

KoA MÉRÉSE NORMÁL ÉS KÓROS ANYAGBAN

Doktori dolgozat

Írta:

BALÁZS GÉZA
laboratórium vezető

Készült:

A JATE Biokémiai Csoport irányításával

- 1974 -

T A R T A L O M J E G Y Z É K

Bevezetés	1. o.
Irodalmi áttekintés	2. o.
Anyagok és módszerek	26. o.
Eredmények és értékelés	35. o.
Összefoglalás	40. o.
Irodalom	43. o.

Rövidítések:

KoA, HS-KoA = koenzim A

Ac-KoA, Ac-SKoA = acetil-koenzim A

Pr-KoA = propionil-koenzim A

Acil-KoA = acil-koenzim A

ATP = adenzin-trifoszfát

pk. = papirkromatográfia

EtOAc = etilacetát

i-PROH = izopropanol

EtOH = etanol

IR = infravörös

UV = ultraibolya

PTA = foszfo-transzacetiláz /EC 2.3.1.8/

vt. = vörösvértetek

GSH = redukált glutathion

Ac-P = acetil-foszfát

P_a = anorganikus foszfát /ortofoszforsav/

Trisz = trisz-hidroximetil-amino-metán

E = enzim egység /ált. per ml/, vagy számmal extinkció

B E V E Z E T É S

Mivel KoA meghatározásra irányuló kvantitatív mérés nem túl sok szerepel az irodalomban és az összefoglalók (1), még a mai keletiek is, elsősorban NOVELLI és mtsai (2), valamint KAPLAN és LIPMANN (3) ilyen irányú adatait közlik /ezek 1948- ill. 1949-ből erednek!/ - amelyeket később, az irodalmi ismertetésben mi is részletesen bemutatunk -, munkánk során célul tűztük ki, hogy különböző normális és kóros emberi anyagból, valamint különböző friss állati szövetből összehasonlító KoA meghatározásokat végzünk.

Megkíséreljük a KoA meghatározását vérből /itt elsősorban a normális és diabeteszes vörösvértettek KoA tartalmát kívánjuk követni és ha lehet összehasonlítani/.

Emberi anyagból elsősorban friss balesetes kadaver májszövege állt rendelkezésünkre, másrészt friss hulla anyagon végeztünk méréseket.

I R O D A L M I Á T T E K I N T É S

Bevezetés

Az irodalmi áttekintés célja, hogy részletesebben foglalkozzunk mindazokkal a folyamatokkal, amelyekben a mai ismereteink szerint a KoA-nak szerepe van.

Durván, gondolatilag ezek a biológiai történések két nagy csoportra oszthatók, a KoA-nak acetil- és acil-KoA-kban betöltött szerepkörére, bár az tény, hogy a karbonsav csoportok aktiválása mindkét esetben hasonló lépéseken keresztül zajlik le.

Először talán ejtsünk néhány szót a KoA felfedezéséről, hogy ezen keresztül a funkcióját kézenfekvőbben magyarázni tudjuk.

NACHMANSOHN és mtsa (4,5) 1943-ban felismerte, hogy a kolin acetilezése ATP-t igényel éppen úgy, mint ahogy azt LIPMANN kimutatta a szulfonamidokra is. A kérdést tovább vizsgálva kiderült, hogy az ATP mellett még szükség van egy hőstabil kofaktorra, ami nem volt más, mint a KoA.

A kofaktor szerkezetét LIPMANN és mtsai (5,6), SNELL és mtsai (7), BADDILEY (8), valamint LYNEN és mtsai (9,10) tisztázták.

LYNEN és csoportja azt is kimutatta, hogy a transzfer funkcióban a KoA aminoetántiol csoportjából a szabad -SH csoportnak van szerepe. Az -SH csoportot acilezéssel sikerült transzfer funkcióra kész állapotba hoz-

ni /lásd az 1. ábrát/.

Ugyanakkor NOVELLI (11), LIPMANN egyik munkatársa meghatározta a különböző szövetek KoA tartalmát is /I. táblázat/.

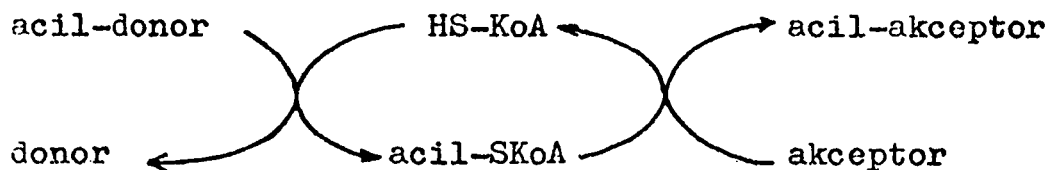
I. táblázat

A nyúl különböző szöveteinek
KoA értékei (1)

Szerv	KoA egység pro g nedves szövet
Máj	112.0
Szív	26.4
Vese	49.5
Agy /marha/	40.5
Here	25.6
Vázizom	6.0

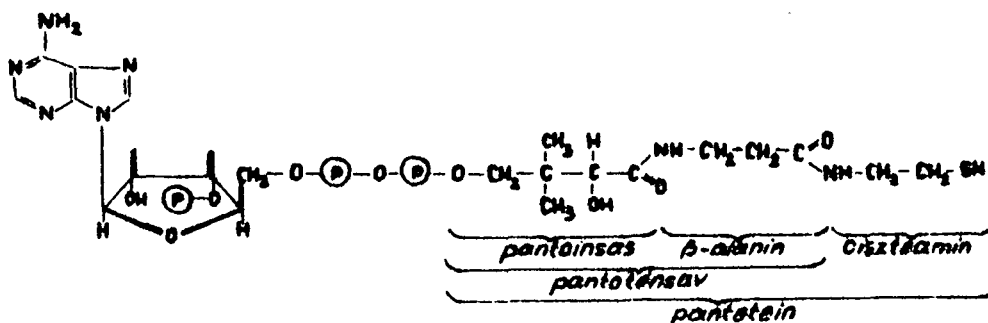
Általában a KoA az acil- /acetyl-/ csoportok átvitelében játszik szerepet, mint ezt már korábban említettük.

A csoportátvitel, egyéb csoportátviteli reakciókhoz hasonlóan, valamilyen acil- /acetyl/ -donort és hasonlóan acil- /acetyl/ -akceptort igényel.



A KoA szerkezete és bioszintézise

A KoA szerkezete ma már jól ismert /1. ábra/.



1. ábra

A KoA univerzálisan előfordul az élő világban /II., III. táblázat/ (12).

II. táblázat

Állati és emberi szövetek KoA értékei
/KoA egység pro g nedves szövet/ (1)

Szövetek	Nyúl	Patkány	Galamb	Ember
Máj	112	132	105	-
Mellékvese	65	91		
Mellékvese kéreg	-	79	-	-
Vese	50	74	-	-
Agy	-	28	40	-
Agykéreg	40			
Szív	26	42	45	-
Here	26	-	-	-
Bél /vékony/	-	26	-	-
Vázizom	-	20	-	-
Vérplazma	-	-	-	-
Vörösvértestek	-	-	-	3-4

III. táblázat

Növények és mikroorganizmusok KoA tartalma
/KoA egység pro g nedves anyag/ (1)

Növény	KoA egys.	Mikroorganizmus	KoA egys.
Spenót	0,74	Proteus morgani	572
Paradicsom	1,3	Lactobacillus arabinosus	150
Borsó /fagyasztott/	4,5	Lactobacillus delbrücki	40
Búza /kereskedelmi/	33,0	Száritott élesztő /Forralás után/	72 41
Méhpepő	0	Escherichia coli	320
		Propionsav baktérium	320
		Clostridium butylicum	2000

A KoA bioszintézise tisztázásában MAAS (13) és NOVELLI (14) munkáit kell kiemelni, a mikroorganizmusokban történő bioszintézisét viszont BROWN (15,16) és BADDILEY (17) vizsgálta.

Az állati szervezetben végzett KoA analizisekből kiderült, hogy a májban a KoA több mint 50 %-a a mitokondriumokban fordul elő.

A következőkben a KoA előállításával, elválasztásával és tisztításával azért foglalkozunk kissé részletesebben, mert a felsoroltak munkánk fő irányvonalába esnek.

A KoA előállítás elvei

1./ Általános módszerek.

A KoA előállítására egyik legjobb kiindulási anyag az élesztő. A KoA adszorbeálódik csontszénre, mint nukleotid, és arról viszonylag szelektíve eluálható olyan alkalikus ágensekkel, mint az NH_3 -viz-aceton vagy a piridin-viz-aceton. Az eluátumban található KoA merkuri- vagy kupro-ionokkal még savas pH-nál is oldhatatlan komplexet ad, így a többi, eluálódó nukleotidtól elválasztható. A továbbiakban savanyú csoportjai miatt ioncserélő gyantán tisztítható. Néha az -SH csoportot védeni kell acilezéssel a felesleges megkötődéstől.

2./ Specifikus módszerek.

a./ KoA előállítására (18)

A csontszénre adszorbeált KoA-t alkoholos- NH_3 -al, frakcionáltan eluáljuk. A KoA-ban gazdag frakciót acetonnal kezeljük. A keletkező csapadékot pH 8,1 körüli lúgban oldjuk és DOWEX-1 X2 gyantán /formát/ - ami kis keresztmérésű - 0,6 M hangyasavat és 0,3 M NH_4 -formiátot használva eluáljuk. A kistisztaságú KoA-t így 50-55 %-os termeléssel nyerjük. /A KoA-t ilyenkor főleg glutathion szennyezi./

Más módszerrel a KoA úgy nyerhető (1), hogy a csontszénre adszorpció után a csontszénre adszorbeált anyagot nátriumszulfiddal redukáljuk és pH 2-nél merkurikloriddal kicsapjuk. A csapadékot szűrjük és H_2S -el elbontjuk.

