

## DÉGRADATION SYSTÉMATIQUE DES DINITROPHÉNYLPEPTIDES (DNP-PEPTIDES)

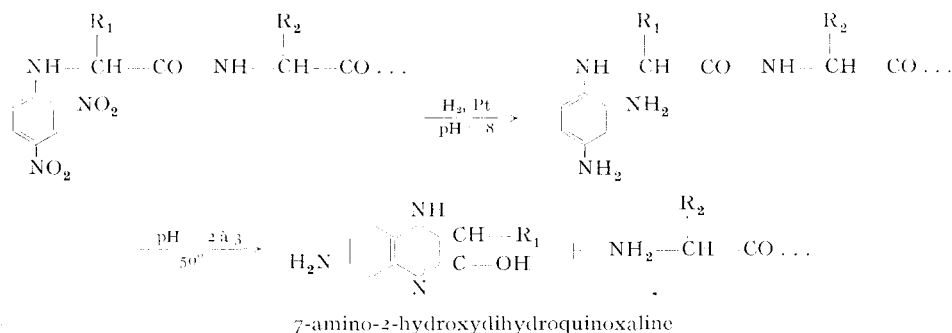
par

MARIAN JUTISZ ET WERNER RITSCHARD\*

(avec la collaboration technique de PEDRO DE LA LLOSA)

*Laboratoire de Chimie biologique de la Faculté des Sciences, Paris (France)*

La technique de SANGER<sup>1</sup>, aboutissant à la formation des DNP-peptides et DNP-protéines, telle qu'elle est utilisée actuellement, ne permet d'identifier que l'acide aminé N-terminal d'un peptide ou d'une protéine. Nous apportons dans le présent travail les premiers résultats d'un procédé de dégradation progressive d'une chaîne peptidique à partir de son extrémité aminée, substituée par un groupement DNP. Ce procédé dont le principe est fondé sur une réaction proposée par HOLLEY ET HOLLEY<sup>2</sup>, peut être schématisé de la façon suivante:



Le fluorodinitrobenzène (FDNB) agit, comme réactif de condensation, dans des conditions plus douces que le 4-carbométhoxy-2-nitrofluorobenzène utilisé par ces derniers auteurs<sup>2</sup>, et les dérivés qu'il donne avec les acides aminés et les peptides sont bien connus. Par contre les dérivés DNP donnent des produits de réduction extrêmement sensibles à l'oxydation, ce qui avait empêché HOLLEY ET HOLLEY d'utiliser cette réaction. Nous avons évité cette difficulté en effectuant toutes les opérations en atmosphère d'hydrogène ou d'azote.

Le premier stade de l'opération consiste à réduire, par hydrogénation catalytique en présence de platine\*\*, en NH<sub>2</sub> les groupes NO<sub>2</sub> d'un DNP-peptide. Dans un deuxième

\* Boursier de la "Stiftung für Stipendien auf dem Gebiete der Chemie" (Suisse). Adresse actuelle: Massachusetts General Hospital, Boston 14, Mass. (U.S.A.).

\*\* Nous utilisons actuellement de préférence le catalyseur industriel Baker (5 % de platine sur alumine; Baker, 113 Astor St., Newark, New Jersey (U.S.A.)). Il suffit, dans nos conditions opératoires, de 5 mg environ de ce catalyseur par opération, alors qu'il faut 10 mg de noir de platine, obtenu par réduction de son oxyde. En outre, nous avons observé, en particulier dans le cas du glycyl-glycocolle, la formation importante de dicétopipérazines, de même qu'une certaine hydrolyse, quand on agite ce dipeptide en milieu légèrement acide, en présence de noir de platine. Cet inconvénient n'existe pas dans le cas du catalyseur Baker.

stade, toujours en atmosphère d'hydrogène, l'acidification à pH 2 à 3 et le chauffage à 50° produisent une lactamisation entre le groupe  $\text{NH}_2$  en ortho et le carbonyle peptidique de l'acide aminé N-terminal; il se forme une 7-amino-2-hydroxydihydroquinoxaline avec libération du groupe aminé du résidu adjacent. Après séparation de la quinoxaline le peptide résiduel est traité par FDNB et le cycle des opérations est recommencé.

#### PARTIE EXPÉRIMENTALE

Les DNP-aminoacides et les DNP-peptides utilisés dans ce travail ont été préparés à l'état cristallisé par la méthode de SANGER<sup>1</sup>. La salmine (*Oncorhynchus*) employée, est un produit commercial (Sharp & Dohme, U.S.A.).

