

Ein synthetisches Pentapeptid als Plastein-Monomeres

Untersuchungen über die Plasteinreaktion. II*

Von HELMUT DETERMANN und THEODOR WIELAND

(Eingegangen am 5. November 1960)

ZUSAMMENFASSUNG:

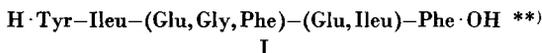
Synthetisch erhaltenes L-Tyrosyl-L-isoleucyl-glycyl-L-glutamyl-L-phenylalanin ist unter der Wirkung von Pepsin zu einem plasteinartigen Polypeptid kondensierbar. Durch Extinktionsmessungen an der Dinitrophenylverbindung ließ sich dessen Polymerisationsgrad zu 2 bis 3 bestimmen.

SUMMARY:

The pentapeptide L-tyrosyl-L-isoleucyl-glycyl-L-glutamyl-L-phenylalanine has been synthesized and proved to be a monomer in the plastein reaction with pepsin as a catalyst. The molecular weight of the plastein so formed was ~ 2250 as determined by UV spectrophotometry of its DNP-derivative.

Einleitung

Bei unseren Untersuchungen über die Plastein-Reaktion, einer enzymatisch katalysierten Polymerisation bestimmter Oligopeptide zu höhermolekularen Produkten (Plasteine), konnten wir vor kurzem einige definierte plasteinaktive Peptide aus WITTE-Pepton isolieren^{1, 2)}. Eines davon,



*) I. Mitteilung vgl. ¹⁾.

***) Wir verwenden die von M. GOODMAN und G. W. KENNER³⁾ zur Formulierung von Peptiden und Derivaten benutzten Abkürzungen. Bei den hier beschriebenen Synthesen handelt es sich immer um die L-Formen der Aminosäuren.

¹⁾ TH. WIELAND, H. DETERMANN und E. ALBRECHT, Liebigs Ann. Chem. **633** (1960) 185.

²⁾ Vortragsbericht H. DETERMANN, TH. WIELAND und O. ZIPP, Chimia **14** (1960) 374.

³⁾ M. GOODMAN und G. W. KENNER, Advances Protein Chem. **12** (1957) 465.

wart von einem Äquivalent Triäthylamin mit Carbobenzoychlorid erhalten. Bei der alkalischen Verseifung von IIIa entsteht die gleiche Säure IIIc wie aus der Dicarbobenzoxyverbindung IIIb, da hier der am Sauerstoff gebundene Carbobenzoxy-Rest ebenfalls hydrolytisch abgespalten wird.

Die glutaminsäurehaltige Dipeptidkomponente IV wurde in Form verschiedener Derivate auf ihre Verwendbarkeit hin untersucht. Wir erhielten die beiden Ester IVa und IVb aus den Komponenten nach der Anhydrid-Methode in kristallisierter Form in guten Ausbeuten. Da sich aber einerseits der γ -Äthylester im endgültigen Pentapeptid schlecht eindeutig verseifen läßt¹⁰⁾, andererseits die γ -Benzylgruppe von IVb wegen ihrer Säurelabilität¹¹⁾ beim Versuch der Abspaltung des Carbobenzoxy-Restes mit Bromwasserstoff in Eisessig teilweise mit abgespalten wird, sind beide Derivate nicht recht geeignet. Wir stellten deshalb α -Glutamylphenylalanin (IVd) aus der Tosylverbindung IVc her, die sich sehr gut aus Tosylpyrrolidoncarbonsäurechlorid¹²⁾ und freiem Phenylalanin gewinnen läßt; es ist hier nicht nötig, den Phenylalaninester zu verwenden¹³⁾. Nach der Abspaltung der Tosylgruppe mit Natrium in Ammoniak fällt beim Aufarbeiten das freie Dipeptid (IVd) in Kristallen an. Deshalb kann man sich das umständliche Entfernen der in anderen Fällen¹³⁾ störenden Sulfationen sparen. Das freie Peptid IVd entsteht auch aus IVb durch katalytische Hydrierung.

Bei der Synthese des Pentapeptids II setzten wir wegen seiner guten Zugänglichkeit das freie Dipeptid IVd in Form seines Dinatriumsalzes ein, obwohl die Aufarbeitung des Synthese-Ansatzes hierdurch erschwert werden mußte. Man verzichtete auf die Isolierung des geschützten Syntheseproduktes, entfernte den Carbobenzoxy-Rest mit Bromwasserstoff in Eisessig und hatte nun unumgesetztes freies neutrales Tripeptid vom freien sauren Pentapeptid zu trennen. Hierzu wurde der Ansatz einer kontinuierlichen Elektrophoresis im BECKMAN-*Spinco*-Apparat CP unterworfen. Die sich sauber abtrennende anodische Komponente, von der wir ca. 3 g isolierten, erwies sich durch Bausteinanalyse¹⁴⁾ und Endgruppen-

¹⁰⁾ Vgl. z.B. A. R. BATTERSBY und J. C. ROBINSON, J. chem. Soc. [London] 1955, 259; E. SONDEHEIMER und R. W. HOLLEY, J. Amer. chem. Soc. 76 (1954) 2467; P. SCHELLENBERG und J. ULLRICH, Chem. Ber. 92 (1959) 1276; 90 (1957) 700.

