

the value for K_m , the Michaelis-Menten constant, was found to be at $0.07 \times 10^{-3} M$ of the substrate.

The changes in the ATPase activity measured at the various morphological stages of the insect, from egg to

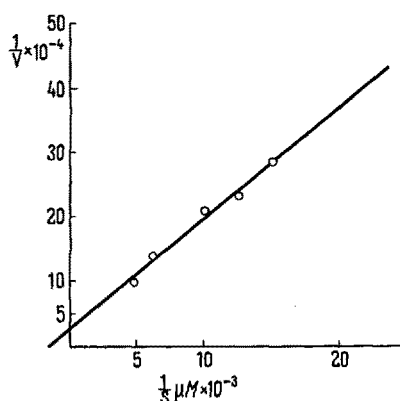


Fig. 2. The conditions of the experiment were the same as described in Figure 1, the only difference was that different concentrations of ATP were used.

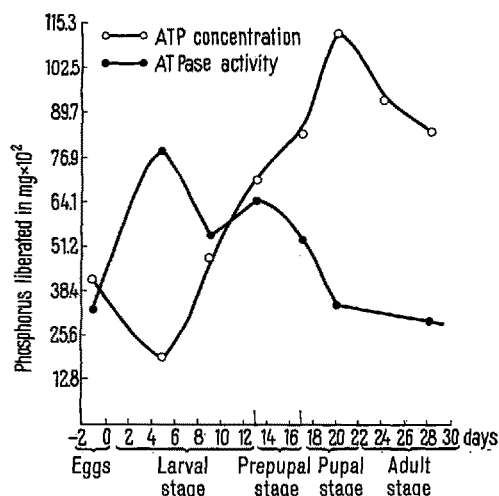


Fig. 3. The conditions of the experiment were the same except that in these experiments homogenates of insects, at various stages of the life cycle from egg to adult stage, were used as enzyme source. The variation of ATP concentration actually represents the 7 min's hydrolyzable phosphorus obtained by subtracting the total inorganic phosphorus (including arginine 'phosphorus') from the phosphorus measured after heating the TCA extract in boiling water for 7 min. It represents all the energy-rich phosphates, di- and tri-phosphates of purine nucleotides, inosine acid phosphorus, etc. Since ATP is the major component, we have loosely used ATP instead of 7 min's hydrolyzable phosphorus in the text.

adult stage, appear to be inversely related to the variation of ATP concentrations at any one stage of its life cycle, as shown in Figure 3. The low ATP concentration in the larva is as should be expected, because during this period synthesis of RNA, proteins and lipids are known to occur most rapidly⁹ and these energy-requiring processes of life derive the necessary energy from ATP hydrolysis and hence ATP concentration cannot be high. This is also the period of most active growth of the insect⁴. During the latter period of the larval stage, the insect is most active, and therefore requires energy for such purposes. This energy comes from ATP hydrolysis. The ATPase activity is therefore expected to be high during this period, which has been found to be indeed the case. During the pupal period the insect does not eat or excrete any waste product of metabolism to any measurable extent, and during this period there is no appreciable change in the weight of the insect. Naturally, therefore, the ATPase activity should be comparatively low, and that is what has been found. In conclusion, it can be said that the hydrolysis of ATP by ATPase occurs most extensively during the period when the insect grows most actively. ATP concentration is low during the most active growth period, as during this period ATP is extensively used up for such synthetic reactions as RNA, proteins, lipids etc. essentially required for the growth of the insect.

Résumé. Un homogénat brut de *Tribolium confusum* Duval peut hydrolyser les molécules d'ATP, d'ADP, d'AMP et d' α -glycérophosphate. L'activité de l'ATPase dépend des ions Mg^{++} et Ca^{++} . La courbe illustrant les variations de l'activité de cette ATPase en fonction du pH, montre deux pH optima, l'un à 7.5 et l'autre à 8.5. L'activité de l'ATPase est élevée durant la période larvaire, alors que la croissance est active et elle est faible durant la période pupale. La concentration de l'ATP est toujours inversement proportionnelle à l'activité de l'ATPase et cela à tous les stades du cycle vital de l'insecte.

ASHOKA DEVI,
F. V. PATIL, and N. K. SARKAR

Faculty of Medicine, Laval University, Quebec (Canada)
and Post-graduate Institute for Medical Research and
Education, Chandigarh (Punjab, India), May 7, 1963.

⁹ A. DEVI, P. LINDSAY, and N. K. SARKAR, Exper. 19, 344 (1963).

