

225. Un substrat pour le dosage chimique de la rénine

par M. Roth et Anja Reinharz

(14 VI 66)

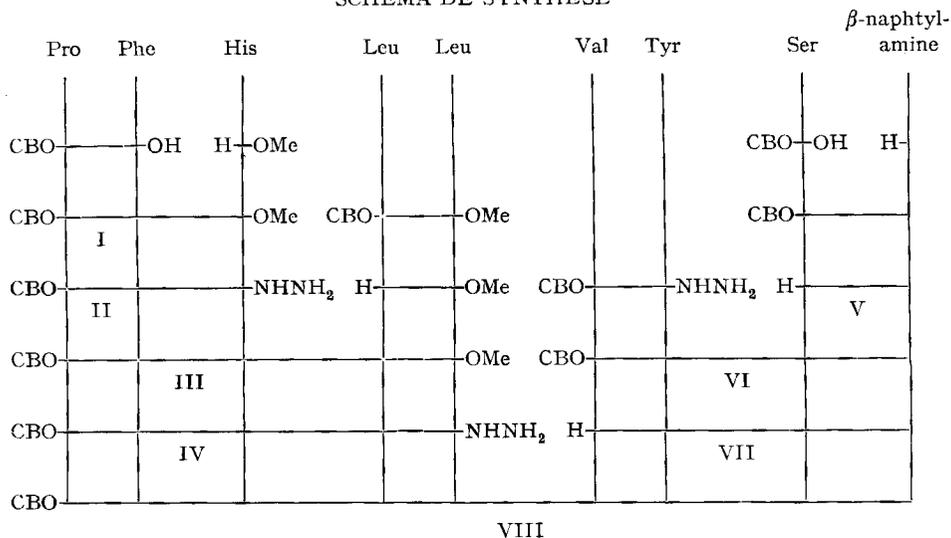
Comme l'ont montré SKEGGS *et al.* [1], la rénine exerce son effet protéolytique sur son substrat naturel, une α_2 -globuline, en libérant par hydrolyse d'une liaison Leucyl-Leucyle une chaîne de dix acides aminés qui constituent l'extrémité amino-terminale de cette globuline. La rénine catalyse également l'hydrolyse, au niveau de la liaison Leucyl-Leucyle, de l'octapeptide Prolyl-Phénylalananyl-Histidyl-Leucyl-Leucyl-Valyl-Tyrosyl-Sérine, qui reproduit une portion de la structure du substrat naturel [2]. On n'a pas pu trouver jusqu'ici de polypeptide plus court qui soit attaqué par la rénine, ce qui semble indiquer que la spécificité de la rénine est accordée à la structure du substrat en des points relativement éloignés de la liaison hydrolysable.

Les dosages de rénine pratiqués jusqu'ici se font par voie biologique (mesure de l'effet, direct ou indirect, sur l'animal ou sur un organe isolé). Ils ont été développés jusqu'à un haut degré de sensibilité [3], mais présentent l'inconvénient d'être difficiles à reproduire et à étalonner. C'est pourquoi, la mise au point d'un dosage chimique de la rénine revêt un intérêt incontesté. Un tel dosage présenterait des avantages particuliers si l'on pouvait incuber la rénine avec un substrat synthétique spécifique et mesurer, soit la disparition du substrat, soit l'apparition d'un produit de réaction. C'est dans ce but que MAZUR & SCHLATTER [4] ont réalisé une nouvelle synthèse du substrat octapeptidique décrit plus haut.

