

142. Isolierung von Bradykinin aus Rinderplasma nach Einwirkung von Schlangengift (*Bothrops jararaca*)

Vorläufige Mitteilung

von H. ZUBER und R. JAQUES¹⁾

(14. V. 60)

Pharmakologisch identische Peptide (Bradykinin) entstehen bei der Einwirkung von Schlangengift (*Bothrops jararaca*) oder von Trypsin auf Plasmaproteine²⁾, vermutlich infolge Hydrolyse von Peptid- oder Esterbindungen in entsprechenden Proteinvorstufen («Bradykininogen») ³⁾. Ihre chemische Identität ist keineswegs sicher. Im folgenden beschreiben wir die Isolierung von Bradykinin aus mit Schlangengift behandeltem Rinderplasma und die Untersuchung dieses Bradykinins.

Zur Isolierung von Bradykinin liessen wir 10 g Schlangengift (*Bothrops jararaca*)⁴⁾ unter Zusatz von Cystein⁵⁾ 45 Min. auf 100 l Rinderplasma einwirken (pH = 8,1, 38°). Nach Inaktivieren der *Bothrops-jararaca*-Enzyme durch Einleiten von 200 l siedendem 95-proz. Äthanol und 10-min. Sieden der Äthanol-Wasser-Mischung wurde die zentrifugierte und klarfiltrierte Lösung im Vakuum zur Trockene eingengt (975 g); biol. Aktivität⁶⁾: bei 50–80 γ /ml Tyrodelsg. Kontraktionshöhe 10–15 mm (Schwellendosis). Dieser sirupöse Rückstand wurde mit 90 l 90-proz. Äthanol (in 12 Portionen zu je 7,5 l) in der Siedehitze extrahiert und die Lösung erneut im Vakuum eingedampft (732 g; unlöslicher Rückstand: 243 g; biol. Aktivität der löslichen Fraktion: bei 50 γ /ml Kontraktionshöhe 32 mm). Danach wurde der Extrakt wieder in 30 l 90-proz. Äthanol (Zimmertemp.) gelöst (unlöslicher Rückstand: 200 g) und die Lösung auf einer Aluminiumoxyd-Säule⁶⁾ (Aluminiumoxyd WOELM, sauer, anionotrop. Aktivitätsstufe I; Säule: 14 × 90 cm) gebracht. Die Chromatographiesäule wurde nacheinander mit 90-proz. Äthanol (Fr. I und II) bzw. 50-proz. Methanol (Fr. III und IV) eluiert. 95% der Aktivität befanden sich in der Fraktion III (eluiert mit 75 l 50-proz. Methanol) (Trockensubstanz: 121 g; biol. Aktivität: bei 20 γ /ml Kontraktionshöhe 86 mm; bei 10 γ /ml Kontraktionshöhe 12 mm). Der Rückstand der Fraktion III wurde in Wasser gelöst, auf pH 5 eingestellt und gegen dest. Wasser dialysiert (24 Std., 0°). Dabei blieben etwa 80% des Bradykinins und etwa 13% der Begleitstoffe (Salze) im Dialysierschlauch, während sich 20% des Peptids und 87% der Salze im Dialysat befanden (jenes liess sich durch zweimalige Wiederholung der Dialyse weiter anreichern. Nicht dialysierbarer Rückstand: 17,0 g; biol. Aktivität: bei 5 γ /ml Kontraktionshöhe 79 mm). Die nicht dialy-

¹⁾ Der chemische Teil wurde von H. ZUBER, der pharmakologische Teil von R. JAQUES ausgeführt.

²⁾ M. ROCHA e SILVA, W. T. BERALDO & G. ROSENFELD, Amer. J. Physiol. 156, 261 (1949); E. S. PRADO, W. T. BERALDO & M. ROCHA e SILVA, Arch. Biochemistry 27, 410 (1950); C. G. VAN ARMAN, Proc. Soc. exp. Biol. 79, 356 (1952).

³⁾ U. HAMBERG & M. ROCHA e SILVA, Experientia 13, 489 (1957).

⁴⁾ Freundlicherweise von der Fa. INSTITUTO PINHEIROS, Brasilien, zur Verfügung gestellt.

