

Zusammenfassung.

Es ist papierchromatographisch nachgewiesen worden, dass mehrere Rattenorgane in Form ihrer Homogenate sowie Leberautolysat und Lebermitochondrien befähigt sind, aus D-Methionin-isopropylester den D-Methionyl-D-methionin-isopropylester zu synthetisieren. Der Peptidester ist chemisch ziemlich beständig, wird aber von den verschiedenen Homogenaten in verschiedenem Ausmaße und unter noch nicht genau definierbaren Bedingungen zum D-Methionyl-D-methionin verseift. Parallel zur Synthese, von der im günstigsten Falle (Leber- und Hodenhomogenat) ungefähr 10% des angewandten D-Methioninesters erfasst werden, verläuft der enzymatische Abbau des restlichen Esters zum freien D-Methionin.

Die im Zusammenhang mit dieser Untersuchung ausgearbeitete papierchromatographische Analysentechnik wird genau beschrieben; zwei Fleckenkarten orientieren über eine Anzahl bisher unbekannter R_F -Werte von Methioninderivaten.

Organisch-chemische Anstalt der Universität Basel
und Eiweisslaboratorium der Medizinischen
Universitätsklinik, Basel.

29. Enzymatische Peptidsynthese.

5. Mitteilung¹⁾.

Inkubation von D-Methionin-isopropylester mit autolysiertem und frischem Leberhomogenat: Isolierung von D-Methionyl-D-methionin-isopropylester und D-Methionyl-D-methionin

von M. Brenner, H. R. Müller und A. Vetterli.

(14. XII. 51.)

Homogenate von verschiedenen Rattenorganen verwandeln zugesetzten D-Methionin-isopropylester partiell in den Isopropylester des D-Methionyl-D-methionins. Die Reaktion bleibt meistens auf dieser Stufe stehen. In einzelnen Fällen aber, zum Beispiel in frischem Leberhomogenat, geht sie weiter, indem der Dipeptidester enzymatisch zum Dipeptid verseift wird. Der Nachweis dieser Reaktionsfolge stützt sich auf papierchromatographische Analysen¹⁾. Obschon diese

¹⁾ 4. Mitteilung: M. Brenner, H. R. Müller & Eva Lichtenberg, Helv. 35, 217 (1952).

als zuverlässig zu betrachten sind, war es wünschenswert, den Befund durch die Isolierung und direkte Identifizierung des Dipeptids und seines Esters sicherzustellen.

Man sieht aus Tab. 1 der vorhergehenden Mitteilung, dass zur Isolierung des Dipeptidesters am ehesten das Reaktionsgemisch von D-Methionin-isopropylester und autolysiertem Leberhomogenat geeignet ist. Die Abtrennung des Dipeptidesters aus diesem Gemisch bietet keine Schwierigkeiten, sofern sie erst nach vollständiger Umwandlung des Ausgangsmaterials erfolgt: Der Dipeptidester konnte mit Essigester extrahiert und als Salz mit 1-Nitronaphthalin-5-sulfonsäure von mitextrahierten lipoidlöslichen Leberbestandteilen in reiner Form abgetrennt werden. Das Salz war nach Smp., Mischprobe, Drehung und Analyse mit einem synthetischen Vergleichspräparat identisch. Die Ausbeute betrug rund 10%, bezogen auf angewandten Aminosäureester.

