

# UNTERSUCHUNGEN ZUR TOTALSYNTHESE DES FERREDOXINS—I SYNTHESE DER AMINOSÄURESEQUENZ VON *C. PASTEURIANUM* FERREDOXIN

E. BAYER, G. JUNG und H. HAGENMAIER

Chemisches Institut der Universität Tübingen

(Received in Germany 28 December 1967; accepted for Publication 16 February 1968)

**Zusammenfassung**—Die Synthese der Aminosäuresequenz von Ferredoxin aus *Clostridium pasteurianum* nach der Festphasenmethode wird beschrieben. Das Polypeptid wurde isoliert und charakterisiert als S-Sulfonat und stimmt in Molekulargewicht, Endgruppenanalyse, UV-Spektrum und Aminosäureanalyse mit dem S-Sulfonat von natürlichem Apoferreredoxin überein.

**Abstract**—The solid-phase synthesis of the amino acid sequence of ferredoxin from *C. pasteurianum* is described. The polypeptide was isolated and characterized as S-sulfonate. Mol. wt. determination, endgroup analysis, UV spectrum and amino acid analyses of this product are in agreement with results obtained for the S-sulfonate of native apoferreredoxin.

EINE Totalsynthese des an der Elektronenübertragung bei Assimilationsvorgängen beteiligten Ferredoxins lässt sich in drei Teilschritte zerlegen.

- (1) Totalsynthese der Aminosäuresequenz<sup>1</sup> aus 55 Aminosäuren bei Clostridienferredoxin.
- (2) Bildung der zur Einführung des Aktivzentrums geeigneten Sekundär- bzw. Tertiärstruktur.
- (3) Einführung des eisenhaltigen Aktivzentrums.

Präparative Untersuchungen haben ergeben, dass die dritte Stufe, die Einführung des Aktivzentrums in die bei der Behandlung mit  $\alpha, \alpha'$ -Dipyridyl erhaltenen eisenfreien und inaktiven Apoferreredoxine, in 40%iger Ausbeute zu Pflanzenferredoxin<sup>2</sup> und in 70%iger Ausbeute zu Clostridienferredoxin<sup>3</sup> führt, wobei in beiden Fällen die volle biologische Aktivität erhalten wird. Die hohen Ausbeuten bei der Resynthese, des dritten und letzten Schrittes im oben angegebenen Schema ermutigen zum Versuch der Totalsynthese.

Der zeitraubendste Schritt dürfte der erste Schritt, die Verknüpfung von 55 Aminosäuren zur Primärstruktur des Ferredoxins aus *C. pasteurianum* sein, dessen Sequenz in Abb. 1 wiedergegeben ist. Am geeignetsten erschien die Festphasenmethode nach Merrifield,<sup>4</sup> bei der die Arbeitszeit wesentlich abgekürzt wird. Andererseits besteht aber die Gefahr, dass bei der Festphasenmethode im Gegensatz zu den klassischen Methoden eine grosse Zahl schwer trennbarer Peptidgemische entsteht, da bei einer unter 100% liegenden Ausbeute und einer statistischen Verteilung jeder neu angeknüpften Aminosäure prinzipiell verschiedene Polypeptidketten wachsen können.

