Dalsze studia nad glutationem. Związek miedziowy utlenionego glutationu drożdży.

(A copper compound of the oxidised glutathione).

Napisał

ANTONI KOZŁOWSKI

I. Uwagi ogólne.

Cysteina przedstawia związek bardzo zajmujący fizjologa pod wielu względami, przedewszystkiem narzuca mu pytanie, w jaki sposób tlenek siarki, doprowadzony do komórki żywej w postaci soli kwasu siarkowego ($\text{HO} \cdot \text{SO}_2 \cdot \text{OH}$) oraz tlenek azotu, w postaci soli kwasu azotowego ($\text{HO} \cdot \text{NO}_3$), zostają odtlenione i następnie uwodornione do grupy wodorosiarkowej (sulfhydrylowej, merkaptanowej, $-\text{SH}$) wzgl. do grupy wodorooazotowej (aminowej, $-\text{NH}_2$). Przemiana podobna *in vitro* wymaga tak licznych zabiegów chemicznych i tak dużego nakładu energii, że wprawia badacza w zdumienie swym łatwym przebiegiem w organizmie rośliny.

Prócz powyższego, cysteina nasuwa biologowi jeszcze inne, nie mniej zaciekawiające zagadnienie, mianowicie, jaką rolę może ów aminokwas odgrywać w procesach wymiany atomów wodoru między pewnemi składnikami treści komórki. Wiadomo bowiem, że grupa sulfhydrylowa cysteiny może łatwo w odpowiednich warunkach odczepiać wodór, który następnie zostaje przyłączony do tlenu powietrza, do pewnych związków sztucznie doprowadzonych, lub też do niektórych normalnych składników treści komórki; w procesie takim cysteina przechodzi w odmianę złożoną z dwóch drobin cysteiny odwodornionej, czyli w cystynę:

W organizmie żywym zachodzi równocześnie reakcja odwrotna, t. j. przyłączanie wodoru przez cystynę, czyli jej przejście w cysteinę; tak więc ów aminokwas może być zarówno dawcą jak też odbiorcą wodoru. Równowaga owej przemiany może być przesunięta w jednym lub drugim kierunku, co zależy od funkcji fizjologicznej danej komórki. Na uwagę zasługują tu spostrzeżenia, według których komórki odznaczające się wzmożoną przemianą materji, jak np. komórki merystematycznych tkanek korzeni i pędów, oraz komórki przerabiające intensywnie glikogen, jak np. komórki rozwijających się drożdży i wielu innych grzybów, komórki mięśni i wątroby, są szczególnie bogate w cysteinę, która nadto przeważa tu ilościowo nad cystyną. W tkankach natomiast rozwiniętych rośliny, gdzie przemiana materji przebiega w znacznie powolniejszym tempie, cystyna przeważa ilościowo nad cysteiną, a zarazem obie znajdują się tam w stosunkowo niedużej ilości. Należy tu też zaznaczyć, że komórki chlorofilonośne są stosunkowo ubogie w ów aminokwas i że zawierają go przeważnie w postaci cystyny; kwestja jednak ta wymaga jeszcze obszerniejszych i ściślejszych badań. Bezpośrednie bowiem mikrochemiczne wykazanie cysteiny przy pomocy reakcji nitroprusydkowej w tkankach zielonych jest utrudnione przez chlorofil; wyizolowanie zaś z nich cystyny nie dowodzi jeszcze, że znajdowała się ona w tkankach żywych jako taka, a nie w postaci cysteiny, która mogła ulec odwodornieniu podczas jej preparowania.

Jakkolwiek nie jest jeszcze zbadaniem, które składniki treści komórki biorą udział w przemianie cysteiny na cystynę lub w procesie odwrotnym i jakie przy tem powstają związki pośrednie, nie ulega najmniejszej wątpliwości, że wokół grupy sulfhydrylowej cysteiny koncentruje się bardzo ważny cykl przemiany materji, w który włączone są nie tylko procesy odwodornienia i uwodornienia, lecz prawdopodobnie także procesy hydrolizy, jak o tem można wnioskować z prac Grassmanna (1), Krebsa (2) i Waldschmidt-Leitza (3).

Jednym z takich cykli metabolizmu, w którym siarka organicznie związana odgrywa prawdopodobnie bardzo ważną rolę, jest przeróbka cukrów prowadząca do powstawania alkoholu czyli fermentacja alkoholowa. Badania przeprowadzone w pracowniach Hardena i Eulera wykazały, że koferment zymazy, ko-zymaza, zawiera siarkę; pozostaje jeszcze do zbadania, czy siarka owa należy do cysteiny wzgl. cystyny, czy też do jakiegoś innego związku.

