

synthesis of DNA-like RNA and ribosomal RNA. Depression of the former would then lead to a secondary inhibition of ribosomal RNA synthesis, thus overshadowing the  $\alpha$ -amanitin resistance of the enzyme responsible for its synthesis. There is however, little experimental evidence available at present, supporting this hypothesis. Another alternative, which encompasses an in vivo transformation of  $\alpha$ -amanitin to a metabolite capable of affecting the nucleolar RNA polymerase, should also be considered and cannot be resolved at present. The availability of radioactively labelled amanitin should render such studies feasible.

During transcription in vivo, it is conceivable that the enzyme could be modified by dissociation of, or association with, an enzyme component responsible for the altered amanitin susceptibility of the

enzyme. At the present state of our understanding of the transcriptional process and its control in higher organisms, it is premature to ascribe a correct explanation to the observed phenomena. However, the reported experiments exclude the use of  $\alpha$ -amanitin in the intact organism to eliminate specifically the synthesis of DNA-like RNA and may be interesting and useful to investigators in other laboratories attempting to study the posttranscriptional processing of RNA synthesized in vivo.

We wish to thank Professor P. KARLSON and W. SCHMID for their continued interest and encouragement and Miss H. RADLER, Mrs. U. PANKOW, Mrs. CH. HAENISCH and Miss G. FRÖHLICH for competent technical assistance. The Deutsche Forschungsgemeinschaft has provided financial support.

## Zur Biosynthese der Penicilline: Bildung von 5-(2-Aminoadipyl)-cysteinyl-valin in Extrakten von *Penicillium chrysogenum*

Formation of 5-(2-Aminoadipyl)-cysteinyl-valin by Extracts of *Penicillium chrysogenum*

KARL BAUER

Isotopenlaboratorium der Universität Stuttgart

(Z. Naturforsch. 25 b, 1125—1129 [1970]; eingegangen am 25. April 1970)

Mycel-extracts of *P. chrysogenum* catalyse the formation of 5-(2-aminoadipoyl)-cysteinyl-valin out of its aminoacid components.

For the synthetical preparation of this compound the solid-phase method is particularly suited. The synthesis can be carried out even with very small quantities of substance and thereby allows the preparation of radioactive labelled L-5-(2-aminoadipoyl)-L-cysteinyl-L-valin of relatively high specific activity.

Die Penicilline gehören zur Gruppe der Peptidantibiotica. Sie werden von *P. chrysogenum* aus den Aminosäuren Cystein und Valin, die das 3-Lactamthiazolidin-Ringsystem (6-Aminopenicillansäure) bilden, und einem Seitenketten-Precursor aufgebaut<sup>1</sup>.

Der Mechanismus der Biosynthese der Penicilline ist noch weitgehend unbekannt, obwohl er seit

langem Gegenstand umfangreicher Untersuchungen ist<sup>2</sup>. Von besonderem Interesse war dabei die Entdeckung des 5-(2-Aminoadipyl)-cysteinyl-valin (1) im Mycel von *P. chrysogenum*<sup>3</sup>, da es in enger struktureller Beziehung steht zu dem bereits früher aus dem Fermentationsmedium von *Cephalosporium* isolierten Penicillin N<sup>4</sup> und zu dem später in *P. chrysogenum* entdeckten Isopenicillin N<sup>5</sup> (2), das

Sonderdruckanforderungen an Dr. KARL BAUER, Isotopenlaboratorium d. Chem. Institute d. T.H., D-7000 Stuttgart 1, Azenbergstr. 14—16.

<sup>1</sup> H. R. V. ARNSTEIN, Annu. Rep. Chem. Soc. 54, 339 [1957].

<sup>2</sup> S. Reviews: A. L. DEMAİN, in: Biosynthesis of Antibiotics, Vol. I, S. 30, I. F. SNELL, Academic Press, New York, London 1966; E. P. ABRAHAM, G. G. F. NEWTON, S. C. WARREN, in: Z. VANEK, Z. HOSTALEK, Biogenesis of Anti-

biotic Substances, Czech. Acad. Sci., (distr. Academic Press, New York, London), Prag 1965.

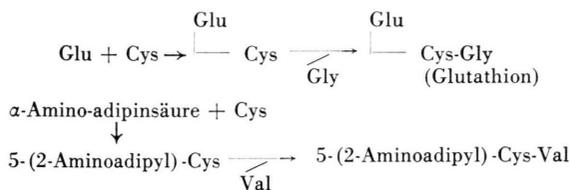
<sup>3</sup> H. R. V. ARNSTEIN and D. MORRIS, Biochim. biophysica Acta [Amsterdam] 35, 561 [1959].