Über Peptidsynthesen. C-terminale Teilsequenzen des Eledoisins und eledoisinanaloger Verbindungen^{1,2}

Bei den bisher bekannt gewordenen blutdruckwirksamen Peptiden wie Angiotensin, Bradykinin oder Kallidin bewirkt der Fortfall von mehr als zwei Aminosäuren stets einen Verlust der Aktivität. Anders verhält sich das Eledoisin (zur Isolierung und Strukturaufklärung dieses Wirkstoffes vgl. ^{3,4}, über eine Synthese vgl. ⁵, über bio-

logische Eigenschaften vgl. ⁶⁻⁸). N-terminale Teilsequenzen des Eledoisins sind unwirksam². Dagegen zeigen C-terminale Hexa- und Heptapeptide der originalen Sequenz sowie eledoisinanaloger Verbindungen zum Teil eine erstaunlich hohe biologische Aktivität.

Bei den vorliegenden Teilsequenzen wurde der Asparaginsäurerest in Position 5 gegen Asparagin, Glutamin, Pyroglutaminsäure und Glycin, der Isoleucinrest in Position 8 gegen Valin und Leucin sowie der Methioninrest in Position 11 gegen Alanin ausgetauscht,

C-terminale Teilsequenzen des Eledoisins und eledoisinanaloger Verbindungen^a

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	Schmp.	spez. Drehung	Analyse	Meerschweinchen- Ileum ng/ml	Kaninchen- Blutdruck Eledoisin = 100
	Pyroglu-Pro-Ser-Lys-Asp-Ala-Phe-Ileu-Gly-Leu-Met-NH ₂ Eledoisin															
I	H-Asp-Ala-Phe-Ileu-Gly-Leu-Met-NH ₂ · 1,5 TFAOH											217-220°	-16,3° c = 0,5; DMF	N 11,97 F 9,14 Gef. 11,66 9,50	0,1	100%
II	H-Asp-Ala-Phe-Leu-Gly-Leu-Met-NH ₂ · TFAOH											196-200°	-25,0° c = 0,5; DMF	N 12,75 F 6,50 Gef. 12,44 7,05	1-3	1-5%
III	H-Asp-Ala-Phe-Ileu-Gly-Leu-Ala-NH ₂ · HCl · H ₂ O											212-215°	-34,0° c = 0,5; AcOH	C 52,27 H 7,30 H ₂ O 2,4 Gef. 52,42 7,78 2,8	8	1%
IV	H-Asp-Ala-Phe-Ileu-Gly-Leu-Met-NH ₂ · 2 TFAOH											215-240°	-22,8° c = 0,5; DMF	N 12,70 F 11,50 Gef. 12,45 11,75	0,01	100%
V	H-Asp-Ala-Phe-Leu-Gly-Leu-Met-NH ₂											233-243°	-77,2° c = 0,5; TFAOH	C 55,00 H 7,51 Gef. 55,27 7,59	30-70	5%
VI	H-Asp-Ala-Phe-Ileu-Gly-Leu-Ala-NH ₂ · 1 TFAOH · 1 1/2 H ₂ O											270°	-57,2° c = 1; TFAOH	N 14,93 F 6,75 H ₂ O 3,19 Gef. 14,53 6,82 3,20	25	0,5%
VII	H-Glu-Ala-Phe-Ileu-Gly-Leu-Met-NH ₂											245-258°	-68,5° c = 0,5; TFAOH	C 55,55 H 7,65 Gef. 55,83 7,86	0,03-0,08	80-100%
VIII	H-Glu-Ala-Phe-Leu-Gly-Leu-Met-NH ₂											214-220°	-62,8° c = 0,5; TFAOH	C 55,55 H 7,65 O 16,57 Gef. 55,07 7,45 16,30	1-3	4%
IX	Pyroglu-Ala-Phe-Leu-Gly-Leu-Met-NH ₂ · H ₂ O											279-281°	-54,7° c = 0,5; AcOH	O 2,32 N 14,39 Gef. 2,73 14,28	0,1	2-5%
X	H-Gly-Ala-Phe-Ileu-Gly-Leu-Met-NH ₂ · 1 TFAOH											230-250°	-41,0° c = 0,5; AcOH	N 13,65 F 6,94 Gef. 12,65 6,76	0,04	80-100%
XI	H-Gly-Ala-Phe-Val-Gly-Leu-Met-NH ₂											240-246°	-45,4° c = 1,0; AcOH	C 55,47 H 7,56 Gef. 55,08 7,61	0,1	80-100%
XII	H-Gly-Ala-Phe-Leu-Gly-Leu-Met-NH ₂ · HCl											240-285°	-46,7° c = 0,5; AcOH	N 15,07 Cl 4,77 Gef. 14,39 5,29	0,1	5%
XIII	H-Ala-Phe-Ileu-Gly-Leu-Met-NH ₂ · 0,3 H ₂ O											233-234°	-18,0° c = 0,5; DMF	C 56,83 H 7,92 N 14,98 56,57 7,64 14,30	0,3-1,5 0,79	30%
XIV	H-Ala-Phe-Val-Gly-Leu-Met-NH ₂											225-229°	-52,2° c = 1; TFAOH	N 15,44 Gef. 15,33	3	20%
XV	H-Ala-Phe-Leu-Gly-Leu-Met-NH ₂ · 0,5 H ₂ O											230-232°	-25,1° c = 0,5; DMF	N 14,88 C 56,52 H 8,11 Gef. 14,71 56,24 8,12	300-700	1%
XVI	H-Ala-Phe-Ileu-Gly-Leu-Ala-NH ₂											271-272°	-51,4° c = 0,5; TFAOH	C 59,03 H 8,05 O 16,27 Gef. 58,83 8,18 15,97	250	0,1%
XVII	H-Ileu-Gly-Leu-Met-NH ₂ · HCl												-27,0° c = 1; MeOH	C 48,70 H 8,19 N 14,97 Gef. 49,02 8,52 14,61	2,5 γ	ohne bis 10 γ