¹¹⁾ Z. B. H. SACHS und E. BRAND, J. Amer. chem. Soc. 75 (1953) 4610.

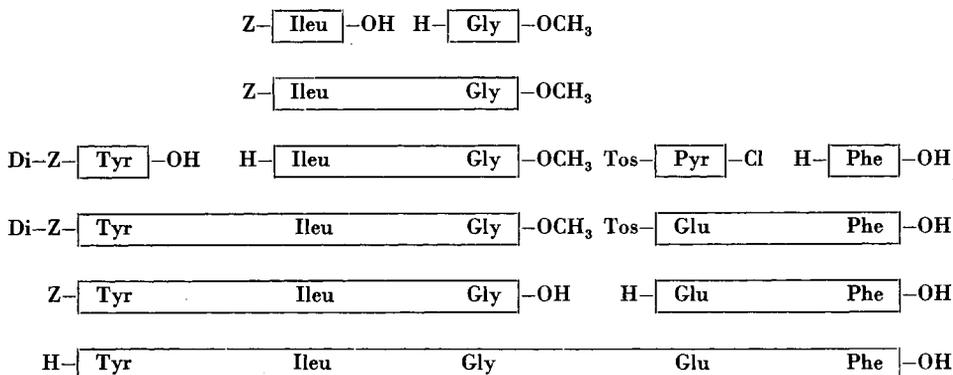
¹²⁾ J. RUDINGER, Collect. Czechoslov. chem. Commun. 19 (1954) 365.

¹³⁾ J. RUDINGER, Collect. Czechoslov. chem. Commun. 19 (1954) 375.

¹⁴⁾ K. RÖWE, E. FERBER und H. FISCHER, Hoppe Seyler's Z. physiol. Chem. 313 (1958) 174.

bestimmung nach SANGER¹⁵⁾ als rein. Das freie Peptid löst sich bei neutraler und stark saurer Reaktion in Wasser leicht auf, schwer dagegen im pH-Bereich von 2 bis 4. Der tatsächlich zum Ziel führende Syntheseweg ist in Tabelle 1 dargestellt.

Tab. 1. Syntheschema für das Pentapeptid II



Plastein-Reaktion

Kurz nach Zugabe von wenig Pepsin zu einer konzentrierten Lösung des Peptids beginnt bei 37°C und pH 5 ein dichter Niederschlag auszufallen. Nach zwölfstündiger Inkubation werden ca. 30% Plastein durch Zentrifugieren gewonnen und ebenso wie der Überstand genauer untersucht. Wie bei der Plastein-Bildung aus natürlichen Vorstufen¹⁾ findet auch hier die Reaktion ohne Transpeptidierung, also *unter Wasserabspaltung* statt. Das isolierte Plastein zeigt nach Hydrolyse mit Salzsäure dieselbe Aminosäurezusammensetzung¹⁴⁾ wie sein Monomeres, während der Überstand nur nicht umgesetztes Pentapeptid, jedoch keine Spaltprodukte enthält.

Das Plastein ist in Wasser so gut wie unlöslich, durch Zusatz von Natronlauge geht es in Lösung und läßt sich nun gegen viel Wasser dialysieren, ohne wieder auszufallen. Im Schlauch liegt jetzt eine neutrale Lösung des Natriumsalzes vor, aus welcher durch verdünnte Säure die

¹⁵⁾ Übersicht: G. BISERTE, J. W. HOLLEMAN, J. HOLLEMAN-DEHOVE und P. SAUTIERE, J. Chromatography 2 (1959) 225.

schwerlösliche protonisierte Form ausfällt. Die klare Lösung des Natriumsalzes wurde bei der Herstellung eines Dinitrophenyl-(DNP)-Derivates benützt, das wir zur Bestimmung des Molekulargewichtes benötigten. Die Hydrolyse mit Salzsäure in Eisessig ergibt daraus außer den vier anderen Aminosäuren (im erwarteten Verhältnis)¹⁴⁾ O-DNP-Tyrosin aus der Kette und N,O-Di-DNP-Tyrosin vom Aminoende.

Bestimmung des durchschnittlichen Polymerisationsgrades

Zur Molekulargewichtsbestimmung kann man die Konzentration des O-DNP-Tyrosins mit der des N,O-Di-DNP-Tyrosins im Hydrolysat des dinitrophenylierten Plasteins vergleichen. Hierzu benützten wir die Messung der Extinktion im Bereich von 250 bis 400 $m\mu$ in 99%iger Ameisensäure. Die Spektren der beiden reinen Verbindungen sind in Abb. 1 wiedergegeben, sie überlappen sich im ultravioletten Bereich. Bei 290 $m\mu$ hat die Di-DNP-Verbindung (Kreuze) ein flaches Minimum und bei

