielewska, K. Toczko, Z. Kaniuga i J. Manicki, Wykorzystanie przez organizm ludzki składników podanego dożylnie hydrolizatu białkowego. III. Składniki moczu interferujące w oznaczaniu azotu aminowego</b>	429
<b>R. Ammon und E. Zoch, Das Vorkommen von Ketosäuren und Aminosäuren in der Menschlichen Placenta</b>	437

#### Zeszyt 4

<b>Danuta Hulanička, Cykl pentozowy u maczugowców</b>	449
<b>Janina Droese, Danuta Stawicka, Maria Toczko, S. Niziołek, W. Brzeski i I. Reifer, Biosynteza i przemiany alkaloidów w lubinie wąskolistnym. II. Biosynteza alkaloidów w izolowanych zarodkach i liścieniach</b>	459
<b>J. Heller and Monika M. Jeżewska, The uric acid riboside in <i>Sphingidae</i> moths</b>	469
<b>Halina Sierakowska, and D. Shugar, Investigations on histochemical localiza- tion of nuclease enzymes</b>	475
<b>W. Szer and D. Shugar, N-methylation of uridylic acid and preparation of oligonucleotides of 3-methyluridylic acid</b>	491
<b>Joanna Baranowska and D. Shugar, Photochemistry of model oligo- and poly- nucleotides. III. Cross-linking and staining properties of ultraviolet irradi- ated films of nucleic acids and oligonucleotides</b>	505
<b>R. Wagner and R. Sparaco, Studies on liver autopsy specimens in glycogenosis. Discrepancies between <i>in vitro</i> experiments and <i>in vitro</i> observations</b>	521

## CONTENTS

(Volume VII, Nos. 1—4, 1960)

### No. 1

<b>P. Szafrński, M. Bagdasarian and L. Tomaszewski</b> , Vitamin B <sub>12</sub> and the activation of amino acids . . . . .	3
<b>P. Szafrński, Hanna Wehr and E. Sułkowski</b> , Comparative studies on proteins of microsomes and cytoplasmic soluble proteins deriving from Guinea pig liver . . . . .	11
<b>T. Kłopotowski and Zofia Śmietańska</b> , The increased lipids synthesis in the livers of rats fed a diet containing soya bean oil . . . . .	21
<b>I. Reifer, J. Buchowicz and K. Toczko</b> , The synthesis of the pyrimidine ring from L-carbamylaspartic acid in exised blades of wheat seedlings . . . . .	29
<b>L. Wojtczak and Wanda Chmurzyńska</b> , Inhibition studies on insect polyphenol oxidase . . . . .	39
<b>Halina Szafran, Z. Szafran and J. Oleksy</b> , Studies on hydrolases in digesting juices. V. Proteolytic enzymes in the dog pancreatic juice . . . . .	51
<b>K. L. Wierzchowski and D. Shugar</b> , Further studies on the photochemistry of pyrimidines, with special reference to 5- and 6-substituted derivatives in relation to photoreactivation in the T-even bacteriophages . . . . .	63
<b>B. Bartosiński</b> , New chromatographic method for the separation of riboflavin from its nucleotides and the availability of the method to the estimation of the flavokinase activity . . . . .	85

### No. 2-3

<b>R. Niemiro</b> , Aminoaciduria induced with maleic acid. IV. The toxic dose of maleinate <i>in vivo</i> and <i>in vitro</i> . . . . .	95
<b>B. Skarżyński, T. W. Szczepkowski and Mirosława Weber</b> , Investigations on the oxidation of thiosulphate in the animal organism . . . . .	105
<b>P. Poszwiński, K. Zakrzewski and Zofia May</b> , The preventive effect of caprylate on heat denaturation of serum albumin . . . . .	115
<b>W. Drabikowski</b> , The binding of ATP by native and by modified proteins . . . . .	127

<b>Janina Opińska-Blauth, Halina Kowalska and Alina Dobrzańska,</b> Aminoaciduria in newborn during the first week of their life . . . . .	137
<b>P. Szafrński, E. Sulkowski, T. Golaszewski and J. Heller,</b> Isolation and some characteristics of the cytoplasmic nucleopeptides from Guinea pig liver . . . . .	151
<b>Kathleen M. Henry, S. K. Kon, Pamela E. E. Todd, Joyce Toothill and D. H. Tomlin,</b> Calcium and phosphorus metabolism in the rat: Effect of age on rate of adaptation to a low calcium intake . . . . .	167
<b>J. Heller, T. Chojnacki and Maria J. Piechowska,</b> On pyrophosphate in the Hawk-moth <i>Celerio euphorbiae</i> . . . . .	187
<b>Krystyna Belżeczka and Konstancja Raczyńska-Bojanowska,</b> Studies on transamination in insects. II. Enzyme-coenzyme connection and coenzyme requirement in aspartic- $\alpha$ -ketoglutaric transaminase in <i>Celerio euphorbiae</i> . . . . .	193
<b>Maria Toczko, S. Niziołek, F. Ryszka, W. Brzeski and I. Reifer,</b> Biosynthesis and changes of alkaloid content in <i>Lupinus angustifolius</i> . I. Changes in content of alkaloids in the early stages of growth . . . . .	203
<b>M. Żydowo,</b> Desaminases of adenylic acid and adenosine in rat kidney . . . . .	215
<b>L. Żelewski,</b> The effect of medium used for homogenization upon the mitochondrial respiration . . . . .	227
<b>Alicja Grudzińska,</b> The comparison of the free amino acids in human urine and saliva . . . . .	235
<b>J. Rogulski,</b> Sulphydryl groups in rat tissues after intoxication with maleic acid . . . . .	239
<b>M. Laskowski, and Beatrice Kassel,</b> Chromatographic studies with chymotrypsinogen B and chymotrypsin B . . . . .	253
<b>W. Rzczycki and M. Hillar,</b> Respiration of the beef submandibular salivary gland in relation to the production of mucin <i>in vitro</i> . . . . .	261
<b>S. Angielski, J. Rogulski and Lucyna Madońska,</b> Aminoaciduria induced with maleic acid. V. Comparison of maleic acid intoxication with intoxication caused by: salyrgan, mercurium chloride, iodoacetate, malonic acid and phlorizin . . . . .	269
<b>S. Angielski, J. Rogulski, P. Mikulski and J. Popinigis,</b> Aminoaciduria induced with maleic acid. VI. $\alpha$ -amino nitrogen and keto acids in blood . . . . .	285
<b>S. Angielski, J. Rogulski and Jadwiga Baściak,</b> Aminoaciduria induced with maleic acid. VII. Attempts of interpretation of the influence of diets and the manner of its administration on the picture of intoxication . . . . .	295
<b>Celina Janion and D. Shugar,</b> Absorption spectra, structure and behaviour towards some enzymes of dihydropyrimidines and dihydro-oligonucleotides . . . . .	309
<b>Cecylia Lutwak-Mann,</b> Some properties of early embryonic fluid in the rabbit . . . . .	331
<b>Tadeusz Mann,</b> Chemical analysis of semen in the study of male sex hormone activity in the animal . . . . .	341
<b>W. Brzeski,</b> Dynamik der Inkorporation der Glykokoll-Kohlenstoffatome in Chlorophyll <i>a</i> und <i>b</i> . . . . .	351
<b>Joan Keilin,</b> The nature of the haemoprotein in the eggs of <i>Planorbis corneus</i> . . . . .	367
<b>K. L. Wierzchowski and D. Shugar,</b> Photochemistry of model oligo- and polynucleotides. II. Homopolymers of adenylic, guanylic and cytidylic acids and several heteropolymers . . . . .	377

<b>Wanda Mejbaum-Katzenellenbogen, Bronislawa Morawiecka and Wanda Dobryczycka</b> , Studies on regeneration of proteins from insoluble protein-tannin compounds. III. Proteins soluble in sulphosalicylic acid (glycoproteins) . . . . .	401
<b>D. Keilin</b> , Haemerythrin . . . . .	415
<b>A. Kaliciński</b> , Glucosamine in umbilical and mother blood . . . . .	425
<b>I. Chmielewska, K. Toczko, Z. Kaniuga and J. Manicki</b> , Utilization of infused protein hydrolyzate by the human organism. III. Urine constituents interfering with the amine nitrogen determination . . . . .	429
<b>R. Ammon und E. Zoch</b> , Das Vorkommen von Ketosäuren und Aminosäuren in der Menschlichen Placenta . . . . .	437

No. 4

<b>Dnuta Hulanicka</b> , The pentose cycle in <i>Corynebacterium diphtheriae</i> . . . . .	449
<b>Janina Droese, Danuta Stawicka, Maria Toczko, S. Niziolek, W. Brzeski and I. Reifer</b> , Biosynthesis and changes of alkaloid content in the blue lupine ( <i>L. angustifolius</i> ). II. Biosynthesis of alkaloids in isolated germs and cotyledons . . . . .	459
<b>J. Heller and Monika M. Jeżewska</b> , The uric acid riboside in <i>Sphingidae</i> moths . . . . .	469
<b>Halina Sierakowska and D Shugar</b> , Investigations on histochemical localization of nuclease enzymes . . . . .	475
<b>W. Szer and D. Shugar</b> , N-methylation of uridylic acid and preparation of oligonucleotides of 3-methyluridylic acid . . . . .	491
<b>Joanna Baranowska and D. Shugar</b> , Photochemistry of model oligo- and polynucleotides. III. Cross-linking and staining properties of ultraviolet irradiated films of nucleic acids and oligonucleotides . . . . .	505
<b>R. Wagner and R. Sparaco</b> , Studies on liver autopsy specimens in glycogenesis. Discrepancies between <i>in vitro</i> experiments and <i>in vivo</i> observations . . . . .	521



## INDEKS AUTORÓW

### A

<b>Ammon R. und Zoch E.</b> , Das Vorkommen von Ketosäuren und Aminosäuren in der Menschlichen Placenta . . . . .	437
<b>Angielski S., Rogulski J. i Madońska Lucyna</b> , Aminoacyduria wywołana kwasem maleinowym. V. Porównanie zatrucia kwasem maleinowym z zatruciem wywołanym: salyrganem, chlorkiem rtęci, jodoocetanem, kwasem malonowym i florydzyną . . . . .	269
<b>Angielski S., Rogulski J., Mikulski P. i Popinigis J.</b> , Aminoacyduria wywołana kwasem maleinowym. VI. Azot $\alpha$ -aminowy i ketokwasy krwi . . . . .	285
<b>Angielski S., Rogulski J. i Baściak Jadwiga</b> , Aminoacyduria wywołana kwasem maleinowym. VII. Próby interpretacji wpływu diety i sposobu podania na obraz zatrucia . . . . .	295

### B

<b>Bagdasarian M.</b> , patrz Szafranski P. and Tomaszewski L. . . . .	3
<b>Baranowska Joanna and Shugar D.</b> , Photochemistry of model oligo- and polynucleotides. III. Cross-linking and staining properties of ultraviolet irradiated films of nucleic acids and oligonucleotides . . . . .	505
<b>Bartosinski B.</b> , Nowa chromatograficzna metoda rozdzielania ryboflawiny od jej nukleotydów i możliwość zastosowania jej do oznaczania aktywności flawokinazy . . . . .	85
<b>Baściak Jadwiga</b> , patrz Angielski S. i Rogulski J. . . . .	295
<b>Belżeczka Krystyna and Raczyńska-Bojanowska Konstancja</b> , Studies on transamination in insects. II. Enzyme-coenzyme connection and coenzyme requirement in aspartic $\alpha$ -ketoglutaric transaminase in <i>Celerio euphorbiae</i> . . . . .	193
<b>Brzeski W.</b> , patrz Toczko Maria, Niziołek S., Ryszka F. i Reifer I. . . . .	203
<b>Brzeski W.</b> , Dynamik der Inkorporation der Glykokoll-Kohlenstoffatome in Chlorophyll <i>a</i> und <i>b</i> . . . . .	351
<b>Brzeski W.</b> , patrz Droese Janina, Stawicka Danuta, Toczko Maria, Niziołek S. i Reifer I. . . . .	459
<b>Buchowicz J.</b> , patrz Reifer I. and Toczko K. . . . .	29

## C

<b>Chmielewska Irena, Toczko K., Kaniuga Z. i Manicki J.</b> , Wykorzystanie przez organizm ludzki składników podanego dożylnie hydrolizatu białkowego. III. Składniki moczu interferujące w oznaczaniu azotu aminowego . . .	429
<b>Chmurzyńska Wanda</b> , patrz Wojtczak L. . . . .	39
<b>Chojnacki T</b> , patrz Heller J. and Piechowska Maria J. . . . .	187

## D

<b>Dobryszczycka Wanda</b> , patrz Mejbaum-Katzenellenbogen Wanda i Morawiecka Bronisława . . . . .	401
<b>Dobrzańska Alina</b> , patrz Opińska-Blauth Janina i Kowalska Halina . . .	137
<b>Drabikowski W.</b> , The binding of ATP by native and by modified proteins . .	127
<b>Droese Janina, Stawicka Danuta, Toczko Maria, Niziołek S., Brzeski W. i Reifer I.</b> , Biosynteza i przemiany alkaloidów w łubinie wąskolistnym. II. Biosynteza alkaloidów w izolowanych zarodkach i liścieniach . . . . .	459

## G

<b>Gołaszewski T.</b> , patrz Szafranski P., Sulkowski E. and Heller J. . . . .	151
<b>Grudzińska Alicja</b> , Porównanie wolnych aminokwasów moczu i śliny człowieka	235

## H

<b>Heller J.</b> , patrz Szafranski P., Sulkowski E. and Gołaszewski T. . . . .	151
<b>Heller J., Chojnacki T. and Piechowska Maria J.</b> , On pyrophosphate in the Hawk-moth <i>Celerio euphorbiae</i> . . . . .	187
<b>Heller J. and Jeżewska Monika M.</b> , The uric acid riboside in <i>Sphingidae</i> moths	469
<b>Henry Kathleen M., Kon S. K., Todd Pamela E. E., Toothill Joyce and Tomlin D. H.</b> , Calcium and phosphorus metabolism in the rat: Effect of age on rate of adaptation to a low calcium intake . . . . .	167
<b>Hillar M.</b> , patrz Rzczycki W. . . . .	261
<b>Hulanicka Danuta</b> , Cykl pentozowy u maczugowców . . . . .	449

## J

<b>Janion Celina and Shugar D.</b> , Absorption spectra, structure and behaviour towards some enzymes of dihydropyrimidines and dihydro-oligonucleotides . . . . .	309
<b>Jeżewska Monika M.</b> , patrz Heller J. . . . .	469
<b>Kaliciński A.</b> , Glikozamina w krwi pępowinowej i w krwi matki . . . . .	425
<b>Kaniuga Z.</b> , patrz Chmielewska I., Toczko K. i Manicki J. . . . .	429
<b>Kassel Beatrice</b> , patrz Laskowski M. . . . .	253

## X

<b>Keilin Joan</b> , The nature of the haemoprotein in the eggs of <i>Planorbis corneus</i>	367
<b>Keilin D.</b> , Haemerythrin . . . . .	415
<b>Kłopotowski T. i Śmietńska Zofia</b> , Zwiększenie syntezy lipidów w wątrobie szczura przez dietę zawierającą olej sojowy . . . . .	21
<b>Kon S. K.</b> , patrz Henry Kathleen M., Todd Pamela E. E., Toothill Joyce and Tomlin D. H. . . . .	167
<b>Kowalska Halina</b> , patrz Opieńska-Blauth Janina i Dobrzańska Alina . . . . .	137

## L

<b>Laskowski M. and Kassell Beatrice</b> , Chromatographic studies with chymotrypsinogen B and chymotrypsin B . . . . .	253
<b>Lutwak-Mann Cecylia</b> , O naturze i składzie chemicznym płynu w blastocystach królika . . . . .	331

## M

<b>Madońska Lucyna</b> , patrz Angielski S. i Rogulski J. . . . .	269
<b>Manicki J.</b> , patrz Chmielewska I., Toczko K. i Kaniuga Z. . . . .	429
<b>Mann Tadeusz</b> , Zastosowanie analizy chemicznej płynu nasiennego do badań nad czynnością męskiego hormonu płciowego w ustroju zwierzęcym . . . . .	341
<b>May Zofia</b> , patrz Poszwiński P. i Zakrzewski K. . . . .	115
<b>Mejbaum-Katzenellenbogen Wanda, Morawiecka Bronisława i Dobryszczycka Wanda</b> , Badania nad regeneracją białek z nierozpuszczalnych połączeń białkowo-taninowych. III. Białka rozpuszczalne w kwasie sulfosalicylowym (glikoproteidy) . . . . .	401
<b>Mikulski P.</b> , patrz Angielski S., Rogulski J. i Popinigis J. . . . .	285
<b>Morawiecka Bronisława</b> , patrz Mejbaum-Katzenellenbogen Wanda i Dobryszczycka Wanda . . . . .	401

## N

<b>Niemirow R.</b> , Aminoacyduria wywołana kwasem maleinowym. IV. Ustalenie dawki trującej maleinianu <i>in vivo</i> i <i>in vitro</i> . . . . .	95
<b>Niziołek S.</b> , patrz Toczko Maria, Ryszka F., Brzeski W. i Reifer I. . . . .	203
<b>Niziołek S.</b> , patrz Droese Janina, Stawicka Danuta, Toczko Maria, Brzeski W. i Reifer I. . . . .	459

## O

<b>Oleksy J.</b> , patrz Szafran Halina i Szafran Z. . . . .	51
<b>Opieńska-Blauth Janina, Kowalska Halina i Dobrzańska Alina</b> , Aminoacyduria u noworodków w pierwszym tygodniu życia . . . . .	137

## XI

P

<b>Piechowska Maria J.</b> , patrz Heller J. and Chojnacki T. . . . .	187
<b>Popinigis J.</b> , patrz Angielski S., Rogulski J. i Mikulski P. . . . .	285
<b>Poszwiński P., Zakrzewski K. i May Zofia</b> , Zapobieganie denaturacji cieplnej albumin osoczowych przez dodatek kaprylanu sodu . . . . .	115

R

<b>Raczyńska-Bojanowska Konstancja</b> , patrz Belżecka Krystyna . . . . .	193
<b>Reifer I., Buchowicz J. and Toczko K.</b> , The synthesis of the pyrimidine ring from L-carbamylaspartic acid in excised blades of wheat seedlings . . . . .	29
<b>Reifer I.</b> , patrz Toczko Maria, Niziołek S., Ryszka F. i Brzeski W. . . . .	203
<b>Reifer I.</b> , patrz Droese Janina, Stańska Danuta, Toczko Maria, Niziołek S. i Brzeski W. . . . .	459
<b>Rogulski J.</b> , Grupy sulfhydrylowe tkanek szczurów po zatruciu kwasem mleinowym . . . . .	239
<b>Rogulski J.</b> , patrz Angielski S. i Madońska Lucyna . . . . .	269
<b>Rogulski J.</b> , patrz Angielski S., Mikulski P. i Popinigis J. . . . .	285
<b>Rogulski J.</b> , patrz Angielski S. i Baściak Jadwiga . . . . .	295
<b>Ryszka F.</b> , patrz Toczko Maria, Niziołek S., Brzeski W. i Reifer I. . . . .	203
<b>Rzeczycki W. i Hillar M.</b> , Oddychanie ślinianki podszczękowej wołu a produkcja mucyny <i>in vitro</i> . . . . .	261

S

<b>Shugar D.</b> , patrz Wierzchowski K. L. . . . .	63
<b>Shugar D.</b> , patrz Janion Celina . . . . .	309
<b>Shugar D.</b> , patrz Wierzchowski K. L. . . . .	377
<b>Shugar D.</b> , patrz Sierakowska Halina . . . . .	475
<b>Shugar D.</b> , patrz Szer W. . . . .	491
<b>Shugar D.</b> , patrz Baranowska Joanna . . . . .	505
<b>Sierakowska Halina and Shugar D.</b> , Investigations on histochemical localization of nuclease enzymes . . . . .	475
<b>Skarżyński B., Szczepkowski T. W. and Weber Mirosława</b> , Investigations on the oxidation of thiosulphate in the animal organism . . . . .	105
<b>Sparaco R.</b> patrz Wagner R. . . . .	521
<b>Stawska Danuta</b> , patrz Droese Janina, Toczko Maria, Niziołek S., Brzeski W. i Reifer I. . . . .	459
<b>Sułkowski E.</b> , patrz Szafranski P. and Wehr Hanna . . . . .	11
<b>Sułkowski E.</b> , patrz Szafranski P., Gołaszewski T. and Heller J. . . . .	151
<b>Szafran Halina, Szafran Z. i Oleksy J.</b> , Badania nad hydrolazami soków trawiennych. V. Enzymy proteolityczne soku trzustkowego psa . . . . .	51

<b>Szafran Z.</b> , patrz Szafran Halina i Oleksy J. . . . .	51
<b>Szafrański P., Bagdasarian M. and Tomaszewski L.</b> , Vitamin B <sub>12</sub> and the activation of amino acids . . . . .	3
<b>Szafrański P., Wehr Hanna and Sulkowski E.</b> , Comparative studies on proteins of microsomes and cytoplasmic soluble proteins deriving from Guinea pig liver . . . . .	11
<b>Szafrański P., Sulkowski E., Golaszewski T. and Heller J.</b> , Isolation and some characteristics of the cytoplasmic nucleopeptides from Guinea pig liver . . . . .	151
<b>Szczepkowski T. W.</b> , patrz Skarżyński B. and Weber Mirosława . . . . .	105
<b>Szer W. and Shugar D.</b> , N-methylation of uridylic acid and preparation of oligonucleotides of 3-methyluridylic acid . . . . .	491
<b>Smietańska Zofia</b> , patrz Kłopotowski T. . . . .	21

### I

<b>Toczko K.</b> , patrz Reifer I. and Buchowicz J. . . . .	29
<b>Toczko K.</b> , patrz Chmielewska I., Kaniuga Z. i Manicki J. . . . .	429
<b>Toczko Maria, Niziołek S., Ryszka F., Brzeski W. i Reifer I.</b> , Biosynteza i przemiany alkaloidów w łubinie wąskolistnym. I. Zmiany składu alkaloidów we wczesnych stadiach rozwoju roślin . . . . .	203
<b>Toczko Maria</b> , patrz Droese Janina, Stawicka Danuta, Niziołek S., Brzeski W. i Reifer I. . . . .	439
<b>Todd Pamela E. E.</b> , patrz Henry Kathleen M., Kon S. K., Toothill Joyce and Tomlin D. H. . . . .	167
<b>Tomaszewski L.</b> , patrz Szafrański P. and Bagdasarian M. . . . .	3
<b>Tomlin D. H.</b> , patrz Henry Kathleen M., Kon S. K., Todd Pamela E. E. and Toothill Joyce . . . . .	167
<b>Toothill Joyce</b> , patrz Henry Kathleen M., Kon S. K., Todd Pamela E. E. and Tomlin D. H. . . . .	167

### W

<b>Wagner R. and Sparaco R.</b> Studies on liver autopsy specimens in glycogenosis. Discrepancies between <i>in vitro</i> experiments and <i>in vivo</i> observations . . . . .	521
<b>Weber Mirosława</b> , patrz Skarżyński B. and Szczepkowski T. W. . . . .	105
<b>Wehr Hanna</b> , patrz Szafrański P. and Sulkowski E. . . . .	11
<b>Wierzchowski K. L. and Shugar D.</b> , Further studies on the photochemistry of pyrimidines, with special reference to 5- and 6-substituted derivatives in relation to photoreactivation in the T-even bacteriophages . . . . .	63
<b>Wierzchowski K. L. and Shugar D.</b> , Photochemistry of model oligo- and polynucleotides. II. Homopolymers of adenylic, guanylic and cytidylic acids and several heteropolymers . . . . .	377
<b>Wojtczak L. and Chmurzyńska Wanda</b> , Inhibition studies on insect polyphenol oxidase . . . . .	39

**Z**

<b>Zakrzewski K.</b> , patrz Poszwiński P. i May Zofia . . . . .	115
<b>Zoch E.</b> , patrz Ammon R. . . . .	437

**Ż**

<b>Zelewski L.</b> , Zależność oddychania mitochondriów od środowiska użytego do homogenizacji . . . . .	227
<b>Żydowo M.</b> , Dezaminazy kwasu adenilowego i adenozyiny w nerce szczura	215

## INDEKS RZECZOWY

### A

<b>Adenilowy kwas:</b> i adenozyzna, dezaminazy w nerce szczura, M. Żydowo . . . . .	215
<b>Adenozyzna:</b> i adenilowy kwas, dezaminazy w nerce szczura, M. Żydowo . . . . .	215
<b>Albuminy osoczowe:</b> zapobieganie denaturacji cieplnej przez dodatek kaprylanu sodu, P. Poszwiński, K. Zakrzewski i Zofia May . . . . .	115
<b>Alkaloidy:</b> w łubinie wąskolistnym, zmiany składu we wczesnych stadiach rozwoju roślin, Maria Toczko, S. Niziołek, F. Ryszka, W. Brzeski i I. Reifer . . . . .	203
<b>Alkaloidy:</b> w łubinie wąskolistnym, biosynteza i przemiany w izolowanych zarodkach i liścieniach, Janina Droese, Danuta Stawicka, Maria Toczko, S. Niziołek, W. Brzeski i I. Reifer . . . . .	459
<b>Aminokwasy:</b> aktywacja i witamin B <sub>12</sub> , P. Szafranski, M. Bagdasarian i L. Tomaszewski . . . . .	3
<b>Aminokwasy:</b> porównanie wolnych w moczu i ślinie człowieka, Alicja Grudzińska . . . . .	235
<b>Aminokwasy:</b> i ketokwasy, występowanie w ludzkim łożysku, R. Ammon i E. Zoch . . . . .	437
<b>Aminoacyduria:</b> u noworodków w pierwszym tygodniu życia, Janina Opieńska-Blauth, Halina Kowalska i Alina Dobrzańska . . . . .	137
<b>Aminoacyduria:</b> wywołana kwasem maleinowym, azot $\alpha$ -aminowy i ketokwasy krwi, S. Angielski, J. Rogulski, P. Mikulski i J. Popinigis . . . . .	285
<b>Aminoacyduria:</b> wywołana kwasem maleinowym, porównanie zatrucia kwasem maleinowym z zatruciem wywołanym: salyrganem, chlorkiem rtęci, jodocyanem, kwasem malonowym i florydynam, S. Angielski, J. Rogulski i Lucyna Madońska . . . . .	269
<b>Aminoacyduria:</b> wywołana kwasem maleinowym, ustalenie dawki trującej maleinianu <i>in vivo</i> i <i>in vitro</i> , R. Niemirow . . . . .	95
<b>Aminoacyduria:</b> wywołana kwasem maleinowym, wpływ diety i sposobu podania na obraz zatrucia, próby interpretacji, S. Angielski, J. Rogulski i J. Adwiga Baściak . . . . .	295
<b>Azot <math>\alpha</math>-aminowy:</b> i ketokwasy krwi w aminoacydurii wywołanej kwasem maleinowym, S. Angielski, J. Rogulski, P. Mikulski i J. Popinigis . . . . .	285
<b>Azot aminowy:</b> składniki moczu interferujące w oznaczaniu, I. Chmielewska, K. Toczko, Z. Kaniuga i J. Manicki . . . . .	429
<b>ATP:</b> wiązanie przez białka rodzime i zmodyfikowane, W. Drabikowski . . . . .	127

## B

<b>Bakteriofagi:</b> T-parzyste, fotoreaktywacja w związku z fotochemicznym zachowaniem się pirymidyn, K. L. Wierzchowski i D. Shugar . . . . .	63
<b>Białka:</b> albuminy osoczowe, zapobieganie denaturacji cieplnej przez dodatek kaprylanu sodu, P. Poszwiński, K. Zakrzewski i Zofia May . . . . .	115
<b>Białka:</b> mikrosomów i rozpuszczalne cytoplazmy wątroby świnki morskiej, porównawcze badania, P. Szafrński, Hanna Wehr i E. Sułkowski . . . . .	11
<b>Białka:</b> wiązanie ATP przez rodzime i zmodyfikowane, W. Drabikowski . . . . .	127
<b>Białko:</b> hydrolizat, wykorzystywanie przez organizm ludzki składników dożylnie podanego, składniki moczu interferujące w oznaczaniu azotu aminowego, Irena Chmielewska, K. Toczko, Z. Kaniuga i J. Manicki . . . . .	429
<b>Białkowo-taninowe połączenia:</b> badania nad regeneracją białek rozpuszczalnych w kwasie sulfosalicylowym (glikoproteidów) z nierozpuszczalnych połączeń, Wanda Mejbaum-Katzenellenbogen, Bronisława Morawiecka i Wanda Dobrzyńska . . . . .	401
<b>Blastocysty:</b> o naturze i składzie chemicznym płynu u królika, Cecylia Lutwak-Mann . . . . .	331

## C

<i>Celerio euphorbiae</i> : i <i>Sphinx pinastri</i> , wykazanie obecności rybozydu kwasu moczowego, J. Heller, Monika M. Jeżewska . . . . .	469
<i>Celerio euphorbiae</i> : o pyrofosforanie u motyla, J. Heller, T. Chojnacki i Maria J. Piechowska . . . . .	187
<i>Celerio euphorbiae</i> : związek między enzymem i koenzymem w transaminazie: kwas asparaginowy — kwas $\alpha$ -ketoglutazarowy, Krystyna Bełżecka i Konstancja Raczyńska-Bojanowska . . . . .	193
<b>Chlorofil a i b:</b> dynamika inkorporacji atomów węgla glicyny, W. Brzeski . . . . .	351
<b>Chymotrypsyna B:</b> i chymotrypsynogen B, badania chromatograficzne, M. Laskowski i Beatrice Kassel . . . . .	253
<b>Chymotrypsynogen B:</b> i chymotrypsyna B, badania chromatograficzne, M. Laskowski i Beatrice Kassel . . . . .	253
<i>Corynebacterium diphtheriae</i> : wykazanie cyklu pentozowego, badania nad lokalizacją we frakcjach komórkowych, Danuta Hulanicka . . . . .	449

## D

<b>Denaturacja cieplna:</b> albumin osoczowych, zapobieganie przez dodatek kaprylanu sodu, P. Poszwiński, K. Zakrzewski i Zofia May . . . . .	115
<b>Dezaminazy:</b> kwasu adenilowego i adenozyiny w nerce szczura, M. Żydowo . . . . .	215

## E

<b>Enzym-koenzym:</b> związek między, w transaminazie: kwas asparaginowy — kwas $\alpha$ -ketoglutazarowy u <i>Celerio euphorbiae</i> , Krystyna Bełżecka i Konstancja Raczyńska-Bojanowska . . . . .	193
<b>Enzymy proteolityczne:</b> w soku trzustkowym psa, Halina Szafran, Z. Szafran i J. Oleksy . . . . .	51



## F

<b>Flawokinaza:</b> chromatograficzna metoda oznaczania aktywności, B. Bartosiński	35
<b>Fotochemia:</b> modelowych oligo- i polinukleotydów, homopolimery kwasów: adenilowego, gwanilowego i cytydylowego oraz szereg heteropolimerów, K. L. Wierzchowski i D. Shugar	377
<b>Fotochemia:</b> pirymidyn ze specjalnym uwzględnieniem 5 i 6 podstawionych pochodnych w stosunku do fotoreaktywacji w bakteriofagach T-parzystych, K. L. Wierzchowski i D. Shugar	63
<b>Fotoreaktywacja:</b> bakteriofagów T-parzystych, w związku z fotochemicznym zachowaniem się pirymidyn, K. L. Wierzchowski i D. Shugar	63
<b>Fosfor:</b> i wapń, metabolizm u szczurów, wpływ wieku na szybkość adaptacji do diety niskowapniowej, Kathleen M. Henry, S. K. Kon, Pamela E. E. Todd, Joyce Toothill i D. H. Tomlin	167

## G

<b>Galleria mellonella:</b> badania nad inhibitorami polifenolooksydazy, L. Wojtczak i Wanda Chmurzyńska	39
<b>Glicyna:</b> dynamika inkorporacji atomów węgla do chlorofilu <i>a</i> i <i>b</i> , W. Brzeski	351
<b>Glikogenowa choroba:</b> badania nad próbkami wątroby przypadków sekcyjnych, niezgodność między wynikami uzyskanymi z doświadczeń <i>in vitro</i> ze spostrzeżeniami <i>in vivo</i> , R. Wagner i R. Sparaco	521
<b>Glikoproteidy:</b> badania nad regeneracją z nierozpuszczalnych połączeń białko-taninowych, oznaczanie zawartości w płynach ustrojowych, Wanda Mejsbaum-Katzenellenbogen, Bronisława Morawiecka i Wanda Dobryszczyka	401
<b>Glikozamina:</b> w krwi pępowinowej i w krwi matki, A. Kaliciński	425