<sup>4</sup> G. G. F. NEWTON, E. P. ABRAHAM, and C. W. HALE, Biochem. J. 58, 94 [1954].

<sup>5</sup> E. H. FLYNN, M. H. MCCORMICK, M. C. STAMPER, H. DEVALERA, and C. W. GODZESKI, J. Amer. chem. Soc. 84, 4594 [1962].



die primäre Verknüpfung von Cystein mit der Aminodicarbonsäure.



Von besonderem Interesse wäre zu wissen, ob alle Bausteine des 5-(2-Aminoadipyl)-cysteinyl-valin L-Konfiguration besitzen. L-Valin dient als direkter Precursor für das Penicillin, im Penicillinkern besitzt der Valinanteil jedoch D-Konfiguration. Es wäre denkbar, daß der Konfigurationswechsel während der Aktivierung des Valins eintritt, wie es bei der Biosynthese von Gramicidin S<sup>10</sup> der Fall ist, bei der L-Phenylalanin während der Aktivierung in D-Phenylalanin umgewandelt wird, bevor die Peptidbildung erfolgt.

### Synthese von L-5-(2-Aminoadipyl)-L-cysteinyl-L-valin

Zu den Untersuchungen über die Bildung des 5-(2-Aminoadipyl)-cysteinyl-valin in Extrakten von *P. chrysogenum* benötigten wir geringe Mengen der Verbindung als Vergleichssubstanz. Sie ist außerdem für weitere Versuche erforderlich, die dem Studium der enzymchemischen Umwandlung von 5-(2-Aminoadipyl)-cysteinyl-valin in Isopenicillin N dienen sollen.

Mycel von *P. chrysogenum* ist kein geeignetes Ausgangsmaterial zur Gewinnung des „Tripeptids“, da der Mikroorganismus nur eine sehr geringe Menge der Verbindung enthält. Wir synthetisierten daher L-5-(2-Aminoadipyl)-L-cysteinyl-L-valin zunächst nach klassischen Methoden, später insbesondere nach dem MERRIFIELD<sup>11</sup>-Verfahren. Der Aufbau des Tripeptids an fester Phase läßt sich mit guter Ausbeute auch im Mikromaßstab durchführen und eignet sich daher zur Gewinnung von radioaktiv markiertem L-5-(2-Aminoadipyl)-L-cysteinyl-L-valin hoher spezifischer Aktivität.

Zur Synthese des L-5-(2-Aminoadipyl)-L-cysteinyl-L-valin an fester Phase verwendeten wir chlormethyliertes Polystyrol und bauten das Tripeptid vom Valin-Ende her auf. Dabei dienten t-BOC-L-Valin, S-Benzyl-N-t-BOC-L-Cystein und N-Tosyl-L- $\alpha$ -amino-adipinsäure- $\alpha$ -benzylester als Reaktionspartner.

Zur Gewinnung des selektiv veresterten  $\alpha$ -Amino-adipinsäure-Derivates wurde zunächst aus L-Glutaminsäure durch Arndt-Eistert-Synthese die N-Tosyl-L- $\alpha$ -amino-adipinsäure<sup>12</sup> hergestellt. Diese konnte nach einem für N-Tosyl-L-glutaminsäure- $\alpha$ -benzylester beschriebenen Verfahren<sup>13</sup> durch Umsetzung mit Benzylbromid + Triäthylamin in den N-Tosyl-L- $\alpha$ -amino-adipinsäure- $\alpha$ -benzylester übergeführt werden.

Die Verknüpfung der Aminosäure erfolgte – nach jeweiliger Freisetzung der Aminogruppe mittels 1 N HCl in Eisessig – nach der Carbodiimid-Methode. Die Spaltung der Esterbindungen und damit auch die Ablösung von der festen Phase wurde mittels CF<sub>3</sub>COOH/HBr vorgenommen. Anschließend wurden die Tosyl- und S-Benzylgruppe mit Na in flüssigem Ammoniak entfernt.

Bei der Synthese des Tripeptids nach klassischen Verfahren verknüpften wir S-Benzyl-L-cysteinyl-L-valinester<sup>14</sup> nach der Carbodiimid-Methode mit N-Carbobenzoxy-L- $\alpha$ -amino-adipinsäure- $\alpha$ -benzylester. Die Abspaltung der Schutzgruppen erfolgte in der Reihenfolge Esterverseifung (mit NaOH in H<sub>2</sub>O/Aceton), Entfernung der Carbobenzoxy-Gruppe (mit HBr/Eisessig), Abspaltung der S-Benzylgruppe (mit Na in flüssigem Ammoniak). Der  $\alpha$ -Ester der N-Carbobenzoxy-L-amino-adipinsäure war nach einem für Glutaminsäure beschriebenen Verfahren<sup>13</sup> gewonnen worden.

