

89. Synthese von 4'-Azido-3',5'-ditritio-L-phenylalanin-peptiden als «Photo-affinitätsproben» für Ligand-Rezeptor-Wechselwirkungen

Vorläufige Mitteilung¹⁾

von **Walter Fischli, Mario Caviezel, Alex Eberle, Emanuel Escher**
und **Robert Schwyzer**

Institut für Molekularbiologie und Biophysik,
Eidgenössische Technische Hochschule, Hönggerberg, CH-8093 Zürich

(17. III. 76)

The Synthesis of 4'-Azido-3',5'-ditritio-L-phenylalanine Peptides as «Photo-affinity Probes» for Ligand-Receptor Interaction, – Summary. The synthesis of L-*p*-azido-phenylalanine and peptides thereof containing tritium atoms in the *m,m'*-positions of the phenyl ring is described. Starting materials are L-*p*-amino-phenylalanine and L-*p*-amino-*m,m'*-diiodo-phenylalanine. Such peptides are being used for specific photoaffinity labelling of receptor and enzyme molecules.

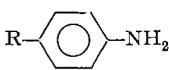
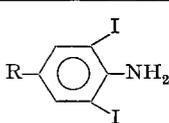
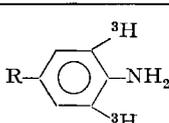
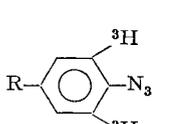
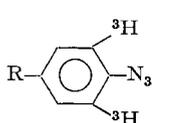
Vor einigen Jahren wurde über die Synthese von L-*p*-Azido-phenylalanin [2] und über die Verwendung von Peptiden dieser und verwandter Aminosäuren [1] zur spezifischen Markierung von Chymotrypsin [3] und Aminopeptidasen [4] berichtet. Die Spezifität ist dabei auf die Assoziation der Phenylalanin-Seitenkette mit einem speziellen topographischen Element der Enzyme zurückzuführen; die kovalente Markierung kommt durch Photolyse der Azidophenyl-Gruppe (365 nm) und Reaktion des entstandenen Nitrens mit benachbarten Teilen des Enzym-Proteins zustande. Dieser Prozess, den wir zum Auffinden spezifischer Ligand-Rezeptor-Wechselwirkungen verwenden [3], wird häufig als «Photoaffinitäts-Markierung» bezeichnet [5].

Bisher stand noch kein radioaktives L-*p*-Azido-phenylalanin zur Verfügung, und die radioaktive Markierung im Peptid musste in benachbarte Aminosäuren eingebaut sein [3] [4]. Dieses Vorgehen ist mit der Gefahr behaftet, dass trotz kovalenter Bindung des Phenylalanins an die Rezeptor-Molekel die Radioaktivität durch hydrolytische Prozesse verlorengehen könnte.

Wir beschreiben hier die Herstellung von L-4'-Azido-3',5'-ditritio-phenylalanin (**4**) und von N(α)-Benzyloxycarbonyl-L-alanyl-L-alanyl-L-(4'-azido-3',5'-ditritio)-phenylalanin (**5**), Z · Ala-Ala-Phe(N₃, t₂) · OH. Die Synthese ist so angelegt, dass die Tritiumatome möglichst spät ins Peptid eingeführt werden können, was zur Verminderung von unerwünschten Nebenreaktionen beiträgt (Tabelle).

¹⁾ Diese Arbeit wurde vom *Schweizerischen Nationalfonds zur Förderung der wissenschaftlichen Forschung* unterstützt und ist ein Teil der Dissertation von *W. F.* Zu Nomenklatur und Abkürzungen vgl. [1]. Stellenzahlen mit Index (4' etc.) beziehen sich auf den Phenylkern des Phenylalanins.

Tabelle. Synthese von L-4'-Azido-3',5'-ditritio-phenylalanin (**4**) und von N(α)-Benzyloxycarbonyl-L-alanyl-L-alanyl-L-(4'-azido-3',5'-ditritio)-phenylalanin (**5**)²⁾

No.	—R	Verbindung	Bemerkungen
1	$\begin{array}{c} \text{COOH} \\ \\ -\text{CH}_2-\text{CH} \\ \\ \text{NH}_2 \end{array}$		Synthese nach [2]
2	$\begin{array}{c} \text{COOH} \\ \\ -\text{CH}_2-\text{CH} \\ \\ \text{NH}_2 \end{array}$		Jodierung von 1 mit J ₂ kristallisiert, analysenrein
3	$\begin{array}{c} \text{COOH} \\ \\ -\text{CH}_2-\text{CH} \\ \\ \text{NH}_2 \end{array}$		Katalytische Tritiierung von 2 nach [6]; 16,0 ± 5 Ci/mmol (Mengenbestimmung kolorime- trisch, mit grossem Fehler)
4	$\begin{array}{c} \text{COOH} \\ \\ -\text{CH}_2-\text{CH} \\ \\ \text{NH}_2 \end{array}$		Verdünnen von 3 mit 9facher Menge nicht-radioaktiver Sub- stanz, Diazotieren und Umsetzen mit NaN ₃ . 1,92 Ci/mmol (Men- genbestimmung kolorimetrisch, mit grossem Fehler)
5	$\begin{array}{c} \text{Z} \cdot \text{Ala}-\text{Ala}-\text{NH} \\ \\ -\text{CH}_2-\text{CH} \\ \\ \text{COOH} \end{array}$		Synthese analog [1]; 2,39 Ci/mmol (Mengenbestimmung durch Ein- waage, kleiner Fehler); Eigen- schaften sonst identisch mit den- nen des nicht-radioaktiven Tri- peptides [1]

LITERATURVERZEICHNIS

- [1] E. Escher & R. Schwyzer, *Helv.* 58, 1465 (1975).
 [2] R. Schwyzer & M. Caviezel, *Helv.* 54, 1395 (1971).
 [3] E. Escher & R. Schwyzer, *FEBS Letters* 46, 347 (1974).
 [4] E. Escher, R. Jost, H. Zuber & R. Schwyzer, *Israel J. Chemistry* 12, 129 (1974).
 [5] G. W. Fleet, R. R. Porter & J. R. Knowles, *Nature* 224, 511 (1969); H. R. Kiefer, J. Lindstrom, E. S. Lennox & S. J. Singer, *Proc. nat. Acad. Sci. U. S.* 67, 1688 (1970).
 [6] R. Schwyzer & G. Karlaganis, *Liebigs Ann. Chem.* 760, 1298 (1973).

²⁾ Alle Verbindungen sind dünnschichtchromatographisch einheitlich (Sprühreagentien und Autoradiographie).