

RICHARD KUHN und DONALD EKONG

## Über ein Glykopeptid aus Kuh-Colostrum

Aus dem Max-Planck-Institut für Medizinische Forschung, Institut für Chemie, Heidelberg

(Eingegangen am 5. September 1962)

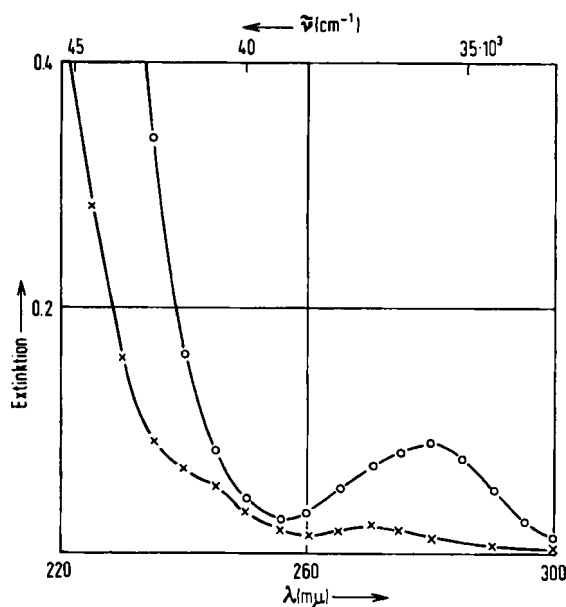
Die Bausteinanalyse eines aus Kuh-Colostrum isolierten Glykopeptids ergab (in Molen pro Mol): 4 Galaktose, 4 Hexosamin, 4 Sialinsäure, 2 Alanin, 2 Valin, 2 Isoleucin, 2 Serin, 4 Threonin, 3 Prolin, 2 Asparaginsäure, 3 Glutaminsäure und 1 Lysin. Vermutlich liegt ein Peptid aus 21 Aminosäureresten vor, wobei 4 Carboxylgruppen der Monoaminodicarbonsäuren zur Bindung von je 1 Tri-saccharid-Rest (Hexosamin + Galaktose + Sialinsäure) dienen.

Im Colostrum der Kuh finden sich, neben Albuminen und Globulinen, Glykoproteine und Glykopeptide, die verhältnismäßig reich an Sialinsäure sind<sup>1)</sup>, aber noch nicht in einheitlicher Form gewonnen wurden. Aus der durch Essigsäure nicht fällbaren Fraktion — aber auch ohne Anwendung von Säure — konnten wir jetzt aus Kuh-Colostrum ein in der Ultrazentrifuge einheitlich sedimentierendes und im Elektropherogramm einheitliches Glykopeptid erhalten. Dieses unterscheidet sich von den in größerer Zahl bekannten Glykoproteinen durch seinen hohen Gehalt an Zuckern (Galaktose 15.2%, Hexosamin 14.2%, Sialinsäure 24.1%) und entsprechend niedrigen Gehalt an Aminosäuren (Peptidanteil<sup>2)</sup> 49.3%).

Das Glykopeptid ist ein farbloses Pulver, leicht löslich in Wasser und in Formamid. Die von Kationen befreite wäßrige Lösung reagiert stark sauer. Der isoelektrische Punkt liegt zwischen pH 2 und pH 3.6; im Papierelektropherogramm läuft die Substanz anodisch noch bei pH 3.6 und kathodisch erst bei pH 2. Die Sedimentationskonstante wurde in wäßriger Lösung bestimmt zu  $S_{20}^{1\%} = 1.28 (\pm 0.09)$  [vgl.  $S_{20} = 3.11$  für  $\alpha_1$ -Säureglykoprotein des Menschenserums<sup>3)</sup>;  $S_{20}^{0.8} = 2.9$  für  $\alpha_1$ -Säureglykoprotein des Rinderserums<sup>4)</sup>]. Das spricht dafür, daß es sich um ein relativ niedermolekulares Produkt handelt. Dies wurde durch Viskositätsmessungen gestützt.  $\eta_{rel.}$  einer 2-proz. Lösung in Wasser bei 20° war 1.22. Das Molekulargewicht errechnet sich aus der Bausteinanalyse (s. unten) zu 4782. Das UV-Spektrum (Abbild. 1) zeigt keine Absorption bei 280 m $\mu$ . Es fehlen also aromatische Gruppen<sup>5)</sup>.

