

Zur Synthese von Human-Big-Gastrin I und seinem 32-Leucin-Analogen¹

4. Mitt.²: Reindarstellung und Charakterisierung
der synthetischen Tetratriacontapeptid-amide

**Ernst Jaeger, Manfred Gemeiner, Walter Goehring, Siegwald Knof,
Regina Scharf, Paul Thamm, Gerhard Wendlberger und Erich Wünsch***

Abteilung für Peptidchemie, Max-Planck-Institut für Biochemie,
D-8033 Martinsried bei München, Bundesrepublik Deutschland

(Eingegangen 7. August 1979. Angenommen 4. September 1979)

*The Synthesis of Human Big Gastrin I and Its 32-Leucine Analogue IV.
Purification and Characterization of the Synthetic Tetratriacontapeptide Amides*

The preparation of the pure tetratriacontapeptide amide <Glu-Leu-Gly-Pro-Gln-Gly-His-Pro-Ser-Leu-Val-Ala-Asp-Pro-Ser-Lys-Lys-Gln-Gly-Pro-Trp-Leu-Glu-Glu-Glu-Glu-Glu-Ala-Tyr-Gly-Trp-Met-Asp-Phe-NH₂ (human big gastrin I) and the analogue Leu³²-human big gastrin I from the crude synthetic materials obtained after deblocking of the overall protected tetratriacontapeptide amide derivatives by means of trifluoroacetic acid is described. The criteria for homogeneity obtained by chromatographic, electrophoretic, enzymatic and spectroscopic methods are reported.

(Keywords: Human big gastrin I; Leu³²-human big gastrin I; Synthetic peptide hormones)

Abkürzungen: Es werden hier die von der IUPAC-IUB Commission on Biochemical Nomenclature empfohlenen Abkürzungen für Aminosäuren und Schutzgruppen verwendet. *Andere Abkürzungen:* HBG-I = Human-Big-Gastrin I; LHBG-I = 32-Leucin-Human-Big-Gastrin I; HBG-[1—20] = N-terminale Teilsequenz [1—20] des Human-Big-Gastrins I; HG-17-I = Human-Gastrin I; LHG-17-I = 15-Leucin-Human-Gastrin I; HG-13-I = Human-Minigastrin I; LHG-13-I = 11-Leucin-Human-Minigastrin I. [Anm.: Auf Grund der kürzlich erfolgten Strukturkorrektur (R. A. Gregory, H. J. Tracy, J. I. Harris, M. J. Runswick, S. Moore, G. W. Kenner und R. Ramage, Hoppe-Seylers Z. physiol. Chem. **360**, 73, 1979) sind HG-13-I und LHG-13-I neuerdings richtiger als Des-1-Tryptophan-Human-Minigastrin I bzw. [Des-1-Tryptophan]-11-Leucin-Human-Minigastrin I zu bezeichnen].

Ergebnisse und Diskussion

In der vorausgehenden Mitteilung² haben wir die Synthese der geschützten Tetratriacontapeptid-amide mit den Sequenzen von Human-Big-Gastrin I (HBG-I) und seinem 32-Leucin-Analogen (LHBG-I) sowie des entsprechenden N-terminalen Eicosapeptid-Derivates (Teilsequenz 1—20; HBG-[1—20]) beschrieben. Nach üblicher Abspaltung aller Schutzgruppen von diesen Peptid-Derivaten durch Einwirkung von wasserfreier Trifluoressigsäure in Anwesenheit von Anisol und Ethandithiol als „Scavenger“ wurde aus <Glu-Leu-

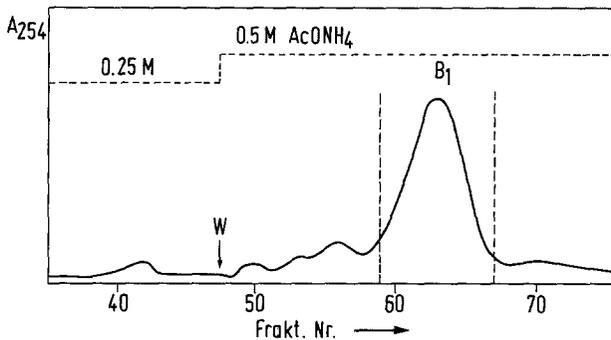


Abb. 1. Ionenaustauschchromatographie von rohem, synthetischem Human-Big-Gastrin I (Fraktion HBG-A) an DEAE-Sephadex A-25; Elutionskurve

Gly-Pro-Gln-Gly-His(*Adoc*)-Pro-Ser(*Bu^t*)-Leu-Val-Ala-Asp(*OBu^t*)-Pro-Ser(*Bu^t*)-Lys(*Boc*)-Lys(*Boc*)-Gln-Gly-Pro-Trp-Leu-Glu(*OBu^t*)-Glu(*OBu^t*)-Glu(*OBu^t*)-Glu(*OBu^t*)-Ala-Tyr(*Bu^t*)-Gly-Trp-Met-Asp(*OBu^t*)-Phe-NH₂ [1—34a]² rohes Human-Big-Gastrin I (HBG-A), aus dem entsprechenden Leu³²-Analogon [LHBG 1—34a]² rohes 32-Leucin-Human-Big-Gastrin I (LHBG-A) und aus <Glu-Leu-Gly-Pro-Gln-Gly-His(*Adoc*)-Pro-Ser(*Bu^t*)-Leu-Val-Ala-Asp(*OBu^t*)-Pro-Ser(*Bu^t*)-Lys(*Boc*)-Lys(*Boc*)-Gln-Gly-Pro-OH [1—20a]² die rohe Teilsequenz 1—20 (HBG-[1—20]-A) erhalten.

Für die Isolierung von reinem HBG-I aus dem „Spaltungs-Rohprodukt“ HBG-A wurde dieses zu Vorreinigung und zum Austausch der Trifluoressigsäure-Ionen zunächst einer Ionenaustauschchromatographie an DEAE-Sephadex A-25 unterworfen (siehe Abb. 1). Diese erste Reinigungsoperation führte aber nicht zur vollständigen Abtrennung der im Dünnschichtchromatogramm des Rohproduktes (siehe Abb. 2a) erkennbaren Verunreinigungen: Die erhaltene Hauptfraktion HBG-B₁

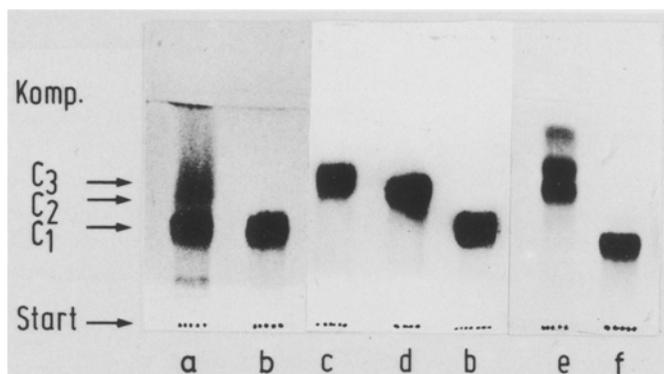


Abb. 2. Dünnschichtchromatographie auf Kieselgel-60-Fertigplatten (Merck) in Butanol-(2)/Propanol-(2)/0,9proz. Monochloressigsäure (30:4:26); Anfärbung mit Chlor/Tolidin-Reagens. *a* Roh-Human-Big-Gastrin I (HBG-A); *b* Reines synthetisches Human-Big-Gastrin I (= Fraktion HBG-C₁); *c* Fraktion HBG-C₃ (nach Verteilungschromatographie); *d* Fraktion HBG-C₂; *e* Mischung *tert*-butylierter Nebenprodukte von LHBG (= Fraktionen LHBG-C₂ + LHBG-C₃); *f* Reines synthetisches Leucin-Human-Big-Gastrin I (= Fraktion LHBG-C₁)