Malheureusement, les méthodes par photométrie d'absorption destinées à doser, par exemple, l'augmentation de groupes aminés consécutive à une protéolyse ne sont guère sensibles. Une méthode fluorimétrique est préférable. C'est pourquoi, nous fondant sur la sensibilité de méthodes fluorimétriques développées précédemment pour le dosage de la trypsine [5] et de l'aminopeptidase [6], nous avons réalisé (voir schéma) la synthèse d'un substrat fluorigène de la rénine, le N-carbobenzoxy-L-prolyl-L-phénylalananyl-L-histidyl-L-leucyl-L-leucyl-L-valyl-L-tyrosyl-L-séryl- β -naphtylamide (VIII). La condensation de la N-CBO-L-prolyl-L-phénylalanine avec le L-histidinate de méthyle au moyen de dicyclohexylcarbodiimide a fourni le N-CBO-L-prolyl-L-phénylalananyl-L-histidinate de méthyle (I), qui fut transformé en hydrazide correspondant (II). Selon MAZUR & SCHLATTER [4] nous avons obtenu à partir de ce composé, par l'action du nitrite d'isoamyle en milieu acide à -45° , l'azide que nous avons condensé avec le L-leucyl-L-leucinate de méthyle; le N-CBO-L-prolyl-L-phénylalananyl-L-histidyl-L-leucyl-L-leucinate de méthyle (III) qui en résultait fut transformé en hydrazide IV. La même méthode nous a permis d'obtenir le N-CBO-L-valyl-L-tyrosyl-L-séryl- β -naphtylamide (VI) à partir de N-CBO-L-valyl-L-tyrosyl-hydrazide et de L-séryl- β -naphtylamide, ainsi que le N-CBO-L-prolyl-L-phénylalananyl-L-histidyl-L-leucyl-L-leucyl-L-valyl-L-tyrosyl-L-séryl- β -naphtylamide (VIII) à partir de l'hydrazide IV et du L-valyl-L-tyrosyl-L-séryl- β -naphtylamide (VII). L'octapeptide protégé final VIII est peu soluble dans l'eau et l'alcool, et faiblement soluble dans le diméthylformamide.

Il n'est cependant pas précipité lorsqu'une solution à 1 mg par ml dans ce dernier solvant est ajoutée à un volume trente fois supérieur d'un milieu d'incubation aqueux; cela permet d'utiliser la substance comme substrat pour la mesure fluorimétrique de l'activité de réactions enzymatiques.

SCHÉMA DE SYNTHÈSE



Abréviation: CBO = carbobenzoxy.

Le dosage est basé sur le fait que la β -naphtylamine est fortement fluorescente alors que ses dérivés N-acylés ne le sont pas. Si l'on admet que le substrat fluorigène est attaqué par la rénine de la même manière que l'est l'octapeptide Pro-Phe-His-Leu-Leu-Val-Tyr-Ser, l'un des produits de l'hydrolyse doit être le dérivé térapeptidique Leu-Val-Tyr-Ser- β -naphtylamide. Afin de développer une fluorescence, nous ajoutons au milieu d'incubation un excès d'un enzyme auxiliaire, l'aminopeptidase M[7]; cette aminopeptidase non spécifique n'attaque pas le substrat VIII mais est capable de détacher successivement les acides aminés du dérivé térapeptidique en libérant finalement de la β -naphtylamine fluorescente. En présence d'un excès suffisant d'aminopeptidase, l'augmentation de fluorescence du milieu d'incubation est fonction de l'activité enzymatique de la rénine.

Les essais que nous avons effectués avec des préparations de rénine de rein de Porc ou de Lapin purifiée montrent que le substrat permet une détermination simple et reproductible de l'enzyme.

Nous allons maintenant comparer le dosage fluorimétrique avec le dosage biologique de la rénine.

Nous adressons nos remerciements au FONDS NATIONAL SUISSE POUR LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE et à la FONDATION FRITZ HOFFMANN-LA ROCHE POUR L'EXPANSION DU TRAVAIL SCIENTIFIQUE EXÉCUTÉ PAR ÉQUIPES, dont l'aide a rendu possible le présent travail. Nous remercions également le Dr ST. GUTTMANN, de la Maison SANDOZ, à Bâle, qui a aimablement effectué les scissions hydrogénolytiques du CBO-Séryl- β -naphtylamide et du CBO-Valyl-Tyrosyl-Séryl- β -naphtyl-

lamide, et à qui nous sommes redevables en outre de données analytiques, de la mesure des pouvoirs rotatoires et de précieux conseils. Enfin, nous devons notre gratitude à Mlle S. JACCOURD et à M. D. HOFSTÄTTER pour leur dévouée collaboration.

