

Aminoalkohol ausgeäthert. Durch Einleiten von HCl wird das Hydrochlorid aus der getrockneten Lösung wieder ausgefällt (3 g). Ausb. 14.5 g Rohprodukt (87% d. Th.). Aus Alkohol/Äther feine Nadeln vom Schmp. 228°.

$C_{20}H_{25}NO \cdot HCl$ (331.9) Ber. C 72.38 H 7.90 Cl 10.68 N 4.22
Gef. C 73.03 H 7.98 Cl 10.64 N 4.25

DL-erythro-2-Amino-1-cyclohexyl-1.2-diphenyl-äthanol: Das Hydrochlorid-Rohprodukt wird in heißem Wasser gelöst und mit Aktivkohle behandelt. Das Filtrat wird rasch abgekühlt und Ammoniak bis zur alkalischen Reaktion zugegeben. Nach Aufbewahren über Nacht hat sich der Aminoalkohol als farblose, zähe Substanz abgeschieden. Das überstehende Wasser wird dekantiert und der Rückstand mit wenig verd. Äthanol verrieben. Der Aminoalkohol wird abgesaugt, getrocknet und aus Petroläther umkristallisiert. Farblose Kristalle vom Schmp. 93–94.5°. Ausb. 54% d. Th. (bez. auf Desylamin-hydrochlorid).

$C_{20}H_{25}NO$ (295.4) Ber. C 81.31 H 8.53 N 4.74 Gef. C 81.35 H 8.81 N 4.69

N-Benzoylverbindung: 0.6 g des *Aminoalkohols* werden in 30 ccm Äther gelöst, mit 0.28 g *Benzoylchlorid* versetzt und unter Schütteln 10 ccm 1-proz. Natronlauge zugegeben. Das ausgefallene Produkt wird abgesaugt, mit Wasser gewaschen und aus Methanol umkristallisiert. Farblose Nadeln vom Schmp. 225°. Ausb. 87% d. Th.

$C_{27}H_{29}NO_2$ (399.5) Ber. C 81.17 H 7.32 N 3.51 Gef. C 81.20 H 7.31 N 3.55

THEODOR WIELAND, HERBERT MERZ und GERHARD PFLEIDERER

Über Peptidsynthesen, XXII¹⁾

Zur Reaktivität von Aminosäure-glykolestern

Aus dem Institut für Organische Chemie der Universität und seiner Biochemischen Abteilung, Frankfurt a. M.

(Eingegangen am 24. März 1960)

Die Geschwindigkeiten der Spaltung verschiedener Mono-leucinester von Glykolen durch Hydroxylamin wurden bestimmt. Nur die Ester von Nucleotiden und Nucleosiden sind in ihrem Verhalten dem Leucylthiophenol vergleichbar.

In der XII. Mitteilung²⁾ wurde über ein an der Carboxylgruppe „aktiviertes“ Valinderivat berichtet, das beim Erhitzen von Valylthiophenol mit Adenosin-5'-phosphat (AMP) entstand. Die Verbindung wurde aufgrund ihrer großen Labilität gegen OH^\ominus und Hydroxylamin zunächst für ein Anhydrid aus Valin und AMP gehalten, bis sich durch ihre Resistenz gegenüber Perjodat herausstellte, daß es sich um einen Ester handeln muß, in dem die Carboxylgruppe der Aminosäure mit dem 2'- oder 3'-Hydroxyl des Riboserests von AMP verknüpft ist^{3,4)}. Diesem Bindungstyp begegnet man auch in der lebenden Zelle; nach H. G. ZACHAU, G. ACS und F. LIP-

¹⁾ XXI. Mitteil.: TH. WIELAND, *Angew. Chem.* **71**, 417 [1959].

²⁾ TH. WIELAND, E. NIEMANN und G. PFLEIDERER, *Angew. Chem.* **68**, 305 [1956].

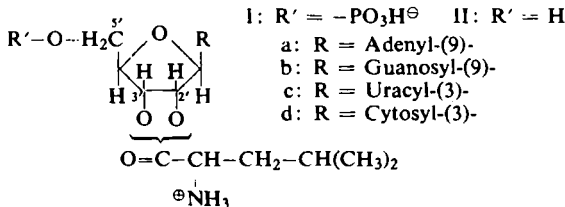
³⁾ TH. WIELAND und G. PFLEIDERER, *Advances in Enzymol.* **19**, 235 [1957].