⁵⁾ U. HAMBERG & H. F. DEUTSCH, Arch. Biochemistry Biophysics 76, 262 (1958).

⁶⁾ Getestet als «slow reacting substance» am isol. Meerschweinchenileum, 20 ml Tyrodelösung. Bei den Vorfraktionen enthielt die Tyrode Atropin (10^{-8}) sowie NEOANTERGAN[®] (10^{-8}) zur Ausschaltung von evtl. Begleitstoffwirkungen. Die weitere pharmakologische Differenzierung des Bradykinincharakters der reineren Fraktionen erfolgte überdies auch an folgenden Testobjekten: 1. Blutdruck der mit Dial-CIBA narkotisierten und atropinisierten Katze. 2. Blutdruck des mit Luminal narkotisierten Hahns. 3. Erhöhung der Haut-Kapillarpermeabilität am mit Vitalfarbstoff vorbehandelten Meerschweinchen. 4. Isoliertes, atropinisiertes Rattencolon und isol. Rattenuterus in DE JALÓN'S Lösung.

sierbare Fraktion wurde in Wasser gelöst und nach Ausfällen und Abtrennen einer bei pH 8,0 unlöslichen Substanz in zwei Portionen (zu je 8,5 g) durch eine Oxycellulose-Säule (Oxycellulose mit 11% Carboxyl; Oxycellulose: Cellulose = 1:3; Säule: 5 × 27 cm) laufen gelassen. Dabei wurde beim Eluieren mit Wasser das stark basische Polypeptid nur zum Teil in der Säule festgehalten, während der andere Teil durch die Säule hindurchläuft (Fraktion I, biol. Aktivität: bei 5 γ /ml Kontraktionshöhe 100 mm). Der adsorbierte Teil des Bradykinins wurde mit 0,7 N Monochloressigsäure eluiert (Fraktion III, biol. Aktivität: bei 0,5 γ /ml Kontraktionshöhe 25 mm). Bei nochmaliger Fraktionierung der Fraktion I und III an der gleichen Oxycellulose-Säule wurde jedoch praktisch das ganze Bradykinin in der Säule festgehalten, wobei beim Eluieren mit Wasser die meisten Begleitsubstanzen und die restlichen Aminosäuren (bes. Alanin, Valin, Leucin, Phenylalanin, Cystin und Tyrosin) aus der Säule ausgewaschen wurden. Beim Eluieren mit Monochloressigsäure (Konzentr.-Gradient 0,1 bis 1,0 N) wurde eine stark an Bradykinin angereicherte und bis auf Spuren von Aminosäuren (ausser Arginin und evtl. Arginipeptiden) befreite Fraktion erhalten (biol. Aktivität: bei 0,05 γ /ml Kontraktionshöhe 70 mm). Von dieser Reinigungsstufe an liessen sich alle weiteren Reinigungsoperationen auch mit Hilfe der Papierchromatographie und der Hochspannungselektrophorese (HSE) verfolgen. Die Bradykinin-Flecken lassen sich gut durch Anfärben mit Ninhydrin (grauviolette Färbung), SAKAGUCHI-Reagenz⁷⁾ (rote Farbe) und der Chlormethode⁸⁾ identifizieren. Nach Totalhydrolyse (6 N HCl, 105°) der mit Monochloressigsäure eluierten Fraktion (die Monochloressigsäure wurde durch Ausäthern entfernt) liessen sich folgende Aminosäuren nachweisen: Etwa gleich stark (Ninhydrinfärbung): Arginin, Phenylalanin, Prolin, etwas schwächer: Glycin, Serin, schwach bis spurenweise: Glutaminsäure, Asparaginsäure, Alanin, Valin, Leucin, Histidin. Die weitere Reinigung der vereinigten Fraktionen (835 mg; biol. Aktivität: bei 0,05 γ /ml Kontraktionshöhe 70 mm) erfolgte mit der HSE auf Filtrierpapierbogen. Nach Anfärben von Randstreifen wurden die Bradykinin-Zonen aus dem Papier eluiert. Die HSE bei pH 1,9 (45 V/cm, 90 Min.) führte zu einer etwa 10fachen Anreicherung (72 mg) und die anschliessende HSE bei pH 6,5 (23 V/cm, 90 Min.) zu einer etwa 2fachen Anreicherung (39 mg; biol. Aktivität: bei 0,003 γ /ml Kontraktionshöhe 40 mm; Schwellendosis: bei 0,001 γ /ml Kontraktionshöhe 10–15 mm).

