

T. CHOJNACKI and T. KORZYBSKI

THE INCORPORATION OF ^{32}P -LABELLED PHOSPHORIC ESTERS OF GLYCEROL, CHOLINE, ETHANOLAMINE, AND SERINE INTO PHOSPHOLIPIDS OF GUINEA PIGS TISSUES *IN VITRO*

Department of Evolutional Biochemistry, Institute of Biochemistry and Biophysics of the Polish Academy of Sciences, Warsaw

Since the early study on phospholipid biosynthesis *in vitro*, an observation was made that the ability of tissues to incorporate ^{32}P into phospholipids depends greatly on the presence of undestroyed tissue structure. In the study of Fishler *et al.* [8] the incorporation of ^{32}P -orthophosphate into liver phospholipids took place only in slices. The homogenization of the tissue led to the complete loss of the ability to synthesize phospholipids. Homogenization of brain tissue also brought about a considerable lowering of ^{32}P incorporation into phospholipids [10, 18].

The authors cited above did not mention, however, whether the lowered biosynthesis of phospholipids in ground tissue was due to the inhibition of the synthesis of phosphoric precursors, or the second step was involved, i.e. the incorporation of phosphoric esters into lipid acceptors. In the present paper an attempt was made to answer whether the homogenization of tissue did affect the synthesis of phospholipids at the stage of the incorporation of phosphoric esters. The effect of structural changes brought about by freezing and thawing was also studied. Liver tissue was used in the experiments; the intense biosynthesis of phospholipids in this organ being well known. Furthermore the incorporation of phosphoric esters into phospholipids in other undestroyed tissues of guinea pig and their ability to hydrolyze the esters were studied.

EXPERIMENTAL

Labelled substrates

^{32}P -phosphocholine ($^{32}\text{PChol}$)¹. This was obtained by the method of Riley [17]. The solution of $\text{KH}_2^{32}\text{PO}_4$ (0.03 ml. containing 3.8 mg. P, 1.8 mc)

¹ Abbreviations used: PChol, phosphocholine; PEt, phosphoethanolamine; PSer, phosphoserine; α -GP, α -glycerophosphate.

was added to 99 mg. of choline hydrochloride and 101 mg. P_2O_5 . The mixture was heated at 155° for 15 hr. under reduced pressure (glass filter pump), hydrolyzed with 2-3 ml. of water in boiling water bath for 15 min., then pH was adjusted to 10 by addition of several ml. of saturated hot $Ba(OH)_2$ solution. The precipitated barium phosphate was centrifuged and washed twice with 5 ml. portions of water. To the combined (25 ml.) solutions 50 ml. of cold (-20°) absolute ethanol were slowly dropped in and the mixture left for 24 hr. at -20° . The crystals of barium $^{32}PChol$ were washed with some ml. of ethanol (60, 80 and 100 per cent, successively) and dried in a desiccator over KOH. The yield of the synthesis was about 30 per cent of the used amount of $KH_2^{32}PO_4$. For each experiment a fresh solution of sodium salt of $^{32}PChol$ was prepared by precipitation of Ba^{2+} ions with a small excess of 0.5 M-Na_2SO_4 . The specific activity of the used $^{32}PChol$ was $5 \cdot 10^4$ to $4 \cdot 10^5$ imp./min./ $\mu\text{mol P}$.

^{32}P -phosphoethanolamine (^{32}PEt). This was prepared according to Artom [1] by heating 0.15 ml. of ethanolamine with 0.1 ml. of $Na_2H^{32}PO_4$ solution (0.34 mg. P; 1.9 mc), and with an excess of P_2O_5 (326 mg.). The mixture was heated for 3 hr. at 185° and pressure 20 mm. Hg. The hydrolysis and the precipitation of barium phosphate were performed as described for $^{32}PChol$. The combined solutions (about 100 ml.) were applied on Dowex-1-formate column (11×1.2 cm.). The column was washed with 100 ml. of water, then ^{32}PEt eluted with 0.05 M -formic acid. The eluate containing ^{32}PEt was evaporated to dryness in a desiccator over KOH. For experiments the dry residue was dissolved in water and pH adjusted to 7 with 0.1 N-NaOH . The specific activity of ^{32}PEt ranged from $2.4 \cdot 10^4$ to $3.1 \cdot 10^4$ imp./min./ $\mu\text{mol P}$.

^{32}P -phosphoserine ($^{32}PSer$). This was prepared according to the method of Levene & Schormüller [13] and purified on column chromatography according to Borkenhagen & Kennedy [3]. The solution of $Na_2H^{32}PO_4$ (0.05 ml.; 0.75 mg. P; 1 mc) was added to 100 mg. of DL-serine hydrochloride, then 189 mg. of P_2O_5 were added and after mixing left for 72 hr. at room temperature. The mixture was then dissolved in 2-3 ml. of water, heated on a boiling water bath for 15 min. and saturated hot solution of $Ba(OH)_2$ was added to reach pH about 10. The precipitate of barium phosphate was centrifuged and washed 10 times with 5 ml. portions of water. The supernatant, and subsequent washings were combined (about 70 ml.) and applied on a Dowex-1-formate column (11×1.2 cm.). The column was washed with about 150 ml. of water. The total radioactivity of the solution was adsorbed on the ion exchange resin. The elution of $^{32}PSer$ was performed by the gradient elution with formic acid. The mixing chamber contained initially 300 ml. of water, and 0.5 M-HCOOH was

placed in the reservoir. Portions of 10 and 25 ml. were collected under continuous control of a counter for β -radiation which was placed on the tube attached to the column. It made thus possible to follow directly the course of elution of ^{32}P compounds. The fraction containing ^{32}P Ser (between 265 and 315 ml. from the beginning of the elution) was eva-

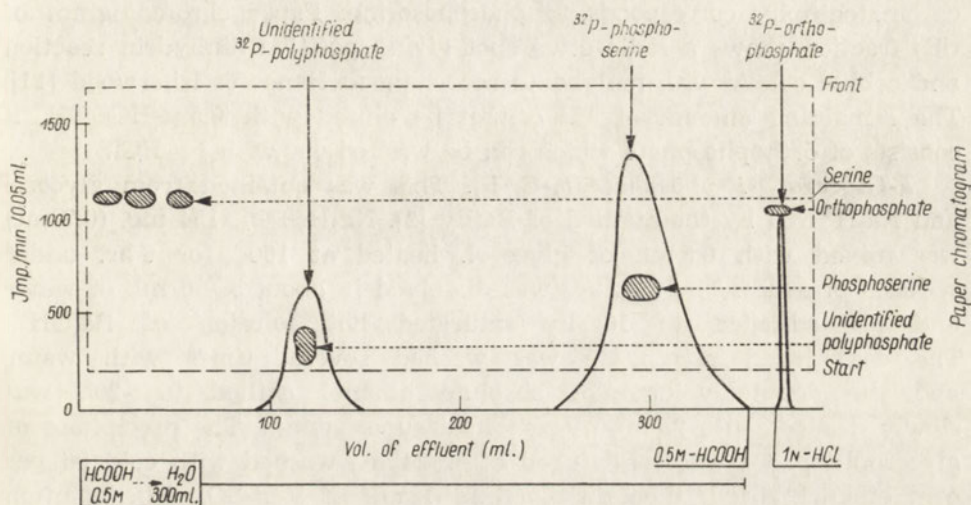


Fig. 1. The column chromatography of ^{32}P Ser on the ion exchange resin Dowex-1-formate. The scale of radioactivities of different fractions is shown on the left of the figure, the full line curve corresponds to it. The position of the chromatographic spots of different fractions is shown on the right. Paper chromatogram was developed in the following solvent system: isopropanol 75 ml., water 25 ml., trichloroacetic acid 5 g. and conc. ammonia 0.3 ml. (cf. the text)

porated to dryness in a desiccator over KOH. The specific activity of sodium salt of ^{32}P Ser used in the experiments amounted to $1.8 \cdot 10^4$ to $3.9 \cdot 10^4$ imp./min./ $\mu\text{mol P}$.

The results of column chromatography of ^{32}P Ser were similar to those obtained by Borkenhagen & Kennedy [3]. According to these authors the fraction between 240 and 288 ml. contained phosphoserine. In our experiment the phosphoserine fraction was similarly eluted although it contained only 2/3 of the radioactivity applied on the column. To identify the remaining phosphorus compounds, the paper chromatography was carried out, and also the elution of free serine was studied. The column chromatography and the paper chromatogram of all the eluted fractions are presented in Fig. 1. It can be seen that free serine is eluted from the column within the first 75 ml., all other fractions do not contain it. The first radioactive fraction appears between 100 and

130 ml. of the eluate, and in the paper chromatography it has a low R_F value and does not react with ninhydrin. In the used solvent system for the paper chromatography polyphosphates reveal a similar low R_F [7]. They may arise during addition of P_2O_5 to the reaction mixture when in spite of continuous cooling with ice local temperature has been likely to be too high. The second radioactive peak observed in the course of column chromatography corresponds to phosphoserine. Paper chromatogram of this fraction shows a radioactive spot giving positive ninhydrin reaction and a blue colour with molybdate according to Hanes & Isherwood [11]. The remaining amount of ^{32}P cannot be eluted with 0.5 N-HCOOH, it consists of orthophosphate which can be washed out with 1 N-HCl.

α -Glycero- ^{32}P -phosphate (α -G ^{32}P). This was obtained from glycerol and $Na_2H^{32}PO_4$ by the method of Bailly [2]. $Na_2H^{32}PO_4$, 154 mg. (0.7 mc) was mixed with 0.5 ml. of glycerol, heated at 160° for 6 hr. under reduced pressure. The mixture was dissolved in about 5 - 6 ml. of water and pH adjusted to 10 by saturated hot solution of $Ba(OH)_2$. The centrifuged precipitate was washed several times with water and the double volume of absolute ethanol chilled to -20° was slowly dropped into 25 ml. of combined supernatants. The precipitate of glycerophosphate was centrifuged after 24 hr., washed with cold 96 per cent ethanol, dried, then dissolved in 1 ml. of N- H_2SO_4 . The solution was heated for 1 hr. on a boiling water bath, the volume being always made up to the original one with water. Glycerophosphate thus prepared contained about 90 per cent of the form α (determined with the Burmaster's method [4]). The solution of sodium glycerophosphate as used in experiments was prepared by 20-fold dilution of a stock solution with water, then neutralized with 0.1 N-NaOH. The specific activity of α -G ^{32}P amounted to $4 \cdot 10^4$ to $3.4 \cdot 10^5$ imp./ μ mol P.

Paper chromatography

The identification of the obtained labelled esters of phosphoric acid was achieved by paper chromatography on Whatman No. 1 filter paper by adding the respective unlabelled and chromatographically pure compounds (PChol, PEt and PSer obtained according to Plimmer and Burch [16], Outhouse [15], and Neuhaus & Korkes [14], respectively and a commercial sample of α -GP, BDH) to the applied solutions. Two-dimensional chromatography according to Dawson [6] was applied, the first descending run: phenol saturated with 0.1 per cent ammonia solution; the second ascending run: ethanol - conc. ammonia - water (61 : 29 : 10 v/v). Also an ascending chromatography according to Ebel [7] was applied with two systems; the acid solvent: isopropanol 75 ml., water 25 ml., trichloroacetic

acid 5 g., conc. ammonia 0.3 ml., and the alkaline solvent: *n*-propanol 30 ml., ethanol 30 ml., water 39 ml., conc. ammonia 1 ml.

To follow the cleavage of labelled esters during incubation the ascending paper chromatography on Whatman No. 1 filter paper and the solvent systems of Ebel [7], or phenol saturated with 0.1 per cent ammonia was used. In the last case the start line was placed 10 cm. above the border of the paper, and the time of the development being prolonged to 36 hr.

To localise the radioactive spots the chromatograms were placed in contact with X-ray film for a suitable period of time. To detect the phosphoric compounds the spots were developed with molybdate [11]. The chromatograms were sprayed with the solution of ninhydrin (0.2 g. of ninhydrin, 95 ml. of butanol and 5 ml. of glacial acetic acid) in order to detect the spots of serine and ethanolamine as well as P_{Ser} and P_{Et}.

Incubation and assays

The incorporation of ^{32}P labelled esters into phospholipids was studied in (1) tissue fragments 1 - 1.5 mm. thick, cut by means of scissors a few minutes after killing and removing the organ of guinea pig, (2) similar tissue fragments but frozen by placing them in test tubes surrounded with dry ice for 5 min., then warmed to 37° in a water bath, (3) homogenates of tissue obtained by grinding it for 2 - 3 min. in a Potter-Elvehjem homogenizer with a mixture of 0.13 M-NaCl, 5 mM-KCl, 1.2 mM-MgSO₄, 0.8 mM-CaCl₂ and 10 mM-phosphate buffer pH 7. This solution which was used by Freinkel [9] in his study on the incorporation of ^{32}P -orthophosphate into phospholipids of thyroid gland slices, is very similar to the phosphate Krebs-Ringer solution. Experiments with ^{32}P Chol led to the conclusion that the changes in reciprocal ratios among Na⁺, K⁺, and Mg²⁺ in the isotonic solution brought about the decrease in the rate of incorporation of labelled ester into phospholipids by tissue fragments and homogenates.

Either 0.5 g. portions of the tissue fragments added to 0.4 ml. portions of Freinkel's salt solution, or 0.9 ml. of the homogenate were incubated with 1 μmole of the labelled substrate (0.1 ml.) in test tubes (16 × 120 mm.) on a 37° water bath with constant stirring. At definite intervals the incubation was stopped by an addition of 2 ml. of ethanol and heating for 1.5 min. on a boiling water bath. Then the tissue fragments were homogenized. These as well as the deproteinized homogenates were centrifuged, the sediments washed twice with 3 ml. of 70 per cent ethanol and the supernatants combined.

The aqueous and the chloroform extracts were obtained according to Dawson's procedure [5]. To obtain an aqueous extract the combined

supernatants were shaken vigorously for 5 min. with 25 ml. of chloroform, then the upper phase was collected and paper chromatography was made. In order to obtain the total lipids the lower chloroform layer was added to the washed sediments and the extraction was carried out for 20 min. under reflux with constant boiling. The extract was filtered through glass wool, then the clear filtrate cooled and washed twice with double volumes of 0.1 N-HCl. Layers having been separated, the upper one was completely sucked out by means of a pipette and discarded. The two fold washings with diluted hydrochloric acid proved to remove completely the water soluble radioactive impurities out of the chloroform phase. The first washing contained about 0.5 per cent of the radioactivity added as $^{32}\text{PChol}$ to the incubation mixture. The second one contained no radiophosphorus. Samples of chloroform phase containing lipids were placed on tin planchets 2 cm. in diameter and after evaporation their radioactivity was measured by means of BAT 25 β -counter with a mica window (4 mg./cm.²). The content of phosphorus in the chloroform extract was assayed with the King's method [12] after digestion with 0.8 ml. of perchloric acid (3-6 hr. at 150-160°).

RESULTS

The incorporation of labelled phosphoric esters into phospholipids of liver tissue and the effect of destroying its structure upon the process is presented in Fig. 2. About 10-15 experiments were performed with $^{32}\text{PChol}$, $\alpha\text{-G}^{32}\text{P}$, and ^{32}PEt for each one, but only the results of the experiments made simultaneously with two or three labelled esters on the same liver are presented. The same change in phospholipid biosynthesis depending on the preparation of the liver sample was observed in all the experiments.

The maximum amounts of ^{32}P incorporated into phospholipids of the undestroyed liver tissue were not the same in various individuals. The maximum incorporation of $^{32}\text{PChol}$ and $\alpha\text{-G}^{32}\text{P}$ was about 1-2 per cent of the amount of ester added and 0.5-1 per cent for ^{32}PEt . For a better comparison of parallel experiments on different animals the values of specific activity are expressed in terms of per cent, the maximum value for each substrate used being considered as 100. The absolute specific activity values which correspond to 100 of the figure 2 are presented in the table 1. In all experiments the freezing and thawing of the tissue (columns filled with parallel full lines) greatly impaired the ability to incorporate ^{32}P -precursor into phospholipids. The homogenization (columns filled with points) resulted also in a lowered biosynthesis. The most remarkable effect of destroying tissue structure was observed with

$^{32}\text{PChol}$ incorporation. In the case of $\alpha\text{-G}^{32}\text{P}$ and ^{32}PEt the incorporation into phospholipids of liver was lower but still distinct.

Two experiments were made with $^{32}\text{PSer}$. As is seen in Fig. 2 (exp. No. 1) the homogenization of tissue brings about an increase of incorporation on the contrary to other phosphoric esters.

The $^{32}\text{PChol}$ and ^{32}PEt incorporation was still raising for 3 hr. and even 6 hr. lasting incubation. On the contrary, in the experiments with $\alpha\text{-G}^{32}\text{P}$ the radioactivity of phospholipids observed after 1 hr. was somewhat lower and that found after 3 hr. was considerably lowered (the data are not presented in Fig. 2).

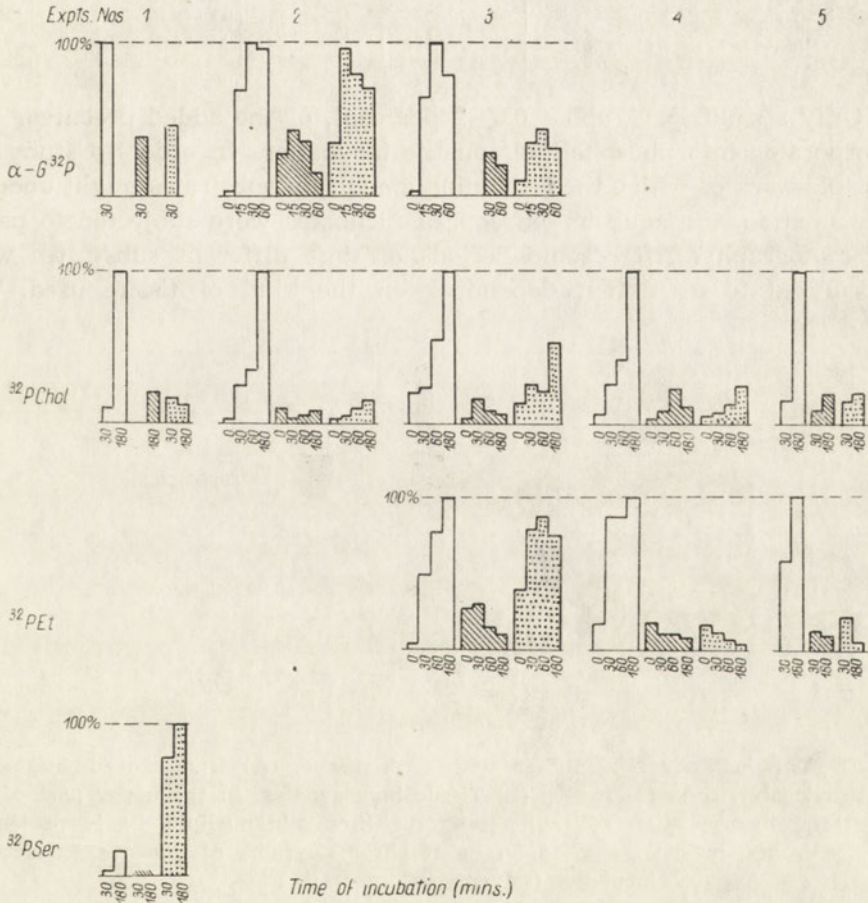


Fig. 2. Specific activities of phospholipids extracted from guinea pig liver after various periods of incubation with $\alpha\text{-G}^{32}\text{P}$, $^{32}\text{PChol}$, ^{32}PEt and $^{32}\text{PSer}$ in relation to different ways of preparation of the tissue: undestroyed fragments (plain columns), frozen tissue (columns striated), and homogenized tissue (columns covered with points). Specific activity (imp./min./mg.P) expressed as per cent of the maximum value for each experiment and a given substrate

Table 1

Specific activities of phospholipid fractions considered as 100 in the Fig. 2

It is assumed that the specific activity of all the esters is identical, namely 10^5 imp./min./ μ m. P. Calculations are based on this assumption in view of different specific activities of the substrates

Incubation with	Specific activity (imp./min./mg. lipid P)				
	Exp. 1	Exp. 2	Exp. 3	Exp. 4	Exp. 5
α -G 32 P	5950	1210	2580	—	2450
32 PChol	4810	3340	1910	3810	640
32 PEt	—	—	580	2470	—
32 PSer	1780	—	—	—	—

Only a small part, about 0.5 - 2 per cent, of the added precursor was incorporated into phospholipids on the incubation. In order to study the possible changes which the remaining amount of substrates might undergo on incubation, the aqueous extracts of incubates were subjected to paper chromatography. After some periods of time different substrates were hydrolyzed to an extent depending on the kind of tissue used. The

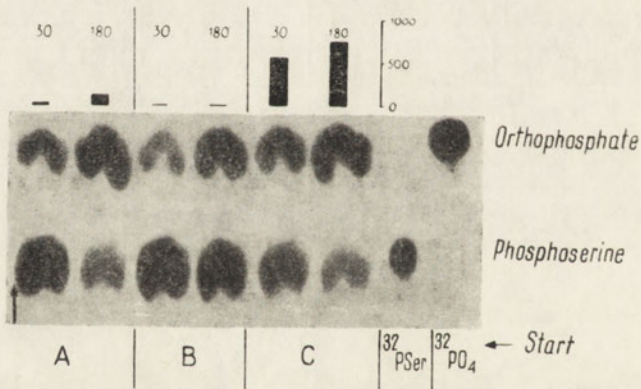


Fig. 3. The incubation of 32 P Ser with liver tissue. (A) Undestroyed fragments, (B) Previously frozen fragments, (C) Tissue homogenates. In the upper part of the figure the incorporation of radiophosphorus (imp./min./mg. lipid P) is presented. The lower one presents autoradiogram of chromatograms of aqueous extracts of incubates (solvent system as in Fig. 1)

extent of dephosphorylation did not depend on the way of preparing the tissue sample. The autoradiograms of chromatograms of the aqueous extracts of different organs incubated with labelled substrates are presented in the Figs. 3 and 4.

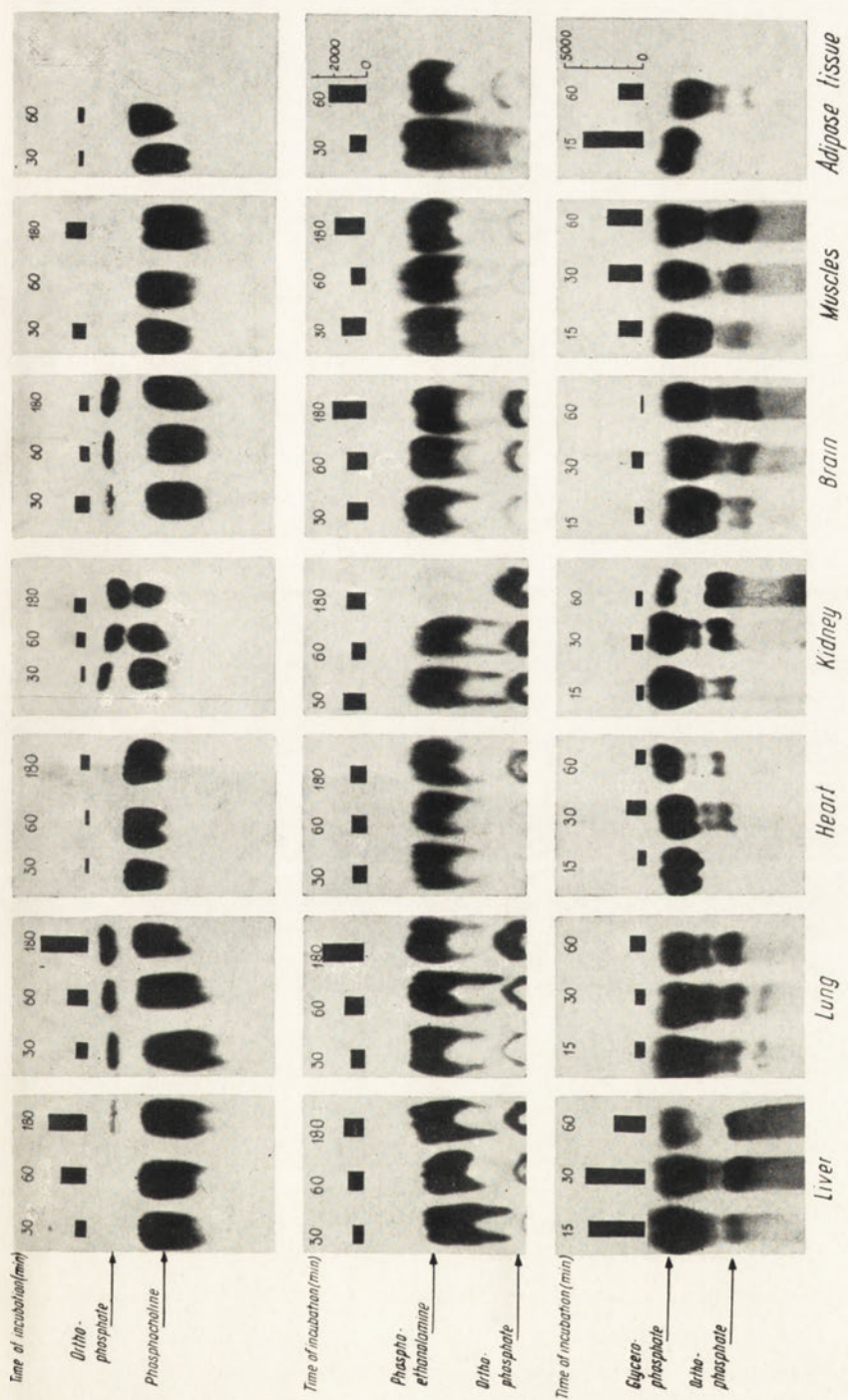


Fig. 4. The autoradiogram of the chromatograms of aqueous extracts after incubation of tissues with: (1) $^{32}\text{PChol}$, (2) ^{32}PET , and (3) $\alpha\text{-}^{32}\text{P}$. The incorporation of radiophosphorus into phospholipids (imp./min./mg.lipid P) is presented as columns above the respective autoradiograms. These values are calculated assuming that the specific activity of the esters used is equal, namely: 10^5 imp./min./ $\mu\text{m.P}$. For chromatography of aqueous extracts the following solvent systems were used: expt. (1) isopropanol 75 ml, water 25 ml, trichloroacetic acid 5 g, and conc. ammonia 0.3 ml.; expt. (2) phenol saturated with 0.1 per cent ammonia solution; expt. (3) *n*-propanol 30 ml, ethanol 30 ml, water 39 ml., and conc. ammonia 1 ml.

Phosphocholine is almost not hydrolyzed at all by liver tissue during 3 hr. incubation (Fig. 4), traces of ^{32}P present in orthophosphate spot probably derived only from the polyphosphates decomposed, representing the impurities of the $^{32}\text{PChol}$ preparation. The liver tissue during 3 hr. brings about only a low degree of cleavage of ^{32}PEt (Fig. 4). The great part of $\alpha\text{-G}^{32}\text{P}$ after 1 hr. incubation with liver tissue fragments is hydrolyzed to orthophosphate (Fig. 4). Thirty minutes after mixing liver tissue with $\alpha\text{-G}^{32}\text{P}$, i.e. in the time of maximum incorporation of radio-phosphorus into phospholipids the rate of the cleavage is still a slight one. In the chromatogram of aqueous extract of the incubate with $\alpha\text{-G}^{32}\text{P}$ the presence of third radioactive spot of an unidentified substance may be observed besides that of orthophosphate. The liver tissue brings about a conspicuous cleavage of $^{32}\text{PSer}$ to orthophosphate (Fig. 3).

$^{32}\text{PChol}$ is hydrolyzed to a greatest extent by kidney tissue (Fig. 4), less by lung and brain and no cleavage was observed with muscle and heart. Adipose tissue (omentum) like liver hydrolyzes $^{32}\text{PChol}$ to a minute extent only.

^{32}PEt is hydrolyzed to the greatest extent by kidney, less by lung and liver whereas heart muscle and brain hydrolyzes it to a slight degree only (Fig. 4). There was no cleavage of ^{32}PEt in incubates of striated muscle and of adipose tissues.

$\alpha\text{-G}^{32}\text{P}$ is dephosphorylated at a fairly high degree by lung, liver, kidney, brain and striated muscle. There is no hydrolysis of $\alpha\text{-G}^{32}\text{P}$ or a small one only with heart muscle and adipose tissues. Liver, lung, brain and adipose tissues with $\alpha\text{-G}^{32}\text{P}$ bring about the appearance of an unidentified phosphorus compound giving a spot placed between glycerophosphate and orthophosphate besides the usual orthophosphate spot (Fig. 4).

The incorporation of labelled substrates into phospholipids in different tissue fragments is presented in the upper parts of Figs. 3 and 4. In the experiments with $^{32}\text{PChol}$ a continuous (during 3 hr) rise of specific activity of phospholipids in the following tissues is observed: liver, lung, kidney, striated and heart muscle. They rise for the first half an hour only in brain and adipose tissues.

In the experiments with ^{32}PEt a continuous rise of the specific activity of phospholipids can be observed in liver, lung, brain and adipose tissues. In the remaining tissues the specific activities measured after 30 min., 1 hr., and 3 hr. do not show any significant difference.

In the experiments with $\alpha\text{-G}^{32}\text{P}$ it was shown that the lowering of the specific activity of phospholipids in the tissues investigated, which is observed since the first incubation hour is parallel to the cleavage of glycerophosphate.

Table 2

Specific activities of phospholipids from fractions of liver obtained from fragments incubated with $^{32}\text{PChol}$ for 3 hr.

Details in the text

	imp./min./mg. lipid P			Mean value of the ratio of specific activity of phospholipids of the fraction to that of the whole homogenate
	Exp. 1	Exp. 2	Exp. 3	
Whole homogenate	4980	1550	1240	
Fraction I (500 g)	2520	1000	1130	0.69 ± 0.12
Fraction II (15,000 g)	4600	1460	1320	0.98 ± 0.04
Fraction III (supernatant)	5900	1720	1280	1.11 ± 0.05

Using $^{32}\text{PChol}$ and the undestroyed liver tissue an attempt was made to find which part of cellular structures did exhibit the greatest ability to incorporate the ester into phospholipids. Fragments of liver that had previously been incubated with $^{32}\text{PChol}$ for 3 hr. were homogenized at 0° with 0.25M-saccharose solution. The homogenates were centrifuged and the following fractions obtained: (I) The sediment obtained at 500 g, (II) the sediment obtained at 15 000 g, and (III) the supernatant of the sediment II. The specific activities of phospholipids of the whole homogenate and of the fractions were estimated by means of methods described above. It may be seen in table 2, that during the incubation a greater incorporation into phospholipids occurs to the fractions II and III.

DISCUSSION

The findings concerning the *in vitro* incorporation of the examined esters into phospholipids of the undestroyed liver fragments of guinea-pig lead to the conclusion that PChol and PEt are incorporated into phospholipids without the previous dephosphorylation. When $\alpha\text{-G}^{32}\text{P}$ is the substrate the isotope incorporation into phospholipids depends on the amount of the ester. The specific activity of phospholipids diminishes with the progress of the hydrolysis of glycerophosphate. In the experiments with PSer the liver hydrolyzes the greater part of the ester to orthophosphate. As the cleavage of $^{32}\text{PSer}$ is progressing the specific activity does not decrease as it is observed with $\alpha\text{-G}^{32}\text{P}$. It is difficult to evaluate to what extent the incorporation of $^{32}\text{PSer}$ as a whole molecule does occur, or to what extent the radioactivity of phospholipids is due to the synthesis from orthophosphate.

In the experiments on the cleavage of $^{32}\text{PChol}$, ^{32}PEt and $\alpha\text{-G}^{32}\text{P}$ by different tissues *in vitro* it has been found that they bring about different degrees of dephosphorylation of the esters. These differences were also found by Strickland *et al.* [19] in extracts of brain, liver, kidneys, prostate and intestine mucosa at an optimum pH for alkaline and acid phosphatase and at high concentrations of the substrates. In our experiments the amounts of the substrates incubated with the tissues were very small, resembling thus the amounts of endogenous substrates present in investigated sample and the pH was close to that of the tissue. Thus the results may provide a better approach to the dephosphorylation processes of the esters in various organs.

The lowered phospholipid synthesis resulting from the mechanical destruction of cell structure leads to the conclusion, that the metabolism of these compounds is connected with the overall function of the cell. The effect of homogenization on the intensity of incorporation of $^{32}\text{PChol}$, ^{32}PEt and $\alpha\text{-G}^{32}\text{P}$ is found to be independent on the kind of medium used to homogenize tissues (isotonic saccharose solution, isotonic solutions with different ratios of K^+ , Na^+ and Mg^{2+}). During the incubation of liver tissue with $^{32}\text{PSer}$ only an increased incorporation of ^{32}P into phospholipids was observed after homogenization.

The changes observed in tissues on freezing and thawing resulted in a greater inhibition of the incorporation of the esters into phospholipids than homogenization did. It should be mentioned that it was not due to the diminished penetration of the labelled esters into previously frozen tissue fragments. The determination of ^{32}P contents in tissue fragments after incubation with $^{32}\text{PChol}$ washed twice with 10 ml. portions of 0.9 per cent NaCl led to the conclusion that the diffusion of the ester into the tissue was not decreased by freezing. Concentrations of $^{32}\text{PChol}$ in the tissue and in the medium were equal after 2 - 3 hr. incubation.

It seems that such a great degree of sensibility of the processes of phospholipid synthesis towards the agents which affect tissue structure do not find any analogy in other metabolic pathways.

SUMMARY

The incorporation of ^{32}P labelled glycerophosphate, phosphocholine and phosphoethanolamine into phospholipids of guinea pig liver *in vitro* was several times lower when the tissue was either placed for 5 min. in dry ice and then thawed or homogenized. The homogenization led to the several times higher incorporation when phosphoserine was substrate. Maximum yield of $^{32}\text{PChol}$ and $\alpha\text{-G}^{32}\text{P}$ incorporation into phospholipids amounted to 1 - 2 per cent, the values for ^{32}PEt and $^{32}\text{PSer}$ were 1 per cent and 0.5 per cent, respectively.

It was found that after a three hour incubation of the fragments of liver tissue with the substrates an intense dephosphorylation of $^{32}\text{PSer}$ and $\alpha\text{-G}^{32}\text{P}$ and a small one of $^{32}\text{PChol}$ and ^{32}PEt took place. Among other tissues that of kidney brought about a complete hydrolysis of all the esters.

REFERENCES

- [1] Artom C., in *Methods in Enzymology*, (S. P. Colowick & N. O. Kaplan eds.) 4, 815, Academic Press, New York, 1957.
- [2] Bailly O., *Ann. Chim. Paris* 6, 96, 1916
- [3] Borkenhagen L. F. & Kennedy E. P., *J. Biol. Chem.* 234, 849, 1959.
- [4] Burmaster C. F., *J. Biol. Chem.* 164, 233, 1946.
- [5] Dawson R. M. C., *Biochem. J.*, 59, 5, 1955
- [6] Dawson R. M. C., *Biochem. J.* 61, 552, 1955
- [7] Ebel J. P., *Bull. Soc. Chim. Biol.* 34, 321, 1952
- [8] Fishler M. C., Taurog A., Perlman I. & Chaikoff I. L., *J. Biol. Chem.* 141, 809, 1941
- [9] Freinkel N., *Biochem. J.* 68, 327, 1958
- [10] Fries B. A., Schachner H. & Chaikoff I. L., *J. Biol. Chem.* 144, 59, 1942
- [11] Hanes C. S. & Isherwood F. A., *Nature* 164, 1107, 1949
- [12] King E. J., *Biochem. J.* 26, 292, 1932
- [13] Levene P. & Schormüller S., *J. Biol. Chem.* 105, 547, 1934
- [14] Neuhaus F. C. & Korkes S., in *Biochemical Preparations* (C. S. Vestling ed.), 6, 75, John Wiley & Sons, New York; Chapman & Hall, London; 1958
- [15] Outhouse E. L., *Biochem. J.* 30, 197, 1936
- [16] Plimmer R. H. & Burch W. J. N., *Biochem. J.* 31, 398, 1937
- [17] Riley R. F., *J. Am. Chem. Soc.* 66, 512, 1944
- [18] Strickland K. P., *Canad., J. Biochem. Physiol.* 32, 50, 1954
- [19] Strickland K. P., Thompson R. H. S. & Webster G. R., *Arch. Biochem. Biophys.* 64, 498, 1956

WŁĄCZANIE ZNAKOWANYCH ^{32}P ESTRÓW FOSFOROWYCH GLICEROLU, CHOLINY, ETANOLOAMINY I SERYNY W FOSFOLIPIDY NARZĄDÓW ŚWINKI MORSKIEJ *IN VITRO*

Streszczenie

Włączanie glicerofosforanu, fosfocholiny i fosfoetanolaminy znakowanych ^{32}P w fosfolipidy wątroby świnki morskiej *in vitro* było kilkakrotnie zmniejszone gdy tkankę umieszczono na 5 min. w temperaturze -70° a następnie odtajano, lub gdy ją zhomogenizowano. Natomiast gdy substratem była fosfoseryna homogenizacja powodowała kilkakrotny wzrost włączania. Maksymalna wydajność włączania w fosfolipidy $^{32}\text{PChol}$ i $\alpha\text{-G}^{32}\text{P}$ wynosi około 1—2%, ^{32}PEt około 1%, $^{32}\text{PSer}$ około 0.5%.

Po trzygodzinnej inkubacji fragmentów tkanki wątrobowej z badanymi substratami stwierdzono intensywną defosforylację $^{32}\text{PSer}$ i $\alpha\text{-G}^{32}\text{P}$ a nieznaczną $^{32}\text{PChol}$ i ^{32}PEt . Z innych tkanek nerka powodowała całkowitą hydrolizę wszystkich badanych substratów.

Otrzymano 6.7.1960

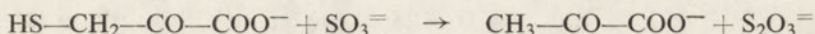
J. M. ZGLICZYŃSKI and TERESA STELMASZYŃSKA

SULPHINIC COMPOUNDS AS BIOLOGICAL ACCEPTORS OF BIVALENT SULPHUR

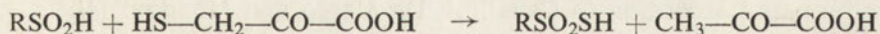
FORMATION OF ALANINETHIOSULPHONIC ACID AND THIOTAURINE FROM SULPHINIC COMPOUNDS AND THE OUTER SULPHUR ATOM OF THIOSULPHATE

*Department of Physiological Chemistry of the Medical Academy in Cracow
 Head of the Department: Prof. Dr B. Skarżyński*

Almost four years ago B. Sörbo found that alaninethiosulphonic acid and thiotaurine might be formed under suitable conditions in the homogenates of rat liver [10, 11]. Sörbo's experiments were based on the reaction occurring in liver homogenates between β -mercaptopyruvic acid and sulphite.

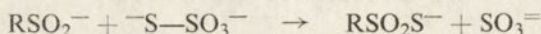


The formation of thiosulphate on the above reaction was inhibited to a large extent when some sulphinates were added to the reaction mixture, e.g. cysteinesulphinic acid or hypotaurine. This phenomenon could be explained by assuming that sulphinates as well as the sulphite groups were acceptors of the thiol group sulphur. Hence, the formation of thiosulphonic derivatives might be expressed by the following equation.



Cavallini, De Marco and Mondovi [2] have shown that thiotaurine was present in the urine of rats fed with large doses of cystine. It had to be concluded, therefore, that the formation of thiosulphonic derivatives was not dependent on specific experimental conditions, but was a normal biological stage in the metabolism of sulphur in the living organism. Nevertheless, the question remains open whether the reaction between sulphinates and β -mercaptopyruvic acid is the only source of thiosulphonic compounds in the organism.

Therefore we decided to investigate some sulphur compounds, other than β -mercaptopyruvic acid, containing sulphur at the 0 to -2 oxidation degree and hence capable to behave as donors of the SH group. Thio-sulphate was the compound investigated, the choice being suggested by the results obtained by Skarżyński, Szczepkowski and Weber [8] which had shown that only the outer sulphur atom of thiosulphate is capable to be incorporated into organic tissue compounds. The degree of oxidation of this sulphur and the chemical structure of the thiosulphate molecule suggested that in the organism the reaction might also take place according to the following scheme:



In order to clear up this problem we undertook the study of reactions occurring between thiosulphate on the one hand, and cysteinesulphinic acid or hypotaurine on the other, both without biological material and in haemolysates of normal human red blood cells.

METHODS

The biological reactions between sulphinates and thiosulphate were studied in haemolysates of normal human red blood cells. This material was chosen in view of its easy availability without any contaminations. Experiments were carried out in phosphate buffers, pH 7.4, the incubation time being 2 to 3 hours at 38° . In experiments performed in the presence of haemolysates, 0.001 M solutions of thiosulphate (Merck), 0.01 M-cysteinesulphinic acid prepared as described below, and 0.01 M-hypotaurine prepared after Cavallini *et al.* [3], were used. The substrates were dissolved in 0.02 M-phosphate buffer, pH 7.4. The volume of the incubated test was usually 5 ml. (2ml. of thiosulphate solution, 0.5 ml. of cysteinesulphinic acid or hypotaurine and 2.5 ml. of haemolysate). In control tests the substrate solution was replaced by phosphate buffer. Standards solutions of alaninethiosulphonic acid and thiotaurine were prepared according to Cavallini, De Marco and Mondovi [4].

Erythrocytes obtained from 10 - 15 ml. normal human venous blood sampled into 2 ml. of 3.8% sodium citrate were centrifuged for 3 - 4 minutes at 1000 r.p.m., then plasma, containing blood platelets and leucocytes, was discarded. The erythrocytes were washed twice with 0.9% NaCl solution. The cell suspension finally contained an average of 8 to 9 million erythrocytes per cmm. The erythrocytes were haemolysed with twice that volume of water and incubated in the presence of substrates, then the protein was precipitated with 2 volumes of acetone at -5° . The acetone was separated from water with the excess

of chloroform, the sample being thus defatted, too. The error in determinations of the substrates due to this of removing protein did not exceed 4 per cent.

Reactions without haemolysates were carried out with solutions diluted as in the experiments with erythrocytes, as well as with concentrated solutions at molar ratios of thiosulphate to sulphinates of 2 : 1, 1 : 1 and 1 : 2. The pH applied was 7.4, and the incubation time ranging from 10 minutes to 2 hours, at 20°, 37° and 60°.

Table 1

Chromatographic identification of sulphur-containing aminoacids

Compound	Isatin [7] colour reaction	Azide [13]	Nitro- prusside +KCN [6]	AgNO ₃	Chloro- platinate [14]	FeCl ₃ [5]	KI+ +HCl [5]	Alkaline cyanolysis at 100°
Cysteine	violet- pink	++	+	—	+	—	—	—
Cystine	brownish- violet	++	+	—	+	—	—	—
Cysteamine	brown	+	+	—	+	—	—	—
Cysteic acid	brownish- red	(trace decol- our.)	—	—	—	—	—	—
Taurine	(v. weak)	—	—	—	—	—	—	—
Cysteine sul- phinic acid	blue	v. weak decol- our.	—	—	+	+	+	—
Hypotaurine	blue	v. weak decol- our.	—	—	+	+	+	—
Alanine thiosul- phonic acid	blue- violet	++	(weak) +	+	+	—	+	++
Thiotaurine	blue- violet	++	(weak) +	+	+	—	+	++
Cystine disul- phoxide (de- composes)	brownish- red	+	+	—	+	—	++	—

The determinations of the reaction products and substrates were performed after deproteinisation with the method of Sörbo [12]. In addition, each experiment was verified chromatographically. The samples were placed marginally on circles of Whatman No. 1 filter paper and partitioned for 14 to 16 hours in two systems: butanol-acetone-water

(40 : 40 : 20) and tertiary isobutanol-water (70 : 30). The spots were developed with ninhydrin or isatin; sulphur compounds were identified with the tests shown in Table 1 and compared to corresponding standards.

Synthesis of cysteinesulphinic acid

The applied method was based on that described by Cavallini [3] in his report on the synthesis of hypotaurine. Cystine was the originating compound for the synthesis, as it had been in the author's procedure. Cystine disulphoxide was an intermediate product in the synthesis of cysteinesulphinic acid, the former being formed of cystine under the influence of hydrogen peroxide in the presence of iodine as catalyst. The disulphoxide was dismutated in a solution of ammonia, and the cysteinesulphinic acid formed was purified on the cationite Dowex 50 hydrogen form.

Procedure. 2.4 g. cystine dissolved in 10 ml. of HCl solution (2.2 ml. 33% HCl + 8.8 ml. H₂O) was added with 50 mg. KI and 2.3 ml. 30% H₂O₂. The hydrogen peroxide was added drop by drop while the solution was shaken vigorously. The brown-coloured solution resulting from the liberation of iodine was left at room temperature for about 12 hours, then 200 ml. acetone in 10 ml. portions was added, and vigorously mixed again. The white precipitate of cystine disulphoxide was filtered on a Büchner funnel and washed with 90 per cent acetone, then with acetone and ether. The disulphoxide was recrystallized twice from water-acetone solution (1 : 10). The substance showed a melting point at 195°, but underwent decomposition in this temperature. No contaminations other than traces of cystine were present.

Cystine disulphoxide (1.36 g.) was dissolved in 10 ml. of 1 M-ammonia and left for about 1.5 hours at 30°. The solution was then passed through a Dowex 50 H⁺ column (1.5 × 8 cm., 300 - 500 mesh). After washing the column with water, two fractions were collected. The first one contained hydrochloric acid and traces of cysteic acid and it was discarded. Cysteinesulphinic acid was obtained within the second 100 ml. fraction, slightly acid, containing no chloride ions. This solution was concentrated *in vacuo* over H₂SO₄ conc. The cysteinesulphinic acid obtained on this procedure did not contain any mineral contamination and appeared to be homogeneous on chromatography. Its melting point was 153°.

RESULTS

Reactions of sulphinic compounds with thiosulphate without erythrocytes

The reaction of 0.01 M-sulphinates (hypotaurine or cysteinesulphinic acid) with 0.001 M-thiosulphate was studied in five experiments and the results indicated that at these substrate concentrations no perceptible

reaction occurred. As the concentration of the reacting solutions increased up to 0.1 M, and at 38°, a slight decrease in thiosulphate was noted, as well as the appearance of thiosulphonates. However, without tissue, the reaction occurred only at 1 M-concentrations and at temperatures above 60°. Under these conditions the reaction was immediate, the corresponding thiosulphonates being formed.

Nine determinations were performed with 0.5 M-solutions of hypotaurine and cysteinesulphinic acid at 60°. It was found that the reaction between sulphinates and thiosulphate at the ratio of 2 : 1 consumed 80 per cent of the thiosulphate, 76 per cent of the theoretically calculated amount of thiosulphonates being formed. Chromatographically, two spots were found corresponding to the non-utilized sulphinates and the formed thiosulphonic compound. Quantitative analysis of the reaction between equivalent amounts of sulphinate and thiosulphate showed the rate of 60 per cent of thiosulphate utilization and that of thiosulphonates production 58 per cent. The chromatographic pattern did not differ from that described above. When thiosulphate was employed in twofold excess it was utilized by 50 per cent, and the production of thiotaurine and alaninethiosulphonic acid was 40 per cent of the theoretically calculated. Chromatographically, three bands were obtained, corresponding to thiosulphonate and sulphinate, some chemical properties of which are listed in Table 1. The third band was due to an unidentified sulphur compound.

Reactions of sulphinic compounds with thiosulphate in haemolysates of erythrocytes

These experiments were carried out under conditions in which, in the absence of a biocatalyst, the reaction did not take place, i.e. 0.01 M-sulphinate and 0.001 M-thiosulphate solutions at 37°. The addition of erythrocyte haemolysates led to the production of thiosulphonic compounds proportional to the amount of the added haemolysate.

A total of 24 experiments was made using haemolysates. The results of this series of experiments are shown in Table 2 and indicate that the thiosulphate with hypotaurine reaction rate is higher than that with cysteinesulphinic acid. Hypotaurine, in the presence of haemolysate, proved to be a better acceptor for the thiosulphate sulphur than the cysteinesulphinic acid. After the incubation of haemolysates with thiosulphate only, the formation of traces of thiosulphonic compounds was always observed, probably as the result of the reaction of thiosulphate with the sulphinic compounds present in the haemolysates. Similarly, the addition of sulphinates without thiosulphate to haemolysates also led

Table 2

Formation of thiosulphonic compounds as the result of incubation of haemolysates of red blood cells with thiosulphate and sulphinate compounds

Thiosulphate 2 μ moles, sulphonic compounds 5 μ moles and 2.5 ml. of haemolysate (final volume 5 ml.) were incubated 2 hrs., 37°, pH 7.4

Incubation mixture	Thiosulphate after incubation (μ mole)	Thiosulphonic compounds formed (μ mole)	
		Thiotaurine	Alaninethiosulphonic acid
Haemolysate, thiosulphate	1.6	trace	trace
Haemolysate, hypotaurine	0	0.2	0
Haemolysate, cysteinesulphinic acid	0	0	0.14
Denatured haemolysate, thiosulphate, sulphinates	2	0	0
Haemolysate, thiosulphate hypotaurine	1	0.85	0
Haemolysate, thiosulphate cysteinesulphinic acid	1.2	0	0.5

to the formation of traces of thiosulphonic compounds, probably due to the reaction with thiosulphate present in the haemolysates.

Chromatographic analysis confirmed the quantitative findings. Thiotaurine and some taurine were chromatographically identified after incubation of haemolysates with hypotaurine and thiosulphate. Chromatograms of samples containing thiosulphate and cysteinesulphinic acid showed the presence of alaninethiosulphonic acid, cysteic acid, and traces of taurine and thiotaurine. Samples incubated with thiosulphate only did not contain any thiosulphonic compounds, some traces only of an unidentified sulphur compound similar to that observed during the reaction between an excess of thiosulphate and sulphinates without haemolysate. In chromatograms of samples containing only sulphinic compounds, only their oxidation products were found, such as taurine and cysteic acid.

DISCUSSION

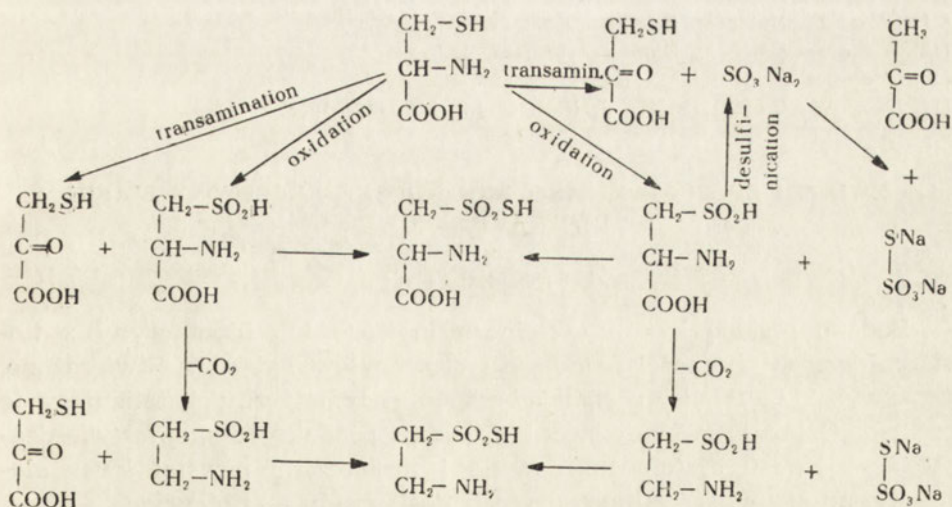
The obtained results indicate that normal human red blood cells possess an enzyme system catalysing the reaction between thiosulphate and sulphinic compounds to give thiosulphonic compounds.

The experiments demonstrate such reactions in the erythrocyte haemolysates to which the substrates, i. e. thiosulphate and sulphinic compounds, have been added. However, we are not able to claim with certainty that the reactions of this type do occur also under physiological

conditions. Nevertheless, it may be assumed with a high degree of probability that the substrates of these reactions are biological metabolites in erythrocytes. Hence, the possibility that thiosulphonic compounds are formed in biological reaction also exists [9].

It is sure that red blood cells are able to oxidize cysteine to cysteinesulphinic acid, from which hypotaurine is formed by decarboxylation [1]. Cysteine is also the originating compound for the biological formation of thiosulphate [10]. Moreover, Sörbo claims that the intensity of thiosulphate formation in the red blood cells is nearly the highest after that in the liver and kidneys. Since both thiosulphate and sulphinic compounds are normally formed in erythrocytes, the conditions also exist for the enzymatic production of thiosulphonic compounds.

As described in the experimental part, some trace amounts of thiosulphonic compounds are formed in erythrocyte haemolysates also after the addition of one only of the essential substrates. It is rather impossible to ascertain, as yet, whether the traces of thiotaurine and alaninethiosulphonic acid found were not due to experimental error. The colorimetric method of Sörbo employed might give rise to an error in the presence of protein, and the complete deproteinization of the haemolysates was not always possible. Still another eventuality must be considered. Under the applied experimental conditions alaninethiosulphonic acid and thiotaurin may be produced in much larger amounts, but it may immediately undergo further transformation. It is highly probable that thiosulphonic compounds are formed as intermediate



Scheme of reactions of sulphur-containing aminoacids

metabolites. Therefore we propose to include these compounds into the scheme of the general metabolism of bivalent sulphur.

The authors express cordial thanks to Professor Dr. Bolesław Skarżyński for his help and valuable advice while this work was in progress.

SUMMARY

The reactions between cysteinesulphinic acid or hypotaurine and thiosulphate were investigated in the presence of haemolysate of human erythrocytes. It was found that the erythrocytes catalysed these reactions. Products of reactions were identified chromatographically and determined colorimetrically. Alaninethiosulphonic acid was formed from cysteinesulphinic acid and thiosulphate, thiotaurine from hypotaurine and thiosulphate.

REFERENCES

- [1] Awapara J., *J. Biol. Chem.* **203**, 183, 1953.
- [2] Cavallini D., de Marco C., Mondovi B., *J. Biol. Chem.* **234**, 854, 1959.
- [3] Cavallini D., de Marco C., Mondovi B., Stirpe F., *Rendiconti dell'Accademia Nazionale dei Lincei. Classe di Scienze fisiche, matematiche e naturali, serie VIII*, vol. **18** fasc. 5, 1955.
- [4] Cavallini D., de Marco C., Mondovi B., *Bull. Soc. Chim. Biol.* **40**, 12, 1958.
- [5] Cavallini D., de Marco C., Mondovi B., *J. Biol. Chem.* **216**, 577, 1955.
- [6] Chargaff E., Levine C., Green C., *J. Biol. Chem.* **175**, 67, 1948.
- [7] Saifer A., Oreskes I., *Science* **119**, 124, 1954.
- [8] Skarżyński B., Szczepkowski T., Weber M., *Nature* **184**, 994, 1959. *Acta Biochim. Polon.* **7**, 105, 1960.
- [9] Smith E., Tuller E., *Arch. Biochem. Biophys.*, **54**, 114, 1955.
- [10] Sörbo B., *Biochim. Biophys. Acta* **21**, 393, 1956.
- [11] Sörbo B., *Biochim. Biophys. Acta* **24**, 324, 1957.
- [12] Sörbo B., *Biochim. Biophys. Acta* **23**, 412, 1957.
- [13] Toennies G., Kolb J., *Anal. Chem.* **23**, 823, 1951.
- [14] Troll W., Cannan R. K., *J. Biol. Chem.* **200**, 803, 1953.

ZWIĄZKI SULFINOWE JAKO BIOLOGICZNE AKCEPTORY SIARKI DWUWARTOŚCIOWEJ

Streszczenie

Badano reakcję kwasu cysteinosulfinowego lub hipotauryny z tiosiarczanem w obecności hemolizatu erytrocytów ludzkich. Stwierdzono, że krwinki czerwone posiadają zespół enzymatyczny katalizujący tę reakcję. Oznaczono jakościowo i ilościowo produkty reakcji, stwierdzając że z kwasu cysteinosulfinowego i tiosiarczanu powstał kwas alaninotiosulfonowy, zaś z hipotauryny i tiosiarczanu — tiotauryna.

