

Über ϵ -Markierung von Peptiden

Automatische Sequenzanalyse des Insulins

Gerhard Braunitzer*, Barbara Schrank, Siegfried Petersen** und Uwe Petersen

(Der Schriftleitung zugegangen am 14. Mai/18. Oktober 1973)

Zusammenfassung: Zur automatischen und vollständigen Sequenzanalyse von Peptiden durch ϵ -Markierung mit Sulfonsäuregruppen enthaltenden aromatischen Senfölen werden zwei neue, fluoreszierende, wasserlösliche Isothiocyanate V und VI (Isothiocyanate der Disulfonsäure von 2-Phenyl-

benzothiazol und der Trisulfonsäure von Pyren) beschrieben. Unter Verwendung der ϵ -Markierung und des Proteinprogramms im Sequenator gelang die automatische Sequenzanalyse der Peptidketten des Insulins.

On ϵ -labelling of peptides: Automatic sequence analysis of insulin

Summary: Complete automatic sequence analysis of peptides may be achieved using aromatic isothiocyanate derivatives containing sulfonic acid groups to label the ϵ -amino groups of lysine residues. Two new fluorescent derivatives V and VI

(isothiocyanates of 2-phenylbenzothiazol and pyrene) are described. Using ϵ -labelling and the protein program of the sequenator, it was possible to analyse automatically the sequences of the insulin peptide chains.

Der schrittweise Abbau einer Peptidkette mit Phenylsenfö[1] wurde nach Perfektionierung der Ausbeuten automatisiert[2]. Um Elutionsverluste während des Abbaus zu vermeiden³, haben wir – ohne jede Änderung des Chemismus im Sequenator – versucht, durch chemische Modifizierung der Peptidketten[3,4] die Elution zurückzudrängen und so

einen vollständigen automatischen Abbau von Peptiden zu ermöglichen. Lysinhaltige Peptide werden mit hydrophilen Senfölen umgesetzt: ihre Anlagerung an die ϵ -Gruppe ist irreversibel, während das Umsetzungsprodukt des hydrophilen Senföls mit der α -Aminogruppe in saurem Milieu abgespalten wird. Nach einer so erfolgten „ ϵ -Markierung“ kann

* Postanschrift: Prof. Dr. G. Braunitzer, Max-Planck-Institut für Biochemie, D-8033 München-Martinsried, Am Klopferspitz 4.

** Postanschrift: Prof. Dr. S. Petersen, Bayer AG, Wiss. Hauptlaboratorium, D-509 Leverkusen-Bayerwerk.

Abkürzungen: I = 4-(Isothiocyanato)benzolsulfonsäure, Natriumsalz; II = 5-(Isothiocyanato)benzol-1,3-disulfonsäure, Dinatriumsalz; III = 3-(Isothiocyanato)naphthalin-1,5-disulfonsäure, Dinatriumsalz; IV = 7-(Isothiocyanato)naphthalin-1,3,5-trisulfonsäure, Trinatriumsalz; S₁ (Benzol), S₂ (Essigester), S₃ (n-Butylchlorid), R₁ (Phenylsenfö), R₂ (Quadrolpuffer), R₃ (Heptafluorbuttersäure) sind Lösungsmittel und Reagenzien des automatischen Abbaus im Sequenator; R₂ = Quadrol = N,N,N',N'-Tetrakis-(2-hydroxypropyl)äthylendiamin, vgl. I. c.[2].

⁺ Im Verlaufe von 30 Abbauschritten werden wenige mg des Proteins bzw. Peptids mit ca. 1500 ml Lösungsmittel gewaschen!

¹ Edman, P. (1950) *Acta Chem. Scand.* **4**, 283–293.

² Edman, P. & Begg, G. (1967) *Eur. J. Biochem.* **1**, 80–91.

³ Braunitzer, G., Schrank, B. & Ruhfus, A. (1970) *diese Z.* **351**, 1589–1590.

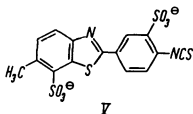
⁴ Braunitzer, G., Schrank, B., Ruhfus, A., Petersen, S. & Petersen, U. (1971) *diese Z.* **352**, 1730–1732.

das Peptid mit Phenylsenföl im Sequenator vollständig abgebaut werden^[3-6].

