

acetone and ether. Hydrolysis was then carried out in 6*N* HCl at 105°C in sealed evacuated tubes. The ether extract and the aqueous phase of the DNP-protein hydrolyzate were run on paper chromatograms both in the tert-amyl alcohol-phthalate system⁴ and in the *n*-butanol-NH₃ and phosphate buffer 0.75 *M*, pH 6 bidimensional system⁵.

Only DNP-alanine appeared to be present in the ether extract; di-DNP-histidine and DNP-arginine were absent from the aqueous phase. No glycine or proline degradation products were detectable, even when the DNP-protein was hydrolyzed for 4 h in concentrated HCl at 105°C. No DNP-cysteic acid was found after dinitrophenylation and hydrolysis of performic acid oxidized protein. It was therefore concluded that alanine is the only N-terminal residue in glutamic aspartic transaminase.

In order to determine the number of DNP-alanine residues per mole of protein, some DNP-protein preparations were carefully dried and weighed after water, acetone and ether washings. From the lysine, histidine, tyrosine and cysteine content of transaminase⁶, about 85% of the weight could be attributed to the original protein. Hydrolysis was then carried out as described before; at the same time control tests were made in which known amounts of DNP-alanine were submitted to hydrolysis together with DNP-protein. The ether extracts of hydrolyzates were run on paper chromatograms in the solvent system of BLACKBURN and LOWTHER⁴, and, after elution of the DNP-alanine spots in 1% NaHCO₃, the resulting solutions were examined for absorption at 360 mμ in a Beckman DU spectrophotometer. Yields, calculated from the optical density, were related to the yields of synthetic DNP-alanine.

From three assays, the values of 1.0, 1.0 and 0.9 moles of DNP-alanine have been found per 58,000 g of protein, i.e. per mole of coenzyme. The molecular weight of glutamic aspartic transaminase, as determined at the ultracentrifuge by JENKINS et al.⁷, is about 110,000, so that the enzyme appears to be formed by two polypeptide chains, that carry the same N-terminal residue.

Riassunto. Su una preparazione altamente purificata di glutammico aspartico transaminasi del cuore di porco sono stati determinati i gruppi N-terminali con il metodo di SANGER. È stata dimostrata la presenza di una mole di alanina N-terminale per 58 000 g di proteina, cioè per una mole di coenzima. La transaminasi risulterebbe pertanto costituita da due catene polipeptidiche.

C. TURANO, PAOLA VECCHINI, and ANNA GIARTOSIO

Istituto di Chimica Biologica, Università di Roma, and Centro Studi di Enzimologia del C.N.R., Roma (Italy), August 9, 1962.

⁴ S. BLACKBURN and A. G. LOWTHER, *Biochem. J.* **48**, 126 (1951).

⁵ J. W. DAVIES and G. HARRIS, *Arch. Biochem. Biophys.* **74**, 229 (1958).

⁶ C. TURANO, A. GIARTOSIO, F. RIVA, and P. FASELLA, unpublished data.

⁷ W. T. JENKINS, D. A. YPHANTIS, and I. W. SIZER, *J. biol. Chem.* **234**, 51 (1959).

Isolierung eines hochgereinigten Polypeptides mit uterusrelaxierender Wirksamkeit

Sowohl COHEN¹ als auch FRIEDEN² haben in den letzten Jahren gereinigte Hormonpräparate mit Relaxinwirkung, PAUL und WIGVIST³ solche mit uterusrelaxierender Aktivität dargestellt. Wir nehmen eine neue Mitteilung COHENS⁴ über weitere Fortschritte bei der Isolierung und Reinigung von Relaxin zum Anlass, um über die Isolierung eines durch sehr hohe uterusrelaxierende Aktivität ausgezeichneten Polypeptides aus Ovarien gravider Schweine zu berichten, um so mehr, als die Frage der Identität oder Verschiedenheit von Relaxin und «Uterus-Relaxing-Factor» bisher nicht eindeutig beantwortet ist.

Von verschiedenen Reinigungsverfahren, die von uns untersucht worden sind⁵, erwies sich das im nachstehenden Schema dargestellte als das günstigste, da es auch grössere Mengen des hochgereinigten Polypeptides zu erhalten erlaubt.

