

Z Katedry i Zakładu Chemii Fizjologicznej Wydziału Lekarskiego Akademii Medycznej  
w Lublinie

Kierownik: prof. dr Janina Opińska-Blauth

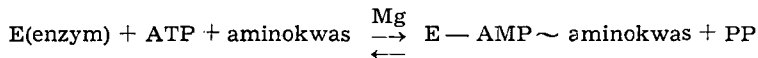
Eugeniusz GAŚSIOR

Aktywacja aminokwasów u *Mycobacterium phlei*

Активация аминокислот у *Mycobacterium phlei*

Activation of Amino Acids in *Mycobacterium phlei*

Reakcją zapoczątkowującą proces biosyntezy cząsteczki białkowej jest aktywacja aminokwasów. Wykazał ją poraz pierwszy w r. 1955 Hoagland (25). Schematycznie przedstawić ją można równaniem:



Produktem aktywacji jest przejściowe połączenie kwasu adenilowego z aminokwasem (AMP ~ aminokwas) i pirofosforan. W żywej komórce kompleks ten stabilizowany jest przez enzym aktywujący aminokwas. Grupa karboksylowa zaktywowanego aminokwasu połączona jest wiązaniem wysoko energetycznym z resztą ortofosforanową AMP. Wysoko energetyczne wiązanie w kompleksie adenilowo-aminokwasowym umożliwia udział aminokwasu w dalszych etapach biosyntezy białka.

Enzymy aktywujące są szeroko rozpowszechnione zarówno w tkankach zwierzęcych (8, 13, 29, 39, 42), roślinnych (5, 6, 14, 31), jak i u drobnoustrojów (4, 15, 16, 32, 33, 47, 49). Występują one przede wszystkim we frakcji białek rozpuszczalnych. Wytrącają się w punkcie izoelektrycznym przy pH około 5, stąd też Hoagland (26) nazwał je „enzymami pH 5”.

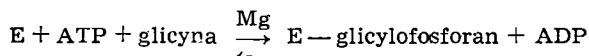
Logiczną konsekwencją faktu, że aktywacja jest pierwszym etapem biosyntezy białka, jest konieczność aktywowania wszystkich aminokwasów, wchodzących w skład danego białka. Bardzo szczegółowe badania zarówno Hoaglanda (26), jak i Novelli'ego (15, 16) mające na celu wykazanie aktywacji pełnego garnituru aminokwasów, nie dały jednak pozytywnych rezultatów. Aktywację stwierdzono jedynie dla kilku aminokwasów: tyrozyny, tryptofanu, fenyloalaniny, histydyny, metioniny, waliny, leucyny i izoleucyny w preparatach enzymatycznych

Używane skróty: **ATP** — kwas adenozyntroójfosforowy, **ADP** — kwas adenozyndwufosforowy, **AMP** — kwas adenozynojednofosforowy, **PP** — pirofosforan, **E-AMP** aminokwas — kompleks enzymu z kwasem adenilowym i aminokwasem.

różnych drobnoustrojów (16). Podobne wyniki uzyskano dla tkanek zwierzęcych (26, 29).

W wyraźnej sprzeczności z cytowanymi wyżej badaniami stoją spostrzeżenia innych autorów. Nisman i współpr. (32, 33) stwierdzili u *Escherichia coli* aktywację 18 aminokwasów. Podobne rezultaty dały badania Clarka na materiale roślinnym (6), oraz Webstera (47) na ekstraktach i frakcji wytrąconej w punkcie izoelektrycznym z groszku, wątroby świni i z drożdży.

Aktywacja u drobnoustrojów przebiegać może również inną drogą niż przez tworzenie połączeń aminokwasowo-adenilowych. Cormier i Novelli (9, 10) w r. 1958 wykazali, że glicyna aktywowana jest przez bezkomórkowe ekstrakty *Photobacterium fischeri* z powstawaniem estru fosforanowego glicyny jako związku pośredniego i ADP:



U drobnoustrojów stwierdzono ostatnio biosyntezę białka bez udziału enzymów aktywujących aminokwasy (1, 2, 7, 46). Mechanizm tych reakcji jest nieznan.

Oddzielnym i interesującym zagadnieniem w problematyce biosyntezy białka jest wykorzystywanie gotowych peptydów w reakcjach biosyntezy. Taką możliwość sugerują badania Rendiego i współpr. (37), oraz Tuboi i Huzino (45) wykazujące aktywację peptydów przez wątrobę zwierzęcą, jakkolwiek stwierdzenie aktywacji nie stanowi jeszcze wystarczającego dowodu na bezpośredni udział peptydów w syntezie białek.

Chociaż aktywacja aminokwasów stawiana jest w rzędzie znanych i ściśle określonych reakcji chemicznych, to jednak badania w tej dziedzinie nie wolne są od sprzecznych danych i przeciwstawnych opinii. Dotyczy to w szczególności zagadnień aktywacji u drobnoustrojów. Rozbieżności te zadecydowały o wyborze bakterii do badań nad aktywacją w niniejszej pracy. Użyto do tych celów *Mycobacterium*, ponieważ drobnoustroje te odznaczają się pewnymi odmiennymi cechami metabolizmu w porównaniu z innymi drobnoustrojami. Ponadto badania nad aktywacją byłyby kontynuacją poprzednich badań Zakładu poświęconych przemianie węglowodanowej i fosforowej, oraz aminokwasowej u *Mycobacterium* (44, 45, 21, 27).

Tematem niniejszej pracy było przebadanie następujących zagadnień:

- 1) wykazanie aktywacji u *Mycobacterium phlei*, a w szczególności przygotowanie takiego materiału enzymatycznego, który byłby zdolny do aktywowania wszystkich aminokwasów w odpowiednio dobranych warunkach reakcji. Wzięto tu pod uwagę obydwa możliwe procesy aktywacji.
- 2) Przebadanie aktywacji niektórych peptydów.
- 3) Próby ustalenia zależności pomiędzy stężeniem aminokwasów w puli wewnątrzkomórkowej i białkach prątków, a ich aktywacją.

## CZEŚĆ DOŚWIADCZALNA

### I Materiał i metody

#### Drobnoustroj

Do badań użyto szczepu *Mycobact. phlei* uzyskanego z Instytutu Gruźlicy w Warszawie. Drobnoustroj hodowano na podłożu Löwensteina w butlach Roux w temperaturze 37°C przez 7—8 dni i kilka dni w temperaturze pokojowej. Do hodowli stosowano również syntetyczne

podłoże płynne DKG o składzie (13): glukoza 40 g, kwas glutaminowy 10 g (w niniejszej pracy 8 g), kwas cytrynowy 2 g,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  0,5 g,  $\text{MgSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$  0,5 g, cytrynian żelazowo-amonowy 0,05 g,  $\text{ZnSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$  0,02 g i woda do 1 000 ml. pH doprowadzano do 7,4 za pomocą 1 N KOH. Pożywki sterylizowano przez tyndalizację. Bakterie hodowano w kolbach Fernbacha pojemności 1 litra, w warunkach podobnych do hodowli na podłożu Löwensteina. Wydajność hodowli z 1 butli Roux około 13—16 g wilgotnej masy bakteryjnej. Z podłoży płynnych wydajność 10—12 g wilgotnej masy.