Wir berichteten früher^[3,4] über Senföle des Benzols und Naphthalins, die eine bis drei SO₃H-Gruppen enthalten (Verbindungen I–IV). In vorliegender Arbeit beschreiben wir zwei Senföle des 2-Phenylbenzothiazols und des Pyrens, die zwei bzw. drei SO₃H-Gruppen enthalten (Verbindungen V und VI); sie wurden zusätzlich wegen ihrer fluoreszierenden Eigenschaften ausgesucht. Als Beispiel für das neue Verfahren wird die automatische Sequenzierung des Insulins beschrieben.

Neue hydrophile Senföle

Synthese von 2-(4-Isothiocyanato-3-sulfo-phenyl)-6-methylbenzothiazol-7-sulfonsäure (nicht definiertes Na-, Ca-Salz) V

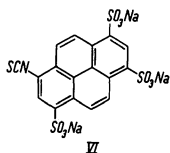


45 g 2-(4-Amino-3-sulfo-phenyl)-6-methylbenzothiazol-7-sulfonsäure, Dinatriumsalz (technisches Dehydrothiotoluidin-disulfonsaures Natrium) (78-proz.) werden in 500 ml Wasser und 4 ml konzentrierter Salzsäure gelöst, mit 13,5 g Thiophosgen 4 h bei Raumtemperatur kräftig gerührt und der schleimige gelbe Niederschlag abgesaugt. Das Produkt bleibt auch nach Lösen in Wasser und Aussalzen mit Kochsalz und Calciumchlorid schleimig. Man saugt ab, trocknet im Vakuum bei 80°C und pulverisiert das Salz.

Ausbeute: 30 g;

IR (KBr): 2050 cm⁻¹ (Senföl).

Synthese von 8-Isothiocyanatopyren-1,3,6-trisulfonsäure, Trinatriumsalz VI



23 g 8-Aminopyren-1,3,6-trisulfonsäure werden in 150 ml Wasser gelöst, mit 5 ml konzentrierter Salzsäure versetzt und mit 7 g Thiophosgen bei Raum-

temperatur kräftig verrührt bis kein Amin mehr nachweisbar ist (durch Diazotierung und Kupplung). Die Lösung wird filtriert, mit 150 ml gesättigter Kochsalzlösung ausgesalzen und das ausgefallene Produkt bei 100°C im Vak. getrocknet: 16,4 g. Zur Reinigung wird die gesamte Menge in 250 ml Wasser gelöst, mit Aktivkohle verrührt, filtriert und mit Natriumchlorid ausgesalzen. Das ausgefallene gelbe Produkt saugt man scharf ab, wäscht mit 10 ml Wasser und trocknet bei 100°C im Vak. Die Verbindung ist nach Analyse ca. 83 bis 85proz. Der Rest ist Kristallwasser und Kochsalz.

Ausbeute: 10,6 g.

IR: 2110 cm⁻¹ (Senföl);

NMR (D₂O): δ 7,7 d J=10 Hz (1H), 7,3 s (1H), 8,75 d J=10 Hz (1H), 8,95 s (2H), 9,35 s (1H).

Die neuen Reagenzien besitzen für die automatische Sequenzanalyse distinkte Vorteile: Die Senföle V und VI zeigen sehr schlechte Löslichkeit in organischen Lösungsmitteln und bewährten sich bei zahlreichen Peptiden zur ε-Markierung: sie entsprechen qualitativ der Anwendung von IV^[4] und sind den Verbindungen I bis III^[3,4] überlegen. Pyren-Derivate wurden schon früher in der Eiweißchemie^[7,8] beschrieben; V ist intensiv gelb. Die starke Fluoreszenz von V und VI erlaubt, sehr geringe Mengen ihrer Peptid-Derivate nachzuweisen; beide Verbindungen eignen sich sehr gut für chromatographische Untersuchungen. Über diese zweite Anwendungsmöglichkeit von V und VI berichten wir gesondert.

Automatische Sequenzierung des Insulins

Material und Methoden

Insulin: A- und B-Kette des Insulins vom Schwein waren Präparate der Firma Schwarz/Man; N. Y. (USA).