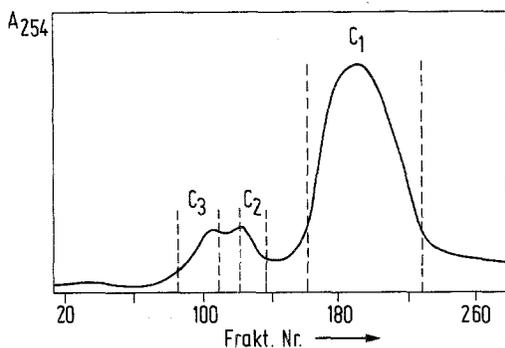


Abb. 3. Verteilungschromatographie von vorgereinigtem Human-Big-Gastrin (Fraktion HBG-B₁) an Sephadex G-25 im Zweiphasensystem Butanol-(2)/Ethanol/0,1M-Ammoniumacetat-Lösung (25:0,8:20); *pH* 8,0 in der Unterphase. Elutionskurve

war noch durch einige Nebenprodukte verunreinigt, die gegenüber dem „Hauptfleck“ höhere R_F -Werte aufwiesen.

Auf Grund unserer Erfahrungen bei der Reindarstellung von Leu¹⁵-Human-Gastrin I³ und Leu¹¹-Human-Minigastrin I⁴ und unserer systematischen Untersuchungen zur Aufklärung störender Nebenreaktionen bei der Abspaltung *tert*-butyl-haltiger Schutzgruppen von geschützten Peptiden des Tryptophans⁵⁻⁷ hatten wir auch im vor-

liegenden Falle des HBG-I mit der Entstehung mehrerer Tryptophan-modifizierter Nebenprodukte gerechnet, die sich durch ihre Verteilungskoeffizienten vom Synthese-Hauptprodukt unterscheiden sollten. Tatsächlich gelang durch Verteilungschromatographie an Sephadex G-25 (siehe Abb. 3) eine weitere Auftrennung der vorge-reinigten Fraktion HBG-B₁ in die Hauptfraktion HBG-C₁ und die Nebenfraktionen HBG-C₂ und -C₃, wobei die Vollständigkeit des erzielten Trenneffektes auch durch den dünn-schichtchromatographischen Test unterstrichen wurde (siehe Abb. 2b—d). Erwartungsgemäß

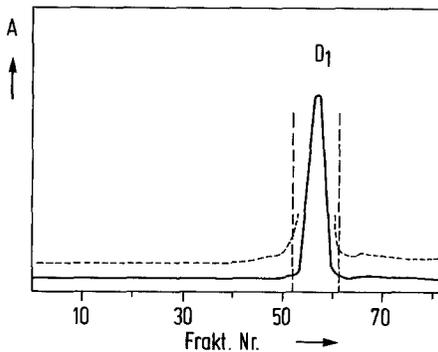


Abb. 4. Gelfiltration von synthetischen Human-Big-Gastrin I (Fraktion HBG-C₁) an Bio-Gel P-4 in 0,025 M Ammoniumacetat-Lsg. (pH 8,0); Elutionskurve. Absorptionsmessung (Uvicord-III) bei 278 nm (—) bzw. 206 nm (---)

konnten in den Nebenprodukten *tert*-butylierte Tryptophan-Reste mittels ¹H-NMR-Spektroskopie nachgewiesen werden. Das Auftreten von *tert*-Butyl-Singulettts mit chemischen Verschiebungen bei 1,68 ppm und 1,15 ppm (bei Fraktion HBG-C₃) sowie 1,46 ppm und 1,36 ppm (bei Fraktion HBG-C₂) zeigte — zusammen mit der ebenfalls ermittelten Aminosäurezusammensetzung — das Vorliegen von HBG-I-Produkten an, die in den Positionen 1, 2 (oder 7), 3 und 5 des Tryptophan-Indolrings *tert*-butyliert waren (vgl. hierzu Lit.^{6,7}).

Die isolierte Hauptfraktion HBG-C₁ wurde — besonders zur vorteilhaften Entfernung der bei vorangegangenen Chromatographie-Prozessen eingeschleppten Fremdstoffe — einer dritten Reinigungsoperation durch Gelfiltration an Bio-Gel P-4 unterworfen (siehe Abb. 4); dieses Trägermaterial erwies sich günstiger als das ursprünglich verwendete Bio-Gel P-6¹. Eine Abtrennung weiterer, bisher nicht erkannter peptidartiger Nebenprodukte von der Hauptkomponente HBG-D₁ konnte auf Grund der erhaltenen Elutionskurve ausgeschlossen werden.

Das aus HGB-D₁ durch Gefriertrocknung in fester Form erhaltene Peptidmaterial erschien dünnschichtchromatographisch vor allem im System Butanol-(2)/Propanol-(2)/0,9proz. Monochloressigsäure (30:4:26) (siehe Abb. 2) und dünnschichtelektrophoretisch im System Pyridin/Ameisensäure/Wasser (10:1:89; *pH* 6,0) einheitlich; es zeigte die für Human-Big-Gastrin I zu erwartende Aminosäurezusammen-

Tabelle 1. Aminosäureanalysen von synthetischem Human-Big-Gastrin I nach saurer Hydrolyse mit 6N-HCl (24 h; 110 °C) unter Zusatz von Thioglykolsäure¹⁶ (2,5%); Doppelbestimmung

	Fraktion HGB-D ₁		Ber. Verh. für Human-Big-Gastrin I
	Analyse A	Analyse B	
Lys	1,99	1,98	2
His	0,99	1,01	1
Trp	1,96	1,94	2
Asp	2,00	2,01	2
Ser	2,04	2,06	2
Glu	8,00	8,01	8
Pro	4,00	4,00	4
Gly	3,94	3,96	4
Ala	1,99	2,01	2
Val	1,01	1,01	1
Met	1,02	1,01	1
Leu	3,01	3,00	3
Tyr	1,01	1,01	1
Phe	1,01	1,02	1
Peptidgehalt	79,9%	80,2%	

setzung einschließlich der Tryptophan-Werte nach saurer Hydrolyse unter Zusatz von Thioglykolsäure (siehe Tab. 1) und erwies sich somit als das gewünschte Tetratriakontapeptid-amid <Glu-Leu-Gly-Pro-Gln-Gly-His-Pro-Ser-Leu-Val-Ala-Asp-Pro-Ser-Lys-Lys-Gln-Gly-Pro-Trp-Leu-Glu-Glu-Glu-Glu-Glu-Ala-Tyr-Gly-Trp-Met-Asp-Phe-NH₂ (HBG-I), dessen Homogenität zusätzlich durch mikropräparative trägerfreie Hochspannungselektrophorese (siehe Abb. 5a) und durch Hochdruckflüssigkeitschromatographie (HPLC; siehe Abb. 6a) gesichert wurde: Bei beiden Verfahren konnten keinerlei Nebenprodukte sichtbar gemacht werden. Nach Isolierung des Peptids im Anschluß an die erstere Testmethode waren alle Analysendaten identisch mit denen der Fraktion HGB-D₁.