Zebrałą masę bakteryjną po odmyciu od pożywki traktowano oziębionym do  $-20^\circ \text{C}$  acetonem (21), a następnie suszono pod zmniejszonym ciśnieniem. Proszek acetonowy bakterii hodowanych na podłożu Löwensteina używano do doświadczeń nad aktywacją aminokwasów i peptydów, natomiast w badaniach nad ustaleniem zależności pomiędzy stężeniem kwasu glutaminowego, a jego aktywacją stosowane były proszki acetonowe z hodowli płynnych.

#### Przygotowanie radioaktywnego pirofosforanu ( $\text{PP}^{32}$ )

Fosfor radioaktywny ( $\text{P}^{32}$ ) w postaci  $\text{H}_3\text{PO}_4$  otrzymywano z Instytutu Badań Jądrowych w Warszawie. Radioaktywną próbkę w ilości 200  $\mu\text{C}$  doprowadzano do pH 9—9,2 za pomocą 0,1 N KOH i pirolizowano w piecu w temperaturze  $450^\circ \text{C}$  przez 2 godziny w małej parownicze kwarcowej. Pirolizowana próbka zawierała obok pirofosforanu, około 20% ortofosforanu i pewną ilość polifosforanów o różnym stopniu kondensacji. Taki materiał poddawano oczyszczaniu za pomocą bibułowej chromatografii preparatywnej zstępującej w układzie: III — rzęd. butanol, kwas mrówkowy, woda (80:5:20) wg Crowthera (12) przez 24 godziny. Po porównaniu z autoradiogramem, pasek bibuły zawierający  $\text{PP}^{32}$  eluowano wodą, roztwór zagęszczano i dodawano pirofosforanu sodowego jako nośnika. Aktywność właściwa  $\text{PP}^{32}$  stosowanego do doświadczeń wynosiła około  $10^5$  imp/min./ $\mu\text{M}$ .

Fosfor oznaczano wg metody Fiske-Subbarowa (18) na fotokolorymetrze Havemanna. Pirofosforan hydrolizowano uprzednio 1 N  $\text{H}_2\text{SO}_4$  przez 15 min. na wrzącej łaźni wodnej, ATP natomiast hydrolizowano 1 N HCl przez 10 minut. Pomiaru radioaktywności próbek dokonywano cienkookienkowym licznikiem G-M typu BAT produkcji polskiej.

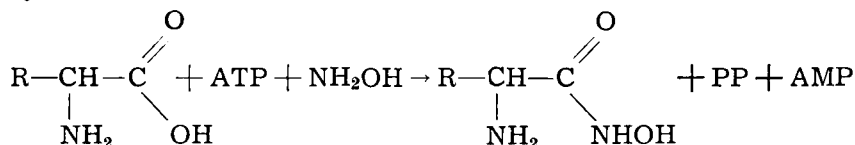
#### Metody pomiaru aktywacji aminokwasów

Do ilościowej oceny szybkości reakcji aktywacji stosowane są dwie metody:

A. Metoda „wymiany” ( $\text{ATP-PP}^{32}$ ) polegająca na wymianie piętno-

wanego pirofosforanu z resztą pirofosforanową ATP w obecności odpowiedniej enzymów aktywujących, aminokwasów i jonów magnezu. Wykorzystana jest tu odwracalność reakcji 1.

B. Metoda hydroksamowa. W metodzie tej oznacza się kolorymetrycznie kwasy aminohydroksamowe powstające w reakcji kompleksów aminokwasowo-adelinowych (produktów aktywacji aminokwasów) z hydroksylaminą:



Hydroksylamina działa w tym procesie jako czynnik wychwytyjący zaktywowany aminokwas.

#### A. Metoda wymiany pomiędzy ATP a PP<sup>32</sup>.

Odczynniki:

1. Aminokwasy: Przygotowywano 0,1 M roztwory DL-aminokwasów: alanina (BDH), arginina · HCl (BDH), kwas asparaginowy (Schuchardt), kwas glutaminowy (Joliot Curie), asparagina (J. D. Ridel), cysteina (Light), fenyloalanina (Gliwice imp.), glicyna (Gliwice imp.), L-glutamina (Mann Research Laboratories), histydyna (Fein Chemie), izoleucyna (Schuchardt), leucyna (Light), lizyna · HCl (Light), metionina (Gliwice imp.), prolina (BDH), seryna (Schuchardt), tyrozyna (BDH) treonina (BDH), tryptofan (Politechnika Śląska — Gliwice), walina (Schuchardt).

2. ATP sól dwupotasowa (Nutritional Biochemicals Corporation, USA) — 0,1 M roztwór o pH 7.

3. MgCl<sub>2</sub> — roztwór 0,05 M

4. KF — roztwór 0,1 M

5. Kwas trójchlorooctowy — 12%

6. Bufor octanowy 0,1 i 0,05 M pH 4,5

7. Bufor fosforanowy 0,05 M pH 7,4

8. Bufor „Tris” (trójhydroksymetyloaminometan) 0,1 M pH 7,4

9. HCl — 1 N

10. Węgiel aktywny — Norit A (f-my Fisher Scientific Co., USA). Przygotowywano go przez przemywanie 1 N HCl na lejku Buchnera, a następnie wodą do odczynu obojętnego. Po przemyciu suszono na powietrzu.

Doświadczenia przeprowadzano wg De Moss i Novelli'ego (16) w sposób nieco zmodyfikowany: mieszaninę zawierającą 5 μM ATP, 5 μM MgCl<sub>2</sub>, 10 μM KF, 10 μM aminokwasu dodawanego pojedynczo, lub 5 μM aminokwasu w mieszaninie aminokwasów, 5 μM PP<sup>32</sup> — 10<sup>5</sup> imp./min./μM, 100 μM buforu fosforanowego pH 7,4, oraz enzym w całkowitej objętości 1,2 ml inkubowano przez 15 minut w temperaturze 37°C. Reakcję zatrzymywano przez dodanie 1 ml 12% kwasu trójchlorooctowego. W płynie nad osadem po odwirowaniu strątu białkowego oznaczano ilość PP<sup>32</sup> inkorporowanego w ATP metodą Crane'a i Lipmanna (11) w modyfikacji De Moss i Novelli'ego (16), po dodaniu buforu octanowego pH 4,5

i węgla aktywnego. ATP zaadsorbowany całkowicie na węglu hydrolizowano 1 N HCl i radioaktywność oznaczano za pomocą licznika G-M. Szybkość aktywacji aminokwasów wyrażano w  $\mu\text{M}$  PP<sup>32</sup> wcielonego do ATP/mg białka/15 minut. Białka oznaczano metodą Lowry i współpr. (28).

W doświadczeniach bilansowych, kiedy oznaczano zarówno radioaktywność, jak i ilość fosforu we frakcji pirofosforanowej i frakcji adsorbującej się na węglu aktywnym stosowano bufor Tris zamiast buforu fosforanowego.