Zur Bereitung des Dipeptids kommt nur ein Ansatz mit frischem Leberhomogenat in Frage. Seine Isolierung schien weniger einfach zu sein, als jene des Esters. Wir glaubten anfänglich, dass eine erfolgreiche Abtrennung nur bei Anwendung moderner chromatographischer Methoden¹⁾ erwartet werden dürfe. In einem anderen Zusammenhang ist jedoch die interessante Beobachtung gemacht worden, dass sich das Dipeptid ebenfalls mit Essigester extrahieren lässt, sofern das System Trichloressigsäure enthält. Dasselbe gilt für Methionin-isopropylester und den Dipeptidester, viel weniger aber für freies Methionin, das unter gleichen Bedingungen zur Hauptsache in der wässrigen Phase verbleibt. Auf dieser Basis lässt sich das Dipeptid leicht isolieren: Das Reaktionsgemisch wurde zur Entfernung von noch vorhandenem Ausgangsmaterial und unverseiftem Dipeptidester mit Essigester extrahiert, hierauf mit Trichloressigsäure angesäuert, filtriert und wieder mit Essigester extrahiert. Der zweite Essigester-Extrakt hinterliess beim Verdampfen des Essigesters ein Gemisch von Dipeptid, etwas Methionin und viel Trichloressigsäure. Letztere konnte zum grössten Teil infolge ihrer Löslichkeit in Benzol/Pentan entfernt werden; der Rest liess sich an Amberlite IR-4B adsorbieren. Die Filtration durch den Ionenaustauscher bewirkte gleichzeitig eine weitgehende Abtrennung des Methionins, indem dieses vor dem Dipeptid aus der Säule trat. Letzteres wurde über sein Salz mit 1-Nitronaphthalin-5-sulfonsäure gereinigt und war nach Smp., Mischprobe, Drehung und Analyse mit einem synthetischen Vergleichspräparat identisch. Die Ausbeute betrug rund 7%, bezogen auf angewandten Aminosäureester.

Wir danken der *Rockefeller Foundation* in New York und der *Stiftung für Stipendien auf dem Gebiete der Chemie* in Basel für die gewährte Unterstützung.

¹⁾ W. H. Stein & S. Moore, Cold Spring Harbor Symposia Quant. Biol. **14**, 179 (1950).

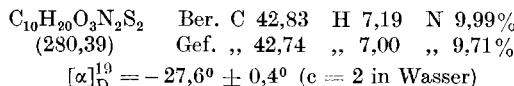
Experimenteller Teil.

Alle Smp. sind auf dem *Kofler*-Block bestimmt und korrigiert worden; Fehlergrenze $\pm 2^\circ$.

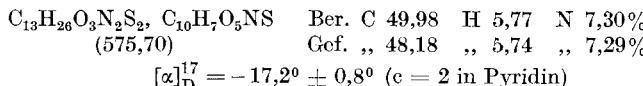
1. Ausgangsmaterial und Vergleichspräparate.

D-Methionin-isopropylester. Kristallisation als Nasylat: Die Mischung von 15 g rohem Ester¹⁾ und 10 cm³ Isopropanol wird vorsichtig mit einer Lösung von 25 g Naphtalin- β -sulfonsäure-trihydrat (20% Überschuss) in 80 cm³ heißem Isopropanol versetzt. Nach Animpfen der noch heißen Lösung erfolgt Kristallisation in Nadeln. Ausbeute 24,6 g (77%). Das Nasylat ist bereits nach der ersten Kristallisation rein: Smp. 150–152°; $[\alpha]_D^{16} = -14,1^\circ \pm 0,5^\circ$ (c = 5 in Methylcellosolve). Freisetzung des Esters: Zu 12 g Nasylat, 30 cm³ Wasser und 200 cm³ Pentan gibt man unter Umschwenken auf einmal 59 cm³ 1-m. Sodalösung und schüttelt kräftig durch. Die Pentanschicht wird sofort abgetrennt, bevor sieh aus der übersättigten wässerigen Phase das Natriumsalz der Sulfonsäure auszuscheiden beginnt. Nach Trocknen mit Natriumsulfat und Verdampfen des Pentans verbleiben 4,7 g öliger Ester (Ausbeute 85%), der sofort weiterverwendet wird.

D-Methionyl-**D**-methionin: Das Peptid wurde nach dem bereits früher für die Darstellung seines Antipoden beschriebenen Diketopiperazin-Verfahren²⁾ hergestellt. Smp. 228–231°. Zur Analyse und Drehung wurde 5 Std. bei 80° und 0,02 Torr getrocknet.



