

SYNTHESE EINES LABEMPFLINDLICHEN PENTADECAPEPTIDS AUS KUH- α -CASEIN*

K. P. POLZHOFFER

Unilever Forschungsgesellschaft mbH Hamburg

(Received in Germany 16 September 1971: Received in the UK 28 September 1971)

Abstract—The solid phase synthesis of the pentadecapeptide H-Lys-His-Pro-Pro-His-Leu-Ser-Phe-Met-Ala-Ile-Pro-Pro-Lys-Lys-OH,† a partial peptide sequence from bovine α -casein, is described. During the synthesis the N^o-amino group of the individual amino acids was blocked by the t-butyloxycarbonyl residue (Boc),‡ the N^o-amino group of Lys by the benzyloxycarbonyl residue (Z), the OH group of Ser by the benzyl residue and the imidazole nitrogen of His by the 2,4-dinitrophenyl group. The stepwise condensation of the protected amino acids on to the peptidyl resin proceeded by means of the carbodiimide method.

After the separation of the peptide from the carrier resin with purified HBr/Anisol with simultaneous cleavage of the benzyloxycarbonyl and benzyl protective groups, impure dinitrophenyl peptide hydrobromide was obtained in 59.8% yield calc. on the content of Lys in the Boc-Lys(Z)-polymer. The dinitrophenyl groups could be eliminated quantitatively in aqueous solution at pH 8 with 2-mercaptoethanol within 16 h.

After purification of the peptide by gel chromatography on Sephadex G-25 in 0.05 M acetic acid, 13.6% of pure pentadecapeptide acetate were obtained. The purity was controlled by TLC in different solvent systems, by thin-layer electrophoresis and by quantitative amino acid analyses. The following peptides were synthesised by the same method for comparison: the octapeptide H-Lys-His-Pro-Pro-His-Leu-Ser-Phe-OH, the heptapeptide H-Met-Ala-Ile-Pro-Pro-Lys-Lys-OH, the hexapeptide H-His-Leu-Ser-Phe-Met-Ala-OH and the pentapeptides H-Leu-Ser-Phe-Met-Ala-OH and H-Ser-Leu-Phe-Met-Ala-OH.

The pentadecapeptide is quantitatively split by rennin between Phe and Met at pH 4.25. The Michaelis-Menten constant for this reaction is 0.45 mmoles/l. The hexapeptide is also split by rennin whereas both pentapeptides were found to be resistant to rennin. The His residues in the peptides thus may be considered to be substrate specific.

The pentadecapeptide and the hexapeptide as synthetic substrates are suitable for activity determinations and for a control of rennin preparations.

Zusammenfassung—Die Festphasensynthese des Pentadecapeptids H-Lys-His-Pro-Pro-His-Leu-Ser-Phe-Met-Ala-Ile-Pro-Pro-Lys-Lys-OH, einer Peptid-Teilsequenz aus dem Kuh- α -Casein, wird beschrieben. Während der Synthese wurde die N^o-Aminogruppe der einzelnen Aminosäuren durch den tert.-Butyloxycarbonyl-Rest (Boc) abgeblockt, die N^o-Aminogruppe des Lys durch den Benzyloxycarbonyl-Rest (Z), die OH-Gruppe des Ser durch den Benzyl-Rest und der Imidazol-Stickstoff des His durch die 2,4-Dinitrophenyl-Gruppe. Die schrittweise Ankondensation der geschützten Aminosäuren an das Peptidyl-Harz erfolgte mit Hilfe des Carbodiimid-Verfahrens.

Nach Ablösung des Peptids vom Kunststoff-Träger mit gereinigtem HBr/Anisol bei gleichzeitiger Abspaltung der Benzyloxycarbonyl- und Benzyl-Schutzgruppen erhielt man verunreinigtes Dinitrophenyl-

* Teilweise vorgetragen beim Biochemical Meeting on Peptides and Proteins and on Antigens and Immunogenicity, 14–16 Jan. 1971 Lüttich (s. Lit. 1)

† Alle Aminosäuren besitzen L-Konfiguration

‡ Abkürzungen im Text:

Z = Benzyloxycarbonyl-; Boc = t-Butyloxycarbonyl-; Bzl = Benzyl-; Dnp = 2,4-Dinitrophenyl-; DCCI = N,N'-Dicyclohexylcarbodiimid; DMF = Dimethylformamid; TFA = Trifluoressigsäure; Met(O) = Methioninsulfoxid; Cleland's Reagenz = 1,4-Dithiol-2,3-dihydroxy-butan; Et₃N = Triäthylamin; R_{Asp} (-)(+) = Relation to Asp, (-) Laufrichtung zur Kathode

Peptidhydrobromid in 59.9 %iger Ausbeute, bzg. auf den Lys-Gehalt des Boc-Lys(Z)-Polymeren. Die Dinitrophenyl-Gruppen konnten in wässriger Lösung bei pH 8 mit 2-Mercaptoäthanol in 16 h quantitativ entfernt werden.

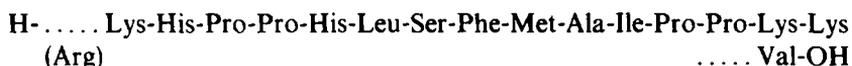
Nach Reinigung des Peptids durch Gelchromatographie an Sephadex G-25 in 0.05 M Essigsäure erhielt man 13.6 %reines Pentadecapeptidacetat. Die Reinheitskontrolle erfolgte durch Dünnschichtchromatographie in verschiedenen Fließmittelsystemen, durch Dünnschichtelektrophorese und durch quantitative Aminosäure-Analysen.

Folgende Peptide wurden zu Vergleichszwecken nach derselben Methode synthetisiert: Das Octapeptid H-Lys-His-Pro-Pro-His-Leu-Ser-Phe-OH, das Heptapeptid H-Met-Ala-Ile-Pro-Pro-Lys-Lys-OH, das Hexapeptid H-His-Leu-Ser-Phe-Met-Ala-OH und die Pentapeptide H-Leu-Ser-Phe-Met-Ala-OH und H-Ser-Leu-Phe-Met-Ala-OH.

