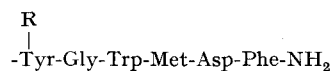
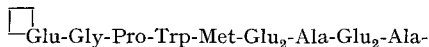


parison of all the bands. All 7 fragments from both the natural and synthetic gastrins were analysed for amino-acid composition and structures were assigned either by end-group determination (dansylation, hydrazinolysis) (Sub-2,3,4) or by comparison with synthetic materials (Sub-1,5,6,7). In the event, 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-



(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. ERNBACH, Nature 214, 1302 (1967).

Der Dextranträger führt also zu keinen messbaren Veränderungen der untersuchten kinetischen Eigenschaften, was mit den bisherigen Vorstellungen über die Beeinflussung des aktiven Zentrums durch das Mikromilieu des Trägers übereinstimmt⁶. Danach sind aufgrund von Diffusionsbehinderung insbesondere für makromolekulare Substrate höhere K_m -Werte und in solchen Fällen Änderungen in der pH-Aktivitätskurve sowie den K_m -Werten zu erwarten, wenn sowohl die Substrate als auch der Träger ionisierte Gruppen enthalten. Für Sephadex ist der Gehalt an dissoziierenden Gruppen äusserst gering. Offenbar werden bei der Aktivierung des Trägers durch Bromcyan auch nur wenige ionisierende Gruppen eingeführt, die zu keinen Änderungen der kinetischen Parameter führen.

Summary. Yeast hexokinase was coupled to Sephadex by means of cyanogen bromide. The activity of the fixed enzyme was 2% of that before coupling. The activity of the noncoupled part of the enzyme was also decreased to the same degree. This decrease cannot be caused by the coupling reaction itself. The Michaelis-constants and the pH-activity curve of the coupled enzyme do not differ significantly from that of the free enzyme.

R. BOHNENSACK, W. AUGUSTIN
und E. HOFMANN

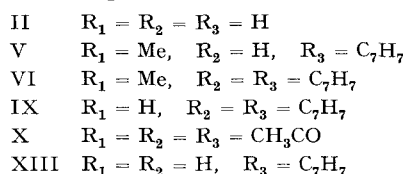
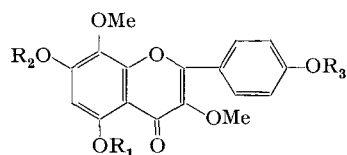
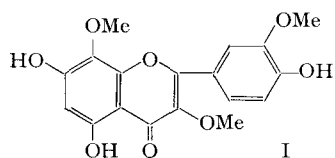
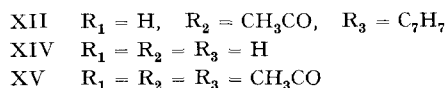
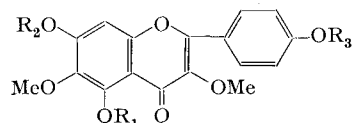
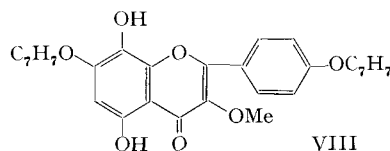
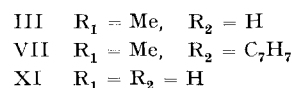
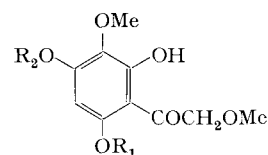
Physiologisch-chemisches Institut der Medizinischen Akademie Magdeburg und Physiologisch-chemisches Institut der Karl-Marx-Universität, 701 Leipzig (DDR), 28. Oktober 1968.

The Syntheses of 3,8-Dimethoxy-5,7,4'-trihydroxyflavone and Related Compounds

Recently, 2 new flavonoid pigments were isolated from *Cyanoestegia angustifolia* Turcz. (Verbenaceae) by E. L. GHISALBERTI et al.¹ These authors proposed the structures of these pigments as 5,7,4'-trihydroxy-3,8,3'-trimethoxyflavone (I) and 3,8-dimethoxy-5,7,4'-trihydroxyflavone (II) on the basis of spectroscopic and degradative studies. In previous papers², we reported the synthesis of I and its identity with a natural pigment. Now we describe the total synthesis of II by 2 different methods.

According to Allan-Robinson's flavone synthesis, the condensation of 2,4-dihydroxy-3,6, ω -trimethoxyacetophenone (III)³ with 4-benzyloxybenzoic anhydride (IV) gave 4'-benzyloxy-7-hydroxy-3,5,8-trimethoxyflavone (V, m.p. 240–242°, Found: C, 68.85; H, 4.97. $C_{25}H_{22}O_7$ requires: C, 69.11; H, 5.10%), which was converted into its benzyl ether (VI, m.p. 149–150°, Found: C, 73.12; H, 5.39. $C_{32}H_{28}O_7$ requires: C, 73.27; H, 5.38%). VI was also obtained from 4-benzyloxy-2-hydroxy-3,6, ω -trimethoxyacetophenone (VII)³ and IV. The oxidation of VI with nitric acid, followed by the subsequent reduction with sodium sulfite yielded 7,4'-dibenzyloxy-5,8-dihydroxy-3-methoxyflavone (VIII, m.p. 201–203°, Found: C, 72.39; H, 4.68. $C_{30}H_{24}O_7$ requires: C, 72.57; H, 4.87%). Partial methylation of VIII with diazomethane gave

7,4'-dibenzyloxy-3,8-dimethoxy-5-hydroxyflavone (IX, m.p. 161–162°, Found: C, 73.19; H, 5.11. $C_{31}H_{26}O_7$ requires: C, 72.93; H, 5.13%). Debenzylation of IX with hydrogen yielded the expected flavone II (m.p. 247–249° and 257–258°, UV λ_{max}^{EtOH} nm (log ϵ): 274 (4.36), 310_i (4.16)⁴, 326 (4.19), 360 (4.15). Found: C, 61.82; H, 4.39. $C_{17}H_{14}O_7$ requires: C, 61.82; H, 4.27%) (natural one⁶,



¹ E. L. GHISALBERTI, P. R. JEFFERIES and C. I. STACEY, Aust. J. Chem. 20, 1049 (1967).

² K. FUKUI, M. NAKAYAMA and T. HORIE, Experientia 24, 417 (1968); K. FUKUI, T. MATSUMOTO, M. NAKAYAMA and T. HORIE, Bull. chem. Soc. Japan 41, 2805 (1968).

³ V. D. N. SASTRI and T. R. SESHADRI, Proc. Indian Acad. Sci. 24 A, 238 (1946).

⁴ i , inflection point.

⁵ The natural pigment, kindly supplied by Prof. P. R. JEFFERIES, the University of Western Australia, was measured in this laboratory.