Otrzymano 2.9.1960

J. PAWEŁKIEWICZ, B. BARTOSINSKI and W. WALERYCH

ENZYMIC SYNTHESIS OF LIGHT-SENSITIVE COBALTO (II)-CORRINS*

Department of Biochemistry, College of Agriculture, Poznań

Head of the Department: Prof. Dr J. Pawełkiewicz

Pracę tę dedykujemy Panu Profesorowi Dr Wł. Mozółowskiemu w 65 rocznicę Jego urodzin.

In the course of investigations on enzymic synthesis of vitamin B₁₂ from cobinamide and 5,6-dimethylbenzimidazole [11] it has been found that the initial red colour of the reaction mixture changes to yellow. As in the described experiment about 5 to 20 per cent only of the added cobinamide was transformed into vitamin B₁₂, while the rest remained unchanged, one might suppose that during the synthesis the initial compound was undergoing a preliminary and reversible change, giving the yellow derivative, which was transformed again into red cobinamide in the isolation process. Since later investigations [12] have shown that corrin compounds occur as light-sensitive derivatives in the cells of propionic bacteria, discovered by Barker *et al.* [3, 20, 1, 2], and since it was found that the light-sensitive derivative of cobinamide is characterised by yellow colour, it became evident that it was the light-sensitive derivative of cobinamide that might have been the intermediate in the enzymic synthesis.

The experiments have confirmed that assumption. In the enzymic system from *Propionibacterium shermanii*, similar to that described by

* In the present paper cobalto (II)-corrins are also called S-(sensitive to light)-corrinoids. The prefix S added to the commonly used name of parent substance designates its light-sensitive derivative. Thus SB₁₂ stands for vitamin B₁₂, and S Ψ B₁₂ and SB_{12p} for the derivatives of pseudovitamin B₁₂ and vitamin B_{12p} (cobinamide), respectively. See [19] on the subject of cobalti (III)-corrin nomenclature.

This work has been done partly thanks to the financial support of Biochemical Committee of the Section of Biological Sciences of the Polish Academy of Sciences.

Pawełkiewicz & Bartosiński [11] cobinamide is transformed into its light-sensitive form. So a number of other S-corrinoids have been obtained. It has also been shown that an analogue synthesis may also be performed using an enzymic system from *Nocardia lutea*. Also Bernhauer *et al.* [5] have recently shown the enzymic formation of light-sensitive cobinamide and vitamin B₁₂ derivatives ("Corrinoidkonjugaten") in a system from *P. shermanii*.

The details of the method used, and the properties of a number of S-corrinoids have been discussed in the present paper. A preliminary note has already been published [12].

EXPERIMENTAL

Organisms and media

Propionibacterium shermanii. Propionic acid bacteria were grown on a semi-synthetic medium of Pawełkiewicz & Zodrow [17], without, however, the addition of cobaltous salts, and with the following modifications: (1) Acid casein hydrolyzate, prepared according to [18], 120 ml.; (2) Enzymic casein hydrolyzate, prepared according to [18], 150 ml.; (3) KH₂PO₄, 3g.; (4) MgCl₂·6H₂O, 0.4 g.; (5) Tap water, *ad* 850 ml. The pH of the medium has been adjusted with 1 N-NaOH to 6.5, then it was distributed into flasks and sterilized in the autoclave for 20 to 45 minutes (depending on the volume) at 115°.

Then the following sterilized solutions were added to the medium: (6) Biotin (150 mg./500 ml.), 10 ml.; (7) Calcium pantothenate (100 mg./250 ml.), 10 ml.; (8) Ferrous sulphate (100 mg. FeSO₄·7H₂O/100 ml. acidified with a few drops of concentrated H₂SO₄ before sterilization in the autoclave), 10 ml.; (9) 50 per cent (w/v) crystalline glucose (produced by the Potato Industry Union, Poznań), 20 ml.

The propionic bacteria strains were kept in the medium described above, with the addition of 0.001 per cent cobaltous sulphate, in sealed glass vials at 4°. 0.1 - 10 ml. samples of bacterial suspension were transferred with Pasteur pipette into test tubes, containing 10 ml. of fresh medium and incubated at 30° for three days. Then 100 ml. portions of the medium were inoculated with heavy growth culture. They were incubated for nine days, the pH value was adjusted to pH 6.5 - 6.8 with sterile saturated solution of sodium carbonate every three days. At the same time fresh 50 per cent glucose solution was added, in amounts equalling 0.5 per cent of the volume of the medium. Then 600 ml. portion of the medium was inoculated with the culture, and after 9 days' incubation, similarly as above, it was used as inoculum for 7000 ml. of

fresh medium in a 10 000 ml. flask. The resulting culture was incubated for 12 - 15 days, acids being neutralized and glucose added in the above described way.

Nocardia lutea. Stock culture of actinomyces strain *Nocardia lutea*¹ (Centralbureau voor Schimmelcultures, Holland) was maintained on agar slant medium of the following composition: (1) Beef extract, 2 g.; (2) Acid casein hydrolyzate, prepared according to [18], 5 ml.; (3) KH_2PO_4 , 0.5 g.; (4) Agar, 1.5 g.; (5) Tap water, *ad* 100 ml. The pH was adjusted with 1 N-NaOH to 7.2 and sterilized in the autoclave at 115° for 10 min. After cooling to about 50°; (6) 50 per cent glucose solution, 2ml. was added, and, after stirring, the medium was distributed into sterilized test tubes.

Nocardia lutea strain was incubated for 48 hrs. at 37°, then was stored at 4° for two months.

For the experiments *Nocardia lutea* was grown in a liquid medium, in a reciprocating shaker at 33°. The shaker performed 80 full oscillations of 10 cm. amplitude per minute. The composition of the liquid medium was as follows: (1) Acid casein hydrolyzate [18], 40 ml.; (2) Enzymic casein hydrolyzate [18], 20 ml.; (3) Yeast extract, prepared according to [18], 8 g.; (4) KH_2PO_4 , 5 g.; (5) DL-cysteine hydrochloride, 10 mg.; (6) Nicotinic acid amide, 2 mg.; (7) Thiamine (10 mg. thiamine hydrochloride /100 ml.) 2 ml.; (8) Biotin (15 mg./500 ml.), 1 ml.; (9) Calcium pantothenate (100 mg./250 ml.), 1.5 ml.; (10) Cobaltous sulphate (100 mg. $\text{CoSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ /250 ml.), 2.5 ml.; (11) Tap water, *ad* 1000 ml. pH was adjusted with 1 N-NaOH to 7.2 and the medium in 150 ml. portions distributed into 1000 ml. flasks, then 3 ml. of 50 per cent sterile glucose solution per flask was added. The flasks were inoculated by means of platinum loop from the slant and incubated in a shaker for 24 hrs.

The *P. shermanii* cells from 10 000 ml. culture, or the *N. lutea* cells from 1000 ml. cultures were then centrifuged, at 25 000 or 4 000 r.p.min., respectively, washed with water and dried with acetone according to the method described by Bartosiński [4]. The obtained bacterial powders were stored at -10° for several months, without loss of their enzymic properties.

Enzymic incubation

Acetone dried *P. shermanii* cells (0.5 - 1 g.), or *Nocardia lutea* cells (2 g.) were ground in a mortar at 4° with 15 ml. 0.05M-phosphate buffer, pH 7.0, and then 0.2 ml. of 50 per cent glucose solution, 0.25 ml. 0.2M- MgSO_4 , about 1 mg. adenine, and 3 - 10 mg. corrin compound were added. After thorough mixing, several drops of toluene were added, the

¹ According to the unpublished data, supplied by B. Bartosiński, this strain produces about 60 μg of vitamin B_{12} per 1000 ml. of medium.

thick suspension was stirred again and then transferred into a test tube (18 × 150 mm). A toluene layer about 2 cm. high was placed on its surface; the test tube was stopped with cotton wool and incubated at 30° for 24 hrs.

Isolation and purification of S-corrinoids

All steps involving the isolation, separation and purifying of S-corrinoids were performed in dark rooms or in dispersed red light.

After incubation the mixture was transferred into an Erlenmayer flasks, diluted to 80 - 100 ml., then acetic acids was added, in order to adjust the pH to 4.5. The flask was placed in boiling water bath and vigorously stirred till the liquid reached the temp. of 75°. After cooling, the solution was filtered through Whatman No. 4 paper and the corrin compounds were repeatedly extracted from the clear filtrate with a mixture of phenol and chloroform (1 : 3, v/v). Combined phenol extracts were washed with equal volume of water. Small quantities of coloured compounds which had passed into water were extracted again with a small amount of extraction mixture. One volume of chloroform and one volume of *n*-butanol were added to the washed phenol extract. Corrinoids were reextracted from this mixture with small portions of water, till a complete decolorization of the organic phase was obtained. The resultant solution was shaken vigorously three times with chloroform, in order to remove traces of phenol, then it was concentrated under reduced pressure in a water bath at about 50°. The concentrated solution was applied to Whatman No. 3 paper in the form of a narrow band, and separated by electrophoresis in 0.5M-acetic acid at 5-8 Volt/cm. gradient during 6-12 hrs. The separated band of cobalto (II)-corrin was eluted from the paper with water acidified with acetic acid (0.5 ml. acetic acid in 100 ml. water) according to Pawełkiewicz & Walerych [14]. The eluate was applied in the form of a narrow band on Whatman No. 2 paper and the chromatography was run by the descending technique using the following solvent system: *n*-butanol - propane-2-ol - acetic acid - water (100 : 70 : 1 : 100, v/v). Eluates of the samples purified by chromatography were used for physico-chemical investigations.

Chemicals

Calcium pantothenate, biotin, thiamine hydrochloride (Nutritional Biochemical Co.) nicotinic amide (General Biochem. Inc.) and DL-cysteine hydrochloride (K. K. Laboratories, Inc., Long Island City)

were a gift from the Rockefeller Foundation. All inorganic salts were purchased from Fabryka Odczynników Chemicznych, Gliwice, Poland.

The cobalti (III)-corrins: cobinamide (vitamin B_{12p}) [7] and cobinamide guanosinediphosphate (cobalamin yl) [15] have been isolated from the cultures of *Propionibacterium shermanii*. Adenyl-cobamide cyanide (pseudovit. B₁₂) has been isolated from *P. arabinosum*. 5,6-dimethylbenziminazolyl-cobamide cyanide (vitamin B₁₂) [10], 5-hydroxybenziminazolyl-cobamide cyanide (vitamin B_{12 III}) [8], 5-ethoxybenziminazolyl-cobamide cyanide [13], and 5-methylbenziminazolyl-cobamide cyanide [10] have been obtained biosynthetically, using *P. shermanii* and the appropriate nucleotide bases as precursors. 2-methyladenyl-cobamide cyanide (factor A) was obtained from Prof. Dr. K. Bernhauer.

Hydroxyl corrinoid derivatives: 5,6-dimethylbenziminazolyl-cobamide hydroxide (vitamin B_{12b}), 5-ethoxybenziminazolyl-cobamide hydroxide and 5-methylbenziminazolyl-cobamide hydroxide were obtained using the following method:

About 20 mg. of cyano-derivative were dissolved in 200 ml. of water acidified with acetic acid to pH 3, and irradiated with 250 watt tungsten lamp from a distance of 20 cm. During irradiation the solution was being cooled with cold water, streaming around the walls of the vessel, and at the same time a strong current of air, passing through the solution was removing cyanic acid which was being formed there. The progress of the reaction was followed by measuring the absorption of the solution at 355 and 361 m μ . After the photolysis was completed (i.e. the absorption maximum was shifted from 361 to 355 m μ), the sample was evaporated under reduced pressure, dissolved in about 10 ml. of water and applied on the Carboxymethyl-cellulose column (H⁺-form) which adsorbed the hydroxy-derivative. Traces of unchanged cyanoforn were washed out from the column with water [16]. The hydroxycompound was then eluted with 0.1 M-acetic acid, the solution was evaporated under reduced pressure to dryness, and used for enzymic experiments without further purification.

RESULTS

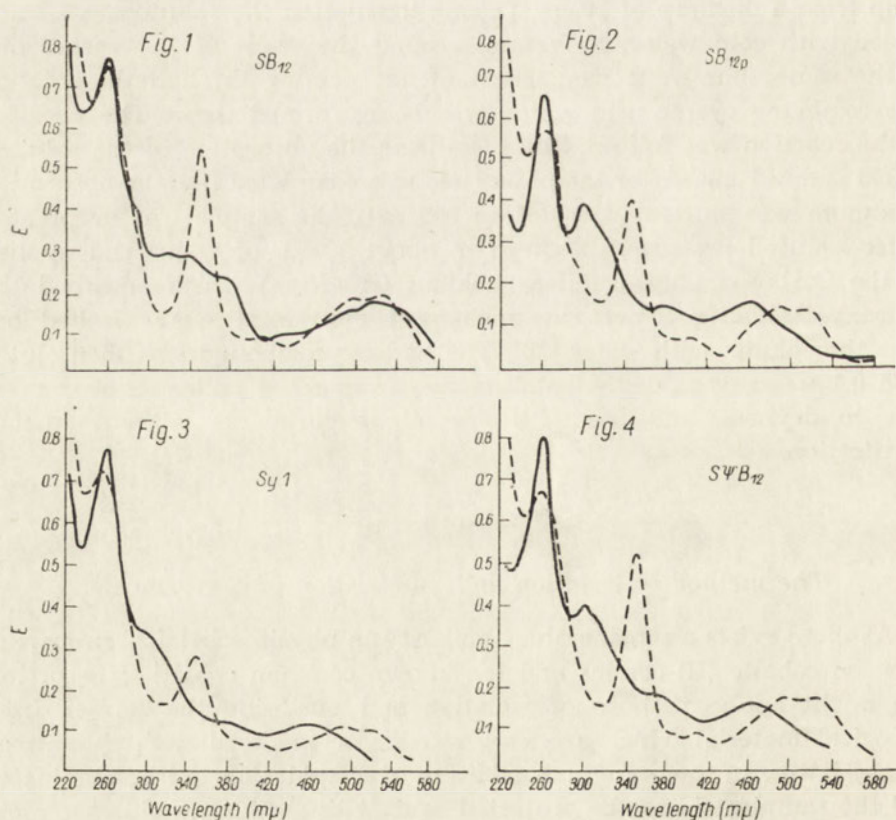
The method of isolation and purification of S-corrinoids

As there exists a considerable similarity in physico-chemical properties between cobalto (II)-corrins and the known common cobalti (III)-corrins, one might apply methods of isolation and purifying the former from biological material which are very similar or identical with those used for the latter. In these methods addition of cyanides should be eliminated and the samples should be protected against light. S-corrinoids are more

basic compounds in comparison to their oxidized forms, as a result of the presence of an additional adenine molecule. That feature facilitates separation of these compounds. Until now the column chromatography methods using ion exchangers like Dowex-50 [1, 2], carboxymethyl-cellulose [12] was applied for separation of complex mixture. In simpler cases, such as mixtures from enzymic systems, electrophoresis or paper chromatography proved sufficient. The absorption spectra of crystalline B₁₂-coenzyme (SB₁₂) and that of the compound obtained by enzymic process and purified as described in the experimental part, were practically identical.

Enzymic preparation of S-corrinoids and their physico-chemical properties

Table 1 shows which ones of the investigated cobalti (III)-corrins were transformed into light-sensitive analogues by enzymic system from *P. shermanii* and the absorption maxima of the reaction products. Fig 1 - 8 show the absorption spectra of the S-corrinoids, obtained in the course of the experiments.



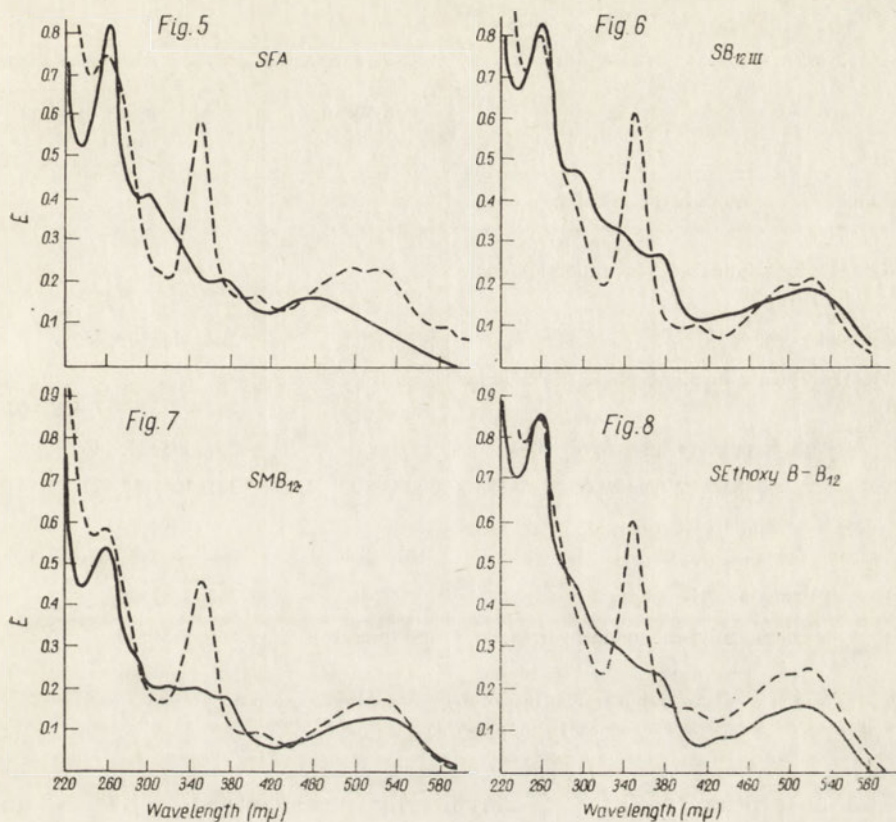


Fig. 1—8. The absorption spectra of (—) the enzymatically obtained S-corrinoids and of (-----) the products of their photolytic decomposition in water: 1) SB_{12} , $c\ 1.88 \cdot 10^{-5}$ 2) SB_{12p} , $c\ 1.53 \cdot 10^{-5}$ 3) Sy_1 4) $S\overline{W}B_{12}$, $c\ 1.87 \cdot 10^{-5}$ 5) SFA , $c\ 2.51 \cdot 10^{-5}$ 6) $SB_{12 III}$, $c\ 2.3 \cdot 10^{-5}$ 7) $SMB-B_{12}$, $c\ 1.64 \cdot 10^{-5}$ 8) $SEthoxy B-B_{12}$, $c\ 2.35 \cdot 10^{-5}$ The measurements were made every 5–10 $m\mu$, and in the maxima region every 1 $m\mu$.

The experimental data show that vitamin B_{12} is enzymically transformed into SB_{12} at the most in trace amounts in the system from *P. shermanii*, and on the other hand about 20 per cent is transformed in the system from *Nocardia lutea*. It is worth mentioning that attempts to conduct that reaction *in vivo*, with growing or resting *P. shermanii* cells, have also given negative results.

S-corrinoids spectra obtained during the described experiments are characterized by a strong maximum in the 260–264 $m\mu$ region. Such a maximum is typical of the cobalto (II)-corr'in system, as well of cobinamide derivative which does not contain additional adenine group, characteristic for "natural" S-corrinoids. The derivative was obtained by chemical reduction of cobinamide (unpublished data).

Table 1

Enzymic synthesis of S-corrinoids in the system from P. shermanii and their absorption spectra

Substrate	Symbol of product	Absorption maxima (m μ)
5,6-Dimethylbenziminazolyl-cobamide cyanide (vit. B ₁₂)	SB ₁₂ *	
5,6-Dimethylbenziminazolyl-cobamide hydroxide (vit. B _{12b})	SB ₁₂	262, 375—7, 525
Cobinamide (vit. B _{12p})	SB _{12p} **	264, 304, 375, 462
Cobinamide guanosinediphosphate (cobalamin yl)	Syl	262—3, 376—7, 458—60
Adenylcobamide cyanide (pseudovit. B ₁₂)	S Ψ B ₁₂	264, 305, 375, 462
2-Methyladenyl-cobamide cyanide (factor A)	SFA	264, 305, 375, 460—2
5-Hydroxybenziminazolyl-cobamide hydroxide (hydroxy form of vit. B _{12III})	SB _{12III}	260—1, 293—5, 375, 520
5-Methylbenziminazolyl-cobamide hydroxide	SMB-B ₁₂	262, 375, 520
5-Ethoxybenziminazolyl-cobamide hydroxide	SEthoxyB-B ₁₂	260, 375, 520

* SB₁₂ is formed in large quantities from vitamin B₁₂ in the enzymic system from *Nocardia lutea*.

** SB_{12p} is formed too in the enzymic system from *Nocardia lutea*.

The absorption spectra of enzymically produced SB₁₂, S Ψ B₁₂, and SB_{12p} are identical with those already published by Barker *et al.* [3, 20, 1, 2] and by Pawełkiewicz *et al.* [12]. In the spectra of SB₁₂ and SMB₁₂ we can observe a distinct inflection in the 280-290 m μ region, which may be caused by the presence of the respective benzimidazole bases in their molecules. A similar inflection of the absorption curve may be seen in the spectra of SEthoxyB-B₁₂ in the 290-310 m μ region, caused by the presence of 5-ethoxybenzimidazole [13]. The presence of 5-hydroxybenzimidazole in SB_{12 III} molecule (Fig. 6) is still more clearly pronounced. A slight maximum is visible here at 293-295 m μ . It is known that 5-hydroxybenzimidazolyl-cobamide cyanide also absorbs at 295 m μ [6]. On the other hand, the fact that absorption maxima appear at 305 m μ in the SB_{12p}, S Ψ B₁₂ and SFA spectra may be rather ascribed to the existence of a different chromophore group, which is absent in benzimidazole derivatives. A very pronounced absorption band in Syl at 262 m μ is probably caused by the presence of additional guanine moiety in its molecule [15]. The absorption ratio $\frac{d(262 \text{ m}\mu)}{d(460 \text{ m}\mu)}$ equals 6.66 for this compound in comparison to 5.10 for S Ψ B₁₂.

Table 2

R_F values of *S*-corrinooids

Descending paper chromatography on Whatman No. 2 paper, solvent: *n*-butanol - propan-2-ol - acetic acid - water (100 : 70 : 1 : 100, v/v), 20 hrs.

Symbol of the compound	<i>R_F</i>
Vitamin B ₁₂	0.40
Cobinamide	0.48
SB ₁₂	0.28
SB _{12p}	0.34
Syl	0.09
S Ψ B ₁₂	0.13
SFA	0.15
SB _{12III}	0.21
SMB-B ₁₂	0.24
SEthoxyB-B ₁₂	0.26

The *R_F* values for the obtained corrinooids and their electrophoretic properties are shown in Tables 2 and 3 respectively. It has been found that the order of spots of *S*-corrinooids on the chromatograms is the same as the order of the respective common corrinooids. This fact proves the analogy in structural change occurring in the transformation: corrin \rightleftharpoons *S*-corrin. As might have been foreseen, SB₁₂, and SB_{12p}, are more hydrophylic than vitamin B₁₂ and cobinamide respectively, and their *R_F* values are also lower. All light-sensitive *S*-corrinooids are more basic than their cyanide cobalti (III)-corrin derivatives (Table 3). The basicity is

Table 3

Electrophoretic properties of S-corrinooids in 0.5 M-acetic acid

The relative rate of migration is expressed in terms of *R_B*, the distance moved by the compound divided by the distance moved by cobinamide. While vitamin B₁₂ is electroneutral at pH 3 (0.5 M-acetic acid), its position on electrophorograms defined the starting point and permitted elimination of the movements of compounds by electroosmose

Symbol of the compound	<i>R_B</i>
Vitamin B ₁₂	0.00
Cobinamide	1.00
SB ₁₂	0.92
SB _{12p}	1.29
Syl	0.24
S Ψ B ₁₂	1.23
SFA	1.10
SB _{12III}	1.24
SMB-B ₁₂	1.16
SEthoxyB-B ₁₂	1.10

increased by the additional adenine moiety present in their structures. This property allows the easy separation of the two classes of compounds. The differences in basicity between S-corrinoids themselves are also of interest. And so, e.g. SB_{12p} is more basic than SB₁₂, which property was used for separation those derivatives on carboxymethyl-cellulose [12].

DISCUSSION

The experiments performed in our laboratory [12] have shown that the corrinoids appear in the cells of propionic bacteria as light-sensitive derivatives. And thus cobalti (III)-corrins, hitherto isolated from these bacteria should be considered as artifacts which are formed during the isolation of cobalto (II)-corrins. The data obtained in the present paper support the conclusions. The majority of the investigated cobalti (III)-corrins are transformed into cobalto (II)-corrin derivatives in the enzymic system from *P. shermanii*. Only, unexpectedly, vitamin B₁₂ did not change, or changed in trace amounts only into SB₁₂. On the other hand, hydroxyl derivative of vitamin B₁₂ (vit. B_{12b}) readily enters into that reaction. As similar results have been obtained in the *in vivo* experiments with growing or resting *P. shermanii* cells, one may suppose that vitamin B₁₂ is for this microorganism rather passive metabolite. It is, however, possible that such behaviour is the result of physiological state of cells used in experiments, such as their growth phase, age, the medium used, etc. Also data of Bernhauer *et al.* [5] stating that they succeeded in transforming vitamin B₁₂ into light-sensitive "Cobalamin-konjugat", further support such an opinion. The present work has also shown that the enzymic preparation from *Nocardia lutea* transforms vitamin B₁₂ into SB₁₂. This problem requires further study.

The reaction of transformation of cobalti (III)-corrins into light-sensitive S-corrinoids is connected with their reduction to the complex of bivalent cobalt [5, 9, 12]. The preliminary experiments have shown that enzymic reduction takes place in the presence of insoluble fragment of acetone powder of *P. shermanii* cells.

In the experiments glucose was added to the incubation mixture, in order to increase the reductivity of the medium, although it had been shown that even without that addition the reaction took place, but at a considerably lower rate. The ten-fold increase of the used glucose concentration reduced the reaction time from 24 to several hours. In the dialyzed enzymic preparations, the addition of FMN, DPN and of some salts, as Mo, accelerated the formation of S-corrinoids. Further experiments have shown that the addition of adenine, which is one of the components of light-sensitive analogues is not necessary. Oxygen distinctly inhibits the enzymic reduction of cobinamide. The red colour

of cobinamide on the surface of the reaction mixture does not change, while the sample becomes yellow in the deeper layers. For that reason the incubations were performed in test tubes, and toluene was placed on the surface of the liquid; it served as an antiseptic at the same time.

SUMMARY

1. It has been shown that the suspensions of acetone dried *Propionibacterium shermanii* and *Nocardia lutea* cells transformed cobalti (III)-corrins into light-sensitive cobalto (II)-corrins. Thus the following compounds were converted into their light-sensitive analogues: 5,6-dimethylbenziminazolyl-cobamide cyanide (vitamin B₁₂), cobinamide (vitamin B_{12p}), cobinamide guanosinediphosphate (cobalamin y), adenylobamide cyanide (pseudovitamin B₁₂), 2-methyladenyl-cobamide cyanide (factor A), 5-hydroxybenziminazolyl-cobamide hydroxide (hydroxy-form of vitamin B_{12 111}), 5-methylbenziminazolyl--cobamide hydroxide and 5-ethoxybenziminazolyl-cobamide hydroxide.

2. A method of isolation and purifying of the cobalto (II)-corrins from the enzymic systems has been described.

3. The absorption spectra and the chromatographic and electrophoretic properties of the obtained cobalto (II)-corrins have been given.

REFERENCES

- [1] Barker H. A., Smyth R. D., Weissbach H., Munch-Petersen A., Toohey J. I., Ladd J. N., Volcani B. E. & Wilson R. M., *J. Biol. Chem.* **235**, 181, 1960.
- [2] Barker H. A., Smyth R. D., Weissbach H., Toohey J. I., Ladd J. N. & Volcani B. E., *J. Biol. Chem.* **235**, 480, 1960.
- [3] Barker H. A., Weissbach H. & Smyth R. D., *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **44**, 1093, 1958.
- [4] Bartosiński B., *Acta Biochim. Polon.* **7**, 85, 1960.
- [5] Bernhauer K., Gaiser P., Müller O. & Wagner O., *Biochem. Z.* **333**, 106, 1960.
- [6] Friedrich W. & Bernhauer K., *Angew. Chem.* **65**, 627, 1953.
- [7] Janicki J. & Pawelkiewicz J., *Acta Biochim. Polon.* **2**, 329, 1955.
- [8] Kurnatowski R., Szymkowiak A., Wiśniewski W. & Pawelkiewicz J., *Acta Biochim. Polon.* **5**, 19, 1958.
- [9] Nowicki L. & Pawelkiewicz J., *Bull. Acad. Polon. Sci., Ser. Biol.* **8**, 433, 1960.
- [10] Pawelkiewicz J., *Acta Biochim. Polon.* **1**, 313, 1954.
- [11] Pawelkiewicz J. & Bartosiński B., *Bull. Acad. Polon. Sci., Ser. Biol.* **8**, 5, 1960.
- [12] Pawelkiewicz J., Bartosiński B. & Walerych W., *Bull. Acad. Polon. Sci., Ser. Biol.* **8**, 123, 1960.
- [13] Pawelkiewicz J. & Nowakowska K., *Acta Biochim. Polon.* **2**, 259, 1955.
- [14] Pawelkiewicz J. & Walerych W., *Acta Biochim. Polon.* **5**, 327, 1958.

- [15] Pawełkiewicz J., Walerych W. & Bartosiński B., *Acta Biochim. Polon.* 6, 431, 1959.
- [16] Pawełkiewicz J., Walerych W., Friedrich W. & Bernhauer K., *J. Chromatography* 3, 359, 1960.
- [17] Pawełkiewicz J. & Zodrow K., *Patent Pol.* 42378, 1956.
- [18] Pawełkiewicz J. & Zodrow K., *Acta Microbiol. Polon.* 6, 219, 1957.
- [19] Smith E. L., *Vitamin B₁₂*, p. 67 Menthuen & Ltd., London, 1960.
- [20] Weissbach H., Toohey J. & Barker H. A., *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S.* 45, 521, 1959.

ENZYMATYCZNA SYNTEZA ŚWIATŁOCZUŁYCH KOBALTO(II)-KORYN

Streszczenie

1. Wykazano, że zawiesiny wysuszonych acetonem komórek *Propionibacterium shermanii* i *Nocardia lutea* przekształcają szereg kobalti (III)-koryn w światłoczułe kobalto (II)-koryny. Otrzymano w ten sposób światłoczułe analogi: 5,6-dwumetylobenzimidazolylocyjano-kobamidu (wit. B₁₂), kobinoamidu (wt. B_{12p}), dwufosfoguanozyno-kobinoamidu (kobalaminy yl), adenylocyjano-kobamidu (pseudowit. B₁₂), 2-metyloadenylocyjano-kobanidu (czynnik A), 5-hydroksybenzimidazolylohydroksy-kobamidu (hydroksy forma wit. B_{12 III}), 5-metylobenzimidazolylohydroksy-kobamidu oraz 5-etoksybenzimidazolylohydroksy-kobamidu.

2. Opisano preparatywną metodę izolowania i oczyszczania kobalto (II)-koryn z układów enzymatycznych.

3. Podano widma absorpcyjne otrzymanych kobalto (II)-koryn oraz ich własności chromatograficzne i elektroforetyczne.

Otrzymano 1.10.1960

W. NIEMIERKO, W. DRABIKOWSKI and HANNA STRZELECKA-GOŁASZEWSKA

**A NEW PROCEDURE OF ULTRAFILTRATION AND ITS
ADAPTABILITY IN STUDIES ON BINDING OF NUCLEOTIDES
BY PROTEINS. PASSAGE OF ATP THROUGH CELOPHANE
MEMBRANES IN PRESENCE AND ABSENCE OF PROTEIN**

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

In the course of our studies on binding of ATP by proteins [7, 8] it appeared useful to replace the time consuming equilibrium dialysis by a more rapid method of ultrafiltration. A modified ultrafiltration vessel was constructed which enabled to use the centrifugal force to move solutions through the membrane. Preliminary experiments with solutions of nucleotides alone showed a "retention" of nucleotides by the celophane membrane which resulted in a decrease in the concentration of nucleotides in initial portions of the filtrate and, in the presence of proteins, might imitate the effect of binding of nucleotides by proteins. This effect of „retention" could be, however, excluded by forcing the whole volume of the solution to pass through the membrane. This was possible by covering the water solution by a layer of liquid paraffin. The present paper describes this new procedure and demonstrates its adaptability in studies on binding of nucleotides (and other substances of low molecular weight) by proteins.

METHODS

Ultrafiltration was carried out in a vessel made entirely of plexiglass which is shown in Fig. 1. It is composed of three parts (Fig. 1, A, B and C) which can be joined together by means of screw threads. A filtration membrane is put on the perforated plate D, covered with a rubber ring gasket, and fixed between parts A and B. The lower part (C) serves as a container for the filtrate. It can be easily separated from other parts thus facilitating the removal of portions of the filtrate. Filtration mem-

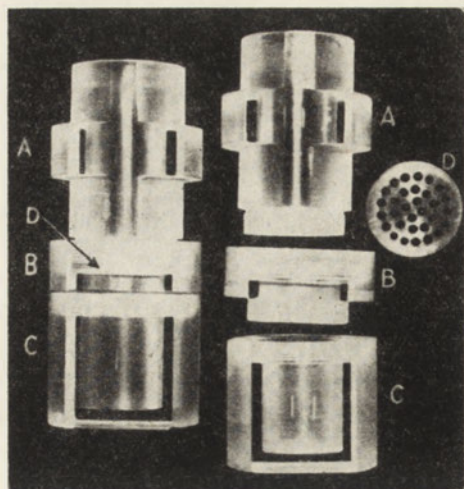


Fig. 1. Ultrafiltration vessel in mounted and dismounted states (explanation in the text)

branes were cut off of dialyzing tubings (Fisher Scientific Co, U.S.A) washed according to Hughes & Klotz [15].

Solutions (usually 2 - 3 ml.) were placed in the upper part (A) of the vessel and covered by a layer of 5 ml. liquid paraffin. The vessels were put into the cups and were centrifuged at 6000 r.p.m. (about 3500 g) at 2°. After 3 - 4 hours all the water phase was found in the lower part (C) but the paraffin layer always remained unfiltered in the upper part (A).

Equilibrium dialysis was carried out at 2° in celophane dialyzing tubings (Kalle & Co, Wiesbaden - Biebrich, Germany) with small amounts of thymol added to the solutions in order to prevent bacterial growth. The details of the procedure of dialysis are described in Tables.

Adenine and its derivatives were determined spectrophotometrically (S. P. 500 Unicam Spectrophotometer) at pH 7.0. Molar extinction at 259 m μ was taken as 15 400 according to Bock *et al.* [3]. In cases where thymol was present, ATP was determined by the ribose moiety according to Mejbaum [21]. Phosphate was determined according to Fiske & Subbarow [11]; sucrose by the anthrone method [2]; and albumin by the biuret method [12].

ATP disodium salt and ADP sodium salt were obtained from Pabst; AMP was a product of Nutritional Biochemicals Co., and adenosine of Fluka. Human serum albumin (fifth fraction of Cohn) was kindly offered by the Institute of Hematology in Warsaw.

RESULTS

Filtration of solutions of ATP through celophane membranes

Preliminary experiments showed that the concentration of ATP in the initial portion of the filtrate (approximately $\frac{1}{2}$ to $\frac{2}{3}$ of the total volume) was much lower than in the original solution, whereas the

Table 1

Passage of ATP through celophane membrane in the course of filtration

2-5 ml. of solution of ATP in 0.04 M-acetate buffer, pH 3.6, was filtered during 3 hours

Expt. No.	Concentration of ATP (mM)		
	In the original solution	In the first portion of the filtrate ($\frac{1}{2}$ - $\frac{2}{3}$ of the original volume)	In the residue
1	0.73	0.52	0.81
	0.73	0.55	0.81
	1.61	1.15	1.75
	1.61	1.18	1.72
2	0.24	0.18	0.29
	0.50	0.35	1.01
	0.88	0.69	1.02

Table 2

Changes in the concentration of ATP in the filtrate in the course of filtration through celophane membrane

Experiment A: 5 ml. of ATP solution in 0.04 M-acetate buffer, pH 3.6. Experiment B: 5 ml. of ATP solution in 0.04 M-acetate buffer, pH 3.6, under a layer of liquid paraffin (3 ml.). In this case, all the solution passed the membrane after 3 hours.

The concentration of ATP was determined in successive portions of the filtrate, collected within time limits (min.) as indicated

Expt.	Concentration of ATP (mM)							
	In the original solution	In successive portions of the filtrate						
		0-30 min.	30-60 min.	60-120 min.	120-150 min.	150-180 min.	180-210 min.	210-270 min.
A	0.96	0.72	0.86		0.88		1.18*	
	0.96	0.68	0.85		0.88		1.19*	
B	0.96	0.82	0.91	0.99	1.05			
	0.96	0.82	0.88	0.97	1.04			

*This portion remained above the membrane after 210 min. of filtration and passed the membrane only when a layer of paraffin was subsequently put on its surface.

Table 3

Recovery of ATP in the filtrate in the case when the whole solution passed the membrane

1.5 ml. of ATP solution in 0.04 M-acetate buffer, pH 3.6, was centrifuged in the filtration vessel under a layer of liquid paraffin (5 ml.) until all the water phase passed the membrane (usually in about 3 hours)

Expt. No.	Concentration of ATP (mM)		Recovery of ATP in the filtrate %
	In the original solution	In the filtrate	
1	0.055	0.056	101
	0.108	0.111	102
	0.165	0.173	104
2	0.220	0.214	97
	0.276	0.267	97
	0.317	0.318	100
3	0.378	0.363	96
	0.440	0.434	98

filtration residue became more concentrated (Table 1). Further analyses (Table 2, exp. A) revealed that the concentration of ATP increased in successive portions of the filtrate. It was, however, impossible to recover in the filtrate the whole amount of ATP as a certain volume of the solution always remained in the upper part of the vessel. In order to move the whole volume through the membrane, a layer of liquid paraffin, as mentioned earlier, was put above the water solution. In this way the rate of filtration was increased but the general character of the process remained unchanged, i.e. the concentration of ATP increased in the

Table 4

Changes in the concentration of ortho- and pyrophosphates and of adenine nucleotides in the filtrate in the course of filtration through the celophane membrane

3 ml. samples of solutions neutralized to pH 7.0 by means of NaOH were filtered under a layer of 5 ml. liquid paraffin. Three portions were collected in the course of filtration within time limits as indicated, and the concentration of the solutes was determined. Each time when a portion of the filtrate was removed 1 ml. of paraffin was added on the surface of the residue. The filtration was complete after 3 hours

Substance	Concentration (mM)			
	In the original solution	In successive portions of the filtrate		
		0 - 50 min.	50 - 100 min.	100 - 180 min.
AMP	1.01	0.72	0.92	1.44
Orthophosphate	1.04	0.75	0.93	1.36
ADP	1.01	0.63	0.83	1.53
Pyrophosphate	1.03	0.69	0.87	1.43

course of filtration and in final portions exceeded the concentration in the original solution (Table 2, exp. B). If the entire volume of the solution passed the membrane, the whole amount of ATP present in the original solution could be recovered in the filtrate (Table 3).

A "retention" of certain small ions by semipermeable membranes has been observed long ago by Ershler [10] and by McBain & Stuewer [18] and explained as an effect of the electric charge of the ions and of a small permeability of the membranes. In order to examine the effect of these two factors the filtration of various adenosine phosphates, of adenine,

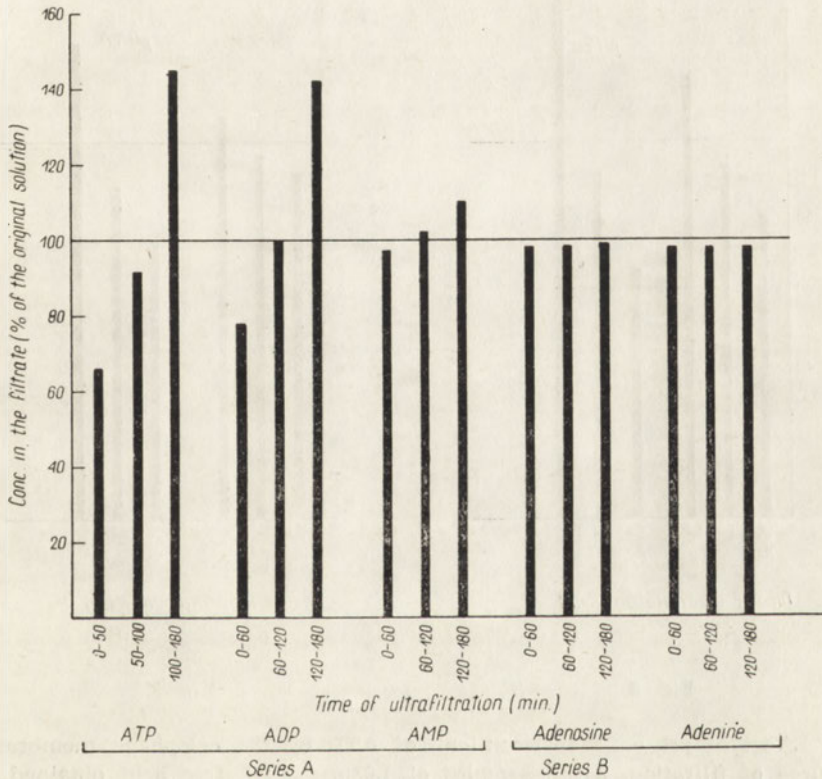


Fig. 2. Changes in the concentration of ATP, ADP, AMP, adenosine and adenine in the filtrate in the course of filtration through the cellophane membrane.

3 ml. samples of 1.0 mM-solutions of ATP, ADP and AMP neutralized by NaOH to pH 7.0 (series A), or 3 ml. samples of 1.2mM-solutions of adenosine and adenine in 0.04M-acetate buffer, pH 3.6 (series B) were filtered under a layer of liquid paraffin (5 ml. in series A, and 2 ml. in series B). The filtrates were collected within time limits as indicated on the abscissa and the concentration of the solutes was determined. Each time, when a portion of the filtrate was removed an additional portion of liquid paraffin (1 ml. in series A, and 3 ml. in series B) was added on the surface of the residue. The filtration was complete in about 3 hours

of adenosine, and of ortho- and pyrophosphates has been investigated and the influence of pH thereupon has been studied.

It is shown in Fig. 2 that an increased number of phosphate residues in the molecule results in an increase in the "retention" effect. The "retention" is also observed with ortho- and pyrophosphate (Table 4) but not with adenosine and adenine (Fig. 2). The degree of the "reten-

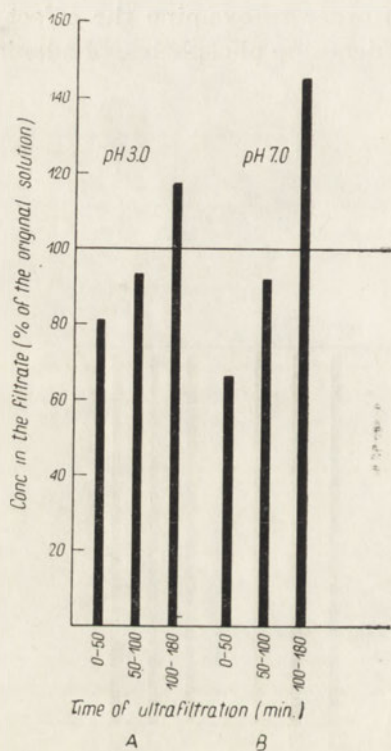


Fig. 3

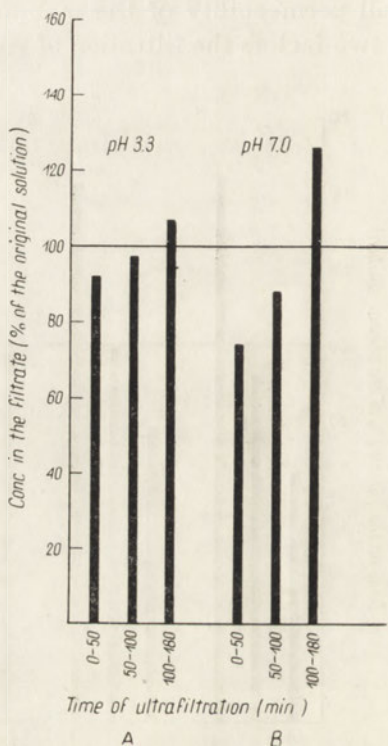


Fig. 4

Fig. 3. Effect of pH on the "retention" of ATP by the celophane membrane in the course of filtration. 3 ml. samples of 1.03mM ATP, free acid obtained from sodium salt by means of Amberlite IR-120, pH 3.0 (expt. A), or sodium salt, pH 7.0 (expt. B), were filtered under a layer of 5 ml. liquid paraffin.

Successive portions of the filtrates were collected within time limits as indicated on the abscissa and the concentration of ATP was determined. Each time when the filtrate was removed a new portion of 1 ml. liquid paraffin was added on the surface of the residue. All the solution was completely filtered after 3 hours

Fig. 4. Effect of pH on the "retention" of orthophosphate by the celophane membrane in the course of filtration. 3 ml. samples of 1.05mM orthophosphoric acid, pH 3.3, (expt. A), or of 1.05mM sodium orthophosphate, pH 7.0, (expt. B) were filtered under a layer of 5 ml. liquid paraffin. All other conditions as in Fig. 3

tion" of ortho- and pyrophosphates is only slightly smaller than of the adenine nucleotides with one or two phosphate groups, respectively¹. "Retention" of ATP and orthophosphate increases with increasing pH of the medium (Fig. 3 and 4).

These results indicate that the "retention" of nucleotides by cellophane membranes is caused mainly by the electric charge of ions, whereas the size of molecules may have a slight effect only. This is also proved by experiments with an acid dye, Orange II, and with sucrose. A high degree of "retention" was observed with Orange II, whereas sucrose was "retained" only slightly (the first portion of sucrose solution collected from 0 min. till 50 min. contained 95%; the second portion, from 50 min. till 100 min., 102%; and the third portion, from 100 min. till 180 min., 108% of the initial concentration). It is suggested that this small "retention" of sucrose may be caused by its slightly acidic character.

Ultrafiltration of mixed solutions of ATP and proteins

Solutions of ATP and serum albumin were placed in the upper part of the filtration vessel, covered with a layer of liquid paraffin, and centrifuged until the whole water phase passed through the membrane. The results obtained in this way concerning the binding of ATP by the protein were compared with those obtained from equilibrium dialysis experiments.

Cellophane membranes obtained from Fisher Scientific Co. appeared not to be suitable for dialysis of nucleotides as the equilibrium, in spite of a frequent stirring or shaking, was attained only after 8 days (Table 5). This slow penetration of ATP through cellophane membranes is probably caused by the negative charge of the molecules as is the case in the filtration. This is evident from experiments with adenosine where the equilibrium is obtained in two days already. Among different kinds of cellophane membranes those produced by Kalle & Co. appeared most suitable, because the equilibrium in the case of ATP was attained with these membranes in 4 days². Hydrolysis of ATP during that time was

¹ The degree of "retention" varies from experiment to experiment (cf. AMP in Fig. 2 and in Table 4), presumably owing to slightly different experimental conditions, but parallel results from the same experiment are always fairly similar (e. g. Table 2). In spite of these variations the general character of the process and its dependence on the number of phosphate groups are similar.

² With the membranes from Kalle & Co. the "retention" of nucleotides in the filtration was quite similar as with membranes from Fisher Scientific Co. but the rate of filtration was slightly smaller.

Table 5

Equilibrium dialysis of adenosine and of ATP

10 ml. H₂O was placed in dialyzing tubings (Fisher Scientific Co.) and equilibrated against 10 ml. of water solution of adenosine (0.454 mM) or ATP sodium salt (0.546 mM.). In one series the outer solution was stirred by bubbling air, in the other, the solution was not stirred

Substance	Time of dialysis (days)	Concentration inside the tubing (mM)		
		Calculated for the equilibrium	Found	
			Stirred	Not stirred
Adenosine	2	0.242	0.244	0.174
	4		—	0.240
ATP	2	0.273	0.119	0.076
	4		0.170	0.140
	6		0.212	0.194
	8		0.277	0.244

negligible (about 5% of ATP hydrolysed) and did not affect the final results, notwithstanding the fact that ADP and AMP are bound by proteins to a smaller extent than ATP [7].

Table 6

Binding of ATP by serum albumin as determined by equilibrium dialysis and by the present ultrafiltration procedure

A. Dialysis. 10 ml. of a solution of serum albumin (5.6 mg./ml.) in 0.1 M-acetate buffer, pH 3.6, in the dialyzing tubing (Kalle & Co.) was dialysed against 10 ml. of 0.818 mM-ATP in acetate buffer, pH 3.6. In the control, acetate buffer alone was placed inside the tubing.

B. Ultrafiltration. 2 ml. of solution containing serum albumin (2.8 mg./ml.) and ATP (0.409 μ moles/ml.) in 0.1 M-acetate buffer, pH 3.6, was filtered under a layer of 5 ml. liquid paraffin during 3 hours until a complete passage of the water phase through the membrane (the filter membranes were cut off of celophane dialyzing tubings, Fisher Scientific Co.).

In control test a solution of ATP alone (0.409 μ moles/ml.) in 0.1 M-acetate buffer, pH 3.6, was filtered.

Each value, in both experiments, A and B, gives the mean of duplicate determinations

A. Dialysis	Concentration of ATP outside the tubing at equilibrium (mM)		Calculated amount of ATP bound by albumin	
	Control (ATP alone)	ATP+albumin	μ moles/ml.	μ moles/g. albumin
	(a)	(b)	(a - b)	
	0.409	0.145	0.264	105.1
B. Ultrafiltration	Concentration of ATP in the filtrate (mM)		Calculated amount of ATP bound by albumin	
	Control (ATP alone)	ATP+albumin	μ moles/ml.	μ moles/g. albumin
	(a)	(b)	(a - b)	
	0.399	0.134	0.265	105.3

Table 6 presents the results of one of the experiments in which the data for the amount of protein bound ATP obtained by the present ultrafiltration procedure and by equilibrium dialysis are compared. As can be seen the results obtained by both methods are practically identical.

Unexpectedly enough it appeared that serum albumin diminished the "retention" of ATP during ultrafiltration. The difference between the concentration of ATP in the initial portions and in the whole filtrate was much lower in the presence than in the absence of albumin. In dialysis experiments serum albumin also increased the rate of penetration of ATP through celophane membranes and shortened the time in which the equilibrium was attained.

DISCUSSION

Various procedures of ultrafiltration by means of centrifugal force have been described by several authors. Coolidge [6] has used centrifuge tubes with plates of sintered glass sealed in the middle of the tubes. Other authors used large centrifuge tubes in which dialyzing bags with the solution were supported either by small containers of sintered glass [25] or by nickel nets [5].

It may be supposed that the modification of the ultrafiltration vessel described in the present paper has some advantages as compared with the apparatus mentioned above although the filtration surface is smaller than in procedures where filtration bags are used. The vessel is especially suitable for filtration of small volumes of solutions. The design of the vessel enables, if necessary, a removal of portions of the filtrate without the necessity of dismounting.

A "retention" of various substances of low molecular weight by semipermeable membranes has been already described by Ershler [10] and by McBain & Stuewer [18] who have also found that in the case of electrolytes the greater is the dilution the more pronounced is the "retention". According to McBain & Stuewer [18] the "retention" depends upon the size of pores of the membrane and, in the case of electrolytes, furthermore upon the electric charge of the membrane and the Donnan effect. In the case of celophane membranes used in the present investigation the size of pores seemed to have no considerable effect on the degree of "retention"; in spite of the differences in the size of molecules, orthophosphate was "retained" to the same extent as AMP, and pyrophosphate as ADP; the "retention" of the two last substances was more pronounced than that of the two former. It seems that the "retention" effect is caused mainly by the negative charge of ions of the solute to be filtered. An increase in the number of phosphate residues in the nucleotide

molecule, i. e. an increasing acidity of the compound, increased the "retention" effect. Adenine and adenosine which do not form negatively charged ions are not "retained" whereas sucrose, probably owing to its slightly acidic character, is "retained" to a small extent. The assumption of the principal role of the electric charges in the "retention" phenomenon is also in agreement with the observed effect of pH. ATP is less "retained" at pH 3.6, where it forms tertiary anions, than at pH 7.0, where the dissociation of the fourth proton is considerably advanced (pK 6.5) and where the dissociation of the amino group in the adenine ring is regressed [1,19].

A very slow dialysis of nucleotides through celophane membranes as observed in the present investigation can also be explained by the negative charge of the molecules. This is indicated by a comparison of dialysis of ATP, adenine and adenosine. Our experiments with dialysis of adenosine and the experiments of Leventhal [17] with dialysis of adenine showed a rather quick equilibration whereas the equilibration of ATP in our experiments was rather slow. There are only few data concerning ultrafiltration and dialysis of nucleotides. Mommaerts [22] noted a very slow penetration of nucleotides through dialyzing membranes and a "retention" of nucleotides during ultrafiltration. This slow penetration might have caused a misinterpretation of some results on the binding of adenine nucleotides by actin [23, 24] as was recently pointed out by Martonosi *et al.* [20]. They have also found that ATP penetrates faster through celophane membranes in the presence of G-actin. This is in agreement with our finding concerning a considerable increase in the penetration of nucleotides through celophane membranes in the presence of serum albumin.

The "retention" of nucleotides as observed by other authors and by ourselves may be explained as an electrostatic repulsion of the nucleotide anions by the celophane membrane as both are negatively charged. Wilbrandt [26] has shown that an electrostatic field exists in the pores of celophane membranes which is caused by the dipole moment of hydroxyl groups. It has been pointed out [cf. 9] that ultrafiltration is thermodynamically equivalent to equilibrium dialysis. It has been also shown [13,14] that ultrafiltration is accompanied by Donnan effect. However, in our experiments the Donnan effect is probably negligible because of a rather high concentration of the buffer solution.

In most studies, in which ultrafiltration has been used for measuring the binding of small molecules by proteins, only first portions of the filtrate have been analysed [4,9,16]. In this way the effect of "retention" has not been taken into account which may cause an erroneous interpretation of results. In the present investigation it has been shown that

the effect of "retention" can be overcome if the whole volume of the solution passes through the membrane. This has been possible by means of a layer of liquid paraffin put on the surface of the water phase. In this case ultrafiltration gives results which are comparable with those obtained by equilibrium dialysis. It seems that this procedure may be used in various investigations concerning the interaction of micro- and macromolecular compounds. It has been already used in this Laboratory in studying the binding of ATP by serum albumin [8] and the binding of nucleotides by actin (Drabikowski & Strzelecka-Golaszewska, unpublished).

SUMMARY

A modified procedure of ultrafiltration is described in which the centrifugal force is used to move solutions through the membrane. A special vessel made of plexiglass is applied and a layer of liquid paraffin is put above the solution to be filtered. This increases the rate of filtration and enables the whole volume of the solution to pass through the membrane. It has been shown that this procedure can be used for studying the binding of nucleotides (and other substances of low molecular weight) by proteins. The results obtained in this way appeared to be identical with those obtained by equilibrium dialysis.

When the described procedure was applied to filtration of solutions of adenine nucleotides alone, it was observed that the concentration of the substances in initial portions of the filtrate was smaller than in the original solution and it increased in the course of filtration. This "retention" of nucleotides was shown to be dependent on the negative charge of nucleotide molecules. If the whole volume of the solution was filtered the nucleotide could be quantitatively recovered.

