

FRITZ MICHEEL und HANS LEO HÜLSMANN

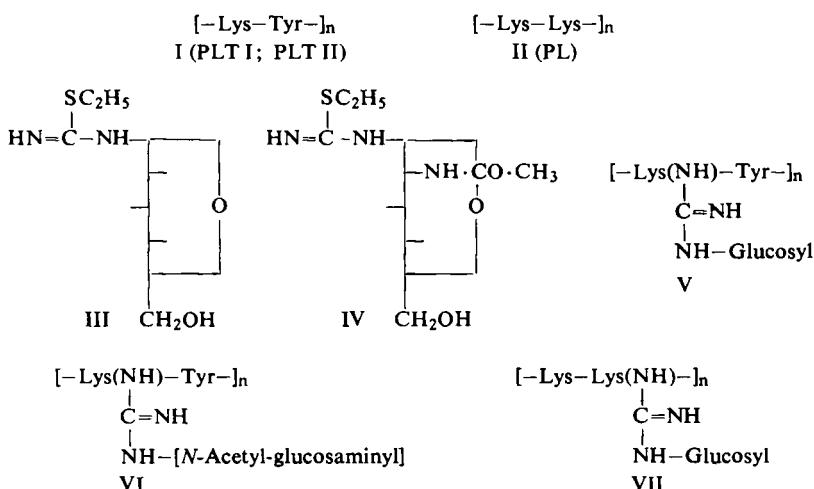
Synthetische*) Darstellung von Modellen für Kohlenhydrat-Eiweißverbindungen

Aus dem Organisch-Chemischen Institut der Universität Münster (Westf.).
(Eingegangen am 11. Juni 1959)

Poly-DL-lysyl-L-tyrosine verschiedener Zusammensetzung werden synthetisiert. Diese, wie auch Poly-L-lysin, werden mit 1- β -[S-Äthyl-isothioureido]-D-glucose oder mit N-Acetyl-1- β -[S-äthyl-isothioureido]-D-glucosamin an der ϵ -Amino-gruppe der Lysinreste zu den entsprechenden Guanyl-Derivaten kondensiert. Diese sind nach ihrer Zusammensetzung und ihren Mol.-Gewichten synthetische Modelle für Kohlenhydrat-Eiweißverbindungen.

Zur Synthese von Kohlenhydrat-Proteinverbindungen aus ihren Bausteinen, nämlich Aminosäuren und Zuckern, wurde folgender Weg beschritten: Zunächst stellten wir, wie von F. MICHEEL und CH. BERDING¹⁾ beschrieben, aus den *N*-Carbonsäure-anhydriden nach der Methode von H. LEUCHS²⁾ die folgenden Produkte her:

1. Poly-DL-lysyl-L-tyrosin mit einem Mol.-Verhältnis der Komponenten von 1:1 („PLT I“)
 2. Poly-DL-lysyl-L-tyrosin mit einem Mol.-Verhältnis der Komponenten von 3:1 („PLT II“)
 3. Poly-DL-lysin („PL“).



^{*)} Synthetisch in Bezug auf die Komponenten: Aminosäuren und Zucker.

¹⁾ Chem. Ber. 88, 1062 [1955]. ²⁾ Ber. dtsch. chem. Ges. 39, 857 [1906].

Für PLT I wurde in der Ultrazentrifuge ein Mol.-Gewicht von 10500, für PLT II ein solches von 23900 ermittelt³⁾.

Einzelheiten finden sich im Versuchsteil. Auch bei der Elektrophorese erwiesen sich PLT I und II sowie PL als weitgehend homodispers.