Bei der analytischen Untersuchung mit Hilfe der Niederspannungselektrophorese bei den pH-Werten 1,8, 4,7, 5,8, 9,0 und 11,0 in der Apparatur von WIELAND⁶ erwies sich das gewonnene Polypeptid (Komponente IIIa und IIIb) als stark basisch und als einheitlich; bei den Anfärbungen mit Ninhydrin, mit Amidoschwarz, nach der Chlormethode und mittels der Sakaguchi-Reaktion zeigte sich stets nur eine einzige Bande, während das Peptid mit dem Pauli-Reagens eine nur sehr schwache

Färbung gab. Auch bei der Elektrophorese auf acetylierter Membranfolie bei pH 4,7 und pH 5,8 in der Versuchsanordnung nach HANNIG und GRASSMANN⁷ war keine Heterogenität nachweisbar. Als einheitlich erwies sich das Polypeptid ebenfalls bei der Papierchromatographie bei 18°C in den Lösungsmittelsystemen sek.-Butanol/1% TCA (organ. Phase) (Rf 0,7), sek.-Butanol/0,2% TCA (organ. Phase) (Rf 0,4). Die elektrophoretische Untersuchung des isolierten uterusrelaxierenden Faktors mittels der Stärkegel-Hochspannungselektrophorese⁸ liess nach Anfärbung mit Amidoschwarz und 12 h fortgesetzten Auswaschens neben der Hauptbande noch 2 sehr schwache langsamer kathodisch wandernde Begleitkomponenten sichtbar werden. Um auch noch diese geringfügigen Verunreinigungen des uterusrelaxierenden Polypeptides zu entfernen, bedarf es einer mehrfach wiederholten Chromatographie der Komponente IIIb an Sephadex.

¹ H. COHEN und W. KLEINBERG, *Arch. Biochem. Biophys.* **91**, 17 (1961).

² E. H. FRIEDEN, N. R. STONE und N. W. LAYMAN, *J. biol. Chem.* **235**, 2267 (1960).

³ K. G. PAUL und N. WIGVIST, *Acta endocrin.* **35**, 435 (1960).

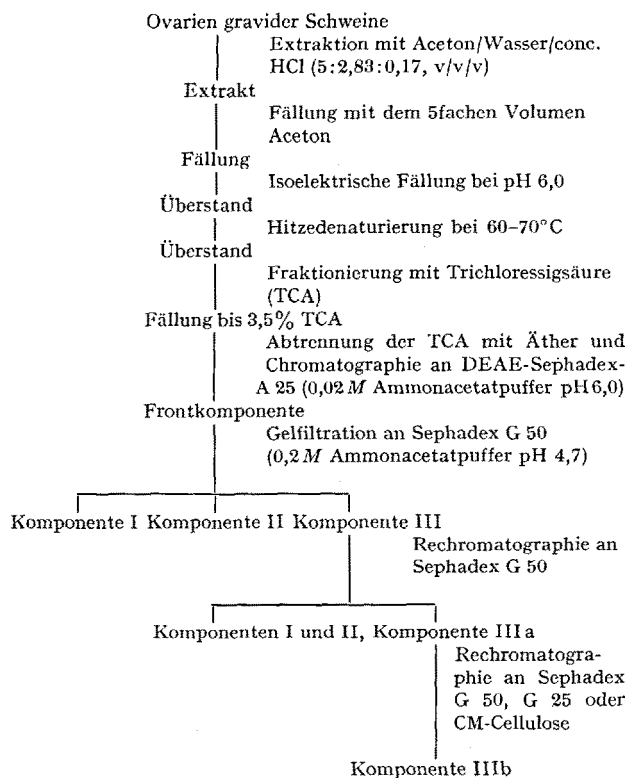
⁴ H. COHEN, *Acta endocrin., Suppl.* **67**, 107 (1962).

⁵ DB-Patent angemeldet am 9. 2. 1962.

⁶ TH. WIELAND, E. FISCHER und L. WIRTH, *Angew. Chem.* **60**, 313 (1948).

⁷ Broschüre der Membranfiltergesellschaft, Göttingen.

⁸ R. J. BARRETT, H. FRIESEN und E. B. ASTWOOD, *J. biol. Chem.* **237**, 432 (1962).



Das hochgereinigte Polypeptid ist am isolierten Ratten-uterus in der Versuchsanordnung nach MAGNUS⁹ in Nanogramm-Mengen (0,5–10 ng/30 ml Badflüssigkeit) wirksam. Die uterusrelaxierende Aktivität¹⁰ am Meer-schweinchenuterus *in situ*¹¹ beträgt 2700–3300 URF-Einheiten/mg¹².