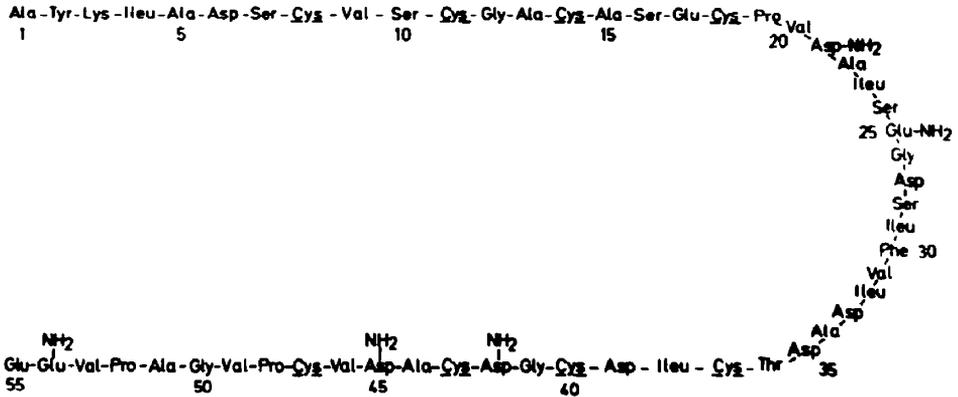


ABB. 1 Aminosäuresequenz von *C. pasteurianum* Ferredoxin<sup>1</sup>

Die Synthese der Aminosäuresequenz des Apoferredoxins sollte daher auch zu grundsätzlichen Aussagen über die Brauchbarkeit der Merrifield-Methode führen, zumal bisher mit den Insulinketten lediglich Sequenzen mit 21 bzw. 30 Aminosäuren synthetisiert worden sind.<sup>5</sup> Eine weitere Schwierigkeit bei der Synthese ist der hohe Cysteingehalt des Ferredoxins, da die Abspaltung der Benzylschutzgruppen zu tiefgreifenden Veränderungen im Molekül führen könnte. In orientierenden Versuchen stellten wir fest, dass natürliches Apoferredoxin nach Behandlung mit Natrium in flüssigem Ammoniak in einer Ausbeute von 15% als reines S-Sulfonat zurückgewonnen werden kann. In das derart gewonnene S-Sulfonat des natürlichen Apoferredoxins lässt sich unter den Bedingungen der Resynthese<sup>2,3</sup> das Aktivzentrum zu enzymatisch voll aktivem Ferredoxin wieder einführen. Die Abspaltung der S-Benzyl-Schutzgruppen sollte also bei der Synthese des Apoferredoxins kein Hindernis darstellen.

Im Hinblick auf eine möglichst hohe Ausbeute bei der Peptidsynthese sind die *t*-Butyloxycarbonylamino-säuren extrem gereinigt und auf ihre Reinheit mittels Massenspektrometrie,<sup>6</sup> Gaschromatographie,<sup>6</sup> Polarimetrie und Dünnschichtchromatographie geprüft worden. Die *t*-Butyloxycarbonylverbindungen weisen die in Tabelle 1 genannten Reinheitskriterien auf. Dargestellt wurden die Boc-Aminosäuren sowohl nach dem von Schwyzer *et al.*<sup>7</sup> beschriebenen Verfahren, als auch nach der pH-Stat-Methode von Schnabel.<sup>8</sup> Nach letzterer Methode werden die Boc-Aminosäuren mit besserer Ausbeute und in höherem Reinheitsgrad erhalten.

Zur Synthese der Sequenz (Abb. 1) wurde wie folgt gearbeitet:<sup>2,2</sup> Die C-terminale Glutaminsäure (Sequenz Nr. 55) wurde als Boc-Glu(OBzl)-OH<sup>2,3</sup> mit chlormethyliertem Copolymerem aus Styrol und Divinylbenzol (Fa. Bio-Rad, New York, Kapazität: 1.8 mMol pro g) in Benzol verestert. Die sonst übliche Veresterung in Äthanol wurde wegen einer möglichen Umesterung nicht angewandt. Die Beladung des Harzes wurde durch Aminosäureanalyse nach Hydrolyse in 6N-HCl zu 0.28 mMol pro g Harz bestimmt. Die oft angewandte Hydrolyse durch Rückflusskochen in 6N-HCl-Dioxan-H<sub>2</sub>O ist ungeeignet, da dabei aus Glutaminsäure bis zu 50% Threonin und Serin entstehen. Die Abspaltung der Boc-Schutzgruppe wurde mit 1N-HCl-Eisessig vorgenommen.<sup>4,5</sup> Die Einwirkungsdauer wurde gegen Ende der Synthese auf 40 Minuten erhöht. Dieser Abspaltungsmethode ist gegenüber der Abspaltung mit 4N-HCl-Dioxan der Vorzug zu geben. Nur die Boc-Schutzgruppe des Threonins