Quelques dihydroquinoxalines dérivées des DNP-aminoacides ont été synthétisées selon les indications de WALDMANN<sup>3</sup>, par réduction de ces derniers par la poudre d'étain en milieu chlorhydrique aqueux. On obtient, après précipitation de l'étain par un courant d'hydrogène sulfureux, les bichlorhydrates des 7-amino-2-hydroxydihydroquinoxalines correspondantes. Le rendement de ces préparations, faites sur environ 1 g d'un DNP-aminoacide, est en général assez faible, de l'ordre de 50%, les pertes étant dues essentiellement à l'oxydation au cours des recristallisations. Le point de fusion des bichlorhydrates est situé au dessus de 300°, avec décomposition des produits. Les quinoxalines suivantes ont été ainsi préparées: 7-amino-2-hydroxydihydroquinoxaline, 2HCl, (glycocolle); 7-amino-2-hydroxy-3-méthyldihydroquinoxaline, 2HCl (alanine); 7-amino-2-hydroxy-3-isopropyldihydroquinoxaline, 2HCl, (valine). Les dérivés de la leucine et de la proline, ainsi que la *o*-diaminophényltyrosine ont été obtenus seulement en solution, en vue d'une étude de leur comportement au cours de la chromatographie sur papier.

Les dihydroquinoxalines s'oxydent rapidement à l'air, surtout en solution alcaline, en quinoxalines<sup>4</sup>. Cette sensibilité à l'oxydation rend leur isolement et leur caractérisation difficile. On peut cependant les identifier par chromatographie sur papier; elles subissent alors une oxydation partielle et c'est sous cette forme oxydée qu'elles peuvent être décelées par une fluorescence bleue caractéristique\*. Nous n'avons jusqu'ici essayé qu'un seul système de solvants: butanol 75 + acide formique 15 + eau 10. Dans ce solvant, on observe pour les produits d'oxydation des dihydroquinoxalines de quelques acides aminés, les  $R_F$  moyens suivants: glycocolle 0.52; alanine 0.57; valine 0.80; leucine 0.90; proline 0.20; en outre la *o*-diaminophényltyrosine donne in  $R_F$  de 0.35 (après révélation à la ninhydrine seulement).

Les dihydroquinoxalines ne sont que très peu solubles dans les solvants organiques habituels<sup>3, 4</sup>; leur extraction à partir du milieu de réaction contenant un aminoacide, un peptide ou une protéine, pose donc un problème. La chromatographie sur papier permet de séparer les dihydroquinoxalines des aminoacides et des peptides, et nous l'avons utilisé pour contrôler qualitativement la dégradation de chaque DNP-peptide. Pour les essais quantitatifs nous avons cependant préféré transformer les quinoxalines en leurs DNP. Les DNP-quinoxalines, outre qu'elles sont stables vis à vis de l'oxygène atmosphérique, sont solubles dans l'acétate d'éthyle et on peut les séparer par extraction à partir de la solution aqueuse alcaline. Un exemple de cette séparation est cité ci-dessous.

\* Il est important de ne pas trop charger le chromatogramme en produits à examiner, l'excès des dihydroquinoxalines provoquant la formation des traînées.

Après une étude détaillée des conditions opératoires nous avons arrêté le mode opératoire suivant: 10  $\mu$ M environ d'un DNP-di ou tripeptide en solution dans 2 ml de bicarbonate de sodium à 0.5 % sont introduits dans le ballon à réaction d'un appareil classique à hydrogénation catalytique, suivis de 10 mg de noir de platine ou mieux, de 5 mg de catalyseur Baker. L'agitation dans l'atmosphère d'hydrogène dure environ 30 minutes. La solution jaune passe tout d'abord au brun rouge puis se décolore. La quantité théorique de  $H_2$  est absorbée en 15 à 20 minutes. On introduit alors dans le ballon, par la tubulure latérale, toujours en atmosphère d'hydrogène, 0.4 à 0.5 ml d'acide chlorhydrique 0.5 N. Après une agitation vigoureuse pendant quelques minutes à température ordinaire on plonge le ballon dans un bain-marie à 50° et l'on continue une faible agitation pendant un temps variant de 3 à 6 heures.

En vue de contrôler le rendement de la dégradation deux méthodes ont été utilisées:

(1) Dosage de l'acide aminé résiduel par la méthode ( $N/CO_2$ ) de VAN SLYKE et coll.<sup>5</sup> (pour les dipeptides seulement): après la lactamisation, la solution est filtrée pour séparer le catalyseur, on ajuste à 5 ml et l'on dose l'azote total (Kjeldahl), et l'acide aminé résiduel par la méthode ( $N/CO_2$ ) de VAN SLYKE et coll. La chromatographie sur papier dans butanol-acide formique permet le contrôle qualitatif de la réaction.