- 1) R. KUHN, R. BROSSMER und W. SCHULZ, Chem. Ber. **87**, 123 [1954]; E. KLENK und G. UHLENBRUCK, Hoppe Seyler's Z. physiol. Chem. **305**, 224 [1956].
- 2) Bestimmt mit Hilfe der Biuret-Reaktion nach H. L. ROSENTHAL und H. I. CUNDIFF, Clin. Chem. [New York] **2**, 394 [1956]; mit Ovalbumin als Standard.
- 3) E. L. SMITH, D. M. BROWN, H. E. WEIMER und R. J. WINZLER, J. biol. Chemistry **185**, 569 [1950].
- 4) H. E. SCHULTZE, I. GÖLLNER, K. HEIDE, M. SCHÖNENBERGER und G. SCHWICK, Z. Naturforsch. **10 b**, 463 [1955].
- 5) Vgl. die Abwesenheit aromatischer Aminosäuren in den Blutgruppensubstanzen A, B, H; W. T. J. MORGAN, Naturwissenschaften **46**, 181 [1959].

Nach Hydrolyse mit 1 *n* H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> bei 100° ließen sich chromatographisch nur Galaktose, Glucosamin und Galaktosamin als reduzierende Zucker nachweisen; die beiden Aminozucker in etwa gleichen Mengen.



Abbild. 1  
UV-Spektren in 0.1 *n* Phosphat-Puffer, pH = 6.8:  
— x — x Glykopeptid aus Colostrum (40 mg-%)  
— o — o Eialbumin (20 mg-%)

Quantitative Bestimmungen ergaben 4 Mol Galaktose, 4 Mol Hexosamin und 4 Mol Sialinsäure je Mol Glykopeptid (Tab. 1).

Tab. 1. Bestimmung der Kohlenhydrat-Komponenten des Glykopeptids (N = 8.35%)

| Baustein    | Methode                       | %    | Mole/Mol |
|-------------|-------------------------------|------|----------|
| Galaktose   | Anthron <sup>6)</sup>         | 15.2 | 4.23     |
| Hexosamin   | Ehrlich-Aldehyd <sup>7)</sup> | 14.2 | 3.96     |
| Sialinsäure | Ehrlich-Aldehyd <sup>8)</sup> | 24.1 | 3.90     |

Der Acetylgehalt des Glykopeptids (gef. CH<sub>3</sub>CO = 9.07%; mit Toluolsulfonsäure bestimmt) ist höher als er sich für 4 *N*-Acetyl-hexosamin + 4 *N*-Acetyl-neuraminsäure berechnet (ber. CH<sub>3</sub>CO = 7.2%). Vermutlich liegen die Sialinsäurereste teilweise als *O*-Acetyl-Verbindungen vor; vielleicht gingen *O*-Acetyl-Gruppen bei der Isolierung verloren. Für das Vorliegen von *N*-Glykoly-Gruppen hat die chromatographische Untersuchung der enzymatisch und durch verd. Säure abgespaltenen Sialinsäure keinen Anhaltspunkt gegeben.

Die Bestimmung der Aminosäuren (Tab. 2) verdanken wir Herrn Doz. Dr. G. BRAUNITZER, München.

<sup>6)</sup> J. ROE, J. biol. Chemistry **212**, 335 [1955].

<sup>7)</sup> N. F. BOAS, J. biol. Chemistry **204**, 553 [1953].

<sup>8)</sup> I. WERNER und L. ODIN, Acta Soc. med. Upsaliensis [N. F.] **57**, 230 [1952]; C. **1953**, 6072.

Tab. 2. Bestimmung der Aminosäuren im Glykopeptid

| Aminosäure | Mole/Mol | Aminosäure     | Mole/Mol |
|------------|----------|----------------|----------|
| Alanin     | 1.96     | Prolin         | 2.87     |
| Valin      | 1.77     | Asparaginsäure | 1.95     |
| Isoleucin  | 1.89     | Glutaminsäure  | 3.2      |
| Serin      | 2.19     | Lysin          | 1.03     |
| Threonin   | 3.93     |                |          |

Mit krist. Carboxypeptidase<sup>9)</sup> ließ sich aus dem Glykopeptid keine Aminosäure abspalten. Danach scheint die C-terminale Aminosäure als Amid vorzuliegen oder an Zucker gebunden zu sein. Als N-terminale Aminosäure fand G. BRAUNITZER Glutaminsäure (1 Rest; bestimmt mit Phenylisothiocyanat<sup>10)</sup>). Mit 2.4-Dinitro-fluorbenzol<sup>11)</sup> haben wir nur  $\epsilon$ -[2.4-Dinitro-phenyl]-lysin erhalten, das nicht von einer endständigen Aminosäure stammt.