TABELLE I. EIGENSCHAFTEN DER VERWENDETEN t-BUTYLOXYCARBONYLAMINOSÄUREN

(1) Boc-L-Ala-OH:	Fp. 81° [Lit. 83–84°, 9 80–82° <sup>10</sup> ]; [ $\alpha$ ] <sub>D</sub> <sup>25</sup> = –24·9° (c = 2·049, Eisessig) [Lit. [ $\alpha$ ] <sub>D</sub> <sup>25</sup> = –22·4° (c = 2·095, Eisessig); [ $\alpha$ ] <sub>D</sub> <sup>18–25</sup> = –25·2° (c = 1, Eisessig) <sup>10</sup> ]
(2) Boc-L-Asn-OH:	Fp. 180° [Lit. 181–182°, <sup>11</sup> 200°, <sup>12</sup> 174–176° <sup>10</sup> ]; [ $\alpha$ ] <sub>D</sub> <sup>28</sup> = –7·6° (c = 1,097, DMF) [Lit. [ $\alpha$ ] <sub>D</sub> <sup>25</sup> = –7·8° (c = 1, DMF); <sup>11</sup> [ $\alpha$ ] <sub>D</sub> <sup>18–25</sup> = –8·5° (c = 1, DMF) <sup>10</sup> ]
(3) Boc-L-Asn-ONp:	Fp. 157–158° [Lit. 157–158°, <sup>11</sup> 163° <sup>13</sup> ]; [ $\alpha$ ] <sub>D</sub> <sup>25</sup> = –40·4° (c = 1·76, Methanol) und [ $\alpha$ ] <sub>D</sub> <sup>28</sup> = –36·9° (c = 1·001, DMF) [Lit. [ $\alpha$ ] <sub>D</sub> <sup>25</sup> = –40° bzw. –45·3° (c = 1, DMF); <sup>11</sup> [ $\alpha$ ] <sub>D</sub> <sup>22</sup> = –35·0° (c = 2, Eisessig 95%) und [ $\alpha$ ] <sub>D</sub> <sup>22</sup> = –36·0° (c = 2, DMF) <sup>12</sup> ]
(4) Boc-L-Asp(OBzl)-OH:	Fp. 99° [Lit. 101° <sup>12</sup> ]; [ $\alpha$ ] <sub>D</sub> <sup>27</sup> = +8·2° (c = 2·153, Eisessig) und [ $\alpha$ ] <sub>D</sub> <sup>26</sup> = +36·5° (c = 1·973, Methanol) [Lit. [ $\alpha$ ] <sub>D</sub> <sup>22</sup> = +9° ± 1° (c = 2·95, Eisessig 95%) <sup>12</sup> ]
(5) Boc-L-Asp(OBzl)-ONp:	Fp. 105°; [ $\alpha$ ] <sub>D</sub> <sup>26</sup> = –24·5° (c = 2·132, Methanol)
(6) Boc-L-Cys(Bzl)-OH:	Fp. 86° [Lit. 63–65°, <sup>9</sup> 86–87°; <sup>14</sup> 63–65° <sup>10</sup> ]; [ $\alpha$ ] <sub>D</sub> <sup>25</sup> = –43·2° (c = 1·027, Eisessig) [Lit. [ $\alpha$ ] <sub>D</sub> = –41·0° (c = 0·999, Eisessig); <sup>9</sup> [ $\alpha$ ] <sub>D</sub> <sup>18–25</sup> = –45·3° (c = 1, Eisessig) <sup>10</sup> ]
(7) Boc-L-Gln-OH:	Fp. 116–117° Zersetzung [Lit. 114–118°, <sup>15</sup> 116–118° <sup>10</sup> ]; [ $\alpha$ ] <sub>D</sub> <sup>27</sup> = –4·6° (c = 1·944, Äthanol) [Lit. [ $\alpha$ ] <sub>D</sub> <sup>25</sup> = –3·0° (c = 1, Äthanol); <sup>15</sup> [ $\alpha$ ] <sub>D</sub> <sup>18–25</sup> = –2·9° (c = 1, Äthanol) <sup>10</sup> ]
(8) Boc-L-Gln-ONp:	Fp. 156–157° [Lit. 145–146° <sup>16</sup> ]; [ $\alpha$ ] <sub>D</sub> <sup>25</sup> = –41·1° (c = 1·995, Methanol)
(9) Boc-L-Glu-(OBzl)-OH:	farbloses Öl [Lit. Öl <sup>17</sup> ] [ $\alpha$ ] <sub>D</sub> <sup>27</sup> = –6·0° (c = 1·912, Eisessig)
