

Es ist damit ein neuer Weg gegeben, die Existenz von H-Brücken nachzuweisen und ihre Eigenschaften zu studieren.

Aus den bisher vorliegenden Befunden könnte man noch zahlreiche Tatsachen anführen, die unmittelbar mit den Problemen der inneren Vorgänge bei mehratomigen Molekeln zusammenhängen; so haben z. B. auch Beobachtungen am Emissionsspektrum des Wassers Aufschluß über den Anregungsmechanismus in der H_2O -Molekel gegeben *).

Soweit sich bisher überblicken läßt, ist bereits bei Molekeln mit wenigen Atomen der innere „Lebensprozeß“ reichhaltiger, als man von vornherein erwarten möchte. Es ist anzunehmen, daß die Aufdeckung der Zusammenhänge dort sich auch auf die Kenntnis von den Vorgängen bei den großen biologischen Molekeln auswirken wird. Es handelt sich, ganz

allgemein ausgedrückt, um den Versuch, den physikalischen Erfahrungsbereich in enge Verbindung zu bringen mit der chemischen und biologischen Erscheinungswelt.

Die vorstehende kurze Notiz soll nicht eine Darstellung der bisherigen Befunde geben, sondern lediglich ein Hinweis sein für interessierte Kreise auf Versuche, die ihrerseits ja nur einen Anfang darstellen.

Eingeg. 24. Januar 1944. [A. 19.]

¹⁾ Chem. Technik 15, 99 [1942]. Weitere Arbeiten von H. Schüler u. A. Woelcke in der Physik. Z.: *) 43, 890 [1941]: Grundsätzliches zur Anregung organischer Moleküle durch Elektronenstoß in der Glimmentladung. *) 43, 17 [1942]: Weitere Untersuchungen organischer Substanzen mit Hilfe der Elektronenstoßanregung in der Glimmentladung. *) 43, 415 [1942]: Über die unterschiedliche Wirkung von Elektronenstoß und Licht bei Anregung organischer Moleküle. *) 43, 520 [1942]: Spektroskopischer Nachweis der H-Brücken-Bildung beim Chinon durch Elektronenstoßanregung. *) 44, 335 [1943]: Über den Anregungsmechanismus im H_2O -Molekül auf Grund der Befunde an seinem Emissionsspektrum im Sichtbaren.

Chemie und Biologie der Oxyaminosäuren*)

Von Dr. rer. nat. habil. LEONHARD BIRKOFER, Heidelberg

Kaiser-Wilhelm-Institut für medizin. Forschung, Institut für Chemie

Die Eiweißkörper bauen sich bekanntlich aus einer Reihe von Aminosäuren auf. Um zu erfahren, ob alle bekannten Aminosäuren für die Ernährung gleich wichtig sind, führte W. C. Rose ¹⁾ Fütterungsversuche an Ratten und Hunden durch mit einer Diät, die aus Kohlenhydraten, Fetten, anorganischen Salzen und Vitaminen in hinreichender Menge bestand. An Stelle von Proteinen wurden die zu untersuchenden Aminosäure-Gemische verfüttert. Rose stellte fest, daß bei den Tieren nach Verfüterung von Gemischen der bis zum Jahre 1934 bekannten Aminosäuren Wachstumsstillstand eintrat. Dieser konnte jeweils durch Zusatz eines Protein-Hydrolysates behoben werden. Mit Hilfe dieses Wachstumstestes gelang es Rose, aus Fibrin eine bis dahin noch unbekannte Aminosäure, das Threonin, zu isolieren, das nach Zusatz zu dem bei der Diät verwandten Aminosäure-Gemisch das gleiche Wachstum wie Protein-Fütterung gewährleistete. Nun konnte Rose die Aminosäuren in für das Wachstum „wesentliche“ und „nichtwesentliche“ trennen (Tab. 1).

Tabelle 1.

wesentliche		nicht wesentliche
Lysin.....	1,0	Glycin
Tryptophan.....	0,2	Alanin
Histidin.....	0,4	Serin
Phenylalanin.....	0,7	Norleucin
Leucin.....	0,9	Asparaginsäure
Isoleucin.....	0,5	Glutaminsäure
Threonin.....	0,6	Oxyglutaminsäure
Methionin.....	0,6	Prolin
Valin.....	0,7	Oxyprolin
Arginin.....	0,2	Citrullin
		Tyrosin
		Cystein

Von den in der Tabelle aufgeführten 22 Aminosäuren sind nur 10 für die Ernährung unerlässlich. Die „nichtwesentlichen“ Aminosäuren können offenbar synthetisiert werden, da ja alle Aminosäuren zum Aufbau der Organ-Proteine erforderlich sind.

Reichliche Gaben von nicht wesentlichen Aminosäuren setzen die zum Wachstum erforderliche Menge der „wesentlichen“ Aminosäuren auf einen geringen Prozentsatz herab. Die Zahlen in Tab. 1 geben diese Mindestmenge in Prozent der Gesamtnahrung an.

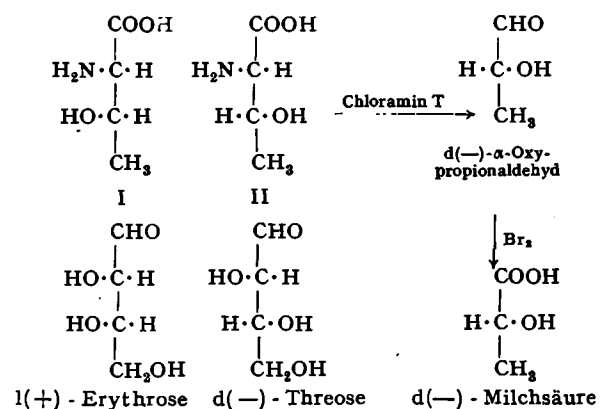
Einige der wesentlichen Aminosäuren, z. B.: Phenylalanin, Leucin, Isoleucin und Valin, können in der Nahrung durch die entsprechenden Oxy- oder Ketosäuren ersetzt werden. Die Aminierung findet in diesem Falle im Organismus statt.

Konstitution und Synthese.

Rose konnte das Threonin als α -Amino- β -oxy-buttersäure identifizieren ²⁾. Da es 2 asymmetrische C-Atome aufweist, gibt es 4 optisch aktive Formen. Es war nun zu entscheiden, welche Konfiguration die aus Fibrin isolierte Säure hatte. Sie zeigte eine Drehung von $[\alpha]_D = -28^\circ$. Die Reduktion mit H₂ und rotem Phosphor ³⁾ führte zu einer rechtsdrehenden α -Amino-buttersäure, die identisch war mit der von Emil Fischer ⁴⁾ synthetisch sowie von S. Oikawa ⁵⁾ aus biologischem Material dargestellten. Somit war die räumliche Lage der Amino-Gruppe festgelegt ⁶⁾. Die rechtsdrehende α -Amino-

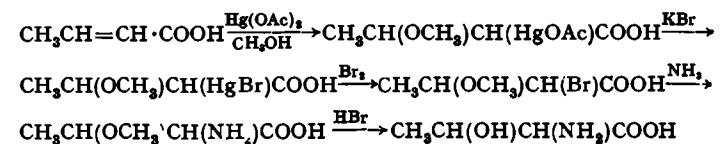
buttersäure gehört wie fast alle natürlich vorkommenden Aminosäuren der l-Reihe an und ist nach der neueren Nomenklatur l(+)- α -Amino-buttersäure. Für die neue Säure aus Fibrin standen nun nur noch 2 Konfigurationen zur Diskussion:

Tabelle 2.



