

# ANGEWANDTE CHEMIE

HERAUSGEGEBEN VON DER GESELLSCHAFT DEUTSCHER CHEMIKER  
71. Jahrgang · Nr. 13 · Seite 417–440 · 7. Juli 1959  
FORTSETZUNG DER ZEITSCHRIFT »DIE CHEMIE«

## Aus der Chemie der Polypeptide Peptid-Synthesen IV\*)

Von Prof. Dr. THEODOR WIELAND

Institut für organische Chemie der Universität Frankfurt a. M.

Erweiterte Fassung eines Vortrages auf der GDCh-Vortragstagung anlässlich der 100. Versammlung der Gesellschaft Deutscher Naturforscher und Ärzte in Wiesbaden am 29. September 1958

Trennung und Struktur-Aufklärung von Peptiden sind die wichtigsten Hilfsmittel bei der Konstitutions-Ermittlung von Proteinen. Außerdem sind viele Wirkstoffe (Hormone, Antibiotika, Gifte) Peptide. Beides zusammen erklärt das zunehmende Interesse an der Chemie der Peptide. Der neueste Stand der Forschung auf diesem Gebiet wird an mehreren Beispielen dargestellt und schließlich ein Überblick über Fortschritte der Peptid-Synthese in den letzten zwei Jahren gegeben.

### Einleitung

Vor etwa einem halben Jahrhundert, zu Anfang des Jahres 1906, hat *Emil Fischer* vor der Deutschen Chemischen Gesellschaft in Berlin einen in weitesten Kreisen stark beachteten Vortrag über seine „Untersuchungen über Aminosäuren, Polypeptide und Proteine“<sup>1)</sup> gehalten. Seine Voraussage, daß die „organische Chemie, deren Wiege bei den Proteinen gestanden hat, sich ihnen schließlich wieder zuwenden“ werde, hat sich erst ziemlich viel später erfüllt. Trotz der hervorragenden Ergebnisse, die zu jener Zeit im Berliner Laboratorium, aber auch in Heidelberg durch *Th. Curtius*, auf analytischem und präparativem Gebiet erzielt wurden, war der chemischen Bearbeitung wenig später eine gewisse Grenze gesetzt. Diese konnte erst in den 30er Jahren durch die Auffindung neuer Methoden zur Peptidsynthese überschritten werden. Wir alle haben es dann miterlebt, wie sich durch die Erfindung der Papierchromatographie vor 15 Jahren durch *Gordon, Martin und Syngle*<sup>2)</sup>, zu der sich wenig später die Papierelektrophorese<sup>3)</sup> gesellte, sowie durch die Einführung der Gegenstromverteilung<sup>4)</sup> und der Ionen-Austauscher-Harze<sup>5)</sup> eine wahre Renaissance der Proteinchemie anbahnte. Ihr stürmisches Verlauf versetzt mich heute in die Lage, eine Skizze aus der Chemie der Polypeptide zu entwerfen, die – um nochmals die Worte *E. Fischers* zu gebrauchen – in dem damals noch so dunkeln Gebiet heute schon besser die Umrisse des chemischen Kulturlandes erkennen läßt, „aus dem die Biologie einen großen Teil der Hilfsmittel beziehen kann, deren sie zur Lösung ihrer chemischen Aufgaben bedarf“.

Aus der fast unermeßlichen Fülle des Stoffes sollen nur einige Beispiele gewählt werden, die zeigen, bei welchen Gelegenheiten sich der organische Chemiker mit Peptiden

zu befassen hat. Peptide sind bekanntlich amid-artige Kondensationsprodukte aus gleichen oder verschiedenen Aminosäuren, deren Zahl von 2 bis in die Tausende gehen kann. Es empfiehlt sich hier, eine allerdings recht willkürliche Einteilung vorzunehmen und Verbindungen

aus 2–10 Aminosäuren als Oligopeptide,  
solche aus 10–100 Aminosäuren als Polypeptide  
und darüber hinausgehende als Makropeptide  
zu bezeichnen. Zu letzteren gehören vor allem die Eiweißstoffe.

Da man die Eiweißstoffe durch partielle Hydrolyse, also Spaltung eines Teils der Peptidbindungen, in zahlreiche Peptide zerlegen kann, bilden Oligo- und Polypeptide außerordentlich wichtige Hilfsmittel bei der Strukturaufklärung der Proteine. Ein Teil der modernen Proteinchemie besteht daher in einer Untersuchung der Peptide, worüber im 1. Teil berichtet wird.

Oligo- und Polypeptide werden, wenn auch selten in höherer Konzentration, in der Natur angetroffen. Viele von ihnen entfalten starke biologische Wirkungen als Hormone oder Giftstoffe für Mikroorganismen oder höhere Lebewesen. Ein Teil der Naturstoffchemie ist also ebenfalls eine Chemie der Peptide, die im 2. Kapitel behandelt wird.

Diese beiden wichtigen Rollen der Peptide machen es verständlich, daß sich auch der synthetisch arbeitende Organiker mit großer Intensität diesem Zweig der Chemie widmet. Deshalb wird im 3. Teil ein Überblick über die neuere Chemie der Peptidsynthesen gegeben.

### I. Peptide als Hilfsmittel der Strukturaufklärung von Proteinen

Unter den Proteinen, deren Bedeutung auch durch die immer mehr in den Vordergrund tretenden Nucleinsäuren nicht geschmälert wird, sind die Enzyme aus zweierlei Gründen am interessantesten: Erstens sind viele von ihnen heute in kristallisierter und, wie es scheint, einheitlicher Gestalt zugänglich geworden, so daß die chemischen Voraussetzungen für die Aufklärung ihrer Konstitution erfüllt sind. Zweitens darf man sich von der Entrüstung

\*) Zugleich 21. Mitteilung in der Reihe „Über Peptidsynthesen“. 20. Mitt.: *Th. Wieland u. B. Heinke*, Liebigs Ann. Chem. 615, 184 [1958]. Zusammenfassung Peptid-Synthesen III: *Th. Wieland u. B. Heinke*, diese Ztschr. 69, 362 [1957].

<sup>1)</sup> *E. Fischer*, Ber. dtsc. chem. Ges. 39, 530 [1906].

<sup>2)</sup> *A. H. Gordon, A. J. P. Martin u. R. L. M. Syngle*, Biochem. J. 37, Proc. XIII [1943]; *R. Consden, A. H. Gordon u. A. J. P. Martin*, ebenda 38, 224 [1944].

<sup>3)</sup> *Th. Wieland u. E. Fischer*, Naturwissenschaften 35, 29 [1948]; diese Ztschr. 60, 313 [1948].

<sup>4)</sup> *L. C. Craig*, J. biol. Chemistry 155, 519 [1944].

<sup>5)</sup> *Z. B. S. Moore u. W. H. Stein*, J. biol. Chemistry 192, 663 [1951].

ihres Baus die Antwort auf eine der wichtigsten biologischen Fragen erhoffen, nämlich der nach den Mechanismen von katalytischen Reaktionen unvorstellbarer Spezifität. Aus diesen Gründen beschäftigen sich mehrere Laboratorien seit vielen Jahren mit der Strukturaufklärung von Enzymen.

Am weitesten gediehen sind hier die Arbeiten an der Ribonuclease, einem Pankreas-Enzym, das spezifisch die Ribonucleinsäuren hydrolytisch spaltet. Von *Hirs, Moore und Stein*<sup>4)</sup> ist mit Hilfe der Chromatographie die Natur sämtlicher 124 Aminosäuren ermittelt worden, die hier in einer Makropeptid-Kette aneinander gereiht sind. Hieraus geht allerdings noch nichts über die Reihenfolge der Bausteine hervor. Um diese zu erkennen, mußte man die Kette vorsichtig und verschiedenartig in größere Stücke zerbrechen, bei den Bruchstücken die Aufeinanderfolge der Aminosäuren feststellen und schließlich durch sinnvolle Kombination dieser Erkenntnisse die primäre Struktur der Proteinkette rekonstruieren. Die schonende Spaltung kann mit Säure in der Kälte, besser aber mit proteolytischen Enzymen ausgeführt werden. Hier verwendet man Trypsin, Pepsin, Chymotrypsin und neuerdings die Bakterienprotease Subtilisin, die das Ribonuclease-Molekül alle an verschiedenen Stellen spalten<sup>5)</sup>. Das Vorbild für dieses Verfahren bilden die grundlegenden Arbeiten von *Sanger, Tuppy und Mitarb.*<sup>6)</sup>, durch die heute die Konstitution des Insulins völlig aufgeklärt ist.

Hierbei werden die Peptide des Partialhydrolysats in Milligramm-Mengen durch Austauscherchromatographie, mikropräparative Papierelektrophorese, Papierchromatographie oder Gegenstromverteilung getrennt und isoliert. Dann ermittelt man an ihnen die amino- und carboxyl-endständigen Aminosäuren. Die Reihenfolge der Bausteine wird am besten nach der *Edmanschen Methode*, durch stufenweisen Abbau der Phenylthiohydantoin<sup>7)</sup>, erkannt. Wie die Rekonstruktion der ursprünglichen Polypeptidkette erfolgt, geht am besten aus dem in Tabelle 1 wiedergegebenen Beispiel der Strukturmittlung des melanocyten-stimulierenden

Proteins (β-MSH) hervor<sup>10)</sup>. Man erkennt hieraus auch, wie die zum Teil recht scharf ausgeprägte Spezifität der spaltenden Enzyme zur Lösung des Problems ausgenutzt wird. Diese Arbeitsweise hat in der letzten Zeit auch zur nahezu lückenlosen Aufklärung der Aminosäure-Folge der Ribonuclease geführt<sup>11)</sup>.

ben wird<sup>12)</sup>, auch arbeitet, sie kann doch nicht, etwa bei einer Gesamtzahl von 300 Aminosäuren pro Eiweißmolekül, zwischen 30 oder 31 Molekülen einer Aminosäureart unterscheiden. Eine solche Genauigkeit ist aber notwendig, um sehr geringfügige Differenzen in gleichartigen Proteinen zu erkennen. Es handelt sich hier um nahe verwandte Fragestellungen, die für den Chemiker und den Genetiker von gleicher Interesse sind:

1. Sind Proteine, insbesondere solche, die eine bestimmte physiologische Funktion zu erfüllen haben (Haemoglobin, Bluts serum-Proteine, einzelne Enzyme) bei allen Arten von Lebewesen oder bei allen Individuen einer Art oder wenigstens in allen Organen eines Individuums von identischer Struktur?