A további tisztítást Amberlite IR-120-as (H^+) gyantán végezzük. Az említett gyantán történik a glutathiontól való elválasztás, amikor is a KoA -SH csoportját benzoilezéssel védjük.

A glutathiontól végleg csak a DOWEX-2 X10-es gyantán tisztíthatjuk meg a KoA-t. Az eluátumban a KoA-t fenolos extrakcióval dúsitjuk és a benzoil csoportot hidrazinnal hasítjuk le. Így a KoA kb. 80 %-os tisztasággal nyerhető.

b./ Az Ac-KoA készítése élesztőből.

LYNEN és mtsai (9) az Ac-KoA-t az élesztő konyhasós plazmolizátumából izolálták. A plazmolizátum fenolos extrakcióját Ba-sós kicsapás, csontszenes adszorpció és cellulóz oszlopon történő megosztás, valamint etilacetát-piridin-víz-ben /1:1:1/ történő bekonzentrálás követi.

Az organikus oldószert $CHCl_3$ -os extrakcióval eltávolítjuk, mennyiségét az "elnyújtott nitroprussid" reakcióval határozzuk meg. A vizes fázist viszont DOWEX-2-es gyantán hangyasavas-ammóniumformiátos gradiens elucióval tisztítják. A készítmény 60-70 %-os tisztaságú. A termelés 4-6 mikro-M Ac-KoA / kg élesztőt eredményez.

Papirkromatográfiás és elektrofozetikus elválasztás (1).

Kis mennyiségű KoA tisztítására /20 mikro-M-ig/ a papirkromatográfia /pk./ igen alkalmas módszernek bizonyul 4,5 körüli pH-nál.

Futtató elegyek:

EtOH - 0,1 M-os ammónium-acetát /1:1/

piridin - EtOAc - H₂O /1:1:1/

piridin - i-PrOH - H₂O /1:1:1/

Pk.-val a zsírsav acil-KoA-k is elválaszthatók savanyú közegben /pH 3,5/ piridin - acetát pufferben.

Kimutatásra ugyancsak többféle módszer használható:

a./ A KoA fluoreszcenciája 254 nm-nél.

b./ A foszfát-észter csoportok miatt a foszfát detektálás is jól használható.

c./ A HS-KoA elszinteleníti a nitroprussid oldatot, vagy a hig J₂-oldatot.

d./ NH₃-ás előkezelés után a szabad KoA azonnal kimutatható nitroprussid oldattal /piros szín/, míg az acil- /acetyl/-KoA az NH₃ gőz hatására lassú ammonolizist szenved és ezt követően mutatható ki nitroprussid reagenssel.

A kötött diszulfid cianidos hasítás után is kimutatható.

Az éterbe merítés a gyenge nitroprussid reakciót előmozdítja.

A KoA és acil-tiolok tulajdonságai.

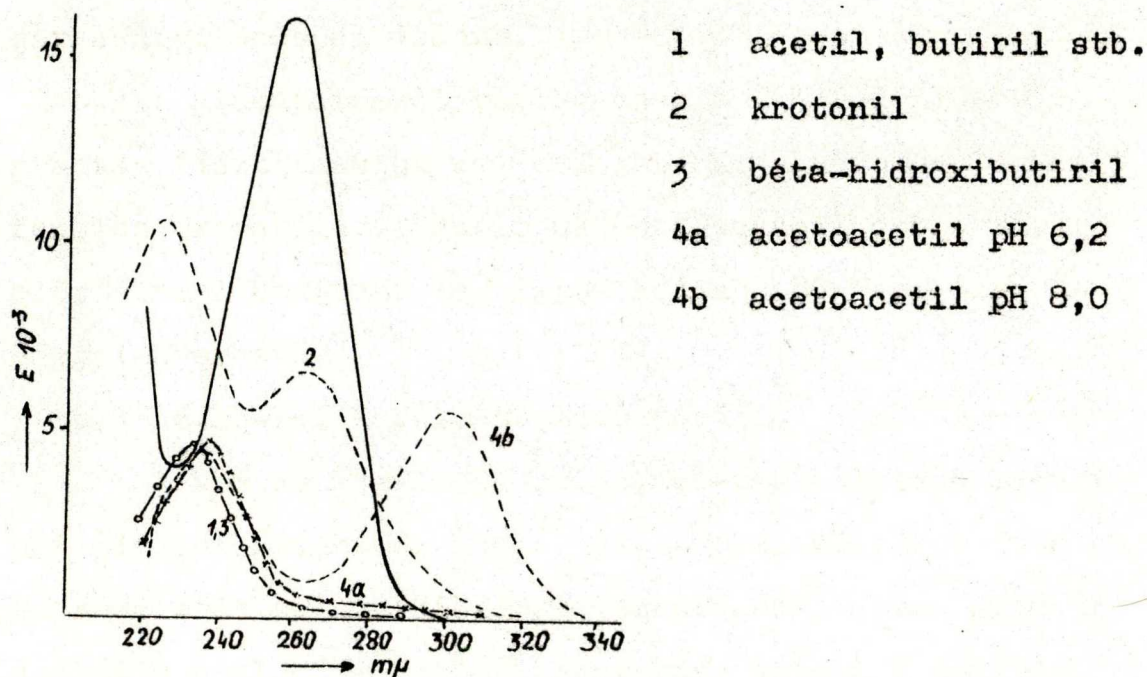
a./ Fizikai tulajdonságok:

A KoA ms.: 767

Aceton, éter és EtOH-ban nem oldódik. Vizben viszont igen jó az oldékonysága.

UV abszorpciója: pH 7,0-nél 260 nm-nél erős adenin

sáv mutatható ki; $E = 16,400$; E_{\max} 259,5 nm-nél, pH 7,0-nél 16,800.



2. ábra

S-acil-N-acetilciszteaminok UV abszorpciós spektruma (LYNEN; 9). A folyamos vonal a KoA spektrumát mutatja.

Erős sav. pK értékei pH 2,0-nél: pK 9,6 /-SH/, pK 6,4 /szek.-foszfát/ és pK 4,0 /adenin $\text{NH}_3^{(+)}$ csoportja/.

Az oldhatatlan sóin kívül egyéb sóiról nem sokat tudunk.

b./ Redox sajátosságai:

Más tiolokhoz hasonlóan levegő /különösen nehéz fémek jelenlétében/, H_2O_2 , J_2 , vagy permanganát hatására oxidálódik. Ilyenkor a katalitikusan inaktív diszulfid

keletkezik. Glutathionnal és Cys-nel kevert diszulfidot adhat.

Az oxidált diszulfidok reduktive hasíthatók Jones reduktorban Zn/HCl-al, Na-amalgámmal, H₂S-el, merkaptánokkal, vagy borohidriddel.

c./ Alkilezhetőség:

Jódacetát, maleinimid, etil-maleinimid irreverzibilisen inaktiválják. Az -SH reagensekkel stöchiometrikusan reagál, melyek közül ki kell emelni a p-klór-merkuribenzoátot és az arzenit okozta inaktiválást, ami viszont tiol felesleggel megfordítható.

d./ Eltarthatósága:

A nedvesség kizárásával, liofilizált formában jól eltartható. Ugyanígy híg savas oldatban is tárolható, de erős sav tönkreteszi. Neutrális pH-nál hő hatásra gyorsan inaktiválódik.

Alkaliákra igen érzékeny.

e./ A KoA egységeknek többféle megfogalmazása ismert:

A Lipmann egység azt a KoA mennyiséget jelenti, ami adott körülmények között a szulfonamid fele mennyiségét acetilezni képes (12).

1 egység KoA = 0,7 gamma pantoténsavval, vagy 2,43 gamma KoA-val.

1 mg KoA = 413 U KoA; 1 mikro-M KoA = 316 U KoA.

f./ Acilálás

1./ Kémiai módszerek:

A KoA sokféle kémiai partnerrel acilezhető, neve-

zetesen savanhidridekkel, savkloridokkal, tiosavakkal, acil-szénsavészterekkel stb.

Kb. 10-20 %-os reagens feleslegre van szükség az acilezéshez. A KoA maradék mellől az acil-származékok éterrel extrahálhatók.

Az acetoacetyl-KoA keténnel állitható elő.

Az alfa-béta-telitetlen karbonsavak könnyen reagálnak KoA-val, de itt zavaró tényezőt jelenthet egy másik molekula KoA addíciója a kettőskötésre.

2./ Enzimes módszerek:

Az enzimes acilezésre az aciltiokinázt /EC 6.2.1.1/ (acetyl-KoA szintetáz) szokták felhasználni.



Pirofoszfátáz jelenlétében a fenti reakció az acil-KoA irányába tolódik el.

A fenti módszerrel a zsírsav-, a béta-hidroxisav-KoA-k, de az acetoacetyl-KoA-val együtt a többi béta-ke-to-acil-KoA származékok is szintetizálhatók.

g./ Az acil-tiolok tulajdonságai:

1./ Enyhén savanyú pH-nál stabilak. Ilyenkor hőstabilak is.

2./ Az acil-csoport hig lággal lehasítható.

3./ Neutrális pH-nál higany sók elbontják az acil-KoA-t, miközben merkuri-merkaptid és szabad anion keletkezik.