Chemikalien: Die Reinigung von S₁, S₂, R₁ und R₃ zur Sequenzanalyse wurde in unserem Laboratorium durchgeführt, S₃ und R₂ (Quadrol) und teilweise auch R₁

⁵ Braunitzer, G., Chen, R., Schrank, B. & Stangl, A. (1973) *diese Z.* **354**, 867–878.

⁶ Braunitzer, G. (1971) Colloque Montpellier, 28–29 Sept., S. 3–10, Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale.

⁷ Chadwick, C. S., Johnson, P. & Richards, E. G. (1960) *Nature [London]* **186**, 239–240.

⁸ Knopp, J. & Weber, G. (1967) *J. Biol. Chem.* **242**, 1353–1354.

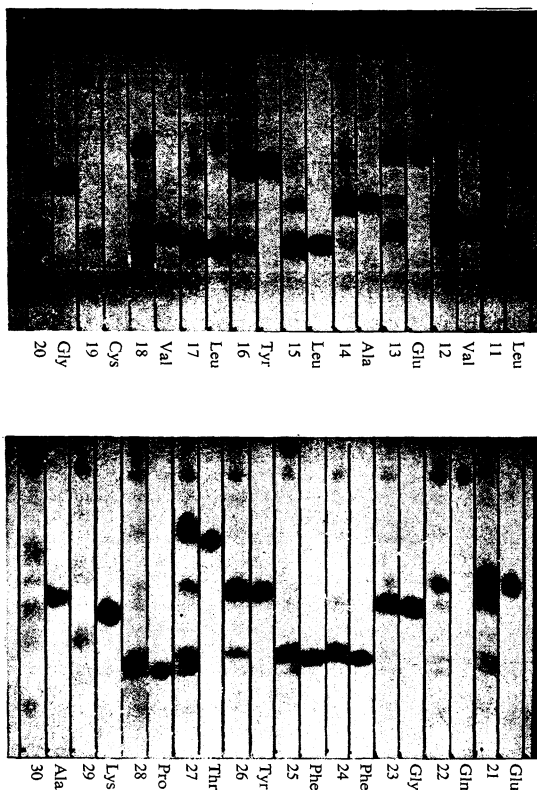


Abbildung. Dünnschichtchromatogramme der über 11 bis 30 Schritte im Sequenator erhaltenen Abbauprodukte der Insulin-B-Kette des Schweins (Protein-Quadrol-Programm).

Aufnahmen im Transilluminator, H₁-System: Wiedergegeben sind die Essigester-Fractionen. Die Zahl entspricht den jeweiligen Abbauschritten im Sequenator, die zu erwartenden Aminosäuren sind parallel als Referenz getupfelt^{9,10}. In der wäßrigen Phase verblieben sind: 19 = Cysteinsäure; 22 = Arg; 29 = Lys, ϵ -markiert.

⁹ Braunitzer, G. & Schrank, B. (1970) *diese Z.* **351**, 417.

¹⁰ Edman, P. (1970) in *Protein Sequence Determination* (Needleman, S. B., Hrsg.) S. 211–255, Springer Verlag, Berlin.

waren Produkte der Fa. Pierce, Rockford (USA). S₂ wurde mit Trifluoressigsäure anstelle mit Essigsäure angesäuert, da die Filmbildung mit Trifluoressigsäure besser gelingt als mit Essigsäure. Wir führen diesen Effekt auf die Verdrängung von Quadrol von den -SO₃H-Gruppen durch Trifluoressigsäure zurück.

Programm: Normales Proteinprogramm^[2] mit zweimaliger Zyklisierung. S₁, 500 sec; S₂, 800 sec. Pyridinlösungen von II, III, IV, V und VI: 100 mg II bis VI wurden in 1 ml 0,5proz. wäbrigem Pyridin (auf pH 6,0 titriert) gelöst, über Sephadex G-15 (0,9 × 60 cm) im gleichen Puffer chromatographiert und die Fraktionen von II bis VI lyophilisiert.