2. Bestehen solche Proteine aus einer einzigen Sorte von Molekülen oder gibt es nebeneinander mehrere Proteine biologisch gleichartiger Wirkung?

Die chemische Aufgabe bei der Beantwortung dieser Fragen besteht darin, Protein-Individuen zu trennen und eventuelle geringfügige strukturelle Unterschiede zwischen den als einheitlich isolierten Proteinen aufzudecken. Durch chromatographische, hauptsächlich aber elektrophoretische Methoden ist es in der letzten Zeit gelungen, die erste der beiden aufgeworfenen Fragen eindeutig an mehreren Beispielen im Sinne einer großen Vielfältigkeit zu beantworten, nachdem die Verschiedenartigkeit des Haemoglobins von Foetus und erwachsenem Menschen schon 1866 von *Körber*<sup>13)</sup> auf Grund des verschiedenartigen De-naturierungsverhaltens gegen Laugen und Säuren entdeckt worden war. Man weiß heute, daß sich die Haemoglobine und wohl auch die Blutproteine aller untersuchten Species voneinander unterscheiden<sup>14)</sup> und hat beim Menschen 25 verschiedene, zum Teil abnormale, erbliche Haemoglobin-Varianten gefunden<sup>15)</sup>. Den Anstoß hierzu gab die Entdeckung von *Pauling und Mitarb.*<sup>16)</sup>, daß Haemoglobin bei der Sichelzellenanämie (Haemoglobin S) sich vom normalen Haemoglobin A elektrophoretisch unterscheidet. Die Aufdeckung der geringfügigen Unterschiede zwischen

Haemoglobin A, Haemoglobin S und einem weiteren abnormalen Haemoglobin C durch *Ingram*<sup>17)</sup> gelang durch eine Analyse des bei der enzymatischen Spaltung entstehenden Peptid-Gemisches. Bei einer solchen Spaltung können je nach Molekulargewicht, Struktur des Proteins und verwendeten Enzym 20–50 Peptide entstehen, die ihrerseits aus

Aminosäuren in bestimmter Sequenz aufgebaut sind. Unterwirft man ein solches Peptid-Gemisch einer „zweidimensionalen“ Analyse, indem man es auf einem rechteckigen Papierblatt zuerst in einer Dimension elektrophoretisch, dann in der zweiten chromatographisch trennt, so findet man die Peptide in einem bestimmten Muster über den Bogen verteilt. Dieses Muster ist für unter gleichen Bedingungen abgebaute Proteine etwa ebenso charakteristisch wie ein Fingerabdruck für

Enzym	Struktur der Spaltpeptide
Chymotrypsin	Asp-Glu-Gly-Pro-Tyr
Trypsin	Asp-Glu-Gly-Pro-Tyr-Lys
Chymotrypsin	Lys-Met-Glu-His-Phe
Trypsin	Met-Glu-His-Phe-Arg
Chymotrypsin	Arg-Try
Trypsin	Try-Gly-Ser-Pro-Pro-Lys-Asp
Chymotrypsin	Gly-Ser-Pro-Pro-Lys-Asp
Komplette Sequenz:	Asp-Glu-Gly-Pro-Tyr-Lys-Met-Glu-His-Phe-Arg-Try-Gly-Ser-Pro-Pro-Lys-Asp

Tabelle 1. Peptide der Chymotrypsin- und Trypsin-Spaltung von β-MSH (Schwein)

den Hormons (β-MSH) aus Schweinehypophysen hervor<sup>10)</sup>. Man erkennt hieraus auch, wie die zum Teil recht scharf ausgeprägte Spezifität der spaltenden Enzyme zur Lösung des Problems ausgenutzt wird. Diese Arbeitsweise hat in der letzten Zeit auch zur nahezu lückenlosen Aufklärung der Aminosäure-Folge der Ribonuclease geführt<sup>11)</sup>.

So exakt die chromatographische Analyse der Proteinhydrolysate, die heute in vollautomatischer Weise betriebe-

<sup>4)</sup> C. H. W. *Hirs, S. Moore u. W. H. Stein*, J. biol. Chemistry 219, 623 [1956]; C. H. W. *Hirs, W. H. Stein u. S. Moore*, ebenda 221, 151 [1956].

<sup>5)</sup> S. z. B. bei Ch. B. *Anfinsen u. R. R. Redfield*, Advances Protein Chem. 11, 1 [1956].

<sup>6)</sup> F. *Sanger u. F. Tuppy*, Biochemic. J. 49, 463, 481 [1951]; F. *Sanger u. E. O. P. Thompson*, ebenda 53, 366 [1953]; A. P. *Ryle, F. Sanger, L. F. Smith u. Ruth Kitai*, ebenda 60, 541 [1955]. Übersicht: F. *Sanger*, Advances Protein Chem. 7, 1 [1952].

<sup>7)</sup> P. *Edman*, Acta chem. Scand. 4, 283 [1950].

<sup>10)</sup> J. J. *Geschwind, C. H. Li u. L. Barnaföldi*, J. Amer. chem. Soc. 79, 620 [1957].

<sup>11)</sup> C. H. W. *Hirs*, Fed. Proc. 16, 196 [1957]; S. *Moore u. W. H. Stein*, Harvey Lectures 1956/57, 119.

<sup>12)</sup> S. *Moore, D. H. Spackman u. W. H. Stein*, Anal. Chem. 30, 1185 [1958].

<sup>13)</sup> Zitiert in: H. A. *Itano*, Advances Protein Chem. 12, 219 [1957].

<sup>14)</sup> J. A. M. *Ager, H. Lehmann u. F. Vella*, Brit. med. J. 2, 539 [1958]; H. C. *Dessauer, W. Fox u. J. R. Ramirez*, Arch. Biochem. Biophysics 71, 11 [1957].

<sup>15)</sup> Zitiert in: S. *Benziger, V. M. Ingram u. H. Lehmann*, Nature [London] 182, 852 [1958].

<sup>16)</sup> L. *Pauling, H. A. Itano, S. J. Singer u. J. C. Weels*, Science [Washington] 110, 539 [1949].

<sup>17)</sup> V. M. *Ingram*, Biochim. biophysica Acta 28, 539 [1958]; J. A. *Hunt u. V. M. Ingram*, ebenda 28, 646 [1958].

einen Menschen. Um Unterschiede zwischen sehr ähnlichen Proteinen zu entdecken, bedient man sich dieser Analyse mit großem Erfolg. Bei den genannten Haemoglobinen A, S und C führen die durch Mutation eines einzigen Gens hervorgerufenen Unterschiede dazu, daß sich jeweils eines der etwa 20 Spalt-Peptide infolge einer veränderten Ladung in den Phero-Chromatogrammen an anderer Stelle befindet. Die Analyse dieses Peptids, durch das allein sich die drei Haemoglobine unterscheiden, ergab, daß in die beiden aus je 300 Aminosäuren zusammengesetzten Haemoglobin-hälften an Stelle einer Glutaminsäure im Haemoglobin A je ein Valin (Haemoglobin S) bzw. je ein Lysin (Haemoglobin C) eingebaut ist.

Auch über die Heterogenität des Haemoglobins beim Menschen<sup>18)</sup>, bei Mäusen<sup>19)</sup>, Schafen<sup>20)</sup> und Vögeln<sup>21)</sup> ist berichtet worden. In den letzten Jahren hat man durch Zonenelektrophorese, hauptsächlich in Stärkegel, Polymorphismus des  $\beta$ -Globulins beim Menschen<sup>22)</sup>, Rind<sup>23)</sup>, Schwein<sup>24)</sup>, Pferd<sup>25)</sup> und Schaf<sup>26)</sup> aufgefunden. Schon vorher hatte man das Auftreten von Haptoglobin-Varianten beim Menschen beobachtet<sup>27)</sup>. Auch bei diesen eng miteinander verwandten Proteinen, deren Auftreten, so weit untersucht, genetisch festgelegt ist, wird die Peptid-Analyse durch „Fingerabdruck“ die chemischen Unterschiede auffinden lassen.

Die Frage nach der Verschiedenheit gleichartig wirkender Enzyme verschiedener Herkunft und nach deren Heterogenität ist heute ebenfalls wieder in den Vordergrund gerückt, nachdem Warburg schon 1943 die deutlichen Unterschiede zwischen Aldolase aus Hefe und Säugetiermuskel erkannt hatte<sup>28)</sup> und ebensole an der Alkohol-Dehydrogenase aus Hefe<sup>29)</sup> und Säugetierleber<sup>30)</sup> zutage traten. Aus systematischen Untersuchungen, die im Laboratorium des Verfassers von G. Pfleiderer ausgeführt worden sind, ergab sich, daß sich kristallisierte Milchsäure-

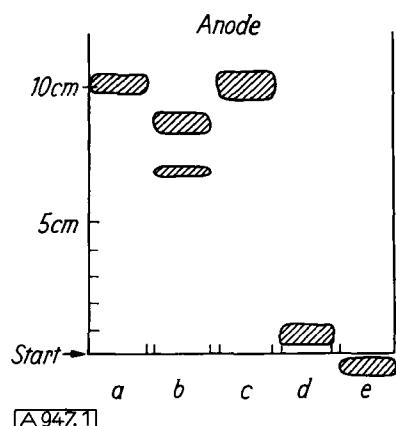


Abb. 1. Stärkeelektrophorese von Milchsäure-Dehydrogenasen verschiedenster Ursprungs in 0,033 m Veronal-Puffer pH 8,6; 25 V/cm; 5½ h. — a aus Rattenherz, b aus Rinderherz, c aus Schweineherz, d aus Kaninchenskelettmuskel, e aus Ratten-Skelettmuskel. — Zur Technik s.<sup>31)</sup>

- <sup>18)</sup> H. G. Kunkel u. G. Wallenius, Science [Washington] 122, 288 [1955].
- <sup>19)</sup> J. Rosa, G. Schapira, J. de Goudry, J. C. Dreyfus, G. Mathé u. J. Bernhard, Nature [London] 182, 947 [1958]; dort auch frühere Literatur.
- <sup>20)</sup> T. H. J. Huisman, G. van Vliet u. T. Sebens, Nature [London] 182, 171 [1958].
- <sup>21)</sup> R. Datta, J. Gosh u. B. C. Guha, Nature [London] 181, 1204 [1958].
- <sup>22)</sup> O. Smithies, Nature [London] 181, 1203 [1958].
- <sup>23)</sup> G. C. Ashton, Nature [London] 182, 370 [1958]; H. Harris, E. B. Robson u. M. Siniscalco, ebenda 182, 452 [1958].
- <sup>24)</sup> G. C. Ashton, Nature [London] 179, 824 [1957].
- <sup>25)</sup> G. C. Ashton, Nature [London] 182, 1029 [1958].
- <sup>26)</sup> G. C. Ashton, Nature [London] 182, 1101 [1958].
- <sup>27)</sup> O. Smithies u. N. F. Walker, Nature [London] 178, 694 [1956].
- <sup>28)</sup> O. Warburg u. W. Christian, Biochem. Z. 314, 149 [1943].
- <sup>29)</sup> E. Negelein u. H. J. Wulff, ebenda 293, 351 [1934].
- <sup>30)</sup> R. K. Bonnichsen, Acta chem. scand. 4, 715 [1950].
- <sup>31)</sup> Th. Wieland u. G. Pfleiderer, diese Ztschr. 69, 199 [1957].