Summary. A highly purified polypeptide with a powerful uterus relaxing activity has been isolated from pregnant sow ovaries. The homogeneity has been checked, using various electrophoretic and chromatographic techniques.

G. GRISS, J. KECK,
R. ENGELHORN und H. TUPPY

Wissenschaftliche Abteilung der Firma Dr. Karl Thomae GmbH, Biberach an der Riss (Deutschland), und Institut für Biochemie der Universität Wien (Österreich), 24. September 1962.

⁹ R. MAGNUS, Pflügers Arch. ges. Physiol. 102, 123 (1904).

¹⁰ L. C. FELTON, E. H. FRIEDEN, H. H. BRYANT, J. Pharmacol. exp. Therap. 107, 160 (1953).

¹¹ R. ENGELHORN und L. SCHMIDT, Arzneimittelforschung 6, 454 (1956).

¹² Eine ausführliche Beschreibung der Versuche wird demnächst veröffentlicht.

Sur un mécanisme possible de la phosphorylation oxydative¹

On peut considérer à l'heure actuelle comme établi que les quinones naturelles telles que les vitamines K et les ubiquinones sont des intermédiaires dans le transport des électrons le long de la chaîne respiratoire². Il est probable, bien que la question soit encore controversée, qu'elles interviennent également dans l'une au moins des phosphorylations qui accompagnent l'oxydation, l'intermédiaire commun à ces deux réactions étant un phosphate d'hydroquinone ou de chromanyle-6³.

Cette hypothèse a été fortement étayée par les expériences-modèles non-enzymatiques de WIELAND⁴ et surtout de TODD⁵ qui ont montré qu'en présence d'un oxydant tel que par exemple le sulfate de cerium ou le brome (jouant le rôle des cytochromes), les phosphates d'hydroquinone agissent comme agents phosphorylants vis-à-vis d'alcools pour former un ester phosphorique, ou vis-à-vis d'esters phosphoriques en donnant des pyrophosphates. TODD et al. ont ainsi synthétisé l'ADP à partir d'AMP, de diméthyl-naphthoquinol phosphate et de brome comme oxydant⁶ (Figure 1').

Mais, pour que ces expériences, d'une portée considérable, constituent un modèle complet de phosphorylation oxydative, il faudrait encore montrer comment se forme le quinol phosphate au cours de la réduction de la quinone en présence de phosphate minéral (Figure 2).

Une telle « phosphorylation réductive » d'une quinone n'a pas encore été réalisée jusqu'à ce jour et l'on en est réduit aux spéculations pour essayer de comprendre le mécanisme par lequel une telle fixation de phosphate minéral peut s'effectuer. Un mécanisme tout simple a été proposé par WIELAND⁴ (Figure 3).

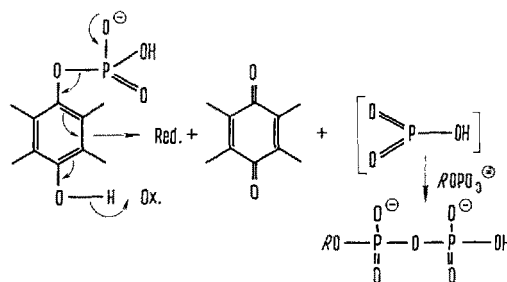


Fig. 1

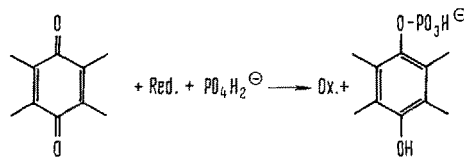


Fig. 2

¹ Communication présentée au Symposium International de Chimie organique des Produits Naturels, Bruxelles (12–15 juin 1962). Résumé dans: Industrie Chimique Belge 27, 558 (1962).

² Ciba Foundation Symposium on Quinones in Electron Transport (Churchill, London 1961).

³ A. F. BRODIE, Fed. Proc. 20, 995 (1961).

⁴ TH. WIELAND et F. PATTERMANN, Chem. Ber. 92, 2917 (1959).

⁵ V. M. CLARK, D. W. HUTCHINSON, G. W. KIRBY et Sir ALEXANDER TODD, J. chem. Soc. 1961, 715.

⁶ V. M. CLARK, D. W. HUTCHINSON et Sir ALEXANDER TODD, J. chem. Soc. 1961, 722.

⁷ Sur cette Figure et les suivantes, « Ox. » et « Red. » représentent les deux formes, oxydée et réduite, d'un couple oxydo-réducteur approprié.