Partie expérimentale¹⁾

La N-CBO-L-prolyl-L-phénylalanine et le N-CBO-L-valyl-L-tyrosyl-hydrazide ont été obtenus chez FLUKA, 9470 Buchs (Suisse), la chymotrypsine cristallisée, chez BOEHRINGER, Mannheim (Allemagne), et l'aminopeptidase M, chez CARL ROTH, Karlsruhe (Allemagne). L'activité de l'aminopeptidase M est exprimée en unités enzymatiques internationales se rapportant à l'hydrolyse du Leucyl-*p*-nitranilide à 30°.

Chromatographie: La chromatographie sur couche mince est faite sur gel de silice G (MERCK); Rf₁, dans le méthanol; Rf₂, dans le mélange méthanol-acétone (8:2); Rf₃, dans le mélange méthanol-chloroforme (1:9); Rf₄, dans le mélange *n*-butanol-acide acétique-eau (8:2:2); Rf₅, dans le mélange méthanol-chloroforme-ammoniaque 25% (10:10:3). La chromatographie sur papier (SCHLEICHER & SCHUELL 2040 b) est ascendante. Révélation: ninhydrine, réaction au chlore-iodure ou réactif de PAULY.

Hydrolyses: L'hydrolyse acide a été effectuée dans des ampoules évacuées, en présence de HCl 6N, pendant 72 h à 110°. La rénine de rein de Porc utilisée pour l'hydrolyse enzymatique est une préparation du stade 5 de la méthode de HAAS, LAMFROM & GOLDBLATT [8]²⁾.

Le spectre d'absorption du produit final a été obtenu avec un spectrophotomètre enregistreur BECKMAN DK-1.

La fluorescence à 410 nm de la β -naphtylamine excitée à 338 nm a été mesurée avec un spectrofluorimètre FARRAND.

N-CBO-L-prolyl-L-phénylalananyl-L-histidinate de méthyle (I). On suspend 2,84 g (10,6 mmoles) de dichlorhydrate de L-histidine de méthyle dans 20 ml de chloroforme et ajoute 3,36 ml (24 mmoles) de triéthanolamine; la solution refroidie à 4° est mélangée avec une solution de 3,96 g (10 mmoles) de N-CBO-L-prolyl-L-phénylalanine dans 20 ml de chloroforme refroidie à 4°. On ajoute 2,47 g (12 mmoles) de dicyclohexylcarbodiimide, agite 1 h à 4°, puis laisse 24 h à 20°. On filtre la dicyclohexylurée, lave le filtrat trois fois à l'eau, trois fois avec KOH 0,1N et trois fois à l'eau, le sèche sur MgSO₄ et évapore le chloroforme sous vide. Le résidu huileux, trituré dans l'acétate d'éthyle puis cristallisé dans un mélange méthanol-éther (1:6,5), fournit 4,34 g (79% de la th.) de tripeptide protégé. F. 154–157°. Rf₂ = 0,63; Rf₄ = 0,86. Chromatographie sur papier avec le système *n*-butanol-acide acétique-H₂O (7:1:2), Rf 0,75.

C₂₉H₃₅O₆N₅ (547,6) Calc. C 63,6 H 6,1 N 12,8% Tr. C 62,9 H 6,4 N 12,6%

N-CBO-L-prolyl-L-phénylalananyl-L-histidyl-hydrazide (II). 2,74 g (5 mmoles) de l'ester I, traités selon MAZUR & SCHLATTER [4], fournissent 2,23 g (82%) de N-CBO-L-prolyl-L-phénylalananyl-L-histidyl-hydrazide (II). F. 156–159° (lit. [4]: F. 153–157°). Rf₃ = 0,58; Rf₄ = 0,32.