Formel I ist analog der Struktur der l(+)-Erythrose, während Formel II der Konfiguration der d(-)-Threose entspricht. Bekanntlich werden Aminosäuren mit Chloramin T zum entsprechenden um ein C-Atom ärmeren Aldehyd oxydiert; so mußte sich die α -Amino- β -oxy-buttersäure in einen α -Oxypropionaldehyd überführen lassen und weiter durch Oxydation in die entsprechende Milchsäure. Da hierbei d(-)-Milchsäure entstand, war die Stellung der Oxy-Gruppe ebenfalls gesichert. Die neue Aminosäure leitet sich also von der d(-)-Threose ab und wurde d(-)-Threonin (II) genannt. Diese Bezeichnung ist nicht ganz glücklich, da Threonin wie alle anderen natürlichen Aminosäuren besser zur l-Reihe gerechnet wird. Legt man die Konfiguration nach einem Vorschlag von Kōgl ⁷⁾ am α -C-Atom fest, so rechnet Threonin wie die durch Reduktion daraus entstehende l(+)-Amino-buttersäure ebenfalls zur l-Reihe. Heute findet man die Bezeichnungen d(-)- und l(-)-Threonin nebeneinander in der Literatur.

Es wurden mehrere Threonin-Synthesen entwickelt. Man erhält meist eine Mischung von d,l-Threonin und dem Isomerenpaar d,l-Allothreonin. Die Methode von West u. Carter ⁸⁾ verläuft nach folgendem Schema: Quecksilberacetat wird in Methanol an Crotonsäure angelagert, das Addukt mit KBr umgesetzt und aus dem Produkt durch Brom-Einwirkung α -Brom- β -methoxybuttersäure erhalten. Diese wird mit Ammoniak in die α -Amino- β -methoxybuttersäure verwandelt und daraus durch Entmethylierung mit HBr α -Amino- β -oxybuttersäure gewonnen.



^{*)} Vorgetragen am 30. November 1943 in einer Sitzung der Physikalisch-medizinischen Societät und der Chemischen Gesellschaft der Universität Erlangen.

¹⁾ Science 66, 298 [1937].

²⁾ R. H. McCoy, C. E. Meyer u. W. C. Rose, J. biol. Chemistry 113, 283 [1935/36].

³⁾ E. Abderhalden u. K. Heyns, Ber. dtsch. chem. Ges. 67, 530 [1934].

⁴⁾ E. Fischer u. A. Mouneyral, ebenda 33, 2383 [1900].

⁵⁾ Jap. J. med. Sci., Sect. II 1, 61 [1925].

⁶⁾ C. E. Meyer u. W. C. Rose, J. biol. Chemistry 115, 721 [1936].

⁷⁾ F. Kōgl u. W. A. J. Borg, Hoppe-Seyler's Z. physiol. Chem. 269, 180 [1941].

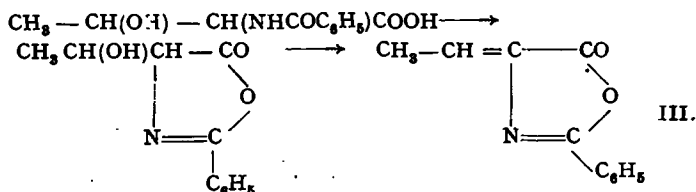
⁸⁾ J. biol. Chemistry 119, 103, 109 [1937]; E. Abderhalden u. K. Heyns, Ber. dtsch. chem. Ges. 67, 530 [1934].

Um die optisch reinen Komponenten zu erhalten, wird die Isomerenmischung der α -Amino- β -methoxy-buttersäuren entweder formyliert (mit Ameisensäure-Essigsäureanhydrid)⁹⁾ oder benzoylet. Da sowohl Formyl- als auch Benzoyl-d,l-O-methyl-threonin schwerer löslich ist als Formyl- bzw. Benzoyl-d,l-O-methyl-allothreonin, gelang es, die Threonin- von den Allothreonin-Derivaten zu trennen. Sowohl Formyl- bzw. Benzoyl-d,l-O-methyl-threonin als auch Formyl- und Benzoyl-d,l-O-methyl-allothreonin lassen sich jeweils über die Brucin-Salze in die optisch aktiven Verbindungen überführen. Diese werden dann durch Kochen mit HBr zu den entsprechenden freien Aminosäuren verseift und entmethyliert.

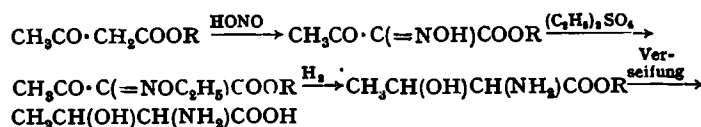
Tabelle 3¹⁰⁾.

	F.
d(—) = l(—) - Threonin $[\alpha]_D -28,3^0$	251—253 ⁰
l(+) = d(+) - Threonin $[\alpha]_D +28,4^0$	251—253 ⁰
d, l - Threonin	227—229 ⁰
d(+) - Allothreonin $[\alpha]_D +9,60$	268—272 ⁰
l(—) - Allothreonin $[\alpha]_D -9,11$	269—272 ⁰
d, l - Allothreonin	237—239 ⁰

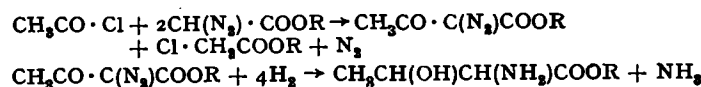
Um d,l-Allothreonin¹¹⁾ frei von d,l-Threonin zu gewinnen, lagert man CH_3OBr an Crotonsäure an und behandelt die entstehende α -Brom- β -methoxy-buttersäure weiter, wie bereits besprochen. N-Benzoyl-d,l-threonin und N-Benzoyl-d,l-allothreonin können in Pyridin-Lösung mittels Benzoylchlorid in Benzoylamino-crotonsäure-azlacton (III) übergeführt werden¹²⁾. Dieses geht durch Natriummethylat in N-Benzoyl-O-methyl-threonin über, woraus sich leicht Threonin gewinnen läßt. So kann man also Allothreonin in Threonin überführen.