Durch Neuraminidase (RDE) wird, ebenso wie durch 0.1 *n* HCl bei 80°, alle Sialinsäure leicht in Freiheit gesetzt (bestimmt mit Thiobarbitursäure). Bei längerer Einwirkung von 0.1 *n* HCl bei 80° tritt Galaktose auf. Das sialinsäure-haltige und das nach RDE-Einwirkung sialinsäure-freie Glykopeptid reagieren nicht mit Anilin-hydrogenphthalat.

Von Trypsin und von  $\alpha$ -Chymotrypsin wird das Glykopeptid nicht angegriffen.

Anhaltspunkte hinsichtlich der Verknüpfungsweise der Bausteine haben sich aus der Acetolyse und der Bestimmung der freien Säuregruppen ergeben. Nach verschiedenen langen Acetolysen ließen sich (neben *N*-Acetyl-glucosamin, *N*-Acetyl-galaktosamin, Galaktose und einem schnell wandernden Chromogen, das mit Ehrlich-Aldehyd schon in der Kälte Rotfärbung gab) nur 3 Bruchstücke chromatographisch nachweisen (Tab. 3).

Tab. 3. Oligosaccharide, die bei der Acetolyse auftreten

| Spaltstück | <i>R</i> <sub>Lactose</sub><br>in F—N <sup>*)</sup> | Ehrlich-Reakt.<br>direkt, warm | Morgan-<br>Elson | Thiobar-<br>bitursäure |
|------------|---|--------------------------------|------------------|------------------------|
| I          | 0.70  | ++                             |                  | —                      |
| II         | 1.0   | ++                             |                  | —                      |
| III        | 1.20  | —                              | ++               | —                      |

<sup>\*)</sup> F—N = FISCHER-NEBEL-Gemisch [Pyridin/Eisessig/Essigester/Wasser (5:1:5:3)].

Diese orientierenden Feststellungen sprechen dafür, daß nur 2 Disaccharide auftreten (II und III) und 1 Trisaccharid (I), dem die Struktur Sialinsäure < Galaktose < Hexosamin < zukommen dürfte<sup>\*\*)</sup>.

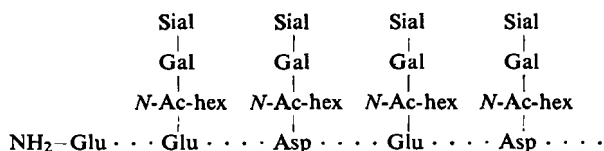
<sup>9)</sup> Nach H. FRAENKEL-CONRAT, J. I. HARRIS und A. L. LEVY, *Methods biochem. Analysis* **2**, 359 [1955].

<sup>10)</sup> Nach P. EDMAN, *Acta chem. scand.* **4**, 277, 283 [1950].

<sup>11)</sup> Nach H. FRAENKEL-CONRAT, J. I. HARRIS und A. L. LEVY, *Methods biochem. Analysis* **2**, 359 [1955].

<sup>\*\*) Unter den angewandten Bedingungen der Chromatographie war nicht zu erwarten, daß die glucosamin- und galaktosaminhaltigen Oligosaccharide getrennt werden.</sup>

Die Zahl der freien sauren Gruppen im Glykopeptid, bestimmt durch das Bindungsvermögen für Safranin<sup>12)</sup>, beträgt 4 (Tab. 4). Nach der Bausteinanalyse hätte man jedoch 9 freie Carboxylgruppen erwarten können (3 Glutaminsäure-, 2 Asparaginsäure- und 4 Sialinsäure-Reste). Dem N-Gehalt nach ist es unwahrscheinlich, daß die 5 „fehlenden“ Carboxylgruppen alle als Amid ( $-\text{CONH}_2$ ) vorliegen. Näherliegend ist die Vorstellung, daß 4 der fehlenden Carboxylgruppen je 2 Glutaminsäure- und Asparaginsäure-Resten des Peptids entsprechen (die endständige Glutaminsäure kann als Glutamin vorliegen). Das bedeutet, daß die durch Acetolyse nachgewiesenen 4 Trisaccharid-Einheiten bei esterartiger Bindung an 4 Carboxylgruppen der Monoaminodicarbonsäuren das Carboxyl-Defizit genau zu decken vermögen. Man kommt so zu etwa folgender Vorstellung über den Bau des Glykopeptids (Sial = Sialinsäure, Gal = Galaktose, N-Ac-hex = N-Acetyl-hexosamin):