4./ Az acil-KoA jóacetáttal szemben nem érzékeny.

Nem reagál nitroprussiddal, csak az ammonolízis

utáni "elnyújtott reakciót" mutatja.

5./ Hidroxilaminnal savanyú pH-nál hidroxamsavat, majd ferrikloriddal vörös színű színreakciót ad.

Az acil-KoA nem reagál ATP-vel.

Az acil-foszfátok pH 4,5-nél melegítésre hidrolizálnak. /Ez a melegítésre lejátszódó hidrolízis csak az acil-foszfátokat érinti/. A KoA -SH csoportja ugyanis képes foszfátokkal acil-foszfátokat szolgáltatni, ezek alkáli stabilak és sav labilok, ellentétben a tioészterekkel.

A KoA-foszfátokat a Hg-sók is képesek hidegen elhidrolizálni. /Ez a sajátságuk megegyezik a tioészterekével./

h./ Modell anyagok és KoA gátlók:

Az acil-ciszteaminok és származékaik képesek a KoA-t funkciójában helyettesíteni. A ciszteaminok affinitása azonban kisebb az acil-gyökökhöz, mint a KoA-é.

Specifikus KoA antagonisták nem ismertek.

Az általános -SH gátlókról már korábban volt szó.

KoA meghatározások (1,19)

/ A 2. módszerrel nem foglalkozunk részletesen, mert azt nem használtuk fel mérésre munkánk során./

1./ Kémiai módszerek:

Főbb vonalaiban a KoA direkt kémiai módszerekkel történő mérését már elveiben korábban vázoltuk.

Ezek a módszerek nem mondhatók specifikusoknak a KoA-ra, így nem terjedtek el nagyon.

/Természetesen a szakavatottak kezében, különböző kombinált formákban felhasználhatók mérésre. Itt elsősorban arra gondolunk, hogy a KoA tisztítását és egyéb -SH anyagoktól történő elválasztását meg kell előbb oldani./

A kémiai módszerek inkább össz szabad -SH anyag meghatározására alkalmasak. Megemlítjük itt a

- "direkt" és "elhúzó" nitroprussid reakciót;
- a HCN-es hasítást:



- a merkúri sókkal történő sóképzést;
- a p-klór-merkuribenzoáttal történő reakciót, amikor pH 4,5-nél 255 nm-nél intenzív abszorpciót kapunk.

2./ Mikrobiológiai módszerek:

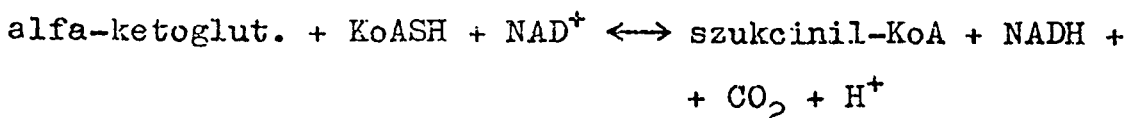
KoA mérésre itt az *Acetobacter suboxydans* és a *Lactobacillus helveticus* 80 a leghasználatosabbak.

3./ Az enzimes módszerek több alcsoportra oszthatók:

a./ Több módszer dolgozik azzal az eljárással, hogy a KoA mérést végső fokon a $NAD^{(+)}$ redukciójára vezeti vissza és a redukciót követi 340 nm-nél (19,20).

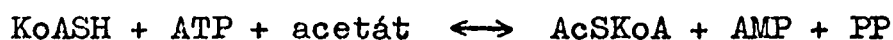
Az ilyen módszereket kinetikus mérőmódszerek címszó alatt szokták leírni.

Pl.:



b./ A további módszerekhez acil-donor és -akceptorra van szükség.

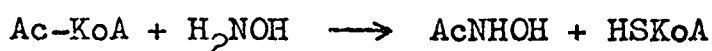
Ezekre példák lehetnek a következők:



Akceptor célokra legjobban megfelelnek az arilamidok. Az arilamidok használata azért előnyös, mert az arilamidok spektruma acetilezés után a rövidebb hullámhossz felé tolódik.

Jó akceptorok többek között a szulfonamidok (21, 22), 4-aminoazobenzol (23) /absz. max. 497 nm-nél/, vagy a p-nitroanilin (24) /absz. max. 420 nm-nél/ stb.

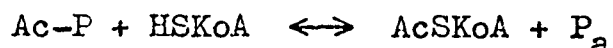
c./ A hidroxámsavképzés hidroxilaminnal igen jó Ac-KoA meghatározást tesz lehetővé, mégpedig a következő módon:



vagy az Ac-foszfát foszfotranszacetiláz katalizálta reakciójával, ahol az arzenolizis KoA függő.

Itt a hidroxamsavas módszerrel az Ac-foszfát eltűnése követhető (25,26).

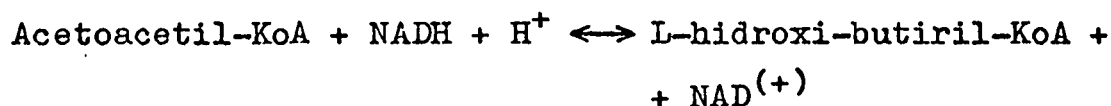
A Clostridium klyveri foszfotranszacetiláz a leghasználhatóbb erre a célra.



d./ Stöchiometrikus meghatározások:

Ennél a módszernél p-nitroanilint (24), vagy citrátot (27) használnak akceptornak és a keletkező anyagmennyiséget spektrofotometriásan mérik.

A stöchiometrikus módszer is összekapcsolt a $\text{NAD}^{(+)}$ változás 340 nm-nél történő meghatározásával.



A reakció pH 7,5-nél majdnem kvantitativeltolt a jobb oldal irányába.

IV. táblázat

Néhány patkányszövet összehasonlító KoA adatai (21)
/Az adatok mikro-g / g nedves szövetre vonatkoznak/

Szövet	Meghatározási módszerek		
	Béta-hidroxiacil-KoA dehidrogenázal mért értékek	Foszfotranszacetiláz módszerrel mért eredmények	Karnitin-acetyl-transzferáz mérés
Máj	197	123	131
Vese	75	52	56
Szív	54	34	35

Az acil-tiol csoport néhány egyéb jellemzője:

A KoA IR spektrum jellemzője a molekula C-S kötésével hozható összefüggésbe. A C-S elnyelési sáv 9 mikron körüli.

KoA és acil származékai spektrumát a 2. ábra mutat-

ja be. Ha az adeninen kívül a molekulában más kromofor csoport is előfordul /pl. aril-, béta-ketosav csoport, vagy telitetlen kötés/, a KoA spektruma megváltozik.

Kelátképzők jelenlétében az enol-képzés fokozódik.

Az acil-merkaptán csoport a "nagy" energiájú kötések közé tartozik.

Az acil-tiol kötés hasítása és keletkezése.

Röviden áttekintve ezeket a nagy jelentőségű reakciókat felölelő területeket, általában elmondhatjuk, hogy a kén atom V. táblázatban feltüntetett előnyös tulajdonságai /a kén nagyobb atom-rádiusza, mag-töltése, nagy proton disszociáló képessége stb./, komoly előnyöket biztosítanak a kén atommal kapcsolt reakcióknak, mint más atom esetén tapasztaltaknak.

Az -SH csoport polárosabb, azaz erősebb sav, mint a víz. A kén atom nagyobb töltéssűrűsége az oka a diszulfid hid képződés előtérbe kerülésének a kettőskötés képzésre való hajlammal szemben.

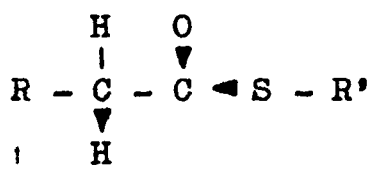
Az V. táblázatból kitűnik az is, hogy a C és S atom elektronegativitása közel egyforma, a helyettesített C-S kötés elektronegativitása szintén kicsi, alacsony a dipol értéke - viszont asszimmetrikus helyettesítővel a kötés polarizálható. Pl. az acil csoport C:O kötése elektronokat sziv el a C-S kötésből és a kötő elektronok a S atom felé tolódnak.

V. táblázat

Néhány atom fizikai adata (1)

Atom	Atomrádiusz	Magtöltés	Elektronok	Elektro- negativitás
O	1,40 (O^{2-})	8	$2_s^2 2p^6$ (O_2^-)	3,5
S	1,84 (S^{2-})	16	$3_s^2 3p^6$ (S_2^-)	2,5
C	2,60 (C^{4-})	12	$2_s^2 2p^4$	2,5
N	1,71 (N^{3-})	14	$2_s^2 2p^5$	3,0

Az acil-tiol kötés reakciótípusai közé tartóznak pl. a karbonil C-atom nukleofil helyettesítése:

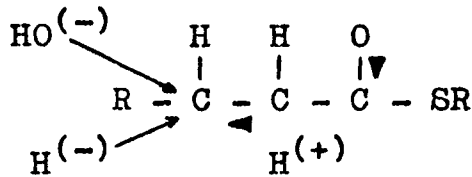


A nukleofil szubsztitúció főbb típusai:

A karbonil-C-atom heterolízise aminokkal /ammonolízis, hidroxamát képződés, aminosav acetilézése/, hidroxivegyületekkel /hidrolízis, hidroxil-csoportok acetilézése/, karboxil vegyületekkel, foszfátokkal, tiolokkal, hidrid / $H^{(-)}$ / ionnal, karbanionnal /Claisen és egyéb kondenzációk/.