REFERENCES

- [1] Alberty R. A., Shith R. M. & Bock R. M., *J. Biol. Chem.* **193**, 425, 1951.
- [2] Ashwell G., in *Methods in Enzymology* (S. P. Colowick & N. O. Kaplan eds.) Vol. 3, p. 73, Acad. Press N. Y. 1957.
- [3] Bock R. M., Nan Sing Ling, Morell S. A. & Lipton S. H., *Arch. Biochem. Biophys.* **62**, 253, 1956.
- [4] Boyer P. D., Ballou G. A. & Luck J. M., *J. Biol. Chem.* **167**, 407, 1947.
- [5] Brandt Rehberg P., *Acta Physiol. Scand.* **5**, 305, 1943.
- [6] Coolidge T. B., *J. Biol. Chem.* **135**, 541, 1940.
- [7] Drabikowski W., *Acta Biol. Exper.* **18**, 223, 1958.
- [8] Drabikowski W., *Acta Biochim. Polon.*, in press.
- [9] Edsall J. T. & Wyman J., *Biophysical Chemistry* Vol. 1, p. 595, Acad. Press N. Y. 1958.
- [10] Ershler B., *Kolloid Z.* **68**, 289, 1934.
- [11] Fiske W. C. & Subbarow Y., *J. Biol. Chem.* **66**, 375, 1925.

- [12] Gornall A. G., Bardanill C. J. & David M. M., *J. Biol. Chem.* **177**, 751, 1949.
 [13] Greenberg D. M. & Gunther L., *J. Biol. Chem.* **85**, 491, 1930.
 [14] Greenberg D. M. & Greenberg M., *J. Biol. Chem.* **94**, 373, 1931.
 [15] Hughes T. R. & Klotz I. M., in *Methods of Biochemical Analysis*, (D. Glick, ed.) Vol. 3, p. 265, Interscience Publishers, New York-London 1956.
 [16] Klotz I. M. & Walker F. M., *J. Am. Chem. Soc.* **69**, 1609, 1947.
 [17] Leventhal D. E., *Thesis of University of Illinois*, 1958, University Microfilms Inc. Ann. Arbor Mich.
 [18] McBain J. W. & Stuewer R. F., *J. Phys. Chem.* **40**, 1157, 1936.
 [19] Martell A. E. & Schwarzenbach G., *Helv. Chim. Acta* **39**, 653, 1956.
 [20] Martonosi A., Gouvea M. A. & Gergely J., *J. Biol. Chem.* **235**, 1700, 1960.
 [21] Mejbaum W., *Z. physiol. Chemie* **258**, 117, 1939.
 [22] Mommaerts W. F. H. M., *J. Biol. Chem.* **198**, 445, 1952.
 [23] Straub F. B. & Feuer G., *Biochim. Biophys. Acta* **4**, 455, 1950.
 [24] Strohman R. C., *Biochim. Biophys. Acta* **32**, 436, 1959.
 [25] Toth A., *Biochem. Z.* **191**, 355, 1927.
 [26] Wilbrandt W., *J. Gen. Physiol.* **18**, 933, 1935.

NOWA PROCEDURA ULTRAFILTRACJI W ZASTOSOWANIU DO BADANIA WIĄZANIA NUKLEOTYDÓW PRZEZ BIAŁKA. PRZECHODZENIE ATP PRZEZ BŁONY CELOFANOWE W OBECNOŚCI I NIEOBECNOŚCI BIAŁKA

Streszczenie

Opisano zmodyfikowaną procedurę ultrafiltracji, w której siła osławkowa wykorzystywana jest dla wytworzenia ciśnienia powodującego przechodzenie roztworu przez błonę filtracyjną. Ultrafiltrację przeprowadzano w specjalnie do tego celu skonstruowanym naczyniu z plexiglasu. Na powierzchnię roztworu poddawanego ultrafiltracji nakładano warstwę płynnej parafiny, co zwiększało szybkość sączenia i umożliwiało przesączenie całej objętości badanego roztworu do końca. Wykazano, że powyższa procedura ultrafiltracji może mieć zastosowanie do badania wiązania nukleotydów (i innych niskocząstkowych substancji) przez białka, ponieważ uzyskane wyniki okazały się identyczne z wynikami dializy wyrównawczej.

Poddając filtracji czyste roztwory nukleotydów adeninowych zaobserwowano, że stężenie substancji w pierwszych porcjach przesącza było niższe niż w roztworze wyjściowym, a dopiero w dalszych porcjach przesącza stopniowo wzrastało. Wykazano, że to „zatrzymywanie“ nukleotydów zależy głównie od ładunku jonów nukleotydowych. Jeżeli roztwór badany zostaje przesączony w całości, w przesącza odnajduje się całą wprowadzoną ilość nukleotydu.

Otrzymano 3.10. 1960

Note added in proof. When our manuscript had already been finished and presented to the Editor, an abstract in the *Review Journal of USSR (Section Biol. Chem., 1960, No. 22)* of a paper on Centrifugal Filtration Method by Koishiro Saito & Nariko Hasumura came to our attention (*Japanese J. Med. Progress, 46, 698, 1959*). Prof. Saito has kindly sent us afterwards reprints of this and of three other papers on related subjects (Kashii-Yukinori, *J. Physiol. Soc. Japan, 20, 318 and 325, 1958*; Makoto Minoguchi, *J. Juzen. Med. Soc., 65, 49, 1960*). So far as we can understand from the short English summaries (all the papers are printed in Japanese) the method described by the Japanese authors appears to be very similar to our procedure. The authors used it for determination of protein bound Ca, P, and Cl, and for determination of Hb-bound CO₂. As can be read in one of the summaries, "the inconvenience of retaining of some of the ions could be completely avoided by using collo-dion membrane prepared on a plane glass surface, though in this case the yield of the filtrate suffered a slight decrease". It seems, however, that the passage of the whole quantity of water solution through the membrane, as used in our method, may be a safer procedure.

T. CHOJNACKI i MARIA J. PIECHOWSKA

BIOSYNTeza FOSFOLIPIDÓW U OWADÓW**I. WŁĄCZANIE ^{32}P -FOSFOCHOLINY W FOSFOLIPIDY
U *CELERIO EUPHORBIAE****Zakład Biochemii Ewolucyjnej, Instytut Biochemii i Biofizyki PAN, Warszawa*

Poznanie schematu biosyntezy fosfolipidów zawdzięczać należy głównie badaniom ostatnich lat pracowni Kornberga [17, 18] i Kennedy'ego [14]. Prace Dawsona natomiast pozwoliły ustalić przypuszczalne prekursorzy fosfolipidów oraz produkty ich rozpadu w warunkach *in vivo* [7, 8]. Na podstawie tych prac wiadomo, że pochodzenie fosforu fosfolipidów może być co najmniej dwojakie: albo jest to reszta fosforanowa wbudowana w cząsteczkę fosfolipidu w postaci α -glicerofosforanu, jak to ma miejsce w opisanej przez Kornberga i Pricera syntezie kwasu fosfatydowego [18] i inozytofosfatydu przez Paulusa i Kennedy'ego [20], albo estry fosforowe choliny i etanoloaminy łączą się z cząsteczką D - α , β -dwuglicerydu, tworząc fosfatydylocholinę lub fosfatydyloetanoloaminę [15]. Przy użyciu podwójnie znakowanej radioaktywnymi węglem i fosforem fosfocholiny Kornberg i Pricer [17] wykazali, że w przebiegu syntezy lecytyny w preparatach bezkomórkowych wątroby szczura, fosfocholina jest zużytkowana bez uprzedniego rozłożenia. Jak wykazali Kennedy i Weiss [15], pośrednim etapem tej reakcji jest powstawanie cytydynodwufosfocholiny, zaś drugi etap stanowi reakcja między cytydynodwufosfocholimą i D - α , β -dwuglicerydem. W analogiczny sposób odbywa się synteza kefaliny. Źródłem lecytyny może być również reakcja metylowania kefaliny, jak wskazują wyniki badań Bremera i Greenberga [3]. Jeśli chodzi o biosyntezę fosfatydyloseryny, z badań Hübschera i wsp. [13] wydaje się, że w powstawaniu tego związku bierze udział wolna, nieufosforylowana seryna, i że proces ten nie ma analogii z biosyntezą fosfatydylocholiną i fosfatydyloetanoloaminy. Istnieją jednak również dane wskazujące na powstawanie fosfatydyloseryny z ufosforylowanej seryny [16]. Poza tym możliwa jest również droga powstawania kwasu fosfatydowego przez fosforylację dwuglicerydu, jak to ma miejsce w opisanej przez Hokinów [12] reakcji ATP z D - α , β -dwuglicerydem.

Celem tej pracy było zbadanie, czy u *Celerio euphorbiae* synteza fosfatydylocholinyl zachodzi z ufosforylowanej cholinyl. Na podstawie otrzymanych wyników stwierdziliśmy, że zarówno *in vitro* jak i *in vivo* fosfocholina zostaje wbudowana bez uprzedniego odłączenia ortofosforanu. Pozwala to przypuszczać, że biosynteza fosfatydylocholinyl u gatunku *Celerio euphorbiae* przebiega w podobny sposób jak u zwierząt wyższych.

CZĘŚĆ DOŚWIADCZALNA

Odczynniki: Potrzebne do badań odczynniki otrzymywano według następujących metod:

- (1) Sól barową fosfocholinyl metodą Plimmera i Burcha [21].
- (2) Znakowaną ^{32}P -fosfocholinyl (sól Ba) metodą Riley'a [22] przez ogrzanie $\text{H}_3^{32}\text{PO}_4$ z chlorowodorkiem cholinyl w ciągu 10 godzin w 155° pod zmniejszonym ciśnieniem.
- (3) Sól barową fosfoetanolaminyl metodą Outhouse'a [19] przy użyciu POCl_3 .
- (4) Znakowaną ^{32}P -fosfoetanolaminyl (sól Ba) metodą Artoma [2] z $\text{H}_3^{32}\text{PO}_4$.

Bliższe dane dotyczące syntezy znakowanych ^{32}P -fosfocholinyl i ^{32}P -fosfoetanolaminyl podane zostały w poprzedniej pracy [5].

Stosowane do doświadczeń sole sodowe estrów otrzymywano przez wytrącenie jonów Ba^{2+} niewielkim nadmiarem 0,5 M-roztworu Na_2SO_4 .

- (5) ATP uzyskano z mięśni królika metodą Szent-Györgyi'ego [24].

Material: Doświadczenia *in vitro* przeprowadzono na ciele tłuszczowym *Celerio euphorbiae* w następujących stadiach rozwojowych: gąsienice w czasie ostatniej linki, gąsienice w 1-2 dni oraz w 4-5 dni po ostatniej lince, wrzeciona, poczwarki w 10-14 dni po zapoczwarczeniu oraz dojrzałe motyle (samce) w około 6 godzin po wylęgu. Doświadczenia *in vivo* przeprowadzano na gąsienicach w 4-5 dni po ostatniej lince oraz na samcach motyla w około 6 godzin po wylęgu.

Włączanie ^{32}P -fosfocholinyl w fosfolipidy *in vitro*

Ciało tłuszczowe owadów wypreparowywano w narkozie eterowej i rozcierano w homogenizatorze Pottera-Elvehjema z 0,1 M-buforem fosforanowym, pH 7,5 w ilości 1 ml buforu na 150 mg tkanki.

Mieszanina inkubowana (1 ml) zawierała: 0,5 ml homogenatu ciała tłuszczowego (około 100 mg ciała tłuszczowego zawierające 2-3,55 mg N całkowitego w zależności od różnic indywidualnych pomiędzy osobnikami tego samego stadium i różnic spowodowanych różnym okresem rozwoju), 75 μmoli buforu fosforanowego o pH 7,5, 25 μmoli MgCl_2 oraz

2,5 μmola ^{32}P -fosfocholinę lub 4 μmole ^{32}P -fosfoetanolaminy. Aktywność właściwa ^{32}P -fosfocholinę wynosiła od $5 \cdot 10^4$ do $1,5 \cdot 10^5$ imp./min./ $\mu\text{mol P}$; aktywność właściwa ^{32}P -fosfoetanolaminy wynosiła $3 \cdot 10^4$ imp./min./ $\mu\text{mol P}$.

Próbki inkubowano w probówkach okrągłodennych, \varnothing 1,6 cm, wysokości 12 cm, w łaźni wodnej o temperaturze 37° w ciągu trzech godzin ze stałym wstrząsaniem.

Inkubację przerywano dodaniem 2 ml etanolu i ogrzaniem w 100° w ciągu półtorej minuty, po czym sporządzono z badanej próbki wyciąg wodny i wyciąg chloroformowy jak w poprzedniej pracy [5] metodą Dawsona [7]. Wyciąg chloroformowy zawierający fosfolipidy przemywano dwukrotnie podwójną objętością 0,1 N-HCl dla usunięcia domieszek ^{32}P -fosfocholinę. Ilość ^{32}P włączoną w trakcie inkubacji w fosfolipidy oznaczano mierząc na miseczkach metalowych radioaktywność odparowanej próbki przemytego wyciągu chloroformowego pod licznikiem BAT 25. Fosfor fosfolipidów oznaczano metodą Fiskego i Subbarowa [10] po spaleniu próbki wyciągu z H_2SO_4 . Identyfikację powstałego ^{32}P -fosfolipidu prowadzono badając chromatograficznie radioaktywność produktów łagodnej hydrolizy alkalicznej fosfolipidów ekstraktu chloroformowego metodą Dawsona [6]. W wyciągu wodnym zawarte były rozpuszczalne związki fosforowe ciała tłuszczowego oraz nieużyty do syntezy duży nadmiar ^{32}P -fosfocholinę. Ewentualne przemiany dodanego znakowanego estru kontrolowano badając chromatograficznie próbkę wyciągu wodnego w układzie kwaśnym rozpuszczalników według Ebela [9] i lokalizując radioaktywne plamy metodą autoradiografii. Azot w homogenatach oznaczano metodą Kjeldahla.

Włączanie ^{32}P -fosfocholinę w fosfolipidy in vivo

Gąsienicom wstrzykiwano około 2 μmole ^{32}P -fosfocholinę ($9 \cdot 10^4$ imp./min./ $\mu\text{mol P}$) w objętości 0,1 ml. Po założeniu luźno nicianej podwiązki na odnóże gąsienicy, igłę strzykawki wprowadzano poprzez jego szczyt ukośnie pod powierzchnią skóry na głębokość 1 - 1,5 cm. W trakcie wyjmowania igły z ciała podwiązkę zaciskano celem uniemożliwienia wycieku hemolimfy. Motylom wstrzykiwano do odwłoku około 1 μmol ^{32}P -fosfocholinę ($5,9 \cdot 10^4$ imp./min./ $\mu\text{mol P}$) w objętości 0,1 ml. Po 24 godzinach motyle oraz gąsienice, po usunięciu zawartości przewodu pokarmowego, homogenizowano w 10% kwasie trójchlorooctowym (TCA) i oznaczano zawartość ^{32}P mierząc pod licznikiem radioaktywność próbki homogenatu. Następnie izolowano frakcję kwasorozpuszczalną i lipidową metodą Schneidera [23]. Metodę tę zastosowano w badaniach *in vivo* ze względu na obecność pyrofosforanu u motyli samców. Pyrofosforan

występuje w formie nie dającej się ekstrahować w oddziaływaniu obojętnym [11] stosowanym w metodzie Dawsona, przechodzi zaś do TCA używanego przez Schneidera. Zawartość ^{32}P we frakcji lipidowej i kwasorozpuszczalnej oznaczano po odparowaniu próbek na miseczkach metalowych; fosfor całkowity metodą Fiskego i Subbarowa [10] po spaleniu próbki z H_2SO_4 . Ekstrakty lipidowe uzyskane metodą Schneidera zawierają radioaktywne zanieczyszczenia nielipidowe, wobec jednak dużej radioaktywności fosfolipidów obecność ich można było pominąć.

WYNIKI

Wyniki badań *in vitro* włączania ^{32}P -fosfocholinę w fosfolipidy homogenatu ciała tłuszczowego u różnych stadiów rozwojowych *Celerio euphorbiae* przedstawiono na Rys. 1. Wartość włączania wyrażono jako względną aktywność właściwą frakcji fosfolipidowej.

Względna aktywność właściwa = $\frac{\text{aktywność właściwa P lipidowego}}{\text{aktywność właściwa P fosfocholinę}} \cdot 100$.

Z 8 doświadczeń obejmujących gąsienice w czasie ostatniej linki oraz żerujące do 5 dni od ostatniej linki znaleziono średnią względną aktywność właściwą równą 3,6. W porównaniu do gąsienic włączanie u wrzecion, poczwarek i motyli było kilkakrotnie mniejsze.

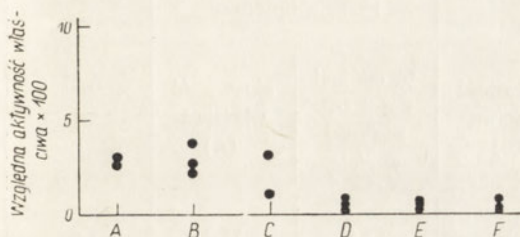
W 9 doświadczeniach obejmujących wrzeciona, poczwarki i motyle względna aktywność właściwa frakcji fosfolipidowej wahała się w granicach od 0,28 do 0,94. Po łagodnej hydrolizie alkalicznej [6] frakcji fosfolipidowej ciała tłuszczowego gąsienic inkubowanego z ^{32}P -fosfocholiną radioaktywność stwierdzano chromatograficznie tylko w plamie odpowiadającej glicerofosfocholinie, co świadczy, że włączanie ^{32}P było wrazem syntezy radioaktywnej lecytyny.

W trakcie 3 godz. inkubacji ciała tłuszczowego z ^{32}P -fosfocholiną nie stwierdzono rozkładu dodanego estru ani wytwarzania ^{32}P -ortofosforanu. W badaniu chromatograficznym plama ortofosforanu zawierała pod koniec inkubacji jedynie ślady izotopu. Wobec tego możemy przyjąć, że radioaktywna lecytyna powstawała w reakcji włączania w materiał lipidowy nierozłożonej fosfocholinę.

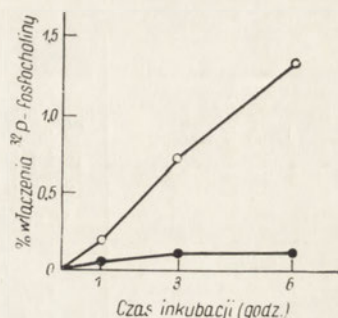
Badane w jednym doświadczeniu włączanie ^{32}P -fosfoetanolaminy w fosfolipidy ciała tłuszczowego różnych stadiów rozwojowych *Celerio euphorbiae* jest podobne do włączania fosfocholinę. I tu również intensywne wbudowywanie znakowanego estru obserwowano u gąsienic, natomiast starsze stadia rozwojowe dawały bardzo niskie wartości.

W dalszych doświadczeniach badano wpływ ATP i czynników hamujących na wielkość włączania ^{32}P -fosfocholinę w fosfolipidy. W doświadczeniach użyto homogenatu ciała tłuszczowego wypreparowanego z kilku

gąsienic żerujących po ostatniej lince. Włączenie wyrażono w procentach dodanego estru. Na Rys. 2 przedstawiono wpływ ATP. Jak widać, w próbie kontrolnej włączenie fosfocholiny zachodzi z prawie niezmienną szybkością w ciągu kilku pierwszych godzin, i po 6 godz. inkubacji 1,35⁰/₀ dodanej radioaktywności jest wbudowane w fosfolipidy. Dodanie 7 μ moli



Rys. 1. Włączenie ³²P-fosfocholiny *in vitro* w fosfolipidy ciała tłuszczowego w różnych stadiach rozwojowych *Celerio euphorbiae*. (A) gąsienice w czasie ostatniej linki; (B) gąsienice żerujące w 1-2 dni po ostatniej lince; (C) gąsienice żerujące w 4 - 5 dni po ostatniej lince; (D) wrzeciona; (E) poczwarki; (F) motyle samce w około 6 godzin po wyłęgu. Punkty oznaczają wynik jednego doświadczenia. Szczegóły w tekście



Rys. 2. Wpływ ATP na przebieg włączenia ³²P-fosfocholiny w fosfolipidy homogenatu ciała tłuszczowego gąsienic żerujących. (○) kontrola, (●) z ATP (7 μ moli). Skład mieszaniny inkubowanej i warunki inkubacji podano w części doświadczalnej

ATP obniża znacznie włączenie znakowanego estru. Po 6 godz. inkubacji w wyciągu chloroformowym znaleziono tylko 0,13⁰/₀ dodanej radioaktywności. Obniżenie włączenia powodowały również jony wapnia, cysteina oraz fluorek potasu (Tabl. 1).

Tablica 1

Czynniki hamujące syntezę *in vitro* ³²P-fosfolipidów z ³²P-fosfocholiny w homogenacie ciała tłuszczowego gąsienic żerujących

Skład mieszaniny inkubowanej i warunki inkubacji w tekście. Wyniki podano w procentach ³²P-fosfocholiny wbudowanej w fosfolipidy

Dodatek (μ mole)	Dośw. 1	Dośw. 2
Kontrola	0,194	0,700
CaCl ₂ (12,5)	0,176	—
CaCl ₂ (50)	0,052	—
Cysteina (10)	—	0,286
KF (40)	—	0,042
Cysteina (10)+KF (40)	—	0,586

Tablica 2

Rozmieszczenie ^{32}P w frakcjach fosforowych gąsienic i motyli *Celerio euphorbiae* po 24 godz. od wstrzyknięcia ^{32}P -fosfocholino

Dane dotyczące przebiegu frakcjonowania oraz wstrzykiwanych ilości ^{32}P -fosfocholino podano w części doświadczalnej. Wyniki podano w procentach ogólnej ilości ^{32}P zawartej w ciele owada oraz jako aktywności właściwe (imp./min./ μmol fosforu). Podano również stosunek aktywności właściwej frakcji lipidowej (A) do aktywności właściwej frakcji kwasorozpuszczalnej (B)

Doświadczenie	Frakcja kwasorozpuszczalna		Frakcja lipidowa		A/B
	% ogólnej ilości ^{32}P zawartej w ciele	aktywność właściwa (B)	% ogólnej ilości ^{32}P zawartej w ciele	aktywność właściwa (A)	
Gąsienice					
I	42,0	9,9	52,5	35,3	3,6
II	42,6	11,8	55,3	29,4	2,5
III	44,2	20,5	40,3	23,8	1,2
Motyle					
I	83,5	19,2	14,1	16,9	0,9
II	69,4	14,3	11,4	14,3	1,0
III	70,5	16,4	14,7	23,6	1,4

Badania nad włączaniem *in vivo* ^{32}P -fosfocholino w fosfolipidy u gąsienic i u motyli dały wyniki potwierdzające wyniki doświadczeń *in vitro*. Po wstrzyknięciu znakowanego estru znaleziono po 24 godz. znaczne włączenie izotopu w fosfolipidy u gąsienic, natomiast u motyli ilość ^{32}P w fosfolipidach stanowiła mały procent całkowitej radioaktywności oznaczonej w ciele motyla. U gąsienic aktywność właściwa frakcji fosfolipidowej była do trzech razy wyższa od aktywności właściwej frakcji kwasorozpuszczalnej, podczas gdy u motyli obie wartości były zbliżone do siebie (Tabl. 2).

DYSKUSJA

Rola fosfocholino w biosyntezie fosfolipidów oraz mechanizm jej włączania w fosfolipidy zostały zbadane przez Kornberga i Pricera [17] oraz Kennedy'ego i Weissa [15] u zwierząt wyższych (wątroba szczura, wątroba kurczęcia). Przedstawione w tej pracy badania *in vitro* nad włączaniem ^{32}P -fosfocholino w fosfolipidy ciała tłuszczowego *Celerio euphorbiae* wskazują, że również u tego owada w syntezie lecytyny bierze udział cząsteczka fosfocholino jako całość. Dzięki zastosowaniu do doświadczeń buforu fosforanowego w ilości 30 $\mu\text{moli P}$ na 1 μmol dodawanej do homogenatu ^{32}P -fosfocholino można było wykluczyć możliwość włączania

w fosfolipidy ^{32}P -ortofosforanu, który mógłby powstać z rozpadu radioaktywnej fosfocholiny. Obecność w inkubacie nieznakowanego ortofosforanu w stężeniu wielokrotnie przewyższającym stężenie ^{32}P -fosfocholiny stwarzała blok rozcieńczeniowy uniemożliwiający przejście izotopu w fosfolipidy *via* ortofosforan. Badaniem chromatograficznym stwierdzono zresztą, że rozpad znakowanej fosfocholiny i powstawanie ^{32}P -ortofosforanu nie zachodzi prawie wcale w ciągu kilkugodzinnej inkubacji. Chromatogramy wyciągów wodnych inkubatów 3- i również 6-godzinnych wykazywały radioaktywność w plamie fosfocholiny, a tylko ślady ^{32}P w plamie ortofosforanu. Można wobec tego przyjąć, że nierozłożona cząsteczka fosfocholiny wbudowywana była w fosfolipidy. Po łagodnej hydrolizie alkalicznej frakcji fosfolipidowej około 70% zawartego w niej ^{32}P przechodziło do fazy wodnej. W badaniu chromatograficznym radioaktywność ta odpowiadała plamie glicerofosfocholiny. Świadczy to o syntezie w ciele tłuszczowym radioaktywnej lecytyny z ^{32}P -fosfocholiny. W stosowanych warunkach łagodnej hydrolizy alkalicznej metodą Dawsona [6] czysta lecytyna ulega hydrolizie w 84%. Trzeba przyjąć zatem, że w ciele tłuszczowym obok lecytyny w mniejszym stopniu powstawały z dodanej fosfocholiny fosfolipidy niezmydlające się, do których zalicza się sfingomielinę.

Synteza znakowanej lecytyny zachodziła z różnym natężeniem w homogenatach ciała tłuszczowego różnych stadiów rozwojowych *Celerio euphorbiae*. W stadium gąsienicy zachodziła ona wyraźnie, u wrzecion, poczwerek i motyli prawie wcale nie zaobserwowano włączania ^{32}P -fosfocholiny we frakcję fosfolipidową. Należy zaznaczyć, że różnice te nie są spowodowane niejednakowym stopniem rozcieńczenia radioaktywnego estru przez własny nieznakowany substrat próbek ciał tłuszczowych z różnych stadiów rozwojowych owada. Próbkki fosfocholiny izolowane chromatograficznie z wyciągów wodnych różnych inkubatów nie wykazywały znacznych różnic w aktywności właściwej pomiędzy sobą (oznaczenia te wykonano posługując się metodą stosowaną w innej pracy [4]).

W doświadczeniu z ^{32}P -fosfoetanolaminą u gąsienic zachodziło wyraźne włączanie *w fosfolipidy dodanego estru, podczas gdy u starszych stadiów rozwojowych włączanie było bardzo niskie. Analogia między włączaniem fosfocholiny i fosfoetanolaminy może być tłumaczona tym samym mechanizmem biosyntezy lecytyny i kefaliny [15].

O ile niskie wartości włączania u wrzecion i poczwerek pozostają w zgodności z ogólnie znanym spadkiem procesów metabolicznych* u tych stadiów w porównaniu do gąsienic, o tyle nie stwierdzenie włączania w ciele tłuszczowym motyli stanowi niespodziankę wymagającą dalszego zbadania. W tym celu sprawdzono *in vivo* zdolność włączania znakowanej

fosfocholiny w fosfolipidy u gąsienic i u motyli. Również i w tych doświadczeniach stwierdzono niższe włączanie ^{32}P w fosfolipidy u motyli w porównaniu z gąsienicami.

Zauważone w homogenatach ciała tłuszczowego gąsienic obniżenie syntezy radioaktywnej lecytyny z ^{32}P -fosfocholiny pod wpływem ATP można wytłumaczyć możliwym w tych warunkach zmniejszeniem ilości dwuglicerydu, który jest akceptorem fosfocholiny. W podobnie przeprowadzonych doświadczeniach ze znakowaną fosfocholimą na tkance wątrobowej świnki morskiej (T. Chojnacki i T. Korzybski, dane niepublikowane) zauważono również obniżenie włączania fosfocholiny w obecności ATP, podczas gdy ADP nie powodował tego efektu. W przeciwieństwie do włączania fosfocholiny ATP nie powodował obniżenia włączania w fosfolipidy wątroby ^{32}P - α -glicerofosforanu lecz wzrost o około 50%, co może być tłumaczone innym mechanizmem włączania tego estru. Hokin i Hokin [12] wykazali, że D - α , β -dwugliceryd może być fosforylowany kosztem ATP. Powstaje w tej reakcji kwas fosfatydowy, który z kolei może brać udział w syntezie inozytofosfatydu [20]. Powyższa hipoteza o odciąganiu D - α , β -dwuglicerydu z toru lecytynowego do procesów powstawania innych fosfolipidów będzie potwierdzona wówczas, jeśli uda się wykazać reakcję Hokinów u *Celerio euphorbiae*.

Hamujący wpływ fluoru i cysteiny trudno powiązać z hamowaniem określonych etapów biosyntezy lecytyny z fosfocholiny. Obniżenie syntezy w obecności jonów wapnia według Kennedy'ego i Weissa [15] polega na hamowaniu działania transferazy gliceryd - fosfocholina.

Autorzy wyrażają serdeczne podziękowanie Prof. Dr I. Mochackiej za cenne wskazówki i pomoc w przygotowaniu pracy do druku.

STRESZCZENIE

W biosyntezie lecytyny u *Celerio euphorbiae* bierze udział cząsteczka fosfocholiny. Natężenie włączania ^{32}P -fosfocholiny badane w homogenatach ciała tłuszczowego jest niejednakowe w różnych stadiach rozwojowych owada. Jest ono najsilniejsze u gąsienic, podczas gdy u wrzecion, poczwerek i motyli jest nieznaczne. Również *in vivo* włączanie wstrzykniętej znakowanej fosfocholiny w fosfolipidy całych organizmów jest u motyli blisko trzy razy niższe niż u gąsienic żerujących.

LITERATURA

- [1] Agranoff B. W., Bradley R. M. & Brady R. J., *J. Biol. Chem.* 233, 1077, 1959.
- [2] Artom C., w *Methods in Enzymology* (Eds. S. P. Colowick & N. O. Kaplan) 4, 815, Academic Press, New York, 1957.

- [3] Bremer J. & Greenberg D. M., *Biochim. Biophys. Acta* **35**, 287, 1959.
- [4] Chojnacki T., *Acta Biochim. Polon.* **8**, 167, 1961.
- [5] Chojnacki T. & Korzybski T., *Acta Biochim. Polon.* **8**, 111, 1961.
- [6] Dawson R. M. C., *Biochim. Biophys. Acta* **14**, 374, 1954.
- [7] Dawson R. M. C., *Biochem. J.* **59**, 5, 1955.
- [8] Dawson R. M. C., *Biochem. J.* **62**, 693, 1956.
- [9] Ebel J. P., *Bull. Soc. Chim. Biol.* **34**, 321, 1952.
- [10] Fiske C. H. & Subbarow Y., *J. Biol. Chem.* **66**, 375, 1925.
- [11] Heller J., Chojnacki T. & Piechowska M. J., *Acta Biochim. Polon.* **7**, 187, 1960.
- [12] Hokin L. E. & Hokin M. R., *Biochim. Biophys. Acta* **31**, 285, 1959.
- [13] Hübscher G., Dils R. P. & Pover W. F. R., *Nature* **182**, 1806, 1958.
- [14] Kennedy E. P., *Ann. Rev. Biochem.* **26**, 119, 1957.
- [15] Kennedy E. P. & Weiss S. B., *J. Biol. Chem.* **222**, 193, 1956.
- [16] Kometiani P. A., Tkeszelaszwili L. K. & Ovsjanko T. A. *Proceedings of the United Nations International Conference of the Peaceful Uses of Atomic Energy* **25**, 165, 1958.
- [17] Kornberg A. & Pricer W. F. Jr., *Federation Proc.* **11**, 242, 1952.
- [18] Kornberg A. & Pricer W. F. Jr., *J. Biol. Chem.* **204**, 345, 1953.
- [19] Outhouse E. L., *Biochem. J.* **30**, 197, 1936.
- [20] Paulus H. & Kennedy E. P., *J. Am. Chem. Soc.* **80**, 6689, 1959.
- [21] Plimmer R. H. & Burch W. J. N., *Biochem. J.* **31**, 398, 1937.
- [22] Riley R. F., *J. Am. Chem. Soc.* **66**, 512, 1944.
- [23] Schneider W. C., *J. Biol. Chem.* **164**, 747, 1946.
- [24] Szent-Györgyi A., *Chemistry of Muscular Contraction*, Academic Press, New York, 1947.

BIOSYNTHESIS OF PHOSPHOLIPIDS IN INSECTS

I. INCORPORATION OF ^{32}P -PHOSPHOCHOLINE INTO PHOSPHOLIPIDS OF *CELERIO EUPHORBIAE*

Summary

A molecule of phosphocholine takes part in biosynthesis of lecithin in *Celerio euphorbiae*. The rate of incorporation of ^{32}P -phosphocholine when followed in homogenates of fat-body is not equal in various stages of the insect growth. It is the highest in caterpillars, while it is a slight one only in spindle, pupa and moth. The incorporation of injected labelled phosphocholine into phospholipids, when observed *in vivo*, is also in moth 1/3 of that in feeding caterpillars.

Otrzymano 5.11.1960

T. CHOJNACKI

BIOSYNTeza FOSFOLIPIDÓW U OWADÓW

II. BADANIA NAD WŁĄCZANIEM ^{32}P -ORTOFOSFORANU U MOTYLA
*CELERIO EUPHORBIAE**Zakład Biochemii Ewolucyjnej, Instytut Biochemii i Biofizyki PAN, Warszawa*

Wyniki badań nad biosyntezą lecytyny w różnych stadiach rozwojowych *Celerio euphorbiae* przeprowadzone *in vitro* na homogenatach ciała tłuszczowego przy użyciu znakowanej ^{32}P -fosfocholiny wykazały, że natężenie biosyntezy w czasie rozwoju stadialnego gąsienicy do motyla spada [5]. Podczas gdy u gąsienic w fosfolipidach znajdowano zwykle 1 - 1,5% ^{32}P dodawanego w postaci znakowanego estru, u starszych stadiów rozwojowych włączanie wynosiło mniej niż 0,1%. Tak niska wartość leżała już w granicach błędu doświadczenia. Z tego powodu nie można było wnioskować o mechanizmie biosyntezy fosfolipidów w ciele tłuszczowym starszych stadiów rozwojowych. Również w badaniach *in vivo* stwierdzono, że po iniekcji znakowanej fosfocholiny wbudowywanie tego estru w fosfolipidy było blisko 3 razy niższe u motyli niż u gąsienic żerujących [5]. Wynik taki mógł być jednak uwarunkowany słabą penetracją wstrzykniętego estru do wnętrza komórek. U zwierząt wyższych po wstrzyknięciu ^{32}P -fosfocholiny nie dochodzi również do oczekiwanego masywnego wbudowania izotopu w fosfolipidy tkanek. Tłumaczy się to nieprzepuszczalnością błon komórkowych dla estrów kwasu fosforowego [14]. W związku z tym, interesujące było zbadanie u motyli natężenia biosyntezy lecytyny ze znakowanego fosforanu nieorganicznego.

W tej pracy po wstrzyknięciu motylom ^{32}P -ortofosforanu zbadano przebieg włączania izotopu w fosfolipidy. Sledzono również włączanie ^{32}P w cząsteczkę fosfocholiny, co pozwoliło wnioskować o roli tego estru w biosyntezie lecytyny.

Uzyskanie danych o natężeniu biosyntezy lecytyny w całym organizmie owada pozwala porównać ten proces z przebiegiem lokalnego deponowania w męskim narządzie rodnym motyla dużych ilości pyrofosforanu. Pyrofosforan, którego powstawanie związane jest prawdopodobnie z tworzeniem lecytyny z fosfocholiny, powstaje pod koniec okresu poczwarko-

wego i już po kilkunastu godzinach od momentu wylęgu ilość jego się nie zwiększa [10, 12].

METODY

Motyle samce brane do eksperymentów pochodziły z własnej hodowli. W kilka godzin po wylęgu wstrzykiwano do ciała tłuszczowego 0,1 ml roztworu $\text{Na}_2\text{H}^{32}\text{PO}_4$ (5 μC ^{32}P ; 10 μg P). Ilość izotopu zawartego w ciele motyla oznaczano każdorazowo po sporządzeniu homogenatu. Po upływie odpowiedniego czasu od momentu zastrzyku motyle zabijano eterem i całe homogenizowano z 3 ml wody. Homogenat ogrzewano we wrzącej łaźni wodnej półtorej minuty i uzupełniano do 10 ml 96% etanolem. Dla uzyskania frakcji fosfolipidowej i frakcji rozpuszczalnej w wodzie postępowano jak poprzednio [4] według procedury stosowanej przez Dawsona [7], która zapewnia uzyskanie frakcji fosfolipidowej wolnej od domieszek związków fosforowych rozpuszczalnych w wodzie. Zastosowanie tej procedury było ważne szczególnie u motyli zabijanych po krótkim czasie od zastrzyku, gdy włączanie ^{32}P w fosfolipidy mogło być jeszcze nieznaczne, a niewielkie skażenie frakcji fosfolipidowej związkami rozpuszczalnymi w wodzie mogło spowodować błędne wyniki. Związki fosforowe frakcji rozpuszczalnej w wodzie po przepuszczeniu przez kolumnę Amberlit IRC 50 (forma H^+) chromatografowano w układzie dwukierunkowym według Dawsona [8] na bibule Whatman No 1 przemytej 2 N-kwasem octowym.

Materiał zawarty w ekstrakcie chloroformowym poddawano łagodnej hydrolizie alkalicznej według Dawsona [6] i produkty hydrolitycznej degradacji fosfolipidów badano chromatograficznie w układzie dwukierunkowym na bibule Whatman No 1 przemytej 2 N-kwasem octowym. Aktywności właściwe lecytyny i kefaliny oznaczono na podstawie badania ich produktów degradacji. W tym celu wycinano z chromatogramów radioaktywne plamy glicerofosfocholiny (GPChol)¹ i glicerofosfoetanolaminy (GPET) i oznaczano w nich zawartość ^{32}P i fosforu całkowitego. W badaniu chromatograficznym związki te nie różniły się od produktu fosforowego łagodnej hydrolizy alkalicznej lecytyny (f-my Merck) i kefaliny uzyskanej z mózgu metodą Folcha [3] (frakcja V). Wycinek bibuły spalano w 0,2 ml 60% kwasu nadchlorowego w suszarce w 155° w ciągu 12 godzin, następnie hydrolizowano z 1 ml wody w ciągu 20 minut, zobojętniano stężonym amoniakiem i uzupełniano do 2 ml wodą. Zawartość ^{32}P w spalonej próbce oznaczano przy pomocy licznika do cieczy BAS 7. Za-

¹ Stosowane skróty: ATP, adenosynotrójfosforan; CDPChol, cytydynodwufosfocholina; CMP, cytydynojednofosforan; CTP, cytydynotrójfosforan; GPChol, glicerofosfocholina; GPET, glicerofosfoetanolamina; PChol, fosfocholina; PP, pyrofosforan.

wartość fosforu w tej próbce oznaczano metodą Berenbluma i Chaina [1] stosując zamiast izobutanolu *n*-butanol [2].

W podobny sposób oznaczano aktywność właściwą fosfocholiny po wycięciu radioaktywnej plamy tego związku z chromatogramu frakcji związków rozpuszczalnych w wodzie. Radioaktywne związki fosforowe lokalizowano na chromatogramach metodą autoradiografii, czas zetknięcia z kliszą wynosił 3 do 10 dni. Niektóre z tych związków zidentyfikowano przy użyciu odpowiednich nieznakowanych substancji, α -glicerofosforanu (f-my BDH) oraz fosfocholiny i fosfoetanolaminy otrzymanych syntetycznie według metod podanych w poprzedniej pracy [4].

Przy porównywaniu zawartości ^{32}P w poszczególnych frakcjach fosforowych w zależności od czasu upływającego od momentu zastrzyku izotopu, całkowitą zawartość ^{32}P w ciele motyla sprowadzono do wartości teoretycznej 10^6 imp./min. ($5 \mu\text{C}$ odpowiadało tej wartości w stosowanych warunkach pomiaru). W poszczególnych doświadczeniach aktywność wprowadzana w dawce teoretycznej 10^6 imp./min. wykazywała odchylenia w granicach $\pm 30\%$. Odchylenia wzwyż należało odnieść do większej niż 0,1 ml ilości wprowadzonego roztworu $\text{Na}_2\text{H}^{32}\text{PO}_4$, odchylenia w dół mogły pochodzić zarówno od błędu *in minus* przy iniekcji, jak też mogły być spowodowane wydalaniem z moczem.

Przy porównywaniu aktywności właściwych u różnych motyli frakcji fosforowych i związków fosforowych uwzględniono również różnice w zawartości fosforu zależne od wielkości motyla. Po wprowadzeniu bowiem pewnej ilości izotopu do organizmu zawierającego mało fosforu uzyskuje się wysoki stosunek $^{32}\text{P} : ^{31}\text{P}$. Jeśli natomiast zawartość fosforu jest większa, uzyskamy niższy stosunek $^{32}\text{P} : ^{31}\text{P}$ po dodaniu tej samej co poprzednio ilości izotopu. Dlatego u każdego motyla oznaczano zarówno zawartość ^{32}P , jak i fosfor całkowity. Oznaczone aktywności właściwe poszczególnych związków fosforowych lub frakcji fosforowych różnych motyli porównywano między sobą po pomnożeniu przez charakterystyczny dla każdego motyla współczynnik *k*:

$$k = \frac{\text{umowna aktywność właściwa fosforu całego motyla}}{\text{znaleziona aktywność właściwa fosforu całego motyla}}$$

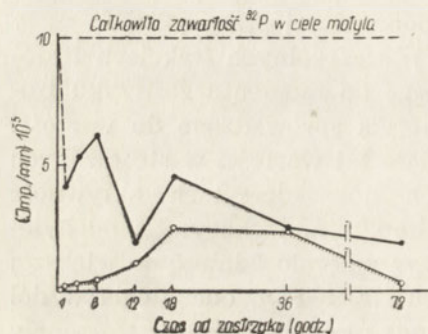
Jako umowną aktywność właściwą przyjęto wartość $2 \cdot 10^4$ imp./min. $\mu\text{mol P}$, co odpowiadałoby 10^6 imp./min. w ciele motyla zawierającego 50 μmoli fosforu całkowitego. Uwzględniono również poprawkę na półokres trwania izotopu. Oznaczenia dla każdego badanego czasu wykonano na pojedynczych osobnikach.

WYNIKI I DYSKUSJA

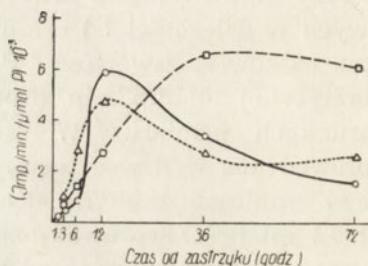
Włączanie wstrzykniętego motylowi ^{32}P -ortofosforanu we frakcję fosfolipidową zachodzi bardzo powoli, osiągając maksimum po około 18

godzinach od momentu podania izotopu (Rys. 1). W tym czasie zawartość ^{32}P w tej frakcji stanowi około 25% całej ilości izotopu w ciele motyla. Po osiągnięciu wspomnianego maksimum radioaktywność frakcji fosfolipidowej maleje i po 72 godzinach stanowi już tylko 5% całości.

Aktywność właściwa frakcji fosfolipidowej osiąga maksimum około 12 godziny po zastrzyku izotopu (Rys. 2). Przebieg narastania aktywności właściwych poszczególnych fosfolipidów zawartych w tej frakcji daje jednak obrazy różne. Kefalina wykazuje większą ruchliwość metaboliczną

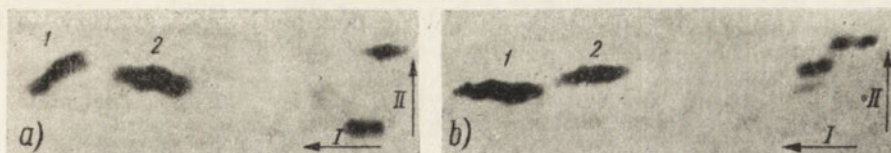


Rys. 1. Zawartość ^{32}P we frakcjach fosforowych samca motyla *C. euphorbiae* w różnych momentach po zastrzyku ^{32}P -ortofosforanu. (●) wyciąg wodny; (○) wyciąg chloroformowy



Rys. 2. Aktywności właściwe (imp./min./ $\mu\text{mol P}$) fosfolipidów motyli wilczomleczków w różnych momentach po wstrzyknięciu ^{32}P -ortofosforanu. (○) ekstrakt chloroformowy; (□) lecytyna; (△) kefalina

niż lecytyna. Znaczny wzrost radioaktywności kefaliny notowano w ciągu pierwszych 12 godzin od podania izotopu. Przebieg krzywej aktywności właściwej lecytyny jest zupełnie odmienny. Włączanie ^{32}P w lecytynę narasta nieznacznie w ciągu pierwszych 18 godzin. Maksimum aktywności właściwej tego związku zanotowano po upływie 36 godzin od podania izotopu. Po upływie dalszych 36 godzin aktywność właściwa lecytyny spadła tylko nieznacznie. Porównując charakter krzywych aktywności właściwych tych dwu fosfolipidów z przebiegiem krzywej aktywności właściwej frakcji fosfolipidowej badanej jako całość, widać, że całość fosfolipidów wykazuje typ obrotu podobny do obrotu kefaliny. Ponieważ aktywność właściwa frakcji fosfolipidowej jest wypadkową aktywności właściwych poszczególnych fosfolipidów w niej zawartych, można przewidzieć z analizy krzywych rysunku 2, że frakcja fosfolipidowa zawiera połączenia o jeszcze szybszym metabolizmie niż obserwowany w przypadku kefaliny. Na fotografiach rysunku 3, które przedstawiają autoradiogramy chromatogramów hydrolizatów alkalicznych fosfo-



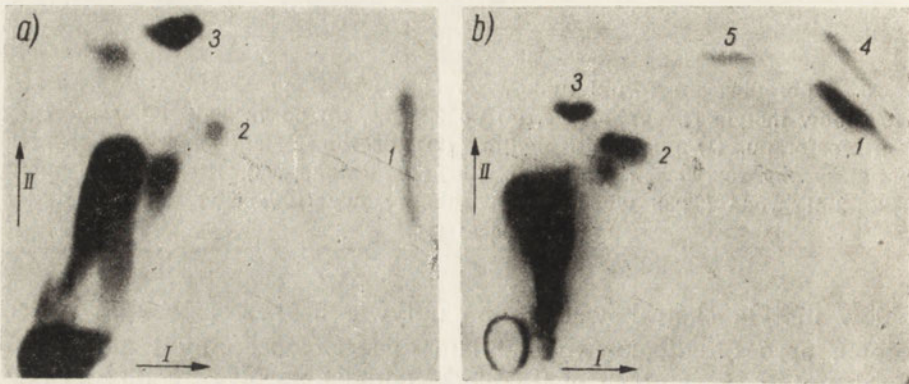
Rys. 3. Autoradiogram dwukierunkowego chromatogramu alkalicznego hydrolizatu fosfolipidów motyla *C. euphorbiae*, (a) po 3 godz., (b) po 72 godz. od wstrzyknięcia ^{32}P -ortofosforanu. (1) glicerofosfochololina, (2) glicerofosfoetanolamina. Kierunek I: fenol nasycony roztworem 0,1% NH_3 (technika zstępująca). Kierunek II: metylopropan-2-ol - woda (62:38 v/v)-kwas trójchlorooctowy (10% w/v) (technika wstępująca) [6]

lipidów motyla ekstrahowanych po upływie 3 i 72 godzin od podania izotopu, oprócz radioaktywnych plam glicerofosfocholiny i glicerofosfoetanolaminy, powstałych w trakcie łagodnej hydrolizy alkalicznej odpowiednio z lecytyny i kefaliny, widać kilka innych radioaktywnych plam. Te ostatnie mogą odpowiadać produktom degradacji kwasu fosfatydowego, inozytofosfatydu czy serynofosfatydu. Przemianie tych właśnie połączeń i kefaliny należy przypisać włączenie w ciągu kilku pierwszych godzin większej ilości izotopu do frakcji fosfolipidowej. Synteza lecytyny bowiem jest w tym czasie jeszcze nieznaczna.

Obserwowane u motyla wilczomlecza różnice między szybkością obrotu lecytyny i kefaliny pozostają w dobrej zgodności z wynikami podobnych badań u zwierząt wyższych *in vitro* [6] i *in vivo* [8, 15], u których fosfolipidy można według malejącej szybkości obrotu mierzonego przy pomocy ^{32}P , uszeregować w następującej kolejności: kwas fosfatydowy, dwufosfoinozytyd, kefalina i fosfatydyloseryna, lecytyna.

Badanie zawartości ^{32}P w frakcji związków rozpuszczalnych w wodzie wykazało bardzo szybki odpływ z tej frakcji wstrzykniętego ^{32}P -ortofosforanu (Rys. 1). Najprawdopodobniej spowodowane to jest deponowaniem ^{32}P w białym odcinku przewodu wytryskowego w postaci pyrofosforanu, który jak wykazano [10], nie przechodzi przy oddziaływaniu obojętnym do frakcji związków rozpuszczalnych w wodzie. Proces syntezy pyrofosforanu w ciele samca przebiega rzeczywiście bardzo intensywnie w ciągu kilku pierwszych godzin życia motyla [12]. Na fotografiach rysunku 4 przedstawiono autoradiogramy chromatogramów związków fosforowych wyciągu wodnego motyla po zastrzyku ^{32}P -ortofosforanu. Widoczne są na nich między innymi radioaktywne plamy glicerofosforanu, fosfocholiny i fosfoetanolaminy. Na podstawie prac wielu autorów wiadomo, że powyższe estry stanowią u zwierząt wyższych prekursorzy fosfolipidów. W poprzedniej pracy [5] stwierdzono, że taką samą rolę spełniają u gasienic *C. euphorbiae*. Powstanie tych estrów z ortofos-

sforanu u motyli wskazuje na możliwość podobnej drogi syntezy fosfolipidów również w stadium motyla.

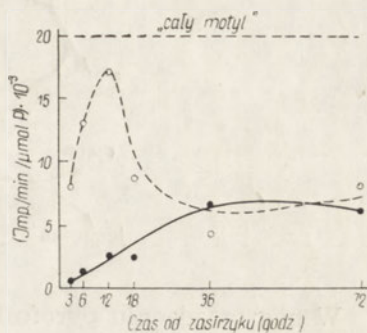


Rys. 4. Autoradiogram dwukierunkowego chromatogramu wyciągu wodnego motyla wilczomlecza, (a) po 1 godz., (b) po 72 godz. od wstrzyknięcia ^{32}P -ortofosforanu. (1) fosfocholina, (2) fosfoetanolamina, (3) glicerofosforan, (4) glicerofosfocholina. (5) glicerofosfoetanolamina. Kierunek I: fenol nasycony roztworem 0,1% NH_3 (technika zstępująca). Kierunek II: etanol- NH_3 stęż. (c. wł. 0,880) - woda; (61 : 29 : 10) (technika wstępująca) [8]

Na chromatogramie frakcji związków rozpuszczalnych w wodzie uzyskanych z motyla po upływie 72 godzin od podania izotopu widoczne są radioaktywne plamy odpowiadające glicerofosfocholiny i glicerofosfoetanolaminie. Jak wykazał Dawson w badaniach prowadzonych na wątrobie [7, 9], dwuestety te są produktami katabolizmu fosfolipidów. Obecność GPChol i GPEt w frakcji rozpuszczalnej w wodzie uzyskanej z motyla, u którego zaznaczył się już spadek aktywności właściwych lecytyny i kefaliny świadczy, że u *C. euphorbiae* rozpad fosfolipidów przebiega podobną drogą.

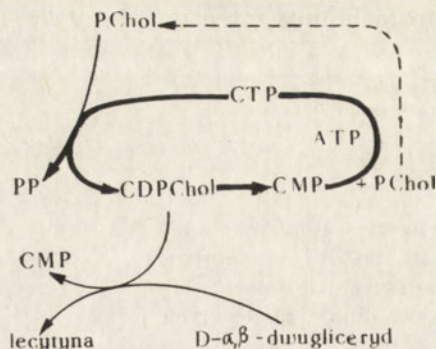
W celu wyjaśnienia roli fosfocholiny w procesie syntezy lecytyny u motyla *C. euphorbiae* wykonano pomiary aktywności właściwych tych związków w kilku różnych momentach na przestrzeni trzech dni od podania izotopu. Wyniki tych pomiarów przedstawiono na rysunku 5. Maksimum aktywności właściwej fosfocholiny występuje po upływie 6 - 12 godzin od zastrzyku ^{32}P -ortofosforanu. Po 18 godzinach zanotowano znaczny spadek tej wartości i podobnie niskie wartości po 36 i 72 godzinach. Aktywność właściwa lecytyny narasta wolniej i osiąga maksimum po około 36 godzinach. Z porównania przebiegu krzywych aktywności właściwych tych dwu związków wynika, że fosfocholina może być u motyla *C. euphorbiae* prekursorem lecytyny, bowiem jej maksimum aktyw-

ności właściwej poprzedza maksimum obserwowane dla lecytyny, a część opadająca krzywej fosfocholiny przecina krzywą lecytyny w okolicy szczytu.



Rys. 5. Aktywności właściwe (imp./min./ $\mu\text{mol P}$) fosfocholiny i lecytyny motyli *C. euphorbiae* w różnych momentach po wstrzyknięciu ^{32}P -ortofosforanu. (O) fosfocholina, (●) lecytyna

Opisane przez Kennedy'ego i Weissa [13], włączenie fosfocholiny w cząsteczkę lecytyny zachodzi w dwu etapach. W pierwszej reakcji z CTP i fosfocholiny powstaje cytydynodwufosfocholina i pyrofosforan nieorganiczny. W drugiej z cytydynodwufosfocholiny i $D-\alpha, \beta$ -dwuglicerydu powstaje CMP i lecytyna. Przypuszcza się, że duże ilości PP nagromadzone w przewodzie wytryskowym samca motyla *C. euphorbiae* stanowią produkt pierwszego etapu biosyntezy lecytyny. Z ilości PP znajdującego w *ductus ejaculatorius* i zawartości fosforu lipidowego motyla [11] wynika, że ilość powstającej CDPChol może przewyższać jej zapotrzebowanie dla syntezy lecytyny w całym ciele motyla. Proces lokalnego nagromadzenia PP nie wykazuje zgodności w czasie z zachodzącą w całym organizmie biosyntezą lecytyny. Po kilkunastu godzinach od wylęgu motyla nie obserwuje się już zwiększania ilości PP w narządzie rodnym [12], podczas gdy biosynteza lecytyny w całym organizmie zachodzi bardzo wyraźnie jeszcze po tym czasie. Z drugiej strony intensywnej lokalnej syntezy PP w pierwszych godzinach życia motyla nie towarzyszy w tym czasie zwiększenie natężenia biosyntezy lecytyny w całym organizmie owada. Świadczy to o niezużytkowaniu CDPChol powstającej z CTP i PChol w drugim etapie, tj. w reakcji z $D-\alpha, \beta$ -dwuglicerydem. Prawdopodobnie jest to spowodowane szybkim rozkładem cytydynodwufosfocholiny przez enzym analogiczny do pyrofosfatazy nukleotydu [16]. Dzięki temu jedynym nagromadzonym produktem reakcji fosfocholiny z CTP jest pyrofosforan; cytydynodwufosfocholina nie wchodzi w reakcję z $D-\alpha, \beta$ -dwuglicerydem, lecz ulega rozpadowi. Produkty tego rozpadu, fosfocholina i CMP, po uprzedniej fosforylacji do CTP mogą reagować ponownie z wytworzeniem następnej cząsteczki PP. Opisaną wyżej sytuację obrazuje następujący schemat:



W nagromadzeniu pyrofosforanu u motyla *C. euphorbiae* może odgrywać rolę również reakcja CTP z fosfoetanolaminą, stanowiąca pierwszy etap biosyntezy kefaliny [13]. Wykazanie w niniejszej pracy zarówno fosfoetanolaminy, jak i syntezy radioaktywnej kefaliny w ciele motyla wskazuje na taką możliwość.