Es sei erwähnt, daß auch im Submaxillaris-Mucoid<sup>13)</sup> und in Ovalbumin<sup>14)</sup> eine esterartige Bindung von Kohlenhydrat an Glutaminsäure- bzw. Asparaginsäure-Reste angenommen wird.

Das reine Glykopeptid des Kuh-Colostrums führt nicht zur Bildung von Antikörpern. Wenn man die rohe „Glykoproteid-Fraktion“ Kaninchen injiziert (je 2 ccm 2-proz. Lösung zweimal pro Woche, 4 Wochen lang; Agar-Diffusions-Test<sup>15)</sup>), so erhält man glykoproteid-präzipitierende Antisera, die jedoch mit dem reinen Glykopeptid keine Flockung geben. Die immunchemische Reinheitsprüfung ist empfindlich und wertvoll.

M- bzw. N-Blutgruppenaktivität<sup>16)</sup> zeigte das Glykopeptid nicht<sup>17)</sup>. Es ließ auch keine gonadotrope Aktivität erkennen<sup>18)</sup>.

Dem DEUTSCHEN AKADEMISCHEN AUSTAUSCHDIENST danken wir für die Gewährung eines Stipendiums.

<sup>12)</sup> Nach H. FRAENKEL-CONRAT und M. COOPER, J. biol. Chemistry **154**, 239 [1944].

<sup>13)</sup> E. R. B. GRAHAM und A. GOTTSCHALK, Biochim. biophysica Acta [Amsterdam] **38**, 513 [1960]; W. H. MURPHY und A. GOTTSCHALK, ebenda **52**, 349 [1961].

<sup>14)</sup> F. R. JEVONS, Nature [London] **181**, 1346 [1958]; P. JOHANSEN, R. D. MARSHALL und A. NEUBERGER, ebenda **181**, 1345 [1958]; L. W. CUNNINGHAM, B. J. NUENKE und R. B. NUENKE, Biochim. biophysica Acta [Amsterdam] **26**, 660 [1957].

<sup>15)</sup> Ö. OUCHTERLONY, Acta pathol. microbiol. scand. **25**, 186 [1948].

<sup>16)</sup> G. F. SPRINGER und N. J. ANSELL, Proc. nat. Acad. Sci. USA **44**, 182 [1958]; E. KLENK und G. UHLENBRUCK, Hoppe-Seyler's Z. physiol. Chem. **319**, 151 [1960].

<sup>17)</sup> Herrn G. F. SPRINGER, Philadelphia, sind wir für die Prüfung verschiedener Fraktionen sehr dankbar.

<sup>18)</sup> Herrn Doz. Dr. K. WALTER, Medizin. Klinik der Univ. Heidelberg, sei für die Prüfung aufrichtig gedankt.

## BESCHREIBUNG DER VERSUCHE

*Isolierung des Glykopeptids:* 10 l frisches Colostrum wurden 1 Stde. in der Stock-Zentrifuge (3000 U/Min.) zentrifugiert. Man ließ über Nacht bei 4° stehen und hob die Fettschicht ab. Zur mittleren, wäßr. Schicht wurde unter Rühren Eisessig zugetropft, bis pH 4.6. Nach einigen Stdn. bei 4° zentrifugierte man vom ausgefallenen Casein ab. Die überstehende Lösung wurde 4 Tage gegen fließendes Wasser dialysiert. Im Cellophan-Schlauch fiel ein Niederschlag aus; er wurde abzentrifugiert und verworfen. Die Lösung wurde dann auf 2 l eingeeengt und auf 0–4° gekühlt. 1 l Aceton, auf –10° vorgekühlt, wurde unter kräftigem Rühren zugetropft. Nach einem Tag bei 4° wurde abzentrifugiert. Der überstehenden Lösung wurde noch 1 l vorgekühltes Aceton unter Rühren zugegeben. Nach einem Tag wurde die „Glykoproteid-Fraktion“ in wenig Wasser gelöst und gefriergetrocknet. Ausb. 19.7 g \*).