(2) Isolement et dosage de l'acide aminé ou du peptide résiduels sous forme de DNP: à la fin de la lactamisation l'hydrogène est chassé complètement du ballon à réaction par un courant d'azote (15 minutes en agitant à 40°)\*. On introduit dans le ballon, par une tubulure latérale, 2 ml de FDNB à 2 % dans l'acétone + 2 ml d'une solution aqueuse de bicarbonate de sodium à 7 % + 7 ml de l'acétone. On continue l'agitation, dans l'atmosphère d'azote, pendant deux heures. Au bout de ce temps on chasse l'acétone sous vide. On extrait trois fois par l'éther puis, après l'acidification par l'acide chlorhydrique 2 N, par l'acétate d'éthyle. Les DNP-quinoxalines passent, soit dans l'éther au cours de la première extraction, soit restent dans la phase acide aqueuse, alors que la plupart des DNP-aminoacides et des DNP-peptides sont extraits par l'acétate d'éthyle. Les extraits à l'acétate d'éthyle réunis sont évaporés à sec et l'on abandonne le résidu pour une nuit dans un dessiccateur sous vide, en présence de  $CaCl_2$  anhydre, de NaOH en pastilles et de la paraffine en copeaux. Ce résidu est ensuite purifié par chromatographie sur une colonne de Hyllo-Supercel tamponné à pH 7.25 en utilisant comme solvant le mélange chloroforme + méthyléthylcétone + eau<sup>6,7</sup>. La bande correspondant au DNP-aminoacide ou au DNP-peptide est dosée par spectrophotométrie et contrôlée par chromatographie sur papier.

Quand il s'agit d'un tripeptide, le cycle des opérations est recommencé sur une partie de l'extrait à l'acétate d'éthyle, purifié par chromatographie.

Dans le cas de la DNP-salmine, moins soluble que les DNP-peptides, nous avons dû modifier légèrement le procédé: 150 mg de la DNP-salmine (sulfate) sont dissouts dans environ 13 ml d'eau à 50° (le pH de cette solution est d'environ 2), on ajoute 0.46 ml d'une solution à 7 % de bicarbonate de sodium (pH 7.9) et 20 mg de noir de platine. L'hydrogénation est effectuée dans des conditions habituelles mais en maintenant le ballon à réaction, par un courant d'air chaud, à une température de 30° environ, pour empêcher que la DNP-salmine ne précipite sous forme d'huile. La réaction dure environ 2 h 30 min. Au bout de ce temps la solution, initialement jaune, se décolore complètement. On ajoute, en agitant, 0.4 ml d'acide sulfurique N (quantité suffisante pour neutraliser  $CO_3HNa$ ). On abandonne pendant une nuit à température ordinaire, puis on chauffe en agitant à 50° pendant 1 h 30 min. On refroidit le ballon dans la glace et l'on ajoute, en atmosphère d'hydrogène, un volume d'alcool, refroidi à 0°. Cette précaution est indispensable si l'on veut éviter la précipitation de la protamine dégradée sous forme d'huile. On centrifuge et lave le précipité à l'alcool et à l'éther.

Les eaux-mères de cette opération, devant contenir la quinoxaline dérivée de la DNP-proline, sont examinées par chromatographie sur papier dans le solvant: butanol 75 + acide formique 15 + eau 10.

Le précipité qui est formé de la salmine dégradée, mélangée au catalyseur et aux sels minéraux, est mis en suspension dans 6 ml d'alcool. On ajoute 2 ml de FDNB à 2 % dans l'acétone et 2 ml d'une solution de bicarbonate à 7 %. On agit pendant 15 heures à température ordinaire. On acidifie à pH 2 par acide sulfurique N, on refroidit dans la glace puis on précipite par un volume d'alcool froid. Le précipité ainsi obtenu, formé de la DNP-salmine dégradée, est lavé par l'alcool et par l'éther, puis séché dans un dessiccateur.

50 mg de ce produit sont hydrolysés par l'acide chlorhydrique 6 N, à 110°, pendant 12 heures. Cet hydrolysât, purifié selon les indications de MILLS<sup>7</sup>, a été examiné par chromatographie sur papier dans deux solvants différents: butanol 75 + acide formique 15 + eau 10 et alcool isoamylique + phénol + eau<sup>8</sup>.

Les résultats obtenus dans le cas de la dégradation de quelques DNP-peptides ont été rassemblés dans les Tableaux I et II.

