

SUR L'ACÉTYLATION DES GROUPES PHÉNOL PROTÉIQUES
PAR LE CÉTÈNE

par

M. ROVERY ET P. DESNUELLE

Laboratoire de Chimie Biologique, Faculté des Sciences, Marseille (France)

Un récent travail nous a montré¹ que l'aptitude à l'acylation des groupes thiol protéiques varie considérablement selon la protéine à laquelle on s'adresse et, pour une même protéine, selon son état de dénaturation. Presque nulle dans l'albumine d'œuf native, elle est au contraire plus marquée dans l'albumine dénaturée et la kératéine que dans les mercaptans simples eux-mêmes. Cette différence de comportement traduit évidemment une plus ou moins grande mobilité de l'hydrogène fonctionnel. Il nous a paru intéressant de savoir jusqu'à quel point elle peut être retrouvée avec d'autres groupes protéiques également porteurs d'un hydrogène mobile. Parmi ces derniers, les groupes phénol ont particulièrement retenu notre attention car, d'une part, leur importance dans les protéines physiologiquement actives a été maintes fois soulignée et, d'autre part, l'étude de leur "réactivité" peut être abordée à la fois par trois voies différentes: Titrimétrique, spectrographique et chimique.

Les courbes de titrage de l'albumine d'œuf native² semblent déjà montrer que les -OH phénoliques de cette protéine s'ionisent avec difficulté. Mais, dans ce domaine, la technique spectrographique est d'un précieux secours car l'ion phénate absorbe beaucoup plus entre 2900 et 3100 Å[°] que la fonction phénol non-dissociée. CRAMMER ET NEUBERGER³ observent alors que:

a. Les groupes phénol de l'insuline s'ionisent bien. Leur p_K est toutefois notablement plus élevé que celui de la tyrosine (10.15) mais ce fait est attribué à la charge nette portée par la protéine en milieu alcalin plutôt qu'à un comportement particulier des groupes eux-mêmes.

b. Les groupes phénol de l'albumine native, par contre, ne s'ionisent pas de manière sensible jusqu'à $p_H = 12$. A $p_H = 13$, l'ionisation se produit brusquement, tandis que la protéine se dénature. La dénaturation une fois réalisée, les groupes de l'albumine s'ionisent alors considérablement à $p_H = 12$.

Les auteurs anglais interprètent ces faits en supposant que les groupes phénol de l'albumine native participent à des liaisons hydrogène qui sont brisées au moment de la dénaturation. De telles liaisons n'existeraient pas dans la molécule d'insuline dont la stabilité serait uniquement assurée par des ponts disulfure. Ce très important travail suggère ainsi que la mobilité des atomes d'hydrogène portés par les groupes phénol protéiques est susceptible de varier considérablement soit au moment de la dénaturation de certaines protéines, soit quand on passe d'une protéine à une autre de structure différente.

La voie chimique, d'autre part, peut utiliser soit le pouvoir réducteur qu'exercent les groupes phénol vis-à-vis de certaines substances organiques, soit leur aptitude à l'acylation. Le pouvoir réducteur, en premier lieu, est généralement estimé à l'aide du

réactif de Folin auquel la tyrosine, comme d'ailleurs le tryptophane et la cystéine, confère une coloration bleue aisément mesurable. Si ce même réactif est mis au contact d'une protéine que, pour simplifier, nous supposerons tout d'abord dépourvue de cystéine, une coloration apparaît également, mais son intensité est beaucoup moins forte que la teneur de la protéine en tyrosine et en tryptophane le laisse prévoir. Le rapport: Coloration mesurée/Coloration calculée est d'ailleurs indépendant de la protéine mise en œuvre et se situe entre 50 et 60%^{4, 5}. Doit-on en conclure que les groupes phénol des protéines sont en partie "dissimulés"? Il semble que non car les peptides simples de la tyrosine⁶, ou, plus généralement, les tyrosines N-substituées⁷ ne livrent déjà qu'une fraction de la coloration attendue.

