

pensiert. Je nach der relativen Grösse der beiden Effekte stellt sich dann ein Gleichgewicht ein, welches in den beiden hier untersuchten Fällen III(Me_{1,8}) und III(Me_{1,4,6,8}) zu einem Verhältnis von ca. 1 : 1 führt.

c) Bemerkenswert ist, dass das Tautomerieverhältnis lösungsmittelabhängig zu sein scheint, wie das Beispiel III (Me_{1,4,6,8}) zeigt¹⁷⁾. Dieser Effekt dürfte auf die verschiedenen Verhältnisse bei der Solvatation der isomeren Kationen zurückzuführen sein. Dieser letztgenannte Effekt macht wahrscheinlich, dass in der Tab. 7 eine bessere Übereinstimmung zwischen den Isomerenverhältnissen nach den beiden obengenannten Methoden für zwei verschiedene Lösungsmittel gefunden wurde, als man vernünftigerweise erwarten darf.

Die vorliegende Arbeit wurde vom SCHWEIZERISCHEN NATIONALFONDS (Projekt Nr. 2766) unterstützt. Ausserdem dankt DORIS MEUCHE der STIFTUNG FÜR STIPENDIEN AUF DEM GEBIETE DER CHEMIE für die Gewährung eines Stipendiums.

SUMMARY

The NMR. spectra of the five monomethylazulenes and of some polysubstituted azulenes, as well as those of their conjugate acids (azulenium cations), are recorded. It is shown that protonation of azulenes lacking C_{2v} symmetry leads to a tautomeric equilibrium of two conjugate acids. The position of this tautomeric equilibrium is in essential agreement with the one previously predicted from the UV. spectra on the basis of a MO treatment.

Laboratorium für Organische Chemie der
Eidg. Technischen Hochschule, Zürich
Department of Chemistry,
The University of St. Andrews

¹⁷⁾ Private Mitteilung Dr. D. DREYER und Dr. L. REPOGLE.

279. Untersuchungen über die Plastein-Reaktion, VI¹⁾

Einfluss der Kettenlänge und der Endgruppen des Monomeren auf die Kondensierbarkeit^{1a)}

von Helmut Determann, Klaus Bonhard²⁾, Rudolf Köhler und Theodor Wieland

(6. VI. 63)

In dem ersten synthetischen, in Gegenwart von Pepsin kondensierbaren Penta-peptid L-Tyrosyl-L-isoleucyl-glycyl-L-glutamyl-L-phenylalanin (I)³⁾

war die Veränderung der mittelständigen Aminosäuren ohne besonderen Einfluss auf

¹⁾ 5. Mitteilung: H. DETERMANN, O. ZIPP & H. J. TORFF, Liebigs Ann. Chem., im Druck.

^{1a)} An der Herbstversammlung der Schweiz. Chem. Gesellschaft vom 31. VIII. 63 in Sitten vorgetragen; veröffentlicht laut besonderem Beschluss des Redaktionskomitees.

²⁾ Teil der Dissertation K. BONHARD, Universität Frankfurt (Main) 1963, D 30.

³⁾ H. DETERMANN & TH. WIELAND, Makromol. Chem. 44-46, 312 (1961).

die Reaktivität geblieben^{1) 4)}. Aus früheren synthetischen Versuchen^{5) 6)} und auch aus Beobachtungen bei der Isolierung Plastein-aktiver Peptide aus dem Partialhydrolysat von Fibrin⁷⁾ war bekannt, dass keineswegs alle Oligopeptide unter dem Einfluss proteolytischer Enzyme zu Polypeptiden zusammentreten können. Offenbar müssen mehrere Strukturmerkmale zusammenkommen, um ein Peptid für diese Reaktion als Substrat geeignet zu machen. Wir haben uns die Aufgabe gestellt, einige dieser besonderen Eigenschaften ausfindig zu machen.

Kettenlänge und Plastein-Reaktion. Es war zu erwarten, dass für die Kondensierbarkeit eines Peptids eine bestimmte Anzahl von Aminosäureresten in der Kette notwendig ist. Wir haben unter weitgehender Beibehaltung der Endgruppen und der charakteristischen Aminosäuren in der Kette durch Variation des Pentapeptids I eine «homologe» Reihe vom Di- bis Hexapeptid dargestellt und jedes Glied auf seine Reaktivität geprüft (s. Tabelle 1). Man erkennt, dass die Grenze in dieser Reihe beim Tetrapeptid III liegt. Es ist äusserst schwer in Wasser löslich (Sättigung bei $1,6 \times 10^{-3}$ Mol/l), tritt jedoch in solcher Lösung beim Inkubieren mit Pepsin zu einem noch schwerer löslichen Polypeptid zusammen. Sowohl die beiden grösseren (I, II) als auch die beiden kleineren Peptide (IV, V) sind in Wasser bei pH 5 wesentlich löslicher als das mittlere Tetrapeptid. In ihrer Plasteinbildung unterscheiden sie sich jedoch grundlegend. Während aus konzentrierten wässrigen Lösungen des Hexapeptids II und des Pentapeptids I beim Inkubieren mit 1% Pepsin innerhalb von wenigen Stunden 20–30% der Peptideinwaage als Kondensationsprodukt ausfallen⁸⁾, zeigen entsprechende Ansätze mit dem Tripeptid IV und dem Dipeptid V keine Veränderung des eingesetzten Substrats. Bei zeitlich sehr ausgedehnter Inkubation kommt es erwartungsgemäss in allen Fällen zu einer geringfügigen proteolytischen Abspaltung des Phenylalanins am Carboxylende.

Tabelle 1 *). Kettenlänge und Plastein-Reaktion

	Peptid	Plasteinbildung
II	H·Tyr-Leu-Ala-Gly-Glu-Phe·OH	+
I	H·Tyr-Leu-Gly-Glu-Phe·OH	+
III	H·Tyr-Leu-Glu-Phe·OH	+
IV	H·Tyr-Glu-Phe·OH	–
V	H·Glu-Phe·OH	–

* Alle Untersuchungen wurden mit L-Aminosäuren ausgeführt, für deren Abkürzung die üblichen Symbole Verwendung finden.

Endaminosäuren und Plastein-Reaktion. Bei der eben beschriebenen Variation der Kettenlänge hatten wir, um vergleichbare Verhältnisse herzustellen, die aromatischen Aminosäuren am Kopf und Schwanz des Pentapeptids I beibehalten. Da nun keines-

⁴⁾ H. DETERMANN, O. ZIPP & TH. WIELAND, Liebigs Ann. Chem. 657, 172 (1962).