A nukleofil reakciók bekövetkezhetnek a béta-C-atomon is. Ide elsősorban a zsírsav-ciklus reakciói sorolhatók.

Az enoil-tiolok reakciói:

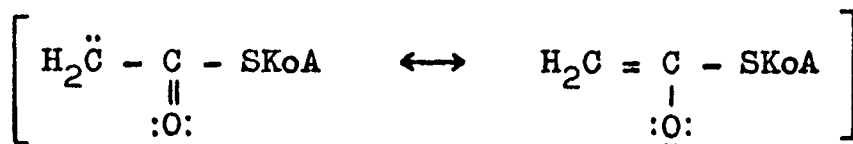


A fenti szerkezettel az acil-tiolok béta-C-atomján lejátszódó reakciókat magyarázzuk. A reakciók magyarázatát az acil-tiolok alfa-béta telítetlen keton formában történő felírása megkönnyíti. A telítetlen forma esetén az alfa-C karbanion, a béta-C karbonium kation formában reagál. A nukleofil támadás $\text{H}^{(-)}$, $\text{OH}^{(-)}$ ezért a béta-C-atomot éri és a folyamat 1,2- vagy 1,4-addícióval zárul.

Az eliminációt itt a rezonancia-stabil alfa-béta telítetlen formába való visszatérés mozditja elő. Az elimináció első lépése proton kihasadás az alfa-C-ről és a keletkező karbanion ilyenkor a béta-C-atomról történő nukleofil csoport $\text{H}^{(-)}$, $\text{OH}^{(-)}$ ledobásával stabilizálódik. /Még itt megemlítem, hogy a biológiai anyagcserében a redukált NAD(P)H és a FADH_2 lehet a hidrid-ion forrás/.

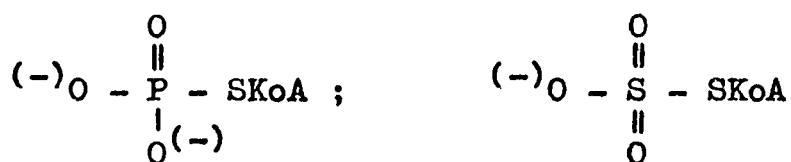
Kondenzációs reakciók az alfa-C-atomon.

Az acetil-KoA-nak már eleve két rezonancia formája van; azaz rezonancia szempontjából stabil karbanion keletkezik:



Ezek a formák játszanak szerepet az alfa-metilén-csoport elektrofil reakcióiban, mégpedig az észter-kondenzációban, az aldol-kondenzációban és az Ac-KoA stb. karboxilezési reakciójában.

A következő reakciótípusnak, a tiol-foszfát hasadás példáinak a felsorolása előtt, elmondhatjuk, hogy a tiol-foszfát és tiol-szulfát kötés sokkal ritkább.



Mindkét kötés magas energiatartalmú.

Az S-P vagy S-S kötések hasadása történhet hidrolizissal, protolizissal, vagy arzenolizissal.

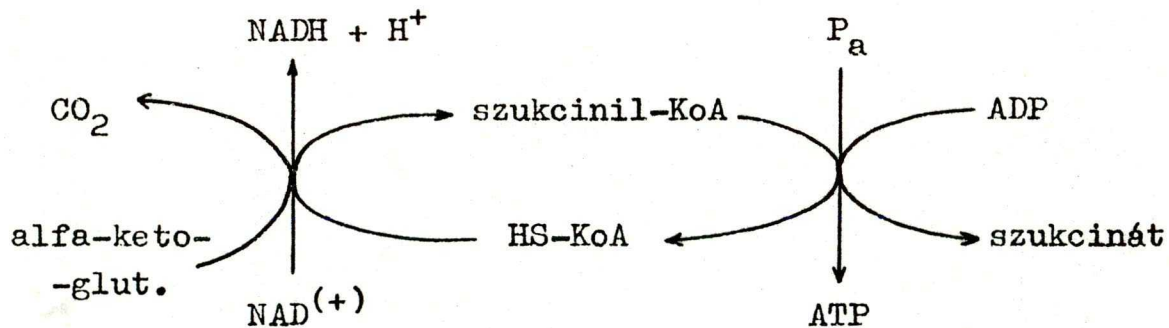
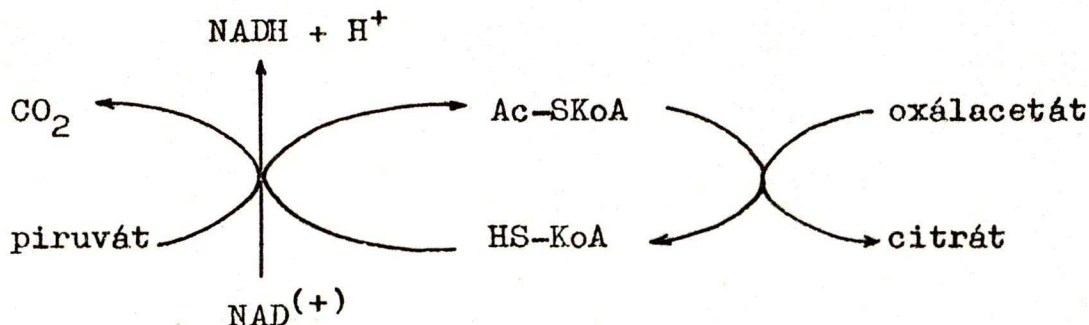
A leírtak természetesen csak vázlatosan mutatták be azokat a fontos reakciókat, amelyekben a KoA résztvesz.

A továbbiakban a KoA anyagcserében betöltött szerepével szeretnék röviden foglalkozni.

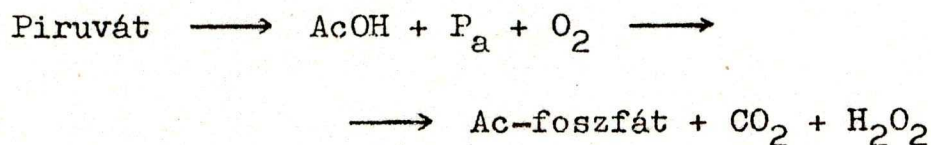
A./ A KoA szerepe a szénhidrát anyagcserében.

A KoA itt elsősorban a piruvát trikarbonsav cikluson keresztül történő oxidációjában játszik transzfer szerepet.

Először élesztőben, majd a növényekben irták le az oxidatív dekarboxilezési reakciókat.

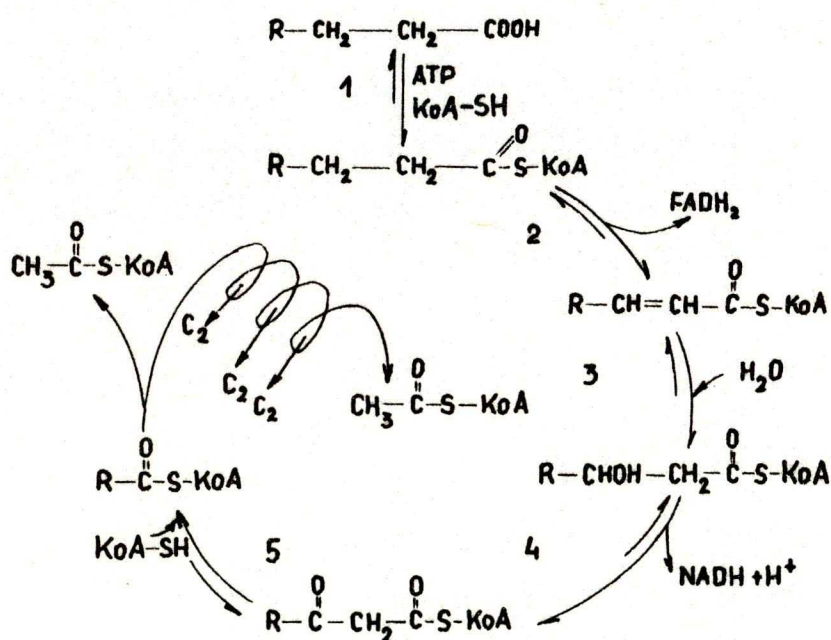


A piruvát felhasználásnak más útja is ismert baktériumokban, amit a piruvát oxidáz katalizál és az O₂ az elektronakceptora:



B./ A KoA szerepe a zsírsav anyagcserében.

A zsírsav lebontás vázlatát a következő ábra szemlélteti /3. ábra/.



3. ábra

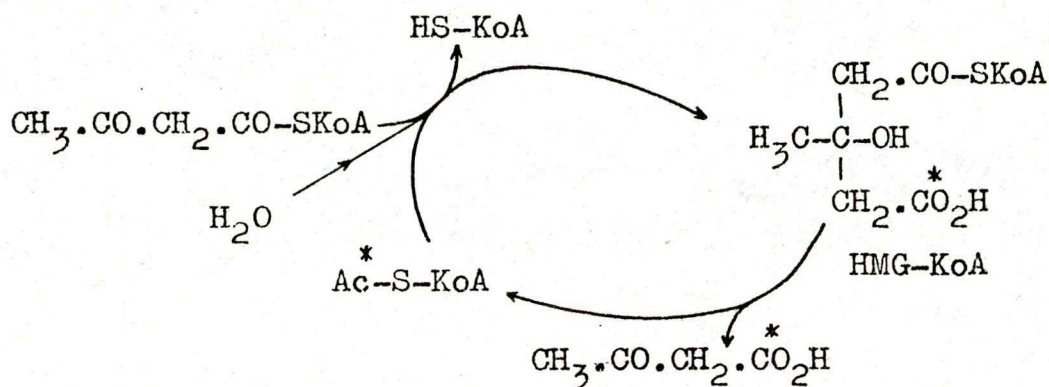
Zsírsav béta-oxidáció spirális sémája.