## H

<b>Hemerytryna:</b> —, D. Keilin	415
<b>Hemoproteid:</b> jaj <i>Planorbis corneus</i> , budowa chemiczna, Joan Keilin	367
<b>Histochemia:</b> metoda lokalizacji nukleaz przy użyciu cyklicznych fosforanów nukleozydów i fosfomonoesterazy, H. Sierakowska, D. Shugar	475
<b>Hormon płciowy męski:</b> zastosowanie analizy chemicznej płynu nasiennego do badań nad czynnością w ustroju zwierzęcym, Tadeusz Mann	341

## K

<b>Kaprylan sodu:</b> w zapobieganiu denaturacji cieplnej albumin osoczowych, P. Poszwiński, K. Zakrzewski i Zofia May	115
<b>L-karbamyloasparaginowy kwas:</b> w syntezie pierścienia pirymidynowego w odciętych źdźbłach kielków pszenicy, I. Reifer, J. Buchowicz i K. Toczko	29
<b>Ketokwasy:</b> i aminokwasy w ludzkim łożysku, R. Ammon i E. Zoch	437
<b>Ketokwasy:</b> i azot $\alpha$ -aminowy we krwi w aminoacydurii wywołanej kwasem maleinowym, S. Angielski, J. Rogulski, P. Mikulski i J. Popinigis	285
<b>Kielki pszenicy:</b> synteza pierścienia pirymidynowego z kwasu L-karbamyloasparaginowego w odciętych źdźbłach, I. Reifer, J. Buchowicz i K. Toczko	29

<b>Krew:</b> pępowinowa i matki, zawartość glikozaminy, A. Kaliciński . . . . .	425
<b>Krew:</b> w aminoacydurii wywołanej kwasem maleinowym, zawartość azotu $\alpha$ -aminowego i ketokwasów, S. Angielski, J. Rogulski, P. Mikulski i J. Popinigis . . . . .	285

## L

<b>Lipidy:</b> w wątrobie szczura, zwiększenie syntezy przez dietę zawierającą olej sojowy, T. Kłopotowski i Zofia Śmietańska . . . . .	21
---	----

## L

<b>Łożysko:</b> ludzkie, występowanie ketokwasów i aminokwasów, R Ammon- i E. Zoch . . . . .	437
<b>Lubin:</b> wąskolistny, biosynteza i przemiany alkaloidów w izolowanych zarodkach i liścieniach, Janina Droese, Danuta Stawicka, Maria Toczko, S. Niziołek, W. Brzeski i I. Reifer . . . . .	459
<b>Lubin:</b> wąskolistny, zmiany składu alkaloidów we wczesnych stadiach rozwoju roślin, Maria Toczko, S. Niziołek, F. Ryszka, W. Brzeski i I. Reifer . . . . .	203

## M

<b>Maleinowy kwas:</b> w wywołaniu aminoacydurii, azot $\alpha$ -aminowy i ketokwasy we krwi, S. Angielski, J. Rogulski, P. Mikulski, i J. Popinigis . . . . .	285
<b>Maleinowy kwas:</b> w wywoływaniu aminoacydurii, porównanie z zatruciem wywołanym: salyrganem, chlorkiem rtęci, jodoctanem, kwasem malonowym i florydzyną, S. Angielski, J. Rogulski i Lucyna Madońska . . . . .	269
<b>Maleinowy kwas:</b> w wywoływaniu aminoacydurii, próby interpretacji wpływu diety i sposobu podania na obraz zatrucia, S. Angielski, J. Rogulski i Jadwiga Baściak . . . . .	295
<b>Maleinowy kwas:</b> w wywoływaniu aminoacydurii, ustalenie dawki trującej <i>in vivo</i> i <i>in vitro</i> , R. Niemirow . . . . .	95
<b>Maleinowy kwas:</b> zatrucie a grupy sulfhydrylowe tkanek szczura, J. Rogulski . . . . .	239
<b>Metoda:</b> oznaczania aktywności flawokinazy, nowa chromatograficzna metoda rozdzielania ryboflawiny od jej nukleotydów, B. Bartosiński . . . . .	35
<b>Metoda:</b> histochemicznej lokalizacji nukleaz przy użyciu cyklicznych fosforanów nukleozydów i fosfomonoesterazy. Halina Sierakowska, D. Shugar . . . . .	469
<b>Mikrosomy:</b> i cytoplazma wątroby świnki morskiej, porównawcze badania nad białkami, P. Szafranski, Hanna Wehr i E. Sulkowski . . . . .	11
<b>Mitochondria:</b> zależność oddychania od środowiska użytego do homogenizacji, L. Zelewski . . . . .	227
<b>Mocz:</b> i ślina człowieka, porównanie wolnych aminokwasów, Alicja Grudzińska . . . . .	235
<b>Mucyna:</b> produkcja <i>in vitro</i> a oddychanie w śliniance podszczękowej wołu, W. Rzczycki i M. Hillar . . . . .	261

## N

<b>Nasienny plyn:</b> Zastosowanie analizy chemicznej do badań nad czynnością męskiego hormonu płciowego w ustroju zwierzęcym, Tadeusz Mann . . .	341
<b>Nerka:</b> dezaminazy kwasu adenilowego i adenozyiny u szczura, M. Żydowo	215
<b>Noworodki:</b> aminoacyduria w pierwszym tygodniu życia, Janina Opieńska-Blauth, Halina Kowalska i Alina Dobrzańska . . . . .	137
<b>Nukleazy:</b> histochemiczna metoda lokalizacji przy użyciu cyklicznych fosforanów nukleozydów i fosfomonoesterazy, Joanna Baranowska, D. Shugar	505
<b>Nukleinowe kwasy:</b> i oligonukleotydy, polimeryzacja i właściwość barwienia się w związku z naświetlaniem promieniami ultrafioletowymi, Joanna Baranowska, D. Shugar . . . . .	505
<b>Nukleopeptydy:</b> cytoplazmatyczne, wątroby świnki morskiej, izolowane i charakterystyka, P. Szafranski, E. Sułkowski, T. Gołaszewski i J. Heller . . . . .	151
<b>Nukleotydy:</b> oligo- kwasu 3-metylourydylowego, otrzymywanie, właściwości, W. Szer, D. Shugar . . . . .	491
<b>Nukleotydy:</b> oligo- i kwasy nukleinowe, polimeryzacja i właściwość barwienia się w związku z naświetlaniem promieniami ultrafioletowymi, Joanna Baranowska i D. Shugar . . . . .	505
<b>Nukleotydy:</b> oligo- i poli- fotochemia homopolimerów kwasów adenilowego, gwanilowego i cytydylowego oraz niektórych heteropolimerów, K.L. Wierchowski i D. Shugar . . . . .	377
<b>Nukleotydy:</b> oligo- dwuhydro- i dwuhydropirymidyny, widma absorpcyjne, budowa i zachowanie się wobec pewnych enzymów, Celina Janion i D. Shugar . . . . .	309

## O

<b>Oddychanie:</b> mitochondriów, zależność od środowiska użytego do homogenizacji, L. Żelewski . . . . .	227
<b>Oddychanie:</b> ślinianki podszczękowej wołu a produkcja mucyny <i>in vitro</i> , W. Rzeczycki i M. Hillar . . . . .	261
<b>Oksydaza polifenolowa:</b> badania nad inhibitorami u <i>Galleria mellonella</i> , L. Wojteczak i Wanda Chmuryńska . . . . .	39
<b>Olej sojowy:</b> zwiększenie syntezy lipidów w wątrobie szczura przez zawarty w diecie, T. Kłopotowski i Zofia Śmietańska . . . . .	21

## P

<b>Pentozowy cykl:</b> u <i>Corynebacterium diphtheriae</i> , wykazanie i badanie nad lokalizacją we frakcjach komórkowych, Danuta Hulanička . . . . .	449
<b>Pirymidynowy pierścień:</b> synteza z kwasu L-karbamyloasparaginowego, w odciętych źdźbłach kielków pszenicy, I. Reifer, J. Buchowicz i K. Toczeko	29
<b>Pirymidyny:</b> ze specjalnym uwzględnieniem 5 i 6 podstawionych pochodnych w stosunku do fotoreaktywacji w bakteriofagach T-parzystych, K. L. Wierchowski i D. Shugar . . . . .	63
<b>Pirymidyny:</b> dwuhydro- i dwuhydrooligonukleotydy, widma absorpcyjne, budowa i zachowanie się wobec pewnych enzymów, Celina Janion i D. Shugar	309

<i>Planorbis corneus</i> : budowa hemoproteidu jaj, Joan Keilin . . . . .	367
<b>Pyrofosforan</b> : badania nad formą występowania u motyla wilczomlecza ( <i>Celerio euphorbiae</i> ), J. Heller, T. Chojnacki i Maria J. Piechowska . . . . .	187

## R

<b>Ryboflawina</b> : nowa chromatograficzna metoda rozdziału od jej nukleotydów, B. Bartosiński . . . . .	85
<b>Rybozyd kwasu moczowego</b> : wykazanie obecności u <i>Sphinx pinastri</i> i <i>Celerio euphorbiae</i> , J. Heller, Monika M. Jeżewska . . . . .	469

## S

<i>Sphinx pinastri</i> : i <i>Celerio euphorbiae</i> , wykazanie obecności rybozydu kwasu moczowego, J. Heller, Monika M. Jeżewska . . . . .	469
<b>Sulfhydryłowe grupy</b> : tkanek szczurów po zatruciu kwasem maleinowym, J. Rogulski . . . . .	239

## S

<b>Ślina</b> : i mocz człowieka, porównanie wolnych aminokwasów, Alicja Grudzińska . . . . .	235
<b>Ślinianka podszczękowa</b> : wołu, oddychanie a produkcja mucyny <i>in vitro</i> , W. Rzczycki i M. Hillar . . . . .	261

## T

<b>Tiosiarazan</b> : badania nad utlenianiem w ustroju zwierzęcym, B. Skarżyński, T. W. Szczepkowski i Mirosława Weber . . . . .	105
<b>Transaminacja</b> : związek między enzymem i koenzymem w transaminazie: kwas asparaginowy — kwas $\alpha$ -ketoglutarynowy u <i>Celerio euphorbiae</i> , Krysztyna-Bełżecka i Konstancja Raczyńska-Bojanowska . . . . .	193
<b>Trzustkowy sok</b> : enzymy proteolityczne u psa, Halina Szafran, Z. Szafran, i J. Oleksy . . . . .	51

## U

<b>Ultrafiolet</b> : polimeryzacja i właściwość barwienia się błon kwasów nukleinowych i oligonukleotydów w związku z naświetlaniem, Joanna Baranowska, D. Shugar . . . . .	505
<b>Urydylowy kwas</b> : metoda otrzymywania 3-metylo-pochodnej i badania nad oligonukleotydem kwasu 3-metylourydylowego, W. Szer, D. Shugar . . . . .	521

## W

<b>Wapń:</b> i fosfor, metabolizm u szczurów, wpływ wieku na szybkość adaptacji do diety niskowapniowej, Kathleen M. Henry, S. K. Kon, Pamela E. E. Todd, Joyce Toothill i D. H. Tomlin . . . . .	167
<b>Wątroba:</b> ludzka, w przypadkach sekcyjnych choroby glikogenowej, powstawanie glikozy w próbkach narządu R. Wagner i R. Sparaco . . . . .	505
<b>Wątroba:</b> świnki morskiej, izolowanie i charakterystyka nukleopeptydów cytoplazmatycznych, P. Szafrński, E. Sułkowski, T. Gołaszewski i J. Heller . . . . .	151
<b>Wątroba:</b> świnki morskiej, porównawcze badania nad białkami mikrosomów i rozpuszczalnymi białkami cytoplazmy, P. Szafrński, Hanna Wehr i E. Sułkowski . . . . .	11
<b>Witamin B<sub>12</sub>:</b> a aktywacja aminokwasów, P. Szafrński, M. Bagdasarian i L. Tomaszewski . . . . .	3



P. SZAFRAŃSKI, M. BAGDASARIAN and L. TOMASZEWSKI

## VITAMIN B<sub>12</sub> AND THE ACTIVATION OF AMINO ACIDS\*

*Instytut Biochemii i Biofizyki PAN,  
Zakład Chemii Fizjologicznej, AM, Warszawa  
Kierownik: prof. dr J. Heller*

Wagle, Mehta and Johnson [7, 8] have suggested some role of vitamin B<sub>12</sub> in the protein biosynthesis. They have shown that the incorporation of labelled amino acids into protein *in vitro* has been lower in microsomes deriving from livers and spleens of vitamin B<sub>12</sub> deficient rats than in those deriving from normal animals. The addition of vitamin B<sub>12</sub> has risen the rate of amino acids incorporation in preparation deriving from the vitamin deficient rats. It has been stated later that the rate of amino acids activation has been lowered by as much as 40% when an antivitamin, namely the vitamin B<sub>12</sub> anilide, was added. The experiments performed by these authors to study the localization of vitamin B<sub>12</sub> in the cells have revealed that it occurs mainly in microsomes and in the supernatant collected during centrifugation of the microsomes. It has been stated on fractionation of the supernatant that 76% of the vitamin present in it has been precipitated at pH 5 with the amino acid activating enzymes. The preliminary fractionation of "pH 5 enzymes" has proved, that nearly whole vitamin B<sub>12</sub> has been precipitated with the protein at the ammonium sulphate saturation 0.4 to 0.6. This fraction represents a mixture of the crude amino acid activating enzymes. Basing upon these results Wagle, Mehta and Johnson [8] have suggested that vitamin B<sub>12</sub> plays some role in the amino acids activation. These reports have been criticized recently [1, 4], but all the experiments, both those supporting the hypothesis and those contradicting it, have been carried out on the only slightly purified enzymatic preparations. Therefore, we have decided to isolate the tryptophan activating enzyme up to the stage of its high purity and to follow the vitamin B<sub>12</sub> contents in various fractions obtained during the process of the purification.

\* Presented at the III International Symposium on Vitamins, Poznań, 21-24.IX.1959.

## EXPERIMENTAL

The tryptophan activating enzyme was isolated from the ox pancreas acetone powder. The method described in the following appears to be more convenient than that referred to by Davie, Koningsberger and Lipmann [2], since it allows to obtain a powder retaining its activity on storage and gives a high yield of active enzyme.

*Methods.* The activity of the tryptophan activating enzyme was estimated by hydroxamic method [2]. Glycine hydroxamate prepared according to Safir and Williams [6] was employed as the standard solution. The accuracy of the method in our experiments remained within the limits of  $\pm 5\%$ . The vitamin B<sub>12</sub> content was estimated by means of the Ford's microbiological method using *Ochromonas malhamensis* [3]. This method has been chosen for its high sensibility and almost absolute specificity towards cyanocobalamine.

The protein content was estimated by the biuret method [5].

*Acetone powder.* 500 g. of fresh pancreas, free from fat and conjunctive tissue was minced in a mincer with holes of about 1.5 mm. in diameter. The tissue minced in this manner could be subsequently well dehydrated and yielded a powder of long stability. The minced pancreas was treated with 3 l. of acetone cooled to  $-15^{\circ}$  and the extraction was carried out for 15 min. at about  $0^{\circ}$ . Then the suspension was quickly filtered under *vacuo* and the extraction twice repeated with 2 l. of cold acetone each time. The powder was washed with 500 ml. of cold acetone on the Büchner funnel and dried quickly at room temperature with a stream of cold air. The powder stored in vacuum dessicator over CaCl<sub>2</sub> at  $4^{\circ}$  retained its activity for several months.

*Fractionation.* All the manipulations were performed at  $0^{\circ}$ . 50 g. of the acetone powder were extracted with 700 ml. of 0.05M-KCl for 20 min. and stirred occasionally during this extraction. The suspension was centrifuged for 15 min. at 4000 g, the sediment discarded while the extract was collected and the activity of the tryptophan activating enzyme was determined in it, as well as the vitamin B<sub>12</sub> content (Fraction I). The results obtained in this fraction from different acetone powders varied from 0.4 to 1.5  $\mu$ moles of the hydroxamate formed per 1 mg. of protein per hour. The vitamin B<sub>12</sub> content in the same fraction ranged from 0.6 to 2.1  $\mu$ g. per 1 mg. of protein.

To further purification the extract was acidified with 2 N-acetic acid to pH 4.55 and centrifuged at 4000 g. Vitamin B<sub>12</sub> was estimated in the supernatant. It amounted for about 20% of the quantity found in the extract from acetone powder. The remaining 80% was precipitated with



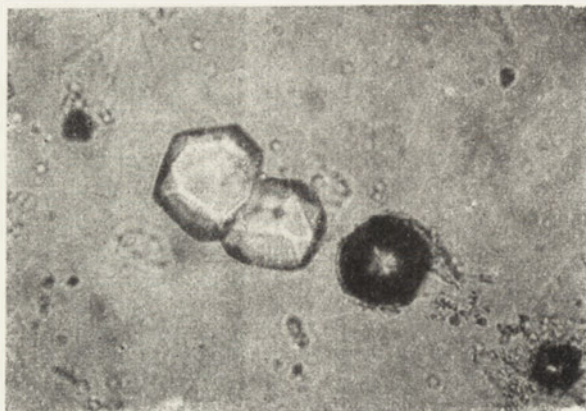
the amino acid activating enzymes at pH 4.55. This precipitate was then dissolved in 200 ml. of 0.2 M-Tris buffer, pH 7.6, and the insoluble residue discarded after centrifugation. The supernatant, called Fraction II, contained only 30% to 60% of the vitamin B<sub>12</sub> that had been extracted from acetone powder, since some part of the vitamin was discarded with insoluble proteins. The total enzymatic activity of this fraction was lower than that of Fraction I, the difference being 30% to 45%, while the specific activity was in certain cases more than twice that found in Fraction I.

Solid ammonium sulphate was added to the Fraction II to give 0.45 saturation, the resulting precipitate was removed by centrifugation at 30 000 g for 10 min. and discarded. The supernatant was acidified with 2 N-acetic acid to pH 4.55, centrifuged at 30 000 g, the precipitate dissolved in 20 ml. of Tris buffer, pH 7.6, and the insoluble residue discarded (Fraction III). The loss of the total activity during the preparation of the Fraction III was 20% to 50%, as compared with Fraction II, but the specific activity was 8 times higher. It was rather a considerable increase when compared to that observed during the passage from the first fraction to the second.

Saturated ammonium sulphate solution was then added to the Fraction III to reach up 0.45 saturation. The resulting precipitate was discarded after centrifugation at 30 000 g for 10 min. and solid ammonium sulphate was added to the supernatant up to 0.6 saturation. The obtained precipitate was centrifuged in the similar manner and dissolved in 10 ml. of water (Fraction IV). The loss of total activity at this step was 45% whereas the specific activity increased about 3 times and the vitamin B<sub>12</sub> content 2 times, as calculated per 1 mg. of protein.

Fraction IV was submitted to dialysis for 2 hours against 4 l. of distilled water stirred continuously. The precipitate being discarded, the liquid was acidified with 0.1 N-acetic acid to pH 4.8 and centrifuged at 30 000 g for 5 min. Thus obtained precipitate contained the very active enzyme but its specific activity was somewhat lower than that of the next fraction. The supernatant was acidified with 0.1 N-acetic acid to pH 4.55 and centrifuged at 30 000 g for 10 min. The resulting precipitate was suspended in 2 ml. of water and some few drops of 0.1 N-NaOH were added to give pH 6.5. The insoluble residue was removed by centrifugation and discarded. The supernatant was the Fraction V. The loss of activity was sometimes considerable at this step of the procedure and reached up even as much as 80% of the total activity found in the Fraction IV, but the specific activity increased strongly, and so did the vitamin B<sub>12</sub> content as calculated per 1 mg. of protein. Fraction V

contained the highly purified enzyme which showed one main fraction and only some insignificant contaminations on acetylocellulose electrophoresis. The electrophoresis was carried out in 0.05 M-veronal buffer, pH 8.5 for 3 hours, 0.6 mA being applied on 1 cm. of the strip. We have succeeded to crystallize the enzyme out of Fraction V using ammonium sulphate (Phot. 1). The enzyme has been also crystallized at



Phot. 1. Crystals of tryptophan activating enzyme

its isoelectric point reached up with acetic acid. It was, however, impossible to recrystallize it on account of too small amounts of the enzyme. The specific activity of the crystalline enzyme was the same as that found in Fraction V from which it had been crystallized.

The results of two typical fractionations have been gathered in Table 1. The amount of vitamin B<sub>12</sub> as calculated per 1 mg. of protein increased along the purification of the enzyme. Thus it might look likely that the vitamin was bound to the tryptophan activating enzyme. When one considers, however, that the molecular weight of vitamin B<sub>12</sub> is 1300, while that of the enzyme is 20 000 to 30 000, according to Lipmann *et al.* [2] one can calculate that there should be one molecule of the vitamin for every 4000 to 6000 molecules of the enzyme. If the equimolar ratio vitamin/enzyme were assumed, the molecular weight of the enzyme would have to be about 130 000 000. There is no doubt, however, that some considerable concentration of the vitamin is obtained during the purification of the enzyme.

Another suggestion arises that the enzyme has some specific ability to adsorb the vitamin selectively. To study this hypothesis the extract of acetone powder containing itself about 20 µg. of vitamin B<sub>12</sub> was treated with the equal amount of the vitamin, and the whole fractionation

procedure was performed on the so enriched extract. The contents of vitamin B<sub>12</sub> in individual fractions varied with the same range of values as they did in the corresponding fractions of the extract without the vitamin added. Thus the last experiment did not provide any evidence for the selective adsorption of vitamin B<sub>12</sub> on the tryptophan activating enzyme. Yet it did not exclude this possibility, since the enzyme might be completely saturated with the vitamin present in preparation originally. It was possible, too, that vitamin B<sub>12</sub> was bound to other proteins accompanying the enzyme, since electrophoresis showed that even the preparations of the highest purity still contained some contamination of heterogeneous proteins. Our results, when calculated as the total vitamin B<sub>12</sub> content in the purified enzyme, showed that the vitamin occurred in amounts which could be considered as contamination only.

These results are not the only ones contradicting those of Johnson *et al.* [7, 8], since Arnstein and Simkin [1] when working like Johnson on rats have not found any difference between the rate of the protein synthesis in the vitamin B<sub>12</sub>-deficient rats and in the normal ones. Microsomes isolated from the livers of the vitamin B<sub>12</sub>-deficient rats and from those deriving from the normal ones have shown the same rate of incorporation of <sup>14</sup>C-labelled amino acids. The addition of vitamin B<sub>12</sub>

Table 1

*Vitamin B<sub>12</sub> content in different fractions during purification of the tryptophan activating enzyme isolated from ox pancreas*

The figures are the results of two experiments *a* and *b*. The fractionation was carried out on 50 g. of acetone powder.

Fraction	Experiment	Total protein (mg.)	Total activity (μmole of hydroxamate/hr.)	Total vitamin B <sub>12</sub> (mμg)	Specific activity (μmole of hydroxamate/mg. of protein/hr.)	Vitamin B <sub>12</sub> (mμg/mg. of protein)
I	<i>a</i>	19 380	14 922	17 823	0.77	0.93
	<i>b</i>	11 480	17 000	24 820	1.48	2.14
II	<i>a</i>	8 875	8 342	10 910	0.94	1.26
	<i>b</i>	3 740	12 144	8 380	3.25	2.24
III	<i>a</i>	508	4 014	1 764	7.90	3.47
	<i>b</i>	676	9 193	2 410	13.60	3.57
IV	<i>a</i>	227	2 275	1 180	20.00	5.30
	<i>b</i>	300	8 928	2 285	31.00	7.65
V	<i>a</i>	29.0	1 363	180	47.00	6.30
	<i>b</i>	43.0	1 870	379	43.50	9.05

to the former preparations did not influence the rate of amino acids activation nor that of their incorporation into microsomes.

It results apparently, from our experiments, that vitamin B<sub>12</sub> is not any component of the tryptophan activating enzyme. Hence Johnson's suggestion on the direct participation of the vitamin in the amino acids activation does not appear to be justified.

The authors wish to express their very thanks to Prof. dr Wł. Mozolowski for his most valuable discussion on the paper presented.

One of the authors (P. S.) wishes to thank Dr. T. S. Work for the guidance in isolation of the tryptophan activating enzyme in the National Institute for Medical Research, Mill Hill, London.

#### SUMMARY

The tryptophan activating enzyme was isolated from the ox pancreas acetone powder. The amount of vitamin B<sub>12</sub> as calculated per 1 mg. of protein increased on purification and reached its highest value in crystalline enzyme. However, when molecular weight of vitamin B<sub>12</sub> was considered, as well as that of the enzyme, it resulted from the calculations that one molecule of the vitamin corresponded to 4000-6000 molecules of the enzyme. Thus, it became apparent that vitamin B<sub>12</sub> did not take any direct part in the tryptophan activation.

#### REFERENCES

- [1] Arnstein H. R. V., Simkin J. L. *Nature* **183**, 523, 1959.
- [2] Davie E. W., Koningsberger V. V., Lipmann F. *Arch. Biochem. Biophys.* **65**, 21, 1956.
- [3] Ford J. E. *Brit. J. Nutr.* **7**, 299, 1953.
- [4] Fraser M. J., Holdsworth E. S. *Nature* **183**, 519, 1959.
- [5] Kingsley G. R. *J. Lab. Clin. Med.* **27**, 840, 1942.
- [6] Safir S. R., Williams J. H., *Org. Chem.* **17**, 1292, 1952.
- [7] Wagle S. R., Mehta R., Johnson B. C. *J. Biol. Chem.* **230**, 137, 1958.
- [8] Wagle S. R., Mehta R., Johnson B. C. *J. Biol. Chem.* **233**, 619, 1958.

#### WITAMIN B<sub>12</sub> I AKTYWACJA AMINOKWASÓW

#### Streszczenie

Z proszku acetonowego otrzymanego z trzustki wołowej wyizolowano enzym aktywujący tryptofan. Ilość witaminu B<sub>12</sub> w przeliczeniu na mg białka wzrasta podczas oczyszczania enzymu aż do stadium krystalicz-

nego. Z przeliczeń jednak uwzględniających ciężar cząsteczkowy witaminu B<sub>12</sub> i ciężar cząsteczkowy enzymu wynika, że na jedną cząsteczkę witaminu B<sub>12</sub> przypada 4000 do 6000 cząsteczek enzymu. Widać stąd, że witamin B<sub>12</sub> nie bierze bezpośredniego udziału w aktywacji tryptofanu.

Otrzymano 6.7.1959 r.

*Addendum.* Johnson has recently revised his opinions concerning the eventual role of vitamin B<sub>12</sub> in the amino acids activation at the session of the 3-rd International Symposium on Vitamins which took place on the 21 to 24 September, 1959 at Poznań. He suggests now that vitamin B<sub>12</sub> plays some role in the next step of the protein biosynthesis, i.e. in the transfer of the activated amino acids to the soluble ribonucleic acid.

It seems, however, that it is very difficult to interpret his results, since under conditions of the experiments the activated amino acids do acylate proteins non-enzymatically what falsifies to some extent the values found for the enzymatic incorporation of amino acids into protein (Moldave K., Castelfranco P., Meister A., *J. Biol. Chem.* **841**, 234, 1959).



P. SZAFRAŃSKI, HANNA WEHR and E. SUŁKOWSKI

## COMPARATIVE STUDIES ON PROTEINS OF MICROSOMES AND CYTOPLASMIC SOLUBLE PROTEINS DERIVING FROM GUINEA PIG LIVER

*Instytut Biochemii i Biofizyki PAN,  
Zakład Chemii Fizjologicznej AM, Warszawa  
Kierownik: prof. dr J. Heller*

It is admitted, that the protein biosynthesis does occur in microsomes. This opinion is based upon the observation, that when  $^{14}\text{C}$ -labelled amino acids are administered to animals the greatest part of the radioactivity is recovered in microsomes of liver, which is known to be an organ of high protein biosynthesis. Yet a part of  $^{14}\text{C}$ -labelled amino acids appears in soluble cytoplasmic proteins, too. The question arises, whether there is any relationship between proteins of microsomes, and perhaps of other subcellular structures, on the one hand, and those of the soluble cytoplasm, on the other. Some data indicate that there exists such a relationship, indeed. Simkin [8] has incubated labelled microsomes within the system applied usually to follow the protein biosynthesis *in vitro*, and has stated that radioactive proteins have appeared in the soluble fraction. Peters [6] has shown that the extraction of microsomes, as well as of mitochondria, with deoxycholate has liberated a protein which was immunologically and electrophoretically similar to the serum albumin. Campbell *et al.* has obtained similar results [2].

The present experiments are related with our previous work [7], in which we have fractionated soluble cytoplasmic proteins, which have shown a high rate of incorporation of radioactive amino acids. In this paper we present the results obtained on fractionation of the radioactive microsomal proteins, using the methods applied previously to soluble proteins. Thus, we are able to compare microsomal proteins with the soluble cytoplasmic ones. The comparative electrophoretic studies have also been done on these two groups of proteins.

## EXPERIMENTAL

*Methods.*  $^{14}\text{C}$ -labelled amino acids were prepared by hydrolysis of the *Chlorella* radioactive protein [7].

The isolation of ribonucleic acid (RNA) and protein were carried out as described in the previous report [7], as well as the measurement of the radioactivity of protein.

Nitrogen was estimated by the Kjeldahl method [1].

Protein was determined at 290 m $\mu$  in Unicam SP 500 spectrophotometer [10].

RNA was determined at 260 m $\mu$ , the yeast RNA being used as standard [5].

Paper electrophoresis was performed according to Kohn [4].

### *Preparation of microsomes*

Guinea pigs, 6—8 months old, were used for experiments. They were starved for 24 hours, then injected with the mixture of radioactive amino acids into jugular vein, the administered dose being 36  $\mu\text{c}/\text{kg}$  of body weight. Animals were killed by decapitation 30 minutes after the injection, and livers were removed. Further procedure aiming to get microsomes was identical to those described earlier for the supernatant [7]. The microsomal material obtained after centrifugation at 42 000  $g$  was suspended in 38% (v/v) glycerol. The volume of glycerol was twice that of fresh liver tissue. The suspension was centrifuged at 42 000  $g$  for 45 min., then the speed was reduced for about 10 min. Microsomes were washed once more with glycerol in the same manner. 24 grams of liver yielded usually 38 mg. of total microsomal nitrogen.

### *Fractionation of microsomes*

Microsomes washed with glycerol were divided into two parts and extracted after a procedure based on the method of Simkin and Work [9]. One part was treated with 0.5 ml. of 1 M-NaCl solution per 1 mg. of microsomal nitrogen, while the same amount of 0.1 M-NaHCO<sub>3</sub>/Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> buffer, pH 9, was added to the other. The two suspensions were homogenized in homogenizer with polyacrylic piston for 45 sec. at 1500 r/min., and allowed to stand for 20 min. in ice. Then, they were centrifuged at 42 000  $g$  for 15 min. The sediments were treated once more with 1 M-sodium chloride solution or 0.1 M-carbonate buffer, pH 9, respectively, in amounts of 0.25 ml. per 1 mg. of microsomal nitrogen,



homogenized as previously, and the insoluble residue removed by centrifugation, while the supernatants obtained on both extractions were combined.

Thus, two extracts of microsomes were obtained: one of them contained proteins dissolving in 1M-sodium chloride, while the other, those soluble in 0.1M-carbonate buffer, pH 9. The both extracts were subfractionated subsequently by means of calcium chloride and ammonium sulphate at their various concentrations [7].

*The contents of RNA and protein, and the radioactivity of protein*

Table 1 shows the contents of microsomal RNA and proteins, soluble in 1M-sodium chloride, as well as the RNA/protein ratios found in each fraction. It can be seen that over 73% of RNA and 57% of proteins were found in fractions precipitated at ammonium sulphate saturations of 0.3 to 0.5. The other fractions were less abundant in these compounds.

Table 1

*The protein and RNA contents in the individual fractions of the Guinea pig liver microsomal nucleoproteins soluble in 1M-sodium chloride*

The extracted suspension of microsomes contained 18 mg. of total nitrogen. Protein was estimated at 290 m $\mu$ , RNA at 260 m $\mu$ .