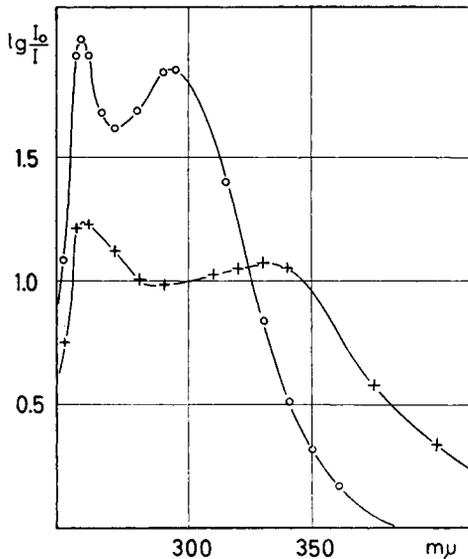


Abb. 1. Absorptionsspektren von 10^{-4} m N,O-Di-DNP-Tyrosin (-x-) und von $2 \cdot 10^{-4}$ m O-DNP-Tyrosin (-o-) in 99%iger Ameisensäure. Abszisse: Wellenlänge in $m\mu$, Ordinate: $\lg I_0/I$

335 $m\mu$ ein ebensolches Maximum, während die Mono-DNP-Verbindung (Kreise) bei 290 $m\mu$ ein ausgeprägtes Maximum besitzt und bei 335 $m\mu$ nur wenig absorbiert. Die beiden Wellenlängen sind also zur Konzentra-

tionsbestimmung nach dem Zweikomponentenverfahren^{16,17)} geeignet. Man findet die Konzentration beider DNP-Verbindungen aus den Gleichungen (1)

$$C_M = (16,4 E^{290} - 15,1 E^{335}) \cdot 10^{-5} \quad (1)$$

$$C_D = (12,4 E^{335} - 4,5 E^{290}) \cdot 10^{-5}$$

wobei E^{290} und E^{335} die Extinktionen bei den bezeichneten Wellenlängen darstellen und die molare Konzentration von O-DNP-Tyrosin bzw. N,O-Di-DNP-Tyrosin mit C_M bzw. C_D bezeichnet wird. Die Zahlenkonstanten sind aus den molaren Extinktionskoeffizienten der beiden reinen Analysesubstanzen errechnet worden, nachdem diese den gleichen Bedingungen wie bei der Hydrolyse von dinitrophenyliertem Plastein ausgesetzt gewesen sind. Wir haben uns von der Brauchbarkeit des Verfahrens dadurch überzeugt, daß wir bekannte Mischungen der Komponenten „hydrolysierten“ und danach auf dem beschriebenen optischen Weg ihre Zusammensetzung nachprüften. Dabei ergaben sich Werte, wie sie in Tabelle 2 zusammengestellt sind.

Tab. 2. Vergleich der nach Gl. (1) errechneten Konzentrationen C_M und C_D mit der Einwaage.

Gemisch	$C_M \cdot 10^5$ [Mol/l]		$C_D \cdot 10^5$ [Mol/l]	
	berechnet	eingewogen	berechnet	eingewogen
A	3,0	3,2	8,0	7,9
B	4,9	4,9	4,5	4,7
C	7,8	8,1	3,3	3,2

Im Falle des Hydrolysats vom obigen DNP-Plastein betrug das Verhältnis $C_M : C_D = 1,3$, bei einem parallel hergestellten Plastein 1,5. Da der Polymerisationsgrad n mit diesem Verhältnis nach

$$n = \frac{C_M}{C_D} + 1 \quad (2)$$

zusammenhängt, ergibt sich für das erste totalsynthetische Plastein $n = 2,3$ bzw. 2,5.

Dieser Wert wurde auch bei einer zweiten, unabhängigen optischen Messung erhalten. Wie aus Abb. 1 hervorgeht, absorbiert bei 400 m μ nur der N-DNP-Anteil des dinitrophenylierten Tyrosins, also nur der an

¹⁶⁾ G. H. BEAVEN und E. R. HOLIDAY, *Advances Protein Chem.* 7 (1952) 369.

¹⁷⁾ E. R. FRITZE und H. ZAHN, *Z. analyt. Chem.* 162 (1958) 414.

der Aminoendgruppe befindliche DNP-Rest, während O-DNP-Gruppen hier unsichtbar bleiben. Man erhält also eine Aussage über das Molekulargewicht (M) durch Vergleich der Absorption (E) gewogener Mengen DNP-Plastein mit derjenigen des DNP-Monomeren. Es gilt

$$M_{\text{Plastein}} = \frac{E_{\text{Monomer}}^{400} \cdot C_{\text{Plastein}} \quad [\text{g/l}]}{E_{\text{Plastein}}^{400} \cdot C_{\text{Monomer}} \quad [\text{Mol./l}]} \quad (3)$$

In unserem Fall resultiert ein Molekulargewicht von 2250, was einem Polymerisationsgrad von 2,6 entspricht.