C₂₈H₃₃O₆N₇ (547,6) Calc. C 61,4 H 6,1 N 17,5% Tr. C 61,3 H 6,0 N 18,0%

N-CBO-L-prolyl-L-phénylalananyl-L-histidyl-L-leucyl-L-leucinate de méthyle (III). 2 g (3,65 mmoles) de N-CBO-L-prolyl-L-phénylalananyl-L-histidyl-hydrazide (II) condensés avec 1,31 g (3,9 mmoles) de bromhydrate de L-leucyl-L-leucinate de méthyle [4], fournissent 1,94 g (69%) de N-CBO-L-prolyl-L-phénylalananyl-L-histidyl-L-leucyl-L-leucinate de méthyle (III) de F. 114–119° (lit. [4]: F. 110–115°). Rf₄ = 0,71. Chromatographie sur couche mince avec le système méthanol-chloroforme (2:8), Rf = 0,47.

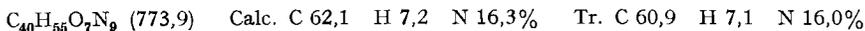
C₄₁H₅₅O₈N₇ (773,9) Calc. C 63,6 H 7,2 N 12,7% Tr. C 63,5 H 7,2 N 12,8%

N-CBO-L-prolyl-L-phénylalananyl-L-histidyl-L-leucyl-L-leucyl-hydrazide (IV). L'ester III, traité selon MAZUR & SCHLATTER [4], fournit avec un rendement de 79% le N-CBO-L-prolyl-L-phényl-

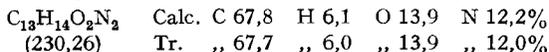
¹⁾ Les F. sont déterminés sur un bloc de KOFLER. Les microanalyses de C et H ont été faites par le Dr K. EDER, Ecole de Chimie, Université de Genève.

²⁾ Nous remercions les Drs R. VEYRAT et H. R. BRUNNER, Laboratoire de physiopathologie, Université de Genève, qui ont vérifié la bonne activité de notre préparation par mesure de l'effet presseur chez le Rat.

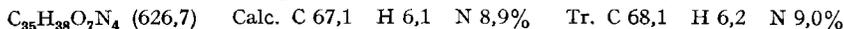
alanyl-L-histidyl-L-leucyl-L-leucyl-hydrazide (IV). F. 198–204° (lit. [4]: F. 203,5–206°). Chromatographie sur couche mince dans le mélange méthanol-chloroforme (2:8), Rf = 0,28; Rf₄ = 0,59.



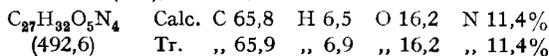
L-séryl-β-naphtylamide (V): préparé selon NESVADBA [9]. F. 155–156° (lit. [9]: F. 151,5–152,5°). [α]_D²⁰ = –8,4° (c = 0,98; méthanol). A l'électrophorèse sur papier à pH 1,9 et 5,8, le produit est homogène et migre respectivement vers la cathode et vers l'anode.



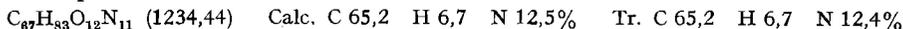
N-CBO-L-valyl-L-tyrosyl-L-séryl-β-naphtylamide (VI). A une solution de 1,71 g (4 mmoles) de N-CBO-L-valyl-L-tyrosyl-hydrazide dans 12 ml de diméthylformamide, on ajoute 10 ml de HCl 2N dans le tétrahydrofurane, refroidit à –45°, ajoute 0,64 ml (4,8 mmoles) de nitrite d'isoamyle et laisse 10 min à –45°. On ajoute 5,6 ml (40 mmoles) de triéthylamine et 1,11 g (4,8 mmoles) de L-séryl-β-naphtylamide dissous dans 4 ml de diméthylformamide. On laisse trois jours à –18° et précipite le produit par 250 ml d'eau glacée. Le précipité est repris par le méthanol à 50° et cristallisé par addition de tétrahydrofurane: 0,72 g (29%) de N-CBO-L-valyl-L-tyrosyl-L-séryl-β-naphtylamide de F. 246–252°. Rf₁ = 0,88; Rf₃ = 0,80; Rf₅ = 0,93; Rf₆ = 0,97.