Autor pragnie wyrazić podziękowanie Prof. Dr I. Mochnackiej i Prof. Dr J. Hellerowi za cenne wskazówki dotyczące badanego w tej pracy zagadnienia oraz za pomoc w przygotowaniu pracy do druku.

STRESZCZENIE

Zbadano *in vivo* przebieg włączania ^{32}P w fosfolipidy samca motyla *Celerio euphorbiae*. Maksimum aktywności właściwej frakcji fosfolipidowej po zastrzyku znakowanego ortofosforanu występuje po około 12 godzinach. Kefaliny wykazują większą szybkość odnowy niż lecytyny. Maksimum aktywności właściwej kefalin osiągane jest po ok. 12 godzinach, a lecytyn po 36 godzinach od podania izotopu. Porównanie przebiegu włączania ^{32}P w fosfocholinę i lecytynę wskazuje, że fosfocholina może być prekursorem lecytyny.

Przedyskutowano biosyntezę lecytyny u samca motyla *Celerio euphorbiae* w związku z deponowaniem pyrofosforanu w jego *ductus ejaculatorius*, wskazując, że nie ma równoległości między procesem lokalnego nagromadzenia PP, a natężeniem biosyntezy w całym ciele.

L I T E R A T U R A

- [1] Berenblum J. & Chain E., *Biochem. J.* **32**, 295, 1938.
- [2] Campbell I. & O'Connor D., *Podstawy radioizotopowych metod badawczych*, str. 210, PWN, Warszawa, 1956.
- [3] Colowick S. P. & Kaplan N. O., w *Methods in Enzymology*. Vol. III, p. 326, Academic Press Inc. Publishers, New York, 1957.
- [4] Chojnacki T. & Korzybski T., *Acta Biochim. Polon.* **8**, 111, 1961.
- [5] Chojnacki T. & Piechowska M. J., *Acta Biochim. Polon.* **8**, 157, 1961.
- [6] Dawson R. M. C., *Biochim. Biophys. Acta* **14**, 374, 1954.
- [7] Dawson R. M. C., *Biochem. J.* **59**, 5, 1955.
- [8] Dawson R. M. C., *Biochem. J.* **61**, 552, 1955.
- [9] Dawson R. M. C., *Biochem. J.* **62**, 693, 1956.
- [10] Heller J., Chojnacki T. & Piechowska M. J., *Acta Biochim. Polon.* **7**, 187, 1960.
- [11] Heller J. & Jeżewska M., *Bull. Acad. Polon. Sci. Sér. Biol.* **6**, 51, 1958.
- [12] Heller J., Piechowska M. J. & Chojnacki T., *Acta Biochim. Polon.* **5**, 343, 1958.
- [13] Kennedy E. P. & Weiss S. B., *J. Biol. Chem.* **222**, 193, 1956.
- [14] Kometiani P. A. & Tkeszelaszwili L. K., *Ukrainskij Biochimicznyj Żurnal*, **31**, 913, 1959.
- [15] Sakagawa T. & Shimojo T., *J. Biochem. Tokio* **46**, 61, 1959.
- [16] Williams-Ashman H. G. & Banks J., *J. Biol. Chem.* **223**, 509, 1956.

BIOSYNTHESIS OF PHOSPHOLIPIDS IN INSECTS

II. STUDIES ON INCORPORATION OF ^{32}P -ORTHOPHOSPHATE
IN *CELERIO EUPHORBIAE* MOTH

S u m m a r y

The course of incorporation of ^{32}P into phospholipids of the *Celerio euphorbiae* male moth was investigated. Maximal specific activity of phospholipid fraction was found about 12 hours after injection of labelled orthophosphate. Cephalins showed higher rate of regeneration than lecithins did. Cephalins reached up their maximal specific activity within 12 hours after isotope had been administered while lecithins after 36 hours only. The course of incorporation of ^{32}P into phosphocholine indicated that phosphocholine might be a precursor of lecithin.

The biosynthesis of lecithin in *Celerio euphorbiae* male moth has been discussed in relation to the storage of pyrophosphate in his *ductus ejaculatorius* and it has been concluded that the process of local accumulation of pyrophosphate did not run in parallel with the rate of biosynthesis of lecithin in whole body.

Otrzymano 5.11.1960

S. ANGIELSKI, J. ROGULSKI i JADWIGA BASCIAK

AMINOACYDURIA WYWOŁANA KWASEM MALEINOWYM

VIII. WPŁYW PROGESTERONU NA OBRAZ ZATRUCIA KWASEM MALEINOWYM SZCZURÓW KARMIONYCH DIETĄ GALAKTOZOWĄ

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

W poprzednich doniesieniach [1, 2, 3] wykazano, że kwas maleinowy podany szczurom parenteralnie wywołuje zespół objawów wielokierunkowego uszkodzenia kanalików nerkowych. Warunkiem wystąpienia pełnego obrazu zatrucia jest obecność laktozy lub galaktozy w diecie. Skądinąd wiadomo, że młode szczury karmione dietą zawierającą duże ilości galaktozy giną po kilkunastu dniach [9]. Dorosłe szczury wolniej przybierają na wadze. Stwierdza się też wyraźne zaburzenia funkcji nerki przypominające zespół wielokierunkowego uszkodzenia kanalików nerkowych. Kilkakrotnie wzrasta wydalanie moczu a także cukru (przede wszystkim galaktozy), amoniaku, wapnia i fosforu [9, 6, 5] oraz azotu aminowego i ketokwasów [6, 5, 3]. Stwierdzono ponadto badaniem histologicznym [5] zmiany degeneracyjne w komórkach kanalików nerkowych oraz wykazano występowanie zaćmy w soczewce oka [11].

Z drugiej strony wiadomo, że w galaktozemii dochodzi również do znacznych zaburzeń funkcji nerki [13]. W kilka dni po podaniu galaktozy dzieciom chorym na galaktozemię występuje wyraźna aminoacyduria będąca pochodzenia nerkowego [16]. Dochodzi też do zaburzeń w stanie grup SH, co ma bezpośredni związek z tworzeniem się zaćmy [10, 15].

W ostatnich latach ukazało się szereg prac dotyczących wpływu różnych czynników na przemianę galaktozy. W doświadczeniach *in vitro* wykazano [20], że reakcją kontrolującą szybkość przemiany 1-¹⁴C-galaktozy w ¹⁴CO₂ jest reakcja epimeryzacji UDPGal w UDPG¹. Reakcja ta wymaga obecności katalitycznych ilości DPN⁺, jest natomiast hamowana

¹ Stosowane skróty: UDPG, urydynodwufosfo-glikoza; UDPGal, urydynodwufosfo-galaktoza; DPN, nukleotyd dwufosfopirydynowy; TPN, nukleotyd trójfosfopirydynowy.

w znacznym stopniu przez zredukowaną postać nukleotydu. Dlatego te czynniki, które zwiększają poziom DPNH zmniejszają szybkość spalania galaktozy, natomiast czynniki obniżające poziom DPNH znacznie tę szybkość zwiększają. Do pierwszych należą alkohol etylowy i różnego rodzaju substraty aldehydowe, spośród drugich wymienić należy przede wszystkim progesteron [22, 25, 12, 26]. Tak, np. utlenianie galaktozy przez homogenat nerki zostaje zahamowane po dodaniu aldehydu glikolowego. Progesteron odwraca tę inhibicję prawie całkowicie, prawdopodobnie przez zahamowanie wytwarzania DPNH w reakcji dehydrogenazy aldehydowej [8]. Stwierdzono ponadto, że podanie progesteronu dzieciom chorym na galaktozemię i otrzymującym galaktozę znakowaną na pierwszym węglu zwiększa znacznie (z wartości bliskich zera do około 10%) wydalanie izotopu w wydechowym CO₂ [7, 24, 23]. W doświadczeniach na szczurach wykazano, że progesteron opóźnia wystąpienie zaćmy u szczurów karmionych dietą zawierającą galaktozę [23, 24].

Opierając się na tych spostrzeżeniach zbadano wpływ progesteronu na wydalanie cukru i azotu aminowego przez szczury karmione dietą galaktozową oraz wpływ progesteronu na obraz zatrucia kwasem maleinowym.

METODY

Do doświadczeń używano białe szczury (samice), wagi 210 - 280 g. Zwierzęta karmiono dietą zawierającą 16% galaktozy. Do czasu rozpoczęcia doświadczenia szczury przebywały na diecie przez okres 3 tygodni. Pożywienie udostępniano zwierzętom 3 razy po 30 min. w ciągu doby. W tych warunkach można było dość dokładnie określić ilość spożytej przez szczury galaktozy. Po około 14 dniach przyzwyczajania do tego rodzaju karmienia, ilości pożywienia spożywane przez te szczury były równe spożyciu szczurów, którym pokarm udostępniony był do woli. Zwierzęta przybierały normalnie na wadze. Poza tym warunki doświadczenia, sposób zbierania i konserwacji moczu, przygotowanie roztworu maleinianu do wstrzyknięć były takie, jak opisano w doniesieniu V [2]. Azot aminowy oznaczano metodą Yemma i Cockinga [27]. Zawartość cukru redukującego w moczu oznaczano metodą Somogyi'ego w modyfikacji Nelsona [21]. Ilość wydalanej galaktozy określano na podstawie redukcji po fermentacji, w tym celu mocz inkubowano przez 1 godzinę w 37°, z zawiesiną drożdży piekarskich przemytych kilkakrotnie wodą. Zawartość glikozy w moczu obliczano przez odjęcie od całkowitej ilości cukru wartości odpowiadających galaktozie.

Odczynniki. Kwas maleinowy cz.d.a (import radziecki). Progesteron („Syntolutan“, Jeleniogórskie Zakłady Farmaceutyczne) ampułkowany roztwór olejowy zawierający 10 mg krystalicznego progesteronu w 1 ml.

WYNIKI

Poprzednio wykazano [3], że szczury karmione dietą nie zawierającą ani laktozy ani galaktozy wydalają cukier w bardzo niewielkich ilościach, rzędu kilkudziesięciu μ moli na dobę. Na diecie mlecznej, zawierającej laktozę wydalanie wynosi około 0,6 mmola. Natomiast ilości cukru wydane na dobę przez szczury karmione dietą zawierającą galaktozę (16⁰/

Tablica 1

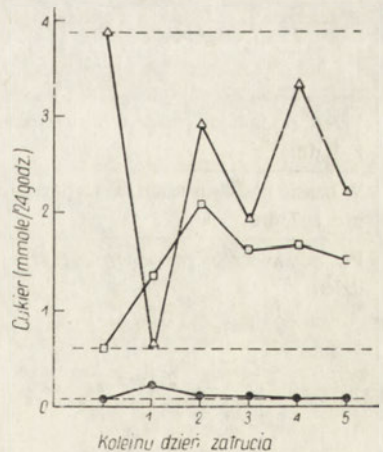
Wpływ kwasu maleinowego na wydalanie cukru przez szczury karmione dietą galaktozową

Kwas maleinowy podano dootrzewnowo w dawce 40 mg/100 g wagi. Szczury (samice) wagi 210 - 280 g, do czasu wstrzyknięcia maleinianu karmione były przez 10 dni dietą galaktozową. Liczby wyrażają średnie dobowego wydalania 5 szczurów. W nawiasach wartości graniczne

Przed zatruciem (średnio z 3 dni)	Cukier (mmole/24 godziny)				
	kolejny dzień zatrucia				
	1	2	3	4	5
3,9 (2,0 - 6,2)	0,65 (0,2 - 1,0)	2,95 (2,65 - 3,45)	1,95 (1,1 - 3,1)	3,3 (2,0 - 4,35)	2,15 (0,2 - 2,9)

masy, co jest równoważne ilości laktozy zawartej w diecie mlecznej) są znacznie większe. Średnie dobowe wydalanie u tych szczurów wynosi około 3,9 mmola, a więc ponad 6 razy więcej niż u szczurów karmionych dietą mleczną.

Rysunek 1. Wydalanie cukru w zatruciu kwasem maleinowym przez szczury na różnych dietach. Kwas maleinowy wstrzyknięto dootrzewnowo w dawce 40 mg/100 g wagi. Wartości dotyczące wydalania cukru na dietach bezlaktozowej i mlecznej wzięto z poprzedniego doniesienia [3]. Liczby wyrażają średnią dobowego wydalania 4 lub 5 szczurów, na diecie (●) bezlaktozowej, (□) mlecznej, i (△) galaktozowej



Po podaniu kwasu maleinowego (40 mg na 100 g wagi, dootrzewnowo) wydalanie cukru przez szczury karmione dietą bezlaktozową, bądź mleczną osiąga w 1 lub 2 dniu wartości ponad 3-krotnie większe. W następnych dniach stopniowo powraca do normy [3]. Całkiem odmiennie przedstawia

się wydalanie cukru przez szczury karmione dietą galaktozową. Jak widać z danych tablicy 1 w pierwszym dniu po podaniu maleinianu (w tej samej dawce) szczury wydalały ponad 6 razy mniejsze ilości cukru niż przed zatruciem. W drugim i dalszych dniach wydalanie jest już wyraźnie większe i wykazuje wartości bliskie normalnym. Porównanie wydalania cukru w zatruciu kwasem maleinowym przez szczury na różnych dietach przedstawia rysunek 1.

Wpływ progesteronu na wydalanie cukru i azotu aminowego przez szczury karmione dietą galaktozową

Jak widać z danych tablicy 2 progesteron podawany domięśniowo w dawce 3 mg na 100 g wagi zwiększa prawie dwukrotnie wydalanie cukru. Wzrasta nieco ilość wydalonego moczu. Wydalanie azotu aminowego nie ulega widocznym zmianom (pewna tendencja zniżkowa). Progesteron wstrzykiwano szczurom codziennie przez okres 7 dni. Zarówno diureza jak i zwiększone wydalanie cukru utrzymywały się przez cały ten okres na mniej więcej jednakowym poziomie (Rys. 2). Nie stwierdzono

Tablica 2

Wpływ progesteronu na diurezę oraz na wydalanie azotu aminowego i cukru przez szczury karmione dietą galaktozową

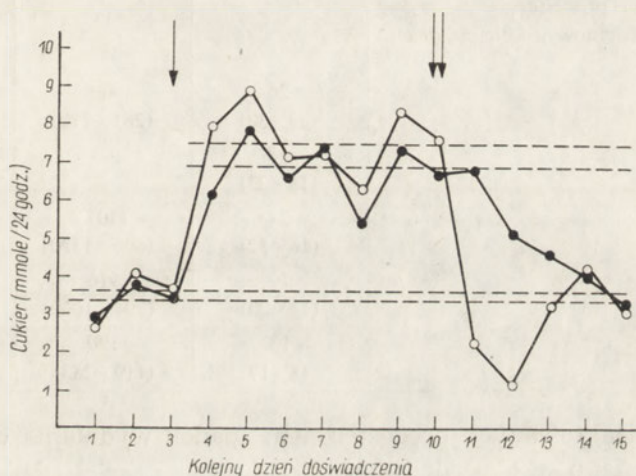
Szczury (samice) wagi 250 - 340 g. Czas stosowania diety do chwili wstrzyknięcia progesteronu 14 dni. Progesteron wstrzykiwano codziennie w dawce 3 mg/100 g wagi, domięśniowo. Liczby wyrażają średnie dobowe wydalania 4 szczurów. W nawiasach wartości graniczne.

	Diureza (ml)	Azot aminowy (μ mole)	Cukier (mmole)
Przed podaniem progesteronu (średnio z 3 dni)	12 (7 - 17)	136 (85 - 193)	3,32 (2,36 - 4,34)
W czasie podawania progesteronu (średnio z 7 dni)	17 (10 - 23)	106 (59,5 - 162,5)	6,75 (4,3 - 10,2)
Po odstawieniu progesteronu, kolejny dzień			
1	16 (11 - 20)	—	6,9 (4,9 - 8,1)
2	17 (14 - 20)	121 (75,5 - 163)	5,1 (4,4 - 6,0)
3	16 (14 - 21)	—	4,6 (3,4 - 7,1)
4	14 (13 - 16)	164 (111 - 283)	4,0 (2,7 - 5,3)
5	12 (8 - 16)	163 (107 - 195)	3,2 (1,6 - 5,6)

kumulowania się działania hormonu. Po zaprzestaniu wstrzykiwania progesteronu wydalanie cukru w przeciągu 5 dni stopniowo powraca do normy.

Wpływ progesteronu na obraz zatrucia kwasem maleinowym szczurów karmionych dietą galaktozową

W doświadczeniu tym, podobnie jak poprzednio, wstrzykiwano szczurom progesteron codziennie w dawce 3 mg na 100 g wagi, domięśniowo. Po odstawieniu progesteronu, następnego dnia wstrzyknięto maleinian w jednorazowej dawce 40 mg na 100 g wagi, dootrzewnowo. Wyniki podaje tablica 3 i częściowo rysunek 2. Jak widać, wyraźnie wzrasta



Rysunek 2. Wpływ progesteronu i kwasu maleinowego na wydalanie cukru przez szczury karmione dietą galaktozową. Progesteron wstrzykiwano codziennie w dawce 3 mg/100 g wagi. Po tygodniu jednej grupie zwierząt (●) odstawiono progesteron drugiej grupie (○) odstawiono progesteron i następnego dnia wstrzyknięto kwas maleinowy w dawce 40 mg/100 g wagi. Podano średnie dobowe wydalania 4 szczurów. Strzałkami oznaczono rozpoczęcie i zakończenie podawania progesteronu oraz wstrzyknięcie kwasu maleinowego

diureza i wydalanie azotu aminowego. Ilości azotu aminowego wydalone w pierwszym dniu zatrucia są ponad 3 razy, a w trzecim dniu ponad 8 razy większe niż wartości przed zatruciem. Na piąty dzień po podaniu maleinianu diureza i wydalanie azotu aminowego spadają dość raptownie, osiągając wartości, jakie szczury wydalają w okresie przed podaniem progesteronu. Wydalanie cukru ulega wyraźnemu zmniejszeniu; w pierwszym dniu zatrucia ponad trzykrotnie, w drugim dniu blisko siedmiokrotnie. Na piąty dzień szczury wydalają ilości cukru takie jak przed podawaniem progesteronu. Z porównania tablic 1 i 3 widać, że

Tablica 3

Wpływ progesteronu na obraz zatrucia kwasem maleinowym szczurów karmionych dietą galaktozową

W następnym dniu po ostatnim wstrzyknięciu progesteronu podano szczurom kwas maleinowy w dawce 40 mg/100 g wagi, dootrzewnowo. Pozostałe dane jak w tablicy 2. Liczby wyrażają średnie dobowego wydalania 4 szczurów. W nawiasach wartości graniczne

	Diureza (ml)	Azot aminowy (μ mole)	Cukier (mmole)
Przed podaniem progesteronu (średnio z 3 dni)	13 (7 - 19)	160 (102 - 228)	3,53 (2,06 - 4,95)
W czasie podawania progesteronu (średnio z 7 dni)	16 (10 - 23)	124 (70 - 220)	7,50 (5,5 - 10,5)
Po odstawieniu progesteronu wstrzyknięto kwas maleinowy, kolejny dzień zatrucia			
1	26 (23 - 30)	468 (261 - 770)	2,23 (1,6 - 3,0)
2	18 (16 - 23)	—	1,15 (0,4 - 2,3)
3	24 (16 - 32)	1107 (806 - 1320)	3,20 (2,2 - 4,3)
4	19 (17 - 20)	916 (794 - 1020)	4,16 (2,25 - 5,3)
5	13 (8 - 17)	190 (119 - 283)	3,10 (0,7 - 4,8)

u szczurów traktowanych progesteronem spadek wydalania cukru po podaniu maleinianu jest mniej raptowny.

Z porównania danych tablic 2 i 3 widać, że po odstawieniu progesteronu tak diureza jak wydalanie cukru i azotu aminowego wracają do wartości z okresu przed podawaniem progesteronu, i że dotyczy to w równym stopniu szczurów zatrutych maleinianem jak i nie zatrutowanych.

Wydalanie glikozy i galaktozy w zatruciu kwasem maleinowym przez szczury traktowane uprzednio progesteronem

Szczury karmione dietą galaktozową wydają z moczem około 3,5 mmola cukru redukującego w ciągu doby. Z tego prawie 99% stanowi galaktoza. Ilości glikozy wydane na dobę są niewielkie, rzędu poniżej 100 μ moli. Są to wartości równe wydalaniu cukru przez szczury karmione dietą bezlaktozową [3]. Prawie dwukrotnie zwiększone wydalanie cukru redukującego w czasie podawania progesteronu odbywa się wyłącznie kosztem galaktozy. Progesteron jest więc bez wpływu na wydalanie glikozy. Jak widać z danych tablicy 4 w pierwszym dniu po po-

Tablica 4

Wydalenie glikozy i galaktozy po zatruciu kwasem maleinowym przez szczury traktowane uprzednio progesteronem

Zawartość galaktozy w moczu określano na podstawie redukcji po fermentacji. Zawartość glikozy obliczano przez odjęcie od całkowitej zawartości cukru wartości odpowiadających galaktozie. Pozostałe dane jak w tablicy 2 i 3

	Cukier reduk. (mmole)	Galaktoza (mmole)	Glikoza (mmole)
Przed podaniem progesteronu (średnio z 3 dni)	3,53 (2,06 - 4,95)	3,45 (2,0 - 4,87)	0,08 (0,06 - 0,1)
W czasie podawania progesteronu (średnio z 7 dni)	7,50 (5,5 - 10,5)	7,43 (5,4 - 10,41)	0,07 (0,06 - 0,11)
Po odstawieniu progesteronu wstrzyknięto kwas maleinowy, kolejny dzień zatrucia			
1	2,23 (1,6 - 3,0)	0,92 (0,63 - 1,3)	1,31 (0,7 - 2,16)
2	1,15 (0,4 - 2,3)	0,75 (0,4 - 1,5)	0,40 (0,0 - 0,8)
3	3,20 (2,2 - 4,3)	2,14 (1,7 - 2,65)	1,06 (0,2 - 1,65)
4	4,16 (2,25 - 5,3)	3,18 (1,07 - 4,55)	0,98 (0,6 - 1,4)
5	3,10 (0,7 - 4,8)	2,95 (0,4 - 4,5)	0,15 (0,0 - 0,3)

daniu kwasu maleinowego (i odstawieniu progesteronu), gdy całkowita ilość wydalanego cukru redukującego spada przeszło trzykrotnie (z 7,5 do 2,23 mmola), spadek wydalania galaktozy jest więcej niż siedmiokrotny (7,43 do 0,92 mmola), natomiast wydalanie glikozy wzrasta blisko dwudziestokrotnie (z 0,07 do 1,31 mmola). W drugim dniu ulega zmniejszeniu wydalanie zarówno galaktozy jak i glikozy. Na 5 dzień po podaniu maleinianu ilości wydalanej galaktozy są już tylko nieznacznie niższe niż w okresie przed podawaniem progesteronu. Wydalanie glikozy osiąga wartości bliskie normalnym.

Wpływ kwasu maleinowego na przyswajanie i wydalanie spożytej galaktozy przez szczury traktowane uprzednio progesteronem

Jak widać z danych tablicy 5 szczury karmione dietą zawierającą 16% galaktozy wydalały około jedną trzecią spożytej galaktozy. Galaktoza przyswojona, ulegająca przemianie, stanowi około dwie trzecie. W czasie podawania progesteronu szczury spożywają wyraźnie większe ilości pokarmu, a tym samym więcej galaktozy. O taką samą wartość

Tablica 5

Wpływ kwasu maleinowego na przyswajanie i wydalanie spożytej galaktozy przez szczury traktowane uprzednio progesteronem

Ilość galaktozy przyswojonej obliczono przez odjęcie ilości galaktozy wydalonej od spożytej. Pozostałe dane jak w tablicach 2 i 3. Liczby wyrażają wartości średnie z 4 szczurów. W nawiasach wartości graniczne

Galaktoza (mmole/24 godz.)			% wydalonej galaktozy	
spożyta (a)	wydalona (b)	przyswojona (a - b)	(b/a)	(b/a)
Przed podaniem progesteronu (średnio z 3 dni)				
10,3 (8,4 - 14,2)	3,25 (2,25 - 4,26)	7,06 (4,94 - 11,5)	31	33
W czasie podawania progesteronu (średnio z 7 dni)				
13,8 (10,8 - 17,2)	6,67 (4,23 - 10,1)	7,13 (4,7 - 10,5)	50	52
Po odstawieniu progesteronu (kolejny dzień)				
14,0 (11,7 - 16,6)	6,8 (4,9 - 8,1)	7,2 (5,3 - 9,3)	48	10
13,8 (10,8 - 16,2)	5,0 (4,4 - 6,0)	8,8 (6,3 - 10,7)	36	57
13,1 (11,0 - 15,4)	4,5 (3,4 - 7,2)	8,6 (5,4 - 9,8)	34	32
15,2 (14,8 - 16,2)	3,9 (2,7 - 5,3)	11,3 (9,3 - 13,5)	26	35
13,7 (11,2 - 15,2)	3,1 (1,6 - 5,6)	10,6 (9,0 - 12,1)	22	34
Galaktoza (mmole/24 godz.)				
spożyta (a)		wydalona (b)	przyswojona (a - b)	
Przed podaniem progesteronu (średnio z 3 dni)				
10,5 (8,5 - 14,9)		3,45 (2,0 - 4,87)	7,05 (4,84 - 10,06)	
W czasie podawania progesteronu (średnio z 7 dni)				
14,3 (11,9 - 16,9)		7,43 (5,4 - 10,41)	6,87 (4,6 - 10,5)	
Po odstawieniu progesteronu wstrzyknięto kwas maleinowy (kolejny dzień zatrucia)				
8,6 (7,9 - 10,0)		0,92 (0,63 - 1,3)	7,7 (6,7 - 9,1)	
1,3 (0,1 - 2,7)		0,75 (0,4 - 1,5)	0,55 (0,0 - 1,2)	
6,7 (5,8 - 7,6)		2,14 (1,7 - 2,65)	4,56 (4,1 - 5,2)	
9,0 (5,4 - 11,0)		3,18 (1,07 - 4,55)	5,58 (4,33 - 7,1)	
8,7 (3,2 - 12,6)		2,95 (0,4 - 4,5)	5,75 (2,8 - 8,1)	

wzrasta jednak i wydalanie galaktozy, stanowiące obecnie około połowę spożycia. Połowa spożytej galaktozy ulega przemianie, ale bezwzględna ilość galaktozy przyswojonej nie zmienia się. Jest to zgodne z danymi Barki i wsp. [4], którzy stwierdzili, że wydalanie galaktozy jest proporcjonalne do jej spożycia. W ciągu 5 dni po odstawieniu progesteronu spożycie galaktozy nie ulega zmniejszeniu. Natomiast wyraźnie zmniejsza się wydalanie galaktozy, spadając do wartości z okresu przed podawaniem progesteronu (co stanowi obecnie około jedną piątą spożycia). W następstwie tego wzrasta znacznie bezwzględna ilość galaktozy ulegającej przemianie. Stanowi ona obecnie około cztery piąte spożycia.

Szczury, którym po odstawieniu progesteronu wstrzyknięto kwas maleinowy, spożywają znacznie mniejsze, w porównaniu z kontrolą, ilości galaktozy. W pierwszym dniu zatrucia bezwzględna ilość galaktozy przyswojonej nie ulega zmianie i stanowi około 90% spożycia. Bardzo znacznie spada wydalanie. W drugim dniu zatrucia szczury spożyły tylko niewielkie ilości galaktozy, wskutek czego, mimo nikłego wydalania, ilość galaktozy przyswojonej uległa znacznemu obniżeniu. W następnych dniach wartości galaktozy spożytej, wydalanej i przyswojonej, wykazują tendencję powrotu do wartości z okresu przed podawaniem progesteronu.

DYSKUSJA

W doświadczeniach na skrawkach wątrobowych wykazano, że u szczurów karmionych dietą z dużą zawartością galaktozy wzrasta aktywność glikozo-6-fosfatazy [17]. W związku z tym zamiana glikozy w glikogen i kwasy tłuszczowe ulega wyraźnemu zmniejszeniu. Natomiast spalanie do CO_2 nie ulega zmianom. Stwierdzono też, że w soczewkach szczurów karmionych dietą galaktozową spada znacznie spalanie glikozy na drodze cyklu pentozowego [18, 19]. Wiąże się to z inhibicją przez galaktozo-1-fosforan dehydrogenazy glikozo-6-fosforanowej. Kosztem cyklu pentozowego miałyby wzrastać aktywność cyklu glikolitycznego. Wykazano ponadto, że spożycie alkoholu zmniejsza tolerancję na galaktozę. Nie stwierdzono jednak, by etanol hamował aktywność jakiegokolwiek enzymu biorącego udział w spalaniu galaktozy [14]. Wpływ jego ma charakter pośredni i polega na zwiększaniu poziomu DPNH, który jest inhibitorem epimerazy UDP-galaktozy [20]. Powoduje to zmniejszone utlenianie galaktozy. Stymulujący spalanie galaktozy wpływ progesteronu tłumaczą Topper i wsp. [26] jego hamującym działaniem na aktywność dehydrogenaz redukujących DPN^+ . Isselbacher i McCarthy [12], którzy stwierdzili, że podobnie jak DPN^+ również i TPN^+ stymuluje spalanie galaktozy, przypuszczają, że związane to jest z aktywacją dehydrogenazy glikozo-6-fosforanowej i zwiększonym utlenianiem galaktozy poprzez cykl pentozowy. Wpływ progesteronu miałyby polegać na dostarczaniu TPN^+ w wyniku redukcji

przez TPNH, nienasyconego wiązania w pierścieniu A steroidu. Stymulację utleniania galaktozy przez progesteron stwierdzono także *in vivo* [7, 24, 23]. Podanie bowiem progesteronu dzieciom chorym na galaktozemię i otrzymującym galaktozę znakowaną na pierwszym węglu zwiększało znacznie wydalanie izotopu w wydechowym CO₂.

Wobec tego można się było spodziewać, że po podaniu progesteronu szczurom karmionym dietą galaktozową, wskutek zwiększonego spalania galaktozy zmniejszy się jej wydalanie. Podobnie można było przypuszczać, że zmniejszeniu ulegną zaburzenia funkcji nerki u szczurów obarczonych galaktozą. Pewnym potwierdzeniem takiego przypuszczenia są dane [23, 24] stwierdzające, że u szczurów karmionych galaktożą progesteron opóźnia wystąpienie zaćmy. Zwiększone spalanie galaktozy mogłoby również być przyczyną zmniejszenia objawów zatrucia kwasem maleinowym. Uzyskane wyniki nie potwierdzają w pełni tych przypuszczeń. Wydalanie azotu aminowego w czasie podawania progesteronu nie ulega bowiem wyraźnym zmianom, wykazując wprawdzie pewną tendencję zniżkową. Natomiast diureza, a zwłaszcza wydalanie galaktozy, znacznie wzrastają. O ile przed podawaniem progesteronu szczury wydalają około jedną trzecią spożytej galaktozy, to w czasie podawania progesteronu wydalają około połowę. Bezwzględna ilość galaktozy przyswojonej nie ulega żadnym zmianom. Dopiero po odstawieniu progesteronu uwidacznia się stopniowo przewidywany wpływ hormonu. Ilość galaktozy ulegająca przyswojeniu wyraźnie wzrasta. Na piąty dzień po odstawieniu progesteronu stanowi ona blisko 80% spożycia wobec 70% w okresie przed podawaniem progesteronu i 50% w czasie wstrzykiwania hormonu. W wartościach bezwzględnych wzrost ten jest jeszcze wyraźniejszy. Równocześnie ilość galaktozy wydalanej spada do około 20%, wobec 30% w okresie przed podawaniem progesteronu i 50% w czasie wstrzykiwania hormonu. Nie ma to jednak większego wpływu na obraz zatrucia kwasem maleinowym. W każdym razie nie zmniejsza jego objawów.

Ilości azotu aminowego wydalane przez szczury po podaniu kwasu maleinowego są nawet prawie dwa razy większe niż u szczurów nie traktowanych uprzednio progesteronem. Można jednak mówić o pewnego rodzaju przesunięciu maksimum nasilenia aminoacydarii i diurezy na trzeci i czwarty dzień zatrucia. Również spadek wydalania cukru jest mniej raptowny i wykazuje maksimum dopiero na drugi dzień po zatruciu. Spostrzeżenia te są zgodne z danymi Pescha i wsp. [24], którzy stwierdzili, że podanie progesteronu szczurom karmionym dietą galaktozową opóźnia wystąpienie zaćmy, ale jej nie zapobiega.

STRESZCZENIE

Szczury karmione dietą galaktozową wydalają kilka razy więcej cukru niż szczury karmione dietą bezlaktozową lub mleczną. Po podaniu kwasu maleinowego szczurom na diecie galaktozowej wydalanie cukru gwałtownie spada, przeciwnie niż u szczurów na diecie bezlaktozowej lub mlecznej. W czasie podawania progesteronu ilość przyswajanej przez szczury galaktozy nie ulega żadnym zmianom. Zwiększa się tylko w następstwie większego spożycia wydalanie galaktozy. Dopiero po odstawieniu progesteronu znacznie wzrasta przyswajanie spożywanej galaktozy. Podanie kwasu maleinowego szczurom traktowanym progesteronem wywołuje typowy zespół objawów. Stwierdza się jednak przesunięcie głównego nasilenia objawów uszkodzenia funkcji nerki na dalsze dni zatrucia.

LITERATURA

- [1] Angielski S., Rogulski J., Janowicz E., Madońska L., *Acta Biochim. Polon.* **6**, 295, 1959.
- [2] Angielski S., Rogulski J., Madońska L., *Acta Biochim. Polon.* **7**, 269, 1960.
- [3] Angielski S., Rogulski J., Baściak J., *Acta Biochim. Polon.* **7**, 295, 1960.
- [4] Barki V. H., Feigelson P., Collins R. A., Hart E. B., Elvehjem C. A., *J. Biol. Chem.* **181**, 565, 1954.
- [5] Careddu P., Cabassa N., *Boll. Soc. Ital. Biol. Sper.* **33**, 444, 1957.
- [6] Craig J. M., Maddock Ch. E., A. M. A. *Arch. Pathol.* **55**, 118, 1953.
- [7] Elder T. D., Segal S., Maxwell E. S., Topper Y. J., *Federation Proc.* **19**, 53, 1960.
- [8] Gillette J. R., *J. Biol. Chem.* **234**, 139, 1959.
- [9] Handler Ph., *J. Nutrition* **33**, 221, 1947.
- [10] Hayningen V. R., Pirie A., *Biochem. J.* **53**, 436, 1953.
- [11] Hayningen V. R., *Biochem. J.* **73**, 197, 1959.
- [12] Isselbacher K. J., McCarthy E. A., *Biochem Biophys. Res. Comm.* **1**, 49, 1959.
- [13] Isselbacher K. J., *Am. J. Med.* **26**, 715, 1959.
- [14] Isselbacher K. J., McCarthy E. A., *J. Clin. Invest.* **39**, 999, 1960.
- [15] Kinoshita J. H., Merole L. O., *Arch. Biochem. Biophys.* **81**, 395, 1959.
- [16] Komrower G. M., Schwarz V., Holzel A., Golberg L., *Arch. Disease Childhood* **31**, 254, 1956.
- [17] Landau B. R., Hastings A. B., Zottu S., *J. Biol. Chem.* **233**, 1257, 1958.
- [18] Lerman S., *Nature* **184**, 1406, 1959.
- [19] Lerman S., *Science* **130**, 1473, 1959.
- [20] Maxwell E. S., *J. Biol. Chem.* **229**, 139, 1957.
- [21] Nelson N., Somogyi M., w *Standard Methods of Clinical Chemistry* (red. M. Reiner) tom 1, str. 65, Academic Press, New York, 1953.
- [22] Pesch L. A., Topper Y. J., *Biochim. Biophys. Acta* **30**, 206, 1958.
- [23] Pesch L. A., Segal S., Topper Y. J., *J. Clin. Invest.* **38**, 1030, 1959.
- [24] Pesch L. A., Segal S., Topper Y. J., *J. Clin. Invest.* **39**, 178, 1960.
- [25] Simon E. R., Pesch L. A., Topper Y. J., *Biochim. Biophys. Res. Comm.* **1**, 6, 1959.
- [26] Topper Y. J., Maxwell E. S., Pesch L. A., *Biochim. Biophys. Acta* **37**, 563, 1960.
- [27] Yemm E. W., Cocking E. C., *Analyst* **80**, 209, 1955.

AMINOACIDURIA INDUCED WITH MALEIC ACID

VIII. THE EFFECT OF PROGESTERONE UPON THE PICTURE OF INTOXICATION WITH MALEIC ACID IN RATS FED WITH GALACTOSE DIET

Summary

Rats fed with galactose diet excrete several times more sugar than those kept on galactose-free or milk diet. After maleic acid had been given to rats fed with galactose diet the excretion of sugar falls down rapidly in the contrary to rats kept on galactose-free or milk diet. During the administration of progesterone the amount of assimilated galactose does not undergo any change in rats. The excretion of galactose is then increased only as result of its increased consumption. The assimilation of uptaken galactose increases considerably only after withdrawal of progesterone. The administration of maleic acid to rats treated with progesterone gives rise to a typical syndrom. However, the main intensity of the symptoms of renal lesion is shifted towards later days of intoxication.

Otrzymano 10.11.1960

M. ORŁOWSKI and A. SZEWCZUK

COLORIMETRIC DETERMINATION OF γ -GLUTAMYL TRANSEPTIDASE ACTIVITY IN HUMAN SERUM AND TISSUES WITH SYNTHETIC SUBSTRATES

*The Third Medical Clinic, School of Medicine, and Department of Biochemistry,
Institute of Immunology and Experimental Therapy of the Polish Academy of
Sciences, Wrocław*

It was demonstrated by Hanes *et al.* [7] using paper chromatographic procedures that kidney extracts are able to catalyze transpeptidation reactions from glutathione or other γ -glutamyl peptides. Kinoshita and Ball [11] described a procedure for measurement of the transpeptidation product, in which arginine was used as acceptor of the γ -glutamyl moiety, while any γ -glutamyl peptide could be employed as the donor. Fodor *et al.* [3] applied a modification of the Sullivan and Hess reaction [22] for the determination of cysteinylglycine liberated during the enzymatic cleavage of glutathione activated by various amino acids. Ball *et al.* [1] described two methods for the determination of γ -glutamyl transpeptidase activity. One method is manometric, based on the measurement of CO uptake caused by cysteinylglycine which readily forms an iron-carbon monoxide chelate. The second method is based upon measurement of the enzyme-dependent disappearance of glutathione by the alloxan procedure of Patterson and Lazarow [15].

The use of glutathione as the donor of the γ -glutamyl moiety at pH about 9, near the optimum for the γ -glutamyl transpeptidase bears some difficulties. The autooxidation of glutathione may be at this pH a serious source of error. Not all authors reported to have good results with the Sullivan and Hess method for the determination of cysteinylglycine as the product of enzymatic reaction [1].

The specificity of γ -glutamyl transpeptidase seems to be limited to the γ -glutamyl moiety, while the remaining part of the γ -glutamyl peptide is apparently of secondary importance. This view is supported by the following findings. Not only glutathione may serve as substrate for γ -glutamyl transpeptidase but also other γ -glutamyl peptides as well

[8, 11]. The enzymatic cleavage of glutathione is competitively inhibited by other γ -glutamyl peptides [4]. It was demonstrated that γ -glutamyl transpeptidase catalyzes the reaction between glutathione and a wide variety of amino acids and related compounds [18]. This type of specificity makes possible to devise rapid and precise methods for the determination of γ -glutamyl transpeptidase activity on synthetic substrates obtained by combining the γ -glutamyl residue with chromogenic groups. Substrates with a chromogenic group linked to other amino acids has been described and used for the determination of leucine aminopeptidase [5, 6], trypsin [19], chymotrypsin [17] and carboxypeptidase [16].

In the previous paper [23] the use of some γ -glutamyl aminonitriles for the colorimetric determination of a specific peptidase in serum was described. Our further studies (*Clin. Chim. Acta*, in press) revealed that this activity is exhibited by a γ -glutamyl transpeptidase present in serum. Using these substrates it was demonstrated [24] that the activity of this enzyme changes in different pathological conditions, and may be useful in clinical diagnosis.

In the present paper the synthesis of γ -glutamyl-naphthylamides is described. These new substrates allow a rapid and precise determination of γ -glutamyl transpeptidase activity in serum and tissues. γ -L-glutamyl- α -naphthylamide was also successfully employed for the histochemical demonstration of γ -glutamyl transpeptidase in kidney sections. (Albert Z., Orłowski M. and Szewczuk A., *Nature*, in press).

MATERIALS AND METHODS

Synthesis of substrates

γ -L-glutamyl- α -naphthylamide. 12.95 g. (0.05 mole) of phthaloyl-L-glutamic anhydride, obtained by the method of Sheehan and Bolthofer [20], were dissolved with heating in 30 ml. of dry dioxane and after cooling 7.15 g. (0.05 mole) of α -naphthylamine were added. The obtained solution was heated to 45° for 30 minutes with occasional stirring, and then evaporated at reduced pressure. The remaining oily product was dissolved in 50 ml. of 1 M-sodium carbonate, filtered, diluted to 300 ml. with water and then acidified with 70 ml. of 2 N-hydrochloric acid. The precipitate was filtered, washed with distilled water and dried in a *vacuum* desiccator over CaCl₂. Afterwards it was dissolved in 250 ml. of ethyl alcohol and 7.45 g. (0.05 mole) triethanolamine, and 8.1 g. (0.075 mole) of pure phenylhydrazine were added. The mixture was boiled for two hours with refluxing, cooled, and 3 g. (0.05 mole) of glacial acetic acid were added. The material was left over night at 4°, then filtered on a Buchner funnel, washed three times with alcohol, once with ether, and dried on air. The crude product

was then dissolved in 400 ml. of water with heating to 90 - 95°, 0.5 g. of charcoal were added, stirred, and filtered while hot. After 12 hours the crystalline product was collected on a Buchner funnel, washed with alcohol and dried in a *vacuum* desiccator over CaCl_2 . The yield was 6 g. (44% theoretical) of pure γ -L-glutamyl- α -naphthylamide. The melting point was 185°, $[\alpha]_D^{20} = 28^\circ$ (3% in 1 N-HCl).

Analysis gave: C, 66.33; H, 5.78; N, 9.95. Calculated for $\text{C}_{15}\text{H}_{16}\text{O}_3\text{N}_2$: C, 66.16; H, 5.93; N, 10.29. The α -amino nitrogen determined by the method of Van Slyke [21] was 4.97%, in good agreement with theory (5.15%).

γ -D, L-glutamyl- α -naphthylamide. This compound was obtained by the same procedure as the optical active L-isomer, starting from phthaloyl-D, L-glutamic anhydride prepared by the method of King and Kidd [10]. The melting point and analytical results were similar as for the L-isomer.

γ -L-glutamyl- β -naphthylamide. This compound was obtained in the same way as γ -L-glutamyl- α -naphthylamide. The crude product was dissolved in 150 ml. of 0.5N-NaOH, quickly filtered, diluted to 400 ml. with water, and precipitated by the addition of 100 ml. 1N-acetic acid. The precipitate was filtered on a Buchner funnel and washed with water and alcohol and then dried *in vacuo* over CaCl_2 . Melting point 205°. The specific optical rotation could not be estimated, since the compound was almost insoluble in water and hydrochloric acid.

γ -L-glutamyl- γ -L-glutamyl- α -naphthylamide. 780 mg. of phthaloyl-L-glutamic anhydride was dissolved in a hot solution of 816 mg. γ -L-glutamyl- α -naphthylamide in 3 ml. of glacial acetic acid. The solution was heated for 30 minutes at 60°. Acetic acid was removed *in vacuo*, and the remaining powder was dissolved in 15 ml. of dry dioxane. After 3 hours the solution was filtered, condensed at reduced pressure and dissolved in 60 ml. 0.1 M- Na_2CO_3 . The material was precipitated by the addition of 30 ml. 0.5 N-HCl, filtered, washed with water and dried in a desiccator over CaCl_2 . 1.06 g. of this material was dissolved in 9 ml. of 0.5 M- Na_2CO_3 , and 1 ml. 2 M-hydrazine was added. After 2 days the mixture was acidified to pH 3 with fresh distilled hydroiodic acid, filtered and concentrated under reduced pressure. 50 ml. of 99% ethanol was then added and the crystalline product was dried after recrystallization from 99% ethanol with traces of water. Melting point 183 - 184° with decomposition.

Analysis gave: C, 59.74; H, 5.61. Calculated for $\text{C}_{20}\text{H}_{23}\text{O}_6\text{N}_3$: C, 59.85; H, 5.73. The α -amino nitrogen determined by the method of Van Slyke was 3.21%, in good agreement with theory (3.49%).

γ -D,L-glutamyl-glycylglycine. This was obtained by the method of Kermack and Matheson [9].

Method for measurement of γ -glutamyl transpeptidase activity in serum and urine with γ -L-glutamyl- α -naphthylamide as substrate

The method is based on the determination of α -naphthylamine liberated during the enzymatic incubation after diazotization and conversion to an azo dye by a modification of the Bratton and Marshall procedure [2].

Reagents. A substrate solution was prepared by dissolving with heating 20 μ moles of γ -glutamyl- α -naphthylamide (5.42 mg.) per 1 ml. of 0.1M tris buffer, pH 9.0. This solution was prepared fresh daily. 25% trichloroacetic acid. 0.1% sodium nitrite solution. 0.5% ammonium sulfamate. 0.05% solution of N-(1-naphthyl)ethylenediamine dihydrochloride in 95% ethanol.

Procedure. 0.5 ml. of the buffer-substrate mixture and 0.25 ml. of water were mixed in a centrifuge tube and placed in water bath at 37°. After temperature equilibration the reaction was started by the addition of 0.25 ml. of serum. The incubation was carried out for 120 minutes and stopped by the addition of 1 ml. of 25% trichloroacetic acid. A blank was prepared simultaneously with serum added after trichloroacetic acid. The tubes were centrifuged, and 1 ml. of the clear supernatant was transferred into a test tube. Diazotization of α -naphthylamine was accomplished by the addition of 1 ml. of sodium nitrite solution. After 3 minutes 1 ml. of ammonium sulfamate solution was added in order to decompose excess sodium nitrite and left for two minutes. Afterwards 2 ml. of N-(1-naphthyl)ethylenediamine dihydrochloride was added to each tube and allowed to stand in a water bath at 37° for 2 hours. The optical density of the azo dye was measured in a Coleman Universal Spectrophotometer at 560 m μ against the blank. The amount of α -naphthylamine liberated during the incubation was calculated from a standard curve prepared with 0.02 to 0.2 μ moles of α -naphthylamine in 1 ml. 12.5% trichloroacetic acid. In the described conditions no binding of α -naphthylamine by serum proteins could be observed and the same optical density was obtained with equal amounts of α -naphthylamine determined directly or after incubation with serum for two hours.

The enzyme activity in serum was expressed in units (serum units) as the amount of micromoles of α -naphthylamine liberated per 100 ml. of serum in the described conditions.

The determination of enzyme activity in human urine was performed with 0.25 ml. of undiluted urine, using the same procedure as described for the serum.

Assay of enzyme activity in human tissues

The tissues were obtained from normal humans who died in accidents. The enzyme activity was determined during the first 24 hours *post mortem* in crude homogenates prepared in 0.85% sodium chloride solution with an all glass Potter homogenizer. The procedure applied was the same as for serum. For the activity measurement in kidney preparations a 1% homogenate and an incubation time of 3 to 10 minutes was used. For all other tissues a 10% homogenate was used and incubation times from 5 to 30 minutes. For some experiments with the kidney and liver the homogenates were centrifuged for 10 minutes at 2000 r.p.m. and dialyzed over night against isotonic NaCl. The protein was determined by the method of Mejbaum [13]. The enzyme activity in tissues was expressed in units (tissue units) as the amount of α -naphthylamine liberated per g. of tissue protein and 10 minutes in the conditions of the assay method.

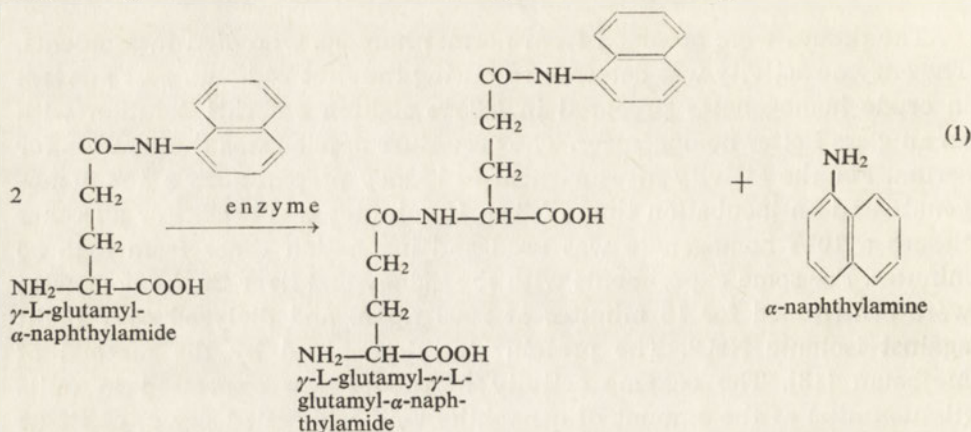
RESULTS

The identification of products of the enzymatic reaction

For the identification of the products of enzyme action on γ -L-glutamyl- α -naphthylamide this substrate was incubated with dialyzed serum of high activity and the reaction was stopped by the addition of two volumes of hot ethanol. The proteins were removed by centrifugation and the clear supernatant was evaporated to dryness. The remainder was dissolved in a small amount of 10% isopropanol, freed from insoluble contaminations by centrifugation and used for chromatography on Whatman No. 1 paper in two solvent mixtures: (a) Butanol - pyridine - water (1 : 1 : 1) and (b) butanol - acetic acid - water (4 : 1 : 5).

The R_F value for γ -L-glutamyl- α -naphthylamide was in solvent (a) 0.69 and in solvent (b) 0.71. After enzymatic incubation only minute amounts of glutamic acid could be detected besides α -naphthylamine. The main product of the enzymatic reaction migrated with a R_F value of 0.51 in solvent (a) and 0.59 in solvent (b). This product was eluted from chromatograms and the amount of material giving a positive ninhydrin reaction was estimated by the method of Moore and Stein [14] before and after complete hydrolysis in 6 N-HCl at 110°. The result of this analysis was the establishment that the amount of ninhydrin positive material increased twice after hydrolysis. The hydrolysis products were then identified as glutamic acid and α -naphthylamine. These results suggested, that the analysed product is composed of two molecules of glutamic acid and one molecule of α -naphthylamine. Apparently the substrate serves

both as donor and acceptor of the γ -glutamyl moiety in the enzymatic γ -glutamyl transfer reaction according to the following:



This concept was proved by the comparison of the product of the enzymatic reaction with a synthetic sample of γ -L-glutamyl- γ -L-glutamyl- α -naphthylamide. Both compounds migrated with same R_F values in

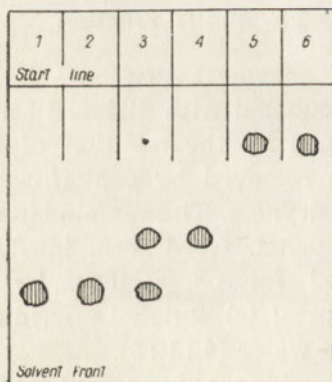
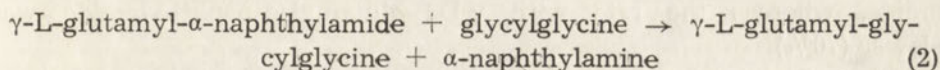


Fig. 1. Diagrammatic presentation of the chromatographic analysis of the products of enzymatic reaction. Ninhydrin positive spots. (1) — pure γ -L-glutamyl- α -naphthylamide (2) — a blank sample of γ -L-glutamyl- α -naphthylamide after mixing with dialysed serum without incubation, (3) — the same as in (2) but after incubation, (4) — synthetic γ -L-glutamyl- γ -L-glutamyl- α -naphthylamide, (5) — the main reaction product after hydrolysis in 6 N-HCl, (6) — standard of glutamic acid

both used chromatographic solvent systems (Fig. 1). A mixed sample of both compounds migrated as a single spot. An additional proof was obtained by the analysis of the maximal amount of α -naphthylamine liberated during the enzymatic reaction in dialysed serum. In accordance with equation (1) this maximal amount was shown to be almost exactly 50% (Fig. 2). The transpeptidation product γ -L-glutamyl- γ -L-glutamyl- α -naphthylamide undergoes further hydrolysis to glutamic acid and α -naphthylamine during prolonged incubation with crude homogenates from human liver and kidney.

Of interest is the course of enzymatic reaction in the presence of glycylglycine. This peptide has an activating effect of about 90% if

present in an equimolar amount with γ -L-glutamyl- α -naphthylamide. In the presence of an excess of glycylglycine the amount of liberated α -naphthylamine amounted to 100%. This result may be interpreted that glycylglycine served as acceptor for the whole γ -glutamyl moiety of the substrate according to equation:



In fact chromatographic analysis revealed that in the presence of glycylglycine the main reaction product is identical with the synthetic obtained γ -D,L-glutamyl-glycylglycine. These results confirm the suggestion that the investigated enzyme is γ -glutamyl transpeptidase.

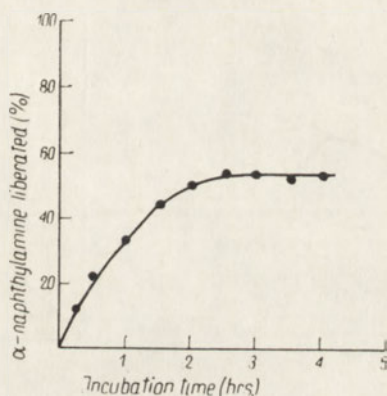


Fig. 2. α -Naphthylamine liberated during the incubation of dialyzed serum with γ -L-glutamyl- α -naphthylamide

pH. The optimum pH was examined in tris buffer over the pH range 7.2 to 9.2 (Fig. 3). A sharp optimum was found at pH 8.8 to 9.0. The same optimum was found for the liver and kidney enzyme.

Substrate concentration. The rate of enzymatic reaction was measured with substrate concentrations from 2.5 to 20 μ moles per 1 ml. of incubation mixture (Fig. 4). Maximal activity could not be obtained with substrate concentrations as high as 20 μ moles per 1 ml.

Time of incubation, and amount of enzyme. In the described conditions the enzyme activity is proportional to the incubation time and amount of serum or liver and kidney homogenates. If the activity of a sample was too great to give correct readings in the spectrophotometer, the assay was repeated using an appropriate dilution of serum or homogenate.

Assay of different substrates. The liberation of naphthylamine by the serum enzyme was investigated with the following substrates: γ -L-glutamyl- α -naphthylamide, γ -D,L-glutamyl- α -naphthylamide, and γ -L-gluta-

myl- β -naphthylamide. The last substrate was at pH 9.0 almost insoluble and therefore all substrates were dissolved in 0.2 M- Na_2CO_3 and assayed at pH 10 in a final concentration of 5 μmoles per 1 ml. The rate of enzymatic reaction with γ -L-glutamyl- α -naphthylamide was taken as 100. A higher rate (380%) was observed with γ -L-glutamyl- β -naphthylamide, whereas the rate with γ -D,L-glutamyl- α -naphthylamide was slower (70%).

