

previously reported². The faint albumin-like peak exhibited by the early regenerating liver may be due to: (a) increased production of albumin; (b) reduced release of albumin into the blood stream; (c) depolymerization of large molecules into smaller ones, as suggested by DI SABATO¹⁰ for cell vacuolation, a regressive process also appearing in the regenerating liver¹¹.

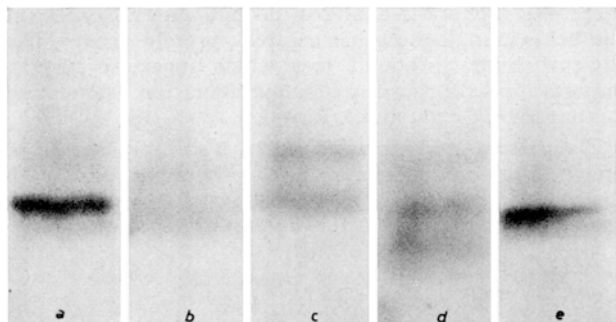


Fig. 2—Paper electrophoresis pattern of glycoproteins of resting and regenerating rat liver. The symbols are the same as in Fig. 1.

Staining: periodic acid-Schiff⁹.

Because of the virtual identity of the normal and regenerating liver protein patterns, evidence is given that no single protein could be regarded as a reserve material chemically different from the basal structural proteins (LUCK¹²). Furthermore, since it is well known that the neoplastic liver growth is accompanied by a marked reduction in the amount of slowly moving proteins and by a large increase in the fast-moving ones², our results show that the liver regeneration is quite a normal growth in spite of the biochemical similarities with the liver tumors¹³.

Evidence is given in Figure 2 that the liver soluble glycoproteins markedly decrease 24 h after operation. 60 and 240 h later, two faint peaks, and may be a third one, appear in the electrophoretic pattern. 30 days after hepatectomy, the glycoproteins are again normalized. This behaviour most likely accounts for a decrease of the ground substance of the liver connective tissue, secondary to the stress induced by the surgical trauma⁴. It may also be suggested that during the liver regeneration the more complex conjugated proteins synthesis is sacrificed on behalf of the synthesis of the bulk of the proteins necessary to the parenchymal re-building.

G. GUIDOTTI and E. CLERICI

Institute of General Pathology, University of Milan (Italy), June 5, 1958.

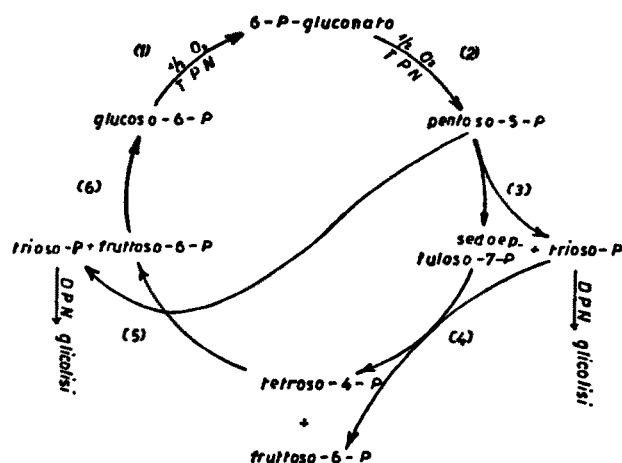
Riassunto

Gli autori hanno studiato il comportamento delle proteine e delle glicoproteine solubili del fegato rigenerante di ratto mediante l'elettroforesi su carta. La colorazione con Amidoschwarz mostra che il comportamento elettroforetico delle proteine di fegato rigenerante è praticamente sovrapponibile a quello del fegato normale. La colorazione secondo KÖRW e GRÖNWALL dimostra che le glicoproteine diminuiscono nei primi giorni dopo l'atto operatorio, tornando però alla normalità circa 30 giorni dopo l'epatectomia.

Eptoformazione non ossidativa nel muscolo scheletrico

Con il termine di «eptoformazione non ossidativa», BONSIGNORE *et al.*¹ hanno indicato la formazione, esclusivamente anaerobia, in assenza di TPN, di un eptoso-fosfato – probabilmente sedoeptuloso-7-fosfato – a partire da glucoso-6-fosfato, ad opera della frazione solubile di omogenati di fegato di ratto.

Normalmente invece, come è noto, lo stesso sedoeptuloso-7-fosfato viene considerato un prodotto della degradazione dei pentosi, a loro volta formati aerobicamente dagli esosio-fosfati, mediante l'intervento degli enzimi glucoso-6-fosfato- e 6-fosfogluconato-deidrasi (TPN specifici) della via ossidativa diretta. Attraverso la formazione intermedia di eptoso, i pentosi possono poi essere convertiti anaerobicamente ad esosi. Questa conversione, come è sommariamente indicato nello schema del ciclo di Horecker qui sotto riportato, è catalizzata dagli enzimi transchetolasi e transaldolasi.



- (1) Glucoso-6-fosfato-deidrasi; (2) 6-fosfogluconato-deidrasi; (3) transchetolasi; (4) transaldolasi; (5) transchetolasi; (6) esosio-fosfatoisomerasi.