Toutefois, il paraît maintenant admis que le pouvoir réducteur des groupes phénol protéiques augmente au moment de la dénaturation. C'est ainsi, par exemple, que l'albumine d'œuf native ne réduit pas le ferricyanure à $p_H = 9.6$. Mais, une fois dénaturée et privée de ses -SH par la cystine⁸, elle le réduit à ce même p_H . Le pepsinogène, d'autre part, est nettement moins réducteur à $p_H = 8$ que la pepsine. HERRIOTT, qui note ce fait⁹, l'attribue à une dénaturation plus poussée de la pepsine dans les conditions de l'expérience. MILLER⁶, de son côté, pense que les groupes phénol de certaines protéines, par suite d'une dénaturation plus complète consécutive au séjour en milieu alcalin, réduisent mieux le réactif de Folin pendant le dosage colorimétrique selon HERRIOTT⁵ à $p_H = 11$ que pendant celui à $p_H = 8$. La différence des résultats fournis par les deux méthodes, communément attribuée à la tyrosine O-acylée et lui servant de mesure, pourrait alors ne lui être due qu'en partie. L'auteur recommande donc l'adjonction systématique d'un détergent au milieu réactionnel afin d'assurer aux protéines un état de dénaturation aussi uniforme que possible. Notons enfin, dans le même ordre d'idées, que la porphyrindine oxyde plus facilement les -OH phénoliques de l'albumine dénaturée que ceux de l'albumine native¹⁰.

Les recherches entreprises jusqu'ici sur l'acylation des groupes phénol protéiques ont été conduites dans des conditions expérimentales (p_H , température, nature de l'agent acylant) extrêmement variées. C'est qu'en effet leur but immédiat n'était pas d'étudier systématiquement le phénomène, mais bien de déterminer ses répercussions sur l'activité physiologique des protéines mises en œuvre. De plus, subissant fortement l'influence du travail fondamental de HERRIOT ET NORTHRUP⁴ sur la pepsine, elles ont presque toujours été réalisées en milieu acide où l'acylation des -OH phénoliques progresse lentement. Enfin, leur interprétation quantitative n'est vraiment possible que dans le cas particulier de l'acétylation^{11, 12}.

Pour toutes ces raisons, bien rares sont les résultats obtenus jusqu'ici, qui semblent se prêter à une comparaison réellement instructive. Nous en avons rassemblé quelques-uns dans le Tableau I.

Un examen sommaire des chiffres du Tableau I suggère d'ores et déjà que l'acétylation des groupes phénol de l'insuline et de la glycyltyrosine progresse plus vite que celle des groupes de la pepsine et de l'ovalbumine. Toutefois, des essais préliminaires nous ayant appris que la vitesse d'acétylation dépend beaucoup du p_H , de la température et du débit de cétène, la comparaison ébauchée au Tableau I nous a paru mériter d'être précisée dans des expériences où tous ces facteurs seraient rigoureusement contrôlés.

De plus, si les -OH phénoliques de l'albumine d'œuf se révèlent réellement "inertes" à l'acylation, il est intéressant de savoir dans quelle mesure cette "inertie" disparaît au moment de la dénaturation.

TABLEAU I

QUELQUES RENSEIGNEMENTS DÉJA CONNUX CONCERNANT L'ACÉTYLATION PAR LE CÉTÈNE A $pH = 5-6$, DES GROUPES PHÉNOL DE LA GLYCYL-TYROSINE, DE L'OVALBUMINE NATURE ET DE L'INSULINE

Durée de l'acétylation (min)	% de tyrosine acétylée dans la :			
	Glycyltyrosine ⁵	Pepsine ⁴	Insuline ¹³	Ovalbumine native ¹⁴
5	—	—	4	—
10	—	—	11	—
30	20	—	—	—
45	—	4	—	0*
60	39	—	—	—
180	79	—	—	—
720	—	12	—	—
1080	—	—	87	—
2100	—	32	—	—

* La durée exacte de l'acétylation ne ressort pas clairement dans ce travail.

Tel est le double objet du présent travail.