^a Alle optisch aktiven Aminosäuren in der L-Form.

Zur Synthese der Teilsequenzen I–IX wurde BOC-Ala-Phe-NHNH₂ mit H-Ileu-Gly-OMe bzw. H-Leu-Gly-OMe oder H-Val-Gly-OMe gekuppelt und nach Umwandlung in die Hydrazide mit H-Leu-Met-NH₂ oder H-Leu-Ala-NH₂ umgesetzt. Nach der Abspaltung der BOC-Gruppe wurde mit BOC-Asp(OtBu)-OH, MeOCbo-Asp(NH₂)-OPhNO₂, MeOCbo-Glu(NH₂)-OPhNO₂ oder MeOCbo-Pyrogly-OH gekuppelt. Die freien Heptapeptidamide resultierten nach Abspaltung der Schutzgruppen mit Trifluoressigsäure.

Zur Synthese von X–XII wurde aus BOC-Gly-OH und H-Ala-Phe-OMe das Tripeptid erhalten, das nach Hydrolyse des Methylesters mit H-Ileu-Gly-Leu-Met-NH₂ bzw. der entsprechenden Val- oder Leu-Verbindung umgesetzt wurde. Die erforderlichen Tetrapeptidamide wurden aus BOC-Val-Gly-NHNH₂ bzw. BOC-Leu-Gly-NHNH₂ und H-Leu-Met-NH₂, das Ileu-Derivat aus H-Leu-Met-NH₂ durch schrittweise Ankondensation von BOC-Gly-OH und BOC-Ileu-OH hergestellt.

Die Verbindungen XIII–XVII stellen Zwischenprodukte dieser Synthesen dar. Da ein Teil der hier beschriebenen Verbindungen zur Synthese von Eledoisinanaloga Verwendung fand, erfolgt eine ausführliche Beschreibung an anderer Stelle. Die analytischen und biologischen Daten der synthetisierten Verbindungen sind in der Tabelle zusammengestellt. Alle Verbindungen mit Ausnahme von IX sind mit Leucinaminopeptidase vollständig hydrolysierbar. Bei den biologischen Daten wird die Kontraktion des Meerschweinchen-Ileums als Grenzdosis in ng/ml angegeben. Der Kaninchenblutdruck bezieht sich auf ein von uns synthetisiertes Eledoisin⁹ (Meerschweinchen-Ileum, Grenzdosis 0,15 bis 0,3 ng/ml; Kaninchenblutdruck, Grenzdosis 0,5 bis 1 ng/kg, relative Aktivität zu Bradykinin etwa 10fach).

Der Vergleich der biologischen Wirksamkeiten erlaubt bereits eine Aussage über die für eine Aktivität entscheidenden Aminosäuren.

Die kürzeste noch deutlich wirksame Sequenz ist das C-terminale Pentapeptid². Wesentlich höher wirksam sind die Hexapeptide, die Heptapeptide liegen zum Teil bereits in der gleichen Größenordnung wie das Eledoisin selbst.

