

157. Untersuchungen über Getreideschleimstoffe

VI. Abbau eines Glycoproteins mit proteolytischen Enzymen¹⁾

von W. Kündig und N. Neukom

(9. V. 63)

Frühere Versuche an den wasserlöslichen Schleimstoffen des Weizenmehls haben gezeigt, dass sich diese durch Chromatographie an Diäthylaminoäthyl-Cellulose (DEAE-Cellulose) in ein reines Arabinoxylan (Hauptfraktion) und 4 Glycoproteinfraktionen zerlegen liessen²⁾. Die Schleimstoffe des Weizenmehls bilden bei Zugabe von Spuren eines Oxydationsmittels bekanntlich ein Gel³⁾. Es konnte gezeigt werden, dass an dieser Gelierung nur die Glycoproteinfraktion-2 beteiligt ist. Über die Reaktionen, die sich bei dieser oxydativen Gelierung abspielen, konnten noch keine genauen Angaben gemacht werden, es erscheint lediglich wahrscheinlich, dass daran Polyphenole beteiligt sind⁴⁾. Im folgenden sollen einige weitere Versuche beschrieben werden, die zur Ermittlung der Struktur des Glycoproteins-2 unternommen worden sind.

Zunächst wurde die Einwirkung von reinen proteolytischen Enzymen auf dieses Glycoprotein untersucht. Nach Einwirkung von kristallinem Chymotrypsin und Abtrennung der nichtabgebauten Polysaccharide (durch Alkoholfällung) konnten zwei freie Aminosäuren, Tryptophan und Tyrosin, papierchromatographisch nachgewiesen werden⁵⁾. Das Chymotrypsinhydrolysat wurde an Dowex 50 (H) chromatographiert. Mit 0,01M NaH_2PO_4 wurde eine kohlehydrat- und ninhydrinpositive Substanz eluiert, in welcher sich nach der Hydrolyse nur Galaktose und Arabinose (keine Xylose) als Kohlehydratkomponenten nachweisen liessen. Tyrosin wurde mit 0,2M und Tryptophan mit 0,3M Phosphatpuffer eluiert. Mit der letzteren Pufferkonzentration liess sich zusätzlich eine noch nicht identifizierte ninhydrinpositive, wohl auch nicht weiter spaltbare Substanz eluieren. Neben diesen 3 monomeren Abbauprodukten wurde eine Reihe von Oligopeptiden festgestellt, die nicht näher untersucht wurden. Da Chymotrypsin nur Peptidbindungen spaltet, an welchen aromatische Aminosäuren beteiligt sind⁶⁾, sind wahrscheinlich das Tyrosin und das Tryptophan in den Peptidketten N-endständig angeordnet. Die Bestimmung der N-endständigen Aminosäuren im Glycoprotein-2 nach SANGER⁷⁾ bestätigte diese Annahme. – Neben Tyrosin und Tryptophan konnte nach dieser Methode dünnschichtchromatographisch⁸⁾ auch noch Alanin identifiziert werden.

Die Hydrolyse des Glycoproteins-2 mit Trypsin ergab ähnliche Resultate wie mit Chymotrypsin, mit der Ausnahme, dass hier keine freien Aminosäuren nachgewiesen

¹⁾ V. Mitt.: H. NEUKOM & W. KÜNDIG, *Helv.* **45**, 1458 (1962).

²⁾ W. KÜNDIG, H. NEUKOM & H. DEUEL, *Helv.* **44**, 823 (1961).

³⁾ H. C. BAKER, H. K. PARKER & M. D. MIZE, *Cereal Chemistry* **20**, 267 (1943).

⁴⁾ W. KÜNDIG, H. NEUKOM & H. DEUEL, *Helv.* **44**, 969 (1961).

⁵⁾ Vgl. I. SMITH, «Chromatographic and Electrophoretic Techniques», Vol. I, «Chromatography», W. Heinemann, Medical Books Ltd., London, 1960.

⁶⁾ E. C. THOMPSON, *Adv. Org. Chemistry* **7**, 182 (1960).

⁷⁾ F. SANGER, *Biochem. J.* **39**, 507 (1945).

werden konnten: es wurde auch hier eine alkohollösliche, ninhydrinpositive Komponente abgespalten, welche nach der Hydrolyse Galaktose und Arabinose ergab.