### Experimenteller Teil

Fermentation: Zu den Versuchen wurde ein Penicillin produzierender Stamm von *P. chrysogenum* (ATCC 12 690) verwendet. *P. chrysogenum* wurde 77 Std. bei 28 °C in einem synthetischen Medium<sup>6</sup>, dann 12 Std. bei der gleichen Temperatur in einem HungermEDIUM<sup>7</sup> fermentiert.

<sup>10</sup> W. GEVERS, H. KLEINKAUF, and F. LIPMANN, Proc. nat. Acad. Sci. USA **60**, 269 [1968].

<sup>11</sup> R. B. MERRIFIELD, J. Amer. chem. Soc. **85**, 2149 [1963]; ibid. **86**, 304 [1964]; Biochemistry **3**, 1385 [1964].

<sup>12</sup> J. RUDINGER, H. FARKAŠOVÁ, Collect. czechoslov. chem. Commun. **28**, 2941 [1963].

<sup>13</sup> G. H. L. NEFKENS et R. J. F. NIVARD, Recueil Trav. chim. Pays-Bas **83**, 199 [1964].

<sup>14</sup> H. R. V. ARNSTEIN and D. MORRIS, Biochem. J. **76**, 318 [1960].

Mycel-Extrakt: Nach Abfiltrieren und gründlichem Waschen mit 0,1 M Phosphatpuffer ( $\text{KH}_2\text{PO}_4/\text{KOH}$ ) pH 7,0, der pro Liter 20 mMol Mercaptoäthanol und 5 mMol Magnesiumacetat enthielt, wurden 20 g Mycel mit 40 g Glasperlen ( $\phi$  0,11 mm) in einer Reibschale zu einer homogenen Masse zerrieben. Dann zentrifugierte man 1 Stde. bei 4 °C und 30 00 g. Der Überstand wurde sofort für die Inkubationsversuche verwendet. Proteingehalt: 15 mg/ml.

Inkubationsversuche: In Gärröhrchen wurden die unten aufgeführten Komponenten vermischt und 45 Min. bei 28 °C inkubiert.

1. Inkubations-Ansatz: 1 ml Extrakt, 0,01 ml 0,5 M ATP (5  $\mu\text{Mol}$ ), 0,01 ml 0,5 M Phosphoenolpyruvat (5  $\mu\text{Mol}$ ), 20  $\mu\text{g}$  Pyruvatkinase gelöst in 0,01 ml Wasser, 0,01 ml 1 M Magnesiumacetat (10  $\mu\text{Mol}$ ), 0,1 ml 0,01 M L-Cystein (1  $\mu\text{Mol}$ ), 0,1 ml 0,01 M DL- $\alpha$ -Aminoadipinsäure (1  $\mu\text{Mol}$ ), 1  $\mu\text{Ci}$  [ $\mu$ - $^{14}\text{C}$ ]-L-Valin\* (6,9 mCi/mMol) gelöst in 0,01 ml Wasser, 1 ml 0,5 M Phosphatpuffer ( $\text{KH}_2\text{PO}_4/\text{KOH}$ ) pH 7.

2. Inkubations-Ansatz: 0,1 ml 0,01 M L-Valin (1  $\mu\text{Mol}$ ), 1  $\mu\text{Ci}$  [ $3$ - $^{14}\text{C}$ ]-DL-Cystein (17 mCi/mMol). Alle übrigen Komponenten wie beim 1. Inkubations-Ansatz beschrieben.

Identifizierung der Peptide: Durch Zugabe von 10 ml Äthanol wurde die Inkubation abgestoppt und das gefällte Protein abzentrifugiert. Die Lösung wurde i. Vak. eingedampft und der Rückstand der Perameisensäureoxydation<sup>8</sup> unterworfen. Dann dampfte man i. Vak. ein, löste den Rüststand in 5 ml Wasser, gab die Lösung über eine Säule (1,5  $\times$  10 cm) von Dowex 50 WX 12 ( $\text{H}^\ominus$ -Form) und dampfte den Durchlauf i. Vak. ein. Aus dem Rückstand wurden durch Hochspannungselektrophorese und Papierchromatographie die radiochemischen reinen Sulfonsäure-Derivate der Peptide erhalten und ihre Identität mit den synthetisch gewonnenen Vergleichssubstanzen nachgewiesen.