Per spiegare la «eptoformazione non ossidativa», BONSIGNORE *et al.*¹ ammettono appunto l'intervento catalitico di questi enzimi transchetolasi e transaldolasi in senso inverso a quello riportato nello schema, cioè nel senso della trasformazione anaerobia degli esosi (glucoso-6-fosfato e fruttosio-6-fosfato) a pentosi.

Nella presente nota dimostriamo che la eptoformazione anaerobia a partire da glucoso-6-fosfato (e da fruttosio-6-fosfato) ha luogo anche ad opera di estratti enzimatici di muscolo scheletrico. Nel muscolo scheletrico, sprovvisto, completamente² o quasi³, delle attività deidrasiche della via ossidativa diretta (glucoso-6-fosfato- e 6-fosfogluconato-deidrasi), la dimostrazione di tale «eptoformazione non ossidativa» potrebbe assumere particolare importanza, in quanto potrebbe indicare la via seguita da questo tessuto per la biosintesi dei pentosi.

L'estratto enzimatico è stato preparato da muscolo scheletrico di ratto con il metodo di GLOCK e McLEAN³, seguito da BONSIGNORE *et al.*¹. Il metodo consiste essen-

¹⁰ G. DI SABATO, *Exper.* 12, 385 (1956).

¹¹ K. ATERMAN, *Arch. Path.* 53, 209 (1952).

¹² J. M. LUCK, *J. biol. Chem.* 115, 491 (1936).

¹³ E. CLERICI, G. GUIDOTTI, and E. BAZZANO, *Tumori*, in press.

¹ A. BONSIGNORE, S. PONTREMOLI, G. FORNAINI e E. GRAZI, *G. Biochim.* 6, 241 (1957).

² T. L. KELLY, E. D. NIELSON, R. B. JOHNSON e C. S. VESTLING, *J. biol. Chem.* 212, 545 (1955).

³ G. E. GLOCK e P. McLEAN, *Biochem. J.* 56, 171 (1954).

zialmente in una estrazione a 0–4°C del tessuto – previa triturazione con sabbia di quarzo – in KCl 0,15 *M* contenente, per litro, 8 ml di KHCO₃ 0,02 *M*. Dopo ultracentrifugazione (25 min a 14 000 g), abbiamo però ritenuto opportuno trattare l'estratto con carbone Merck (60 mg/ml)⁴, per eliminare i nucleotidi presenti nell'estratto⁵, e in particolare il TPN (la cui assenza impediva la formazione di eptoso attraverso la eventuale, sia pur scarsa, via ossidativa diretta), e l'ATP (la cui assenza impediva la fosforilazione dell'esoso-fosfato ad estere difosforico, e quindi la sua degradazione attraverso la via glicolitica). Il trattamento eliminava inoltre l'interferenza dei pentosi nucleotidici nei procedimenti di identificazione e di dosaggio dell'eptoso.

L'estratto enzimatico così trattato, previa dialisi per 16–20 h a 0–4°C contro il liquido di estrazione, veniva usato per le prove enzimatiche.

La composizione dettagliata delle prove è indicata nella tabella, in cui sono riportati i valori (espressi come μM di eptoso/mg di N₂ proteico) dell'attività enzimatica eptoforativa del nostro estratto a partire da glucoso-6-fosfato e da fruttosio-6-fosfato⁸.

Tabella

Ciascuna prova conteneva: 1 ml estratto enzimatico (contenente ~ 1,5 mg N₂ proteico, dosato con il metodo di KJELDAHL-NESSLER); 250 μM tampone Tris pH 7,6; 1 μM acido monoiodoacetico¹⁰; 7,5 μM esoso-6-PO₄. Il volume finale veniva portato a 2,5 ml con il KCl di estrazione. Ambiente: aria. Temperatura: 37°C. Tempo di incubazione: 4 h.

Substrato	μM eptoso/mg N ₂ proteico
—	0,00
Glucoso-6-P	0,15
Fruttosio-6-P	0,19

Vari metodi sono stati seguiti per identificare la presenza e la natura chimica dell'eptoso. Nelle nostre condizioni sperimentali, come abbiamo già detto, tali metodi di identificazione e di dosaggio erano notevolmente facilitati, data l'assenza nell'estratto enzimatico dei pentosi nucleotidici, capaci di interferire fortemente nei metodi stessi.

⁴ P. J. VANDEMARK e W. A. WOOD, *J. Bact.* 71, 385 (1956).

⁵ L'efficacia del trattamento con carbone era dimostrata dalla completa scomparsa nell'estratto dei pentosi nucleotidici, dosabili con la reazione all'orcinolo secondo MEJBAUM⁶, dopo riscaldamento in HCl 6 *N* a 100°C per 40 min⁷. Il carbone, nei 30 min in cui veniva lasciato a contatto con l'estratto, adsorbiva anche il 40% delle proteine. Per questo motivo l'estratto iniziale veniva fatto più concentrato (25%), di quanto (10%) suggerito da BONSIGNORE¹.