⁴⁾ TH. WIELAND, F. JAENICKE, H. MERZ und M. OSSORIO, *Liebigs Ann. Chem.* **613**, 95 [1958].

MANN⁵⁾ sind Ester der Aminosäuren mit dem endständigen Adenylsäurerest niedrigmolekularer Ribonucleinsäuren als die energiereichen Proteinbausteine zu betrachten¹⁾. Die für einen Ester ungewöhnliche Reaktivität dieser Verbindungsklasse hat uns veranlaßt, an Aminosäureestern einiger cyclischer Glykole die Geschwindigkeit der Hydroxamsäurebildung vergleichend zu untersuchen⁶⁾.

EINIGE NUCLEOTIDESTER DES LEUCINS

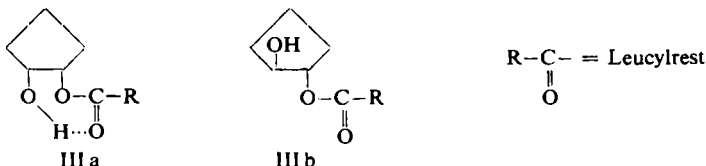
Durch kurzes Erhitzen mit DL-Leucylthiophenol-hydrochlorid⁷⁾ in Dimethylsulfoxyd wurden analog der Synthese des Adenosin-5'-phosphat-2'(oder 3')-valinesters aus den Dinatriumsalzen der Nucleotide die entsprechenden Leucinester von Adenosin-5'-phosphat (AMP) (Ia), Guanosin-5'-phosphat (GMP) (Ib), Uridin-5'-phosphat (UMP) (Ic) und Cytidin-5'-phosphat (CMP) (Id) dargestellt. Die Ausbeuten der durch mikropräparative Hochspannungs-Papieroelektrophorese⁸⁾ gereinigten Ester betragen ca. 10%, beim Cytidinderivat noch weniger. Trotzdem konnte genügend Material für vergleichende Bestimmungen der Hydroxylaminolyse-Geschwindigkeiten gewonnen werden.



Versuche, auf analogem Weg den Leucinester der 2'-Desoxy-adenylsäure zu erhalten, führten merkwürdigerweise nicht zum Erfolg. Der 2'(oder 3')-Adenosinester des Leucins (IIa) ließ sich aus Ia durch Einwirkung von saurer Prostataphosphatase (vgl. auch I. c.⁵⁾) erhalten und durch Papieroelektrophorese reinigen.

LEUCINESTER VON *cis*- UND *trans*-CYCLOPENTANDIOL-(1.2)

Um zu ergründen, ob die energiereiche Bindungsart des Aminoacylrests ganz allgemein sterisch fixierten Estern von 1.2-Glykolen innewohnt und ob das im *cis*-Ester (IIIa) benachbarte Hydroxyl (durch H-Brückenbindung mit dem Carboxyl-O)



die nucleophile Angriffbarkeit des Acylrests auf das beobachtete Maß steigert, wurden auch die Leucinester von *cis*- und *trans*-Cyclopentandiol-(1.2) (IIIa und b) synthetisiert.

⁵⁾ H. G. ZACHAU, G. ACS und F. LIPMANN, Proc. nat. Acad. Sci. USA **44**, 885 [1958].

⁶⁾ Siehe auch die gleichzeitigen Mitteilungen von H. G. ZACHAU, Chem. Ber. **93**, 1822 [1960]; H. G. ZACHAU und W. KARAU, Chem. Ber. **93**, 1830 [1960], nachstehend.

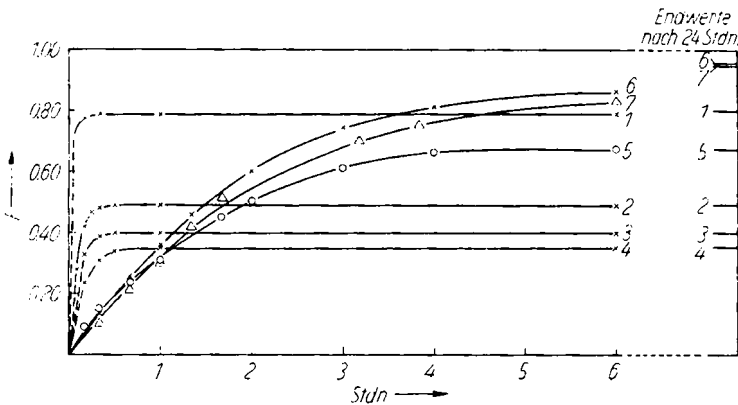
⁷⁾ TH. WIELAND und W. SCHÄFER, Liebigs Ann. Chem. **576**, 104 [1952].