(10) Boc-Gly-OH:	Fp. 88° [Lit. 85–89°, <sup>18</sup> 88·5–89° und 89–90° <sup>9</sup> ]
(11) Boc-Gly-ONp:	Fp. 70° [Lit. 70–71° <sup>12</sup> ]
(12) Boc-L-Ile-OH × 0·5 H <sub>2</sub> O:	Fp. 59–61° [Lit. 49–57°, <sup>9</sup> 66–68° <sup>10</sup> ]; [ $\alpha$ ] <sub>D</sub> <sup>27</sup> = +2·4° (c = 1·653, Eisessig) und [ $\alpha$ ] <sub>D</sub> <sup>26</sup> = +3·8° (c = 2·080, Methanol) [Lit. [ $\alpha$ ] <sub>D</sub> <sup>25</sup> = +3·0° (c = 2·005, Eisessig); <sup>9</sup> [ $\alpha$ ] <sub>D</sub> <sup>18–25</sup> = +2·5° (c = 1, Eisessig) <sup>10</sup> ]
(13) Boc-L-Lys (Z)-OH:	farbloses Öl [Lit. Öl <sup>9</sup> ] [ $\alpha$ ] <sub>D</sub> <sup>27</sup> = –8·2° (c = 2·102, Eisessig) [Lit. [ $\alpha$ ] <sub>D</sub> <sup>18–25</sup> = –9·3° (c = 1, Eisessig) <sup>10</sup> ]
(14) Boc-L-Phe-OH:	Fp. 85° [Lit. Öl; <sup>19</sup> 79–80°, <sup>9</sup> 85–87°; <sup>20</sup> 84–86° <sup>10</sup> ], [ $\alpha$ ] <sub>D</sub> <sup>25</sup> = –3·6° (c = 5·048, Eisessig) [Lit. [ $\alpha$ ] <sub>D</sub> = –0·8° (c = 4·975, Eisessig); <sup>9</sup> [ $\alpha$ ] <sub>D</sub> <sup>20</sup> = 4·1 ± 2° (c = 5, Eisessig); <sup>20</sup> [ $\alpha$ ] <sub>D</sub> <sup>18–25</sup> = –4·0° (c = 1, Eisessig) <sup>16</sup> ]
(15) Boc-L-Pro-OH:	Fp. 133–134° [Lit. 136–137°, <sup>9</sup> 134–136° <sup>10</sup> ] [ $\alpha$ ] <sub>D</sub> <sup>25</sup> = –60·8° (c = 2·043, Eisessig) [Lit. [ $\alpha$ ] <sub>D</sub> = –60·2° (c = 2·011, Eisessig); <sup>9</sup> [ $\alpha$ ] <sub>D</sub> <sup>18–25</sup> = –68·5° (c = 1, Eisessig) <sup>10</sup> ]
(16) Boc-L-Ser(Bzl)-OH:	Fp. 59° [Lit. 60–62°, <sup>21</sup> Öl <sup>17</sup> ] [ $\alpha$ ] <sub>D</sub> <sup>27</sup> = +18·8° (c = 1·598, Äthanol 80%) [Lit. [ $\alpha$ ] <sub>D</sub> <sup>20</sup> = +20·4° (c = 2, Äthanol 80%) <sup>21</sup> ]
(17) Boc-L-Thr-OH:	Fp. 80° [Lit. 76–80°; <sup>7</sup> 74–77° <sup>10</sup> ] [ $\alpha$ ] <sub>D</sub> <sup>25</sup> = –2·0° (c = 0·998, Methanol) [Lit. [ $\alpha$ ] <sub>D</sub> = –2·52° (Methanol) <sup>15</sup> ]
(18) Boc-L-Tyr(Bzl)-OH:	Fp. 109–110° [Lit. 108–110° <sup>10</sup> ] [ $\alpha$ ] <sub>D</sub> <sup>26</sup> = +16·35° (c = 2·077, Methanol) [Lit. [ $\alpha$ ] <sub>D</sub> <sup>18–25</sup> = +12·1° (c = 1, Aceton) und +5·5° (c = 1, Eisessig) <sup>10</sup> ]
(19) Boc-L-Val-OH:	Fp. 80° [Lit. Öl; <sup>19</sup> 72–73°, <sup>10</sup> 77–79° <sup>9</sup> ] [ $\alpha$ ] <sub>D</sub> <sup>28</sup> = –6·9° (c = 2·009, Eisessig) [Lit. [ $\alpha$ ] <sub>D</sub> <sup>25</sup> = 5·8° (c = 1·208, Eisessig); <sup>9</sup> [ $\alpha$ ] <sub>D</sub> <sup>18–25</sup> = +6·0° (c = 1, Eisessig) <sup>10</sup> ]

