

149. Fritz Micheel und Christoph Berding: Synthese eines hochpolymeren DL-Lysyl-L-tyrosyl-peptides

[Aus dem Organisch-Chemischen Institut der Universität Münster (Westf.)]

(Eingegangen am 23. März 1955)

Es werden Poly-DL-lysyl-L-tyrosine synthetisiert, in denen das Verhältnis der Komponenten wie 1:3, 1:1 und 3:1 ist. Das Produkt mit einem Lysyl-/Tyrosyl-Gehalt von 1:1 zeigt ein osmotrisch gemessenes Mindest-Mol.-Gewicht von 50–55000 und erweist sich elektrophoretisch als einheitlich. Messungen in der Ultrazentrifuge zeigen, daß neben einer Hauptkomponente noch kleinere Mengen von Nebenkomponten mit höherem Mol.-Gew. vorliegen.

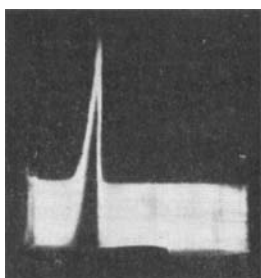
Wir haben eine Reihe von Synthesen von Polypeptiden nach dem Prinzip der Polymerisation der *N*-Carboxy-anhydride der Aminosäuren durchgeführt¹). Insbesondere wurden Polymerisate des DL-Lysins und des L-Tyrosins sowie Mischpolymerisate aus beiden dargestellt. Ein Poly-DL-lysin von einem Mol.-Gew. bis zu 12000 ist bekannt²). Ein Poly-L-tyrosin, das kürzlich³) beschrieben wurde, deckt sich mit dem von uns damals schon dargestellten hinsichtlich seiner Eigenschaften und seines Molekulargewichtes (bis zu 13000), so daß auf seine Beschreibung verzichtet wird. Hingegen beschreiben wir ein Mischpolymerisat aus DL-Lysin und L-Tyrosin, weil dieser Typ noch nicht bekannt und gegen über den nur aus einer Aminosäure bestehenden bisher bekannten durch seine Eigenschaften bemerkenswert ist. Wir haben Mischpolymerisate mit einem Verhältnis von L-Tyrosin zu DL-Lysin von 1:3 (I), 1:1 (II) und 3:1 (III) hergestellt. Ausgangsstoffe waren das ϵ -*N*-Carbobenzoxycarboxy-DL-lysin-anhydrid und das *O*-Carbobenzoxycarboxy-L-tyrosin-anhydrid. Beide Anhydride wurden in reiner kristallisierter Form angewandt. Die Mischpolymerisation wurde in der Wärme in mit Wasser gesättigtem Benzol vorgenommen. Nach Abspaltung der Carbobenzoxycarboxy-Reste wurden die erhaltenen Polymerisationsprodukte durch Dialyse in Cellophanschläuchen bei p_H 8 und p_H 3.5 von niedrigmolekularen Anteilen befreit. Die Molekulargewichtsbestimmung nach der osmotrischen Methode (Apparatur nach B. H. Zimm und I. Myerson⁴)) ergab für Präparate von jeweils maximalem Polymerisationsgrade folgende Werte: I 12–13000, II 48–55000, III 18–21000. Zu diesen Werten ist zu bemerken, daß die wahren Molekulargewichte erheblich höher liegen müssen. Die Copolymerisate gelangten als Hydrochloride zur Verwendung und enthielten pro NH_3^+ -Gruppe je Lysinrest ein Chlorion, so daß infolge der Dissoziation das wirkliche Molekulargewicht höher sein dürfte. Die Lösungen der freien Copolymerisate reagieren in Wasser stark basisch, so daß auch mit ihnen bei der osmotischen Bestimmung nur Mindestmolekulargewichte erhalten werden könnten.

¹) H. Leuchs, Ber. dtsch. chem. Ges. **39**, 857 [1906].

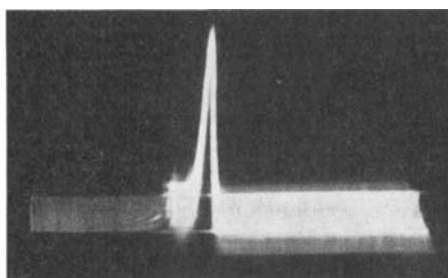
²) E. Katchalski, J. Amer. chem. Soc. **70**, 2094 [1948]; R. R. Becker u. M. A. Stahmann, J. Amer. chem. Soc. **74**, 38 [1952].

³) E. Katchalski, J. Amer. chem. Soc. **75**, 5284 [1953]; K. Schlögl u. F. Wessely, Mh. Chem. **84**, 705 [1953]. ⁴) J. Amer. chem. Soc. **68**, 911 [1946].