⁸⁾ TH. WIELAND und G. PFLEIDERER, Angew. Chem. **67**, 257 [1955]; **69**, 199 [1957].

Hier führte die bei den Nucleotiden erfolgreiche Verwendung des Leucylthiophenols nicht sofort zum Erfolg. Deshalb wurde eine der wirksamsten Veresterungsmethoden, die Reaktion der Glykole mit dem Aminosäurechlorid-hydrochlorid, angewandt. Man erhielt den Mono-leucinester des *trans*-Glykols (IIIb) als krist. Hydrochlorid in 50-proz. Ausbeute. Bei der *cis*-Verbindung verlief der Versuch unbefriedigender; es konnten nur ca. 10% einer festen Verbindung (Hydrochlorid von IIIa) isoliert werden, die zu 70% aus dem gesuchten Ester bestanden.

SPALTUNG VON LEUCINESTERN MIT HYDROXYLAMIN

Die Labilität der Leucinester wurde durch Aufnahme der Kinetik der Spaltungen mit einem mehr als 1000fachen Überschuß von Hydroxylamin in Wasser bei p_H 7.8 und 25° festgestellt. Es wurden von Zeit zu Zeit Proben entnommen und in ihnen jeweils die Extinktion des roten Eisen(III)-Komplexes der entstandenen Hydroxamsäuren bei 546 $m\mu$ gemessen. Die Extinktionswerte in Abhängigkeit von der Inkubationszeit für 7 untersuchte Leucinester zeigt die Abbildung. Die an der rechten Ordinate sichtbaren Extinktionen der Proben nach 24stdg. Inkubation mit Hydroxylamin dienen als E_∞ -Werte zur Ermittlung der relativen, der Spaltung unterworfenen



Geschwindigkeit der Bildung von Leucin-hydroxamsäure aus den Leucinestern 1 - 7.
Ordinate: Extinktion der FeIII-Komplexe bei 546 $m\mu$.

Halbwertszeiten der Hydroxamsäurebildung

Nr.	Verbindung	$t_{1/2}$ (Min.)
1	Leucyl-thiophenol	2
2	Leucyl-2'(oder 3')-AMP	4
3	Leucyl-2'(oder 3')-UMP	5
4	Leucyl-2'(oder 3')-GMP	7
5	Leucyl- <i>cis</i> -cyclopentandiol	64
6	Leucyl- <i>trans</i> -cyclopentandiol	87
7	Leucin-methylester	105

Mengen der verschiedenen Ester. Im Vergleich mit dem definierten *trans*-Cyclopentandiolester (IIIb, Kurve 6) als Eichsubstanz geht für das mit gleicher Einwaage eingesetzte Präparat des *cis*-Esters (IIIa, Kurve 5) ein Gehalt von 70% an durch Hydroxylamin spaltbarer Substanz hervor.

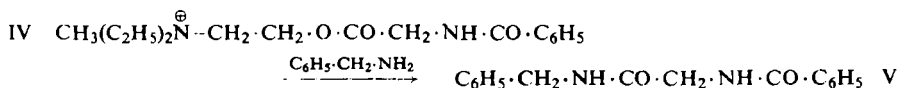
Trägt man die gemessenen Extinktionswerte in der Form $\log E_{\infty} - \log(E_{\infty} - E)$ gegen die Meßzeiten auf, so resultieren in allen Fällen Geraden (Reaktionen 1. Ordnung infolge des großen Hydroxylaminüberschusses) mit verschiedener Steigung. Die beim Ordinatenwert $\log 2$ (0.3010) abzulesenden Halbwertszeiten der Hydroxamsäurebildung für die untersuchten Ester haben die in der Tab. aufgeführten Werte.