Die aus den Papierstreifen eluierte Bradykinin-Fraktion ist frei von allen Aminosäuren und anderen Peptiden (es sind nur Spuren von Serin, Glycin und Alanin, die aus dem Papier eluiert wurden, nachweisbar). Sie ist aber noch zu 70–90% (je nach Konzentration beim Eluieren) mit Ninhydrin-negativen Substanzen (aus dem Filtrierpapier zusammen mit dem Bradykinin eluiert) verunreinigt, die aber bei der weiteren Identifizierung (Totalhydrolyse usw.) des Polypeptids nicht stören. Das Peptid verhält sich bei der Papierchromatographie und der HSE als einheitliche Substanz. Rf-Wert (n-Butanol-Eisessig-Wasser (4:1:5)) = 0,35 (i. Vgl. Prolin: 0,26, Phenylalanin: 0,51). Bei der HSE beträgt der Wanderungsweg bei pH 1,9, 45 V/cm, 70 Min. 14 cm (i. Vgl. Arginin 19 cm, Glycin 16 cm, Alanin 14 cm, Leucin 11 cm und bei pH 6,5, 23 V/cm, 90 Min. 6,5 cm (i. Vgl. neutrale Aminosäuren 2,5 cm). Nach der Totalhydrolyse liessen sich folgende Aminosäuren nachweisen: Arginin, Phenylalanin, Prolin, Glycin und Serin; ihre quantitative Bestimmung erfolgte auf Filtrierpapier (Trennung durch HSE bei pH 1,9, 80 Min.) nach der Ninhydrin-Kupferkomplex-Methode⁹⁾ (Fehlerbreite \pm 10%). (Prolin wurde mit der Isatin-Methode¹⁰⁾ bestimmt.) Das molare Verhältnis der Aminosäuren ist demnach Arginin: Phenylalanin: Prolin: Glycin: Serin = 2:2:2:1:1¹¹⁾ (gemessene Mittelwerte: 2,08: 2,2: 1,90: 1,0: 1,09 auf Glycin = 1,0 bezogen). Durch Umsatz mit Fluordinitrobenzol (in wässr. Äthanol, 1% Trimethylaminlösung) wurde das freie Peptid in sein Dinitrophenylderivat überführt. Das Dinitrophenyl-bradykinin lässt sich durch Essigesterextraktion reinigen (sehr schwer extrahierbar

⁷⁾ S. SAKAGUCHI, J. Biochem. (Japan) 37, 231 (1950): siehe H. FRAENKEL-CONRAT, J. I. HARRIS & A. L. LEVY, Methods of Biochem. Analysis (1955), Vol. 2, S. 377.

⁸⁾ F. REINDEL & W. HOPPE, Chem. Ber. 87, 1103 (1954).

⁹⁾ F. G. FISCHER & H. DÖRFEL, Biochem. Zeitschr. 324, 544 (1953); TH. WIELAND & E. KAWERAU, Natur 168, 77 (1951).

¹⁰⁾ E. HRABÉTOVÁ & J. TUPÝ, J. Chromatogr. 3, 199 (1960).

¹¹⁾ Nach D. F. ELLIOTT *et al.*, Bioch. J. 74, 15 P (1960), hat das Bradykinin, das aus einer Globulinfraction (Rinderserum) durch Abbau mit Trypsin entsteht, dieselbe Aminosäurezusammensetzung: Arg:Phe:Pro:Gly:Ser = 2:2:2:1:1.