Der Tyrosin-Gehalt der Copolymerisate wurde auf Grund der Absorption bei 293.5 m μ (bei p_H 12.1) photometrisch bestimmt, wobei ein Poly-tyrosin (Mol.-Gew. 6000) als Bezugssubstanz diente. Eingehender haben wir Copolymerisat II mit einem Verhältnis von 1:1 der Komponenten untersucht, weil es wegen seines hohen Mol.-Gewichtes besonders interessierte. Jedoch verhalten sich die Copolymerisate I und III grundsätzlich analog. Zunächst war die Frage zu prüfen, ob es sich um ein echtes Copolymerisat handelt, oder ob vielleicht ein Gemisch von Poly-lysin und Poly-tyrosin vorläge. Weiter war von Interesse, ob die Makromoleküle alle etwa die gleiche Zusammensetzung haben, oder ob das analytisch ermittelte Verhältnis von Tyrosin: Lysin von 1:1 nur ein statistischer Mittelwert aus Copolymerisaten mit hohem Lysin- und geringem Tyrosin-Gehalte einerseits und von geringem Lysin- und hohem Tyrosin-Gehalte andererseits ist. Hierüber mußte die Elektrophorese Auskunft geben. Bei der Messung in der Elektrophorese-Apparatur nach Antweiler zeigte sich nur eine einzige scharfe Zacke (Abbild. 1: Copolymerisat Tyrosin:Lysin = 1:1, Abbild. 2: Tyrosin:Lysin = 1:3). e/m muß also bei den Präparaten innerhalb sehr enger Grenzen liegen. Ein Gemisch aus Poly-lysin und Poly-tyrosin würde wegen der starken polaren Verschiedenheiten



Abbild. 1. Elektropherogramm: Copolymerisat II (Tyrosin: Lysin = 1:1)



Abbild. 2. Elektropherogramm: Copolymerisat I (Tyrosin: Lysin = 1:3)

der beiden Aminosäurebausteine zwei wesentlich verschiedene Zacken liefern. Aber auch ein Copolymerisat, das aus Molekülen besteht, die unter sich einen stark voneinander abweichenden Gehalt an beiden Aminosäuren hätten, würde mit Rücksicht auf die starken Unterschiede in der Polarität der basischen Lysin- und der sauren Tyrosin-Reste mindestens eine breite, wenn nicht mehrere Banden erwarten lassen. Die Schlußfolgerung ist also begründet, daß die Moleküle der Copolymerisate hinsichtlich ihres strukturellen Aufbaus recht einheitlich sind.

Um auch zu ermitteln, wie das beim Copolymerisat II osmotrisch gefundene mittlere Mindestmolekulargewicht von über 50000 zu bewerten ist, wurde dies Poly-DL-lysyl-L-tyrosin in der Ultrazentrifuge untersucht. Auch hier zeigte sich eine hohe Homogenität des Stoffes. Abbild. 3 zeigt das Diagramm (Philpot-Svensson-Methode) nach 105 Min. bei 50000 Touren („Phywe“-

Ultrazentrifuge), Abbild. 4 zeigt das gleiche Präparat nach 124 Min. ($c = 1\%$). Wie man sieht, ist das Polymerisat auch hinsichtlich seines Molekulargewichtes verhältnismäßig einheitlich. Neben einer Hauptkomponente finden



Abbild. 3. Philpot-Svensson-Aufnahme:
Copolymerisat II, 105 Min. bei 50000
Touren, $c = 1\%$



Abbild. 4. Philpot-Svensson-Aufnahme:
Copolymerisat II, 124 Min. bei 50000
Touren, $c = 1\%$

sich geringere Mengen dreier Komponenten mit größerem Molekulargewicht. Das Diagramm bei Verwendung von 0.5-proz. Lösung ist analog. Die weitere Auswertung der Messungen in der Ultrazentrifuge ist noch nicht abgeschlossen. Unter Berücksichtigung der Ergebnisse der Elektrophorese ist zu folgern, daß die Haupt- und Nebenkompontenten des Copolymerisates einen mindestens sehr ähnlichen strukturellen Aufbau haben.

Lösungen des Copolymerisates II geben mit Lösungen von Serumalbumin Fällungen. Eine antigene Wirkung am Kaninchen ließ sich infolgedessen durch die Präcipitinreaktion nicht feststellen. Hingegen sind die Stoffe erheblich giftig. 25–30 mg/kg, intravenös verabfolgt, führen beim Kaninchen in weniger als 1 Min. zum Tode. Vermutlich ist infolge der eiweißfällenden Wirkung des Copolymerisates der Tod durch Thrombose eingetreten. Die sofort ausgebluteten Tiere hatten große Blutgerinnsel in den großen zum Herzen und der Lunge führenden Gefäßen. Infolge der Giftigkeit konnte auch ein anaphylaktischer Schock nicht mit Sicherheit festgestellt werden, jedoch trat ein Abfall der Körpertemperatur um $1.5\text{--}2^\circ$ ein.