D-Methionyl-**D**-methionin-isopropylester, Salz mit 1-Nitronaphtalin-5-sulfonsäure: Eine Suspension von 500 mg 1-nitronaphtalin-5-sulfonsaurem Salz von **D**-Methionyl-**D**-methionin²⁾ in 25 cm³ abs. Isopropanol wird unter Eiskühlung mit HCl-Gas geättigt; das Salz geht dabei in Lösung. Anschliessend wird während 20 Min. am Rückfluss gekocht und dann am Vakuum zur Trockne verdampft. Bereits eine einmalige Kristallisation aus 25 cm³ Wasser gibt 450 mg reines Salz des Dipeptidesters. (Ausbeute 85%), Smp. 192–195°. Zur Analyse und Drehung wurde 6 Std. bei 80° und 0,02 Torr getrocknet.



Freier Dipeptidester: Eine Lösung des obigen Salzes in feuchtem Essigester wird mit 1-m. Sodalösung (2 Mol Na₂CO₃ pro Mol sulfonsaures Salz) durchgeschüttelt. Die wässerige alkalische Lösung wird abgetrennt und die Esterphase anschliessend zur Entfernung noch vorhandener Sulfonsäure (gelbe Farbe) mehrmals abwechselungsweise mit Wasser und 0,1-n. Sodalösung extrahiert. Man trocknet mit Natriumsulfat und entfernt den Essigester am Vakuum. Der ölig zurückbleibende Peptidester wird sofort weiterverwendet³⁾.

2. Isolierung des Dipeptidesters und des Dipeptids.

Der Arbeitsgang ist in beiden Fällen durch papierchromatographisch kontrollierte Vorversuche genau festgelegt worden; auch die eigentliche Isolierung wurde papierchromatographisch verfolgt und verlief überall programmgemäß.

a) Methionin-dipeptid-ester. Herstellung des Leberautolysates: 13 g Leber (von 2 Ratten) werden mit 65 cm³ Wasser homogenisiert, das Homogenat durch Gaze filtriert, mit Toluol überschichtet und während 8 Tagen bei 22° unter zeitweiligem Um-

¹⁾ *M. Brenner & V. Kocher*, Helv. **32**, 333 (1949).

²⁾ *M. Brenner & R. W. Pfeister*, Helv. **34**, 2085 (1951).

³⁾ Vgl. 4. Mitteilung, Helv. **35**, 217 (1952).

schwenken der Autolyse überlassen. Man dialysiert das so erhaltene Autolysat in einem Cellophanschlauch 20 Std. bei 4° in bewegter Apparatur gegen Toluol-gesättigtes Wasser, wobei die Aussenflüssigkeit (ca. 500 cm³) nach 2, 4, 6, 8 und 12 Std. gewechselt wird. Das dialysierte Autolysat wird nun während einer Std. bei 4° zentrifugiert (2000 Umdrehungen/Min.), das Überstehende abdekantiert und durch eine dünne Schicht von gewaschenem Standard Super Cel¹⁾ klar filtriert. Der Rückstand in den Zentrifugengläsern wird nochmals mit 30 cm³ Wasser verrührt, die Suspension erneut zentrifugiert und das Überstehende wiederum filtriert. Man vereinigt die beiden Filtrate, setzt etwas Toluol zu und verdünnt mit Wasser auf 100 cm³.

Synthese des Dipeptidesters: 3,7 g D-Methionin-isopropylester werden in obigem Autolysat (100 cm³) gelöst, die Lösung mit etwas Toluol versetzt und 5 Std. unter zeitweiligem leichtem Umschwenken bei Zimmertemperatur stehengelassen. Nach dieser Zeit ist annähernd aller Ausgangsester in Dipeptidester und freies Methionin übergeführt. Dipeptid kann noch keines nachgewiesen werden, dagegen Spuren von autoxydiertem Dipeptidester.