Das Pentadecapeptid wird von Rennin zwischen Phe und Met bei pH 4.25 quantitativ gespalten. Die Michaelis-Menten-Konstante für diese Reaktion beträgt 0.45 mMol/l. Auch das Hexapeptid wird von Rennin gespalten, wogegen die beiden Pentapeptide Rennin gegenüber resistent sind. Die His-Reste in den Peptiden können somit als substratspezifisch angesehen werden.

Das Pentadecapeptid und das Hexapeptid sind als synthetische Substrate zur Aktivitätsbestimmung und zur Kontrolle von Renninpräparaten geeignet.

HEUTE wird allgemein angenommen, dass die "Labung" des Caseins drei Reaktionsstufen umfasst:² Die Abspaltung des κ -Caseinoglykopeptids, die Koagulation und die langsame proteolytische Spaltung aller Casein-Komponenten durch das Lab. Als Substrat für die Primärreaktion wird das κ -Casein angesehen,³ das oft schon in 1 min⁴ in para- κ -Casein und κ -Caseinoglykopeptid gespalten wird. Den Mechanismus dieser Renninspaltung untersuchten Jolles *et al.*⁵ und fanden, dass dabei eine Phe-Met-Peptidbindung gespalten wird. Die Aminosäuresequenz um diese "renninempfindliche" Stelle wurde von denselben Autoren durch tryptische Spaltung des κ -Caseins mit nachfolgender Sequenzanalyse bestimmt:⁶⁻⁸



Das zentrale Pentadecapeptid mit Lys als N-terminaler Aminosäure sollte von uns synthetisiert werden, um die Renninspaltung dieses Substratbruchstückes zu untersuchen.

METHODEN UND ERGEBNISSE

Festphasen-Peptidsynthese

Die Peptidsynthese nach Merrifield^{9,10} wurde von uns in einigen Punkten geändert: Die Kupplung wurde in einem DMF/CH₂Cl₂¹¹-Gemisch ausgeführt, die Kupplungszeiten wurden verlängert und die Boc-Gruppen mit TFA/CH₂Cl₂¹² abgespalten. Folgende Aminosäure-Derivate wurden zur Synthese verwendet: Boc-Lys(Z)-OH, Boc-His(Dnp)-OH,¹³ Boc-Pro, Boc-Leu, Boc-Ser(Bzl)-OH, Boc-Phe, Boc-Met, Boc-Ala, Boc-Ile. Alle Boc-Aminosäuren wurden nach der pH-Stat-Reaktion¹⁴ hergestellt. Die Kupplungsrate wurde während der Synthesen durch Aminosäure-Analyse nach Moore und Stein verfolgt. Die Abspaltung der Peptide vom Harz vollzogen wir mit HBr in TFA/Anisol.

Die Abspaltung mit HBr wird für Met-haltige Peptide oft als ungeeignet angesehen,¹⁵ da als Nebenprodukte Met(O)- und S-Benzylhomocystein-Derivate entstehen können. Die Bildung von Met(O)-Derivaten störte in unserem Falle nicht, da bei der reduktiven Dnp-Abspaltung mit 2-Mercaptoäthanol gleichzeitig auch die

Sulfoxid-Derivate quantitativ¹⁵ reduziert werden. Bei der Synthese des Pentadecapeptids wurde nach der HBr-Behandlung dünn-schichtchromatographisch nur wenig S-Benzyl-homocystein-Peptid nachgewiesen. Wir führen dies auf die Abschirmung des Met-Restes durch die Peptidkette zurück. Während der Herstellung des Heptapeptides H-Met-Ala-Ile-Pro-Pro-Lys-Lys-OH wurde hingegen $\sim 20\%$ von diesem Nebenprodukt erhalten.

Abspaltungsversuche mit Z-Met und Z-Met(O) mit HBr/TFA unter Zusatz von Anisol, Äthyl-Methylsulfid,¹⁵ Cleland's Reagenz¹⁶ und 2-Mercaptoäthanol¹⁷ zeigten, dass bei Zusatz von Anisol am wenigsten S-Benzyl-homocystein entsteht.

Nach Reinigung der Peptide an Sephadex-Gelen wurden folgende Ausbeuten erzielt:

H-Lys-His-Pro-Pro-His-Leu-Ser-Phe-Met-Ala-Ile-Pro-Pro-Lys-Lys-OH:	13%
H-Lys-His-Pro-Pro-His-Leu-Ser-Phe-OH:	15%
H-Met-Ala-Ile-Pro-Pro-Lys-Lys-OH:	13%
H-His-Leu-Ser-Phe-Met-Ala-OH:	20%
H-Leu-Ser-Phe-Met-Ala-OH:	21%
H-Ser-Leu-Phe-Met-Ala-OH:	54%

Die Reinheit der Peptide wurde durch Aminosäure-Analysen (Tab. 1), Dünnschichtchromatographie und Elektrophorese charakterisiert.

Die Verluste an Ser bei der salzsauren Hydrolyse des Pentadecapeptids wurden nach Lit. 18 zu 27% bestimmt (24 h, 6 n HCl, 110° i. Vak.).

Spaltungen mit Rennin

Die Renningspaltungen wurden bei pH 4.25 durchgeführt.⁴ Die entstehenden Aminogruppen wurden mit Hilfe des 2,4,6-Trinitrobenzolsulfonsäure-Reagenzes¹⁹ photometrisch bestimmt. Die Michaelis-Menten-Konstante K_m wurde aus einem Lineweaver-Burk-Diagramm²⁰ bestimmt und betrug für das Pentadecapeptid 0.45 mMol/l (Abb. 1).