Dehydrogenasen (MDH) aus denselben Organen (Skelettmuskel, Herzmuskel) verschiedener Tierspecies (Kaninchen, Schwein, Ratte, Rind) im elektrophoretischen Verhalten und auch in anderen Eigenschaften voneinander unterscheiden<sup>31a)</sup> (Abb. 1).

In verschiedenen Organen ein- und desselben Tieres finden sich sogar mehrere verschiedenartige Milchsäure-Dehydrogenasen, deren Konzentrationsverhältnis von Organ zu Organ verschieden ist und deren Zahl bei den verschiedenen Tierspecies wechselt<sup>32)</sup> (Abb. 2).

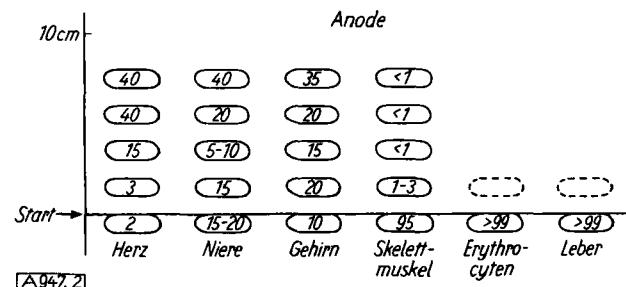


Abb. 2. Elektrophorese von Extrakten verschiedener Rattenorgane auf Membranfolie (Schleicher & Schüll) in 0,033 m Veronal-Puffer pH 8,6; 60 V/cm; 1 h. — Die Zahlen in den Banden bedeuten ungefähre Prozent der Gesamtaktivität, wie sie von W. Wörner und G. Pfleiderer (unveröffentl.) durch Ablösen des Enzyms und Aktivitätsbestimmung ermittelt wurden

Von der Äpfelsäure-Dehydrogenase weiß man, daß sich das aus Mikrosomen isolierte Enzym von dem im Plasma derselben Zelle vorkommenden deutlich unterscheidet<sup>32a)</sup>.

Während von den heterogenen Enzymen aus einem Organ bisher noch nicht genügend für eine vergleichende Analyse zur Verfügung stand, konnten die Milchsäure-

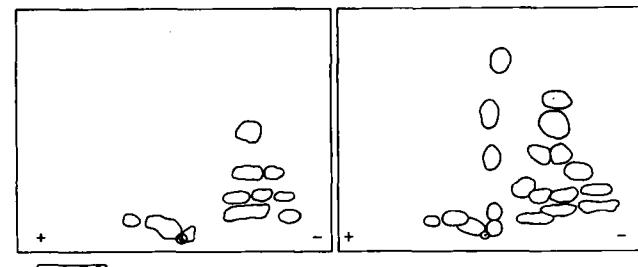


Abb. 3. Papier-Phero-Chromatogramme der Subtilisin-Spaltprodukte von Milchsäure-Dehydrogenase aus Schweineherz (links) und aus Kaninchenskelettmuskel (rechts). Arginin-haltige Peptide wurden mit Sakaguchi-Reagens sichtbar gemacht. — Elektrophorese: 90 min bei pH 6,5 und 40 V/cm. — Chromatographie: 20 h aufsteigend mit n-Butanol-Eisessig-Wasser (3:1:1). — Nach unveröffentl. Versuchen von H. Merz

Dehydrogenasen aus Rattenskelettmuskel und Kaninchenskelettmuskel mit der MDH aus Schweineherzmuskel nach dem geschilderten Verfahren verglichen werden. Die Phero-Chromatogramme der Peptid-Mischungen, die durch Hydrolyse mit einer Bakterienprotease entstanden, wiesen unverkennbare Differenzen auf<sup>33)</sup> (Abb. 3).

Diese Peptidanalyse eignet sich auch ausgezeichnet dazu, die Verschiedenheit oder Identität zweier Proteasen verschiedener Herkunft festzustellen. Hierzu läßt man beide eiweiß-spaltenden Enzyme unter gleichen Bedingungen auf ein- und dasselbe Protein einwirken und vergleicht dann die Phero-Chromatogramme der Peptid-Mischungen. Deren Identität läßt mit sehr großer Wahrscheinlichkeit auf Gleichheit der beiden Enzyme schließen. Es konnte so

- <sup>31a)</sup> G. Pfleiderer u. D. Jeckel, Biochem. Z. 329, 370 [1957].
- <sup>32)</sup> Th. Wieland u. G. Pfleiderer, Biochem. Z. 329, 112 [1957].
- <sup>32a)</sup> G. S. Christie u. J. D. Judah, Proc. Roy. Soc. [London] 141, 420 [1953]; Th. Bücher u. M. Klingenberg, diese Ztschr. 70, 562 [1958]; Äpfelsäure-Dehydrogenase aus Mitochondrien: K. H. Shull, Nature [London] 183, 259 [1959].
- <sup>33)</sup> G. Griss u. K. Haider, unveröffentl.

die Identität einer im eigenen Laboratorium isolierten Bakterienproteinase mit der japanischen „Nagarse“<sup>34)</sup> sichergestellt werden<sup>33, 34a)</sup>.

## II. Peptide als Naturstoffe

Während sich vor 10 Jahren die definierten, aus Tier und Pflanze isolierten Peptide noch bequem in wenigen Minuten aufzählen ließen, würde diese Aufgabe heute ein längeres Kapitel füllen. Es sei also auch hier nur auf einige Punkte eingegangen. Polypeptide kommen wahrscheinlich, wenn auch in großer Verdünnung, in sämtlichen Organismen vor. Sie erregen unser Interesse besonders, wenn sie eine starke biologische Wirkung haben oder in ausnehmend hoher Konzentration auftreten. Dies gilt z. B. von den Pseudopeptiden Carnosin ( $\beta$ -Alanyl-histidin, etwa 0,5% des Säugetiermuskels) oder Glutathion, einem ubiquitären Tripeptid ( $\gamma$ -Glutamyl-cysteinyl-glycin), von dem man mehrere biochemische Funktionen kennt. Z. B. wirkt es als Coenzym der weitverbreiteten Methylglyoxalase, die Methylglyoxal in D-Milchsäure verwandelt<sup>35)</sup>. Die physiologische Bedeutung dieser Reaktion ist bisher nicht verständlich. Glutathion kommt in hoher Konzentration in der Augenlinse vor. Vor kurzem hat Waley<sup>36)</sup> hierin weitere Tripeptide aufgefunden: Ophthalminsäure, ein C-analoges, S-freies Glutathion: ( $\gamma$ -Glutamyl- $\alpha$ -aminobutyryl-glycin) und die C-ärmere Norophthalminsäure, die beide bei der Methylglyoxalase-Reaktion dem Glutathion kompetitiv entgegenwirken. Es bestehen auch Anhaltspunkte für das Vorkommen eines analogen, threonin-haltigen Tripeptids.

Eine weitere Funktion des Glutathions am kleinen Süßwasserpolyph *Hydra littoralis* besteht in einer tentakel-erregenden Wirkung, die von kleinsten Konzentrationen ( $10^{-4}$  bis  $10^{-5}$  m) des von der Beute abgegebenen Tripeptids ausgelöst wird und bei Konzentrationserhöhung zu einer Retraktion führt<sup>37)</sup>. Diese „Futterreaktion“ wird auch von Ophthalminsäure schon in Konzentrationen ab  $10^{-6}$  m (ca. 0,5 mg/l) gegeben, während Norophthalminsäure etwas weniger wirksam ist<sup>38)</sup>. Dieser Befund verdient deshalb besonderes Interesse, weil sämtliche bisher bekannten biologischen Wirkungen des Glutathions seiner SH-Gruppe zugeschrieben werden müssen. Hier liegt hingegen eine Wirkung vor, die auf die besondere Aufeinanderfolge der drei Aminosäuren zurückzuführen ist.

Auf die als Wuchsstoffe für *Lactobacillus casei* wirksamen, nicht sehr spezifischen „Streptogenin“-Peptide, von denen die Verbindung Leucyl-cysteinyl-leucyl-valyl-glutaminsäure die bisher aktivste ist<sup>39)</sup>, sei hier nur hingewiesen, ebenso auf Peptide im Harn, über die vor kurzem eine Arbeit publiziert wurde, in der die wichtigste Literatur zusammenfassend zitiert ist<sup>40)</sup>. Über Vorkommen und pathologische Bedeutung von Polypeptiden siehe auch<sup>41)</sup>.

<sup>34)</sup> B. Hagihara, Ann. Rep. Scient. Works, Fac. Sci. Osaka Univ. 2, 35 [1954]; K. Okunuki u. B. Hagihara, J. Biochemistry [Tokyo] 43, 57 [1956].

<sup>34a)</sup> Den Herren K. Okunuki und B. Nagihara, Osaka, sei auch hier für die Vermittlung des kristallisierten Präparates herzlich gedankt.

<sup>35)</sup> K. Lohmann, Biochem. Z. 254, 332 [1932].

<sup>36)</sup> S. G. Waley, Biochem. J. 64, 715 [1956]; 67, 172 [1957]; Synthese: ebenda 68, 189 [1958].

<sup>37)</sup> W. F. Loomis, Ann. N. Y. Acad. Sci. 62, 209 [1955].

<sup>38)</sup> E. E. Cliffe u. S. G. Waley, Nature [London] 182, 804 [1958].

<sup>39)</sup> R. B. Merrifield u. D. W. Woolley, J. Amer. chem. Soc. 80, 6635 [1958].

<sup>40)</sup> H. Hanson u. S. Fittkau, Hoppe-Seylers Z. physiol. Chem. 313, 152 [1958].