Isolierung des Dipeptidesters als Salz der 1-Nitronaphthalin-5-sulfonsäure: Das Reaktionsgemisch wird 3mal mit je 100 cm³ Essigester ausgeschüttelt, mit NaCl gesättigt und nochmals mit 100 cm³ Essigester extrahiert. Zur Phasentrennung ist jedesmal kurzes Zentrifugieren (10') notwendig. Die vereinigten Essigesterauszüge werden mit Natriumsulfat getrocknet, filtriert und am Vakuum bei 20° eingedampft. Den Rückstand, 850 mg braunes Öl, löst man in 25 cm³ kaltem Isopropanol, setzt 800 mg 1-Nitronaphthalin-5-sulfonsäure zu, erwärmt bis zur völligen Lösung der Sulfonsäure und verdampft am Vakuum zur Trockne. Der Rückstand wird in 45 cm³ heissem Wasser aufgenommen, die Lösung von etwas braunem Öl abdekantiert, mit synthetischem Dipeptidester-salz geimpft und erst bei Zimmertemperatur, dann bei 4° stehengelassen. Man erhält 670 mg sulfonsaures Salz, das zur Reinigung einmal aus 50 cm³ Wasser und ein zweites Mal aus 30 cm³ Wasser umkristallisiert wird. Ausbeute 380 mg, Smp. 192—195°. Die Mischprobe mit einem gleich schmelzenden synthetischen Vergleichspräparat schmilzt bei 191—195°. Zur Analyse und Drehung werden 150 mg des Salzes nochmals aus 10 cm³ Wasser umgelöst, die Kristalle zuerst im Vakuumexsikkator über Schwefelsäure und Kalilauge und hernach 6 Std. bei 80° und 0,02 Torr getrocknet.

C ₁₃ H ₂₆ O ₃ N ₂ S ₂ , C ₁₀ H ₇ O ₅ NS	Ber. C 47,98	H 5,77	N 7,30%
(575,70)	Gef. ,, 48,21	,, 5,48	,, 7,54%
[α] _D ²¹ = -16,4° ± 0,8° (c = 2 in Pyridin)			

b) Methionin-dipeptid. Herstellung des Leberhomogenates: 27,5 g Leber (von 4 Ratten) werden mit 150 cm³ Wasser unter Eiskühlung homogenisiert, das Homogenat durch Gaze filtriert und nach Zugabe von etwas Toluol sofort verwendet.

Synthese des Dipeptids: 4,7 g D-Methionin-isopropylester werden mit 150 cm³ Leberhomogenat und etwas Toluol verrührt. Nach 48ständigem Stehen bei 22° ist der Grossteil des als Zwischenprodukt gebildeten Dipeptidesters zum Dipeptid abgebaut, so dass die Reaktion abgebrochen werden kann.

Isolierung des Dipeptids: Das Reaktionsgemisch (ungefähr 150 cm³) wird 3mal erschöpfend mit je 350 cm³ Essigester ausgeschüttelt und die gebildete Emulsion jedesmal durch kurzes Zentrifugieren zerstört. Der Essigester enthält wenig Dipeptidester und wird verworfen. Zur wässrigen Phase (Organbrei) gibt man 25 cm³ 20-proz. Trichloressigsäure, filtriert die sofort auftretende voluminöse Fällung von Eiweiss und Organpartikeln ab und wäscht mit Wasser gründlich nach. Man engt das klare Filtrat auf 150 cm³ ein (15 mm, Bad 30—35°), zentrifugiert zur Sedimentation dunkel gefärbter öliger Bestandteile, dekantiert und filtriert. Das klare, gelbliche Filtrat wird in 4 Scheidetrichtern mit je 300 cm³ Essigester extrahiert und hierauf verworfen, da es neben viel Methionin und ninhydrinpositiven Substanzen aus der Leber nur noch wenig Dipeptid enthält. Man wäscht die Essigesterlösungen hintereinander 2mal mit 30 cm³ Wasser; dieses Waschwasser, das