W każdym razie należy tu podkreślić, że komórki zdolne do intensywnej fermentacji alkoholowej, jak np. komórki drożdży i nasion wielu gatunków roślin, odznaczają się dużą zawartością cysteiny; co więcej, ekstrakt z takich organizmów traci własności ko-zymazy, jeśli cysteina zostanie w nim rozłożona przez silniejsze ogrzewanie. Możliwe jest, że cysteina odgrywa tu rolę ko-zymazy i że cystyna, obok innych, służy tu jako akceptor wodoru, który — zdaniem Kluyvera i Struyka (4) — jest jednym z niezbędnych czynników w procesie owej fermentacji. Jeśliby owo przypuszczenie okazało się w przyszłości uzasadnione, pociągnie ono za sobą dalszy wniosek, wyjaśniający mechanizm tego procesu, a mianowicie, że cysteina, w roli ko-zymazy, bierze udział w reakcjach dysmutacyjnych; Euler bowiem i Myrbäck (5) wykazali, że ko-zymaza jest identyczną z ko-mutazą.

Na szczególną uwagę zasługuje tutaj fakt, że cysteina zawarta w drożdżach, odznacza się dużą nietrwałością w przeciwstawieniu do cysteiny powszechnie znanej (sporządzanej przez uwodornienie cystyny otrzymywanej z włosów lub rogów zwierzęcych rozkładanych silnym kwasem mineralnym, 25% HCl). Jakto już na innym miejscu (6) zaznaczono, cysteina drożdży odczepia siarkowodór już w chwili zabicia komórki. Podczas gdy zwykła cysteina wzgl. cystyna wydziela SH_2 dopiero przy reakcji silnie alkalicznej i to w temperaturze podwyższonej, cysteina w ekstrakcie z drożdży traci grupę $-\text{SH}$ już w temperaturze pokojowej, przy reakcji wyraźnie kwaśnej (koncentracja jonów wodorowych w soku komórkowym drożdży jest w pobliżu $\text{pH} = 5.6$).

Wszelkie usiłowania podjęte przez autora, w celu zapobieżenia temu rozkładowi środkami chemicznymi spełzły na niczem. Między wielu substancjami badał autor także wpływ siarki pierwiastkowej. Jak wiadomo, siarka sproszkowana, dodana do roztartych tkanek powoduje w wielu przypadkach intensywne wydzielanie siarkowodoru. De Ray-Pailhade (7) tłumaczy to obecnością labilnego czyli aktywnego atomu wodoru w grupie sulfhydrylowej (w związku nazwanym przez niego filotionem), który może być przyłączany do siarki, dając w ten sposób siarkowodór:

Nie miejsce tu rozpatrywać, czy rzeczywiście taka reakcja w owym przypadku zachodzi; w każdym razie należy tu podkreślić, że siarkowodór, wydzielany z drożdży zadanych siarką, nie pochodzi z uwo-

dornienia tej ostatniej, lecz z rozkładu cysteiny drożdży. Siarka, dodana do wodnej suspenzji drożdży, da się z powrotem odzyskać ilościowo; jeśli jednak takie drożdże, poddane działaniu siarki na przeciąg kilkunastu godzin lub kilku dni, wyciągniemy następnie rozcieńczonym acetonem, ekstrakt zawierać będzie tylko drobne ilości cysteiny wzgl. cystyny lub glutationu w porównaniu do grupy kontrolnej. Wobec tego zaleconą jest duża ostrożność w interpretacji zjawiska opisanego przez de Ray-Pailhade'go.