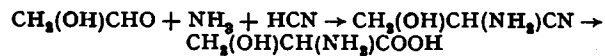
Ein zweites Verfahren von *Adkins u. Reeve*¹³⁾ geht von Acetessigester aus. Man führt ihn in Isonitrosoacetessigester über und diesen mit Diäthylsulfat in den O-Äthyl-äther des Isonitroso-acetessigesters. Anschließend katalytische Hydrierung mit *Raney-Nickel* und darauffolgende Verseifung führen zur α -Amino- β -oxy-buttersäure. d,l-Threonin und d,l-Allothreonin kann man entweder über die Formyl- bzw. Benzoyl-Verbindungen trennen oder auf Grund der Tatsache, daß d,l-Threonin in Wasser leichter löslich ist als d,l-Allothreonin.



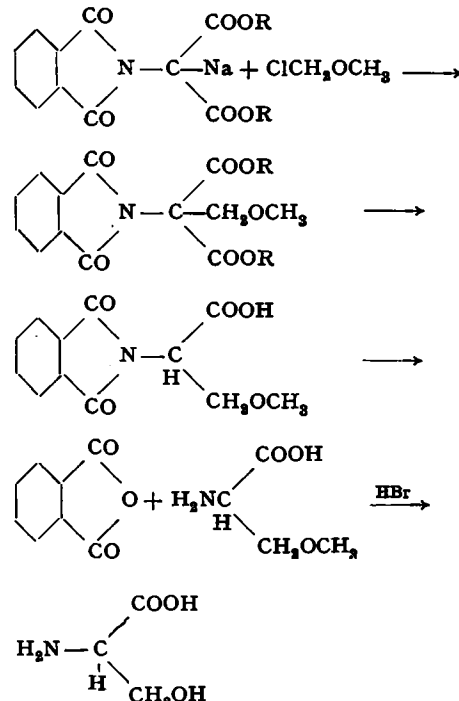
Ein drittes Verfahren führte *Birkofer*¹⁴⁾ durch katalytische Hydrierung des Acetyldiazoessigesters aus. Die Hydrierung muß in saurer Lösung durchgeführt werden, da anderenfalls durch das bei der Reaktion auftretende Ammoniak die Lösung alkalisch würde und unter diesen Bedingungen der α -Amino- β -oxy-buttersäureester zu Dimethylpyrazin-dicarbon-säureester kondensiert. Es entstand das erwartete Gemisch von d,l-Threonin und d,l-Allothreonin in 40%iger Ausbeute.



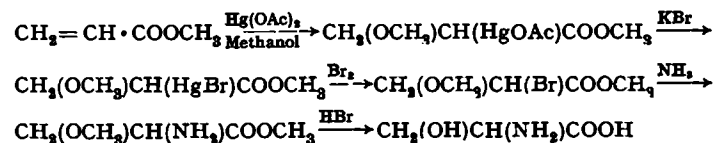
Die am längsten bekannte Oxyaminosäure ist das von *Cramer* im J. 1865 unter den Spaltungsprodukten des Seidenleims aufgefundenen *Serin*. Man war sich lange darüber im unklaren, ob eine α -Amino- β -oxy- oder eine α -Oxy- β -amino-propionsäure vorlag. Erst 1902 wurde diese Frage zugunsten von α -Amino- β -oxy-propionsäure durch *Synthese* geklärt¹⁵⁾. *Emil Fischer* ließ Ammoniak und Blausäure auf Glykolaldehyd einwirken und erhielt nach Verseifen des Oxynitrils ein *Serin*, das mit dem aus Seidenleim isolierten identisch war.



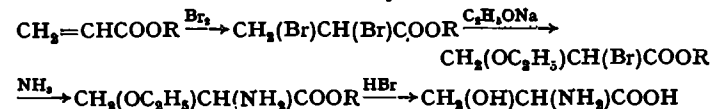
Nach dieser ersten Synthese des *Serins* wurden noch mehrere andere ausgearbeitet. *Leuchs u. Geiger*¹⁶⁾ gingen vom Äthoxyacetaldehyd aus. Diese Synthese unterscheidet sich nicht wesentlich von der erstgenannten. Das dabei entstehende β -Äthoxy-serin wurde durch HBr zu *Serin* entalkyliert. *Dunn, Redemann u. Smith*¹⁷⁾ oxydierten Äthylenglykol-monomethyl-äther mit Bichromat zu Äthoxyacetaldehyd und verarbeiteten diesen wie oben besprochen weiter. Nach einem anderen Prinzip stellte *S. K. Mitra*¹⁸⁾ 1930 *Serin* her. Er kondensierte Chlor-methyläther mit Natrium-phthalimidmalonester; das Produkt wurde dann verseift, decarboxyliert und hydrolytisch gespalten



1936 bedienten sich *R. L. Schilts u. H. E. Carter*¹⁹⁾ einer Methode, die bereits beim Threonin beschrieben wurde (S. 135). Es wird an die entsprechende ungesättigte Säure, in diesem Falle an Acrylsäureester, Quecksilberacetat in Methanol angelagert und nach dem üblichen Gang das *Serin* gewonnen.



*J. L. Wood u. V. du Vigneaud*²⁰⁾ stellten durch Anlagern von Brom an Acrylsäureester α,β -Dibrom-propionsäureester her, der durch Äthylat in α -Brom- β -äthoxy-propionsäureester übergeht. Mit Ammoniak wird die α -Amino-Verbindung gebildet und durch HBr zu *Serin* entäthyliert.



Als *E. Fischer* das *Serin* aus Proteinen isolierte, kannte man nur die Racemform. 1906 gelang ihm die Spaltung in optisch aktive Komponenten²¹⁾. Dazu wurde das Racem-gemisch in das p-Nitro-benzoyl-Derivat übergeführt und d,l-p-Nitro-benzoylserin über die Chinin-Salze getrennt.

Tabelle 4.

l(—)- <i>Serin</i> $[\alpha]_D -6,83^0$ (i. Wasser)	d(+)- <i>Serin</i> $[\alpha]_D +6,87^0$ (Wasser)
l(—)- <i>Serin</i> $[\alpha]_D +14,45^0$ (n-HCl)	d(+)- <i>Serin</i> $[\alpha]_D -14,32^0$ (n-HCl)

Zur Konfigurationsbestimmung wurde das natürliche, linksdrehende *Serin* mit HJ reduziert, wobei es in α -Amino-propionsäure übergeht, die mit dem natürlichen l-Alanin

⁹⁾ J. S. Fruton u. H. T. Clarke, J. biol. Chemistry 106, 667 [1934].

¹⁰⁾ H. D. West u. H. E. Carter, ebenda 122, 611 [1937/38].

¹¹⁾ H. D. West, G. S. Krummel u. H. E. Carter, ebenda 122, 605 [1937/38].

¹²⁾ H. E. Carter, P. Handler u. D. B. Melville, ebenda 129, 359 [1939].

¹³⁾ J. Amer. chem. Soc. 60, 1328 [1938].

¹⁴⁾ Ber. dtsch. chem. Ges. im Druck.

¹⁵⁾ E. Fischer u. H. Leuchs, Ber. dtsch. chem. Ges. 35, 8787 [1902].

¹⁶⁾ Ebenda 39, 2644 [1906].

¹⁷⁾ J. biol. Chemistry 104, 511 [1934].