RÉSULTATS EXPÉRIMENTAUX

I. DÉTERMINATION DU % DE TYROSINE ACÉTYLÉE

En principe⁵, la méthode consiste à mesurer le pouvoir chromogène, vis-à-vis du réactif de Folin, de la protéine acétylée prise, soit dans l'état-même où elle sort de l'acétylation (méthode pH 8), soit après l'avoir maintenue quelques minutes à $pH = 11$ (méthode pH 11). Le protocole expérimental utilisé, dérivé de celui de MILLER⁶, est brièvement résumé ci-après:

1. Méthode pH 8

A x ml de solution contenant 20 à 30 γ de tyrosine ou une quantité équivalente de protéine, sont ajoutés (1-x) ml d'eau, 0.1 ml de CIH N/5 et 0.2 ml de dodécysulfate de Na à 10%. Après 3 min, 0.1 ml de NaOH N/5, 1 ml du réactif de Folin dilué et 2 ml de tampon phosphate sont ajoutés et la solution est laissée 15 min à 35.5°.

2. Méthode pH 11

A x ml de solution, sont ajoutés (1-x) ml d'eau et 0.1 ml de NaOH N/5. Après 15 à 30 min, 0.2 ml de détergent* et 0.1 ml de CIH N/5 sont ajoutés et le dosage est continué comme précédemment.

Le tampon est composé de 9 parties de phosphate disodique 0.5 M et 1 partie de NaOH à 10%. Le réactif de Folin est dilué de telle façon que 1 ml de ce réactif + 2 ml de tampon + 1 ml d'eau se trouvent à $pH = 7.7$ après 10 min de contact.

La coloration bleue apparue est mesurée dans les 2 cas au photocalorimètre (Filtre Wratten n° 27).

Une courbe de référence est d'autre part établie avec de la tyrosine pure (Tableau II).

Cette courbe permet de transformer les mesures colorimétriques précédentes en poids de tyrosine que, selon les conditions du dosage, nous désignerons désormais par les symboles " pH 8" et " pH 11".

A partir de ces données expérimentales, il s'agit maintenant de calculer le % de tyrosine acétylée, c.à.d. le rapport: Tyrosine acétylée (colorimétrique)/Tyrosine totale (colorimétrique) × 100, qui nous permettra d'établir nos comparaisons ultérieures sur

* Cette quantité est évidemment diminuée si l'échantillon soumis au dosage contient déjà du détergent.

TABLEAU II
ÉLÉMENTS DE LA COURBE DE RÉFÉRENCE RELATIVE AU DOSAGE
DES - OH PHÉNOLIQUES SELON MILLER
PHOTOCOLORIMÈTRE-FILTRE WRATTEN NO. 27. CUVE DE 1 CM

Tyrosine (γ)	Densités optiques
10	0.112
15	0.170
20	0.225
25	0.285
30	0.340

une base uniforme et précise. Ce calcul est différent selon la composition de la protéine mise en œuvre et, comme les travaux publiés jusqu'ici ont été fort avares de détails en ce qui le concerne, nous croyons utile d'en exposer ci-après les divers aspects:

a. *La substance étudiée est un dérivé simple de la tyrosine ou une protéine qui, comme l'insuline, ne contient ni tryptophane ni cystéine.*

Le % de tyrosine acétylée est évidemment donné par le rapport simple:

$$\frac{“p_{HII}” - “p_{H8}”}{“p_{HII}”} \times 100 \quad (1)$$

b. *La protéine étudiée contient, comme la pepsine, du tryptophane, mais pas de cystéine.*

Le numérateur du rapport (1) exprime toujours la quantité de tyrosine acétylée (colorimétrique) car l'acétyltryptophane n'est pas saponifié à $p_H = 11$. Mais la valeur “ p_{HII} ”, qui se trouve au dénominateur, représente en fait une somme tyrosine + tryptophane (exprimé en tyrosine). Cette valeur ne peut donc servir au calcul qu'après lui avoir retranché ce qui revient au tryptophane.

c. *La protéine étudiée contient à la fois, comme l'albumine d'oeuf, du tryptophane et de la cystéine.*

