

Brückenreaktionen an Aminosäuren und Faserproteinen^{a)}

Von Prof. Dr.-Ing. HELMUT ZAHN

Chemisches Institut der Universität Heidelberg

Bei Einwirkung bifunktioneller Fluor-Verbindungen der aromatischen Reihe wie 1,5-Difluor-2,4-dinitrobenzol oder p,p'-Difluor-m,m'-dinitro-diphenylsulfon auf Faserproteine, z. B. Wollkeratin, Seidenfibrin und Sehnenkollagen, tritt in überraschend hohem Ausmaß bifunktionelle Reaktion mit den Phenol-Gruppen des Tyrosins (Fibroin und Keratin) und den ε-Amino-Gruppen des Lysins (Keratin, Fibroin, Kollagen) und Oxylysins (Kollagen) ein. Diese bifunktionelle Reaktion der Brückenreagentien ist eine starke Stütze für die Hypothese des segmentierten Baus der genannten Faserproteine, wonach bestimmte Aminosäuren in Segmenten des Proteins gehäuft eingebaut sind. Nach Einbau der neuen Brücken in das Gefüge des Proteins ist dieses chemisch und physikalisch stabilisiert, was dafür spricht, daß Aminosäure-Gruppen verschiedener Ketten miteinander vernetzt wurden. Voraussetzung für die präparative Bearbeitung solcher Brückenreaktionen an Fasern war die Kenntnis synthetischer Modelle aus Aminosäuren und Brückenreagens, deren Darstellung und Eigenschaften im größten Teil dieser Arbeit beschrieben werden.

I. Definitionen

1.) Faserproteine

Faserproteine sind Proteine wie Keratin, Fibroin und Kollagen, in welchen die Polypeptid-Ketten normalerweise Fibrillen und diese sichtbare Fasern bilden. Keratin ist der Hauptbestandteil von Wolle, Fibroin von Seide und Kollagen der Lederhaut. Die Gestalt der Peptidketten in ungedehnter Wolle ähnelt sehr wahrscheinlich einer Schraube mit einem Gang von 5,55 Å und 3,7 Aminosäure-Resten je Windung²⁶). Im Seidenfibrin sind die Peptidketten nahezu gestreckt und werden zu flachen Kettenrosten zusammengehalten²⁷). Die Form der Peptidketten des Kollagens ist noch nicht mit Sicherheit bekannt, obwohl die stark gegliederte Kollagenfibrille wegen ihrer auffallenden Streifung im elektronenmikroskopischen Bild am häufigsten untersucht worden ist²⁸).

Für die vorliegende Arbeit ist die in Tabelle 1 gezeigte Aminosäure-Zusammensetzung dieser Proteine von besonderem Interesse.

Aminosäuren	Wolle		Fibroin nach Hoover ²¹) u. Mitarbb.	Kollagen nach J. H. Bowes ²⁶)
	nach Simmonds ²⁹)	nach Corfield u. Robson ²⁸)		
Glycin	5,16	5,5	42,3	27,5
Alanin	3,71	4,3	24,5	8,8
Valin	4,96	5,7	3,20	2,7
Leucin	7,63	8,9	0,80	5,4
Isoleucin	3,07	3,7	—	5,4
Prolin	7,28	6,8	1,50	15,8
Phenylalanin	3,43	4,0	1,50	2,3
Tryptophan	2,10	0,94	1,00	0,0
Serin	9,04	9,9	16,24	2,8
Threonin	6,55	5,56	1,50	2,2
Oxyprolin	—	—	—	14,0
Tyrosin	6,38	5,5	10,6	0,89
Lysin	2,82	3,3	0,44	5,3
Oxylysin	—	—	—	1,3
Arginin	10,49	9,8	1,05	8,7
Histidin	0,90	1,2	0,47	0,62
Asparaginsäure ..	6,69	6,8	2,00	7,0
Glutaminsäure ..	14,98	14,5	2,03	11,4
Cystin bzw. Cystein ..	11,3	10,3	—	0,0
Methionin	0,69	0,56	2,59	0,89
Cysteinsäure	—	—	—	—
Ammoniakstickstoff	1,42	—	—	0,68

Tabelle 1

Aminosäuren des Seidenfibrins in Gewichtsprozent

^{a)} Erweiterte Fassung der Lecture in Melbourne, International Wool Textile Research Conference, Australia, 22. August bis 9. September 1955.

2.) Brückenreaktionen (Cross-Linking-Reactions)

Unter Brückenreaktionen sollen hier chemische Reaktionen verstanden werden, bei welchen zwei gleiche oder verschiedene Moleküle durch Reaktion mit einer bifunktionellen Brückenmolekül miteinander verbunden werden. Bekannte Beispiele aus der makromolekularen Chemie sind die Überführung von Rohgummi in ein vernetztes Produkt bei der Vulkanisierung und die natürliche „Vernetzung“ im Keratin durch die Diaminosäure Cystin, die zwei verschiedene Peptidketten mittels SS-Brücken verknüpft. Da Brückenreaktionen die Eigenschaften von makromolekularen Stoffen empfindlich zu beeinflussen vermögen, werden sie in der Technik in mannigfacher Weise angewendet. Genannt seien die Formalisierung und Chinnon-Behandlung von Proteinen (Gerbung der tierischen Haut, Härtung von Casein-Fasern) und die Stabilisierung von Cellulose-Fasern durch Einwirkung bifunktioneller Moleküle wie Hexan-diisocyanat, Poly-äthyleniminen, Formaldehyd, Glyoxal, Polymethylol-Verbindungen.

3.) Brückenreagentien

Zwischen linearen Makromolekülen können bi-, tri-, tetra- oder allgemein polyfunktionelle Verbindungen Brücken einbauen. Voraussetzung hierfür ist, daß die Makromoleköl z. B. Doppelbindungen oder funktionelle Gruppen enthält, mit denen sich das Brückenreagens umsetzen kann. Das Reaktionsprodukt aus Makromoleköl und Brückenreagens enthält „Brücken“ aus den hauptvalenzmäßig in das Makromolekölgerüst eingebauten Molekülen des Brückenreagenses. Der Ausdruck „Brücke“ wird hier zur abgekürzten Bezeichnung von Reaktionsprodukten aus Substrat und Vernetzungsmittel verwendet.

4.) Nachweis von Brückenreaktionen in Faserproteinen

Die Konstitutionsermittlung der Reaktionsprodukte bei Vernetzungen ist seit langem Ziel zahlreicher Arbeiten gewesen, wobei an die Aufklärung des Mechanismus der Kautschuk-Vulkanisierung und die Frage nach der Art der Hydroxyle, welche bei der Formalisierung von Cellulose reagieren, gedacht wird. Speakman⁴¹), der eigentliche Begründer des Forschungsgebietes der „cross-linking-reactions“ bei Wolle, hat mit originellen Methoden, für welche der Ausdruck Mechanochemie geprägt wurde, den Mechanismus und das Ausmaß verschiedener Vernetzungsreaktionen aufklären können. Man untersucht z.B., wie groß die Belastung sein muß, um eine chemisch behandelte Faser in Wasser um 30% zu dehnen und vergleicht den erhaltenen Wert mit einer Messung an einer unbehandelten Keratin-Faser. Der so erhaltene, sog. 30%-Index

nimmt nach einer abbauenden Reaktion ab und kann nach Einbau neuer Querbrücken in das Keratin-Gerüst zunehmen.

Unter Superkontraktion versteht man die Verkürzung, die Wollhaare in Lösungen erleiden, welche a) Cystin-Bindungen, b) Wasserstoff-Brücken oder c) beide spalten. Durch geeignete Kombination verschiedener Superkontraktionsmittel kann man klären, ob die Cystin-Bindungen an der zu untersuchenden Reaktion beteiligt waren oder nicht.

Der Gewichtsverlust von Wolle in Alkalien oder Säuren gibt Hinweise auf die chemische Resistenz der mit bifunktionellen Molekülen umgesetzten Fasern.

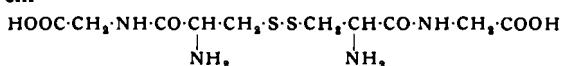
Der Nachweis einer erfolgten Brückenreaktion in Faserproteinen ist keineswegs einfach und erfordert sorgfältige Kontrollversuche bei Kombination verschiedener unabhängiger chemischer und physikalischer Methoden²⁴⁾. Für den organischen Chemiker würde der klarste Beweis darin bestehen, die neue Brücke mit den beiden verbundenen Aminosäuren aus dem Protein-Verband zu isolieren. Wenn dies gelänge, könnte man feststellen, welche Aminosäuren von benachbarten Peptid-Ketten sich räumlich so nahe kommen, daß sie eine Brückenreaktion eingehen können. Damit könnte man beginnen, eine Topologie der inneren Oberflächen in Faserproteinen zu begründen¹⁾.

II. Allgemeines über die Synthese von Brücken-bis-aminosäuren

Die Isolierung einer Brücken-bis-aminosäure aus dem Hydrolysat eines mit einem Brückenreagens umgesetzten Proteins hat folgende Voraussetzungen:

- a) Die Brücken-bis-aminosäure darf bei der hydrolytischen Spaltung der Peptid-Bindungen nicht zerstört werden.
- b) Sie muß sich neben dem großen Überschuß an freien Aminosäuren im Hydrolysat nachweisen und
- c) von den überschüssigen freien Aminosäuren trennen lassen.

An synthetischen Brücken-bis-aminosäuren kann man diese Voraussetzungen bequem studieren. Zwar waren bereits eine ganze Reihe von Brücken-bis-aminosäuren aus der Literatur bekannt, angefangen von den Carbonyl-bis-aminosäuren von E. Fischer²⁰⁾, z. B. Carbonyl-bis-glycin HOOC-CH₂-NH-CO-NH-CH₂-COOH und dem Cystinyl-bis-glycin



von du Vigneaud^{21a)}, doch erfüllen diese Verbindungen nicht die Voraussetzung a), da sie bei der Hydrolyse des Proteins mit den Peptid-Bindungen gespalten werden und die Hydrolyse nicht überstehen. Es mußte daher nach neuen stabilen Brücken-bis-aminosäuren gesucht werden.