(Sequenz Nr. 36) wurde mit 4N-HCl-Dioxan abgespalten, um eine Acylierung der ungeschützten Hydroxylgruppe zu vermeiden. Neutralisiert wurde wie üblich mit Triäthylamin in Dimethylformamid. Das dabei entstehende Triäthylaminhydrochlorid wurde dazu benutzt, die für den nächsten Syntheseschritt zur Verfügung stehenden freien  $\text{NH}_2$ -Gruppen zu bestimmen, indem das Chlorid nach Vollhard titriert wurde.<sup>23</sup> Abbildung 2 zeigt, dass während der Synthese die Menge der freien  $\text{NH}_2$ -Gruppen stetig abnimmt. Nach 54 Koppelungsschritten standen noch 38% der nach der ersten Boc-Abspaltung bestimmten freien Aminogruppen zur Verfügung. Dies würde einer durchschnittlichen Ausbeute von 98.9% pro Syntheseschritt entsprechen.

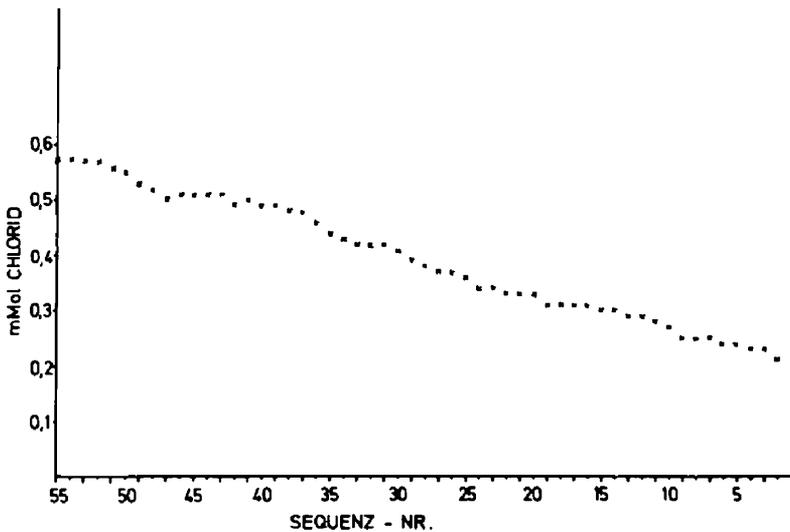


ABB. 2 Titration von Triäthylaminhydrochlorid im Verlauf der Synthese von Apoferrodoxin

Die Knüpfung der Peptidbindung wurde mit Dicyclohexylcarbodiimid (= DCCI) in Methylenchlorid vorgenommen. Mit wachsender Peptidkette wurde die Reaktionszeit von 2 Std. auf 3 Std. verlängert und zwar wurde vor der DCCI-Zugabe auf gute Sorption der Boc-Aminosäurelösung im Harz geachtet. Bei einem Ansatz von 2 g verestertem Harz wurden pro Syntheseschritt jeweils 2.5 bis 3 mmol Boc-Aminosäure eingesetzt, entsprechend einem 5- bis 6-fachen Überschuss. Asn, Gln und Gly wurden als pNp-Ester mit 6- bis 7-fachem Überschuss und 6- bis 8-stdg. Reaktionszeit angebaut. Ausserdem wurde die auf Thr folgende Asp als Boc-Asp-(OBzl)-ONp eingeführt, da Thr wie bei den Insulinsynthesen mit ungeschützter Hydroxylgruppe angebaut wurde.<sup>24</sup> Die Synthese wurde durch laufende Analyse von Hydrolysaten mit einem automatischen Aminosäureanalysator (Modell Uni-chrom, Fa. Beckman Instr., München) verfolgt. Die Analysenwerte zeigen Zunahmen der entsprechenden Aminosäuren in guter Übereinstimmung mit den erwarteten Werten (Tabelle 2).

Das geschützte Polypeptid-Polymere wurde gespalten, indem bromfreier Bromwasserstoff 90 Minuten lang durch eine Suspension des Polypeptid-Harzes in Trifluoressigsäure unter Zusatz von Methionin geleitet wurde. Nach Abfiltrieren vom Harz wurde das Peptid mit wasserfreiem Äther ausgefällt. Es wurden 1.75 g S-Benzyl-geschütztes Polypeptid als weisses Pulver erhalten. Das entspricht einer

Ausbeute von 51 % bezogen auf die Menge (0.56 mMol) C-terminaler Glutaminsäure, die an das Polymer gebunden war. Die grössere Ausbeute gegenüber dem durch Titration erhaltenen Wert von 38 %, erklärt sich durch das Vorhandensein kleiner Peptide.

Zur Abspaltung der S-Benzylschutzgruppen wurden 500 mg S-Benzyl-Polypeptid in 650 ml flüssigem Ammoniak gelöst. Zur Abspaltung der Schutzgruppe wurde Natrium, gelöst in flüssigem Ammoniak, aus einem kühlbaren Tropftrichter zugegeben. Nach 60 Sekunden bleibender stabiler Blaufärbung am Ende der Reaktion wurde die Hauptmenge des Ammoniaks bis auf ein Volumen von 30 ml abgedampft. Restlicher Ammoniak wurde durch Gefriertrocknen (am Wasserstrahlvakuum) entfernt. Das anfallende Pulver wurde gelöst in 0.2 % Essigsäure, die Lösung mit 0.1 m Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan-Lösung auf pH 9.0 eingestellt und einer oxidativen Sulfityse durch Zusatz von Natriumsulfit und Natriumtetrathionat unterworfen. Nach 24 Stunden wurde das entstandene S-Sulfonat durch Dialyse gegen Wasser von Salzen gereinigt.