<sup>41)</sup> K. Felix, Dtsch. med. Wschr. 82, 694 [1957].

Besonders starke biologische Wirkung hat die große Klasse der Polypeptid-Hormone, deren Erforschung in den letzten Jahren sehr große Fortschritte gemacht hat. Es handelt sich um die Hormone der Hypophyse, der Bauchspeicheldrüse und um die im Blut aus inaktiven Vorstufen gebildeten Hypertensine. Von allen in Tabelle 2 zusammengestellten Wirkstoffen ist die genaue Sequenz der Aminosäuren aufgeklärt, zum Teil sind sie auch schon synthetisch erhalten worden<sup>42)</sup>.

Einige der Peptidhormone erscheinen in Tabelle 2 in der Mehrzahl, da sie je nach Tierart geringfügige Unter-

	Hormon	Wirkung	Zahl d. Aminosäuren
Pan-kreas	Insuline (Rind, Schaf, Schwein, Pferd)	blutzucker-senkend	21 (A-Kette) u. 30 (B-Kette) Disulfidring
	Glukagon	Insulin-Antagonist	29
	Corticotropine (ACTH)	stimulieren Hormonsek. d. Nebenniere	39 (Aminosren 31, 32 u. 33: Leu, Ala, Glu [Schwein] Ala, Ser, Glu [Schaf])
Hypo-physis	Inter- medine ( $\alpha$ -MSH $\beta$ -MSH*)	Ausbreitung der Melanophoren	13 (wie 1–13 des ACTH) 18
	Ocytocin Vasopressine	uterus-kontrahierend blutdrucksteig., antidiuretisch	9 (Disulfidring) 9 (wie Ocytocin, aber Phe, Arg (Lys) statt Ileu, Leu als Nr. 3 und 8)
Serum	Hypertensine	starke und kurze Blutdrucksteig.	I: 10 II: 8 (I minus His-Leu)

\* )  $\beta$ -MSH des Rindes enthält an zweiter Stelle einen Serin-Rest, das des Schweins einen Glutaminsäure-Rest (vgl. Tabelle 1).

Tabelle 2. Polypeptid-Hormone

schiede aufweisen. So enthält das Insulin vom Rind als achte, neunte und zehnte Aminosäure der A-Kette Ala-Ser-Val, Insulin vom Schaf Ala-Gly-Val, das vom Schwein und Wal Thr-Ser-Ileu und das vom Pferd Thr-Gly-Ileu<sup>43)</sup>.

Schon bei diesen niederen Peptiden findet man also geringe, aber definierte, artgebundene Unterschiede in der Natur und Sequenz der Aminosäuren. Diese können sich bei den Proteinen, unter Erhaltung der physiologischen Wirksamkeit wegen der größeren Anzahl unwesentlicher Bausteine natürlich stärker ausprägen. Beim ACTH sind nur die ersten 28 Aminosäuren für die Wirkung vonnöten, die carboxyl-endständigen 11 weiteren lassen sich mit Carboxypeptidase ohne Verlust der Wirkung abspalten<sup>44)</sup>. Das Enzym Papain verträgt die Abspaltung von 100 Aminosäuren vom Aminoende der aus 180 Gliedern bestehenden Kette ohne völligen Verlust der katalytischen Wirkung<sup>45)</sup>. Sechs verschiedene Esterasen<sup>46)</sup> enthalten die Aminosäure-Sequenz: Gly-Asp-Ser-Gly, eine Anordnung, in der offenbar die hydrolytische Wirksamkeit, wenigstens zum Teil, lokalisiert ist. Es ist daher nicht ausgeschlossen, daß ein großer Peptid-Teil aller Enzym-Moleküle zur Spezifität der Wirkung nichts beizutragen hat und deshalb in seiner Aminosäure-Zusammensetzung in weiteren Grenzen variieren darf.

Für Spezifitäts-Betrachtungen ist es sehr günstig, daß die Natur bei den Peptid-Hormonen vorexperimentiert, welche Aminosäuren für die Wirkung nötig und welche nicht unbedingt nötig sind. So sieht man beim Ocytocin, daß der Austausch der dritten (Ileu) und achten (Leu) Aminosäure gegen Phenylalanin und Arginin (Rind) bzw. Lysin (Schwein) zu einem Umschlagen der Hormonwir-

<sup>42)</sup> Zusammenfassende Darstellung: R. Schwyzer, Chimia 12, 53 [1958].

<sup>43)</sup> H. Brown, F. Sanger u. R. Kitai, Biochem. J. 60, 556 [1955]; J. I. Harris, F. Sanger u. M. A. Naughton, Arch. Biochem. Biophys. 65, 427 [1956].

<sup>44)</sup> R. G. Shepherd u. Mitarb., J. Amer. chem. Soc. 78, 5067 [1956].

<sup>45)</sup> R. L. Hill u. E. L. Smith, Biochim. biophysica Acta 19, 376 [1956].

<sup>46)</sup> Zitiert nach H. N. Rydon, Nature [London] 182, 928 [1958].

kung, d. h. zu den Vasopressinen führt, die nur noch geringe uterus-kontrahierende Wirkung haben. Ein isomeres Ocytocin, das an Stelle eines Asparagin-Restes den des Iso-asparagins besitzt, ist wirkungslos<sup>47).</sup>

Sehr auffallend und unsere Vorstellungen von der Spezifität verwirrend<sup>48)</sup> ist der Befund, daß das Isoleucin-Hypertensin-II am isolierten Rattenuterus eine hohe Ocytocin-Aktivität besitzt<sup>49)</sup>, obwohl beide nur Asparaginsäure, Isoleucin, Prolin und Tyrosin als gemeinsame Bausteine, aber in gänzlich anderer Anordnung, enthalten.

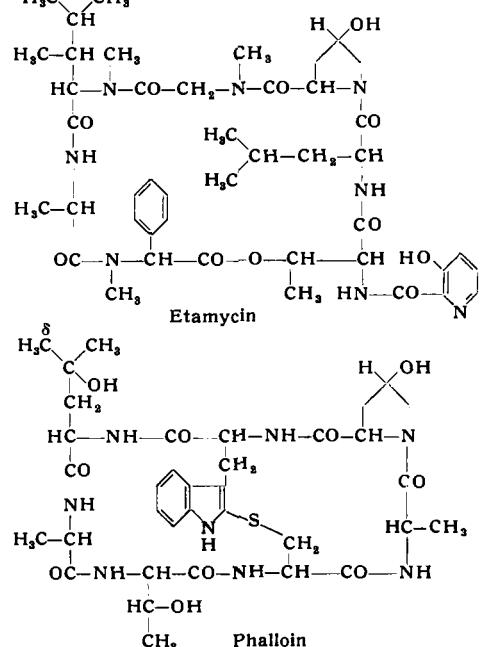
Die letzten drei Peptidhormone aus Tabelle 2 sind heute durch mehrere Synthesen zugänglich<sup>50)</sup>. Dies gibt weitere Möglichkeiten, das Molekül auf seine essentiellen Bausteine hin abzutasten. Das synthetisch erhaltene „Oxypressin“<sup>50)</sup> besitzt den Pentapeptid-disulfid-Ring des Vasopressins und die Tripeptid-Seitenkette des Ocytocins und somit die Wirkungen beider Hormone. Für ein gründliches Studium des Zusammenhangs zwischen Struktur und Wirkung wären allerdings, selbst wenn man Kopf- und End-Aminosäuren konstant hielte, viele Tausende von isomeren und analogen Peptiden zu synthetisieren und zu prüfen. Noch wenig läßt sich bis heute feststellen: Gegenseitiges Vertauschen von Valin, Leucin oder Isoleucin scheint im Prinzip wenig an der Wirkung der drei Hormone zu ändern, von größerem Einfluß sind Anwesenheit und Natur der basischen Seitenketten. Hier liegt noch ein weites, wenn auch etwas ein töniges Feld vor dem präparativen Chemiker.

Als Produkte von Mikroorganismen und Pilzen sind in den letzten Jahrzehnten cyclische Peptide in größerer Zahl entdeckt worden. Sie besitzen fast alle starke Giftwirkungen auf höhere Organismen, z. T. auch auf Bakterien, und sind deshalb als Antibiotika zu bezeichnen. Ihre Resistenz gegenüber den Abbau-Enzymen normaler Zellen verdanken sie wohl alle nicht nur ihrer cyclischen Gestalt, sondern auch ihrem Gehalt an eiweißfremden Strukturteilen, z. B.

optischen Antipoden normaler Aminosäuren oder gänzlich ungewöhnlichen Aminosäuren und zusätzlich anderen Bindungen als Peptid-Bindungen. Es würde zu weit führen, die Strukturformeln aller bisher bekannten physiologisch aktiven Cyclopeptide anzugeben. In Tabelle 3 sind ihre Namen und ihre proteinfremden Strukturelemente aufgezeichnet.

Erwähnenswert sind hier auch die in ihrer Konstitution noch nicht geklärten fungiciden Polypeptide mikrobiellen Ursprungs, wie Bacillomycine<sup>53)</sup> und Mycobacillin<sup>54)</sup>.

Besonders interessant erscheint, im Hinblick auf eigene Untersuchungen über die Knollenblätter-Pilzgifte, die Struktur eines aus *Streptomyces griseus* isolierten Antibiotikums, des Etamycins (Viridogriseins). Dieses Molekül hat sich in seinem Bau von dem eines normalen Polypeptids schon recht weit entfernt. Es enthält nach Sheehan<sup>55)</sup> eine Esterbindung und die seltsamen Bausteine 3-Hydroxypicolinsäure, D-Leucin, allo-D-Hydroxyprolin, Sarkosin, L- $\alpha$ -Phenylsarkosin und N- $\beta$ -Dimethylleucin. Die Pilzgifte Phalloidin und Phalloin haben, wie die von uns ermittelten Strukturformeln zeigen<sup>56)</sup>, eine entfernte Ähnlichkeit.



Die beiden Pilzgifte unterscheiden sich nur durch den Mehrgehalt des Phalloidins um ein Sauerstoff-Atom am  $\delta$ -Kohlenstoff-Atom des verzweigten Bausteins. Im zehnfach giftigeren  $\alpha$ -Amanitin ist eine neue Dihydroxy-Aminosäure enthalten<sup>57)</sup>, die dasselbe doppelt verzweigte Kohlenstoffgerüst besitzt wie das Methylleucin des Etamycins. Diese Anordnung findet man auch in der Seitenkette des Ergosterins und des Fungisterins, zwei Steroiden, die von H. Wieland auch aus dem grünen Knollenblätterpilz isoliert werden konnten<sup>58)</sup>.  $\gamma$ -Amanitin liefert bei der Hydrolyse das Lacton eines weiteren ähnlichen Bausteins, für den die sauerstoff-ärmere Struktur zutreffen könnte.