The influence of glutathione (GSH). — Since GSH was frequently used as substrate for γ -glutamyl transpeptidase its influence on the liberation of α -naphthylamine was investigated. GSH was shown to be inhibitory in the described reaction. The degree of inhibition was dependent on

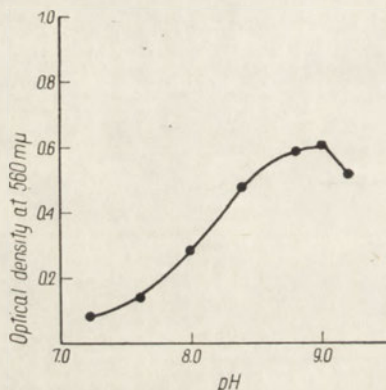


Fig. 3. Effect of pH on enzyme activity (expressed as optical density)

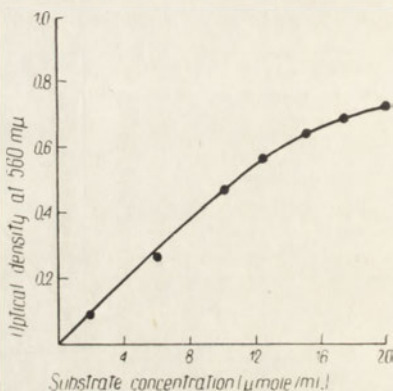


Fig. 4. Rate of enzymatic reaction as a function of concentration of substrate

the relative concentrations of GSH and γ -L-glutamyl- α -naphthylamide. The graphical analysis of the type of inhibition according to Lineweaver and Burk [12] revealed its competitive character.

Inhibitors and activators. In a final concentration of 10^{-3} M, Cu^{2+} inhibited 20%, Zn^{2+} , Co^{2+} , Al^{3+} inhibited about 10%, Fe^{3+} , Ca^{2+} , Mg^{2+} were without effect. At a final concentration of 10^{-2} M, glycylglycine activated 90%, L-glutamine 32%, L-arginine 35%, DL-methionine 12%, D,L-alanine and D,L-serine were without influence. N-ethylmaleimide and iodoacetic acid inhibited 60% and 17% respectively.

Stability of enzyme. Heating the serum for 60 minutes at 45° before the determination did not change the activity. 70% activity is lost after heating the sample for 1 hour at 55° . Heating the serum for 5 minutes at 65° destroyed the activity.

Enzyme activity in human serum and tissues. The enzyme activity was determined in sera of 34 healthy subjects between the ages of 8 to 55 years. The mean activity was 27.2 "serum units" (standard error of the

Table 1

The distribution of γ -glutamyl transpeptidase activity in human tissues

The activity is expressed in "tissue units". 1 unit = 1 μ mole of α -naphthylamine liberated per g. of tissue protein and 10 min. incubation. Details see text

Case No.	Age	Sex	Time from accident death to activity measurement (hrs)	Kidney	Liver	Pancreas	Spleen	Brain	Heart muscle	Skeletal muscle	Lung	Intestine
1	27	M	6	2000	94	173	20	11	2	1	5	24
2	21	M	7	1900	88	112	57	11	—	1	—	16
3	50	M	19	3210	78	267	31	14	2	4	13	32
4	38	M	13	1790	86	86	29	9	0	0	4	12
Mean				2225	86.5	184.5	34	11	1	1.5	7	21

mean \pm 2.1). In some pathological conditions particularly in obstructive jaundice and carcinoma of the liver the enzyme activity increased occasionally 100 times over that found in normal subjects [23]. No activity was found in red blood cells. Considerable activity was found in human urine. The mean activity of 10 specimens of 24 hrs. urine from healthy human subjects was 128 "serum units" (standard error of the mean \pm 14.5).

The results of γ -glutamyl transpeptidase measurements in the tissues of 4 human subjects are summarized in Table 1. As may be seen the highest activity was found in kidney tissue. Much lower activities were observed in pancreas and liver, while in other tissues only traces of activity could be found. If the activity in kidney was taken as 100, the relative activities for other tissues may be expressed as 8.3 for pancreas, 3.9 for liver, 1.5 for spleen, 0.95 for intestine, 0.50 for brain, 0.31 for lung, 0.045 for heart muscle, and 0.067 for skeletal muscle.

The activity of sera in healthy subjects calculated per g. of protein and a 10 minutes incubation time is 0.3 "tissue units", assuming that the normal value for serum proteins is 7.5%. It may be seen from this calculation, that the enzyme activity in normal serum is about 7000 times lower than in kidney and about 290 times lower than in liver.

DISCUSSION

The use of γ -L-glutamyl- α -naphthylamide as substrate makes possible to determine γ -glutamyl transpeptidase activity in serum, urine and tissues. The activity determination is based on the measurement of α -naphthylamine liberated during the enzymatic incubation. This is very easy to perform. The new substrate γ -L-glutamyl- α -naphthylamide introduced for this purpose does not change in contrast to GSH in the

conditions of the described method and during storage. The transpeptidation reaction was established by the identification of γ -L-glutamyl- γ -L-glutamyl- α -naphthylamide as the main product of the enzymatic reaction. This compound was identified both by chemical and chromatographic analysis and by comparison with a sample of synthetic γ -L-glutamyl- γ -L-glutamyl- α -naphthylamide. The transpeptidation reaction proceeds without the addition of amino acids or peptides since the substrate serves simultaneously as donor and acceptor of the γ -glutamyl moiety. The enzyme assay is possible even in crude tissue homogenates in the presence of high activities of other enzymes. A further confirmation for the concept that γ -L-glutamyl- α -naphthylamide is a substrate for γ -glutamyl transpeptidase is the formation of γ -glutamyl-glycylglycine in the presence of glycylglycine. In the same way may be interpreted the competitive inhibition of GSH since this peptide was known as substrate for γ -glutamyl transpeptidase [7, 11, 18]. The properties of the enzyme (pH optimum, stability, activators and inhibitors, absence in red blood cells) are suggesting that the enzyme is different from the known peptidases present in serum. The enzyme is identical with the previously described by us "specific peptidase in blood serum" [23]. The enzyme is probably a SH enzyme since an inhibition was demonstrated with N-ethylmaleimide and iodoacetic acid.

Of interest is the distribution of the enzyme. The highest activity was found in kidney homogenates. The activity in liver homogenates is over 20 times lower. The origin of the serum enzyme is not known, however the changes observed in liver diseases [23, 24] may indicate that the serum enzyme originates from the liver. The physiological function of the kidney enzyme is not known, however the possibility must be considered, that the enzyme may be important in the reabsorption of amino acids from the kidney tubulus. Further work to test this possibility is in progress.

We wish to express our thanks to Prof. Dr T. Baranowski and Prof. Dr E. Szczeklik for helpful criticism of this paper. We are much indebted to Miss K. Augustyniak for her technical assistance.

SUMMARY

A new method was described for the assay of γ -glutamyl transpeptidase activity. The method is based on the colorimetric determination of α -naphthylamine liberated enzymatically from γ -L-glutamyl- α -naphthylamide. The synthesis of this substrate and other related compounds is

given. γ -L-glutamyl- γ -L-glutamyl- α -naphthylamide was identified as the transpeptidation product. In the presence of glycylglycine and γ -L-glutamyl- α -naphthylamide the main reaction product was identified as γ -glutamyl-glycylglycine.

The transpeptidase activity in sera of normal human subjects was 27.2 units (1 unit = 1 μ mole of α -naphthylamine liberated per 100 ml. serum, after a 2 hrs. incubation). The mean activity in urine was 128 units. Some properties of the enzyme and its distribution in men were investigated. The highest activity was found in kidney. In pancreas, liver and spleen the activities amounted to 8.3, 3.9, and 1.5 per cent respectively of that found in kidney. Only traces of activity were found in intestine, lung, brain, heart and skeletal muscles. The origin of the serum enzyme and the significance of the kidney enzyme was discussed.

REFERENCES

- [1] Ball E. G., Revel J. P. & Cooper D., *J. Biol. Chem.* **221**, 895, 1956.
- [2] Bratton A. C. & Marshall E. K. Jr., *J. Biol. Chem.* **128**, 537, 1939.
- [3] Fodor P. J., Miller A. & Waelsh H., *J. Biol. Chem.* **202**, 551, 1953.
- [4] Fodor P. J., Miller A., Neidle A. & Waelsch H., *J. Biol. Chem.* **203**, 991, 1953.
- [5] Gomori G., *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* **87**, 559, 1954.
- [6] Green M. N., Kwan-Chung Tson., Bressler R. & Seligman A. M., *Arch. Biochem. Biophys.* **57**, 458, 1955.
- [7] Hanes C. S., Hird F. J. R. & Isherwood F. A., *Nature* **166**, 288, 1950.
- [8] Hanes C. S., Hird F. J. R. & Isherwood F. A., *Biochem. J.* **51**, 25, 1952.
- [9] Kermack W. O. & Matheson N. A., *Biochem. J.* **65**, 45, 1957.
- [10] King F. E. & Kidd D. A., *J. Chem. Soc.* 3315, 1949.
- [11] Kinoshita J. H. & Ball E. G., *J. Biol. Chem.* **200**, 609, 1953.
- [12] Lineweaver H. & Burk D., *J. Am. Chem. Soc.* **56**, 658, 1934.
- [13] Mejbaum-Katzenellenbogen W., *Acta Biochim. Polon.* **2**, 279, 1955.
- [14] Moore S. & Stein W. H., *J. Biol. Chem.* **211**, 907, 1954.
- [15] Patterson J. W. & Lazarow A., in *Methods of Biochemical Analysis*, (Ed. D. Glick) **2**, 273, 1955. New York.
- [16] Ravin H. A., *J. Am. Chem. Soc.* **73**, 2080, 1951.
- [17] Ravin H. A., Bernstein Ph. & Seligman A. M., *J. Biol. Chem.* **208**, 1, 1954.
- [18] Revel J. P. & Ball E. G., *J. Biol. Chem.* **234**, 577, 1959.
- [19] Riedel A., Wunsch E. & Hartl A., *Z. physiol. Chem.* **316**, 61, 1959.
- [20] Sheehan J. C. & Bolthofer W. *Am. J. Am. Chem. Soc.* **72**, 2469, 1950.
- [21] Van Slyke D. D., Dillon R. T., Mac Fadyen D. A. & Hamilton P., *J. Biol. Chem.* **141**, 627, 1941.
- [22] Sullivan M. X. & Hess W. C., *J. Biol. Chem.* **116**, 221, 1936.
- [23] Szewczuk A. & Orłowski M., *Clin. Chim. Acta* **5**, 680, 1960.
- [24] Szczeklik E., Orłowski M., Szewczuk A., *Pol. Tyg. Lek.* **16**, 503, 1961.

KOLORYMETRYCZNE OZNACZANIE AKTYWNOŚCI γ -GLUTAMYLO-TRANS-PEPTYDAZY W SUROWICY I TKANKACH CZŁOWIEKA PRZY UŻYCIU SYNTETYCZNYCH SUBSTRATÓW

Streszczenie

Opisano nową metodę oznaczania aktywności γ -glutamylotranspeptydazy, opartą na kolorymetrycznym oznaczeniu α -naftyloaminy uwolnionej w czasie inkubacji enzymatycznej z γ -L-glutamylotranspeptydamidem. Podano metodę syntezy tego związku, jak również innych pokrewnych związków. Jako produkt transpeptydacji zidentyfikowano γ -L-glutamylotranspeptydamid. W obecności glicylo-glicyny i γ -L-glutamylotranspeptydamidu głównym produktem jest γ -glutamylotranspeptydamid-glicyna.

Średnia aktywność enzymu w surowicy zdrowych osób wynosiła 27.2 jednostki (1 jednostka = 1 μ mola α -naftyloaminy uwolnionej przez 100 ml surowicy w ciągu 2 godz.). Średnia aktywność w moczu wynosiła 128 jednostek.

Opisano niektóre własności enzymu i badano jego rozmieszczenie w tkankach u człowieka. Największą aktywność stwierdzono w homogenatach z nerki. Aktywność enzymu w trzustce, wątrobie i śledzionie wynosiła odpowiednio 8,3, 3,9 i 1,5% aktywności stwierdzonej w nerce. Tylko ślady aktywności stwierdzono w jelitach, płucach, mózgu oraz mięśniu sercowym i szkieletowym.

Dyskutowano pochodzenie enzymu surowiczego oraz znaczenie fizjologiczne enzymu nerkowego.

Otrzymano 19.11.1960

A. SZEWCZUK, ELŻBIETA WOLNY, M. WOLNY i T. BARANOWSKI

NOWA METODA OTRZYMYWANIA D-GLICERALDEHYDO-3-FOSFORANU

*Zakład Biochemii Instytutu Immunologii i Terapii Doświadczalnej im. L. Hirszfelda,
PAN, Wrocław*

Kierownik Zakładu: Prof. Dr T. Baranowski

*Praca poświęcona uczczeniu 65 rocznicy urodzin
Profesora Dra Wł. Mozołowskiego*

Pierwotna metoda otrzymywania D-gliceraldehydo-3-fosforanu polegała na rozszczepieniu D-fruktozo-1,6-dwufosforanu przez aldolazę, w wyniku czego produkt był zawsze zmieszany z fosfodwuhydroksyacetonem [17]. W roku 1955 Ballou i Fischer [2] opisali dziewięciostopniową syntezę z mannitolu. Niedawno Klybas i współpr. [12] otrzymali D-gliceraldehydo-3-fosforan, zanieczyszczony innymi fosforanami cukrów, w reakcji utlenienia D-rybozo-5-fosforanu przez czteroocetan ołowiu.

W obecnej pracy zajęliśmy się utlenianiem niektórych łatwo dostępnych estrów fosforanowych cukrów (fruktozy i glikozy) przy pomocy kwasu nadjodowego. Tego typu reakcje były prowadzone w obojętnym lub alkalicznym środowisku, przy czym otrzymano fosfobiozę [6, 7, 14], lub też w kwaśnym środowisku, nie wydzielając ostatecznych produktów reakcji [18, 16]. Wykazaliśmy, że przy utlenianiu kwasem nadjodowym D-fruktozo-1,6-dwufosforanu w silnie kwaśnym środowisku powstaje D-gliceraldehydo-3-fosforan obok kwasu fosfoglikolowego. Substancje te rozdzielono przez frakcjonowanie etanolem ich soli magnezowych. Otrzymano również D-gliceraldehydo-3-fosforan przez utlenienie D-fruktozo-6-fosforanu.

MATERIAŁY I METODY

D-glikozo-6-fosforan w formie krystalicznej soli barowej oraz surowy D-fruktozo-1,6-dwufosforan otrzymano przez fermentację sacharozy wg Orłowskiego [19]. Ten ostatni preparat oczyszczono w następujący sposób (Orłowski, doniesienie prywatne): ok. 250 g trudno rozpuszczalnych fosforanów baru wyekstrahowano 5-krotną ilością wody, rozpuszczono

w 1 N-HCl i odbarowano siarczanem sodu. Przesącz zubożniono i usunięto ortofosforan mieszkanką magnezową. Po zakwaszeniu do pH 4 dodano 480 ml 25% octanu baru i przesączono. Otrzymany roztwór doprowadzono do pH 8,4 i dodano 0,1 obj. etanolu. Osad odsączono, przemyto 10% etanolem a następnie acetonem i wysuszono. Uzyskano ok. 120 g D-fruktozo-1,6-dwufosforanu o czystości ok. 70%.

DL-Gliceraldehydo-3-fosforan otrzymano syntetycznie metodą Baera i Fischera [1].

D-fruktozo-6-fosforan otrzymano przez częściową kwaśną hydrolizę D-fruktozo-1,6-dwufosforanu wg. Mandla i Neuberga [15].

Kwas fosfoglikolowy w formie krystalicznej soli barowej uzyskano z α -fosfoglicerolu metodą Fleury i Courtoisa [9].

Grupy aldehydowe oznaczano jodometrycznie metodą McLeoda i Robinsona [13].

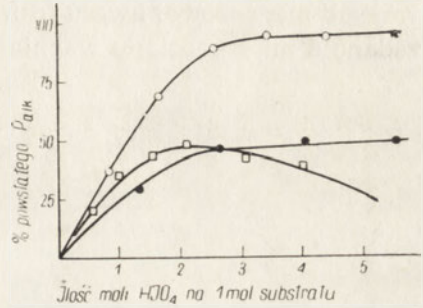
D-gliceraldehydo-3-fosforan oznaczano wg Coopera i współpr. [5]: przy pomocy dehydrogenazy D-gliceraldehydo-3-fosforanu, oraz przy pomocy dehydrogenazy α -fosfoglicerolu (enzymu Baranowskiego) z dodatkiem izomerazy fosfotriozowej.

Chromatografię przeprowadzono na bibule Whatman Nr. 1. Przygotowanie bibuły i wywołanie przy pomocy fosfatazy alkalicznej wykonano wg. Baranowskiego i współpr. [3]. Do rozwijania chromatogramu używano mieszaniny: eter izopropylowy - 90% kwas mrówkowy (90 : 60). Przy użyciu rozpuszczalnika: III-rz. butanol - woda - kwas pikrynowy (80 : 20 : : 2, v/v/w), chromatogram wywołano wg Hanesa i Isherwooda [11].

WYNIKI

W pierwszym etapie pracy badano reakcję utleniania D-glikozo-6-fosforanu, D-fruktozo-6-fosforanu i D-fruktozo-1,6-dwufosforanu przez kwas nadjodowy w środowisku kwaśnym. Wszystkie badane estry użyto w formie 0,1 M-roztworów w 0,5 N-HCl odbarowanych na Dowex 50 (H^+). Utlenienie prowadzono w 0° przez 10 min. przy pomocy 1 M-kwasu nadjodowego, po czym rozkładano pozostały kwas nadjodowy nadmiarem glikolu etylenowego. Miarą powstałego D-gliceraldehydo-3-fosforanu było oznaczenie fosforu alkalicznie labilnego (P_{alk} = ilość fosforu odszczepionego w 1 N-NaOH w ciągu 20 minut w temp. pokojowej). Jak przedstawiono na rys. 1. przy użyciu trzech lub więcej moli kwasu nadjodowego na jeden mol estru, w warunkach doświadczenia, prawie całkowita ilość fosforu D-fruktozo-6-fosforanu i 50% fosforu D-fruktozo-1,6-dwufosforanu przechodziła w fosfor labilny, z równoczesnym zniknięciem fruktozy. Przedłużenie czasu reakcji nie miało wpływu na charakter krzywych. Użyte wyniki dowodzą, że 1 mol każdego z wymienionych estrów fruktozy zostaje utleniony na 1 mol D-gliceraldehydo-3-fosforanu.

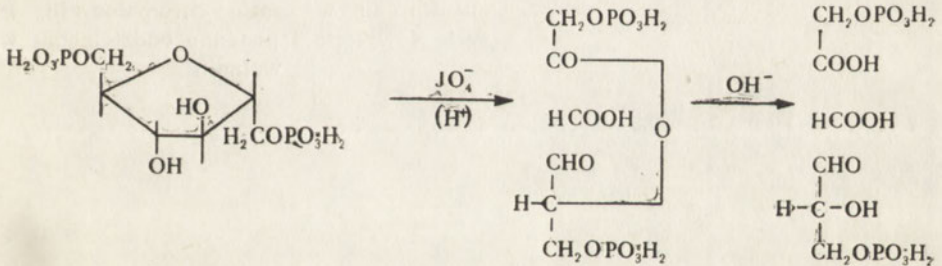
Prawdopodobnie w wyniku utlenienia D-fruktozo-1,6-dwufosforanu obok kwasu mrówkowego powstaje trwały w środowisku silnie kwaśnym związek estrowy pomiędzy D-gliceraldehydo-3-fosforanem a kwasem fosfoglikolowym (lub kwasem glikolowym w przypadku utlenienia D-fruktozo-6-fosforanu). Związek ten hydrolizuje po zobojętnieniu, dając odpowiedni kwas i triozofosforan. Powstanie tego typu związku



Rys. 1. Wpływ ilości kwasu nadjodowego na powstawanie fosforu alkalicznie labilnego (P_{alk}). Użyto następujących substratów: (●), D-fruktozo-1,6-dwufosforan; (○), D-fruktozo-6-fosforan; (□) D-gliko-6-fosforan

estrowego w czasie utleniania D-rybozo-5-fosforanu przez kwas nadjodowy w środowisku silnie kwaśnym postulował Morrison i współpr. [18].

Zgodnie z powyższym przebieg utleniania D-fruktozo-1,6-dwufosforanu można przedstawić następującym schematem reakcji:

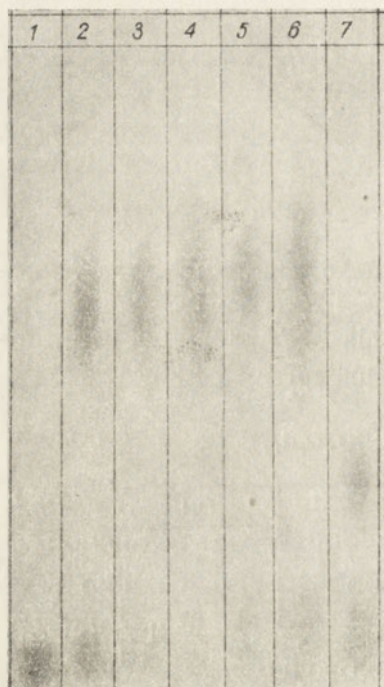


Natomiast związek estrowy przypuszczalnie powstały przy utlenieniu D-gliko-6-fosforanu hydrolizuje już w środowisku kwaśnym i uwalniany D-gliceraldehydo-3-fosforan, jak wynika z rys. 1, jest dalej utleniany przez nadmiar kwasu nadjodowego.

Otrzymywanie D-gliceraldehydo-3-fosforanu z D-fruktozo-1,6-dwufosforanu

3 milimole (2,6 g 70% preparatu) D-fruktozo-1,6-dwufosforanu w formie soli barowej rozpuszczono w 9 ml 1 N-HCl i odbarowano przy pomocy Dowex 50 (H⁺). Otrzymany eluat (30 ml) po ochłodzeniu do 0° zadano zimnym 1 M-kwasem nadjodowym (12 ml) i pozostawiono na 15 minut.

Nadmiar kwasu nadjodowego rozłożono w temp. pokojowej przez dodanie 2 ml glikolu etylenowego i po 30 minutach doprowadzono do pH 7,2 przy pomocy 2N-NaOH. Po zadaniu równą objętością 96% etanolu (ok. 70 ml) zostawiono w 0° na 2 godziny, po czym odsączono wykryształizowany jodan sodu. Klarowny przesącz zadano 9 ml. 1M-octanu magnezu i równą objętością etanolu (ok. 130 ml). Po 1 godz. utworzony w 0° osad odwirowano, przemyto etanolem i wysuszono w próżni. Otrzymano 1,3 g surowej soli magnezowej kwasu fosfoglikolowego. Uzyskany klarowny roztwór zadano 6 ml 1M-octanu wapnia i odstawiono na 3 godziny w 0°, miesza-



Rys. 2. Chromatogram związków fosforowych: (1), ortofosforan; (2) i (3), DL-gliceraldehydo-3-fosforan, odpowiednio 1,7 μg i 0,85 μg ; (4), (5) i (6), preparat własny, odpowiednio 1,35 μg , 0,75 μg i 1,5 μg ; (7), D-fruktozo-1,6-dwufosforan i ortofosforan. Widoczne zanieczyszczenia ortofosforanem w pozycjach 2-6 pochodzą z rozkładu D-gliceraldehydo-3-fosforanu w czasie chromatografii. Pozycję 4 wycięto i poddano oddzielnemu wywołaniu

jąc od czasu do czasu i pocierając ścianki bagietką. Utworzony krystaliczny osad odwirowano, przemyto 3 razy 50% etanolem (po 8 ml), a następnie 96% etanolem i wysuszono w próżni nad chlorkiem wapnia. Otrzymano 320 mg preparatu o zawartości 1,09 milimola dwuwodnej soli wapniowej D-gliceraldehydo-3-fosforanu (wydajność 36% teoret.).

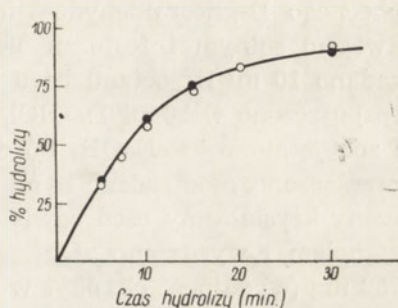
Chromatograficznie stwierdzono, że uzyskany preparat jest identyczny z syntetycznie otrzymanym DL-gliceraldehydo-3-fosforanem i posiada jedynie drobne zanieczyszczenia rozpoznane jako kwas fosfoglikolowy (Rys. 2).

Krzywa hydrolizy kwaśnej (Rys. 3) jest identyczna z analogiczną krzywą otrzymaną przez Ballou i Fischera [2] dla syntetycznie uzyskanego D-gliceraldehydo-3-fosforanu.

Na podstawie wyników analiz przedstawionych w tabl. 1. czystość preparatu w przeliczeniu na dwuwodną sól wapniową D-gliceraldehydo-3-fosforanu wynosi ok. 83%. Ponieważ preparat ze związków fosforanowych jest zanieczyszczony tylko fosfoglikolanem, ilość soli wapniowej tego związku obliczona z różnicy między fosforem organicznie związanym a fosforem alkalicznie labilnym wynosi 11,2%. Oprócz tego w preparacie oznaczono 3,0% jodanu wapnia. Pomimo wymienionych zanieczyszczeń nie stwierdzono różnic podczas oznaczania aktywności enzymatycznej obu dehydrogenaz fosfortrioz pomiędzy otrzymanym preparatem a syntetycznym DL-gliceraldehydo-3-fosforanem (w przeliczeniu na równoważną

Rys. 3. Hydroliza D-gliceraldehydo-3-fosforanu w 1 N-HCl w 100°.

(○), preparat własny (% hydrolizy przeliczano na P_{alk})
(●), wyniki uzyskane przez Ballou i Fischera [2]



ilość D-formy). Próby wykazania biozy wg Borenfreunda i Dischego [4], tetrozy wg Dischego [8] i fruktozy metodą Roe [20] dały wynik negatywny.

Z preparatu uzyskano 2,4-dwunitrofenyloosazon metyloglioksalu metodą Baera i Fischera [1]. Analiza dla $C_{15}H_{12}N_8O_8$: obliczono — C : 41,67%, H : 2,80%; znaleziono — C : 41,86%, H : 3,09%.

Tablica 1

Analiza otrzymanego preparatu soli wapniowej D-gliceraldehydo-3-fosforanu

Rodzaj oznaczenia	Mikromole/mg	% substancji
Fosforan nieorganiczny	0,05	0,75*
Fosfor alkal. labilny	3,40	83,3+
Fosfor całkowity	4,00	
Grupy aldehydowe	3,24	79,5+
Dehydrogenaza D-gliceraldehydo-3-fosforanu	3,32	81,5+
Dehydrogenaza α -fosfoglicerolu	3,36	82,5+

(*) przeliczono na fosforan wapnia.

(+) przeliczono na $C_3H_5O_6PCa.2H_2O$.

Preparat był substratem dla otrzymania D-fruktozo-1,6-dwufosforanu wobec aldolazy i izomerazy fosfortrioz. Utlenienie jodem wg Meyerhofa

[17] dało kwas D-3-fosfoglicerynowy. Obie reakcje prześledzono chromatograficznie.

Powyższą metodą otrzymano krystaliczną sól wapniową D-gliceraldehydo-3-fosforanu (czystość ok. 80%) również z handlowego preparatu D-fruktozo-1,6-dwufosforanu firmy BDH.

Oczyszczanie kwasu fosfoglikolowego

1,3 g surowej soli magnezowej kwasu fosfoglikolowego rozpuszczono w 10 ml wody i usunięto magnez przy pomocy Dowex 50 (Na^+). 20 ml eluatu zadano 6 ml 5N-NaOH i pozostawiono na 1 godz. w celu rozłożenia obecnego D-gliceraldehydo-3-fosforanu. Roztwór zobojętniono stężonym kwasem solnym i fosforan usunięto mieszkanką magnezową. Przesącz zadano 10 ml 1M-octanu baru i równą objętością etanolu. Zebrany osad rozpuszczono w 20 ml 1N-HCl, przesączono, dodano 5 ml 1M-octanu baru i zobojętniono 5N-NaOH. Po doprowadzeniu do wrzenia roztwór szybko przesączono, osad zadano 10 ml 1N- HNO_3 i zobojętniono. Po 30 min. utworzony krystaliczny osad odwirowano, przemyto 3 razy wodą, a następnie etanolem i wysuszono w próżni nad chlorkiem wapnia. Otrzymano ok. 750 mg (wydajność ok. 65% w przeliczeniu na użyty D-fruktozo-1,6-dwufosforan) krystalicznej soli barowej kwasu fosfoglikolowego.

Analiza dla $\text{C}_4\text{H}_4\text{O}_{12}\text{P}_2\text{Ba}_3 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$: obliczono — 7,84% P, znaleziono — 7,69% P. Preparat był chromatograficznie jednorodny i identyczny z kwasem fosfoglikolowym otrzymanym z α -fosfoglicerolu. Krzywe hydrolyzy w 1N- H_2SO_4 i 1N- CH_3COOH nie wykazały odchyień od analogicznych krzywych podanych przez Fleury i Courtois [10].

Otrzymywanie D-gliceraldehydo-3-fosforanu z D-fruktozo-6-fosforanu

Do 50 ml 0,1M-D-fruktozo-6-fosforanu odbarowanego na Dowex 50 (H^+) i ochłodzonego lodem dodano 17,5 ml zimnego 1 M-kwasu nadjodowego i po 15 min. wkroplono 1,5 ml glikolu etylenowego. Po 30 min. roztwór zobojętniono do pH 7,0 przy pomocy 2N-NaOH, zadano równą objętością etanolu i odstawiono na 3 godz. w 0°. Wykryształowany jodan sodu odsączono, do klarownego przesączu dodano 14 ml 1M-octanu wapnia i 14 ml etanolu i po 3 godz. stania w 4° odwirowano. Osad przemyto trzykrotnie 50% a następnie 96% etanolem i wysuszono w próżni nad chlorkiem wapnia. Uzyskano 1,35 g dwuwodnej soli wapniowej D-gliceraldehydo-3-fosforanu o czystości 65% (wydajność 68% teoret.). Identyfikację i oznaczanie czystości wykonano w ten sam sposób jak dla preparatu otrzymanego z D-fruktozo-1,6-dwufosforanu. Nasze obserwacje uzasadniają przypuszczenie, że czystość otrzymanego produktu jest uzależniona od czystości użytego wyjściowego preparatu D-fruktozo-6-fosforanu.

STRESZCZENIE

Opracowano prostą jednostopniową metodę otrzymywania krystalicznej soli wapniowej D-gliceraldehydo-3-fosforanu o czystości ok. 83%, polegającą na utlenieniu kwasem nadjodowym D-fruktozo-1,6-dwufosforanu. Jako produkt uboczny otrzymano z dobrą wydajnością czysty kwas fosfoglikolowy w formie soli barowej. Opisano również sposób otrzymywania D-gliceraldehydo-3-fosforanu z D-fruktozo-6-fosforanu.

L I T E R A T U R A

- [1] Baer E. & Fischer H. O. L., *J. Biol. Chem.* **150**, 223, 1943.
- [2] Ballou C. E. & Fischer H. O. L., *J. Amer. Chem. Soc.* **77**, 3329, 1955.
- [3] Baranowski T., Długajczyk A. & Kochman M., *Archiwum Immunologii i Terapii Doświadczalnej* **7**, 725, 1959.
- [4] Borenfreund E. & Dische Z., *J. Biol. Chem.* **180**, 1297, 1949.
- [5] Cooper J., Srere P. A., Tabachnick M. & Racker E., *Arch. Biochem. Biophys.* **74**, 306, 1958.
- [6] Courtois J., *Bull. Soc. Chim. France* **9**, 136, 1942.
- [7] Courtois J. & Ramet M., *Bull. Soc. Chim. France* **11**, 539, 1944.
- [8] Dische Z. & Dische M. R., *Biochim. Biophys. Acta.* **27**, 184, 1958.
- [9] Fleury P. & Courtois J., *Ann. Chim. Analyt. Chim. Appl.* (3) **23**, 117, 1941.
- [10] Fleury P. & Courtois J., *Bull. Soc. Chim. France* **9**, 570, 1942.
- [11] Hanes C. S. & Isherwood F. A., *Nature* **164**, 1107, 1949.
- [12] Klybas V., Schramm M. & Racker E., *Arch. Biochem. Biophys.* **80**, 229, 1959.
- [13] McLeod M. & Robinson R., *Biochem. J.* **23**, 517, 1929.
- [14] Loring H. S., Levy L. W., Moss L. K., & Ploeser J. M., *J. Am. Chem. Soc.* **78**, 3724, 1956.
- [15] Mandl I. & Neuberg C. w *Methods in Enzymology* (eds. Colowick S. P. & Kaplan N. O.) tom 3, str. 167, Academic Press Inc. N. Y. 1957.
- [16] Marinetti G. V. & Rouser G., *J. Amer. Chem. Soc.* **77**, 5345, 1955.
- [17] Meyerhof O. & Junowicz-Kocholaty R., *J. Biol. Chem.* **149**, 71, 1943.
- [18] Morrison M., Rouser G. & Stotz E., *J. Am. Chem. Soc.* **77**, 5156, 1955.
- [19] Orłowski M., *J. Biol. Chem.* **234**, 1651, 1959.
- [20] Roe J. H., Epstein J. H. & Goldstein N. P., *J. Biol. Chem.* **178**, 839, 1949.

A NEW METHOD OF PREPARATION OF D-GLYCERALDEHYDE-3-PHOSPHATE

S u m m a r y

A method of preparation of crystalline calcium D-glyceraldehyde-3-phosphate (of 83 per cent purity) has been described. The method is based on the oxidation of D-fructose-1,6-diphosphate by periodic acid.

As the by-product the pure barium salt of phosphoglycolate was obtained.

D-glyceraldehyde-3-phosphate was also obtained by oxidation of D-fructose-6-phosphate by the similar method.

Otrzymano 22.11.1960

R. KRAUZE, **K. NAIMSKI** and K. ZAKRZEWSKI

ISOLATION OF γ -GLOBULINS BY MEANS OF ZINC AND ALUMINIUM SALTS

*The Research Laboratory, Serum and Vaccine Production Board, and
The Department of Biochemistry, Institute of Haematology, Warsaw*

The methods employed for isolation of γ -globulin on both laboratory and industrial scale are commonly based on the ethanol fractionation elaborated by Cohn [5] and modified by several authors [cf. 8]. The application of organic solvents for protein fractionations has several drawbacks, and a number of attempts have been made to fractionate serum by making use of specific interaction of metal ions with proteins [7]. Cohn [6 and cf. 13] using zinc salt separated plasma proteins into two fractions, one of which contained γ -globulins, fibrinogen and part of β -globulins; further purification of individual proteins from this fraction has not been described. Rejnek & Skvaril [11, 12] isolated γ -globulins with zinc and aluminium after preliminary fractionation of serum by means of Cohn's Method 6, with a satisfactory yield. Lewin [10] purified human γ -globulins by removal of other proteins with aluminium; γ -globulins could have been precipitated with ethanol eventually.

The studies presented below had in view designing a simple method for isolation of human serum γ -globulin by use of zinc and aluminium salts, without employing organic solvents.

MATERIALS AND METHODS

Serum frozen at -20° was used for the experiments; the serum was obtained from pooled human placental blood.

All fractionations and centrifugations were performed in the cold room at 0° to 4° ; all reagents were pre-cooled to about 4° before use. For equilibration, 18 - 24 hours were allowed after mixing the reagents with protein solution and prior to centrifugation.

Serum was adjusted to the required protein concentration with 0.15M-sodium chloride brought to pH 7.4 with NaOH.

Zinc acetate was added as 0.5 M-solution adjusted to pH 6.5 with NaOH. Ammonium aluminium sulfate dissolved in water was added to protein solution in proportion 1 : 1; the concentration of aluminium was adjusted prior to mixing with protein. pH of final mixture of protein and precipitating agent was adjusted with 1 M-NaOH or 1 M-HCl. Ionic strength of final mixture of protein and precipitating agent was adjusted with appropriate NaCl solution unless otherwise indicated. Metal ions were removed from solutions and suspensions by means of Escarbo, sulfonated-coal cation exchanger.

Nitrogen was determined by micro-Kjeldahl method; non-protein nitrogen was determined after precipitation of proteins by trichloroacetic acid 10%. In several experiments, proteins were determined spectrophotometrically at 560 m μ by biuret method, essentially after Kingsley [9]. pH was determined with a glass electrode at room temperature.

Moving boundary electrophoresis was carried out in Fokal F apparatus, using white light, at 2°. Prior to electrophoresis, all solutions were exhaustively dialyzed in cold against veronal buffer, pH 8.6, ionic strength 0.1.

For the experiments in which the distribution of zinc was studied, to the zinc solution was added a small amount of Zn-65 (as zinc chloride). The radioactivity of solutions was determined after drying a small sample on a planchette; an end window Geiger-Muller counter and a decade scaler were employed for counting.

RESULTS

Fractionation with zinc

1st variable: zinc concentration (protein concentration, pH and ionic strength constant). When ionic strength was kept constant at 0.15, pH at 7.2, protein at 2.3% (w/v), and zinc concentration varied from 1 mM to 25 mM, the amount of precipitated proteins as well as the amount of zinc found in the precipitate increased throughout the investigated range of metal concentration (Fig. 1).

The precipitates formed were separated, then dissolved using the minimum quantity of 0.05 M-sodium citrate, dialyzed against distilled water for one day and then against veronal buffer pH 8.6, ionic strength 0.1. The solutions were analysed in moving boundary electrophoresis with the results shown in Fig. 2. The γ -globulins are quantitatively precipitated at about 6 mM-Zn²⁺ while the precipitation of α - and β -globulins approaches completion only around 25 mM-Zn²⁺. The amount of albumin precipitated increases linearly with increasing zinc concentration.

When zinc was added to the solution of purified γ -globulin (pH 7.2,

ionic strength 0.1, protein 1%), quantitative precipitation occurred beginning at about 6 mM- Zn^{2+} , as indicated in Fig. 3.

2nd variable: protein concentration (zinc concentration, pH and ionic strength kept constant). When only protein concentration is varied,

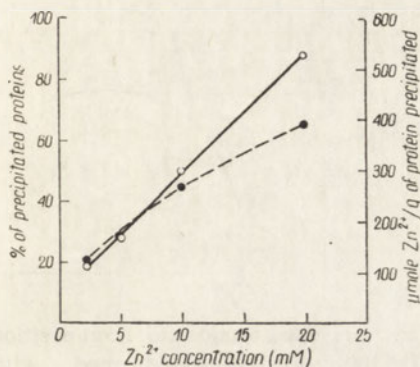


Fig. 1. Precipitation of protein by increasing zinc concentration, pH 7.2, ionic strength 0.15, protein concentration 2.3%. Broken line: % precipitated protein. Solid line: μ mole Zn^{2+} per g, protein precipitated

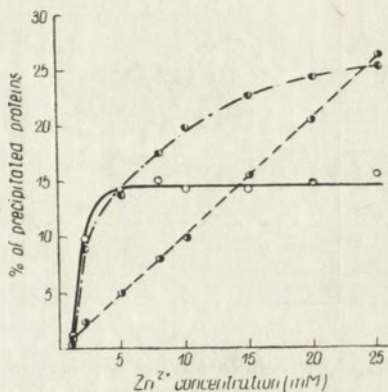


Fig. 2. Electrophoretic composition of the precipitates, formed with various zinc concentrations at pH 7.2, ionic strength 0.15, protein concentration 2.3%. (○-○), γ -globulins; (-○-), α , β -globulins; (-●-), albumin

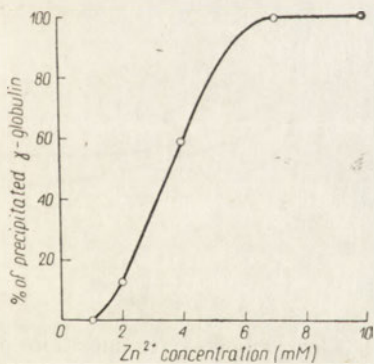


Fig. 3. Precipitation of isolated γ -globulin by increasing zinc concentration at pH 7.2, ionic strength 0.15, γ -globulin concentration 1%

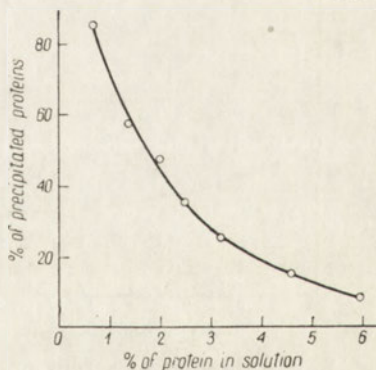


Fig. 4. Precipitation of serum proteins at 10 mM- Zn^{2+} , pH 7.5, ionic strength 0.15 at various protein concentrations

other parameters of fractionation kept constant, (pH 7.5; ionic strength 0.15 and zinc concentration 10 mM), the amount of proteins precipitated decreases with increasing protein: zinc ratio, as seen in Fig. 4.

3rd variable: hydrogen ion concentration (zinc concentration, ionic strength, and protein concentration constant). No precipitate is formed

when pH of the solution is below pH 5.5 (10 mM $-Zn^{2+}$; ionic strength 0.15). The amount of insoluble proteins then increases, reaching a maximum between pH 7 and 8 (see Figs. 5 and 6). The amount of zinc found

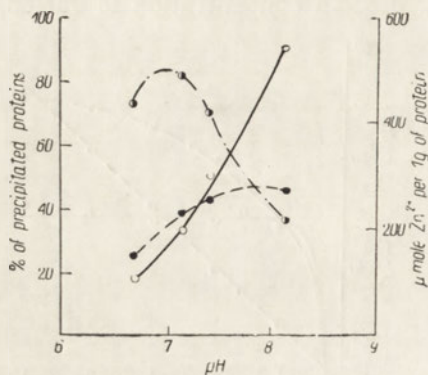


Fig. 5. Precipitation of serum proteins in various pH's by 10 mM $-Zn^{2+}$, at ionic strength 0.15 and protein concentration 2.84%. (●-), protein precipitated; (○-), zinc in the precipitate; (●-), zinc in the supernatant

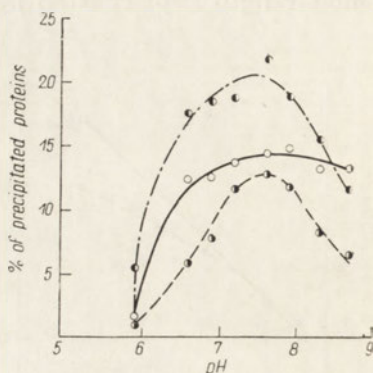


Fig. 6. Electrophoretic composition of the precipitates formed with 10 mM $-Zn^{2+}$, at ionic strength 0.15, protein concentration 2.3% at various pH's. (○-), γ -globulin; (●-), α , β -globulins; (●-), albumin

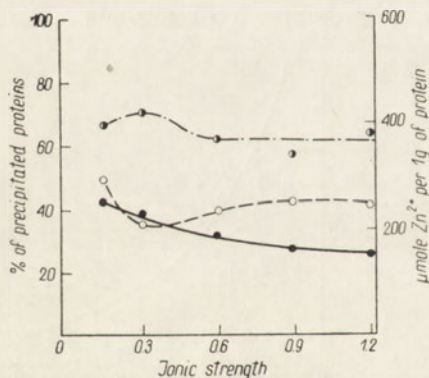


Fig. 7. Precipitation of serum proteins with 10 mM $-Zn^{2+}$, at pH 7.6, protein concentration 3.6%, at various ionic strengths (●-), % protein precipitated; (○-), zinc in the precipitate; (●-), zinc in the supernatant

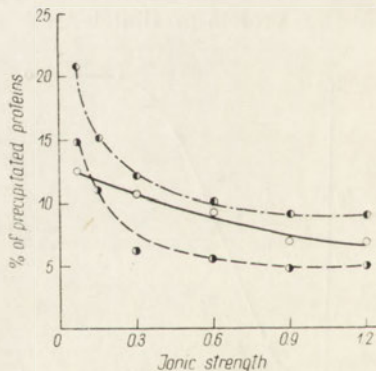


Fig. 8. Electrophoretic composition of protein precipitates formed with 10 mM $-Zn^{2+}$, at pH 7.6, protein concentration 3.6% at various ionic strengths. (○-), γ -globulin; (●-), α , β -globulins; (●-), albumin

in the precipitate increases with increasing pH, but the amount of zinc in the supernatant drops down sharply beyond pH 7.2 (Fig. 5).

The results of electrophoretic examination of protein precipitates formed with 10 mM $-Zn^{2+}$ at various pH's are shown in Fig. 6. A marked

zone of optimum precipitation of albumins and α - + β -globulins has been found between pH 7 and 8. At pH's lower than 7, the solubility of γ -globulin decreases also sharply, but on the alkaline side, their tendency to dissolve is much less marked.

4th variable: ionic strength (protein concentration, pH, and zinc constant). The increase of ionic strength leads to a decrease of the amount of protein precipitated (cf. Figs. 7 and 8), but it is not correlated with the amount of zinc present in the precipitate (Fig. 7). When sodium acetate was used instead of sodium chloride for adjusting the ionic strength, the results were essentially similar.

The electrophoretic analysis of the precipitates formed is shown in Fig. 8. The albumin and the α - and β -globulins become solubilized by increasing ionic strength, but γ -globulin less strongly so. In sodium acetate this difference was somewhat more marked.

Fractionation with aluminium

The conditions for fractionation with aluminium salts were investigated using a dissolved precipitate of serum proteins obtained at 10 mM- Zn^{2+} , 0.1 ionic strength, 2.5% protein, pH 7.2. The precipitates were

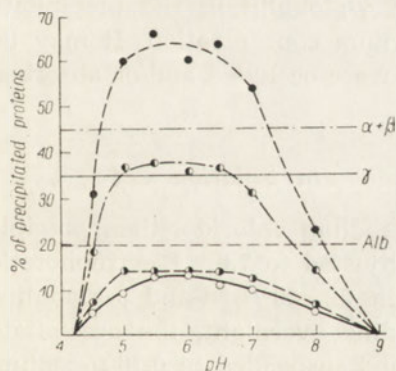


Fig. 9. Precipitation of serum proteins at various pH's with 20 mM-aluminium salt, at 1.23% protein concentration. (—●—), total protein; (—○—), γ -globulin; (—●—), α , β -globulins; (—○—), albumin. Horizontal lines show the percentage of appropriate fraction in the initial protein solution

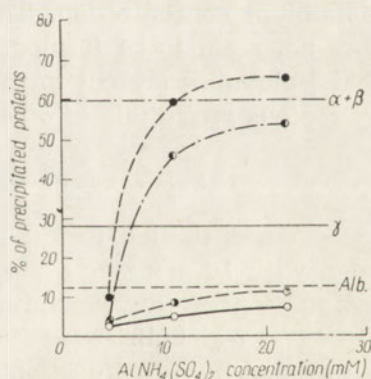


Fig. 10. Precipitation of serum proteins by various concentrations of aluminium salt at pH 7.0 and protein concentration 1.23%. (—●—), total protein; (—○—) γ -globulin; (—●—), α , β -globulins; (—○—), albumin. Horizontal lines show the percentage of appropriate fraction in initial protein solution

suspended in 0.16 M-sodium chloride, treated batchwise with cation exchanger in Na^+ cycle, in order to remove zinc and to dissolve proteins.

1st variable: hydrogen ion concentration (protein concentration and

aluminium concentration constant). The mixture of protein and aluminium-ammonium sulfate was adjusted to pH's indicated in Fig. 9. The final concentration of proteins was 1.23%, and that of aluminium salt 20 mM. A scanty precipitate which formed at pH 4.2 increased sharply with increasing aluminium concentration and reached the maximum at pH 5.5. No precipitate was formed at pH 9 and above (cf. Fig. 9).

The precipitates formed were dissolved in minimum quantity of 0.5 M-sodium citrate, dialyzed overnight against distilled water and then exhaustively against veronal buffer pH 8.6, strength 0.1. A small amount of denaturated protein was removed by centrifugation, and the supernatant analysed in electrophoresis. The results are shown in Fig. 9. It can be seen that an extensive precipitation of albumin and of α - and β -globulins occur in the range pH 5 - 6.5, while the protein of a mobility similar to γ -globulin present in the precipitate forms a small proportion of total γ -globulin.

2nd variable: aluminium concentration (protein concentration, pH constant). The concentration of aluminium was varied between 2 and 30 mM, while pH was 7.0, and the protein concentration maintained at 1.23%. From Fig. 10 it may be seen that the precipitation of albumin and of albumin and of α - and β -globulins is markedly dependent upon aluminium concentration. The amount of γ -globulin in the precipitate does not seem to be influenced by aluminium concentration. It may be that γ -globulins present in the precipitate were occluded and/or absorbed by copious precipitate of other proteins.

Suggested procedure for γ -globulin isolation

Serum is diluted to 3% protein with sodium chloride, then precipitated with 10 mM-zinc acetate, and pH adjusted to 7.6. Electrophoretic composition of this precipitate is: albumin 22 - 30%, α - and β -globulins 41 - 46%, γ -globulin 29 - 36%. After standing overnight, the precipitate is removed by centrifugation at 0° to 4° and suspended in 0.16 M-sodium chloride. The cation exchanger in Na⁺ cycle is added and the mixture stirred for an hour in cold. A slight drop of pH, to about 6.5 occurs, presumably due to incomplete saturation of the resin with sodium ion, and it helps in removing zinc completely. The supernatant is collected by decantation or centrifugation; its protein content is about 3%. The solution is then treated with equal volume of ammonium-aluminium sulfate so as to yield the final mixture 1.5% in protein and 0.5% in aluminium salt; pH is adjusted to 5.5 with NaOH. A copious precipitate forms, which is removed by centrifugation in cold after a few hours of standing in cold. The supernatant is then clarified by filtration through Seitz-filter pads. Zinc acetate is added to final concentration 1 mM in

Zn^{2+} and pH is adjusted to 7.6 with NaOH. The mixture is left overnight, and then the precipitate of γ -globulin removed by centrifugation.

γ -globulins are suspended in 0.16 M-NaCl, treated with small quantity of cation exchanger in Na^+ cycle for one hour, and then filtered through Seitz EK-filter pads for sterilization. If needed, the resin may be removed before filtration, glycine and a preservative (merthiolate, tricresol) added and the solution sterilized by filtration. The 10-15% concentration of γ -globulin in the final solution may easily be achieved, even though losses at these high concentrations become larger.

DISCUSSION

The described procedure for the isolation of γ -globulin is composed of three parts: in the first step a preparation of serum proteins enriched in γ -globulin is obtained by fractionation with zinc, and then, in the second step, the ballast proteins are removed by aluminium and a pure solution of γ -globulins is obtained. The third step consists of concentration of γ -globulin by zinc precipitation. Attempts at employing aluminium fractionation alone were unsuccessful; both the total yield of γ -globulin, and their purity were considerably decreased.

Fractionation with zinc becomes efficient only at pH 7 or above. On the basis of the experiments presented above, it would appear that fractionation at higher pH (above 8) would yield a more purified product, as a result of an increased difference in the solubility of γ -globulins and other serum proteins. This advantage is, however, offset by the difficulty in centrifugation of the precipitates formed at higher pH's.

When the pH of the solution in which fractionation with zinc takes place is increased, the binding capacity of precipitated proteins for zinc appears to increase; also the binding capacity for zinc appears to be increasing with increasing concentration of zinc. The data shown in Fig. 5 indicate that these phenomena may rather be due to the precipitation of insoluble zinc hydroxide than to a true binding of zinc by proteins.

The rather abrupt changes in the solubility of serum proteins at pH's above 7, and the solubility characteristics of zinc hydroxide strongly point to the fact that an interaction between proteins and zinc hydroxide, rather than free Zn^{2+} ion is the main factor in the described process of fractionation. The fractionation by aluminium is almost certainly a process of absorption on the proteins on insoluble aluminium hydroxide.

The purity of the final preparation of γ -globulin compares favourably with that of the preparation obtained by the use of organic solvent fractionation. An electrophoretic pattern of a typical preparation is

shown in Fig. 11; in some preparations a component of a mobility corresponding to that of α_1 -globulins could be observed but never amounted to more than 1-2% of total proteins. The heterogeneity constant of several preparations, as calculated by the methods of Alberty

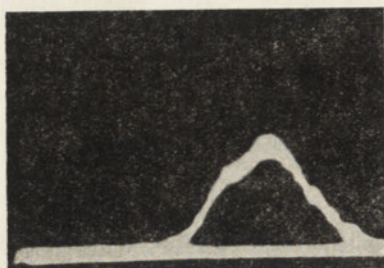


Fig. 11. Electrophoretic pattern of human serum γ -globulin purified by zinc and aluminium salt fractionation. Veronal buffer pH 8.6, ionic strength 0.1; 22.5 mA; 5085 sec.

[1] at pH 7.2, ionic strength 0.1, was 0.991 ± 0.022 S. D. $\times 10^{-5}$. The heterogeneity constant for ethanol fractionated human γ_1 -globulin at pH 5.4 was $0.26 \cdot 10^{-5}$ and of its pseudo-globulin component $0.9 \cdot 10^{-5}$; for human γ_2 -globulin at pH 7.2 the heterogeneity constant was $0.9 - 1.2 \cdot 10^{-5}$ [3] and for bovine γ -globulin isolated by electrophoresis-convection method [4] at pH 6.5 it was $0.67 \cdot 10^{-5}$ [2].

The γ -globulin preparation obtained contained agglutinins against pertussis and typhoid, antibodies against influenza, haemagglutinins and diphtheria antitoxin. The latter determined by the Ramon intracutaneous rabbit test exhibited 1.6 to 4.0 units per 1 ml. of 10% γ -globulin solution, in several preparations; this indicates that the antitoxin has been concentrated 10 - 25 times relative to the native serum employed.

SUMMARY

The method described for isolating human γ -globulins is composed of three steps: 1) obtaining a protein preparation enriched in γ -globulins by zinc fractionation, 2) removal of ballast proteins by aluminium fractionation, 3) final concentration of γ -globulins by zinc fractionation.

The four following parameters were varied independently for studying fractionation by means of zinc: zinc concentration, protein concentration, pH and ionic strength.

The following two parameters were varied independently for studying fractionation by means of aluminium: aluminium concentration and pH.

REFERENCES

- [1] Alberty R. A., *J. Am. Chem. Soc.* **70**, 1675, 1948.
- [2] Alberty R. A., in *The Proteins*, Vol. 1, Part A (Ed. by H. Neurath and K. Bailey), Academic Press Inc., New York, 1953.
- [3] Anderson E. A. & Alberty R. A., *J. Phys. Coll. Chem.* **52**, 1345, 1948.
- [4] Cann J. R., Brown R. A. & Kirkwood J. G., *J. Biol. Chem.* **181**, 161, 1949.
- [5] Cohn E. J., Strong L. E., Hughes W. L. Jr., Mulford D. J., Ashworth J., Melin M. & Taylor H. L., *J. Am. Chem. Soc.* **60**, 1598, 1946.
- [6] Cohn E. J., Tullis J. L. & Surgenor D. M., *Science* **114**, 479, 1951.
- [7] Cohn E. J. in *Chemical Specificity in Biological Interactions* (Ed. by F. R. Gurd), Academic Press Inc., New York, 1954.
- [8] Hughes W. L., in *The Proteins*, Vol. 2, Part B. (Ed. by H. Neurath and K. Bailey), Academic Press Inc., New York, 1953.
- [9] Kingsley G. R., *J. Lab. Clin. Med.* **29**, 438, 1944.
- [10] Lewin J., *Therapie* **9**, 523, 1954.
- [11] Rejnek J. & Skvaril F., *Coll. Czechoslov. Chem. Comm.* **22**, 1489, 1957.
- [12] Rejnek J. & Skvaril F., *Coll. Czechoslov. Chem. Comm.* **23**, 773, 1958.
- [13] Strässle P., *Experientia* **9**, 242, 1953.

WYODRĘBNIANIE γ -GLOBULIN PRZY POMOCY FRACJONOWANIA
SOLAMI CYNKU I GLINU

Streszczenie

Opisana metoda wyodrębniania γ -globulin z surowicy ludzkiej składa się z trzech etapów: 1) otrzymanie preparatu wzbogaconego w γ -globulinę przy pomocy frakcjonowania solami cynku; 2) usunięcie białek balastowych przy pomocy frakcjonowania solami glinu; 3) ostateczne wyodrębnienie γ -globulin z roztworu przy pomocy frakcjonowania solami cynku.