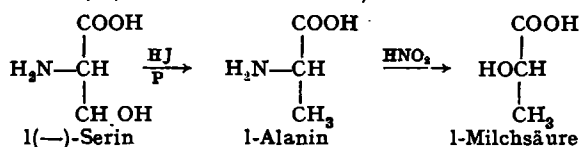
¹⁸⁾ J. Indian chem. Soc. 7, 799 [1930].

¹⁹⁾ J. biol. Chemistry 116, 793 [1936].

²⁰⁾ Ebenda 124, 413 [1940].

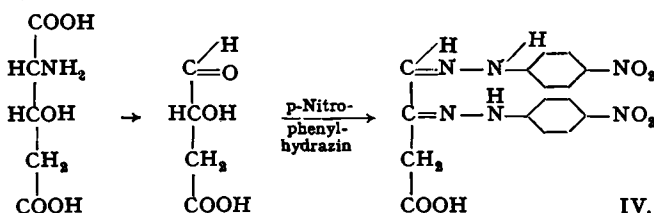
²¹⁾ E. Fischer u. W. A. Jacobs, Ber. dtsch. chem. Ges. 39, 2942 [1906].

identisch ist. Bei der Desaminierung wird die α -Amino-propion-säure in l-Milchsäure verwandelt. Hiermit ist bewiesen, daß in der Natur l(—)-Serin vorkommt²³⁻²⁴).

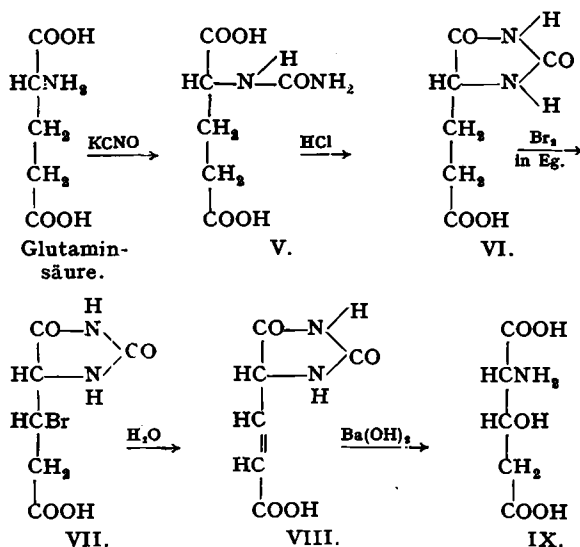


Wie sich vom Alanin das Serin, so leitet sich von der Glutaminsäure die Oxyglutaminsäure ab. Sie wurde i. J. 1918 von H. D. Dakin²⁵ im Verlauf der Ausarbeitung seines Butylalkohol-Extraktionsverfahrens aus Casein isoliert. Kurze Zeit darauf fand Dakin²⁶ auch im Glutenin und Gliadin die Oxyglutaminsäure. Sie erwies sich als optisch aktiv u. zw. ganz schwach rechtsdrehend ($[\alpha]_D \sim +0,8^\circ$). Die Rechtsdrehung der wäßrigen Lösung wurde durch HCl-Zusatz wesentlich erhöht ($[\alpha]_D = +16,3^\circ$, in 20%iger HCl)²⁶).

Zur Konstitutionsaufklärung wurde die Oxyglutaminsäure mit HJ und rotem P reduziert, wobei sie in Glutaminsäure überging. Die Oxydation mit Chloramin-T führte zu Äpfelsäurehalbdehyd, der als p-Nitro-phenylosazon (IV) identifiziert wurde.

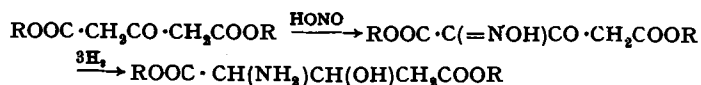


Nach der Isolierung schritt Dakin²⁶ zur Synthese. Er ging von der Glutaminsäure aus, die mit Kaliumcyanat α -Uramino-glutarsäure (V) bildet. Diese verwandelte er mit HCl in Hydantoinpropionsäure (VI). Durch Bromierung in Eisessig entstand Hydantoin- β -brom-propionsäure (VII), die durch mehrstündiges Kochen mit Wasser in Hydantoinacrylsäure (VIII) überging. Beim Kochen mit Baryt entstand Oxyglutaminsäure (IX).



Nach Dakin zeigt die synthetische Oxyglutaminsäure dieselben Eigenschaften wie die aus Casein isolierte, mit Ausnahme der optischen Aktivität.

Bevor Dakin den eben geschilderten Weg zur Darstellung der Oxyglutaminsäure beschritt, versuchte er, sie durch Reduktion von Isonitroso-acetondicarbonsäureester mit Na-Amalgam zu erhalten, jedoch ohne Erfolg. Erst C. R. Harington u. S. S. Randall²⁷, die Isonitroso-acetondicarbonsäureester mit Pd-Kohle und HCl hydrierten, gelang die Synthese auf diesem Wege.



²³) P. Karrer, Helv. chim. Acta 6, 957 [1923].
²⁴) P. Karrer u. H. Schneider, ebenda 13, 1281 [1930].
²⁵) A. Wohl u. R. Schellenberg, Ber. dtsch. chem. Ges. 55, 1404 [1922].
²⁶) Biochemic. J. 12, 290 [1918].
²⁷) Ebenda 13, 898 [1919].
²⁸) Ebenda 35, 1917 [1981].

Die synthetische Oxyglutaminsäure kristallisiert aus einer konzentrierten wäßrigen Lösung in gut ausgebildeten Prismen mit 3 Mol Kristallwasser (F. 75°); nach Wasserabgabe verfestigt sie sich wieder und schmilzt unter Zersetzung bei 185°. Die wasserfreie Oxyglutaminsäure schmilzt scharf unter Zersetzung bei 198°. Hier unterscheidet sich die synthetische Säure stark von der von Dakin aus Casein isolierten. Diese, die nicht einwandfrei kristallisiert erhalten werden konnte, verliert bei 105° allmählich Wasser und geht in Oxypyrrolidoncarbonsäure über. Weitere Unterschiede sind folgende: Dakins Säure gibt in überschüssiger NaOH gelöst mit Diazobenzolsulfosaurem Natrium eine Rotfärbung, die sich beim Erwärmen vertieft; mit β -Naphthol in konz. H₂SO₄ tritt eine grüne Fluoreszenz auf. Haringtons Säure zeigt mit Diazobenzolsulfosaurem Na keine Farbreaktion und mit β -Naphthol nur eine sehr schwache Grünfluoreszenz.

Da Oxyglutaminsäure 2 asymmetrische C-Atome besitzt, gibt es 4 optisch aktive Formen. Es wäre möglich, daß die Diskrepanzen zwischen der synthetischen und der natürlichen Säure darauf zurückzuführen sind, daß Körper mit verschiedener Konfiguration verglichen worden sind.

Eine Trennung der l- β -Oxy-glutaminsäure kann nur über gut kristallisierende Derivate erfolgen. Abderhalden²⁹ fand in dem Carbobenzoxo-Derivat eine leicht kristallisierende Verbindung. Leider waren aber die Versuche zur Trennung in optisch aktive Komponenten ohne Erfolg.