Remarquons tout d'abord que les groupes -SH de l'albumine, rendus “réactifs” par le détergent présent au moment du dosage, vont exercer un pouvoir réducteur propre. Le numérateur du rapport (1) ne représentera la tyrosine acétylée (colorimétrique) que si la cystéine (acétylée ou non) se comporte comme le tryptophane, c.à.d. si elle possède le même pouvoir chromogène à $p_H = 8$ qu'à $p_H = 11$. Cette hypothèse n'est évidemment pas tout-à-fait exacte car, d'une part, les groupes thiol sont assez labiles à $p_H = 11$ et, d'autre part, les liaisons S-acétylées s'hydrolysent notablement à ce même p_H . Les deux phénomènes, exerçant sur le dosage des effets contraires, vont tendre dans une certaine mesure à se compenser. Il faut toutefois s'attendre à ce que les résultats du dosage soient un peu trop faibles quand quelques fonctions -SH seulement auront été acétylées (cas de l'albumine native) mais soient légèrement par excès quand beaucoup de -SH auront été acétylés (cas de l'albumine dénaturée). De nombreux essais nous ont d'ailleurs montré que les erreurs entraînées par la présence des -SH n'affectent en aucun cas la signification générale des résultats qui seront exposés plus loin*.

* Notons d'ailleurs qu'il pourrait à priori sembler plus simple de chercher à débarrasser la protéine de ses groupes -SH, par traitement à l'iode en particulier. Toutefois, malgré les affirmations d'ANSON¹⁶, il nous a été impossible d'obtenir, par addition d'une quantité d'iode légèrement supérieure à la quantité calculée, une albumine ne réduisant plus le ferricyanure en présence de dodéccylsulfate. Nous avons alors pensé qu'un excès d'iode risquait d'attaquer les restes tyrosine dont nous nous proposions d'étudier le comportement et nous avons préféré travailler avec la protéine normale.

Bibliographie p. 521.

Quant à la tyrosine totale (colorimétrique), elle se déduira du pouvoir chromogène de la protéine initiale en lui retranchant ce qui revient au tryptophane et à la cystéine. Après avoir déterminé les coefficients d'équivalence nécessaires, nous avons trouvé par exemple que l'albumine d'œuf contient 2,5% de tyrosine totale (colorimétrique).

II. COMPARAISON A DIVERS P_H DE LA VITESSE D'ACÉTYLATION DES -OH PHÉNOLIQUES APPARTENANT A LA GLYCYLTYROSINE, L'ALBUMINE D'OEUF NATIVE ET L'INSULINE

On traite par le cétène (2 bulles/sec. Temp. 20-25°) soit une solution à 0,45% de glycyltyrosine (HOFFMANN-LA ROCHE), soit une solution de 3,1% d'albumine d'œuf cristallisée, soit enfin, une suspension de 200 mg d'insuline pure (Boots) dans 5 ml de liquide. Les tampons utilisés sont des mélanges acide acétique-acétate M ($P_H = 5,6$) ou phosphates M/4 ($P_H = 7,5$). Le P_H est rigoureusement maintenu à sa valeur de départ (rouge de méthyle pour le $P_H = 5,6$; rouge de phénol pour le $P_H = 7,5$) par addition ménagée de soude. Au bout du temps prescrit, l'albumine qui a précipité pendant l'acétylation, est éliminée par centrifugation. Quant à l'insuline, peu soluble dans les tampons utilisés, elle est centrifugée après traitement, lavée à l'acétone et à l'éther puis dissoute dans l'eau.

Les diverses techniques décrites dans le chapitre précédent sont alors appliquées aux liqueurs obtenues et les résultats qu'elles donnent sont reportés dans le Tableau III.

TABLEAU III
APTITUDE A L'ACÉTYLATION DES GROUPES PHÉNOL DE LA GLYCYLTYROSINE, DE L'ALBUMINE NATIVE ET DE L'INSULINE

PH	Durée de l'acétylation (min)	% de tyrosine acétylée		
		Glycyltyrosine	Albumine native	Insuline
7,5	5	35	—	20
7,5	10	—	—	—
7,5	15	96	40	—
7,5	45	—	65	—
5,6	10	50	5	—
5,6	15	—	—	25
5,6	20	94	—	—
5,6	25	—	10	—

Les chiffres du Tableau III appellent les quelques remarques suivantes:

1. Dans nos expériences, l'acétylation des -OH phénoliques de la glycyltyrosine et des protéines progresse nettement plus vite que l'on a coutume de le signaler. Voici un exemple frappant: D'après HERRIOTT⁵, la glycyltyrosine s'acétyle à 20% pendant 30 min à P_H 5,6. Nous trouvons 94% d'acétylation en 20 min dans les mêmes conditions. Le débit du cétène est probablement plus rapide dans nos expériences. Mais il ne faut pas oublier que la vitesse d'acétylation des groupes phénol est extrêmement sensible aux variations de P_H . Au dessous de $P_H = 5$ en particulier, elle devient presque nulle. Peut-être avons-nous simplement maintenu notre P_H avec plus de soin qu'on ne l'avait fait jusqu'ici.