Final concentration of salt	Protein (mg.)	% of total protein	RNA (mg.)	% of total RNA	RNA/protein ratio
0.004 M-CaCl <sub>2</sub>	3.54	5.3	0.09	0.9	0.03
0.012 " "	3.74	5.7	0.06	0.6	0.02
0.025 " "	3.96	6.0	0.04	0.3	0.01
0.2 saturation of (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	3.12	4.7	0.14	1.3	0.04
0.3 " "	8.48	12.8	0.27	2.7	0.03
0.4 " "	24.32	36.8	3.90	38.7	0.16
0.5 " "	5.12	7.8	3.20	31.7	0.63
0.6 " "	2.61	3.7	0.20	1.9	0.08
0.8 " "	4.24	6.4	0.25	2.5	0.06
1.0 " "	2.88	4.2	0.02	0.2	0.01
Nucleoproteins before fractionation	65.54	100.0	10.09	100.0	0.15

The distribution of proteins among the fractions obtained from the carbonate extract of microsomes, presented in Table 2, differed from this described above. Nearly the half of proteins was precipitated within three

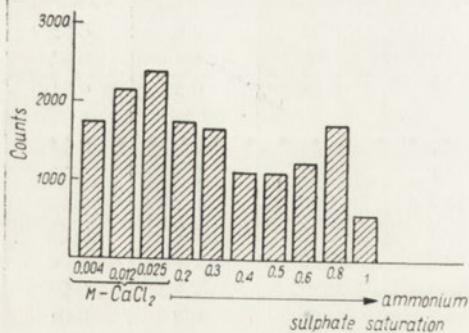
Table 2

The protein and RNA contents in the individual fractions of the Guinea pig liver microsomal nucleoproteins soluble in 0.1 M-carbonate buffer, pH 9

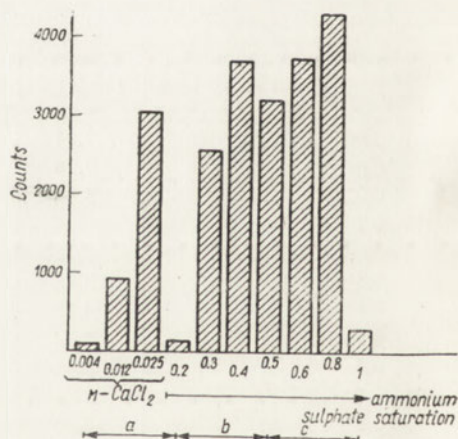
The extracted suspension of microsomes contained 16 mg. of total nitrogen. Protein was estimated at 290 m $\mu$ , RNA at 260 m $\mu$

Final concentration of salt	Protein (mg.)	% of total protein	RNA (mg.)	% of total RNA	RNA/protein ratio
0.004 M-CaCl <sub>2</sub>	4.10	5.2	0.08	1.1	0.02
0.012 " "	8.64	11.0	0.71	10.0	0.08
0.025 " "	22.80	29.0	1.01	14.2	0.04
0.2 saturation of (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	0.99	1.3	0.04	0.6	0.04
0.3 " "	2.52	3.2	0.05	0.7	0.02
0.4 " "	14.72	18.7	0.23	3.2	0.02
0.5 " "	5.34	6.8	0.39	5.5	0.07
0.6 " "	4.88	6.2	0.39	5.5	0.08
0.8 " "	4.60	5.9	0.53	7.4	0.12
1.0 " "	0.60	0.8	0.08	1.1	0.13
Nucleoproteins before fractionation	78.30	100.0	7.13	100.0	0.09

calcium chloride fractions and only one of the remaining fractions, namely this precipitated at ammonium sulphate saturation of 0.4, contained over 18% of proteins soluble in the carbonate buffer.



Diagr. I. The radioactivity of the liver microsomal proteins, soluble in 1 M-sodium chloride. Radioactivity is expressed as counts/hour/mg. of protein. Animals were killed 30 min. after the administration of <sup>14</sup>C-amino acids



Diagr. II. The radioactivity of the liver microsomal proteins soluble in 0.1 M-carbonate buffer, pH 9. Radioactivity is expressed as counts/hour/mg. of protein. Animals were killed 30 min. after the administration of <sup>14</sup>C-amino acids

Diagrams I and II show the radioactivity found in various protein fractions extracted either with sodium chloride or with carbonate buffer, respectively. Proteins soluble in sodium chloride, precipitated at the ammonium sulphate saturations of 0.3 to 0.5 containing the greatest part of RNA present in the extract (Table 1), did not exhibit any particularly high radioactivity (Diagram I).

There were three groups of radioactive proteins in the carbonate extract, designated *a*, *b*, and *c*. The group *a* consisted of fractions precipitated with calcium chloride, the group *b* was thus obtained at ammonium sulphate saturation of 0.2 to 0.5 and the *c* was that precipitated between 0.5 and 1.0 of ammonium sulphate saturation. The last group contained fractions of the highest specific radioactivity.

These results were analogous to those found when the supernatant proteins had been fractionated in the same way [7]. In both cases three groups of radioactive proteins had been found. One of them had been precipitated at low concentrations of calcium chloride, the other at the ammonium sulphate saturations of 0.15 to 0.45, and the third one at those between 0.45 and 1.0.

We proposed to examine further this analogy between the microsomal proteins and those of the supernatant by means of paper electrophoresis.

#### *Paper electrophoresis*

Livers previously perfused with 0.25 M-sucrose solution were used in these experiments. Microsomes and supernatant were prepared from this liver. The carbonate extract of microsomes, as well as the supernatant, were both subfractionated into three fractions with calcium chloride and ammonium sulphate. The first fraction contained proteins precipitated at the calcium chloride concentration of 0.025M, the second those precipitated at the ammonium sulphate saturation of 0.5, and the third one was that obtained at the total saturation. The fractions obtained from microsomes were designated *a*, *b*, and *c*, respectively (Diagram II), while those deriving from the supernatant were called I, II, and III, likewise as previously reported [7].

Each of the nucleoprotein fractions was digested with RNA-ase (Light) in 0.02 M-carbonate buffer, pH 9, one part of the enzyme being added for 100 parts of RNA (w/w). Digestion was carried out in a dialysis bag against 10 l. of 0.02 M-carbonate buffer, pH 9, for 15 hours at 37°. The digested RNA was thus removed by dialysis, and the protein remaining inside the bag was then concentrated by lyophilization and subjected to paper electrophoresis. The electrophoresis of protein yielded

satisfactory results only in the case of the ammonium sulphate fractions: c of microsomes and III of the supernatant [7]. The other fractions were either insoluble (even after the addition of ethylenediaminetetraacetate) or they did not give any good separation on electrophoresis. The electrophorograms of the microsomal c fraction, as well as of the III fraction of supernatant are given in the Fig. 1. It can be seen from it that

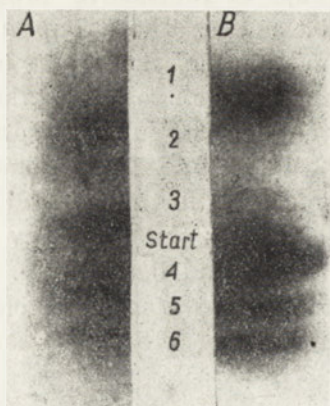


Fig. 1. Electrophorogram of (A) microsomal proteins, fraction c, and (B) that of the supernatant proteins, fraction III. Details in the text

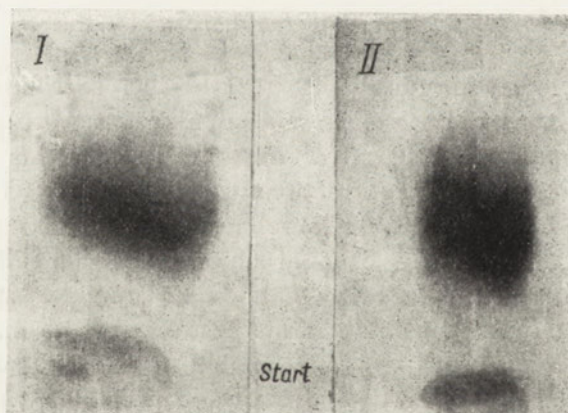


Fig. 2. Electrophorogram of the proteins isolated from (I) microsomes and of proteins isolated in the same way from (II) supernatant, microsomes being removed

the proteins present in these fractions both of microsomes and of the supernatant behave during electrophoresis in the very similar way. Although there exist some differences in the quantities of protein contained in individual electrophoretical fractions, yet their qualitative resemblance is apparent.

To substantiate this resemblance we isolated from microsomes one electrophoretically individual protein and a corresponding one from the supernatant. We have discarded the calcium chloride fraction of the supernatant (the final concentration of calcium chloride being 0.025 M), since this fraction was contaminated with small amounts of microsomes that were not entirely removed on centrifugation under given conditions. We have done the same with the carbonate extract of microsomes to keep the identical procedures in both cases. Protein was precipitated in supernatant, as well as in the carbonate extract at the total saturation of ammonium sulphate, then centrifuged and dissolved in some few millilitres of the 0.02 M-carbonate buffer, pH 9, and dialysed with RNA-ase, as described above. Proteins were isolated from these solutions, according to the procedure given by Kekwick for preparation of  $\gamma$ -globulins [3]. The proteins thus obtained were subjected to paper electrophoresis.

The electrophoretic mobilities of the two proteins (Fig. 2) are very similar. The isolation of the electrophoretically homogeneous protein from microsomes, as well as from the supernatant, altogether with the former results points out the resemblance of protein patterns in the two studied materials.

#### DISCUSSION

The demonstrated resemblance, between the microsomal proteins and those of the supernatant from the guinea pig liver indicates that some relationship exists between the proteins of these two cell components. Three groups of radioactive,  $^{14}\text{C}$ -labelled proteins were found in microsomes, as well as in the supernatant precipitating in both materials under similar conditions. This resemblance has been substantiated electrophoretically, too. There are some fractions in proteins of microsomes and in those of the supernatant which show the similar electrophoretical properties, but albeit with different quantities. These resemblances have been observed not only in one but in several fractions, what pleads for the similar nature of the studied proteins. This has been substantiated, too, by the isolation of two individual proteins from microsomes and from the supernatant which behave in the same manner on electrophoresis.

However, the resemblance of microsomal proteins to those of the supernatant is not a sufficient evidence for the hypothesis that the biosynthesis of all these proteins does occur in microsomes. Although many authors have stated that the microsomes-free supernatant incorporates  $^{14}\text{C}$ -amino acids to a slight extent only, and that the addition of microsomes results in the appearance of radioactivity mainly in microsomes, yet these data do not exclude any possibility of the protein

biosynthesis in the soluble fraction of cytoplasm. Our earlier experiments have suggested it to be so, indeed [7]. These suggestions are strongly supported by the isolation of nucleopeptides from the guinea pig liver supernatant, which may be some intermediates in protein synthesis (in press). Thus, polypeptides might be formed in the soluble fraction of cytoplasm and then be bound to microsomes to get their secondary structure. Then the protein molecule might be detached from microsome and pass into the soluble cell fraction. The process of liberation of microsomal proteins has been already stated. Simkin [8] has incubated  $^{14}\text{C}$ -labelled microsomes within unlabelled supernatant in the presence of ATP and  $\text{Mg}^{++}$ , and he has found labelled proteins in the microsomes surrounding solution. This fact would be able to explain the resemblance we have found between the microsomal proteins and those of the supernatant.

Basing on these results it seems to be possible to admit as working hypothesis that polypeptides might be synthesised in the soluble fraction of cytoplasm, then transferred to microsomes, where they would get their secondary structure and would be likely to return into environment as the soluble proteins of cytoplasm.

---

The very capable assistance of Miss K. Derkus is gratefully acknowledged.

#### SUMMARY

The guinea pig were killed 30 min. after injection of radioactive amino acids, livers were removed, microsomes were prepared and extracted with 1 M-sodium chloride solution or with 0.1 M-carbonate buffer, pH 9. The extracts were subfractionated with calcium chloride and ammonium sulphate. In the carbonate extract three groups of proteins, which incorporated  $^{14}\text{C}$ -amino acids, were found. These proteins behaved on fractionation likewise as soluble proteins of cytoplasm. The resemblance between some microsomal proteins, and those of the supernatant was substantiated electrophoretically, too. Two corresponding individual proteins were isolated one from microsomes and the other from the supernatant, which showed both the same electrophoretical mobilities. The possibility of some steps of protein synthesis in the soluble fraction of cytoplasm was discussed.

## REFERENCES

- [1] Beleher R., Godbert A. L. *Semi-Micro Quantitative Organic Analysis*, Longmans, Green and Co. London-New York-Toronto, p. 87, 1945.
- [2] Campbell P. N. Greengard O., Kernot B. A. *Biochem. J.* **68**, 18P, 1958.
- [2] Kekwick R. A. *Biochem. J.* **34**, 1248, 1940.
- [4] Kohn J. *Clin. Chim. Acta* **3**, 450, 1958.
- [5] Ogur M., Rosen G. *Arch. Biochem.* **25**, 262, 1950.
- [6] Peters T. J. *Biol. Chem.* **229**, 659, 1957.
- [7] Szafrński P., Sułkowski E. *Acta Biochim. Polon.* **6**, 185, 1959.
- [8] Simkin J. L., *Biochem. J.* **70**, 305, 1958.
- [9] Simkin J. L., Work T. S. *Biochem. J.* **65**, 307, 1957.
- [10] Warburg O., Christian W. *Biochem. Z.* **310**, 384, 1941.

PORÓWNAWCZE BADANIA NAD BIAŁKAMI MIKROSOMÓW  
I ROZPUSZCZALNYMI BIAŁKAMI CYTOPLAZMY WĄTROBY  
ŚWINKI MORSKIEJ

Streszczenie

Świnki morskie zabijano w 30 min. po dożylnym podaniu  $^{14}\text{C}$ -aminokwasów, wypreparowywano wątrobę, izolowano mikrosomy i ekstrahowano je za pomocą 1 M-chlorku sodu, względnie 0,1 M-buforu węglanowego, pH 9. Następnie oba wyciągi rozfrakcjonowano za pomocą chlorku wapnia i siarczanu amonu. W wyciągu węglanowym mikrosomów wykazano obecność trzech grup radioaktywnych frakcji białkowych, wysalających się podobnie jak rozpuszczalne białka cytoplazmy. Podobieństwo między kilkoma białkami mikrosomów i supernatantu potwierdzono również za pomocą elektroforezy. Z mikrosomów, oraz z supernatantu wyizolowano także indywidualne białko o tej samej ruchliwości elektroforetycznej. Dyskutowana jest możliwość syntezy białka w rozpuszczalnej części cytoplazmy.

Otrzymano 3.8.1959 r.





T. KŁOPOTOWSKI i ZOFIA SMIETAŃSKA

**ZWIĘKSZENIE SYNTEZY LIPIDÓW W WĄTROBIE SZCZURA  
PRZEZ DIETĘ ZAWIERAJĄCĄ OLEJ SOJOWY\***

II. *Klinika Chorób Wewnętrznych Akademii Medycznej, Warszawa*  
*Kierownik: prof. dr med. D. Aleksandrow,*  
*Pracownia Izotopowa Instytutu Gruzlicy,*  
*Kierownik: doc. dr med. W. Tysarowski*

W ostatnich latach wielokrotnie stwierdzano, że oleje roślinne obniżają u ludzi poziom cholesterolu surowicy, co może mieć korzystny wpływ na kliniczny przebieg miażdżycy naczyń [1, 4, 9] i rodzinnej hypercholesterolemii [9]. W poszukiwaniu przyczyn tych zjawisk badano między innymi wpływ diet olejowych na intensywność procesów syntezy cholesterolu. Zagadnieniem tym zajęliśmy się w naszej pracy, lecz w odróżnieniu od większości autorów badaliśmy intensywność procesów syntezy zarówno cholesterolu, jak i kwasów tłuszczowych u dojrzałych szczurów pod wpływem długotrwałego stosowania diety z olejem sojowym.

## METODY

Do doświadczeń używano samców szczurzych, wagi 290 do 430 g. Pierwszą grupę zwierząt karmiono dietą beztłuszczową, drugą — margarynową, trzecią — olejową po beztłuszczowej, czwartą — olejową po margarynowej. Szczegółowy skład diet podaje tablica 1. Czas karmienia każdą dietą wynosił 4 tygodnie.

Po okresie diety szczurom wstrzykiwano dootrzewnowo po 100  $\mu$ c roztworu octanu sodu, znakowanego węglem  $^{14}\text{C}$  w grupie karboksylowej. Po czterech godzinach szczury ogłuszano i dekapitowano, pobierając przy tym krew z otwartych naczyń szyjnych. Następnie wyjmowano wątroby i z każdej odważano trzy próbki po 1,0 g. Próbki homogenizowano w szklanym homogenizatorze Pottera i Elvehjema z 5 ml wody i 10 ml

\* Praca wykonana dzięki subwencji Komitetu Miażdżycowego Polskiej Akademii Nauk.

18<sup>0</sup>/<sub>0</sub> KOH w 95<sup>0</sup>/<sub>0</sub> etanolu. Estry hydrolizowano przez ogrzewanie w temperaturze ok. 80° przez 4 godziny. Po oziębieniu hydrolizatu ekstrahowano z niego cholesterol eterem naftowym (p. w. 35-60°) czterokrotnie. Ekstrakty odparowywano a osad rozpuszczano w mieszaninie acetonu i 95<sup>0</sup>/<sub>0</sub>

Tablica 1

## Skład diet

Wartości podano w <sup>0</sup>/<sub>0</sub> suchej wagi paszy

	Bez- tłuszczowa	Margary- nowa	Olejowa
Mąka pszenna	50	35	35
Sacharoza	25	25	25
Kazeina	20	20	20
Margaryna	—	15	—
Olej sojowy	—	—	15
Mieszanina witaminów*	0,5	0,5	0,5
Mieszanina soli			
Osborne'a i Mendia	4,5	4,5	4,5

\* Mieszanina witaminów wg [10] zawierała kalciferol, biotynę, kwas foliowy,  $\beta$ -karoten, menadion, amid kwasu nikotynowego, ryboflawinę, tiaminę, witamin B<sub>12</sub>, pantotenian wapnia,  $\alpha$ -tokoferol, cholinę i inozytol.

etanolu 1:1 (obj./obj.), po czym wytrącano digitonid cholesterolu. Po przemyciu rozpuszczano go gorącym metanolem i po ostudzeniu dopełniano do określonej objętości. Z tego roztworu pobierano próbki do pomiaru radioaktywności oraz do oznaczania chemicznego metodą Sperry i Webb [17].

Hydrolizat pozbawiony cholesterolu zakwaszano 6 N-kwasem solnym i ponownie czterokrotnie ekstrahowano eterem naftowym. Eter odparowywano, a osad rozpuszczano w 10 ml 0,2 N-KOH w 50<sup>0</sup>/<sub>0</sub> (obj./obj.) etanolu. Po ponownym, ostrożnym zakwaszeniu, powtarzano ekstrakcję. Ekstrakty odparowywano i osady rozpuszczano w 5,0 ml 95<sup>0</sup>/<sub>0</sub> etanolu, zobojętnionego wobec fenoloftaleiny. Po pobraniu próbek do oznaczeń radioaktywności, w resztach roztworów oznaczano kwasy tłuszczowe przez miareczkowanie 0,04 N-NaOH, wobec fenoloftaleiny jako indykatora [12].

Dla pomiaru radioaktywności badane próbki nakraplano na miseczki cynowe. Po wyschnięciu mierzono ich aktywność licznikiem Geigera-Muellera z okienkiem mikowym grubości 1,2 mg/cm<sup>2</sup>. Wyniki uzyskiwano odejmując aktywność tła i po korekcji do warstwy nieskończenie cienkiej, przeliczano na 1,0 g wątroby.

## WYNIKI I OMÓWIENIE

*Poziom cholesterolu w surowicy*

W naszych doświadczeniach (Tabl. 2) obserwowaliśmy statystycznie znamienne wzrost poziomu cholesterolu w surowicy pod wpływem diety olejowej. Jest to zgodne z wynikami prac tych autorów, którzy, podobnie jak my, stosowali diety bezcholesterolowe [2, 10, 16]. Natomiast w doświadczeniach, gdzie dieta zawierała cholesterol stwierdzano spadek jego poziomu w surowicy [7, 11, 16]. Wydaje się więc możliwe, że diety olejowe obniżają poziom cholesterolu w surowicy, w porównaniu z odpowiednią kontrolą, wtedy, gdy zawierają one cholesterol lub następują po diecie cholesterolowej.

Tablica 2

*Wpływ diety na poziom cholesterolu w surowicy szczurów*

Obok wartości średnich podano wartości średniego błędu średniej arytmetycznej. W nawiasach podano ilości niezależnych oznaczeń.

Dieta	Cholesterol (mg ‰)
Beztłuszczowa	79,4 ± 4,6 (9)
Margarynowa	76,5 ± 4,5 (6)
Olejowa, po beztłuszczowej	82,3 ± 3,9 (8)
Olejowa, po margarynowej	96,4 ± 4,4 (7)

*Stężenia cholesterolu i kwasów tłuszczowych w wątrobie*

Jak to przedstawia tablica 3, diety olejowe powodują w wątrobie, podobnie jak w surowicy, znaczny, statystycznie znamienne wzrost stężeń zarówno cholesterolu, jak i kwasów tłuszczowych. Wyniki te są zgodne z wynikami tych prac, gdzie używano do doświadczeń szczurów dojrzałych, u których poziom kontrolny cholesterolu w wątrobie wynosił około 2,5 mg/g wątroby [2, 18]. Natomiast autorzy, którzy badali wpływ oleju, bądź kwasu linolowego na poziom cholesterolu wątroby u osesków szczurzych, podają zgodnie prawie dwukrotnie wyższy poziom kontrolny i jego obniżanie pod wpływem diet z nienasyconymi kwasami tłuszczowymi [10, 15]. Nie wiadomo jednak, czy zależność zmian stężeń cholesterolu od

Tablica 3

*Wpływ diet na zawartość lipidów w wątrobie szczura*

Obok wartości średnich podano wartości średnich błędów średniej arytmetycznej. W nawiasach podano ilość badanych szczurów

Dieta	Cholesterol (mg/g)	Kwasy tłuszczowe (mg/g)
Beztłuszczowa	2,66 ± 0,20 (10)	0,093 ± 0,004 (11)
Margarynowa	3,01 ± 0,18 (9)	0,129 ± 0,017 (8)
Olejowa, po beztłuszczowej	4,09 ± 0,48 (6)	0,202 ± 0,011 (9)
Olejowa, po margarynowej	4,31 ± 0,68 (5)	0,205 ± 0,016 (8)

poziomu wyjściowego lub wieku szczurów dotyczy również kwasów tłuszczowych, nie znaleźliśmy w piśmiennictwie żadnych danych na ten temat.

*Intensywność procesów syntezy cholesterolu i kwasów tłuszczowych*

Średnie wartości radioaktywności włączonej w cholesterol i kwasy tłuszczowe (Tabl. 4) wykazują równoległość w poszczególnych grupach. Wewnątrz grup obserwowano jednak znaczny rozrzut wyników, mimo zgodności próbek dla pojedynczych szczurów. W decydującej mierze było to wynikiem indywidualnej zmienności, czego wyrazem jest niska zmienność statystyczna różnic. Zjawisko to występowało również u innych

Tablica 4

*Wpływ diety na włączanie radioaktywności octanu-1-<sup>14</sup>C w lipidy wątroby szczura*

Wyniki podano w impulsach na minutę na 1 g wątroby, ± średni błąd średniej arytmetycznej. W nawiasach podano ilość niezależnych pomiarów

Seria dośw.	Dieta	Cholesterol	Kwasy tłuszczowe
1	Beztłuszczowa	307 ± 118 (4)	1967 ± 834 (4)
	Margarynowa	223 ± 46 (6)	1222 ± 383 (6)
	Olejowa, po beztłuszczowej	435 ± 115 (6)	2804 ± 730 (6)
	Olejowa, po margarynowej	347 ± 135 (5)	2057 ± 492 (5)
2	Beztłuszczowa	564 ± 95 (5)	6858 ± 1705 (5)
	Margarynowa	368 ± 60 (3)	3569 ± 329 (3)

autorów prac nad syntezą lipidów *in vivo*, np. z trzech doświadczeń Avigana i Steinberga [2] tylko w jednym obliczona przez nas wartość P była niższa od 0,05. W związku z koniecznością zmiany licznika Geigera-Muellera w czasie pracy, w tablicy 4 ujęto jako osobne doświadczenie 2 grupy zwierząt, gdzie radioaktywność mierzona była innym licznikiem. Niewyjaśniona pozostaje dla nas wysoka synteza kwasów tłuszczowych w tym drugim doświadczeniu. Być może, że miała tu wpływ na wyniki, poza zmianą licznika, również inna pora roku (lato) niż w doświadczeniu pierwszym.

Obydwa nasze doświadczenia wykazują niższą syntezę zarówno cholesterolu, jak i kwasów tłuszczowych po diecie margarynowej, w porównaniu z beztłuszczową. To samo odnośnie cholesterolu stwierdzili Mukherjee i Alfin-Slater, którzy wykazali ponadto, że pod wpływem diety z uwodorowanym olejem kokosowym wytwarza się w wątrobie inhibitor syntezy cholesterolu, zlokalizowany przez nich we frakcji o określonej sedymentacji, prawdopodobnie we frakcji mitochondrialnej [15].

Natomiast dieta olejowa wywarła odwrotny wpływ na intensywność procesu syntezy cholesterolu. Synteza była tu o 40 do 50% wyższa niż w odpowiednich grupach wyjściowych. To samo stwierdzili liczni autorzy w innych niż nasze warunkach doświadczalnych: zarówno *in vivo* [2, 13, 18], jak i *in vitro* na skrawkach wątrób szczurów karmionych różnymi olejami [13, 15, 18], u szczurów dojrzałych [2, 13] i u osesków [15], po dietach z olejem kukurydzy [2, 13], rzepakowym [18], bawełnianym [15] oraz z estrem metylowym kwasu linolowego [15], po diecie wielotygodniowej [2, 15], jak i po trzydniowej [13]. Ta zgodność licznych i różnych prac pozwala na wyciągnięcie wniosku, że nienasycone kwasy tłuszczowe zwiększają syntezę cholesterolu u szczurów.

Porównując stężenie cholesterolu w wątrobie z intensywnością procesów jego syntezy, wnioskujemy, że nie zawsze zachodzi homeostaticzne obniżanie jej przez akumulujący się cholesterol, tak jak to opisali Frantz i współ. [5] u szczurów karmionych cholesterolem. O homeostaticznym działaniu cholesterolu wątroby musi więc decydować nie tylko stężenie, ale również jego postać lub pochodzenie.

Jak to przedstawia tablica 4 stwierdzono zmniejszenie syntezy kwasów tłuszczowych pod wpływem diety margarynowej. Natomiast dieta olejowa nie miała takiego wpływu, a nawet średnie włączonej radioaktywności w gram wątroby były wyższe w porównaniu z dietą beztłuszczową. Wyniki te są sprzeczne z wynikami Hilla i współ. [8], którzy stwierdzili znaczny spadek inkorporacji octanu-1-<sup>14</sup>C w kwasy tłuszczowe pod wpływem wszystkich badanych diet tłuszczowych, w tym diety z olejem kukurydzy. Praca nasza różni się od pracy Hilla głównie tym, że stosowa-

waliśmy dietę olejową przez cztery tygodnie, oni zaś tylko przez trzy dni. Nie można jednak rozstrzygnąć, czy może to tłumaczyć rozbieżność wyników.

Resumując, w naszych warunkach doświadczalnych olej sojowy podwyższał poziom cholesterolu osocza, co może być skutkiem stwierdzanego jednocześnie wzmożenia jego syntezy. Natomiast liczni autorzy stwierdzali obniżanie się cholesterolu osocza pod wpływem diet zawierających oleje roślinne [1, 4, 7, 9, 11, 16]. Z analizy warunków doświadczalnych prac nad wpływem oleju na poziom cholesterolu osocza wnioskujemy, że obniżenie to zachodziło pod wpływem olejów stosowanych po dietach naturalnych (a więc zawierających cholesterol) u ludzi [1, 4, 9], lub też stosowanych łącznie z cholesterolem u zwierząt, w stosunku do diety bez oleju [7, 11, 16]. Jak wynika z doświadczeń Gordona i współ. [6] oraz Byersa i Friedmana [3], nienasycone kwasy tłuszczowe zwiększają katabolizm cholesterolu. Możliwe jest więc, że na diecie bezcholesterolowej olej zwiększa procesy zarówno syntezy jak i katabolizmu cholesterolu, z przewagą tego pierwszego, co daje w efekcie wzrost poziomu cholesterolu osocza. Natomiast na diecie zawierającej cholesterol procesy jego syntezy są zahamowane [14] przez akumulację egzogenego cholesterolu w wątrobie [5]. Być może, że w tych warunkach podawany olej nie wywiera pobudzającego działania na syntezę cholesterolu, zachowuje zaś swe działanie wzmagające jego katabolizm, co daje w efekcie obniżenie poziomu cholesterolu w osoczu. Sprawdzenie czy efekt działania oleju na poziom cholesterolu w surowicy zależy od jego obecności w diecie, oraz czy w tych warunkach rzeczywiście dochodzi do przewagi procesów katabolizmu nad procesami syntezy, będzie tematem następnej pracy.

---

Dziękujemy Panu Prof. D. Aleksandrowowi za cenne wskazówki dotyczące badanego przez nas zagadnienia oraz Panu Doc. K. Ostrowskiemu za udostępnienie aparatury do pomiaru radioaktywności.

#### STRESZCZENIE

Oznaczano zawartość lipidów surowicy i wątroby oraz włączanie octanu-1-<sup>14</sup>C w cholesterol i kwasy tłuszczowe wątroby u szczurów karmionych dietami beztłuszczową, margarynową oraz dietą zawierającą olej sojowy. Stwierdzono, że dieta olejowa (bez cholesterolu) podnosi poziom cholesterolu surowicy oraz zwiększa zawartość cholesterolu i kwasów tłuszczowych w wątrobach dojrzałych szczurów.

Pomimo wyższych stężeń badanych lipidów w wątrobach szczurów, karmionych dietą zawierającą olej sojowy, ich synteza, mierzona przez włączanie octanu-1-<sup>14</sup>C, była wyższa w porównaniu ze szczurami, utrzymywanymi na dietach beztłuszczowej i margarynowej. Oznacza to, że wzrost zawartości cholesterolu i kwasów tłuszczowych w wątrobie nie zawsze wywiera homeostatyczny wpływ na szybkość ich syntezy.

Zaobserwowano, że dieta margarynowa nieznacznie podnosi zawartość lipidów wątroby, pomimo że powoduje zmniejszenie syntezy zarówno cholesterolu, jak i kwasów tłuszczowych.

#### LITERATURA

- [1] Ahrens E. H., Insull W., Blomstrand R., Hirsch J., Tsaltas T. T. & Peterson M. J. *Lancet* **1**, 943, 1957.
- [2] Avigan J. & Steinberg D. *Proc. Soc. Exper. Biol. Med.* **97**, 814, 1958.
- [3] Byers S. O. & Friedman M. *Proc. Soc. Exper. Biol. Med.* **98**, 523, 1958.
- [4] Ciświcka-Sznajderman M. *Kardiologia Polska* **2**, 123, 1959.
- [5] Frantz I. D., Schneider H. S. & Hinkelman B. T. *J. Biol. Chem.* **206**, 465, 1954.
- [6] Gordon H., Lewis B., Eales L. & Brock I. J. *Nature* **180**, 923, 1957.
- [7] Hegsted D. M., Gotsis A. & Stare F. J. *J. Nutrition* **63**, 377, 1957.
- [8] Hill R., Linazasoro J. M., Chevalier F. & Chaikoff I. L. *J. Biol. Chem.* **233**, 305, 1958.
- [9] Kinsell L. W., Frishey R. W., Michaels G. D. & Splitter S., *Lancet* **1**, 334, 1958.
- [10] Klein P. D. *Arch. Biochem. Biophys.* **76**, 56, 1958.
- [11] Klein P. D. *Arch. Biochem. Biophys.* **81**, 382, 1959.
- [12] Kolthoff I. M. & Stenger V. A., *Volumetric Analysis*, Interscience, New York & London **2**, 124, 1947.
- [13] Linazasoro J. M., Hill R., Chevalier F. & Chaikoff I. L. *J. Exper. Med.* **107**, 613, 1958.
- [14] Morris M. D., Chaikoff I. L., Felts J. M., Abraham S. & Fansah N. O. *J. Biol. Chem.* **224**, 1039, 1957.
- [15] Mukherjee S. & Alfin-Slater R. B. *Arch. Biochem. Biophys.* **73**, 359, 1958.
- [16] Nath N., Wiener R., Harper A. E. & Elvehjem C. A. *J. Nutrition* **67**, 289, 1959.
- [17] Sperry W. M. & Webb M. *J. Biol. Chem.* **187**, 97, 1950.
- [18] Wood J. D. & Migicovsky B. B. *Canad. J. Biochem. Physiol.* **36**, 433, 1958.

