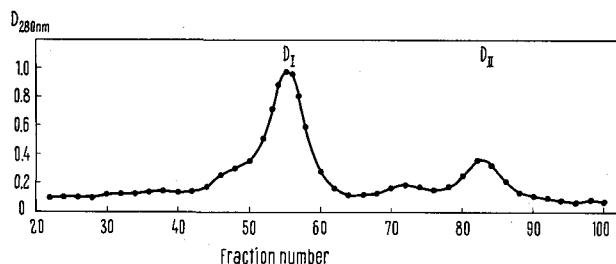


tures known to be displayed by the gastrin peptides of other species¹. Detailed studies with synthetic material⁴ will be reported.

From the first batch of antrums, a total of approximately 1 mg gastrin was obtained (DI+DII); in the second preparation, the yield was smaller, being approximately 800 µg total gastrin. As is evident from the Figure,



Separation by gradient elution chromatography of the dog gastrins (DI and DII) on aminoethylcellulose in ammonium bicarbonate buffer.

the proportion of the unsulphated (DI) to the sulphated (DII) form is about 2:1. This is similar to the proportion found in man, but different from that found in the hog, sheep and cow, in which the sulphated form of the hormone predominates.

Zusammenfassung. Die Isolierung von zwei Gastrinen aus der Magenschleimhaut von Hunden wird beschrieben.

R. A. GREGORY, HILDA J. TRACY,
M. I. GROSSMAN, D. DE VALOIS
and R. LICHTER

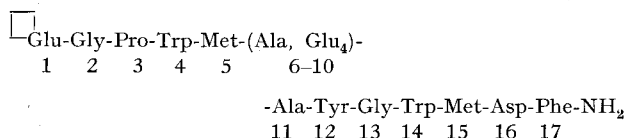
*The Physiological Laboratory,
University of Liverpool (England), and
Veterans Administration Center,
Los Angeles (Illinois 90073, USA), 3 January 1969.*

⁴ K. L. AGARWAL, G. W. KENNER and R. C. SHEPPARD, *Experientia* 25, 346 (1969).

Structure and Synthesis of Canine Gastrin

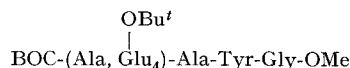
Amino-acid analysis of canine gastrins I and II¹ showed that both DI and DII had the composition (Ala₂, Asp, Glu₅, Gly₂, Met₂, Phe, Pro, Trp₂, Tyr) and that the tyrosine in canine gastrin II was O-sulphated, as in human, porcine, bovine, and ovine gastrins II². Amongst those gastrins, structural variations are confined to positions 5 and 10 in the heptadecapeptide chain, and the foregoing composition could be tentatively accommodated in an analogous [Met⁵, Ala¹⁰]-structure, which would make canine gastrin a hybrid of the porcine and bovine-ovine hormones. Papain degradation of canine gastrin I³

afforded $\square$ -Glu-Gly-Pro-Trp-Met, confirming one of the tentative assignments, but the central portion of the molecule was cleaved so extensively that no clear results emerged and doubt was cast on the analogy with the bovine-ovine hormones. We therefore adopted the broader working hypothesis that canine gastrin I has one of the 5 structures summarized below; each is derived from porcine gastrin I by a single substitution of alanine for glutamic acid.



In order to conserve the small supply of canine gastrin, our next step was to synthesize all 5 heptadecapeptide amides for comparison of their enzymic 'fingerprints' with those of the natural hormone. The compounds were made by a general method originally devised for synthesis of porcine gastrin I⁴ and also employed with minor improvements for synthesis of human gastrin I⁵; it has been superseded for preparation of pure gastrins in quantity, but it was particularly convenient for the present purpose of permuting the central sequence. The 5 octapeptide

derivatives, comprising the sequence 6-13, with the general structure shown below were prepared by active



ester condensations and then coupled, after saponification of the methyl ester, with the C-terminal tetrapeptide. Finally, after removal of protective groups by trifluoroacetic acid, the N-terminal pentapeptide was added by

means of $\square$ -Glu-Gly-Pro-Trp-Met-N₃ (1-5 azide). The 5 heptadecapeptide amides were purified by chromatography on G-25 Sephadex and appeared to be homogeneous (thin-layer chromatography, electrophoresis). Samples (0.1 mg) were digested with papain at pH 7.0, subtilisin at pH 8.0, and thermolysin at pH 8.0, and the concentrated digests were examined by electrophoresis on Whatman No. 1 paper (pH 6.5, 6 Kv) alongside digests of canine gastrin I. Subtilisin differentiated the 5 synthetic compounds, while the papain digests of the [Ala⁸] and [Ala⁹]-isomers and the thermolysin digests of the [Ala⁷] and [Ala⁸]-isomers were not clearly distinguishable. The total conclusion was that the [Ala⁸]-isomer was most similar in behaviour to canine gastrin I, but the identification was marred by the presence of an extra Ehrlich-positive spot on each of the patterns from syn-