⁵⁾ A. I. VIRTANEN, H. K. KERKKONEN, M. HAKALA & T. LAAKSONEN, Naturwissenschaften 37, 139 (1950); A. I. VIRTANEN, Makromol. Chem. 6, 94 (1951).

⁶⁾ H. DETERMANN, Dissertation Universität Frankfurt (Main) 1958.

⁷⁾ TH. WIELAND, H. DETERMANN & E. ALBRECHT, Liebigs Ann. Chem. 633, 165 (1960).

⁸⁾ Die Abhängigkeit der Plastein-Reaktion von der absoluten Konzentration und vom Enzym-Substrat-Verhältnis ist zur Zeit Gegenstand einer genaueren Untersuchung.

wegs alle Pentapeptide ein für die Plastein-Reaktion geeignetes Substrat darstellen und die zahlreichen Veränderungen im Inneren des Pentapeptids I keinen entscheidenden Einfluss haben^{1) 4)}, müssen die endständigen Aminosäuren für die Kondensation wichtig sein. Man sollte das um so eher erwarten, als dem Pepsin auch bei der *Spaltung* von Peptidbindungen eine gewisse Spezifität zugeschrieben wird⁹⁾. Wir haben im Standardpentapeptid I die aromatischen Endaminosäuren systematisch durch Alanin ersetzt und I mit den drei resultierenden Pentapeptiden VI, VII und VIII in ihrer Plastein-Reaktion verglichen (s. Tabelle 2). Von allen vier Peptiden liessen sich bei pH 5 20-proz. wässrige Lösungen herstellen, aus denen mit Pepsin nur bei I und VI Plasteine gewonnen werden konnten. Die Pentapeptide VII und VIII waren auch nach 17stündiger Inkubation völlig unverändert. Vor allem der Unterschied im Verhalten von VI und VII deutet auf eine ausgeprägte Spezifität des Pepsins gegenüber einer lipophilen Carboxyl-Endgruppe hin. Es sieht so aus, als ob die Spezifität bei der *Kondensation* grösser ist als bei der Spaltung von Peptiden durch Pepsinkatalyse.

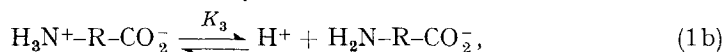
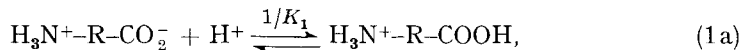
Tabelle 2. *Endgruppen und Plastein-Reaktion*

	Peptid	Plastein-Reaktion
I	H·Tyr-Leu-Gly-Glu-Phe·OH	+
VI	H·Ala-Leu-Gly-Glu-Phe·OH	+
VII	H·Tyr-Leu-Gly-Glu-Ala·OH	—
VIII	H·Ala-Leu-Gly-Glu-Ala·OH	—

pK-Wert und Plastein-Reaktion. Da im Verlauf der Plastein-Reaktion zwei Peptide unter Wasserabspaltung zusammentreten, muss bei dem einen Partner die Carboxyl- und bei dem anderen die Amino-Gruppe entladen vorliegen. Eine Teilreaktion der Kondensation wird also durch folgende Gleichung symbolisiert¹⁰⁾:



Sie lässt sich in zwei Teilgleichungen (1a, 1b) zerlegen:



von denen man erkennt, dass sie die Definitionsgleichungen der pK-Werte für die Carboxylgruppe (pK₁) und die Ammoniumgruppe (pK₃) darstellen. Für die freie Reaktionsenergie des Protonenübergangs der Gleichung (1) ergibt sich aus der VAN'T HOFF'schen Gleichung:

$$\Delta F = -RT \ln K = 1,36 (\text{pK}_3 - \text{pK}_1) [\text{Kcal/Mol}], \quad (2)$$

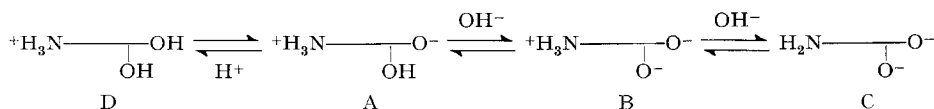
wenn man für *R* 1,99 cal/Grad und Mol, für *T* 298 Grad und die Umrechnung des natürlichen auf den dekadischen Logarithmus berücksichtigt. Je kleiner die nach Gleichung (2) zu errechnende freie Reaktionsenergie ist, desto weiter liegt das Gleichgewicht in (1) auf der rechten Seite. Das bedeutet, dass Peptide mit kleinen pK-Wert-Differenzen der Kondensation leichter zugänglich sein sollten als solche mit grossen

⁹⁾ Vgl. C. B. ANFSEN & R. R. REDFIELD, *Advances Protein Chemistry* 11, 2 (1956).

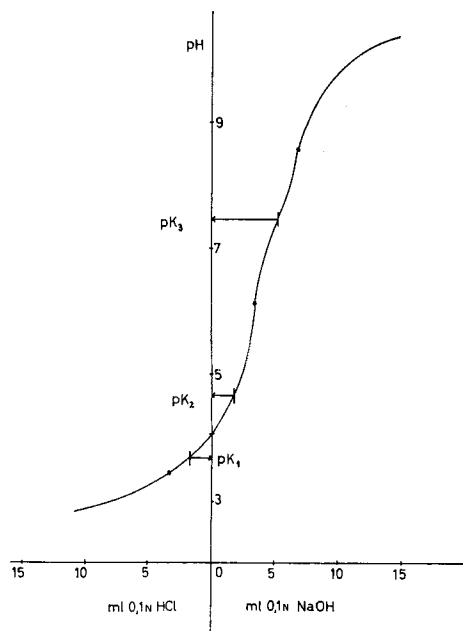
¹⁰⁾ Vgl. TH. WIELAND, *Angew. Chem.* 63, 7 (1951).

Unterschieden. Aus Messungen an einer homologen Reihe von Polyglycinen ist bekannt¹¹⁾, dass der pK-Wert für die Carboxylgruppe praktisch konstant bleibt, während der Wert für die Ammoniumgruppierung mit zunehmender Kettenlänge abnimmt. Demnach ist in längeren Peptidketten die Differenz $pK_3 - pK_1$ kleiner und damit die Zwitterionenstruktur weniger ausgeprägt. Es lag daher nahe, durch Vergleich der pK-Wert-Differenzen unserer aktiven und inaktiven Peptide zu prüfen, ob die Gleichung (1) auch bei der Plastein-Reaktion eine Rolle spielt. Es handelt sich hier in allen Fällen um Peptide mit einer α -Aminogruppe und zwei Carboxylgruppen. Die Ketten-endständige α -Carboxylgruppe unterscheidet sich beträchtlich von der γ -Carboxylgruppe der Glutaminsäure in der Seitenkette.