Bis vor kurzem mußten wir auf Grund negativer Spaltungsergebnisse mit Perjodat die verzweigten Aminosäuren in einer dehydratisierten, ungesättigten Form annehmen. Wie A. Schöpf jetzt zeigen konnte<sup>59)</sup>, liegen aber zumindest

Cyclopeptid	Fremdbausteine	ungewöhnl. Bindungen
Enniatine (Welkstoffe)	$\alpha$ -Hydroxy-isovaleriansäure, N-Methylvalin, N-Methylisoleucin	Ester
Mutterkorn-alkaloide	Lysergsäure, $\alpha$ -Hydroxy- $\alpha$ -aminosäuren	Ester
Valinomycine, Amidomycin	D- $\alpha$ -Hydroxy-isovaleriansäure, L-Milchsäure, D-Valin	Ester
Actinomycine	1,8-Dimethyl-3-amino- phenoazon(2)-4,5-dicarbonsäure, D-allo-Isoleucin, Sarkosin	Ester
Echinomycin <sup>52)</sup>	D-Serin, N-Methylvalin, Chinoxalincarbonsäure(2)	Ester, Dithianring
Gramicidine	Ornithin, D-Phenylalanin	
Tyrocidine	ebenso	
Polymyxine	$\alpha$ , $\gamma$ -Diaminobuttersäure, Methyloctansäure	$\gamma$ -Peptid
Bacitracin A	D-Ornithin D-Asparaginsäure	8-Peptid, Thiazolin-Ende
Micrococcin P	Thiazol-4-carbonsäure	
Subtilin A <sup>58a)</sup>	$\beta$ -Methyl-lanthionin	5 Peptid-Ringe

Tabelle 3. Einige physiologisch aktive Cyclopeptide<sup>42, 51)</sup>

<sup>47)</sup> V. du Vigneaud u. Mitarb., J. Amer. chem. Soc. 81, 167 [1959].  
<sup>48)</sup> D. W. Woolley u. R. B. Merrifield, Science [Washington] 128, 238 [1958].

<sup>49)</sup> H. Schwarz, F. M. Bumpus u. I. H. Page, J. Amer. chem. Soc. 79, 5697 [1957].

<sup>50)</sup> P. G. Katsoyannis, J. Amer. chem. Soc. 79, 109 [1957].

<sup>51)</sup> E. B. Chain, Ann. Rev. Biochemistry, 27, 171 [1958].

<sup>52)</sup> W. Keller-Schierlein, M. L. Mihailović u. V. Prelog, Helv. chim. Acta 42, 305 [1959].

<sup>52a)</sup> A. Stracher u. C. L. Craig, J. Amer. chem. Soc. 81, 696 [1959] und dort zitierte Arbeiten.

<sup>53)</sup> N. Sharon, A. Pinsky, R. Turner-Graff u. J. Babad, Nature [London] 174, 1190 [1954].

<sup>54)</sup> S. K. Majumdar u. S. K. Bose, Nature [London] 181, 134 [1958].

<sup>55)</sup> J. C. Sheehan, H. G. Zachau u. W. B. Lawson, J. Amer. chem. Soc. 79, 3933 [1957].

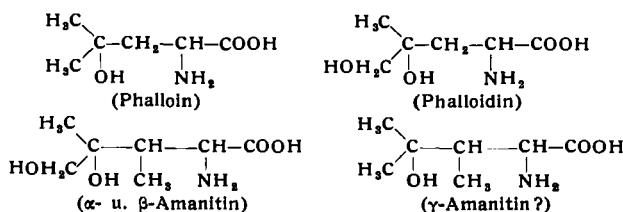
<sup>56)</sup> Th. Wieland u. W. Schön, Liebigs Ann. Chem. 593, 157 [1955]; Th. Wieland, K. Mannes u. A. Schöpf, ebenda 617, 152 [1958].

<sup>57)</sup> Th. Wieland u. A. Höfer, Liebigs Ann. Chem. 619, 35 [1958].

<sup>58)</sup> H. Wieland u. G. Coutelle, Liebigs Ann. Chem. 548, 270 [1941].

<sup>59)</sup> A. Schöpf, Dissert. Univers. Frankfurt/M. 1959.

die des Phalloidins und der Amanitine ( $\alpha$ - und  $\beta$ -) als  $\gamma$ -Hydroxy-Verbindungen vor. Somit ergeben sich für die verzweigten Bausteine der Giftstoffe folgende Bilder:



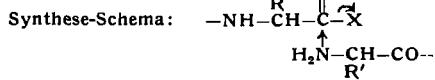
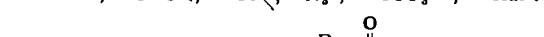
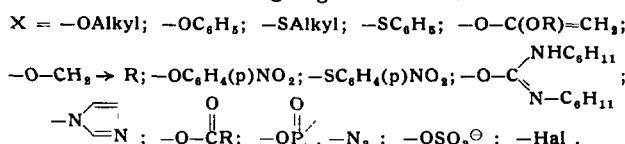
Als neue verzweigte Aminosäuren sind  $\alpha$ -Amino-isobuttersäure und  $\beta$ -Hydroxyleucin im Hydrolysat eines Antibiotikums<sup>60)</sup>,  $\gamma$ -Hydroxyvalin im Saft von *Kalanchoe daigremontiana*<sup>61)</sup> aufgefunden worden.

### III. Peptid-Synthesen<sup>62)</sup>

Die Verknüpfung von zwei und mehr Aminosäuren miteinander hat sich schon *E. Fischer* zur Aufgabe gestellt, nachdem er die chemische Natur der Proteine erkannt hatte. Zu seiner Zeit wurden von ihm und unabhängig von *Th. Curtius* die grundlegenden Methoden ausgearbeitet, die auch heute noch in Gebrauch sind. Da die Peptidsynthese im Prinzip nichts anderes ist als eine N-Acylierung, können hierfür alle Methoden angewandt werden, die man zur Anheftung eines Acylrests, hier eines Aminosäure-Restes, an den Stickstoff der anderen Aminosäure verwendet. Die Peptidsynthese geht so vor sich, daß der nucleophile Stickstoff der zweiten Komponente den Kohlenstoff der Carboxyl-Gruppe in Bindung bringt. Bei der Carboxyl-Gruppe, noch mehr bei ihrem Anion, wie es bei den Aminosäure-Zwitterionen in neutraler wäßriger Lösung vorliegt, hat dieser Kohlenstoff seine elektrophile Eigenschaft wegen der Mesomerie fast völlig eingebüßt, so daß die Anlagerung nur unter Energieaufwand oder nach Aktivierung der Carboxyl-Gruppe möglich ist.

Peptidsynthesen ohne Aktivierung: Bei dreistündigem Erhitzen von Aminosäuren in einer Glutaminsäure-Schmelze (= Pyrrolidon-carbonsäure) auf 170 °C bilden sich nicht-dialysierbare Polypeptide, die alle in der Schmelze befindlichen Aminosäure-Bausteine enthalten<sup>63)</sup>. L-Methionin tritt bei pH 9 in Gegenwart einer Proteinfraktion aus Leber mit einer zweiten Molekel zu Dimethionin zusammen. Das sich einstellende Gleichgewicht kann zu einigen Prozent auf der Seite des Dipeptids liegen<sup>64)</sup>.

Die Aktivierung der Carboxyl-Gruppen wird dadurch erreicht, daß man ihren Kohlenstoff mit einem elektronenanziehenden Substituenten versieht, der dort einen mehr oder weniger starken positiven Zustand erzeugt. Als solche Substituenten (X) dienen bei den heute gebräuchlichen zahlreichen Peptidsynthesen die folgenden ungefähr mit zunehmender Aktivierung angeordneten Reste:



<sup>60)</sup> G. W. Kenner u. R. C. Shepard, Nature [London] 181, 48 [1958].  
<sup>61)</sup> J. K. Pollard, E. Sondheimer u. F. C. Steward, Nature [London] 182, 1356 [1958].

<sup>62)</sup> Zusammenfassungen: W. Grassmann u. E. Wünsch, Fortschr. Chem. org. Naturstoffe (Springer-Verlag, Wien) 13, 344 [1956]; M. Goodman u. W. E. Kenner, Adv. Protein Chemistry (Acad. Press, New York) 12, 465 [1957]; Th. Wieland u. B. Heinke, diese Ztschr. 63, 7 [1951]; 66, 507 [1954]; 69, 362 [1957].

<sup>63)</sup> S. W. Fox u. K. Harada, Science [Washington] 128, 1214 [1958].  
<sup>64)</sup> M. Brenner u. A. Vetterli, Helv. chim. Acta 40, 937 [1957].

Aus wichtigen praktischen Gründen ergibt sich außerdem die Notwendigkeit, die in der acylierenden Aminosäure oder im Peptid vorhandene freie Aminogruppe durch einen Rest zu schützen, der nach der Peptidsynthese schonend wieder abgespalten werden kann. Dieses Problem wurde erst 1932 von Bergmann und Zervas<sup>65)</sup> durch Einführung des Carbobenzoxy-Rests gelöst, der durch katalytisch erregten Wasserstoff, mit Na in flüssigem Ammoniak oder mit Bromwasserstoff in Eisessig in der Kälte entfernt werden kann. Seither sind zahlreiche Schutzgruppen aufgefunden und mit Erfolg verwendet worden, die die Möglichkeiten komplizierter Synthesen stark vermehrt haben. Auch die Carboxyl-Gruppe des zu acylierenden Teils muß unter Umständen blockiert werden. Hierzu ist eine Veresterung mit Methyl- oder Äthyl-, manchmal auch mit Benzylalkohol gebräuchlich, da diese Ester durch schwaches Alkali bzw. katalytisch mit Wasserstoff wieder gespalten werden können.

Es gibt auch Methoden zur Peptidsynthese, bei denen die Aminogruppe der einen Komponente, z. B. in Form eines Isocyanat- oder Phosphitamid- oder -imid-Restes in einen reaktionsfähigen Zustand versetzt wird. Die Methoden der Peptid-synthesen sind in mehreren Fortschrittsberichten<sup>66)</sup> unter Erfassung der Literatur bis Ende 1956 zusammengestellt worden, so daß hier nur wesentliche Neuigkeiten der letzten zwei Jahre ausführlicher behandelt werden sollen. Zwei allgemeine Bemerkungen seien vorangestellt.