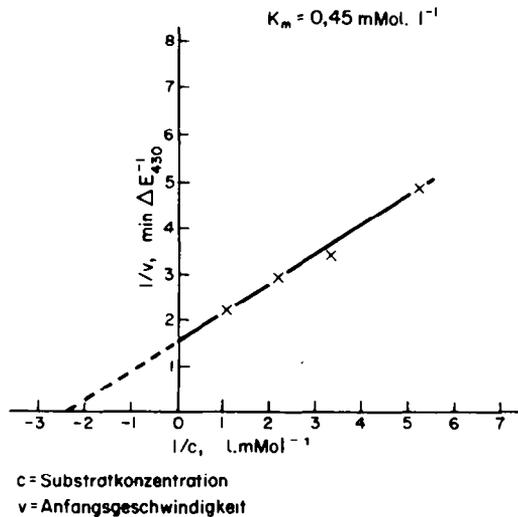


ABB 1. Bestimmung der Michaelis-Menten-Konstanten nach Lineweaver Burk [20]

Dazu wurden die Reaktionsgeschwindigkeiten während der ersten 10 min als Anfangsgeschwindigkeiten angenommen und für die einzelnen Substratkonzentrationen als $\Delta E_{430}/\text{min}$ bestimmt. Die reziproken Werte der Anfangsgeschwindigkeiten (v) wurden dann gegen die reziproken Werte der entsprechenden Substratkonzentrationen (c) entsprechend folgender Gleichung aufgetragen:

$$\frac{1}{v} = \frac{K_m}{v_{\max}} \times \frac{1}{c} + \frac{1}{v_{\max}}$$

V_{\max} ist die theoretische Maximalgeschwindigkeit der Reaktion.

Das Pentadecapeptid wurde durch Rennin zwischen Phe und Met quantitativ gespalten (Abb 2). Die Spaltung war nach 30 min beendet.

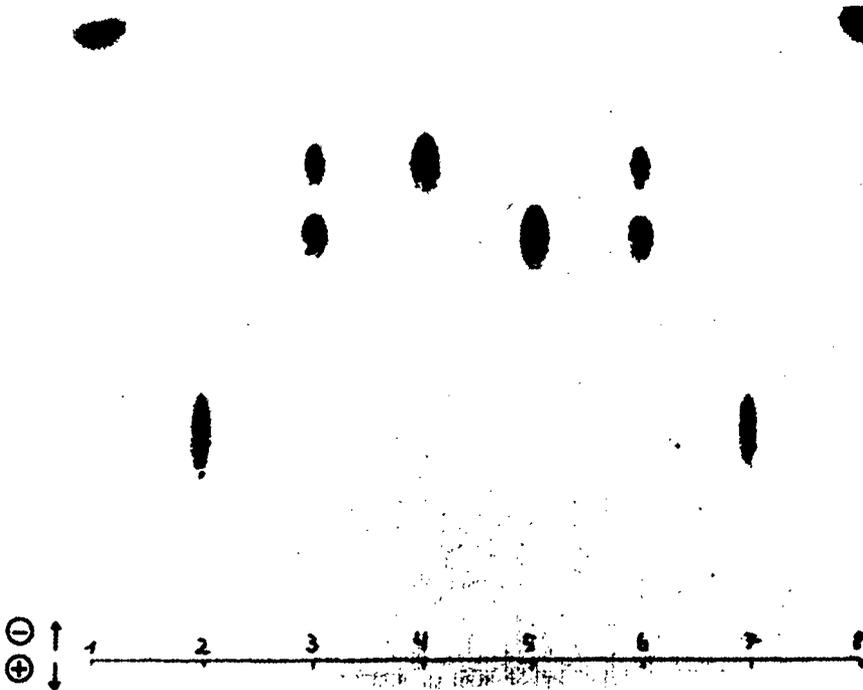


ABB 2. von links nach rechts Asp. Pentadecapeptid, Pentadecapeptid + Rennin, Synth. H-Lys-His-Pro-Pro-His-Leu-Ser-Phe-OH, Synth. H-Met-Ala-Ile-Pro-Pro-Lys-Lys-OH, Pentadecapeptid + Rennin, Pentadecapeptid, Asp

Nach Angaben von Hill,⁴ der die Spaltung des Pentapeptids H-Ser-Leu-Phe-Met-Ala-OME durch Rennin untersuchte und eine Michaelis-Konstante von $K_m = 4 \pm 2$ mMol/l fand, soll Ser für die Substratspezifität verantwortlich sein. Wir synthetisierten H-Leu-Ser-Phe-Met-Ala-OH*, H-Ser-Leu-Phe-Met-Ala-OH und H-His-Leu-Ser-Phe-Met-Ala-OH und untersuchten die Spaltung durch Rennin. Nur das

* Nach Jolles⁷ liegt im κ -Casein die Sequenz Leu-Ser vor, wohingegen Hill⁴ die Sequenz Ser-Leu annimmt

TABELLE I. AMINOSÄURE-ANALYSEN DER SYNTHETISIERTEN PEPTIDE (6n HCl, 110°C, 24 h)
H-Lys-His-Pro-His-Leu-Ser-Phe-Met-Ala-Ile-Pro-Pro-Lys-Lys-OH
1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15

Aminosäuren	1 15		1-8		9 15		6-11		5-10		7-6-10	
	Gef.	Theor.	Gef.	Theor.								
Lys	3.08	3	1.02	1	1.92	2	0	0	0	0	0	0
His	1.98	2	2.00	2	0	0	0	0	1.06	1	0	0
Pro	4.14	4	2.01	2	1.70	2	0	0	0	0	0	0
Leu	1.07	1	0.94	1	0	0	0.96	1	1.08	1	1.00	1
Ser	1.02	1	0.87	1	0	0	0.81	1	0.91	1	10.5	1
Phe	1.00	1	0.90	1	0	0	1.00	1	1.00	1	0.99	1
Met	0.91	1	0	0	0.74	1	0.79	1	0.92	1	0.91	1
Ala	1.05	1	0	0	1.10	1	0.87	1	0.97	1	0.99	1
Ile	1.03	1	0	0	1.05	1	0	0	0	0	0	0