Ein solches Peptid liegt in wässriger Lösung praktisch vollkommen als Zwitterion A vor. Durch Zusatz von Lauge wird zunächst von der γ -Carboxylgruppe ein Proton abgespalten (B), weitere Lauge entlädt die Ammoniumgruppierung, die Form C herrscht dann im Gleichgewicht vor. Das α -Carboxylat-Anion wird nur durch starke Säure protonisiert (D), die Bestimmung des pK-Werts der α -Carboxylgruppe (pK_1)



ist daher mit einem relativ grossen Fehler behaftet. Da der Zahlenwert aber erwartungsgemäss¹¹⁾ in allen untersuchten Peptiden weitgehend konstant war, haben wir



Titrationsskurve für eine Lösung von ca. $7 \times 10^{-4} \text{ M H-Tyr-Leu-Glu-Phe-OH}$ (III)

uns auf Stichproben beschränkt und durch Titration mit Lauge zunächst den Äquivalenzpunkt der γ -Carboxylgruppe (pH bei Verbrauch von 0,5 Äquiv. = pK_2) und

¹¹⁾ Vgl. E. J. COHN & J. T. EDSALL, «Proteins, Amino Acids and Peptides», New York 1943.

dann den der Ammoniumgruppierung (pH bei Verbrauch von 1,5 Äquiv. = pK_3) bestimmt (vgl. Figur). Der Laugenverbrauch zwischen den beiden Äquivalenzpunkten lieferte uns durch Vergleich mit der Einwaage ein Reinheitskriterium für das Peptid. Bei der Berechnung der pK -Werte haben wir diese titrimetrisch ermittelte «Einwaage» zugrunde gelegt. Um die Zuverlässigkeit unserer Messanordnung (vgl. Versuchsteil) zu prüfen, haben wir die pK -Werte von reiner Glutaminsäure bestimmt und beim Vergleich mit den Literaturwerten eine ausgezeichnete Übereinstimmung erzielt. In Tabelle 3 sind die so ermittelten pK -Werte, die für die Teilreaktion (1) wichtige Differenz und die Plastein-Aktivität für die bisher betrachteten Peptide und für einige zum Vergleich herangezogene Substanzen zusammengestellt.

Tabelle 3. pK -Wert und Plastein-Reaktion

	Peptid	pK_1	pK_3	$pK_3 - pK_1$	Plastein
III	H·Tyr-Leu-Glu-Phe·OH	3,7	7,3	3,6	+
I	H·Tyr-Leu-Gly-Glu-Phe·OH	—	7,3	3,7	+
II	H·Tyr-Leu-Ala-Gly-Glu-Phe·OH	3,5	7,4	3,9	+
VII	H·Tyr-Leu-Gly-Glu-Ala·OH	3,5	7,4	3,9	—
IV	H·Tyr-Glu-Phe·OH	3,7	7,7	4,0	—
VIII	H·Ala-Leu-Gly-Glu-Ala·OH	3,7	7,9	4,2	—
V	H·Glu-Phe·OH	—	7,9	4,3	—
VI	H·Ala-Leu-Gly-Glu-Phe·OH	3,4	7,9	4,5	+
IX	H·Ala-Glu(γ -Tyr·OH)·OH	3,8	8,3	4,5	—
X	H·Ala-Glu-Phe·OH	3,4	8,3	4,9	—

Es besteht danach kein Zusammenhang zwischen Plastein-Bildung und pK -Wert-Differenz. Zwar ist der Betrag der Differenz für die kürzeren (inaktiven) Peptide (IV, V, IX und X) höher als bei den längeren (aktiven) Bausteinen (I und III), aber zum aktiven Hexapeptid II gehört ein relativ hoher Wert. Das Amino-endständige Alanin bewirkt allgemein eine Erhöhung von pK_3 . So kommt es, dass die kritische Differenz für das aktive Pentapeptid VI um 0,6 Einheiten *grösser* ist als die für das inaktive VII.

Zum Mechanismus der Plastein-Reaktion. Die vorstehend geschilderten Befunde lassen als Grund für das Eintreten der Plastein-Reaktion die Molekelgestalt und die Natur der Aminosäure am Carboxylende des Oligopeptids als entscheidend erkennen. Letztere muss nach unseren synthetischen Befunden aromatischen Charakter haben. Bei unseren früheren Studien mit natürlichen Plastein-Bausteinen fanden wir auch solche aktiv, welche ganz allgemein eine lipophile Aminosäure (Leucin, Isoleucin) am Carboxylende tragen. Damit findet eine Vermutung von VIRTANEN⁵⁾ ihre Bestätigung, der eine Verminderung der Plastein-Aktivität natürlicher Spaltpeptide mit fortschreitender Freisetzung lipophiler Aminosäuren durch Pepsin beobachtete. Dass die Molekelgestalt von entscheidendem Einfluss ist, geht daraus hervor, dass bei geeigneter Carboxyl-Endgruppe und sehr ähnlichen pK_1 - und pK_3 -Werten nur Tetra- und höhere Peptide kondensiert werden. Vielleicht ist dies kein Zufall, da für die Ausbildung der α -Helix mehr als drei Aminosäuren notwendig sind. Ausserdem muss die Oligopeptidkette des Monomeren α -peptidartig verknüpft sein, denn das Pentapeptid, das formal aus I durch Platzwechsel des Phenylalanins von der α - zur γ -Carboxyl-

gruppe entsteht (Tyrosyl-leucyl-glycyl- γ -glutamyl-phenylalanin¹²⁾), lässt sich mit Hilfe von Pepsin nicht kondensieren.