1. Bei allen angeführten Synthese-Methoden kann Racemisierung eines der dabei beteiligten Bausteine eintreten. Man kann racemisierende Einflüsse durch Auswahl der Methode und des Lösungsmittels weitgehend unterbinden. Eine elegante Methode zur Prüfung auf einheitliche L-Zusammensetzung besteht in der Einwirkung von Leucin-amino-peptidase<sup>67)</sup>, die die Peptidkette vom Aminoende her successive abbaut, wenn sie aus L-Baustein besteht. Eine neuere Anwendung dieser Methode beschreiben z. B. K. Hofmann u. Mitarb.<sup>67)</sup>.

2. Eine weitere Schwierigkeit, die mit der Anzahl der zusammengeknüpften Aminosäuren immer stärker ins Gewicht fällt, ist die Auffindung des geeigneten Lösungsmittels. Es wurde deshalb bei den eigenen Untersuchungen von Anfang an darauf Wert gelegt, Verfahren zu finden, die Peptidsynthesen womöglich in Wasser, dem natürlichen „Medium“ der Proteine, oder wenigstens in wasserhaltigen organischen Flüssigkeiten ermöglichen. Diesem Bestreben kommt sehr entgegen, daß bei allen aktivierten Carboxyl-Gruppierungen die Geschwindigkeit der Aminolyse (Peptidbildung) gegenüber der der Hydrolyse oder Alkoholyse um ein Vielfaches erhöht ist. Deshalb kann man manche der oben angeführten aktivierten Aminosäuren, nachdem man sie in wasserfreiem Medium hergestellt hat, mit Anionen der zu acylierenden Verbindung in wäßriger Lösung zum Umsatz bringen. Besonders groß ist der Unterschied zwischen Aminolyse- und Hydrolyse-Geschwindigkeit bei den von uns eingehend untersuchten Thiophenyl-Verbindungen, die man daher in Alkohol oder Wasser gelöst zur Umsetzung verwenden kann. So reagieren die Aminoacyl-thiophenole, auch solche mit freier Aminogruppe, in wäßriger Lösung mit Proteinen an den  $\epsilon$ -Aminogruppen ihrer Lysinreste<sup>68)</sup>.

Auch tert. Butanol, das sich nur äußerst schwer acylieren läßt, ist für manche höhere Peptide ein gutes Lösungsmittel.

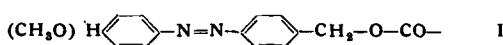
<sup>65)</sup> M. Bergmann u. L. Zervas, Ber. dtsch. chem. Ges. 65, 1192 [1932].  
<sup>66)</sup> D. H. Spackman, E. L. Smith u. D. M. Brown, J. biol. Chemistry 212, 255 [1955].

<sup>67)</sup> K. Hofmann, M. E. Woolner, G. Spühler u. E. T. Schwarz, J. Amer. chem. Soc. 80, 1486 [1958].  
<sup>68)</sup> Th. Wieland u. H. Merz, Biochem. Z. 330, 521 [1958].

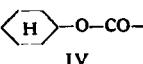
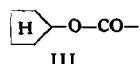
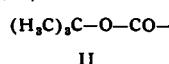
mittel, in dem aktivierte Aminosäuren oder Peptide sowohl dargestellt als auch weiter umgesetzt werden können<sup>69).</sup>

### N-Schutzgruppen

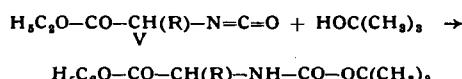
Über die grundlegende Wende, die in der synthetischen Peptidchemie durch die Einführung des Carbobenzoxy-Restes (Abkürzung hier Cbo, in vielen Arbeiten auch Z-) eingetreten ist, wurde oben berichtet<sup>65).</sup> Obwohl seither weit aus die meisten Peptide unter Verwendung dieser Schutzgruppe synthetisiert worden sind, hat man versucht, durch Abwandlung dieses Urethan-Prinzips weitere Vorteile zu erzielen. So wird die Verwendung gefärbter Acylreste, des p-Phenylazo-benzoyloxycarbonyl-Restes (I) und des p-(p'-Methoxyphenylazo)-benzyloxycarbonyl-Restes (H<sub>3</sub>CO statt H in I) vorgeschlagen, um die bei allen Peptidsynthesen notwendigen Reinigungsoperationen bequem verfolgen zu können<sup>70).</sup>



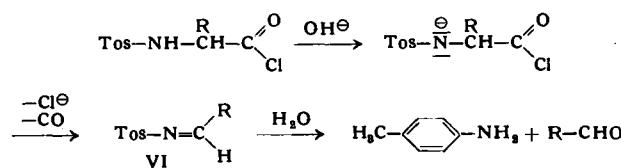
Beide Reste können entweder mit Bromwasserstoff/Eisessig oder durch katalytische Hydrierung abgespalten werden. Andere geeignete Alkylreste der Urethan-Gruppe sind tert. Butyl (II) sowie Cyclopentyl (III) und Cyclohexyl (IV)<sup>71).</sup>



Die damit blockierten Aminosäure- und Peptid-Derivate kristallisieren besonders gut, die Abspaltung erfolgt leicht solvolytisch mit Halogenwasserstoff. Da sie gegen katalytisch erregten Wasserstoff resistent sind, können sie selektiv neben dem Cbo-Rest Anwendung finden. Die cyclischen Reste lassen sich wie der Cbo-Rest durch Acylierung mit den entsprechenden Kohlesäureester-chloriden einführen, während man für die Darstellung der tert. Butyloxy-amino-säuren auf die Umsetzung von Isocyanat-fettsäureestern (V) mit tert. Butanol angewiesen ist.



Bei der Verwendung des ebenfalls sehr gebräuchlichen p-Toluol-sulfonylrestes (Tos) bei der Chlorid-Methode der Peptidsynthese ist darauf zu achten, daß höhere Konzentrationen an OH-Ionen schädlich sind<sup>72).</sup> Diese spalten nämlich den Imidwasserstoff ab, wonach das Anion unter Eliminierung von Chlorid und CO in die Schiff'sche Base (VI) übergeht, die zum aromatischen Amin und dem C-ärmeren Aldehyd hydrolysiert wird:



Die Einführung des Phthalyl-Restes, die üblicherweise recht drastisch durch Zusammenschmelzen der Aminosäure mit Phthalsäure-anhydrid vorgenommen wird, läßt sich schonender durch Erhitzen der Komponenten in Dioxan auf 105 °C bewerkstelligen<sup>73).</sup> Der Wert dieser

<sup>69)</sup> Unveröffentl. Versuche mit B. Heinke u. W. Boehringer.

<sup>70)</sup> R. Schwzzer, P. Sieber u. K. Zatskó, Helv. chim. Acta 41, 491 [1958].

<sup>71)</sup> F. C. McKay u. N. F. Albertson, J. Amer. chem. Soc. 79, 4686 [1957].

<sup>72)</sup> A. F. Beecham, J. Amer. chem. Soc. 79, 3257, 3262 [1957].

<sup>73)</sup> J. C. Sheehan, M. Goodman u. G. P. Hess, J. Amer. chem. Soc. 78, 1367 [1956].

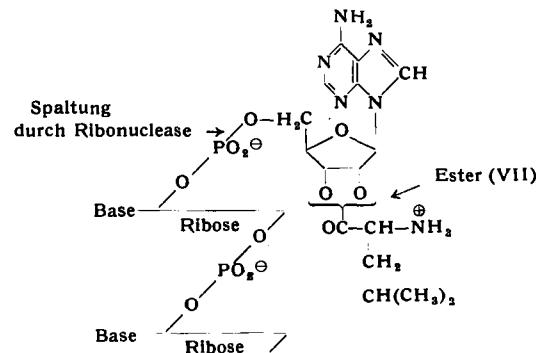
Schutzgruppe ist jedoch in letzter Zeit gesunken, nachdem sich Berichte mehren, daß Phthalyl-amino-säuren recht leicht durch wäßriges Alkali zu Phthal-amido-säuren hydrolysiert werden<sup>74).</sup>

Die einzige durch mildes Alkali abspaltbare Gruppe ist noch immer der Trifluoracetyl-Rest, dessen Anwendbarkeit in den letzten Jahren weiter studiert wurde<sup>75).</sup>

### Aktivierung der Carboxyl-Gruppe<sup>76)</sup>

#### 1. Als Ester

Vor kurzem haben Zachau, Acs und Lipmann<sup>77)</sup> eine lösliche Ribonucleinsäure (IRNS) aus Rattenleber, die mit Hilfe eines Leucin aktivierenden Enzyms mit <sup>14</sup>C-Leucin beladen worden war, mit Ribonuclease verdaut. Dabei konnten sie einen Ester (VII) des Leucins mit der 2'- oder 3'-OH-Gruppe des Adenosins isolieren. Hieraus muß der Schluß gezogen werden, daß eine endständige Adenylysäure-einheit der RNS mit verestertem Leucin vorgelegen hat.



Diese Esterbindung von Aminosäuren an den Riboseteil der Adenylysäure war im Arbeitskreis des Autors schon früher dadurch synthetisch erhalten worden, daß das Mono-Natrium-Salz der Adenylysäure mit Aminoacyl-thiophenolen erwärmt wurde<sup>78, 79).</sup> Dieser Weg stellt auch heute noch den besten zu ihrer Gewinnung dar. Die Adenylylestere geben beim Behandeln mit Hydroxylamin mit einer für diese Verbindungsklasse ungewöhnlichen Leichtigkeit Aminohydroxamsäuren.

Es sei daran erinnert, daß auf S. 422 die Alkylyester als die energieärmsten der aktivierte Aminosäuren am Anfang der Reihe stehen und daß die Ester sek. Alkohole in der Regel noch langsamer durch wäßriges Alkali verseift werden, als die der primären. In unserem Fall aber handelt es sich um einen Ester eines sek. Polyalkohols, für den andere Verhältnisse gelten. Durch die dem Ester-sauerstoff benachbarten O-Atome wird wohl ein induktiver Effekt ausgeübt, der den Kohlenstoff des Estercarbonyls an Elektronen verarmt und dem nucleophilen Angriff leichter zugänglich macht. Es läßt sich abschätzen, daß die Geschwindigkeit der alkalischen Verseifung eines solchen Esters rund 50 mal größer ist als etwa die des Isopropylesters. Da zudem Ester von α-Aminosäuren generell mindestens 100 mal rascher hydrolysiert und wohl auch aminolyisiert werden als die der Fettsäuren, kann man sich eine plausible Vorstellung von der Reaktivität dieser neuen Verbindungsklasse machen, die fast der eines Aminoacyl-mercaptans gleichkommen dürfte.