Bei der Nacharbeitung der Dakinschen Angaben über die Isolierung der Oxyglutaminsäure aus Casein ergaben sich Widersprüche. J. M. Gulland u. C. J. O. R. Morris³⁰ konnten im Gegensatz zu Dakin, der im Casein etwa 10% fand, nur Spuren der gesuchten Säure fassen. Ihre Identität wurde durch Oxydation mit Chloramin-T zu Äpfelsäurehalbdehyd bestätigt, welcher dann in das p-Nitro-phenylosazon übergeführt wurde. Auch Abderhalden³⁰ erhielt nur sehr kleine Ausbeuten. Die Eigenschaften, soweit man sie wegen der kleinen Mengen bestimmen konnte, deckten sich mit den von Dakin angegebenen.

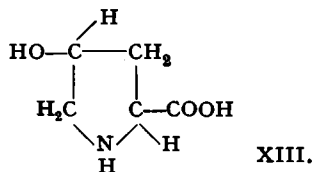
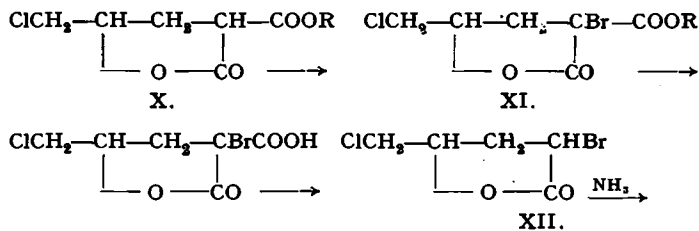
Der Grund für die sich widersprechenden Angaben über das Vorkommen der Oxyglutaminsäure ist nach Knoop³¹ darin zu suchen, daß unter den normalen Hydrolysenbedingungen für Proteine aus der Oxyglutaminsäure Ammoniak unter Bildung der Ketosäure abgespalten wird. Es bleibt der weiteren Forschung vorbehalten, die die Oxyglutaminsäure betreffenden Fragen zu klären.

Eine Oxyaminosäure von noch ungeklärter Konstitution ist das Oxylysin. Es wurde 1925 von Schryver³² in der Lysin-Fraktion von Fischleim aufgefunden. Vor 3 Jahren isolierten A. J. P. Martin u. R. L. M. Synge³³ das Oxylysin aus Gelatinehydrolysat. Die Stellung der Oxy-Gruppe ist noch unsicher. Schryver nahm an, daß es sich um eine α,ϵ -Diamino- β -oxy-n-capronsäure handelt. Van Slyke u. a.³⁴ zeigten, daß aus Oxylysin durch Einwirkung von Perjodsäure 1 Mol Formaldehyd und 1 Mol Ammoniak abgespalten werden. Deshalb wird vermutet, daß Oxylysin entweder δ -Oxy- α,ϵ -diamino-n-capronsäure oder ϵ -Oxy- α,δ -diamino-n-capronsäure ist.

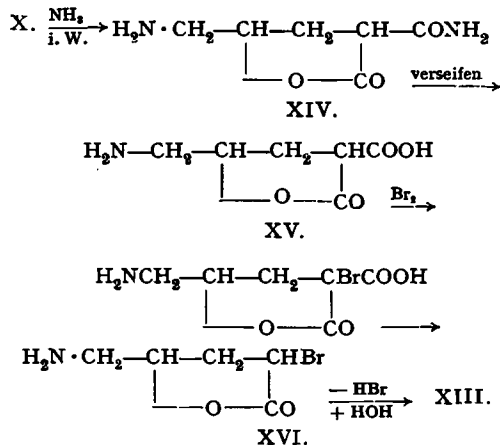
Die bis jetzt besprochenen Oxyaminosäuren hatten die Konstitution von α -Amino- β -oxy-säuren. Zu einem anderen Typ gehört die i. J. 1902 von Emil Fischer³⁵ in den Hydrolysenprodukten des Leims aufgefundene Oxypyrrolidin- α -carbonsäure, das Oxyprolin. Es wurde kurze Zeit darauf auch aus Edestin³⁶, Oxyhämoglobin³⁷ und Casein³⁸ isoliert. Die stark linksdrehende Verbindung ($[\alpha]_D = -8,1^\circ$) wird durch HJ und roten P zu α -Pyrrolidincarbonsäure, dem Prolin, reduziert. Durch Synthese konnte bewiesen werden, daß das aus Protein isolierte Oxyprolin eine γ -Oxy-pyrrolidin- α -carbonsäure ist³⁹). Leuchs synthetisierte Oxyprolin wie folgt^{40, 41}): Epichlorhydrin und Na-Malonester wurden nach Traube⁴¹) in δ -Chlor- γ -valero-

²⁹) E. Abderhalden u. H. Murke, Hoppe-Seyler's Z. physiol. Chem. 247, 227 [1937].
³⁰) J. chem. Soc. [London] 1934, 1644.
³¹) E. Abderhalden u. G. Pitschak, Hoppe-Seyler's Z. physiol. Chem. 265, 31 [1940].
³²) F. Knoop u. Mitarbeiter, ebenda 239, 30 [1936].
³³) S. B. Schryver, H. W. Busion u. O. H. Mukherjee, Proc. Roy. Soc. [London], Ser. B 98, 58 (1925).
³⁴) Biochemic. J. 35, 294 [1941].
³⁵) D. D. van Slyke u. Mitarb., J. biol. Chemistry 133, 287 [1940].
³⁶) Ber. dtsch. chem. Ges. 35, 2660 [1902].
³⁷) E. Abderhalden, Hoppe-Seyler's Z. physiol. Chem. 37, 499 [1903].
³⁸) E. Abderhalden, ebenda 37, 484 [1903].
³⁹) E. Fischer, ebenda 39, 156 [1903].
⁴⁰) H. Leuchs u. J. F. Brewster, Ber. dtsch. chem. Ges. 46, 986 [1913].
⁴¹) H. Leuchs, M. Gina u. J. F. Brewster, ebenda 46, 1960 [1912].
⁴²) W. Traube u. E. Lehmann, ebenda 32, 720 [1899]; 34, 1971 [1901].

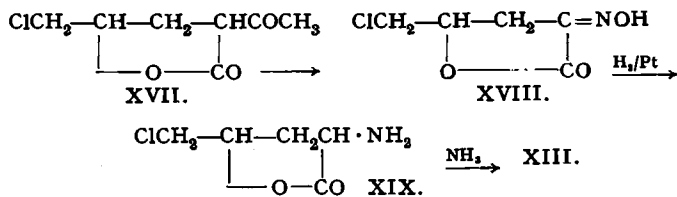
lacton- α -carbonsäureester (X) übergeführt. Dieser wurde zum α -Brom-ester (XI) bromiert, verseift und zum δ -Chlor- α -brom- γ -valerolacton (XII) decarboxyliert. Durch Umsatz mit wäßrigem Ammoniak entstand γ -Oxyprolin (XIII).



