

Racemisierungsstudien an cysteinhaltigen Peptiden

Wolfgang Woiwode, Hartmut Frank, Graeme J. Nicholson und Ernst Bayer*

Institut für Organische Chemie der Universität Tübingen,
Auf der Morgenstelle 18, D-7400 Tübingen 1

Eingegangen am 14. Februar 1978

Die Thiosulfat-Derivate natürlicher Rinderinsulin-A- und Rinderinsulin-B-Ketten sowie einige S-Trityl-Cystein-Peptide wurden hydrolysiert und die Aminosäuren gaschromatographisch auf Racemisierung untersucht. Dabei zeigte sich, daß die jeweils an Cystein N-ständig gebundenen Aminosäuren ungewöhnlich hohe D-Anteile aufweisen. GC/MS-Experimente und UV-spektroskopische Untersuchungen weisen darauf hin, daß die Racemisierung unter den Hydrolysebedingungen erfolgt und über ein Thiazolin-Derivat c verläuft. Damit wurde eine Methode zur Unterscheidung der bei der Hydrolyse auftretenden D-Anteile von ursprünglich vorhandenen D-Enantiomeren-Anteilen erarbeitet.

Studies upon the Racemisation of Cysteine-containing Peptides

The thiosulfate derivatives of natural bovine insulin-A- and insulin-B chains and of several S-tritylcysteine peptides were hydrolysed and the degree of racemisation of the resulting amino acids was investigated by means of gas chromatography. It was found that those amino acids which are N-terminally linked to cysteine undergo racemisation to a high degree. GC-MS and UV spectroscopic investigations indicate that the racemisation occurs during hydrolysis and that it proceeds via a thiazoline derivative c. The method developed is generally applicable to the differentiation between D-enantiomers originally present in the sample and that formed by racemisation during hydrolysis.

Im Rahmen unserer Arbeiten zur Synthese der Insulin-A-Kette nach der Liquid-Phase-Peptidsynthese untersuchten wir natürliches Rinderinsulin-A-Ketten-6,7,11,20-tetrakis(thiosulfat) $[A(SSO_3^-)_4]$ nach der Totalhydrolyse gaschromatographisch¹⁾ auf Racemateanteile. Dabei zeigte sich, daß die Aminosäuren Valin, Glutaminsäure, Cystein und Tyrosin ungewöhnlich hohe D-Anteile aufweisen (Tab. 1).

Die Rinderinsulin-A-Kette hat die Sequenz H-Gly-Ile-Val-Glu-Gln-Cys-Cys-Ala-Ser-Val-Cys-Ser-Leu-Tyr-Gln-Leu-Glu-Asn-Tyr-Cys-Asn-OH²⁾.

Der Vergleich zeigt, daß die Aminosäuren mit hohem D-Anteil Cystein jeweils N-ständig benachbart sind. Nach einer Behandlung mit Bromwasserstoff in Trifluoressigsäure unter Zerstörung der Thiosulfatgruppen und teilweiser Oxidation zum Disulfid wurde bedeutend geringere Racemisierung gefunden, ebenso wie bei der reduzierten Insulin-A-Kette mit freien Thiolgruppen (Tab. 1).

¹⁾ H. Frank, G. J. Nicholson und E. Bayer, J. Chrom. Sci. 15, 174 (1977).

²⁾ F. Sanger und E. O. P. Thompson, Biochem. J. 53, 353, 366 (1953).

Tab. 1. D-Anteile natürlicher Rinderinsulin-A-Ketten-Derivate in %. In Klammern Anzahl der Aminosäuren in der Sequenz

	A(SSO ₃ ⁻) ₄	HBr/TFA-behandelt	Thiol-Kette
Ala (1)	1.8	1.3	0.7
Val (2)	17.1	1.6	3.8
Ile (1)	a)	a)	a)
Ser (2)	0.2	0.2	0.1
Leu (2)	0.2	0.2	0.1
Asp (2)	0.2	0.9	0.4
Cys (4)	6.1	b)	b)
Glu (4)	7.4	0.5	1.1
Tyr (2)	15.2	0.5	2.1

a) Unvollständige Spaltung Val-Ile¹³⁾.

b) Die Derivatisierung ergibt Cystin, das nicht bestimmt wurde.

