

Elektive Spaltung der 2.3-Diphosphoglyzerinsäure in Erythrozyten

Im Rahmen der Untersuchung des Phosphatstoffwechsels der Erythrozyten fanden wir, dass bei Inkubation menschlicher Erythrozyten mit einer entsprechenden Konzentration an NaHSO_3 , oder $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$, die 2.3-Diphosphoglyzerinsäure (2.3-PGS) mit gut messbarer Geschwindigkeit gespalten wird, während sich anorganisches Phosphat und Brenztraubensäure anhäufen. Es ist überraschend, dass die Glykolyse der roten Blutkörperchen gleichzeitig ungestört, bzw. je nach der verwendeten Konzentration des Bisulfit, gesteigert abläuft, wie dies auch durch den normalen ATP-Gehalt bewiesen ist (Tabelle I). Wird das Bisulfit nach der Spaltung der 2.3-PGS aus dem Reaktionsgemisch durch mehrmaliges Waschen mit Tyrode-Lösung entfernt, so bilden die so erhaltenen Erythrozyten aus Glukose mit unveränderter Intensität Milchsäure. Die gespaltene 2.3-PGS wird inzwischen auch bei schwach alkalischem, für die Synthese günstigem pH nicht aufs Neue synthetisiert (Tabelle II). In Hämolysaten verursachen NaHSO_3 bzw. $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$ ausser den bekannten, durch die Schädigung der Zellstruktur hervorgerufenen Stoffwechselveränderungen¹ eine rasche Spaltung der 2.3-PGS.

Für diese allein stehende Erscheinung, dass ein Zwischenprodukt elektiv, ohne Störung des gesamten energieliefernden Stoffwechsels abgebaut werden konnte, ist die mit NaHSO_3 bzw.

TABELLE I

DIE WIRKUNG VON NaHSO_3 AUF DEN 2.3-PGS- BZW. ATP-GEHALT DER ERYTHROZYTEN

Reaktionsgemisch: defibriniertes Menschenblut mit 0.02 M NaHSO_3 bei 37° C inkubiert. Werte in $\mu\text{g/ml}$ Reaktionsgemisch angegeben.

Zeit (min)	$P_{\text{anorg.}}$	P_7	P_{150}	$P_{\text{säure-löslich}}$	$P_7 - P_{\text{anorg.}}$	$P_{\text{säure-löslich}} - P_{150}$
0	21	58	68	166	37	98
30			84	166		82
60	60	97	111	166	37	55
90	70	106	125	166	36	41
120	77	111	134	166	34	32
180	88	124	153	166	36	13

TABELLE II

DIE WIRKUNG VON NaHSO_3 AUF DIE GLYKOLYSE DER ERYTHROZYTEN

Reaktionsgemisch: defibriniertes Menschenblut mit 0.015 M NaHSO_3 bei 37° C inkubiert. Nach 4⁰⁵ stündiger Inkubierung dreimal mit Tyrode-Lösung (glukosefrei, pH 7.4), einmal mit eigenem Serum gewaschen und dann in — mit isotonischer Glukose-Lösung versetztem — Serum suspendiert, im ursprünglichen Volumen weiter inkubiert. Werte in $\mu\text{g/ml}$ Reaktionsgemisch angegeben.

Zeit h	$P_{\text{anorg.}}$	$P_{\text{säure-löslich}} - P_{150}$	Glukose*	Milchsäure**
0	18	88	795	430
1	51	46	610	550
2	78	14	445	805
3 ⁰⁵	88	10	280	—
4 ⁰⁵	98	0	150	1120
Waschen				
6	37	14	1410	445
7	30	15	1180	645
8	30	20	1050	795
9	30	16	900	1040

* nach NELSON⁴ bestimmt.** nach BARKER UND SUMMERSON⁵ bestimmt.

$\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$ aktivierbare Glycerinsäure-2,3-diphosphatase (2,3-PGase) verantwortlich. Das Enzym wurde aus Azeton-Trockenpulver von Menschen- und Schweine-Erythrozyten durch Fraktionierung mit Alkohol und Ammoniumsulfat teilweise gereinigt. Seine Wirkung ist spezifisch auf 2,3-PGS, 3-PGS wird nicht gespalten. Es unterscheidet sich bezüglich seiner Eigenschaften von der, von RAPOPORT und Mitarbeitern^{2,3} aus Muskel hergestellten 2,3-PGase. Für die Aktivität des Erythrozyten-Enzyms sind ausser NaHSO_3 bzw. $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$, einwertige Kationen (K^+ , Na^+ , NH_4^+) in isotonischer Konzentration unbedingt erforderlich. Das Enzym wird durch Hg^{++} Ionen, im Gegensatz zur Muskel-2,3-PGase, nicht aktiviert.