Celem sprawdzenia czy na węglu aktywnym adsorbuje się wyłącznie ATP, poddawano zaadsorbowany materiał elucji za pomocą 50% etanolu zawierającego 0,3 mola amoniaku w litrze (3). Eluat наносono pasmowo na bibułę Whatman nr 1 i chromatografowano. Chromatogram przecinano podłużnie na dwie części. Pierwsza służyła do autoradiografii, drugą wywoływano na obecność fosforanów (35) po uprzedniej hydrolizie mineralnej (24). W obydwu tych metodach uzyskano jedno pasmo odpowiadające położeniu ATP.

Obecność KF w mieszaninie inkubacyjnej ma na celu zahamowanie działania PP-azy i ATP-azy. Fluorek nie wpływa jednakże hamująco na sam przebieg aktywacji (16). Materiał enzymatyczny z *Mycobact. phlei* zawierał czynną pirofosfatazę. Jej obecność stwierdzono, inkubując pirofosforan z ekstraktem bakteryjnym. Dodawany pirofosforan w ilości 3  $\mu\text{M}$  rozkładany był przez ekstrakt bakteryjny, zawierający 3—4 mg białka w ciągu 30 minut. Stąd też w doświadczeniach wymiany konieczna była obecność fluoru.

## B. Metoda hydroksamowa

Odczynniki:

1.  $\text{NH}_2\text{OH}$  — roztwór 5 M. Wolną hydroksylaminę otrzymano wg Berga (3) z siarczanu hydroksylaminy. pH roztworu doprowadzono do 7,2.

2.  $\text{NH}_2\text{O} \cdot \text{HCl}$  roztwór 5 M zobojętniony 10 N KOH do pH 7,2. Wolną hydroksylaminę i chlorowodorek hydroksylaminy oznaczano metodą kolorymetryczną przy długości fali 665  $\text{m}\mu$  (19).

3. Kwas trójchlorooctowy — 100%

4.  $\text{FeCl}_3$  — roztwór 2,0 M

5. Roztwory ATP,  $\text{MgCl}_2$ , aminokwasów i bufor fosforanowy — jak w metodzie wymiany ATP-PP<sup>32</sup>.

W niniejszej pracy do oznaczeń aktywacji użyto z pewnymi modyfikacjami metody Schweeta i współpr. (39). Mieszaninę o składzie: 15  $\mu\text{M}$  ATP, 10  $\mu\text{M}$   $\text{MgCl}_2$ , 10  $\mu\text{M}$  pojedynczego aminokwasu, lub po 5  $\mu\text{M}$  każdego aminokwasu w mieszaninie aminokwasów, 300  $\mu\text{M}$  buforu fosforanowego pH 7,4, enzymatyczna frakcja białkowa (2—4 mg białka) i 3 mM  $\text{NH}_2\text{OH}$ , lub  $\text{NH}_2\text{OH} \cdot \text{HCl}$  w całkowitej objętości 3,0 ml inkubowano przez 2 godziny w temp. 37°C. Reakcję zatrzymywano przez dodanie 1,4 ml 100% kwasu trójchlorooctowego i 0,6 ml 2,0 M  $\text{FeCl}_3$  (38). W tych warunkach utworzone hydroksamiany dają zabarwienie z chlorkiem żelazowym. Barwny kompleks hydroksamianowy oznaczano na fotokolorymetrze Havemannna przy długości fali 520  $\text{m}\mu$  wobec wzorca czystego hydroksamianu leucyny. Otrzymane wyniki wyrażane były w  $\mu\text{M}$  hydroksamianu/mg białka/2 godziny.

Przedstawione powyżej dwie metody badania aktywacji aminokwasów okazały się przydatne nie w jednakowym stopniu do badania aktywacji u *Mycobacterium*. Metoda hydroksamowa jest mniej czuła niż metoda wymiany ATP-PP<sup>32</sup>, co jest poważnym ograniczeniem w stoso-

waniu jej w przypadku małych aktywności enzymów aktywujących. Ponadto duża próba kontrolna (bez dodatku aminokwasów) spowodowana w pewnym stopniu autolizą białka (16) i stałą obecnością aminokwasów w badanym materiale uniemożliwia często pomiar aktywacji metodą hydroksamową w surowych wyciągach i nie zagęszczonych frakcjach enzymatycznych. Spostrzeżenie to w mniejszym stopniu dotyczy metody wymiany.

W niniejszej pracy metodę hydroksamową stosowano w pomiarach aktywacji jedynie w przypadku użycia częściowo oczyszczonej frakcji białkowej. W tych doświadczeniach (przy użyciu mniejszej ilości białka) próba kontrolna była znacznie mniejsza od próby z dodatkiem aminokwasów. W pozostałych doświadczeniach stosowano metodę wymiany ATP-PP<sup>32</sup>.

## II Aktywacja aminokwasów w różnych frakcjach enzymatycznych *Mycobacterium phlei*

### A. Aktywacja aminokwasów w surowych wyciągach bakteryjnych

Ekstrakty bakteryjne uzyskiwano przez dezintegrację suchych bakterii w homogenizatorze Pottera przystosowanym do rozbijania komórek bakteryjnych (17).

Tab. 1. Aktywacja aminokwasów przez surowy wyciąg bakteryjny  
Activation of amino acids by crude bacterium extract

Aminokwas	Ilość $\mu\text{M}$ PP <sup>32</sup> inkorporowanego w ATP/mg białka/15 min.					Wartość średnia
	Wyniki poszczególnych pomiarów					
Mieszanka 18 amino- kwasów	0,12	0,16	0,16	0,15	0,15	0,15
leucyna	0,11	0,12	0,10	0,11		0,11
walina	0,09	0,09	0,12	0,12	0,11	0,10
izoleucyna	0,09	0,09	0,08	0,10		0,09
tyrozyna	0,08	0,09	0,07			0,08
tryptofan	0,08	0,08	0,09	0,07		0,08
próba kontrolna	0,05	0,04	0,05	0,05		0,05

Skład mieszaniny inkubacyjnej: 5  $\mu\text{M}$  ATP, 5  $\mu\text{M}$  MgCl<sub>2</sub>, 10  $\mu\text{M}$  KF, 10  $\mu\text{M}$  pojedynczego aminokwasu i po 5  $\mu\text{M}$  każdego aminokwasu w mieszaninie aminokwasów, 100  $\mu\text{M}$  buforu fosforanowego pH 7,4, 5  $\mu\text{M}$  PP<sup>32</sup>, oraz ekstrakt zawierający 1–2 mg białka. Czas inkubacji 15 min. Dokładne warunki podano w tekście.

1,0 g proszku acetonowego bakterii + 18 ml buforu fosforanowego 0,05 M pH 7,4 dezintegrowano porcjami w ciągu 15—20 minut. Wirowano przy 15 000 obr./min. przez 30 minut na wirówce Janetzky'ego. Otrzymany ekstrakt w objętości około 20 ml zawierał 7—9 mg białka w 1 ml.

Ekstrakt ten użyto do badania aktywacji poszczególnych aminokwasów. Stwierdzono (tab. 1) wyraźną aktywację 5 aminokwasów. Preparatykę enzymatyczną przeprowadzano w temp. 0—4° C.