Darstellung der Modellpeptide. Für die vorstehenden Untersuchungen musste das umfangreiche Versuchsmaterial zunächst synthetisiert werden. Lediglich das Penta-peptid Tyrosyl-leucyl-glycyl-glutamyl-phenylalanin (I)⁴⁾, das Glutamyl-phenylalanin (V)³⁾ und das Alanyl- γ -glutamyl-tyrosin (IX)¹²⁾ standen zur Verfügung. Für die sieben anderen Peptide ist der Syntheseweg ausgehend von den schon früher oder in dieser Arbeit voranstehend beschriebenen Verbindungen in den Schemata 1–4 dargestellt. Die erstmals kristallisierten und wohl charakterisierten Verbindungen sind durch einen Doppelstrich gekennzeichnet. Die dort angeführten Peptidsäuren wurden alle durch Überführung in das gemischte Anhydrid mit Chlorameisensäure-äthylester¹³⁾ aktiviert. Vielfach wurden aus den Methylestern mit Hydrazinhydrat in konzentrierter alkoholischer Lösung – gelegentlich unter Erwärmen – die Hydrazide bereitet, die dann nach Überführung ins Azid zur Kupplung eingesetzt wurden. Namentlich wenn Tyrosin mit freier phenolischer Hydroxylgruppe in der Acylkomponente vorliegt, ist dieses Vorgehen einer Aktivierung mit anderen Säureestern vorzuziehen, da die Produkte der Peptidsynthese sonst häufig nur schwierig und verlustreich zu reinigen sind. Die Freisetzung der Peptide durch Hydrogenolyse der Carbobenzoxypeptid-benzylester wurde in dem wenig zur Umesterung neigenden Isopropanol (manchmal im Gemisch mit Methanol) vollzogen. Beim Hydrieren in reinem Eisessig haben wir bei erhöhter Temperatur gelegentlich innerhalb weniger Stunden eine völlige Acetylierung der Aminogruppe beobachtet. Sämtliche freie Peptide waren papierelektrophoretisch bei pH 1,9 und 6,5 einheitlich und enthielten nach Totalhydrolyse die Aminosäuren im erwarteten Molverhältnis.

Die vorliegende Arbeit wurde durch Gewährung von Beihilfen aus dem FONDS DER CHEMISCHEN INDUSTRIE und von der DEUTSCHEN FORSCHUNGSGEMEINSCHAFT unterstützt, wofür auch hier vielmals gedankt sei. Fräulein R. LÜNSE hat mit Geschick die Aminosäureanalysen ausgeführt.

Experimenteller Teil

Plastein-Reaktion. – Von einer gewogenen Menge des monomeren Peptids wird bei pH 5 (wenig 2N NaOH) eine gesättigte wässrige Lösung bereitet. Es wird 1% vom Peptidgewicht an kristallisiertem Pepsin (80 000 E, BEHRINGWERKE Marburg) eingerührt; der Ansatz bleibt 8 bis 20 Std. bei 37° stehen. Die voluminöse Fällung wird abzentrifugiert und sehr sorgfältig mit Wasser und zum Schluss mit Aceton gewaschen. Der Überstand wird elektrophoretisch auf das Vorliegen etwaiger Spaltprodukte untersucht, und die Aminosäurezusammensetzung des Plasteins wird nach Totalhydrolyse mit der des Ausgangspeptids verglichen.

Bestimmung der pK-Werte. – *Messanordnung.* Etwa 0,01 mMol Peptid wurde über Phosphorpentoxid und Ätzkali im Hochvakuum getrocknet und in 75 ml Wasser gelöst. Unter Rühren mit einem Magnetrührer wurde der pH-Wert mit Hilfe eines pH-Meters mit Einstabmesskette (KNICK, Typ 25, Berlin-Zehlendorf), das gegen Pufferlösungen geeicht war, ermittelt. Aus einer Mikrobürette von 5 ml Fassungsvermögen wurde 0,1N NaOH tropfenweise zugegeben und nach jeweils 1 bis 4 Tropfen (0,04–0,20 ml) der pH-Wert wieder abgelesen. War die Lösung austitriert, wurde mit 0,1N HCl der rückläufige Vorgang durchgemessen. Der Verlauf des pH-Wertes unterhalb pH 4 wurde mit 2N HCl annähernd ermittelt. Ein Wendepunkt ist dabei nicht mehr zu erkennen (Figur), daher wurde der Äquivalenzpunkt der α -Carboxylgruppe durch Auftragen der

¹²⁾ H. DETERMANN & K. BONHARD, in Vorbereitung.

¹³⁾ TH. WIELAND & H. BERNHARD, Liebigs Ann. Chem. 572, 190 (1951); R. A. BOISSONNAS, Helv. 34, 874 (1951); I. R. VAUGHAN, J. Amer. chem. Soc. 73, 3547 (1951).

der Einwaage äquivalenten Säuremenge auf der Abszisse nach links ermittelt. Von jedem Peptid wurden mehrere Einwaagen mehrfach hin- und hertitriert.

Glutaminsäure. Zur Prüfung unserer Messanordnung wurden verschiedene Einwaagen einer reinen Glutaminsäure titriert und die pK-Werte aus der resultierenden Graphik (vgl. Figur) bestimmt:

	pK ₁	pK ₂	pK ₃
Unsere Werte	2,37	4,25	9,72
	2,36	4,16	9,74
		4,23	9,65
		4,30	9,68
Mittelwerte	2,37	4,24 ± 0,04	9,70 ± 0,04
Literaturwerte ¹¹⁾	2,19	4,25	9,67

Ergebnisse. Nachfolgend sind die genauen Messwerte für die in dieser Arbeit beschriebenen Peptide zusammen mit den aus dem Abstand der Äquivalenzpunkte ermittelten «titrimetrischen Einwaagen» angeführt.

Peptid Nr.	Einwaage (mMol)		pK ₁ α-COOH	pK ₂ γ-COOH	pK ₃ NH ₃ ⁺
	gravi- metrisch	titrimetrisch			
I	0,053	0,051 ± 0,003	—	4,65 ± 0,03	7,3 ± 0,1
II	0,108	0,107 ± 0,002			
	0,119	0,122 ± 0,005	3,5 ± 0,1	4,60 ± 0,09	7,35 ± 0,07
	0,082	0,081			
III	0,034	0,035 ± 0,001	3,7 ± 0,1	4,53 ± 0,04	7,34 ± 0,08
IV	—	0,066 ± 0,003	3,7 ± 0,1	4,82 ± 0,06	7,71 ± 0,005
V	0,195	0,200 ± 0,004	—	4,25 ± 0,04	7,90 ± 0,02
VI	0,041	0,044 ± 0,002	3,4 ± 0,1	4,41 ± 0,004	7,9 ± 0,13
VII	0,058	0,061	3,5	4,5	7,4 ± 0,1
VIII	0,077	0,068	3,7	4,5	7,9
IX	0,255	0,247 ± 0,002	3,81 ± 0,02	—	8,30 ± 0,01
X	0,141	0,139 ± 0,002	3,4 ± 0,1	4,44 ± 0,01	8,33 ± 0,05

Bezüglich der Numerierung der Peptide vgl. Tabelle 3.