Schliesslich wurde das Glycoprotein-2 noch mit PRONASE-P, einer sehr aggressiven Protease aus *Streptomyces griseus*⁸⁾, abgebaut. Im Ätherextrakt des Hydrolysates fand sich interessanterweise 3-Hydroxyanthranylsäure. Diese Substanz konnte aber auch in den PRONASE-Hydrolysaten von anderen Proteinen (Serumalbumin und Weizenkleber) nachgewiesen werden und stammt daher offenbar aus dem Enzym und nicht aus dem Substrat. Wird PRONASE allein inkubiert, so entsteht merkwürdigerweise keine 3-Hydroxyanthranylsäure, diese wird offenbar nur während des Proteinabbaus gebildet. Im Butanolextrakt des PRONASE-Abbaus liessen sich alle im Glycoprotein-2 vorkommenden Aminosäuren²⁾ durch zweidimensionale Dünnschichtchromatographie¹⁰⁾ nachweisen. Die Aufspaltung zu den Aminosäuren ist aber nicht vollständig, wie die nachträgliche Hydrolyse mit Säure zeigte¹¹⁾. Auch durch den PRONASE-Abbau wird wieder ein ähnliches alkohollösliches Glycopeptid abgespalten.

Die alkoholunlösliche Komponente – Polysaccharide – des PRONASE-Abbaus wurde an einer DEAE-Cellulose-Kolonnen (Boratform) chromatographiert. Alle Polysaccharide wurden bereits mit Wasser eluiert, im Gegensatz zum intakten Glycoprotein-2, welches sich erst mit 0,01M Na-Borat eluieren lässt. Im Hydrolysat des mit Wasser eluierten Polysaccharides liessen sich nur Xylose und Arabinose nachweisen.

Der Polysaccharidanteil des Glycoproteins-2 besteht bekanntlich aus Xylose, Arabinose und Galaktose²⁾. Da durch die Einwirkung der reinen proteolytischen Enzyme immer ein Galaktose enthaltendes Glycopeptid von der Arabinoxylankette abgespalten wird, muss angenommen werden, dass im Glycoprotein-2 zwei über eine Peptidbrücke verbundene Kohlehydratanteile vorhanden sind.

Das UV.-Spektrum des Arabinoxylans, das durch PRONASE-Abbau von Glycoprotein-2 erhalten wird, zeigt immer noch das früher beschriebene Maximum bei 320 m μ mit der Rotverschiebung in NaOH oder Na-Borat, während das Proteinmaximum bei 275 m μ erwartungsgemäss fast völlig verschwunden ist. Die Gruppierung, die für die Absorption bei 320 m μ verantwortlich ist (wahrscheinlich eine aromatische Dihydroxyverbindung), wird also durch proteolytische Enzyme nicht abgespalten. Es muss daher angenommen werden, dass diese Verbindung direkt an die Arabinoxylankette des Glycoproteins-2 gebunden ist. Interessanterweise tritt nach Zugabe von H₂O₂ zum Arabinoxylan (aus Glycoprotein-2 durch PRONASE-Abbau) keine Veränderung des Maximums bei 320 m μ ein. Wird die Lösung des Glycoproteins-2 dagegen vor dem Abbau mit PRONASE mit H₂O₂ geliert und dann mit PRONASE behandelt, so lässt sich im alkoholfällbaren Arabinoxylan das erwähnte Maximum nicht mehr nachweisen. Offenbar tritt die Oxydation primär an einer anderen Stelle ein, wobei dann erst nachträglich eine Kupplung mit der bei 320 m μ absorbierenden Gruppierung eintritt. – Dass die Polypeptidanteile des Glycoproteins-2 für die oxydative Gelierung wesentlich sind und am Aufbau der Gelstruktur beteiligt sind, konnte durch die Verflüssigung des Gels durch PRONASE gezeigt werden. Einwirkung von PRONASE vor der Zugabe von Oxydationsmitteln verhindert entsprechend eine Gelierung.

⁸⁾ M. BRENNER, A. NIEDERWIESER & G. PATAKI, *Experientia* 17, 145 (1961).

⁹⁾ M. NOMOTO, Y. NARAHISHI & M. MURAKAMI, *J. Biochemistry (Japan)* 48, 583, 906 (1960).

¹⁰⁾ M. BRENNER & A. NIEDERWIESER, *Experientia* 16, 378 (1960).

¹¹⁾ Versuche von Herrn L. PROVIDOLI.

Experimentelles. – Die Isolierung des Glycoproteins-2 aus den Schleimstoffen des Weizenmehls durch präparative Ionenaustauschchromatographie an DEAE-Cellulose wurde bereits beschrieben¹⁾.