Wir kennen neben bifunktionellen Aminosäuren auch tri- und tetrafunktionelle Vertreter dieser Körperklasse, die nicht nur Amino- und Carboxy-Endgruppen für die Peptidkette stellen, sondern auch verschiedenartige, in der sog. Seitenkette befindliche Gruppen liefern. Somit bestehen folgende Möglichkeiten einer Reaktion seitens der Proteinmolekel:

1. Endgruppen-Reaktionen
 - a) Amino-Ende (alle Aminosäuren)
 - b) Carboxy-Ende (alle Aminosäuren)
2. Seitenketten-Reaktionen
 - a) Primäre Amino-Gruppen (Ornithin, Lysin, Oxylysin)
 - b) Guanidin-Gruppe (Arginin)
 - c) Imidazol-Gruppe (Histidin)
 - d) Carbonamid-Gruppe (Glutamin, Asparagin)
 - e) Aliphatisches Hydroxyl (Serin, Threonin, Oxylysin)
 - f) Phenolisches Hydroxyl (Tyrosin)

- g) Carboxyl (Glutamin- und Asparaginsäure)
- h) Sulphydryl-Gruppe (Cystein)
- i) Disulfid-Gruppe Cystin
- k) Thioäther-Gruppe (Methionin und Lanthionin)

Von Seite des Brückenreagenses bestehen mehrere Reaktionsmöglichkeiten (vgl. Bild 1):

Typ	Modellvorstellung	Analytische Kennzeichen	Stabilisierung
Einseitige Substitution		enthält R sowie X	-
Querverknüpfung (crosslinking)		enthält nur R	+
Längsverknüpfung		enthält nur R	+
Intramizellare Reaktion unter Ringbildung		enthält nur R	-
Gemischt		enthält R sowie X	+

A 573-1

Bild 1
Schema von Reaktionsmöglichkeiten zwischen Mizellen (□) im Faserprotein und bifunktionellen Verbindungen (X-R-X)

- 1.) Das Reagens reagiert monofunktionell. Die zweite funktionelle Gruppe bleibt erhalten.
- 2.) Das Reagens reagiert monofunktionell. Die zweite funktionelle Gruppe reagiert mit dem Lösungsmittel.
- 3.) Das Reagens reagiert bifunktionell mit funktionellen Gruppen derselben Peptid-Kette (intramizellare Reaktion, die zur Bildung eines Rings führt).
- 4.) Das Reagens reagiert bifunktionell mit Protein-Gruppen von zwei verschiedenen Peptid-Ketten (echte Brückenreaktionen).

Bei der Mannigfaltigkeit funktioneller Gruppen in den Proteinen (vgl. Tabelle 1) ist es einleuchtend, daß es kein universelles Brückenreagens geben kann. Im Gegenteil sind selektiv wirksame Reagentien erwünscht, da sie übersichtlicher reagieren, so daß nicht zu viele Brücken-bis-aminosäuren gleichzeitig gebildet werden.

In den folgenden Kapiteln beschreiben wir von uns dargestellte Brücken-bis-aminosäuren. Eingeteilt ist zuerst nach der Art der funktionellen Gruppe im Protein und später bei der größten Serie, den aromatischen Brücken-bis-aminosäuren, nach dem Reagens.

III. Synthetische Brücken-bis-aminosäuren mit aliphatischen Brücken

1.) Bis-ester und Bis-äther

Es gelang uns nicht, ein Reagens zu finden, das mit den Ketten-endständigen Carboxylen oder den Seitenketten-Carboxylen von Proteinen eine Hydrolyse-beständige Brücke auszubilden vermag. Mit H. Wilhelm²⁵⁾ wurden zwar Brücken-bis-aminosäuren vom Estertyp synthetisiert (vgl. Tabelle 2); diese Verbindungen hielten jedoch selbst eine milde alkalische Hydrolyse erwartungsgemäß nicht aus. Die O,O'-Alkylen-bis-aminosäuren der aliphatischen Aminosäuren Glycin und Alanin wurden aus den Alkalosalzen der Benzoylaminosäure und α - ω -Dihalogen-alkanen im wasserfreien Medium dargestellt²⁶⁾. Zusammen mit O. Waschka gelang es, O,O'-Hexamethylen-bis-L-tyrosin aus Bis-diazohexan und Benzoyl-tyrosin-äthylester darzustellen²⁷⁾. Es handelt sich um einen Bis-

äther, der bei saurer Hydrolyse von Proteinen zwar angegriffen wird, jedoch mit relativ guter Ausbeute aus dem Hydrolysat einer mit Bis-diazohexan behandelten Naturseide in Substanz isoliert werden konnte.

2.) N_{α},N'_{α} -Alkylen-bis-aminoäuren

In den mit H. Wilhelm^{4, 7)} dargestellten N,N' -Alkylen-bis-aminoäuren (Tabelle 3) waren uns sehr stabile Brücken-bis-aminoäuren zugänglich geworden, in denen jeweils zwei Glycin-, Alanin- und Phenylalanin-molekülen an der primären α -Amino-Gruppe miteinander verbunden

waren. Diese Verbindungen wurden über die Alkylen-bis-iminoäure-nitrile aus α - ω -Diaminen, dem um ein Kohlenstoff-Atom ärmeren Aldehyd und Cyanwasserstoff synthetisiert. Die Dinitrile wurden nach den üblichen Methoden zu den Diliminoäuren verseift.

3.) Aliphatische Bis-thioäther des Cysteins

Die in Tabelle 4 zusammengestellten Bis-thioäther des L-Cysteins wurden mit B. Wölleman¹⁰⁾ und K. Traumann^{11, 21)} aus der freien Aminoäure und α - ω -Dihalogen-alkanen in alkoholischer Lösung bei pH 7,5–8 und 75–80 °C

Name	Formel	Abkürzung	Derivat	Fp. °C
O,O'-Äthylen-bis-glycin	$H_2N \cdot CH_2 \cdot CO \cdot O(CH_2)_3 O \cdot CO \cdot CH_2 \cdot NH_2$	$H \cdot Gly \cdot O \cdot (CH_2)_3 \cdot O \cdot Gly \cdot H$	Dibenzoyl-Derivat	138 °
O,O'-Trimethylen-bis-glycin	$H_2N \cdot CH_2 \cdot CO \cdot O(CH_2)_3 O \cdot CO \cdot CH_2 \cdot NH_2$	$H \cdot Gly \cdot O \cdot (CH_2)_3 \cdot O \cdot Gly \cdot H$	"	130 °
O,O'-Tetramethylen-bis-glycin	$H_2N \cdot CH_2 \cdot CO \cdot O(CH_2)_4 O \cdot CO \cdot CH_2 \cdot NH_2$	$H \cdot Gly \cdot O \cdot (CH_2)_4 \cdot O \cdot Gly \cdot H$	"	156 °
O,O'-Äthylen-bis-D,L-alanin	$H_2N \cdot CH \cdot CO \cdot O(CH_2)_3 \cdot O \cdot CO \cdot CH \cdot NH_2$	$H \cdot Ala \cdot O \cdot (CH_2)_3 \cdot O \cdot Ala \cdot H$	"	147 °
O,O'-Methylencarbonylmethylen-bis-glycin	$H_2N \cdot CH_2 \cdot CO \cdot O \begin{array}{c} CH_3 \\ \\ CH_2 \end{array} \cdot CO \cdot O \begin{array}{c} CH_3 \\ \\ CH_2 \end{array} \cdot NH_2$	$H \cdot Gly \cdot O \begin{array}{c} (CH_2)_2 \\ \\ CO \cdot CH_2 \end{array} \cdot O \cdot Gly \cdot H$	"	153 °
O,O'-Hexamethylen-bis-L-tyrosin	$H_2N \cdot CH \cdot COOH \begin{array}{c} CH_3 \\ \\ CH_2 \end{array} \cdot CO \cdot O \begin{array}{c} CH_3 \\ \\ CH_2 \end{array} \cdot HOOC \cdot CH \cdot NH_2$	$H \cdot Tyr \cdot OH \begin{array}{c} (CH_2)_4 \cdot CO \cdot CH_2 \\ \\ O \end{array} \cdot HO \cdot Tyr \cdot H$	Dibenzoyl-diäthylester	144–146 °

Tabelle 2
 O,O' -Äthylen-bis-aminoäuren. H. Wilhelm, O. Waschka

Name	Formel	Abkürzung	Fp. °C	Derivate Dinitrile Fp. °C
N,N'-Tetramethylen-bis-glycin	$HOOC \cdot CH_2 \cdot NH \cdot (CH_2)_4 \cdot NH \cdot CH_2 \cdot COOH$	$HO \cdot Gly \cdot (CH_2)_4 \cdot Gly \cdot OH$	258 °	58,5 °
N,N'-Tetramethylen-bis-D,L-alanin	$HOOC \cdot CH \cdot NH \cdot (CH_2)_4 \cdot NH \cdot CH \cdot COOH$	$HO \cdot Ala \cdot (CH_2)_4 \cdot Ala \cdot OH$	—	65,5 °
N,N'-Hexamethylen-bis-D,L-alanin	$HOOC \cdot CH \cdot NH \cdot (CH_2)_6 \cdot NH \cdot CH \cdot COOH$	$HO \cdot Ala \cdot (CH_2)_6 \cdot Ala \cdot OH$	275 °	54,0 °
N,N'-Tetramethylen-bis-D,L-phenylalanin	$HOOC \cdot CH \cdot NH \cdot (CH_2)_4 \cdot NH \cdot CH \cdot COOH$	$HO \cdot Phe \cdot (CH_2)_4 \cdot Phe \cdot OH$	236 °	72,0 °
N,N'-Hexamethylen-bis-D,L-phenylalanin	$HOOC \cdot CH \cdot NH \cdot (CH_2)_6 \cdot NH \cdot CH \cdot COOH$	$HO \cdot Phe \cdot (CH_2)_6 \cdot Phe \cdot OH$	225 °	Öl