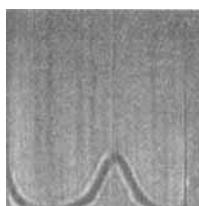
Diese Polypeptide wurden mit 1- β -[S-Äthyl-isothioureido]-D-glucose (III)⁴⁾ oder mit N-Acetyl-1- β -[S-äthyl-isothioureido]-D-glucosamin (IV)⁵⁾ an den ϵ -Aminogruppen ihrer Lysinreste kondensiert. Es werden die Poly- N^{ϵ} -[1- β -D-glucosyl-guanyl]-DL-lysyl-L-tyrosine (V) und die Poly- N^{ϵ} -[N-acetyl-1- β -D-glucosaminyl-guanyl]-DL-lysyl-L-tyrosine (VI) erhalten. Mit Poly-DL-lysin wird Poly- N^{ϵ} -[1- β -D-glucosyl-guanyl]-DL-lysin (VII) gewonnen. Je nach den Reaktionsbedingungen konnten mehr oder weniger ϵ -Aminogruppen der DL-Lysinreste besetzt werden. Wir haben Kondensationsprodukte näher untersucht, die einen D-Glucosegehalt bei PLT I zwischen 6.2 und 22.9% (11% bzw. 50% der Aminogruppen besetzt), bei PLT II von 19.7 und bei PL von 27.9% (25.7 bzw. 29% der Aminogruppen besetzt) aufwiesen. Zur Ermittlung der Zusammensetzung wurden der Kohlenhydratgehalt, der Tyrosingehalt und der Gehalt an freien Aminogruppen bestimmt. Mit IV haben wir Kondensationsprodukte aus PLT I und aus PLT II mit einem D-Glucosamingehalt von 34.9 bzw. 42.4% hergestellt (Besetzungsgrad 66 bzw. 75% der Aminogruppen).

Nähtere Angaben finden sich im Versuchsteil.



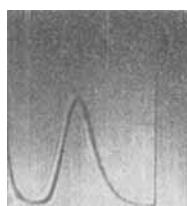
Abbild. 1

Sedimentationsbild der 1-proz. Lösung eines Kondensationsproduktes von PLT I mit III in 0.2 m NaCl-Lösung; Laufzeit 25 Min. bei 49 000 U/Min. in der Phywe-Ultrazentrifuge, Normalzelle, Philpot-Winkel 25°



Abbild. 2

Sedimentationsbild der 0.3-proz. Lösung eines Kondensationsproduktes von PLT I mit III in 0.2 m NaCl-Lösung; Laufzeit 45 Min. bei 25 000 U/Min. in der Phywe-Ultrazentrifuge, Unterschichtungszelle, Philpot-Winkel 45°



Abbild. 3

Sedimentationsbild der 1-proz. Lösung eines Kondensationsproduktes von PLT II mit IV in 0.2 m NaCl-Lösung; Laufzeit 25 Min. bei 49 000 U/Min. in der Phywe-Ultrazentrifuge, Unterschichtungszelle, Philpot-Winkel 30°

³⁾ Diese Untersuchungen mit der Phywe- und Spinco-Ultrazentrifuge wurden von H. RUDOLPH ausgeführt (vgl. Dissertation, RUDOLPH, Univ. Münster (Westf.) 1959). Wir sind dem WIRTSCHAFTSMINISTERIUM DES LANDES NORDRHEIN-WESTFALEN für die Bereitstellung von Mitteln für die Ultrazentrifuge „Spinco“ zu großem Dank verpflichtet.

⁴⁾ F. MICHEEL und W. BERLENBACH, Chem. Ber. **85**, 189 [1952].

⁵⁾ F. MICHEEL und W. LENGSFELD, Chem. Ber. **89**, 1246 [1956].

Messungen in der Ultrazentrifuge zeigten ein unterschiedliches Verhalten der Stoffe aus PLT I und aus PLT II. Während die Ausgangspolypeptide PLT I und PLT II homodispers waren, erwiesen sich die Kondensationsprodukte von PLT I (Lysin:Tyrosin = 1:1) mit III und mit IV als weitgehend heterodispers. Dies trat jedoch nur bei hoher Tourenzahl in Erscheinung (49000) (s. Abbild. 1). Bei niedrigerer Tourenzahl (25000) (s. Abbild. 2) erschien eine breite Bande, aus der die mittlere Sedimentationskonstante berechnet wurde. Möglicherweise ist der hohe Tyrosingehalt die Ursache für eine Assoziation. Darauf deutet die starke Zunahme der Sedimentationskonstanten von 0.66 für PLT I auf 5.6 bei V mit einem Glucosegehalt von 22.9% hin; analog 4.71 bei VI mit Glucosamingehalt von 34.9%. Anders verhielten sich die Kondensationsprodukte V und VI, die aus PLT II mit III bzw. IV erhalten wurden. Sie erwiesen sich auch bei hoher Tourenzahl als weitgehend homodispers (s. Abbild. 3). Die Sedimentationskonstanten stiegen normal. V, aus PLT II und III erhalten, zeigte 2.16, VI aus PLT II und IV erhalten, 2.63.