L-valyl-L-tyrosyl-L-séryl-β-naphtylamide (VII). On dissout 2 g de N-CBO-L-valyl-L-tyrosyl-L-séryl-β-naphtylamide (VII) dans un mélange de tétrahydrofurane et de méthanol (1:2), ajoute 0,5 g de noir de palladium à 10% et agite dans une atmosphère d'hydrogène. On filtre, évapore à sec et recristallise dans un mélange éthanol-éther. On obtient 450 mg (28%) de L-valyl-L-tyrosyl-L-séryl-β-naphtylamide (VII). F. 172–182°. Rf₃ = 0,16; chromatographie sur couche mince avec le système méthanol-chloroforme (3:7), Rf = 0,79.



N-CBO-L-prolyl-L-phénylalaninyl-L-histidyl-L-leucyl-L-leucyl-L-valyl-L-tyrosyl-L-séryl-β-naphtylamide (VIII). Une solution de 357 mg (0,45 mmoles) de N-CBO-L-prolyl-L-phénylalaninyl-L-histidyl-L-leucyl-L-leucyl-hydrazide (VI) dans 2 ml de diméthylformamide est additionnée de 1 ml de HCl 2N dans le tétrahydrofurane et refroidie à –45°. On ajoute 73 μl (0,54 mmoles) de nitrite d'isoamyle, agite 30 min à –45° et, en maintenant cette température, ajoute 252 μl (1,8 mmole) de triéthylamine et 249 mg (0,5 mmole) de L-valyl-L-tyrosyl-L-séryl-β-naphtylamide (VII). Après avoir agité 2 h à –45°, on laisse trois jours à –18°. La masse compacte qui s'est formée est reprise par un peu de tétrahydrofurane froid, filtrée et lavée par le tétrahydrofurane, puis par l'éther anhydre. On obtient 0,41 g (74%) de N-CBO-L-prolyl-L-phénylalaninyl-L-histidyl-L-leucyl-L-leucyl-L-valyl-L-tyrosyl-L-séryl-β-naphtylamide (VIII) sous forme d'une poudre blanche que l'on dissout dans le diméthylformamide et laisse reprécipiter par addition d'acétate d'éthyle. F. 269–275°. Rf₄ = 0,85; Rf₅ = 0,80; chromatographie sur couche mince avec le mélange méthanol-chloroforme (2:8), Rf = 0,63; homogène. [α]_D²⁰ = –46,7° (c = 1,0; acide acétique à 95%). La substance, dissoute dans l'acide acétique à 75%, présente un maximum d'absorption à 277 nm. ε = 8230. Elle n'est pas fluorescente à 410 nm.



Hydrolyse acide de VIII: Après hydrolyse de l'octapeptide protégé VIII par HCl 6N, la chromatographie quantitative sur échangeur d'ions a donné les résultats suivants³⁾ (entre parenthèses les valeurs théoriques): histidine 1,00 (1); leucine 1,94 (2); phénylalanine 0,95 (1); proline 1,04 (1); sérine 0,77 (1); tyrosine 0,79 (1); valine 0,97 (1).

Hydrolyse enzymatique de VIII: Si l'octapeptide protégé VIII (solution à 15 μg/ml) est incubé à 37° avec l'un des enzymes suivants: rénine, chymotrypsine, aminopeptidase M, on ne constate pas de libération notable de β-naphtylamine (mesurée par fluorimétrie). Par contre, si l'on combine l'action d'une endopeptidase (rénine ou chymotrypsine) avec celle de l'aminopeptidase M, il se forme de la β-naphtylamine, ce qui laisse supposer que les endopeptidases libèrent des polypeptidyl-naphtylamides qui sont hydrolysés par l'aminopeptidase M avec libération de β-naphtyl-

³⁾ Nous remercions le Dr T. BRECHBÜHLER, Kinderspital, Bâle, qui a aimablement effectué ces dosages.