Die Leistungsfähigkeit der trägerfreien Hochspannungselektrophorese und der HPLC-Methode* hinsichtlich der Abtrennung von N- und C-terminalen Teilstücken des Big-Gastrins wurde anhand einer Mischung von HBG-I mit HBG-[1—20] (= N-terminale HBG-Teilsequenz [1—20]; siehe unten), HG-17-I (= Pyr¹⁸-Analogon der

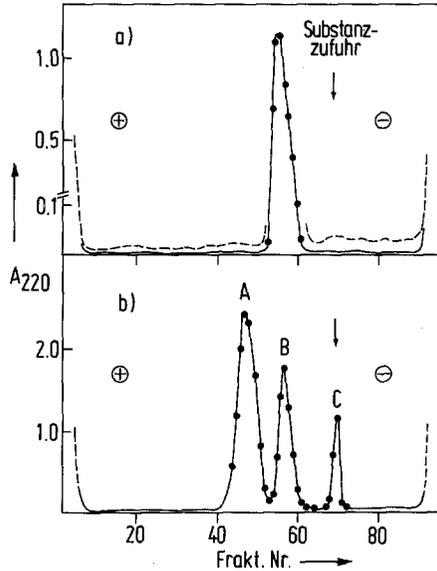


Abb. 5. Trägerfreie kontinuierliche Elektrophorese: *a* von synthetischem Human-Big-Gastrin I (Fraktion HBG-D₁; 13 mg) in 0,014*M*-Ammoniumacetat-Lösung (*pH* 8,25); 2000 V, 88 mA. Schichtdicke bei Absorptionsmessung (PMQ-II): 1 cm (— — —), bzw. 0,1 cm (— — —); *b* einer Mischung von Human-Big-Gastrin I (Fraktion HBG-D₁; 2,6 mg), Human-Gastrin I (1,5 mg), Human-Minigastrin I (2,0 mg) und der Teilsequenz Human-Big-Gastrin-[1—20] (2,1 mg) (Bedingungen wie bei *a*): Schichtdicke: 1,0 cm. A: HG-13-I + HG-17-I; B: HBG-I; C: HBG-[1—20]

C-terminalen HBG-Teilsequenz [18—34]) und HG-13-I (= C-terminale HBG-Teilsequenz [22—34]) demonstriert. Die gute Auftrennung der genannten Peptide und somit auch die Möglichkeit zum Nachweis

* Vgl. die vorläufige Mitteilung: W. Goehring, L. Moroder und E. Wunsch, in *Hormone Receptors in Digestion and Nutrition* (Ed., G. Rosselin et al.), Proceedings of the 2nd International Symposium on Hormonal Receptors in Digestive Tract Physiology, Montpellier, Frankreich, Mai 1979, Elsevier/North Holland Biomedical Press 1979, S. 127. (Anm.: In der Abb. 1 dieser Arbeit sind die Buchstaben B und C irrtümlicherweise vertauscht.)

dieser (und gegebenenfalls anderer!) Teilsequenzen neben der HBG-Gesamtsequenz wird an den Abbildungen 5b und 6a (bzw. Abb. 6b) ersichtlich:

Bei der elektrophoretischen Methode ließen sich alle untersuchten Teilstücke von Human-Big-Gastrin I gut abtrennen (dabei blieben allerdings HG-13-I und HG-17-I ungetrennt; siehe Peak A in Abb. 5b; die Zusammensetzung der Peaks A, B und C wurde durch HPLC- und Dünnschichtchromatographie-Teste ermittelt).

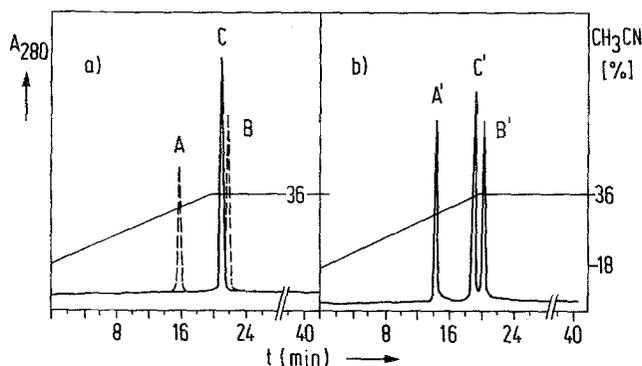


Abb. 6. Analytische Hochdruckflüssigkeitschromatographie: *a*) von synthetischem Human-Big-Gastrin I ohne (—) und mit (---) Beimengung von Human-Gastrin I, Human-Minigastrin I und der Teilsequenz Human-Big-Gastrin-[1—20]. A: HG-13-I (15,6 min); B: HG-17-I (21,6 min); C: HBG-I (20,8 min); *b*) von einer Mischung des synthetischen 32-Leucin-Human-Big-Gastrins I mit 15-Leucin-Human-Gastrin I und 11-Leucin-Minigastrin I. A': LHG-13-I (14,2 min); B': LHG-17-I (20,2 min); C': LHBG-I (19,1 min). Säule: μ -Bondapak C-18; Elutionsmittel: 0,01M-Ammoniumacetat-Lsg. (*pH* 4,5)/Acetonitril (linearer Gradient von 18 bis 36%, 20 min); Durchflußgeschwindigkeit: 1,7 ml/min

Auch bei der HPLC-Methode konnte diese Abtrennung erzielt werden* (siehe Abb. 6a; vgl. Abb. 6b zur Trennung der Leucin-Analoga LHBG-I, LHG-17-I und LHG-13-I), wobei jedoch die Teilsequenz [1—20] unter den Versuchsbedingungen nicht mehr von der Säule eluiert wurde und deshalb einem Nachweis entzogen blieb. Durch kombinierte Beurteilung der Ergebnisse der beiden Testmethoden können sichere Aussagen über das Vorliegen von Sequenzbruchstücken

* Bei der HPLC-Technik war außerdem im Gegensatz zum trägerfreien Hochspannungselektrophorese-Verfahren auch eine Trennung der methioninhaltigen Peptide von den entsprechenden Leucin-Analoga möglich; vgl. die Retentionszeiten in den Abb. 6a und 6b.

im Syntheseprodukt erhalten werden: Die in den Abb. 5a und 6a gezeigten Resultate sichern einen hohen Reinheitsgrad des synthetischen HBG-I.