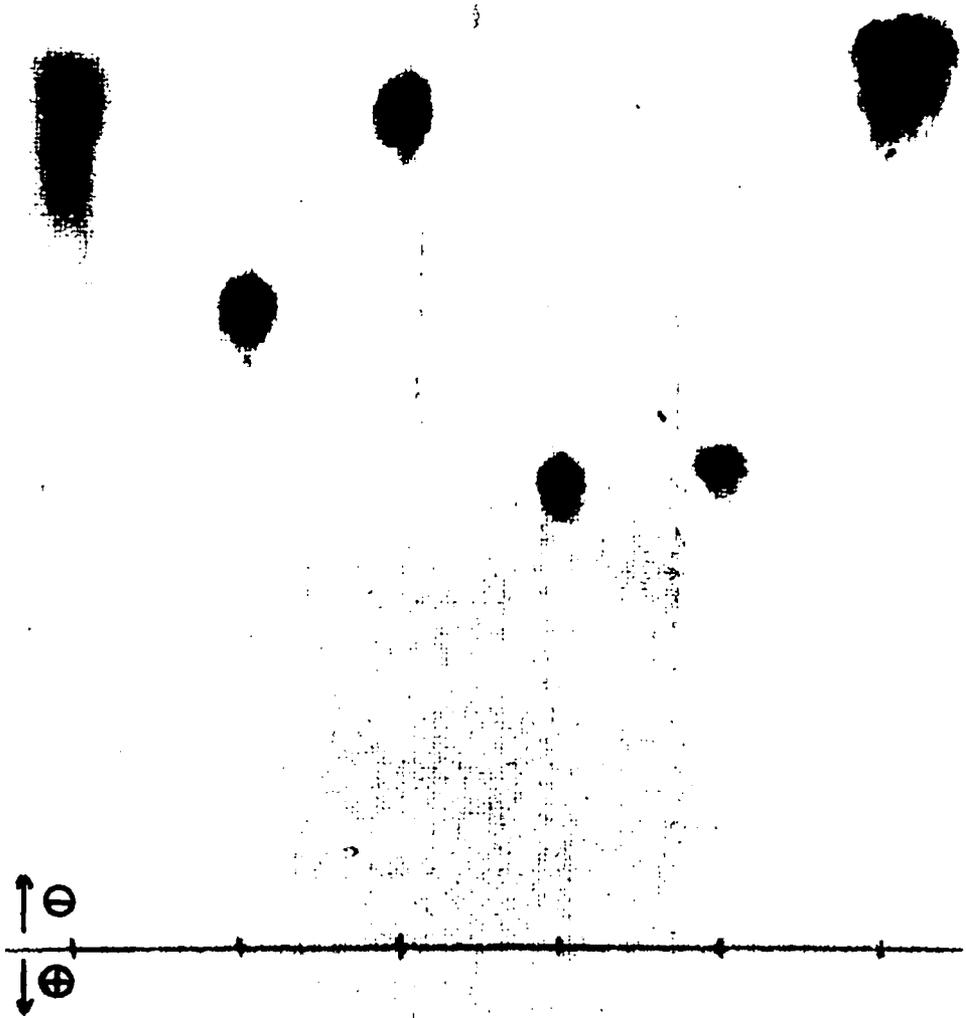


ABB 3. von links nach rechts Asp, H-His-Leu-Ser-Phe-Met-Ala-OH, H-His-Leu-Ser-Phe-Met-Ala-OH + Rennin, H-Leu-Ser-Phe-Met-Ala-OH, H-Leu-Ser-Phe-Met-Ala-OH + Lab H-Met-Ala-OH

His-haltige Hexapeptid wurde zwischen Phe und Met gespalten (s. Abb 3): die Spaltung war nach 2 Tagen beendet.

Zur Bestimmung der während der Renninspaltung des Pentadecapeptids entstehenden N-terminalen Aminosäure Met wurde das Reaktionsgemisch aus Rennin und Pentadecapeptid dansyliert und hydrolysiert. Im Hydrolysat waren durch Aminosäurechromatographie nur noch Spuren von Met nachzuweisen.

DISKUSSION

Das von uns synthetisierte Pentadecapeptid besitzt gegenüber Rennin eine hohe Substratspezifität ($K_m = 0.45 \text{ mMol/l}$), die vorwiegend auf die Anwesenheit der His-Reste im Peptid zurückzuführen ist. Die Annahme von Hill, wonach Ser für den Labangriff verantwortlich sei,⁴ konnte nicht bestätigt werden. Wohl besteht die Möglichkeit, dass Ser und His in der Sequenz---His-Leu-Ser---bei der Bildung des Enzym-Substrat-Komplexes zusammenwirken: dies könnte anhand von Peptiden, die statt Ser bzw. His andere Aminosäuren enthalten, geprüft werden.

H-Lys-His-Pro-Pro-His-Leu-Ser-Phe-Met-Ala-Ile-Pro-Pro-Lys-Lys-OH und His-Leu-Ser-Phe-Met-Ala-OH werden von Rennin gespalten, die Peptide sind in wässrigen Puffersystemen sehr gut löslich und die Substrat-Spaltprodukte können elektrophoretisch bestimmt werden; aufgrund dieser Eigenschaften würden sich die beiden Peptide sehr gut als synthetische Substrate zur Bestimmung der Enzymaktivität von Renninpräparaten eignen.

EXPERIMENTELLES

Allgemeines: t-Butyloxycarbonyl-aminosäuren wurden aus t-Butyloxycarbonylazid²¹ nach der pH-Stat-Methode von Schnabel¹⁴ hergestellt. Boc-His(Dnp)-OH wurde nach einem modifizierten Verfahren²³ synthetisiert. Boc-Ser(Bzl)-OH wurde von der Fa. Fluka bezogen. Alle Boc-Aminosäuren waren dünn-schichtchromatographisch einheitlich. Das Trägerharz (Copolystyrol-2% Divinylbenzolpolymer) Bio-Beads--SX-2, wurde von der Fa. Bio-Rad, München, bezogen. Das Reaktionsgefäß wurde nach der Vorschrift von P Kusch²⁴ angefertigt.

Sämtliche Lösungsmittel wurden vor ihrer Verwendung absolutiert und destilliert. Triäthylamin wurde über Na-Draht am Rückfluss gekocht, über Na destilliert und über Na aufbewahrt. Dicyclohexylcarbodiimid wurde im Vakuum destilliert. HBr-Gas wurde zweimal mit 10 %iger Phenollösung in Eisessig gewaschen, hierauf zweimal mit 10 %iger Resorcinlösung in TFA; Lösungsmittelreste wurden bei -40° in einer Kühlfalle ausgefroren. Die optischen Drehungen wurden am Zeiss-Kreispolarimeter 0.01° bestimmt.

Dünnschichtelektrophoresen wurden auf Merck-DC-Fertigplatten Kieselgel, 20 cm \times 20 cm, Nr. 5721/0025 in der Camag-Elektrophorese-Kammer nach Pastuska durchgeführt. Aminosäure-Analysen wurden am Aminosäure-Analysator BC- 200 der Fa. Bio-Cal, München, durchgeführt.