Frakcjonowanie solami cynku przebadano w układzie czterech niezależnych zmiennych: stężenie soli cynku, stężenie białka, pH i siła jonowa.

Frakcjonowanie solami glinu przebadano w układzie dwóch niezależnych zmiennych: stężenie soli glinu i pH.

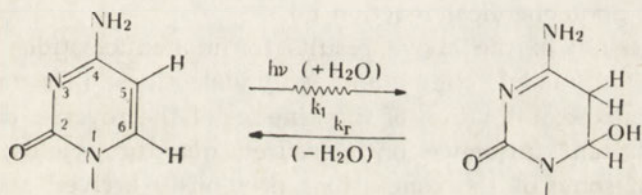
Otrzymano 6.12.1960

K. L. WIERZCHOWSKI and D. SHUGAR

PHOTOCHEMISTRY OF CYTOSINE NUCLEOSIDES AND NUCLEOTIDES. II*

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

Evidence has previously been presented to show that the initial photoproducts resulting from the ultraviolet (2537 Å) irradiation of cytosine and its N-glycosides are the 5-hydro-6-hydroxy derivatives [17, 25, 21, 20, 18], resulting from the uptake of a water molecule at the 5,6 double bond as in the case of uracil and its N-alkylated derivatives and N-glycosides [15, 23, 16, 14, 20].



The photoproducts of the latter exhibit only end absorption in the quartz ultraviolet. By contrast the photoproducts of the N-glycosides of cytosine exhibit a new absorption band in the neighbourhood of 2400 Å. For cytosine and 1-methylcytosine no such clearly defined band appears as a result of irradiation, and this difference in behaviour was ascribed to some type of interaction between the pyrimidine and carbohydrate rings in the glycosides [25].

Additional evidence for such interaction was based on quantum yield measurements at different pH values for the various isomeric nucleotides. However, the quantum yields calculated at that time were "effective" quantum yields, no account being taken of the instability of the photoproducts. For, unlike the initial photoproducts of uracil glycosides, which are reasonably stable at neutral pH at room temperature, those of cytosine

* Part I, [25].

and its glycosides are relatively unstable and tend to revert spontaneously to the parent compounds in the dark even at room temperature [17, 25, 21, 20]. As a result an equilibrium is established between the forward (photochemical) and reverse (dark, thermal) reactions. If C_0 is the initial concentration of the cytosine glycoside, C_e the concentration at equilibrium, k_1 and k_r the rates of the forward and reverse reactions, then

$$k_r(C_0 - C_e) = k_1 I_0 \alpha C_e,$$

where α is a proportionality constant for the amount of light absorbed by C_e , whence

$$C_e = \frac{k_r C_0}{k_1 I_0 \alpha - k_r}$$

assuming, of course, that the photoproduct itself is radiation resistant (see below). Since k_r is the rate constant for a thermal reaction, the equilibrium point is a function of I_0 and temperature. The value of k_r is also pH dependent and, at markedly alkaline pH, is so high, as will be shown below, that quantum yield measurements require the exercise of special precautions. Furthermore, we have found that, for such compounds as d-pC and d-pCp¹, the rate of the reverse reaction is so high by comparison with the quantum yield, even at neutral pH, that irradiation on a hot summer day requires fairly high radiation doses to make the photochemical reaction go.

The extension of the above results for mononucleotides to the photochemistry of model oligo- and polynucleotides [27] indicated the necessity of a re-examination of the kinetics of the reverse, dark, reaction and the resultant influence on measured quantum yields; as well as a revision of some of the conclusions previously arrived at with regard to these.

In the interim a paper appeared by Wang [22], in which it was postulated that the photoproducts of cytosine and its glycosides are not the 5-hydro-6-hydroxy derivatives, but rather tautomers in which the proton on the N₁ nitrogen has been shifted to position 5 with the accompanying shift of the 5, 6 double bond to N₁, C₆. The assumptions on which this conclusion was based are, in our opinion, of doubtful validity, but we shall deal here with only two of them which are most relevant: (a) In formulating the reaction sequence for photoproduct formation, as well as the structure of the photoproducts, Wang implies explicitly that these will be of identical form for cytosine as well as its glycosides. His own formulation, however, excludes such a possibility

¹ The following symbols will be used in this text: C stands for cytidine, Cp is cytidine-3'-phosphate, pC is cytidine-5'-phosphate; whereas a prefix d-refers to the corresponding deoxy compound; Cp! is cytidine-2':3'-cyclic phosphate; U is uridine; Φ is quantum yield in moles/einstein.

since it requires that the N_1 position on the pyrimidine ring be unsubstituted whereas, in fact, in the glycosides it is. It is also contrary to the observation [25] that cytosine and 1-methylcytosine exhibit identical photochemical behaviour. (b) According to Wang the new maximum at 2400 Å exhibited by the photoproducts of cytosine glycosides is not shown by dihydropyrimidines; hence the photoproducts cannot be 5-hydro-6-hydroxy derivatives, since these also possess a saturated 5, 6 double bond. This argument is based on an unwarranted generalization of the finding of Batt *et al.* [1] that the dihydropyrimidines of 2,4-dioxypyrimidines exhibit no selective absorption in the quartz ultraviolet at neutral pH. It would, on the other hand, certainly not be expected to apply to cytosine analogues since, following saturation of the 5, 6 double bond of these latter, there is still conjugation between the 2-keto and the 3, 4 double bonds, which would be expected to possess selective absorption in the ultraviolet. We have, indeed, shown that dihydrocytosine analogues do exhibit a maximum in the neighbourhood of 2400 Å [9] and this provides further evidence that the photoproducts of cytosine glycosides are, in fact, the 5-hydro-6-hydroxy derivatives².

It must nonetheless be admitted, in agreement with Wang [22], that the nature of the photoproducts of cytosine and 1-methylcytosine is by no means as clearly established as for the N-glycosides, and we have examined this question further.

Materials

Most of the compounds employed are those previously referred to [18, 25]. We are grateful to Dr. A. M. Michelson for a gift of samples of d-Cp and d-pCp; cytidine-2'(3'), 5'-diphosphate was prepared as described by Hall & Khorana [6], but using Cp as starting material; attempts to separate the two isomers on ion-exchange columns were unsuccessful. Cp! was prepared by a method elsewhere described [19]. Glass distilled water was used throughout and the heavy water was 99.98% in D₂O.

Methods

These are essentially the same as in previous studies [25, 27]. The irradiation source was a British Thermal Syndicate resonance lamp and irradiation was carried out in spectrophotometer cuvettes. The radiation

² This, is of course, not based on direct chemical evidence since the photoproducts of cytosine glycosides are too unstable to isolate. It is, therefore, theoretically possible that the photoproducts are the 5-hydroxy-6-hydro derivatives. But this appears unlikely since 5-substituted cytosine analogues do not form reversible photoproducts of the type hitherto discussed [26].

was filtered through a 5 mm. layer of aqueous acetic acid (1:1) to remove wavelengths below 2300 Å and the radiation incident on the cuvettes was in the range $2.5 - 6.5 \times 10^{-7}$ einsteins/cm²/min. The special compartment of the Hilger Uvispek was used for maintaining solutions at any desired temperature removed from ambient, during or subsequent to irradiation, by circulating water from a Hoeppler ultrathermostat. Measurements of pH were carried out with the glass electrode, using a Radiometer pH meter; measurements of pH, or rather pD, in heavy water were corrected as described by Hart [7] and Mikkelsen & Nielsen [13] so that $pD = \text{apparent pH} + 0.4$.

RESULTS

Cytosine glycosides

In order to obtain the absorption spectra of the photoproducts of isomeric cytosine nucleotides, each was irradiated in 0.02 M-phosphate buffer pH 7 at a temperature of 6-8°, in order to inhibit the reverse reaction. The results for Cp are shown in Fig. 1(A), where curve *a* is that

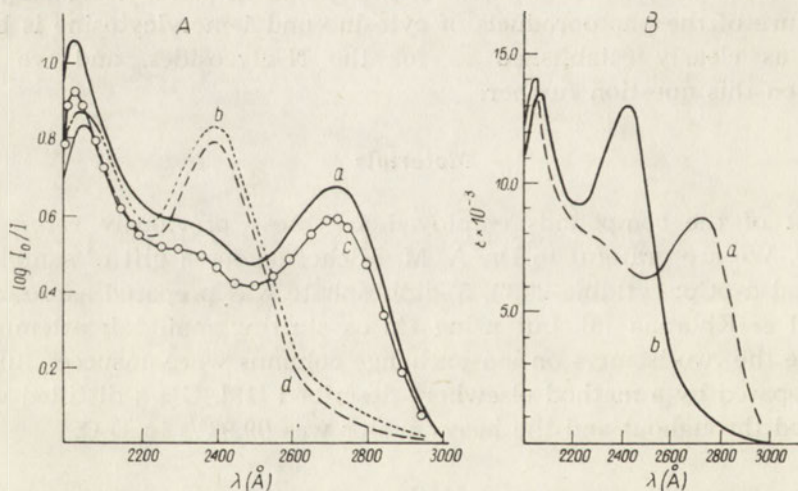


Fig. 1(A) Photochemical transformation of Cp in 0.02 M-phosphate buffer pH 7 at 6-8° and an incident light intensity (2537 Å) of $2.6 \cdot 10^{-7}$ einstein cm²/min.: (a) Prior to irradiation, (b) Following attainment of photochemical equilibrium, (d) Absorption spectrum of photoproduct deduced from curve b, (c) Spectrum obtained following completion of reverse, dark, reaction.

Fig. 1(B) Absorption spectrum of Cp (curve *a*) and of its photoproduct (curve *b*).

of Cp, curve *b* is that for Cp and its photoproduct at equilibrium, and curve *c* after warming the solution so that the reverse reaction was carried to completion. Curve *d* is the calculated spectrum of

the photoproduct obtained from curve *b*, the absorption of which in the neighbourhood of 2700 Å indicates that 6% of the Cp has not reacted. From the difference between curves *a* and *c* it follows that 13% of the Cp has reacted irreversibly. The overall percentage of reversibility is nonetheless quite high. The reverse reaction is quantitative so that curve

Table 1

Spectral constants for several isomeric cytosine nucleotides and their photoproducts

	Nucleotide		Photoproduct			
	λ_{\max} (Å)	ϵ_{\max} ($\times 10^{-3}$)	λ_{\max} (Å)	ϵ_{\max} ($\times 10^{-3}$)	λ (Å)	ϵ ($\times 10^{-3}$)
C2'p	2710	8.6*	2400	12.5	2710	1.4
Cp	2710	8.9*	2400	13.0	2710	1.5
pC	2710	7.3*	2400	10.3	2710	1.2
d-pC	2710	8.6	2400	11.3	2710	1.4

* Values taken from table of California Foundation for Biochemical Research.

d corresponds to curve *c* decreased by 6%. The extinction coefficient of the photoproduct may therefore be calculated from that for Cp, and Fig. I(B) exhibits the absorption spectrum of Cp and its photoproduct Cp.H₂O.

Table 2

Initial quantum yields and rate constants for cytosine N-glycosides
10⁻⁴ M solutions in 0.02 M-phosphate buffer, pH 7

Compound	$\Phi \cdot 10^{-3}$		$k \cdot 10^{-5}$ (sec. ⁻¹)
	Temp. 22° $I_0 = 6.5 \cdot 10^{-7}$ (einsteins/cm. ² /min.)	Temp. 6-8° $I_0 = 2.7 \cdot 10^{-7}$ (einsteins/cm. ² /min.)	
Cytidine	10.8	—	—
Glucopyranosylcytosine	14.3	—	—
C2' p	13.2	13.0	1.3
Cp	13.3	13.5	1.5
pC	9.2	8.8	0.6
pCp (2', 5'; 3', 5')	10.2	—	—
Deoxycytidine	7.4	—	—
d-Cp	10.6	—	—
d-pC	3.0	3.1	0.2
d-pCp	3.4	—	—

For the other isomeric nucleotides the photoproduct spectra differ only with respect to the values of the extinction coefficients, which are presented in Table 1.

Calculations of the quantum yields for the various nucleosides and nucleotides required elimination of the influence of the reverse reaction. This condition was approximated in two different ways: (a) by increasing the intensity of the incident radiation to the point where the rate of the photochemical reaction was considerably greater than that of the reverse reaction (at room temperature); (b) by taking advantage of the relatively high temperature coefficient of the reverse reaction (see below), the latter being sufficiently slow at 6-8° so that it exerts only a minimal effect on the kinetics of the photochemical reaction.

At pH values not markedly alkaline, quantum yield values obtained by both procedures differed at most by only 2-3% from the mean (see Table 2), which is within the limits of experimental error. The photo-

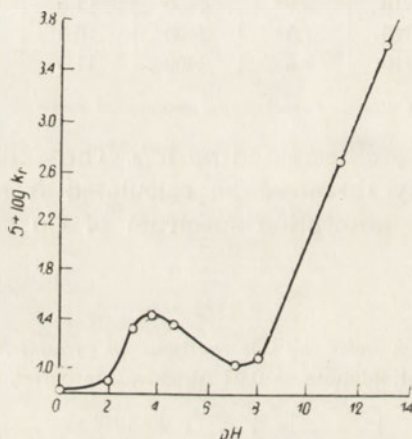


Fig. 2. First order rate constants for the dark reaction $C \cdot H_2O \rightarrow C$ at 25° as a function of pH

chemical reaction was also found to be first order, with constant quantum yield, up to the point where the reverse reaction began to interfere with the measurements.

At pH values to the alkaline side of 10 the situation is quite different. Under these conditions the rate of the reverse reaction is so high for all cytosine glycosides as to appreciably affect quantum yield calculations. For all compounds the reverse reaction is strictly first-order and the dependence of the 1st-order rate constant on pH is quantitatively similar to that illustrated for cytidine in Fig. 2.

An examination of the rate constants at neutral pH for nucleosides and nucleotides showed that the values for the former were all similar. By contrast the values of k_r for the nucleotides were found to be dependent on the position of esterification, the 5'-nucleotides exhibiting

the highest values. Since at pH 7 the secondary phosphate hydroxyls are only partially dissociated ($pK \approx 6$), rate constants were also measured at pH 8.1, where they are fully dissociated. Table 3 lists the rate constants at 25° for all nucleosides and nucleotides at pH 2, 7 and 8.1. We shall revert to these in the Discussion (below).

Table 3

Rate constants at 25° for reverse reaction of photoproducts of cytosine analogues, i.e. for elimination of water molecule

Photoproduct	pH 2	pH 7	pH 8.1
	k_r (sec. ⁻¹ · 10 ⁴)		
Cytidine	0.77	1.10 (1.4)	1.25
Glucopyranosylcytosine	—	1.50	—
C ₂ ' p	1.76	4.00	0.64
Cp	0.74	1.00	0.64
pC!	1.27	6.50	0.83
pCp pC ₂ ' p	1.90	4.60	1.40
Cp!	—	6.30	0.85
2'3'-isoprop. cytidine	—	1.20	0.96
Deoxycytidine	0.94	1.70	1.48
d-Cp	0.94	1.34	1.83
d-pC	1.60	5.50	1.06
d-pCp	1.63	5.00	2.30

Ionic strength of medium: In view of the importance of the ionic strength of the medium on the behaviour of cytosine and 1-methylcytosine (see below) this effect was examined in the case of cytidine, but was found to be relatively small. Addition of 0.1 M-NaCl at pH 7 resulted in an increase in the rate of the reverse reaction of only 30%. This effect may, however, be of some significance because of the reported effect of salt concentration on the photoreactivation of microorganisms [11].

Activation energy of reverse reaction: The rate of the reverse reaction for Cp at neutral pH was measured at three different temperatures, 25, 30 and 50°. The rates were found to fit an Arrhenius plot with a Q_{10} of 2.6 and an activation energy of 15.5 kcal/mole; this is to be compared with a value of 15 kcal/mole which we have calculated from the data of Sinsheimer [21]. Although none of the other isomers were examined, it is most likely that they would all exhibit similar activation energies. The application of such measurements to the behaviour of model oligonucleotides has already been demonstrated elsewhere [27].

Cytosine and 1-methylcytosine

It has previously been pointed out that the photochemical behaviour of both these compounds is similar, but differs appreciably from that for the corresponding glycosides [25]. Since then we have found that the dihydroderivatives of *all* of these compounds exhibit one selective absorption band in the ultraviolet at about 2400 Å [9]. Hence both cytosine and 1-methylcytosine might also be expected, on irradiation, to exhibit this maximum simultaneously with disappearance of the main maximum at 2670 Å.

In unbuffered medium one can, indeed, observe an increase in absorption at 2400 Å for both compounds, but without formation of a clearly defined maximum (Fig. 3). Upon removal of the irradiation source, the reverse reaction is placed in evidence by a decrease in absorp-

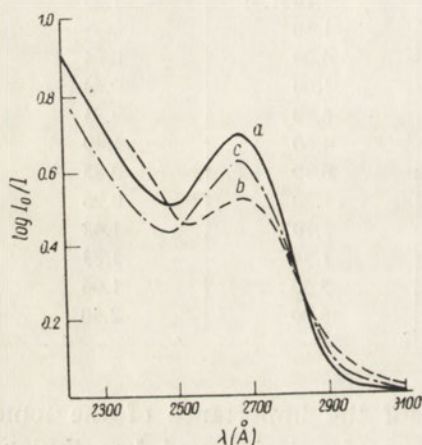


Fig. 3. Photochemical transformation of cytosine in aqueous, unbuffered, medium at pH 7: (a) Prior to irradiation, (b) Following 90 mins. irradiation at room temp. and intensity of $3 \cdot 10^{-7}$ einsteins/cm.²/min. (c) Following completion of the reverse reaction by heating at neutral pH

tion at 2400 Å and a concomitant increase at 2670 Å, until finally the ratio of extinction at 2670 to that at 2400 Å is identical with that for the parent compound. The reverse reaction is strictly first-order with a rate constant at room temperature of 1.6×10^{-1} sec.⁻¹ so that $t^{1/2}$ is 72 mins. This is sufficiently slow so that quantum yields may be calculated directly from the decrease in absorption, the values being the same for both substances at 2×10^{-3} , hence quite low.

An attempt was made to place more clearly in evidence the increase in absorption at 2400 Å by irradiation at a temperature 6–8°. No difference could, however, be found, a result that might have been anticipated from the fact that $t^{1/2}$ at room temperature is so high.

The degree of reversibility is dependent on the extent of photoproduct formation. Following 25% photolysis, reversibility is about 60%. It is even higher for smaller doses but, following 80% photolysis no reversibility can be observed.

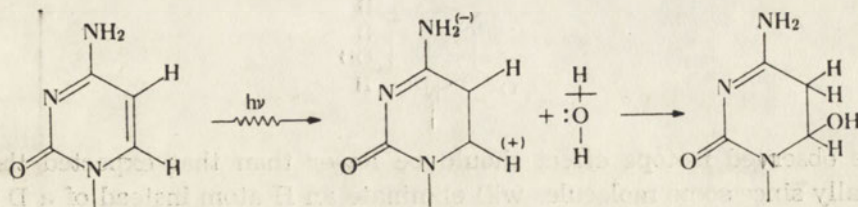
In the presence of 0.02 M-phosphate buffer at the same pH, the quantum yield decreases about 35%. Following 10% photolysis some reversibility may still be observed (about 50%), but beyond this point it decreases rapidly and the irradiation products exhibit appreciable absorption in the wavelength range 2800 - 3000 Å (cf Fig. 3). There is consequently more than one photochemical reaction involved. In addition, the reverse reaction in buffered medium is much more rapid, the rate constant being $10^{-3} \text{ sec.}^{-1}$, corresponding to a $t^{1/2}$ of only 10 mins., this probably being the reason for the decrease in measured quantum yield referred to above.

That the buffer effect is due purely to the influence of the ionic strength of the medium was demonstrated by addition of NaCl to a concentration of 0.1 M. Under these conditions no reversibility could be observed even after small irradiation doses. It should be recalled that, for cytidine, a similar increase in ionic strength of the medium resulted in an increase in the rate of the reverse reaction of only 30%.

While it appears from the above fairly well established that cytosine and 1-methylcytosine give rise to reversible photoproducts, it is also quite clear that this is not the only reaction resulting from irradiation. It is conceivable that the radiation itself provokes *partial* reversibility. Another possibility is that the reversible photoproduct is slightly more photosensitive than the parent compound so that an equilibrium is established between the formation of reversible photoproduct and its destruction. On the other hand, the lack of reversibility after high irradiation doses implies the formation of non-reversible photoproducts. This problem requires further study, but it should be noted that cytosine and 1-methylcytosine likewise differ in photochemical behaviour from the glycosides in non-aqueous medium, as well as in aqueous medium at pH 9 [28].

Isotope effect for reverse reaction

It was previously shown that the isotope effect for photochemically induced nucleophilic addition of a water molecule to the 5,6 double bonds of uracil and cytosine analogous is $k_{\text{H}_2\text{O}}/k_{\text{D}_2\text{O}} = 2.2$, in accordance with expectations [25], if the reaction is as follows:



since opening of the D-O bond requires a higher activation energy than does the H-O bond [24].

The isotope effect for the reverse reaction is, on the other hand, more complex than previously assumed since it must involve not only dissociation of the C-H (or C-D) bond at position 5 of the photoproduct, but also the effect of the acid-base properties of the light or heavy water, in which the elimination reaction is carried out, on the rate of a reaction catalyzed by hydrogen or hydroxyl ions.

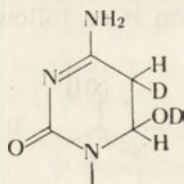
A separation of these two effects for uridine and cytidine has been achieved in the following manner. The photoproduct of each substance was obtained in light and in heavy water and lyophilized. Each photoproduct was then divided into two portions, one of which dissolved in light, the other in heavy, water for measurement of the rates of the reverse reaction. The results are illustrated in Table 4.

Table 4

Isotope effect for elimination of water molecule from photoproducts of uridine and cytidine

Photoproduct	$k_{70^\circ} \cdot 10^4 \text{ (sec}^{-1}\text{)}$	
	in H ₂ O, pH 1.6	in D ₂ O, pD 1.6
U·H ₂ O	7.4	13.4
U·D ₂ O	—	7.1
	$k_{40^\circ} \cdot 10^4 \text{ (sec}^{-1}\text{)}$	
	in H ₂ O, pH 1.6	in D ₂ O, pD 1.6
C·H ₂ O	5.1	1.5
C·D ₂ O	3.4	1.1
	$k_{25^\circ} \cdot 10^4 \text{ (sec}^{-1}\text{)}$	
	in H ₂ O, pH 11.6	in D ₂ O, pD 11.6
C·H ₂ O	84.5	7.8

As will be seen from the Table, the elimination of D₂O from the photoproducts is slower than for elimination of H₂O, as is to be expected for a reaction involving rupture of a C - D, as compared to a C - H, bond. If, however, the photoproduct is as follows in heavy water:

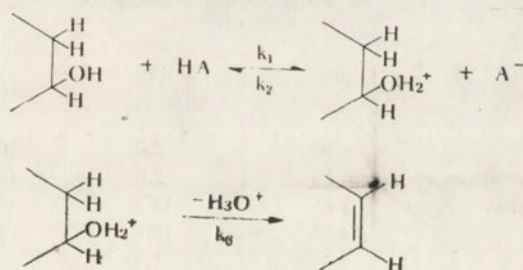


the observed isotope effect should be lower than that expected theoretically since some molecules will eliminate an H atom instead of a D from

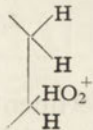
position 5. For cytidine, on the other hand, where the rate of the reverse reaction is appreciable at room temperature, the equilibrium established during irradiation will, in heavy water, lead to the exchange of both H atoms at position 5 for D. The isotope effect for cytidine photoproducts should consequently be greater than for the photoproducts of uridine. Actually the reverse is true, the values being 1.9 for uridine and 1.5 for cytidine.

If we examine now the effect of the medium, it will be seen from Table 4 that the photoproduct of uridine undergoes the elimination reaction faster in heavy water so that k_{D_2O}/k_{H_2O} is 1.8, whereas for the photoproduct of cytidine this ratio is 0.3 under the same conditions and as low as 0.1 in alkali. Consequently, the catalysis mechanism is different for each photoproduct. For reactions catalyzed specifically by H_3O^+ or OH^- the isotope effect $k_{H_2O}/k_{D_2O} < 1$, whereas for general acid-base catalysis this ratio is greater than unity. Hence the elimination reaction for the photoproduct of uridine (and probably for other uracil derivatives) is catalyzed specifically, whereas the reaction for the photoproducts of cytosine derivatives belongs to the class of more general acid and base catalyzed reactions.

By analogy with the scheme presented by Ingold [8] for the monomolecular elimination of water from an aliphatic double bond (mechanism E_1), the reverse reaction would be as follows:



so that for cytosine derivatives $k_3 > k_2$, since only then will $k_{H_2O}/k_{D_2O} > 1$ [2]. By contrast, for uracil derivatives, where the value of k_3 is about 2 orders of magnitude lower than for cytosine analogues, $k_3 < k_2$ and the elimination reaction, which is the slowest, determines the kinetics of the overall process. The concentration of the conjugate

acid  is higher in D_2O than in H_2O since heavy water possesses less

basic properties than light water [2, 24]. The photoproduct therefore competes more effectively for the deuteron in D_2O than for the proton in H_2O so that the reaction is more rapid in heavy, than in light, water.

DISCUSSION

In Part I of this study [25] it was postulated that some type of hydrogen bonding must exist between one of the carbohydrate hydroxyls and the 2-carbonyl of the cytosine ring. This was based on the observed difference in photochemical behaviour between cytosine and 1-methylcytosine on the one hand, and cytosine glycosides on the other. Although it could not be unequivocally established which of the sugar hydroxyls is most involved, the observed low quantum yields for the 5'-nucleotides and the reduced quantum yields for all the glycosides at alkaline pH (where the sugar hydroxyls are known to dissociate [4]), led to the suggestion that the 5'-hydroxyl is probably the one mainly involved.

The results now obtained show that the decreased quantum yields previously observed at alkaline pH (>11) are due largely to the rapid reverse reaction prevailing under these conditions. Hence, although the original suggestion of the involvement of one of the sugar hydroxyls in hydrogen bonding with the 2-carbonyl of the aglycon remains valid, the evidence favouring the 5'-hydroxyl is now seen to lack experimental support.

Table 5

Comparison of amino pK, quantum yields and rate constants for reverse reaction at pH 7.0 and 8.1, at 25° for various cytosine analogues

Compound	pK	$\Phi \times 10^{-3}$	$k_r \times 10^4$ (sec ⁻¹)	
			pH 7.0	pH 8.1
Cytosine	4.60	2.0	10	—
1-methylcytosine	4.55	2.0	10	—
Glucopyranosylcytosine	3.85	14.3	1.5	—
Cytidine	4.1	10.8	1.1	1.25
Deoxycytidine	4.3	7.4	1.7	1.48
C2' p	4.36	13.0	4.0	0.64
Cp	4.28	13.5	1.0	0.64
pC	4.50	9.0	6.5	0.83
pCp 2', 5' and 3', 5'	—	10.2	4.6	1.4
Cp	—	11.5	6.3	0.85
d-Cp	—	10.6	1.3	0.83
d-pC	4.55	3.0	5.5	1.06
d-pCp	—	3.4	5.0	2.30

For purposes of comparison we have assembled some pertinent data in Table 5, from which it will be observed that the quantum yields for nucleosides are markedly dependent on the nature of the carbohydrate moiety, whereas the rates of the reverse reaction are approximately the

same. The decreased quantum yield for deoxycytidine as compared to cytidine is carried over to the corresponding nucleotides. It is even further accentuated as between, e.g. pC and d-pC or Cp and d-Cp, thus hinting at some participation of the phosphate groups themselves in the reaction. If any doubts existed on this score, they are at once dispelled by the marked decrease in the rates of the reverse reaction for most of the nucleotides in going from pH 7 to pH. 8.1, where the only modification resulting from change in pH is an increase in dissociation of the secondary phosphate hydroxyls. It consequently follows that the phosphate hydroxyls influence both the excited state of the cytosine ring, as well as the stability of the resulting photoproduct. In part this interaction is most likely of the dipole-dipole type between the two functional, polar, phosphate and amino groups, such mutual interaction resulting in a modification of the pK values of the two groups, the magnitude of which is dependent on the distance between them as has been shown in the case of amino acids. Both Loring *et al.* [12] and Cavalieri [3] profited from this fact for identification of the *a* and *b* isomers of cytidylic acid, the 3'-isomer being that for which the amino pK is closest to cytidine and the phosphate pK₂ more acid. The data for the 5'-nucleotides are in agreement with this (Table 5) since, according to Furberg [5] the distance between the two functional groups is a minimum in these isomers. This is further supported by the proton magnetic resonance studies of Jardetsky [10], on cytosine nucleotides. By comparison with cytidine the phosphate group in isomeric nucleotides induces only a change in frequency of the protons at positions 5 and 6 of the pyrimidine ring, this frequency shift being maximal for the 5'-nucleotides as compared to a mixture of the 2' and 3' isomers.

The quantum yields for the cytidylic acid isomers lead to the same conclusion, the influence of the phosphate group being most pronounced for the 5'-isomers. It is true that the difference between the quantum yields for Cp and C2'p is not appreciable, but greater stability of the photoproduct of Cp suggests that this difference is real.

The influence of the dissociation of the phosphate group on photoproduct stability may be interpreted in terms of catalysis of the reverse reaction by a potentially dissociable proton. Decreasing the pH from 8.1 to 7.0 reduces the degree of dissociation of the secondary phosphate hydroxyls and increases the concentration of acid in the neighbourhood of the hydroxyl group at C₆ in the photoproduct. The decrease in stability of the photoproduct, in the pH range where nucleoside photoproducts exhibit practically no change in stability, would therefore be due in part to the intramolecular catalysis of the reverse reaction by the proton involved in secondary phosphate dissociation. The differences between

the different nucleotide isomers is therefore due to two mutually dependent effects: (a) the distance between the amino and phosphate groups, and (b) the pK of the latter. The most unstable photoproducts are therefore those nucleotides where the two functional groups are closest, i.e. the 5'-isomers. The quantum yield and rate of the reverse reaction for the 2':3' cyclic nucleoside suggest that its configuration differs from that observed using atomic models, if it is assumed that all the bonds in the carbohydrate ring are in one plane.

SUMMARY

A detailed study has been made of the reversible photoproducts resulting from the ultraviolet irradiation (at 2537 Å) of cytosine glycosides, with special reference to the kinetics of the reverse reaction and the influence of pH, ionic strength and temperature. The photochemical reaction involves nucleophilic addition of a water molecule to the 5,6 double bond of the pyrimidine ring; the reverse reaction involves the acid-base catalyzed elimination of this water molecule. Quantum yields previously calculated, and in which the influence of the reverse reaction was ignored, are found to be essentially unchanged except at highly alkaline pH where the velocity of the reverse, dark, reaction is extremely high. Both forward and reverse reactions are of first-order. Examination of the isotope effect for the reverse reaction has shown that it involves general acid and base catalysis, as compared to uracil and its glycosides where specific acid-base catalysis is involved. It has been shown that the photochemical and reverse reactions are influenced not only by interaction between the pyrimidine and carbohydrate rings (specifically the pyrimidine 2-carbonyl and one of the carbohydrate hydroxyls) but, in the case of nucleotides, also by the degree of dissociation of the phosphate hydroxyls and the position of esterification of the sugar. The activation energy for the reverse reaction is of the order of 15 kcal./mole. For cytosine and 1-methylcytosine hydration of the pyrimidine rings is not the only reaction which takes place as a result of irradiation, and the nature of these additional reaction(s) remains to be clarified.

REFERENCES

- [1] Batt R. D., Martin J. K., Ploeser J. M. & Murray J., *J. Am. Chem. Soc.* **76**, 3663, 1954.
- [2] Brodskij A., *Chimia izotopow*, Izv. Akad. Nauk USSR, Moscow, 1952.
- [3] Cavaliere L. P., *J. Am. Chem. Soc.* **75**, 5268, 1953.
- [4] Fox J. J. & Shugar D., *Biochim. Biophys. Acta* **9**, 369, 1952.
- [5] Furberg S., *Acta Chem. Scand.*, **4**, 751, 1950.
- [6] Hall R. H. & Khorana H. G., *J. Am. Chem. Soc.*, **77**, 1871, 1955.

- [7] Hart R. G., *National Research Council Canada* (Ottawa), Pub. No. 2385. 1949.
- [8] Ingold C. K., *Structure and mechanism in organic chemistry*, Cornell U. Press, Ithaca, N.Y., 1955.
- [9] Janion C. & Shugar D., *Acta Biochim. Polon.* **7**, 309, 1960.
- [10] Jardetsky C. D., *J. Am. Chem. Soc.*, **82**, 229, 1960.
- [11] Kaplan R. W. & Gunkel W., *Arch. Mikrobiol.* **35**, 63, 1960.
- [12] Loring H. S., Hammel M. L., Levy L. W. & Bortner H. W., *J. Biol. Chem.* **196**, 821, 1952.
- [13] Mikkelsen K. & Nielsen S. O., *J. Phys. Chem.*, **64**, 632, 1960.
- [14] Moore A. M., *Canad. J. Chem.* **36**, 281, 1958.
- [15] Moore A. M. & Thomson C. H., *Science* **122**, 594, 1955.
- [16] Moore A. M. & Thomson C. H., *Canad. J. Chem.* **35**, 163, 1957.
- [17] Shugar D., in *The Nucleic Acids* (E. Chargaff & J. N. Davidson eds.), Vol. III, Chapt. 30, Academic Press, N. Y., 1960.
- [18] Shugar D. & Wierzchowski K. L., *Biochim. Biophys. Acta* **23**, 657, 1957.
- [19] Shugar D. & Wierzchowski K. L., *Bull. Acad. Polon. Sci., Sér. Biol.* **6**, 283, 1958.
- [20] Shugar D. & Wierzchowski K. L., *Postępy Biochemii* **4**, suppl., 243, 1958.
- [21] Sinsheimer R. L., *Radiation Research*, **6**, 121, 1957.
- [22] Wang S. Y., *Nature*, **184**, suppl. **4**, 184, 1959.
- [23] Wang S. Y., Apicella M. & Stone B. R., *J. Am. Chem. Soc.* **78**, 4180, 1956.
- [24] Wiberg K., *Chem. Rev.* **55**, 713, 1955.
- [25] Wierzchowski K. L. & Shugar D., *Biochim. Biophys. Acta* **25**, 355, 1957.
- [26] Wierzchowski K. L. & Shugar D., *Acta Biochim. Polon.* **7**, 63, 1960.
- [27] Wierzchowski K. L. & Shugar D., *Acta Biochim. Polon.* **7**, 377, 1960.
- [28] Wierzchowski K. L. & Shugar D., *4th Intern. Cong. Photobiol.*, Copenhagen, 1960.

FOTOCHEMIA NUKLEOZYDÓW I NUKLEOTYDÓW CYTOZYNY. CZĘŚĆ II.

Streszczenie

Przeprowadzono szczegółowe badania nad odwracalnymi fotoproduktami powstającymi w wyniku naświetlania ultrafioletem (2537 Å) glikozydów cytozyny ze specjalnym uwzględnieniem kinetyki reakcji odwrótnej i wpływu pH, siły jonowej i temperatury. Fotochemiczna reakcja obejmuje nukleofilne włączenie cząsteczki wody do podwójnego wiązania 5 - 6 pierścienia pirymidynowego, reakcja odwrótne stanowi katalizowane przez kwas-zasadę odłączenie tej cząsteczki wody. Stwierdzono, że wyliczone poprzednio wydajności kwantowe, w których pominięto wpływ reakcji odwrótnej, nie wykazują istotnych zmian oprócz występujących w wysoko alkalicznych pH, gdzie szybkość reakcji odwrótnej jest szczególnie wysoka. Obie reakcje są pierwszego rzędu. Bardziej szczegółowe badanie efektu izotopowego na reakcję odwrótną, jak też porównanie z uracylem i jego glikozydami, gdzie występuje specyficzna kwaso-zasadowa kataliza, wykazały, że zachodzi ona na drodze ogólnej kwaśnej i zasadowej katalizy.

Wykazane zostało, że na reakcję fotochemiczną i odwrotną wpływa nie tylko oddziaływanie wzajemne między pierścieniami pirymidyny i węglowodanu (szczególnie węglem 2 pirymidyny i jednym z wodorotlenów węglowodanu), lecz w wypadku nukleotydów, również stopień dysocjacji wodorotlenów fosforanu i pozycja estryfikacji cukru. Energia aktywacji dla reakcji odwrotnej jest rzędu 15 kcal/mol. Dla cytozyny i 1-metylocytozyny uwodnienie pierścienia pirymidynowego nie jest jedyną reakcją jaka zachodzi w wyniku naświetlania, a charakter dodatkowych reakcji pozostaje do wyjaśnienia.

Otrzymano 24.12.1960

W. SZER and D. SHUGAR

THE PREPARATION AND PROPERTIES OF HIGH MOLECULAR WEIGHT POLYMERS OF N-METHYLURIDYLIC ACID

Instytut Biochemii i Biofizyki PAN, Warszawa

(Institute of Biochemistry & Biophysics, Polish Academy of Sciences, Warsaw)

In a previous publication [26] we have reported on the preparation and properties of N-methyluridine-2'(3')-phosphate and oligonucleotides of MeUp¹ obtained by chemical synthesis [21], the resulting oligonucleotides containing a mixture of 2',5' and 3',5' internucleotide linkages, with average chain lengths of up to 8,5 residues.

In view of the interest attaching to such polymers, both from a physico-chemical viewpoint and their behaviour towards enzymes [26], it appeared desirable to extend these studies to higher polymers, which we have now done by established procedures: preparation of MeUMP, followed by phosphorylation to MeUDP and polymerization of the latter with polynucleotide phosphorylase [9]. It has proved possible in this way to prepare also copolymers of MeUp and Up and to examine all of these for secondary structure, complexing ability with poly-A, as well as their behaviour towards enzymes.

MeUMP (II) was obtained by phosphorylation of N-methyl-2', 3'-O-isopropylideneuridine (I) with P₂O₅ in 85% phosphoric acid [11, 19], under conditions similar to those employed for phosphorylation of isopropylideneuridine or benzylidencytidine [19].

In the latter procedure, following phosphorylation and addition of water, heating for 30 minutes on a boiling water bath to decompose the polyphosphates formed during phosphorylation results in partial (up to

¹ The following nomenclature is used in this text: A, adenosine; U, uridine; Up, uridine-2'(3')-phosphate; UMP, uridine-5'-phosphate; UDP, uridine-5'-pyrophosphate; the prefix "Me" refers to the corresponding 3-methyl (N-methyl-) derivative; poly-U, poly-uridylic acid; poly-A, poly-adenylic acid; poly-U-MeU (25) refers to a copolymer of Up and MeUp containing 25% of the latter; the procedure for oligonucleotides is illustrated by MeUpUp, in which the 3'-hydroxyl of MeUp is linked to the 5' of Up, the terminal phosphate being on the 3' of the latter.

15%) demethylation of MeUMP. However, it was found that the heating time could be shortened to 15 minutes for decomposition of polyphosphates (as well as for removal of the isopropylidene group); under these conditions demethylation is hardly observable, and chromatographically pure II may be obtained in 69% yield from I.

MeUDP (III) was then obtained in good yield by the relatively simple modification of Michelson [19] through the action of dibenzylphosphorochloridate on the tri-*n*-octylamine salt of unprotected II. Following removal of benzyl groups by catalytic hydrogenation, III was precipitated as the calcium salt at slightly acid pH (5.5) where II is more soluble and remains in solution. The methyl esters of MeUMP and related compounds are of some theoretical interest and their properties will be described in a separate communication.

Poly-MeU was prepared enzymatically with polynucleotide phosphorylase as described by Grunberg-Manago *et al.* [10]. The reaction went to completion in several hours at 30°, with about 40% yield of polymer (with respect to MeUDP). The yield is therefore lower, and the equilibrium shifted more in the direction of phosphorolysis than with UDP and ADP as substrates. The reaction was also found to be completely inhibited when the reaction mixture contained 35% MeUMP.

The foregoing is of interest in relation to the specificity of polynucleotide phosphorylase, particularly in view of the fact that N-methylation of Up confers resistance to degradation by ribonuclease ([26], see below). Lengyel & Chambers [15] have shown that thiouridine-5'-pyrophosphate is likewise a suitable substrate for polynucleotide phosphorylase. On the other hand, we have found that the enzyme is completely inactive against dihydro-MeUDP [cf. Ref. 22] so that aromaticity of the pyrimidine ring appears to be necessary. It should be recalled in this connection that oligonucleotides of dihydro-Up with chain lengths of 15-20 residues may be obtained simply by hydrogenation of chemically synthesized oligo-U on a rhodium catalyst [12].

Acid hydrolysis of poly-MeU to mononucleotides resulted in an increase in optical density at the absorption maximum, 2620 Å, of 9.8%². The hyperchromicity of the high molecular weight polymer is consequently the same as for shorter chains. Since there is no possibility for formation of intramolecular hydrogen bonds in the methylated polymer (see also below), it follows that the hyperchromicity must be due to interaction of π -electron orbitals of adjacent rings [13, 14, 20].

² Alkaline hydrolysis to mononucleotides of the methylated polymer is not permissible since, as previously pointed out [12, 26], alkylation or substitution of both nitrogen atoms of the pyrimidine ring renders the latter alkali labile.

The foregoing conclusion is based on the assumption that the 10% hyperchromicity of poly-U and poly-MeU results from incorporation of the aromatic rings in the polynucleotide chain. Attention has previously been drawn to the observation of Shapiro & Chargaff [24] that deoxynucleoside diphosphates exhibit several % hyperchromicity with respect to the nucleosides, and that this may account for part of the hyperchromicity of polynucleotide chains [25].

It has been demonstrated recently by Lipsett [17] that poly-U exhibits reversible secondary structure at low temperatures, this being placed in evidence by a temperature profile with a "melting point", T_m , of about 6°. We have found that poly-MeU exhibits no secondary structure, even in the presence of 0.05 M-MgCl₂, its absorption spectrum remaining unaffected even at 3-4°. Furthermore poly-MeU does not form a twin-stranded complex with poly-A, either under standard conditions [4] or at higher ionic strength and temperatures of 3-4°.

In connection with the foregoing, we should like to draw attention to the 30% hyperchromicity exhibited by polyribosethymine phosphate [8]. Attention has previously been drawn to the fact that, since this polymer differs from poly-U only in that the uracil residues are methylated in the 5-position, its high hyperchromicity as compared to poly-U indicates an appreciable difference in structure [25].

It now seems clear that this difference is due to the fact that polyribosethymine phosphate has a higher T_m than poly-U and that it therefore exhibits secondary structure well above room temperature.

In view of the demonstration of the existence of a triple-stranded complex of the form poly-A-poly-U-poly-U, it has been suggested [6] that, in addition to the normal hydrogen bonds predicted for the Watson-Crick model [28] between the number 3 nitrogens of the pyrimidine and purine bases and the pyrimidine 4-carbonyl and purine amino group, there exists also the possibility of a second pair of hydrogen bonds, viz. between the number 3 nitrogen of the second uracil residue and the number 7 nitrogen of the adenine residue, as well as between the pyrimidine 4-carbonyl and the second hydrogen of the adenine amino group. The foregoing results for poly-MeU demonstrate that it suffices to block the number 3 nitrogen in the uracil ring to prevent the formation either of multiple stranded complexes or of intramolecular secondary structure.

It would be of considerable interest to investigate the effect of methylation on twin-strand complexing in the complex poly-G-poly-C, which is even more stable due to the formation of 3 interstrand hydrogen bonds [23]. Such trials will, of course, be possible only if methylated CDP and GDP prove to be substrates of polynucleotide phosphorylase. In our opinion the use of such methods, for the blocking of groups suspected of

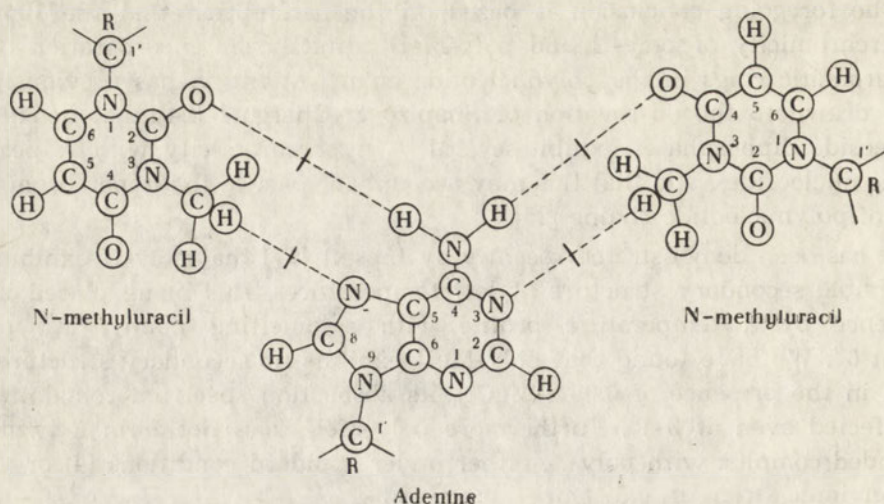


Fig. 1. Blocking of the number 3 nitrogen in the uracil rings of poly-MeU prevents formation of multiple stranded complexes with poly-A.

participating in hydrogen bonding in linear polynucleotides, should prove much more profitable in investigations on complementarity than other proposed methods.

Enzymatic studies on poly-MeU confirmed and extended our previous findings [26]. The polymer proved to be resistant to ribonuclease, but was quantitatively hydrolyzed to Me-UMP by purified snake venom phosphodiesterase at a rate considerably faster than chemically synthesized oligo-MeU. This is undoubtedly due to the fact that the chemically prepared oligonucleotide contains a mixture of 2',5' and 3',5' linkages and a terminal phosphate at the 2'(3') position.

The enzymatic polymer was also hydrolyzed slowly by commercial preparations of alkaline phosphatase, testifying to the presence in the latter of traces of an as yet unidentified phosphodiesterase [26].

Copolymers containing both U and MeU were prepared by using substrate solutions containing UDP and Me-UDP in the proportions 4:1 and 3:2. Following isolation of the copolymers, acid hydrolysis to mononucleotides and chromatography showed that their content of MeU was 5% and 25%, respectively. The methylated diphosphates are therefore less readily incorporated into polymers by the enzyme, in agreement with the results presented above for the synthesis of homopolymers of MeU.

Examination of potential secondary structure in the copolymer containing 25% MeU, viz. poly-U-MeU(25), showed that only below 5.5° was there an observable decrease in optical density, which attained 7.6% at 3.5° (lower temperatures were not possible in these experiments, using

the Hilger compartment). The secondary structure of the copolymer therefore disappears above 5.5° ; this is to be compared with the corresponding temperature for the same transition in poly-U, 8.5° [17], a result which we have confirmed.

Poly-U-MeU(25) also forms a twin-stranded complex with poly-A, the resulting maximum hyperchromicity being 17.2% for a mixture of poly-A and poly-U-MeU(25) in the ratio 1 : 3.3, i. e. when the number

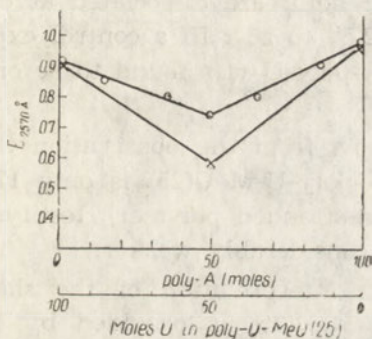


Fig. 2. "Titration curve" of poly-U-MeU [25] + poly-A at 10° in $0.15M$ -NaCl + $0.015M$ -sodium citrate. The point denoted by a cross represents the hyperchromicity of poly-U + poly-A used as a control

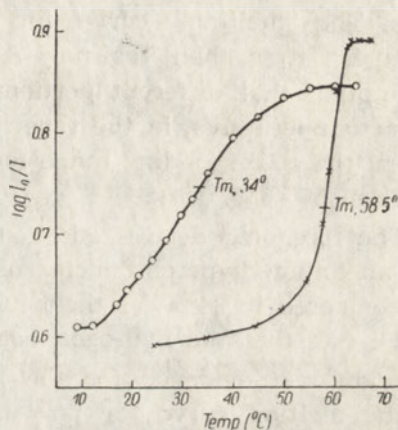


Fig. 3. Temperature profiles of (●), poly-U-MeU [25] + poly-A, and (x), poly-U + poly-A

of A residues equalled the number of unsubstituted U residues (Figs. 2 and 3). Under analogous conditions, a 1 : 1 mixture of poly-A-poly-U exhibited a hyperchromicity of 34%. It consequently follows, as already shown by Doty and Fresco & Alberts [5, 7] for multiple-stranded polymers of poly-U and poly-AU, that the methylated residues are pushed out of the helix to form "loops". This is further supported by the fact that these "loops" may embrace two adjacent MeU residues since, as

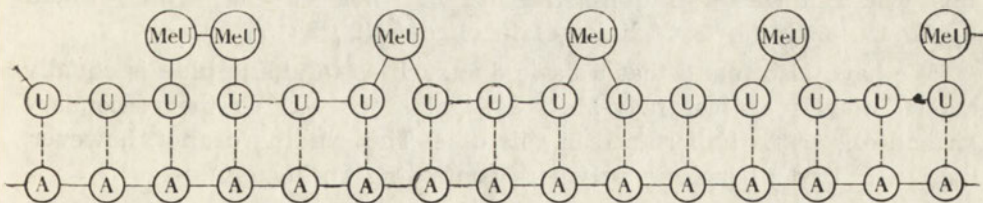


Fig. 4. Probable structure of twin-stranded complex of poly-U-MeU [25] + poly-A [cf. Ref. 5]

will be shown below, poly-U-MeU(25) contains almost 10% of such adjacent pairs, and practically no tracts of three MeU residues, so that the twin-strand complex of poly-U-poly-U-MeU(25) would have the structure shown in Fig. 4.

It seems reasonable to expect that such a structure will not be as stable as the complex free of loops and, in fact, its T_m is only 34° (Fig. 3) as compared to a T_m of 58.5° for poly-A-poly-U under the same conditions. The "melting" curve for the poly-A-poly-U-MeU(25) complex is much flatter than for poly-A-poly-U which is explicable on the assumption that different portions of the helix are dissociated at different temperatures, in the range from 12.5° to 56° . In a control experiment the corresponding range for poly-A-poly-U was found to be only 4° , from $57 - 61^\circ$.

The foregoing derives additional support from the observation that the maximum hyperchromicity of poly-A-poly-U-MeU(25) is only 17% (as compared to 34% for the natural twin-stranded polymer), testifying to the fact that the hydrogen bonds are considerably weaker.

Additional evidence for the foregoing interpretation of the shape of the melting curve for poly-A-poly-U-MeU(25) is provided by the behaviour of complexes of poly-U with oligonucleotides of Ap containing a mixture of 2', 5' and 3', 5' internucleotide linkages. We have made some preliminary trials with such oligonucleotides, of average chain length about 12 residues, and kindly supplied by Dr. A. M. Michelson [21]. Such oligonucleotides do not, of course, possess any secondary structure. However at room temperature oligo-A (2', 5'; 3', 5') complexes readily with poly-U (3', 5') as indicated by the resulting hypochromicity of the mixture, which attains a maximum of 14% at a ratio of U: A of 1:1. The resulting complex exhibits a melting curve over the temperature range 9° to 36° with a T_m of 21.5° . Similar complexes have been reported by Lipsett *et al.* [18] for poly-U and oligo-A containing, however, only 3', 5' internucleotide linkages. It would obviously be of interest to examine the properties of complexes of poly-U with samples of oligo-A of different chain lengths but containing only 2', 5' linkages; this would, however, require the use of some enzyme which would hydrolyze only the 3', 5' linkages in oligo-A (2', 5'; 3', 5').

We have also found that a basic dye such as toluidine blue is equally metachromatic against poly-MeU as against poly-U so that secondary structure is of no importance in this case. This finding cannot, however, be generalized to include polymers containing amino groups.

Acid hydrolysis of the copolymers resulted in the formation of Up and MeUp. Hydrolysis with snake venom phosphodiesterase gave MeUMP

and UMP, both of which were further identified by hydrolysis with snake venom 5'-nucleotidase to the corresponding nucleosides.

On the other hand, hydrolysis with ribonuclease gave Up plus two additional products with R_F values in solvent systems A and B somewhat lower than that for Up; there was no product of ribonuclease hydrolysis corresponding to MeUp, nor were there any products corresponding to tetra- or higher oligonucleotides, the R_F values of which would be close

Table 1

Course of polymerization of N-methyl-UDP

Incubation time (hours)	Me-UDP (%)	Poly-MeU (%)
0	100	0
0.5	80.5	19.5
2	64.5	35.5
12	60	40
24	59.5	40.5

to 0 [21, 26]. The spectra of the two above-mentioned spots, at pH 7 and 12, as well as chromatography of their acid hydrolysates, indicated that they were (in order of decreasing R_F values) a dinucleotide of the type MeUpUp and a trinucleotide such as MeUpMeUpUp. The quantitative proportions in the separate fractions were determined following

Table 2

Products of ribonuclease hydrolysis of poly-U-Me U (25)

Residue	Copolymer content	Hydrolysis products		
		Mononucleotides consisting of	Dinucleotides consisting of	Trinucleotides consisting of
Up	75	63.7%	15.6%	4.7%
MeUp	25	0%	15.6%	9.7%

ribonuclease hydrolysis with the following results: out of the 25% MeU residues in the polymer, 15.6% occur singly, sandwiched between U residues: while 9.4% exist as tracts of two residues. There is no possibility of formation of other types of oligonucleotides, e.g. $U3'-p \begin{array}{c} | \\ +5'MeU3'p \\ | \end{array}$ since this would be susceptible to ribonuclease hydrolysis at the position indicated by the dotted line (see Table 2).

EXPERIMENTAL

N-methyl-2',3'-isopropylideneuridine (I): 1 gm. (3.5 mmole) 2',3'-isopropylideneuridine, obtained according to Levene & Tipson [16] was dissolved in 50 ml. methanol and cooled to 0°, following which an ethereal solution of diazomethane, from 10 gm. *N*-methylnitrosourea [1], was added until a stable yellow colour was obtained. The reaction mixture was then left for 2 hrs. at 0° and overnight at room temperature. Completion of the reaction was verified by testing the optical density of the product at 2620 Å at pH 7 and 13, which should be the same; and by chromatography in solvents A and B (Table 3). The colorless solution was evaporated to dryness under reduced pressure, the residue dissolved in 2 ml. hot ethanol, 0.5 ml. ether was then added and the mixture left at 0° for crystallization. After 16 hours the crystals were filtered, washed with cold methanol and ether (yield 820 mg.) and an additional 120 mg. obtained from the filtrate; total yield, 940 mg. or 90% theor. Following recrystallization from ethanol-ether (1:1) the m. p. was 182-183° and the product showed only one spot in solvents A and B. In a butanol-borate solvent system the product did not form any complex. When 1 mg. was dissolved in 0.1 ml. *N*-HCl and left overnight at 37°, the resulting product was chromatographically identical with *N*-methyluridine in solvents A and B.

Analysis: C, 51.92%; H, 5.87%; N, 9.36%. Calculated for $C_{13}H_{18}O_6N_2$: C, 52.35%; H, 6.0; N, 9.4%.

N-methyl-UMP (II): 1 gm. (3.35 mmole) of I, finely powdered and previously dried over P_2O_5 , was added to a mixture of 4.5 gm. P_2O_5 in 6 gm. phosphoric acid [11, 19]. With exclusion of moisture, the reaction vessel was mechanically agitated in a 50° bath for 2 hrs. To the reaction mixture was then added 75 ml. water and the whole then placed in a boiling water bath for 15 mins.³ The mixture was then cooled rapidly to room temperature and brought to pH about 6.5 with a saturated barium hydroxide solution. The barium phosphate was then filtered off and washed with hot water, and the combined filtrates reduced to a volume of about 8 ml., brought to pH 7.5 with barium hydroxide and filtered into a centrifuge tube. About 16 ml. ethanol was then added to the solution which was then left at 0° for 30 mins., and centrifugated to give the crude barium salt of II, contaminated with traces of UMP and *N*-methyl-UDP. The precipitate was washed with ethanol and ether, again dissolved in a small volume of water and precipitated with ethanol to give 1.12 gm. dried Ba salt of II. The barium salt was dissolved in 20 ml. water and passed through a column of Amberlite IR-120 (H^+

³ If heating is unduly prolonged, partial demethylation occurs.