Die Zunahme des Mol.-Gewichtes steht ebenfalls mit der Menge der aufgenommenen Kohlenhydratreste in Einklang. Aus PLT II (Mol.-Gew. 23900) wurde mit III ein Präparat V vom Kohlenhydratgehalt 19.7% und Mol.-Gew. 30800 und mit IV ein Präparat VI vom Kohlenhydratgehalt 42.4% und Mol.-Gew. 45000 erhalten. Man kann beide Stofftypen hinsichtlich ihres Mol.-Gewichtes und ihres Verhaltens als Modelle für Kohlenhydrat/Eiweißverbindungen ansprechen.

Die erhaltenen Stoffe wurden auf ihr mögliches antigenes Verhalten geprüft. Es gelangten zur Anwendung: PLT I, ferner VI mit einem Kohlenhydratgehalt von 6.2% und von 22.9%. Die in üblicher Weise durch intravenöse Gaben nach Art einer Immunisierung behandelten Kaninchen zeigten bei erneuten Gaben (20 mg je Tier intravenös) keinerlei Anzeichen eines anaphylaktischen Schocks oder eine Temperaturerniedrigung (anal mit dem Thermorapidinstrument*) gemessen).

Für die Unterstützung der Untersuchungen durch das WIRTSCHAFTSMINISTERIUM DES LANDES NORDRHEIN-WESTFALEN und den FONDS DER CHEMIE sind wir zu Dank verpflichtet.

BESCHREIBUNG DER VERSUCHE

In Anlehnung an die Vorschrift von F. MICHEEL und CH. BERDING¹⁾ wurden die folgenden hochpolymeren Polypeptide hergestellt:

1. *Poly-DL-lysyl-L-tyrosin* (PLT I) mit einem Mol.-Verhältnis beider Aminosäure-Reste von 1:1.
2. *Poly-DL-lysyl-L-tyrosin* (PLT II) mit einem Mol.-Verhältnis von Lysyl/Tyrosyl-Resten von 3:1.
3. *Poly-DL-lysin* (PL).

N^ε-Carbobenzoxy-N^α-carboxy-DL-lysin-anhydrid und *O-Carbobenzoxy-N-carboxy-L-tyrosin-anhydrid* wurden in Benzol unter Verwendung von Wasser als Initiator polymerisiert. Anfangs wurde die Temperatur mehrere Std. unterhalb von 70° gehalten, um ein Abdestillieren des Wassers zu verhindern; dann wurde 24 Std. unter Rückfluß zum Sieden erhitzt. Nach Abspalten der Carbobenzoxyreste mit Eisessig/HBr und Entfernen aller niedrigmolekularen Anteile

*) NETHELER & HINZ, Hamburg.

durch Schnelldialyse in rotierenden Cellophanschläuchen wurden die Lösungen i. Vak. eingedampft und die Polypeptid-hydrobromide aus den konzentrierten Lösungen durch Zugabe von Alkohol/Äther (1:1) nach vorherigem Ansäuern mit verd. Bromwasserstoffsäure auf den p_{H} -Wert 2 gefällt. Die amorphen Produkte (Polypeptide) wurden abzentrifugiert, gewaschen und gut getrocknet.

PLT I: $(\text{C}_{15}\text{H}_{22}\text{BrN}_3\text{O}_3)_n \cdot \text{H}_2\text{O}$ (372.3)_n Ber. C 48.36 H 5.96 Br 21.47 N 11.28

Gef. C 48.16 H 6.16 Br 20.97 N 11.31

PLT II: $(\text{C}_{27}\text{H}_{48}\text{BrN}_7\text{O}_5)_n \cdot \text{H}_2\text{O}$ (790.5)_n Ber. C 41.02 H 6.16 Br 33.33 N 12.41

Gef. C 41.86 H 6.55 Br 25.89 N 12.94

PL: $(\text{C}_6\text{H}_{13}\text{BrN}_2\text{O})_n \cdot \text{H}_2\text{O}$ (209.1)_n Ber. N 13.40 Gef. N 12.85

Alle Präparate sind aschefrei.

Die Bestimmung des Tyrosingehaltes erfolgte durch Messung der UV-Absorption bei 293.5 m μ mit Hilfe eines Spektralphotometers Unicam SP 500. Die Eichkurve wurde an reinem Poly-L-tyrosin aufgenommen.

Die freien NH₂-Gruppen wurden nach dem von G. KAINZ⁶⁾ ausgearbeiteten mikrovolumetrischen Verfahren bei 100° bestimmt. In jedem Falle wurde der Desaminierungslösung Kaliumjodid zugesetzt.