An Stelle des δ -Chlor- α -brom-valerolactons (XII) kann zur Umsetzung mit Ammoniak auch α,δ -Dichlor-valerolacton verwendet werden⁴²⁾. Bei der Einwirkung von wäßrigem Ammoniak auf Chlor-valerolacton-carbonsäureester (X) entsteht δ -Amino- γ -valerolacton- α -carbonsäureamid (XIV), was sich zu δ -Amino- γ -valerolactoncarbonsäure (XV) verseifen läßt. Beim Bromieren dieses Körpers entsteht eine Brom-Verbindung, die unter CO_2 -Abspaltung in α -Brom- δ -amino- γ -valerolacton (XVI) übergeht. Beim Erwärmen in wäßriger Lösung spaltet sich intramolekular HBr ab unter Bildung von Oxyprolin (b)⁴³⁾.

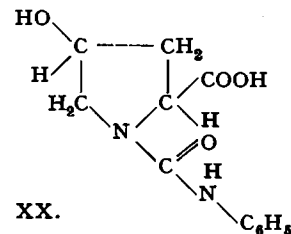


H. Mollwain u. G. M. Richardson⁴⁴⁾ führten folgende Synthese für Oxyprolin durch: α -Acetyl- δ -chlor- γ -valerolacton (XVII) wird mit H_2SO_4 und Nitrosylschwefelsäure in α -Oximino- δ -chlor- γ -valerolacton (XVIII) verwandelt, dieses durch katalytische Reduktion mit Pt/ H_2 in α -Amino- δ -chlor- γ -valerolacton (XIX) übergeführt und dann durch Einwirkung von Ammoniak bei 30° Oxyprolin gebildet.

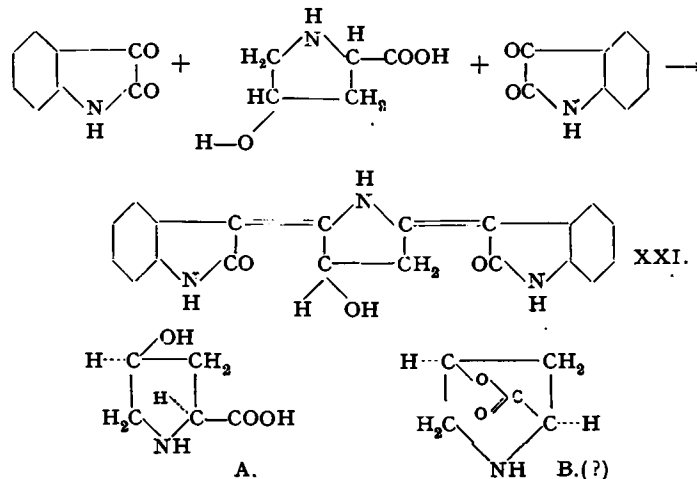


Bei den Synthesen entstehen, da auch Oxyprolin 2 asymmetrische C-Atome besitzt, 4 optisch aktive Formen. Es gelingt, die beiden Isomerenpaare über die Kupfer-Salze zu trennen. Das Cu-Salz des d,l-Oxyprolins (a) ist schwerer, das des d,l-Oxyprolins (b) leichter löslich^{45, 46)}. Sowohl d,l-Oxyprolin (a) als auch d,l-Oxyprolin (b) wurden zwecks Spaltung in die d- und l-Form in die d,l-Phenylisocyanat-Derivate (XX) übergeführt und von diesen die Chinin-Salze gebildet. Diese ließen sich jeweils in die d- und l-Salze trennen⁴⁷⁾.

Nachdem man die 4 optisch aktiven Oxyproline in Händen hatte, konnte durch Vergleich mit aus Proteinen isoliertem



Oxyprolin festgestellt werden, daß dieses l(—)-Oxyprolin (a) ist. H. Wieland⁴⁷⁾ isolierte aus dem Knollenblätterpilz „Amanita phalloides“ ein „Phalloidin“ genanntes Peptid in kristallisierter Form. Nach der Säurehydrolyse wurden l-Alanin, l-Cystin, l-Oxytryptophan und l-Oxyprolin (b) isoliert ($[\alpha]_D = -57,4^\circ$). Sowohl l(—)-Oxyprolin (a) als auch l(—)-Oxyprolin(b) geben die Ninhydrin-Reaktion. Im Gegensatz hierzu verursacht nur l(—)-Oxyprolin (a) mit Isatin eine intensive Blaufärbung. Nach Untersuchungen von W. Graßmann u. K. v. Arnim⁴⁸⁾ ist der blaue Farbstoff (XXI) das Kondensationsprodukt zweier Molekeln Isatin mit einer Molekel Oxyprolin, wobei die Carboxyl-Gruppe abgespalten wird. Wieland hält es für sehr wahrscheinlich daß l-Oxyprolin (b) die Farbreaktion deshalb nicht zeigt, weil (vielleicht durch die Einwirkung des Eisessigs) die Carboxyl-Gruppe unter Lacton-Bildung (B) festgelegt wird und somit keine Decarboxylierung eintreten kann. Wenn dies zutrifft, so wäre die Konfiguration der Oxyprolin(b)-Reihe im Sinne der Formel A erwiesen. Das l(—)-Oxyprolin(b) aus Phalloidin wäre l-cis-Oxyprolin.



Analytisches.

Die quantitative Threonin-Bestimmung beruht darauf, daß die Aminosäure mit Perjodsäure⁴⁹⁾ oder Bleitetraacetat⁵⁰⁾ oxydativ gespalten wird, und der entstehende Acetaldehyd auf Grund der Farbreaktion mit p-Oxy-diphenyl in konz. Schwefelsäure colorimetrisch bestimmt werden kann (permanganat-rotviolette Farbe). Serin wird mit Perjodsäure quantitativ in Formaldehyd, Ammoniak und Glyoxylsäure gespalten. Der auftretende Formaldehyd kann durch Umsatz mit Dimedon gravimetrisch bestimmt werden⁵¹⁾. Nach der von S. Rapoport⁵²⁾ angegebenen Methode wird Serin zu Glycerinsäure desaminiert, diese nach E. Eegriwe⁵³⁾ mit Naphthoresorcin in konz. Schwefelsäure umgesetzt und die auftretende Blaufärbung colorimetriert.

Durch Oxydation von Oxyglutaminsäure mit Chloramin-T erhält man Äpfelsäurehalbdehyd, der sich als p-Nitro-phenylosazon quantitativ erfassen läßt⁵⁴⁾.

Um Oxyprolin quantitativ zu bestimmen, wird das Protein-Hydrolysat mit Ammonium-Reineckat $\text{NH}_4[\text{Cr}(\text{SCN})_4(\text{NH}_3)_2] \cdot \text{H}_2\text{O}$ ⁵⁵⁾ versetzt. Hierbei fallen die Reineckate von Prolin und Oxyprolin aus. Nach Zerlegung der Reineckate in die freien Aminosäuren kann man Oxyprolin wegen seiner Unlöslichkeit in Alkohol von Prolin trennen.