Der Leucin-CMP-ester (Id) stand für eine exakte Vergleichsmessung nicht in ausreichender Menge zur Verfügung. Aus seiner Hydrolyseempfindlichkeit bei der Elution aus Papierpherogrammen geht eindeutig hervor, daß er ebenfalls zur Gruppe der reaktionsfähigen Verbindungen gehört.

Die Reaktion des Leucin-adenosin-2'(oder 3')-esters (IIa) mit Hydroxylamin wurde nur an Hand von 3 Meßpunkten verfolgt. Da nach 5 Min. schon mehr als 90% gespalten waren, dürfte hier $t_{1/2}$ auch bei 3–4 Min. liegen.

DISKUSSION DER ERGEBNISSE

Aus den geschilderten Ergebnissen geht deutlich hervor, daß die energiereiche Aminosäureesterbindung, die mit der Thioesterbindung auf gleicher Stufe steht, nur in den Estern der Nucleotide oder Nucleoside angetroffen wird. Die nachbarständige Hydroxylgruppe vermag diese Labilisierung nicht zu erklären. Sie übt zwar, wie an den Cyclopentandiolestern (IIIa, b) zu sehen ist, eine induktive Wirkung aus, die jedoch über die bei Monoestern von 1.2-Glykolen bekannte nicht hinausgeht. So beträgt die relative Geschwindigkeit der alkalischen Esterhydrolyse in Wasser (25°) beim Glykolmonoacetat 1.52 gegen Methylacetat = 1.0⁹⁾. Daß der *cis*-Ester (IIIa) durch Hydroxylamin etwas rascher gespalten wird, mag mit der auf S. 1817 angedeuteten H-Brücke zusammenhängen, doch genügt dieser Effekt bei weitem nicht, um die Reaktionsgeschwindigkeit auf das rund 10fache zu erhöhen, wie es bei den Nucleotidestern der Fall ist. Da die Anwesenheit des 5'-veresterten Phosphatrests zur Labilisierung nicht nötig ist und die verschiedenen Basen (R in I) qualitativ gleichartig wirken, muß die Reaktionsfähigkeit der „aktivierten“ Aminosäuren außer durch den Ringsauerstoff (vgl. I. c.⁶⁾) durch die Wirkung des glykosidisch gebundenen Stickstoff-Atoms bedingt sein. Für dieses läßt sich nach der MO-Methode eine Formalladung von ± 0.3 bis 0.4 ausrechnen¹⁰⁾, was einen induktiven Effekt verständlich macht, der dem des Stickstoffs in den Estern quartärer Colamine ähnlich sein dürfte. Nach R. SCHWYZER¹¹⁾ beginnt der Hippursäureester des *N*-Methyl-*N,N*-diäthylcolamin-bromids (IV) in wäßriger Lösung bei Raumtemperatur mit Benzylamin schon nach 1 Min. Hippursäure-benzylamid (V) abzuschneiden, ist also ein deutlich „aktivierter“ Aminosäureester.



⁹⁾ Aus L. P. HAMMETT, Physical Organic Chemistry, McGraw-Hill Book Co., New York 1940, S. 211.

¹⁰⁾ A. PULLMAN und B. PULLMAN, Bull. Soc. chim. France 1958, 766.

¹¹⁾ R. SCHWYZER, B. ISELIN und M. FEURER, Helv. chim. Acta 38, 69 [1955].

Diese Analogie macht für die aktivierten Nucleotidester der Aminosäuren das 2'-C-Atom als Bindungsort wahrscheinlicher, da die induktive Wirkung des Stickstoffs für eine Aktivierung der entfernteren 3'-Estergruppierung nicht ausreichen dürfte. Hierzu fügt sich die Tatsache, daß, soweit man bisher weiß, nur lösliche Ribonucleinsäuren, nicht 2'-Desoxy-ribonucleinsäure, an der biologischen Übertragung aktivierter Aminosäuren beteiligt sind.