Amerikanische Biochemiker haben schon vorher sehr wahrscheinlich machen können, daß bei der biologischen Proteinsynthese lösliche Ribonucleotide als Vehikel der aktivierte Aminosäuren fungieren, wobei auch hier vieles

<sup>74)</sup> Z. B. H. Hanson u. R. Illhardt, Hoppe-Seylers Z. physiol. Chem. 298, 210 [1954].

<sup>75)</sup> F. Weygand u. R. Geiger, Chem. Ber. 89, 647 [1956]; F. Weygand u. U. Glöckler, ebenda 89, 653 [1956]; F. Weygand, R. Geiger u. U. Glöckler, ebenda 89, 1543 [1956].

<sup>76)</sup> Zusammenfassende Übersicht über „aktivierte Aminosäuren“: Th. Wieland u. G. Pfleiderer, Adv. Enzymology (Interscience Publ., New York) 19, 235 [1957].

<sup>77)</sup> H. G. Zachau, G. Acs u. F. Lipmann, Proc. Natl. Acad. Sci. New York 44, 885 [1958].

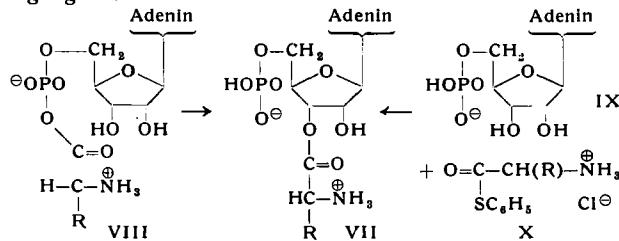
<sup>78)</sup> Th. Wieland, F. Jaenicke, H. Merz u. M. Ossorio, Liebigs Ann. Chem. 613, 95 [1958]; Th. Wieland, E. Niemann u. G. Pfleiderer, diese Ztschr. 68, 305 [1956].

auf eine esterartige Bindung deutet<sup>79</sup>). Wir haben also Grund anzunehmen, daß die von uns erstmalig synthetisierte Aminosäure-Adenylester-Bindung einen von der Natur benutzten Typ der aktivierten Eiweißbausteine darstellt.

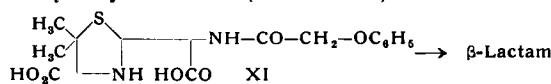
Die Vorstellungen über den weiteren Gang der Proteinsynthese können nur kurz angegedeutet werden: Es ist nicht unwahrscheinlich, daß die Aminosäuren, jede an einen spezifischen RN-S-Träger gebunden, sich in bestimmter Reihenfolge an eine große RN-S-Matrize des Eiweiß-Bildungsapparats der Zelle anlagern und so geordnet unter gegenseitiger Peptidverknüpfung zum Protein reagieren.

## 2. Als Anhydride

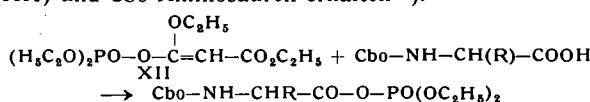
Die wichtigsten Anhydride von (N-acylierten) Aminosäuren oder Peptiden mit organischen Säuren sind in den vorausgegangenen Übersichten<sup>62)</sup> aufgezählt worden. Seitdem ist hier nichts wesentlich Neues dazugekommen. Unter den anorganischen Anhydridkomponenten ist die Phosphorsäure noch stärker ins Zentrum gerückt, nachdem sich die alten Befunde von der Beteiligung des Adenosin-triphosphats bei der biologischen Proteinsynthese von zahlreichen Seiten, z. B.<sup>80</sup>), bestätigen ließen. Als Produkte des ersten Reaktionsschrittes der Aminosäuren mit Adenosintriphosphat gelten die gemischten Anhydride (VIII). Diese sind heute recht gut zugänglich, indem man entweder die den Aminosäuren entsprechenden  $\alpha$ -Azidosäuren<sup>78</sup>) oder Cbo-Aminosäuren<sup>81</sup>) oder sogar die freien Aminosäuren<sup>82</sup>) mit Adenylsäure, in wasserhaltigem Pyridin gelöst, durch Dicyclohexyl-carbodiimid<sup>83</sup>) verknüpft und – in den ersten beiden Fällen – anschließend katalytisch hydriert. Die Anhydride wandeln sich, wahrscheinlich durch intramolekulare Acylwanderung, in die oben genannten Adenylester (VII, hier als 3'-Ester formuliert) der Aminosäuren um<sup>78</sup>). Diese sind, wie unter 1. erwähnt, direkt durch Erhitzen von Adenylat (IX) mit Aminoacyl-thiophenolen (X) zugänglich.



Das hier so erfolgreich verwendete Carbodiimid-Verfahren hat sich auch bei der ersten synthetischen Darstellung eines Penicillins durch Sheehan bewährt<sup>84</sup>). Nur mit seiner Hilfe gelang bei XI der  $\beta$ -Lactam-Ringschluß zum Phenoxycetyl-Penicillin (Penicillin V).



Anhydride N-geschützter Aminosäuren mit Phosphorsäure-diester, die sich ebenfalls als Acylierungs-Komponenten eignen, lassen sich aus Enolphosphaten wie Phosphorsäure-diäthylester - ( $\alpha$ -äthoxy -  $\beta$ -carbäthoxy) - vinylester (XII) und Cbo-Aminosäuren erhalten<sup>85</sup>).



<sup>78</sup>) M. B. Hoagland, P. C. Zamecnik u. M. L. Stephenson, Biochim. Biophysica Acta 24, 215 [1957]; M. B. Hoagland, Reprint No. 2 des Symposiums VIII beim IV. Internat. Kongreß f. Biochemie in Wien, 1958.

<sup>79</sup>) M. B. Hoagland, Biochim. Biophysica Acta 16, 288 [1955].

<sup>80</sup>) P. Castelfranco, K. Moldave u. A. Meister, J. Amer. chem. Soc. 80, 2335 [1958]; R. Lambert, F. Zilliken u. S. Gurin, diese Ztschr. 70, 571 [1958].

<sup>81</sup>) P. Berg, J. biol. Chem. 233, 608 [1958].

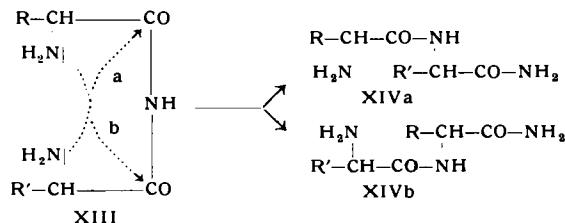
<sup>82</sup>) J. C. Sheehan u. G. P. Hess, J. Amer. chem. Soc. 77, 1067 [1955].

<sup>83</sup>) J. C. Sheehan u. K. R. Henery-Logan, J. Amer. chem. Soc. 79, 1262 [1957].

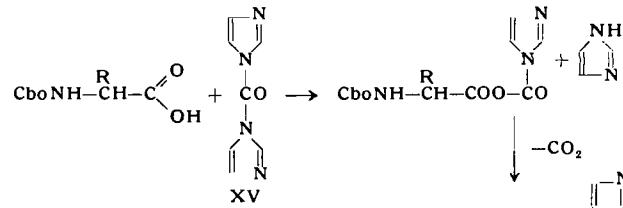
<sup>84</sup>) F. Cramer u. K. G. Gärtner, Chem. Ber. 91, 1562 [1958].

## 3. Als aktivierte Amide

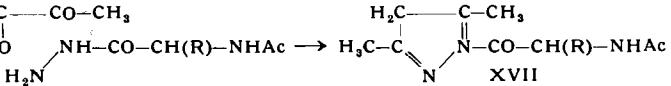
Diaminoacylimide lagern sich in wäßriger Lösung schon bei  $p_H$  5 zu Dipeptidamiden um<sup>86</sup>). Es konnten jetzt außer dem einfachen Diglycylimid ( $R = R' = H$  in XIII) auch die gemischten Imide von Glycin und Alanin ( $R = H$ ,  $R' = CH_3$ ), Glycin und Valin ( $R = H$ ,  $R' = CH(CH_3)_2$ ) und Dialanylimid als kristallisierte Hydrobromide gewonnen werden<sup>87</sup>). Bei der intramolekularen Umlagerung der unsymmetrischen Verbindungen ( $R = H$ ), die zu zwei isomeren Produkten (XIVa und XIVb) führt, fanden wir, daß der Glycyl-Rest bevorzugt wandert, da die Amide (XIVa) im Reaktionsgemisch vorwiegen.



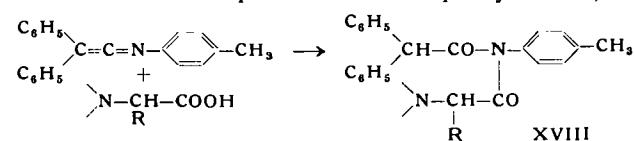
1953 wurde vom Autor mit G. Schneider<sup>88</sup>) gezeigt, daß N-Aminoacyl-Derivate des Imidazols als aktivierte Aminosäuren zur Peptidverknüpfung dienen können, doch lieferten die Synthesen dieser Verbindungen nur geringe Ausbeuten. Diese Schwierigkeit konnte jetzt von Anderson und Paul<sup>89</sup>) überwunden werden. Sie zeigten, daß N,N'-Carbonyl-diimidazol<sup>90</sup>) (XV) mit N-Acyl-aminoäuren bei Zimmertemperatur unter  $CO_2$ -Entwicklung das aktivierte Amid (XVI) gibt, das ohne Isolierung mit Estern zweiter Aminosäuren oder Peptide mit guten Ausbeuten ohne Racemisierung unter Peptidbildung reagiert.



Auch die N-Acylamino-2,4-dimethyl-pyrazoline (XVII), die man analog<sup>91</sup>) aus den Hydraziden von N-geschützten Aminosäuren mit Acetylacetone gewinnt, überträgt ihren Acyl-Rest beim Erhitzen auf den Stickstoff zweiter Amino-Komponenten<sup>92</sup>).



Weitere für denselben Zweck brauchbare Aminoacyl-imide (XVIII) gewinnt man aus Diphenylketen-p-tolylimid und Acylaminosäuren. Sie reagieren mit zweiten Aminosäure- oder Peptidestern unter Peptidsynthese<sup>93</sup>).