⁶ W. MEJBAUM, *Hoppe-Seylers Z.* 258, 117 (1939).

⁷ H. G. ALBAUM e W. W. UMBREIT, *J. biol. Chem.* 167, 369 (1947).
– A. BONSIGNORE, E. MARINELLO e G. MISSALE, *Aggiornamenti Biochimica* (Ed. Pensiero Scientifico, Roma 1955), p. 142.

⁸ Durante l'incubazione, i substrati aggiunti non subivano alcuna idrolisi fosfataseica, come abbiamo potuto constatare dosando i fosfati liberi nel mezzo prima e dopo l'incubazione, con il metodo di BERENBLUM e CHAIN⁹.

⁹ I. BERENBLUM e E. CHAIN, *Biochem. J.* 32, 295 (1938).

¹⁰ L'acido monoiodoacetico, inibitore della triosofosfato-deidrogenasi, veniva aggiunto per impedire la sottrazione, attraverso la via glicolitica, del trioso-fosfato eventualmente presente nell'estratto. Il trioso-fosfato, secondo l'ipotesi di BONSIGNORE¹, sarebbe infatti necessario per la eptoforazione non ossidativa a partire da esoso-fosfato. L'attività della trioso-fosfato deidrase (e quindi la via glicolitica) era del resto impedita dalla mancanza, nel nostro estratto, di DPN, eliminato, assieme agli altri nucleotidi, dal trattamento con carbone.

La presenza dell'eptoso è stata anzitutto individuata mediante gli spettri di assorbimento ottenuti con la reazione di DISCHE e SCHWARTZ e con le reazioni I e II all'orcinolo di DISCHE¹¹. La sua natura di chetoeptoso è stata identificata mediante la reazione di BEVENUE e WILLIAMS¹² su carta (anelli azzurri).

Una più precisa identificazione della natura dell'eptoso è stata ottenuta mediante la prova della formazione di anidro-eptosi, alcali-stabili, per riscaldamento in HCl 0,2 *N* per 1 ora a 100°C¹. Tale prova ci ha dimostrato anzitutto che gli eptosi presenti nel nostro campione erano esterificati con PO₄ in posizione 7. La prova è infatti risultata positiva soltanto dopo trattamento con fosfatasi acida di patata (preparata secondo PFANKUCH¹³). La percentuale di formazione di anidro-eptosi, alcali-stabili, in tali condizioni (75–80%) ci ha permesso inoltre di limitare il numero dei possibili chetoeptosi presenti a tre: sedo-, ido-, e gulo-eptuloso.

L'analisi cromatografica su carta¹⁴ del campione, incubato con fosfatasi, ha infine messo in evidenza un'unica macchia azzurra – rivelata con il reattivo di BEVENUE e WILLIAMS¹² – avente *R_f*, in fenolo saturo di H₂O¹⁵, coincidente con quello datoci dal sedoeptuloso, ottenuto per riscaldamento in ambiente acido di un campione di sedoeptulosano monoidrato, gentilmente fornitoci dal Prof. HORECKER.

I valori quantitativi riportati nella tabella sono stati ottenuti con il metodo di DISCHE¹¹, previa taratura del metodo stesso col campione di sedoeptulosano sintetico. Essi dimostrano chiaramente che l'estratto enzimatico di muscolo scheletrico determina formazione di eptoso, sia a partire da glucoso-6-fosfato, quanto a partire da fruttosio-6-P.

Il carattere anaerobico di tale eptoforazione era deducibile dalla mancanza nell'estratto di TPN (adsorbito sul carbone), necessario per l'eventuale attività delle deidrogenasi (TPN specifiche) della via ossidativa diretta. È stato ad ogni modo confermato dalla mancanza di consumo di O₂ in esperienze manometriche, eseguite con le stesse miscele di incubazione, in presenza di blu di metilene (come trasportatore autossidabile di H), il quale avrebbe permesso di svelare l'eventuale attività glucoso-6-fosfato-deidrasica¹⁶.

V. MORET e S. SPERTI

Istituto di Chimica Biologica, Università di Padova, il 12 giugno 1958.

Summary

The so-called 'non-oxydative heptoforformation' has been shown in enzymatic preparations of rat skeletal muscle, using as substrates glucose-6-phosphate and fructose-6-phosphate.

¹¹ Z. DISCHE, *J. biol. Chem.* 204, 983 (1953).

¹² A. BEVENUE e K. T. WILLIAMS, *Arch. Biochem. Biophys.* 34, 225 (1951).

¹³ E. PFANKUCH, *Hoppe-Seylers Z.* 241, 34 (1936).

¹⁴ Il campione, dopo incubazione con fosfatasi acida di patata, prima di essere sottoposto alla corsa cromatografica discendente, è stato desalicato su resine (Amberlite IR 410 e Dowex 50), previa precipitazione degli esteri fosferici non idrolizzati con acetato di Ba.

¹⁵ G. R. NOGGLE, *Arch. Biochem. Biophys.* 43, 238 (1953).

¹⁶ V. MORET e S. SPERTI, *Boll. Soc. ital. Biol. sper.* 24, 94 (1958).