Diskussion

Durch die geschilderten Befunde ist noch einmal sichergestellt, daß der Zusammentritt der Pentapeptid-Moleküle in Gegenwart von Pepsin unter Abspaltung von Wasser erfolgt. Das Auftreten von O-DNP-Tyrosin im Hydrolysat zeigt deutlich, daß die Kopffaminosäure des Monomeren im Plastein Peptid-gebunden vorliegt. Der relativ niedere Polymerisationsgrad erklärt sich durch die enorme Schwerlöslichkeit der Oligomeren. Es wird daher nötig sein, Plasteinbausteine mit hydrophilen Gruppen herzustellen, um vielleicht höhermolekulare Plasteine zu erhalten. Eine andere Möglichkeit, um aus dem Bereich der Schwerlöslichkeit herauszukommen, ist die Wahl eines anderen p_{H} -Wertes bei der Polymerisation. Dann kann jedoch nicht mehr mit Pepsin gearbeitet werden. Es wurde deshalb am beschriebenen Pentapeptid die Einwirkung von Chymotrypsin bei p_{H} 8,3 betrachtet und gefunden, daß auch hier die Bildung eines Plasteins erfolgt, das aber in Lösung bleibt. Über seine Eigenschaften soll später berichtet werden.

Versuchsteil*)

I. Peptidsynthesen

Tripeptidkomponente

1. Carbobenzoxy-isoleucyl-glycin-methylester; Z-Ileu-Gly·OCH₃

13,5 g (0,05 M) Carbobenzoxy-isoleucin werden mit 15 ccm (0,11 M) Triäthylamin in 250 ccm trockenem Tetrahydrofuran unter Rühren und Feuchtigkeitsausschluß bei -4°C tropfenweise mit 4,7 ccm Chlorameisensäureäthylester versetzt und unter Abscheidung von Triäthylammoniumhydrochlorid in das gemischte Anhydrid übergeführt, dessen Bildung

*) Alle Synthesen wurden mit L-Aminosäuren durchgeführt. Die Schmelzpunkte wurden im Kupferblock bestimmt und nicht korrigiert. Alle Substanzen wurden durch Papierelektrophorese auf ihre Reinheit geprüft, notfalls wurde vorher die Carbobenzoxygruppe partiell hydrolysiert.

nach 20 Min. bei -4°C abgeschlossen ist. Daraufhin wird eine vorgekühlte Lösung von 6,25 g (0,05 M) Glycinmethylester-hydrochlorid in 50 ccm Wasser in einem Guß zu dem Ansatz hinzugefügt, die Eis-Kochsalz-Mischung entfernt und das Gemisch unter weiterem Rühren auf Zimmertemperatur kommen lassen. Beim Abdestillieren des Tetrahydrofurans scheidet sich der Carbobenzoxydipeptid-ester fest ab, er wird mit Wasser, 5%igem NaHCO_3 , 1 n HCl und wieder mit Wasser neutral gewaschen. Nach dem Trocknen und Umkristallisieren aus 100 ccm Essigester werden 12,5 g (75% d.Th.) Carbobenzoxy-isoleucylglycinmethylester vom Schmp. 128–130 $^{\circ}\text{C}$ erhalten. Analysenpräparat (aus Essigester) Schmp. 131 $^{\circ}\text{C}$.

Analyse: $\text{C}_{17}\text{H}_{24}\text{O}_5\text{N}_2$ (M = 336,4) Ber. C 60,70 H 7,19 N 8,33
Gef. C 60,64 H 7,11 N 8,43

2. Hydrochlorid vom Isoleucyl-glycin-methylester; $\text{HCl} \cdot \text{H} \cdot \text{Ileu} \cdot \text{Gly} \cdot \text{OCH}_3$

12,5 g der Carbobenzoxyverbindung werden in 300 ccm absol. Methanol, das 25 ccm 6 n methanolische HCl enthält, mit Pd-Mohr aus 1 g PdCl_2 bei 40°C unter heftiger Durchmischung mit einem Vibro-Mischer im Wasserstoffstrom innerhalb weniger Stdn. hydriert. Beim Eindampfen der filtrierten Lösung hinterbleibt das Esterhydrochlorid als Kristallkuchen. Auflösen in trockenem Methanol und Ausfällen mit ebensolchem Äther liefert 8,0 g (90% d.Th.) Isoleucyl-glycin-methylester als Hydrochlorid vom Schmp. 175 $^{\circ}\text{C}$ (Zers.).

Analyse: $\text{C}_9\text{H}_{19}\text{O}_3\text{N}_2\text{Cl}$ (M = 238,7) Ber. C 45,28 H 8,02 N 11,73
Gef. C 45,27 H 8,40 N 10,98

3. Carbobenzoxy-tyrosin-hydrazid; $\text{Z} \cdot \text{Tyr} \cdot \text{NHNH}_2$

13,5 g (0,07 M) freier Tyrosin-methylester^{9,5)} werden in 200 ccm Chloroform aufgeschlämmt und unter Vibrieren bei $0-5^{\circ}\text{C}$ tropfenweise mit 10,0 ccm (0,07 M) Triäthylamin und 12,0 g (0,07 M) Carbobenzoxychlorid versetzt, wobei sich das Gemisch allmählich klärt. Nach 1 Stde. bei Zimmertemperatur wird das Lösungsmittel abdestilliert und der Rückstand in Essigester/Wasser aufgenommen. Die Essigester-Schicht wird mit 5%igem NaHCO_3 , 1 n HCl und Wasser sorgfältig neutral gewaschen, getrocknet und i. Vak. eingedampft. Das klare Öl wird in 40 ccm Methanol gelöst und mit 7,0 g 100%igem Hydrazinhydrat versetzt. Der sich über Nacht bei Zimmertemperatur abscheidende Kristallkuchen wird abgepreßt, mit Methanol kalt gewaschen und aus 1,2 l Methanol umkristallisiert. Die Gesamtausbeute über beide Stufen (Carbobenzoxylierung und Hydrazinolyse) beträgt 60% d.Th., Schmp. 218 $^{\circ}\text{C}$.