/1/ Zsírsav tiokináz; /2/ Ac-SKoA-dehidrogenáz (FAD); /3/ enoil-hidratáz; /4/ béta-hidroxiacil-dehidrogenáz; /5/ béta-ketoacil-tioláz.

A KoA jelentős szerepet tölt be a zsírsav anyagcserében. Aktiválás után /ATP-t igénylő folyamat/ a zsírsav KoA-hoz kapcsoltnak esik át a dehidrogénezésen, hidratáción, ismét oxidáción, végül C-C kötés hasadáson.

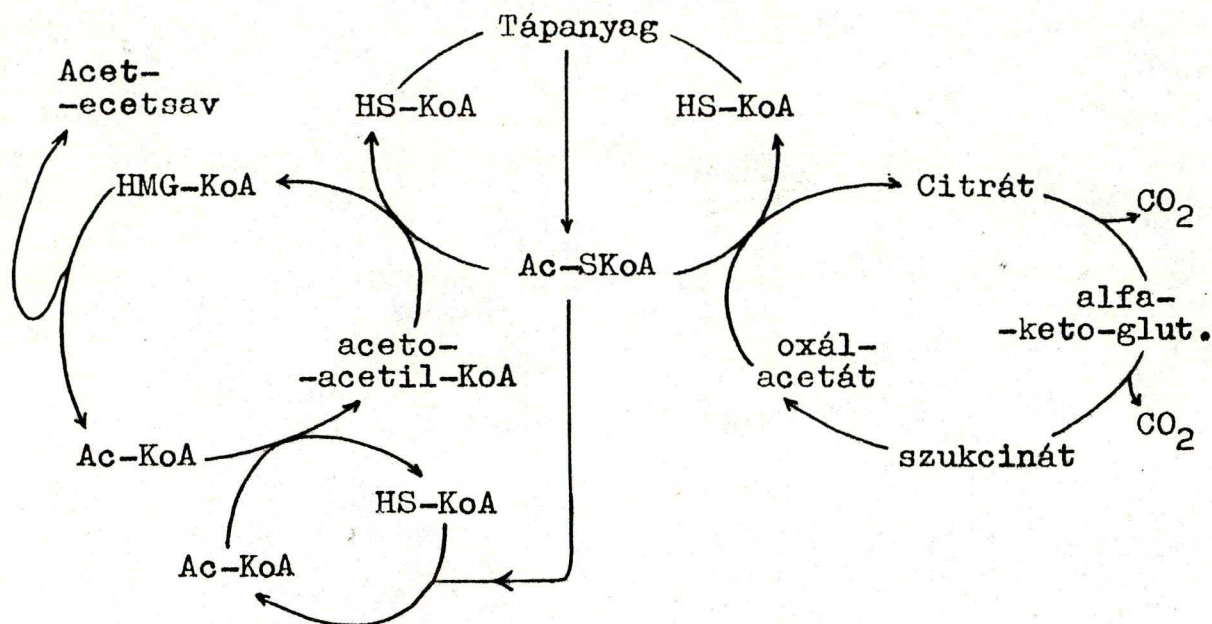
Diabeteszben jelentős mennyiségű acetecetsav képződik, ami az acetoacetyl-KoA-ból ered.

LYNEN és mtsai (28) az acetecetsav felszabadítására a "hidroximetil-glutaril-KoA /HMG-KoA/ ciklust" tartják kézenfekvőnek.



A KoA regeneráció fő útjait az állati szervezetben ugyancsak az említett szerzők vázolták fel (28). A következő oldalon mutatjuk be az általuk valószínűnek tartott, Ac-SKoA-ból kiinduló reakcióutak összefüggéseit, amelyből kitűnik az aktiv ecetsav energetikai szempontból is fontos szerepe.

Az acetoacetát kb. 2/3-át foglalja magába a zsírsav égéshőjének és azt a célt szolgálja, hogy általa a szervezet energiát transzportál a májból a perifériás sejtekbe. Az acetecetsav a KoA-tól való elszakadással válik transzportálhatóvá. Az acetecetsav mielőtt a májat elhagyja, fő tömegében D-béta-OH-vajsavvá redukálódik, majd az izmokban acetecetsavvá oxidálódik és a KoA-val kapcsolódva további anyagcsere átalakításra rendelkezésre áll.



A perifériás szövetekben mint szukcinil-KoA nyer felhasználást. Ez az átalakulás direkt energia veszteség nélkül lejátszódik az acetoacetát-szukcinát tioforáz segítségével. Az acetoacetát "aktiválása" így az alfa-ketoglutarát oxidációjának a terhére történik. Ha az acetoacetyl-KoA szint emelkedik, a citrát ciklus irányába történő átalakulás fokozódik a tioláz és "kondenzáló enzim" segítségével.

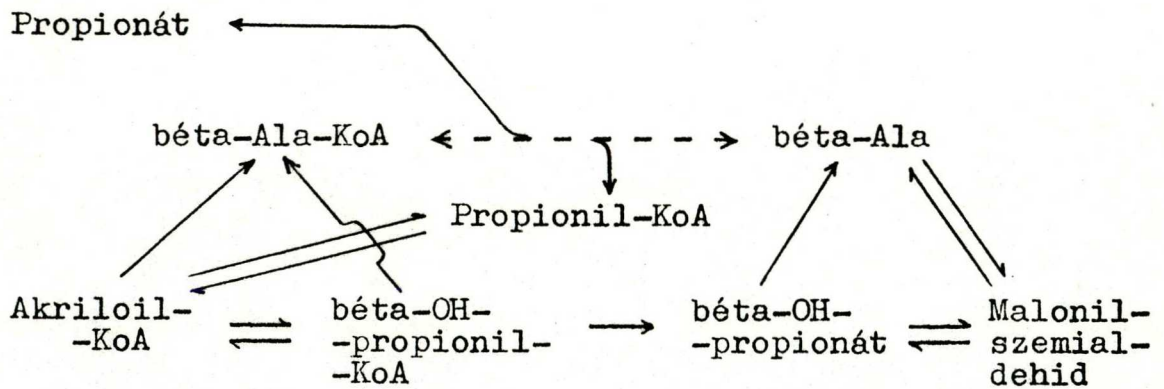
Diabeteszben keton-testek ürülnek. Ilyenkor a zsír a fő energiaforrás, de a sok Ac-KoA-nak, ami a májban keletkezik, nincs biztosítva a lebontása a citrát ciklusban, így az acetoacetát felhalmozódik. Feltételezhetően a diabeteszes májban oxálacetát hiány van, de ez kissé megerősítve. Normál és diabeteszes patkány májban nem lehetett oxálacetát különbséget kimu-

tatni/. Tehát a ketonuria az említett kiegyensúlyozatlanság következménye. A máj zsírsavlebontó képessége az Ac-KoA tovább oxidálódásától függ.

C./ Propionsav anyagcsere.

A propionsav elágazó zsírsavakból és aminosav maradványokból keletkezik. Metil-malonil-KoA \rightarrow szukcinil-KoA úton nyer felhasználást.

A propionil-KoA másik hasznosítása acetát tiokinázzal, transzforázzal, vagy oxidációval történik. Az utóbbi esetben béta-OH-propionát keletkezik. Az akrilóil-KoA és a béta-OH-propionil-KoA végül deacilálódik és acetáttá oxidálódik. A fenti KoA származékok a béta-Ala oxidációs termékei is.



A máj mitokondriumokban a propionát teljesen eloxidálódik. HUENNEKENS és mtsai (29) korábbi munkája szerint a laktát és a piruvát intermedierek, mások szerint ez nem valószínű.

D./ Az elágazó zsírsavak anyagcseréjével és a zsírsavszintézissel kapcsolatos problémák tankönyvekben kellően részletezettek (30).

Az előbbiek - mint már említettük - a fő propionil-KoA források.

A N Y A G O K É S M Ó D S Z E R E K

Foszfotranszacetiláz /PTA/ - /Boehringer-Mannheim, NSzK
vagy Sigma, USA gyártmányú volt/

KoA - /Boehringer-Mannheim, NSzK; teljesen tiszta volt/

ATP-dinátrium só - /Reanal, Budapest/

Redukált-glutathion /GSH/ - /Reanal, Budapest/

Nátrium-acetát - /Laphoma, Jugoszlávia/

Nátrium-citrát - /Kemika, Jugoszlávia/

Nátrium-nitrit - /Pliva, Jugoszlávia/

Trisz-puffer alapanyag - /Kemika, Jugoszlávia/

Ammónium-szulfát - /Merck, NSzK/

Triklórecetsav - /Merck, NSzK/

Nátrium-hidrokarbonát - /Merck, NSzK/

Szulfanilamid - /Merck, NSzK/

Ammónium-szulfamát - /BDH, Anglia/

L-Cys-HCl - /Merck, NSzK/

N-(naftil)-l-etilén-diamin-diHCl - /Merck, NSzK/

Acetil-foszfát K-, Li-só - részben Boehringer-Mannheim,
NSzK gyártmányú volt, részben a diLi-sót mi
állítottuk elő (31).

A felsorolt anyagok a legtisztább jelzéssel ellátott vegy-
szerek voltak.

Anyagelőkészítés a meghatározáshoz:

A KoA mennyiségét különböző szövetmintákból határoztuk meg. /A felhasznált minták élő, vagy holt anyagból eredtek./

Embernél a vérből és 2 órás kadaver májából végeztünk KoA méréseket.

