Weitere Untersuchungen zur Aminosäuresequenz des Melittins, III¹

Hydrolyse mit hochgereinigtem Trypsin

JOACHIM JENTSCH *

Institut für Pharmakologie und Toxikologie der Universität Würzburg (Direktor: Prof. Dr. Dr. W. NEUMANN †)

(Z. Naturforsch. 24 b, 264—265 [1969]; eingeg. am 15. November 1968)

In einer früheren Mitteilung² berichteten wir über die Sequenzanalyse des Bienengiftes Melittin aus den tryptischen und peptischen Spaltstücken. Das zur Analyse verwendete Trypsinpräparat spaltete die Polypeptidkette in sehr guter Ausbeute an einer atypischen Stelle, nämlich am Tryptophanrest in Pos. 19. Um zu entscheiden, ob diese Spaltstelle auf chymotrypsische Verunreinigungen des Trypsins zurückzuführen ist oder ob Tryptophan entgegen den früheren Befunden² nicht Pos. 19, sondern den C-Terminus des Melittins darstellt, wurde die Spaltung mit hochgereinigtem Trypsin wiederholt. Über die Ergebnisse wird nachstehend berichtet.

Material und Methoden

18,6 mg Trypsin („frei von Chymotrypsin“) werden in 5,4 ml 0,01 M CaCl₂-Lösung gelöst und mit 4,9 mg TPCK ** in 0,1 ml wasserfreiem Methanol versetzt. Die Reaktionsmischung wird 5 Std. im Autotitrator der Fa. Metrohm AG, Herisau (Schweiz), bei pH 7,0 durch Zugabe von 0,5 N NaOH gehalten. Ohne vom Präzipitat abzufiltrieren, wird die Lösung anschließend an Sephadex G-75 in 0,05 M Ammoniumformiatpuffer, pH 8,0, chromatographiert.

Zur tryptischen Spaltung werden 29,7 mg Melittin als 0,5-proz. Lösung in 0,1 M Ammoniumbicarbonat-Puffer, pH 7,8, 6 Std. bei 37 °C mit 2 Gew.-% gereinigtem Trypsin behandelt. Das tryptische Hydrolysat wird mit 0,5 N Ameisensäure auf pH 3,8 titriert, ein geringer Teil des Hydrolysates wird durch die Fingerpintmethode auf seine Zusammensetzung untersucht (Abb. 1 a) und der Rest an phosphorylierter Cellulose (1,17 mÄqu./g; Serva-Entwicklungslabor, Heidelberg) chromatographiert (Abb. 2). Die unter den Gipfeln T-1 bis T-4 erhaltenen Peptidgemische werden nach Lyophilisation papierelektrophoretisch weiter gereinigt, mit 10-proz. Pyridinlösung vom Papier eluiert, und die Peptide nach Hydrolyse mit 6 N HCl der quantitativen Aminosäureanalyse unterworfen.

Ergebnisse und Diskussion

Das bekannteste Verfahren zur Inaktivierung des Chymotrypsins im Trypsin ist die Behandlung mit ver-

Abb. 1 a—c. Fingerprints der Spaltprodukte des Melittins nach Inkubation mit unterschiedlich reinen Trypsinpräparaten. a) Hydrolyse mit TPCK-behandeltem und gefiltertem Trypsin; b) Hydrolyse mit HCl-inkubiertem Trypsin (Boehringer); c) Hydrolyse mit HCl-inkubiertem Trypsin („frei von Chymotrypsin“-Handelspräparat). 1. Richtung: Elektrophorese in Pyridin/Acetat/Wasser (40 : 6 : 1000), pH 5,9; 3200 V, 60 V/cm, 40 Min. 2. Richtung: Chromatographie in n-Butanol/Eisessig/Wasser 4 : 1 : 5 (V/V) absteigend. Anfärbung mit Ninhydrin. Sprühreaktion auf Tryptophan; waagrecht schraffiert = pos. Sprühreaktion auf Arginin; senkrecht schraffiert = pos. T-1—T-5: Reihenfolge der Elution der tryptischen Fraktionen aus der Cellulose-Ionenaustauschersäule.

dünnter Salzsäure nach NORTHROP und KUNITZ³. Während beispielsweise Humanhämoglobin mit einem so vorbehandelten Trypsin die erwarteten Spaltstücke liefert⁴, spaltet HCl-inkubiertes Trypsin (Boehringer) die Melittinkette statt zwischen Pos. 21—22 in sehr guter Ausbeute an der Carboxylgruppe des Tryptophans in Pos. 19 unter Bildung von Val-Leu-Thr-Thr-Gly-Leu-Pro-Ala-Leu-Ileu-Ser-Try. Auch ein anderes Trypsinpräparat des Handels („frei von Chymotrypsin“) spaltet nach HCl-Inkubation Melittin noch an der aromatischen Aminosäure. Daneben tritt bereits das erwartete Peptid T-X (Tab. 1) mit C-terminalem Lysin

* Jetzige Postanschrift: Dr. J. JENTSCH, Physiologisch-chemisches Institut der Universität Tübingen, 74 Tübingen, Hoppe-Seyler-Str. 1.

** Verwendete Abkürzungen: TPCK = L-(α -Tosylamido- β -phenyl)- α -thyl-chlormethylketon; T = Tryptische Spaltprodukte.

¹ II. Mitt.: J. JENTSCH, Z. Naturforsch. 24 b [1969].

² J. JENTSCH u. E. HABERMANN, Proc. of the 8. European Peptide Symposium, Noordwijk, Sept. 1966, Amsterdam 1967, S. 263.

³ J. H. NORTHROP u. M. KUNITZ, in: E. ABDERHALDEN, Handbuch der biologischen Arbeitsmethoden, Vol. IV/2 (Urban und Schwarzenberg, Berlin 1936), S. 2213.

⁴ B. LIEBOLD u. G. BRAUNITZER, Hoppe-Seyler's Z. physiol. Chem. 315, 271 [1959].