Table 3

Paper chromatography

The following solvent systems were used with ascending chromatography on Whatman No. 1:

(A), propan-2-ol-NH₄OH (d = 0.88)-H₂O (70:10:20, v/v/v). (B), ethanol-M-ammonium acetate (70:30, v/v), R_F values for the various compounds are as follows

Compound	R_F in solvent	
	A	B
Uridine	0.49	0.73
N-methyluridine	0.78	0.91
N-methyl-2',3'-O-isopropylidene uridine (I)	0.86	—
Uridine-5'-phosphate	0.18	0.26
N-methyluridine-5'-phosphate (II)	0.25	0.48
Uridine-5'-pyrophosphate	—	0.10
N-methyluridine-5'-pyrophosphate (III)	—	0.16
Dihydrouridine-5'-pyrophosphate	—	0.10
Dinucleotide MeUpUp	0.9	0.18
Trinucleotide MeUpMeUpUp	0.4	0.12
Poly-(MeU) (IV)	0	0

form, \varnothing 2 cm., length 8 cm.). The column was washed twice with 15 ml. portions water and the combined percolates concentrated under reduced pressure (temp. not exceeding 30°) to about 10 ml., following which water was removed by azeotropic distillation with benzene and ethanol. The ethanol solution (vol. about 9 ml.) was passed through a Schott G-4 filter into a centrifuge tube containing 50 ml. dry ether at 0°. The resulting precipitate was centrifuged down, washed first with ethanol-ether (1:4), then with ether, and finally dried in vacuum over P₂O₅ to give 780 mg. of II (69% theor.). The product exhibited only one spot in solvents A and B and was stationary in a butanol-borate solvent. Its spectrum was identical with that of N-methyluridine-2' (3')-phosphate [26]. Treatment with snake venom 5'-nucleotidase resulted in hydrolysis exclusively to N-methyluridine.

λ_{\max} 2620 Å; ϵ_{\max} 8.8 × 10³. Analysis: N, 8.12%; P, 9.32%. Calculated for C₁₀H₁₅O₉N₂P: N, 8.28%; P, 9.46%.

N-methyl-UDP (III): 505 mg. (1.5 mmole) of II, previously dried in vacuum, was dissolved in 20 ml. dry dioxane, to which was then added 530 mg. (1.5 mmole) tri-*n*-octylamine. The solution was further dried by several distillations under reduced pressure with addition of dry toluene, finally evaporated to dryness and left overnight in vacuum over P₂O₅. The resulting tri-*n*-octylamine salt of II was dissolved in 10 ml. dioxane, to which was then added dibenzylphosphorochloridate (from 460 mg. dibenzylphosphite and 240 mg. N-chlorosuccinimide) in

15 ml. dioxane-benzene (1:1), followed by the dropwise addition of a solution of tri-*n*-butylamine (370 mg., 2 mmole) in 5 ml. dioxane-benzene (1:1). Chromatographic control of the reaction showed that over 90% of II was phosphorylated after 3 hours at room temp. Solvent was then removed under reduced pressure and the residue shaken twice in ether (30 ml.) and in petroleum ether (30 ml.). The ether was decanted and the residual oily fluid dissolved in 20 ml. ethanol-water (6:4) and hydrogenated at atmospheric pressure on a palladium catalyst [2]. The catalyst was removed by filtration and the solution brought to pH 5.5 with triethylamine. The mixture was dehydrated by azeotropic distillation, filtered, and an excess of an ethanolic solution of calcium chloride added. The resulting crude calcium salt of III was centrifuged, washed with ethanol-water (2:1) and ethanol. Examination of the supernatant showed that it contained mainly unreacted II and was therefore discarded. The crude calcium salt of III (540 mg.) was dissolved in water, 1N-HCl added to pH 3, and filtered into 25 ml. ethanol. The resulting precipitate was again dissolved in water and precipitated with ethanol to yield 510 mg. of the calcium salt of III (73.3 theor.), giving only one spot in solvents A and B. Treatment with snake venom resulted in quantitative conversion to N-methyluridine (due to action of pyrophosphatase in venom).

λ_{\max} — 2620 Å; ϵ_{\max} — 8.74×10^3 . Analysis: N, 6.37; P, 13.62%. Calculated for $C_{10}H_{14}O_{12}N_2P_2Ca$: N, 6.1%; P, 13.83%.

Poly-(N-methyl-U) 23 mg. of the calcium salt of N-methyl-UDP (III) was dissolved in 1 ml. water and calcium removed on a column of Amberlite IR-120 (H^+). The solution was concentrated to 0.2 ml. and brought to pH 7.6 with 1N-NaOH, following which was added 0.2 ml. 0.2 M-tris buffer pH 8.1, 4 μ l. 1 M-MgCl₂ and 40 μ l. polynucleotide phosphorylase [10]. Incubation was at 30° for 24 hours and the reaction was followed chromatographically by the disappearance of III and the formation of polymer which remained at the starting point on the chromatogram (solvent B), with results as shown in Table 1. The final yield of polymer, following two precipitations with alcohol and exhaustive dialysis, was 5.4 mg⁴.

Acid hydrolysis. Exposure of the polymer to 1N-HCl for 14 hours at 37° resulted in complete hydrolysis with the formation, in solvents A and B, of only one product. N-methyluridine-2'(3')-phosphate.

Hyperchromicity and secondary structure. Following acid hydrolysis

⁴ No accurate data are available as to the molecular weight of the polymer. However sedimentation constant measurements (performed in the laboratory of Prof. P. Doty by Dr. K. Wierzchowski) on an old, partially degraded, preparation gave a molecular weight of 15,000.

the increase in absorption of a solution of polymer was 9.8% at 2620 Å. At temperatures down to 3°, no temperature profile was observed for the polymer under conditions where the temperature profile of poly-U was reproduced as described by Lipsett [17]; see below.

Attempted complex formation with poly-A. Under conditions as described by Warner [27] and Doty *et al.* [4] poly-A was "titrated" with poly-U to form the usual 1 : 1 complex. Repetition of this procedure with poly-MeU gave only a mixture in which the ultraviolet absorption was always the sum of the absorptions of poly-A and poly-MeU.

Attempted synthesis of poly-(dihydro-U). 10 mg. of the sodium salt of UDP was hydrogenated over a rhodium catalyst [3] until the absorption at 2600 Å had completely disappeared [12]. The solution was then concentrated and incubated with polynucleotide phosphorylase as described above. No evidence for polymer formation could be observed [cf. Ref. 22].

Test for secondary structure in poly-MeU. The optical density of a solution of poly-MeU in 0.01 M-MgCl₂ was examined over a temperature range of 75° to 4° in the thermostated cell compartment of the Hilger Uvispek with a Hoeppler circulating ultrathermostat. No change in absorption could be observed at 2620 Å, even when the MgCl₂ concentration was raised to 0.05 M. Under analogous conditions poly-U exhibited a temperature profile as described by Lipsett [17].

Copolymers poly-U-MeU. These were prepared enzymatically as for poly-MeU. Two incubation mixtures were used in which the ratios of UDP to MeUDP were 4 : 1 and 3 : 2 respectively. The resulting copolymers were hydrolyzed in 1N-HCl overnight at 37° and chromatographed in solvents A and B. Products of hydrolysis contained only Up and MeUp and were eluted from chromatograms and estimated 2620 Å. The ratios of MeUp to Up were found to be 5% and 25% respectively.

Secondary structure of poly-U-MeU(25). The procedure was analogous to that for poly-MeU, above. From 5.5° to 3.5° (lower temperatures could not be obtained) the optical density decreased from 0.520 to 0.480, i. e. a decrease of 7.6%.

Twin-stranded complex poly-A-poly-U-MeU(25). This was formed under standard conditions [4, 7] but at 8°. Optical density readings were then recorded at increasing temperatures to establish the temperature profile (see Figs. 2, 3).

Enzymatic tests

Substrates were made up at a concentration of 10 mg./ml. in 0.1-M-buffer and enzyme added to a concentration of 1 mg./ml. unless otherwise indicated. The reaction mixtures were then incubated at 37°,

along with an appropriate control; from time to time samples were withdrawn for chromatographic analysis.

Alkaline phosphatase. Two commercial preparations (Sigma and Worthington) were used with similar results. Incubation was in borate buffer pH 8.7 with addition of traces of Mg^{2+} . Under these conditions (a) N-methyluridine-5'-phosphate was hydrolyzed quantitatively to N-methyluridine; (b) with poly-(MeU) traces of N-methyluridine were visible after 3 hours incubation, increasing to 10% after 5 hours and 20% at 20 hours.

Acid phosphatase was a gift of Dr. W. Ostrowski. Incubation of a mixture of II and III at pH 5 for 30 mins. was without effect on III while II was quantitatively hydrolyzed to N-methyluridine.

Snake venom (Crotalus adamanteus) for which we are indebted to Dr H. Fraenkel-Conrat. Incubation in borate buffer pH 9.2 with addition of Mg^{2+} ; (a) N-methyluridine-5'-phosphate (II) was hydrolyzed quantitatively to N-methyluridine; (b) N-methyluridine-5'-pyrophosphate (III) was hydrolyzed in 2 hours quantitatively to N-methyluridine.

Purified snake venom 5'-nucleotidase (prepared by Mrs. F. Rzendowska in this laboratory, along with snake venom phosphodiesterase, by salt elution from a cellulose column) at pH 8.8 in borate buffer quantitatively hydrolyzed N-methyluridine-5'-phosphate to N-methyluridine.

Snake venom and purified phosphodiesterase. Incubation was at pH 8.8 in borate buffer with addition of Mg^{2+} . With snake venom, poly-MeU exhibited, after 2 hours, the presence of smaller oligonucleotides, N-methyluridine-5'-phosphate and N-methyluridine. Following 20 hours incubation, the only product was N-methyluridine. With purified phosphodiesterase there is initially formation of smaller oligonucleotides and, after 8 hours, the only product was N-methyluridine-5'-phosphate.

Pancreatic ribonuclease (Sigma). Incubation at pH 7.2 in acetate buffer. No effect on poly-MeU was observed up to 8 hours. After 20 hours there was 10 - 15% hydrolysis to smaller oligonucleotides, and even after 40 hours no trace of monomers could be observed, under conditions where poly-U was completely hydrolyzed in 1 hour. In one experiment where the enzyme concentration was increased 5-fold (so that ratio of enzyme concentration to substrate was 1:2) the methylated polymer was completely hydrolyzed to oligonucleotides after 20 hours, but without appearance of monomer.

Polynucleotide phosphorylase (from *A. vinelandi*, kindly supplied by Dr. S. Ochoa): Incubation was in 0.2 M-tris buffer pH 8.1, containing in a volume of 0.5 ml.: 0.5 mg. poly-(MeU), 5 μ moles potassium phosphate, 5 μ moles $MgCl_2$ and 5 μ l. enzyme. The solution was incubated at 30° and samples taken for chromatography at 30 min. intervals. The forma-

tion of smaller oligonucleotide was visible after 30 mins. After two hours there was formation of about 30% of III, which remained unchanged after 14 hours.

Hydrolysis products of poly-U-MeU [25]. Phosphodiesterase hydrolyzed this copolymer quantitatively to uridine-5'-phosphate and N-methyluridine-5'-phosphate.

With ribonuclease, hydrolysis for 3 hours led to the formation of 3 spots in solvent systems A and B. The main hydrolysis product, with R_F values of 0.17 and 0.25 in solvents A and B, was identified as Up. The other two spots, with lower R_F values (see Table 3) were eluted and examined spectrally in the wavelength range 2300 - 2900 Å at pH 7 and pH 13. It was established that the centre and lower spots contained MeUp and Up in the ratios 1:1 and 1:2, respectively: This was also verified in the following manner: A larger quantity of the ribonuclease hydrolysate was chromatographed on Whatman 3 MM. The central and lower spots were eluted, the eluates concentrated and then hydrolyzed in 1 N-HCl overnight at 37°. The hydrolysates were rechromatographed in solvent systems A and B, again giving spots corresponding to MeUp and Up in the ratios 1:1 and 1:2 as above. Quantitatively the products of hydrolysis of poly-U-MeU [25] were therefore as given in Table 2.

SUMMARY

N-methyluridine-5'-phosphate (MeUMP) and MeUDP have been synthesized. MeUDP is a substrate for polynucleotide phosphorylase, which has been used to prepare poly-MeU. In contrast to poly-U, poly-MeU exhibits no secondary structure under any conditions. Nor, in agreement with the Watson-Crick model, will poly-MeU form any complexes with poly-A. Blocking of one hydrogen in one of the aromatic rings suffices, therefore, to prevent formation of multiple-stranded complexes or of intramolecular secondary structure. Furthermore the 10% hyperchromicity exhibited by the methylated polymer cannot be due to any type of internal hydrogen bonding. Co-polymers of U and MeU have also been prepared; these exhibit secondary structure and complexing abilities with poly-A which are dependant on the ratio of U to MeU in the chain and which are interpretable on the assumption that MeU residues form "loops" outside these structures. Preliminary experiments have also demonstrated that poly-U will form multiple-stranded complexes with small oligonucleotides of adenylic acid containing 2', 5' internucleotide linkages. Dihydro-UDP was found to be inactive as a substrate for polynucleotide phosphorylase.

Poly-MeU is resistant to pancreatic ribonuclease but is susceptible to snake venom phosphodiesterase. Commercial preparations of alkaline phosphatase have also been found to contain traces of some unidentified phosphodiesterase (which is presumably present in various tissues) which will likewise hydrolyze the methylated polymer.

The ribonuclease hydrolysis products of co-polymers of U and MeU are qualitatively and quantitatively in agreement with expectations.

Attention is drawn to the advantages, in studies on complementarity in linear polynucleotides, of using methods for the blocking of specific groups suspected of participating in hydrogen bonding.

REFERENCES

- [1] Arndt F., *Org. Synth. Coll.* Vol. 2, 165, 1946.
- [2] Baddiley J. & Todd A. R., *J. Chem. Soc.* p. 648, 1947.
- [3] Cohn W. E. & Doherty D. G., *J. Am. Chem. Soc.* **78**, 2863, 1956.
- [4] Doty P. Boedtker H., Fresco J. R., Haselkorn R. & Litt M., *Proc. Natl. Acad. Sci. (U. S.)* **45**, 482, 1959.
- [5] Doty, P., *Harvey Lecture*, delivered January 21, 1960.
- [6] Felsenfeld G., Davies D. R. & Rich A., *J. Am. Chem. Soc.* **79**, 2023, 1957.
- [7] Fresco J. R. & Alberts B. M., *Proc. Natl. Acad. Sci. (U. S.)* **46**, 311, 1960.
- [8] Griffin B. E., Todd A. R. & Rich A., *Proc. Natl. Acad. Sci. (U. S.)* **44**, 1123, 1958.
- [9] Grunberg-Manago M., Oritz P. J. & Ochoa S., *Science*, **122**, 907, 1955.
- [10] Grunberg-Manago M., Oritz P. J. & Ochoa S., *Biochim. Biophys. Acta* **20**, 269, 1956.
- [11] Hall R. H. & Khorana H. G., *J. Am. Chem. Soc.* **77**, 1871, 1955.
- [12] Janion C. & Shugar D., *Acta Biochim. Polon.* **7**, 309, 1960.
- [13] Laland A. G., Lee W. A., Overend W. G. & Peacocke A. R., *Biochim Biophys. Acta* **14**, 356, 1954.
- [14] Lawley P. D., *Biochim. Biophys. Acta*, **19**, 328, 1956.
- [15] Lengyel P. & Chambers R. W., *J. Am. Chem. Soc.* **82**, 752, 1960.
- [16] Levene P. & Tipson R. S., *J. Biol. Chem.* **106**, 113, 1934.
- [17] Lipsett M. N., *Proc. Natl. Acad. Sci. (U. S.)* **46**, 445, 1960.
- [18] Lipsett M. N., Heppel L. A. & Bradley D. F., *Biochim. Biophys. Acta* **41**, 175, 1960.
- [19] Michelson A. M. *J. Chem. Soc.* p. 1957, 1958.
- [20] Michelson A. M., *Nature*, **182**, 1502, 1958.
- [21] Michelson A. M., *J. Chem. Soc.* p. 1371, 1959.
- [22] Ochoa S. & Heppel L., *Chemical Basis of Heredity*, John Hopkins Press, Baltimore, p. 615, 1957.
- [23] Pauling L. & Corey R. B., *Arch. Biochem. Biophys.* **65**, 164, 1956.
- [24] Shapiro H. S. & Chargaff E., *Biochim. Biophys. Acta* **26**, 596, 1957.
- [25] Shugar D., in *The Nucleic Acids* (E. Chargaff & J. N. Davidson eds.), vol. III, Acad. Press. New-York, London, p. 39, 1960.
- [26] Szer W. & Shugar D., *Acta Biochim. Polon.* **7**, 491, 1960.
- [27] Warner R. C., *J. Biol. Chem.* **229**, 711, 1957.
- [28] Watson J. D. & Crick F. H. C., *Nature* **171**, 737, and 964, 1953.

OTRZYMYWANIE I WŁAŚCIWOŚCI POLIMERÓW KWASU
3-METYLOURYDYLOWEGO O WYSOKIM CIĘŻARZE CZĄSTECZKOWYM

Streszczenie

Przeprowadzono syntezy 5'-fosforanu i 5'-pirofosforanu 3-metylourydyny. Stwierdzono, że ten ostatni jest odpowiednim substratem dla polinukleotydowej fosforylasy, przy pomocy której otrzymano homopolimer kwasu 3-metylourydylowego (poli-MeU). Homopolimer poli-MeU nie wykazuje obecności drugorzędowej struktury i zgodnie z modelem Watson'a-Crick'a, nie tworzy kompleksu z homopolimerem kwasu adenykowego (poli-A). Wobec tego zablokowanie jednego atomu tworzącego wiązanie wodorowe w jednym z pierścieni aromatycznych jest wystarczające dla uniemożliwienia zarówno utworzenia podwójnych łańcuchów kompleksu jak i wewnątrzcząsteczkowej drugorzędowej struktury. Efekt hyperchromowy w wyniku hydrolizy rzędu 10%, jaki posiada poli-MeU, nie może więc być związany z żadnym rodzajem wiązania wodorowego. Otrzymano również kopolimery kwasu urydylowego i 3-metylourydylowego (poli-U-MeU); wykazują one obecność drugorzędowej struktury i zdolność kompleksowania z poli-A, zależną od stosunku U : MeU w kopolimerze. Maksimum kompleksowania, jak wynika z pomiarów hiperchromazji, przypada na równomolowy stosunek poli-A do reszt U w kopolimerze, co zinterpretowano zakładając, że reszty MeU są „wysunięte“ na zewnątrz podwójnego łańcucha kompleksu. We wstępnych doświadczeniach stwierdzono, że poli-U tworzy dwułańcuchowe kompleksy z oligonukleotydami kwasu adenykowego, zawierającymi również wiązania fosfodwuestrowe 2',5. 5,6-dwuhydro-5'-pirofosforan urydyny okazał się nieaktywny jako substrat polinukleotydowej fosforylasy.

Poli-MeU jest odporne na działanie rybonukleazy z trzustki, a ulega działaniu fosfodwuesterazy z jadu węża. Handlowe preparaty alkalicznej monofosfatazy zawierają ślady niezidentyfikowanej fosfodwuesterazy (prawdopodobnie zawartej w wielu tkankach), która również hydrolizuje poli-MeU.

Produkty hydrolizy kopolimeru poli-U-MeU przy pomocy rybonukleazy określono jakościowo i oznaczono ilościowo.

Zwrócono uwagę, że metoda blokowania tych pozycji, które zgodnie z teorią biorą udział w tworzeniu wiązań wodorowych pomiędzy linowymi polinukleotydami jest bardziej przydatna w badaniach powinowactwa między zasadami niż inne proponowane metody.

Otrzymano 28.12.1960

The first part of the book is devoted to a general introduction to the subject of the history of the English language. It begins with a discussion of the Indo-European languages and the position of English among them. The author then discusses the development of the English language from Old English to Middle English and finally to Modern English. The second part of the book is devoted to a detailed study of the history of the English language in the United States. It begins with a discussion of the early English settlers in America and the development of the American dialects. The author then discusses the influence of other languages on the English spoken in America and the development of the American English language. The third part of the book is devoted to a study of the history of the English language in the British Empire. It begins with a discussion of the English language in the West Indies and the West Indies. The author then discusses the influence of other languages on the English spoken in the British Empire and the development of the English language in the British Empire. The fourth part of the book is devoted to a study of the history of the English language in the Commonwealth of Nations. It begins with a discussion of the English language in the Commonwealth of Nations and the influence of other languages on the English spoken in the Commonwealth of Nations. The author then discusses the development of the English language in the Commonwealth of Nations.

T. W. SZCZEPKOWSKI

**UDZIAŁ RODANAZY W METABOLICZNYM POWSTAWANIU
TIOSIARCZANU**

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

Ogólnie sprawę ujmując, metabolizm siarki w ustroju zwierzęcym polega na jej utlenieniu do najwyższego — plus szóstego stopnia utlenienia. W wyniku takiego utlenienia może powstać bądź to kwas sulfonowy zawierający siarkę związaną jeszcze z węglem, jak tego przykładem jest tauryna, bądź też nieorganiczny siarczan. Tworzenie tauryny z cysteiny zostało w ogólnych zarysach zbadane, przy czym jako stadia przejściowe uchwycono kwas cysteiniosulfinowy i hipotaurynę, natomiast powstawanie siarczanu w toku utleniania siarki cysteiny jest jeszcze wciąż problemem wymagającym bliższego wyjaśnienia. Najprostszy do pomyślenia mechanizm powstawania siarczanu polegałby na hydrolitycznym rozpadzie organicznych kwasów sulfonowych mogących powstawać w procesach metabolicznych, a więc tauryny, kwasu cysteinowego lub jego ketonowej pochodnej kwasu sulfopirogronowego: $H_2NCH_2 \cdot CH_2SO_3H$, $HOOC \cdot CHNH_2 \cdot CH_2SO_3H$, $HOOC \cdot CO \cdot CH_2SO_3H$. Hydroliza taka nie zachodzi jednak w warunkach fizjologicznych [16]. Dotychczasowe badania doprowadzają nas do raczej nieoczekiwanego wniosku, że odszczepienie siarki od reszty organicznej może dokonać się albo w postaci siarczkowej, albo w postaci siarczynowej.

Wytwarzanie siarkowodoru w tkankach zwierzęcych zostało wykazane [6] i wiąże się ono z desulfuracją cysteiny. Siarczyn może powstawać w procesach biologicznych przez rozłączenie wiązania siarki z węglem w kwasach sulfinowych, czyli przez tzw. desulfinację, przez utlenianie siarki i wreszcie przez redukcję siarczanów. Zaznaczyć jednak należy, że o zdolności tkanek zwierzęcych do utlenienia siarki wnioskujemy tylko na podstawie przesłanek pośrednich, a redukcja siarczanu nie odgrywa w tkankach zwierzęcych poważniejszej roli, z wyjątkiem woreczka żółtkowego ptaków [7]. Innymi słowy, zasadniczym źródłem siarczynu w ustroju jest desulfinacja.

Proces desulfuracji [13] został wykazany doświadczalnie w czasie inkubacji tkanki wątrobowej królika z kwasem cysteinosulfonowym [5], a dalsze badania [2] doprowadziły do wniosku, że proces desulfuracji poprzedzony jest transaminacją, czyli właściwą substancją macierzystą siarczynu jest w tym przypadku kwas sulfinylopirogronowy. Drugim źródłem powstawania siarczynu może być hipotauryna [3], ale mechanizm tego procesu nie jest znany, a wiele danych przemawia za tym, że hipotauryna jako źródło siarczynu może odgrywać jedynie drugorzędną rolę [7].

Stwierdzenie, że metabolizm siarki biegnie poprzez wytworzenie siarkowodoru i siarczynu prowadzi do wniosku, że organizm zwierzęcy musi dysponować mechanizmem szybko przetwarzającym te wysoce toksyczne związki na produkty nieszkodliwe. Zresztą w normalnym ustroju siarczki i siarczyny występują co najwyżej w ilościach śladowych. Szlaki metaboliczne, po których biegnie utlenianie siarczków i siarczynów nie mogą być uważane za wyjaśnione. Spośród obserwacji dotyczących utleniania siarczynu trzeba wymienić: (1) Enzymatyczna reakcja siarczynu z kwasem merkaptopirogronowym, w wyniku której powstaje tiosiarczan [23]. (2) Utlenianie siarczynu do siarczanu przez oksydazę ksantynową w obecności hipoksantyny [8]. (3) Utlenianie enzymatyczne przyspieszane przez kwas dwutiooktanowy [8].

Odnosnie utleniania siarczku względnie siarkowodoru opisano następujące fakty: (1) Utlenianie nieenzymatyczne do tiosiarczanu w obecności hematy, zdenaturowanej oksyhemoglobiny i cytochromu c [21]. (2) Utlenianie do wielosiarczków, które następnie utleniają się nieenzymatycznie do tiosiarczanu [24]. (3) Wytwarzanie ugrupowań wielosiarczkowych z grup tiolowych enzymu przez przyłączenie do nich siarki z kwasu merkaptopirogronowego [9]. (4) Wprowadzenie siarczku sodu do żyły usznej królika wywołuje wzrost tiosiarczanu w moczu [4].

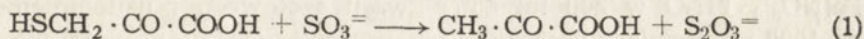
Jak widzimy, w badaniach nad utlenianiem siarczku zwrócono uwagę na powstawanie wielosiarczków i tiosiarczanu, brak jest jednak wyjaśnienia znaczenia tych procesów i ich mechanizmu.

Zupełnie nowe światło na mechanizm powstawania siarczanów rzuciły prace Skarżyńskiego, Szczepkowskiego i Weber nad mechanizmem utleniania tiosiarczanu [18, 19] i nad jego rolą metaboliczną [25, 26]. Stosując tiosiarczan znakowany siarką radioaktywną ^{35}S w pozycji zewnętrznej ($^*\text{S}-\text{SO}_3$)⁻ lub tiosiarczan znakowany w pozycji wewnętrznej ($\text{S}-^*\text{SO}_3$)⁻ mogliśmy wykazać, że wydaleniowi w postaci siarczanu ulega bardzo szybko siarka wewnętrzna. Siarka zewnętrzna zostaje zatrzymana w organizmie szczura przez znacznie dłuższy czas, co świadczy, że wchodzi ona w jakieś procesy metaboliczne. Z badań naszych wynikało, że w ustroju zwierzęcym tiosiarczan jest szybko metabolizowany, i że być może jest on ważnym ogniwem w przemianach siarki. Szybki me-

tabolizm tiosiarczanu mógł tłumaczyć dlaczego związek ten występuje normalnie w moczu tylko w małych ilościach.

Dalsze nasze badania [25, 26] wykazały, że tiosiarczan jest głównym poprzednikiem metabolicznym siarczanu; innymi słowy, wytwarzanie siarczanu w organizmie zwierzęcym poprzedzone jest wytworzeniem tiosiarczanu.

Poznanie doniosłej roli metabolicznej tiosiarczanu wysunęło z kolei zadanie wyjaśnienia mechanizmu jego powstawania w organizmie zwierzęcym. Dotychczas poznana reakcja enzymatyczna, prowadząca do powstania tiosiarczanu, przebiega pomiędzy kwasem merkaptopirogronowym i siarczynem [23] w myśl wzoru:



Trudno jest jednak przypuszczać, żeby powyższa reakcja przedstawiała jedyną drogę powstawania tiosiarczanu i dlatego postanowiłem prześledzić możliwość jego wytwarzania w inny sposób, z udziałem innych enzymów. Zamiarem moim było zbadanie możliwości reakcji siarczku i siarczyny w organizmie zwierzęcym, których wynikiem powinno być powstawanie tiosiarczanu, a co za tym idzie następnie również siarczanu.

STOSOWANE METODY I ODCZYNNIKI

Oznaczenia spektrofotometryczne były wykonywane z pomocą spektrofotometru „Uvispec“ f-my Hilger.

Rodanazę otrzymywano według metody Sörbo [20] z wątroby wołowej. Krystaliczny preparat po rozpuszczeniu w 0,01 M-roztworze octanu sodu dializowano wobec takiego samego roztworu octanu sodu celem usunięcia siarczanu amonu. Aktywność preparatów wahała się w granicach 180-200 jednostek na miligram białka. Do oddializowanych preparatów dodawano zgodnie z zaleceniem Sörbo albumin uzyskany z surowicy wołowej celem zapobieżenia denaturacji przez rozcieńczenie. Stężenie albuminu w preparatach stosowanych do oznaczeń wynosiło 0,025%. Albumin pochodził z f-my BDH.

Chromatografię bibułową tiosiarczanu i jego pochodnych przeprowadzano na bibule Whatman Nr. 1, stosując jako rozpuszczalnik *n*-butanol - acetone - wodę (2 : 2 : 1 v/v). Barwienie plam tiosiarczanu i jego tionowych pochodnych przeprowadzano azotanem srebra [17].

Dla oznaczenia tiosiarczanu obok siarczku i siarczyny, stosowano zmodyfikowaną metodę Kurtenackera i Wollaka [10]. Badany roztwór w ilości 1 ml dodawano do 1 ml 20% roztworu azotanu kadmu. Wytrącony osad siarczku kadmu i ewentualnie połączenia kadmu z cysteiną odsączano i przemywano na sączku wodą. Do przesączu dodawano 2 ml 38%

roztworu aldehydu mrówkowego i 1 ml kwasu octowego, po czym miareczkowano jodem. W tych warunkach reakcji z jodem ulegał tylko tiosiarczan. Dla mniejszych stężeń tiosiarczanu stosowano oznaczenia według metody Sörbo, polegającej na zamianie tiosiarczanu w rodanek w obecności cyjanku i jonów miedziowych [22].

Oznaczenia rodanku przeprowadzano kolorymetrycznie na podstawie barwnej reakcji rodanku z jonami żelazowymi. Postępowano zgodnie z przepisem Sörbo [20], w myśl którego do roztworu zawierającego rodanek dodaje się aldehydu mrówkowego celem usunięcia wpływu tiosiarczanu i innych związków siarkowych, przeszkadzających w reakcji z żelazem. Odczynnik żelazowy sporządzono przez rozpuszczenie 100 g $\text{Fe}(\text{NO}_3)_3 \cdot 9\text{H}_2\text{O}$ w 200 ml 65% kwasu azotowego i uzupełnienie wodą do 1000 ml. Pomiary ekstynkcji przeprowadzano przy długości fali 460m μ .

Dwusiarczek sodu sporządzono przez ogrzanie na łaźni wodnej roztworu siarczku sodu i siarki koloidowej w stosunku molowym 1:1. W tak uzyskanym roztworze obok dwusiarczku sodu występują w równowadze z nim inne wielosiarczki o ogólnym wzorze Na_2S_x [14]. Roztwór wykazuje barwę żółtą, a przeprowadzone przez mniejsze oznaczenia rozkładu ekstynkcji wykazały, że najdogodniejsza do oznaczeń dwusiarczku jest długość fali 385m μ . Dla tej długości fali inne związki siarkowe nie wykazują znaczniejszej absorpcji. Ze względu na trudności uzyskania roztworu dwusiarczku o ściśle oznaczonym składzie, niemożliwe było oznaczenie wartości ekstynkcji molowej dla tego związku.

Cystyna używana do badań pochodziła z f-my Riedel de Haen, cysteina z f-my Fluka, a glutation z f-my Eastman.

W niniejszej pracy symbolem R oznaczono rodnik aminopropionowy $-\text{CH}_2 \cdot \text{CHNH}_2 \cdot \text{COOH}$.

CZĘŚĆ DOŚWIADCZALNA

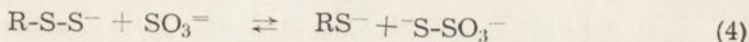
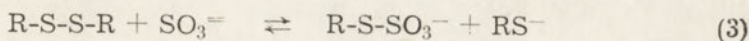
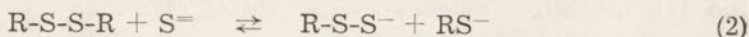
I. BADANIA NAD MODELOWYMI REAKCJAMI TRANSULFURACJI

a) Reakcje w układzie siarczek - siarczyn - cystyna

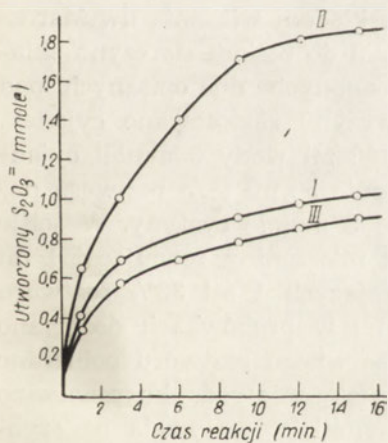
Rozważając możliwości reakcji siarczku i siarczynu, zwróciłem uwagę na nie badane dotychczas zachowanie się tych związków w obecności dwusiarczkwów organicznych, takich jak np. cystyna. Wstępne próby jakościowe przeprowadzone metodą chromatografii bibułowej pozwoliły stwierdzić, że w układach takich powstaje tiosiarczan. Dla bliższego określenia przebiegu reakcji wykonano próby ilościowe w ten sposób, że w kolbie Erlenmeyera odważano odpowiednie ilości siarczku i siarczynu i rozpuszczano w 100 ml 0,1 N-roztworu wodorotlenku sodu. Do drugiej kolby odważano cystynę. Z pierwszej kolby odmierzano 50 ml roztworu i do-

dawano do kolby zawierającej cystynę. Od tej chwili mierzono dokładnie czas, a zawartość kolby mieszano. W określonych odstępach czasu pobierano 1 ml mieszaniny reagującej z obu kolb i dodawano do probówek zawierających odmierzone uprzednio 20% roztwór azotanu kadmu w ilości 1 ml. Roztwór w kolbie bez cystyny służył jako próba odniesienia. Wytworzony tiosiarczan oznaczano jodometrycznie po dodaniu metanalu w sposób opisany w części dotyczącej metod. W roztworze kontrolnym zawierającym siarczek i siarczyn nie obserwowano znaczącego tworzenia się tiosiarczanu w czasie doświadczenia. Graficzny obraz powstawania tiosiarczanu w wyżej wymienionych warunkach przedstawia Rys. 1, który obrazuje też wpływ zmiany stężeń siarczku i siarczyny.

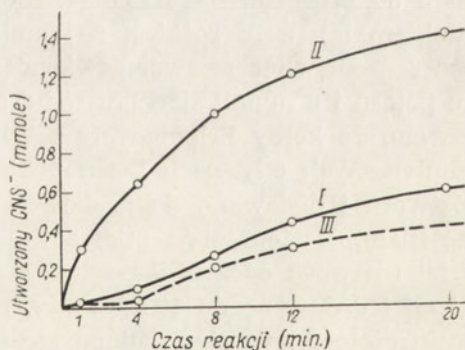
Reakcje jakie mogą przebiegać w układzie siarczek - siarczyn - cystyna można sformułować następująco:



Do wytworzenia tiosiarczanu może prowadzić reakcja (4), ale na szybkość jej przebiegu wpływają reakcje (2) i (3). Za słusznością takiego



Rys. 1.



Rys. 2.

Rys. 1. Wytwarzanie tiosiarczanu w układzie siarczek - siarczyn - cystyna. Stężenia odczynników: (I) siarczek 0,06 M, siarczyn 0,06 M; (II) siarczek 0,24 M, siarczyn 0,06 M; (III) siarczek 0,06 M, siarczyn 0,24 M; stężenie cystyny we wszystkich próbach 0,06 M. Temperatura 20°

Rys. 2. Wytwarzanie rodanku w układzie siarczek - cyjanek - cystyna. Stężenia odczynników: (I) siarczek 0,06 M, cyjanek 0,06 M; (II) siarczek 0,24 M, cyjanek 0,06 M; (III) siarczek 0,06 M, cyjanek 0,24 M; stężenie cystyny we wszystkich próbach 0,06 M. Temperatura 20°

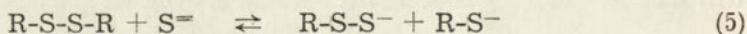
sformułowania przemawiają zmiany szybkości reakcji towarzyszące zmianie stężenia siarczku i siarczynu (Rys. 1). Zwiększając stężenie siarczku przesuwamy w prawo równowagę reakcji (2) i zwiększa się wtedy stężenie nadsiarczku cysteiny $R-S-S^-$, z którym może reagować siarczyn dając tiosiarczan. Zwiększenie stężenia siarczynu wpływa na równowagę reakcji (3), wskutek czego wzrasta stężenie cysteiny i równowaga reakcji (2) przesuwa się na lewo, co połączone jest z ubytkiem stężenia nadsiarczku cysteiny. Zahamowanie tworzenia tiosiarczanu przez siarczyn nie jest jednakże tak wybitnie zaznaczone, gdyż spadkowi stężenia nadsiarczku cysteiny przeciwdziała zwiększone stężenie siarczynu potrzebnego do przebiegu reakcji (4).

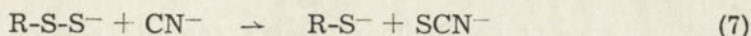
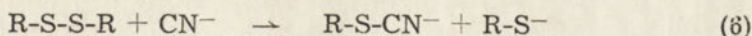
Powyższe doświadczenia stanowią dowód przemawiający za udziałem w reakcji nadsiarczku cysteiny, którego powstawanie postulowano ostatnio [1], ale który dotychczas nie został otrzymany w stanie czystym i scharakteryzowany.

b) Reakcje w układzie siarczek - cyjanek - cystyna

Cyjanek reaguje z dwusiarczkami, to jest związkami zawierającymi ugrupowanie $-S-S-$ w sposób podobny do siarczynu, przy czym przebiega reakcja zwana cyjanolizą, połączona z rozkładem wiązania dwusiarczkowego [12]. To podobieństwo reakcji cyjanunku do reakcji siarczynu skłaniało do przeprowadzenia doświadczeń podobnych do opisanych pod punktem (a), z tą różnicą, że zamiast siarczynu zastosowano cyjanek. Sporządzono więc roztwór zawierający w 100 ml wody 6 mmoli cyjanunku potasu i 6 mmoli siarczku sodu, a następnie 50 ml tego roztworu dodawano do kolby Erlenmeyera zawierającej 3 mmole cystyny. W ściśle odmierzonych odstępach czasu pobierano z mieszaniny reagującej 1 ml roztworu i dodawano do próbek zawierających 1 ml 38% roztworu metanal. Następnie do mieszaniny zawartej w próbkach dodawano 5 ml roztworu odczynnika żelazowego. Z barwnego roztworu pobierano 0,5 ml i dodawano do 10 ml wody, po czym stężenie rodanku oznaczano spektrofotometrycznie. Zmiana stężeń odczynników wpływała na szybkość i wydajność reakcji; zwiększenie stężenia siarczku zwiększało, a zwiększenie stężenia cyjanunku hamowało szybkość i wydajność tworzenia rodanku. Graficzny obraz przebiegu tworzenia rodanku w zależności od stężenia składników reakcji przedstawia Rys. 2.

Podobnie jak reakcja powstawania tiosiarczanu w mieszaninie siarczku, siarczynu i cystyny, tak i wytwarzanie rodanku może znaleźć wytłumaczenie w następujących reakcjach:



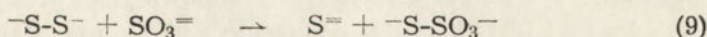


Za udziałem nadsiarczku cysteiny w powstawaniu rodanku świadczy przyspieszenie reakcji po zwiększeniu stężenia siarczku i jej zahamowanie po zwiększeniu stężenia cyjanku. Reakcja (6) jest zapewne nieodwracalna, gdyż wytwarza się w niej tiazolidynowa pochodna cysteiny [15].

c) Reakcje dwusiarczku sodu z siarczynem i cyjankiem

Nadsiarczku cysteiny nie udało się do tej pory wyizolować, ale jego odpowiednikiem strukturalnym jest dwusiarczek nieorganiczny, na którego powstawanie w układach biologicznych zwrócono ostatnio uwagę [9, 24]. Reakcja dwusiarczku z cyjankiem prowadzi do powstania rodanku i jak wykazano, przebiega ona bardzo szybko, gdy stężenia odczynników są większe od 0,01 M [24]. Dla małych stężeń odczynników szybkość reakcji oczywiście maleje i wtedy wyraźnie zaznacza się katalityczny wpływ rodanazy [24].

Reakcja dwusiarczku z siarczynem, podobnie jak analogiczna reakcja z cyjankiem, przebiega bardzo szybko gdy stężenia odczynników są większe od 0,01 M. Tak np. po zmieszaniu ze sobą 0,06 M roztworów dwusiarczku i siarczynu w równych objętościach, po upływie 2 min. 93% siarczynu ulega zamianie na tiosiarczan w temperaturze 20°. Przebieg reakcji w roztworach rozcieńczonych obrazują wartości podane pod punktem IIc. Reakcje dwusiarczku z cyjankiem i siarczynem przebiegają według wzorów:



Dla porównania wzajemnych szybkości reakcji sporządzono w dwóch zlewkach następujące mieszaniny: (a) 10 ml 0,1 M- Na_2S_2 + 10 ml 0,1 M-KCN + 10 ml wody; (b) 10 ml 0,1 M- Na_2S_2 + 10 ml 0,1 M-KCN + 10 ml 0,1 M- Na_2SO_3 . Po upływie 6 godzin oznaczono w zlewkach przechowywanych w temperaturze pokojowej wytworzony rodanek. W zlewce (a) zawartość rodanku wynosiła 1 mmol, natomiast w zlewce (b) 0,75 mmola, przy czym powstało 0,25 mmola tiosiarcznanu. Uzyskane wartości wskazują, że szybkość reakcji cyjanku z dwusiarczkiem sodu jest trzykrotnie większa od szybkości reakcji siarczynu z dwusiarczkiem.

II. REAKCJE TRANSULFURACJI KATALIZOWANE PRZEZ RODANAZĘ

Wykazana w poprzednim ustępie analogia pomiędzy mechanizmem niekatalizowanych reakcji prowadzących do powstania tiosiarcznanu i rodanku skłania do przypuszczenia, że i w żywych ustrojach tiosiarcznan i rodanek mogą powstawać na drodze podobnych przemian. Oczywiście w warunkach biologicznych trzeba brać pod uwagę o wiele mniejsze stężenia związków biorących udział w reakcji, niż te, jakie zastosowano w modelowych doświadczeniach. Jeżeliby to przypuszczenie było słuszne, to należało się spodziewać, że w żywych ustrojach istnieje jakiś biokatalizator, względnie biokatalizatory, które przebieg tych reakcji odpowiednio przyspieszają wtedy, gdy stężenie substratów będzie bardzo małe.

Od około 30 lat znany jest enzym rodanaza, w obecności którego powstaje *in vitro* rodanek z tiosiarcznanu i cyjanku [11] oraz dwusiarczku nieorganicznego i cyjanku [24]. Należało stwierdzić jak się zachowuje układ zawierający w znacznym rozcieńczeniu cystynę, siarczek i cyjanek, i w razie stwierdzenia katalitycznego wpływu rodanazy na ten układ, wyjaśnić czy rodanaza katalizuje analogiczną reakcję powstawania tiosiarcznanu w układzie cystyna, siarczek, siarczyn. Ciekawe było również zbadanie wpływu rodanazy na reakcję dwusiarczku nieorganicznego z siarczynem.

a) Katalityczny wpływ rodanazy w układzie cystyna - siarczek - cyjanek

W celu zbadania katalitycznego wpływu rodanazy oznaczano ilości rodanku w układzie cystyna - siarczek - cyjanek powstającego po upływie 1 min. samorzutnie i w obecności enzymu. W tym celu sporządzono w probówkach mieszaniny o składzie opisanym w tablicy 1 przedstawiającej równocześnie ilości powstałego rodanku. Układy II i IV przedstawione w tablicy służyły jako odpowiednie próby porównawcze dla układów I i III. Składniki dodawano w kolejności zaznaczonej w tablicy. Sporządzając roztwór siarczku z cystyną rozpuszczano najpierw 0,5 mmola cystyny w 10 ml 0,1 M-roztworu siarczku sodu i tak uzyskany roztwór rozcieńczano wodą tuż przed zastosowaniem w doświadczeniu. Ilości powstałego rodanku oznaczano kolorymetrycznie dodając do poszczególnych próbek 1 ml metanal 38% i 5 ml odczynnika żelazowego. Ślady zmętnienia usuwano przez wirowanie. Uzyskane wartości ekstynkcji porównywano z wartościami uzyskanymi dla standardowych roztworów rodanku sporządzonych z identycznym dodatkiem buforu fosforanowego i metanal. Czas doświadczenia ograniczono do jednej minuty licząc się z tym, że rodanaza katalizuje reakcję między nadsiarczkiem

Tablica 1

Wpływ rodanazy na szybkość wytwarzania rodanku w układzie cystyna - siarczek - cyjanek
 Aktywność rodanazy 0,7 j./1 ml. Temperatura 20°. Czas doświadczenia 1 minuta. Liczba doświadczeń 6

Nr układu	I	II	III	IV
Rodanaza	1 ml	1 ml	—	—
Octan-Na 0,01 M + albumin 0,025%	—	—	1 ml	1 ml
Bufor fosforanowy 0,1 M pH 7,7	1 ml	1 ml	1 ml	1 ml
Na ₂ S 0,002 M + cystyna 0,001 M	1 ml	1 ml	1 ml	1 ml
KCN 0,002 M	1 ml	—	1 ml	—
Woda	—	1 ml	—	1 ml
Rodanek powstały (μmole)				
średnio	0,56	—	0,26	—
zakres	0,47—0,6		0,23—0,28	

cysteiny i cyjankiem. Ponieważ szybkość powstawania nadsiarczku nie jest znana, więc po przedłużeniu czasu reakcji istniała ewentualność, że tworzenie nadsiarczku może być czynnikiem limitującym bieg reakcji w układzie. W krótkim okresie czasu wpływ rodanazy powinien być wyraźniejszy, gdyż działa ona na nadsiarczek istniejący już początkowo w układzie. Czas mierzono od chwili dodania cyjanku.

Uzyskane wyniki wskazują wyraźnie, że rodanaza katalizuje wytwarzanie rodanku z siarczku i cyjanku w obecności cystyny.*

b) Katalityczny wpływ rodanazy w układzie cystyna - siarczek - siarczyn

Celem zbadania wpływu rodanazy na wytwarzanie tiosiarczanu w układzie cystyna - siarczek - siarczyn oznaczano powstający tiosiarczan w mieszaninach reagujących opisanych w tablicy 2. Podobnie jak w poprzednim doświadczeniu odczynniki dodawano w kolejności przedstawionej w tablicy, w identyczny sposób sporządzano też roztwór siarczku z cystyną. Roztwór siarczynu sporządzano przez rozcieńczenie tuż przed dodaniem do układu roztworu 0,1 M. Czas mierzono od chwili dodania siarczynu. Po upływie 1 minuty dodawano do układu 1 ml 0,2 M roztworu octanu kadmu i po odwirowaniu osadu pobierano 3 ml płynu i oznaczano w nim tiosiarczan metodą Sörbo [22]. W tym celu do badanego roztworu dodawano 0,5 ml 0,1 M roztworu cyjanku potasu i 0,3 ml roztworu chlorku miedziowego, a następnie 5 ml odczynnika żelazowego. Odczytaną ekstynkcję porównywano z wartościami uzyskanymi dla standardowych roztworów tiosiarczanu z dodatkiem fosforanu i octanu kadmu. Oznaczony kolorymetrycznie rodanek stanowił miarę zawartości tiosiarczanu w badanym roztworze. Roztwór siarczynu nie dawał śladów

Tablica 2

*Wpływ rodanazy na szybkość wytwarzania tiosiarczanu w układzie
cystyna - siarczek - siarczyn*

Aktywność rodanazy 0,7 j./1 ml. Temperatura 20°. Czas doświadczenia 1 min. Liczba doświadczeń 6

Nr układu	I	II	III	IV
Rodanaza	1 ml	1 ml	—	—
Octan-Na 0,01 M + albumin 0,025%	—	—	1 ml	1 ml
Bufor fosforanowy 0,1 M, pH 7,7	1 ml	1 ml	1 ml	1 ml
Na ₂ S 0,002 M + cystyna 0,001 M	1 ml	1 ml	1 ml	1 ml
Na ₂ SO ₃ 0,002 M	1 ml	—	1 ml	—
Woda	—	1 ml	—	1 ml
Przyrost tiosiarczanu (μmole)				
średnio	0,65	—	0,24	—
zakres	0,55 - 0,78	—	0,20 - 0,28	—

rodanku traktowany metodą Sörbo, nie uwzględniono go też w próbach odniesienia.

Układy Nr II i IV stanowiły próby odniesienia odpowiednio dla układów I i III.

Powyższe doświadczenia potwierdzają sformułowane poprzednio przypuszczenie, że rodanaza może być biologicznym katalizatorem również dla powstawania tiosiarczanu w toku reakcji wykazującej daleko idące podobieństwo do reakcji prowadzącej do powstawania rodanku.

c) Katalityczny wpływ rodanazy w układzie dwusiarczek - siarczyn

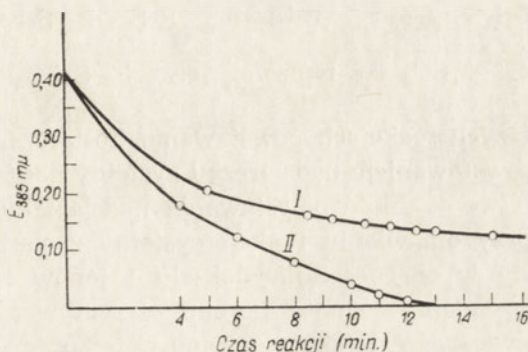
Dla zbadania katalitycznego wpływu rodanazy na reakcję siarczynu z dwusiarczkiem nieorganicznym, w czasie której powstaje tiosiarczan, zastosowano substraty w znacznym rozcieńczeniu i stężenie jonów wodorowych zbliżone do tego jakie występuje w tkankach. Zaznaczyć należy, że ze względu na trudność otrzymania roztworu dwusiarczku sodu o ściśle określonym składzie, wartość jego stężenia jest tylko przybliżona i odpowiada stężeniu siarczku, z którego otrzymano dwusiarczek. Roztwór siarczynu sporządzony był w 0.01 M-buforze fosforanowym, pH 7,8. Najdogodniejszym sposobem oznaczania szybkości reakcji okazało się oznaczanie spadku ekstynkcyjności roztworu dla długości fali 385 mμ, gdyż, jak wynika z przeprowadzonych badań, ekstynkcyjność dwusiarczku dla tej długości fali jest wybitnie zaznaczona, a dla innych związków siarki nie wykazuje znaczniejszych wartości.

W naczynkach spektrofotometru „Uvispec“ Hilgera umieszczano:

(I) 0,5 ml H_2O ; 1 ml Na_2S_2 0,0025 M; 1 ml Na_2SO_3 0,0025 M; 0,1 ml octanu sodu 0,01 M zawierającego 0,025% albuminu.

(II) 0,5 ml H_2O ; 1 ml Na_2S_2 0,0025 M; 1 ml Na_2SO_3 0,0025 M; 0,1 ml roztworu rodanazy (0,1 j.).

(III) 0,5 ml H_2O ; 1 ml Na_2S_2 0,0025 M; 1 ml buforu fosforanowego, pH 7,8, 0,01 M.



Rys. 3. Wpływ rodanazy na reakcję dwusiarczku nieorganicznego z siarczynem. (I) ubywanie dwusiarczku w roztworze dwusiarczku i siarczynu bez rodanazy; (II) ten sam układ z rodanazą. Ubywanie dwusiarczku mierzono spadkiem ekstynkcji roztworu dla długości fali 385 mμ. Skład doświadczenia w tekście

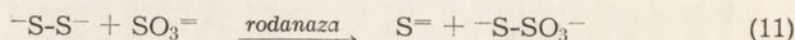
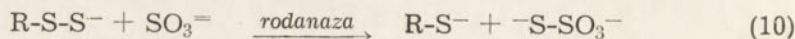
Pomiary przeprowadzono w temperaturze 20°. Typowy obraz szybkości spadku ekstynkcji dwusiarczku przedstawiono na Rys. 3, z którego widać, że rodanaza zdecydowanie przyspiesza reakcję dwusiarczku z siarczynem.

OMÓWIENIE WYNIKÓW

Poprzednie badania [25, 26] wskazują na to, że tiosiarczan jest głównym metabolitem w biologicznych przemianach siarki, prowadzących do powstania siarczynu jako końcowego produktu. Mechanizm powstawania tiosiarczynu nie jest jednak dostatecznie wyjaśniony; dotychczas opisano tylko jedną reakcję przebiegającą pomiędzy kwasem merkaptopirogronowym i siarczynem [23], w toku której tiosiarczan może powstawać w warunkach fizjologicznych. Reakcja między kwasem merkaptopirogronowym i siarczynem jest zapewne ważną drogą powstawania tiosiarczynu, ale z pewnością nie jest drogą jedyną i doświadczenia przedstawione w tej pracy wskazują na możliwość powstawania tiosiarczynu w wyniku innych reakcji.

Jedną z opisanych w tej pracy dróg powstawania tiosiarczynu prowadzi przez reakcję siarczynu z siarczynem w obecności dwusiarczku

organicznego, druga przez reakcję dwusiarczku nieorganicznego z siarczynem. Obie reakcje są katalizowane przez enzym rodanazę, którego rolę ograniczono dotychczas do udziału w procesie powstawania rodanku, a która w świetle opisanych w części doświadczalnej wyników zyskuje o wiele donioślejsze znaczenie biologiczne. Reakcje katalizowane przez rodanazę prowadzące do powstawania tiosiarczuanu można przedstawić następującymi wzorami:



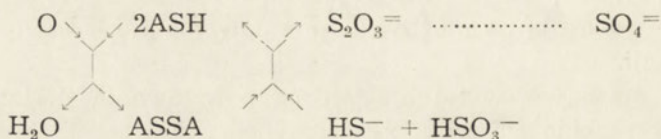
W obu powyższych reakcjach powstawanie tiosiarczuanu związane jest z przejściowym powstawaniem nadsiarczku cysteiny bądź też dwusiarczku nieorganicznego. Ewentualność powstawania nadsiarczku cysteiny brano już pod uwagę przy omawianiu reakcji cysteiny z siarką [9] i procesu degradacji cystyny w obecności pirydoksalu i jonów miedziowych [1], dotychczas nie posiadamy jednak sposobu otrzymywania tego związku i nie znamy jego własności. Reakcje opisane w tej pracy wskazują na to, że nadsiarczek cysteiny może powstawać w reakcji cystyny z siarkowodorem, i że powstawanie tego związku spełnia ewentualnie ważne zadanie w metabolizmie siarki.

Powstawanie dwusiarczku nieorganicznego w toku metabolizmu siarki zostało udowodnione [9, 24], a doświadczenia opisane w tej pracy wskazują na to, że nieorganiczny dwusiarczek może reagować z siarczynem prowadząc do powstawania tiosiarczuanu, przy czym reakcja ta jest katalizowana przez enzym rodanazę. Dwusiarczek nieorganiczny byłby więc w świetle tych faktów poprzednikiem metabolicznym tiosiarczuanu.