Nach Gefriertrocknung wurden 450 mg leichtes weisses Pulver erhalten. Das S-Sulfonat wurde durch Gelfiltration auf einer Sephadex G-50 Säule (108 × 2.5 cm) gereinigt, mit 0.2 N Essigsäure als Elutionsmittel. Die Extinktion der Fraktionen bei 258 m $\mu$  wurde automatisch registriert von einem Uvicord (LKB-Produkt AB, Stockholm). Mit dem Folin-Lowry-Test wurde ein Peak gefunden. Die Folin-positiven Fraktionen wurden ein zweitesmal auf Sephadex G-50 gereinigt. Hierbei wurde sowohl durch UV-Absorption als auch mit dem Folin-Lowry Test ein Peak erhalten, dessen Elutionszeit mit der des S-Sulfonats von natürlichem Apoferredoxin übereinstimmte. Nach Gefriertrocknung wurden aus 500 mg S-Benzylpeptid 108 mg weisses Pulver erhalten. Die Ausbeute an gereinigtem Peptid entspricht etwa der Ausbeute, die man bei der Natriumbehandlung von natürlichem Apoferredoxin erhält. Das UV-Spektrum des S-Sulfonats weist wie das UV-Spektrum des S-Sulfonats von natürlichem Apoferredoxin eine Schulter bei 280 m $\mu$  auf, die dem Tyrosin zuzuordnen ist (Abb. 3). Das Molekulargewicht wurde in der Ultrazentrifuge zu  $6320 \pm 300$  (berechneter Wert nach der Sequenz: 6134) durch Gleichgewichtslauf bestimmt, mit einem angenommenen partiellen spezifischen Volumen von 0.71.\* Das gereinigte Polypeptid-S-Sulfonat ist in der Ultrazentrifuge einheitlich wie Abb. 4 zeigt. Die Aminosäureanalysen (Tabelle 2) des synthetischen Produktes stimmen mit denen des natürlichen Apoferredoxins überein. Die Ammoniakbestimmung (ber. 5.0, gef. 5.4) zeigt, dass die Säureamidgruppierungen intakt geblieben sind.

Eine Endgruppenbestimmung der N-terminalen Aminosäure mit 2,4-Dinitrofluorbenzol wurde durchgeführt<sup>26</sup> und dünnschichtchromatographisch in zwei verschiedenen Fließmitteln DNP-Alanin gefunden. Neben DNP-Alanin trat ein weiterer schwächerer Fleck auf, der sowohl DNP-Tyrosin als DNP-Lysin entsprechen könnte. Dieser Befund ist identisch mit einer an natürlichem Apoferredoxin durchgeführten Endgruppenbestimmung.

Durch die Endgruppenbestimmung im Verein mit den Ultrazentrifugenmessungen, dem eindeutigen Syntheseverlauf, den analytischen Daten und dem chromatographischen Verhalten ist sichergestellt, dass die von Tanaka *et al.* angegebene Aminosäuresequenz des Ferredoxins synthetisiert worden ist.

\* Herrn Prof. Dr. H. Friedrich-Freksa und Herrn H. Bachowsky, Max-Planck-Institut für Virusforschung, Tübingen, danken wir bestens für die Messungen mit der Ultrazentrifuge.

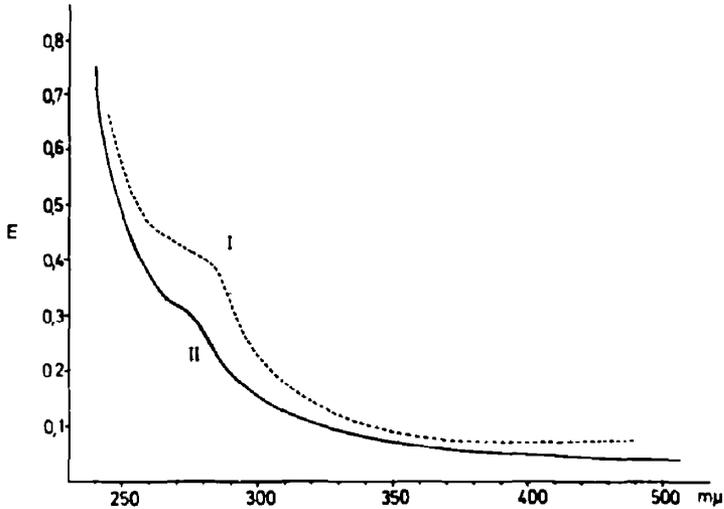


ABB. 3 UV-Spektren von natürlichem (I) und synthetischem (II) Apoferredoxin-S-Sulfonat