Tabelle 3
 $N_{\alpha}N'_{\alpha}$ -Alkylen-bis-aminoäuren. H. Wilhelm

Name	Formel	Abkürzung	Fp. °C	R _{Gly}	[α] _D	Äthyliester-hydrochlorid Fp. °C
S,S'-Äthylen-bis-L-cystein	$H_2N \cdot CH \cdot COOH \begin{array}{c} CH_2-S-(CH_2)_2-S-CH_2 \\ \\ CH_2 \end{array} \cdot NH_2$	$H \cdot Cy \cdot OH \begin{array}{c} HO \cdot Cy \cdot H \\ \\ S-(CH_2)_2-S \end{array}$	284	0,19	+8,5	176
S,S'-Trimethylen-bis-L-cystein	$H_2N \cdot CH \cdot COOH \begin{array}{c} HOOC \cdot CH \cdot NH_2 \\ \\ CH_2-S-(CH_2)_3-S-CH_2 \end{array}$	$H \cdot Cy \cdot OH \begin{array}{c} HO \cdot Cy \cdot H \\ \\ S-(CH_2)_3-S \end{array}$	280	0,25	-5,2	172
S,S'-Tetramethylen-bis-L-cystein	$H_2N \cdot CH \cdot COOH \begin{array}{c} HOOC \cdot CH \cdot NH_2 \\ \\ CH_2-S-(CH_2)_4-S-CH_2 \end{array}$	$H \cdot Cy \cdot OH \begin{array}{c} HO \cdot Cy \cdot H \\ \\ S-(CH_2)_4-S \end{array}$	283	0,39	-2,5	181
S,S'-Pentamethylen-bis-L-cystein	$H_2N \cdot CH \cdot COOH \begin{array}{c} HOOC \cdot CH \cdot NH_2 \\ \\ CH_2-S-(CH_2)_5-S-CH_2 \end{array}$	$H \cdot Cy \cdot OH \begin{array}{c} HO \cdot Cy \cdot H \\ \\ S-(CH_2)_5-S \end{array}$	274	0,50	-1,3	148
S,S'-Hexamethylen-bis-L-cystein	$H_2N \cdot CH \cdot COOH \begin{array}{c} HOOC \cdot CH \cdot NH_2 \\ \\ CH_2-S-(CH_2)_6-S-CH_2 \end{array}$	$H \cdot Cy \cdot OH \begin{array}{c} HO \cdot Cy \cdot H \\ \\ S-(CH_2)_6-S \end{array}$	278	0,95	0,0	171

Tabelle 4
S,S'-Alkylen-bis-cysteine. B. Wölleman, K. Traumann

in guten Ausbeuten dargestellt. Von den Verbindungen wurden verschiedenartige Derivate dargestellt und das Alternieren der Schmelzpunkte, Löslichkeiten, Drehungen und Gitterstrukturen beim Übergang von geradzahligen zu ungeradzahligen Brücken eingehend studiert. Dazu war gerade diese Serie geeignet, weil eine lückenlose Reihe von Brücken von der bereits bekannten Djenkolsäure mit einer Methylen-Gruppe zwischen den Schwefel-Atomen bis zum Hexamethylen-bis-cystein vorlag. J. A. Schikanowa³⁸⁾ hat derartige Verbindungen als erster dargestellt und isoliert.

Diese Verbindungen konnten aus Wolle isoliert werden, die nach M. Harris³⁴⁾ zuerst mit Thioglykolat-Lösung bei pH 4,5 reduziert und dann mit Dihalogen-alkanen behandelt worden war. Nach M. Harris wird unter diesen Bedingungen zuerst Cystin reduktiv gespalten, worauf die gebildeten Sulphydryl-Gruppen mit den Dihalogen-alkanen zu Alkali-stabilen Bis-thioäther-Verbindungen reagieren. Dieser Reaktionsweg konnte nun durch unsere Untersuchungen präparativ bestätigt werden.

IV. Synthetische Brücken-bis-aminoäuren mit aromatischen Brücken

Angeregt durch Arbeiten von F. Sanger³⁶⁾ über die Verwendung von 1-Fluor-2,4-dinitrobenzol, beschäftigten wir uns seit 1948 mit einem entsprechenden, jedoch bifunktionellen, reaktionsfähigen Benzol-Derivat, dem 1,5-Di-

fluor-2,4-dinitrobenzol (FFDNB), das im Chemischen Institut der Universität Heidelberg in dieser Zeit von F. Weygand in anderem Zusammenhang verwendet wurde.

FFDNB reagiert leicht mit Proteinen wie Wolle und Seide^{2, 9)}, die behandelten Fasern werden gegen die Einwirkung von Säuren und Phenol bedeutend stabiler. Diese Befunde sprachen für eine Brückenreaktion zwischen FFDNB und freien Phenol-Gruppen des Tyrosins sowie freien primären Amino-Gruppen des Lysins. Bei der Hydrolyse des mit FFDNB behandelten Proteins ließen sich chromatographisch neben Reaktionsprodukten einer monofunktionellen Umsetzung von FFDNB mit Tyrosin und Lysin auch verschiedene Brücken-bis-aminoäuren isolieren. Zusammen mit J. Meienhofer wurden die in einem späteren Abschnitt des Aufsatzes genannten Verbindungen isoliert²²⁾.

Die beiden Fluor-Atome in FFDNB haben einen Abstand von etwa 5 Å, so daß das Reagens für eine Brückenreaktion mit ziemlich nahe beieinander liegenden Protein-Gruppen in Frage kommt. Im übrigen sind es dieselben Gruppen, welche auch in der bekannten Weise mit dem Sangerschen Reagens reagieren.

Es war wünschenswert, noch weitere reaktionsfähige Difluor-Verbindungen mit einem größeren Fluor-Abstand als in FFDNB zu besitzen. Zusammen mit H. Zuber^{8, 9)} wurde im erstmal dargestellten p,p'-Difluor-m,m'-dinitro-diphenylsulfon (FF-Sulfon) ein solches Re-

Name	Formel	Abkürzung	Fp. °C	Derivate
[1-Fluor-2,4-dinitrophenyl-5]-glycin		FDNP-Gly-OH	200 °	Äthylester Fp. 138,5 °C
—, —]-D,L-alanin		FDNP-Ala-OH	157 °	
—, —]-D,L-phenylalanin		FDNP-Phe-OH	195 °	Äthylester Fp. 76 °C
O-[—, —]-L-tyrosin-hydrochlorid		HCl·H·Tyr-OH O-DNPF	>300 °	N-Chloracetyl-äthylester Fp. 114 °C
N-[—, —]-D,L-lysin-hydrochlorid		HCl·H·Lys-OH NH-DNPF	173 °	Nα-Acetyläthylester Fp. 132 °C
Nε-[—, —]-oxylysin		H·Olys-OH NH-DNPF	—	Nα-Acetyl-α-carbäthoxy-β-lacton Fp. 205 °C

Tabelle 5. [1-Fluor-2,4-dinitrophenyl-5]-aminoäuren. J. Meienhofer, A. Würz

agens gefunden. Es reagiert ebenfalls bifunktionell mit Proteinen wie Seidenfibrin¹⁸⁾ und Kollagen¹⁷⁾. Die Fluor-Atome im FF-Sulfon besitzen einen Abstand von etwa 12 Å. FFDNB und FF-Sulfon lassen sich als chemische Zirkel mit Meßbereichen von 5 und 12 Å auffassen. Liegen Sulfhydryl-, Amino-, Phenol- und Imidazol-Gruppen, die für eine nucleophile Substitutionsreaktion am aromatischen Kern in Frage kommen, in diesen Abständen im Protein-Verband vor, so tritt die erwünschte Brückenreaktion ein.

1.) Reaktionen mit 1,5-Difluor-2,4-dinitrobenzol

Wie im Abschnitt II betont, kann ein bifunktionelles Reagens beim Fehlen eines zweiten Reaktionspartners auch monofunktionell reagieren. Im Abschnitt IV, 1a wird über einige entsprechende Modellsubstanzen berichtet, bei denen nur ein Fluor-Atom durch einen Aminosäure-Rest ausgetauscht ist. In Abschnitt IV, 1b werden Brücken-bis-amino-säuren einfacher Art und im Abschnitt IV, 1c Brücken-bis-amino-säuren gemischter Art, d. h. aus zwei verschiedenen Aminosäuren beschrieben. Allgemein bewährte sich bei der Synthese aller Modellsubstanzen die Verwendung von Aminosäureestern, da die Ester der Dinitrophenyl-amino-säuren besser kristallisieren als die freien Carbonsäuren. Aus den Estern, die meist in Form von Nadeln kristallisieren, werden die freien Säuren durch Verseifen dargestellt.

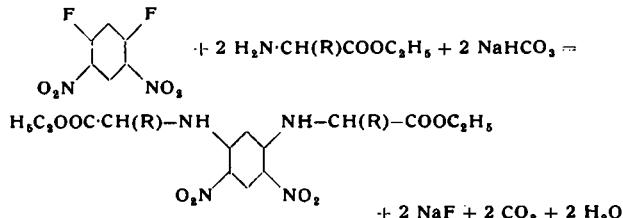
a) 1-Fluor-2,4-dinitrophenyl-5-amino-säuren²⁰⁾

Normalerweise reagieren beide Fluor-Atome mit den Amino-Gruppen der Aminosäuren bzw. ihrer Ester. Die Reaktion verläuft jedoch stufenweise, d. h., wenn ein Fluor-Atom reagiert hat, ist das zweite reaktionsträger. Wenn man daher die Temperatur niedrig genug hält und für einen Überschuß an FFDNB im Reaktionsgemisch sorgt, erzielt man weitgehend monofunktionelle Reaktion. Da ein Überschuß an FFDNB vom Reaktionsprodukt schlecht zu trennen ist, verwendet man stöchiometrische Mengen und läßt den Aminosäureester zu der Lösung des FFDNB in Aceton langsam zutropfen. Auf 1 Mol Ester-hydrochlorid benötigt man 2 Mole Natriumhydrogencarbonat²¹⁾. Die Reaktion ist bei 10–15 °C in 1–2 h beendet. Die freien Säuren werden durch Verseifen der Ester mit 6n Salzsäure durch Erhitzen unter Rückflußkühlung nach etwa 8 h erhalten. Beim Umkristallisieren aus Wasser erhält man die reinsten Präparate, wenn man zuvor sorgfältig auf den Eigen-pH-Wert der Säure einstellt.