On constate en examinant la Tableau I un léger écart entre les résultats obtenus

\*Il convient d'utiliser l'azote pur, débarrassé d'oxygène.

TABLEAU I

(Les réductions ont été effectuées en présence soit de noir de platine, soit de catalyseur Baker)

DNP-di-peptide	Rendement de la dégradation %		Temps de lactamisation (h)
	Dosage (N/CO <sub>2</sub> ) VAN SLYKE	Dosage par la méthode DNP	
Gly-Gly	93	80	3
DL-Ala-Gly	92	78	4.5
DL-Leu-Gly	93	87	6
Gly-DL-Ala	—	76	3
Gly-L-Leu	94	—	3
Gly-L-Tyr	97	—	6*
Gly-L-Try	98	—	12*

\* La lactamisation a été effectuée à température ordinaire.

TABLEAU II

(Les réductions ont été effectuées en présence de catalyseur Baker)

DNP-tri-peptide	Rendement de la dégradation % (Dosage par la méthode DNP)			Temps de lactamisation (h)
	I <sup>er</sup> stade	II <sup>ème</sup> stade	Total	
Gly-Gly-Gly	81	77	62.4	I:3; II:3
L-Leu-Gly-Gly	78	80	62.4	I:6; II:3

par les deux méthodes de dosage: la méthode (N/CO<sub>2</sub>) de VAN SLYKE et col. et la méthode d'isolement sous forme de DNP. Si l'on tient compte dans ce dernier cas des pertes subies au cours de la préparation et de la purification des aminoacides résiduels sous leur forme DNP<sup>9</sup>, on voit que les deux méthodes de dosage conduisent à des chiffres indiquant des rendements assez élevés. En ce qui concerne des tripeptides (voir Tableau II), il faudrait également apporter des corrections tenant compte des pertes.

Dans le cas de la salmine, la chromatographie sur papier a permis de déceler, dans les eaux-mères de précipitation de la salmine dégradée, une seule substance qui, par son  $R_F$  et sa fluorescence, se comporte comme la quinoxaline dérivée de la DNP-proline. D'autre part, un seul DNP-aminoacide a été identifié dans l'hydrolysate de la DNP-salmine dégradée, à savoir, la DNP-arginine. L'enchaînement N-terminal de la salmine étant Pro-Arg...<sup>10</sup>, ce résultat prouve que la DNP-proline terminale a été détachée de la DNP-salmine.

## DISCUSSION

Notre premier souci en mettant au point cette méthode a été d'éviter des réactions secondaires et d'obtenir des rendements aussi élevés que possible. Les réactions secondaires qui, dans ce procédé, sont dues principalement à l'oxydation des produits de réaction, sont éliminées en travaillant en l'absence totale d'oxygène.

Une explication s'impose en ce qui concerne les rendements: le premier stade de l'opération consistant en une réduction des groupes NO<sub>2</sub>, nous avons pu constater, en mesurant la quantité de H<sub>2</sub> absorbé, que cette réduction était pratiquement quantitative en milieu légèrement alcalin (pH = 8), et en présence de bicarbonate de sodium. Le

deuxième stade, la lactamisation, doit être précédée obligatoirement d'une rupture de la liaison peptidique adjacente de l'acide aminé terminal N-substitué. Après une série d'essais nous avons constaté que les meilleurs résultats étaient obtenus en effectuant cette opération en présence d'acide chlorhydrique ou d'acide sulfurique, à pH 2 à 3, et à 50° environ; la durée du chauffage dépendant de la nature du résidu terminal (la présence de l'hydrogène à ce stade évite des réactions secondaires). Dans la Fig. 1 nous avons présenté à titre d'exemple la courbe de la libération du glycylglycocolle, en fonction du temps, à partir du DNP-L-leucyl-glycylglycocolle, traité dans les conditions citées plus haut, en présence de catalyseur Baker. Cette courbe ayant l'aspect classique des courbes d'hydrolyse acide partielle des peptides, nous pensons qu'il s'agit là aussi d'un phénomène d'hydrolyse, suivi d'une lactamisation. Le groupe  $\text{NH}_2$  en ortho du radical diaminophényle est certainement responsable de la labilisation particulière de la liaison peptidique adjacente. Cette hydrolyse ne se fait cependant à température ordinaire, sauf dans le cas de certains glycyl-peptides, qu'avec un assez mauvais rendement.