Przeprowadzono również doświadczenia na ekstrakcie pozbawionym aminokwasów przez dializę, adsorbcję aminokwasów na węglu aktywnym i mieszaninie Dowex 50 forma H<sup>+</sup> i Dowex 2 forma OH<sup>-</sup>. Stwier-

Tab. 2. Aktywacja aminokwasów przez frakcję pH 4,4  
Activation of amino acids by pH 4.4 fraction

Aminokwas	Ilość $\mu$ M PP <sup>32</sup> inkorporowanego w ATP/mg białka/15 min.	
	Średnia arytmetyczna	Odchylenie standardowe
leucyna	0,31	± 0,06
walina	0,27	± 0,06
izoleucyna	0,26	± 0,04
tyrozyna	0,25	± 0,05
tryptofan	0,24	± 0,06
feniloalanina	0,22	± 0,04
metionina	0,22	± 0,04
kwas glutaminowy	0,20	± 0,04
arginina	0,17	± 0,05
alanina	0,17	± 0,04
lizyna	0,16	± 0,04
histydyna	0,16	± 0,03
seryna	0,15	± 0,04
cysteina	0,14	± 0,04
treonina	0,11	± 0,03
kwas asparaginowy	0,10	± 0,03
glicyna	0,08	± 0,04
prolina	0,07	± 0,03
asparagina	0,06	± 0,04
glutamina	0,06	± 0,04
mieszanina 18 aminokwasów	0,38	± 0,07
próbka kontrolna	0,065	± 0,04

Skład mieszaniny inkubacyjnej i warunki inkubacji — jak w tabeli 1. Dodatkne warunki podano w tekście.

dzono w takich przypadkach, że próba kontrolna zmniejszała się 2—3-krotnie, ale w tym samym stopniu zmniejszały się także próby właściwe.

### B. Aktywacja aminokwasów przez frakcję wytrąconą przy pH 4,4

Dogodniejszym źródłem dla badania aktywacji poszczególnych aminokwasów okazała się frakcja wytrącona z ekstraktu bakteryjnego za pomocą 1 N  $\text{CH}_3\text{COOH}$  przy pH 4,4. Wytrącony, odwirowany osad rozpuszczano w 0,05 M buforze fosforanowym pH 7,4 w objętości odpowiadającej 1/3 objętości ekstraktu. Frakcja enzymatyczna pH 4,4 zawierała minimalne ilości wolnych aminokwasów w przeciwieństwie do ekstraktu bakteryjnego. Tabela 2 przedstawia wyniki doświadczeń nad aktywacją poszczególnych aminokwasów przez tę frakcję.

### III Próby zagęszczenia enzymu aktywującego leucynę

Szybkość aktywacji leucyny przez frakcję pH 4,4 w stosunku do pozostałych aminokwasów była największa. Frakcji tej użyto do doświadczeń nad oczyszczaniem enzymu aktywującego leucynę. Enzym oczyszczano metodą frakcjonowanego wysalania siarczanem amonu w temp. 0—4° C w sposób następujący:

Do 15 ml roztworu białek pH 4,4 otrzymanego — wg procedury podanej wyżej — z 2,5 g proszku acetonowego *Mycobacterium phlei* dodawano obojętnego, nasyconego roztworu siarczanu amonu do nasycenia 0,45. Odwirowany osad odrzucano. Płyn nad osadem frakcjonowano siarczanem amonu w substancji. Wytrącone osady wirowano przy 10—12 tys. obr./min w wirówce Janetzky'ego. Frakcja białkowa uzyskana przy 0,6—0,8 nasycenia posiadała największą aktywność enzymatyczną. Po 3 godz. dializie wobec 0,02 M buforu fosforanowego pH 7,4 przy stałym mieszanii buforu mieszadłem elektromagnetycznym frakcji tej użyto do badania aktywacji leucyny. Wyniki umieszczono w tabeli 3.

Tab. 3. Aktywacja leucyny przez różne frakcje enzymatyczne  
Activation of leucine by various enzymatic fractions

Rodzaj materiału	Ilość ml roztworu	Ilość mg białka	Całkowita aktywność*	Specyficzna aktywność**
Ekstrakt bakteryjny	45	270	32,4	0,12
Frakcja pH 4,4 (I)	15	120	30,0	0,25
Frakcja 0,6—0,8 nasyc. (II)	1,5	11	7,15	0,65

\*) Aktywność całkowita — ilość  $\mu\text{M}$   $\text{PP}^{32}$  inkorporowanego w ATP dla całkowitej ilości białka danej frakcji/15 min.

\*\*) Aktywność specyficzna — ilość  $\mu\text{M}$   $\text{PP}^{32}$  inkorporowanego w ATP/mg białka/15 min.

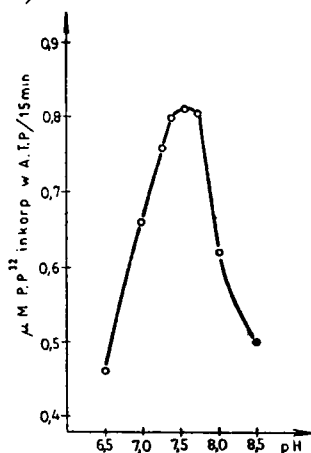
Skład mieszaniny inkubacyjnej i warunki inkubacji — jak w tabeli 1. Dokładne warunki doświadczenia podano w tekście.



Zastosowana procedura oczyszczania pozwoliła na kilkakrotne zagęszczenie enzymu aktywującego leucynę, jakkolwiek preparat ten zawierał jeszcze inne enzymy aktywujące. Z przeprowadzonych oznaczeń pomiaru wymiany ATP-PP<sup>32</sup> wynika, że aktywacji ulegają: walina, izoleucyna, tyrozyna, tryptofan i kwas glutaminowy. Aktywność tych enzymów jest rzędu aktywności frakcji pH 4,4. Świadczy to, że ulegają one zagęszczeniu w mniejszym stopniu niż enzym aktywujący leucynę.

Częściowe oczyszczenie enzymu leucynowego pozwoliło na przeprowadzenie doświadczeń nad aktywacją peptydów leucynowych, aktywację leucyny mierzoną metodą hydroksamową, oraz na częściową charakterystykę frakcji II. Frakcja II przechowywana w temperaturze 0°C traci szybko aktywność. Dodatek cysteiny, lub glutationu w stężeniu 0,05 M i wersenu w stężeniu 0,005 M działały stabilizująco. W obecności tych czynników aktywność frakcji II spadała do połowy po 20—24 godz. Ekstrakt enzymatyczny, a także frakcja pH 4,4 nie traciły tak szybko swojej aktywności.

Optymalne pH dla enzymu aktywującego leucynę we frakcji II wynosi około 7,4—7,6. (ryc. 1)



Ryc. 1. Zależność pomiędzy pH mieszaniny inkubacyjnej, a aktywacją leucyny  
Correlation between pH of incubation mixture and activation of leucine

Warunki doświadczenia: 10 μM leucyny, 5 μM ATP, 5 μM MgCl<sub>2</sub>, 10 μM KF, 5 μM PP<sup>32</sup>, 100 μM buforu fosforanowego (w zakresie 5,0—8,0 pH), lub buforu Tris (powyżej pH 8,0), oraz 1,6 mg białka. Obj. 1,2 ml. Czas inkubacji 15 min. Dokładne warunki oznaczeń podano w tekście.