2. Comme on pouvait s'y attendre, les groupes phénol s'acétylent mieux, quelle que

soit la molécule qui les portent, à $p_H = 7.5$ qu'à $p_H = 5.6$. Ce fait traduit simplement la mobilité plus grande de l'hydrogène phénolique en milieu alcalin.

Quand il s'agit donc de déterminer les répercussions qu'exerce l'acétylation des groupes phénol sur l'activité physiologique des protéines, on a intérêt à travailler en milieu légèrement alcalin chaque fois que la stabilité de la protéine le permet.

3. Les groupes phénol de la glycyltyrosine s'acétylent toujours notablement plus vite que ceux des deux protéines étudiées. Toutefois, l'acétylation est beaucoup plus aisée dans l'insuline que dans l'albumine d'œuf native. Nos résultats confirment ceux de CRAMMER ET NEUBERGER en ce qui concerne tout-au-moins les différences entre insuline et albumine native. Dans cette dernière protéine, l'hydrogène phénolique présente bien une mobilité remarquablement faible. Mais cette mobilité ne semble pas être à son maximum dans l'insuline elle-même.

III. ESSAI DE COMPARAISON ENTRE L'ACÉTYLATION DES - OH PHÉNOLIQUES DE L'ALBUMINE D'ŒUF NATIVE ET DÉNATURÉE

Il convient maintenant de se demander ce que devient, au moment de la dénaturation, l'aptitude à l'acétylation des groupes phénol de l'albumine. Va-t-elle, par un processus aussi spectaculaire que celui noté sur les groupes thiol, rejoindre ou même dépasser celle des phénols simples? Va-t-elle tout-au-moins être portée au même niveau que celle des groupes de l'insuline? Pour fixer ce point, deux techniques expérimentales, analogues à celles déjà utilisées au cours de notre première étude¹, peuvent alors être envisagées: *a.* Soit recueillir le coagulum dénaturé qui se forme quand on acétyle des solutions aqueuses d'albumine, le disperser dans le dodécylsulfate et appliquer les techniques de MILLER à cette dispersion; *b.* soit faire agir directement le cétène sur une solution d'albumine dans le dodécylsulfate et noter la diminution que subit le pouvoir chromogène du milieu au cours du traitement. Toutefois, en dehors des erreurs provoquées par les liaisons S-acétyle, erreurs dont nous avons déjà discuté l'importance, plusieurs circonstances viennent compliquer l'interprétation des expériences qui vont suivre.

a. Etude du coagulum

Une solution d'albumine à 3.0% dans un tampon phosphate M/4 ($p_H = 7.4$) est soumise pendant 45 min à un barbotage assez rapide de cétène (2 bulles/sec). La température est de 20° et le p_H est constamment maintenu à 7.5 par addition de soude. Le coagulum est lavé et dispersé dans la quantité de dodécylsulfate nécessaire aux dosages ultérieurs.

Le dosage p_{HII} qui, normalement, devrait indiquer la somme globale tyrosine + tryptophane + cystéine (colorimétriques) s'est révélé nettement trop faible. Nous attribuons ce fait à la présence du détergent qui, on le sait⁶, ralentit considérablement l'hydrolyse des liaisons acylées. Ce détergent ne peut être éliminé par dialyse sous peine de voir la protéine précipiter. Nous avons donc renoncé à toute détermination précise du % de tyrosine acétylée dans le coagulum. Ce % peut toutefois être estimé de façon approximative comme suit: pendant le dosage p_{H8} , la cystéine ne joue aucun rôle puisqu'elle est complètement acétylée. La coloration obtenue est donc uniquement due à la tyrosine et au tryptophane non-acétylés. Si on lui retranche la totalité du tryptophane, on obtient alors une valeur minimum pour la tyrosine non-acétylée. Dans le cas présent, nous

trouvons environ 20% de la tyrosine totale (colorimétrique). Ce résultat, quoique imprécis, montre déjà que les groupes phénol de l'albumine n'acquièrent pas à la dénaturation une "réactivité" égale à celle des groupes de la glycyltyrosine.