Owa nietrwałość cysteiny w drożdżach może być tłumaczona w sposób trojaki, a mianowicie: 1) specyficzną strukturą chemiczną t. j. nietrwałem wiązaniem grupy siarkowodorowej w drobinie owego aminokwasu zawartego w drożdżach; 2) wpływem wiązania, prawdopodobnie peptydowego, cysteiny w glutationie; 3) sąsiedztwem pewnych związków w ekstrakcie, które łatwo atakują grupę $-SH$ cysteiny. Narazie trudno jeszcze orzec, który z tych czynników gra główną rolę. Znanem jest, że cystyna może istnieć w wielu odmianach różniących się postacią kryształów, rozpuszczalnością i trwałością; na nietrwałość pewnej odmiany cystyny zwrócił pierwszy uwagę Gabriel (8), według którego izo-cystyna odczepia siarkę nawet w roztworze kwaśnym ogrzewanym w obecności siarczanu miedzi. Zauważono też wielokrotnie, że cysteina związana peptydowo staje się skłonną do odczepiania $-SH$. Cysteina glutationu drożdży, poddana uprzednio odwodornieniu na cystynę, a następnie ogrzewana z 25% kwasem solnym lub siarkowym, ulega częściowo rozkładowi z wydzielaniem siarki bezpostaciowej, a częściowo przemianie na sól cystyny trwałej. Wpływ innych substancji da się zauważyć choćby już w tem, że w acetonowym ekstrakcie z drożdży cysteina ulega niemal zupełnemu rozkładowi w ciągu 24 godzin przy $+4^{\circ}$, podczas gdy oczyszczony preparat cysteiny wzgl. glutationu w podobnych warunkach wydziela siarkowodorów znacznie powolniej, a jeszcze słabiej po odwodornieniu.

Bądź co bądź, nietrwałość cysteiny drożdży powinna być uwzględniona nie tylko w preparatyce i w doświadczeniach fizjologicznych, lecz także przy określaniu struktury chemicznej glutationu i związków jemu podobnych.

Struktura chemiczna glutationu drożdży wymaga jeszcze dalszych ściślejszych dat analitycznych. Substancja ta, zawierająca około 10.5% siarki i 13.5% azotu, została początkowo określona przez Hopkinsa (9) jako dwupeptyd, złożony z cysteiny i kwasu glutaminowego; później jednak Hopkins (10) i niezależnie od niego Kendall (11) doszli do wniosku, że glutation drożdży jest dość nie-

trwałym (12) trójeptydem złożonym z cysteiny, kwasu glutaminowego i glikokolu. Wobec jednak owej nietrwałości glutationu, oraz ze względu na to, że indentyfikacja jego składników z wyjątkiem cysteiny nie została jeszcze poparta przez wyczerpującą analizę elementarną, wyjaśnienie budowy chemicznej glutationu pozostaje nadal pod znakiem zapytania. Nie jest bowiem wykluczonem, że preparat glutationu drożdży i substancyj podobnych, wyizolowanych z innych organizmów, może zawierać także pochodne cysteiny, od której została odczepiona grupa sulfhydrylowa. Że taka wtórna zmiana peptydu jest możliwa, o tem świadczy praca Bergmana i Stathera (13), w której przeprowadzono przemianę dwualanilocystyny w krystaliczną pochodną, wolną od siarki. Również Brand i Sandberg (14) zwrócili uwagę, że odczepienie grupy wodosiarkowej może spowodować zmianę w własnościach glutationu lub związków jemu podobnych.

Z uwzględnieniem trudności napotykaných przy badaniu glutationu autor podjął się sporządzenia związku miedziowego, który może ułatwi dalsze dotyczące studia.

II. Związek miedziowy glutationu odwodornionego.

Glutation uwodorniony, wykrystalizowany z mieszaniny alkoholu i eteru (6), w ilości około 0.9 gm z 1 kg świeżych prasowanych drożdży piekarskich, wykazuje pod mikroskopem duże kryształy pryzmatyczne zebrane w rozetki, oraz mniejsze, igielkowate, skupione w druzę; obok tych daje się zauważyć drobna ilość substancji żółtawej, żywicowatej, która nie da się oddzielić przez dalsze przekrystalizowanie lub przez ponowne przeprowadzenie preparatu przez związek miedziowy; możliwe, że owo zanieczyszczenie bezpostaciowe powstaje na nowo wskutek częściowego rozkładu glutationu.

Preparat taki zawierał: 39.89% C, 5.80% H, 13.86% N (Dumas) i 9.5% S. (Nadtlenek sodu, benzydyna).

Sposób sporządzenia miedziowego związku glutationu uwodornionego, opisany przez Hopkinsa (10) nie wyklucza możliwości zanieczyszczenia takiego preparatu śladami tlenku metalu, który niełatwo da się wypłukać rozcieńczonym kwasem siarkowym z mikroskopijnie ziarnistego i łatwo zbijającego się osadu. Trudność tę można uniknąć przez sporządzenie podobnego związku z glutationu odwodornionego. Metoda w tym celu stosowana jest bardzo łatwą i umożliwia uprzednie oczyszczenie glutationu przez użycie octanu ołowiu, który łatwo strąca glutation uwodorniony, nieznacznie natomiast

glutaton odwodorniony, z tego zaś ostatniego usuwa pewne zanieczyszczenia. Nadmiar tlenu miedziawego nie powoduje, w przeciwstawieniu do glutatonu uwodornionego, rozpuszczania się kompleksu miedziowego glutatonu odwodornionego i da się łatwo oddzielić przez filtrowanie. Przebieg pracy może być przedstawiony na następującym przykładzie:

75 gm glutatonu uwodornionego rozpuszczono w 300 cm³ wody, zobojętniono kwaśnym węglanem potasu, zadano kroplą 0.1% chlorku żelaza i mieszano prądem powietrza, dopóki wszystka cysteina nie została odwodorniona na cystynę, t. j. dopóki nie znikła goździkowa barwa wywołana chlorkiem żelaza, a reakcja nitroprusydkowa na cysteinę stała się negatywną. Płyn żółto zabarwiony zakwaszono słabo kwasem octowym i zadano kilku kroplami 10% roztworu obojętnego octanu ołowiu. Powstały osad odfiltrowano; bezbarwny filtrat, zadawany dalej octanem ołowiu, dawał najpierw osad nanowo się rozpuszczający, a wkońcu wytworzył trwałą mleczną suspensję: podczas potrząsania płynu przylepiał się do ściany kolby żywicowy osad. suspensję ową pozostawiono przez noc w temperaturze +1°. Płyn lekko mętny odlano; osad rozłożono dostateczną ilością 3% kwasu siarkowego; filtrat po siarczanie ołowiu dał silną reakcję nitroprusydkową w obecności cyanku potasu; frakcję tę przerobiono osobno na związek miedziowy.

Płyn, oddzielony od owego żywcowatego osadu, przefiltrowano; filtrat uwolniono od ołowiu rozcieńczonym kwasem siarkowym i zadano tym ostatnim do ilości około 25%, poczem dodawano po kropli suspensji wodnej tlenu miedziawego, sporządzonego z odczynnika Fehlinga. W miarę rozpuszczania się tlenu płyn zabarwiał się cytrynowo żółto, zielono, a wkońcu zmętniał od nadmiaru zbrunatniałego tlenu metalu. Zawiesinę taką potrząsano przez kilka minut i pozostawiono w spokoju; przefiltrowano ją natychmiast, skoro tylko zaczął się pojawiać na powierzchni płynu biały nalot, pełzający na ścianę kolby. Filtrat przejrzysty, żółto-zielono zabarwiony, mieszano prądem powietrza; stopniowo wytwarzał się coraz to obfitszy biały osad. Suspensję taką zostawiono przez noc przy +1°; osad biały odcentryfugowano, zawieszono w 2 l wody, ponownie odcentryfugowano, przepłukiwano wodą, aż przepłuczyny przybrały reakcję obojętną; poczem przepłukiwano go kolejno acetonem rozcieńczonym, absolutnym i suchym eterem, świeżo przedestylowanym z nad wodortlenu potasu; wkońcu suszono go w obecności pięciotlenu fosforu w eksykatorze wypróżnionym pompą olejowo-rtęciową. W ten spo-

sób otrzymano około 6·5 gm białego, bezpostaciowego proszku o ledwie uchwytym odcieniu niebieskawym.

Związek ten trudno rozpuszcza się w 5%, nieco łatwiej w 10% i 20% kwasie siarkowym, bardzo zaś łatwo w rozcieńczonym kwasie solnym; jeśli do wodnej suspensji tej substancji dodawano po kropli 1% kwasu solnego, powstał bezbarwny, przeźroczysty roztwór, z którego wypadł z powrotem, podczas zobojętniania kwaśnym węglanem potasu, biały osad; podobny roztwór w 10—20% kwasie solnym przybiera wkrótce barwę żółtą i zieloną. Ledwie uchwytna ilość owego proszku rozpuszczona w kropli roztworu cyanku potasu daje intensywną barwę purpurową po dodaniu nitroprusydku sodu.

Substancja ta wolna była od kwasu siarkowego; zawartość miedzi owego kompleksu wynosiła 16·45% Cu; po odliczeniu Cu substancja organiczna zawierała 10·24% siarki i 13·20% azotu (S oznaczono metodą Cariusa, azot zaś metodą Kjeldahla).

Podobny kompleks otrzymany z frakcji wytrąconej octanem ołowiu, w sposób wyżej opisany, zawierał tylko 7·55% siarki po odliczeniu miedzi.