Abbau des Glycoproteins-2 mit Chymotrypsin und Trypsin: Eine Lösung von 200 mg Glycoprotein-2 in 20 ml Wasser wurde mit 20 ml Borat-HCl-Puffer pH 7,8 [47,1% (v/v) 0,1N HCl + 52,9% (v/v) 0,2M Na-Borat] und darauf mit 10 mg Chymotrypsin oder Trypsin (α -Chymotrypsin und Trypsin krist., für analytische Zwecke, C. F. BÖHRINGER & SÖHNE, Mannheim, Deutschland) versetzt. Zur Stabilisierung des Trypsins wurde 1M CaCl₂-Lösung bis zu einer Konzentration von 0,01M zugegeben²⁾. Dann wurde die Lösung 24 Std. bei 40° inkubiert. Zur Kontrolle der Autolyse der Enzyme wurde die gleiche Reaktionslösung ohne Glycoprotein mit je 20 mg Chymotrypsin oder Trypsin inkubiert. Nach der Inkubation wurde mit dem 3-fachen Volumen Alkohol versetzt und über Nacht im Kühlschrank stehengelassen, um die nicht abgebauten Polysaccharide und das Enzym auszufällen. Nach Filtration durch eine G-4-Glasfilternutsche wurde das Filtrat im Vakuum eingedampft und der Rückstand in Wasser oder 10-proz. Isopropanol aufgenommen.

Die papierchromatographische Untersuchung der Abbauprodukte des Chymotrypsin- und Trypsinhydrolysates des Glycoproteins-2 erfolgte auf WHATMAN Nr. 1 Papier. Laufmittel: a) *n*-Butanol-Eisessig-Wasser = 12:3:5; b) *n*-Butanol-Methyläthylketon-Ammoniak-Wasser = 5:3:1:1. Die Chromatogramme wurden mit 0,2-proz. Ninhydrin in Aceton, diazotierter Sulfanilsäure oder EHRlich's Reagens entwickelt. Im Chymotrypsinhydrolysat konnte neben Tyrosin und Tryptophan ein weiterer, nicht identifizierter Fleck mit einem Rf-Wert von 0,82 (Laufmittel a) festgestellt werden, der sich nur mit Ninhydrin anfärbte.

Zur säulenchromatographischen Untersuchung wurde die wässrige Lösung der Abbauprodukte des Chymotrypsin- und Trypsinabbaus des Glycoproteins-2 auf eine Dowex-50-(H)-Kolonnen gegeben. Die Elution erfolgte stufenweise, mit Wasser, 0,01M NaH₂PO₄, 0,1M Na-Phosphat-Puffer pH 6, 0,2M Na-Phosphat-Puffer pH 7 und 0,3M Na₂HPO₄. In den Eluatien wurde die Konzentration der Aminosäuren und Peptide mit dem modifizierten Ninhydrintest nach ROSEN³⁾, die Konzentration der Kohlehydrate mit dem modifizierten Anthrontest nach BAILY⁴⁾ bestimmt.

Abbau des Glycoproteins-2 mit PRONASE-P. 200 mg des Glycoproteins-2 wurden in 20 ml Wasser gelöst und mit 20 ml 0,1M Na-Phosphat-Puffer pH 7,3 versetzt. Nach Zugabe von 10 mg PRONASE P, B-grade (CALIFORNIA CORP. BIOCHEM. RES., Los Angeles, USA) wurde 24 Std. bei 40° inkubiert. Das ausgeflockte Enzym wurde abfiltriert, das pH des Filtrates auf 3 eingestellt und die Lösung 6 Std. im KUTSCHER-STEUDEL-Apparat mit peroxidfreiem Äther extrahiert. Im Ätherextrakt konnte papierchromatographisch 3-Hydroxyanthranylsäure nachgewiesen werden. Nach der Ätherextraktion wurde das pH der Lösung auf 6 eingestellt, die Lösung zweimal mit *n*-Butanol extrahiert und darauf mit dem 3-fachen Volumen Alkohol versetzt. Der *n*-Butanol-extrakt wurde im Vakuum eingedampft und der Rückstand zur Bestimmung der Aminosäuren mittels Dünnschichtchromatographie¹⁰⁾ in 10-proz. Isopropanol aufgenommen.

Die alkoholfällbaren Polysaccharide wurden durch Filtration durch eine G-4-Glasfilternutsche von den alkohollöslichen Substanzen abgetrennt und auf der Nutsche wieder in Wasser gelöst. Diese Lösung wurde 24 Std. gegen destilliertes Wasser dialysiert, im Vakuum etwas konzentriert und darauf auf eine DEAE-Cellulose-Kolonnen in Borat-Form gegeben²⁾.

UV.-Absorptionsspektren: In 0,5-proz. wässrigen Lösungen in 1 cm Quarzküvetten mit einem BECKMAN DU Spektrophotometer aufgenommen.