Analyse: $\text{C}_{17}\text{H}_{19}\text{O}_4\text{N}_3$ (M = 329,4) Ber. N 12,76 Gef. N 12,62

4. Di-carbobenzoxy-tyrosyl-isoleucyl-glycin-methylester (IIIb); $\text{Di-Z} \cdot \text{Tyr} \cdot \text{Ileu} \cdot \text{Gly} \cdot \text{OCH}_3$

6,3 g (0,014 M) Di-carbobenzoxy-tyrosin⁶⁾ werden mit 4 ccm (0,028 M) Triäthylamin und 1,3 ccm (0,014 M) Chlorameisensäureäthylester in 75 ccm Tetrahydrofuran in der bei 1. beschriebenen Weise in das gemischte Anhydrid überführt. Dieses wird ebenso mit 3,33 g (0,014 M) Isoleucyl-glycin-methylester als Hydrochlorid in 10 ccm Wasser aminolytisch aufgespalten. Nach der gleichen Aufarbeitung läßt sich das Produkt noch wasserfeucht aus ca. 250 ccm Methanol umkristallisieren, und man erhält 4,6 g (52% d.Th.) Di-carbobenzoxy-tyrosyl-isoleucyl-glycin-methylester (IIIb) vom Schmp. 203–205 $^{\circ}\text{C}$. Analysenpräparat (aus Methanol) Schmp. 206 $^{\circ}\text{C}$.

Analyse: $\text{C}_{34}\text{H}_{39}\text{O}_9\text{N}_3$ (M = 633,7) Ber. C 64,44 H 6,20 N 6,63
Gef. C 64,33 H 6,21 N 6,80

5. Carbobenzoxy-tyrosyl-isoleucyl-glycin-methylester (IIIa); Z·Tyr-Ileu-Gly·OCH₃

9,9 g (0,03 M) Carbobenzoxy-tyrosin-hydrazid führt man in einem Gemisch aus 130 ccm konz. HCl und 650 ccm Wasser bei -5°C mit 2,4 g (0,03 M) NaNO₂ in wenig Wasser ins Azid über. Nach 5 Min. wird das Azid⁷⁾ – immer bei 0°C – abgesaugt, in 100 ccm Essigester gelöst und dort mit eiskalter 5%iger NaHCO₃-Lösung und Eiswasser gewaschen. Man gibt in der Kälte zu dem kurz mit Natriumsulfat getrockneten Essigester eine gekühlte Chloroform-Lösung von 7,2 g (0,03 M) Isoleucyl-glycin-methylester als Hydrochlorid, die vorher mit 4,2 ccm (0,03 M) Triäthylamin versetzt war und stellt für 24 Stdn. in den Eisschrank. Nach weiteren 24 Stdn. bei Zimmertemperatur haben sich 10,0 g (66% d.Th.) Carbobenzoxy-tyrosyl-isoleucyl-glycin-methylester (IIIa) fest abgeschieden, die abgesaugt und in der beschriebenen Weise auf neutrale Reaktion hin aufgearbeitet werden (Schmp. 198°C). Beim Umlösen aus Methanol wird keine deutliche Kristallisation und kein eindeutiger Schmp. des Niederschlags gefunden, daher wurde das Rohprodukt direkt zur Alkaliverseifung eingesetzt.

6. Carbobenzoxy-tyrosyl-isoleucyl-glycin (IIIc); Z·Tyr-Ileu-Gly·OH

7,0 g (0,014 M) Carbobenzoxy-tyrosyl-isoleucyl-glycin-methylester (IIIa, Rohprodukt) werden in 300 ccm Aceton gelöst. Dazu gibt man bei Zimmertemperatur während 30 Min. unter Vibrieren portionsweise insgesamt 25 ccm 1 n NaOH, löst mit 100 ccm Wasser das ausgeschiedene Natriumsalz und läßt mit weiteren 10 ccm 1 n NaOH eine Stde. stehen. Nach dem Abdestillieren des Acetons i. Vak. wird mit 50 ccm 2 n HCl angesäuert, und die abgeschiedenen Flocken werden durch leichtes Erwärmen und Schütteln in 500 ccm Essigester aufgenommen. Die mit Wasser neutral gewaschene Essigester-Lösung wird zweimal mit 150 ccm 5%iger KHCO₃ ausgezogen und die Bicarbonatphase nach Waschen mit frischem Essigester mit konz. HCl angesäuert. Die Säure scheidet sich in Flocken ab, wird auf der Nutsche neutral gewaschen und noch feucht aus 500 ccm 96%igem Äthanol umkristallisiert. Man erhält 5,5 g (81% d.Th.) Carbobenzoxy-tyrosyl-isoleucyl-glycin (IIIc) vom Schmp. 236°C . Analysenpräparat (aus wassergesättigtem Essigester) Schmp. 238°C .