b. *Acétylation des groupes phénol de l'albumine en dispersion dans le dodécylsulfate*

Quand on ajoute un tampon acétate ($p_H = 5.6$) ou phosphate ($p_H = 7.5$) à une dispersion d'albumine dans le dodécylsulfate, la protéine précipite entièrement. Ce fait ne nous a pas géné dans notre première étude¹ car les $-SH$ s'acétylent très bien en milieu acide et l'on peut opérer sans tampon. Dans le cas présent, l'emploi d'un tampon paraît indispensable. Nous avons alors noté qu'un tampon citrate $M/2$ à $p_H = 6.4$ pouvait à la rigueur être utilisé, mais l'addition ultérieure de quantités même minimes de soude, destinées à maintenir le p_H à sa valeur initiale, provoque la précipitation. Il est donc, en tout cas, impossible d'éviter une acidification progressive du milieu. Cette acidification est évidemment préjudiciable à la bonne marche de l'acétylation et, afin d'obtenir des bases précises de comparaison, nous avons effectué des expériences-témoin, dans les mêmes conditions, sur la glycyltyrosine, l'insuline et l'albumine d'oeuf native.

Notons, d'autre part, que, contrairement à ce que l'on observe au paragraphe (a), le détergent peut être ici éliminé par dialyse, une fois l'acétylation terminée, sans que la protéine coagule. Cette circonstance favorable permet d'appliquer la technique de détermination du % de tyrosine acétylée (Tableau IV) telle qu'elle est décrite plus haut.

TABLEAU IV
ACÉTYLATION PAR LE CÉTÈNE DES GROUPES PHÉNOL DE L'ALBUMINE DÉNATURÉE PAR LE DODÉCYLSULFATE

Durée de l'acétylation (min)	% de tyrosine acétylée			
	Glycyltyrosine	Albumine native	Albumine dénaturée	Insuline
10	33	0	0	3
20	53	0	0	15
30	64	0	15	20

Les chiffres du Tableau IV suggèrent les quelques remarques suivantes:

1. Comme nos essais précédents le laissaient prévoir, ces nouvelles expériences montrent clairement que les groupes phénol de l'albumine dénaturée s'acétylent moins bien que ceux de la glycyltyrosine. La dénaturation de l'albumine ne provoque donc pas, chez les groupes phénol, une variation de "réactivité" aussi marquée que chez les groupes thiol.

2. Quant au comportement des groupes de l'albumine dénaturée et de l'insuline, nos expériences sont trop imprécises pour permettre d'affirmer qu'il est identique. L'obligation où nous sommes en effet de travailler à p_H variable, ralentit beaucoup les acétylations et rend les différences éventuelles peu sensibles. Il est toutefois probable que l'acétylation des $-OH$ phénoliques, comme leur ionisation, progresse de manière analogue dans les deux protéines.

RÉSUMÉ

1. Nous indiquons comment il faut déterminer, de manière approchée tout au moins, la proportion de tyrosine acétylée dans des protéines contenant du tryptophane et de la cystéine.

2. L'aptitude à l'acétylation par le cétène présentée par les groupes phénol de la glycylyrosine, de l'albumine d'oeuf *native* et de l'insuline décroît dans l'ordre suivant: Glycylyrosine > Insuline > Albumine *native*. Ce résultat confirme que les atomes d'hydrogène portés par les groupes phénol de l'albumine *native* sont doués d'une très faible mobilité, qui fait également obstacle à leur ionisation.

3. L'acétylation des groupes de l'albumine *dénaturée* et de l'insuline semble progresser de façon analogue. La dénaturation, en tout cas, ne fait pas varier la "réactivité" des groupes phénol de l'albumine de façon aussi accusée que celle des groupes thiol.