¹ R. A. GREGORY, H. J. TRACY, M. I. GROSSMAN, D. DE VALOIS and R. LICHTER, *Experientia* 25, 345 (1969).

² G. W. KENNER and R. C. SHEPPARD, *Proc. R. Soc. B* 170, 89 (1968).

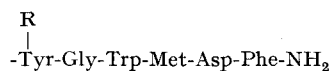
³ P. H. BENTLEY, Ph. D. Thesis, Liverpool (1967).

⁴ J. C. ANDERSON, G. W. KENNER, J. K. MACLEOD and R. C. SHEPPARD, *Tetrahedron Suppl.* 8, Part I, 39 (1966).

⁵ J. BEACHAM, P. H. BENTLEY, G. W. KENNER, J. K. MACLEOD, J. J. MENDIVE and R. C. SHEPPARD, *J. chem. Soc. (C)* 2520 (1967).

parison of all the bands. All 7 fragments from both the natural and synthetic gastrins were analysed for amino-acid composition and structures were assigned either by end-group determination (dansylation, hydrazinolysis) (Sub-2,3,4) or by comparison with synthetic materials (Sub-1,5,6,7). In the event, this degradation of the natural gastrin provided complete independent evidence for the correctness of the [Met⁶, Ala⁸]-sequence (see Table II). No differences were detected between the syn-

□ Glu-Gly-Pro-Trp-Met-Glu₂-Ala-Glu₂-Ala-



(I)

thetic heptadecapeptide amide and natural canine gastrin I or de-sulphated canine gastrin II (hydrolysis with N HCl, 4 h at 20°C). The structures of both canine gastrins are therefore fully defined as (I, R=H and SO₃H respectively).

Zusammenfassung. Zwei Gastrine aus der Magenschleimhaut des Hundes wurden als Heptadecapeptide erkannt, und es wird die Synthese des einen beschrieben.

K. L. AGARWAL, G. W. KENNER
and R. C. SHEPPARD

Robert Robinson Laboratories,
University of Liverpool (England), 3 January 1969.

Chemische Kopplung von Hexokinase aus Hefe an Sephadex

Versuche zur chemischen Bindung von Enzymen an unlösliche Polymere haben in den letzten Jahren sehr an Bedeutung gewonnen¹⁻⁴. Neben einem theoretischen besteht auch ein praktisches Interesse, da aufgrund der so erreichten Unlöslichkeit die Enzyme nach beendeter enzymatischer Umsetzung in einfacher Weise von der Reaktionslösung abgetrennt und wiederholte Male zu neuen Umsetzungen eingesetzt werden können. Bei fester Anordnung in «biochemischen Reaktoren» gestatten sie den Umsatz grosser Stoffmengen⁵. Über die erfolgreiche Fixierung von Phosphotransferasen und Dehydrogenase wurde erst vor kurzem berichtet^{3,6,7}. Im Rahmen unserer Studien über Hefehexokinase (ATP: D-Hexose-6-phosphotransferase, E.C. 2.7.1.1)⁸ haben wir die Kopplung dieses Enzyms an Sephadex untersucht. Damit sollte ein Beitrag zu der Frage geliefert werden, ob durch die Bindung des Enzyms an einen festen Träger gegenüber dem löslichen Enzym veränderte Eigenschaften auftreten, die insbesondere für die In-vivo-Regulation des Enzyms neue Gesichtspunkte liefern könnten. Angeregt wurden die Versuche durch einen Bericht über die ATPase des sarcoplasmatischen Reticulums, bei deren Solubilisierung mit Digitonin die Oubainhemmbarkeit verlorengeht, nach Kopplung an Cellulose aber wieder zurückkehrt⁹.