Die in Tabelle 5 zusammengestellten FDNP-Amino-säuren zeigen im Papyrogramm erwartungsgemäß ähnliche R_f-Werte wie die bekannten DNP-Amino-säuren, von denen sie sich nur durch das zusätzliche Fluor-Atom unterscheiden.

b) Bifunktionelle Reaktion von FFDNB zu einfachen Dinitrophenyl-bis-amino-säuren^{14, 19, 20)}

Die Reaktion verläuft nach der Gleichung:

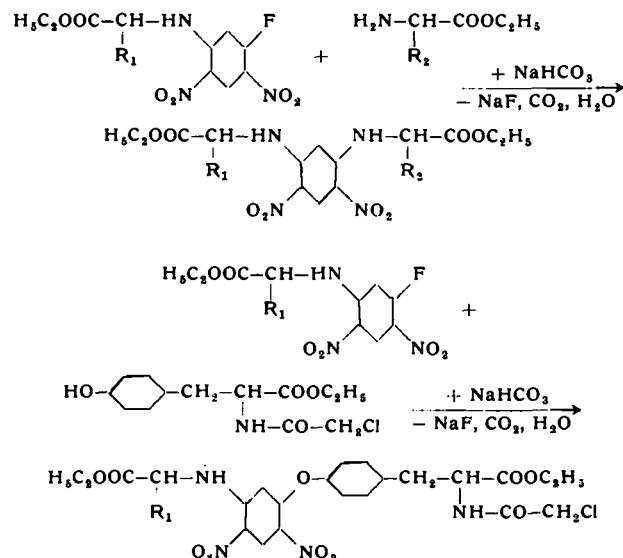


Bifunktioneller Umsatz wird durch einen großen Überschuß an Aminosäureester im Reaktionsgemisch erreicht. In eine Lösung von Aminosäureester und Natrium-

hydrogencarbonat in Aceton-Wasser 1:1 läßt man die Lösung des FFDNB in Aceton zutropfen. Die Reaktionen werden bei 40–60 °C unter Einleiten von Kohlendioxyd durchgeführt, wodurch nach Ditscher¹⁹⁾ die Zersetzung des Hydrogencarbonats in der Wärme und ein damit verbundenes Ansteigen des pH-Wertes auf 8–9 zurückgedrängt wird. Die Verseifung der Diäthylester geschieht wie im Abschnitt IVa beschrieben. Tabelle 6 zeigt die so dargestellten einfachen Brücken-bis-amino-säuren. Vom Tyrosin wurde der Bis-äther, vom Lysin und Oxylysin die ε-N-Derivate dargestellt.

c) Gemischte Dinitrophenyl-bis-amino-säuren²⁰⁾

In erster Stufe stellen wir die Fluor-dinitrophenyl-amino-säure dar und setzen dieses Derivat, das noch ein reaktionsfähiges Fluor-Atom enthält, in zweiter Stufe mit dem Ester einer weiteren Aminosäure um. Der Verlauf der Reaktionen ist in folgenden Formelbildern wiedergegeben:



Eine frühere Methode¹⁵⁾ bediente sich des Fluor-chlor-dinitrobenzols, das in der Kälte zuerst das Fluor gegen einen Aminosäure-Rest und in der Siedehitze (100 °C) das Chlor gegen einen weiteren Aminosäure-Rest austauscht, wobei die zweite Stufe jedoch nur unvollständig reagiert. Besser bewährte sich die neue Methode, von den Fluor-dinitrophenyl-amino-säureestern auszugehen, da man mit diesen Verbindungen bei 40–60 °C jede gewünschte gemischte Brückenverbindung darstellen kann. Man löst überschüssiges Aminosäureester-hydrochlorid und das erforderliche Natriumhydrogencarbonat in einem Aceton-Wasser-Gemisch (1:1) und läßt die Lösung der FDNP-Verbindung in Aceton zutropfen. Auf diese Weise läuft die Reaktion nahezu vollständig ab, und man erhält die gewünschten Brückenverbindungen in guten Ausbeuten.

Zur Darstellung der Tyrosin-Derivate bereitet man zuerst eine N-FDNP-Amino-säure und läßt dieses Monoproduct in zweiter Stufe mit dem N-Chloracetyl-L-tyrosin-äthylester reagieren. Wie mit R. Kockläuner gezeigt wurde, kann man nicht erst den Fluor-dinitrophenyläther des Tyrosins darstellen und diesen in zweiter Stufe mit einem Aminosäureester behandeln, da sonst die Äther-Bindung gespalten wird¹⁶⁾.

Die in Tabelle 7 zusammengestellten gemischten Dinitrophenyl-bis-amino-säuren wurden dargestellt. Bei den polyfunktionellen Aminosäuren Tyrosin und Lysin ließen wir stets die Phenol- bzw. ε-N-Gruppe reagieren. Die Ester wurden in der beschriebenen Weise verseift.

Name	Formel	Abkürzung	Fp. °C	Derivate
[2,4-Dinitrophenylen-1,5]-bis-glycin		HO·Gly·DNP_en Gly·OH	272 °	Diäthylester Fp. 198 °C
[—, —]-bis-D,L-alanin		HO·Ala·DNP_en Ala·OH		
[—, —]-bis-D,L-valin		HO·Val·DNP_en Val·OH	178 °	
[—, —]-bis-D,L-phenylalanin		HO·Phe·DNP_en Phe·OH	232 °	Däthylester Fp. 138 °C
[—, —]-bis-prolin		HO·Pro·DNP_en Pro·OH	185 °	
O,O'-[—, —]-bis-L-tyrosin-hydrochlorid		HCl·H·Tyr·OH HCl·H·Tyr·OH	>300 °	N,N'-Dichlor-acetyl-diäthylester Fp. 140 °C
N _ε ,N _ε '-[—, —]-bis-D,L-lysin-hydrochlorid		HCl·H·Lys·OH HCl·H·Lys·OH	>300 °	N _α ,N' _α -Diacetyl-diäthylester Fp. 168 °C
[—, —]-bis-oxylysin-hydrochlorid		HCl·H·Olys·OH └ DNP_en ─ ┌ HCl·H·Olys·OH		N _α -Acetyl- α -carb-äthoxy-8-lacton Fp. 202 °C

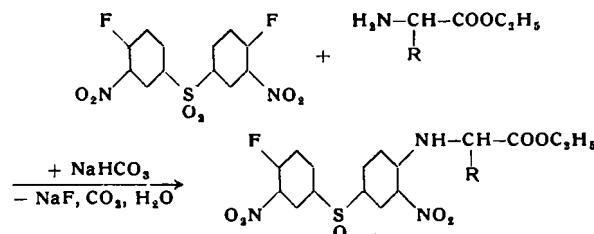
Tabelle 6
[2,4-Dinitrophenylen-1,5]-bis-aminoäuren. W. Ditscher, J. Meienhofer, A. Würz, L. Zürn²⁴⁾

2.) Reaktionen mit p,p'-Difluor-m,m'-dinitro-diphenylsulfon (FF-Sulfon)

Für die Reaktion des FF-Sulfons sind im allgemeinen die gleichen Bedingungen einzuhalten wie für die Reaktion des FFDNB. Auch hier bewährte es sich, die Aminoäureester und nicht die freien Aminoäuren einzusetzen. Bei den Reaktionen des FF-Sulfons mußte die Reaktionstemperatur erhöht werden.

a) Monofunktionelle Reaktionen²⁰⁾

Die Reaktion verläuft nach der Gleichung

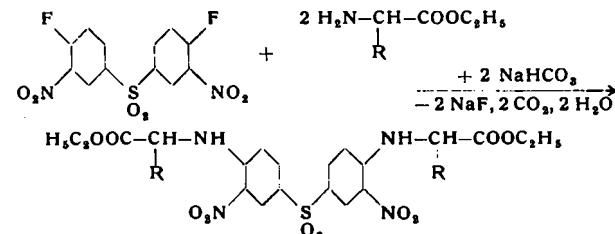


Die Lösung des Aminoäureesters und des Hydrogen-carbonats läßt man langsam zur acetonischen Lösung des FF-Sulfons zutropfen, damit dieses stets im Überschuß

vorliegt. Allerdings verläuft die Reaktion beim FF-Sulfon nicht stufenweise wie beim FFDNB, da die räumlich weit voneinander entfernten, an verschiedenen Phenyl-Kernen sitzenden Fluor-Atome energetisch gleichwertig sind. Mono- und bifunktioneller Umsatz laufen gleichberechtigt nebeneinander her. Bei zu niedriger Temperatur reagiert das FF-Sulfon zum größten Teil nicht. Die Aufarbeitung des Reaktionsgemisches gelang in zwei Fällen durch mehrfaches fraktioniertes Umkristallisieren, in einem Fall durch Säulentrennung. Dargestellt wurden die in der Tabelle 8 aufgeführten F-Sulfonderivate. Beim Lysin war wiederum die ε-Amino-Gruppe in Reaktion getreten.

b) Einfache Sulfon-bis-aminoäuren²⁰⁾

Die Reaktion verläuft nach der Gleichung:



Name	Formel	Abkürzung	Fp. °C	Derivate
[2,4-Dinitrophenyl]-1-glycin-5-D,L-alanin		HO·Gly·DNP _{en} ·Ala·OH	249 °	
[—,—]-L-glycin-5-D,L-phenylalanin		HO·Gly·DNP _{en} ·Phe·OH	229 °	Diäthylester Fp. 128 °C
[—,—]-L-glycin-5-O-L-tyrosin		HO·Gly·DNP _{en} ·O-H-Tyr·OH	>300 °	N-Chloracetyl-diäthylester Fp. 185 °C
[—,—]-1-glycin-5-N _ε -D,L-lysin		HO·Gly·DNP _{en} ·NH-H-Lys·OH	>300 °	N _α -Acetyl-diäthylester, amorph
[—,—]-1-D,L-phenylalanin-5-O-L-tyrosin		HO·Phe·DNP _{en} ·O-H-Tyr·OH	250 °Z	N-Chloracetyl-diäthylester Fp. 140 °C
[—,—]-1-D,L-phenylalanin-5-N _ε -D,L-lysin		HO·Phe·DNP _{en} ·NH-H-Lys·OH		N _α -Acetyl-diäthylester Fp. ~105 °C
[—,—]-1-O-L-tyrosin-hydrochlorid-5-N _ε -D,L-lysin-hydrochlorid		HCl·H-Tyr·OH O-DNP _{en} ·NH HCl·H-Lys·OH	>300 °	N _α -Acetyl-N-trifluor-acetyl-diäthylester Fp. 147 °C N _α -Acetyl-N-chloracetyl-diäthylester Fp. 160 °C
[—,—]-1-N _ε -D,L-lysin-hydrochlorid-5-S-L-cystein-hydrochlorid		HCl·H-Lys·OH HN·DNP _{en} ·S HCl·H-Cy·OH		N _α -Acetyl-äthylester

Tabelle 7
[2,4-Dinitrophenyl]-1-aminosäure A-5-aminosäure B. R. Kockläuner, J. Meienhofer

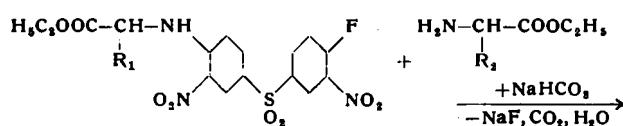
Name	Formel	Abkürzung	Fp. °C	Derivate
[p-Fluor-m,m'-dinitro-diphenylsulfon-p']-glycin		F-Sulfon·Gly·OH	225 °	Äthylester Fp. 174 °C
[—,—]-D,L-phenylalanin		F-Sulfon·Phe·OH	211 °	Äthylester Fp. 89 °C
N _ε -[—,—]-D,L-lysin-hydrochlorid		F-Sulfon·NH HCl·H-Lys·OH		

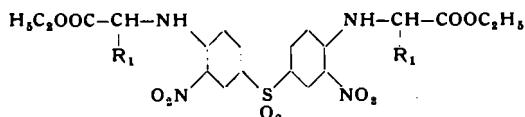
Tabelle 8
[p-Fluor-m,m'-dinitro-diphenylsulfon-p']-aminosäuren. J. Meienhofer, D. Wegerle

Man lässt FF-Sulfon bei 60 °C 5–6 h mit dem Aminosäureester und Natrium-hydrogencarbonat reagieren und hält durch Einleiten von CO₂ bei pH 7. Dargestellt wurden die in Tabelle 9 aufgeführten Verbindungen. Besonders wichtig ist uns das Sulfon-bis-tyrosin, da es aus Naturseide durch Reaktion mit FF-Sulfon in guten Ausbeuten isoliert werden konnte.

c) Gemischte Sulfon-bis-aminosäuren²⁰⁾

Die Reaktion verläuft nach der Gleichung:





Dargestellt wurden Brücken-bis-aminoäuren aus Lysin-Oxylysin, Glycin-Phenylalanin sowie Glycin-Tyrosin (vgl. Tabelle 10). Besonders interessant ist die zuerst genannte Verbindung, da sie mit *D. Wegerle*¹⁷⁾ aus Sehnenkollagen, welches mit FF-Sulfon „gegerbt“ worden war, isoliert werden konnte.

V. Charakterisierung der synthetischen Brücken-bis-aminoäuren mit aromatischen Brücken

1.) Elementaranalyse

Alle in den Tabellen 1–10 aufgeführten Verbindungen wurden durch Elementaranalyse charakterisiert. Bestimmt wurden alle Elemente bis auf Sauerstoff, der nur vereinzelt bestimmt wurde. Einige Derivate gaben gut kristallisierte Dihydrochloride. In diesen Fällen wurden auch Chlor-Analysen ausgeführt.

Soweit es sich um FDNP-Aminoäuren oder F-Sulfonaminoäuren handelt, wurde das nicht umgesetzte Fluor in diesen Verbindungen in der Kalium-Schmelze, da diese explosiv verläuft, nur qualitativ nachgewiesen, indem die Fluor-Ionen nach *Zeppelin*¹⁸⁾ titriert wurden.

2.) Schmelzpunkt und Kristallform

Von der Synthese her lagen die Verbindungen der Tabellen 6–10 in Form ihrer Ester vor. Diese Ester bilden charakteristische Kristalle, meist lange, gelbe Nadeln und haben einen definierten Schmelzpunkt. Dagegen ist der Schmelzpunkt und die Kristallform der Verseifungsprodukte nur dann definiert, wenn man durch sorgfältige pH-Kontrolle beim Fällen sehr reine Produkte erzielt.

3.) Röntgenogramm

Besonders wertvoll erwiesen sich das *Debye-Scherrer*- und das *Kratky*-Röntgenogramm zur Charakterisierung unserer Verbindungen. Sie unterschieden sich alle durch spezifische linienreiche Röntgenogramme. Im Falle

Name	Formel	Abkürzung	Fp. °C	Derivate
[m,m'-Dinitro-diphenylsulfon-p,p']-bis-glycin		HO·Gly·Sulfon·Gly·OH	225 °	Diäthylester Fp. 203 °C
[—,—]-bis-D,L-phenylalanin		HO·Phe·Sulfon·Phe·OH		Diäthylester Fp. 175 °C
O,O'—[—,—]-bis-L-tyrosin-hydrochlorid		HCl·H·Tyr·OH O·Sulfon·O HO·Tyr·H·HCl	>350 °	N,N'-Dibenzoyl-diäthylester Fp. 155—170 °C N,N'-Dichlor-acetyl-diäthylester Fp. 125 °C
N _ε ,N _ε '—[—,—]-bis-D,L-lysin-hydrochlorid		HCl·H·Lys·OH HN·Sulfon·NH HO·Lys·H·HCl		

Tabelle 9
[m,m'-Dinitro-diphenylsulfon-p,p']-bis-aminoäure. W. Ditscher, J. Meienhofer, D. Wegerle, H. Zuber

Name	Formel	Abkürzung	Fp. °C	Derivate
N _ε ,N _ε '—[m,m'-Dinitro-diphenylsulfon]-p-D,L-lysin-hydrochlorid-p'-D,L-oxylysin-hydrochlorid		HCl·H·Lys·OH HCl·H·Olys·OH NH—Sulfon—NH		
[—,—]-p-glycin-p'-D,L-phenylalanin		HO·Gly·Sulfon·Phe·OH	230 °	Diäthylester Fp. 109 °C
[—,—]-p-glycin-p'-O-L-tyrosin		HO·Gly·Sulfon·O H·Tyr·OH		N-Chlor-acetyl-diäthylester Fp. 196 °C

Tabelle 10
[m,m'-Dinitro-diphenylsulfon]-p-aminosäure A-p'-aminosäure. B. J. Meienhofer, D. Wegerle

des Sulfon-bis-tyrosins aus N-Chloracetyl-L-tyrosin-äthylester und FF-Sulfon einerseits und aus dem Kupfer-Komplex des Tyrosins und FF-Sulfons andererseits ergaben sich nach Verseifung und Aufarbeitung Kristalle mit gleichem Röntgenogramm, wie es auch die aus Sulfon-Seide isolierte Verbindung zeigte. Stellt man die Brücken-bis-aminoäure aus racemischem Tyrosin dar, so erhält man erwartungsgemäß ein ganz anderes Röntgenogramm. Der Schmelzpunkt ist zur Charakterisierung dieser unter Zersetzung bei hohen Temperaturen (oft über 300 °C) schmelzenden Verbindungen nur von geringem Wert.

Auch die *Kratky*-Aufnahme unserer Verbindungen erwies sich als sehr wertvoll, da man hier ein linienarmes, charakteristisches Langperiodenspektrum erhält, welches mit der Molekelform in gesetzmäßigem Zusammenhang steht.

4.) Chromatographisches Verhalten

Alle Verbindungen mit Ausnahme der reinen Tyrosinäther sind intensiv gelb. Diese Farbe erleichtert sehr den Nachweis und die Trennung durch chromatographische Methoden. In Bild 2 ist ein Paprogramm einiger FDNP-Aminoäuren, gemischter und einfacher Dinitrophenylen-bis-aminoäuren in sek. Butanol-Ameisensäure-Wasser (SBA) (75:15:10) wiedergegeben.

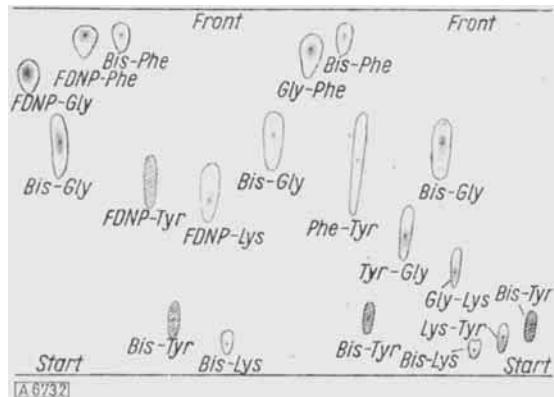


Bild 2
Papierchromatogramm von Difluordinitrobenzol-Verbindungen
(Lösungsmittel: sek. Butanol-Ameisensäure-Wasser)

Die Verbindungen sind deutlich getrennt. Eine gemischte Verbindung weist einen mittleren R_f -Wert auf, der zwischen den zugehörigen einfachen Brücken-bis-aminoäuren liegt. Erwartungsgemäß wandern Dinitrophenylen-bis-lysins und -bis-tyrosin als Di-aminoäuren sehr wenig, während die α -N-Dinitrophenyl-Derivate als Carbonsäuren in dem genannten sauren Gemisch einen höheren R_f -Wert besitzen. Die Derivate des Tyrosins sind zwar farblos, lassen sich jedoch durch ihre starke Absorption im UV-Licht leicht erkennen. Seitenkettenständige Derivate des Tyrosins und Lysins zeigen positive Ninhydrin-Reaktion, da ihre α -Amino-Gruppe frei ist.