#### IV Aktywacja leucyny mierzona metodą hydroksamową

Celem tego doświadczenia było sprawdzenie w jakim stopniu wyniki uzyskane metodą hydroksamową są zgodne z wynikami badania aktywacji mierzonej metodą wymiany ATP-PP<sup>32</sup>. Jako źródła enzymu użyto częściowo oczyszczonej frakcji II. Wyniki podano w tabeli 4.

Umieszczone w tab. 4 dane wskazują, że wartości uzyskiwane dla aktywacji leucyny mierzonej metodą hydroksamową są prawie 10-krotnie mniejsze od analogicznych wyników metody wymiany.

Tab. 4. Aktywacja leucyny na podstawie oznaczeń hydroksamianu  
Activation of leucine on the strength of hydroxam estimations

Doświadczenie	$\mu\text{M}$ hydroksamianu /mg białka/ 2 godz.	
	Próba właściwa	Próba kontrolna
1	0,53	0,18
2	0,60	0,19
3	0,61	0,17

Skład mieszaniny inkubacyjnej: 15  $\mu\text{M}$  ATP, 10  $\mu\text{M}$   $\text{MgCl}_2$ , 10  $\mu\text{M}$  leucyny, 300  $\mu\text{M}$  buforu fosforanowego, enzymatyczna frakcja białkowa (2—4 mg białka) i 3 mM  $\text{NH}_2\text{OH}$  w całkowitej obj. 3,0 ml. Czas inkubacji 2 godz. Dokładne warunki doświadczenia podano w tekście.

## V Aktywacja peptydów

Frakcję II zastosowano do badania aktywacji peptydów leucynowych. Do doświadczeń użyto trzech peptydów: glicylo-L-leucyny, L-alanylo-L-leucyny i L-leucylo-glicyny (f-my Mann Research Laboratories). Celem stwierdzenia czy badane peptydy nie ulegają rozkładowi, przeprowadzono 30 min. inkubację peptydów z frakcją enzymatyczną II w warunkach podobnych do doświadczeń wymiany (nie dodawano ATP

Tab. 5. Aktywacja peptydów przez enzym leucynowy  
Activation of peptides by leucine enzyme

Substrat	Ilość $\mu\text{M}$ PP <sup>32</sup> inkorp. w ATP /mg białka/ 15 min.				
	Wyniki poszczególnych pomiarów				Wartość średnia
leucyna	0,65	0,71	0,69		0,68
glicyloleucyna	0,53	0,47	0,51	0,51	0,50
alanyloleucyna	0,47	0,45	0,46	0,46	0,46
leucyloglicyna	0,31	0,23	0,27	0,26	0,286
próba kontrolna	0,08	0,06	0,05		0,063

Do inkubacji użyto 10  $\mu\text{M}$  poszczególnych peptydów. Ilości pozostałych składników mieszaniny inkubacyjnej i czas inkubacji jak w tabeli 1. Dokładne warunki doświadczenia opisano w tekście.

i PP). Za pomocą chromatografii bibułowej w układzie propanol-woda (7:3) nie stwierdzono rozpadu peptydów na aminokwasy. Jak wynika z tab. 5, wszystkie trzy peptydy są aktywowane jakkolwiek w stopniu niejednakowym. Dla wszystkich peptydów wartości liczbowe aktywacji są mniejsze niż dla wolnej leucyny.

## VI Zależność pomiędzy stężeniem aminokwasów w puli wewnątrzkomórkowej a aktywacją

Ogólne badania nad składem wewnątrzkomórkowej puli aminokwasów u bakterii gramo-dodatnich wskazują, że kwas glutaminowy pojawia się jako pierwszy z aminokwasów i jego stężenie przewyższa stężenia innych wewnątrzkomórkowych aminokwasów puli (20, 48). W odniesieniu do prątków kwasoodpornych przeprowadzone badania dały podobne wyniki (36). Nasuwa się pytanie, czy istnieje prosta zależność szybkości aktywacji kwasu glutaminowego od jego stężenia w puli aminokwasowej, analogicznie do zależności, jaka zachodzi pomiędzy stężeniem substratu, a ilością syntetyzowanego enzymu adaptacyjnego. Na podstawie przeprowadzonych oznaczeń pomiaru aktywacji kwasu glutaminowego (tab. 2) dla *Mycobact.* hodowanego na podłożu Löwensteina takiej zależności nie stwierdzono.

Do poniższych doświadczeń użyto *Mycobact. phlei* z podłoża płynnego DGK. Stwierdzono bowiem wcześniej (22), że hodowle z podłoża DGK

Tab. 6. Aktywacja kwasu glutaminowego i innych aminokwasów przez bakterie hodowane na podłożu syntetycznym

Activation of glutamic acid and other amino acids by bacteria cultured on synthetic medium

Aminokwas	Ilość $\mu\text{M}$ PP <sup>32</sup> inkorp. w ATP/mg białka/15 min.					Wartość średnia
	Wyniki poszczególnych pomiarów					
kwas glutaminowy	0,22	0,23	0,20	0,18		0,21
leucyna	0,33	0,31	0,31	0,29		0,31
tyrozyna	0,25	0,24	0,27	0,27		0,26
kwas asparaginowy	0,09	0,08	0,07	0,07		0,08
asparagina	0,08	0,07	0,07			0,073
glutamina	0,07	0,06	0,08			0,07
próbna kontrolna	0,07	0,06	0,05	0,06	0,07	0,062

Skład mieszaniny inkubacyjnej — jak w tab. 1. Dokładne warunki doświadczenia podano w tekście.

zawierają większe ilości kwasu glutaminowego, niż analogiczne hodowle z podłoża Löwensteina. Doświadczenia te miały także na celu porównanie aktywacji aminokwasów u bakterii z podłoża DGK, z aktywacją u bakterii z pożywki Löwensteina.

W serii wstępnych prób przeprowadzono doświadczenia nad optimum pH dla aktywacji kwasu glutaminowego. Okazało się, że aktywacja kwasu glutaminowego była tylko w nieznacznym stopniu zależna od pH w zakresie 5,8—8,0. W tabeli 6 podano wartości liczbowe dla aktywacji kwasu glutaminowego przez frakcję pH 4,4 z bakterii hodowanych na podłożu syntetycznym w porównaniu do aktywacji innych aminokwasów. Nie stwierdzono wyraźnych różnic w aktywacji kwasu glutaminowego i innych aminokwasów w odniesieniu do bakterii hodowanych na podłożu stałym Löwensteina.

## VII Aktywacja aminokwasów związana z tworzeniem się estrów fosforowych aminokwasów

W ostatnich latach stwierdzono (2, 9, 10), że u drobnoustrojów aktywacja może przebiegać z utworzeniem estrów fosforowych aminokwasów. Aktywacja taka związana jest z enzymatyczną wymianą zachodzącą pomiędzy ortofosforanem ( $P^{32}$ ), a ATP.

Wymianę tę badano wg Cormiera i Novelli'ego (9), używając ortofosforanu potasu pH 7,2 o aktywności  $2,10^5$  imp. /min./  $\mu M P^{32}$ . Posługując się frakcją pH 4,4 nie stwierdzono inkorporacji ortofosforanu w ATP, tym samym proces aktywacji u *Mycobact.* nie biegnie przez tworzenie się estrów aminokwasowych.