Für die Dünnschichtchromatographie auf Kieselgel-G-Platten verwendeten wir folgende Fließmittel-Systeme:

BPEW	= n-Butanol: Pyridin: Eisessig: Wasser = 30:20:6:24 (v/v)
BEW	= n-Butanol: Eisessig: Wasser = 4:1:1 (v/v)
PEW	= Pyridin: Eisessig: Wasser = 50:30:15 (v/v)
2-Bu ^o EW	= 2-Butanon: E.essig: Wasser = 10:30:25 (v/v)
EtOAcPEW	= Äthylacetat: Pyridin: Eisessig: Wasser = 5:5:1:3 (v/v)
BIMW	= n-Butanol: Isopropanol: Monochloressigsäure: Wasser = 65:15:3:20 (v/v/w/v)
SIMW	= sek.-Butanol: Isopropanol: Monochloressigsäure: Wasser = 70:10:3:40 (v/v/w/v)
CME	= Chloroform: Methanol: Eisessig = 90:10:5 (v/v)

Die Substanzen wurden mit Ninhydrin- und Chlorreagenz²⁴ angefärbt; His-haltige Peptide ausserdem mit Pauly's---Reagenz.²⁵

Für die Dünnschichtelektrophoresen verwendeten wir folgenden Puffer (pH 1.9): Ameisensäure (88 %ig): Eisessig: Wasser = 15:10:27 (v/v).

Synthese von Boc-Lys(Z)-OH

H-Lys(Z)-OH 90.35 g (0.5 Mol) Lysinhydrochlorid wurden in 1 l eines Äthanol-Wasser-Gemisches (3:1, v/v) gelöst und bei 20° mit 50.5 g (0.5 Mol) Et₃N versetzt. Nach kräftigem Umschütteln gab man 150.0 g (0.66 Mol) Phenylbenzylkohlen säureester²⁶ hinzu und schüttelte nach Zugabe von weiteren 0.5 l Äthanol: Wasser = 3:1 drei Tage auf der Schüttelmaschine. Die ausgefallenen Kristalle wurden abgesaugt, i. Vak. bei 40° über P₂O₅/KOH getrocknet und aus Dioxan/Wasser (1:1, v/v) umkristallisiert. Ausbeute: 79.4 g (58.3% d. Th.); Schmp.: 254-256°; $R_f_{\text{BPEW}} = 0.57$.

Boc-Lys(Z)-OH. 79.0 g (0.28 Mol) *H-Lys(Z)-OH* wurden in 300 ml Dioxan/Wasser (1:1, v/v) suspendiert und tropfenweise mit 4 n NaOH versetzt, bis alles gelöst war. Nach Zugabe von 44.3 g (0.31 Mol) Boc-Azid²¹ erwärmte man die Lösung auf 45° und hielt das Gemisch unter Zugabe von 4 n NaOH unter kräftigem Rühren auf einem pH von 10.2. Nach 5 h war die Reaktion beendet (Laugenverbrauch: ~148 ml 4 n NaOH). Dioxan wurde i. Vak. abgezogen, überschüssiges Boc-Azid durch dreimaliges Ausäthern entfernt und die wässrige Lösung unter Eiskühlung mit fester Citronensäure auf pH 2-3 eingestellt. Die angesäuerte Lösung extrahierte man dreimal mit Äthylacetat, wusch die vereinigten organ. Extrakte mit ges. NaCl-Lösung neutral und trocknete über Na₂SO₄. Nach Abziehen des Lösungsmittels i. Vak. erhielt man 93.0 g (89.4% d. Th.) eines farblosen Öls, das dünn schicht chromatographisch einheitlich war. $R_{\text{FCME}} = 0.68$.

Chlormethylierung der Bio-Beads S---X2 (200-400 Mesh). 100 g mit n NaOH, Wasser, 2 n HCl und Methanol gewaschene Bio-Beads S X2 (200-400 Mesh)* wurden in 400 ml Methoxychlormethan²⁷ suspendiert, 1 h bei 25° gequollen, auf 0° abgekühlt und mit einer vorgekühlten Lösung von 7.52 ml SnCl₄ in 200 ml Methoxychlormethan versetzt. Die Suspension wurde unter Feuchtigkeitsausschluss 30 min bei 0° gerührt, abfiltriert und auf der Nutsche mit folgenden Lösungsmitteln gründlich gewaschen: Dioxan/Wasser = 3:1 (2 l), Dioxan/3n HCl = 3:1 (2 l), Wasser (2 l), Wasser/Dioxan = 2:1 (1 l), 1:1 (1 l), 1:2 (1 l), Dioxan (1 l), Dioxan/Methanol = 2:1 (1 l), 1:1 (1 l), 1:2 (1 l), Methanol (1 l). Das Harz wurde über Nacht i. Vak. bei 100° getrocknet, es enthielt 1.32 mMol Cl/g.

Boc-Lys(Z)-Polymeres. 10 g (13.2 mMol Cl) Polymeres wurden in 50 ml abs. Äthanol suspendiert, mit 5.12 g (13.2 mMol) Boc-Lys(Z)-OH und 12.0 g (11.9 mMol) Et₃N versetzt und während 24 h im Ölbad unter Feuchtigkeitsausschluss am Rückfluss gekocht. Das Boc-Lys(Z)-Harz wurde abfiltriert und mit folgenden Lösungsmitteln je dreimal gewaschen: Äthanol, Äthanol/Wasser 2:1, 1:1, Wasser, Methanol, Äther, Man trocknete i. Vak. über P₂O₅/KOH und bestimmte von 20 mg des Produktes durch Lys-Abspaltung mittels TFA/HBr den Substitutionsgrad des Aminosäure-Harzes, Lysin-Gehalt des Harzes: 0.37 mMol/g.