Somit mußte die beobachtete Racemisierung im Verlauf der Hydrolyse mit 6 N HCl erfolgt sein. Sie ist bedingt durch die Anwesenheit der säurelabilen Thiosulfatgruppierungen an den Cysteinresten.

Darauf weisen analoge Untersuchungen von Insulin-B-Ketten-7,19-bis(thiosulfat) [B(SSO₃⁻)₂] und Insulin hin:

Bei der Analyse der B-Kette zeigten die zu den beiden Cysteinresten N-ständigen Aminosäuren Valin und Leucin starke Racemisierung. Dagegen liegen die bei der Analyse von natürlichem Rinderinsulin gefundenen Werte in der durch die Derivatisierung bedingten Größenordnung (Tab. 2).

Tab. 2. % D-Aminosäure-Anteile von Rinderinsulin und Insulin-B-Ketten-7,19-bis(thiosulfat). In Klammern Anzahl der Aminosäuren in der Sequenz

	B(SSO ₃ ⁻) ₂	Rinderinsulin
Ala	0.6 (2)	0.7 (3)
Val	8.0 (3)	3.2 (5)
Ile	— (0)	a) (1)
Leu	8.2 (4)	0.5 (6)
Ser	0.6 (1)	0.4 (3)
Asp	0.7 (1)	1.0 (3)
Cys	0.8 (2)	b) (6)
Glu	1.4 (3)	0.8 (4)
Tyr	0.9 (2)	0.6 (4)
Thr	0.8 (1)	0.5 (1)
Phe	1.1 (3)	1.0 (3)
Lys	c) (1)	0.5 (1)
Arg	c) (1)	c) (1)
His	c) (2)	c) (2)
Pro	1.4 (1)	2.1 (1)

a) Unvollständige Spaltung Val-Ile¹³⁾. — b) Cystin nicht bestimmt. — c) Nicht bestimmt.

Um das so gewonnene Bild anhand von experimentellen Daten abzurunden, wurden die Untersuchungen auf *S*-Trityl-Cysteinpeptide ausgedehnt. Bei den untersuchten Peptiden trat Racemisierung wiederum bei den Aminosäuren *N*-ständig zu Cystein auf (Tab. 3).

Tab. 3. Untersuchung der *S*-Trityl-Cysteinpeptide auf Racematanteile

	Cys	Ile ^{*)}	Val	Phe	Leu	Ala
Boc-Ile-Cys(Trt)-OMe	2.5	9,5	—	—	—	—
Boc-Val-Cys(Trt)-OMe	2.4	—	7.4	—	—	—
Boc-Phe-Cys(Trt)-OMe	1.9	—	—	15.2	—	—
Boc-Leu-Cys(Trt)-Ala-OMe	1.5	—	—	—	16.0	2.1

^{*)} Die Racemisierung des α -C-Atoms von *L*-Isoleucin führt zur Bildung von *D-allo*-Isoleucin, das gaschromatographisch bestimmt wurde.

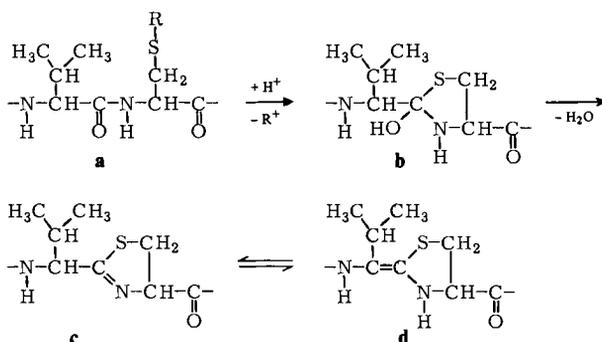
Unter den gewählten Bedingungen wurden die *N*-terminalen Aminosäuren jedoch nur teilweise racemisiert.

Diese experimentellen Befunde lassen sich anhand folgender Beobachtungen erklären:

– Die Racemisierung erfolgt unter dem Einfluß von 6 *N* HCl während der Hydrolyse der Proben und wird fast ausschließlich bei Aminosäuren *N*-ständig von Cystein beobachtet.