BESCHREIBUNG DER VERSUCHE

DL-Leucinester von Nucleotiden: Analog der früheren Vorschrift⁴⁾ wurden 0.2 mMol (70–80 mg) der trockenen Dinatriumsalze von *Guanosin-5'-phosphorsäure**, *Uridin-5'-phosphorsäure* und *Cytidin-5'-phosphorsäure* mit 0.2 mMol (ca. 50 mg) *Leucylthiophenol-HCl* in 1 ccm trockenem Dimethylsulfoxyd 10 Min. auf 120° erwärmt. Nach raschem Abkühlen versetzte man mit 20 ccm trockenem Aceton, zentrifugierte die Fällungen und wusch sie mehrmals mit Aceton, dann Äther. Die Rohprodukte (95 mg von Ib, 68 mg von Ic und 38 mg von Id) wurden durch 1½stdg. Hochspannungs-Papierlektrophorese bei p_H 1.9 mikropräparativ in ihre Komponenten zerlegt und die im UV sichtbaren Banden der Monoleucinester nach dem Ausschneiden bei 9° absteigend mit Wasser eluiert. Die Wanderungsstrecken zur Kathode betragen unter den angegebenen Bedingungen für den Ester von AMP (Ia) = 9 cm, von GMP (Ib) = 9 cm, von UMP (Ic) = 4.5 cm und von CMP (Id) = 6.8 cm. In aliquoten Teilen der Eluate wurden durch Messung der Extinktion die Ausbeuten bestimmt, wobei die bekannten ϵ -Werte der Purine und der Pyrimidine¹²⁾ zugrunde gelegt wurden. Die Ausbeuten betragen, bezogen auf eingesetztes Nucleotid, für Ib 9%, für Ic 10%, für Id aber nur 3.5%. Da durch analytische Papierlektrophorese der Lösung von Id erkannt wurde, daß während des Eluierens bei 0° fast die Hälfte des Nucleotidesters hydrolytisch gespalten war, wurde sie nicht mehr für die weiter unten geschilderten Spaltungsversuche durch Hydroxylamin verwendet.

Beim Dinatriumsalz der 2'-Desoxy-adenosin-5'-phosphorsäure gab das analoge Vorgehen schon nach 1 Min. eine dunkelbraune Lösung, nach 5 Min. langem Erhitzen ließ sich daraus durch 20fachen Acetonzusatz keine Fällung erzielen. Ein durch Ätherzugabe erhaltenes braunes Produkt zeigte im Pherogramm keine einem Leucinester zuzuschreibende Bande.

Der 2'(oder 3')-Adenosin-leucinester (IIa) wurde aus Ia durch 1stdg. Inkubation mit der nach G. SCHMIDT¹³⁾ gereinigten, sauren Prostataphosphatase⁵⁾, Gefriertrocknen des Ansatzes, Auftrennung durch Papierlektrophorese bei p_H 1.9 und Wasserelution bei 0° der am weitesten zur Kathode gewanderten, ninhydrinpositiven und UV-absorbierenden Bande gewonnen. Die im ganzen 5 mg von IIa enthaltende wäbr. Lösung konnte nach entsprechender Verdünnung für die quantitativen Spaltungsversuche durch Hydroxylamin verwendet werden.

Leucyl-trans- und -cis-Cyclopentandiol (IIIb und IIIa): Je 2.55 g der beiden nach L. N. OWEN und P. N. SMITH¹⁴⁾ dargestellten *Cyclopentandiole* wurden in einem 30-ccm-Schliffkölbchen unter Verschluss mit einem $CaCl_2$ -Rohr mit 0.93 g *DL-Leucylchlorid-HCl*¹⁵⁾ bei 55° im Wasserbad geschüttelt, bis deutliche HCl-Entwicklung einsetzte. Dann ließ man 20 Stdn. bei 20°

*¹⁾ Bezogen von Schwarz Laboratories Inc., Mount Vernon, N. Y.

¹²⁾ HOPPE-SEYLER/THIERFELDER, Bausteine der Tierkörper, I, Bd. 2, Springer-Verlag, Berlin 1955.

¹³⁾ S. P. COLOWICK und N. O. KAPLAN, Methods in Enzymology, Bd. II, S. 529, Academic Press Inc. Publ., New York 1955.

¹⁴⁾ J. chem. Soc. [London] 1952, 4026.

¹⁵⁾ TH. WIELAND und W. HEIGEL, Methoden der organ. Chemie (Houben-Weyl), IV. Aufl., Verlag G. Thieme, Stuttgart 1958, Bd. 11/2, S. 358.

stehen und erwärmte die pastenartige Reaktionsmischung nochmals 30 Min. auf 60°. Nach dem Erkalten wurde zur Entfernung des überschüssigen Diols 5 mal mit je 10 ccm Äther digeriert. Hierbei verhielten sich die Ansätze verschieden.