⁴²⁾ H. Leuchs u. K. Bormann, ebenda 52, 2086 [1919].

⁴³⁾ W. Traube, R. Johow u. W. Tepohl, ebenda 56, 1861 [1923].

⁴⁴⁾ Biochemic. J. 33, 44 [1939].

⁴⁵⁾ H. Leuchs u. H. Felsner, Ber. dtsch. chem. Ges. 41, 1726 [1908].

⁴⁶⁾ H. Leuchs, ebenda 38, 1937 [1905].

⁴⁷⁾ H. Wieland u. B. Witkop, Liebigs Ann. Chem. 543, 171 [1940].

⁴⁸⁾ Ebenda 509, 288 [1934]; 519, 192 [1935].

⁴⁹⁾ B. H. Nicolet u. L. A. Shinn, J. Amer. chem. Soc. 61, 1615 [1939].

⁵⁰⁾ R. J. Bloch u. D. Bolling, J. biol. Chemistry 130, 865 [1939].

⁵¹⁾ Biochem. Z. 289, 406 [1937].

⁵²⁾ Z. analyt. Chem. 95, 823 [1933].

⁵³⁾ J. Kapfhammer u. R. Ech, Hoppe-Seyler's Z. physiol. Chem. 170, 294 [1927].

Nach einem anderen Verfahren⁶⁴⁾ wird das Eiweißhydrolysat mit Hypochlorit behandelt. Das durch Wasserdampfdestillation aus Oxyprolin entstandene Pyrrol⁶⁵⁾ bildet mit p-Dimethylamino-benzaldehyd oder Isatin einen blauen Farbstoff, der colorimetriert wird.

Biologische Funktionen.

Alle Oxyaminosäuren außer Threonin wurden bei der Aufarbeitung von Protein-Hydrolysaten ohne vorherige Kenntnis der jeweiligen physiologischen Eigenschaften entdeckt. Im Verlaufe der letzten 15 Jahre hat man erkannt, daß die Oxyaminosäuren beim Aufbau der Phosphoproteide eine Rolle spielen; bei diesen ist nämlich die Phosphorsäure an Oxyaminosäuren gebunden.

Aus den Abbauprodukten des im Eidotter enthaltenen Phosphoproteids Vitellin, ließ sich Serinphosphorsäure isolieren. Man stellte fest, daß der gesamte Vitellin-Phosphor an Serin gebunden vorliegt^{66,68)}.

Läßt man auf das Phosphoprotein Casein einige Tage Schweinepankreas einwirken, so erhält man u. a. ein phosphorhaltiges Peptid, das Phosphopepton I⁶⁹⁾. Es setzt sich aus 10—11 Aminosäure-Molekeln und 3 Molekeln Phosphorsäure zusammen. Die das Phosphopepton I aufbauenden Aminosäuren sind Asparaginsäure, Glutaminsäure, Isoleucin und Serin. Läßt man auf das Phosphopepton I einige Wochen lang Schweinepankreas einwirken, so wird nur Asparaginsäure abgespalten, und es entsteht ein Heptapeptid, Phosphopepton II, welches sich aus Serin, Glutaminsäure, Isoleucin und 3 Molekeln Phosphorsäure aufbaut; ein weiterer enzymatischer Abbau tritt unter diesen Bedingungen nicht ein. Alle drei Phosphorsäure-Molekeln sind auch hier wie im Vitellin mit Serin verestert.

Unterzieht man Phosphopepton I einer enzymatischen Dephosphorylierung mit Nierenphosphatase und läßt auf das nun phosphorsäure-frei gewordene Pepton Schweinepankreas einwirken, so wird es in kürzester Zeit in die einzelnen Aminosäuren gespalten. Die Bildung der Phosphopeptone aus Casein durch Schweinepankreas beruht offenbar auf der Blockierung der Pankreasenzyme durch die Phosphorsäure-Gruppen.

Die Untersuchung der Phosphopeptone hat gezeigt, daß im Casein ein großer Teil des Phosphors an Serin gebunden ist. Nach Befunden von S. Rapoport⁶⁰⁾ ist etwa ein Drittel der Phosphorsäure mit anderen Oxyaminosäuren verestert.

In jüngster Zeit wurde Serin auch als stickstoffhaltiger Bestandteil in den Glycerinphosphatiden des Menschengehirns nachgewiesen^{61,62)}. Wahrscheinlich ist ein Teil des Colamins im Kephalin durch Serin ersetzt. Es ist möglich, daß ein genetischer Zusammenhang der stickstoffhaltigen Komponenten der Glycerinphosphatide besteht. Durch Decarboxylierung des Serins kann Colamin gebildet werden. Es gibt ja hinreichende Beispiele, bei denen auf biologischem Wege Amine aus Aminosäuren entstehen^{61,63)}. Es sei nur an die Bildung von Tyramin aus Tyrosin und von Histamin aus Histidin erinnert.

Der Abbau der Oxyaminosäuren im tierischen Organismus führt, wie Knoop⁶⁴⁾ in Modellversuchen an ω -phenyl-substituierten Oxyaminosäuren feststellte, durch β -Oxydation zu stickstoff-freien Säuren, die um 2 C-Atome ärmer sind als die Ausgangssäuren. Während einige Autoren⁶⁵⁾ fanden, daß d-Oxyaminosäuren durch d-Aminosäureoxydase quantitativ desaminiert werden, konnten andere Autoren⁶⁶⁾ nur geringe Desaminierung beobachten.

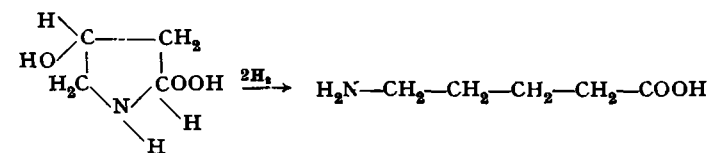
Vom Serin ist noch bemerkenswert, daß es ebenso wie Valin, Sarkosin u. a. den Sauerstoff-Verbrauch von überlebendem Leber- und Nierengewebe um 25—79% steigert⁶⁷⁾. Diese Atmungssteigerung kann durch Spuren von Kaliumcyanid wieder gehemmt werden⁶⁸⁾.

Das Oxyprolin soll vom phlorrhidzindiabetischen Hund in Zucker verwandelt werden können. Verfüttert man z. B. 15 g

l(—)-Oxyprolin(a) so treten im Harn etwa 10,5 g Extrazucker auf⁶⁷⁾.

Es hat den Anschein, daß in Proteinen Oxyprolin mit anderen Aminosäuren sehr fest verankert ist^{68, 69)}. Man isolierte nämlich bei Abbauprodukten von Proteinen in vitro und bei Aufarbeitung von Darminhalt wiederholt schwer aufspaltbare Produkte, die Oxyprolin enthielten. Bei Verdauungsversuchen mit Pepsin und Trypsin zeigte sich, daß z. B. Glycyl-l-oxyprolin und d,l-Leucyl-l-oxyprolin von diesen beiden Fermenten nicht angegriffen wurden. Selbst n-HCl spaltet diese Dipeptide nur in geringem Maße. Von n-NaOH wird nur Glycyl-l-oxyprolin weitgehend abgebaut, während auch hier d,l-Leucyl-l-oxyprolin der Einwirkung standhält.