### OMÓWIENIE WYNIKÓW BADAŃ

Istnieją duże rozbieżności w literaturze na temat aktywacji poszczególnych aminokwasów. Zarówno w tkankach zwierzęcych, roślinnych, jak i u drobnoustrojów większość autorów wykazuje aktywację zaledwie dla kilku aminokwasów.

Z przedstawionych wyżej danych wynika, że u *Mycobact. phlei* prawie wszystkie aminokwasy są aktywowane. Zaznaczają się tu bardzo wyraźnie różnice w liczbie aktywowanych aminokwasów przez ekstrakt bakteryjny, oraz frakcję pH 4,4. Ekstrakt bakteryjny zdolny jest do aktywowania tylko 5 aminokwasów: leucyny, izoleucyny, waliny, i w mniejszym stopniu tyrozyny i tryptofanu. Natomiast frakcja pH 4,4 aktywuje wszystkie pospolite aminokwasy z wyjątkiem proliny, asparaginy i glutaminy.

Jak wykazały wcześniejsze doświadczenia, prątki kwasoodporne zawierają duże ilości aminokwasów wewnątrzkomórkowych (12). Są to:

kwasy glutaminowy, kwas asparaginowy, glicyna, alanina, seryna. W małych ilościach występują natomiast: leucyna — izoleucyna, walina, tyrozyna i tryptofan. Znaczne stężenia aminokwasów endogennych w komórce, a także w ekstraktach bakteryjnych mogą być jedną z przyczyn braku aktywacji aminokwasów występujących w dużych ilościach, w przypadku badania tej reakcji w ekstrakcie bezkomórkowym. Duże stężenie endogennych aminokwasów mogą całkowicie nasycić enzym, stąd też dodatek aminokwasów z zewnątrz nie zwiększa aktywacji. Ogólnie przyjmuje się, że stężenie aminokwasu, przy którym enzym jest nasycony, jest bardzo małe (13, 14). Należy tu dodać, że frakcja pH 4,4 prawie nie zawierała aminokwasów.

Zastosowanie dializy do usuwania aminokwasów z ekstraktu nie daje rezultatów ze względu na inaktywację enzymów aktywujących. Niniejsze doświadczenia nad dializą potwierdziły spostrzeżenia innych autorów (24, 34, 39).

De Moss i Novelli (16) przeprowadzili rozległe badania nad aktywacją aminokwasów u kilkunastu drobnoustrojów. Stwierdzili, że tylko 8 aminokwasów ulega aktywacji przez ekstrakty bakteryjne. Wydaje się na podstawie przytoczonych własnych wyników, że brak aktywacji pozostałych aminokwasów w doświadczeniach De Moss i Novelli'go mógł być spowodowany również obecnością dużej ilości endogennych aminokwasów.

W ścisłym związku z omawianymi zagadnieniami pozostają pewne obserwacje dotyczące próby kontrolnej. Zarówno dla surowego wyciągu jak i frakcji pH 4,4 czy nawet częściowo zagęszczonego enzymu aktywującego leucynę w niniejszej pracy próba kontrolna była jednakowa. Świadczy to, że o wielkości próby kontrolnej decydują również aminokwasy najprawdopodobniej zaadsorbowane na białku. Być może sam enzym aktywujący wiąże pewną ilość aminokwasu, który uwalnia się dopiero w czasie inkubacji. Dlatego też możliwość wykazania aktywacji prawie dla wszystkich aminokwasów we frakcji pH 4,4 związana byłaby z jednej strony z usunięciem wolnych aminokwasów z preparatu, z drugiej zaś strony byłaby funkcją zagęszczania enzymów aktywujących.

Istnieją jeszcze inne trudności w wykazywaniu aktywacji. Webster podkreśla, że aktywację można wykazać zawsze, przeprowadzając doświadczenia w optymalnych warunkach pH dla każdego enzymu aktywującego (47). Tak np. dla aktywacji leucyny optymalne pH w preparatach wątroby wynosi 8,3, w nasionach groszku 7,8, natomiast w drożdżach 7,3. Należy podkreślić, że autor badał aktywację na frakcjach wytrąconych w punkcie izoelektrycznym, a więc na mate-

riale zagęszczonym i uwolnionym w znacznym stopniu od endogennych aminokwasów.

Bardzo interesujące badania przeprowadzono ostatnio (30) nad aktywacją u *E. coli*. Stwierdzono mianowicie w debrisy komórkowym obecność wszystkich enzymów aktywujących, podczas gdy w ekstrakcie po dezintegracji ultradźwiękowej tylko kilka aminokwasów ulegało aktywacji. Trudności ekstrakcji enzymów aktywujących mogą być jeszcze jedną z przyczyn niepowodzeń.

Przytoczone tutaj dane przemawiają za istnieniem aktywacji wszystkich aminokwasów. Przyczyny utrudniające tego rodzaju badania mogą być różne w zależności od badanego materiału. Pamiętać należy także o możliwości innej drogi aktywacji aminokwasów poprzez tworzenie połączeń estrowych. U *Mycobact.* takiej aktywacji nie stwierdzono.

Czy duże wartości aktywacji niektórych aminokwasów pozostają w ścisłym związku z ilością aminokwasów wchodzących w skład białek prątka? Okazało się, że takiej równoległości nie ma. Z danych Seibert i Fabrizio (41) wynika, że kwas glutaminowy, kwas asparaginowy, alanina, leucyna — izoleucyna, walina i glicyna występują w białkach prątka w dużych ilościach. Tyrozyna natomiast w ilościach śladowych. Dla niektórych aminokwasów aktywacja byłaby proporcjonalna do ich stężenia dla większości jednak nie. Dla tyrozyny zależność ta byłaby odwrotnie proporcjonalna. Brak jest również prostej zależności pomiędzy stężeniem kwasu glutaminowego w puli wewnątrzkomórkowej, a jego aktywacją.

Przytoczone obserwacje pozwalają myśleć, że pewna grupa enzymów (najbardziej aktywnych) wykazuje większą stabilność. Brak jest jednakże danych eksperymentalnych na temat trwałości poszczególnych enzymów aktywujących.

Przeprowadzone w niniejszej pracy doświadczenia wykazują aktywację peptydów również i u bakterii. Z badanych 3 peptydów leucynowych peptyd leucylo-glicyna aktywowany był w nieznacznym stopniu w porównaniu do aktywacji glicylo i alanylo-leucyny, oraz wolnej leucyny. Przyczyną małej aktywacji tego peptydu może być brak wolnej grupy karboksylowej leucyny. Świadczyłoby to, że aktywacja peptydów leucynowych katalizowana jest przez enzym aktywujący leucynę. Tak sam wniosek można wyciągnąć z badań Tuboi i Huzino (45) nad aktywacją dwu- i trójpeptydów przez frakcję pH 5 z wątroby gołębia. Czy peptydy biorą bezpośredni udział w biosyntezie białka w obecnej chwili nie da się z całą pewnością powiedzieć twierdząco. Potrzebne są badania dalszych etapów biosyntezy przy użyciu peptydów znacznych C<sup>14</sup>.