Der Nachweis für die Unversehrtheit des 2-Pyrrolidon-5-carbonsäure-Restes in Position 1 sowie des Tryptophan- bzw. Methionin-Restes in Position 31 bzw. 32 wurde mittels enzymatischer Methoden geführt. Die N-terminale „Pyroglutaminsäure“ konnte mit Pyro-

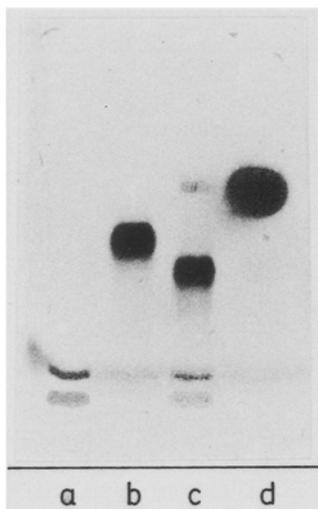


Abb. 7. Dünnschichtchromatographischer Nachweis der Pyroglutaminsäure-Abspaltung von synthetischem Human-Big-Gastrin I mittels Pyroglutamat-Aminopeptidase auf Kieselgel-60-Fertigplatten (Merck) in *n*-Butanol/Eisessig/Pyridin/Wasser (60:6:40:24); *a* Pyroglutamat-Aminopeptidase; *b* reines HBG-I (Fraktion D₁); *c* Inkubationsansatz (siehe exp. Teil) nach 40 h; *d* 2-Pyrrolidon-5-carbonsäure

glutamat-Aminopeptidase bei geeigneter Wahl der Spaltungsbedingungen ohne nennenswerte Hydrolyse der Restsequenz [2—34] vollständig abgespalten werden, wie der dünnschichtchromatographische Vergleich des enzymatischen Hydrolysates mit HBG-D₁ und mit authentischer 2-Pyrrolidon-5-carbonsäure (siehe Abb. 7) zeigte; mit der in der Literatur angegebenen Methode⁹ konnte keine befriedigende Spaltung von Human-Big-Gastrin I erzielt werden. Mit Aminopeptidase M⁸ (Produkt Boehringer) gelang — offensichtlich durch begleitende „Fremdenzyme“ (Dipeptidyl-Aminopeptidase und Pro-X- bzw. X-Pro-spaltende Enzyme) — eine sehr weitgehende Hydrolyse (siehe Tab. 2), eingeleitet durch Abspaltung des Dipeptids

Tabelle 2. Aminosäureanalysen von synthetischem Human-Big-Gastrin I nach Inkubation mit verschiedenen Aminopeptidase-M-Präparationen. a) Spaltung mit Boehringer-Enzym, Kat.-Nr. 102768; Kontr.-Nr. 1248215, b) Spaltung mit Sigma-Enzym, Typ VI-S, Kat.-Nr. L 6007, Lot.-Nr. 67 C-85001

	a)	b)	Ber. Verh. für Human-Big-Gastrin I
Lys	1,91	0,79	2
His	0,97	0,19	1
Trp	1,96	1,98	2
Asp	1,90	1,11	2
Gln	1,64	1,00	2
Ser	1,89	0,84	2
Glu	4,55	4,32	6
Pro	3,63	0,35	4
Gly	3,68	1,14	4
Ala	1,90	1,38	2
Val	1,03	0,61	1
Met	1,00	0,99	1
Leu	1,94	1,39	3
Tyr	0,99	0,99	1
Phe	1,01	1,01	1
Met-S-oxid	—	—	—

<Glu-Leu-OH (Sequenzposition 1—2). Die berechneten Mengen an Tryptophan und Methionin konnten nahezu quantitativ ermittelt werden; Methionin-S-oxid lag nicht vor. Bei Verwendung anderer Enzym-Chargen wurde entweder keine (*Röhm* u. *Haas*, Darmstadt) oder nur eine unvollständige Hydrolyse (*Sigma*) erzielt (vgl. Tab. 2). Dennoch ist auch hier die Absicherung einer Nichtoxidation des Methionin-Restes gegeben.

Zur weiteren Charakterisierung des synthetischen Hormons dienten folgende spektroskopischen Eigenschaften:

a) Eine sehr spezifische Circular dichroismus-Kurve mit einem Minimum bei 196,5 nm (siehe Abb. 8) weist die neutrale Lösung (0,1M-Ammoniumborat-Puffer, *pH* 7,2) von HBG-D₁ auf, was eine weitgehend „ungeordnete“ Konformation erkennen läßt (molare Elliptizität $[\Theta]_{\min} = -19750$ [Grad · cm²/Dezimal Peptidbindung]*; Literatur-

* Die in der vorläufigen Mitteilung¹ angegebenen Daten wurden an Lösungen in Wasser gemessen (die $[\Theta]$ -Werte sind auf die 34 Aminosäurereste berechnet). Wegen der unterschiedlichen Löslichkeitseigenschaften verschiedener Chargen in Wasser (abhängig von den Gefriertrocknungs- und/oder Lagerungsbedingungen) des sauren Peptids empfiehlt es sich jedoch, die Proben in verd. Ammoniak zu lösen und dann mit Borsäure-Lösung den gewünschten *pH*-Wert im Neutralbereich einzustellen.

werte^{10,11} für vollständig ungeordnete Konformation: $[\Theta]_{198} = -22800$ und $[\Theta]_{196,5} = -42000$). Aus den Meßwerten $[\Theta]_{222} = -2200$ und $[\Theta]_{208} = -8300$ läßt sich ein geringer α -Helix-Anteil von etwa 15% (entsprechend 5 Peptidbindungen) nach Lit.^{10,11} berechnen.

b) Die UV-Absorptions-Auswertung (280 nm; in Wasser) ergibt — unter Berücksichtigung des aus den quantitativen Aminosäure-

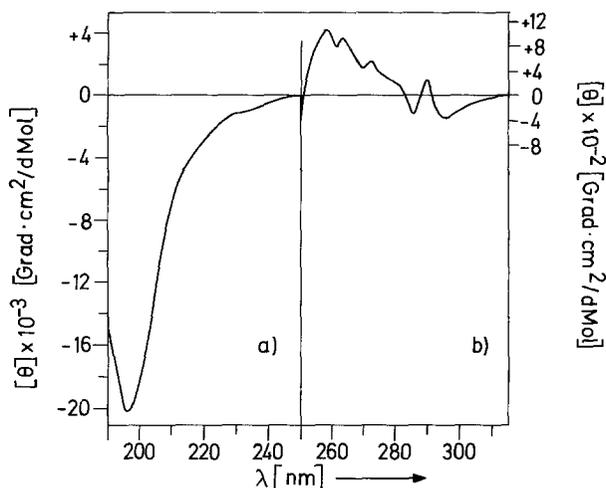


Abb. 8. Circular dichroismus-Kurve von synthetischem Human-Big-Gastrin I (Fraktion HBG-D₁) in 0,1M-Ammoniumborat-Puffer, pH 7,2: a) Im Bereich der Peptidbindungschromophore zwischen 190 nm und 250 nm („fernes UV“; Meßwerte bezogen auf Anzahl der Peptidbindungen (33)); c = 0,330 mg/ml; d = 1,000 cm. b) Im Bereich der Seitenkettenchromophore aromatischer Aminosäuren (2 Trp + 1 Tyr + 1 Phe) zwischen 250 nm und 315 nm („nahes UV“; Meßwerte bezogen auf Molekulargewicht des Tetratrikontapeptid-amids); c = 0,066 mg/ml; d = 0,100 cm

analysen ermittelten Peptidgehaltes von ca. 80% (siehe Tab. 1) — einen molaren Extinktionskoeffizienten von $\epsilon = 1,23 \cdot 10^4$; dieser Wert stimmt mit dem für die vorliegenden aromatischen Aminosäuren (2 Trp + 1 Tyr + 1 Phe) (nach Lit.¹²) berechneten Wert von 12316 ± 25 gut überein. Eine UV-spektroskopische Bestimmung des Trp/Tyr-Verhältnisses ergibt dagegen nur annähernd den erwarteten Wert (2:1): bei einer Auswertung der in 0,1N-Natronlauge gemessenen Absorptionskurve nach der *Beaven-Holiday*-Methode^{13,14} wird ein Verhältnis-

Wert von 2,3 ($\pm 0,2$): 1, bei Anwendung des *Bencze-Schmidt*-Verfahrens¹⁵ ein Wert von 2,1 ($\pm 0,2$): 1 gefunden. Auf Grund des hohen Reinheitsgrades der vermessenen Substanz kann die festgestellte Abweichung durch eine gegenseitige Beeinflussung der aromatischen Systeme der beiden Aminosäuren in den Sequenzpositionen 29 und 31 erklärt werden*.