Boc-Lys(Z)-His(Dnp)-Pro-Pro-His(Dnp)-Leu-Ser(Bzl)-Phe-Met-Ala-Ile-Pro-Pro-Lys(Z)-Lys(Z)-Harz. Für die Synthese wurden 1.56 g (0.57 mMol Lys) Boc-Lys(Z)-Harz eingesetzt. Das in CH₂Cl₂ gequollene Harz enthielt 4.2 ml CH₂Cl₂/g. Diese Lösungsmittelmenge muss bei der Herstellung des TFA/CH₂Cl₂-Gemisches, des DMF/CH₂Cl₂-Gemisches und der Et₃N-Lösung berücksichtigt werden.

Boc-Deblockierungsmittel: TFA:CH₂Cl₂ = 77:23 v/v), TFA-Endkonzentration = 50 %ig bei Zugabe von 11.7 ml TFA/CH₂Cl₂-Lösung.

Et₃N/CHCl₃-Gemisch: 16 %ige Et₃N-Lösung in CHCl₃; Et₃N-Endkonzentration 10 %ig bei Zugabe von 10 ml 16 %iger Et₃N-Lösung

DMF/CH₂Cl₂-Gemisch: DMF:CH₂Cl₂ = 54:16 (v/v); DMF-Endkonzentration 33 %ig bei Zugabe von 7 ml DMF/CH₂Cl₂-Gemisch.

DCCI-Lösung: 2 m DCCI in CH₂Cl₂.

Die einzelnen Boc-Aminosäuren wurden in 10-fachem molarem Überschuss (je 6 mMol) mit der äquivalenten Menge DCCI gekuppelt.

Ein Zyklus für den Einbau einer Aminosäure in die Peptidkette beinhaltet folgende Wasch- und Reaktionsschritte (3 min Schüttelzeit/Schritt): 1) 3-mal waschen mit CH₂Cl₂/EtOH (1:1); 2) 3-mal waschen mit EtOH; 3) 3-mal waschen mit AcOH; 4) 3-mal waschen mit CH₂Cl₂; 5) TFA/CH₂Cl₂, 20 min; 6) 3-mal waschen mit CH₂Cl₂; 7) 3-mal waschen mit CHCl₃; 8) Et₃N/CHCl₃, 15 min; 9) 3-mal waschen mit CHCl₃; 10) 3-mal waschen mit CH₂Cl₂; 11) Boc-Aminosäure, in DMF/CH₂Cl₂, 15 min; 12) DCCI/CH₂Cl₂, 16-18 h.

* Fa. Bio-Rad, München

Nach Einbau des letzten Boc-Lys(Z)-OH wurde bis einschliesslich Schritt 6) weitergearbeitet. Pro Waschschritt wurden, wenn nicht anders angegeben (s. o.) 10 ml Lösungsmittel verwendet. Nach Schritt 7) wurden die Proben für die Aminosäure Kontrollanalysen zur Ermittlung der Kupplungsrate entnommen.

Die Peptid-Harze wurden in Dioxan: conc. HCl = 1:1 (v/v) 24 h bei 110° i. Vak. hydrolysiert.

H-Lys-His(Dnp)-Pro-Pro-His(Dnp)-Leu-Ser-Phe-Met-Ala-Ile-Pro-Pro-Lys-Lys-OH. 4 HBr (MW = 2383·7). Das CH₂Cl₂-feuchte Peptid-Harz wurde im Reaktionsgefäss mit einem Gemisch aus 20 ml TFA und 3 ml Anisol übergossen und durchgeschüttelt. In diese Suspension wurde 1½ h gereinigtes HBr-Gas eingeleitet. Nach dieser Zeit werden jedoch nur 26·8 mg Hydrobromid vom Träger abgespalten: die Abspaltung mit HBr in reiner TFA wurde deshalb wiederholt. Nach weiteren 2 h wurde die Hauptmenge des Peptidhydrobromids abgelöst (795·3 mg).

Nach Abfiltrieren des Polymeren wurden die TFA-Filtrate i. Vak. eingedampft und die öligen Rückstände mit Äther durchgerieben. Der gelbe pulverige Niederschlag wurde abgesaugt, dreimal mit Äther gewaschen und i. Vak. über P₂O₅ getrocknet.

Gesamtausbeute an Dnp-Peptidhydrobromid (MW = 2383·7): 822 mg (59·8%, bzg. auf Boc-Lys(Z)-Harz).

Aminosäure-Analyse (24 h, 110°, 6n HCl):

Ser 0·92 (1), Pro 4·04 (4), Ala 1·00 (1), Met 0·36 (1), Ile 0·92 (1), Leu 1·16 (1), Phe 1·03 (1), Lys 2·93 (3) His 1·92 (2).

Dünnschichtchromatographisch konnten neben dem Hauptprodukt 3 Substanzen in geringer Konzentration nachgewiesen werden:

$R_{f\text{BPEW}}$ Hauptprodukt = 0·44; R_{Asp} = -0·22 pH 1·9, 20 V/cm, 2 h; Verunr. 1 = 0·35; Verunr. 2 = 0·50; Verunr. 3 = 0·57.

H-Lys-His-Pro-Pro-His-Leu-Ser-Phe-Met-Ala-Ile-Pro-Pro-Lys-Lys-OH (MW = 1727·9). 402·5 mg Dnp-Peptidhydrobromid wurden in 10 ml Wasser gelöst und mit ges. Na₂CO₃-Lösung auf pH 8·0 eingestellt. Man gab 2 ml 2-Mercaptoäthanol hinzu und rührte 16 h.

Die gelbgefärbte Lösung wurde danach mit Eisessig auf pH 5·0 eingestellt und auf eine mit 0·05 m Essigsäure äquilibrierte Sephadex G-25 superfine-Säule (2·5 cm × 80 cm) aufgegeben. Man eluierte mit 0·05 m Essigsäure bei einer Fließgeschwindigkeit von 18 ml/h × cm². Es wurden Fraktionen zu je 4·0 ml gesammelt. Das Pentadecapeptid wurde nach 358 ml Vorlauf eluiert und im Eluat mittels DC nachgewiesen. Die ninhydrinpositiven Fraktionen wurden vereinigt und mehrmals gefriergetrocknet.

Ausbeuten: Fraktion 1: 66·5 mg (22·8%)	}	bzg. auf Dnp-Peptidhydrobromid
Fraktion 2: 88·7 mg (30·4%)		
Fraktion 3: 79·2 mg (27·1%)		
Fraktion 4: 26·5 mg (9·6%)		

Die Fraktionen 2-4 waren verunreinigt, Fraktion 1 war DC-einheitlich und stellt das reine Pentadecapeptid dar. Das Peptid liegt als Tetraacetat vor* und wurde in einer Gesamtausbeute von 13·6% (bzg. auf Boc-Lys(Z)-Harz) erhalten.