#### THE INCREASED LIPIDS SYNTHESIS IN THE LIVERS OF RATS FED A DIET CONTAINING SOYA BEAN OIL

#### Summary

The serum and liver lipid content and the incorporation of injected acetate-1-<sup>14</sup>C in liver cholesterol and fatty acids were determined in rats maintained on fat-free, margarine and soya bean oil diets.

It was found that soya bean oil diet (without cholesterol) rises the serum cholesterol and fatty acids content in livers of adult rats.

In spite of higher concentrations of investigated lipids in livers of oil-fed rats their synthesis as measured by the acetate- $^{14}\text{C}$  incorporation was greater as compared with rats maintained on fat-free and margarine diets. It means that the increase of cholesterol and fatty acids liver content does not exert in each case an homeostatic influence on their synthesis.

It was observed that margarine diet slightly increases the lipids content in liver, notwithstanding causes a depression of synthesis both of cholesterol and fatty acids.

Otrzymano 23.10.1959 r.



I. REIFER, J. BUCHOWICZ and K. TOCZKO

## THE SYNTHESIS OF THE PYRIMIDINE RING FROM L-CARBAMYLASPARTIC ACID IN EXISED BLADES OF WHEAT SEEDLINGS

*Zakład Biochemii Roślin, Instytut Biochemii i Biofizyki PAN, Warszawa*

Various workers [11] have shown in recent times that in animal organs as well as in microorganisms pyrimidine nucleotides may be synthesised from L-aspartic acid and carbamyl phosphate. L-carbamylaspartic acid (L-CA), dihydroorotic acid, and orotic acid are the intermediate products of this reaction.

In this paper the interesting question has been investigated, whether one of the known precursors of the biosynthesis of pyrimidine nucleotides in microorganisms [5, 8, 14, 16] and animal organs [7, 12, 14], namely L-CA may also be utilized for the same purpose by the higher plants.

### MATERIAL AND METHODS

D-CA was prepared from D, L-aspartic acid and KCNO, according to the Nyc and Mitchell method [9].

L-CA was synthesised in the same manner, except that L-aspartic acid was used. As free L-CA has not as yet been obtained in crystalline form, therefore the barium salt was prepared in the following manner. The reaction mixture was treated with 5 volumes of ethyl alcohol and the resulting precipitate discarded. The supernatant was then concentrated on the water bath to a thick syrup, treated with alcohol as above and the precipitate again discarded. This was repeated 4 more times and the barium salt was prepared from the last supernatant. It contained neither aspartic acid, nor KCNO and the estimation of the ureido group proved that the product was nearly 100% pure.

CA was determined by the method of Reifer and Toczko [13], bound pentoses by the method of Paegge and Schlenk [10] and phosphate

determinations were made by the method of Fiske and SubbaRow [2]. Absorption spectra were measured with the Jobin-Yvon spectrophotometer, type "Algerie".

## EXPERIMENTAL

### 1. INGESTION AND METABOLISM OF L-CA BY THE PLANT

Wheat seeds, variety "Ostka chlopicka" were sown in large Petri dishes on moist filter paper and germinated for 5—6 days at a temperature of 25°. Roots were separated from the young shoots and 3 g. of blades were quickly weighed and immediately introduced into previously prepared solutions of distilled water, D-CA and L-CA, respectively, and exposed to direct sunlight. The solutions fed contained in 2 ml. about 100  $\mu\text{M}$  of substrate neutralized to pH of about 6.0 (The barium salt of L-CA was previously converted to the K-salt). After 6 hours of ingestion the blades were exhaustively washed with water to remove all traces of the externally adhering substrates, crushed in a glass mortar placed in an ice bath and extracted 3 times with about 8 ml. of 0.6 N-HClO<sub>4</sub>. The undissolved residue was centrifuged off and the supernatant collected in a 25 ml. volumetric flask and brought to volume with 0.6 N-HClO<sub>4</sub>. This solution will henceforth be referred to as "raw extract".

Table 1

*Ingestion and metabolism of carbamylaspartic acid by blades of wheat seedlings*

No.	Ingested substance	Uptake $\mu\text{M}$	Found $\mu\text{M}$	Metabolized* $\mu\text{M}$	E <sub>270</sub> m $\mu$ .
1	D-CA	52.0	56.2	0.0	0.630
	L-CA	54.5	42.5	14.4	0.710
	H <sub>2</sub> O	0.0	2.4	0.0	0.600
2	L-CA	16.0	9.5	9.5	0.700
	H <sub>2</sub> O	0.0	3.0	0.0	0.585
3	L-CA	50.6	34.4	19.2	0.820
	H <sub>2</sub> O	0.0	3.0	0.0	0.660
4	L-CA	62.0	53.0	13.0	0.910
	H <sub>2</sub> O	0.0	4.0	0.0	0.770

\* The figures in this column are composed of the metabolized added L-CA + the amount of L-CA found in the control.

Already in the first experiments it was shown that the plant can metabolize L-CA, but cannot metabolize D-CA. This was proved by the determinations of the quantity of ingested L-CA, and the amount of the non-metabolised L-CA left unchanged in the tissue after 6 hours of incubation. The total uptake of L-CA was determined from the difference between the known amount of L-CA supplied to the medium, and the quantity left in the solution after incubation.

The estimation of L-CA in the tissue was carried out in the following manner: aliquots of the raw extracts were neutralized with 2 N-KOH in an ice bath to pH of about 7.0, potassium perchlorate was removed by centrifugation, and the supernatants were put through a Dowex-1-chloride column ( $1 \times 10$  cm., 50—100 mesh). The columns were exhaustively washed with distilled water, and then eluted with dilute HCl. As was shown in trial runs with pure solutions, L-CA was removed quantitatively with the first 25 ml. of 0.1 N-HCl, and therefore the elution of extracts from plant material was carried out under these conditions. In this way the eluate was made free of urea and citrulline, which were removed with the water washings. However, it is possible that the eluate may still have been contaminated with traces of other ureido compounds. Results are shown in table 1.

As can be seen from table 1 the total ingested amount of D-CA was recovered in the plant tissue, whereas L-CA was recovered only in about 40—80%. This suggested that 20—60% of L-CA was metabolized within 6 hours of ingestion.

## 2. ISOLATION AND IDENTIFICATION OF PRODUCTS OF L-CA METABOLISM

In accordance with the scheme of biosynthesis of pyrimidine nucleotides it was decided to search among the products of metabolism for any possible compounds containing the pyrimidine ring. The extracts were diluted with 0.6 N-HClO<sub>4</sub> in proportion 1:25 and optical densities were measured spectrophotometrically. Maximum differences in absorption were observed at 270 m $\mu$ . As can be seen from table 1, column 6, extracts from plants fed with L-CA have shown distinctly stronger absorption in UV, than extracts from plants fed with D-CA or the controls. It was therefore deduced that L-CA is a precursor of biosynthesis of substances absorbing strongly in UV.

### *Orotic acid*

The products of L-CA metabolism were isolated and identified in the following manner: 10 ml. of the raw extracts (sample No. 4 from table 1) from the control plants and the plants fed with L-CA were neutralized

and the  $\text{KClO}_4$  removed as above. The supernatants were then treated with 10 ml. of about a 10% solution of neutral lead acetate  $\text{Pb}(\text{C}_2\text{H}_3\text{O}_2)_2 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ , made alkaline with 2 ml. of 2 N-KOH and the precipitate centrifuged off. The supernatants were discarded, the precipitate washed once with 5 ml. of a 1% solution of neutral lead acetate and extracted twice with 5 ml. and 2 ml. of 1 N- $\text{H}_2\text{SO}_4$ . The combined extracts were brought to pH of about 3.0 with a saturated

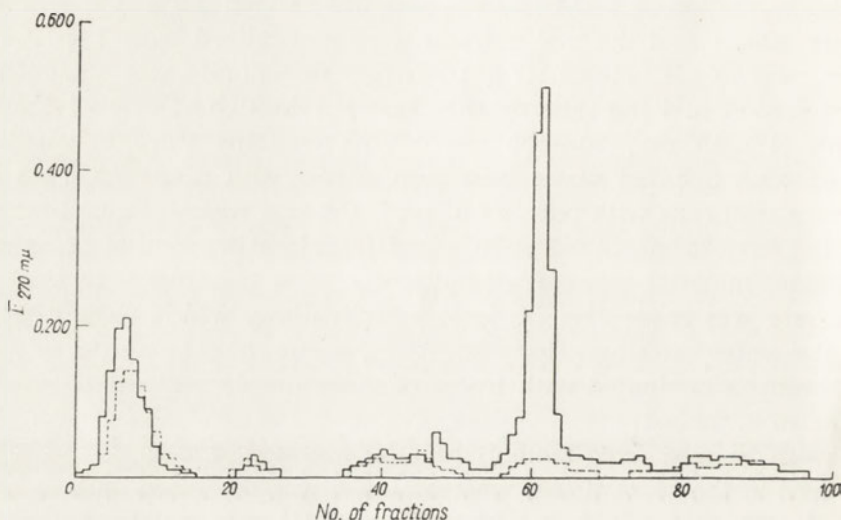


Fig. 1. Graph of gradient elutions of the extracts from plants fed with L-carbamylaspartic acid (—) and control (----)

solution of  $\text{Ba}(\text{OH})_2$  and the barium sulphate removed by centrifugation. The supernatants were made up with distilled water to 25 ml. in a volumetric flask and 1 ml. being used for the determination of optical density and 10 ml. for partition paper chromatography. UV absorption was measured on further dilution of the extract with 0.6 N- $\text{HClO}_4$  in proportion of 1 : 10, corresponding to the quantities cited in table 1. The observed galvanometer readings at 270 mμ were 0.580 for the control and 0.730 for the sample fed with L-CA.

The extracts to be chromatographed were first put through Dowex-1-chloride columns ( $1 \times 25$  ml., 50-100 mesh), washed exhaustively with distilled water, and then eluted with dilute hydrochloric acid using gradient elution technique and collecting separately 5 ml. fractions. The concentration of the eluent was gradually increased, starting from 0.001 N and ending with 1 N-HCl, collecting 100 fractions. The bulk of metabolites resulting from feeding the plant with L-CA was eluted in fractions 57-64 with a concentration of HCl above 0.02 N as

shown by the determinations of optical densities at 270  $m\mu$ . The graphically assembled results are shown in Fig. 1.

The combined fractions 57-64 have shown maximum absorption at 280  $m\mu$  suggesting that the product of biosynthesis from L-CA may be orotic acid. However, the product obtained in these fractions was spectrophotometrically not entirely identical with the curve of pure orotic acid. Therefore the fractions 57-64 were further purified and isolated by means of partition paper chromatography. They were concentrated under reduced pressure in a vacuum dessicator over NaOH to a volume not exceeding 0.3 ml. (The concentration was carried out in the refrigerator at a temperature of 4° for a period of several days). The solutions were then applied in a narrow band of about 1 cm. in length on a sheet of Whatman No. 1 filter paper against a solution of pure orotic acid. (Nutritional Biochemical Corp.). The chromatograms were run at room temperature for 26 hours, using a mixture of propanol-water (60 : 40 v/v) as the liquid phase [4].

Although the chromatogram of the unknown substance has shown only one spot corresponding to the spot of pure orotic acid, yet the whole

Table 2

*Optical densities at 280  $m\mu$  from eluates of 12 strips from the orotic acid chromatogram*

Eluate from strip No.	Orotic acid standard	L-CA fed plant	Control plant
1	0.005	0.005	0.005
2	0.000	0.000	0.000
3	0.000	0.000	0.000
4	0.000	0.005	0.015
5	0.000	0.000	0.020
6	0.010	0.035	0.035
7	0.440	0.875	0.022
8	0.000	0.020	0.010
9	0.015	0.015	0.020
10	0.000	0.000	0.000
11	0.005	0.000	0.005
12	0.000	0.005	0.015

chromatogram was cut into 12 horizontal strips of 3 cm., each of them was then eluted with 5 ml. of 1.0 N-HCl and optical densities measured at 280  $m\mu$  (Table 2). It was shown that almost all of the applied material

was recovered from the strip eluate No. 7 corresponding to an  $R_F = 0.57$ , exactly at the level at which the sample of pure orotic acid has been recovered. This eluate has been used for the purpose of further identification of the unknown substance.

First of all absorption spectra were determined at pH 1.0, 7.0 and 13.0. At the same time the spectra of a solution of pure orotic acid (0.14  $\mu\text{M}$  per 1 ml.) were measured under the same conditions. The concentration of orotic acid was so chosen as to obtain optical density corresponding as

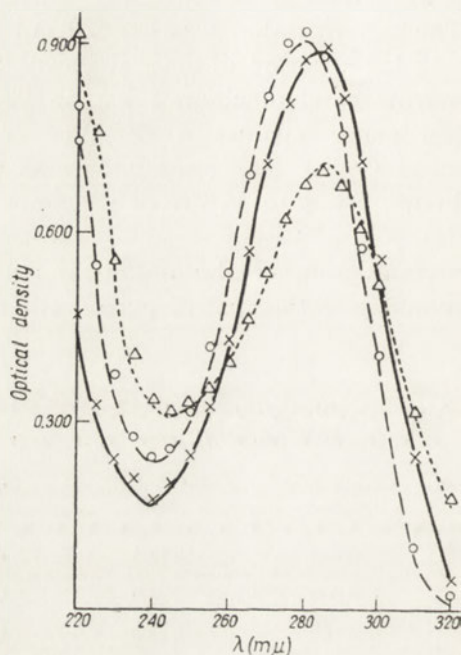


Fig. 2. Absorption spectra of orotic acid and the first product isolated from L-carbamylaspartic acid fed plants: —, — — —, — · — · —, orotic acid in pH 1.0, 7.0 and 13.0, respectively. ×, o, Δ, first product in pH 1.0, 7.0 and 13.0, respectively

nearly as possible to the optical density of the unknown sample. As can be seen from Fig. 2 the UV absorption curves of the unknown substance are identical with the spectrum of pure orotic acid. Determination of pentoses, phosphate and ureido compounds were then carried out. Only insignificant traces of pentoses were detected, tests for phosphate and ureido groups were entirely negative. Finally, the strip eluate No. 7 was put through a Dowex-1-chloride column as above, washed with little water and then with 50 ml. of 0.01 N-HCl collecting 10 fractions of 5 ml. each. Next 40 more 5 ml. fractions were collected

applying the gradient elution technique, starting with 0.01 N-HCl and increasing the concentration of the acid systematically to 0.05 N. The final elution was carried out with 50 ml. of 1 N-HCl collecting 10 fractions of 5 ml. each. Optical density at 280 m $\mu$  was then determined in each fraction and the graph is shown in Fig. 3. The unknown substance behaved exactly in the same way during the process of

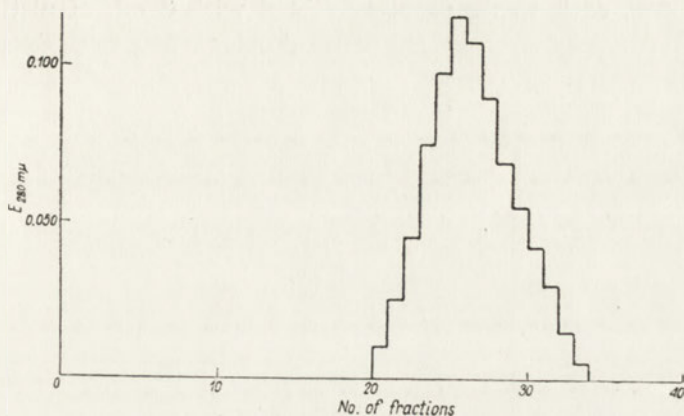


Fig. 3. Graph of gradient elutions of orotic acid and the product from L-carbamylaspartic acid fed plants (The elutions for orotic acid and the unknown substance were overlapping all the time, therefore, no differences can be seen in the graph)

gradient elution as the solution of pure orotic acid, and therefore the results obtained prove that the isolated compound was pure and identical with orotic acid.

The total amount of orotic acid in the 3 g. of blades fed with L-CA was equal to 4.4  $\mu\text{M}$ . (Of the 25 ml. of raw extract, 10 ml. were precipitated with lead acetate, which was then dissolved in dilute sulphuric acid and made up to 25 ml. Again a 10 ml. aliquot was put through the column and chromatographed. The strips of the chromatogram were eluted to 5 ml. of dilute HCl and 1 ml. was used for the spectrophotometric analysis. Thus:  $0.14 \mu\text{M} \times 2.5 \times 2.5 \times 5 = 4.4 \mu\text{M}$ ). In the control plants immersed in water no measurable amounts of orotic acid could be detected.

#### Uridine

10 ml. of raw extracts from the control and the L-CA fed plants (exp. No. 3, Table 1) were freed of  $\text{KClO}_4$  and treated on a Dowex-1-chloride column (10 cm.) as before. The columns were washed 3 times with 5 ml. portions of distilled water and the combined effluents and washings were

again put through a Dowex-50- $H^+$  column ( $1 \times 10$  cm.) to remove all cations. After washing the columns 3 times as above, the combined liquids were concentrated at  $4^\circ$  to about 0.2 ml. under reduced pressure in a vacuum desiccator over NaOH. The concentrate was then applied to Whatman No. 1 paper and the spot developed in Wyatt's solvent [15] as the liquid phase. The dried chromatogram was cut into 20 horizontal strips of 2 cm., each was separately eluted with 3 ml. of distilled water and optical densities were then determined at 260  $m\mu$ . Except in the

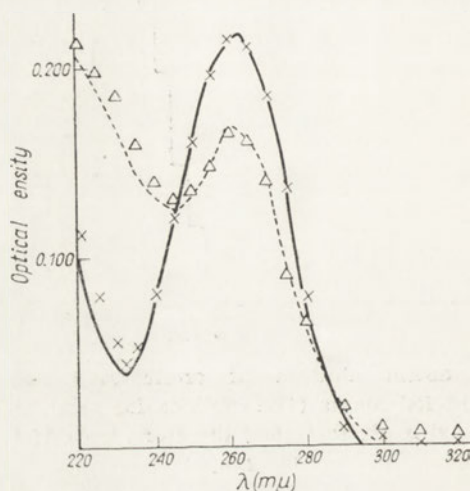


Fig. 4. Absorption spectra of uridine and the second product isolated from L-carbamylaspartic acid fed plants: — uridine in pH 1.0 and 7.0, - - - uridine in pH 13.0, ···, second product in pH 1.0 and 7.0, △, second product in pH 13.0

one strip corresponding to  $R_F = 0.64$ , no differences between the control and the L-CA fed plant were observed in the various eluates. Optical density for the L-CA fed plant was equal to 0.215, whereas the reading for the control plant amounted to 0.105.

Among the known nucleosides only uridine shows with this solvent an  $R_F = 0.64$  and the spectrophotometric analysis of the unknown substance was proved to be identical with the uridine curve as shown in Fig. 4. The unknown compound contained 27.0  $\mu g$  of pentoses and only 14.25  $\mu g$  of pentoses were recovered from the strip of the control plant. The total amount of uridine recovered from the 3 g. samples of blades amounted to 0.17  $\mu M$  in the L-CA fed plant and 0.08  $\mu M$  in the control. According to theory, 24.75  $\mu g$ . and 12.75  $\mu g$ . of pentoses should be recovered, respectively. The eluates contained no phosphate and no ureido compounds.



## DISCUSSION

The data presented here show that the blades of wheat can utilize L-CA, and therefore it was reasonable to assume that this substance is an intermediate product of metabolic processes not only in the animal and in microorganisms but in the higher plants as well. We were able to prove that L-CA is metabolized in the higher plant to compounds containing the pyrimidine ring. Plants fed with L-CA have shown to contain orotic acid which was identified and isolated by means of spectrophotometry, ion exchange and partition paper chromatography. The large quantities of orotic acid found in the plant fed with L-CA prove that this carbamyl amino acid is easily metabolized, and the mechanism of transformation is similar to the one discovered for animal organs and microorganisms. As shown in the text the D-form of carbamylaspartic acid cannot be at all utilized by the plant.

Apart from orotic acid the L-CA fed plants have shown a considerable increase in the content of uridine. This is in agreement with the findings of Cannellakis [1] who proved that uridine may be an intermediary product in the biosynthesis of uridine monophosphates in rats. Uridine may play a similar part in the synthesis of pyrimidine nucleotides in the plant, but this requires further confirmation.

Next to orotic acid and uridine we have found in the L-CA fed plants some other products that show absorption of UV light at 270 m $\mu$  and are eluted from Dowex-1-chloride columns with 0.003 N-HCl (Fig. 1, fractions 5-10). This concentration of HCl is optimal for the elution of mononucleotides, and the identification of these compounds is now under way in our laboratory.

The unexpected presence of so much orotic acid in L-CA fed plants may be due to the fact that the exised blades do not metabolize normally to the end owing to lack of ribose-5-phosphate and ATP, both essential for the further metabolism of orotic acid to mononucleotides [3, 6]. However, it cannot be entirely excluded that under certain conditions orotic acid may act as a store of the pyrimidine ring structure, utilized for the formation of compounds containing this ring, and not necessarily for the exclusive synthesis of pyrimidine mononucleotides.

## SUMMARY

It was proved that L-carbamylaspartic acid is easily metabolized in the exised blades of wheat. Orotic acid and uridine were identified and isolated among the products of L-CA metabolism. It is therefore concluded that the transformation of L-CA in the higher plants follows the same path as in animal organs and microorganisms.

## REFERENCES

- [1] Canellakis E. S. *J. Biol. Chem.* **227**, 329, 1957.
- [2] Fiske C. H. and SubbaRow Y. *J. Biol. Chem.* **66**, 375, 1925.
- [3] Kornberg A., Lieberman I., Simms E. S. *J. Biol. Chem.* **215**, 389, 1955.
- [4] Leone E. and Scale E. *Boll. soc. ital. biol. sper.* **26**, 1223, 1950.
- [5] Lieberman I. and Kornberg A. *J. Biol. Chem.* **207**, 911, 1954.
- [6] Lieberman I., Kornberg A., Simms E. S. *J. Biol. Chem.* **215**, 403, 1955.
- [7] Mokrasch L. C. and Grisiolia S. *Biochim. Biophys. Acta* **33**, 444, 1959.
- [8] Nelson E. V. and Shapiro S. K. *J. Bact.* **67**, 692, 1954.
- [9] Nyc J. F. and Mitchell H. K. *J. Am. Chem. Soc.* **69**, 1382, 1947.
- [10] Paegle L. M. and Schlenk F. *Arch. Biochem.* **28**, 348, 1950.
- [11] Reichard P. *Adv. Enzym.* **21**, 263, 1959.
- [12] Reichard P. and Lagerkvist U. *Acta Chem. Scand.* **7**, 1207, 1953.
- [13] Reifer I. and Toczko K. *Bull. Acad. Polon. Sci. (Sér. Biol.)* **7**, 131, 1959.
- [14] Weed L. L. and Wilson D. W. *J. Biol. Chem.* **207**, 439, 1954.
- [15] Wyatt R. G. from Chargaff E. and Davidson J. N. "The Nucleic Acids" V. 1. p. 243, 1955, New York, Acad. Press Inc.
- [16] Yates R. A. and Pardee A. B. *J. Biol. Chem.* **221**, 743, 1956.

SYNTEZA PIERŚCIENIA PIRYMIDYNOWEGO Z KWASU L-KARBAMYLOAS-  
PARAGINOWEGO W ODCIĘTYCH ŻDŹBLACH KIELKÓW PSZENICY

## Streszczenie

Wykazano, że kwas L-karbamyloasparaginowy ulega szybkiej przemianie w źdźbłach młodych kielków pszenicy. Z produktów przemiany zidentyfikowano i wyizolowano kwas orotowy i urydynę. Na podstawie otrzymanych wyników wnioskuje się, że przemiana kwasu L-karbamyloasparaginowego w roślinach wyższych przebiega w podobny sposób jak w organizmach zwierzęcych i drobnoustrojowych.

Otrzymano 28.10.1959 r.

L. WOJTCZAK and WANDA CHMURZYŃSKA

## INHIBITION STUDIES ON INSECT POLYPHENOL OXIDASE

*Zakład Biochemii Instytutu Biologii Doświadczalnej im. Nenckiego, Warszawa*  
*Kierownik Zakładu: prof. dr W. Niemierko*

Polyphenol oxidase (tyrosinase, phenoloxidase) has long been recognized to participate in sclerotization and melanization of insect cuticle (for references see [13]). Other functions of this enzyme in insects are, however, obscure although numerous investigations have been done to elucidate this problem. In some investigations on the role of polyphenol oxidase in insects [7, 14, 15, 16] substances have been used which are known to inhibit this enzyme. No precise information is, however, available concerning their effect on insect polyphenol oxidase since most of the inhibition studies concerning this enzyme have been carried out on polyphenol oxidase from plant material or from the mammalian malignant tissue, melanoma. It seemed therefore desirable to examine the action of inhibitors on polyphenol oxidase from insect material.

The present paper deals with the effect of resorcinol, cysteine, thiourea and diethyldithiocarbamate on polyphenol oxidase from the wax-moth. A preliminary report on a part of this investigation has been published [2].

### METHODS

Fully grown larvae of the wax-moth, *Galleria mellonella* L. (*Lepidoptera*) were homogenized in a glass homogenizer with 9 volumes of ice-cold 0.25 M-sucrose<sup>1</sup>.

<sup>1</sup> Separate experiments proved that the activity of polyphenol oxidase was independent of whether the homogenate was prepared in distilled water, in phosphate buffer, pH 6.4, or in 0.25 M-sucrose. Sucrose solution was applied in this investigation because portions of the same homogenate were used for isolation of mitochondria in another study.

The activity of polyphenol oxidase was measured with catechol as substrate in conventional vessels of a Warburg apparatus at 30°. Incubation medium contained in a total volume of 2.0 ml.: 1.0 ml. of the homogenate; 20  $\mu$ moles phosphate buffer, pH 6.4; 30  $\mu$ moles catechol, added from the side arm; inhibitors and other additions as indicated in the text. The experiments were always carried out in duplicate parallel runs.

Synthesis of  $^{35}\text{S}$  labelled thiourea: One to two mg. elementary sulphur containing 1 mc  $^{35}\text{S}$  was heated during 30 min. at 200° with a few mg. KCN. Potassium thiocyanate which was thus formed was extracted with ethanol and, after evaporation of ethanol, dissolved in a small volume of water. Potassium thiocyanate was then converted into the ammonium salt by means of  $\text{NH}_4$ -form of Amberlite resin IR-120 and heated dry at 160°-170° during 30 min. Thiourea  $^{35}\text{S}$  which was formed by thermal isomerization of  $\text{NH}_4\text{SCN}$  was separated from the remaining ammonium thiocyanate on a small Dowex 2 column (chloride form). Thiourea was washed out from the column with water, whereas thiocyanate was eluted with 2 N-HCl and discarded.

Chromatography of thiourea was carried out on Whatman No. 1 filter paper in the mixture: butanol-acetic acid-water according to Horák [6]. Spots of thiourea were detected by spraying with diluted ammonia-silver nitrate solution.

Radioactivity was measured with a thin-window Geiger-Müller counter. Results were corrected, if necessary, for self-absorption of the material counted.

## RESULTS

Figures 1, 3, 5 and 7 show the total  $\text{O}_2$  uptake by the system: homogenate-catechol in the presence of various inhibitors, and figures 2, 4, 6 and 8 illustrate the variations in the rate of the  $\text{O}_2$  uptake which is the measure of the activity of polyphenol oxidase.

In the absence of inhibitors (curves marked as "control" in Fig. 1 to 8) the course of oxygen uptake is not linear and the rate of  $\text{O}_2$  uptake decreases steadily during the incubation. This is the effect of a well known [3] inactivation of polyphenol oxidase which accompanies the oxidation of substrates (the so called "reaction inactivation").

It was found that the various inhibitors used in this investigation differed in their effect on the initial activity of the enzyme as well as on the course of oxygen uptake during the incubation. This is considered in details below.

*Resorcinol.* Resorcinol appeared to be a rather weak inhibitor of wax-moth polyphenol oxidase. As can be seen from Fig. 9, a concentration

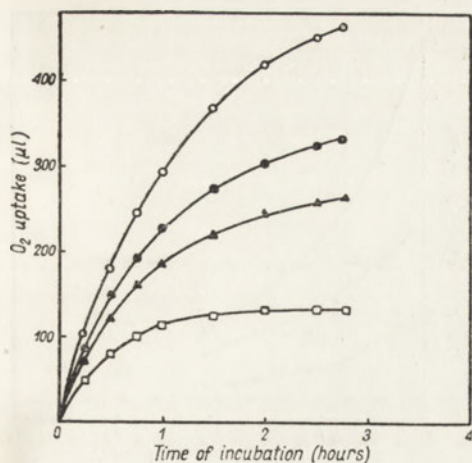


Fig. 1. The effect of resorcinol on the total oxygen uptake

○, control; ●,  $5 \times 10^{-4}$  M-resorcinol; ▲,  $10^{-3}$  M-resorcinol; □,  $2 \times 10^{-2}$  M-resorcinol

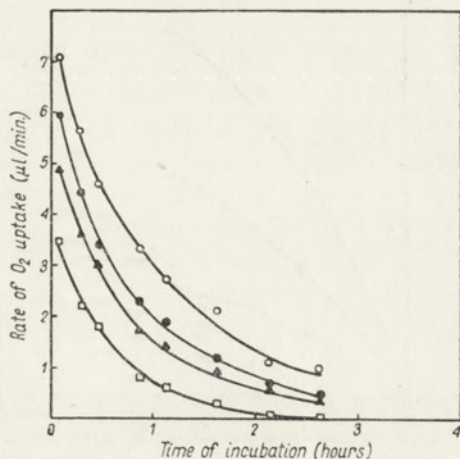


Fig. 2. The effect of resorcinol on the rate of oxygen uptake

of  $3 \times 10^{-3}$  M is necessary to diminish the activity to 50 per cent. The inhibition is approximately constant with time (Table I), and the curves of  $O_2$  uptake in the presence of various concentrations of resorcinol as well as in its absence are similar in their shape and character (Fig. 1). The same concerns the activity curves (Fig. 2).

Table 1

*Inhibition of wax-moth polyphenol oxidase by various concentrations of resorcinol, cysteine, thiourea and sodium diethyldithiocarbamate*

The activity was measured at the beginning of incubation and after 45 or 55 min. of incubation

Inhibitor	Time of incubation (min.)	Concentration (mM)								
		0.1	0.2	0.5	0.8	1	2	5	10	50
		per cent activity*								
Resorcinol	0—5	102		89		79		37	23	7
	45—60	97		79		54		16	9	3
Cysteine	0—5	74	52	49	33	26	10			
	45—60	76	63	60	42	28	4			
Thiourea	0—5	83	39	20	13	12		10		
	55—60	110	131	160	121	85		0		
Na diethyldithiocarbamate	0—5	37	24	10	8	7		4		
	45—60	59	58	52	21	19		12		

\* Activity of the not inhibited control at the same time of incubation was taken as 100 per cent.

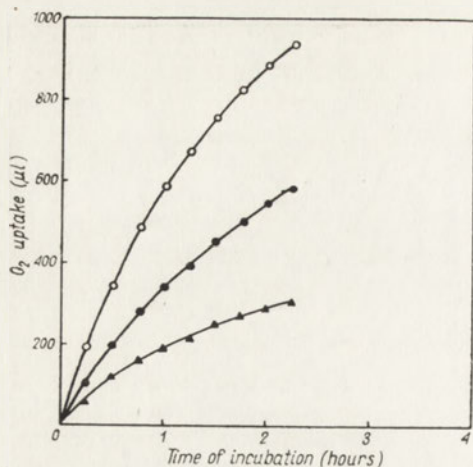


Fig. 3. The effect of cysteine on the total oxygen uptake

○, control; ●,  $5 \times 10^{-4}$  M-cysteine; ▲,  $10^{-3}$  M-cysteine

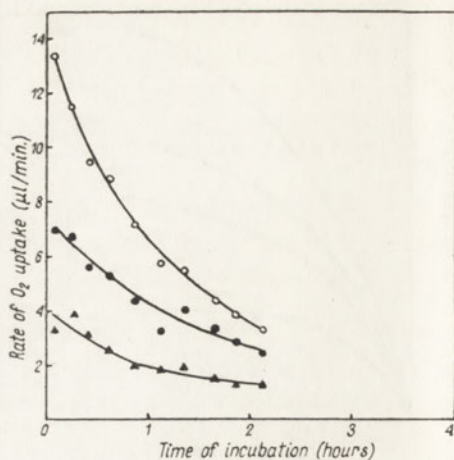


Fig. 4. The effect of cysteine on the rate of oxygen uptake

*Cysteine.* The inhibition by cysteine is similar to the inhibition by resorcinol in the sense that the degree of inhibition is approximately constant during the incubation (Fig. 3 and 4, Table I). As it is seen in Fig. 9, a 50 per cent inhibition is brought about by  $3 \times 10^{-4}$  M-cysteine.