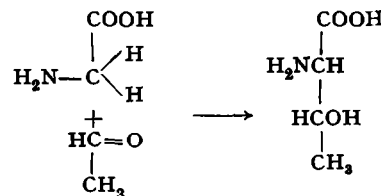
Von Fäulnisbakterien wird Oxyprolin unter Ringaufspaltung zu δ -Amino-valeriansäure hydriert⁷⁰⁾.



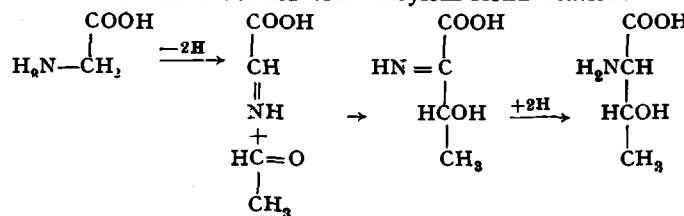
Über die Wuchsstoffwirkungen des Threonins wurde schon zu Beginn dieser Ausführungen gesprochen. Nach Zufuhr von d,l-Threonin und d,l-Allothreonin wurde bei der hungernden Ratte der Glykogen-Gehalt der Leber erhöht⁷¹⁾. Die durch Zufuhr von Buttersäure verursachte Ketonurie nahm sehr stark ab. Diese Befunde sind besonders deshalb interessant, weil hier auch das nicht in der Natur vorkommende d(+)-Threonin und die beiden Allothreonine offenbar eine physiologische Wirkung ausüben, während nur das natürliche l(—)-Threonin wachstumsfördernd wirkt. Sein Fehlen in der Nahrung führte beim Menschen⁷²⁾ und bei Säugetieren (Ratte, Hund)^{73, 74)} zu einer negativen Stickstoff-Bilanz, die nach erneuter Zufuhr den normalen Wert wieder erreichte.

Das Threonin gehört auch zu den lebenswichtigen Wuchsstoffen vieler Mikroorganismen. Der pathogene Pilz „Trichophyton interdigitale“⁷⁵⁾ und auch eine Reihe von Milchsäurebakterien vermögen auf synthetischem Nährboden nur bei Threonin-Anwesenheit zu wachsen). Fehlt diese Aminosäure, so wird außer dem Wachstum auch die Milchsäure-Bildung gehemmt⁷⁶⁾. Die bei der Hefe ausschließlich gärungsbeschleunigend wirkenden Stoffe wurden unter dem Namen „Faktor Z“ zusammengefaßt. Nach Untersuchungen von Kögl⁷⁷⁾ ist erwiesen, daß Threonin einen Hauptbestandteil dieses gärungsbeschleunigenden Faktors darstellt. Einen gleichen, wenn auch schwächeren Effekt zeigt das Glykokoll. Da die Threonin-Wirkung sofort, die des Glykokolls aber erst nach einiger Zeit auftritt, ist daran zu denken, daß in der Hefezelle Threonin aus Glykokoll und Acetaldehyd synthetisiert wird. Die Biosynthese des Threonins könnte nach zwei verschiedenen Mechanismen verlaufen:

1. Nach Art einer Aldol-Kondensation durch Einwirkung einer „Aldolase“:



2. Nach dem Vorbild einer Acyloin-Kondensation:



Eingeg. am 1. April 1944. [A. 31.]

⁶⁴⁾ K. Lang, ebenda 219, 148 [1933].

⁶⁵⁾ E. Waldschmidt-Leitz u. S. Ahabori, ebenda 224, 187 [1934].

⁶⁶⁾ Swigel u. Th. Posternak, C. R. hebdom. Séances Acad. Sci. 186, 615 [1927]; 187, 313 [1928].

⁶⁷⁾ F. A. Lipmann u. P. A. Levene, J. biol. Chemistry 98, 109 [1932].

⁶⁸⁾ P. A. Levene u. A. Schormüller, ebenda 105, 547 [1934].

⁶⁹⁾ Th. Posternak u. H. Pallasek, Helv. chim. Acta 24, 1190 [1941].

⁷⁰⁾ Biochem. Z. 289, 420 [1937].

⁷¹⁾ Vgl. dazu E. Werle, „Bildung u. Abbau biogener Amine“, diese Ztschr. 56, 141 [1943].

⁷²⁾ K. Schwirith, Hoppe-Seyler's Z. physiol. Chem. 277, 87 [1942]; J. Folch u. H. A. Schneider, J. biol. Chemistry 137, 51 [1941]; E. Chargaff, M. Ziff u. D. Rittenberg, ebenda 138, 489 [1941]; J. Folch, ebenda 139, 978 [1941]; E. Chargaff u. M. Ziff, ebenda 140, 927 [1941].

⁷³⁾ J. R. Klein u. P. Handler, ebenda 139, 103 [1941]; H. A. Krebs, Hoppe-Seyler's Z. physiol. Chem. 217, 204 [1933].

⁷⁴⁾ K. Felix u. K. Zorn, ebenda 258, 16 [1939].

⁷⁵⁾ B. Kisch, Biochem. Z. 244, 451 [1931].

⁷⁶⁾ B. Kisch, ebenda 263, 75 [1933].

⁷⁷⁾ J. Kapfhammer u. C. Biscoff, Hoppe-Seyler's Z. physiol. Chem. 173, 251 [1927].

⁷⁸⁾ A. Fodor u. Ch. Epstein, ebenda 171, 222 [1927]; Biochem. Z. 210, 24 [1929].

⁷⁹⁾ E. Abderhalden u. W. Köppl, Fermentforsch. 9, 489 [1928].

⁸⁰⁾ W. Keil u. A. Günther, Hoppe-Seyler's Z. physiol. Chem. 221, 10 [1933].

⁸¹⁾ W. Knowlton-Hall, A. G. Calen u. J. R. Doly, Amer. J. Physiol. 129, P. 372 [1940].

⁸²⁾ W. C. Rose, W. J. Haines, J. E. Johnson u. D. T. Warner, J. biol. Chemistry 148, 457 [1943].

⁸³⁾ E. W. Burroughs, H. S. Burroughs u. H. H. Mitchell, J. Nutrit. 19, 363, P. 365 [1940].

⁸⁴⁾ P. A. Wolf u. R. C. Coley, Amer. J. Physiol. 127, 589 [1939].

⁸⁵⁾ W. A. Mosher, D. H. Saunders, L. B. Kingery u. R. J. Williams, Plant Physiol. 11, 795.

⁸⁶⁾ H. G. Wood, Ch. Geiger u. C. H. Werhman, Iowa State Coll. J. Sci. 14, 367 [1940].

⁸⁷⁾ F. Kögl u. W. A. J. Borg, Hoppe-Seyler's Z. physiol. Chem. 269, 97 [1941].