Analyse: C₂₅H₃₁O₇N₃ (M = 485,5) Ber. C 61,84 H 6,44 N 8,66
Gef. C 61,53 H 6,37 N 8,58

Aus dem Di-carbobenzoxy-tyrosyl-isoleucyl-glycin-methylester (IIIb) wird unter ähnlichen Bedingungen die gleiche Säure IIIc in etwas geringerer Ausbeute erhalten.

*Dipeptidkomponente*7. Carbobenzoxy- α -glutamyl-(γ -äthylester)-phenylalanin-p-nitrobenzylester (IVa); Z·Glu(γ -OEt)-Phe·OpNBz

Wie unter 1. beschrieben, wird aus 3,09 g (0,01 M) Carbobenzoxyglutaminsäure- γ -äthylester¹⁸⁾, 2,8 ccm (0,02 M) Triäthylamin und 0,95 ccm (0,01 M) Chlorameisensäure-äthylester in 50 ccm Tetrahydrofuran eine Lösung des gemischten Anhydrids bereitet, die dann ebenso mit 3,81 g (0,01 M) Hydrobromid von Phenylalanin-nitrobenzylester¹⁹⁾ in

¹⁸⁾ B. HEGEDÜS, Helv. chim. Acta **31** (1948) 737.

¹⁹⁾ H. SCHWARZ und K. ARAKAWA, J. Amer. chem. Soc. **81** (1959) 5691.

Wasser versetzt wird. Der nach Abdestillieren des Tetrahydrofurans (i. Vak.) hinterbleibende Rückstand wird in Essigester 10 mal mit verd. HCl (Phenylalanin-nitrobenzylester ist in verd. Säure schlecht löslich), anschließend schnell zweimal mit 5%iger NaHCO_3 und dann mit Wasser neutral gewaschen. Umkristallisieren des Essigester-Rückstandes mit wäßrigem Methanol liefert 4,1 g (70% d. Th.) Carbobenzoxymethyl- α -glutamyl-(γ -äthylester)-phenylalanin-p-nitrobenzylester (IVa) vom Schmp. 111–113°C. Analysenpräparat (aus wäßrigem Methanol) Schmp. 115°C.

Analyse: $\text{C}_{31}\text{H}_{33}\text{O}_9\text{N}_3$ (M = 591,6) Ber. C 62,93 H 5,62 N 7,10
Gef. C 63,13 H 5,55 N 7,20

8. Carbobenzoxymethyl- α -glutamyl-(γ -benzylester)-phenylalanin-benzylester (IVb);
Z·Glu(γ -OBz)-Phe·OBz

3,7 g (0,01 M) Carbobenzoxymethyl-glutaminsäure- γ -benzylester²⁰) werden, wie bei 1. beschrieben, mit 2,9 g (0,01 M) Phenylalanin-benzylester-HCl mit Hilfe von 2,8 ccm (0,02 M) Triäthylamin und 0,95 ccm (0,01 M) Chlorameisensäure-äthylester gekuppelt. Zur Aufarbeitung wird in Essigester aufgenommen, mit Säure, Bicarbonatlösung und Wasser gewaschen, mit Natriumsulfat getrocknet und eingengt. Beim Versetzen mit Petroläther erhält man 3,65 g (60% d. Th.) Carbobenzoxymethyl- α -glutamyl-(γ -benzylester)-phenylalanin-benzylester (IVb) vom Schmp. 116–117°C. Analysenpräparat (aus Essigester/Petroläther) Schmp. 121°C.

Analyse: $\text{C}_{36}\text{H}_{36}\text{O}_7\text{N}_2$ (M = 608,8) Ber. C 71,03 H 5,96 N 4,60
Gef. C 70,95 H 5,63 N 4,81

9. Tosyl- α -glutamyl-phenylalanin (IVc); Tos·Glu(γ -OH)-Phe·OH

3,0 g (0,01 M) Tosyl-pyrrolidoncarbonsäurechlorid¹²) werden in 10 ccm Tetrahydrofuran gelöst und mit 30 ccm Äther vermischt. Diese Lösung wird mit 1,65 g (0,01 M) Phenylalanin in 15 ccm 2 n NaOH auf der Maschine 2 Stdn. geschüttelt. Danach zieht man die organische Phase mit 5 ccm 2 n NaOH aus, wäscht die vereinigten alkalischen Lösungen mit Äther und erhält beim Ansäuern mit konz. HCl ein beim Reiben erstarrendes Öl. Die Masse wird in 10 ccm 2 n NaOH aufgelöst, angesäuert und geimpft, wobei sich sofort Tosyl- α -glutamyl-phenylalanin (IVc) mikrokristallin abscheidet. Die Ausbeute beträgt 3,55 g (80% d. Th.) an leicht gelbem Rohprodukt vom Schmp. 204–206°C. Weiteres Umkristallisieren ist verlustreich und liefert aus sehr wenig Äthanol 2,5 g (55% d. Th.) derbe Kristalle vom Schmp. 206–207°C. Analysenpräparat (aus Isopropanol) Schmp. 208°C.