Die *trans*-Verbindung (III b) wurde fest. Man löste in 3 ccm absol. Methanol, schüttelte mit etwas Tierkohle und versetzte nach dem Filtrieren und Nachspülen 5 ccm mit 7.5 ccm absol. Äther. Bei -15° bildeten sich bald Kristalle des *Hydrochlorids von III b*, die sich durch weitere Zugabe von 2.5 ccm Äther vermehrten. 0.6 g (48 %) vom Schmp. $192 - 195^{\circ}$ (Zers.).

$C_{11}H_{21}NO_3 \cdot HCl$ (251.8) Ber. C 52.48 H 8.81 N 5.56 Cl 14.09

Gef. C 52.47 H 8.81 N 5.23 Cl 14.08

Das Rohprodukt der *cis*-Verbindung (III a) blieb zähflüssig und erstarrte beim Aufbewahren im Exsikkator bei 2 Torr lackartig. Beim Versetzen der mit Aktivkohle behandelten Methanollösung (5 ccm) mit 20 ccm Äther erhielt man 5 mg feste Fällung. Nach dem Abzentrifugieren wurde mit weiteren 30 ccm Äther versetzt und die beim mehrstündigen Aufbewahren bei -15° abgeschiedene pulverige Fällung (165 mg) gewonnen. Durch vergleichende Messung der Extinktion bei 546 m μ der unter den unten beschriebenen Bedingungen nach 24 Stdn. entstandenen Hydroxamsäure mit III b und Leucin-methylester-HCl stellte sich ein Gehalt von 71 % an *cis*-Ester heraus. Der Rest bestand laut Papierelektrophorese aus Leucin.

Reaktion mit Hydroxylamin

Nach J. D. RAACKE¹⁶⁾ läuft die Reaktion von Aminosäureestern mit Hydroxylamin nur zwischen p_H 7.6 und p_H 8 ohne störende Nebenreaktionen ab; weiterhin muß bei konstanter Temperatur inkubiert und der Fe^{III}-Komplex der Hydroxamsäuren in stark saurer Lösung gebildet und gemessen werden. Es wurden folgende Lösungen verwendet:

1. Hydroxylaminlösung: 6.95 g Hydroxylamin-hydrochlorid in 45 ccm 2 *n* NaOH bei 25° mit 2 *n* NaOH (ca. 5 ccm) auf p_H 7.8 eingestellt (Glaselektrode).

2. Trichloressigsäure-Trichloracetat: 100 g Trichloressigsäure mit Wasser bei 20° zu 100 ccm aufgelöst und mit einer warmen Lösung von 100 g NaOH, mit Wasser auf 100 ccm, bei 20° auf p_H 0.8 eingestellt (Glaselektrode).

3. 2 *m* Eisen(III)-chlorid-Lösung: 54.06 g FeCl₃·6H₂O werden in 50 ccm Wasser gelöst, mit Wasser auf 100 ccm aufgefüllt und klar filtriert.

Zur Ermittlung der Bildungsgeschwindigkeit der Leucin-hydroxamsäure aus den verschiedenen Estern wurden 10–20 ccm der wäßrigen $0.5 - 1.5 \cdot 10^{-3}$ *m* Lösungen, deren Gehalt photometrisch ermittelt war, bei 25° im Thermostaten mit dem gleichen Volumen der Lösung 1. vermischt (Zeitpunkt $t = 0$) und bei derselben Temperatur aufbewahrt. In geeigneten Zeitabständen wurden Proben von je 4 ccm entnommen und sofort unter Umschütteln zu 2.8 ccm Lösung 2. gegeben. Die Messung der Extinktion bei 546 m μ („Eppendorf“-Photometer) erfolgte sogleich nach Zugabe von 1.2 ccm Eisen(III)-chlorid-Lösung 3. in einer 4-cm-Küvette. Der Blindwert mit Wasser anstelle von Aminosäureesterlösung betrug konstant $E = 0.375$. Er wurde öfter gemessen und von allen abgelesenen Werten abgezogen. Der nach 24 Stdn. erhaltene Wert diente zur nachträglichen Feststellung des wahren Gehalts an esterartig gebundenem Leucin und damit zur Berechnung der Halbwertszeiten.

¹⁶⁾ Biochim. biophysica Acta [Amsterdam] 27, 416 [1958].