mit Essigester). Rf-Wert in n-Butanol-Eisessig-Wasser (4:1:5) = 0,7 (i. Vgl. Dinitrophenyl-arginin 0,6). Nach der Totalhydrolyse wurde Dinitrophenyl-arginin gefunden (Arginin ist NH_2 -Endgruppe), während die restlichen Aminosäuren im Hydrolysat nach der quantitativen Bestimmung im Molverhältnis Arginin:Phenylalanin:Prolin:Glycin:Serin = 1:2:x:1:1 (Prolin wurde nicht bestimmt; gemessene Mittelwerte: 0,85: 2,0:x:1,0:1,0 auf Glycin = 1 bezogen) vorhanden sind. Der enzymatische Abbau des freien Peptids mit Chymotrypsin (Enzym: Substrat 1:10) liefert nur Arginin und das restliche Heptapeptid. Ebenso entsteht beim Abbau von Dinitrophenyl-bradykinin mit Chymotrypsin Arginin und das Dinitrophenyl-heptapeptid. Arginin muss demnach Carboxyl-endständig stehen. Bei der Einwirkung von Carboxypeptidase auf Bradykinin und Dinitrophenyl-bradykinin werden nur Arginin und Phenylalanin abgespalten, so dass man am Carboxylende die Sequenz Phe-Arg annehmen kann. Durch Trypsin wird das Peptid nicht gespalten.

Wir schlagen daher für das Bradykinin, gebildet bei der Inkubation von Rinderplasma mit Schlangengift, folgende Teilstruktur vor: $\text{H}\cdot\text{Arg}(\text{Pro}_2, \text{Gly}, \text{Ser}, \text{Phe})\text{-Phe-Arg}\cdot\text{OH}$. Trypsin-Bradykinin und Schlangengift-Bradykinin unterscheiden sich also in ihrer Aminosäure-Zusammensetzung nicht und sind somit chemisch höchst wahrscheinlich identisch.

Über diese Arbeiten, die im Rahmen unserer Studien über Polypeptid-Wirkstoffe¹²⁾ durchgeführt wurden, soll später eingehender berichtet werden.

SUMMARY

Bradykinin, resulting from the action of snake venom (*Bothrops jararaca*) on bovine plasma, has been isolated in an essentially pure form. It contains the five amino acids arginine, phenylalanine, proline, glycine and serine in the ratio of 2:2:2:1:1, corresponding to the amino acid composition found for bradykinin stemming from the action of trypsin on corresponding plasma proteins. Degradation studies give the following partial sequence: $\text{H}\cdot\text{Arg}(\text{Pro}_2, \text{Gly}, \text{Ser}, \text{Phe})\text{-Phe-Arg}\cdot\text{OH}$.

Forschungslaboratorium der CIBA AKTIENGESELLSCHAFT, Basel
Pharmazeutische Abteilung

¹²⁾ R. SCHWYZER, *Chimia* 12, 53 (1958).

143. Synthese von L-Arginyl-L-prolyl-L-prolyl-glycyl-L-phenylalanyl-L-seryl-L-phenylalanyl-L-arginin (Bradykinin?)

Vorläufige Mitteilung

von R. Schwyzer, W. Rittel, P. Sieber, H. Kappeler, und H. Zuber

(18. V. 60)

In unseren Laboratorien wurde von ZUBER & JAQUES das «Schlangengift-Bradykinin»¹⁾ als einheitliches Peptid der Aminosäurezusammensetzung: $\text{Arg}_2, \text{Phe}_2, \text{Pro}_2, \text{Gly}_1, \text{Ser}_1$, isoliert²⁾. Eine Partialformel: $\text{H}\cdot\text{Arg}(\text{Phe}, \text{Pro}_2, \text{Gly}, \text{Ser})\text{-Phe-Arg}\cdot\text{OH}$, konnte auf Grund von Abbaueversuchen aufgestellt werden. ELLIOTT und Mitarbeiter

¹⁾ «Schlangengift-Bradykinin» soll hier jenes Bradykinin bezeichnen, welches aus Plasmaprotein durch Schlangengiftenzyme (*Bothrops jararaca*) freigesetzt wird, «Trypsin-Bradykinin» dagegen jenes, welches durch die Einwirkung von Trypsin entsteht, vgl. ²⁾.

²⁾ H. ZUBER & R. JAQUES, *Helv.* 43, 1128 (1960).