Ciekawie przedstawia się zagadnienie równoważności wyników

w pomiarach aktywacji dokonywanej metodą hydroksamową i metodą wymiany. Van De Ven i współpr. (49) stwierdzili dla kilkunastokrotnie oczyszczonego enzymu aktywującego tyrozynę, równoważność pomiędzy ilością powstającego hydroksamianu tyrozyny, a ilością inkorporowanego pirofosforanu w ATP. Hoagland (26), Schweet i inni (39) takiej równoległości wyników nie stwierdzili. Np. dla aktywacji tyrozyny przez enzym trzustkowy wymiana ATP-PP<sup>32</sup> jest czterokrotnie większa niż ilość powstającego hydroksamianu tyrozyny w równolegle przeprowadzanych doświadczeniach (39). W innych doświadczeniach Schweet i Allen (40) wykazali, że aktywność wymiany jest około 10-krotnie wyższa niż ilość powstającego hydroksamianu we wszystkich stadiach oczyszczania enzymu tyrozynowego.

W niniejszej pracy przeprowadzono również badania porównawcze nad aktywacją leucyny przez częściowo zageszczoną frakcję enzymatyczną. Zaobserwowano, że ilość tworzącego się hydroksamianu była 10-krotnie mniejsza niż odpowiednie wartości dla wymiany ATP-PP<sup>32</sup>. Ogólnie biorąc, dla poszczególnych enzymów różnice wyników są niejednakowe, ale charakterystyczne. Przyjmuje się, że produkt pośredni reakcji aktywacji, bezwodnik adenilowo-aminokwasowy jest nieenzymatycznie rozkładany przez NH<sub>2</sub>OH. Trwałość wiązania aminokwasu z AMP dla poszczególnych połączeń aminokwasowo-adenilowych jest różna (40) i to jest powodem rozbieżności w wynikach aktywacji mierzonych obiema metodami.

Powyższe uwagi ważne są z dwóch względów: 1. Metoda hydroksamowa jako mało specyficzna metoda nie odzwierciedla rzeczywistych szybkości aktywacji dla poszczególnych aminokwasów. Stąd też wyniki uzyskiwane tą metodą mogą budzić często pewne wątpliwości. 2. Zastosowanie do pomiarów wyłącznie metody wymiany stanowi również pewne niebezpieczeństwo. Brak bowiem wymiany nie wyklucza jeszcze obecności enzymów aktywujących, aktywacja może przebiegać drogą tworzenia estrów aminokwasowych. Pewniejsze wyniki można uzyskać jedynie przy stosowaniu obydwu metod mierzenia aktywacji.

---

#### PIŚMIENNICTWO

1. Beljanski M., Ochoa S.: Protein Biosynthesis by Cell-Free Bacterial System. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. 44, 494—499 (1958).
2. Beljanski M.: Protein Biosynthesis by Cell-Free Bacterial System IV. Exchange of Diphosphonucleosides with Homologous Triphosphonucleosides by the „Amino Acid” Incorporating Enzyme. Biochem. Bioph. Acta 41, 111—115 (1960).
3. Berg P.: Acyl Adenylates: An Enzymatic Mechanism of Acetate Activation. J. Biol. Chem. 222, 991—1013 (1956).

4. Berg P.: Acyl Adenylates: The Interaction of Adenosine Triphosphate and L-Metionine. *J. Biol. Chem.*, **222**, 1025—1034 (1956).
5. Bove J., Raacke I. D.: Amino Acids — Activating Enzymes in Isolated Chloroplast from Spinach Leaves. *Arch. Bioch. Bioph.*, **85**, 521—531 (1959).
6. Clark J. M. Jr.: Amino Acid Activation in Plant Tissues. *J. Biol. Chem.* **233**, 421—424 (1958).
7. Cohn P.: Incorporation in Vitro of Amino Acids into Ribonucleoprotein Fractions of Microsomes. *Bioch. Bioph. Acta* **33**, 284—285 (1959).
8. Cole R. D., Coote J., Work T. S.: Activation of Amino Acids by Soluble Enzymes from Pancreas and other Tissues. *Nature* **179**, 199, (1957).
9. Cormier M. J., Novelli G. D.: The Carboxyl Activation of Glycine in Extracts of *Photobacterium fischeri*. *Bioch. Bioph. Acta* **30**, 135—144 (1958).
10. Cormier M. P., Stulberg M. P., Novelli G. D.: Mechanism of the Carboxyl Activation of Glycine in Extracts of *Photobacterium fischeri*. *Bioch. Bioph. Acta*, **33**, 261—263 (1959).
11. Crane R. K., Lipmann F.: The Effect of Arsenate on Aerobic Phosphorylation. *J Biol. Chem.* **201**, 235—243 (1953).
12. Crowther J.: Analysis of Phosphate Mixture by Filter Paper Chromatography. *Anal. Chem.* **26**, 1383—1386 (1954).
13. Davie E. W., Koningsberger V. V., Lipmann F.: The Isolation of a Tryptofan Activating Enzyme from Pancreas. *Arch. Bioch. Bioph.* **65**, 21—38 (1956).
14. Davis J. W., Novelli G. D.: The Activation of Amino Acids in Extracts of Pea Seedlings. *Arch. Bioch. Bioph.*, **75**, 299—308 (1958).
15. De Moss J. A., Novelli G. D.: An Amino Acids Dependent Exchange between Inorganic Pyrophosphate and ATP in Microbial Extracts. *Bioch. Bioph. Acta*, **18**, 592—593 (1955).
16. De Moss J. A., Novelli G. D.: An Amino Acids Dependent Exchange between P<sup>32</sup> Labelled Inorganic PP and ATP in Microbial Extracts. *Bioch. Bioph. Acta* **22**, 49—61 (1956).
17. Dokstader W. B., Halvorson H. O.: A Study of Grinding Techniques for Bacterial Cells. *Science*, **112**, 618—620 (1950).
18. Fiske C. H., Subbarow Y.: *J. Biol. Chem.* **66**, 375 (1925) — cyt. wg Glick D.: *Methods of Biochemical Analysis*, **3**, 1 (1956) Interscience Publishers Inc, New York.
19. Frear D. S., Burrell R. C.: Spectrophotometric Method for Determining Hydroksylamine Reductase in Higher Plants. *Anal. Chem.* **27**, 1664—1665 (1955).
20. Gale E. F.: Assimilation of Amino Acids by Gram-Positive Bacteria and some Actions of Antibiotics Thereon. *Adv. Prot. Chem.*, **8**, 285—391 (1953).
21. Gąsior E.: Transaminaza Asp-Glu u *Mycobacterium phlei.*, *Ann. Univ. M. Curie-Skłodowska. Sec. D*, **11**, 161—174 (1956).
22. Gąsior E., Socha B.: Wolne aminokwasy u *Mycobact. phlei.* (niepublikowane (1960).
23. Głębiński T., Jałowicka D., Sym E. A.: Metabolizm rozwojowy prątków gruźliczych szczepów H-37Rv i L hodowanych na pożywcze DGK. Ogólna charakterystyka metabolizmu prątka gruźliczego. *Gruźlica* **18**, 413—426 (1950).
24. Hanes C. S., Isherwood F. A.: Separation of Phosphoric Esters on Filter Paper Chromatogram. *Nature* **164**, 1107—1112 (1949).
25. Hoagland M. B.: An Enzymic Mechanism for Amino Acids Activation in Animal Tissues. *Bioch. Bioph. Acta* **16**, 288—289 (1955).