Peptidsynthesen¹⁴⁾

Alle Synthesen wurden mit L-Aminosäuren ausgeführt. Die Konstanten der einfachen Aminosäurederivate sind den Tabellenwerken¹⁵⁾ zu entnehmen. Die Schmelzpunkte sind im Kupferblock bestimmt und nicht korrigiert. Sämtliche beschriebenen Substanzen wurden, falls geladen, durch Hochspannungspapieroelektrophorese¹⁶⁾ bei pH 6,5 oder pH 1,9 als einheitlich erkannt. Die Reinheit der ungeladenen Peptidderivate wurde durch Dünnschichtchromatographie an Kieselgel G (MERCK) mit Methanol, Essigester oder Petroläther als Fließmittelkomponenten und Entwicklung mit *t*-Butylhypochlorit¹⁷⁾ überprüft. Die quantitative Aminosäureanalyse wurde mit

¹⁴⁾ Neben den in den Schemata verwendeten Abkürzungen gilt: CAE = Chlorameisensäure-äthylester und TÄA = Triäthylamin.

¹⁵⁾ M. GOODMAN & G. W. KENNER, *Advances Protein Chemistry* 12, 465 (1957); J. P. GREENSTEIN & M. WINITZ, *Chemistry of the Amino Acids*, J. Wiley & Sons, Inc., New York 1961.

¹⁶⁾ TH. WIELAND & G. PFLEIDERER, *Angew. Chem.* 67, 257 (1955); 69, 199 (1957).

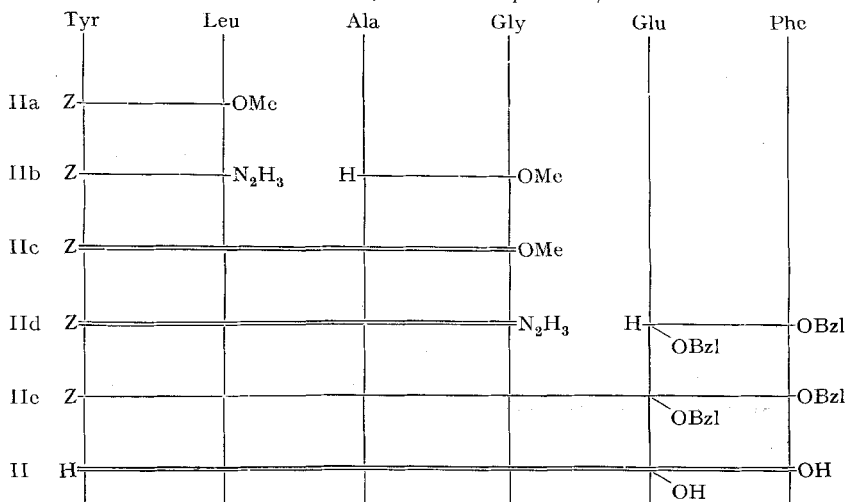
¹⁷⁾ R. H. MAZUR, B. W. ELLIS & P. S. CAMMARATA, *J. biol. Chemistry* 237, 1619 (1962).

Hilfe des Geräts von HANNIG¹⁸⁾ (BENDER & HOBEIN GmbH, München) ausgeführt. Für genauere experimentelle Angaben für die nachstehend beschriebenen Synthesen, insbesondere für die Techniken bei der «Anhydridsynthese», «Esterverseifung» und «Hydrogenolyse» sei auf die «Allgemeinen Arbeitsvorschriften» in Ref. 4) verwiesen.

Synthesen zum Schema 1. – *Bis-carbobenzoxy-tyrosyl-leucin-methylester (IIa)*. Anhydridmethode; 0,04 Mol. 18 g Bis-Z-Tyr·OH, 11,1 ml TAA, 3,72 ml CAE und 7,27 g H·Leu·OMe, HCl. Aufarbeitung in Essigester. Aus Methanol Smp. 165–166°, Ausbeute 12,6 g (54,5%).

$C_{32}H_{36}O_8N_2$ (576,6) Ber. C 66,65 H 6,29 N 4,86% Gef. C 66,70 H 6,14 N 4,93%

Schema 1. *Synthese von Peptid II*)*



*) In den Schemata und im Versuchsteil gilt neben den üblichen Symbolen für die Aminosäuren: Z = Carbobenzoxy-, OBzl = Benzylester- und OMe = Methylester-Gruppe.

*Carbobenzoxy-tyrosyl-leucin-hydrazid (IIb)*¹⁹⁾. 5,77 g (0,01 Mol) Bis-Z-Tyr-Leu-OMe wurden in 30 ml siedendem Äthanol suspendiert. Mit 3 ml (0,06 Mol) Hydrazinhydrat entstand eine klare Lösung, die bei Zimmertemperatur über Nacht zu einem Kristallklotz erstarrte. Sorgfältiges Abpressen, Waschen mit wenig Äthanol/Wasser (1:1) und Trocknen lieferte 4,25 g (96%) Hydrazid vom Smp. 222–223°. Aus heissem Äthanol (mit Hydrazinzusatz) 3,36 g (76%), Smp. 226° (Lit.¹⁹⁾ 226°).

Carbobenzoxy-tyrosyl-leucyl-alanyl-glycin-methylester (IIc). 2,2 g (0,005 Mol) Z-Tyr-Leu-N₂H₃ wurden in der Wärme in 10 ml Eisessig gelöst und mit 20 ml Wasser + 1,1 ml konz. HCl verdünnt. Nach Kühlung auf –5° erfolgte unter heftiger Durchmischung Zusatz von 0,4 g (0,00575 Mol) NaNO₂ in 10 ml Wasser + 5 ml Eisessig (bei 0° gelöst). Das zähe Reaktionsprodukt wurde bei 0° mit dem klaren Überstand 10 Min. durchgeknetet und dann in 70 ml eiskaltem Essigester aufgenommen, bei 0° mit 5-proz. Kaliumhydrogencarbonat-Lösung und Wasser gewaschen und dann mit Natriumsulfat getrocknet. Diese Dipeptid-azid-Lösung wurde mit einer Lösung von 0,99 g (0,005 Mol) H·Ala-Gly·OCH₃, HCl in 15 ml Dimethylformamid + 0,7 ml (0,005 Mol) TAA gut durchmischt und 12 Std. bei –15°, 12 Std. bei +4° und die gleiche Zeit bei 20° aufbewahrt. Aufarbeitung nach Verdünnen mit 150 ml Essigester. Aus Essigester/Petroläther 2,17 g (76%) amorphes Produkt, Smp. 202°. Im Dünnschichtchromatogramm erwies sich die Substanz mit 4–5 Stoffen verunreinigt. Die Analysenprobe wurde daher in Essigester an Kieselgel (300 g auf 300 mg Peptid) chromatographiert und kristallisierte aus Methanol/Wasser in Drusen, Smp. 204°.