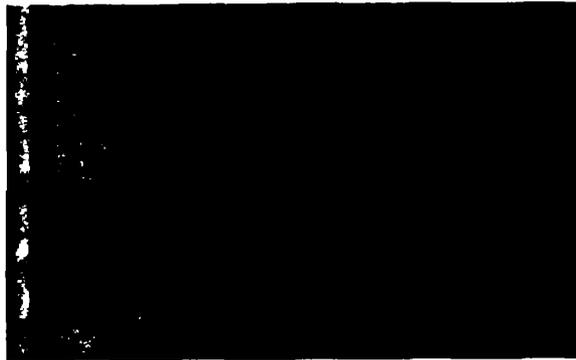


ABB. 4 Gleichgewichtslauf von synthetischem Apoferredoxin-S-Sulfonat (Analytische Ultrazentrifuge Modell E, Beckman Instr.) bei 20410 U/min. Aufgenommen nach 15 Std.

Zugleich ist durch die Synthese der Sequenz von 55 Aminosäuren auch erwiesen, dass die Merrifield-Methode zur Herstellung hochmolekularer Polypeptide geeignet ist. Überraschend ist, dass auch schon das vor der chromatographischen Reinigung erhaltene entbenzylierte Produkt eine ähnliche Aminosäurezusammensetzung wie das Endprodukt zeigt. Wir haben bei unseren vielen Syntheseansätzen immer beobachtet, dass beim Abbruch einer Kette auch die nachfolgenden Aminosäuren nicht mehr angebaut werden. Dadurch wird die Zahl der möglichen Polypeptide eingeschränkt und die Brauchbarkeit der Festphasenmethode zur Synthese grosser Polypeptide erwiesen.

Über die Untersuchungen zur Überführung der bei der Synthese anfallenden Struktur in die zur Einführung des Aktivzentrums und zur Komplexbildung geeigneten Form werden wir getrennt berichten.

TABELLE 2. AMINOSÄUREANALYSEN

Sequenz-Nr.	48-55		33-55		30-55		17-55		10-55		1-55		I	II	III	IV
	118° 24 Std.		112° 22 Std.		112° 21 Std.		112° 28 Std.		114° 21 Std.		110° 26 Std.					
Temp, Zeit der Hydrolyse																
Glu	2.5	2	2.7	2	3.0	2	4.8	4	5.6	4	5.5	4	4.3	4.2	4.3	4.1
Val	2.1	2	3.4	3	3.8	4	5.3	5	5.2	5	7.0	6	6.2	5.5	4.9	4.8
Pro	2.1	2	2.7	2	2.1	2	3.3	3	4.5	3	3.6	3	4.2	3.2	2.8	3.1
Ala	1.1	1	2.4	2	3.3	3	4.6	4	5.7	6	6.6	8	6.9	6.7	7.0	7.5
Gly	1.0	1	2.0	2	2.0	2	3.0	3	4.0	4	4.0	4	4.0	4.0	4.0	4.0
Asp	—	—	2.7	3	4.3	5	6.5	7	6.9	7	8.1	8	8.7	7.6	7.7	8.1
Ile	—	—	0.8	1	1.4	2	3.0	4	3.5	4	3.5	5	4.6	4.3	4.3	3.5
Thr	—	—	—	—	0.8	1	1.0	1	1.0	1	1.0	1	1.1	1.1	1.2	1.0
Phe	—	—	—	—	0.6	1	0.6	1	1.0	1	0.7	1	1.1	1.0	0.6	0.8
Ser	—	—	—	—	—	—	1.3	2	2.3	4	2.5	5	2.6	2.6	3.4	4.5
Tyr	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	0.1	1	0.1	0.2	—	—
Lys	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	0.2	1	0.2	n.b.	n.b.	n.b.
NH <sub>3</sub>	—	—	—	—	—	—	—	—	7.4	5	7.6	5	5.4	n.b.	n.b.	n.b.
Cys(Bzl)	—	—	—	—	—	—	—	—	5.8	7	5.0	8	5.6	—	—	—
Cys(SO <sub>3</sub> H)	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	0.7	8.2	7.2
Cys(SH)	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	4.0	—	—

I. Analyse des S-Benzyl-Polypeptids nach der HBr-Trifluoressigsäure-Abspaltung, Hydrolyse in 6N HCl, 110°, 0.2 Torr, 30 Std.