amine. 10 μg de chymotrypsine cristallisée incubés à pH 7,8 avec 5 μg de substrat VIII en présence de 40 unités internationales (U) d'aminopeptidase M ont présenté une activité de $63,5 \cdot 10^{-2}$ U/g. 5 μl de préparation de rénine incubés à pH 5,6 avec 10 μg de substrat VIII en présence de 20 U d'aminopeptidase M et d'acétate de zinc (10^{-4} M) ont présenté une activité de $6,7 \cdot 10^{-2}$ U par g de protéines. L'hydrolyse prolongée (quatre jours) en présence de rénine et d'aminopeptidase M libère 92% de la quantité théorique de β -naphthylamine; dans les mêmes conditions, la rénine seule n'en libère que 1,8%, et l'aminopeptidase seule, 1,5%.

SUMMARY

A fluorogenic renin substrate, N-CBO-L-prolyl-L-phenylalanyl-L-histidyl-L-leucyl-L-leucyl-L-valyl-L-tyrosyl-L-seryl- β -naphthylamide, has been synthesized. Upon incubation at pH 5,6 with renin and an excess of the auxiliary enzyme aminopeptidase M, it gives rise to β -naphthylamine at a rate related to the quantity of renin.

Since β -naphthylamine can be measured with high sensitivity by fluorimetry, a chemical assay of renin is made possible. The method gave reproducible results when purified samples of hog and rabbit kidney renin were assayed.

Laboratoire central de l'Hôpital Cantonal
1211 Genève 4

BIBLIOGRAPHIE

- [1] L. T. SKEGGS, J. R. KAHN, K. LENTZ & N. P. SHUMWAY, J. exp. Med. 106, 439 (1957).
- [2] L. T. SKEGGS, K. E. LENTZ, H. HOCHSTRASSER & J. R. KAHN, Canad. Med. Ass. J. 90, 185 (1964).
- [3] J. J. BROWN, D. L. DAVIES, A. F. LEVER, J. I. S. ROBERTSON & M. TREE, Biochem. J. 93, 594 (1964); R. BOUCHER, R. VEYRAT, J. DE CHAMPLAIN & J. GENEST, Canad. Med. Ass. J. 90, 194 (1964).
- [4] R. H. MAZUR & J. M. SCHLATTER, J. org. Chemistry 29, 3212 (1964).
- [5] M. ROTH, Clin. chim. Acta 8, 574 (1963).
- [6] L. J. GREENBERG, Biochem. biophysic. Res. Commun. 9, 430 (1962); M. ROTH, Clin. chim. Acta 9, 448 (1964).
- [7] G. PFLEIDERER, P. G. CELLIERS, M. STANULOVIC, E. D. WACHSMUTH, H. DETERMANN & G. BRAUNITZER, Biochem. Z. 340, 552 (1964).
- [8] E. HAAS, H. LAMFROM & H. GOLDBLATT, Arch. Biochemistry Biophysics 42, 368 (1953).
- [9] H. NESVADBA, Mh. Chem. 93, 386 (1962).

226. Die Isolierung zweier neuartiger Indol-Derivate aus dem Mycel von *Claviceps paspali* STEVENS et HALL

von Th. Fehr und W. Acklin

(7. VII. 66)

Im Rahmen von Untersuchungen zur Biosynthese von Ergotalkaloiden, über die anderorts berichtet wird [1], haben wir auch mit dem isolierten Mycel des von KOBEL *et al.* [2] beschriebenen «portugiesischen» *Claviceps-paspali*-Stammes gearbeitet. Dieser Stamm produziert in Submerskultur als Hauptalkaloid die 6-Methyl- $\Delta^{8,9}$ -ergolen-8-carbonsäure, welche im Kulturfiltrat auftritt. Aus dem Trockenmycel (ca. 8 g aus 1 l einer 6-Tage-Kultur) konnten wir eine weitere kleine Menge von Ergolencarbonsäuren isolieren. Bei der dünn-schichtchromatographischen Unter-