Analyse: $\text{C}_{21}\text{H}_{24}\text{O}_7\text{N}_2\text{S}$ (M = 448,42) Ber. C 56,24 H 5,39 N 6,15 S 7,14
Gef. C 56,48 H 5,38 N 6,25 S 7,00

10. α -Glutamyl-phenylalanin (IVd); H·Glu(γ -OH)-Phe·OH

1,8 g (0,004 M) Tosyl- α -glutamyl-phenylalanin werden im 250-ccm-Kolben in 100 ccm trockenem, flüssigen Ammoniak gelöst und unter Feuchtigkeitsausschluß und intensivem Vibrieren mit im ganzen ca. 600 mg Natriummetall in 10 Portionen bis zur 3 Min. bleibenden Blaufärbung versetzt. Hierbei wird mit der neuen Zugabe jeweils gewartet, bis die vorherige Blaufärbung verschwunden ist. Anschließend wird mit 12 g trockenem Kationenaustauscher²¹) in der NH_4^+ -Form (Dowex 50X4, 200–400 mesh) entfärbt, das Ammoniak verdunsten gelassen und der Kolbeninhalt zuletzt 15 Stdn. i. Vak. über Schwefelsäure aufbewahrt. Den wäßrigen Extrakt des Austauschers neutralisiert man mit Eisessig und engt ihn i. Vak. auf 20 bis 30 ccm ein. Die Ausscheidung des Dipeptids in Drusen läßt sich durch

²⁰) W. E. HANBY, S. G. WALEY und J. WATSON, J. chem. Soc. [London] 1950, 3239.

Zugabe von Eisessig (bis pH 4,5) vervollkommen, nach Waschen mit wenig kaltem Wasser erhält man 900 mg (75% d.Th.) α -Glutamyl- γ -phenylalanin (IVd) vom Schmp. 196°C. Analysenpräparat (aus Wasser) Schmp. 196°C.

Analyse: $C_{14}H_{18}O_5N_2$ ($M = 294,3$) Ber. C 57,13 H 6,17 N 9,52
Gef. C 57,30 H 6,17 N 9,33

In größeren Ansätzen war die Ausbeute immer deutlich geringer. Das gleiche freie Di-peptid (IVd) wurde durch Hydrogenolyse – ähnlich wie bei 2. – von Carbobenzoxy- α -glutamyl-(γ -benzylester)-phenylalanin-benzylester (IVb) in 90% Ausbeute gewonnen.

Pentapeptid

11. Tyrosyl-isoleucyl-glycyl- α -glutamyl-phenylalanin (II); H·Tyr-Ileu-Gly-Glu-Phe·OH

In 50 ccm Tetrahydrofuran wird, wie bei 1. beschrieben, aus 3,4 g (0,007 M) Carbobenzoxy-tyrosyl-isoleucyl-glycin (IIIc), 1,0 ccm (0,007 M) Triäthylamin und 0,67 ccm (0,007 M) Chlorameisensäureäthylester das gemischte Anhydrid bereitet und mit einer Lösung von 2,06 g (0,007 M) α -Glutamylphenylalanin (IVd) in 30 ccm 0,5 n NaOH aminolytisch aufgespalten. Nach dem Verjagen des Tetrahydrofurans i. Vak. bleibt eine gallertartig getrübe Lösung der Natriumsalze zurück, die auch durch weitere Lauge und leichtes Erwärmen nicht geklärt werden kann. Deshalb wird sie sofort angesäuert und das sich in Flocken abscheidende Rohprodukt abgesaugt und mit Wasser neutral gewaschen. Nach dem Trocknen erhält man 4,0 g Carbobenzoxy-tyrosyl-isoleucyl-glycyl- α -glutamyl-phenylalanin, verunreinigt mit Carbobenzoxy-tripeptid, als weißes Pulver. Reinigungsversuche blieben erfolglos. Daher wurden 800 mg des trockenen Rohproduktes in 5 ccm 5%igem Bromwasserstoff in Eisessig gelöst und die Hydrobromide nach 10 Min. mit Äther ausgefällt. Aus dem erhaltenen Öl entfernt man i. Vak. über festem Kaliumhydroxyd den Überschuß Bromwasserstoff und den Eisessig und löst es in 75 ccm Wasser, stellt den pH -Wert mit 2 n NaOH auf 6,5 ein und gibt das Gemisch kontinuierlich über 40 Stdn. auf das BECKMAN-*Spinco*-Elektrophorese-Gerät CP (pH 6,5; 950 V; 30 mA). Die Ausbeute an reinem, freien Pentapeptid (leicht gelbes Pulver) beträgt ca. 30% d.Th., berechnet auf die eingesetzte Tripeptidkomponente. Die papierelektrophoretische und papierchromatographische Untersuchung in verschiedenen Puffern bzw. Lösungsmittelsystemen sowie die Bausteinanalyse mit Hilfe des *Spinco*-Analytrols^{21,1)} sprechen für das Vorliegen eines einheitlichen Peptids. Die Totalhydrolyse der Di-DNP-Verbindung ergibt nur Di-DNP-Tyrosin und die 4 freien Aminosäuren im gleichen Verhältnis.