$C_{29}H_{38}O_8N_4$ (570,6) Ber. C 61,04 H 6,71 N 9,82% Gef. C 61,13 H 6,67 N 9,62%

¹⁸⁾ K. HANNIG, Clin. chim. Acta 4, 51 (1959); Chem. Abstr. 53, 4405 (1959).

¹⁹⁾ H. ZAHN & H. E. MESSERKNECHT, Z. physiol. Chem. 315, 228 (1959).

Carbobenzoxy-tyrosyl-leucyl-alanyl-glycinkhydrazid (IIId). 3 g (0,005 Mol) Methylester IIc (Rohprodukt) wurden in 10 ml siedendem Äthanol mit 1,0 ml (0,02 Mol) Hydrazinhydrat in Lösung gebracht und sofort abgekühlt. Nach 3 Std. bei -15° wurde abgepresst, mit kaltem Äthanol gewaschen und getrocknet. Rohausbeute 2,65 g (93%), Smp. $212-214^{\circ}$. Umkristallisiert aus 80 ml Essigester + 15 ml Methanol, Ausbeute 2,22 g (74,4%), Smp. $220-221^{\circ}$.

$C_{28}H_{38}O_7N_6$ (570,6) Ber. C 58,93 H 6,71 N 14,73% Gef. C 58,63 H 6,56 N 14,50%

Carbobenzoxy-tyrosyl-leucyl-alanyl-glycyl-glutamyl(- γ -benzylester)-phenylalanin-benzylester (IIe). Azidsynthese; es wurde wie beim Tetrapeptid IIc gearbeitet. 1,34 g (0,0024 Mol) Hydrazid IIId in 10 ml Eisessig + 10 ml Wasser + 0,55 ml konz. HCl, 0,20 g $NaNO_2$ in 4 ml Wasser + 2 ml Eisessig; 1,7 g (0,026 Mol) Glutamyl-phenylalanin-dibenzylester-toluolsulfonat⁴⁾ in 7 ml Dimethylformamid + 0,37 ml TÄA. Aufarbeitung in Essigester liefert einen zähen Schaum; aus heissem Essigester/Methanol kristallisierten 1,53 g (63%) vom Smp. $207-210^{\circ}$. Aus dem zum Trocknen des Essigesters verwendeten Natriumsulfat konnten mit Methanol noch weitere 300 mg Hexapeptid extrahiert werden.

Tyrosyl-leucyl-alanyl-glycyl-glutamyl-phenylalanin (II). Hydrogenolyse mit Pd-Schwarz. 1,02 g (0,001 Mol) IIe in 50 ml Eisessig + 30 ml Isopropanol + 5 ml Wasser. Aus Eisessig/Äther 0,68 g (97%) grauweisses Pulver. Aus Wasser Smp. 219° (Sintern ab 210°).

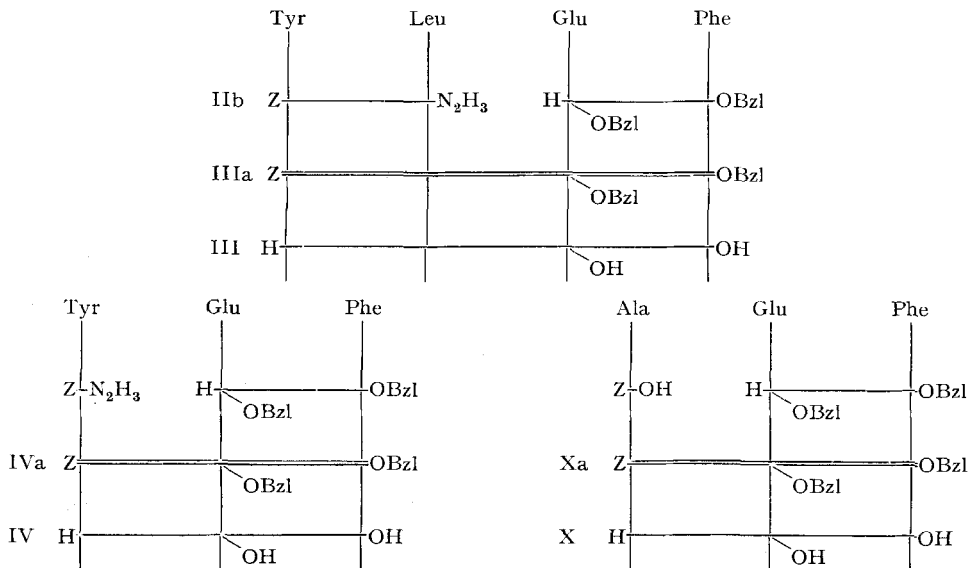
$C_{34}H_{46}O_{10}N_6$ (698,8) Ber. C 58,44 H 6,64 N 12,03% Gef. C 58,02 H 6,36 N 12,60%

Aminosäureanalyse: Tyr/Leu/Ala/Gly/Glu/Phe = 1,12/0,97/1,07/0,98/0,86/1,02.

Synthesen zum Schema 2. – *Carbobenzoxy-tyrosyl-leucyl-glutamyl(- γ -benzylester)-phenylalanin-benzylester (IIIa)*. Azidsynthese; es wurde wie bei IIc (Schema 1) gearbeitet. 4,4 g (0,01 Mol) Z-Tyr-Leu- N_2H_3 (IIb) in 20 ml Eisessig + 30 ml Wasser + 2,2 ml konz. HCl, 0,8 g (0,0115 Mol) $NaNO_2$; 6,5 g (0,01 Mol) H·Glu(-OBzl)-Phe·OBzl-toluolsulfonat⁴⁾ in 10 ml Dimethylformamid + 1,4 ml TÄA. Das Produkt flockte aus der Reaktionslösung voluminös aus und wurde aus heissem Methanol/Essigester umkristallisiert. Ausbeute 5,0 g (56,5%), Smp. $185-187^{\circ}$.

$C_{51}H_{56}O_{10}N_4$ (885,0) Ber. C 69,21 H 6,38 N 6,33% Gef. C 68,58 H 6,57 N 6,82%

Schema 2. Synthese der Peptide III, IV und X



Tyrosyl-leucyl-glutamyl-phenylalanin (III). Bei der Hydrogenolyse traten unerwartete Lösungsschwierigkeiten auf. 500 mg IIIa wurden schliesslich in 60 ml heissem Eisessig gelöst, mit 30 ml Isopropanol und wenig Wasser versetzt und abgekühlt. Nach 3 Std. mit Pd-Schwarz im

Wasserstoffstrom und Umkristallisieren aus Wasser waren 240 mg (75%) reines Tetrapeptid vom Smp. 224° entstanden. – Aminosäureanalyse: Tyr/Leu/Glu/Phe = 0,88/0,98/1,05/1,10.