Tab. 1 gibt die auf das Mol.-Verhältnis Lysin zu Tyrosin von 1:1 bzw. 3:1 berechneten und gefundenen Werte.

Tab. 1. Mikrovolumetrische Bestimmung der Aminogruppen in den hochpolymeren Peptiden

Proz. Gehalt an	PLT I	PLT II	PL
Tyrosylresten	ber. 43.83	20.64	—
	gef. 45.4	22.2	
Aminogruppen	ber. 3.76	5.32	6.70
	gef. 3.8	5.0	6.4

Untersuchungen in der Ultrazentrifuge: Die Bestimmung der Mol.-Gewichte erfolgte in der üblichen Weise durch Ermittlung der Sedimentationskonstanten und des Diffusionskoeffizienten nach der Svedberg-Formel. Die Messungen in der Ultrazentrifuge (Phywe) wurden in 0.2 m NaCl-Lösung bei verschiedenen Konzentrationen vorgenommen. Die Präparate erwiesen sich als weitgehend homodispers. Die Bestimmung des Diffusionskoeffizienten erfolgte in einer Quarz-Überschichtungszelle der Apparatur nach ANTWEILER. Die Ergebnisse finden sich in Tab. 2.

Tab. 2. Sedimentationsdaten der hochpolymeren Polypeptide

Polypeptid	S_0 (293° K)	D_0	V_p	M
PLT I	0.66	$4.5 \cdot 10^{-7}$	0.656	10 500
PLT II	1.22	$10.9 \cdot 10^{-7}$	0.879	23 900

S_0 = Svedberg-Konstante

V_p = partielles spezif. Vol.

D_0 = Diffusionskoeffizient

M = Mol.-Gewicht

An PLT II wurde in der Ultrazentrifuge „Spinco“ eine Mol.-Gewichtsbestimmung nach der Methode von ARCHIBALD durchgeführt. Für die 0.5-proz. Lösung ergab sich 23 700 in Übereinstimmung mit obigem Wert.

⁶⁾ Mikrochem. verein. Mikrochim. Acta 1953, 349.

Darstellung der Kohlenhydrat-Polypeptide: Getrennt hergestellte wäbr. Lösungen der synthet. Polypeptide (PLT I und II bzw. PL) und von III bzw. IV werden vereinigt und die p_{H} -Werte der Reaktionsgemische durch Zugabe von verd. Natronlauge auf den Bereich von 7.5–8.5 eingestellt. Nach 2tägigem Aufbewahren bei 40° werden die Reaktionslösungen durch 3tägige Schnelldialyse in bewegten Cellophanschläuchen von niedrigmolekularen Produkten befreit und sodann vorsichtig i. Vak. eingeengt. Der Rest der Lösungsmittel wird im Exsikkator über KOH und P_2O_5 entfernt.

Tab. 3 gibt einen Überblick über die Darstellungsbedingungen und die analytisch ermittelten Daten der D -Glucosyl-guanyl-polypeptide.

Tab. 3

	PLT I	PLT I	PLT II	PL
Polypeptid (in g)	1.5	0.5	0.5	0.5
III (in g)	6	6	4	4
p_{H} -Wert	8.5	7.8	8.0	8.0
Ausb. (in g)	1.15	0.42	0.39	0.40
Kohlenhydratgehalt (%)	6.2	22.9	19.7	27.9
umgesetzte NH_2 -Gruppen (%)	11.0	50.0	25.7	29
Amino-N	ber. *) (%)	3.99	1.78	4.43
	gef. (%)	3.6	1.4	4.3
Tyrosylgehalt	ber. *) (%)	52.13	41.50	23.15
	gef. (%)	49.5	40.0	19.8

*) Berechnet auf den gefundenen Kohlenhydratgehalt.

Die Kohlenhydratbestimmungen erfolgten nach der Methode von H. SØRENSEN und G. HAUGAARD⁷⁾ in der Modifikation von F. MICHEEL und F.-P. VAN DE KAMP⁸⁾.

Tab. 4 gibt die entsprechenden Daten der D -Glucosaminyl-guanyl-polypeptide.

Tab. 4

	PLT I	PLT II
Polypeptid (in g)	2	1
IV (in g)	10	5
p_{H} -Wert	8.0	8.0
Ausb. (in g)	2.42	1.20
Amino-N gef. (%)	0.75	1.4
Umsetzungsgrad in %, ber. aus Amino-N-Gehalt	75	66
N -Acetyl- D -glucosamin ber. *) (%)	34.90	42.40
gef. (%)	34.3	45.2
N -Acetyl- ber. *) (%)	6.80	8.25
gef. (%)	6.7	8.5

*) Berechnet aus den gefundenen Werten für die freien NH_2 -Gruppen.