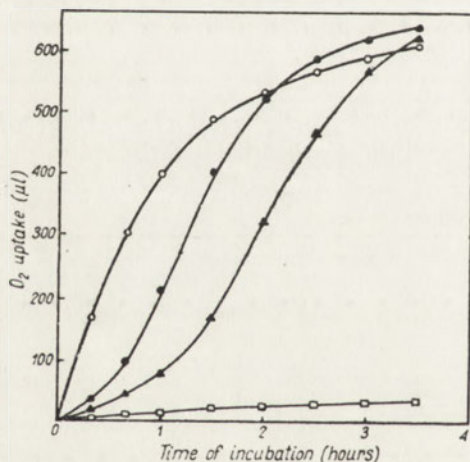


Fig. 5. The effect of thiourea on the total oxygen uptake

○, control; ●,  $5 \times 10^{-4}$  M-thiourea; ▲,  $10^{-3}$  M-thiourea; □,  $5 \times 10^{-3}$  M-thiourea

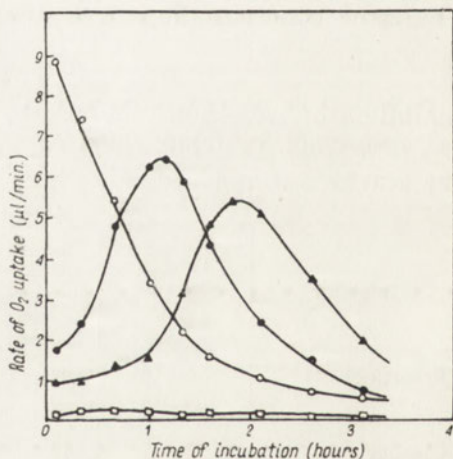


Fig. 6. The effect of thiourea on the rate of oxygen uptake

*Thiourea.* The effect of thiourea differs considerably from that of resorcinol and cysteine. With concentrations up to  $10^{-3}$  M, a strong inhibition can be observed only during a short initial period of incubation

(Fig. 6). At that time the concentration of about  $1.6 \times 10^{-4}$  M is sufficient to inhibit the enzyme activity to the half (Fig. 9). Fig. 5 shows that the  $O_2$  uptake, in the presence of  $5 \times 10^{-4}$  M and  $10^{-3}$  M-thiourea, which is low

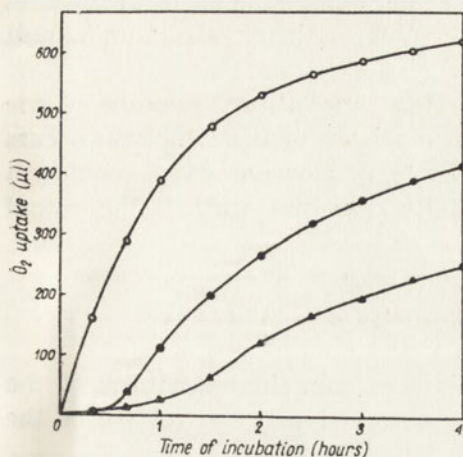


Fig. 7. The effect of sodium diethyldithiocarbamate on the total oxygen uptake

○, control; ●,  $5 \times 10^{-4}$  M-diethyldithiocarbamate; ▲,  $10^{-3}$  M-diethyldithiocarbamate. Sodium diethyldithiocarbamate was used as ethanol solution; each sample, including the control, contained 0.1 ml. ethanol

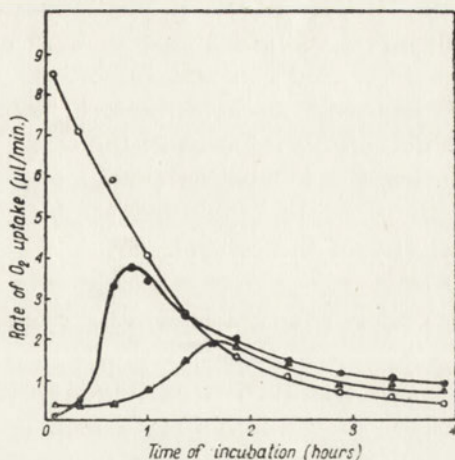


Fig. 8. The effect of sodium diethyldithiocarbamate on the rate of oxygen uptake

during the initial phase of incubation increases considerably after a certain time and, after some 2 or 3 hours, usually surpasses the total oxygen uptake by the control. It is seen (Fig. 6) that the rate of oxygen uptake by inhibited samples increases while that by the not inhibited control decreases steadily as result of "the reaction inactivation"

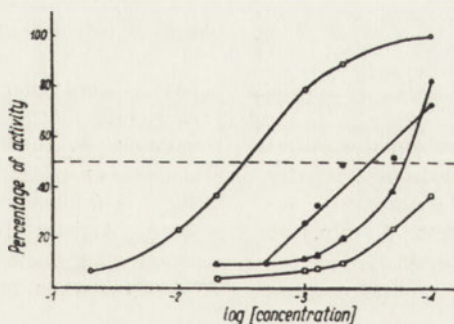


Fig. 9. The effect of various concentrations of ○, resorcinol, ●, cysteine, ▲, thiourea and □, sodium diethyldithiocarbamate on the initial activity of wax-moth polyphenol oxidase. The activity was measured during the first 5 min. of incubation

phenomenon. As consequence, the "inhibited" activity surpasses after a certain time of incubation the activity of the control (Table 1) and attains in its maximum a level which is sometimes several times higher than that of the activity of the control at the same moment of incubation. However, concentrations as high as  $5 \times 10^{-3}$  M bring about an almost complete and constant inhibition.

*Sodium diethyldithiocarbamate.* This inhibition resembles the inhibition by thiourea in the sense that a release of the inhibition occurs during the incubation (Fig. 7 and 8, Table I). However, the maximum activity of the inhibited samples usually does not surpass the actual activity of the control.

### The inhibition by thiourea

This was further examined in order to explain the mechanism of the release of the inhibitory effect. It was observed that the release of the inhibitory effect of thiourea occurred only then when the enzyme was

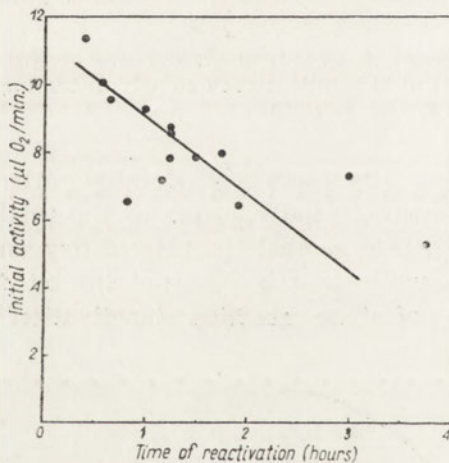


Fig. 10. Correlation between the initial activity of polyphenol oxidase partially inhibited by  $5 \times 10^{-4}$  M-thiourea (measured during the first 5 min. of incubation) and the time needed for maximum reactivation of the enzyme

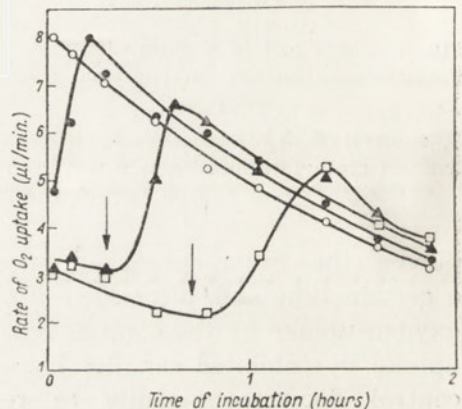


Fig. 11. The effect of ascorbate on the release of the inhibition by thiourea. ○, controls: I, no thiourea, no ascorbate; II, no thiourea, 15  $\mu$ moles sodium ascorbate (both controls give identical curves); ●,  $10^{-4}$  M-thiourea; ▲,  $10^{-4}$  M-thiourea and 5  $\mu$ moles ascorbate; □,  $10^{-4}$  M-thiourea and 10  $\mu$ moles ascorbate. Arrows indicate the moment when all the ascorbate has been oxidized, as calculated from  $O_2$  uptake

incubated together with the inhibitor and the substrate. Preincubation of the homogenate with either the inhibitor or the substrate alone was not effective in abolishing or even shortening the initial period of inhibition.



Many experiments showed (Fig. 10) that the lower the initial activity of an inhibited sample the longer was the period of inhibition. No disappearance of the inhibition was observed when the concentration of thiourea was high enough (e.g.  $5 \times 10^{-3}$  M) to stop the activity of polyphenol oxidase completely (Fig. 6).

It is known that ascorbate reduces the products of phenol oxidation and prevents the accumulation of reddish brown pigments which usually appear during the enzymic oxidation of catechol and *p*-cresol. In the present investigation it was found that the addition of ascorbate to the incubation medium prolonged the period of inhibition (Fig. 11). The

Table 2

*Binding of  $^{35}\text{S}$  from thiourea by compounds insoluble in trichloroacetic acid*

For the variations in the enzymic activity during incubation see Fig. 6, the curve corresponding to  $5 \times 10^{-4}$  M-thiourea. Details of experiment, see text

Time of incubation	Counts/min. in TCA-precipitate as per cent of total counts
0	0
60 min.	2
90 min.	15
140 min.	21
24 hours*	80

\* The incubation of this sample was continued overnight at room temperature and without shaking.

inhibition is released when all the ascorbate has been already oxidized and the reddish brown pigments begin to accumulate.

In a series of experiments the usual mixture containing the homogenate and catechol was incubated with  $5 \times 10^{-4}$  M-thiourea until the inhibition disappeared and, at this moment, a new portion of fresh homogenate was added. The total activity of the resulting mixture was then approximately equal to the sum of activities of the fresh homogenate and of the inhibited sample, thus indicating that the added portion of the fresh enzyme was not inhibited.

All these experiments indicate that the release of the inhibition by thiourea depends on a disappearance of thiourea during the incubation. It may be supposed that thiourea is oxidized or bound by some intermediate products of catechol oxidation. If these products are being reduced by ascorbate, no destruction of thiourea occurs and no release of the inhibition takes place.

Several analytical methods were used to determine whether the concentration of thiourea diminished during the incubation. All these methods appeared, however, to be either not sensitive or not specific enough. Therefore, in order to follow the fate of thiourea used as inhibitor, the  $^{35}\text{S}$  labelled thiourea was used.

Labelled thiourea (final concentration,  $5 \times 10^{-4} \text{ M}$ ; 30 000 counts per min.) was incubated with the usual medium containing homogenate and catechol. At various intervals, samples were taken from the mixture. They were deproteinized with trichloroacetic acid (TCA), centrifuged, and the radioactivity was measured in the supernatant and in the precipitate. It appeared (Table 2) that radioactive sulphur was gradually bound to some

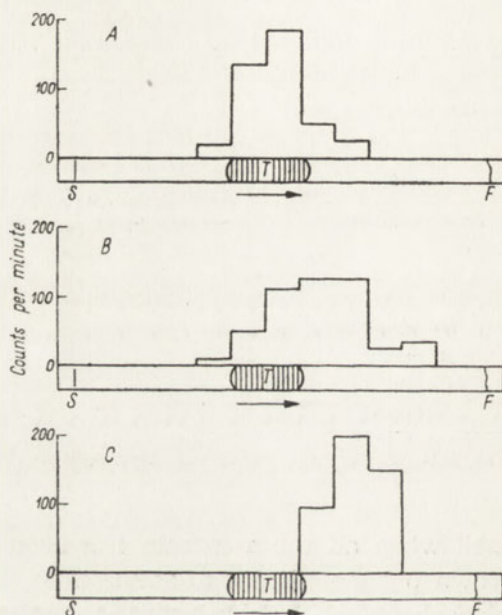


Fig. 12. Distribution of  $^{35}\text{S}$  on chromatograms of TCA-supernatants. S, starting line; T, spot of thiourea; F, solvent front. Inactivation: A, at the beginning of incubation; B, after 45 min. of incubation; C, after 90 min. of incubation

TCA-insoluble material. This process was, however, slow and could not explain a complete disappearance of the inhibition which occurred after 90 min. of incubation as only 15 per cent of total radioactivity was bound with TCA-insoluble compounds at that time.

A more precise insight in the fate of radioactive thiourea was possible by the application of paper chromatography. Samples of TCA-supernatants were chromatographed and the radioactivity was measured along the chromatogram strips. A quantity of carrier thiourea was added to each

sample in order to facilitate the localization of the spots of thiourea. It appeared that in samples taken at the beginning of the incubation practically all the radioactivity was found in the spot of thiourea (Fig. 12 A). As the incubation proceeded, more and more of  $^{35}\text{S}$  was found in some unidentified compounds whose  $R_f$  value was higher than that of thiourea (Fig 12 B), and after 90 min. of incubation no radioactivity could be detected in the spot of thiourea (Fig. 12 C).

#### DISCUSSION

The present results show that the inhibitory effect of resorcinol, cysteine, thiourea and sodium diethyldithiocarbamate on wax-moth polyphenol oxidase (Fig. 9) is of the same order of magnitude as on polyphenol oxidases from potato tuber and mushroom [4, 9, 11, 12].

In the present investigation a special attention was directed on thiourea, since its inhibitory effect showed a spontaneous release during the incubation with the homogenate and the substrate. A striking phenomenon was observed: the activity of the enzyme in the presence of thiourea attained after a certain time of incubation a level which was much higher than that of the activity of the (not inhibited) control at the same moment of incubation. This fact apparently depends on both the release of the inhibition and the delay in the reaction inactivation.

A similar release of the inhibition has been observed on plant polyphenol oxidase with glutathione [5, 8] and with phenylthiocarbamide and thiourea [1]. Bernheim and Bernheim [1] have suggested that some products of substrate oxidation may compete with the inhibitor for active centres of the enzyme, thus releasing the inhibition. Accordingly to this view, the concentration of the inhibitor does not change during the incubation but the enzyme becomes protected against its action. The present investigation shows, however, that thiourea disappears from the medium. This was suggested by experiments in which no inhibition was observed when a fresh portion of homogenate was added to the medium containing homogenate, substrate and thiourea at the time when the original inhibition disappeared. The results of the experiments with ascorbate and the observations which showed that the greater was the initial rate of substrate oxidation the shorter was the time needed for complete reversal of the inhibition allowed to suppose that thiourea was either oxidized or bound by some oxidation products.

A direct evidence in support of this view was obtained by experiments with labelled thiourea. It was shown that practically all the sulphur originally present in thiourea molecules was incorporated into some compounds other than thiourea at the moment when the inhibition was

completely released. No precise information is, however, available so far concerning the fate of thiourea during the incubation. As sulphhydryl groups are known to combine easily with quinones [10], it can be supposed that thiourea, probably as sulphhydryl tautomeric form, may be bound by quinones which are formed during the oxidation of catechol. During the incubation these compounds may gradually polymerize and/or bind with proteins, thus forming complexes insoluble in trichloroacetic acid.

The fact that the maximum activity of the "inhibited" enzyme highly surpasses the activity of the not inhibited control at the same moment of incubation indicates that in the presence of the inhibitor the enzyme is probably protected to some extent from the reaction inactivation during the initial period of low activity. This is in accordance with the assumption (cf. Dawson and Tarpley [3]) that the degree of reaction inactivation depends on the total amount of oxygen consumed by the system.

The effect of diethyldithiocarbamate on polyphenol oxidase of the wax-moth differs from the effect of thiourea. Although a gradual increase of the activity is also observed in the presence of diethyldithiocarbamate, the activity of the inhibited enzyme does not surpass in its maximum that of the control. This difference in the effect of the two inhibitors is not well understood. It can be supposed that diethyldithiocarbamate, similarly as thiourea, is decomposed during the incubation but that this decomposition is not complete.

It follows from the present investigation that a possibility of a partial or even full reactivation must be taken into account in interpreting the results of all those investigations where thiourea, diethyldithiocarbamate and possibly other related compounds are used as inhibitors of polyphenol oxidase.

---

We wish to thank Professor W. Niemierko for his advice and interest in the course of these investigations.

#### SUMMARY

The inhibition of polyphenol oxidase from wax-moth larvae by resorcinol, cysteine, thiourea and sodium diethyldithiocarbamate was investigated.

The degree of the inhibition by thiourea and diethyldithiocarbamate diminished during the aerobic incubation of the enzyme and the substrate (catechol) with the inhibitor. After a certain period of time, which was dependent on the concentration of the inhibitor, the inhibited enzyme attained (with diethyldithiocarbamate as the inhibitor) or surpassed (with thiourea) the activity of the control.

The mechanism of the release of the inhibition by thiourea was investigated with  $^{35}\text{S}$  labelled thiourea. It was found that during the incubation thiourea was gradually converted into some other compounds.

## REFERENCES

- [1] Bernheim F. and Bernheim M. L. C. *J. Biol. Chem.* **145**, 213, 1942.
- [2] Chmurzyńska W. and Wojtczak L. *Nature*, **184**, 1941, 1959.
- [3] Dawson C. R. and Tarpley W. B. in *The Enzymes*, (ed. Sumner J. B. and Myrbäck K.), 1951, vol. II, part 1, p. 454, Academic Press Inc., New York.
- [4] Dubois K. P. and Erway W. F. *J. Biol. Chem.* **165**, 711, 1946.
- [5] Figge F. H. J. and Allen E. *Endocrinology* **29**, 262, 1941.
- [6] Horák V. *Chemické Listy*, **48**, 1416, 1954.
- [7] Karlson P. and Wecker E. *Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chemie* **300**, 42, 1955.
- [8] Kohn R. R. *Enzymologia* **17**, 193, 1955.
- [9] Kuttner R. and Wagreich H. *Arch. Biochem. Biophys.* **43**, 80, 1953.
- [10] Mason H. S. *Advances in Enzymology* **16**, 105, 1955.
- [11] McCarthy J. F., Green L. F. and King C. G. *J. Biol. Chem.*, **128**, 455, 1939.
- [12] Paschkis K. E., Cantarow A., Hart W. M. and Rakoff A. E. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* **57**, 37, 1944.
- [13] Sussman A. S. *Quart. Rev. Biol.* **24**, 328, 1949.
- [14] Sussman A. S. *Biol. Bull.* **102**, 39, 1952.
- [15] Wojtczak L. *Acta Physiol. Polon.* **5**, 593, 1954.
- [16] Wojtczak L. *3rd Internat. Congress of Biochemistry*, Bruxelles, 1955, Summaries of Communications, p. 112.

## BADANIA NAD INHIBITORAMI POLIFENOLOKSYDAZY U OWADÓW

## Streszczenie

Badano hamujący wpływ rezorcyny, cysteiny, tiomocznika i dwuetylodwutiokarbaminianu sodu na aktywność polifenoloksydazy z gąsienic mola woskowego, *Galleria mellonella* L. Stwierdzono, że stopień zahamowania czynności enzymu przez tiomocznik i dwuetylodwutiokarbaminian nie jest stały, lecz maleje podczas tlenowej inkubacji enzymu z substratem (katecholem) i inhibitorem. Po pewnym czasie, który zależy od stężenia inhibitora, obserwuje się całkowite „odhamowanie” enzymu: Aktywność enzymatyczna w obecności inhibitora dorównuje (w przypadku dwuetylodwutiokarbaminianu) lub nawet znacznie przewyższa (w przypadku tiomocznika) aktywność próby kontrolnej.

Mechanizm „odhamowania” przebadano stosując tiomocznik znakowany siarką  $^{35}\text{S}$ . Stwierdzono, że odhamowanie spowodowane jest zachodzącym stopniowo w czasie inkubacji przekształcaniem się tiomocznika w inne, bliżej nie zidentyfikowane związki.

Otrzymano 29.10.1959 r.

Faint, illegible text at the top of the page, possibly a header or title.

Main body of faint, illegible text, appearing to be several lines of a document.

Continuation of faint, illegible text in the middle section of the page.

Final section of faint, illegible text near the bottom of the page.

HALINA SZAFRAN, Z. SZAFRAN i J. OLEKSY

## BADANIA NAD HYDROLAZAMI SOKÓW TRAWIENNYCH

### V.\* ENZYMY PROTEOLITYCZNE SOKU TRZUSTKOWEGO PSA\*\*

*Zakład Chemii Fizjologicznej AM w Krakowie*

*Kierownik: prof. dr B. Skarżyński*

*Zakład Fizjologii AM w Krakowie*

*Kierownik: prof. dr J. Kaulbersz*

Jak wiadomo, trzustka zwierzęca produkuje i wydziela oprócz dawno już znanych białek takich jak trypsynogen i chymotrypsynogen szereg innych enzymów proteolitycznych bądź w formie prekursorów, bądź też w postaci aktywnej. Do dokładniej poznanych należą: karboksypeptydaza A [18, 19], elastaza [3, 7, 12, 23] i protaminaza [10, 29, 30]. Materiałem wyjściowym, z którego te enzymy wyizolowano, była najczęściej trzustka wołowa i tylko w nielicznych przypadkach badano ich występowanie w soku trzustkowym. Dopiero niedawno Keller i wsp. [20] udowodnili identyczność niektórych enzymów i enzymogenów soku trzustkowego wołu z analogicznymi białkami wyizolowanymi w stanie krystalicznym z trzustki tego samego gatunku. Wniosek ten jest zapewne słuszny także w odniesieniu do innych gatunków, jednak niewątpliwie skład enzymatyczny soku trzustkowego poszczególnych gatunków ssaków różni się od siebie.

Z wyjątkiem soku trzustkowego wołu, którego skład enzymatyczny szczególnie w odniesieniu do enzymów proteolitycznych został dość szczegółowo zbadany przez wyżej cytowanych autorów [20], aktywność proteolityczna soku trzustkowego innych gatunków ssaków znana jest tylko bardzo pobieżnie. Większość prac dotyczących tego zagadnienia przeprowadzonych na soku trzustkowym szczura [26] i psa [4, 5, 13, 15, 28] traktuje aktywność proteolityczną jako całość, nie usiłując dokładniej zidentyfikować poszczególne enzymy lub enzymogeny.

\* Poprzednie prace tej serii [15, 16, 28, 28a].

\*\* Praca wykonana dzięki dotacji Komitetu Biochemicznego PAN.

Celem niniejszej pracy jest wykazanie złożonego charakteru zdolności proteolitycznej soku trzustkowego psa oraz próba identyfikacji kilku głównych składników aktywności proteolitycznej tego soku.

#### METODY

Sok trzustkowy psa otrzymywano z przetok trzustkowych przewlekłych według Thomasa, lub też w kilku przypadkach z przetok ostrych. Sok zbierano i przechowywano w temperaturze ok.  $+4^{\circ}$ . W krótkim czasie po zebraniu sok zagęszczano przez dializę w woreczku plastikowym względem 50% roztworu gumy arabskiej i rozdzielano elektroforetycznie na żelu agarowym zawierającym hyflo super-cel. Po zlokalizowaniu frakcji białkowych na elektroforogramie, odpowiednie odcinki żelu eluowano 6 ml roztworu fizjologicznego soli, adsorbent odwirowywano i uzyskane roztwory przechowywano w temperaturze  $4^{\circ}$  aż do wykonania oznaczeń enzymatycznych. Dokładny opis postępowania podano poprzednio [28].

Jako substratów do oznaczeń enzymatycznych używano następujące substancje: hemoglobinę (Difco), ester etylowy L-lizyny (EEL) sporządzony według Werbina i Palma [31], ester etylowy L-tyrozyny (EET) sporządzony według Adkinsa i Billica [1], ester etylowy N-acetylo-DL-tryptofanu (EEAcTr) otrzymany z N-acetylo-DL-tryptofanu (L. Light) przez ogrzewanie pod chłodnicą zwrotną w obecności absolutnego etanolu i suchego chlorowodoru, chloroacetylo-L-tyrozinę (ClAcT) (Hoffmann — La Roche), elastyn wyizolowany z aort wołowych według Granta i Robbinsa [12]. Do aktywacji enzymogenów używano krystaliczną trypsynę (Organofarma) i preparat enterokinazy sporządzony z błony śluzowej jelita wieprzowego według Eichhorna [8].

Enzymatyczną hydrolizę estrów aminokwasów oznaczano następująco: 0,4 ml roztworu zawierającego enzym inkubowano z 0,3 ml buforu fosforanowego 0,3 M o pH 7,3 i 0,3 ml roztworu substratu (stężenie końcowe 0,015 M dla EET i EEAcTr, 0,02 M dla EEL) w łaźni o temperaturze  $37^{\circ}$ . Po określonym czasie inkubacji oznaczano zawartość nierozłożonego estru metodą hydroksamową Hestrina [14].

Hydrolizę hemoglobiny oznaczano metodą Ansona [2], przyjmując według tej metody jednostkę aktywności; przy pomocy tej samej jednostki określano aktywność hydrolizy estrów aminokwasów na podstawie empirycznie uzyskanych krzywych.

Hydrolizę chloroacetylotyrozyny oznaczano następująco: 0,3 ml roztworu enzymu inkubowano z 0,3 ml roztworu substratu (stężenie końcowe 0,015 M) w buforze „tris“ (trójhydroksymetyloaminometan) 0,02 M o pH 7,5 i po odpowiednim czasie trawienia w temperaturze  $37^{\circ}$  zatrzymywa-



no reakcję przez dodanie 1 ml 1% roztworu kwasu pikrynowego. Po odwirowaniu ewentualnego osadu oznaczano w roztworze zawartość wolnej tyrozyny metodą ninhydrynową Rosena [25]. Za jednostkę aktywności przyjęto tę ilość enzymu, która w czasie 30 minut w warunkach oznaczenia działając z prędkością początkową odszczepia 1  $\mu$ M-tyrozyny.

Hydrolizę elastynu oznaczano inkubując roztwór enzymu z 0,3 ml zawiesiny substratu w temperaturze 37°. Zawiesinę substratu sporządza się przez zhomogenizowanie 400 mg sproszkowanego elastynu w 10 ml 0,5 M buforu fosforanowego o pH = 7,4. Całkowita objętość inkubowanej mieszaniny wynosiła 3 ml. Po odpowiednim czasie trawienia zatrzymywano reakcję enzymatyczną przez włożenie probówek do lodu na 5 minut, nierozłożony substrat odsączało i w przesączu oznaczano zawartość rozpuszczonego białka metodą Lowry i wsp. [24]. Za jednostkę aktywności przyjęto ilość enzymu, która w czasie 30 minut rozpuszcza 1 mg elastynu.

Przy doświadczeniach, w których badano wpływ aktywujący trypsyny i enterokinazy, inkubowano przed oznaczeniem aktywności enzymatycznej 0,3 ml eluatu z 0,1 ml roztworu zawierającego 10  $\mu$ g trypsyny względnie 0,3 mg preparatu enterokinazy przez 20 minut w temperaturze 37°. Równolegle przeprowadzono oznaczenia kontrolne pozwalające określić, w jakim stopniu sam aktywator uczestniczy w hydrolizie stosowanego substratu. Uzyskane w ten sposób zazwyczaj niewielkie wartości odejmowano od wyników wszystkich właściwych oznaczeń.

Stężenie białka w eluatach frakcji elektroforetycznych oznaczano przy użyciu odczynnika fenolowego Folina i Ciocalteu [9], metodą opisaną poprzednio [16]. Aktywność enzymatyczną frakcji białkowych przedstawiano albo jako procent całej aktywności (tzn. wszystkich frakcji łącznie) albo też w jednostkach aktywności enzymatycznej na 1 mg białka.

#### WYNIKI

Przy stosowanym przez nas sposobie postępowania rozdział elektroforetyczny białek soku trzustkowego psa umożliwia wyróżnienie 6-8 frakcji białkowych. Na podstawie ich rozmieszczenia dzielono warstwę żelu agarowego na 8 odcinków oznaczanych kolejno liczbami 1, 2a, 2b, 3a, 3b, 4, 5, 6. Położenie tych odcinków i rozmieszczenie w nich białka przedstawia rys. 1 i tablica 1. Po wyeluowaniu białka z poszczególnych odcinków odpowiadających frakcjom białkowym soku przeprowadzono oznaczenia aktywności enzymatycznej uzyskanych roztworów względem sześciu substratów. Oznaczano zarówno aktywność samoistną (tzn. spowodowaną obecnością aktywnych enzymów wytworzonych z enzymogenów

już w czasie całego postępowania poprzedzającego oznaczenie), jak również po aktywacji eluatów krystaliczną trypsyną i preparatem enterokinazy.

Przeprowadzono ogółem 40 analiz elektroforetycznych i na eluatach frakcji białkowych wykonano odpowiednią dla uzyskania znamienności statystycznej ilość poszczególnych oznaczeń enzymatycznych. W tabelicy 2

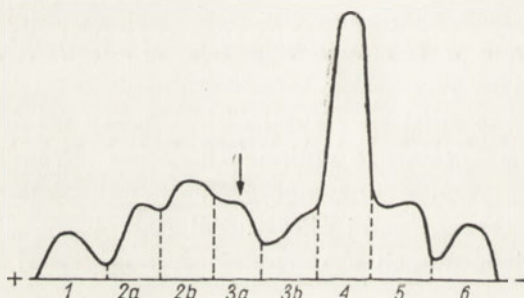
Tablica 1

*Średnie wartości procentowego rozmieszczenia białka we frakcjach elektroforetycznych soku trzustkowego psa*

Wartości średnie obliczone z wyników 40 oznaczeń białka w eluatach frakcji

Frakcje	1	2a	2b	3a	3b	4	5	6
Względny %	6,1	8,7	13,4	9,3	8,1	35,2	11,4	7,8
	$\pm 0,6$	$\pm 0,6$	$\pm 1,0$	$\pm 0,8$	$\pm 0,4$	$\pm 1,0$	$\pm 0,8$	$\pm 0,4$

zebrano średnie wartości rozmieszczenia procentowego aktywności enzymatycznej we frakcjach, natomiast diagramy na rys. 2-6 przedstawiają aktywność właściwą frakcji białkowych. Wysokość słupków na diagramie



Rys. 1. Rozmieszczenie białka na elektroforogramach soku trzustkowego z zaznaczonym podziałem na frakcje. Szerokość każdego odcinka odpowiada szerokości frakcji zbieranych z elektroforogramów; powierzchnie zakreślone przez poszczególne części krzywej są proporcjonalne do stężenia białka we frakcjach.

Miejsce nałożenia soku trzustkowego zaznaczono strzałką

mach odpowiada średnim wartościom aktywności właściwej w jednostkach aktywności na 1 mg białka, ich szerokość jest proporcjonalna do średniej zawartości białka, zatem powierzchnie słupków są zgodne z wartościami zebranymi w tabelicy 2.