10 g der „Glykoproteid-Fraktion“ wurden mit 500 ccm dest. Wasser geschüttelt. Die abzentrifugierte Lösung wurde bei 0–5° nach und nach mit 180 g Ammoniumsulfat (2.73 m) unter Rühren versetzt. Nach 24 Stdn. bei 4° wurde die Fällung abgetrennt (Fällung A). Die überstehende Lösung wurde auf pH 4.9 gebracht (Fällung B). Die Lösung wurde dann auf pH 3.6 gebracht (Fällung C). Schließlich wurde mit Ammoniumsulfat gesättigt (Fällung D). Der Sialinsäuregehalt der vier Fraktionen wurde nach Dialyse gegen dest. Wasser und Gefrier-trocknung bestimmt: A (3.01 g) 2.06%, B (261 mg) 11.51%, C (427 mg) 8.28%, D (743 mg) 15.68%.

Durch Wiederholung der  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ -Fällung wurde das Glykopeptid der Fraktion D weiter gereinigt.

Zu einer 1-proz. Lösung des durch zweimalige Umfällung mit Ammoniumsulfat gewonnenen Glykopeptids wurde das gleiche Volumen Äthanol gegeben. Nach einem Tag bei 0–4° wurde abzentrifugiert und der Lösung eine 2n Bariumacetat-Lösung zugetropft bis sich kein Niederschlag mehr bildete. Nach 2 Tagen bei 4° wurde der Niederschlag abzentrifugiert und verworfen. Die überstehende Lösung wurde dann mit dem 5fachen Vol. Äthanol versetzt. Man ließ 2 Tage stehen. Die Fällung wurde in wenig Wasser aufgenommen und gegen dest. Wasser dialysiert. Der Schlauchinhalt wurde sodann eingeeengt und gefriergetrocknet. Das so gewonnene Glykopeptid war im Papierpherogramm einheitlich (Anfärbung mit EHRLICH-Reagenz, Ninhydrin und Perjodat/Benzidin). Es sedimentierte auch einheitlich in der Ultrazentrifuge. Die freie Säure wurde wie folgt dargestellt: Eine Lösung des Salzes ließ man durch einen sauren Austauscher laufen (Amberlite IR 120,  $\text{H}^+$ -Form). Im Durchlauf befand sich das Glykopeptid als freie Säure. Die stark saure Lösung wurde sofort eingefroren und gefriergetrocknet.

*Anmerkungen:* Daß das Glykopeptid nicht erst durch Säureeinwirkung (bei der Casein-Fällung) entsteht, sondern ein natives Produkt darstellt, ergibt sich daraus, daß man es auch erhält, wenn entrahmtes Colostrum durch Zugabe von Aceton (1/2 Vol.) von Casein befreit und weiter wie oben aufgearbeitet wird. — Auch aus der „Glykoproteid-Fraktion“ ließ sich das Glykopeptid ohne Anwendung saurer Bedingungen rein gewinnen. Eine 1-proz. Lösung der Fraktion wurde mit Ammoniumsulfat halbgesättigt. Die Fällung wurde abzentrifugiert und die überstehende Lösung dann mit Ammoniumsulfat gesättigt. Das Präzipitat enthielt das Glykopeptid neben anderen Eiweißkörpern. Durch Umfällung mit Äthanol in Gegenwart von Barium-Ionen (vgl. oben) erhielt man aus 13.6 g „Glykoproteid-Fraktion“ auf diese Weise 333 mg Glykopeptid. Die nach den beiden Verfahren erhaltenen Produkte waren elektrophoretisch sowie in ihrer Zusammensetzung identisch.

\*) Die überstehende Lösung gab mit weiteren 3 l Aceton noch 3.5 g Fällung (nicht näher untersuchte, auch Mannose enthaltende Glykopeptide).