N -Acetyl- D -glucosamin wurde kolorimetrisch nach der Methode von MORGAN-ELSON⁹⁾ bestimmt.

Die *Messungen in der Ultrazentrifuge* ergaben folgendes Bild:

Die Präparate aus PLT I mit III und mit IV erwiesen sich bei hohen Drehzahlen (49000, Phywe-Instrument) als polydispers. Diejenigen aus PLT II mit III und IV jedoch als recht

⁷⁾ Biochem. Z. 260, 247 [1933].

⁸⁾ F. MICHEEL und F.-P. VAN DE KAMP, Chem. Ber. 85, 1096 [1952].

⁹⁾ L. A. ELSON und W. T. J. MORGAN, Biochem. J. 27, 1824 [1933].

homodispers. Einzelheiten ergeben sich aus den Legenden zu den Abbild. 1, 2 und 3. Die Ergebnisse mit der Phywe-Ultrazentrifuge, die wir mit einer automatischen Kühlung versehen hatten, wurden durch Messungen an der Spinco-Ultrazentrifuge bestätigt. Ebenso konnte das Mol.-Gewicht nach der Gleichgewichtsmethode mit diesem Instrument bestätigt werden.

NARSINH MULJIBHAI SHAH und PARMANAND MAGANLAL SHAH

Hydroxy-acyl-cumarone, III¹⁾

**Friessche Verschiebung
von 5-substituierten 6-Acyloxy-3-methyl-cumarilsäuren**

Aus dem Department of Chemistry, St. Xavier's College, Ahmedabad-9, Indien

(Eingegangen am 13. Juli 1959)

Durch Chlor, Brom oder die Äthylgruppe in 5-Stellung substituierte 6-Acyloxy-3-methyl-cumarilsäuren gehen durch Friessche Verschiebung in die 5-substituierten 6-Hydroxy-7-acyl-3-methyl-cumarilsäuren über, welche sich zu den entsprechenden Cumaronen decarboxylieren lassen.

In Fortsetzung unserer Mitteil.¹⁾ über die Friessche Verschiebung von 6-Acyloxy-3-methyl-cumarilsäuren, die einen Syntheseweg für 6-Hydroxy-7-acyl-3-methyl-cumaron darstellt, unternahmen wir die vorliegende Untersuchung über den Einfluß verschiedener Substituenten auf den Ablauf der genannten Umlagerungsreaktion. Als Substituenten wählten wir Chlor, Brom und die Äthylgruppe in der 5-Stellung des Cumarilsäuresystems.

Die für die vorliegende Arbeit benötigten 5-Brom- (IIa), 5-Chlor- (IIe) und 5-Äthyl-6-hydroxy-3-methyl-cumarilsäuren (IIi) bereiteten wir durch alkalische Hydrolyse der entsprechenden 6-substituierten 3-Chlor-7-hydroxy-4-methyl-cumarine Ia, e und i, hergestellt durch Pechmann-Kondensation von 4-Chlor-, 4-Brom- und 4-Äthyl-resorcin mit α -Chlor-acetessigsäure-äthylester.

5-Brom-6-acetoxy-3-methyl-cumarilsäure (IIIa) unterwarfen wir der Friesschen Verschiebung bei 150–160°, wie früher beschrieben¹⁾. Dem Umlagerungsprodukt ordneten wir die Konstitution IVa der 5-Brom-6-hydroxy-7-acetyl-3-methyl-cumarilsäure zu, da es sich mit der aus dem Cumaron Va durch alkalische Hydrolyse gewonnenen Cumarilsäure als identisch erwies.

Die Ketosäure IVa lieferte bei der Decarboxylierung das entsprechende Cumaron VIa, in jeder Hinsicht identisch mit dem Cumaron, das man durch Alkalieinwirkung auf das Cumaron Va erhielt; das letztere bereiteten wir durch Friessche Verschiebung aus VIIa.

Analog überließen wir die 6-Propionyloxy- (IIIb), 6-Butyryloxy- (IIIc) und die 6-Benzoyloxy-5-brom-3-methyl-cumarilsäure (IIId) den Bedingungen der Fries-Reak-

¹⁾ II. Mitteil.: N. M. SHAH und P. M. SHAH, Chem. Ber. 92, 2933 [1959].