Radioaktivitätsmessungen mit dem radiochemisch reinen Sulfonsäure-Derivat 5-(2-Aminoadipyl)-cysteinyl-valin ergaben, daß sich 0,5 nMol des *Tripeptids* gebildet hatten. Dies entspricht einer Umsatzrate von 0,37% (bezogen auf eingesetztes Valin). Die Radioaktivitätsmessungen wurden mit dem Flüssigkeits-Szintillationszähler Packard TriCarb 526 durchgeführt. Die Auswertung der Papier- und Elektropherogramme erfolgte außerdem durch Autoradiographie.

#### *N-Tosyl-L- $\alpha$ -Aminoadipinsäure- $\alpha$ -benzylester* (Dicyclohexylammoniumsalz)

9,45 g (0,03 Mol) *N-Tosyl-L- $\alpha$ -Aminoadipinsäure*<sup>12</sup> wurden in 25 ml Dimethylformamid, das 3,03 g (0,03 Mol) Triäthylamin enthielt, gelöst. Nach Zugabe von 5,25 g (0,033 Mol) Benzylbromid wurde die Mischung bei Raumtemp. über Nacht stehen gelassen. Danach wurde 100 ml Wasser zugegeben und die Reaktionsmischung 3-mal mit je 50 ml Äthylacetat extrahiert. Die organische Phase wurde 2-mal mit 30 ml Wasser gewaschen, mit  $\text{MgSO}_4$  getrocknet und i. Vak. eingedampft. Das zurückbleibende Öl wurde in 25 ml Tetrahydrofuran gelöst und mit 25 ml Petroläther versetzt.

Nach Zugabe von 6 g Dicyclohexylamin fiel das Dicyclohexylammoniumsalz aus. Es wurde unter Zusatz von Aktivkohle aus Wasser umkristallisiert.

Ausbeute: 8,9 g (49,5% d. Th.); Schmp.: 134 °C.

Analyse: Ber. C 65,36 H 8,06 N 4,74,  
Gef. C 65,02 H 7,88 N 4,72.

#### *N-Tosyl-L- $\alpha$ -Aminoadipinsäure*

10 g des Salzes wurden zur Freisetzung der Säure in 500 ml ätherischer HCl suspendiert. Nach 15 min Rühren wurde vom Dicyclohexylammoniumchlorid abfiltriert, die Lösung i. Vak. eingedampft und der Rückstand, der beim Stehenlassen kristallisierte, aus Tetrachlorkohlenstoff umkristallisiert.

Ausbeute: 5,5 g (81% d. Th.); Schmp.: 98 °C.  
[ $\alpha$ ]<sub>D</sub><sup>20</sup> + 25,6 (C=1 in  $\text{CCl}_4$ ).

Analyse: Ber. C 59,16 H 5,71 N 3,45,  
Gef. C 59,45 H 5,62 N 3,39.

#### *S-Benzyl-N-BOC-L-System und N-BOC-L- $^{14}\text{C}$ -Valin*

Diese wurden nach der pH-stat-Methode von SCHNABEL<sup>15</sup> synthetisiert. Die Verbindungen erwiesen sich bei dünnschichtchromatographischer Untersuchung an Kieselgel G mit Essigester/Pyridin/Essigsäure/Wasser (5 : 5 : 1 : 3) und Dioxan/Methanol/Triäthylamin (10 : 10 : 1) als einheitlich.

Zur Synthese des N-BOC-L- $^{14}\text{C}$ -Valins wurden 117 mg L- $^{14}\text{C}$ -Valin (50  $\mu\text{Ci}$ /mMol) eingesetzt. Die Umsetzung dauerte 12 Stdn. bei einem pH von 9,5. Erhalten wurden 200 mg (92,5%) N-BOC-L- $^{14}\text{C}$ -Valin.

#### *Aufbau des Peptids an der festen Phase*

8 g chloromethyliertes Polystyrol (Bio-Rad, Bio-Beads S.X-2, 200–400 mesh, 1,04 meq Cl/g) wurden 90 Stdn. mit 200 mg N-BOC-L- $^{14}\text{C}$ -Val (0,92 mMol) und 101 mg (1 mMol) Triäthylamin in 50 ml abs. Tetrahydrofuran unter Rückfluß gekocht. Nach dem Abfiltrieren wurde mit Tetrahydrofuran, Methanol, Wasser sowie Methanol gewaschen. Zur Bestimmung des L- $^{14}\text{C}$ -Valin-Gehaltes wurde die BOC-Schutzgruppe mit 1 N HCl/Eisessig abgespalten, das Hydrochlorid mit Triäthylamin zersetzt und der Chlorid-Gehalt des Filtrats nach Volhard bestimmt: 0,65 mMol L- $^{14}\text{C}$ -Val/8 g Harz (Ausbeute: 70%).