Zur Chromatographie der rasch wandernden Derivate eignete sich ein Gemisch aus Butanol und Ammoniak, in welchem Carbonsäuren stark verringerte Wanderungswege zeigen¹⁸.

Auch die Trennung unserer Verbindungen in präparativem Ausmaß durch Chromatographie an Cellulosepulver bereitet keine besonderen Schwierigkeiten. Getrennt wurden insbesondere F-Sulfon-lysins vom Sulfon-bis-lysins und F-Sulfon-oxylysins vom Sulfon-bis-oxylysins¹⁷.

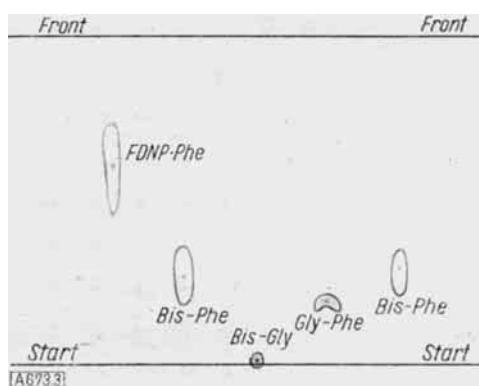


Bild 3
Papierchromatogramm von Difluordinitrobenzol-Verbindungen (Lösungsmittel: sek. Butanol-Ammoniak-Wasser)

5.) Resistenz gegen Hydrolyse und Licht

Alle bisher dargestellten Dinitrophenyl- und Sulfon-Derivate von Aminoäuren erwiesen sich als recht Hydrolyse-beständig. Im Verlaufe ihrer Darstellung wurden starke Säuren bei Siedehitze zur Verseifung der Ester-Gruppen verwendet und trotzdem konnten die Verbindungen in guten Ausbeuten erhalten werden. Ein quantitativer Versuch wurde an Dinitrophenylen-bis-glycin und -bis-valin mit A. Würz ausgeführt¹⁴). Diese Verbindungen wurden 24 h mit 6n Salzsäure auf 105 °C erhitzt. Durch Hydrolyse entstandenes Glycin wurde nach van Slyke bestimmt und ein Hydrolysegrad von 4,6% ermittelt. Beim Dinitrophenylen-bis-valin wurde ein Hydrolysegrad von 10,5% bestimmt.

Erwartungsgemäß sind die Dinitrophenyl-bis-aminoäuren gegen Alkalien ebensowenig beständig wie die Dinitrophenyl-aminoäuren. Einstündigiges Erhitzen mit gesättigter Barytlauge auf 105 °C genügt zur Hydrolyse. Diese von Mills²²) beschriebene Hydrolysemethode wurde daher zum Nachweis der Aminoäuren in isolierten Dinitrophenyl- und Sulfon-Derivaten herangezogen.

Die Lichtechnik der Dinitrophenyl-Verbindungen ist besonders in feuchtem Zustand gering. Etwas stabiler sind die Sulfon-Verbindungen. Es empfiehlt sich daher, insbes. die Lösungen gegen Lichteinwirkung zu schützen.

VI. Isolierung von Brücken-bis-aminoäuren aus Faserproteinen

1.) Bis-äther¹⁹)

Unbehandelte Wolle wurde mit Bis-diazohexan-Lösung vier Tage lang bei Zimmertemperatur behandelt. Die umgesetzte Wolle wurde hydrolysiert und im Hydrolysat Hexamethylen-bis-tyrosin nachgewiesen. Der R_f -Wert der Verbindung in sek. Butanol-Ameisensäure-Wasser (SBA) beträgt 0,20, in Phenol 0,37.

2.) Bis-thioäther²⁰)

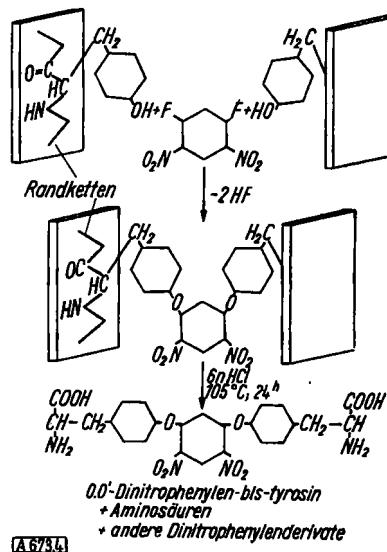
Läßt man in der beschriebenen Weise eine ätherische Lösung von Bis-diazohexan bei 0–4 °C auf reduzierte Wolle einwirken, so entsteht als Hauptprodukt eingebautes S,S'-Hexamethylen-bis-cystein, das aus dem Hydrolysat in Substanz isoliert werden konnte. Die Verbindung wurde papierchromatographisch und durch den Schmelzpunkt identifiziert und mit synthetischem Bis-thioäther verglichen. Die Ausbeute betrug 14%.

Eingehender beschäftigten wir uns mit der Isolierung derartiger Bis-thioäther aus Wolle, die zuerst mit Calcium-thioglykolat reduziert und hierauf mit Äthylen-, Trimethylen-, Tetramethylen-, Pentamethylen-, Hexamethylenbromid umgesetzt worden war. Aus dem Totalhydrolysat

in 6n Salzsäure wurde ein Gemisch des nicht umgesetzten Cystins und Bis-thioäthers isoliert. Das Cystin wird durch Einwirkung von Kaliumcyanid in Lösung gebracht und das zurückbleibende Alkylen-bis-cystein aus ammoniakalischer Lösung mit verd. Essigsäure gefällt. Die isolierten Bis-thioäther wurden durch Elementaranalyse, Zersetzungstemperatur und R_f-Wert charakterisiert bzw. mit den synthetischen Produkten verglichen. Die synthetischen und die aus Wolle isolierten S,S'-Alkylen-bis-cysteine zeigen den gleichen auf Glycin bezogenen Wanderungsweg im Durchlaufchromatogramm mit SBA als Lösungsmittel. Die glatte Reaktion der Cystein-Gruppen in reduzierter Wolle, selbst mit einer verhältnismäßig so großen Molekel wie Hexamethylenbromid bzw. Bis-diazohexan in bifunktioneller Reaktion ist von besonderem Interesse für die Deutung des Einbautes des Cystins in der Wolle. Eine Reaktion in den kristallinen Segmenten der Wolle scheint uns nicht sehr plausibel zu sein.

3.) Dinitrophenylen-bis-aminoäuren

Behandelt man Seide mit FFDNB bei 40 °C in wäßrig-alkoholischer Lösung, so erhält man eine gegen Säuren, Alkalien und Phenol stabilisierte Faser, aus deren Hydrolysat Dinitrophenylen-bis-tyrosin gemeinsam mit A. Würz isoliert werden konnte^{5, 5a}). Bild 4 zeigt, wie man sich die Bildung dieser Dinitrophenylen-bis-aminoäure aus dem Reagens und den eingebauten Tyrosin-phenol-Gruppen in der festen, lediglich in Wasser gequollenen Faser vorstellen kann.

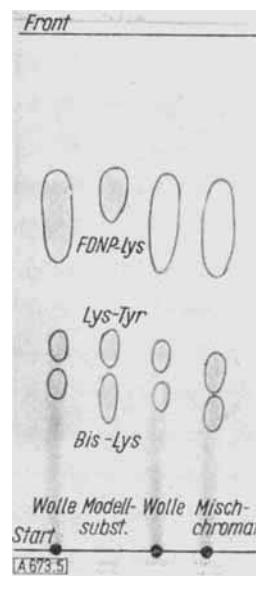


Schema der Bildung einer Dinitrophenylen-Brücke zwischen Tyrosin-Gruppen in Seide und Isolierung des O,O'-Dinitrophenylen-bis-tyrosins

Ähnliche Versuche wurden schon 1948 an Wolle vorgenommen und eine Reihe von gelben und farblosen Dinitrophenyl-Verbindungen im Hydrolysat nachgewiesen. Aber erst nach Kenntnis einer Anzahl synthetischer Reaktionsprodukte von FFDNB mit Aminoäuren gelang jetzt die Identifizierung einiger Produkte mit genügender Sicherheit²²).