Hemoglobina jest substratem, który ulega rozkładowi bez uprzedniej aktywacji we wszystkich zbadanych przypadkach. Aktywność ta zlokaliz-

Tablica 2

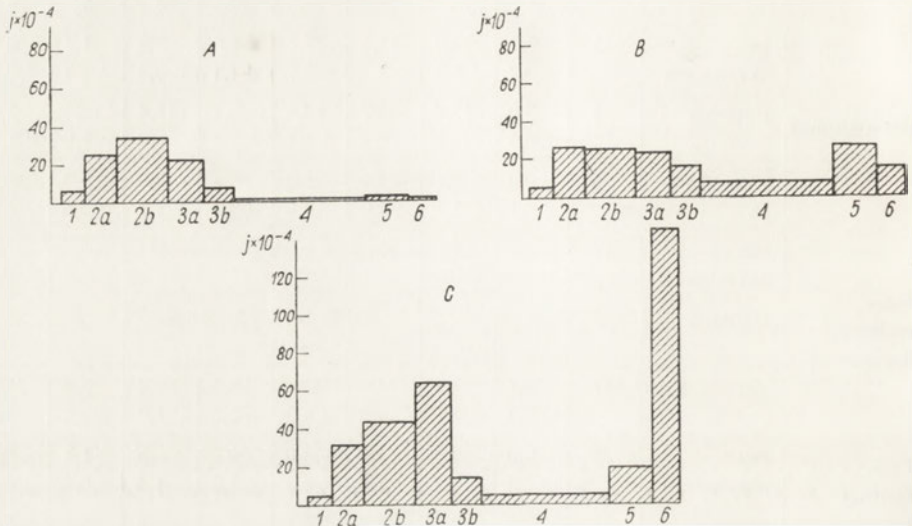
*Srednie wartosci aktywnosci enzymatycznej frakcji bialkowych soku trzustkowego psa*

Poszczególne liczby przedstawiaja procent calaj aktywnosci enzymatycznej wzgledem danego substratu w kazdej frakcji elektroforetycznej

Substrat	Aktywator	Ilość ozn.	Frakcja							
			1	2a	2b	3a	3b	4	5	6
Hemoglobina	bez aktywatora	33	3,3 ±0,7	23,0 ±3,0	43,5 ±3,6	19,3 ±2,7	6,4 ±1,1	2,2 ±0,4	1,4 ±0,3	0,9 ±0,3
	trypsyna	25	3,0 ±0,5	17,7 ±2,3	22,7 ±2,6	14,8 ±2,5	8,2 ±1,3	15,4 ±1,7	12,3 ±1,9	5,9 ±1,1
	enterokinaza	6	0,4 ±0,1	9,1 ±2,9	25,0 ±4,9	25,2 ±4,0	4,4 ±0,9	4,6 ±2,7	5,2 ±2,6	26,1 ±3,8
Ester etylowy lizyny	bez aktywatora	17	zupełny brak aktywności							
	trypsyna	5	zupełny brak aktywności							
	enterokinaza	11	0,5 ±0,3	3,1 ±1,3	25,4 ±6,5	25,5 ±4,3	4,3 ±2,0	1,4 ±1,2	3,6 ±2,2	36,2 ±6,5
Ester etylowy tyrozyny	bez aktywatora	19	8,0 ±2,2	9,3 ±1,8	14,6 ±2,3	44,0 ±4,3	18,3 ±3,3	3,8 ±1,6	1,1 ±0,4	0,9 ±0,4
	trypsyna	18	0,8 ±0,4	2,7 ±0,6	4,7 ±0,9	12,1 ±1,4	21,6 ±2,6	46,8 ±3,9	5,2 ±1,0	6,1 ±1,5
Ester etylowy acetylotryptofanu	bez aktywatora	2	0,0 —	1,6 —	1,6 —	54,2 —	20,4 —	22,2 —	0,0 —	0,0 —
	trypsyna	2	0,0 —	1,2 —	1,3 —	6,8 —	6,8 —	73,2 —	6,9 —	3,8 —
Chloroacetylotyrozyna	bez aktywatora	15	2,5 ±0,8	2,7 ±0,6	5,5 ±1,6	11,8 ±2,1	15,9 ±2,2	41,0 ±3,8	18,4 ±3,6	2,2 ±0,9
	trypsyna	6	1,6 ±0,6	4,5 ±2,6	8,3 ±3,9	10,4 ±3,3	11,1 ±3,3	40,9 ±4,0	20,1 ±6,8	3,1 ±2,6
Elastyn	bez aktywatora	7	2,4 ±1,5	6,6 ±2,8	32,8 ±5,4	22,1 ±3,3	17,4 ±0,8	13,8 ±1,5	3,8 ±0,7	1,1 ±0,1
	trypsyna	4	1,3 ±0,4	4,6 ±1,8	22,0 ±4,4	8,3 ±2,9	6,7 ±2,2	30,6 ±3,7	15,8 ±6,9	10,7 ±7,5

zowana jest głównie we frakcjach 2a, 2b i 3a z maksimum we frakcji 2b. Frakcje 1 i 3b wykazują tylko niewielką aktywność a frakcje 4, 5 i 6 nie rozkładają praktycznie hemoglobiny w tych warunkach. Inkubowanie eluatów z krystaliczną trypsyną powoduje pojawienie się aktywności proteolitycznej także we frakcjach pozostałych, a szczególnie we frakcji 4.

Jeszcze bardziej wyraźnie zaznacza się wpływ preparatu enterokinazy. Inkubowanie eluatów z 0,3 mg tego preparatu powoduje występowanie bardzo silnej aktywności we frakcji 6 przy równoczesnym podwyższeniu aktywności frakcji 3a. Zmiany aktywności we frakcjach białkowych wskutek działania trypsyny i enterokinazy w równoległych doświadczeniach przedstawione są także na rys. 2. Hemoglobina jest substratem



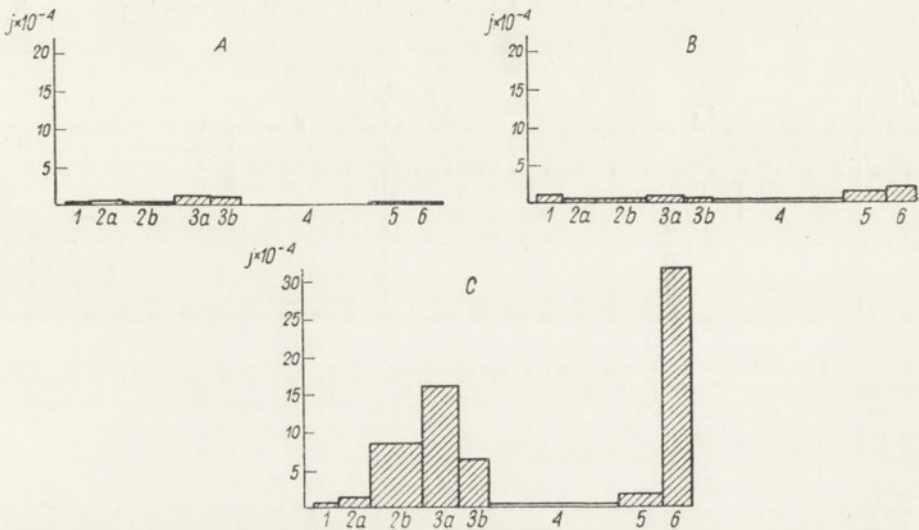
Rys. 2. Hydroliza hemoglobiny przez frakcje białkowe soku trzuskowego. A — doświadczenia bez aktywacji, B — po aktywacji trypsyną, C — po aktywacji enterokinazą. Wysokość słupków odpowiada średnim wartościom aktywności właściwej w jednostkach aktywności na 1 mg białka, szerokość jest proporcjonalna do średniej zawartości białka we frakcjach

niespecyficznym i interpretacja wyników na podstawie hydrolizy tylko tego jednego substratu byłaby problematyczna, jednak wybitna aktywność frakcji 6 po aktywacji enterokinazą pozwala przypuszczać, że w tej frakcji znajduje się trypsynogen.

Diagramy na rys. 3 przedstawiają rozmieszczenie aktywności względem estru etylowego lizyny. Charakterystyczny jest praktycznie zupełny brak zdolności hydrolizy tego związku przez nieaktywowane frakcje białkowe i tylko nieznaczna aktywność we frakcji 6 po aktywacji trypsyną. Aktywacja enterokinazą wywołuje silną aktywność we frakcji 6, a oprócz tego wyraźną aktywność we frakcjach 2b, 3a i 3b. Ester etylowy lizyny jest substratem odpowiadającym warunkom specyficzności trypsyny [31] i jest rozkładany przez krystaliczną trypsynę z dość dużą szybkością. Brak hydrolizy tego substratu przez frakcje nieaktywowane świadczy

o tym, że trypsynogen nie ulega aktywacji w czasie całego postępowania. Pojawienie się silnej aktywności we frakcji 6 po aktywacji enterokinazą potwierdza tezę, że w tej frakcji znajduje się trypsynogen.

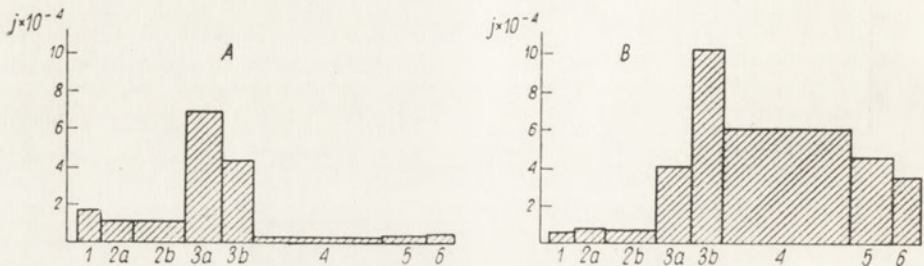
Ester etylowy tyrozyny posiada strukturę odpowiadającą specyficzności chymotrypsyny i ulega hydrolizie pod działaniem tego enzymu z dość znaczną prędkością [27]. Substrat ten w doświadczeniach bez akty-



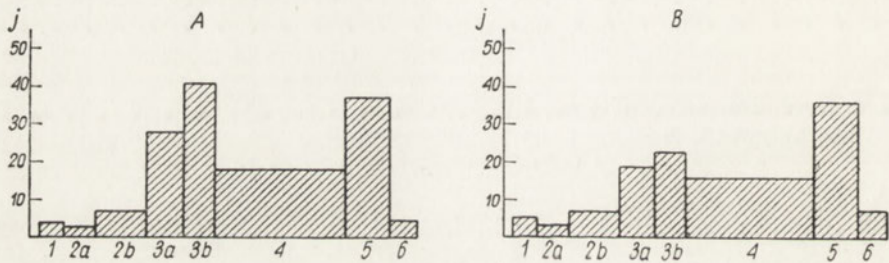
Rys. 3. Hydroliza estru etylowego lizyny przez frakcje białkowe soku trzustkowego. A — bez aktywacji, B — po aktywacji trypsyną, C — po aktywacji enterokinazą. Opis jak dla rysunku 2

wacji ulega w pewnym stopniu hydrolizie przez frakcję 3a (białko pozostające w miejscu nałożenia). Tu prawdopodobnie znajduje się chymotrypsyna wytworzona wskutek przypadkowej aktywacji chymotrypsynogenu w czasie całego postępowania poprzedzającego oznaczenie. Aktywacja trypsyną powoduje pojawienie się wybitnej aktywności we frakcji 4; dość dużą aktywność posiadają także frakcje sąsiednie, a szczególnie 3b (Rys. 4). W przeliczeniu na 1 mg białka aktywność tej frakcji jest nawet wyższa niż frakcji 4, należy jednak pamiętać, że frakcja 3b jest uboga w białko, podczas gdy frakcja 4 zawiera ponad 35% całego białka użytego do rozdziału. W podobny sposób jak ester etylowy tyrozyny zachowuje się inny specyficzny dla chymotrypsyny substrat — ester etylowy N-acetylo-DL-tryptofanu. Ulega on także hydrolizie przez aktywowaną trypsyną frakcję 4 (Tabl. 2). Wyniki te wskazują na to, że we frakcji 4 znajduje się chymotrypsynogen.

Chloroacetylotyrozyna jest jednym z specyficznych substratów dla karboksypeptydazy A [6]. Substancja ta jest rozkładana przez frakcję 4, zarówno w doświadczeniach bez aktywacji, jak i po aktywacji trypsyną. Brak działania aktywującego trypsyny, a nawet pewne obniżenie aktywności we frakcjach 3a i 3b po inkubacji z trypsyną, wskazuje na to, że występująca tam karboksypeptydaza jest już całkowicie aktywna i nawet ulega częściowemu unieczynnieniu. Hydroliza chloroacetylotyrozyny przez poszczególne frakcje przedstawiona jest na diagramach na rys. 5.

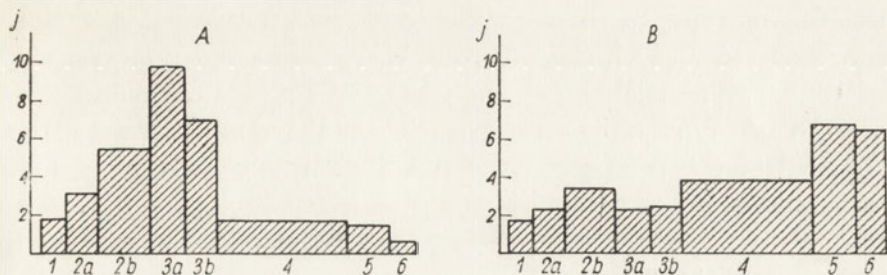


Rys. 4. Hydroliza estru etylowego tyrozyny przez frakcje białkowe soku trzuskowego. A — bez aktywacji, B — po aktywacji trypsyną. Opis jak dla rysunku 2



Rys. 5. Hydroliza chloroacetylotyrozyny przez frakcje białkowe soku trzuskowego. A — bez aktywacji, B — po aktywacji trypsyną. Opis jak dla rysunku 2

Elastyn, drugi z zastosowanych substratów białkowych, ulega hydrolizie bez uprzedniej aktywacji pod działaniem frakcji 2b i 3a, a także, choć w mniejszym stopniu, w następnych 3b i 4. (Rys. 6). Rozmieszczenie aktywności przypomina hydrolizę hemoglobiny w analogicznych warunkach. Inkubacja eluatów z niewielkim stężeniem trypsyny powoduje obniżenie aktywności we frakcjach bliższych anody (2b, 3a, 3b) i wyraźny wzrost, względnie pojawienie się nowej aktywności we frakcjach 4, 5 i 6. Rozkład elastynu i hemoglobiny bez uprzedniej aktywacji i równoczesny brak zdolności hydrolizy estrów aminokwasów w analogicznych warunkach pozwala na rozpoznanie enzymu występującego we frakcji 2b i są-



Rys. 6. Hydroliza elastynu przez frakcje białkowe soku trzustkowego. A — bez aktywacji, B — po aktywacji trypsyną. Opis jak dla rysunku 2

siednich jako elastazy. Hydroliza obu białkowych substratów przez pozostałe frakcje po aktywacji trypsyną da się wyjaśnić działaniem innych obecnych tam enzymów — chymotrypsyny, trypsyny i karboksypeptydazy.

#### DYSKUSJA

Obecnie przedstawione wyniki doświadczeń wykazały, że aktywność proteolityczna soku trzustkowego psa posiada charakter złożony. Na podstawie rozdziału elektroforetycznego białek i zastosowania kilku substratów oraz z zaobserwowanych różnic aktywności przed i po aktywacji frakcji białkowych trypsyną i enterokinazą, można wykazać obecność co najmniej pięciu odrębnych enzymów proteolitycznych. Cztery z nich udało się zidentyfikować, a mianowicie: trypsynogen,  $\alpha$ -chymotrypsynogen, karboksypeptydazę A i elastazę.

Trypsynogen znajduje się we frakcji 6, a więc wędruje w czasie elektroforezy najdalej do katody, co pozostaje w zgodności ze znaną wysoką wartością punktu izoelektrycznego tego białka [21]. Nie wykazuje on żadnej aktywności bez uprzedniej aktywacji i dopiero po aktywacji preparatem enterokinazy pojawia się aktywność względem estru etylowego lizyny i substratów białkowych. Wydaje się, że w tej samej frakcji białkowej znajduje się inhibitor trypsyny, którego występowanie w soku trzustkowym znane było dawniej [17]. Obecność inhibitora, którą udało się wykazać tylko w niektórych doświadczeniach, mogłaby wyjaśnić brak aktywującego działania krystalicznej trypsyny na trypsynogen znajdujący się w tej samej frakcji. Inhibitor ulega inaktywacji pod wpływem wyciągów z błony śluzowej jelita [17] i dzięki temu preparat enterokinazy może aktywować trypsynogen.

Chymotrypsynogen występuje we frakcji 4. Ulega on aktywacji pod działaniem krystalicznej trypsyny i po zaktywowaniu hydrolizuje ester etylowy tyrozyny i ester etylowy acetylotryptofanu oraz substraty biał-

kowe. Chymotrypsynogen może ulec częściowej aktywacji wskutek zabiegów poprzedzających elektroforezę. Wytworzona w ten sposób aktywna chymotrypsyna znajduje się we frakcji 3a i powoduje hydrolizę estru etylowego tyrozyny w doświadczeniach bez aktywacji. Sądząc z ruchliwości elektroforetycznej obecny we frakcji 4 chymotrypsynogen odpowiada krystalicznemu  $\alpha$ -chymotrypsynogenowi [21]. Wydaje się, że w soku trzustkowym psa nie występuje chymotrypsynogen B, obecny w soku trzustkowym wołu [20].

W tej samej frakcji białkowej co chymotrypsynogen znajduje się karboksypeptydaza A. Rozkłada ona chloroacetylotyrozynę i w eluatach jest już całkowicie aktywna. Należy przypuszczać, że prokarboksypeptydaza zostaje całkowicie uczynniona w czasie przygotowania soku do elektroforezy.

Enzym, który wędruje w kierunku anody (frakcja 2a i 2b), rozkłada elastyn i hemoglobinę bez uprzedniej aktywacji i jest nieaktywny względem substratów syntetycznych, wydaje się być identyczny z opisaną w literaturze elastazą [3, 7, 12, 23]. Jest rzeczą prawdopodobną, że również i ten enzym powstaje z nieczynnego prekursora wskutek różnych zabiegów poprzedzających oznaczenie, ponieważ stwierdzono tylko bardzo słabą aktywność proteolityczną świeżo pobranego soku względem hemoglobiny.

Aktywności frakcji 2a, 2b i 3a nie można uważać za jednolitą, ponieważ wskutek aktywacji preparatem enterokinazy pojawia się w nich całkiem nowa aktywność względem estru etylowego lizyny i równocześnie można zaobserwować wzrost aktywności względem hemoglobiny. Niestety stosowany preparat z błony śluzowej jelita nie jest czystą enterokinazą, nie wiadomo więc, czy obserwowaną aktywację powoduje sama enterokinaza, czy też jakiś inny czynnik obecny w preparacie. Być może, że powstaje w ten sposób aktywna protaminaza (przypuszczalnie identyczna z karboksypeptydazą B [29]) lub też jakiś inny z licznych, choć niedokładnie scharakteryzowanych enzymów proteolitycznych trzustki [7, 11, 22, 30]. Identyfikacja enzymu, względnie enzymów, obecnych w tych frakcjach nie jest możliwa na podstawie obecnych doświadczeń i wymaga dalszych bardziej szczegółowych badań.

---

Pragniemy złożyć podziękowanie Panu Prof. Dr B. Skarżyńskiemu za pomoc i opiekę, które umożliwiły nam wykonanie tej pracy.



## STRESZCZENIE

Przeprowadzono badania aktywności proteolitycznej rozdzielonych elektroforetycznie frakcji białkowych soku trzustkowego psa przy użyciu sześciu substratów, a mianowicie: hemoglobiny, elastynu, estru etylowego L-lizyny, estru etylowego L-tyrozyny, estru etylowego N-acetylo-DL-tryptofanu i chloroacetylotyrozyny. Stwierdzono możliwość występowania co najmniej pięciu enzymów proteolitycznych, z czego cztery zidentyfikowano. Są to: trypsynogen,  $\alpha$ -chymotrypsynogen, karboksypeptydaza A i elastaza.

## LITERATURA

- [1] Adkins H., Billica H. R. *J. Am. Chem. Soc.* **70**, 3121, 1948.
- [2] Anson M. L. *J. Gen. Physiol.* **22**, 79, 1938.
- [3] Balo J., Banga I. *Biochem. J.* **46**, 384, 1950.
- [4] Byrne G. M., Phinney J. I., Schachter M., Gordon-Young E. *J. Biol. Chem.* **192**, 683, 1951.
- [5] Delcourt A., Delcourt R. *C. R. soc. biol.* **147**, 1104, 1953.
- [6] Dixon M., Webb C. E. *Enzymes*, Longmans, Green and Co., London 1958, str. 252.
- [7] Dvornich W., Alburn H. E. *Arch. Biochem. Biophys.* **79**, 146, 1959.
- [8] Eichhorn F. w *Die Methoden der Fermentforschung*, wyd. Bamann E., Myrbäck K. Georg Thieme Verlag, Leipzig 1940, str. 2931.
- [9] Folin O., Ciocalteu V. *J. Biol. Chem.* **73**, 627, 1927.
- [10] Folk J. E., Gladner J. A. *J. Biol. Chem.* **231**, 379, 1958.
- [11] Grant N. H., Robbins K. C. *J. Am. Chem. Soc.* **78**, 5388, 1956.
- [12] Grant N. H., Robbins K. C. *Arch. Biochem. Biophys.* **66**, 396, 1957.
- [13] Grossberg A. L., Komarov S. A., Shay H. *Am. J. Physiol.* **168**, 269, 1952.
- [14] Hestrin S. *J. Biol. Chem.* **189**, 249, 1949.
- [15] Homańska-Szafranowa H., Oleksy J. *Acta Biochim. Polon.* **3**, 663, 1956.
- [16] Homańska-Szafranowa H., Oleksy J., Szafran Z. *Acta Physiol. Pol.* **9**, 233, 1958.
- [17] Kasler M. H., Grossman M. I. *Gastroenterology* **29**, 35, 1955.
- [18] Keller P. J., Cohen E., Neurath H. *J. Biol. Chem.* **223**, 457, 1956.
- [19] Keller P. J., Cohen E., Neurath H. *J. Biol. Chem.* **230**, 905, 1958.
- [20] Keller P. J., Cohen E., Neurath H. *J. Biol. Chem.* **233**, 344, 1958.
- [21] Laskowski M., w *Methods in Enzymology*, wyd. Colowick S. P., Kaplan N. O., Academic Press, New York 1955, tom II str 8 i nast.
- [22] Lewis U. J., Thiele E. H. *J. Am. Chem. Soc.* **79**, 755, 1957.
- [23] Lewis U. J., Williams D. E., Brink N. G. *J. Biol. Chem.* **222**, 705, 1956.
- [24] Lowry O. H., Rosebrough N. J., Farr A. L., Randall R. J. *J. Biol. Chem.* **193**, 265, 1951.
- [25] Rosen H. *Arch. Biochem. Biophys.* **67**, 10, 1957.
- [26] Rotschild H. A., Junqueira L. C. U. *Nature* **178**, 258, 1956.
- [27] Schwert G. W., Takenaka Y. *Biochim. Biophys. Acta* **16**, 570, 1955.
- [28] Szafran Z., Homańska-Szafranowa H., Oleksy J. *Acta Biochim. Polon.* **5**, 189, 1958.
- [28a] Szafran Z., Szafran H., Oleksy J. *Acta Biochim. Polon.* **6**, 205, 1959.

- [29] Weil L., Seibles T. S., Telka M. *Arch. Biochem. Biophys.* 79, 44, 1959.  
[30] Weil L., Telka M. *Arch. Biochem. Biophys.* 71, 204, 1957.  
[31] Werbin H., Palm A. *J. Am. Chem. Soc.* 73, 1382, 1951.

STUDIES ON HYDROLASES IN DIGESTING JUICES  
V. PROTEOLYTIC ENZYMES IN THE DOG PANCREATIC JUICE

Summary

The proteolytic activities of electrophoretic protein fractions of the dog pancreatic juice were studied towards the following substrates: haemoglobin, elastin, L-lysine ethyl ester, L-tyrosine ethyl ester and the ethyl ester of N-acetyl-DL-tryptophane, as well as of chloracetyl tyrosine. The possibility of the presence of 5 proteolytic enzymes at least, was stated. Four of them were identified, namely: trypsinogen,  $\alpha$ -chymotrypsinogen, carboxypeptidase A and elastase.

Otrzymano 21.11.1959 r.

K. L. WIERZCHOWSKI and D. SHUGAR

**FURTHER STUDIES ON THE PHOTOCHEMISTRY  
OF PYRIMIDINES, WITH SPECIAL REFERENCE TO  
5- AND 6-SUBSTITUTED DERIVATIVES IN RELATION TO  
PHOTOREACTIVATION IN THE T-EVEN BACTERIOPHAGES**

*Instytut Biochemii i Biofizyki, Polska Akademia Nauk, Warszawa  
(Institute of Biochemistry and Biophysics, Academy of Sciences, Warsaw)*

It has now been reasonably well established that for a variety of pyrimidine derivatives, including nucleosides and nucleotides, unsubstituted in the 5 and 6 positions of the pyrimidine ring, ultraviolet irradiation (at wavelengths above 2200 Å) leads to the formation of photoproducts capable of reverting to the original substance in the "dark" under the influence of acid, alkali, or heat at neutral pH. The photochemical reaction in such cases *usually* involves uptake of a water molecule at the 5,6 double bond with the formation of a 5-hydroxy-6-hydroxy derivative, the reverse dark reaction involving the elimination of this water molecule<sup>1</sup> (see Ref. [13] for review).

A number of pyrimidine derivatives, however, apparently do not undergo this reversible reaction, irradiation being accompanied by ring rupture with the ultimate formation of a variety of stable photoproducts. These include, amongst others, orotic acid, thymine (see, however, below), barbituric acid, 6-aminouracil, etc. A characteristic feature of this class of compounds is that the 5 or 6 position of the pyrimidine ring is substituted.

On the other hand, since such derivatives as 2-thiouracil, 2-thiocytosine, etc. likewise do not form reversible photoproducts, it is rather the electron distribution density in the pyrimidine ring which determines the ability of the 5,6 double bond in the *excited* pyrimidine ring to take

<sup>1</sup> Irradiation of some 4-aminopyrimidines gives rise to reversible photoproducts which do not result from the simple uptake of a water molecule at the 5,6 double bond. These include 2-methoxycytosine, the pyrimidine component of vitamin B<sub>1</sub>, etc., and will be reported upon in detail elsewhere.

up a water molecule; and the apparent failure of 5- or 6-substituted derivatives to do so is not the result of any steric hindrance. In fact, Moore & Thomson [8] claim to have observed "slight" reversibility for 6-methyluracil, although we have been unable to confirm this (see below).

In addition to their interest from a purely physicochemical point of view, the reversible photolytic reactions of pyrimidine nucleotides suggest a conceivable experimental mechanism to account for the phenomenon of biological photoreactivation, the more so in that these reversible photochemical reactions have been shown to occur in both natural and synthetic polynucleotide chains [11, 12, 13, 20]. This is, in fact, at present the only experimental model capable of accounting for photoreactivation in living organisms.

It is, on the other hand, well known that the T-even bacteriophages readily exhibit photoreactivation [3, 4]. However, the only pyrimidine components of the DNA of these phages are thymine, 5-hydroxymethylcytosine and glucosylated 5-hydroxymethylcytosine, all of which are substituted in the 5 position, and hence would not normally be expected to exhibit reversible photolysis. As a result of this we were led to undertake a more detailed investigation of the photochemical behaviour of a variety of substituted pyrimidine derivatives, with special reference to those substituted in the 5 and/or 6 positions.

While the present investigation was in progress, a report appeared [18] presenting indirect evidence that one of the initial photoproducts resulting from the irradiation of 1,3-dimethylthymine (1,3,5-trimethyluracil) is 1,3-dimethyl-5-hydro-6-hydroxythymine, as would be expected from the uptake of a water molecule at the 5,6 double bond. This photoproduct was not isolated because of its instability, this being ascribed to the ease with which it undergoes dehydration; and the evidence for its formation as an intermediate in the photodecomposition of dimethylthymine was based on the observation that one of the final photoproducts of prolonged irradiation of 1,3-dimethylthymine is *N,N'*-dimethylmethylmalonamide, which is a product of decarboxylation or 1,3-dimethyl-5-hydro-6-hydroxythymine.

It had previously been concluded, on the basis of a study of the kinetics of photolysis in light and heavy water [11, 13], that formation of the *final* photoproducts of thymine does not proceed *via* uptake of a water molecule. The foregoing finding indicates, however, that 5-hydro-6-hydroxythymine may be an unstable intermediate in the photodecomposition of thymine. If this were so, it is conceivable, as Wang [18] has suggested, that such an intermediate may exhibit greater stability in a nucleotide chain and thus exhibit the phenomenon of reversibility.

## MATERIALS

Methylated uracil derivatives were obtained by methylation, with dimethylsulphate, of 5-methyluracil (thymine), 6-methyluracil and 5,6-dimethyluracil, followed by repeated crystallization. It was, nonetheless, found that melting point determinations were unsatisfactory for establishing the purity of these compounds and, in our opinion, paper chromatography provides a much better criterion for this purpose. An examination of the spectrum of a given derivative in neutral and alkaline media is especially useful for determining whether it is methylated in the 1 or 3 position, or both, by making use of the previously reported spectra for 1-methyluracil and 3-methyluracil [10].

Of a variety of solvent systems tested, none was found to be more suitable than that used by McOmie *et al.* [6] for the separation of 1,6-dimethyluracil and 3,6-dimethyluracil. The following table represents the  $R_F$  values for various methylated uracils:

Table 1

*R<sub>F</sub> values for methylated uracil derivatives*

Solvent system benzene-ethanol-water (169/45/15, v/v/v), ascending chromatography, Whatman No. 1 paper

Compound	$R_F$
Uracil	0.03
5-methyluracil (thymine)	0.05 (tailing)
6-methyluracil	0.07
5, 6-dimethyluracil	0.15
1, 6-dimethyluracil	0.32
3, 6-dimethyluracil	0.48
1, 3, 5-trimethyluracil	0.72
1, 5, 6-trimethyluracil	0.93
1, 3, 5, 6-tetramethyluracil	0.97

6-aminouracil and 6-aminothymine were obtained through the kindness of Dr. D. Kanazir of the Institute of Nuclear Sciences, Belgrade. Their  $R_F$  values in isopropanol-water-ammonia (70:25:5), ascending chromatography, are 0.24 and 0.31, respectively.

We are indebted to Prof. A. R. Todd for samples of  $O^2 : 2'$ -cyclouridine, isopropylidene- $O^2 : 5'$ -cyclouridine, 1,3-dimethylcytosine and isocytosine- $-1-\beta$ -D-arabinoside. The latter compound was initially discovered as a contaminant of  $O^2 : 2'$ -cyclouridine, in this laboratory, and was

subsequently isolated in quantity and identified in the Cambridge laboratory (Todd & Brown, personal communication).

3-methyluridine and 3-methylthymidine were prepared according to the procedure of Miles [7].

Isocytosine, 5-hydroxymethylcytosine and 5-methyldeoxycytidine were California Foundation products; 5-hydroxymethyluracil was prepared by deamination of 5-hydroxymethylcytosine.

We are grateful to Dr. J. F. Koerner for samples of 5-hydroxymethyldeoxycytidylic acid and glucosylated 5-hydroxymethyldeoxycytidylic acid<sup>2</sup>.

5-ribofuranosyluracil was separated on a small scale by paper chromatography from commercial samples of uridine; it was subsequently checked against a sample kindly provided by Dr. W. E. Cohn.

## METHODS

The methods used were essentially the same as those previously described [12, 19]. The irradiation source was a British Thermal Syndicate mercury resonance lamp (2537 Å) from which wavelengths to the violet of 2300 Å were removed by means of an acetic acid filter. Light intensities were based on uranyl oxalate actinometry; but routine measurements were frequently carried out by measuring the decrease in absorption of a solution of uridylic acid, the quantum yield for which is well established [15, 20]. Irradiations were normally conducted in 10-mm. spectrophotometer cuvettes provided, where necessary to prevent evaporation, with ground joints; and at concentrations of the order of  $10^{-4}$  M. When it was necessary to chromatograph the irradiated solution, concentrations were increased 10-fold and 1-mm. cuvettes used. A Radiometer titrator with appropriate glass microelectrodes was used for pH measurement and control without removing the solutions from the cuvettes.

Quantum yields were usually calculated from changes in absorption spectra, except for 5-substituted cytosine derivatives where radiation induced modifications of absorption spectra were too complicated, and supplementary measurements were found necessary.

<sup>2</sup> The following abbreviations will be used in this text: 5-MC, 5-methylcytosine; 5-MDC, 5-methyldeoxycytidine; 5-HMC, 5-hydroxymethylcytosine; 5-HMDCp, 5-hydroxymethyldeoxycytidylic acid; 5-HMGDCp, 5-hydroxymethyl-(O-glucosyl)-deoxycytidylic acid.

## RESULTS AND DISCUSSION

*Methylated uracil derivatives.* In view of the report of Moore & Thomson [8] that 6-methyluracil exhibits "slight" reversibility, this compound was examined under a variety of conditions, with negative results. Irradiation always resulted in a decrease in absorption which could not be reversed either by heating at neutral pH or by acidification.