– Racemisierung erfolgt besonders dann, wenn sich am Cystein-Schwefel eine säurelabile Gruppierung befindet.

Damit ist der im folgenden angeführte, über ein Thiazolinderivat verlaufende Racemisierungsmechanismus wahrscheinlich:



Thiazolinpeptide wurden in der Vergangenheit in anderem Zusammenhang eingehend untersucht³⁻⁷⁾.

Die Tautomerisierung von **c** unter dem Einfluß starker Säuren wurde bereits für Bacitracin A diskutiert^{3, 5)}. Im Falle der Bunesalz-Ketten und der *S*-Trityl-Cysteinpeptide bildet sich unter den Hydrolysebedingungen das Thiazolinsystem **c**. Vollständige

³⁾ W. Königsberg und L. C. Craig, J. Am. Chem. Soc. **81**, 3452 (1959).

⁴⁾ W. Stoffel und L. C. Craig, J. Am. Chem. Soc. **83**, 145 (1961).

⁵⁾ W. Königsberg, R. J. Hill und L. C. Craig, J. Org. Chem. **26**, 3867 (1961).

⁶⁾ Y. Hirotsu, T. Shiba und T. Kaneko, Bull. Chem. Soc. Jpn. **40**, 2945 (1967).

⁷⁾ Y. Hirotsu, T. Shiba und T. Kaneko, Bull. Chem. Soc. Jpn. **40**, 2950 (1967).

Racemisierung der in den Ring einbezogenen *N*-ständigen Aminosäure erfolgt über die tautomeren Formen **c** und **d**, da der Angriff eines Protons an **d** und die Rückbildung von **c** nicht stereospezifisch verlaufen. Im weiteren Reaktionsverlauf werden die Ketten zu den freien, racemisierten Aminosäuren hydrolysiert.

Zur Untersuchung des Racemisierungsmechanismus wurden Markierungsexperimente mit Deuterium durchgeführt. Die Proben wurden in 6 *N* ²HCl in ²H₂O hydrolysiert und wie im experimentellen Teil beschrieben derivatisiert.

Kapillaren wurden mit der von uns zur Enantiomerentrennung entwickelten Phase Chirasil-Val¹⁻⁸⁾ belegt und in der Kopplung GC-MS mit chemischer Ionisation die Massenspektren aufgenommen.

Drei Modellsubstanzen wurden auf diese Weise analysiert: Insulin-A-Ketten-6,7,11,20-tetrakis(thiosulfat), Boc-Ile-Cys(Trt)-OMe und Boc-Leu-Cys(Trt)-Ala-OMe.

Es zeigte sich, daß bei der Insulin-A-Kette, wie erwartet, die *D*-Enantiomeren der Aminosäuren Valin, Glutaminsäure, Cystein und Tyrosin zu mehr als 95% ein ²H-Atom eingelagert hatten (Tab. 4a).

Tab. 4. Deuterierte Anteile in % des jeweiligen Enantiomeren der von der Racemisierung betroffenen Aminosäuren

a) Rinderinsulin-A-Ketten-6,7,11,20-tetrakis(thiosulfat)				
	Val	Cys	Glu	Tyr
L	17	8	n. b.	20
D	95	95	95	98
b) Boc-Ile-Cys(Trt)-OMe			c) Boc-Leu-Cys(Trt)-Ala-OMe	
	Ile		Leu	Ala
L	10		L	23
D	80		D	96

n. b. = nicht berechnet

Die *D*-Enantiomeren mußten daher während der Hydrolyse entstanden sein. Eine unspezifische Einlagerung von ²H ist ausgeschlossen, da die nicht von der Racemisierung betroffenen Aminosäuren die für ein reines, nicht deuteriertes Derivat zu erwartenden relativen Intensitäten zeigten.