Das Analogon Leu³²-Human-Big-Gastrin I und die N-terminale Teilsequenz HBG-[1—20] wurden in vergleichbarer Weise aus den Spaltungsrohprodukten LHBG-A bzw. HBG-[1—20]-A isoliert, rein dargestellt und hinsichtlich ihrer Reinheit analytisch überprüft.

Die biologische Aktivität des synthetischen Human-Big-Gastrins I (Fraktion HBG-D₁) wurde im Vergleich zu synthetischem 15-Leucin-Human-Gastrin I zu ca. 150% ermittelt¹⁶ (letzteres hat die gleiche biologische Aktivität wie natürliches Human-Gastrin I). Nach der Infusion von HBG-D₁ wurde ferner ein dreifach so hoher Anstieg der Konzentration an immunreaktivem Gastrin im Serum vom Hund gemessen wie nach Infusion äquimolarer Mengen an Human-Gastrin I; die Halbwertszeit für die Abnahme der Gastrin-Immunreaktivität war für HBG-I 2¹/₂ mal so lang wie für HG-I¹⁷.

Experimenteller Teil

Die Gelmaterialien Sephadex G-25, SP-Sephadex C-25 und DEAE-Sephadex A-25 wurden von der Fa. Deutsche Pharmacia (Freiburg) bzw. Bio-Gel P-4 von der Fa. Bio-Rad-Laboratories (München) bezogen. Die kontinuierlichen Absorptionsmessungen zur Ermittlung der Peptidverteilung in den Eluatensäulenchromatographischer Trennungen erfolgten mit Durchflußphotometern der Fa. LKB-Produkte (Stockholm), Modelle Uvicord I (254 nm) oder Uvicord III (206 nm bzw. 278 nm). Für die Fraktionierung der Elutionslösungen wurden Fraktionssammler der Fa. Serva-Technik (Heidelberg), Modell Linear II, verwendet. Die chromatographischen Reinheitsteste erfolgten nach den üblichen Verfahren der Dünnschicht-Chromatographie teils auf Kieselgel-60-Fertigplatten der Fa. Merck (Darmstadt), teils auf frisch bereiteten und luftgetrockneten Platten (Schichtdicke 0,3 mm) unter Verwendung von Kieselgel G (nach E. Stahl; Fa. Merck) in folgenden Lösungsmittelsystemen:

- 1) Butanol-(2)/Propanol-(2)/0,9proz. wäßr. Monochloressigsäure (30:4:26)
- 2) Butanol-(2)/Propanol-(2)/0,9proz. wäßr. Monochloressigsäure (30:4:23)
- 3) Butanol-(1)/Essigsäure/Pyridin/Wasser (45:6:20:24).

Die analytische Dünnschicht-Elektrophorese wurde in einem Gerät der Fa. Desaga (Heidelberg) auf frisch bereiteten Kieselgel-G-Platten (Schichtdicke 0,3 mm) in folgendem Puffersystem durchgeführt: Pyridin/Ameisensäure/Wasser (10:1:89) (*pH* 6,0). Zur Anfärbung der entwickelten und getrockneten

* Weitere Versuche zur Beweisführung dieses Phänomens sind im Gange (vgl. auch Lit.⁴).

Chromatogramme bzw. Elektropherogramme wurde das Chlor-Tolidin-Reagens¹⁸ verwendet. Für die mikropräparative, trägerfreie Hochspannungselektrophorese diente ein Gerät der Fa. Bender u. Hobein (München), Modell VaP₂; die Peptidverteilung in den Auffanggläschen wurde durch Messung der Absorption mit einem Spektralphotometer PMQ-II der Fa. Carl Zeiss (Oberkochen) bei einer Schichtdicke von 1 cm ermittelt. Für die Hochdruckflüssigkeitschromatographie wurde ein Gerät der Fa. Waters (Königstein/Ts.) verwendet, bestehend aus Steuergerät Modell 660, Einspritzblock U 6K, 2 Pumpen Modell 6000A und UV-Spektralphotometer Modell 450.

Die Aminosäureanalysen nach saurer Hydrolyse mit 6M-HCl (20 h; 110 °C) unter Thioglykolsäurezusatz (2,5%) für tryptophanhaltige Peptide¹⁹ wurden an einem „Amino-Acid-Analyser“ der Fa. Beckman Instruments (Modelle 120 B bzw. Multichrom B) durchgeführt und mit einem „Automatic Digital Integrator“ (Modell 125 bzw. 4281) ausgewertet.

Pyroglutamat-Amino-peptidase (L-Pyroglutamyl-peptid-Hydrolase, aus Kalbsleber, EC 3.4.11.8; Kat.-Nr. 200336, Kontr.-Nr. 1497106) und Amino-peptidase M⁸ (α -Amino-acyl-peptid-Hydrolase, microsomal, EC 3.4.11.2; Kat.-Nr. 102768, Kontr.-Nr. 1187515) wurden von der Fa. Boehringer (Mannheim) bzw. letzteres Enzym (Typ VI-S, Kat.-Nr. L-6007, Lot-Nr. 67 C-85001) auch von der Fa. Sigma-Chemie (Taufkirchen b. München) bezogen.

11-Leucin-Human-Minigastrin I (LHG-13-I), 15-Leucin-Human-Gastrin I (LHG-17-I) und Human-Gastrin I (HG-17-I) wurden in unserem Laboratorium synthetisiert (siehe Lit.^{4,5} bzw. unveröffentlichte Ergebnisse), Human-Minigastrin I (HG-13-I) von Herrn Dr. *Gillessen* (Hoffmann-La Roche, Basel) für diese Versuche zur Verfügung gestellt.

Zur Aufnahme der UV-Absorptionsspektren diente ein registrierendes Doppelstrahl-Spektralphotometer der Fa. Varian (Darmstadt), Modell Cary 118C. Die Circular dichroismus-Kurven wurden an einem CD-Gerät Dichrograph Mark III der Fa. Instruments SA, Division Jobin-Yvon (Paris) aufgenommen und mit einem angeschlossenen Datensystem Nicolet BNC-12 durch Mittelwertbildung aus 20–30 „repetitive scans“ ausgewertet.