Since uracil does not exhibit 100% reversibility [9, 14] following irradiation, while 1,3-dimethyluracil does [8, 20], the behaviour of 1,3,6-trimethyluracil was then examined. The results of a typical experiment are illustrated in Fig. 1. The degree of thermal reversibility at neutral pH is seen to be quite high, varying from 65 to 80% in different

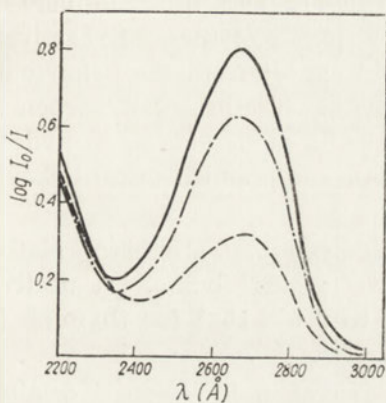


Fig. 1. Photolysis and thermal reversibility of 1,3,6-trimethyluracil in 0.02 M-phosphate buffer pH 7.2:

- before irradiation,
- after irradiation for 3 hrs. at an incident intensity of  $2.6 \times 10^{-7}$  einstein/cm<sup>2</sup>/min.,
- irradiated solution heated 75 mins. at 80°

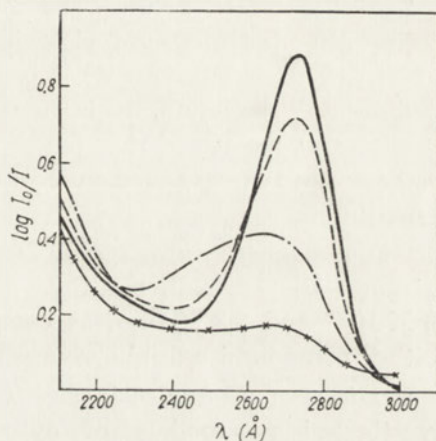


Fig. 2. Irradiation of 6-aminothymine in 0.02 M phosphate buffer pH 8.5 at an incident intensity of  $2.6 \times 10^{-7}$  einstein/cm<sup>2</sup>/min.,

- before irradiation
- after 1 min. irradiation
- after 2 min. irradiation
- x-x-x after 10 min. irradiation

experiments, and depending to some extent on the degree of photolysis. It can therefore be assumed, with a reasonable degree of confidence, that the photolytic reaction in this case likewise proceeds *via* addition of a water molecule at the 5,6 double bond. Furthermore, as in the case of uracil itself [9, 14], the failure to observe 100% reversibility is undoubtedly due to the presence of side reactions.

The behaviour of 1,3-dimethylthymine does not differ significantly from that of thymine itself [13] as concerns the *overall* photochemical reaction (see, however, Introduction and ref. [18]).

The quantum yields for photolysis of 5,6-dimethyluracil, and 1,3,5,6-tetramethyluracil are quite low. The former exhibits no reversibility at all; while the slight thermal reversibility observed for the latter is probably without significance and due, most likely, to traces of 1,3,6-trimethyluracil.

*6-amino-uracil and thymine.* Neither of these compounds exhibits thermal reversibility following photolysis. They are of interest in that 6-aminothymine, at pH values where the amino group is not dissociated, is the most sensitive of all pyrimidine derivatives hitherto investigated with a quantum yield of the order of 0.15 (Fig. 2). Upon dissociation of the amino group, the quantum yield drops radically and is of the order of  $10^{-3}$  for both compounds<sup>3</sup>.

*3-methyluridine* behaves both qualitatively and quantitatively like uridine [20]; the quantum yield is  $19.5 \times 10^{-3}$  and thermal reactivation is 100%. This is likewise what one would expect from the behaviour of 1,3-dimethyluracil [20]. It is nonetheless of interest that, when the 3-position of the uracil ring is substituted in a nucleoside as in hydrogen bonding in a two-stranded nucleotide chain, the photochemical behaviour is unaltered.

*5-hydroxymethyluracil and 5-ribofuranosyluracil* are both relatively resistant to irradiation, the quantum yields being, respectively,  $1.6 \times 10^{-3}$  and  $2.3 \times 10^{-3}$ , as compared to  $0.4 \times 10^{-3}$  for thymine [13]. Neither compound exhibits reversibility.

*Uridine cyclonucleosides.* These compounds were originally investigated as models of cytosine nucleosides, the photochemical behaviour of which suggested the existence of appreciable hydrogen bonding between the 2-carbonyl of the pyrimidine ring and one of the carbohydrate hydroxyls [19]. The corresponding cytosine *cyclonucleosides* would, of course, be more appropriate models, but their extreme instability in aqueous solution [1, 2] rendered their use impossible for this purpose (see, however, below for behaviour of toluenesulfonyl salt of *cyclocytidine*).

The absorption spectrum and photochemical behaviour of  $O^2:2'$ -*-cyclocytidine* are illustrated in Fig. 3. Irradiation at pH 7 results in the disappearance of the characteristic absorption spectrum and the appearance of a new maximum at 2350 Å. This behaviour is in accord with that to be expected from uptake of a water molecule at the

---

<sup>3</sup> Because of its remarkably high sensitivity at alkaline pH, 6-aminothymine should be suitable for actinometry of resonance and germicidal lamps in those instances where it is necessary to measure low doses such as those required for inactivation of, e.g. transforming DNA.



5,6 double bond since the pyrimidine ring is in the quinone form [1a]. The maximum at 2350 Å therefore results from conjugation of the 2,3 double bond and the 4-carbonyl. A similar maximum is shown by the photoproducts of cytosine nucleosides (19) as well as by dihydrocytosine and its nucleosides, and by dihydrouracil in alkaline medium (Janion C. & Shugar D., in preparation) and due to analogous chromophores.

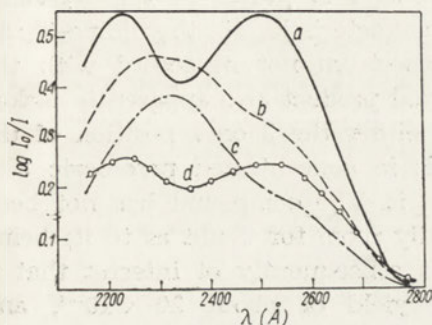


Fig. 3. Photolysis of  $O^2:2'$ -cyclo-uridine in 0.02 M phosphate buffer pH 7.2 at an intensity of  $2.1 \times 10^{-7}$  einstein/cm<sup>2</sup>/min.

- a ————— prior to irradiation  
 b - - - - - after 45 mins. irradiation  
 c - · - · - · after 75 mins irradiation  
 d - o - o - o - o photolysed solution heated 15 mins. at 80°

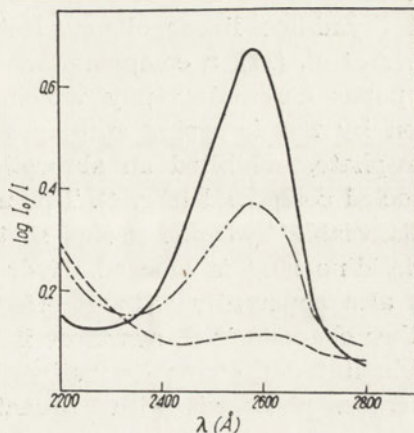


Fig. 4. Photochemical behaviour of unidentified thymidine derivative in 0.02 M phosphate buffer pH 7.2 at incident intensity of  $2.6 \times 10^{-7}$  einstein/cm<sup>2</sup>/min..

- before irradiation  
 - - - - - after 35 mins. irradiation  
 - · - · - · photolysed solution heated 3 hrs. at 80°

The band-width is greater than that of the preceding compounds because of the fact that the photoproduct of *cyclo-uridine* is itself photosensitive, as is clear from the difference between curves *b* and *c*, both of which consequently represent a mixture of *cyclo-uridine* and its primary photoproduct. The photoproduct exhibits appreciable thermal reversibility, as can be seen from curve *d*, which provides further supporting evidence for the foregoing interpretation of the reaction.

The behaviour of 2':3'-isopropylidene- $O^2:5'$ -*cyclo-uridine* is essentially similar to that for  $O^2:2'$ -*cyclo-uridine*, with the exception that the primary photoproduct (the maximum of which is at about 2500 Å as compared to 2375 Å for the parent substance) is even more photosensitive; and is therefore always present at a lower concentration during irradiation. Upon heating it reverts partially to the original compound.

*Thymidine derivatives.* In view of the indirect evidence from Wang's [18] work that the photolysis of 1,3-dimethylthymine proceeds at least partially *via* a transitory 5-hydro-6-hydroxy compound, it appeared of interest to examine 3-methylthymidine. No evidence of reversibility could, however, be detected. The compound is almost as resistant to irradiation as thymidine [13], the quantum yield being about  $0.3 \times 10^{-3}$ .

During the course of attempts to prepare thymidine-3':5'-phosphate and thymidine linear oligonucleotides, according to the procedures of Tener *et al.* [17], a compound was isolated from both reaction mixtures by paper chromatography which, although it possessed the  $R_F$ -value given by the foregoing authors as characteristic of thymidine-3':5'-phosphate, exhibited an absorption spectrum not in accord with the expected compound (Fig. 4). This unusual product also apparently lacked a dissociable hydroxyl group, so that either the 3 or 4 position of the pyrimidine ring is blocked. Hydrolysis in concentrated perchloric acid was also apparently without effect on it. The compound has not been further characterized, but there is hardly room for doubt as to its being a substituted thymine derivative. It is consequently of interest that it undergoes photolysis with a quantum yield of about  $20 \times 10^{-3}$ , and hence corresponding approximately to that for uridine and uridylic acid. Particularly striking is the fact that, even following almost complete photolysis (Fig. 4), the photoproduct may be thermally regenerated to give 50% of the parent compound.

*Isocytosine.* Irradiation of this compound in 0.02 M-phosphate buffer at neutral pH leads to a drop in extinction of both principal maxima at 2850 Å and 2650 Å, as well as an initial increase (up to about 15%) in absorption below 2450 Å. The quantum yield, based on the drop in absorption at 2850 Å, is about  $2.3 \times 10^{-3}$ . As in the case of cytosine in neutral, buffered, medium [19] the reaction is not reversible by heat. From our spectral data this appears to be due to formation of a thermolabile photoproduct with absorption maximum between 2300 Å and 2450 Å. In unbuffered medium, where photolysis of cytosine is partially reversible [11, 19], the behaviour of isocytosine does not differ from that in buffered solution.

Moore & Thomson [8] have reported that the photolysis of this compound may be reversed by acidification. We have attempted to repeat this, but with negative results.

*Isocytosine-1-β-D-arabinoside.* The behaviour of this derivative is of interest in relation to the suggestion previously advanced [19] regarding hydrogen bonding between O<sup>2</sup> of the pyrimidine ring and one of the carbohydrate hydroxyls in cytosine nucleosides and nucleotides,

a proposal based on the study of quantum yields of a series of nucleoside and nucleotide isomers. Hydrogen bonding of this type in isocytidine, viz.  $-\text{NH}_2 \dots \text{HO}-$ , would be much stronger than a bond of the type  $\text{C}=\text{O} \dots \text{HO}-$  and should consequently result in a considerable increase in quantum yield.

The quantum yield for isocytidine in neutral medium was, in fact, found to be considerably higher than for cytidine [19], the actual value

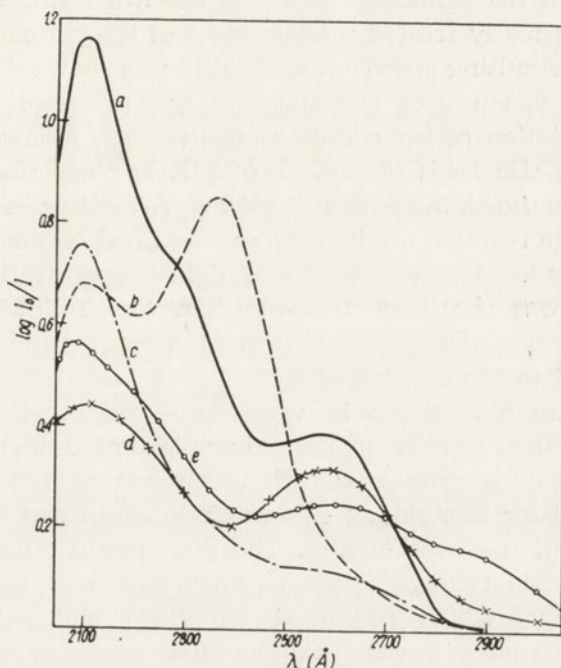


Fig. 5. Photochemical transformation of isocytosine-1- $\beta$ -D-arabinoside in 0.02 M phosphate buffer pH 7.2 at irradiation intensity of  $2.5 \times 10^{-7}$  einstein/cm<sup>2</sup>/min.,

*a* ————— prior to irradiation,

*b* - - - - - after 15 mins. irradiation,

*c* - · - · - · irradiated solution acidified to pH 2.3,

*d* -x-x-x-x irradiated acidified solution heated 3 hrs. at 54°,

*e* -o-o-o-o then neutralized to pH 7.2 (this same curve is obtained if the irradiated solution is not acidified, but heated at neutral pH for 80 mins. at 80°)

being 0.054 as compared to 0.01 for cytidine. The photoproduct also exhibits an absorption spectrum similar to that for the photoproduct of cytidine [19] with a principal maximum at 2360 Å. The photochemical behaviour of isocytidine is illustrated in Fig. 5.

The photoproduct of isocytidine is relatively stable at neutral pH and room temperature, under conditions where the photoproduct of cytidine

is unstable and reverts slowly to the original compound. Acidification to pH 2 likewise does not result in reversal to the extent prevailing for cytosine nucleosides; and even heating for 2 hours at 54° does not carry the "dark" reaction to completion. The absorption spectrum of the thermally treated photoproduct of isocytidine at acid pH (Fig. 5, curve d) does not correspond exactly to that for isocytidine itself in acid solution, the short wavelength maximum of the former being somewhat broader, while the ratio of the extinction values of the two maxima is altered. If the acidified, thermally treated photoproduct of isocytidine is brought to neutral pH, the resulting spectrum again differs somewhat from that for isocytidine (Fig. 5, curve c), and suggests the presence of some new compound. Irradiation of isocytidine at neutral pH, followed by heating at the same pH, also leads to curve c of Fig. 5. Since this curve shows a new, albeit ill-defined, maximum at 2850 Å, suggestive of the formation of isocytosine, the reaction products were examined chromatographically. This was done by irradiation at a 10-fold higher concentration (the course of the reaction was unaltered) in 1-mm. cuvettes, following which the reaction mixture was lyophilized, dissolved in several microliters water, and then applied to the chromatogram.

Ascending chromatography in water-saturated sec.-butanol showed that the thermally treated photoproduct is not isocytidine, its  $R_F$  (relative to that of isocytosine, which was taken as 1.0) being 0.28 as compared to 0.65 for isocytidine; this was also confirmed by elution and spectral examination of the eluates. The photoproduct itself has an  $R_F$  value of 0.53 (again relative to isocytosine), and was accompanied by a second faint spot which contained too little material for spectral analysis. The thermally treated photoproduct also exhibited a second faint spot, with a different  $R_F$  value.

The photolysis of isocytidine is consequently not reversible, although the conclusion which may be drawn from the above is that the photochemical reaction *does* involve addition of a water molecule to the 5,6 double bond. The resulting hydrated molecule loses this water molecule on acidification or heating, but is accompanied by some other reaction leading to the formation of a compound other than isocytidine.

As in the case of *cyclouridine* (see above) the absorption spectrum of the photoproduct of isocytidine is due to conjugation of the 2,3 double bond with the 4-carbonyl.

*1,3-dimethylcytosine* and *1,3,N<sup>6</sup>-trimethylcytosine*. As is to be expected, both these compounds exist in the imino form and are strongly basic, the pK for 1,3-dimethylcytosine being 9.25 [5]. The electron distribution densities in the rings are consequently quite different from that for the corresponding amino derivatives.

The photochemical behaviour of both the ionized (at pH 7) and the non-ionized (at pH 12) forms is non-characteristic, there being in both cases only a decrease in absorption with a quantum yield of about  $2 \times 10^{-3}$ . The reaction is non-reversible for both derivatives. In alcoholic solution the behaviour is likewise non-characteristic, as compared to cytosine which gives rise to a photoproduct possessing an absorption maximum at about 3000 Å [13].

Bearing in mind the fact that, in unbuffered medium, the photolysis of cytosine and 1-methylcytosine is partially reversible [11, 19], it may be concluded that the change in electron density in the cytosine ring, as a result of the change from the amino to the imino form, profoundly modifies the photochemical behaviour.

In view of the doubts which have been expressed as to whether cytosine and its nucleosides exist in whole or in part in the amino or imino form [7, 16], the above results may be regarded as indirect evidence in favour of the amino form in aqueous solution. There is considerable additional evidence, from spectral and titration data, that cytosine nucleosides exist *only* in the amino form, but we shall defer this subject to a separate communication.

*2':3'-isopropylidene-O<sup>2</sup>:5'-cyclocytidine tosylate*. *Cyclocytidine* itself is extremely unstable but the toluenesulfonyl salt of *cyclocytidine* is reasonably stable in neutral aqueous medium [2]. At first sight this compound appears to be an even more suitable model than the *cyclo-uridines* (see above) of cytosine nucleosides, whose photochemical behaviour suggested the involvement of hydrogen bonding between the pyrimidine carbonyl and a carbohydrate hydroxyl.

If such were to be the case, its photochemical behaviour is, indeed unusual. The quantum yield is  $0.8 \times 10^{-3}$ , and therefore one order of magnitude less than for cytidine. At neutral pH irradiation results only in a decrease in absorption of the two principal maxima at 2525 Å and 2210 Å with practically no change in the minimum at 2350 Å. This latter fact could conceivably be due to the formation of a photoproduct with absorption maximum at this wavelength; if so, its extinction is considerably lower than that to be expected, although this might be due to instability of the photoproduct. The instability of the *cyclocytidine* salt at elevated temperatures at neutral pH, and at room temperature for long periods at acid pH, made it impossible to conduct any direct tests for reversibility.

On the other hand, an examination of the absorption spectrum as a function of pH is of interest in relation to the above observations.

Spectral titration to pH 3 (which resulted in no detectable decomposition) showed no evidence for the existence of a dissociable amino group. Titration at alkaline pH was rendered impossible by the instantaneous decomposition of the compound as the pH approached 9, with the simultaneous formation of cytosine. At pH values below 8.6 decomposition was sufficiently slow to at least permit of the conclusion that the pK must be well above pH 9. Since the titration in acid medium shows the absence of a normal dissociating amino group (if it existed its pK would have to be below pH 2, a most unlikely possibility), it seems reasonable to conclude that the above compound is in the imino form and is therefore under no circumstances a suitable model for cytosine nucleosides, such as are the *cyclouridines*.

#### 5-SUBSTITUTED CYTOSINES, INCLUDING NUCLEOSIDES AND NUCLEOTIDES

In contrast to 5-substituted uracils and, in particular, their nucleosides and nucleotides, which normally undergo photodecomposition with rupture of the pyrimidine ring, the analogous 5-substituted cytosine derivatives exhibit one feature common to all, viz. the formation of relatively stable photoproducts containing the intact pyrimidine ring. The identification of these photoproducts would be of considerable interest, particularly in relation to photoreactivation amongst the T-even phages (see Concluding Remarks, below), but is not likely to be a simple task since it will require the irradiation of considerable quantities of some rather rare compounds. We believe, however, that the observations outlined below provide a starting point for further work in this field.

*5-methylcytosine and 5-hydroxymethylcytosine.* Irradiation of each of these substances leads to the formation of photoproducts with similar absorption spectra, the maxima of which are displaced somewhat to the red and with higher extinction coefficients. The photochemical reaction for both compounds is also pH dependent, with an optimum at about pH 9, while the photoproducts themselves are relatively stable at this pH.

The results of a typical experiment for 5-MC at pH 8.5 are shown in Fig. 6, from which it will be observed that the long wavelength shoulder of the principal absorption maximum is displaced to the red with a simultaneous increase in extinction (curve b). Under the conditions prevailing in this experiment the optical density at 2850 Å, where the increase in absorption is maximal, has increased by 75%. If irradiation is continued beyond this point, the entire absorption spectrum begins to exhibit a general decrease in extinction. Curve b in Fig. 6 therefore represents the point of maximum formation of photoproducts. Heating of the irradiated solution at this point at 80°C also leads to a decrease

in absorption and, after 105 mins. heating we get curve *c*, which is seen to represent mainly unchanged 5-MC.

Subtraction of curve *c* from curve *b* gives curve *d*, which is therefore the absorption spectrum of the photoproduct, with a principal absorption maximum at 2850 Å as compared to 2725 Å for the 5-MC, from which it was derived. It follows that the photoproduct is eventually destroyed by extensive heating.

The changes in absorption spectrum of 5-MC under the influence of irradiation may therefore be interpreted as follows. The initial photoproduct undergoes ring rupture slowly, but at a rate comparable to its

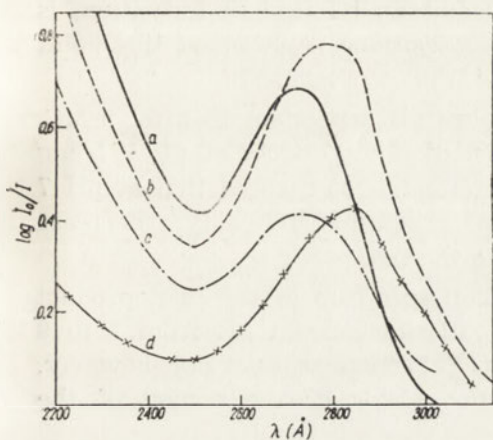


Fig. 6. Irradiation of 5-methylcytosine in 0.02 M phosphate buffer pH 8.5 at intensity of  $2.6 \times 10^{-7}$  einsteins/cm<sup>2</sup>/min.

- a* ————— prior to irradiation,  
*b* - - - - - after 110 mins. irradiation, leading to maximum increase in absorption at 2850 Å,  
*c* - · - · - · irradiated solution following heating for 100 mins. at 80°,  
*d* - x - x - x spectrum of photoproduct obtained by subtraction of curve *c* from curve *b*

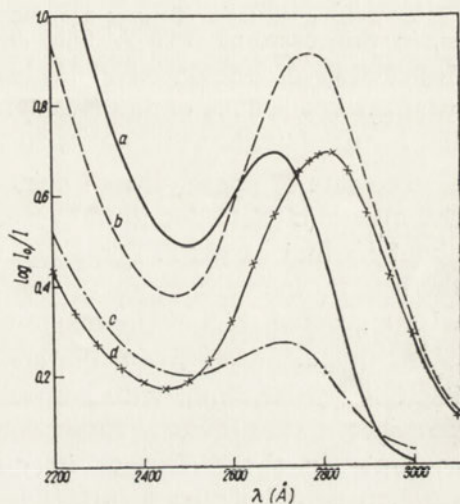


Fig. 7. Irradiation of 5-hydroxymethylcytosine in 0.02 M phosphate buffer pH 9.0 at intensity of  $2.6 \times 10^{-7}$  einsteins/cm<sup>2</sup>/min.,

- a* ————— before irradiation  
*b* - - - - - after 130 mins. irradiation leading to maximum increase in absorption at 2850 Å,  
*c* - · - · - · after heating irradiated solution for 5 hrs. at 80°,  
*d* - x - x - x spectrum of photoproduct, obtained by subtraction of curve *c* from curve *b*

rate of formation. Initially, therefore, we get mainly formation of photoproduct. As the reaction proceeds and the concentration of 5-MC decreases, the rate of formation of photoproduct decreases, while its *relative* rate

of destruction increases. Curve *b* of Fig. 6 corresponds to the equilibrium point.

It follows that heating of the photoproduct of 5-MC not only does not result in reversal of the photochemical reaction, but leads to complete disappearance of the absorption spectrum of the photoproduct. Acidification of the irradiated solution likewise does not result in reversal of the photoproduct to 5-MC, but transforms the former to a product with appreciable absorption in the range 2800—3100 Å. The effect of acid is instantaneous, as contrasted to the extensive heating required at pH 8.5.

The analogous spectral changes accompanying the photolysis of 5-HMC are shown in Fig. 7. The absorption maximum of the photoproduct is, in this case, at 2820 Å. The equilibrium point, at which the rate of destruction of photoproduct begins to surpass its rate of formation, is attained when 60% of the 5-HMC has undergone reaction; at this point the increase in absorption at 2820 Å is 170% (curve *b*, Fig. 7).

The rate of photolysis is somewhat less pH dependant than for 5-MC, the quantum yield for initial formation of photoproduct at pH 7 being about  $\frac{1}{2}$  that at pH 9. For 5-MC this effect is so marked that at pH 7 there is no increase in absorption upon irradiation, but only a decrease with a gradual shift of the maximum to the red.

In this same pH range the absorption spectrum of the photoproduct itself is hypochromic with respect to pH; increase in pH from 7 to 9 provokes a 15% increase in absorption. This increase does not, however, account for the difference in quantum yields or the course of the reaction as a function of pH.

The behaviour of the photoproduct of 5-HMC at elevated temperatures, as well as in acid medium, is completely analogous to that for the photoproduct of 5-MC. Heating results in decomposition with rupture of the pyrimidine ring but at a slower rate than for the photoproduct of 5-MC. The influence of 0.01 N-HCl is instantaneous, but the decomposition pathway is different, as may be inferred from the superposition on the spectrum of unreacted 5-MC of appreciable absorption in the region 2700—3200 Å.

At alkaline pH (pH 12) the photoproduct exhibits a stability comparable to that at the pH at which the rate of the photochemical reaction is a maximum.

Attempts to separate the components of the reaction mixture by paper chromatography and electrophoresis were unsuccessful. In connection with such attempts there was observed an interesting effect of concentration on the reaction rate for 5-HMC. This compound was irradiated at a concentration of 1.5 mg./ml. in a 10-mm. cuvette with air stirring.



Following irradiation with a dose which should have resulted in 10% photolysis, calculated on the basis of the photolysis rate of more dilute solutions, no observable change could be detected.

*5-hydroxymethyldeoxycytidylic acid.* The photochemical transformation undergone by this compound differs markedly from that for 5-HMC in several respects: (a) the transitory increase in absorption in the region 2700—3100 Å is slight, actually less than 3% at about 2850 Å; (b) there

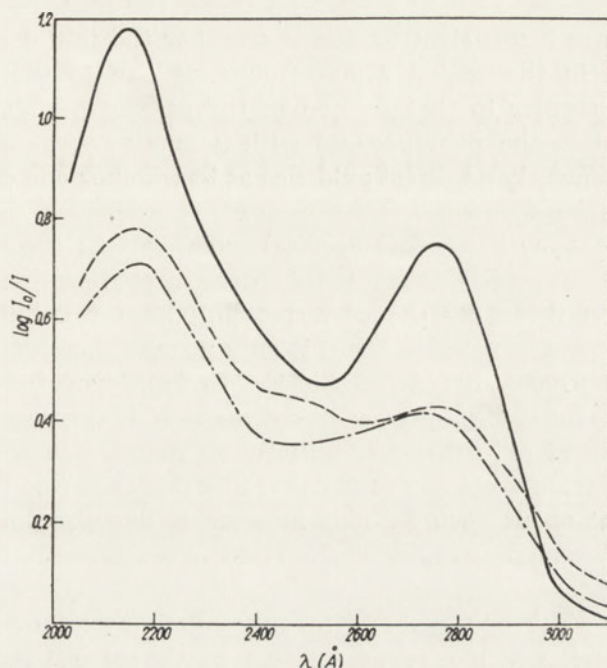


Fig. 8. Irradiation of 5-hydroxymethyldeoxycytidylic acid in 0.02 M phosphate buffer pH 7.2 at incident intensity of  $2.1 \times 10^{-7}$  einsteins/cm<sup>2</sup>/min.,

- before irradiation,
- - - following 12 hrs. irradiation,
- · - · irradiated solution heated 2.5 hrs. at 80°C

is no effect of pH on the formation of photoproducts exhibiting absorption in the region 2700—3100 Å; (c) as in the case of 5-HMGDCp (see below) the reaction involves the formation of a photoproduct with an absorption maximum in the neighbourhood of 2500 Å.

Fig. 8 demonstrates the spectral modifications accompanying the irradiation of 5-HMDCp at pH 7, as well as the effect of heating on the photoproduct. The behaviour at pH 9 is completely analogous with the exception that the quantum yield, calculated on the basis of the quantity of 5-HMDCp destroyed, is about  $1/2$  that at pH 7.

A comparison of the corresponding absorption spectra for 5-HMDCp and its glucosylated derivative (5-HMGDCp, see below Fig. 9) shows that the amount of photoproduct, absorbing at 2500 Å, formed when photochemical equilibrium is attained, is considerably less for 5-HMDC. The photoproduct is thermolabile and heating at elevated temperatures results in its eventual destruction, presumably to the accompaniment of ring rupture. There is no evidence of reversal of the photoproduct to the original compound under the influence of heat.

Our data are insufficient to decide whether the initial small increase in absorption in the region 2700—3100 Å is due to the formation of photoproduct similar to that formed in the case of 5-HMC, or whether this is related to the photoproduct with a maximum at about 2500 Å. There is consequently no direct evidence as to whether one or two defined photoproducts are formed.

*5-methyldeoxycytidine.* The spectral modifications accompanying the photochemical transformation of this derivative bear an even lesser resemblance to those for the corresponding base than in the case of 5-HMDCp. In neutral solution there is only a small increase in absorption in the region 2700—3100 Å, amounting to less than 10% at 2850 Å, following which the absorption over the entire spectral range begins to decrease.

By contrast, at pH 9 there is initially an increase in absorption over the entire spectrum with, as in the case of 5-HMGDCp (see below, Fig. 9), a maximum at about 2500 Å. This increase is likewise small (less than 10%) and subsequent irradiation leads to a decrease in height of the entire spectrum.

Heating at pH 7 or 9 resulted in only relatively minor modifications in the spectrum, which reverted to that of the parent substance, thus indicating that the amount of photoproduct(s) formed was not appreciable.

*5-hydroxymethyl-(O-glucosyl)-deoxycytidylic acid.* Irradiation of this compound at pH values from 7 to 8.5 provokes a general increase in absorption, which is particularly marked at 2850 Å where it attains 50% of the initial absorption. Further irradiation leads to a general decrease in absorption which is most pronounced at 2750 Å and 2350 Å. The net result is the ultimate formation of a new maximum at about 2550 Å.

Paper chromatography of the irradiated solution throws some light on the transformations involved. In ascending chromatography with ethanol-1M-ammonium acetate (5:2, v/v) three spots are observed. One of these with  $R_F$  of 0.17 corresponds to unchanged compound; a second, weaker spot with an  $R_F$  of 0.29 exhibits a maximum at 2550 Å; while the third, which fluoresces light blue on the paper under the ultraviolet lamp, and tails from the start almost to the spot with  $R_F$  0.17, exhibits only end absorption in the ultraviolet.

Spectral examination of the spot with  $R_F$  0.29, which we shall refer to as photoproduct 1 (or  $P_1$ ) showed that it did not possess a potentially dissociable amino group.

Attempts to obtain partial reversal of the reaction by heating were negative. In fact, the photoproduct itself is somewhat thermolabile. Following several hours heating at  $80^\circ$ , the absorption spectrum of the

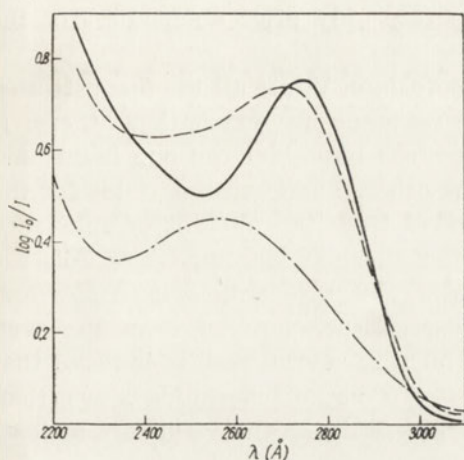


Fig. 9 (a). Irradiation of 5-hydroxymethyl-(O-glucosyl)-deoxycytidylic acid in 0.02 M phosphate buffer pH 8.5 at incident intensity of  $2.6 \times 10^{-7}$  einsteins/cm<sup>2</sup>/min.

———— prior to irradiation,  
 - - - - after 4 hrs. irradiation,  
 - · - · - after 23 hrs. irradiation.