Állatoknál /nyúl, sertés és szarvasmarha/ máj, vese, agy, sziv, tüdő szöveteket használtunk fel mérési célokra.

Mivel a teljes /citrátos/ vérnél nem kaptunk kiértékelhető eredményeket, a teljes vér analíziséről áttértünk a mosott vvt.-el végzett KoA meghatározásra.

A szöveteket kétféleképen készítettük elő:

1./ Mintavétel után a szövetet /1-2,5 g/ azonnal mélyhűtőbe tettük. Lefagyasztás után 12 ml 8%-os HClO_4 oldatban homogenizáltuk /Potter-csőben/, közben a hőmérsékletet 0°C -on tartva. Ezt centrifugálás követte, majd a felúszó pH-ját $2\text{ N K}_2\text{CO}_3$ -al 6-6,5-re állítottuk. Az így nyert folyadékot 2-3 órán át állni hagytuk hűtőszekrényben /+ 4°C /, végül a kicsapódó KClO_4 -ot eltávolítottuk. Ebben a formában hosszabb ideig tárolható + 4°C -on.

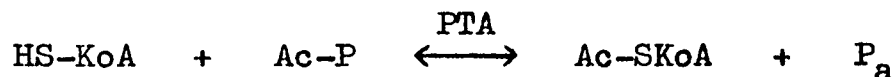
2./ A másik módszer a KoA termostabil tulajdonságát használja fel. /Mivel ez a módszer sokkal gyorsabb és megbízhatóbb, kísérleteink zöménél ezt az eljárást követtük./ Előnye az előbbivel szemben, hogy az előkészítés során mindég ismert koncentrációkkal lehet dolgozni és így, a

legmegfelelőbb anyagmennyiségek felhasználására nyílik lehetőség.

A szövetmintát közvetlenül, vagy lefagyasztás után lemértük és fiziológiás sóoldatban /az arány legtöbbször 1 g nedves szövet pro 4 ml fiziológiás sóoldat/ homogénizáltuk 0 °C-on. A Bergmann-Turax mixerben történő homogénizálás előtt a szövetmintát ollóval aprítottuk. A homogénizátumot 10 percig forraltuk, majd centrifugáltuk és a felülúszót hűtőszekrényben tartottuk a további felhasználásig.

PTA teszt (19,25,32)

Reakció egyenlet:



A mérés elve:

Az Ac-KoA 233 nm-nél erősebben abszorbeál, mint a KoA /lásd a 2. ábrát/. A mérés tehát 233 nm-nél történik. pH = 8,0-nál, 28 °C-on az egyensúly jobbra tolódott.

$$K' = \frac{[\text{Ac-KoA}] [\text{P}_a]}{[\text{Ac-P}] [\text{KoA}]} = 74$$

Az Ac-P felesleg az egyensúlyt majdnem teljesen jobbra tolja. Az enzimet a $\text{K}^{(+)}$ és $\text{NH}_4^{(+)}$ ionok aktiválják.

Reagensek:

0,1 M trisz-HCl puffer /pH = 7,6/

0,1 N HCl oldat a pufferhez

0,1 M Ac-P-dikálium só, vagy K,-Li-só vizes oldata

PTA oldat /0,1 mg fehérje/ml/. A gyári /Boehringer vagy Sigma/ Cl. klyveri eredetű enzimet, ami kb. 1000 E/mg enzimet tartalmazott, 3,0 M-os /NH₄/₂SO₄ szuszpenzióban /pH kb. 8,0/ megfelelően higitottuk. /Az így higitott oldat kb. 6 hónapig jégszekrényben eltartható./

A többi oldatot a jégszekrényben tartás ellenére két naponként meg kell ujitani.

Az oldatok készítésére mindig kétszer desztillált vizet használtunk.

A módszer szövet extraktumok KoA meghatározására nem a legalkalmasabb. /Az irodalomban említett aggályok ellenére, megkíséreltünk a módszerrel jól reprodukálható KoA mérést kidolgozni!/.

A mérésnél általunk használt össz-térfogat 3 ml volt. A méréseket MOM 202-es spektrofotométeren végeztük 233 nm-nél, 1 cm-es kvarc küvettát alkalmazva.

Összehasonlítónak pH = 7,6-os trisz-puffert használtunk.

A delta-extinkció értéket a következőképpen számítottuk:

A küvettába mértünk:

2,69 ml trisz-puffert

0,10 ml Ac-P oldatot

0,20 ml mintát /homogenizátum/, amelynek pH-ja 6-7 értékek közé esett.

Az összekeverés után az extinkciót leolvastuk $/E_1/$.

Ezután a hígított enzimből 0,01 ml-t adva az előző oldathoz, az összerázást követő 3-4 perc múlva az extinkció változást is leolvassuk $/E_2/$.

$$E_2 - E_1 = \text{delta } E$$

A számításoknál használt extinkciós koefficiens értéke: $\text{delta } \epsilon_{233} = 4,44 \text{ cm}^2/\mu\text{Mol}$ volt.

A próbák KoA értéke:

$$c = \text{delta } E \cdot 2,60 \text{ } \mu\text{Mol/l/}$$

$$c = \text{delta } E \cdot 2,00 \text{ mg/ml/}$$

A módszer szórása kb. $\pm 1-2 \%$.

Alkalmaztuk még a Boehringer cég által forgalomba hozott PTA teszt oldatokat is (33).

Reagensek és bemért anyagmennyiségek a mérésnél és a standard görbe készítésekor:

/Magától értetődően, ha a szövet extrakrummal végeztük a mérést, a 0,20 ml KoA oldat helyett mértük be a homogenizátumot./

2,60 ml trisz-HCl puffer /0,1 M-os; pH = 7,4/

0,1 ml Ac-P-K, -Li-só vizes oldata /40 mg/ml/

0,05 ml GSH oldat /30 mg/ml-es oldat a fenti pufferben/

0,03 ml $\text{NH}_4/2\text{SO}_4$ oldat /1,0 M-os vizes oldat/

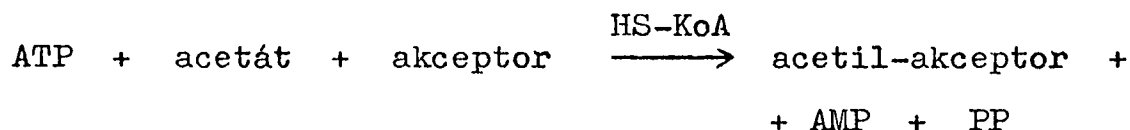
0,02 ml PTA oldat 0,025 M-os trisz-pufferben /pH = 8/.

0,20 ml KoA oldat /5 mg/ml-es trisz-HCl-pufferben oldott KoA/.

Mérés 233 nm-nél, mint fent. A számítás hasonlóképpen.

KoA meghatározása a szulfanilamid acetilezés alapján (34).

Reakció egyenlet:



A mérés elve:

Ha szulfanilamidot használunk mint akceptort, akkor a szulfanilamid visszamérést 540 nm-nél végezhetjük Bratton-Marshall színreakcióval (22).

Egyébként, megfelelően előkezelt galamb máj kivonat jelenlétében a szulfanilamid acetilezés mértéke a KoA mennyiség függvénye /konstans ATP és acetát koncentráció biztosítása esetén/.

Reagensek:

Mixtura - ami 10,0 ml 0,004 M-os szulfanilamid oldatot + 2,5 ml M-os nátrium-acetát + 8,0 ml 0,05 M-os ATP + 10,0 ml 0,2 M-os nátrium-citrát oldatot tartalmaz.

M-os friss nátrium-hidrokarbonát vizes oldata

0,1 M-os Cys-HCl vizes oldat

5 %-os triklórecetsav oldat

Galamb máj enzim oldat /a 34. irodalmi idézetben le-
irt módszerrel készítve/

Később kellett:

PTA oldat - 5 mg/ml-es PTA oldat 0,02 ml-éhez
0,6 ml 0,025 M-os trisz-HCl-puffertadtunk /pH = 8,0/
Ac-P oldat /40 mg/ml/

Standard görbéhez kellett:

KoA oldat /1 mg/ml-es bideszt. vizes oldat, amit
tovább higitottunk/

Kontrol:

0,3 ml mixtura

0,1 ml nátrium-hidrokarbonát oldat

0,1 ml Cys-HCl oldat

Össztérfogat: 1,25 ml bideszt. vízzel kiegészítve

A méréseket kb 1 cm-es üvegküvetákban végeztük
MOM 360-as spektrofotométeren. A leolvasást 540 nm-nél
végeztük.