I. Demaskierung der geschützten Peptide

1. L-2-Pyrrolidon-5-carbonyl-L-leucyl-glycyl-L-prolyl-L-glutaminyl-glycyl-L-histidyl-L-prolyl-L-seryl-L-leucyl-L-valyl-L-alanyl-L-asparagyl-L-prolyl-L-seryl-L-lysyl-L-lysyl-L-glutaminyl-glycyl-L-prolyl-L-tryptophyl-L-leucyl-L-glutamyl-L-glutamyl-L-glutamyl-L-glutamyl-L-glutamyl-L-alanyl-L-tyrosyl-glycyl-L-tryptophyl-L-methionyl-L-asparagyl-L-phenylalaninamid (HBG-A)

150 mg (0,031 mmol) <Glu-Leu-Gly-Pro-Gln-Gly-His(*Adoc*)-Pro-Ser(*Bu*^t)-Leu-Val-Ala-Asp(*OBu*^t)-Pro-Ser(*Bu*^t)-Lys(*Boc*)-Lys(*Boc*)-Gln-Gly-Pro-Trp-Leu-Glu(*OBu*^t)-Glu(*OBu*^t)-Glu(*OBu*^t)-Glu(*OBu*^t)-Glu(*OBu*^t)-Ala-Tyr(*Bu*^t)-Gly-Trp-Met-Asp(*OBu*^t)-Phe-NH₂ (vgl.²) werden unter Argonatmosphäre nach Zusatz von 0,5 ml Anisol und 0,15 ml Ethandithiol-(1,2) mit 15 ml wasserfreier, eiskalter Trifluoressigsäure übergossen und 2 h bei Raumtemperatur stehengelassen; hierbei tritt Lösung ein. Anschließend werden der Reaktionslösung 100 ml absol. Ether zugesetzt, 15 min gerührt, das ausgeflockte Material abfiltriert, mit viel absol. Ether gewaschen und schließlich im Vak. getrocknet: fast farbloses Pulver, Ausb. 135 mg Rohprodukt (84,7% bei einem Peptidgehalt von 74,7%).

2. *L-2-Pyrrolidon-5-carbonyl-L-leucyl-glycyl-L-prolyl-L-glutaminyl-glycyl-L-histidyl-L-prolyl-L-seryl-L-leucyl-L-valyl-L-alanyl-L-asparagyl-L-prolyl-L-seryl-L-lysyl-L-lysyl-L-glutaminyl-glycyl-L-prolyl-L-tryptophyl-L-leucyl-L-glutamyl-L-glutamyl-L-glutamyl-L-glutamyl-L-alanyl-L-tyrosyl-glycyl-L-tryptophyl-L-leucyl-L-asparagyl-L-phenylalaninamid* (Leu³²-HBG-A)

100 mg (0,021 mmol) <Glu-Leu-Gly-Pro-Gln-Gly-His(*Adoc*)-Pro-Ser(*Bu*^t)-Leu-Val-Ala-Asp(*OBu*^t)-Pro-Ser(*Bu*^t)-Lys(*Boc*)-Lys(*Boc*)-Gln-Gly-Pro-Trp-Leu-Glu(*OBu*^t)-Glu(*OBu*^t)-Glu(*OBu*^t)-Glu(*OBu*^t)-Glu(*OBu*^t)-Ala-Tyr(*Bu*^t)-Gly-Trp-Leu-Asp(*OBu*^t)-Phe-NH₂ (vgl.²) werden unter Argonatmosphäre mit 0,5 ml Anisol und 0,1 ml Ethandithiol-(1,2) vermischt, mit 8 ml wasserfreier, eiskalter Trifluoressigsäure übergossen und 2 h bei Raumtemp. stehengelassen; hierbei tritt Lösung ein. Anschließend wird die Reaktionslösung mit absol. Ether versetzt und 15 min gerührt. Der dabei gebildete Niederschlag wird auf das Filter gebracht, mit viel absol. Ether gewaschen und schließlich im Vak. getrocknet: fast farbloses, amorphes Pulver. Ausb. 75 mg Rohprodukt (71,3% bei einem Peptidgehalt von 76,3%).

3. *L-2-Pyrrolidon-5-carbonyl-L-leucyl-glycyl-L-prolyl-L-glutaminyl-glycyl-L-histidyl-L-prolyl-L-seryl-L-leucyl-L-valyl-L-alanyl-L-asparagyl-L-prolyl-L-seryl-L-lysyl-L-lysyl-L-glutaminyl-glycyl-L-prolin* (HBG-[1—20]-A)

200 mg (0,077 mmol) <Glu-Leu-Gly-Pro-Gln-Gly-His(*Adoc*)-Pro-Ser(*Bu*^t)-Leu-Val-Ala-Asp(*OBu*^t)-Pro-Ser(*Bu*^t)-Lys(*Boc*)-Lys(*Boc*)-Gln-Gly-Pro-OH (vgl.²) werden unter Argonatmosphäre mit 10 ml wasserfreier, eiskalter Trifluoressigsäure übergossen und 1,5 h bei Raumtemp. stehengelassen; dabei tritt Lösung ein. Anschließend wird die Hälfte der Trifluoressigsäure im Vak. abdestilliert und das verbleibende Gemisch mit 150 ml absol. Ether versetzt. Der Niederschlag wird abfiltriert, mit absol. Ether gewaschen und schließlich im Vak. getrocknet: fast farbloses amorphes Pulver. Ausb. 180 mg Rohprodukt (90,1% bei einem Peptidgehalt von 78%).

II. Reinigung der Rohprodukte

4. Reinigung von Roh-Human-Big-Gastrin I

a) Durch Ionenaustauschchromatographie an DEAE-Sephadex A-25:

In eine Chromatographiesäule von 40 cm Länge und 2 cm Innendurchmesser wird ein wie üblich mit Startpuffer (0,25*M*-Ammoniumacetat-Lösung, *pH* 6,8) äquilibrierter Ionenaustauscher DEAE-Sephadex A-25 (Acetat-Form) gefüllt. Man bringt die Lösung von 180 mg des rohen HBG-A (siehe unter 1.) in 10 ml 1proz. Ammoniak-Lösung auf die Säule, eluiert bei einer Durchflußgeschwindigkeit von 76 ml/h zunächst mit ca. 1,81 Startpuffer-Lösung und anschließend mit 0,50*M*-Ammoniumacetat-Lösung *pH* 6,8. Das Eluat wird in Fraktionen zu je 38 ml aufgefangen. Nach Vereinigung der Fraktionen Nr. 11 bis 20 (gezählt ab Pufferwechsel, W in Abb. 1) und Lyophilisation erhält man 113 mg vorgereinigtes Human-Big-Gastrin I (HBG-B). Chromatographisch inhomogen im Lösungsmittelsystem Nr. 1.

b) Durch Verteilungschromatographie an Sephadex G-25:

Lösungsmittelsystem: Zu einer Mischung von 2,5 l speziell gereinigtem (vgl. Lit.²⁰) sek.-Butanol, 80 ml absol. Ethanol und 2,0 l 0,1*M*-Essigsäure-Lösung wird

so lange konz. Ammoniak-Lösung gegeben, bis ein *pH*-Meter, dessen Glaselektrode in die vor der jeweiligen Messung abgetrennte Unterphase getaucht wird, einen *pH*-Wert von 8,0 anzeigt.