Carbobenzoxy-tyrosyl-glutamyl(-γ-benzylester)-phenylalanin-benzylester (IVa). Azidsynthese aus $Z \cdot \text{Tyr} \cdot \text{N}_2\text{H}_3^3$) und $\text{H} \cdot \text{Glu}(-\text{OBzl})\text{-Phe} \cdot \text{OBzl-toluolsulfonat}^4$), wie bei IIc (Schema 1). Erst nach Chromatographie an Kieselgel in Essigester/Petroläther (1:1) konnte das kristallisierte Tripeptid-derivat vom Smp. 156° gewonnen werden.

$\text{C}_{45}\text{H}_{45}\text{O}_9\text{N}_8$ (771,8) Ber. C 70,02 H 5,88 N 5,45% Gef. C 69,87 H 5,97 N 5,59%

Carbobenzoxy-alanyl-glutamyl-phenylalanin (Xa). Anhydridsynthese; 0,05 Mol. 1,12 g Carbobenzoxy-alanin, 1,4 ml TAA, 0,47 ml CAE und 3,24 g $\text{H} \cdot \text{Glu}(-\text{OBzl})\text{-Phe} \cdot \text{OBzl-toluolsulfonat}^3$). Aufarbeitung in Essigester. Aus Essigester/Petroläther 1,73 g (51%), Smp. 134–136°.

$\text{C}_{39}\text{H}_{41}\text{O}_8\text{N}_3$ (679,8) Ber. C 68,91 H 6,08 N 6,18% Gef. C 69,10 H 6,02 N 6,43%

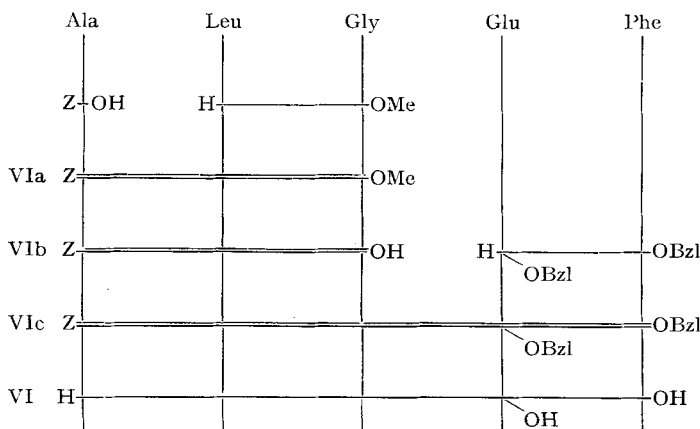
Synthesen zum Schema 3. – *Carbobenzoxy-alanyl-leucyl-glycin-methylester (VIa)*. Anhydridsynthese; 0,05 Mol. 11,2 g Carbobenzoxyalanin, 14,3 ml TAA, 4,75 ml CAE und 11,9 g $\text{H} \cdot \text{Leu-Gly-OMe, HCl}^4$). Aufarbeitung in Essigester. Aus Essigester/Petroläther 12,5 g (61%), Smp. 155°.

$\text{C}_{20}\text{H}_{29}\text{O}_6\text{N}_3$ (407,5) Ber. C 58,95 H 7,17 N 10,32% Gef. C 59,16 H 7,00 N 10,63%

Carbobenzoxy-alanyl-leucyl-glycin (VIb). Verseifung von 12,5 g (0,031 Mol) Ester VIa in 450 ml Aceton mit 38 ml 1N NaOH. Ausbeute 8 g (65%), Smp. 165° aus Essigester/Petroläther.

$\text{C}_{19}\text{H}_{27}\text{O}_6\text{N}_3$ (393,4) Ber. C 58,01 H 6,92 N 10,68% Gef. C 57,90 H 6,92 N 10,73%

Schema 3. Synthese von Peptid VI



Carbobenzoxy-alanyl-leucyl-glycyl-glutamyl(-γ-benzylester)-phenylalanin-benzylester (VIc). Anhydridsynthese; 0,015 Mol. 5,9 g Tripeptidsäure VIb, 4,3 ml TAA, 1,43 ml CAE und 9,7 g $\text{H} \cdot \text{Glu}(-\text{OBzl})\text{-Phe} \cdot \text{OBzl-toluolsulfonat}^4$). Aufarbeitung in Essigester. Beim Trocknen der Lösung mit Natriumsulfat fiel ein Teil des Peptids aus und musste mit Methanol aus dem Salz extrahiert werden. Aus Essigester/Petroläther 8,0 g (63%) vom Smp. 160°.

$\text{C}_{47}\text{H}_{55}\text{O}_{10}\text{N}_5$ (850,0) Ber. C 66,41 H 6,52 N 8,24% Gef. C 66,48 H 6,50 N 8,39%

Alanyl-leucyl-glycyl-glutamyl-phenylalanin (VI). Hydrogenolyse; 0,001 Mol. 850 mg Penta-peptidderivat VIc in 100 ml Isopropanol + 50 ml Methanol + 50 ml Wasser bei 40°. Während des Durchlebens von Wasserstoff wurde in manchen Fällen ausgefallenes freies Peptid durch Zugabe von Methanol wieder aufgelöst. Ausbeute 430 mg (80%), Smp. 198–200° (Zers.). – Aminosäureanalyse: Ala/Leu/Gly/Glu/Phe = 0,95/0,98/1,06/1,08/0,90.

Synthesen zum Schema 4. – *Glutamyl(-γ-benzylester)-alanin-benzylester-toluolsulfonat (VI Ia)*. Glutamylalanin (Smp. 184°) war in ausgezeichneter Ausbeute aus dem Glutamytyrosin²⁰⁾ über

²⁰⁾ J. RUDINGER, Collect. czechoslov. chem. Commun. 19, 375 (1954); Chem. Abstr. 49, 3127 (1955)

Tosyl-glutamyl-alanin-methylester (aus Benzol/Petroläther: Smp. 126°) und Tosyl-glutamyl-alanin (Smp. 194°) gewonnen worden. Es wurde wie bei Ref. 4) beschrieben verestert. Das Toluolsulfonat ist in Benzol recht gut löslich und wird nach dem Einengen mit Äther ausgefällt. Ausbeute 13,0 g (85%), Smp. 139°.