Aminosäure-Analysen von Fraktion 1 (6n HCl, 110°, 24 h):

Ser_{korrt} = 1·02 (1), Pro 4·14 (4), Ala 1·05 (1), Met 0·91, Ile 1·03 (1), Leu 1·07 (1), Phe 1·00, His 1·98 (2), Lys 3·08 (3), $R_{f\text{BPEW}}$ = 0·32; R_{Asp} = -0·36, pH 1·9, 20 V/cm, 130 min; $R_{f2\text{-BuONEW}}$ = 0·67; $R_{f\text{SIMW}}$ = 0·14; $[\alpha]_{\text{D}}^{24}$ = -121·6° (c 0·63, 50%ige HCOOH).

H-Lys-His-Pro-Pro-His-Leu-Ser-Phe-OH. Ansatz: 10 g (3·64 mMol Phe) Boc-Phe-Harz.

Ausbeute an Dnp-Peptidhydrobromid: 3·50 g (66·0%).

Ausbeute an gereinigtem Peptid: 525·4 mg (15·0% bzg. auf Boc-Phe-Harz); $R_{f\text{BPEW}}$ = 0·65; R_{Asp} = -0·80; pH 1·9, 20 V/cm, 130 min; $[\alpha]_{\text{D}}^{25}$ = -54·0° (c 0·2, 50%ige HCOOH).

Aminosäure-Analyse s. Tab. 1.

H-Met-Ala-Ile-Pro-Pro-Lys-Lys-OH. Ansatz: 10 g (3·51 mMol Lys) Boc-Lys(Z)-Harz.

Ausbeute an Peptidhydrobromid: 3·2 g (88·8%).

Ausbeute an gereinigtem Peptid: 357·7 mg (13·0% bzg. auf Boc-Lys(Z)-Harz); $R_{f\text{BPEW}}$ = 0·32; R_{Asp} = -0·71; pH 1·9, 20 V/cm, 130 min, $[\alpha]_{\text{D}}^{25}$ = -59·6° (c 1, 50%ige HCOOH).

Aminosäure-Analyse s. Tab. 1.

H-Leu-Ser-Phe-Met-Ala-OH. Ansatz: 5 g (1·95 mMol) Boc-Ala-Harz, Ausbeute an Peptidhydrobromid: 1·01 g (80%). Aminosäure-Analyse des Peptidhydrobromids (6 n HCl, 110°, 24 h): Leu 1·05 (1), Ser 0·89 (1),

* Für die gaschromatographische und NMR-spektroskopische Acetatbestimmung danken wir den Herren Dr I. P. G. Wirotama und Dr R. Moser

Phe 1-00 (1), Met 0-69 (1), Ala 0-93 (1): Ausbeute an gereinigtem Peptid: 236.1 mg (21.6%, bezg. auf Boc-Ala-Harz). $R_{fBPEW} = 0.67$; $R_{ASP} = -0.52$, pH 1.9, 20 V/cm, 2 h; $R_{fBIMW} = 0.62$; $R_{fBEW} = 0.23$; $R_{fPEW} = 0.92$; $[\alpha]_D^{25} = -19.36^\circ$ (c 1, 50 %ige HCOOH).

Aminosäure-Analyse des gereinigten Peptids s. Tab. 1.

H-His-Leu-Ser-Phe-Met-Ala-OH. Ansatz: 5 g (1.95 mMol Ala) Boc-Ala-Harz, Ausbeute an Dnp-Peptidhydrobromid: 1.67 g (90%). Aminosäure-Analyse des Dnp-Peptidhydrobromids (6n HCl, 110°, 24 h): His(Dnp) 1.25 (1), Leu 1.0² (1), Ser 0.85 (1), Phe 1.00 (1), Met 0.56 (1), Ala 0.91 (1), Ausbeute an gereinigtem Peptid: 274 mg (20%, bezg. auf Boc-Ala-Harz); $R_{fBPEW} = 0.55$; $R_{ASP} = -0.72$, pH 1.9, 20 V/cm, 2 h; $R_{fBIMW} = 0.40$; $R_{fBEW} = 0.12$; $R_{fPEW} = 0.69$; $[\alpha]_D^{25} = -29.3^\circ$ (c 1, 50 %ige HCOOH).

Aminosäure-Analyse des gereinigten Peptids s. Tab. 1.

H-Ser-Leu-Phe-Met-Ala-OH. Ansatz: 10 g (4.61 mMol Ala) Boc-Ala-Harz, Ausbeute an Peptidhydrobromid: 1.93 g (64%). Aminosäure-Analyse des Peptidhydrobromids (6n HCl, 110°, 24 h): Ser 0.67 (1), Ala 1.00 (1), Met 0.97 (1), Leu 1.12 (1), Phe 1.12 (1). Ausbeute an gereinigtem Peptid: 1.422 g (54%, bezg. auf Boc-Ala-Harz); $R_{fBPEW} = 0.52$; $R_{ASP} = -0.50$, pH 1.9, 20 V/cm, 2 h; $R_{fSIMW} = 0.55$; $R_{fBIMW} = 0.52$; $R_{f2-BuON_{EW}} = 0.80$; $[\alpha]_D^{25} = -27.8^\circ$ (c 1.50 %ige HCOOH). Aminosäure-Analyse des gereinigten Peptids s. Tab. 1.

Rennin-Spaltung des Pentadecapeptids. Peptid-Stammlösung: 326.1 mg (0.1886 mMol) Pentadecapeptid und 120.6 mg 2,4,6-Trinitrobenzol-sulfonsäure wurden in 100 ml 0.2 n wässrigen Citratpuffer vom pH 4.25 gelöst. Die Stammlösung besitzt eine Peptidkonzentration von 18.867×10^{-4} Mol/l. Durch Verdünnung mit 0.2 n Citratpuffer (pH 4.25) werden Lösungen folgender Konzentrationen hergestellt: c I $18.867 = 10^{-4}$ Mol/l (Stammlösung); c II 9.434×10^{-4} Mol/l; c III 6.289×10^{-4} Mol/l; c IV 3.773×10^{-4} Mol/l.