Eine ausführliche Veröffentlichung der Experimente, samt einer Diskussion ob 2,3-PGS ein obligates Zwischenprodukt der Hämoglykolyse sei, erscheint in *Acta Physiol. Hung.*

Chemisches Institut der Medizinischen Universität, Budapest (Ungarn)

S. MÁNYAI
Zs. VÁRADY

¹ M. SZÉKELY, S. MÁNYAI UND F. B. STRAUB, *Acta Physiol. Hung.*, 4 (1953) 31.

² S. RAPOPORT UND J. LUEBERING, *J. Biol. Chem.*, 189 (1951) 683.

³ S. RAPOPORT UND J. LUEBERING, R. H. WAGNER, *Z. physiol. Chem.*, 302 (1955) 105.

⁴ N. NELSON, *J. Biol. Chem.*, 153 (1944) 375.

⁵ S. B. BARKER UND W. H. SUMMERSON, *J. Biol. Chem.*, 138 (1941) 535.

Eingegangen am 4. April 1956

Isolation of DNP-peptides from DNP-polyvalyl-proteins*

The difficulty in obtaining significant yields of protein fragments larger than dipeptides by acid hydrolysis has been emphasized by SANGER, and a variety of milder hydrolytic conditions have been used for the isolation of larger peptides¹. During the course of end group studies of polyvalyl-proteins, we have found that peptides containing as many as 9 amino acids from the protein chain, in addition to the added valine, remained after hydrolysis under conditions usually employed for the isolation of DNP-amino acids². This apparent stabilization of sections of the polypeptide chains by valine peptides should offer advantages in studying protein structure, since the products of the strong acid hydrolysis would be a relatively simple mixture of peptides and free amino acids.

The polyvalyl-proteins were prepared by the reaction of the proteins with N-carboxy-DL-valine anhydride². These were reacted with 1,2,4-fluorodinitrobenzene³ and subsequently hydrolyzed with 5.7N HCl at 105° C in a sealed tube for 16 hours. The peptides were isolated by extraction of the hydrolysate with ethyl acetate⁴, followed by separation on silicic acid columns, using water-saturated CHCl_3 as the mobile phase⁵. A further check of purity of the DNP-peptides obtained was determined by two-dimensional paper chromatography using phenol-isoamyl alcohol-water (1:1:1) in one direction and phthalate buffer (pH 6.0) in the other, in addition to the column chromatography using two different eluting solvents. Under identical experimental conditions no DNP-peptides were found when the DNP derivatives of unmodified, poly-L-phenyl-alanyl- or polyglycyl-proteins were hydrolyzed.

Since its amino acid sequence is known^{6,7}, insulin offered a convenient model protein for study. From 19 μM of DNP-polyvalyl-insulin, 7 μM of ϵ -DNP-lysine, two peptides (3 μM and 8 μM) which differed only in the amount of valine present, and 25 μM of DNP-valine, were obtained. Hydrolysis of the peptides in 5.7N HCl at 105° for 96 hours liberated the following amino acids in addition to from 5 to 10 moles of valine^{7,8}: Lys, Phe, Gly, Ala, Thr, Glu, Tyr, Pro, and Arg. Glycine was N-terminal⁹ and alanine C-terminal⁹ and the ratio of phenylalanine to lysine was two¹⁰. The peptide is therefore from the C-terminal end of the phenylalanine chain, which contains the only lysine and proline in the molecule. The specificity of the reaction is such that within the limits of the methods used, only amino groups react¹¹. The results show that over 90% of the lysine is accounted for either in the peptides or as ϵ -DNP-lysine, but the recovery of the DNP-valine is not sufficient to account for all of the amino groups. No other DNP-amino acids were found, nor were any peptides from the N-terminal ends isolated.

DNP-peptides of varying size, but all containing lysine, have been obtained from chymotrypsin, trypsin, lysozyme and bovine plasma albumin when similar experiments were carried out. The yields of the peptides, based upon spectrophotometric determination of the DNP-valine

* Supported in part by a grant from The Nutrition Foundation, Inc., New York, N.Y. Thanks are due the Eli Lilly Co. for a gift of crystalline zinc-insulin.

** Abbreviations: DNP = Dinitrophenyl; amino acids according to E. BRAND AND J. T. EDSALL, *Ann. Rev. Biochem.*, 16 (1947) 223.

*** The aqueous may also contain peptides, and has not as yet been investigated.