Homogenizátum esetén bemért oldatok:

0,3 ml mixtura

0,1 ml nátrium-hidrokarbonát oldat

0,1 ml Cys-HCl oldat

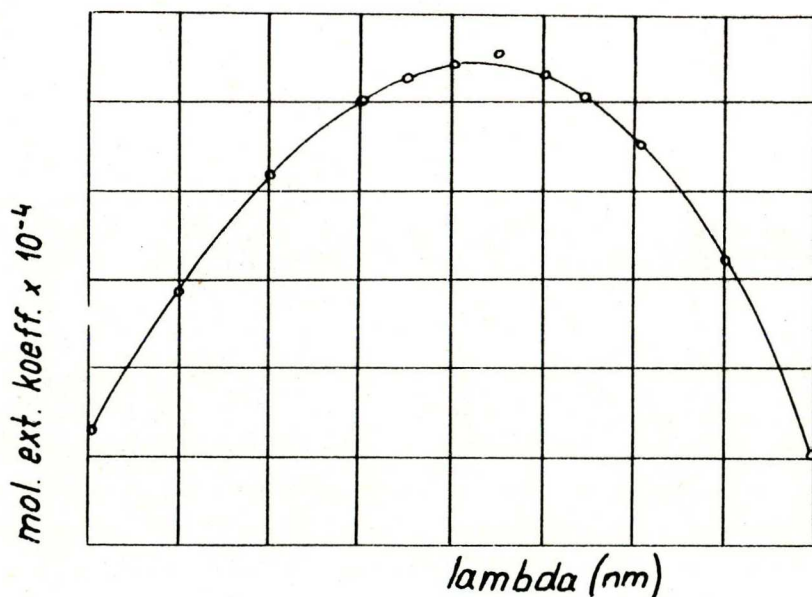
0,25 ml galamb máj oldat

0,3 ml homogenizátum

Az egész oldatot 1,25 ml-re egészítettük ki bideszt. vízzel és 2 órán át állni hagytuk 37 °C-on.

Ezután a reakció leállítására 4 ml 5 %-os triklór-ecetsav oldatot adtunk a fenti elegyhez és a kicsapódó fehérjét centrifugálással választottuk el az átlátszó, mérésre alkalmas felülúszótól. A szulfanilamid maradékot Bratton-Marshall módszerrel, kolorimetriásan mértük vissza a kivett 1,0 ml-es alikvótból.

/A Bratton-Marshall módszer lényege, hogy az 1,0 ml alikvótban lévő szulfanilamidot savanyú oldatban diazotáljuk és N-(naftil)-1-etiléndiamin-dihCl-al kapcsoljuk a szinképzés érdekében. A keletkező színezék abszorpciós görbéjét a következő ábra mutatja /4. ábra/.



4. ábra

A fenti eljárás érzékenységét még a következő oldatok hozzáadásával tudtuk kb. 23-25 %-al növelni:

0,02 ml PTA oldat

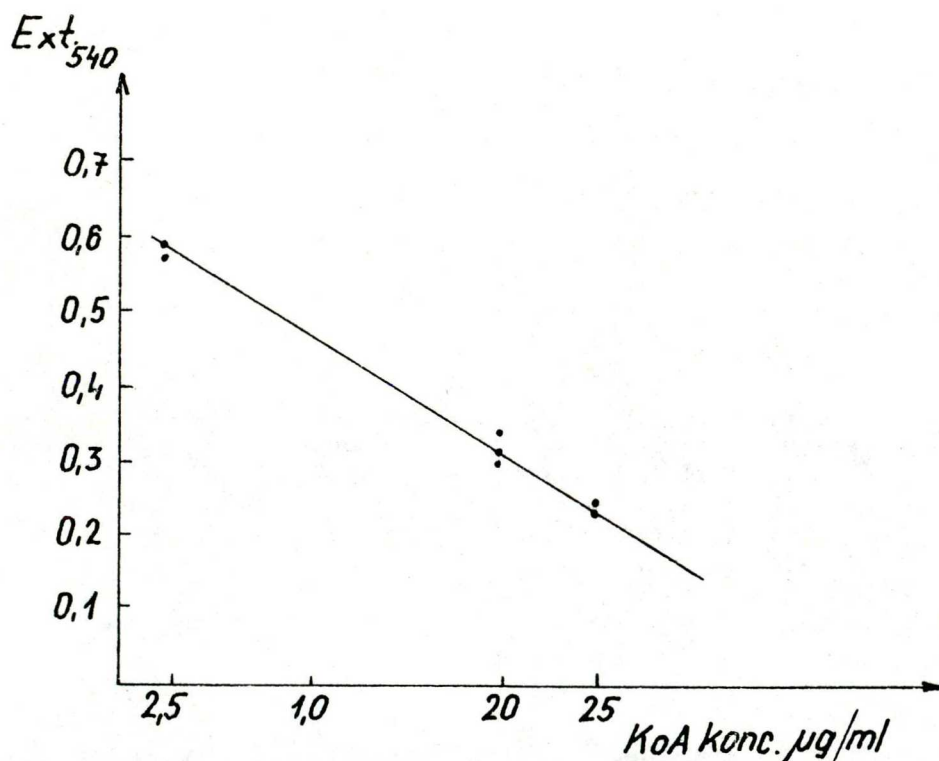
0,1 ml Ac-P oldat

/Ilyenkor a mixtura használt mennyisége 0,2 ml-re csökkent./

A mérőoldat további kezelése megegyezett a fentebb leírtakkal.

A kontrol és a KoA tartalmú homogenizátum esetén mért szulfanilamid mennyiségi különbség adja meg a homogenizátum KoA tartalmát.

A méréseinknél használt standard görbét az 5. ábrán mutatjuk be.



A szulfanilamid acetilezése ismert KoA koncentrációval

5. ábra

EREDMÉNYEK ÉS ÉRTÉKELÉS

Bevezetőben meg kell említeni, hogy a felsorolt és számos esetben kipróbált módszerek közül homogenizátum KoA mérésre a legvégén leírt, Kaplan-Lipmann kombinált Bratton-Marshall általunk módosított, kolorimetriás módszer bizonyult a legalkalmasabbnak. /A módosítás az érzékenység növelésére szolgált és a PTA, Ac-P hozzáadásából állott/.

A PTA teszteknel, a 233 nm-nél végzett mérések nem voltak jól reprodukálhatók a sok befektetett munka ellenére.

A továbbiakban leírt KoA értékek legalább 10 mérés átlagát mutatják be.

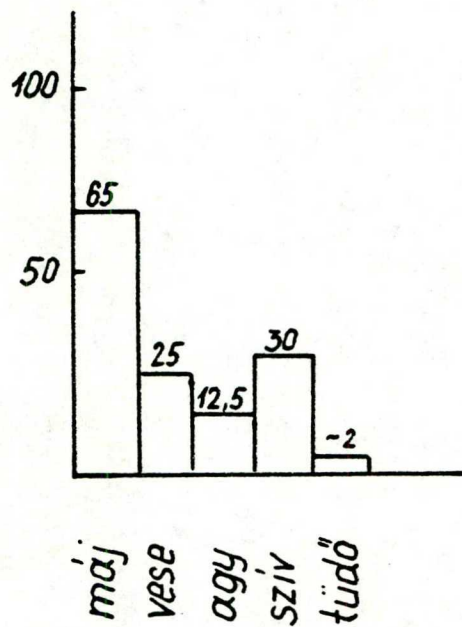
Először a következő ábrán, a gyakran használt kísérleti állatok friss, nagy szerveinek KoA értékeit mutatjuk be $\mu\text{g/ml}$ egységben. /Lásd 6. ábra/

Az ábrát megtekintve szembeötlő, hogy a nagy szervek homogenizátumainak KoA értéke közel azonos, és hogy a $2 \mu\text{g/ml}$ körüli értékek már nem nagyon értékelhetők. /Erre a területre esik a normál és diabeteszes vvt.-ek KoA tartalma is, de erre a problémára a későbbiek során még visszatérünk./

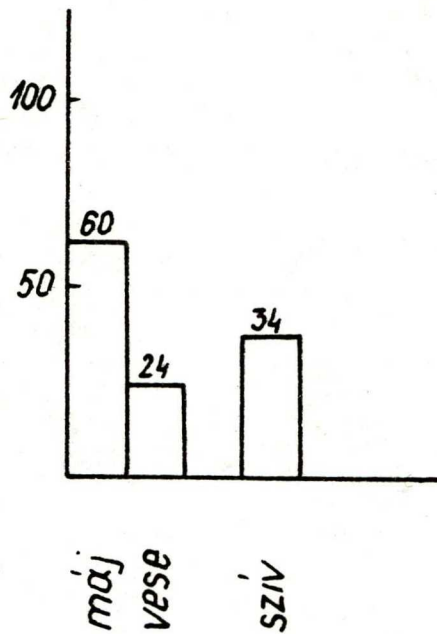
Másrészt az általunk mért értékek a magasabb egységeknél $50\text{-}100 \mu\text{g/ml}$ alacsonyabbak, mint az eddig közölt irodalmi értékek.

Mivel a kalibrációs görbénk lineáris területe kb.

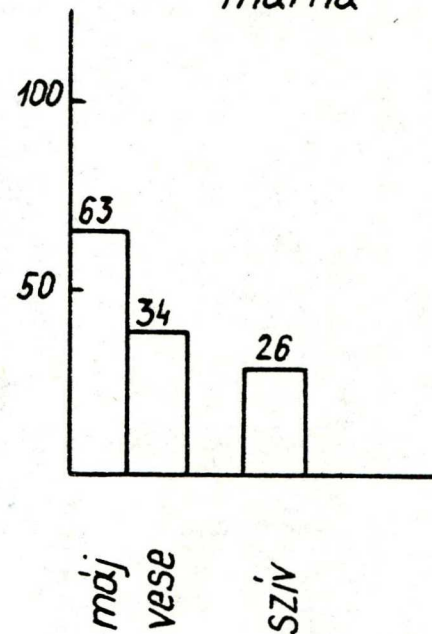
nyúl



sertés



szarvas -
marha



6. ábra

KoA mennyiségek különböző állati szövetben $\mu\text{g/g}$ nedves szövet értékben

25 µg/ml területig tart, a meghatározandó homogenizátum alikvotjait úgy kellett hígítanunk, hogy az extinkció értékek a kalibrációs görbén leolvasható legyen.