$C_{29}H_{34}O_8N_2S$ (570,7) Ber. C 61,03 H 6,00 N 4,89% Gef. C 60,03 H 5,95 N 4,94%

Carbobenzoxy-tyrosyl-leucyl-glycyl-glutamyl(- γ -benzylester)-alanin-benzylester (VIIb). Anhydridsynthese; 0,0041 Mol. 2,0 g Z-Tyr-Leu-Gly $\cdot$ OH⁴), 0,58 ml TAA, 0,39 ml CAE in 20 ml Tetrahydrofuran und 2,3 g Diptidester-toluolsulfonat VIIa in 50 ml Tetrahydrofuran + 10 ml Wasser + 0,58 ml TAA. Aufarbeitung in Essigester. Aus Essigester/Petroläther 2,9 g (82%), Smp. 167°.

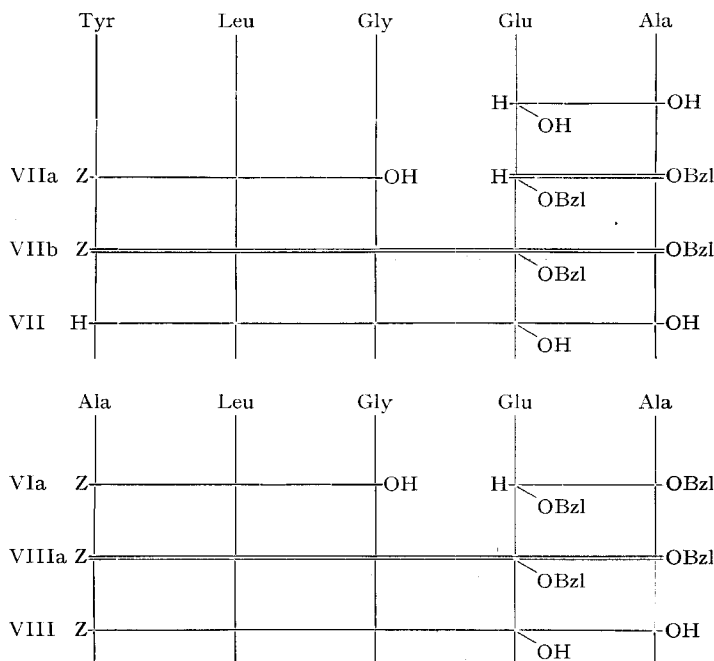
$C_{47}H_{55}O_{11}N_5$ (866,0) Ber. C 65,19 H 6,40 N 8,09% Gef. C 64,76 H 6,32 N 8,25%

Tyrosyl-leucyl-glycyl-glutamyl-alanin (VII). Hydrogenolyse. 3,2 g (0,0037 Mol) Pentapeptidderivat VIIb, 150 ml Isopropanol, 150 ml Methanol und 2 g Pd-Schwarz bei 40°, 4 Std. Das freie Peptid flockte aus und konnte vom Katalysator schlecht heruntergelöst werden. Umgefällt aus Eisessig/Äther 1 g (50%), Smp. 191°. – Aminosäureanalyse: Tyr/Leu/Gly/Glu/Ala = 1,04/1,01/1,01/1,04/0,86.

Carbobenzoxy-alanyl-leucyl-glycyl-glutamyl(- γ -benzylester)-alanin-benzylester (VIIIa). Anhydridsynthese; 0,0038 Mol. 1,5 g Z-Ala-Leu-Gly $\cdot$ OH (VIb, Schema 3), 1,1 ml TAA, 0,36 ml CAE und 2,2 g H $\cdot$ Glu(-OBzl)-Ala $\cdot$ OBzl-toluolsulfonat (VIIa). Aufarbeitung in Essigester, Ausbeute 2,0 g (66%), Smp. 179°.

$C_{41}H_{51}O_{10}N_5$ (773,9) Ber. C 63,63 H 6,64 N 9,05% Gef. C 63,76 H 6,68 N 8,97%

Schema 4. Synthese der Peptide VII und VIII



Alanyl-leucyl-glycyl-glutamyl-alanin (VIII). Hydrogenolyse. 2,9 g (0,00375 Mol) Pentapeptidderivat VIIIa, 150 ml Isopropanol + 150 ml Methanol, 3 g Pd-Schwarz, 40°, 4 Std. Aus Eisessig/Äther 1,3 g (76,5%), Smp. 204° (Zers.). – Aminosäureanalyse: Ala/Leu/Gly/Glu = 2,01/1,00/0,94/1,04.

SUMMARY

Hexa-, penta- and tetra-peptides of similar composition bearing aromatic amino-acids on both ends are active in the plastein reaction. Analogous tri- and di-peptides, however, do not polymerize in the presence of pepsin. Substitution by alanine of the amino-end standing tyrosine in the pentapeptide did not affect its ability to form plastein, whereas the same substitution at the carboxy-end caused inactivity. No correspondence exists in peptides between pK values of the acidic and basic end groups and reactivity in plastein formation. Other structural features seem therefore to be responsible.

Syntheses of the investigated peptides are described.

Institut für Organ. Chemie
der Johann-Wolfgang-Goethe-Universität,
Frankfurt am Main

**280. Fluoreszierende Stoffe aus *Rhodnius prolixus* Stål
(Hemiptera, Heteroptera)**

**Ein neues Kynureninderivat: 3-Hydroxykynurenin-schwefelsäure-
ester = Rhodnitin¹)**

von **M. Viscontini** und **H. Schmid**

Herrn Prof. Dr. TH. POSTERNAK zum 60. Geburtstag gewidmet

(29. VIII. 63)

Rhodnius prolixus ist eine grosse, bis zwei Zentimeter lange blutsaugende Raubwanze, die im tropischen und subtropischen Amerika²⁾ als Parasit von Warmblütern lebt. Im Rahmen von systematischen Untersuchungen, die gegenwärtig in unserem Institut durchgeführt werden, und auf Anregung von Herrn Prof. Dr. E. HADORN, Zoologisch-vergleichend anatomisches Institut der Universität Zürich, haben wir das Muster der fluoreszierenden Stoffe dieses im Laboratorium leicht zu züchtenden hemimetabolen Insekts studiert.

Lässt man Extrakte ganzer Larven oder Imagines in einem zweidimensionalen Papierchromatogramm laufen, so lassen sich unter UV.-Licht mindestens 5 fluoreszierende Stoffe nachweisen. Wir bezeichnen sie mit den folgenden Buchstaben (Fig. 1, oben, und Tab. I).

Exkrete dieser Insekten ergeben auf einem zweidimensionalen Papierchromatogramm ein Fluoreszenzmuster mit den beiden Substanzen K und KE, aber in viel grösserer Konzentration (Fig. 1, unten).

¹) Teil der Dissertation von H. SCHMID, Zoologisch-vergleichend anatomisches Institut der Universität Zürich, 1964.

²) Insbesondere in Venezuela und Mexiko.