Die *Elektrophorese* wurde in der Hochspannungsapparatur von WIELAND und PFLEIDERER auf MACHEREY-NAGEL-Papier Nr. 213 ausgeführt. Als Puffer wurden verwendet:

pH 6.5 Pyridin/Eisessig/Wasser (10 : 0.4 : 90)

pH 3.6 Pyridin/Eisessig/Wasser (1 : 10 : 89)

pH 1.9 Eisessig/Ameisensäure/Wasser (15 : 5 : 80)

Bei 1000—1500 Volt ließ man ca. 2 Stdn. laufen. Die Anfärbung erfolgte mit Ninhydrin, EHRLICH-Reagenz und mit Perjodat/Benzidin. In allen drei Puffern erwies sich das Glykopeptid als einheitlich.

*Sedimentation*: In der Ultrazentrifuge wurde eine 1-proz. wäßrige Lösung des Glykopeptids untersucht. Es sedimentierte einheitlich:  $S_{20}^{1\%} = 1.28 \pm 0.09$ .

*Viskosität*: Angewandt wurde ein OSTWALD-Viskosimeter. Die Durchfluß-Zeiten bei 20° betrugen: 88 Sek. (2-proz. Lösung), 79 Sek. (1-proz. Lösung), 72 Sek. (dest. Wasser).

*Abspaltung der Sialinsäure*: a) 1.07 mg Glykopeptid + 0.2 ccm ( $1/10$  Ampulle) receptor destroying enzyme (Behring-Werke, Marburg) + 0.5 ccm 0.1 n  $\text{CaCl}_2$  ad 5 ccm bei 37°. — b) 1.07 mg Glykopeptid + 0.5 ccm 1 n  $\text{HCl}$  ad 5 ccm bei 80°. — In 1-ccm-Proben wurde die gebildete freie Sialinsäure mit Thiobarbitursäure<sup>19)</sup> bestimmt.

| a) Enzymatische Hydrolyse |            | b) Säure-Hydrolyse |            |
|---------------------------|------------|--------------------|------------|
| Zeit                      | Absorption | Zeit               | Absorption |
| 30 Min.                   | 0.124      | 30 Min.            | 0.057      |
| 60 Min.                   | 0.159      | 60 Min.            | 0.119      |
| 180 Min.                  | 0.162      | 150 Min.           | 0.183      |
| 8 Stdn.                   | 0.186      | 180 Min.           | 0.183      |

Die *Bestimmung der freien Säuregruppen*<sup>12)</sup> erfolgte mit Safranin, extra G (SCHERING-KAHLBAUM, Berlin) bei pH 10.

Tab. 4. Bindung von Safranin durch das Glykopeptid

| Glykopeptid | Farbstoff gebunden | g Farbstoff gebunden durch 4782 g Glykopeptid | Mole Farbstoff gebunden durch 1 Mol Glykopeptid |
|-------------|--------------------|---|---|
| 1.74 mg     | 0.565 mg           | 1550  | 4.36  |
|             | 0.500              | 1372  | 3.86  |
| 1.76        | 0.567              | 1539  | 4.3   |
|             | 0.565              | 1532  | 4.3   |
|             | 0.500              | 1410  | 3.97  |

*Acetolyse*: 50 mg Glykopeptid, 50 ccm Eisessig, 50 ccm Acetanhydrid und 4 ccm konz. Schwefelsäure wurden geschüttelt, bis alles gelöst war (ca. 12 Stdn.). Nach 4 Tagen bei Raumtemperatur wurde die Hälfte des Ansatzes auf etwa 100 g Eis gegossen. Nach einigen Stdn. extrahierte man mit Chloroform. Dabei gingen die acetylierten Zucker ins Chloroform, während die Aminosäuren in der wäbr. Phase blieben. Das Chloroform wurde mit  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  getrocknet und verdampft. Dann wurde 6 Stdn. bei Raumtemperatur mit methanol. Ammoniak entacetyliert<sup>20)</sup>. Das Methanol wurde eingedampft. Nach wiederholtem Abdampfen mit Methanol chromatographierte man den Rückstand auf Papier in FISCHER-NEBEL-Gemisch. Die zweite Hälfte des Ansatzes wurde nach 30 Tagen in gleicher Weise aufgearbeitet und papierchromatographiert. Die beiden Hälften lieferten dasselbe Ergebnis (Tab. 3).

<sup>19)</sup> L. WARREN, J. biol. Chemistry **234**, 1971 [1959].

<sup>20)</sup> R. KUHN und W. KIRSCHENLOHR, Chem. Ber. **87**, 384 [1954].