Wolle wurde mit 50% ihres Gewichtes an FFDNB in Aceton-Wasser (1:1) 24 h bei 40 °C umgesetzt und nach gründlicher Reinigung hydrolysiert²²). Das Hydrolysat wurde nach Entfernung der Salzsäure im Vakuum papierchromatographisch untersucht (SBA). Auf dem Chromatogramm wurden FDNP-Tyrosin und Bis-tyrosin durch ihre

Absorption im UV-Licht eindeutig identifiziert. Aus dem Hydrolysat wurde ein Äther-Auszug gewonnen, welcher die Reaktionsprodukte aus FFDNB und Amino-endständigen Aminoäuren enthielt. Nachgewiesen wurden im ätherischen Extrakt des Hydrolysat-Dinitro-resorcin und die Reaktionsprodukte (vermutlich monofunktionell) von FFDNB mit Asparaginsäure, Glutaminsäure, Threonin, Valin und Leucin. Die Hauptmenge ließ man durch eine Kohlensäule laufen und eluierte die aromatischen Aminoäure-Derivate mit Ameisensäure. In dieser Lösung wurden papierchromatographisch Dinitrophenylen-bis-lysin, FDNP-Lysin, DNPen-Lysin-tyrosin identifiziert. Die Tyrosin-Derivate wurden in der Säule zurückgehalten (vgl. Bild 5)



Mit FFDNB umgesetzte Wolle (Ameisensäure-Eluat aus Kohlesäule)

4.) Sulfon-bis-aminoäuren aus Seide^{8, 13, 18)} und Kollagen¹⁷⁾

Seidenfibroin wurde mit FF-Sulfon solange umgesetzt, bis die Gewichtszunahme etwa 10% betrug. Offensichtlich hatte FF-Sulfon mit freien Amino-Gruppen im Seidenfibroin reagiert, da die umgesetzten Fasern stark gelb gefärbt waren. 75% der eingebauten Tyrosin-Gruppen des Fibroins hatten mit dem Reagens reagiert, da der Tyrosin-Gehalt von 12,0 auf 2,6% abgenommen hatte. Während unbehandelte Seide nur 0,2% Schwefel enthält, erhöht sich der Schwefel-Gehalt durch den Einbau der Sulfon-Brücke nach erschöpfendem Umsatz auf 0,8%. Alle analytischen Daten sprechen dafür, daß 70–90% des FF-Sulfons bifunktionell mit Tyrosin reagiert haben. Tatsächlich konnte die erwartete Verbindung mit guten Ausbeuten aus dem Hydrolysat isoliert und durch Vergleich mit dem synthetischen Sulfon-bis-tyrosin charakterisiert werden.

Aus demselben Hydrolysat wurde durch Verteilungchromatographie zwischen Butanol und Wasser Sulfon-bis-lysin isoliert. Während im Falle des Tyrosins ein gewisser Teil des Reagens auch monofunktionell mit Tyrosin reagiert hatte, ließ sich eigenartigerweise nur das bifunktionelle Sulfon-Derivat, nicht aber das F-Sulfon-lysin nachweisen.

Versuche an Sehnenkollagen mit demselben FF-Sulfon bei Reaktionszeiten bis zu 120 h erreichten nach dieser Zeit das Maximum des Umsatzes. Im Hydrolysat

Amino-säure	Brücken-bis-amino-säure	Isoliert aus	Methode	Aus-beute	Identifiziert durch
Tyr	H · Tyr · OH HO · Tyr · H └ O — DNP _{en} — O ─	DNP _{en} · Fibroin DNP _{en} · Wolle	präparativ	80 % 21 %	R _f -Wert
	H · Tyr · OH HO · Tyr · H └ O — Sulfon — O ─	Sulfon · Fibroin	präparativ		Elementaranalyse, Drehung, Röntgenogramm
	H · Tyr · OH HO · Tyr · H └ O — (CH ₂) ₄ — O ─	Bisdiazoxyhexan · Fibroin Bisdiazoxyhexan · Wolle	papyrographisch papyrographisch		R _f -Wert
Lys	H · Lys · OH HO · Lys · H └ NH — DNP _{en} — HN ─	DNP _{en} · Fibroin	papyrographisch	14-42 %	R _f -Wert
	H · Lys · OH HO · Lys · H └ NH — Sulfon — HN ─	Sulfon · Fibroin Sulfon · Kollagen	präparativ		R _f -Wert u. Identifizierung der Aminosäuren nach alkalischer Spaltung
Olys	H · Olys · OH HO · Olys · H └ NH — Sulfon — HN ─	Reduzierte u. m. Di- halogenalkan od. Bis- diazoxyhexan beh. Wolle	papyrographisch	R _f -Wert u. Schmelzpunkt	R _f -Wert u. Identifizierung der Aminosäuren nach alkalischer Spaltung
CySH	H · Cy · OH HO · Cy · H └ S — (CH ₂) _n — S ─				
Lys, Olys	H · Lys · OH HO · Olys · H └ NH — Sulfon — HN ─	Sulfon · Kollagen	papyrographisch		

Tabelle 11
Isolierung von Brücken-bis-amino-säuren
aus chemisch modifizierten Faserproteinen. A. Würz, O. Waschka
H. Zuber, D. Wegerle

wurden fünf gelbe Sulfon-Derivate nachgewiesen. Durch Isolierung und Vergleich mit synthetischen Verbindungen wurde gezeigt, daß es sich um die einfachen Sulfon-bis-amino-säuren des Lysins und Oxylysin sowie um die gemischte Sulfon-bis-amino-säure des Lysins und Oxylysin handelte. Das Sulfon-bis-lysine war in relativ starker Konzentration vorhanden. Zwei rascher wandernde Verbindungen erwiesen sich als monofunktionelle Reaktionsprodukte von FF-Sulfon mit den ε-Amino-Gruppen von Lysin und Oxylysin.

VII. Diskussion

Die bisherigen Ergebnisse über die Isolierung von Brücken-bis-amino-säuren aus Faserproteinen haben die Brauchbarkeit von FFDNB und FF-Sulfon als chemische Meßzirkel für topochemische Reaktionen in Faserproteinen bewiesen.

Die Bildung von Dinitrophenyl-bis-lysine wurde sowohl im Seidenfibrin als auch im Wollkeratin beobachtet. Diese Tatsache spricht für eine Häufung der Lysin-Reste in bestimmten Segmenten der Faser.

Zur gleichen Schlüssefolgerung kamen wir beim Kollagen. Es war auffallend, daß die basischen Aminosäuren Lysin und Oxylysin mit ihrer freien ε-Amino-Gruppe überwiegend bifunktionell mit FF-Sulfon reagieren. Wenn man beim Kollagen ein Mindestmolekulargewicht von 39000 annimmt und die Aminosäuren des Kollagens entsprechend ihrer prozentualen Häufigkeit auf diese Struktureinheit aufteilt, so entfallen auf insgesamt 419 Reste 12 Lysin- und nur 3 Oxylysin-Reste. Bei Annahme einer gleichmäßigen Verteilung der Aminosäuren längs der Polypeptid-Kette wäre dann im Durchschnitt jeder 35. Rest ein Lysin- und nur jeder 140. ein Oxylysin-Rest. Ein die einzelnen Kollagen-Polypeptid-Ketten vernetzender Umsatz mit bi-

funktionellen Reagentien, wie er von uns in beträchtlichem Umfang festgestellt werden konnte, ist daher besonders beim Oxylysin unwahrscheinlich, wenn sich die einzelnen basischen Reste nicht einigermaßen exakt gegenüberliegen. Nach einer von Bear²⁵⁾ entwickelten Vorstellung ist die Kollagen-Peptid-Kette periodisch abwechselnd aufgebaut aus gut kristallisierenden Bereichen, in denen die Hydroxyl-haltigen Seitenketten mit durchschnittlicher Länge, z. B. Serin und Oxyprolin vorherrschen, und aus weniger geordneten Bereichen, in denen die längeren sauren, basischen und neutralen Aminosäuren eingebaut sind. Wir glauben, daß unsere Reaktionen zwischen Kollagen und FF-Sulfon diese Häufungs-Hypothese von Bear stützen.

Gleichermaßen gilt für das Seidenfibrin, in welchem nach unseren Befunden sowohl das Tyrosin als auch das Lysin in bestimmten Segmenten gehäuft vorzuliegen scheinen. Seidenfibrin ist das klassische Vorbild für eine segmentierte lineare Makromolekül, in welcher nach Smith^{29, 40)} kristallisierte Segmente aus etwa 50 Aminosäure-Resten (Glycin:Alanin:Serin wie 3:2:1) mit weniger gut geordneten Segmenten aus etwa 30 Aminosäuren abwechseln.

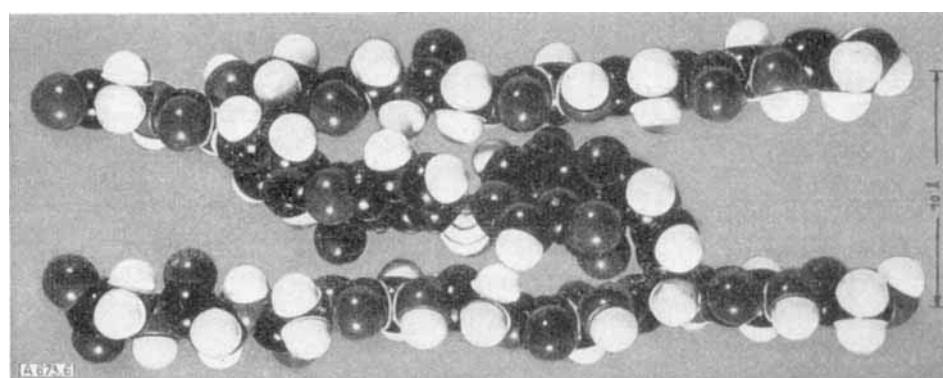


Bild 6
Kalottenmodell einer Diphenylsulfon-Brücke zwischen zwei benachbarten Polypeptid-Kettenrosten

Die weniger gut geordneten Segmente enthalten neben Glycin, Alanin und Serin alle übrigen Aminosäuren mit sperrigen Seitenketten-Resten. An Kalottenmodellen (Bild 6) ließ sich zeigen, daß die Diphenylsulfon-Brücke zwischen zwei benachbarten Polypeptid-Kettenrosten nicht in einem Winkel von 90° untergebracht werden kann, son-

dern sich etwa parallel einlagert und ein Tyrosin-phenol der Kette 1 mit dem 5–6 Aminosäure-Reste weiter entfernten Tyrosinphenol der Kette 2 reagieren kann. Die Möglichkeit, daß die Sulfon-Brücke zwei Tyrosin-phenole ein und derselben Kette in intrachenarer Reaktion verbindet, ließ sich durch physikalisch-chemische Untersuchungen wie Löslichkeit, Superkontraktion, röntgenographisches Verhalten weitgehend ausschließen. Hierüber wurde a. a. O. berichtet¹⁸⁾.