Durchführung der Trennung: In eine Chromatographiesäule von 200 cm Länge und 2 cm Innendurchmesser wird ein mehrere Stunden mit der Unterphase des o. a. Lösungsmittelsystems äquilibriertes Sephadex G-25 fine eingefüllt. Anschließend wird wie üblich bis zum Durchbruch mit der Oberphase des o. a. Lösungsmittelsystems gespült. Man bringt die Lösung von 60 mg des vorgereinigten (siehe unter a) HBG-B in 15 ml Oberphase auf die Säule und eluiert dann mit Oberphase bei einer Durchflußgeschwindigkeit von 24 ml/h. Das Eluat fängt man in Fraktionen zu je 6 ml auf*. Die Elutionskurve (vgl. Abb. 3) zeigt eine Auftrennung in eine Hauptkomponente C_1 und zwei Nebenkomponten C_2 bzw. C_3 . Nach Vereinigung der Fraktionen Nr. 161 bis 228 (für C_1) dampft man das *sek.*-Butanol im Vak. ab und lyophilisiert die verbleibende wäßrige Lösung. Der Rückstand wird in 0,5proz. Ammoniak-Lösung aufgenommen und nach Ultrafiltration erneut lyophilisiert. Man isoliert 42,5 mg der Hauptkomponente HBG- C_1 , die sich im Lösungsmittelsystem Nr. 1 als chromatographisch rein erweist.

In gleicher Weise isoliert man aus den Fraktionen Nr. 120—136 bzw. Nr. 85—108 die Nebenkomponten C_2 (3,0 mg) bzw. C_3 (2,5 mg).

$^1\text{H-NMR}$ [1% ND_3 in D_2O , $M_{\text{e}_4\text{Si}} = 0$]; HBG- C_2 : zusätzlich (gegenüber HBG- C_1) Singulets bei 1,46 ppm und 1,36 ppm; HBG- C_3 : zusätzliche Singulets bei 1,68 ppm und 1,15 ppm.

c) Durch Gelfiltration an Bio-Gel P-4

In eine Chromatographiesäule von 200 cm Länge und 4 cm Innendurchmesser wird ein in 0,025*M*-Ammoniumacetat-Lösung (*pH* 8,0) gequollenes Bio-Gel P-4 eingefüllt. Man bringt die Lösung von 80 mg des vorgereinigten (siehe unter b) HBG- C_1 in der o. g. Ammoniumacetat-Lösung auf die Säule und eluiert bei einer Durchflußgeschwindigkeit von 40 ml/h mit der gleichen Pufferlösung und nach Elution von insgesamt 880 ml mit einer Geschwindigkeit von 80 ml/h. Das Eluat wird in Fraktionen zu je 20 ml aufgefangen. Die Fraktionen Nr. 53—61 werden vereinigt und lyophilisiert. Die Lösung des Rückstandes in 0,5proz. Ammoniak-Lösung wird ultrafiltriert und erneut lyophilisiert. Man erhält 60 mg reines, wasserhaltiges Human-Big-Gastrin I (HBG- D_1). Peptidgehalt: 80,0%.

Chromatographisch (Lösungsmittelsystem Nr. 1; Fertigplatten) und elektroretisch rein. Aminosäureanalysen: siehe Tab. 1.

UV (H_2O) $\lambda_{\text{max}} = 280 \text{ nm}$ ($\epsilon = 1,23 \cdot 10^4$); Testmischung [Trp + Tyr + Phe, molar Verh. 2:1:1]: $\lambda_{\text{max}} = 278 \text{ nm}$ ($\epsilon = 1,24 \cdot 10^4$).

UV (0,1*N*-NaOH): $\lambda_{\text{max}} = 281 \text{ nm}$ ($\epsilon = 1,3 \cdot 10^4$); Testmischung [Trp + Tyr + Phe, molar Verh. 2:1:1]: $\lambda_{\text{max}} = 281 \text{ nm}$ ($\epsilon = 1,23 \cdot 10^4$). CD (0,1*M*-Ammonium-Borat-Puffer, *pH* 7,2): $\lambda_{\text{min}} = 196,5 \text{ nm}$ ($[\Theta] = -19750$ [$\text{Grad cm}^2/\text{Dezimol}$]). $\lambda_{\text{min}} = 295 \text{ nm}$ ($[\Theta] = -360$); $\lambda_{\text{max}} = 289 \text{ nm}$ ($[\Theta] = +275$). $\lambda_{\text{min}} = 285 \text{ nm}$ ($[\Theta] = -300$); $\lambda_{\text{max}} = 257,5 \text{ nm}$ ($[\Theta] = +1090$).

d) Durch trägerfreie kontinuierliche Elektrophorese

Durch die Trennkammer einer VaP₂-Elektrophoreseapparatur wird eine 14*mM*-Ammoniumacetat-Lösung (*pH* 8,25) als Elektrolytlösung mit einer Durchlaufgeschwindigkeit von 240 ml/h gepumpt. Bei 2000 V Klemmenspannung (ent-

* In der vorläufigen Mitteilung (Legende zu Abb. 2 in Lit.¹) sind irrtümlicherweise 12 ml statt 6 ml angegeben.

sprechend einer Feldstärke von 40 V/cm) und einem bei den gegebenen Bedingungen resultierenden Strom von 88 mA pumpt man mittels der Dosiereinrichtung eine Lösung von 12,5 mg der Fraktion HBG-D₁ in 3,5 ml derselben Ammoniumacetat-Lösung innerhalb von 40 min in die über Auffanggläschen Nr. 69 liegende Zufuhröffnung ein. Nach der Substanzeingabe wird der Durchfluß der Elektrolytlösung noch ca. 2 h fortgesetzt. Man ermittelt die Peptidverteilung mittels Extinktionsmessung bei 220 nm (PMQ-II; Schichtdicke 0,1 cm zur Messung des Peaks der Hauptsubstanz und 1,0 cm zur Ermittlung der Untergrundabsorption bzw. zur Suche nach Nebenprodukten; siehe Abb. 5a). Durch Lyophilisieren von Frakt. 53—61 werden 11,5 mg eines Peptids erhalten (Frakt. HBG-E), dessen Analysendaten mit denen von HBG-D₁ übereinstimmen (vgl. unter c).

5. Reinigung von Roh-Leucin³²-Human-Big-Gastrin I

Die Reinigung des rohen Leu³²-HBG-A wird unter den gleichen Versuchsbedingungen durchgeführt, wie für Human-Big-Gastrin I (siehe unter 4) beschrieben.

Aus 160 mg rohem Peptid (siehe unter 2) erhält man durch Ionenaustauschchromatographie an DEAE-Sephadex A-25 113 mg vorgereinigtes Leu³²-HBG-B, hieraus durch anschließende Verteilungschromatographie an Sephadex G-25 71 mg Leu³²-HBG-C₁ und nach weiterer Gelfiltration an Bio-Gel P-4 schließlich 59 mg wasserhaltiges Leu³²-Human-Big-Gastrin I (Leu³²-HBG-D₁). Peptidgehalt: 80,2%. Chromatographisch rein im Lösungsmittelsystem Nr. 2 (Fertigplatten).