II. Analyse von synthetischem S-Sulfonat (Hydrolysebedingungen wie unter I).

III. Zur Erfassung des gesamten Cysteins wurde das S-Sulfonat vor der Hydrolyse mit Perameisensäure oxidiert.<sup>25</sup> Tyr und Phe lassen sich dann nicht mehr quantitativ bestimmen.

IV. Analyse von natürlichem Apoferrredoxin. Oxidation mit Perameisensäure vor Hydrolyse (Hydrolysebedingungen wie unter I, 17 Std. hydrolysiert).

*Danksagung*—Der Deutschen Forschungsgemeinschaft danken wir herzlich für die Unterstützung dieser Arbeit.

## LITERATUR

- <sup>1</sup> M. Tanaka, T. Nakashima, A. Benson, H. Mower and K. T. Yasunobu, *Biochemistry* **5**, 1666 (1966).
- <sup>2</sup> E. Bayer, D. Josef, P. Krauss, H. Hagenmaier, A. Röder und A. Trebst, *Biochem. Biophys. Acta* **143**, 435 (1967).
- <sup>3</sup> E. Bayer und H. Hagenmaier, unveröffentlicht.
- <sup>4</sup> R. B. Merrifield, *J. Am. chem. Soc.* **85**, 2149 (1963); *Ibid.* **86**, 304 (1964); *Biochemistry* **3**, 1385 (1964); *J. Org. Chem.* **29**, 3100 (1966).
- <sup>5</sup> A. Marglin und R. B. Merrifield, *J. Am. Chem. Soc.* **88**, 5051 (1966).
- <sup>6</sup> W. König, Dissertation, Universität Tübingen, unveröffentlicht.
- <sup>7</sup> R. Schwyzer, P. Sieber und H. Kappeler, *Helv. Chim. Acta* **42**, 2622 (1959).
- <sup>8</sup> E. Schnabel, *Liebigs Ann.* **702**, 188 (1967).
- <sup>9</sup> G. W. Anderson und A. C. McGregor, *J. Am. Chem. Soc.* **79**, 6180 (1957).
- <sup>10</sup> E. Schnabel, *Liebigs Ann.* **702**, 188 (1967).
- <sup>11</sup> E. Schröder und E. Klieger, *Ibid.* **673**, 208 (1964).
- <sup>12</sup> E. Sandrin und R. A. Boissonas, *Helv. Chim. Acta* **46**, 1637 (1963).
- <sup>13</sup> G. R. Marshall und R. B. Merrifield, *Biochemistry* **4**, 2394 (1965).
- <sup>14</sup> R. Geiger, Privatmitteilung an E. Wünsch, *Methoden der organischen Chemie* (Houben-Weyl-Müller) Bd. XV, in Vorbereitung.
- <sup>15</sup> K. Hofmann, R. Schmiechen, R. D. Wells, Y. Wolman und N. Yanaihara, *J. Am. Chem. Soc.* **87**, 611 (1965).
- <sup>16</sup> H. Zahn, W. Danho und B. Gutte, *Z. Naturforsch.* **21**, 763 (1966).
- <sup>17</sup> R. Schwyzer, B. Iselin, H. Kappeler, W. Rittel und P. Sieber, U.S. Patent 3, 247, 182, Pat. April 19 (1966).
- <sup>18</sup> F. C. McKay und N. F. Albertson, *J. Am. Chem. Soc.* **79**, 4686 (1957).
- <sup>19</sup> R. Schwyzer, P. Sieber und H. Kappeler, *Helv. Chim. Acta* **42**, 2622 (1959).
- <sup>20</sup> E. Wünsch und G. Wendlberger, *Chem. Ber.* **97**, 2504 (1964).
- <sup>21</sup> E. Wünsch und A. Zwick, *Ibid.* **97**, 2497 (1964).
- <sup>22</sup> G. Jung, Dissertation, Universität Tübingen, Juli 1967.
- <sup>23</sup> Abkürzungen nach IUPAC, *Europ. J. Biochem.* **1**, 375 (1967).
- <sup>24</sup> H. Zahn, Privatmitteilung.
- <sup>25</sup> J. L. Bailey, *Techniques in Protein Chemistry*, Elsevier Publishing Co., Amsterdam-London-New York (1967).
- <sup>26</sup> G. Pataki, *Dünnschichtchromatographie*, Walter de Gruyter u. Co. Berlin.