Stwierdzenie reakcji powstawania tiosiarczuanu z siarczynu i siarczku kosztem jednoczesnej redukcji dwusiarczku organicznego w myśl ogólnej reakcji:



rzuca pewne światło na biologiczne znaczenie tych przemian. Reakcja ta wskazuje, że metabolity związków siarkowych wpływają na równowagę pomiędzy grupami tiolowymi i dwusiarczkowymi i że stan równowagi może być utrzymany dzięki jednoczesnemu działaniu mechanizmu utleniającego grupy tiolowe do dwusiarczkowych w myśl schematu:



Panu Profesorowi Dr B. Skarżyńskiemu składam serdeczne podziękowanie za zainteresowanie tą pracą i zachętę do jej wykonania.

STRESZCZENIE

Badano reakcje prowadzące do powstawania tiosiarczanu, który w świetle ostatnich badań jest głównym metabolitem w biologicznych przemianach siarki wiodących do siarczanu. Wyniki uzyskane i przedstawione w tej pracy wskazują, że tiosiarczan może powstawać z pierwszych nieorganicznych metabolitów siarki, to jest z siarczku i siarczynu w obecności dwusiarczku organicznego (cystyna, utleniony glutation) oraz z dwusiarczku nieorganicznego i siarczynu, przy czym obie te reakcje są katalizowane przez rodanazę. Rodanaza katalizuje również reakcje powstawania rodanku w układzie siarczek - cyjanek - cystyna. Stwierdzenie przebiegu powyższych reakcji rzuca nowe światło na mechanizm powstawania tiosiarczanu i na biologiczną rolę rodanazy.

LITERATURA

- [1] Cavallini D., de Marco C., Mondovi B., *Arch. Biochem. Biophys.* **87**, 281, 1960.
- [2] Chatagner F., Bergeret B., Sejourne T., Fromageot Cl., *Biochim. Biophys. Acta* **9**, 340, 1960.
- [3] Eldjarn L., Sverdrup A., *Acta Chem. Scand.* **9**, 1037, 1955.
- [4] Fromageot Cl., w *La Biochimie du Soufre, Coll. Intern. du Centre Nat. Recherche Scient.*, str. 58, CNRS, Paris 1955.
- [5] Fromageot Cl., Royane M., *Helv. Chim. Acta* **29**, 1279, 1946.
- [6] Fromageot Cl., Wooley E., Chaix P., *Enzymologia* **9**, 198, 1940.
- [7] Fromageot P., Chapeville F., *Proceedings of the Fourth Intern. Congress of Biochemistry, Vienna*, Vol. 13 str. 69. Pergamon Press, 1958.
- [8] Handler P., Fridovich I. w *La Biochimie du Soufre, Coll. Intern. du Centre Nat. Recherche Scient.*, str. 83, CNRS, Paris 1955.
- [9] Hylin J. W., Wood J. L., *J. Biol. Chem.* **234**, 2141, 1959.
- [10] Kurtenacker A., Wollak R., *Z. anorg. allgem. Chem.* **161**, 201, 1927.
- [11] Lang K., *Biochem. Z.* **259**, 243, 1933.
- [12] Mauthner J., *Z. physiol. Chem.* **78**, 28, 1912.
- [13] Pirie N. W., *Biochem. J.* **28**, 305, 1934.
- [14] Schmidt M., Talsky G., *Ber.* **90**, 1673, 1957.
- [15] Schöberl A., Kawohl M., Hamm R., *Ber.* **84**, 571, 1951.
- [16] Singer T. P., Kearney F. B., w *Aminoacids Metabolism* (W. D. McElroy i B. Glas, Ed.) str. 558. J. Hopkins Press, Baltimore, 1955.
- [17] Skarżyński B., Szczepkowski T. W., *Nature* **183**, 1413, 1959.
- [18] Skarżyński B., Szczepkowski T. W., Weber M., *Nature* **184**, 994, 1959.
- [19] Skarżyński B., Szczepkowski T. W., Weber M., *Acta Biochim. Polon.* **7**, 105, 1960.
- [20] Sörbo B., *Acta Chem. Scand.* **7**, 1129, 1953.
- [21] Sörbo B., w *La Biochimie du Soufre, Coll. Intern. du Centre Nat. Recherche Scient.*, str. 57, CNRS, Paris 1955.

- [22] Sörbo B., *Biochim. Biophys. Acta* **23**, 412, 1957.
[23] Sörbo B., *Biochim. Biophys. Acta* **24**, 324, 1957.
[24] Sörbo B., *Biochim. Biophys. Acta* **38**, 349, 1960.
[25] Szczepkowski T. W., Skarżyński B., Weber M., *Nature* **189**, 1007, 1961.
[26] Weber M., Szczepkowski T. W., Skarżyński B., *Acta Biochim. Polon.* **8**, 71, 1961.

THE ROLE OF RHODANASE
IN METABOLIC FORMATION OF THIOSULPHATE

S u m m a r y

Reactions leading to the formation of thiosulphate which in the light of latest research results is the main metabolite in the biological transformation of sulphur to sulphate, were investigated. The results obtained indicate that thiosulphate may be formed from the first inorganic sulphur metabolites, i.e. from sulphide and sulphite in the presence of organic disulphide (cystine, oxidated glutathione) and from inorganic disulphide and sulphite. Both these reactions are catalyzed by rhodanase. The latter also catalyzes rhodanate formation in the system sulphide-cyanide-cystine. The establishment of these reactions throws new light on the mechanism of thiosulphate formation and the biological role of rhodanase.

Otrzymano 3.12. 1960

T. W. SZCZEPKOWSKI

MODELOWE REAKCJE MECHANIZMU DZIAŁANIA RODANAZY

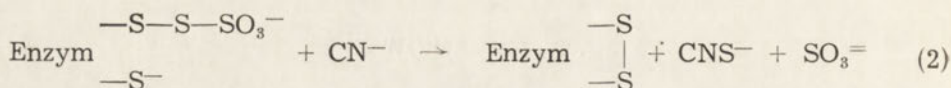
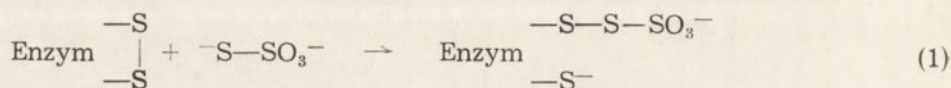
*Zakład Chemii Fizjologicznej Akademii Medycznej w Krakowie
Kierownik Zakładu: Prof. Dr Bolesław Skarżyński*

W toku badań nad procesem biosyntezy tiosiarczanu w ustroju zwierzęcym uzyskano dowody na to [17], że reakcje prowadzące do powstania tego związku z pierwszych nieorganicznych metabolitów siarkowych mogą być katalizowane przez enzym rodanazę opisany po raz pierwszy w 1933 roku przez Langa [3]. Enzym katalizuje powstawanie rodanku z tiosiarczanu i cyjanku [3] oraz z dwusiarczku i cyjanku [14]. Zaobserwowano również wpływ katalityczny rodanazy na reakcje etanosulfotianianu¹ i toluenosulfotianianu z siarczynem, nie wiążąc tego jednak z biologiczną rolą tego enzymu [13]. Rodanaza występuje w pokaźnych ilościach w większości tkanek zwierzęcych i właśnie fakt ten pozostaje w pewnej sprzeczności z bardzo ograniczoną produkcją rodanku zdającego się występować właściwie tylko jako uboczny produkt metabolizmu. Wykazany udział rodanazy w syntezie tiosiarczanu rzuca na ten enzym zupełnie nowe światło, wiążąc go z powstawaniem jednego z głównych pośrednich metabolitów siarki [19, 20], co z kolei skłania do zajęcia się dokładniejszym wyjaśnieniem mechanizmu działania tego enzymu.

Badania Saundersa i Himwicha [5] zdawały się wskazywać na to, że grupą prostetyczną rodanazy jest jakiś ciężki metal, jednak Sörbo, który pierwszy uzyskał rodanazę w postaci krystalicznej [11] przedstawił szereg dowodów przemawiających za występowaniem czynnego ugrupowania dwusiarczkowego w cząsteczce tego enzymu [9]. Mechanizm działania rodanazy miałby według tego autora [10] polegać na reakcji tiosiarczanu z ugrupowaniem dwusiarczkowym enzymu. Powstający w ten

¹ Dla związków typu $R-SO_2SH$ zastosowałem w tej pracy określenie kwasy sulfotianowe, w odróżnieniu od związków typu $R-S-S-SO_3H$ nazwanych kwasami tiosiarczanowymi [16].

sposób związek reagowałby z kolei z cyjankiem, dając rodanek i siarczyn według wzorów:



W myśl tej hipotezy istotnym warunkiem w powstawaniu rodanku byłaby reakcja jonu cyjankowego z ugrupowaniem $-\text{S}-\text{S}-\text{SO}_3^-$ przebiegająca z odszczepieniem siarczynu i przejściowym utworzeniem ugrupowania $-\text{S}-\text{SCN}$, z którego powstawałby rodanek. Do niedawna związki organiczne z ugrupowaniem dwutiosulfonowym $-\text{S}-\text{S}-\text{SO}_3^-$ nie były znane, a co za tym idzie niemożliwe było modelowe sprawdzenie słuszności hipotetycznego mechanizmu działania rodanazy. Niedawno uzyskałem jednak pierwszy taki związek organiczny, posiadający ugrupowanie, jakie miałyby powstawać w rodanazie pod wpływem tiosiarczanu [16, 18]. Jest nim kwas cysteintiosulfonowy: $\text{HOOC} \cdot \text{CHNH}_2 \cdot \text{CH}_2-\text{S}-\text{S}-\text{SO}_3\text{H}$, którego powstawanie obserwowałem w czasie działania tiosiarczanu na cystynę i cysteiny na tetrationian. Preparatywnie otrzymałem ten związek utleniając jodem mieszaninę tiosiarczanu i cysteiny. Własności i dowód budowy kwasu cysteintiosulfonowego przedstawiam na innym miejscu [18], podając poniżej tylko sam sposób jego otrzymywania. Utleniając jodem mieszaninę glutationu i tiosiarczanu otrzymałem również kwas glutationotiosulfonowy.

Posiadanie połączeń zawierających ugrupowanie $-\text{S}-\text{S}-\text{SO}_3^-$ umożliwiło przebadanie ich reakcji z cyjankiem, a więc przeprowadzenie modelowej reakcji takiej, jaka według Sörbo byłaby istotna dla udziału rodanazy w toku biosyntezy rodanku. Niniejsza publikacja przedstawia wyniki tych badań.

Stosowane metody i odczynniki

Do doświadczeń stosowano preparat L-cysteiny pochodzący z f-my Fluka i glutation z f-my Eastman. Uwodniony tiosiarczan sodowy pochodził z Biura Obrotu Odczynniki w Gliwicach i był chromatograficznie jednorodny. Radioaktywny tiosiarczan znakowany siarką ^{35}S w pozycji zewnętrznej pochodził z Radiochemical Centre Amersham.

Chromatogramy były rozwijane w rozpuszczalnikach: (A) I-rzędowy butanol, aceton, woda w stosunku objętościowym 2 : 2 : 1. (B) Fenol nasycony wodnym roztworem zawierającym 6,3% cytrynianu sodu i 3,7%

dwuwodorofosforanu sodu. Barwienie plam cysteiny i kwasu cysteinosulfonowego oraz glutationu i jego pochodnych przeprowadzano izażyną lub ninhydryną, a barwienie plam tiosiarczanu i jego pochodnych azotanem srebra metodą opisaną uprzednio [8].

Autoradiogramy sporządzano na błonach rentgenowskich f-my Kodak.

Otrzymywanie kwasu cysteinosulfonowego. Rozpuszczano 15 mmoli cysteiny w 10 ml wody i roztwór oziębiano w lodówce do temperatury ok. 0°. Osobno przygotowywano roztwór 100 mmoli uwodnionego tiosiarczanu sodu w 30 ml wody i również oziębiano do 0°. Do kolby Erlenmeyera odważano 116 mmoli jodu i 20 mmoli węglanu baru i oziębiano w lodówce wraz z poprzednimi roztworami. Tuż przed przeprowadzeniem reakcji mieszano ze sobą oziębione roztwory cysteiny i tiosiarczanu, po czym otrzymaną mieszaninę wlewano do kolby zawierającej jod i węglan baru. Celem możliwie szybkiego przeprowadzenia reakcji, energicznie wstrząsano kolbą. Koniec reakcji zaznaczał się trwałym brunatnym zabarwieniem roztworu, ponieważ jod dodany był w nadmiarze w stosunku do cysteiny i tiosiarczanu. Po zakończeniu reakcji, roztwór sączono przez sączek porcelanowy, celem oddzielenia od węglanu baru i niewielkiej ilości cystyny. Do przesączu dodawano 800-900 ml acetonu i zostawiano w lodówce na okres ok. 3 godzin. Wytrącony, objętościowo obfity osad soli barowej kwasu cysteinosulfonowego odsączano na sączku porcelanowym i na sączku przemywano acetonem do zaniku brunatnego zabarwienia pochodzącego od jodu. Sól barowa powstaje z wydajnością prawie ilościową.

Sól barową kwasu cysteinosulfonowego przeprowadzano w sól sodową w ten sposób, że po rozpuszczeniu jej w małej ilości wody dodawano siarczan sodu. Po odsączeniu siarczanu baru, do przesączu dodawano metanol do stężenia końcowego 70% i wytrącano cysteinosulfonian sodu dodatkiem eteru w ilości ok. 400 ml na 50 ml roztworu metanolowego.

Radioaktywny kwas cysteinosulfonowy. R-S-*S-SO₃H w postaci soli sodowej otrzymywano metodą powyżej opisaną po zastosowaniu do reakcji tiosiarczanu sodowego znakowanego ³⁵S w pozycji zewnętrznej (³⁵S-SO₃⁼). W tym przypadku stosowano jednak tiosiarczan w stosunku do cysteiny w ilościach molowych 1 : 1.

Sól sodowa kwasu glutationosulfonowego. Związek ten otrzymano utleniając jodem mieszaninę glutationu i tiosiarczanu. Reakcję przeprowadzano z zachowaniem warunków opisanych powyżej dla syntezy kwasu cysteinosulfonowego. Do reakcji stosowano 2 mmole glutationu i 20 mmoli tiosiarczanu. Sól sodowa kwasu glutationosulfonowego wytrąca się z roztworu wodnego metanolem, całkowite wytrącenie uzyskuje się niewielkim dodatkiem eteru.

Tiosiarczan oznaczano kolorymetrycznie metodą Sörbo [12]. W tym celu do badanego roztworu dodawano roztwór cyjanku potasu i roztwór chlorku miedziowego, po czym wytworzony z tiosiarczanu rodanek oznaczano kolorymetrycznie z odczynnikiem żelazowym.

Cyjankę oznaczano miareczkowo po oddestylowaniu go z badanego roztworu, do którego dodano roztwór kwasu borowego i po absorpcji w roztworze azotanu rtęciowego [2]. Nadmiar azotanu rtęciowego nie związanego oznaczano miareczkując 0,05 N-roztworem rodanku potasu wobec roztworu alunu żelazowego jako wskaźnika. Oddestylowanie cyjanku przeprowadzano w aparacie Parnasa-Wagnera przeznaczonym do oznaczania azotu.

Odczynnik żelazowy służący do oznaczania rodanku sporządzano przez rozpuszczenie 100 g $\text{Fe}(\text{NO}_3)_3 \cdot 9\text{H}_2\text{O}$ w 200 ml 65% kwasu azotowego i uzupełnienie wodą do 1000 ml. Dla kolorymetrycznego oznaczenia rodanku wobec tiosiarczanu stosowano dodatek metanal [11].

Wszystkie oznaczenia przeprowadzano w temperaturze pokojowej ok. 20°.

Symbolem R oznaczono w tej pracy rodnik aminopropionowy $\text{HOOC} \cdot \text{CHNH}_2 \cdot \text{CH}_2-$, a symbolem Gl resztę glutationu pozostałą po odjęciu grupy wodorosiarczkowej.

CZĘŚĆ DOŚWIADCZALNA

Reakcje cyjanku z kwasem cysteinotiosulfonowym

Reakcje przeprowadzano zachowując warunki stosowane podczas oznaczania rodanazy [11]. W probówkach umieszczano 1 ml 0,1 M-roztworu soli sodowej kwasu cysteinotiosulfonowego i dodawano do nich 1 ml mieszaniny złożonej z równych objętości 0,2 M-roztworu pierwszorzędowego fosforanu potasu i 0,2 M-mianowanego roztworu cyjanku potasu. W czterech równoległych próbkach oznaczano: (a) ilość powstałego rodanku, (b) ilość rodanku powstałego po dodaniu do mieszaniny cysteiny, (c) ilość wytworzonego tiosiarczanu, (d) ilość zużytego cyjanku.

Ilość powstałego rodanku oznaczano bezpośrednio w próbce dodając 0,5 ml 38% metanal i 2,5 ml odczynnika żelazowego. Ilość zużytego cyjanku oznaczano miareczkowo po oddestylowaniu go z roztworu metodą opisaną powyżej. Wytworzony w toku reakcji tiosiarczan oznaczano po 50-krotnym rozcieńczeniu próbki wodą. Do 1 ml rozcieńczonej próbki i dodawano 3,2 ml wody, 0,5 ml 0,1 M-KCN, 0,3 ml 0,1 M- CuCl_2 i 2 ml odczynnika żelazowego. Mierzono ekstynkcję roztworu dla długości fali i 460 m μ i stężenie tiosiarczanu oznaczano przez porównanie z wartościami i ekstynkcji uzyskanymi dla wzorcowych roztworów tiosiarczanu traktowanych w identyczny sposób jak roztwór badany.

Dla kontroli próby (a) dodawano do roztworu cysteinotiosulfonianu sodu cyjanek po uprzednim dodaniu metanalu i odczynnika żelazowego. Dla kontroli próby (c) dodawano odczynnik żelazowy przed cyjankiem i chlorkiem miedziowym. W obu przypadkach zastosowanie odczynnika żelazowego zakwaszającego roztwór uniemożliwiało przebieg poniżej opisanych reakcji.

Po zmieszaniu roztworu cysteinotiosulfonianu z cyjankiem znikał wolny cyjanek, ale wbrew temu czego należało się spodziewać w myśl hipotezy Sörbo, zasadniczym produktem powstającym z grup $-S-S-SO_3^-$ był tiosiarczan. Reakcja przebiega tak szybko, że już w czasie dłuższym niż 2 minuty od chwili dodania cyjanku do roztworu cysteinotiosulfonianu skład ilościowy produktów reakcji nie ulega zmianie. Skład ten przedstawia Tablica 1.

Tablica 1

Wyniki oznaczeń produktów reakcji cyjanku z cysteinotiosulfonianem sodowym
Reakcje przeprowadzano w temperaturze pokojowej 20°. Czas reakcji 2 minuty

Odczynnik	µmole	
	dodano	oznaczono
Cysteinotiosulfonian sodu	100	—
Cyjanek potasu	100	0,00
Rodanek	—	1—4
Tiosiarczan	—	96—99

Ilość powstałego rodanku nie wzrastała, gdy do mieszaniny cysteinotiosulfonianu i cyjanku dodano cysteiny, jak by należało się spodziewać w myśl hipotezy Sörbo.

Dla bliższego zbadania reakcji zastosowano cysteinotiosulfonian znakowany siarką ^{35}S w pozycji środkowej $R-S-^{35}S-SO_3Na$. Po zadziałaniu cyjankiem w ilości molowej 1 : 1, mieszaninę reagującą poddawano chromatografii bibułowej w rozpuszczalniku (A) i z uzyskanych chromatogramów sporządzano autoradiogramy. Taki autoradiogram przedstawia Fot. 1 i widać z niego, że główna aktywność zgromadzona jest w plamie odpowiadającej tiosiarczanowi, a tylko drobna część aktywności znajduje się w miejscu plamy rodanku. Poza plamą odpowiadającą tiosiarczanowi i rodankowi nie występują na autoradiogramie plamy odpowiadające innym związkom.

Powyższe wyniki nie tłumaczą jakim losom ulega w toku tej reakcji znaczna większość zużytego cyjanku. Należało przypuszczać, że wchodzi on w jakieś połączenie z resztą cysteiny. Dla wyjaśnienia tej sprawy przygotowano chromatogramy bibułowe rozwinięte w rozpuszczalniku (A) produktów reakcji cyjanku z cysteinotiosulfonianem. Chromatogramy bar-



Fot. 1. Autoradiogram produktów reakcji cyjanku z cysteinotiosulfonianem znakowanym siarką ^{35}S ($\text{R-S-}^*\text{S-SO}_3\text{Na}$) otrzymany z chromatogramu rozwiniętego chromatografią wstępującą w rozpuszczalniku (A). Dolna plama — tiosiarczan, górna słabo zaznaczona — rodanek

wiono równolegle izatyną i azotanem srebra [8]. Barwienie azotanem srebra wykazało oprócz plamy tiosiarczanu jeszcze jedną plamę barwiącą się z wolną tym odczynnikiem. Plama ta położona nieco powyżej plamy tiosiarczanu, prawdopodobnie odpowiada połączeniu cyjanku z cysteiną, $R_F = 0,15 - 0,18$. Połączenie to nie zawiera jednak wolnej grupy aminowej, gdyż chromatogramy barwione izatyną nie wykazują żadnej plamy barwnej. Zagadnienie to zostanie omówione podczas interpretacji otrzymanych wyników.

Tablica 2

Wyniki oznaczeń produktów reakcji cyjanku z glutationotiosulfonianem sodowym
Reakcje przeprowadzono w temperaturze pokojowej 20°

Odczynnik	μmole	
	dodano	oznaczono
Glutationotiosulfonian sodu	20	—
Cyjanek potasu	20	0,00
Rodanek	—	ślady
Tiosiarczan	—	18—20

Reakcje cyjanku z glutationotiosulfonianem

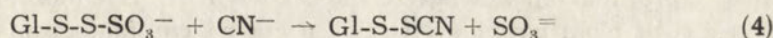
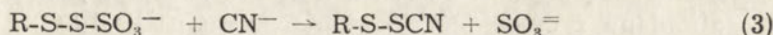
Oznaczenia powstałego rodanku, zużytego cyjanku i powstałego tiosiarczanu przeprowadzono w sposób opisany powyżej. Do badań stosowano roztwory bardziej rozcieńczone $0,02\text{ M}$ -glutationotiosulfonianu sodowego. Wyniki oznaczeń przedstawia Tablica 2.

Chromatogramy mieszaniny reagującej rozwijano w rozpuszczalniku (B). Po wybarwieniu izatyną na chromatogramach produktów reakcji cyjanku z glutationotiosulfonianem uwidoczniają się dwie plamy barwne:

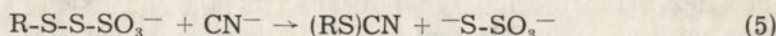
jedną o R_F 0,02, a druga o R_F 0,16. Glutationotiosulfonian daje w tych warunkach tylko jedną plamę o R_F 0,05.

DYSKUSJA

W myśl hipotezy Sörbo [10] reakcje cyjanku z cysteino-tiosulfonianem i glutationotiosulfonianem powinny wyrażać się następującymi wzorami:

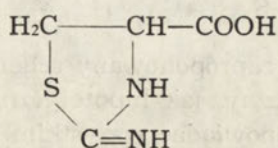
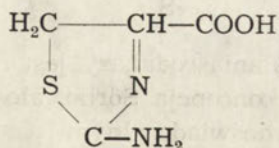


Wyniki podane w części doświadczalnej wykazują jednak, że głównym produktem, powstającym z grupy -S-S-SO_3^- pod wpływem działania cyjanku, jest wolny tiosiarczan. Reakcja ta więc jest reakcją cyjanolizy prowadzącą do powstania tiosiarczanu i jakiegoś połączenia grupy cyjanowej z cysteiną względnie glutationem:



Z teoretycznego punktu widzenia taki właśnie przebieg reakcji cyjanolizy może znaleźć wytłumaczenie w oparciu o teorię elektronową. W cysteinotiosulfonianie powinna wystąpić polaryzacja wiązań między atomami siarki wywołana indukcyjnym wpływem grup: $\text{-CH}_2\text{-}$ i -SO_3^- . W wyniku oddziaływania tych grup siarka związana z węglem występującym na -2 stopniu utlenienia powinna uzyskać ładunek dodatni, natomiast siarka związana z grupą -SO_3^- powinna uzyskać odpowiednio ładunek ujemny [15], w myśl schematu: $\text{-CH}_2\text{-S}^+\text{-S}^-\text{-SO}_3^-$. Jon cyjanowy jako typowy podstawnik nukleofilny powinien reagować przede wszystkim z siarką posiadającą ładunek dodatni.

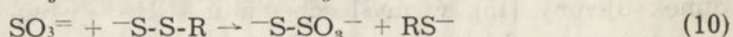
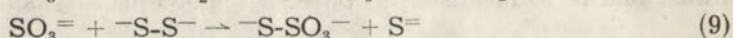
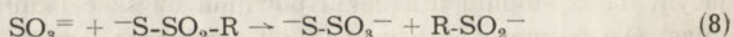
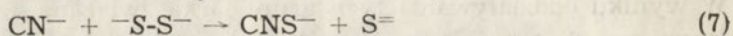
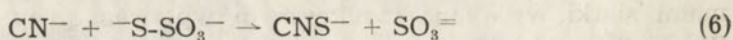
Pozostaje do wyjaśnienia sprawa połączenia cyjanku z cysteiną. Należałoby się spodziewać, że produktem tym jest tiocyjanoalanina $\text{HOOC}\cdot\text{CH}_2\text{NH}_2\cdot\text{CH}_2\text{-SCN}$, która według Mauthnera [4], a początkowo również Schöberla i Hamma [6], powstaje w czasie cyjanolizy cystyny i posiada budowę liniową. Nowsze badania wykazały jednak, że tiocyjanoalanina ulega cyklizacji z wytworzeniem dwóch form tautomerycznych [7]:



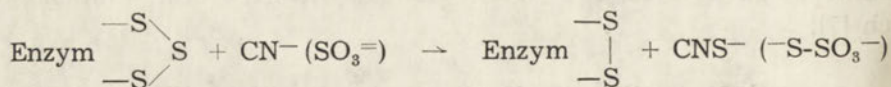
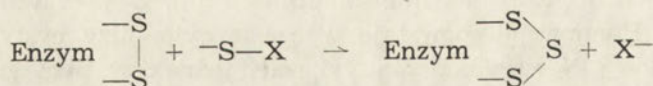
Cykliczne tiazolinowe względnie tiazolidynowe pochodne tiocyjanoalaniny nie barwią się ninhydryną [7] i wprowadzone do organizmu szczura nie ulegają metabolizmowi i nie mogą służyć jako źródło rodanku [21]. Fakt, że chromatogramy produktów reakcji cysteinotiosulfonianu z cyjankiem nie wykazują obecności związków barwiących się izatyną, świadczy, że w toku reakcji powstają cykliczne postacie tiocyjanoalaniny.

W przypadku reakcji glutationotiosulfonianu z cyjankiem przebiegającej w myśl podanych wyników w taki sam sposób jak reakcja cysteinotiosulfonianu z cyjankiem, powstający produkt, G1-SCN, może również ulegać przemianom wewnątrzcząsteczkowym [1]. Być może, że występowanie dwóch plam barwiących się izatyną na chromatogramach produktów reakcji glutationotiosulfonianu jest właśnie wynikiem istnienia dwóch takich odmian.

Jakkolwiek wyniki badań przedstawionych w tej pracy przemawiają przeciwko słuszności proponowanego przez Sörbo mechanizmu działania rodanazy, to jednak koncepcja grupy dwusiarczkowej jako aktywnego centrum tego enzymu wydaje się być skądinąd uzasadniona. Rodanaza przecież katalizuje nie tylko reakcje między cyjankiem i tiosiarczanem [3], ale również między cyjankiem i dwusiarczkiem [14], między sulfo-tionianami i siarczynem [3], między dwusiarczkiem nieorganicznym i siarczynem [17] oraz między nadsiarczkami organicznymi i siarczynem [17] w myśl wzorów:



Rozpatrując powyższe reakcje możnaby zaproponować wspólny mechanizm dla wytłumaczenia ich katalitycznego przebiegu, dający się wyrazić następującym schematem:



Oczywiście, zaproponowany schemat działania rodanazy jest również tylko hipotetyczny, jak hipotetyczna była koncepcja Sörbo, ale wydaje się on lepiej odpowiadać wszystkim faktom doświadczalnym.

Panu Profesorowi Dr Bolesławowi Skarżyńskiemu serdecznie dziękuję za pomoc i zachętę do wykonania tej pracy.

STRESZCZENIE

Przeprowadzono modelowe sprawdzenie mechanizmu działania rodanazy zaproponowanego przez Sörbo. Wykazano, że cyjanek reaguje ze związkami zawierającymi ugrupowanie dwutiosulfonowe $-S-S-SO_3^-$ a mianowicie z otrzymanym po raz pierwszy kwasem cysteinotiosulfonowym i glutationotiosulfonowym w ten sposób, że odszczepia tiosiarczan. Reakcje te nie prowadzą do powstania rodanku ani bezpośrednio ani po dodaniu do produktów reakcji cysteiny. Produktem reakcji cyjanku z cysteinotiosulfonianem oprócz tiosiarczanu jest tiocyjanoalanina ulegająca izomeryzacji do produktu nie barwiącego się ninhydryną względnie izatyną. Uzyskane fakty doświadczalne przemawiają przeciw hipotezie Sörbo tłumaczącej mechanizm działania rodanazy.

LITERATURA

- [1] Aldrich W. N., *Biochem. J.* **48**, 271, 1951.
- [2] Kolthoff I. M., *Die Massanalyse*, Cz. 2, str. 255, Springer, Berlin 1928.
- [3] Lang K., *Biochem. Z.* **259**, 243, 1933.
- [4] Mauthner J., *Z. physiol. Chem.* **78**, 28, 1912.
- [5] Saunders J. P., Himwich W. A., *Am. J. Physiol.* **163**, 404, 1950.
- [6] Schöberl A., Hamm R., *Ber.* **81**, 210, 1948.
- [7] Schöberl A., Kawohl M. Hamm R., *Ber.* **84**, 571, 1951.
- [8] Skarżyński B., Szczepkowski T. W., *Nature* **183**, 1413, 1959.
- [9] Sörbo B., *Acta Chem. Scand.* **5**, 724, 1951.
- [10] Sörbo B., *Acta Chem. Scand.* **5**, 1218, 1951.
- [11] Sörbo B., *Acta Chem. Scand.* **7**, 1129, 1953.
- [12] Sörbo B., *Biochim. Biophys. Acta* **23**, 412, 1957.
- [13] Sörbo B., *Acta Chem. Scand.* **11**, 628, 1957.
- [14] Sörbo B., *Biochim. Biophys. Acta* **38**, 340, 1960.
- [15] Szczepkowski T. W., *Wiadomości Chem.* **9**, 109, 1955.
- [16] Szczepkowski T. W., *Nature* **182**, 934, 1958.
- [17] Szczepkowski T. W., *Acta Biochim. Polon.* **8**, 251, 1961.
- [18] Szczepkowski T. W., *Roczniki Chem.* **35**, 563, 1961.
- [19] Szczepkowski T. W., Skarżyński B. i Weber M., *Nature* **189**, 1008, 1961.
- [20] Weber M., Szczepkowski T. W., Skarżyński B., *Acta Biochim. Polon.* **8**, 71, 1961.
- [21] Wood J. L., Cooley S. L., *J. Biol. Chem.* **218**, 449, 1956.

MODEL REACTIONS OF THE MECHANISM OF RHODANASE ACTION

Summary

A model reaction to prove the mechanism of the action of rhodanase suggested by Sörbo was carried out.

The reactions of cyanide with compounds containing dithiosulphonic groups $S-S-SO_3^-$, cysteinethiosulphonic acid (obtained for the first time) and glutathionethiosulphonic acid, were investigated. It was found that cyanide splits off the thiosulphate and the rhodanate is not formed either directly or after the addition of cysteine to the reaction product.

Another product of reaction of cyanide with cysteinethiosulphate is thiocytaralanine which undergoes isomerization to a product which does not stain with ninhydrin or isatin. The experimental results obtained are not in agreement with the hypothesis of Sörbo concerning the mechanism of rhodanase action.

Otrzymano 17.2.1961

RECENZJE KSIĄŻEK

PROBLEMS IN PHOTOSYNTHESIS. W. Bladergroen. American Lecture Series. Charles C. Thomas Publishers, Springfield, Illinois, USA. 1960. Stron 198. Rys. 70.

W badaniu fotosyntezy bardziej niż innych zjawisk biochemicznych zaznacza się konieczność równoczesnego oparcia się na pojęciach i metodach zarówno fizyki, jak i chemii. Ten dezyderat, coraz mocniej wyrażany przez współczesną biochemię, nie jest łatwy do wypełnienia dla wielu czytelników prac biochemicznych. Książki Bladergroena mogą być w tej dziedzinie istotną pomocą. Tak jak „Wstęp do energetyki i kinetyki procesów biologicznych“ (wydany w polskim tłumaczeniu w 1957 r.), również i recenzowana książka ujmuje te zagadnienia przystępnie a ściśle.

Książkę można podzielić na trzy części: w pierwszej, obejmującej dwa rozdziały, są podane podstawowe wiadomości chemiczne i fotochemiczne niezbędne przy omawianiu fotosyntezy; w drugiej omawia się energetykę fotosyntezy; w trzeciej mieści się przedstawienie chemii tego zjawiska. Podane piśmiennictwo obejmuje prawie 400 pozycji; największy jednak wpływ na bieg myśli Bladergroena wywarły prace Ottona Warburga; umieszczenie na początku książki fotografii tego uczonego oraz dedykowanie mu książki jest tego zewnętrznym wyrazem. Autor przedstawia nie tylko wyniki badań doświadczalnych, ale także opisuje metody i sposoby opracowywania wyników. Liczne ryciny, wykresy i schematy, a także piękny papier i w ogóle bardzo staranne wydanie ułatwiają czytanie tej pożytecznej książki.

Włodzimierz Mozółowski

BIOLOGIE DER GALLENFARBSTOFFE. T. K. With. Georg Thieme Verlag, Stuttgart, 1960. 371 str., 19 rysunków. DM 59. Deutsche Übersetzung von A. Clotten,

Monografia Witha stanowi nowoczesne i wszechstronne opracowanie biologii barwników żółciowych na tle faktów doświadczalnych zebranych przez autora, który może się powołać na własne bogate doświadczenia w tej dziedzinie. Wszechstronność ujęcia tematu powoduje, że książka przemawia do każdego pragnącego zaznajomić się z jej treścią niezależnie od tego, czy będzie nim chemik, analityk, fizjolog, biochemik czy patolog. Każdy interesujący się ze strony swej specjalności barwnikami żółciowymi znajdzie w monografii wiele ciekawych danych i odniesie niewątpliwą korzyść.

With opracował dla swej monografii wyniki licznych badań ogłaszanych w różnych specjalistycznych czasopismach całego świata. Wybiera, cytuje i szerzej omawia tylko te pozycje, które jego zdaniem są istotne dla poznania biologii barwników żółciowych. Autor uwzględnił ponad 900 oryginalnych prac przeważnie z ostatniego dwudziestolecia. Dzięki segregacji uwypuklają się fakty szczegółowo opracowane

tak od strony chemicznej i metodycznej, jak i patofizjologicznej; zarysowuje się obraz całości badań nad barwikami żółciowymi i występują wyraźnie luki wymagające uzupełnienia w dalszych pracach eksperymentalnych.

Duża ilość cytatów i drobiazgowość formy mogą w pierwszej chwili zniechęcać czytelnika nie specjalistę. Po bliższym jednak poznaniu treści i układu książki zainteresowanie i orientacja w całości poruszanych zagadnień wzrasta, gdyż autor bardzo ułatwia zrozumienie całości materiału wprowadzając liczne streszczenia w tekście poszczególnych rozdziałów. Streszczenia te zebrane razem dałyby zwięzłe i jasno napisany artykuł przedstawiający aktualny stan badań nad barwikami żółciowymi i orientujący zarazem o tematyce poszczególnych rozdziałów monografii.

Całość autor podzielił na 11 rozdziałów, z których każdy można czytać i korzystać z niego bez konieczności zaznajamiania się z treścią poprzednich i następnych. Określone rozdziały przeznaczone są dla różnych specjalności takich jak chemia, fizjologia, biochemia, patologia lub biologia. W pierwszym rozdziale została omówiona nomenklatura i budowa barwików pyrolowych, ich podział i najważniejsze metody analityczne. Następne dwa rozdziały zostały poświęcone zagadnieniom przemiany pośredniej barwików żółciowych. Rozdział IV przedstawia nowoczesne poglądy na patogenezę żółtaczek. Dalsze rozdziały interesować już będą szerszą grupę specjalistów. Szczególnie interesujący jest rozdział, w którym autor omawia występowanie i rolę barwików pyrolowych u zwierząt niższych i w roślinach. Ostatni rozdział oświetla krytycznie wartość diagnostyczną poszczególnych metod analitycznych stosowanych w klinikach.

Monografia Witha jest również bardzo cennym podręcznikiem metodycznym. Autor podaje cały szereg prób i metod analitycznych nie ograniczając się jedynie do ich opisu, lecz duży nacisk zostaje położony na interpretację wyników, możliwości popełniania błędów i przydatność danej metody dla diagnozy klinicznej. Przy tej okazji autor dyskutuje celowość wykonywania pracochłonnych i kosztownych analiz mających znaczenie tylko w pewnych badaniach teoretyczno-naukowych a o wątpliwej przydatności dla użytku klinicznego.

Monografię Witha można gorąco polecić każdemu, kto pragnie bliżej zapoznać się z biologią barwików żółciowych lub prowadzić prace badawcze w tej dziedzinie.

Wanda Mejbaum-Katzenellenbogen

Т. ХОЙНАЦКИ И Т. КОЖИВСКИ

ВКЛЮЧЕНИЕ ФОСФОРНЫХ ЭФИРОВ, ГЛИЦЕРОЛА, ХОЛИНА,
ЭТАНОЛАМИНА И СЕРИНА, МЕЧЕНЫХ ^{32}P В ФОСФОЛИПИДЫ РАЗНЫХ
ОРГАНОВ МОРСКОЙ СВИНКИ *IN VITRO*

Резюме

Включение глицерофосфата, фосфохолина и фосфоэтаноламина, меченых ^{32}P в фосфолипиды печени морской свинки *in vitro* уменьшалось в несколько раз если ткань замораживали в течение 5 мин. в температуре -70° , а затем размораживали или же если ткань гомогенизировали. Если же субстратом был фосфосерин, то гомогенизация вызывала увеличение включения в несколько раз. Максимальный процент включения в фосфолипиды составлял: для $^{32}\text{PChol}$ и $\alpha\text{-G}^{32}\text{P}$ приблизительно 1—2%, для ^{32}PEt приблизительно 1% и для PSer около 0,5%.

При трехчасовой инкубации фрагментов почечной ткани с исследуемыми субстратами наблюдалась интенсивная дефосфорилиция $^{32}\text{PSer}$ и $\alpha\text{-G}^{32}\text{P}$ и незначительная дефосфорилиция $^{32}\text{PChol}$ и ^{32}PEt . Из других исследованных тканей почечная ткань полностью гидролизовала все исследуемые субстраты.

Я. М. ЗГЛИЧИНЬСКИ И Т. СТЕЛЬМАШИНЬСКА

СУЛЬФИНОВЫЕ СОЕДИНЕНИЯ
КАК БИОЛОГИЧЕСКИЕ АКЦЕПТОРЫ ДВУХВАЛЕНТНОЙ СЕРЫ

Резюме

Исследовалась реакция цистеинилсульфиновой кислоты или гипотаурина с тиосульфатом в присутствии гемолизата эритроцитов человека. Установлено, что эритроциты содержат ферментативную систему,

катализирующую эту реакцию. Определялись качественно и количественно продукты реакции; установлено, что из цистеинилсульфиновой кислоты и тиотульфата образовалась аланинсульфиновая кислота, а из гипотаурина и тиосульфата — тиотаурин.

Я. ПАВЕЛКЕВИЧ, Б. БАРТОСИНЬСКИ и В. ВАЛЕРЫХ

ФЕРМЕНТАТИВНЫЙ СИНТЕЗ
СВЕТОЧУВСТВИТЕЛЬНЫХ КОБАЛЬТО (II) - КОРРИНОВ *

Резюме

1. Установлено, что суспензии обезвоженных ацетоном клеток *Propionibacterium shermanii* и *Nocardia lutea* превышают ряд кобальто (III) - корринов в светочувствительные кобальто (II) - коррины. Таким образом были получены светочувствительные аналоги: 5,6-диметил-бензимидазолилциано-кобамида (вит. В₁₂), кобинамида (вит. В_{12p}), дифософогуанозино-кобинамида (кобаламина у₁), аденилциано-кобамида (псевдовит. В₁₂), 2-метиладенилциано-кобамида (фактор А), 5-гидроксibenзимидазолилгидрокси-кобамида (гидрокси форма вит. В_{12 III}), 5-метилбензимидазолилгидрокси-кобамида и 5-этоксibenзимидазолилгидрокси-кобамида.

2. Описан метод препаративного выделения и очистки кобальто (II) - корринов из энзиматических систем.

3. Приводятся спектры поглощения полученных кобальто (II) - корринов и их хроматографические и электрофоретические свойства.

В. НЕМЕРКО, В. ДРАВИКОВСКИ и Ганна СТШЕЛЕЦКА-ГОЛАШЕВСКА

МОДИФИЦИРОВАННАЯ ПРОЦЕДУРА УЛЬТРАФИЛЬТРАЦИИ
И ЕЕ ПРИМЕНЕНИЕ К ИССЛЕДОВАНИЮ
СВЯЗАННЫХ С БЕЛКАМИ НУКЛЕОТИДОВ.
ПРОНИКНОВЕНИЕ АТФ ЧЕРЕЗ ЦЕЛЛОФАНОВЫЕ МЕМБРАНЫ
В ПРИСУТСТВИИ И В ОТСУТСТВИИ БЕЛКОВ

Резюме

Описана модифицированная процедура ультрафильтрации, в которой центробежная сила используется для создания давления, вызывающего проникновение раствора через фильтрационную мембрану. Ультрафильтрация проводилась в специально для этой цели скон-

струированном сосуде из плексигласа. На поверхность раствора, подвергающегося ультрафильтрации наслаивался слой жидкого парафина, что увеличивало скорость фильтрации и давало возможность профильтрования всего объема исследуемой жидкости. Показано, что вышеописанная процедура ультрафильтрации может применяться для исследования связывания нуклеотидов (и других низкомолекулярных веществ) белками, так как полученные результаты полностью совпадали с результатами, полученными при помощи компенсационного диализа.

Подвергая фильтрации чистые растворы адениловых нуклеотидов было найдено, что концентрации веществ в первых порциях фильтрата были меньше, чем в исходном растворе и лишь в следующих порциях фильтрата концентрация постепенно возрастала. Установлено, что эта „задержка“ нуклеотидов зависит, главным образом, от заряда нуклеотидных ионов. Если исследуемый раствор профильтровать полностью, то в фильтрате находят все введенное количество нуклеотида.

Т. ХОЙНАЦКИ и Мария Я. ПЕХОВСКА

БИОСИНТЕЗ ЛИПИДОВ У НАСЕКОМЫХ

1. Включение ^{32}P фосфохолина в фосфолипиды у *Celerio euphorbiae*

Резюме

В биосинтезе лецитина у *Celerio euphorbiae* принимает участие молекула фосфохолина. Скорость включения ^{32}P -фосфохолина, определяемая в гомогенатах жирового тела неодинакова в разных стадиях развития этого насекомого. Наиболее интенсивное включение наблюдается у гусениц, тогда как у веретенообразных форм, у куколок и у бочки примерно в три раза меньше, чем у гусениц в периоде потребления меченого фосфохолина в общие фосфолипиды организма у бабочки примерно в три раза меньше, чем у гусениц в периоде потребления пищи.

БИОСИНТЕЗ ФОСФОЛИПИДОВ У НАСЕКОМЫХ.

II. ИССЛЕДОВАНИЯ НАД ВКЛЮЧЕНИЕМ ^{32}P ОРТОФОСФАТА
У БАБОЧЕК *CELERIO EUPHORBIAE*

Резюме

Исследовалось включение *in vivo* ^{32}P в фосфолипиды у самцов бабочек *Celerio euphorbiae*. Максимум удельной активности фракции фосфолипидов наблюдается примерно через 12 часов после инъекции меченого ортофосфата. Скорость обмена кефалина больше, чем скорость обмена лецитина. Максимум удельной активности кефалина достигается через 12 часов, а лецитина через 36 часов после введения изотопа. Сравнение кривых включения ^{32}P в фосфохолин и лецитин указывает на то, что фосфохолин может являться прекурсором лецитина.

Обсуждается биосинтез лецитина у самца бабочки *Celerio euphorbiae* в связи с накоплением пирофосфата в *ductus ejaculatorius*. Автор обращает внимание на отсутствие параллельности* между процессом локального накопления PP и интенсивностью биосинтеза лецитина во всем теле.

С. АНГЕЛЬСКИ, Я. РОГУЛЬСКИ и Ядвига БАСЬЦЯК

АМИНОАЦИДУРИЯ, ВЫЗВАННАЯ МАЛЕИНОВОЙ КИСЛОТОЙ

VIII. Влияние прогестерона на картину отравления малеиновой кислотой у крыс на галактозной диете.

Резюме

Крысы на галактозной диете выделяют в несколько раз больше сахара, чем крысы скармливаемые безгалактозной или молочной диетой. После введения малеиновой кислоты крысам на галактозной диете, выделение сахара резко падает тогда как у крыс на молочной или безгалактозной диете, наоборот, это выделение увеличивается. При введении прогестерона количество присваиваемой крысами галактозы не изменяется. Увеличивается только вследствие большего потребления выделение галактозы. Лишь после прекращения введения прогестерона значительно увеличивается присваивание потребляемой галактозы. Введение малеиновой кислоты крысам, получающим прогестерон, вызывает типичный синдром. Наблюдается лишь перемещение наиболее интенсивных симптомов повреждения почки на дальнейшие дни отравления.

КОЛОРИМЕТРИЧЕСКОЕ ОПРЕДЕЛЕНИЕ АКТИВНОСТИ
 γ -ГЛЮТАМИЛ-ТРАНСПЕПТИДАЗЫ В СЫВОРОТКЕ
И ТКАНЯХ ЧЕЛОВЕКА ПРИ ПОМОЩИ СИНТЕТИЧЕСКИХ СУБСТРАТОВ

Резюме

Описан новый метод определения активности γ -глутамил-транспептидазы, основанный на колориметрическом определении α -нафтиламина, осовобождаемого во время инкубации фермента с γ -L-глутамил- α -нафтиламидом. Приводится описание синтеза этого соединения и других родственных веществ. В качестве продукта транспептидации был идентифицирован γ -L-глутамил- γ -L-глутамил- α -нафтиламид. В присутствии глицил-глицина и γ -L-глутамил- α -нафтиламида главным продуктом является γ -глутамил-глицил-глицин.

Средняя удельная активность фермента в сыворотке здоровых людей составляла 27,2 ед. (1 единица = 1 μ моль α -нафтиламина, освобожденный 100 мл сыворотки в течение 2 часов). Средняя активность в моче составляла 128 единиц.

Описываются некоторые свойства фермента; исследовалось также его распределение в тканях человека. Найвысшая активность наблюдалась в тканях почки. Активность фермента в поджелудочной железе, печени и селезенке составляла соответственно 8,3, 3,9 и 1,5% активности найденной в почке. Следы активности были найдены в кишках, легких и мозгу, а также в сердечной и скелетной мышцах.

Обсуждается происхождение сывороточного фермента и физиологическое значение почечного фермента.

А. ШЕВЧУК, ЭЛЬЖБЕТА ВОЛЬНЫ, М. ВОЛЬНЫ и Т. БАРАНОВСКИ

НОВЫЙ МЕТОД ПОЛУЧЕНИЯ D-ГЛИЦЕРАЛЬДЕГИД-3-ФОСФАТА

Резюме

Разработан простой одноэтапный метод получения кристаллической кальциевой соли D-глицеральдегид-3-фосфата приблизительно 83% чистоты. Метод состоит в окислении D-фруктозо-1,6-дифосфата иодной кислотой. В качестве побочного продукта получали с хорошим выходом чистую фосфогликолевую кислоту в виде бариевой соли. Описан также способ получения D-глицеральдегид-3-фосфата из D-фруктозо-6-фосфата.

ВЫДЕЛЕНИЕ ГАММА ГЛОБУЛИНОВ ПРИ ПОМОЩИ
ФРАКЦИОНИРОВАНИЯ СОЛЯМИ ЦИНКА И АЛЮМИНИЯ

Резюме

Описывается метод выделения гамма-глобулинов из человеческой сыворотки, состоящий из трех этапов: 1. получение препарата богатого гамма-глобулинами при помощи фракционирования солями цинка; 2. удаление балластных белков при помощи фракционирования солями алюминия; 3. Окончательное выделение гамма-глобулинов из раствора при помощи фракционирования солями цинка.

Фракционирование солями цинка исследовалось в системе четырех независимых переменных: концентрации солей цинка, концентрации белка, рН и ионной силы.

Фракционирование солями алюминия исследовалось в системе двух независимых переменных: концентрации соли алюминия и рН.

К. ВЕЖХОВСКИ и Д. ШУГАР

ФОТОХИМИЯ НУКЛЕОЗИДОВ И НУКЛЕОТИДОВ ЦИТОЗИНА. II

Резюме

Проводились подробные исследования над обратимыми фотопродуктами, образующимися в результате облучения ультрафиолетовыми лучами (2557 Å) гликозидов цитозина. Особое внимание обращалось на кинетику обратной реакции и влияние рН, ионной силы и температуры. Фотохимическая реакция охватывает нуклеофильное присоединение молекулы воды к двойной связи 5—6 пиримидинового кольца, обратная реакция является выделением этой молекулы воды, катализируемым кислотой-щелочью. Установлено, что вычисленные ранее квантовые выходы, в которых не принималась во внимание обратная реакция не отражают существенных изменений за исключением тех, которые происходят при высоко щелочном рН, где скорость обратной реакции особенно большая. Обратная реакция является реакцией первого порядка. Более подробные исследования изотопного эффекта в обратной реакции, а также сравнение с урацилом и его производными, где имеет место специфически кислотно-щелочный катализ, показали, что обратная реакция протекает путем общего кислотного и щелочного катализа.

Показано, что на фотохимическую и на обратную реакцию влияет не только взаимодействие между кольцами пиримидина и углевода (особенно между углеродом 2 пиримидина и одним из гидроксиллов углевода), но также в случае нуклеотидов, степень диссоциации гидроксиллов фосфорной кислоты и позиция эстрификации сахара. Обратная реакция обладает энергией активации порядка 15 ккал/моль. В случае цитозина и 1-метилцитозина присоединение воды к пиримидиновому кольцу не является единственной реакцией, происходящей в результате облучения. Характер этих добавочных реакций пока еще не выяснен.

В. ШЭР и Д. ШУГАР

ПОЛУЧЕНИЕ И СВОЙСТВА ПОЛИМЕРОВ 3-МЕТИЛУРИДИЛОВОЙ КИСЛОТЫ С ВЫСОКИМ МОЛЕКУЛЯРНЫМ ВЕСОМ

Резюме

Проведен синтез 5'-фосфата и 5'-пирофосфата 3-метилуридина. Установлено, что последний является соответствующим субстратом для полинуклеотид-фосфорилазы, при помощи которой был получен гомополимер 3-метилуридилловой кислоты poli-MeU. Гомополимер poli-MeU не обладает вторичной структурой и согласно модели Уотсон-Крика не образует комплекса с гомополимером адениловой кислоты poli-A. Таким образом блокирование одного атома, образующего водородную связь в одном из ароматических колец достаточно для того, чтобы сделать невозможным образование двойных цепей комплекса и внутримолекулярной вторичной структуры. Гиперхромный эффект при гидролизе порядка 10%, наблюдаемый в случае poli-MeU не может следовательно быть связан с какой либо водородной связью. Получены также кополимеры уридилловой и 3-метилуридилловой кислоты poli-U-MeU; они обладают вторичной структурой и способностью комплексообразования с poli-A, зависящей от соотношения U:MeU в кополимере. Максимум комплексообразования по данным определения гиперхромазии, получается при эквимольном соотношении poli-A и остатков U в кополимере, что можно объяснить, полагая что остатки MeU „выдвинуты” наружу двойной цепи комплекса. В предварительных опытах установлено, что poli-U образует двуцепные комплексы с олигонуклеотидами адениловой кислоты, содержащими также фосфодиэфирные связи 2', 5'. 5,6-дигидро-5'-пирофосфат уридина оказался неактивным в качестве субстрата полинуклеотид-фосфорилазы.

Poli-MeU устойчива к действию панкреатической рибонуклеазы, но разлагается под действием фосфорилэстеразы змеиного яда. Продажные препараты щелочной монофосфатазы содержат следы неидентифицированной фосфодиэстеразы, содержащейся, повидимому, во многих тканях, которая также гидролизует poli-MeU.

Продукты гидролиза кополимера poli-U-MeU при помощи рибонуклеазы определялись качественно и количественно.

Т. В. ЩЕПКОВСКИ

РОЛЬ РОДАНАЗЫ В МЕТАБОЛИЧЕСКОМ СИНТЕЗЕ ТИОСУЛЬФАТА

Резюме

Исследовались реакции, ведущие к образованию тиосульфата, который как следует из последних сообщений, является главным метаболитом в биологическом обмене серы в результате которого образуется сульфат. Результаты, полученные и представленные в настоящей работе указывают, что тиосульфат может образоваться из первых неорганических метаболитов серы, т. е. из сульфида и сульфита в присутствии органических сульфидов (цистин, окисленный глутатион), а также из неорганических сульфидов и сульфитов, причем обе эти реакции катализирует роданаза. Роданаза катализирует также реакцию образования роданата в системе сульфид - цианид - цистин. Установление наличия этих реакций проливает новый свет на механизм образования тиосульфата и на биологическую роль роданазы.

Т. В. ЩЕПКОВСКИ

МОДЕЛЬНЫЕ РЕАКЦИИ МЕХАНИЗМА ДЕЙСТВИЯ РОДАНАЗЫ

Резюме

Проводились модельные опыты для проверки механизма действия роданазы, предложенного Сёрбо. Установлено, что цианид реагирует с соединениями, содержащими дитиосульфоновою группировку $-S-S-SO_3^-$, а именно с выделенной впервые цистеинтиосульфоновою и глутатионтиосульфоновою кислотой, таким образом, что отделяется гипосульфит. В этих реакциях не образуются роданаты, ни непосредственно, ни после добавления к продуктам реакции цистеина. Продуктом реакции цианида с цистеинтиосульфонатом, кроме гипосульфита, является тиоцианаланин, подвергающийся изомеризации в продукт, не окрашивающийся нингидрином или изотином. Приведенные факты не совпадают с гипотезой Сёрбо, объясняющей механизм действия роданазы.

XIV

OD REDAKCJI

Acta Biochimica Polonica będą od zeszytu 3, tomu 8 ogłaszały prace tylko w języku angielskim. Podjęcie tej decyzji nie było łatwe. Przeciwno niej przemawiało przede wszystkim to, że trud przedstawienia wyników pracy doświadczalnej i ich teoretycznego objaśnienia jest znacznie mniejszy, jeżeli pisze się w języku ojczystym. Wśród argumentów przeciwnych naszej decyzji było także przekonanie, że publikując w języku obcym nie będziemy mogli osiągnąć pod względem stylistycznym poziomu, jaki da się uzyskać, jeżeli pisze się w języku ojczystym. Nie na ostatnim miejscu był też wzgląd sentymentalny, że nasze archiwalne czasopismo nie będzie podawało prac po polsku.

Za decyzją przemawiał jeden ważki argument. Ogłaszanie prac po polsku jest poważnym utrudnieniem w przekazywaniu uzyskanych zdobyczy biochemikom innych narodowości. Publikując zaś po angielsku udostępniamy wyniki naszych badań wszystkim, praktycznie biorąc, biochemikom, bo wszyscy oni korzystać muszą z piśmiennictwa w tym języku. Wydaje nam się, że podjęcie tej trudnej decyzji będzie pożyteczne dla polskiej biochemii.