12. N,O-Di-DNP-Tyrosyl-isoleucyl-glycyl- α -glutamyl-phenylalanin¹⁵⁾; N,O-Di-DNP-Tyr-Ileu-Gly-Glu-Phe·OH

100 mg freies Pentapeptid werden in 10 ccm 50%iges Äthanol mit 100 mg Fluordinitrobenzol und 0,2 ccm Triäthylamin versetzt, eine Stde. im Dunkeln aufbewahrt, im Exsikkator eingedampft, mit Petroläther/Äther (1:1) digeriert und durch Zentrifugieren solange mit Essigester ausgewaschen, bis nichts Gelbes mehr in Lösung geht. Das pulvrige Triäthylammoniumsalz läßt sich mit verd. Salzsäure zerlegen, und das DNP-Peptid löst sich jetzt in Essigester, in dem es neutral gewaschen, getrocknet und daraus anschließend mit Petroläther als zitronengelbes Pulver ausgefällt werden kann. Einerseits zeigt die Papierchromatographie in n-Butanol/Ammoniak ($R_f < 0,1$) das Fehlen von Dinitrophenol und anderen DNP-Verbindungen, andererseits enthält das Totalhydrolysat lediglich N,O-Di-DNP-Tyrosin und keinerlei Tyrosin bei den freien Aminosäuren, was als Beweis für die Reinheit des DNP-Derivates gilt.

²¹⁾ J. M. SWAN und V. DU VIGNEAUD, J. Amer. chem. Soc. 76 (1954) 3110.

II. Plasteinreaktion

1. Plastein-Synthese¹⁾

100 mg Pentapeptid werden in 0,2 ccm Wasser mit winzigen Tropfen 2 n HCl auf pH 5,0 eingestellt und mit einer Spur (< 1 mg) krist. Pepsin versetzt. Nach 15 Stdn. bei 37 °C wird das Enzym durch 10 Min. Erhitzen auf 80 °C denaturiert und das ausgefallene Plastein 7 mal mit viel Wasser und anschließend 2 mal mit Aceton gewaschen. Ausbeute ca. 35 mg getrocknetes Produkt. Das Pulver wird in 0,1 n NaOH gelöst und gegen viel Wasser dialysiert. Die innere, klare Lösung erreicht dann einen pH-Wert von 7,6. Das Plastein fällt erst bei Dialyse gegen verd. Säure wieder aus und kann durch Zentrifugieren gesammelt werden, nachdem die Suspension vorher wieder durch Dialyse gegen Wasser neutralisiert worden war (Ausbeute 30 mg).

2. Dinitrophenylierung des Plasteins

Die klare, dialysierte Lösung von 30 mg Plastein-Natriumsalz in 5 ccm Wasser wird unter intensivem Rühren mit je 1 Tropfen Dinitrofluorbenzol und Triäthylamin versetzt. Während 1 Stde. wird der pH-Wert bei 8,5 bis 9,0 gehalten, wobei das Natriumsalz des DNP-Plasteins langsam ausfällt. Die Suspension wird mit 2 n HCl angesäuert und die flockige Abscheidung durch Zentrifugieren mit Wasser, Methanol, Essigester und Äther sorgfältig ausgewaschen. Das trockene, ockergelbe Pulver löst sich leicht in 99%iger Ameisensäure und ist daraus mit Wasser fällbar. Die so erhaltene, voluminöse Fällung wird in der beschriebenen Weise ausgewaschen und getrocknet (Ausbeute 30 mg).

3. Zur Bestimmung des Polymerisationsgrades

Die für die Molekulargewichtsbestimmung nach Gl. (1) und (2) bzw. (3) erforderlichen Messungen der UV-Absorption von DNP-Verbindungen wurden in 1-cm-Küvetten mit Hilfe des BECKMAN DK 2 durchgeführt. Dazu löste man die Proben – möglichst $8 \cdot 10^{-5}$ m – in 99%iger Ameisensäure. N,O-Di-DNP-Tyrosin war nach LEVY und CHUNG²²⁾ und O-DNP-Tyrosin – vgl. ¹⁷⁾ – durch Dinitrophenylierung von N-Carbobenzoxy-tyrosin und anschließende Partialhydrolyse mit Bromwasserstoff in Eisessig gewonnen worden. Zur Totalhydrolyse wurden die Proben in einem Gemisch aus Eisessig und konz. HCl (1:1) im zugeschmolzenen Rohr 15 Stdn. bei 110 °C aufbewahrt. Anschließend wurde im Exsikkator getrocknet und in Ameisensäure aufgenommen. Für die dekadischen molaren Extinktionskoeffizienten wurde bei O-DNP-Tyrosin $\epsilon_M^{290} = 9180$ und $\epsilon_M^{335} = 3320$ sowie bei N,O-Di-DNP-Tyrosin $\epsilon_D^{290} = 11180$ und $\epsilon_D^{335} = 12110$ mit der Dimension [l/Mol] unter den genannten Bedingungen gefunden. Aus diesen Werten errechnen sich nach dem LAMBERT-BEERSchen Gesetz¹⁶⁾ die Konstanten der Gl. (1).

Wir danken der DEUTSCHEN FORSCHUNGSGEMEINSCHAFT und dem FONDS DER CHEMISCHEN INDUSTRIE für die großzügige Unterstützung dieser Arbeit durch Sachbeihilfen.

²²⁾ A. L. LEVY und D. CHUNG, J. Amer. chem. Soc. 77 (1955) 2899.