Von Interesse für die Konstitutionsermittlung von Proteinen wäre die Übertragung der Brückenreaktionen auf lösliche Eiweißkörper. Würde es z. B. gelingen, die Reaktion von FFDNB und FF-Sulfon so zu lenken, daß nur eine intramolekulare Reaktion im Inneren der Molekülen stattfindet, so könnte man die gegenseitige Lage von Peptid-Ketten ermitteln. Bekannt ist das Problem beim Insulin. Die eigentliche Insulin-Molekkel besteht nach Sanger, Tuppy und Thompson¹⁷⁾ aus einer Phenylalanyl- und einer Glycyl-peptid-Kette. Die beiden Ketten a und b haben ungefähr das Molekulargewicht 6000. Obwohl die Reihenfolge der Aminosäuren in beiden Ketten durch Arbeiten von Sanger aufgeklärt und die Lage der Disulfid-Brücken zwischen a und b bekannt ist, steht eine restlose Kenntnis der räumlichen Anordnung der Ketten a und b noch aus. Wertvolle Aufschlüsse über die Struktur des Insulins könnte man gewinnen, wenn sich feststellen ließe, ob die für nucleophile Reaktionen geeigneten α -Amino-Gruppen des Glycins und Phenylalanins sowie die ϵ -Amino-Gruppe des Lysins und die Phenol-Gruppe des Tyrosins sich mit unseren Reagentien verbinden.

In Vorversuchen wurde gefunden, daß man tatsächlich aus FFDNB und Insulin lösliche Produkte erhalten kann, wenn die Insulin-Konzentration unter 0,5% gehalten wird. Über die Reaktionsprodukte, die aus dem Hydrolysat isoliert wurden, kann noch nichts gesagt werden, da die Versuche noch nicht abgeschlossen sind.

Die vorliegende Untersuchung wurde von folgenden Institutionen gefördert: Internationales Wollsekretariat, London und Düsseldorf; Deutsche Forschungsgemeinschaft, Bad Godesberg; Verband der chemischen Industrie, Referat Berufserziehung und Forschung, Düsseldorf; Deutsches Wollforschungsinstitut e.V. an der Technischen Hochschule Aachen; Carl Freudenberg-Stiftung, Weinheim.

Besonderen Dank schulde ich Herrn Professor Dr. Dr. h. c. Karl Freudenberg, Heidelberg, der meine früheren Untersuchungen an Brückenreaktionen in die hier beschriebene präparative Richtung lenkte.

Die Zusammenfassung stützt sich auf Ergebnisse folgender ehemaliger und jetziger Mitarbeiter, denen ich auch an dieser Stelle herzlich danke: Dr. A. Würz, Dr. H. Wilhelm, Dr. B. Wollemann, Dr. R. Kockläuner, Dr. W. Ditscher, Dr. O. Waschka, Dr. K. Traumann, Dr. H. Zuber, Dipl.-Chem. D. Wegerle, Dipl.-Chem. J. Meienhofer, cand. chem. L. Zürn.

Literatur

A. Heidelberger Arbeiten

- ¹⁾ H. Zahn: Antrittsvorlesung, Heidelberg, Juli 1948, unveröffentlicht.
- ²⁾ H. Zahn: Versuche zur Stabilisierung von Wolle und Seide mit 1,3-Difluor-4,6-dinitrobenzol. Melland Textilber. 31, 762 [1950].
- ³⁾ H. Zahn: Über die Reaktion von 1,3-Difluor-4,6-dinitrobenzol mit Faserproteinen und Aminosäuren. Kolloid-Z. 127, 39 [1951].
- ⁴⁾ H. Zahn u. H. Wilhelm: Über Tetra- und Hexamethylen-bis(α -imino-säurenitrile) und -säuren. Diese Ztschr. 63, 267 [1951].
- ⁵⁾ H. Zahn u. A. Würz: Über die Reaktion des Seidenfibrins mit 2,4-Dinitrofuranbenzol. Biochem. Z. 322, 327 [1952].
- ⁶⁾ H. Zahn: Neue Forschungsergebnisse an Wolle. Textil-Rdsch. [St. Gallen] 7, 305 [1952].
- ⁷⁾ H. Zahn u. H. Wilhelm: Über einige Diester der Hippursäure und des Benzoylalanins mit Diolen. Chem. Ber. 85, 1113 [1952].
- ⁸⁾ H. Zahn u. H. Wilhelm: Über Bis-(α -imino-säurenitrile) und -säuren. I. Mitt. Liebigs Ann. Chem. 579, 1 [1953].
- ⁹⁾ H. Zahn u. H. Zuber: Über einige reaktionsfähige Fluor-Verbindungen der aromatischen Reihe. Chem. Ber. 86, 172 [1953].
- ¹⁰⁾ H. Zuber: Beiträge zur Struktur des Seidenfibrins. Dissertat. Heidelberg 1953.
- ¹¹⁾ H. Zahn u. B. Wollemann: Über einige S,S'-Alkylen-bis-cysteine und deren Isolierung aus chemisch modifizierter Wolle. Makromolekulare Chem. 10, 122 [1953].
- ¹²⁾ W. Ditscher, Dissertat. Heidelberg 1953.
- ¹³⁾ H. Zahn u. H. Zuber: Neue Erkenntnisse über die Chemie der Naturseide. Textil-Rdsch. [St. Gallen] 9, 119 [1954].
- ¹⁴⁾ H. Zahn u. A. Würz: Über Dinitrophenyle-bis-amino-säuren aus 2,4-Dinitro-1,6-difluorbenzol und Glycin, Alanin, Valin, Prolin und Tyrosin. Biochem. Z. 325, 182 [1954].
- ¹⁵⁾ H. Zahn u. R. Kockläuner: Reaktionen von 1-Fluor-5-chlor-2,4-dinitrobenzol mit Aminosäuren. Biochem. Z. 325, 333 [1954].
- ¹⁶⁾ H. Zahn u. R. Kockläuner: Spaltung von O-Dinitrophenyltyrosin durch Aminosäuren. Biochem. Z. 325, 339 [1954].
- ¹⁷⁾ H. Zahn u. D. Wegerle: Reaktion von p,p'-Difluor-m,m'-dinitro-diphenylsulfon mit Sehnenkollagen. Das Leder 5, 121 [1954].
- ¹⁸⁾ H. Zahn u. H. Zuber: Über das Reaktionsprodukt von p,p'-Difluor-m,m'-dinitro-phenylsulfon mit Selenfibrin. Mh. Chemie 85, 759 [1954].
- ¹⁹⁾ O. Waschka: Zur Kenntnis des Bis diazo hexans und dessen Umsetzungen mit Aminosäuren und Proteinen. Dissertat. Heidelberg 1954.
- ²⁰⁾ J. Meienhofer: Reaktionen von 1,5-Difluor-2,4-dinitrobenzol und p,p'-Difluor-m,m'-dinitro-diphenylsulfon mit Aminosäuren usw. Diplomarbeit, Heidelberg 1954.
- ²¹⁾ H. Zahn u. K. Traumann: Zur Kenntnis einiger aliphatischer Bis-thioäther des Cysteins. 2. Mitt. Liebigs Ann. Chem. 597, 232 [1955].
- ²²⁾ H. Zahn u. J. Meienhofer, Unveröff. Versuche.
- ²³⁾ L. Zürn, Diplomarbeit, Heidelberg 1955.

B. Weitere Zitate

- ²⁴⁾ P. Alexander, Kolloid-Z. 122, 8 [1951].
- ²⁵⁾ R. S. Bear, Adv. Protein Chem. 7, 153 [1952].
- ²⁶⁾ J. H. Bowes, Research 4, 155 [1951].
- ²⁷⁾ R. Brill, Liebigs Ann. Chem. 434, 202 [1943].
- ²⁸⁾ M. C. Corfield u. A. Robson, Biochem. J. 59, 62 [1955].
- ²⁹⁾ B. Drucker u. S. G. Smith, Nature [London] 165, 197 [1950].
- ³⁰⁾ E. Fischer, Ber. dtsch. chem. Ges. 35, 1095 [1902]. Vgl. F. Wessely, E. Kemm u. J. Mayer, Hoppe-Seyler's Z. physiol. Chem. 180, 64 [1929].
- ³¹⁾ S. R. Hoover, E. L. Kokes u. R. F. Peterson, Textile Res. J. 18, 423 [1948].
- ³²⁾ H. S. Loring u. V. du Vigneaud, J. biol. Chemistry 111, 385 [1935].
- ³³⁾ G. L. Mills, Nature [London] 165, 403 [1950].
- ³⁴⁾ Th. Nemetschek, W. Graßmann u. U. Hofmann, Z. Naturforsch. 10b, 61 [1955].
- ³⁵⁾ W. I. Patterson, W. B. Geiger, L. R. Mizell u. M. Harris, J. Res. nat. Bur. Standards 27, 459 [1941].
- ³⁶⁾ L. Pauling, R. B. Corey u. Branson, J. Amer. chem. Soc. 72, 5349 [1950].
- ³⁷⁾ F. Sanger, Biochem. J. 39, 507 [1945].
- ³⁸⁾ F. Sanger u. H. Tuppy, Biochem. J. 49, 463 [1951]. F. Sanger u. E. O. P. Thompson, Biochem. J. 53, 353 [1953].
- ³⁹⁾ J. A. Schikanowa, J. Angew. Chem. (USSR) 23, 667 [1950].
- ⁴⁰⁾ D. H. Simmonds, Austr. J. Biol. Sci. 7, 98 [1954].
- ⁴¹⁾ S. G. Smith, Shirley Inst. Memoirs 26, 191 [1953].
- ⁴²⁾ J. B. Speakman u. E. Stott, Trans. Faraday Soc. 31, 1425 [1935]; J. B. Speakman u. S. C. Whewell, J. Soc. Dyers Colourists 52, 380 [1936].
- ⁴³⁾ H. v. Zeppelin, diese Ztschr. 63, 281 [1951]; 64, 223 [1952].

Eintrag am 10. August 1955 [A 673]