Bei seinen Studien über die Einlagerung von Aminosäuren, die an Sauerstoff oder Schwefel einer Seitenkette gebunden sind, in die Peptidkette, einer Reaktion, die zuerst an Salicylsäure-Derivaten studiert wurde, gelang es

<sup>86</sup>) Th. Wieland u. H. Mohr, Liebigs Ann. Chem. 599, 222 [1956].

<sup>87</sup>) Th. Wieland u. H. Urbach, Liebigs Ann. Chem. 613, 84 [1958].

<sup>88</sup>) Th. Wieland u. G. Schneider, Liebigs Ann. Chem. 580, 159 [1953].

<sup>89</sup>) G. W. Anderson u. R. Paul, J. Amer. chem. Soc. 80, 4423 [1958].

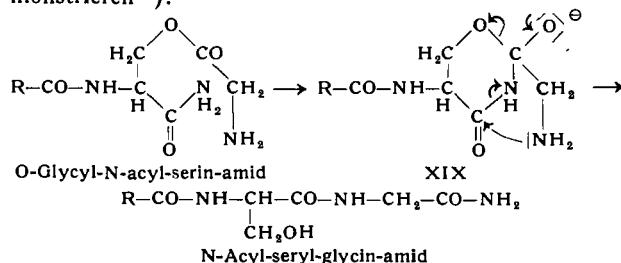
<sup>90</sup>) H. A. Staab, Liebigs Ann. Chem. 609, 75 [1957].

<sup>91</sup>) Th. Posner, Ber. dtsc. chem. Ges. 34, 3973 [1901].

<sup>92</sup>) W. Ried u. B. Schleimer, Liebigs Ann. Chem. 619, 43 [1958].

<sup>93</sup>) C. L. Stevens u. M. E. Munk, J. Amer. chem. Soc. 80, 4069 [1958].

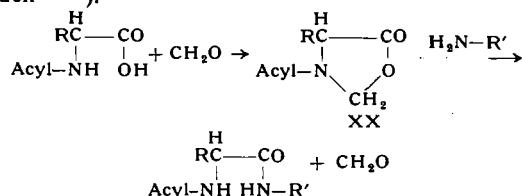
M. Brenner u. Mitarb. jetzt auch an Serin- (und Cystein-) Derivaten eine solche Inkorporierung von Glycin zu demonstrieren<sup>94)</sup>:



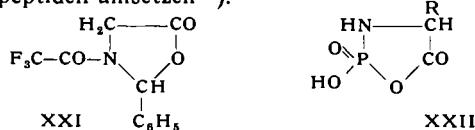
Die Reaktion, die wohl über ein diacylimid-artiges Anion (XIX) verläuft, braucht als Katalysator die starke Base tert. Butylat-Ion.

#### 4. Cyclische, energiereiche Aminosäure-Derivate

Als neue cyclische Derivate mit den Eigenschaften von Azlactonen sind die N-Acyl-oxazolidinone (XX) dargestellt worden<sup>95, 96)</sup>.



Man gewinnt sie aus den Acylaminosäuren und Paraformaldehyd in Benzol bei Gegenwart von etwas p-Toluolsulfonsäure in der Wärme oder, im Falle der Tosyl-Verbindungen, aus Tosyl-aminosäuren und Formaldehyd in Eisessig und Acetanhydrid durch längeres Erhitzen. Sie reagieren mit Aminen und Estern zweiter Aminosäuren zu Amiden und Acyl-dipeptid-estern. Die Anwendungsbreite und Racemisierungsfrage ist hierbei noch nicht genau untersucht. Nach ähnlichem Prinzip war bereits das Trifluor-acetyl-phenyl-oxazolidinon (XXI) aus Glycin, Benzaldehyd, Trifluor-essigsäure-anhydrid und Na-trifluoracetat erhalten worden. Es läßt sich mit Aminosäure-estern unter Ringöffnung und Benzaldehyd-Abspaltung zu Trifluor-acetyl-peptiden umsetzen<sup>97)</sup>.

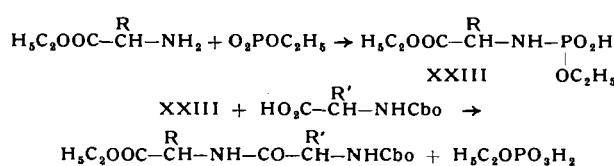


Auch die cyclischen N-Phosphorsäure-anhydride der Aminosäuren<sup>98)</sup> (XXII) gehören infolge ihrer gleichartigen Reaktionsfähigkeit in die Klasse der energiereichen Aminosäure-Derivate.

#### Aktivierung der Amino-Gruppe

Erhitzt man eine N-acylierte Aminosäure oder ein N-acyliertes Peptid mit dem Ester einer zweiten Aminosäure oder eines zweiten Peptids in einer Lösung von P<sub>2</sub>O<sub>5</sub> in Diäthylphosphit in Gegenwart eines tert. Amins mehrere Stunden auf 100 °C, so findet mit guter Ausbeute Peptid-verknüpfung statt. Schramm und Wissmann<sup>99)</sup> führen diese Wasserabspaltung durch das P<sub>2</sub>O<sub>5</sub> auf eine Aktivierung der Aminogruppe zurück und formulieren folgenden Mechanismus: Diäthylphosphit reagiert mit P<sub>2</sub>O<sub>5</sub> unter Bildung von metaphosphoriger Säure und Äthylmeta-

phosphat H<sub>5</sub>C<sub>2</sub>O-PO<sub>2</sub>. Dieses kann mit dem Aminosäure-ester ein Äthylester-phosphoamid (XXIII) geben, das sich mit der Carbonsäure-Komponente unter Abspaltung von Äthylphosphorsäure zum Peptid umsetzt<sup>100)</sup>.



#### Ausblick

Für den Chemiker und Biologen erscheint am fernen Horizont die Frage, wieweit die in kurzen Umrissen geschilderten neuen Ergebnisse der Peptidchemie Hoffnungen auf Verständnis der zahlreichen biologischen Wirkungen von Peptiden und Proteinen und vielleicht sogar auf eine erfolgreiche synthetische Bearbeitung aufkommen lassen können. Die bei der Synthese von physiologisch wirksamen Polypeptiden erzielten Fortschritte lassen erwarten, daß man in naher Zukunft tiefere Einblicke in den Zusammenhang zwischen Aminosäure-Sequenzen und Wirkungsart gewinnen wird. Was aber die Klasse der Proteine betrifft, so ist man hier vom anspruchsvollen Ziel einer Synthese noch unermeßlich weit entfernt. Die schon in der letzten Zusammenfassung geschilderten Methoden zum Aufbau von Makropeptiden sind inzwischen nicht grundsätzlich verbessert worden. Man kann damit zwar gleichartige Aminosäuren in großer Zahl zu Polypeptiden vereinigen, wenn man die inneren Carbaminsäure-anhydride mit geeigneten Katalysatoren polymerisiert. Buntere, wenn auch nicht so hochmolekulare Polypeptide erhält man, wenn man von Oligopeptiden ausgeht, deren Carboxyl-Enden etwa als Thioester, Ester oder Chlorid aktiviert sind, und diese miteinander verknüpft.

Schließlich besteht eine weitere, enzymatische Möglichkeit darin, geeignete Oligopeptide in stark konzentrierter Lösung durch die Einwirkung proteolytischer Enzyme zu hochmolekularen „Plasteinen“ zu vereinigen. Hierüber sind Arbeiten am Institut des Autors durch die Herren Determann<sup>101)</sup> und Albrecht im Gange, in deren Verlauf sich gezeigt hat, daß diese Reaktion wahrscheinlich in einer direkten Abspaltung von Wasser, vielleicht auch eines Alkohols, und nicht in einer Transpeptidierung besteht.

Anhaltspunkte für einen Transpeptidierungs-Mechanismus bei der Plastein-Bildung mit Chymotrypsin werden von Haurowitz und Horowitz<sup>102)</sup> darin gesehen, daß das in Gegenwart von <sup>14</sup>C-Phenylalanin-ester aus Ovalbumin-Peptiden gebildete Plastein eine gewisse Radioaktivität besitzt, die mit <sup>14</sup>C-Phenylalanin ausbleibt. Die Proteinase kann nämlich aus Aminosäure-estern den Aminoacyl-Rest auf Aczeptoren wie Amino-Gruppen übertragen. An hochgereinigten, plastein-bildenden Oligopeptiden und mit Pepsin als Katalysator wurde aber bei uns nach einer nur wenigen Minuten dauernden Polykondensation in der Mutterlauge des Plasteins keine Aminosäure und kein niederes Peptid gefunden. Möglicherweise katalysieren die beiden Enzyme verschiedenartig verlaufende Prozesse. Von deren genauer Kenntnis kann man sich nicht nur eine Erweiterung der Theorie, sondern auch neue wirksame Werkzeuge zur Synthese komplizierter Polypeptide versprechen.

Der Verfasser dankt der Deutschen Forschungsgemeinschaft und dem Fonds der chemischen Industrie für die Unterstützung der in diesem Zusammenhang geschilderten Forschungsthemen.

Eingegangen am 12. März 1959 [A 947]

- <sup>94)</sup> M. Brenner in „Amino Acids and Peptides with Antimetabolic Activity“, Ciba Symposium, J. u. A. Churchill, London 1958, S. 158; M. Brenner u. M. Zimmermann, Helv. chim. Acta 41, 467 [1958] und dort zitierte frühere Arbeiten.  
<sup>95)</sup> D. Ben-Ishai, J. Amer. chem. Soc. 79, 5736 [1957].  
<sup>96)</sup> F. Michèle u. S. Thomas, Chem. Ber. 90, 2906 [1957].  
<sup>97)</sup> F. Weygand u. M. Reither, Chem. Ber. 88, 26 [1955].  
<sup>98)</sup> H. Keller, H. Netter u. B. Niemann, Hoppe-Seylers Z. physiol. Chem. 313, 244 [1958].  
<sup>99)</sup> G. Schramm u. H. Wissmann, Chem. Ber. 91, 1073 [1958].

<sup>100)</sup> St. Goldschmidt u. H. L. Krauss, diese Ztschr. 67, 471 [1955].  
<sup>101)</sup> H. Determann, Dissert. Univers. Frankfurt/M. 1958.  
<sup>102)</sup> F. Haurowitz u. J. Horowitz, J. Amer. chem. Soc. 77, 3138 [1955].