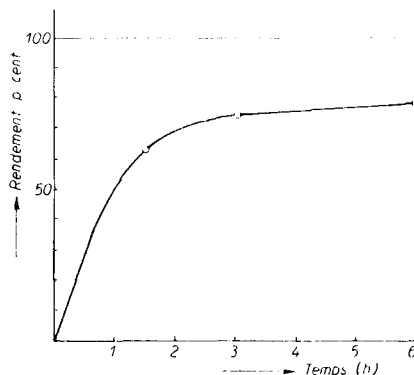


Fig. 1. Libération du Gly-Gly à partir du DNP-L-Leu-Gly-Gly. Voir explications dans le texte.

### RÉSUMÉ

Un procédé de dégradation progressive d'une chaîne peptidique à partir de son extrémité aminée, substituée par un groupement DNP, a été mis au point. Ce procédé consiste à réduire, par hydrogénation catalytique en présence de platine, en  $\text{NH}_2$  les groupes  $\text{NO}_2$  d'un DNP-peptide. L'acidification à pH 2 à 3 et le chauffage à 50°, en atmosphère d'hydrogène, produisent ensuite une lactamisation entre le groupe  $\text{NH}_2$  en ortho et le carbonyle peptidique de l'acide aminé N-terminal; il se forme une 7-amino-2-hydroxydihydroquinoxaline avec libération du groupe aminé du résidu adjacent. Après séparation de la quinoxaline, le peptide résiduel est traité par FDNB et le cycle des opérations est recommencé. Les résultats encourageants ont été obtenus dans le cas de la dégradation de quelques DNP-peptides par cette technique.

### SUMMARY

A stepwise degradation of DNP-peptides has been developed. This procedure consists of reduction of the  $\text{NO}_2$  groups of the DNP-peptide to  $\text{NH}_2$  groups by catalytic hydrogenation in the presence of platinum. Treating at 50° C at pH 2 to 3, in an atmosphere of hydrogen, results in a lactam formation between the ortho- $\text{NH}_2$  group and the peptidic carbonyl group of the N-terminal amino acid; this forms a 7-amino-2-hydroxydihydroquinoxaline with liberation of an  $\text{NH}_2$  group of the adjacent residue. After separation of the quinoxaline the residual peptide is treated by FDNB and the cycle of operations recommenced. Promising results have been obtained using this method for the degradation of some DNP-peptides.

### ZUSAMMENFASSUNG

Es wurde eine neue Methode zum schrittweisen Abbau von DNP-Peptiden ausgearbeitet. Diese Methode besteht aus einer Reduktion der Nitrogruppen des DNP-Peptids zu Aminogruppen, mittels katalytischer Hydrierung in Gegenwart eines Platinkatalysators. Es erfolgt bei einem pH von 2 zu 3, bei 50° C und in Wasserstoffatmosphäre, eine Lactamisierung zwischen der Orthoaminogruppe

und der Peptidcarbonylgruppe der am Aminoende befindlichen Aminosäure; durch diese Reaktion bildet sich ein 7-Amino-2-hydroxydihydrochinoxalin, unter Freisetzung der Aminogruppe des nächststehenden Aminosäurerests. Nach Abtrennung des Chinoxalins wird das Restpeptid mit FDNB behandelt und der Operationszyklus wiederholt. Mit dieser Methode wurden an einigen DNP-Peptiden vielversprechende Ergebnisse erhalten.

## BIBLIOGRAPHIE

- <sup>1</sup> F. SANGER, *Biochem. J.*, 39 (1945) 507.
- <sup>2</sup> R. W. HOLLEY ET A. D. HOLLEY, *J. Am. Chem. Soc.*, 74 (1952) 5445.
- <sup>3</sup> E. WALDMANN, *J. Pract. Chem.*, 91 (1915) 190.
- <sup>4</sup> J. E. C. SIMPSON, *Condensed Pyridazine and Pyrazine Rings (Cinnolines, Phthalazines and Quinoxalines)*, Interscience, New York, 1953, p. 203.
- <sup>5</sup> D. D. VAN SLYKE, D. A. MCFADYEN ET P. HAMILTON, *J. Biol. Chem.*, 141 (1941) 671.
- <sup>6</sup> J. C. PERRONE, *Nature*, 167 (1951) 513.
- <sup>7</sup> G. L. MILLS, *Biochem. J.*, 50 (1952) 707.
- <sup>8</sup> G. BISERTE ET R. OSTEUX, *Bull. soc. chim. biol.*, 33 (1951) 50.
- <sup>9</sup> W. A. SCHROEDER ET J. LE GETTE, *J. Am. Chem. Soc.*, 75 (1953) 4612.
- <sup>10</sup> R. MONIER ET M. JUTISZ, *Biochim. Biophys. Acta*, 14 (1954) 551.

Reçu le 31 janvier 1955