Beschreibung der Versuche

Die Darstellung des ϵ -*N*-Carbobenzoxym- α -*N*-carboxy-DL-lysin-anhydrids und des *O*-Carbobenzoxym-*N*-carboxy-L-tyrosin-anhydrids erfolgt nach Methoden, die den Angaben der Literatur⁵⁾ weitgehend entsprechen.

Copolymerisation

Die reinen, kristallisierten Anhydride des ϵ -*N*-Carbobenzoxym- α -*N*-carboxy-DL-lysin und des *O*-Carbobenzoxym-*N*-carboxy-L-tyrosins werden im gewünschten Verhältnis (1:3, 1:1 und 3:1⁶⁾) in 3–5-proz. Lösung von mit Wasser gesättigtem Benzol 24 Stdn. unter Rückfluß erhitzt. Der Kolbeninhalt wird gallertartig. Es wird mit Petroläther ausgefällt, abzentrifugiert, ausgewaschen und i. Hochvak. über Kaliumhydroxyd, Diphosphorpentoxyd und Paraffinschnitzeln getrocknet. Die Ausbeuten an den Poly- ϵ -*N*-carbobenzoxym-DL-lysyl-*O*-carbobenzoxym-L-tyrosinen betragen über 90% d. Theorie.

⁵⁾ E. Katchalski, J. Amer. chem. Soc. 74, 3688 [1952].

⁶⁾ Gewichtsverhältnis; das Mol.-Verh. ist etwas geringer an Tyrosin- und etwas größer an Lysin-Derivat, reziprok den Mol.-Gewichten von 341.3 bzw. 306.3.

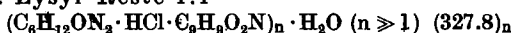
Poly-DL-lysyl-L-tyrosine*)

Die Carbobenzoxy-Derivate werden mit der 5fachen Menge 36-proz. Eisessig-Bromwasserstoff übergossen. Es erfolgt zunächst Lösung unter Abspaltung von Kohlendioxyd, anschließend Abscheidung des Reaktionsproduktes. Nach 30–45 Min. wird mit Äther gefällt, abzentrifugiert und der Rückstand gut auf der Zentrifuge mit Äther ausgewaschen. Zur Reinigung wird 3mal im rotierenden Cellophanschlauch dialysiert:

1. 24 Stdn. bei p_H 8.5 im Innen- und Außenraum
2. 24 Stdn. bei p_H 3.5 „ „ „ „
3. 48 Stdn. gegen dest. Wasser.

Der Inhalt der Dialysen-Innenräume wird vorsichtig i. Vak. eingedampft (starkes Schäumen) und der jeweilige Rückstand gut getrocknet. Die Ausbeuten liegen über 70% d. Theorie.

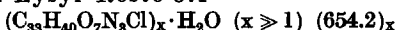
Tyrosyl-Reste: Lysyl-Reste 1:1



Ber. C 54.97 H 6.76 N 12.82 Cl 10.68

Gef.** C 54.89 H 6.53 N 11.23 Cl 10.45 (4% Rückstand)

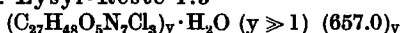
Tyrosyl-Reste: Lysyl-Reste 3:1



Ber. C 61.03 H 6.16 N 10.7 Cl 5.35

Gef.** C 61.93 H 5.82 N 10.9 Cl 5.98 (9% Rückstand)

Tyrosyl-Reste: Lysyl-Reste 1:3



Ber. C 49.44 H 7.38 N 14.95 Cl 16.24

Gef.** C 50.42 H 7.04 N 14.1 Cl 14.1 (5% Rückstand)

Der Tyrosin-Gehalt der Copolymerisate wird photometrisch bei 293.5 m μ im Spektral-photometer „Unicam S P 500“ gemessen. Die Eichkurve wird mit reinem Poly-L-tyrosin ermittelt.

Tyrosin-Gehalt

Mol.-Verh. Tyrosyl-Reste : Lysyl-Reste	ber. (Mol.-%)	gef. (Mol.-%)
3:1	74.84	70.7
1:1	49.79	52.1
1:3	24.84	21.8

Mindestmolekulargewichte der höchstpolymerisierten Produkte, osmometrisch gemessen in der Apparatur nach Zimm und Myerson⁴):

Copolymerisat Tyrosyl-Reste : Lysyl-Reste	Mol.-Gew. gef.
1:3	12000–13000
1:1	48000–55000
3:1	18000–21000

Die elektrophoretische Untersuchung erfolgte in der nach Antweiler entwickelten Apparatur (s. Abbild. 1 und 2). Die Messungen in der Ultrazentrifuge wurden an einem „Phywe“-Instrument vorgenommen. Tourenzahl 49–50000, $c = 1\%$ und 0.5% in 0.2 m NaCl , Meßmethodik nach Philpot-Svensson (s. Abbild. 3 und 4).

*) Durch den Namen soll keine Aussage über die Reihenfolge der Reste gemacht werden. **) Nach Abzug des Ascherückstandes.