Umsetzung der Insulinketten nach Methode I^[4]

Die Umsetzung der A-Kette erfolgte wie früher beschrieben^[4,6]. B-Kette: 0,5–1,0 μMol der oxidierten B-Kette wurde mit 4 mg (≈10 μMol) IV, V oder VI (als Pyridinsalz) in 40 μl Wasser gelöst und 40 μl 3-Dimethylamino-1-propin^[9] hinzugegeben und bei 50°C unter Stickstoff inkubiert. Nach 15 min wurde der Ansatz mit 110 μl Wasser und 200 μl Äthanol verdünnt und sofort in den Becher des Sequenators eingebracht, kurz getrocknet und 1 min in S₁ (Benzol) zur Entfernung von 3-Dimethylamino-1-propin gewaschen. Der Abbau wurde mit Programmpunkt 1 (Anlagerung R₁, Phenylsenföhl) begonnen und nach 29 Schritten beendet: Die 30. Aminosäure, das C-terminale Alanin im Analysator nachgewiesen und quantitativ bestimmt.

Gerät: Sequencer der Fa. Beckman Instruments, Palo Alto, Kalifornien (USA).

Die Thiohydantoine wurden durch Dünnschichtchromatographie identifiziert: Wir verwendeten den tert.-Butylester der Propionsäure oder das H-System^[10] oder auch in vielen Fällen diese Systeme nacheinander.

Ergebnisse

Die Leistungsfähigkeit der beschriebenen Verfahren kann am Beispiel der Analyse der A- und B-Kette des Insulins belegt werden: während über die automatische Sequenzierung der A-Kette sowohl von anderen Autoren^[11–13] als auch von uns^[6] berich-

tet wurde, gelang es nun, die B-Kette zu analysieren. Ihre Fixierung erfolgt durch Umsetzung mit IV, V oder VI: alle Derivate liefern gleich gute Ergebnisse. Als Beleg für die Qualität der Befunde sind die Dünnschichtchromatogramme der Essigester-Fractionen der Thiohydantoine (Schritte 11–30) wiedergegeben (s. Abbildung).

Die Chromatogramme zeigen zweierlei: trotz mehr als dreifacher Dosierung der Thiohydantoine sind kaum Nebenbanden zu sehen, d. h., daß die Analyse der Peptidketten sehr gut gelingt und daß SO₃H-Gruppen den Abbau nicht stören; weiterhin sind kaum Überlappungen festzustellen, die Chromatogramme liefern also klare Ergebnisse. Die Ausbeute ist gut (UV) und beträgt je Schritt nicht ganz 97%; hierbei sind die Verluste des Auswaschens mit einbezogen.

Die Sequenz der Insulinkette wurde durch die Analyse von mehr als 150 Peptiden erarbeitet^[14,15]. Die früher beschriebene Analyse der A-Kette^[6] und die hier wiedergegebenen Daten für die B-Kette beinhalten ein einfaches Verfahren, mit dem Insuline in sehr kurzer Zeit direkt und rein automatisch im Sequenator analysiert werden können.

Die Methode der ε-Markierung ist leistungsfähig und besitzt den Vorteil, daß sowohl Proteine wie Peptide mit dem gleichen Programm und denselben Chemikalien untersucht werden können. Die Ausbeute hängt nach unseren Erfahrungen auch von der Reinheit der Peptide ab, wobei Verunreinigungen durch „Nicht-Peptidanteil“ (Salz, Puffer, Kohlenhydrate usw.) von Bedeutung zu sein scheinen: Die besten Ergebnisse ergeben Peptide, die über Säulen mit synthetischen Trägern gereinigt werden.

Wir danken der Deutschen Forschungsgemeinschaft für die Gewährung einer Sachbeihilfe und Fräulein *Annette Ruhfus* für ihre ausgezeichnete Mitarbeit.

¹³ Sequenator Manual: Fa. Joel Instruments, Tokio, Japan.

¹⁴ Sanger, F. & Tuppy, H. (1951) *Biochem. J.* **49**, 463–490.

¹⁵ Sanger, F. & Thompson, E. O. P. (1953) *Biochem. J.* **53**, 353–374.

¹¹ Laursen, R. A. (1971) *Eur. J. Biochem.* **20**, 89–102.

¹² Sequencer Manual: Fa. Beckman Instruments, Palo Alto, Calif., USA.