Bardzo pilną uwagę należy zwrócić na zupełne usunięcie kwasu siarkowego z kompleksu miedziowego; jest to praca dość mozolna, gdyż ślady tego kwasu tkwią uporczywie w owej substancji; odnosi się przytem wrażenie, że kwas siarkowy jest luźno związany z kompleksem miedziowym i powoli zostaje odczepiany pod działaniem wody. W razie niestaranego usunięcia choćby śladów kwasu, nastąpi jego zagęszczenie podczas suszenia preparatu, co pociągnie za sobą rozkład substancji. W celu zbadania, czy preparat wolny był od kwasu siarkowego, należy przeprowadzić następującą próbę: roztwór około 0·15 gm substancji w 20 cm³ 20% kwasu solnego odparować na kąpeli parowej; pozostałość brunatną zadać 10 cm³ wody; jeśli płyn wykaże zmętnienie, należy go podobnie zadać kwasem solnym i odparować; jeśli zaś jest przeźroczysty, należy go zadać około 100 cm³ wody, ogrzać do wrzenia i zadać 10 cm³ 10% roztworu chlorku baru; po dwudziestu minutach wrzenia, pozostawić płyn w temperaturze pokojowej przez kilka godzin; w razie zanieczyszczenia kwasem siarkowym, opadnie siarczan baru.

O ile nie zamierzano otrzymać krystalicznego preparatu glutationu uwodornionego, sporządzenie kompleksu miedziowego glutationu odwodornionego przeprowadzono w sposób następujący: ekstrakt z drożdży, otrzymany rozcieńczonym acetonem, strącono octanem ołowiu; osad rozłożono 3% kwasem siarkowym; filtrat po siarczanie ołowiu zadano rozcieńczonym kwasem siarkowym do 2·5%

i strącono tlenkiem miedziawym; jedwabisto połyskujący związek miedziawy przepłukano wodą i rozłożono siarkowodorem. Filtrat po siarczku miedzi uwolniono od siarkowodoru prądem powietrza, zobojętniono kwaśnym węglanem potasu, mieszano prądem powietrza aż do zupełnego odwodornienia cysteiny, zadano rozcieńczonym kwasem siarkowym do 2·5% i strącono tlenkiem miedziawym w sposób wyżej opisany.

Praca może być jeszcze bardziej uproszczona, jeśli acetonowy ekstrakt z drożdży strącimy wprost tlenkiem miedziawym, jak to już dawniej opisano (6).

Summary.

A solution of the oxidised glutathione, containing about 2·5% sulphuric acid, was treated with cuprous oxide (Cu_2O); a slight excess of this latter was filtered off; the yellow green filtrate was aerated and left in the coldroom for several hours. A white precipitate was centrifugalized, washed with water, acetone and ether, and dried over phosphorpentoxide in a vacuum desiccator. Yield: about 1 gm per 1 gm of the glutathione.

The copper compound contained 16·45% Cu, and, on subtracting Cu, 10·24% sulphur and 13·2% nitrogen.

The substance was very readily soluble in 1% hydrochloric acid and in a solution of potassium cyanide.

Literatura.

1. Grassmann, W., Dyckerhoff und v. Schoenbeck, O. Ztschr. physiol. Chem. 1930, **186**, 183.
2. Krebs, A. Biochem. 1930. **220**, 289.
3. Waldschmidt-Leitz. Naturwiss. 1930, 644 i 952.
4. Kluyver, A. J. und Struyk, A. P. Biochem. Ztsch. 1928, **201**, 212.
5. Euler, v. H., und Myrbäck, K. Ztschr. physiol. Chem. 1928, **178**, 237.
6. Kozłowski, A. Acta Soc. Bot. Poloniae. 1930. **7**, 87.
7. de Ray-Pailhade. Bull. Soc. Chim. Biol. 1929, **11**, 308 i 1143.
8. Gabriel, S. Ber. Chem. Ges. 1905, **38**, 630.
9. Hopkins, F. G. Biochem. J. 1921, **15**, 287.
10. Hopkins, F. G. J. Biol. Chem. 1929, **84**, 269.
11. Kendall, E. C., McKenzie and H. L. Mason, J. Biol. Chem. 1929, **84**, 657 i 1930, **88**, 409.
12. Mason, H. L. J. Biol. Chem. 1931, **90**, 25.
13. Bergmann M. und Stather. Ztschr. physiol. Chem. 1926, **152**, 189.
14. Bergmann, M. und Brand, E. Ber. Chem. Ges. 1926, **56**, 1280.
15. Brand, E. and Sandberg, M. J. Biol. Chem. 1926, **70**, 381.