In einem 100-ml-Reaktionsgefäß mit Absaugfritte wurde folgender Syntheszyklus durchgeführt: (jeweils 50 ml Flüssigkeit)

1. Entfernen der Schutzgruppe mit 1 N HCl/Eisessig (30 Min.), Eisessig (3-mal je 3 Min.), Äthanol (3-mal je 3 Min.), Methylenchlorid (3-mal je 3 Min.).
2. Freisetzen der Aminogruppe mit Triäthylamin (3 ml)/Methylenchlorid (10 Min.), Methylenchlorid (6-mal je 3 Min.).
3. Kupplung durch Zugabe der geschützten Aminosäuren (65 mMol) in Methylenchlorid; nach 10 Min.

<sup>15</sup> E. SCHNABEL, Liebigs Ann. Chem. **702**, 188 [1967].

Zugabe von 6,5 mMol Dicyclohexylcarbodiimid in Methylchlorid. Nach 5 Stdn. Reaktionszeit wurde gewaschen mit Methylchlorid (5-mal je 3 Min.), Äthanol (4-mal je 3 Min.) und Eisessig (4-mal je 3 Min.).

#### *Abspaltung des Tripeptids vom Träger*

Nach der letzten Kupplung und dem Waschen mit Äthanol wurde das Peptid-Polymer getrocknet. Nach Suspension in 100 ml Trifluoressigsäure und 0,5 ml Anisol wurde 90 Min. mit trockenem, reinem Bromwasserstoff begast. Nach Absaugen und 3-maligem Waschen mit je 20 ml Trifluoressigsäure wurden die vereinigten Filtrate i. Vak. eingedampft. Der erhaltene Sirup wurde über KOH i. Vak. getrocknet.

#### *Abspaltung der Schutzgruppen*

Der erhaltene Sirup wurde in trockenem flüssigen Ammoniak gelöst. Aus einem kühlbaren Tropftrichter wurde eine Lösung von Natrium in flüssigem Ammoniak solange zugetropft, bis die blaue Farbe 60 Sek. bestehen blieb. Danach wurde der Ammoniak abgedampft und letzte Spuren im Exsikkator über  $H_2SO_4$  entfernt. Der Rückstand wurde in 0,5 N  $H_2SO_4$  aufgenommen und das Tripeptid mit 0,5-proz.  $HgSO_4$  in 0,5 N  $H_2SO_4$  gefällt. Das Mercaptid wurde abzentrifugiert und mit Wasser, Methanol und Äther gründlich gewaschen. Nach Aufschlännen in Wasser wurde  $H_2S$  eingeleitet und anschließend das  $HgS$  abzentrifugiert.

Der Niederschlag wurde nochmals aufgeschlämmt und die wäßrigen Lösungen zur Entfernung letzter Spuren von  $HgS$  über Celite abfiltriert und i. Vak. eingedampft.

Es wurden 180 mg eines kristallinen Produktes erhalten. Durch elektrophoretische Prüfung bei pH 1,8 zeigte sich, daß es durch geringe Spuren Cysteinyl-valin verunreinigt war. Zur weiteren Prüfung wurde die das *Tripeptid* enthaltende Zone eluiert und mit Perameisensäure oxydiert. Nach Hydrolyse mittels 6 N HCl bei 110 °C während 72 Stdn. wurde das Aminosäuregemisch bei pH 1,8 elektrophoretisch sowie papierchromatographisch in den Systemen *n*-Butanol/Essigsäure/ $H_2O$  (63 : 10 : 27) und Phenol/ $H_2O$  (4 : 1) untersucht. Die Aminosäuren wurden in molaren Verhältnissen gefunden. Eine Probe des oxydierten Tripeptids wurde bei pH 3,5 (0,35 Mol Pyridin-Essigester) elektrophoretisch auf Whatman 3 MM Papier untersucht (70 V/cm; 30 mA). Das Tripeptid wandert innerhalb 20 Min. 6 cm und entspricht also dem  $\gamma$ -Peptid. Für das  $\alpha$ -Peptid wäre eine Wanderungsstrecke von 3 cm zu erwarten gewesen<sup>16</sup>.

Herrn Professor Dr. H. BREDERRECK danke ich für freundliche Unterstützung. Der Deutschen Forschungsgemeinschaft und dem Verband der Chemischen Industrie bin ich für Personal- und Sachbeihilfen zu Dank verpflichtet. Fräulein INGBORG MÄHNER danke ich für fleißige und gewissenhafte Mitarbeit.

<sup>16</sup> D. MORRIS, Biochem. J. 76, 349 [1960].