Die Kopplungsexperimente wurden mit der von PORATH an Glycylglycin und Chymotrypsin getesteten Bromcyanmethode¹⁰ durchgeführt. 200 mg vorgequollenes Sephadex G 200 superfine (Pharmacia, Uppsala, Schweden) wurden 8 Min. bei Zimmertemperatur mit 4 ml 0,5 M Bromcyan (0,5 M NaCN unter Eiskühlung tropfenweise mit 25 µl Brom/ml versetzt) bei pH 11,5 aktiviert; der pH-Wert wurde durch Zusatz von 2 M NaOH konstant gehalten. Anschliessend wurde in einer Kühlzentrifuge (0°C) dreimal mit eiskaltem 0,1 M NaHCO₃ gewaschen. Zur Kopplung wurde das so aktivierte Produkt mit 188 mg Hefehexokinase (Ferak, Berlin) in 0,1 M NaHCO₃ 24 h bei 4°C gerührt (Gesamtvolumen 10 ml) und darauf bei 0°C je zweimal mit 10 ml 0,1 M NaHCO₃ gewaschen. Aktivitätsbestimmung: Das Kopplungsprodukt wurde in 1,5 ml 3 mM ATP, 3 mM Glucose, 10 mM MgCl₂ und 0,1 M Tris-HCl pH 8,5 bei 25°C unter Schütteln inkubiert. Nach 5 min wurde die Reaktion mit 1 ml 0,1 M EDTA gestoppt und das gebildete Glucose-6-phosphat nach Abzentrifugieren im Überstand mit NADP und Glucose-6-phosphat-dehydrogenase (E.C.

1.1.1.49) im optischen Test bestimmt. Die Proteinbestimmungen erfolgten mit der Biuret-Methode. Bezogen auf die eingesetzte Proteinmenge beträgt das Ausmass an gebundenem Eiweiss 57%. Die spezifische Aktivität des gebundenen Enzyms liegt bei 2% des Ausgangswertes. Da auch im Überstand nach Abbruch der Kopplungsreaktion eine etwa gleich niedrige spezifische Aktivität gefunden wurde, scheint die Inaktivierung kein für die Kopplung an den Träger charakteristischer Vorgang zu sein. Die gebundene Aktivität lässt sich weder mit 0,001 M Salzsäure noch mit 0,5 M NaCl auswaschen, woraus geschlossen werden kann, dass eine kovalente Bindung an den Träger vorliegt.

Mit der oben beschriebenen Methodik haben wir die kinetischen Eigenschaften des gebundenen Enzyms untersucht. Die bei pH 8,5 (0,1 M Tris-Puffer) in Gegenwart von 10 mM MgCl₂ bestimmten K_m-Werte für Glucose (0,20 mM) und ATP (0,17 mM) unterscheiden sich nur unwesentlich von denen des löslichen Enzyms⁸, sie sind ebenso wie beim löslichen Enzym unabhängig von der Konzentration des anderen Substrates. Auch in der pH-Aktivitätskurve konnte keine signifikante Änderung gegenüber dem löslichen Enzym festgestellt werden. Ebenso zeigt die Anwesenheit von 3 mM Glucose-6-phosphat keinen hemmenden Einfluss (ATP und Glucose je 0,3 mM) auf die Reaktionsgeschwindigkeit. (In diesen Experimenten wurde das entstehende ADP enzymatisch gemessen.)

¹ I. H. SILMAN und E. KATCHALSKI, Ann. Rev. Biochem. 35, 873 (1966).

² E. M. CROOK, Biochem. J. 107, 1 (1968).

³ G. MANECKE, Biochem. J. 107, 2 (1968).

⁴ R. WHITTAM, B. A. EDWARDS und K. P. WHEELER, Biochem. J. 107, 3 (1968).

⁵ M. D. LILLY, G. KAY, A. K. SHARP und R. H. J. WILSON, Biochem. J. 107, 5 (1968).

⁶ W. E. HORNBY, M. D. LILLY und E. M. CROOK, Biochem. J. 107, 669 (1968).

⁷ R. J. H. WILSON, G. KAY und M. D. LILLY, Biochem. J. 108, 845 (1968).

⁸ R. BOHNENSACK und E. HOFMANN, in Vorbereitung.

⁹ H. D. BROWN, S. K. CHATOPADHYAY und A. PATEL, Biochim. biophys. Res. Commun. 25, 304 (1966).

¹⁰ R. AXEN, J. PORATH und S. ERNBACK, Nature 214, 1302 (1967).