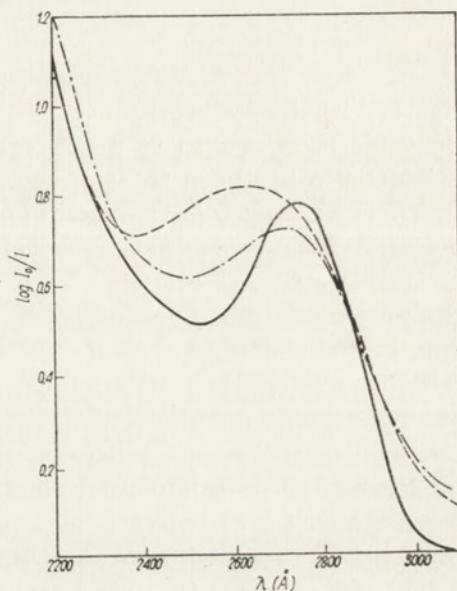
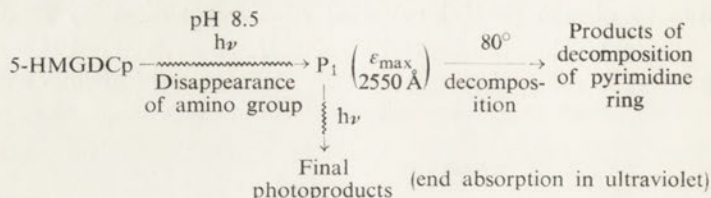


Fig. 9 (b). Irradiation of 5-HMGDCp (————) under conditions as in Fig. 9 (a) to point of maximum increase in absorption at 2550 Å (— — —), followed by heating of solution 4 hrs. at  $80^\circ\text{C}$  to decompose photoproduct (— · — · —)

irradiated solution closely resembles that of the non-irradiated control, with the exception that the optical density is lowered to an extent depending on the prior irradiation dose. If the irradiated solution is heated at the point where the increase in absorption has attained its maximum of 50%, the resultant drop in optical density at 2700 Å corresponds to a destruction of about 10% of the starting substance. Chromatography of such a heated solution shows that  $P_1$  has been destroyed.

Despite the thermolability of the photoproduct in neutral solution, it is relatively stable in acid medium (pH 2) at room temperature.

Although the above observations do not enable us to characterize the nature of  $P_1$  or of the photochemical reaction, the following scheme represents roughly the changes resulting from irradiation:



$P_1$  is relatively resistant to irradiation and its photochemical decomposition sets in at a noticeable rate only after about 10% of the 5-HMGDCp has been transformed.

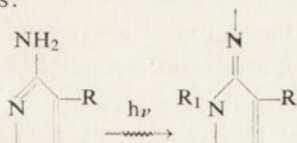
*Quantum yields for 5-substituted cytosines.* While all the 5-substituted cytosine derivatives are relatively resistant to irradiation, there is a considerable difference between the free bases on the one hand and the nucleosides and nucleotides, on the other. The quantum yields for the free bases in neutral solution, calculated from the amount of substance left in the irradiation mixture after thermal decomposition of the photoproduct, is of the order of  $2$  to  $3 \times 10^{-3}$ . For the nucleosides and nucleotides the spectral data alone are insufficient to calculate even moderately accurate quantum yields; but the overall results indicate that for 5-HMGDCp the yield is at least one order of magnitude lower than for the free bases, while for 5-MDC and 5-HMDCp the yields are at least 5-fold less than for the free bases.

#### CONCLUDING REMARKS

There is no doubt, from the spectral data, that the photoproducts of all the 5-substituted cytosine derivatives possess the intact pyrimidine ring with an unsaturated 5,6 double bond, as in the parent substances. They are therefore not 5-hydro-6-hydroxy derivatives of the parent substances, as is the case for the photoproducts of a variety of cytosine nucleosides and nucleotides unsubstituted in the 5-position.

The marked effect of pH on photoproduct formation in the case of the free bases, as well as the sensitivity of these photoproducts to acid, both suggest that the amino group has been modified in such a way as to increase its basicity. Since, following photolysis, a change in pH from 9 to 7 is only partially reversible, while an increase in pH from 7 to 9 results in a definite hyperchromic effect (which is not exhibited by the parent substances in this pH range), the functional group responsible for this effect must have a pK several units higher than that for the amino group of the parent substances. Bearing in mind the fact that the

absorption maxima of the photoproducts are displaced about 100 Å. from those of the parent substances, and comparing these observations with the pK and absorption spectra of 1,3-dimethylcytosine, we are led to the conclusion that the properties of the photoproduct are due to rearrangement as follows:



although the imino group is not necessarily a free one. The instability of this ionized photoproduct would then account for the decrease in quantum yield from pH 9 to 7.

For the nucleosides and nucleotides it is also clear that the nature of the photoproducts is quite different from that for the free bases. Characteristic is the disappearance of a dissociable amino group, although we have no evidence to suggest that simple deamination is involved. Furthermore, the data are insufficient to decide whether the formation of these photoproducts does not proceed *via* intermediates such as those formed by irradiation of the free bases.

Further clarification of the nature of the photoproducts must obviously await the preparation of quantities large enough to submit to chemical and other physico-chemical analyses.

Turning now to the question of photoreversibility in nucleic acids and, in particular, its *in vivo* counterpart of biological photoreactivation, the observations collected here considerably expand our knowledge of the behaviour of various pyrimidine derivatives under the influence of irradiation, and hence also of the *possible* behaviour of those which may be incorporated in polynucleotide chains. Due caution must, of course, be exercised in extending these results to polynucleotides because of the numerous secondary factors which may influence the behaviour of a given aromatic ring in a chain where it is subject to the interaction of its neighbours, as well as to hydrogen bonding of various types. The profound effect of methylation on reversibility in 6-methyluracil is an excellent illustration of the subtlety in behaviour of some derivatives. Even more striking is the example of the unidentified derivative of thymine (i.e. 5-methyluracil), where reversibility is again induced, as a result of substitution on the ring.

While the application of the above results to nucleic acids may at first sight appear a rather difficult task, it is by no means an insurmountable one. Reversible photolysis of pyrimidine rings in nucleic acids has actually been demonstrated. It is now necessary to obtain some idea of the behaviour of each individual ring as a function of its position

in a nucleotide chain and of the nature of its neighbours. The various methods which have been developed during the past few years for the enzymatic and chemical syntheses of nucleotide chains, in many instances of defined length and composition, provide a sizeable number of models for such studies. One such investigation on homopolymers of uridylic acid of various chain lengths has already been made [20], and it is expected that the results of another study on homopolymers of the other common bases in RNA and DNA, as well as of several hetero-oligonucleotides, will shortly be made available (Wierzchowski K. L. & Shugar D. in prep.).

The apparent lack of reversibility in the 5-substituted cytosine derivatives requires special comment. In the preceding text we have used the term "thermolability" with respect to the primary photoproducts of these compounds, but it becomes necessary now to stipulate that this is so only in the strict physico-chemical meaning of the term. In actual fact, from a biological point of view, these photoproducts are remarkably stable at physiological temperatures. With respect to these compounds, therefore, we are confronted with a situation, where, although their photoproducts do not revert to the parent substances under the influence of heat, the pyrimidine ring has not suffered rupture, but is still intact, and has merely undergone substitution at some unknown position(s). In a biological system it is, consequently, still conceivable that some other mechanism for reversibility may come into play. And, in fact, reversibility of the effects of radiation on living organisms may be induced not only by light (photoreactivation) or heat, but also by a variety of other agents (for review see Ref. [4]). Hence, insofar as the T-even bacteriophages are concerned, such an eventuality must be considered if photo-reversibility is linked with the behaviour of the pyrimidine rings, bearing in mind the fact that the meagre data hitherto accumulated on the photochemical behaviour of the purines is such as to suggest only irreversible photodecomposition.

One final point is worthy of comment. The T-even bacteriophages contain only 5-substituted pyrimidine derivatives, for all of which the quantum yields are quite low and, in fact, of the same order of magnitude as for the purines. The radiation resistance of phage T<sub>2</sub> nucleic acid, and hence also of the corresponding bacteriophages, should thus be higher than those of other phages. Few observations exist on this score, except for a study by Zelle & Hollaender [21] on the quantum yields for inactivation of T<sub>1</sub> and T<sub>2</sub> phages from which it appears that the T<sub>2</sub> phage is indeed only 1/2 as sensitive as the T<sub>1</sub>.

---

We are indebted to Miss D. Barszcz and Mrs. Z. Marks for technical assistance in this work.

## SUMMARY

1. A study has been made of the photochemical behaviour of (a) Methylated uracils and cytosines (b) Methylated nucleosides (c) Isocytosine and its 1- $\beta$ -D-arabinoside (d) *Cyclonucleosides* of uracil and cytosine (e) 5-substituted cytosine nucleosides and nucleotides.

2. It has been shown that some 5 and 6 substituted uracil derivatives may give rise to reversible photoproducts.

3. The photochemical behaviour of *cyclouridines* is in agreement with that to be expected and includes the formation of reversible photoproducts.

4. The toluenosulfonyl salt of *cyclocytidine* does not give rise to reversible photoproducts. Its photochemical behaviour, and its titration in aqueous medium suggest that this compound exists in the imino form, like 1,3-dimethylcytosine.

5. Isocytosine and isocytidine do not form reversible photoproducts, but the photoproduct of the latter is a 5-hydro-6-hydroxy derivative of the parent compound.

6. 5-substituted cytosine nucleosides and nucleotides are relatively resistant to irradiation; they form photoproducts which, while not reverting to the parent substances under the influence of acid or heat, are relatively stable and contain the intact pyrimidine ring.

7. The results are discussed in relation to photoreversibility in nucleic acids and, in particular, to photoreactivation in the T-even phages.

8. Chromatographic and spectral methods are described for separation and identification of a variety of methylated uracils.

## REFERENCES

- [1] Andersen W., Hayes D., Michelson A. M. & Todd A. R. *J. Chem. Soc.* 1882, 1954.
- [1a] Brown D. M., Todd A. R. & Varadarian S. *J. Chem. Soc.* 868, 1957.
- [2] Clarke V. M., Zussman J. & Todd A. R. *J. Chem. Soc.* 2952, 1951.
- [3] Dulbecco R. in *Radiation Biology* (A. Hollaender, ed.), Vol. II, Chapt. 12, McGraw-Hill, New York, 1955.
- [4] Jagger J. *Bact. Rev.* 22, 99, 1958.
- [5] Kenner G. W., Reese C. B. & Todd A. R. *J. Chem. Soc.* 855, 1955.
- [6] McOmie J. F. W., Sayer E. R. & Chesterfield J. *J. Chem. Soc.* 1830, 1957.
- [7] Miles H. T. *Biochim. Biophys. Acta* 22, 247, 1956; 27, 46, 1958.
- [8] Moore A. M. & Thomson C. H. in *Progress in Radiobiology*, p. 75, Oliver and Boyd, Edinburgh, 1956.
- [9] Rorsch A., Beukers R., Ijlststra J. & Berends W. *Rec. trav. chim. Pays-Bas* 77, 423, 1958.
- [10] Shugar D. & Fox J. *J. Biochim. Biophys. Acta* 9, 199, 1952.
- [11] Shugar D. & Wierzchowski K. *Biochim. Biophys. Acta* 23, 657, 1957.
- [12] Shugar D. & Wierzchowski K. L. *J. Polymer Sciencē* 31, 269, 1958.
- [13] Shugar D. & Wierzchowski K. L. *Postępy Biochemii* 4, suppl., 243, 1958.

- [14] Sinsheimer R. L. & Hastings R. *Science* **110**, 525, 1949.  
[15] Sinsheimer R. L. *Radiation Research* **1**, 505, 1954.  
[16] Sinsheimer R. L., Nutter R. L. & Hopkins G. R. *Biochim. Biophys. Acta* **18**, 13, 1955.  
[17] Tener G. M., Khorana H. G., Markham R. & Pol E. H. *J. Am. Chem. Soc.* **80**, 6223, 1958.  
[18] Wang S. Y. *Nature* **184**, 59, 1959.  
[19] Wierzchowski K. L. & Shugar D. *Biochim. Biophys. Acta* **25**, 355, 1957.  
[20] Wierzchowski K. L. & Shugar D. *Acta Biochim. Polon.* **6**, 313, 1959.  
[21] Zelle M. R. & Hollaender A. *J. Bact.* **68**, 210, 1954.

DALSZE BADANIA NAD FOTOCHEMIĄ PIRYMIDYN ZE SPECJALNYM  
WZGLĘDNIENIEM 5 I 6 PODSTAWIONYCH POCHODNYCH W STOSUNKU  
DO FOTOREAKTYWACJI W BAKTERIOFAGACH T-PARZYSTYCH

Streszczenie

1. Zbadano fotochemiczne zachowanie się (a) metylowanych pochodnych uracylu i cytozyny, (b) metylowanych nukleozydów, (c) izocytozyny i jej 1- $\beta$ -D-arabinozydu, (d) cyklonukleozydów uracylu i cytozyny oraz (e) 5-podstawionych nukleozydów i nukleotydów cytozyny.

2. Wykazano, że pewne pochodne uracylu podstawione w pozycji 5 lub 6 ulegają odwracalnej reakcji fotochemicznej.

3. Fotochemiczne zachowanie się cyklicznych nukleozydów uracylu jest zgodne z oczekiwanym. Fotoprodukty rozkładają się z odtworzeniem wyjściowej substancji.

4. Toluenosulfonowa sól cyklocytydyny nie ulega odwracalnej przemianie fotochemicznej. Zarówno sama przemiana jak i miareczkowanie tego związku w środowisku wodnym sugerują występowanie w postaci iminowej, podobnie jak 1,3-dwumetylocytozyny.

5. Izocytozyna i izocytydyna nie tworzą w czasie reakcji fotochemicznej fotoproduktów rozkładających się z odtworzeniem substancji macierzystej. Jednak w przypadku izocytydyny fotoprodukt jest jej 5-hydro-6-hydroksy pochodną.

6. 5-podstawione nukleozydy i nukleotydy cytozyny są względnie odporne na działanie promieniowania. Ich fotoprodukty, chociaż nie odtwarzają macierzystych substancji pod wpływem kwasu lub podwyższonej temperatury, to jednak są względnie trwałe i zawierają nienaruszony pierścień pirymidynowy.

7. Przeprowadzono dyskusję wyników z punktu widzenia fotoreaktywacji kwasów nukleinowych a w szczególności fotoreaktywacji parzystych T-fagów.

8. Opisano chromatograficzne i spektrofotometryczne metody identyfikacji i rozdziálu szeregu metylowanych pochodnych uracylu.

Otrzymano 3.12.1959 r.



B. BARTOSIŃSKI

**NOWA CHROMATOGRAFICZNA METODA ROZDZIAŁU  
RYBOFLAWINY OD JEJ NUKLEOTYDÓW I MOŻLIWOŚĆ  
ZASTOSOWANIA JEJ OD OZNACZANIA AKTYWNOŚCI  
FLAWOKINAZY\***

*Katedra Biochemii Wyższej Szkoły Rolniczej w Poznaniu  
Kierownik Katedry: doc. dr J. Pawelkiewicz*

Ryboflawina (Rb) funkcjonuje w metabolizmie w postaci flawinoadeninodwunukleotydu (FAD) lub flawinomononukleotydu (FMN). Pod wpływem działania światła ryboflawina ulega fotolizie, której produktami są między innymi lumichrom lub lumiflawina. Ze znanych dotychczas używanych metod rozdziału ryboflawiny od jej nukleotydów, względnie produktów fotolizy, wymienić można metodę Burch, Bessey'a i Lowry'ego [1] opartą na różnicy współczynników podziału FMN i ryboflawiny między wodę a alkohol benzyłowy. Technika ta pozwala na rozdzielenie stosunkowo większych ilości flawin, jest jednak dość skomplikowana i wymaga odpowiedniej aparatury. Do rozdziału flawin stosowana jest chromatografia bibułowa [5, 8, 10]. Autor niniejszej pracy stwierdził, że metody te często nie dają powtarzalnych wyników. Rozdzielone, np. metodą chromatograficzną flawiny z *Nocardia erythropolis* i *Nocardia lutea* (rozpuszczalnik *n*-butanol, kwas octowy lodowaty, woda, 4:1:5) przy powtórnym chromatografowaniu ponownie rozdzielały się na dwie frakcje. Peel rozdzielał flawiny metodą elektroferozy bibułowej [15]. Technika ta wymaga odpowiedniej aparatury, pozwala jednak na rozdzielenie większych ilości tych związków. Cerletti i Ipata [2] rozdzielali ryboflawinę od jej nukleotydów przy pomocy wymiennika jonowego Amberlite I. R. C. 50. Sposób ten jest szybki, ale nie pozwala na rozdzielenie nukleotydów flawinowych. Moffatt i Khorana [11] rozdzielali ostatnio preparatywnie nukleotydy flawinowe na kolumnach z dwuetyloaminoetylo-celulozą. W pracy niniejszej przedstawiono nową

\* Wygłoszono jako doniesienie na III Międzynarodowym Sympozjum Witaminowym, Poznań, 21—24 wrzesień, 1959.

bardzo szybką metodę chromatograficznego rozdzielania ryboflawiny od jej nukleotydów i produktów fotolizy, opartą na rozdzielaniu związków flawinowych na bibule impregnowanej tymolem względnie fenolem. Metodę tę zastosowano do badania aktywności flawokinazy w materiale mikrobiologicznym. Wiadomo, że w organizmie zwierzęcym i roślinnym ryboflawina ulega fosforylacji [3, 4, 6, 7, 9, 16] katalizowanej przez flawokinazę. Autor stwierdził obecność tego enzymu w *Propionibacterium shermanii*. Brak metody, która pozwalałaby na szybkie rozdzielanie flawin, utrudniało oznaczenie aktywności flawokinazy. Opracowana technika rozdzielania flawin dobrze nadaje się do tego celu.

#### CZEŚĆ DOSWIADCZALNA

##### *Chromatograficzny rozdział związków flawinowych*

Opierając się na chromatograficznym rozdzielaniu korfiryn podanym przez Pawełekiewicza i Walerycha [13], opracowano sposób szybkiego rozdzielania flawin metodą chromatografii bibułowej i kolumnowej.

*Chromatografia bibułowa.* Do celów analitycznych stosowano chromatografię bibułową z odwróconą fazą, to jest taki układ chromatograficzny, w którym fazę nieruchomą stanowią związki fenolowe, jakimi impregnowano bibułę, a fazę ruchomą nasycone wodne roztwory odpowiednich fenoli. Arkusze bibuły Whatman Nr 1, 2 i 4 nasycano 4% alkoholowym roztworem tymolu lub fenolu. Po wysuszeniu bibuły w temperaturze pokojowej wykrawano paski chromatograficzne zwykle lub paski wg Matthiasa [12], albo krążki chromatograficzne i наносzono kroplę roztworu flawin o stężeniu około 0,11 mm. Celem lepszego uwidocznienia наносzono flawiny kilkakrotnie i suszono w strumieniu chłodnego powietrza jak to podał Peel [15].

Jako standardy używano następujące związki flawinowe: ryboflawina i FAD (Nutritional Biochemicals Corporation, Cleveland, Ohio), FMN otrzymany z kultur promieniowca *Nocardia lutea*<sup>1</sup>, lumiflawina otrzymana z ryboflawiny wg. metody Vogela [17].

Chromatogramy rozwijano nasyconymi wodnymi roztworami tymolu lub fenolu. Dobre rozdzielanie ryboflawiny od nukleotydów flawinowych i lumiflawiny uzyskano przy użyciu wszystkich stosowanych bibuł. Najszybsze rozdzielanie uzyskano przy stosowaniu techniki spływowej i bibuły Whatman 4, dobrze widoczny rozdział następował w czasie około 10 minut. Rozdział FAD od FMN wymaga jednak stosunkowo dłuższego czasu (około jednej godziny), ponieważ wartości  $R_f$  są dla obu związków zbli-

<sup>1</sup> B. Bartosiński, dane nieopublikowane.

żone. Do rozdziału FAD od FMN szczególnie nadaje się technika krążkowo-paskowa, wg. Matthiasa [12]. Dobre rozdziały flawin uzyskano również stosując technikę krążkową. Uzyskane wartości  $R_F$  podaje tablica 1.

Tablica 1

*Wartości  $R_F$  flawin w dwóch układach chromatograficznych*

Flawiny rozdzielano metodą paskowo-krążkową, wg Matthiasa [12] na bibule Whatman 2. Czas rozdziału 45 minut

Flawina	Bibuła impregnowana tymolem, rozpuszczalnik: woda nasycona tymolem	Bibuła impregnowana fenolem, rozpuszczalnik: woda nasycona fenolem
Ryboflawina	0,37	0,68
FAD	0,85	0,92
FMN	0,83	0,90
Lumiflawina	0,05	0,07

Po rozwinięciu chromatogramu paski bibuły suszono, przemywano chloroformem celem usunięcia związku fenolowego, eluowano 0,01 N-buforem octanowym o pH 5,5 i flawiny oznaczano ilościowo w fluorymetrze Kletta.

Aby sprawdzić dokładność i użyteczność metody, wykonano następujące doświadczenie: Na impregnowaną tymolem bibułę Whatman Nr 2 naniesiono w postaci wąskiego pasma o długości 5 cm 0,1 ml roz-

Tablica 2

*Ilościowe oznaczenie flawin po rozdziale chromatograficznym*

Chromatografowano mieszaniny równych ilości 0,1 mM-ryboflawiny i 0,1 mM-FAD. Wyniki wyrażone są w skali fluorymetru Kletta wobec roztworu standardowego siarczanu chininy (0,1 mg siarczanu chininy w 100 ml 0,1 N-H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>)

Naniesiona objętość 0,1 mM-roztworu	Ryboflawina	FAD
0,1 ml	62	60
0,2 ml	120	123

tworu flawin, zawierającego mieszaninę równych ilości 0,1 mM-roztworu FAD i ryboflawiny, w drugim miejscu bibuły naniesiono 0,2 ml tej mieszaniny również w postaci wąskiego pasma o długości 5 cm. Po wysuszeniu pasm, chromatogram rozwijano techniką spływową w czasie około 20 minut. Po wysuszeniu bibuły pasma rozdzielonych flawin wycinano, przemywano je chloroformem, eluowano 0,01 M-buforem octanowym o pH 5,5 i oznaczano fluorymetrycznie. Oznaczone w eluatach ilości flawin

odpowiadały ilościom flawin naniesionych. Znalezione wyniki (Tabl. 2) potwierdziły możliwość ilościowego oznaczania flawin podaną metodą.

*Chromatografia kolumnowa.* Opisana wyżej metoda nadaje się tylko do celów analitycznych. Dla rozdziału flawin, również w celach preparatywnych, opracowano chromatografię kolumnową. Proszek celulozowy (Whatman Standard Grade) impregnowano 8% alkoholowym roztworem tymolu, używając na 1 g proszku 2 ml roztworu, proszek następnie suszono w temperaturze pokojowej, rozcierano w moździerzu dla rozbicia grudek i zawieszano w wodnym nasyconym roztworze tymolu. Zawiesinę wlewano do kolumny chromatograficznej i po odcieknięciu płynu silnie ubijano bagietką. Przygotowaną kolumnę wysokości około 10 cm kilkakrotnie przemywano wodnym nasyconym roztworem tymolu. Następnie na kolumnę наносzono 2 ml mieszaniny równych ilości 0,1 mM roztworu FAD i ryboflawiny; kolumnę chromatograficzną rozwijano wodnym nasyconym roztworem tymolu, rozdzielone pasma wmywano wodnym nasyconym roztworem tymolu, a zebrane frakcje przenoszono ilościowo do kolbek miarowych o pojemności 25 ml. Czas analizy wynosił około 5 minut. W eluatach oznaczano flawiny przy pomocy spektrofotometru Uvispek H 700 w kiuwetach o długości 40 mm przy długości fali 445 m $\mu$ . Odnajdywano średnio 101% ryboflawiny (w granicach 100—103%) i 102% FAD (w granicach 100-103%). W celu sprawdzenia rozdzielonych frakcji wymyte flawiny chromatografowano na impregnowanej tymolem bibule Whatman Nr 2. Frakcje FAD i ryboflawiny okazały się czyste.

#### *Oznaczanie aktywności flawokinazy*

Badania przeprowadzano na wyciągach z *Propionibacterium shermanii*. 10-12-dniową kulturę bakteryjną hodowaną metodą Pawelkiewicza i Zodrów [14] wirowano 20 minut przy 6000 obr./min., osad komórek bakteryjnych наносzono cienką warstwą na płytę szklaną i bakterie suszono 2 dni w temperaturze pokojowej. Bakterie następnie usuwano z płyty i rozcierano z proszkiem szklanym. Na 10 g wysuszonych bakterii dawano zwykle 5 g proszku szklanego. 2 g dobrze rozartych bakterii ekstrahowano w temperaturze 4° z 15 ml wody destylowanej, wirowano przy 10 000 g 5 minut, osad odrzucano, a płyn używano do badań. Prowadzono też z dobrym wynikiem badania z wyciągami enzymatycznymi uzyskiwanymi z proszku acetonowego z *Propionibacterium shermanii*. Proszek acetonowy otrzymywano w następujący sposób: 8-10-dniową kulturę bakteryjną wirowano 20 minut przy 6000 obr./min., osad komórek bakteryjnych zawieszano w małej ilości wody i stopniowo wlewano do 20-krotnej objętości oziębionego do około -15° acetonu. Całość mieszało jeszcze 10 minut, sączono przez sączek piankowy G3 i kilkakrotnie

przemywano zimnym acetonem. Otrzymany w ten sposób preparat suszono 24 godziny w temperaturze pokojowej i ekstrahowano jak wyżej podano.

Inkubację przeprowadzano wg. Giri, Appaji Rao i Deb [6]. Do mieszaniny zawierającej 0,5 ml 1,0 mM-ATP, 0,5 ml 0,3 mM-MgSO<sub>4</sub>, 0,5 ml 0,1 M-NaF, 1,0 ml 0,1 mM-ryboflawiny i 3,5 ml 0,1 M-buforu weronałowego o pH 8,0 dodawano 4 ml wyciągu enzymatycznego i inkubowano 3 godzin w temperaturze 37°. Reakcję przerywano dodając 2 ml 30% kwasu trójchlorooctowego. Całość wirowano, a określoną część klarownego płynu (np. 0,1 ml) chromatografowano jak podano wyżej. Ilość powstałego FMN oznaczano fluorymetrycznie. Jako standard używano siarczanu chininy (0,1 mg siarczanu chininy w 100 ml 0,1 N-H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>). Ilość pow-

Tablica 3

*Aktywność flawokinazy w wyciągach z Propionibacterium shermanii*  
Szczegóły inkubacji i rozdziału chromatograficznego w tekście

Nr doświadczenia	Czas inkubacji (godz.)	Ilość powstałego FMN*
1	4	53
2	8	72
3	12	76
4	16	89
5	26	163

\* Podane wartości są wyrażone w skali fluorymetru Kletta.

stałego w 9 próbach FMN wynosiła średnio 43,5 (w skali fluorymetru Kletta) wahając się między wartościami 36 i 51. Obliczony błąd pojedynczego pomiaru wynosił  $\pm 4,9$ , tj. 11,2%, a średni błąd średniej wartości wynosił 1,8, tj. 4,1%. Przeprowadzono też badania nad aktywnością flawokinazy w czasie 26-godzinnej inkubacji. Uzyskane wyniki tych badań podaje tablica 3.

#### DYSKUSJA

Stosowane dotychczas metody rozdziału flawin wymagają dość dużo czasu. W pracy niniejszej zastosowano metodę chromatografii z odwróconą fazą wykorzystując istniejące tutaj różnice współczynników podziału flawin między związki fenolowe a wodę. Fenol jest używany do ekstrakcji flawin z materiału biologicznego [18], przypuszczano więc, że bibuła nasyciona związkami fenolowymi będzie się nadawała do rozdziału związ-

ków flawinowych. Dane eksperymentalne potwierdziły to przypuszczenie. Z powodzeniem rozdzielano ryboflawinę od jej nukleotydów i produktów fotolizy na paskach bibuły impregnowanych fenolem lub tymolem. Technika tą można także szybko identyfikować flawiny wydobyte z materiału biologicznego. Modyfikacja tej metody polegająca na rozdzielaniu flawin na kolumnach wypełnionych proszkiem celulozowym impregnowanym tymolem pozwala preparatywnie rozdzielać ryboflawinę od nukleotydów flawinowych. Raz przygotowaną kolumnę można używać wielokrotnie, przemywając ją po każdorazowym użyciu wodnym nasyconym roztworem tymolu. Technika chromatografii bibułowej można rozdzielić ryboflawinę od nukleotydów flawinowych i lumiflawiny w czasie około 10 minut, metodą chromatografii kolumnowej w czasie 5 minut. Zaletą przedstawionej metody jest również jej taniocść i prostota. Nadaje się ona do celów ilościowych. Zastosowano z powodzeniem tę metodę do oznaczania aktywności flawokinazy (mierzonej ilością powstałego FMN) w materiale mikrobiologicznym. Średni błąd pojedynczego pomiaru aktywności enzymatycznej wynosił dla nisko aktywnych preparatów enzymatycznych otrzymanych z *Propionibacterium shermanii*  $\pm 11,2\%$ , a średni błąd średniej wartości  $\pm 4,1\%$ .

Autor pragnie wyrazić podziękowanie Doc. dr. J. Pawelkiewiczowi za liczne rady i wskazówki, oraz Fundacji Rockefellera za otrzymane odczynniki i aparaturę.

#### STRESZCZENIE

Opracowano bardzo szybką metodę chromatograficznego rozdzielania ryboflawiny od FMN względnie FAD i lumiflawiny. Metoda ta nadaje się również do rozdzielania nukleotydów flawinowych, lecz wymaga dłuższego czasu. Rozdział przeprowadza się na paskach bibuły impregnowanej fenolem lub lepiej tymolem, a fazą ruchomą są nasycone wodne roztwory odpowiednich fenoli. Podana metoda nadaje się również do celów ilościowych. Zastosowano ją do badania aktywności flawokinazy w materiale mikrobiologicznym.

#### LITERATURA

- [1] Burch H. B., Bessey O. A., Lowry O. H. *J. Biol. Chem.* **175**, 457, 1948.
- [2] Cerletti P., Ipata P., IV Internationaler Kongress für Biochemie, Wien, 1958. Streszczenia, 8/36, str. 93.
- [3] Giri K. V., Krishnaswamy P. R., Appaji Rao N. *Nature*, London, **179**, 1134, 1957.
- [4] Giri K. V., Krishnaswamy P. R., Appaji Rao N. *Biochem. J.* **70**, 66, 1958.

- [5] Giri K. V., Krishnaswamy P. R. *J. Indian Inst. Sci.* **38**, 232, 1956.  
[6] Giri K. V., Appaji Rao N., Deb A. K. *Naturwiss.* **45**, 340, 1958.  
[7] György P. *Proc. Soc. exp. Biol. Med.* **35**, 207, 1936.  
[8] Huennekens F. M., Felton S. P. w *Methods in Enzymology*, wyd. S. P. Colowick., O. N. Kaplan., tom III, 950, Academic Press, New York, 1957.  
[9] Kearney E. B., Englard S. *J. Biol. Chem.* **193**, 821, 1951.  
[10] Kilgour G. L., Felton S. P., Huennekens F. M. *J. Am. Chem. Soc.* **79**, 2254, 1957.  
[11] Moffatt J. G., Khorana H. G. *J. Am. Chem. Soc.* **80**, 3756, 1958.  
[12] Matthias W. *Naturwiss.* **41**, 17, 1954.  
[13] Pawelkiewicz J., Walerych W. *Acta Biochim. Polon.* **6**, 441, 1959.  
[14] Pawelkiewicz J., Zodrow K. *Acta Biochim. Polon.* **3**, 225, 1956.  
[15] Peel J. L. *Biochem. J.* **69**, 403, 1958.  
[16] Pulver R., Verzär F. *Enzymologia* **6**, 333, 1939.  
[17] Vogel H. *Chemie und Technologie der Vitamine*, str. 260, T. Enke-Verlag, Stuttgart, 1943.  
[18] Warburg O., Christian W. *Biochem. Z.* **298**, 150, 1938.

NEW CHROMATOGRAPHIC METHOD FOR THE SEPARATION OF RIBOFLAVIN FROM ITS NUCLEOTIDES AND THE AVAILABILITY OF THE METHOD TO THE ESTIMATION OF THE FLAVOKINASE ACTIVITY

Summary

A very quick chromatographic method for separation of riboflavin from flavin nucleotides and from lumiflavin was elaborated. The procedure can also be applied to separate flavin nucleotides one from another, but it requires more time. The separation is carried out on filter paper strips impregnated with phenol or (preferably) with thymol. Saturated aqueous solution of one of the two phenol compounds is used as the mobile phase. The method is also suitable for quantitative analysis. It has been applied in investigations on flavokinase activity in microbiological material.

Otrzymano 16.12.1959 r.