Bestimmung der N-Endständigen Aminosäuren: 10 ml einer 1-proz. Lösung des Glycoproteins-2 wurden mit 10 ml 4-proz. NaHCO₃ versetzt. Nach Zugabe von 0,5 ml Fluordinitrobenzol gelöst in 5 ml Alkohol wurde die Reaktionslösung 2 Std. im Dunkeln geschüttelt. Nach dieser Umsetzung wurde mit dem 4-fachen Volumen Alkohol versetzt und über Nacht im Kühlschrank stehengelassen. Das ausgeflockte Glycoprotein wurde darauf abzentrifugiert. Durch Hydrolyse (18 Std. bei 85°) mit 2N HCl konnte der grösste Teil der Polysaccharide abgebaut werden, wobei die DNP-Derivate der Peptidanteile als unlösliches Sediment zurückblieben. Dieses wurde von der überstehenden Lösung abgetrennt und in einem zugeschmolzenen Glasrohr mit 6N HCl 10 Std. bei 135° hydrolysiert. Das Hydrolysat wurde darauf 3-mal mit peroxidfreiem Äther extrahiert,

¹²⁾ P. DESNUELLE & C. GABELOTEAU, Arch. Biochemistry Biophysics 69, 475 (1957).

¹³⁾ H. ROSEN, Arch. Biochemistry Biophysics 67, 10 (1957).

¹⁴⁾ R. W. BAILY, Biochem. J. 68, 669 (1958).

nachher neutralisiert und 3-mal mit *n*-Butanol extrahiert. Der Ätherextrakt wurde darauf im Vakuum zur Trockene eingedampft und der Rückstand zur Entfernung des Dinitrophenols 2-mal sublimiert. Die DNP-Aminosäuren wurden mittels Dünnschichtchromatographie nach BRENNER *et al.*⁶⁾ bestimmt. Die als Testsubstanzen verwendeten DNP-Aminosäuren wurden nach SANGER⁷⁾ und der modifizierten Methode nach ISHERWOOD & CRUICKSHANK¹⁵⁾ dargestellt.

Der Firma GEBRÜDER BÜHLER, Uzwil, danken wir für die grosszügige finanzielle Unterstützung dieser Arbeit.

SUMMARY

The principal glycoprotein fraction of the water soluble wheat flour pentosans has been degraded by pure chymotrypsin, trypsin and PRONASE. In all cases an alcohol soluble glycopeptide containing galactose and arabinose (but no xylose) was obtained in addition to an alcohol insoluble arabinoxylan fraction. Chymotrypsin also produced free tyrosin and tryptophan which are thought to be N-terminal amino acid residues. In the hydrolysate obtained with PRONASE P all of the common amino acids were found. It was noticed that during degradation of proteins by PRONASE 3-hydroxy-anthranilic acid is formed.

Agrikulturchemisches Institut der
Eidg. Technischen Hochschule, Zürich

¹⁵⁾ F. A. ISHERWOOD & D. H. CRUICKSHANK, *Nature* 174, 123 (1954).

158. Über den Einbau des Kohlenstoffs der Glucose in die Harnsäure bei *Drosophila melanogaster*

Vorläufige Mitteilung

von O. Brenner-Holzach und F. Leuthardt

(20. V. 63)

Im Zusammenhang mit Untersuchungen über die Pterinsynthese bei *Drosophila melanogaster* haben wir den Einbau des aus Glucose stammenden Kohlenstoffs in die Harnsäure untersucht. Wie schon früher mitgeteilt wurde¹⁾, erhält man bei Verfütterung von in C1 und C6 markierter Glucose an *Drosophila melanogaster* mit der C6-markierten Verbindung eine Harnsäure mit höherer spezifischer Aktivität als mit der C1-markierten Glucose. Wir äusserten die Vermutung, dass das C6 der Glucose in spezifischer Weise zur Harnsäuresynthese verwendet wird. Da dafür in erster Linie die C-Atome 2 und 8 in Frage kommen (C-Atome 4 und 5 stammen aus Glykokoll, C6 aus CO₂), muss das C6 der Glucose offenbar besonders leicht in aktiviertes Formiat übergehen. Darauf weisen auch unsere Versuche mit Pterinen hin¹⁾, bei denen sich mit Glucose-[6-¹⁴C] im Isoxanthopterin eine unerwartet hohe spezifische Aktivität nachweisen liess, die sich wahrscheinlich zum grössten Teil im C2 findet. Auch WEYGAND *et al.*²⁾ haben bei Verabreichung von Glucose-[6-¹⁴C] an Kohlweisslingspuppen beim Leucopterin eine hohe Konzentration des Isotops im C2 gefunden.

¹⁾ O. BRENNER-HOLZACH & F. LEUTHARDT, *Helv.* 44, 1480 (1961).

²⁾ F. WEYGAND, H. SIMON, G. DAHMS, M. WALDSCHMIDT, J. SCHLIEP & H. WACKER, *Angew. Chem.* 73, 402 (1961).