Der Asparaginsäurerest lässt sich ohne wesentliche Beeinflussung gegen andere Aminosäuren austauschen (IV, VII und X). Der Isoleucinrest lässt sich bei nur geringem Abfall der Wirkung durch Valin ersetzen (XI und XIV), einen sehr starken Wirkungsverlust bewirkt der Ersatz durch Leucin (II, V, VIII und XV). Ebenso führt der Austausch des Methionins gegen Alanin zu geringer wirksamen Verbindungen (III, VI und XVI). Die Bedeutung des Methioninrestes wird auch durch die kürzlich von CAMERINO et al.² publizierten Teilsequenzen bestätigt. Erstaunlich ist die sehr hohe, mit dem Eledoisin vergleichbare Wirkung der Glu(NH₂)- und Gly-Heptapeptide (VII, X und XI).

Summary. A series of synthetic Eledoisin and Eledoisin-related subunits are described. The biological activities of the peptides are discussed.

E. SCHRÖDER und K. LÜBKE

Hauptlaboratorium der Schering AG, Berlin-West (Deutschland), 12. September 1963.

- ¹ Über Peptidsynthesen XXIII. 2. Mitt. über Eledoisin und Eledoisinanaloga. 1. Mitt. siehe ⁹.
- ² B. CAMERINO, G. DE CARO, R. A. BOISSONNAS, Ed. SANDRIN und E. STÜRMER, Exper. 19, 339 (1963).
- ³ V. ERSPARMER und A. ANASTASI, Exper. 18, 58 (1962).
- ⁴ A. ANASTASI und V. ERSPARMER, Arch. Biochem. Biophys. 101, 56 (1963).
- ⁵ Ed. SANDRIN und R. A. BOISSONNAS, Exper. 18, 59 (1962).
- ⁶ V. ERSPARMER und G. F. ERSPARMER, Brit. J. Pharmacol. 19, 337 (1962).
- ⁷ V. ERSPARMER und A. GLAESSER, Brit. J. Pharmacol. 20, 516 (1963).
- ⁸ F. SICUTERI, M. FANCIULLACCI, G. FRANCHI und S. MICHELACCI, Exper. 19, 44 (1963).
- ⁹ K. LÜBKE, E. SCHRÖDER, R. SCHMIECHEN und H. GIBIAN, Liebigs Ann., im Druck.

Biochemical Aspects of Phagocytosis in Polymorphonuclear Leucocytes. NADH and NADPH

Oxidation by the Granules of Resting and Phagocytizing Cells

It is known¹⁻⁸ that, during phagocytosis by guinea-pig polymorphonuclear leucocytes, a dramatic increase of oxygen uptake occurs. The phagocytic event is also accompanied by a slight increment in lactic acid production (+10%, +20%) and by an increase of about sevenfold in the conversion of glucose-carbon 1 to CO₂. It is beyond doubt that the most significant change in phagocytizing polymorphonuclear leucocytes is the stimulation of the hexose-monophosphate shunt of glucose oxidation.

Owing to the lack of a relationship between the enormous increase of respiration and the very low CO₂ production from glucose-carbon-6, the oxygen uptake must be related to oxidation of coenzymes reduced by processes different from tricarboxylic acid cycle, i.e. Embden-Meyerhof and HMP-pathways.

A recent hypothesis⁹⁻¹⁰ suggests that a possible sequence of the biochemical events during phagocytosis might be as follows: (a) Stimulation of glycolysis would

lower the intracellular pH; (b) this condition would stimulate a NADPH-linked formation of lactate from pyruvate, and consequently the HMP-pathway of glucose oxidation through enhanced regeneration of NADP⁺; (c) furthermore, NADH produced in glycolysis would now be available for a NADH-oxidase released from disrupted granules. According to EVANS and KARNOWSKY⁹⁻¹⁰, the

- ¹ C. W. BALDRIDGE and R. W. GERALD, Amer. J. Physiol. 103, 235 (1933).
- ² H. STÄHELIN, E. SUTER, and M. L. KARNOWSKY, J. exp. Med. 104, 121 (1956).
- ³ H. STÄHELIN, M. L. KARNOWSKY, A. E. FARNHAM, and E. SUTER, J. exp. Med. 105, 265 (1957).
- ⁴ A. J. SBARRA and M. L. KARNOWSKY, J. biol. Chem. 234, 1355 (1959).
- ⁵ Z. A. COHN and S. I. MORSE, J. exp. Med. 111, 667 (1960).
- ⁶ B. S. STRAUSS and C. A. STETSON JR., J. exp. Med. 112, 653 (1960).
- ⁷ G. Y. N. IYER, M. F. ISLAM, and J. H. QUASTEL, Nature 192, 535 (1961).
- ⁸ W. H. EVANS and M. L. KARNOWSKY, Biochemistry 1, 159 (1962).
- ⁹ W. H. EVANS and M. L. KARNOWSKY, J. biol. Chem. 236, PC30 (1961).
- ¹⁰ M. L. KARNOWSKY, Physiol. Rev. 42, 143 (1962).