Wie bei dem postulierten Mechanismus unter Wasserabspaltung aus dem Hydroxythiazolidin **b** zum Thiazolin **c** und Tautomerisierung zu **d** zu erwarten ist, fand man in den Massenspektren der *L*-Enantiomeren der Aminosäuren *N*-ständig von Cystein einen Anteil von einfach deuterierter Aminosäure, der etwa gleich hoch war wie die gaschromatographisch gefundene Menge an *D*-Aminosäure. Naturgemäß ist die quantitative Bestimmung der Menge von deuterierten *L*-Enantiomeren in einem großen Überschuß von nicht deuterierter Verbindung etwas ungenauer, da sich jeweils die Massenpeaks der deuterierten Verbindung mit den entsprechenden ¹³C-Isotopenpeaks der nicht deuterierten Verbindung überlagern. Die Bestimmung hat daher einen relativen Fehler von ±10%.

⁸⁾ H. Frank, G. J. Nicholson und E. Bayer, *Angew. Chem.* **90**, 396 (1978); *Angew. Chem., Int. Ed. Engl.* **17**, 363 (1978).

Ähnliche Ergebnisse wurden für die Modellpeptide erhalten. Im Fall des Isoleucins im synthetischen Dipeptid-Derivat Boc-Ile-Cys(Trt)-OMe konnte gezeigt werden, daß etwa 20% des gefundenen *D-allo*-Isoleucins, also etwa 2% der Gesamtmenge an Isoleucin, nicht deuteriert waren (Tab. 4b). Dieser Anteil dürfte somit schon im intakten Dipeptid-Derivat vorhanden gewesen sein. Daß die Racemisierung des Isoleucinrestes nach dem beschriebenen Mechanismus über das α -C-Atom und nicht wie von anderen Autoren⁹⁾ vermutet über das β -C-Atom verläuft, konnte durch die Markierungsexperimente bewiesen werden:

Das EI-Massenspektrum von nicht deuteriertem Isoleucin zeigte ein Verhältnis zwischen $m/e = 57$ (Isobutyl-Fragment der Seitenkette des Isoleucins) und $m/e = 58$ von 100:7. Für die deuterierte Verbindung wurde zwar ein größeres Verhältnis gefunden (100:35), doch kann die erhöhte Intensität von $m/e = 58$ durch beim Zerfallen des Molekül-Ions