4. Ces faits suggèrent que, contrairement au groupe thiol, les groupes phénol protéiques ne jouissent pas de leur pleine "réactivité" même lorsqu'ils sont dégagés de toute liaison structurale.

SUMMARY

1. We show how to determine, at least approximately, the proportion of acetylated tyrosine in proteins containing tryptophan and cysteine.

2. The tendency to acetylation by ketene shown by the phenol groups of glycylyrosine, *native* egg albumin, and insulin decreases in the following order: glycylyrosine > insulin > *native* albumin. This result confirms that the hydrogen atoms of the phenol groups of *native* albumin possess very little mobility, with a corresponding hindering of ionisation.

3. The acetylation of the groups in *denatured* albumin and in insulin appears to proceed similarly. In any case, denaturation does not affect the "reactivity" of the phenol groups in albumin so markedly as it does that of the thiol groups.

4. These facts suggest that, in contrast with the thiol groups, the phenol groups in proteins do not display their full "reactivity" even when freed from structural linkages.

ZUSAMMENFASSUNG

1. Wir zeigen, wie man, jedenfalls annähernd, die relative Menge von azetyliertem Tyrosin in Eiweißkörpern, die Tryptophan und Cystein enthalten, bestimmen kann.

2. Die Neigung zur Azetylierung durch Keten, die die Phenolgruppen in Glycylyrosin, *nativem* Eialbumin und Insulin haben, nimmt in der folgenden Reihenfolge ab: Glycylyrosin > Insulin > *natives* Albumin. Dieses Ergebnis bestätigt, dass die Wasserstoffatome der Phenolgruppen des *nativen* Albumins nur eine sehr geringe Beweglichkeit besitzen, die auch in gleicher Weise ihrer Ionisierung im Wege steht.

3. Die Azetylierung der Gruppen im *denaturierten* Albumin und im Insulin scheint in analoger Weise zu verlaufen. Auf jeden Fall verändert die Denaturierung die "Reaktivität" der Phenolgruppen des Albumins nicht in so ausgesprochener Weise wie die der Thiolgruppen.

4. Diese Tatsachen zwingen zu der Annahme, dass — im Gegensatz zu den Thiolgruppen — die Phenolgruppen im Eiweiß nicht ihre vollständige "Reaktivität" besitzen, sogar wenn sie von jeder strukturellen Bindung gelöst sind.

BIBLIOGRAPHIE

- 1 P. DESNUELLE ET M. ROVERY, *Biochim. Biophys. Acta*, 1 (1947) 497.
- 2 R. K. CANNAN, A. KIBRICK ET A. H. PALMER, *Ann. N.Y. Acad. Sci.*, 41 (1941) 241.
- 3 J. L. CRAMMER ET A. NEUBERGER, *Biochem. J.* 37 (1943) 302.
- 4 R. M. HERRIOTT ET J. H. NORTHRUP, *J. Gen. Physiol.*, 18 (1935) 35.
- 5 R. M. HERRIOTT, *J. Gen. Physiol.*, 19 (1936) 283.
- 6 G. L. MILLER, *J. Biol. Chem.*, 146 (1942) 339.
- 7 A. H. TRACY ET W. F. ROSS, *J. Biol. Chem.*, 142 (1942) 871.
- 8 A. E. MIRSKY ET M. L. ANSON, *J. Gen. Physiol.*, 19 (1936) 451.
- 9 R. M. HERRIOTT, *J. Gen. Physiol.*, 21 (1938) 501.
- 10 E. BRAND ET B. KASSEL, *J. Biol. Chem.*, 133 (1940) 437.
- 11 G. L. MILLER, *J. Biol. Chem.*, 146 (1942) 345.
- 12 R. M. HERRIOTT, *Advances in Protein Chemistry*, 3 (1947) 190.
- 13 K. G. STERN ET A. WHITE, *J. Biol. Chem.*, 122 (1937) 371.
- 14 H. FRAENKEL-CONRAT, *J. Biol. Chem.*, 152 (1944) 385.
- 15 M. L. ANSON, *J. Gen. Physiol.*, 23 (1940) 321.

Reçu le 12 juin 1948