A továbbiakban mértük a normális és kóros emberi máj KoA tartalmát abból a célból, hogy betekintést nyerjünk a különböző kórfolyamat KoA tartalomra gyakorolt hatásáról.

A normál májak balesetes esetekből származtak. Ilyenkor a májszövetet a halálos balesetet követő 2 óra múlva kaptuk a proszekturáról.

A vizsgálat során 10-10 parallel mérést végeztünk és a mért értékek átlagait mutatja be a VI. táblázat.

A kóros májak hűtött proszektura anyagból származnak.

VI. táblázat

Diagnózis	Minta száma	KoA tartalom µg/g nedves szövet
Normál máj	2	10
Normál máj /alkoholos balesetes esetekből; véralkohol kb. 3 ‰/.	2	56
Metamorphosis adiposa hepatitis diffusa	4	25
Degeneratio parenchimatosa hepatitis	3	7,5

A VI. táblázat áttekintése világossá teszi, hogy KoA meghatározásnak friss máj esetén lehet diagnosztikus

értéke. Pl. eldönthető a friss, alkoholos májnál az etanol okozta, fokozott KoA anyagcsere részvétel.

Az állás során /közönséges proszektura anyag/ a máj KoA tartalma gyorsan csökken, de zsírmájnál az azonos körülmények között végzett KoA meghatározás mégis magasabb értékeket mutat, mint a cirrhotikus májak KoA tartalma.

Tájékoztató méréseket végeztünk normál és beteg /diabetesz, arterioszklerózis/ teljes emberi vérrel is.

Azt tapasztaltuk, hogy a teljes vér KoA értéke igen alacsony és nem mutatható ki szignifikáns különbség a normál és beteg vérrel történő méréseknél.

A továbbiakban, az említett esetekben, elvégeztük fiziológias nátrium-kloriddal mosott vvt.-ek KoA meghatározását is. Itt a nagy sorozatban végzett mérések nem adtak értékelhető különbséget. A mosott vvt.-ek KoA átlagértéke 2,6 µg/ml-nek adódott.

Nagy számú irodalmi adat van a különböző gyógyszerek és szintetikus anyagok kísérleti állatban, a KoA szintre gyakorolt, befolyásoló hatásáról. Ezek közül kiemeljük GARATTINI és mtsai cikkét (35). A szerzők a KoA-hoz kapcsolt acetiláló rendszer, agyszövetben kimutatható befolyásolhatóságával foglalkoztak, vagy a kísérleti állatok "in vivo" KoA-hoz kötött acetiláló funkciójára gyakorolt farmakológiai hatást tanulmányozták.

BOSKOVIC és mtsai (36) 96 különböző csoportba tartozó farmakon in vitro, KoA függő acetilezésre gyakorolt

hatását tették vizsgálat tárgyává.

Tovább sorolhatnánk az idetartozó vizsgálatok és a különböző módszerek hatékonyságának tisztázására irányuló, összehasonlító tanulmányok irodalmi felsorolását, de ilyen formában a kérdés kimerítő tárgyalását nem tartom indokoltnak jelen munkámban.

Ö S S Z E F O G L A L Á S

A bevezetésben szereplő kérdésfeltevésre munkánk során feleletet kaptunk, amennyiben - bár csak módosítással, de kidolgoztunk egy jól reprodukálható KoA meghatározási módszert, ami a Kaplan-Lipmann módszernél kb. 23-25 %-al érzékenyebb és jól felhasználható a szövet extraktumok KoA tartalmának mennyiségi meghatározására.

Módszerünkkel meghatároztuk és összehasonlítottuk a normális, friss állati szövetek nagy szerveinek KoA tartalmát.

A lehetőségeinkhez képest mennyiségi meghatározásokat végeztünk normális és kóros emberi máj KoA tartalmának a meghatározására. Méréseinkből kitűnik /bár a mérések száma itt további gyarapítást igényelne/, hogy a normális "friss" emberi máj-homogenizátum KoA tartalma 10 $\mu\text{g/g}$ nedves szövet értéket mutat.

Magasabb - 56 $\mu\text{g/g}$ nedves szövet - KoA értéket mutat az alkoholos, friss kadaverek máj-homogenizátuma. A máj-parenchima károsodások csökkentik legnagyobb mértékben a homogenizátumok KoA tartalmát.

Nagy számú mérésünk ellenére, módszerünkkel nem sikerült különbséget kimutatni a normál és diabeteszes mossott vvt.-ek KoA tartalma között.

A teljes vér KoA tartalma egyáltalán nem határozható meg az említett módszerrel.

/További összehasonlító kísérleteket tervezünk és a módszerünk érzékenységének növelése szerepel eljövendő célkitűzéseink között, hogy a KoA mind pontosabb meghatározásával a KoA függő folyamatok mechanizmusába mélyebb betekintést nyerhessünk./

Köszönetet mondok Dr. Matkovics Béla egyetemi docens Urnak munkámhoz nyújtott önzetlen segítségéért és útmutató, értékes tanácsaiért.

Ugyancsak köszönetem fejezem ki a Biokémiai Csoport dolgozóinak, akik dolgozatom elkészítésében segítségemre voltak.

I R O D A L O M

1. P.D. BOYER, H. LARDY, K. MYRBACK: The Enzymes, Vol. 3 part B /Academic Press, New York and London 1960/.
2. G.D. NOVELLI, N.O. KAPLAN, and F. LIPMANN: J.Biol.Chem. 177, 97 /1949/.
3. F. LIPMANN: Advances in Enzymol. 6, 231 /1946/.
4. D. NACHMANSOHN, and A.L. MACHADO: J.Neurophysiol. 6, 397 /1943/.
5. F. LIPMANN: J.Biol.Chem. 160, 173 /1945/.
6. F. LIPMANN: Bacteriol Revs. 17, 1 /1953/.
7. E.E. SNELL, and G.M. BROWN: Advances in Enzymol. 14, 49 /1953/.
8. J. BADDILEY; Advances in Enzymol. 16, 1 /1955/.
9. F. LYNEN, E. REIHERT, and L. RUEFF: Ann. 574, 1 /1951/.
10. F. LYNEN, and E. REIHERT: Angew.Chem. 63, 47 /1951/.
11. G.D. NOVELLI: J. Cellular Comp. Physiol. 41, Suppl. 1, 67 /1953/.
12. N.O. KAPLAN, and F. LIPMANN: J.Biol.Chem. 174, 37 /1948/.
13. W.K. MAAS: Federation Proc. 13, 256 /1954/.
14. G.D. NOVELLI: Phys.Rev. 33, 525 /1953/.
15. G.M. BROWN: Federation Proc. 17, 197 /1958/.
16. G.M. BROWN: J.Am.Chem.Soc. 80, 3161 /1958/.
17. J. BADDILEY, D.E. HUGHES, A.P. MATHIAS, and W.S. PIERPONT: Biochem.J. 56, XXII. /1954/.
18. E.R. STADTMAN, and A. KORNBERG: J.Biol.Chem. 203, 47 /1953/.
19. H.U. BERMEYER: Methoden der enzymatischen Analyse. III. kötet, 1893-1921 /Akademie Verlag, Berlin 1970/.
20. F. LIPMANN, G.D. NOVELLI, L.C. TUTTLE, and B.M. GUIRARD: J.Biol.Chem. 167, 869 /1947/.

21. G. MICHAL: *Z. anal. chem.* 243, 649 /1968/.
22. A.C. BRATTON, and E.K. MARSHALL, Jr.; *J.Biol.Chem.* 128, 537 /1939/.
23. R.E. HANDSCHUHMACHTER, G.C. MUELLER, and F.M. STRONG: *J.Biol.Chem.* 189, 335 /1951/.
24. H. TABOR, A.H. MEHLER, and E.R. STADTMAN: *J.Biol.Chem.* 204, 127 /1953/.
25. E.R. STADTMAN, G.D. NOVELLI, and F. LIPMANN: *J.Biol. Chem.* 191, 365 /1951/.
26. S. KORKES in "Phosphorus Metabolism" (W.D. McELROY and B. GLASS, eds.) Vol.I. p.259. Johns Hopkins Press, Baltimore 1951.
27. J.R. STERN, S. OCHOA, and F. LYNEN: *J.Biol.Chem.* 198, 313 /1952/.
28. F. LYNEN, U. HENNING, C. BUBLITZ, B. SÖRBO, and L. KRÖPLIN: *Biochem. Z.* 330, 269 /1958/.
29. F.M. HUENNEKENS, H.R. MAHLER, and J. NORDMANN: *Arch. Biochem.Biophys.* 30, 66; 67 /1951/.
30. P. KARLSON: *Biokémia /Medicina Könyvkiadó Budapest*, 1972/.
31. E.R. STADTMAN, F. LIPMANN: *J.Biol.Chem.* 185, 549 /1950/.
32. H. CHANTRENNE, F. LIPMANN: *J.Biol.Chem.* 187, 757 /1950/.
33. Boehringer /Mannheim/ - Házi kiadvány
34. N.O. KAPLAN, and F. LIPMANN: *J.Biol.Chem.* 174, 37 /1948/.
35. S. GARATTINI, C. MORPURGO, B. MURELLI, R. PAOLETTI, and N. PASSERINI: *Arch. int. pharmacodyn.* CIX/3-4, 400 /1957/.
36. B. BOSKOVIC, Z. FUKS, and P. STERN: *Naucno Drustvo NR Bosne I Hercegovine XVII*, 83 /1961/. "96 különböző farmakológiai tulajdonságú anyag hatása az in vitro aromás-amin enzimatiszus acilálásra."