26. Hoagland M. B., Keller E. B., Zamecnik P. C.: Enzymatic Carboxyl Activation of Amino Acids. *J. Biol. Chem.* **218**, 345—358 (1956).
27. Kański M., Sakławska-Szymonowa O., Szymona M.: Transaminaza asparaginowo  $\alpha$ -ketoglutarowa u *Mycobacterium phlei*. *Acta Bioch. Pol.* **1**, 277—284 (1954).
28. Lowry O. H., Rosenbrough N. J., Farr A. L., Randall R. J.: Protein Measurement with Folin Reagent. *J. Biol. Chem.* **193**, 265—275 (1951).
29. Macorquodale D. J., Mueller G. C.: Effect of Estradiol on the Level of Amino Acid-Activating Enzymes in the Rat Uterus. *J. Biol. Chem.* **232**, 31—42 (1958).
30. Macorquodale D. J., Zillig W.: Untersuchungen zur Biosynthese der Proteine. II. Über die Verteilung der aminosäureaktivierenden Enzyme in Zellfraktionen aus Homogenisaten von *Escherichia coli* B. Hoppe-Seyler's Zeitsch. *Physiol. Chemie* **315**, 86—89 (1959).
31. Marcus A.: Amino Acid Dependent Exchange between Phyrophosphate and Adenosine Triphosphate in Spinach Preparations. *J. Biol. Chem.* **234**, 1238—1240 (1959).
32. Nismann B., Bergmann F. H., Berg P.: Observation on Amino Acid-Dependent Exchanges of Inorganic PP and ATP. *Bioch. Bioph. Acta* **26**, 639—640 (1957).
33. Nismann B.: Incorporation and Activation of Amino Acids by Disrupted Protoplasts of *E. coli*. *Bioch. Bioph. Acta* **32**, 18—31 (1959).
34. Novelli G. D.: Some Problems Concerning the Activation of Amino Acids. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S.* **44**, 86—91 (1958).
35. Opieńska-Blauth J., Madecka-Borkowska I., Borkowski T.: Wykrywanie fosforowych metabolitów metodą chromatografii bibułowej. *Acta Physiol. Pol.* **3**, 315—328 (1952).
36. Paulette G., Defranceschi A.: Studies on the Amino Acids Metabolism of *Mycobact. tbc*. I. Preliminary Investigation by Paper Chromatography. *Bioch. Bioph. Acta* **9**, 271—282 (1952).
37. Rendi R. Di Milia A., Fronticelli C.: Some Characteristics of the Enzymic Carboxyl Activation of Methionine. *Biochem. J.* **70**, 62—66 (1958).
38. Schweet R. S.: The Quantitative Determination of Amino Acids Hydroksamidcs. *Bioch. Bioph. Acta* **18**, 566 (1955).
39. Schweet R. S., Holley R. W., Allen E. H.: Amino Acid Activation in Hog Pancreas. *Arch. Bioch. Bioph.* **71**, 311—325 (1957).
40. Schweet R. S., Allen E. H.: Purification and Properties of Tyrosine Activating Enzyme of Hog Pancreas. *J. Biol. Chem.* **233**, 1104—1108 (1958).
41. Seibert F. B., Fabrizio A. M.: *Am. Rev. Tuberc.*, **66**, 314 (1952), cyt. wg Rzucidlo L.: Białka somatyczne prątka i tuberkulina. Budowa chemiczna prątka gruźlicy. PZWL Warszawa 1960.
42. Szafranski P., Sułkowski E.: Activation of Amino Acids in Various Organs of the Guinea Pig. *Acta Bioch. Pol.* **6**, 133—141 (1959).
43. Szymona M.: The Phosphorylation of Glucose and Glucosamine by Acetone Powder of *Mycobacterium phlei*. *Bull. Acad. Sci. Pol., Cl. II*, **4**, 121—125 (1950).
44. Szymona M.: Utilisation of Inorganic Polyphosphate for Phosphorylation of Glucose in *Mycobacterium phlei*. *Bull. Acad. Sci. Pol., Cl. II*, **5**, 379—381 (1957).
45. Tuboi S., Huzino A.: Enzymic Activation of Peptide. *Arch. Bioch. Bioph.* **86**, 309—310 (1960).

46. Wachsmann J. T., Fukuhara H., Nismann B.: The Activation and Incorporation of Amino Acids by Subcellular Fractions of *Bacillus Megatherium* Strain M. *Bioch. Bioph. Acta* **42**, 388—400 (1960).
47. Webster G. C.: Activation of Amino Acids and Amides by Cell-Free Preparation. *Arch. Bioch. Bioph.* **82**, 125—134 (1959).
48. Wiame J. M., Storck R.: Métabolisme de l'acide glutamique chez *Bacillus subtilis*. *Bioch. Bioph. Acta*, **10**, 268—279 (1953).
49. Van De Ven A. M., Koningsberger V. V., Overbeck J. Th. G.: Isolation of Tyrosine-Activating Enzyme from Baker's Yeast., *Bioch. Bioph. Acta* **28**, 134—143 (1958).

---

### Р Е З Ю М Е

Методом обмена АТФ — РР<sup>32</sup> установлено, что фракция рН 4,4, получаемая от *Mycobacterium phlei*, обладает способностью активировать все обыкновенные аминокислоты.

Путем фракционирования сернокислым аммонием фермент, активирующий лейцин, был несколько раз сгущен. Он характеризуется лабильностью, оптимум рН колеблется в границах 7,4—7,6.

Обнаружена активация лейциновых пептидов лейцил-глицина, аланил-лейцина и глицил-лейцина ферментом, активирующим лейцин.

Автору не удалось установить прямой зависимости между концентрацией аминокислот в белках палочки во внутриклеточном наборе, и их активацией.

Автором произведены сравнительные определения активации с помощью гидроксисового метода. Полученные результаты подвергнуты обсуждению.

Табл. 1. Активация аминокислот сырым бактериальным экстрактом.

Табл. 2. Активация аминокислот фракцией рН 4,4

Табл. 3. Активация лейцина различными энзиматическими фракциями.

Табл. 4. Активация лейцина на основании определений гидроксамота.

Табл. 5. Активация пептидов лейциновым ферментом.

Табл. 6. Активация глутаминовой кислоты и других аминокислот бактериями, культивированными на синтетическом субстрате.

Рис. 1. Зависимость между рН инкубационной смеси и активацией лейцина.

---

### S U M M A R Y

It was found by the method of exchange ATP-PP<sup>32</sup> that the pH 4.4 fraction obtained from *Mycobacterium phlei* is able to activate all common amino acids.

By fractionation with ammonium sulphate, the author obtained ma-

nifold concentration of an enzyme which activates leucine. The enzyme is labile, the optimum pH is 7.4—7.6.

Activation by the leucine-activating enzyme of the following leucine peptides was demonstrated: leucylo-glycine, alanylo-leucine and glycilo-leucine.

It was not possible to demonstrate a simple correlation between the concentration of amino acids in the proteins of the bacterium or in the intracellular pool, and their activation.

Comparative estimations of the activation were carried out by the hydroxam method, and the results are discussed.