Aminosäureanalyse:

	Lys	His	Trp	Asp	Ser	Glu	Pro	Gly	Ala	Val	Leu	Tyr	Phe
Ber.	2	1	2	2	2	8	4	4	2	1	4	1	1
Gef.	2,00	1,05	2,06	2,03	2,06	8,30	4,01	4,00	2,00	0,97	3,92	1,02	1,04

6. Reinigung von Roh-Human-Big-Gastrin-[1—20]

In eine Chromatographiesäule von 50 cm Länge und 2 cm Innendurchmesser wird ein wie üblich mit Startpuffer-Lösung (0,01M-Ammoniumacetat-Lösung; pH 4,5) äquilibrierter Ionenaustauscher SP-Sephadex C-25 (NH₄⁺-Form) gefüllt. 180 mg rohes HBG-[1—20]-A (siehe unter 3) werden in 10 ml 1proz. Essigsäure-Lösung gelöst, auf die Säule gebracht und bei einer Durchflußgeschwindigkeit von 85 ml/h mit insgesamt 6,5 l einer 0,01M-Ammoniumacetat-Lösung eluiert, deren pH-Wert im Verlaufe von drei Tagen linear von 4,5 auf 6,0 ansteigt. Das Eluat fängt man in Fraktionen zu je 85 ml auf, wobei das gewünschte Peptid in den Fraktionen Nr. 56—60 erscheint. Das aus den Fraktionen Nr. 59—60 isolierte Peptid ist rein, das aus den Fraktionen Nr. 56—58 isolierte Material enthält dagegen dünnstichtchromatographisch erkennbare Verunreinigungen, die sich jedoch durch Rechromatographie an SP-Sephadex C-25 unter den oben angegebenen Bedingungen abtrennen lassen. Der pH-Gradient der zur Rechromatographie verwendeten 0,01M-Ammoniumacetat-Lösung kann auf den Bereich 5,0 bis 5,4 (linear über zwei Tage) eingengt werden. Entsprechende Fraktionen werden vereinigt und lyophilisiert. Die jeweiligen Rückstände löst man in 0,5proz. Essigsäure-Lösung und lyophilisiert nach Ultrafiltration erneut. Insgesamt erhält man 100 mg wasserhaltiges HBG-[1—20]-B₁. Peptidgehalt: 82,1%. Chromatographisch rein im

Lösungsmittelsystem Nr. 3, wobei der Nachweis von Verunreinigungen an frischhergestellten Kieselgel-G-Schichten (siehe oben) besser gelingt als an Kieselgel-Fertigplatten (Merck).

Aminosäureanalyse:

	Lys	His	Asp	Ser	Glu	Pro	Gly	Ala	Val	Leu
Ber.	2	1	1	2	3	4	3	1	1	2
Gef.	1,96	0,99	1,02	2,04	3,01	4,08	2,95	0,98	0,99	1,98

Enzymatische Versuche

Inkubation mit Aminopeptidase M: 1,0 mg Fraktion HBG-D₁ werden in 0,5 ml 0,05M-TRIS-Puffer (pH 7,8) suspendiert und mit 2000 mEU des Enzyms (0,1 ml der Suspension) 20 h bei 37 °C inkubiert. Dann gibt man 0,5 ml 0,2M-Natriumcitrat-Puffer (pH 2,2) zu und trägt von der erhaltenen Lösung 0,85 ml auf die Säule des Aminosäureanalysators (Multichrom) auf: Ergebnis siehe Tab. 2.

Abbau mit Pyroglutamat-Aminopeptidase: 3,8 mg (1 µmol) HBG-D₁ werden in 1,0 ml Phosphat-Puffer (pH 8,0) gelöst und mit 3 mg des Enzym-Lyophilisates (d. s. ca. 150 µg Enzym-Protein; gelöst in 0,01 ml Phosphatpuffer) bei 37 °C inkubiert. Nach 17 h gibt man eine zweite und nach weiteren 8 h eine dritte Enzymmenge (jeweils 3 mg in 0,01 ml Phosphatpuffer) zu. Nach insgesamt 40 h Inkubationszeit wird die erhaltene Lösung dünnstichtchromatographisch getestet (siehe Abb. 7): neben einer mit 2-Pyrrolidon-5-carbonsäure identischen Substanz wird ein weitgehend homogenes Spaltprodukt nachgewiesen; Ausgangssubstanz ist nicht mehr erkennbar.

Literatur

- 1 Vorläufige Mitt.: *E. Wünsch, G. Wendlberger, A. Hallett, E. Jaeger, S. Knof, L. Moroder, R. Scharf, I. Schmidt, P. Thamm und L. Wilschowitz, Z. Naturforsch.* **32 c**, 495 (1977).
- 2 3. Mitt.: *G. Wendlberger, L. Moroder, A. Hallett und E. Wünsch, Mh. Chem.* **110**, 1407 (1979).
- 3 *E. Wünsch, E. Jaeger, M. Deffner und R. Scharf, Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem.* **353**, 1716 (1972).
- 4 *E. Jaeger, P. Thamm, I. Schmidt, S. Knof, L. Moroder und E. Wünsch, Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem.* **359**, 155 (1978).
- 5 *E. Wünsch, E. Jaeger, L. Kisfaludy und M. Löw, Angew. Chem.* **89**, 330 (1977); *Int. Ed. Engl.* **16**, 317 (1977).
- 6 *E. Jaeger, P. Thamm, S. Knof und E. Wünsch, Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem.* **359**, 1617 (1978).
- 7 *E. Jaeger, P. Thamm, S. Knof und E. Wünsch, Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem.* **359**, 1629 (1978).
- 8 *G. Pfleiderer, P. G. Celliers, M. Stanulovic, E. D. Wachsmuth, H. Determann und G. Braunitzer, Biochem. Z.* **340**, 552 (1964).
- 9 *D. N. Podell und G. N. Abraham, Biochem. Biophys. Res. Commun.* **81**, 176 (1978).
- 10 *J. H. Straus, A. S. Gordon und D. F. H. Wallach, Europ. J. Biochem.* **11**, 201 (1969).
- 11 *N. Greenfield und G. D. Fasman, Biochemistry* **8**, 4108 (1969).

- ¹² *H. A. Sober*, Handbook of Biochemistry, B-75 (1970).
- ¹³ *G. H. Beaven* und *E. R. Holiday*, Adv. Protein. Chem. **7**, 319 (1952).
- ¹⁴ *T. W. Goodwin* und *R. A. Morton*, Biochem. J. **40**, 628 (1946).
- ¹⁵ *W. L. Bencze* und *K. Schmid*, Anal. Chem. **29**, 1193 (1957).
- ¹⁶ *S. J. Konturek*, *J. Tasler*, *M. Cieszkowsky*, *M. Dobrzanska* und *E. Wünsch*, Am. J. Physiol. **233** (3), E 170 (1977).
- ¹⁷ *S. J. Konturek*, *J. Tasler*, *M. Cieszkowsky*, *E. Mikos*, *E. Jaeger* und *E. Wünsch*, Scand. J. Gastroenterology **13**, Suppl. 49, 102 (1978).
- ¹⁸ *F. Reindel* und *W. Hoppe*, Chem. Ber. **87**, 1103 (1954).
- ¹⁹ *H. Matsubara* und *R. M. Sasaki*, Biochem. Biophys. Res. Commun. **35**, 175 (1969).
- ²⁰ *G. G. F. Newton* und *E. P. Abraham*, Biochem. J. **47**, 257 (1950).