Je 1 ml dieser Lösungen wurden mit 1 ml wässriger Renninlösung* ($\sim 10^{-4}$ Mol/l versetzt und bei 30 inkubiert.

Nach 20 s, 5, 10, 15, 20, 30 min wurden die Reaktionen durch Zugabe von je 1 ml 1.6 %iger Na₂CO₃-Lösung gestoppt (End-pH der Lösung: 9.8). Nach 30 min wurden die Lösungen bei 430 nm vermessen.

Die Extinktionen werden zur Ermittlung der Anfangsgeschwindigkeit v der Reaktion gegen die Zeit aufgetragen. Die Steigung der Tangenten vom Ursprung an diese Kurven ergibt die Anfangsgeschwindigkeiten v.

Zur Bestimmung der Michaelis-Menten-Konstante wurden die reziproken Werte von v gegen die entsprechenden reziproken Werte der Substrat-Konzentration aufgetragen (Abb. 1).

$$v_1 = 0.441 \text{ E} \times \text{min}^{-1} \quad c_1 = 0.9434 \text{ mMol/l}$$

$$v_2 = 0.344 \text{ E} \times \text{min}^{-1} \quad c_2 = 0.4717 \text{ mMol/l}$$

$$v_3 = 0.293 \text{ E} \times \text{min}^{-1} \quad c_3 = 0.3145 \text{ mMol/l}$$

$$v_4 = 0.201 \text{ E} \times \text{min}^{-1} \quad c_4 = 0.1887 \text{ mMol/l}$$

Dansylierung des Spaltgemisches. Ein Gemisch aus 2 ml Peptidlösung (12 µMol Pentadecapeptid) und 2 ml Renninlösung ($\sim 10^{-4}$ Mol/l) wurden bei 30° 5h inkubiert. Das Reaktionsgemisch wurde mit 16 ml 0.1 m NaHCO₃-Lösung, und dann mit einer Lösung aus 113.8 mg (422 µMol) Dansylchlorid in 16 ml Aceton versetzt. Der pH lag bei 8.65 und sank nach 23 h auf pH 8.05. Das Reaktionsgemisch wurde i. Vak. eingedampft und der Rückstand in 6n HCl während 24 h hydrolysiert.

Bei der Aminosäure-Analyse konnten nur Spuren von Met nachgewiesen werden: Ser 0.86 (1), Ala 0.94 (1), Met 0.15 (0), Ile 1.01 (1), Leu 1.00 (1), Phe 0.54 (1), His 2.47 (2), Lys 0.41 (3): Pro konnte nicht ausgewertet werden.

Danksagung- Frau. B. Goebel, Herrn J. Fleischer, Herrn P. J. v.d. Hoek und Fr. A. Weiss danken wir für ausgezeichnete Mitarbeit.

LITERATUR

- 1 K. P. Polzhofer, *Hoppe Seyler's Z. Physiol. Chemie* **352**, 4 (1971)
- 2 P. Jollès, *Angew. Chem.* **78**, 629 (1966)
- 3 P. Jollès und C. Alais, *Biochim. Biophys. Acta* **34**, 565 (1959)
- 4 R. D. Hill, *J. Dairy Res.* **36**, 409 (1969)
- 5 A. Delfour, J. Jollès, C. Alais und P. Jollès, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **19**, 452 (1965)
- 6 J. Jollès, C. Alais und P. Jollès, *Biochim. Biophys. Acta* **168**, 591 (1968)
- 7 J. Jollès, P. Jollès, und C. Alais, *Nature, Lond.* **222**, 668 (1969)

* Hansen's Standard-Käselab-Pulver. Chr. Hansen's Laboratorium GmbH, Lübeck

- ⁸ J. Jollès, C. Alais und P. Jollès, *Helv. Chim. Acta* **53**, 1918 (1970)
- ⁹ G. R. Marshall und R. B. Merrifield, *Biochem.* **4**, 2394 (1965)
- ¹⁰ J. M. Stewart und J. D. Young, *Solid Phase Peptide Synthesis*. W. H. Freeman, San Francisco (1969)
- ¹¹ F. C. Westall und A. B. Robinson, *J. Org. Chem.* **35**, 2842 (1970)
- ¹² S. Karlsson, G. Lindeberg, J. Porath und U. Ragnarsson, *Acta Chem. Scand.* **24**, 1010 (1970)
- ¹³ F. Chillemi und R. B. Merrifield, *Biochem.* **8**, 4344 (1969)
- ¹⁴ E. Schnabel, *Liebigs Ann.* **702**, 188 (1967)
- ¹⁵ B. Iselin, *Helv. Chim. Acta* **44**, 61 (1961)
- ¹⁶ W. W. Cleland, *Biochem.*, **3**, 480 (1964)
- ¹⁷ C. S. Pande, J. Rudick und R. Walter, *J. Org. Chem.* **35**, 1440 (1970)
- ¹⁸ T. A. Mahowald, E. A. Noltmann und S. A. Kuby, *J. Biol. Chem.*, **237**, 1138 (1962)
- ¹⁹ J. Harmeyer, H.-P. Sallmann und L. Ayoub, *J. Chromatog.* **32**, 258 (1968)
- ²⁰ H. Lineweaver und D. Burk, *J. Am. Chem. Soc.* **56**, 658 (1934)
- ²¹ L. A. Carpino, *Ibid.* **79**, 4427 (1957)
- ²² K. Polzhofer, unveröffentlicht
- ²³ P. Kusch, *Kolloid-Z.* **208**, 138 (1966)
- ²⁴ R. H. Mazur, B. W. Ellis und F. S. Cammarata, *J. Biol. Chem.* **237**, 1619 (1962)
- ²⁵ E. Stahl, *Dünnschichtchromatographie* S. 501. Springer-Verlag, Berlin, Göttingen, Heidelberg (1962)
- ²⁶ H. Zahn und F. Schmidt, *Makromolek. Chem.* **36**, 1 (1960)
- ²⁷ K. W. Pepper, J. M. Paisley und M. A. Young, *J. Chem. Soc.* 4097 (1953)