¹⁾ Produkt der Celite Corporation, erhältlich bei der Firma Schneider & Co., Winterthur.

neben wenig Dipeptid vorwiegend Methionin enthält, wird ebenfalls verworfen. Die Essigesterlösungen werden vereinigt, über Natriumsulfat getrocknet und am Vakuum bei 30° Badtemperatur eingedampft. Zurück bleibt eine braune, stechend nach Trichloressigsäure riechende, bewegliche Flüssigkeit. Sie enthält neben freiem Methionin die Hauptmenge des Dipeptids und fast die gesamte angewandte Trichloressigsäure. Letztere lässt sich zu etwa 80% entfernen, indem man in 20 cm³ Benzol löst, 200 cm³ Pentan zusetzt und die hiebei gebildete ölige Abscheidung absitzen lässt. Die überstehende Lösung wird dekantiert; sie hinterlässt beim Abdampfen 4,1 g peptidfreien Rückstand (hauptsächlich Trichloressigsäure). Der pentanunlösliche Anteil wiegt 1,35 g und enthält das Dipeptid, etwas Methionin sowie den Rest der Trichloressigsäure. Zu deren Entfernung wird in 30 cm³ Wasser gelöst und die Lösung, gefolgt von 1,8 l Wasser, durch eine Säule von 30 g feuchtem Amberlite IR-4B filtriert. Das Filtrat ist neutral; die ersten 220 cm³ enthalten fast nur Methionin (180 mg), die folgenden Anteile vorwiegend Dipeptid. Letztere hinterlassen beim Abdampfen 240 mg rohes, bereits kristallines Dipeptid. 190 mg (0,68 mMol) dieses Rohproduktes und 216 mg (0,75 mMol) 1-Nitronaphthalin-5-sulfonsäure werden in 3,2 cm³ 0,5-n. Salzsäure heiß gelöst. Man filtriert, lässt kristallisieren und erhält 280 mg Kristalle, die bei nochmaliger Kristallisation aus 2 cm³ 0,5-n. Salzsäure 230 mg reines Dipeptidsalz vom Smp. 94–95° liefern. Die Mischprobe mit einem synthetischen Vergleichspräparat vom Smp. 94–96° schmilzt ohne Depression. Die Freisetzung des Dipeptids erfolgt nach den früheren Angaben¹⁾ mit Hilfe von Amberlite IR-4B. Umkristallisieren aus verdünntem Alkohol gibt 104 mg reines Dipeptid vom Smp. 228–231°. Die Mischprobe mit einem gleichschmelzenden synthetischen Vergleichspräparat schmilzt ohne Depression. Zur Analyse und Drehung wird 6 Std. bei 60° und 0,02 Torr getrocknet.

$C_{10}H_{20}O_3N_2S_2$ Ber. C 42,83 H 7,19 N 9,99%
(280,39) Gef. „ 42,88 „ 7,12 „ 10,22%
 $[\alpha]_D^{17} = -28,2^0 \pm 0,7^0$ (c = 2 in Wasser)

Die Analysen wurden im Mikroanalytischen Laboratorium der Org.-chem. Anstalt der Universität Basel (Leitung Herr E. Thommen) ausgeführt.

Zusammenfassung.

Die in Leberautolysat bzw. -homogenat aus dem D-Methionin-isopropylester gebildeten Umwandlungsprodukte D-Methionyl-D-methionin-isopropylester und D-Methionyl-D-methionin sind mit Hilfe klassischer Extraktionsmethoden in einfacher Weise präparativ gefasst und zur Identifizierung mit den entsprechenden synthetischen Substanzen verglichen worden.

Organisch-chemische Anstalt der Universität Basel
und Eiweisslaboratorium der Medizinischen
Universitätsklinik, Basel.

¹⁾ M. Brenner & R. W. Pfister, Helv. 34, 2085 (1951).