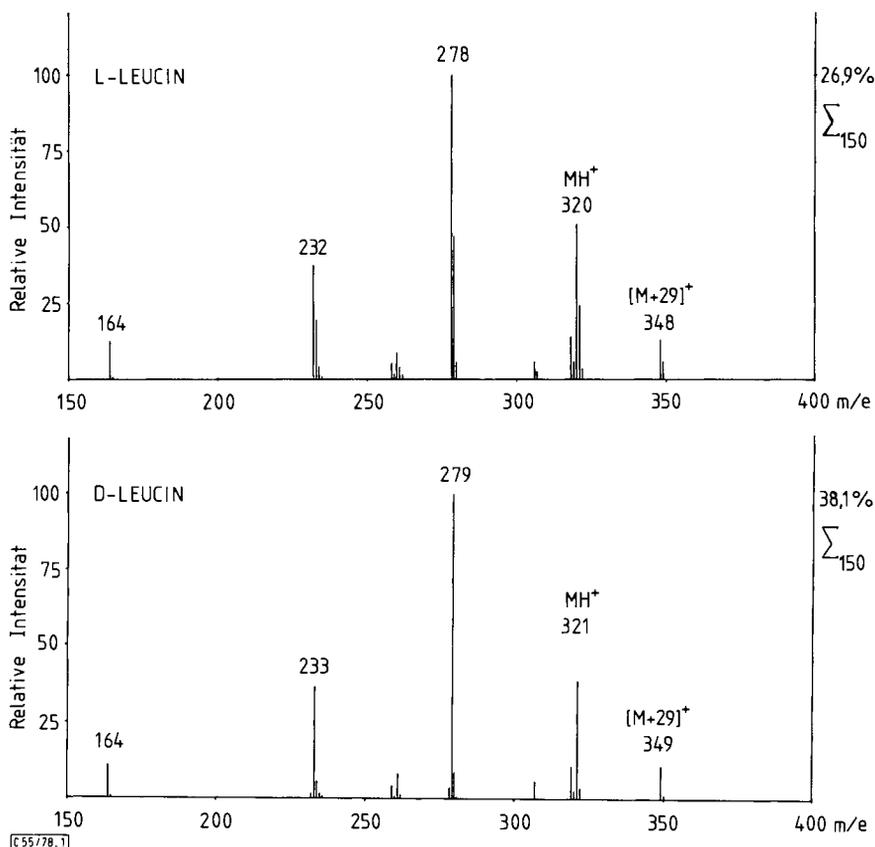


Abb. 1. CI-Massenspektren von L-Leucin (oben) und D-Leucin (unten) nach Hydrolyse des Tripeptids Boc-Leu-Cys(Trt)-Ala-OMe mit 6 N ²HCl in ²H₂O. Die Parameter sind im experimentellen Teil angeführt

⁹⁾ P. Hartter, Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem. **357**, 1683 (1976).

stattfindendes „hydrogen-scrambling“ erklärt werden. Der größte Anteil des eingelagerten Deuteriums, zumindest 75%, ist am α -C-Atom des Isoleucin-Restes gebunden.

Unerwartet war die Beobachtung, daß im Fall des Leucins im Tripeptid Boc-Leu-Cys(Trt)-Ala-OME der Wasserstoffaustausch unter teilweiser Retention verläuft (Tab. 4c). Während gaschromatographisch 16% D-Leucin bestimmt wurden, von denen mehr als 96% deuteriert waren (Abb. 1b), waren bei $23 \pm 2\%$ des L-Leucins der Wasserstoff am α -C-Atom gegen Deuterium ausgetauscht (Abb. 1a).

Ein Erklärungsversuch dieses Phänomens an Hand der geringen Zahl untersuchter Verbindungen wäre zu spekulativ. Auch die signifikant erhöhte Racemisierung der Aminosäuren C-ständig von Cystein konnte nicht geklärt werden. Sicher ist jedoch, daß auch deren Anteile zum größten Teil während der Hydrolyse entstehen. So waren von den 2.1% D-Alanin im Hydrolysat des Tripeptids Boc-Leu-Cys(Trt)-Ala-OME 80% deuteriert, d. h. während der Hydrolyse entstanden.

Zur weiteren Absicherung des vorgeschlagenen Reaktionsweges wurden UV-spektroskopische Untersuchungen herangezogen (Abb. 2).

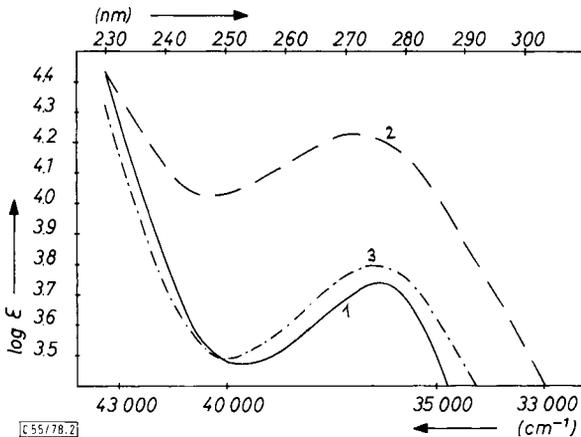


Abb. 2. Molare Extinktion der Insulinkette A(SO₃⁻)₄ nach Aufnahmen

— in Wasser, 6 N HCl oder 12 N HCl, --- nach 45stündigem Stehenlassen in 12 N HCl und - · - - anschließender Hydrolyse in 6 N HCl

Sofort nach Aufnahmen der natürlichen Thiosulfat-A-Kette in Wasser, 6 N HCl oder 12 N HCl resultierte Kurve 1. Bei Raumtemperatur wurde anschließend in 12 N HCl zeitabhängig eine starke Zunahme der Extinktion bei 272 nm beobachtet, was auf die Ausbildung der Thiazoline hinweist³⁾. Nach 45 Stunden wurde Kurve 2 erhalten. Nach Verdünnung dieser Probe auf 6 N HCl nahm die Bande bei 272 nm stark ab. Die anschließende zweistündige Hydrolyse bei 110°C unter Luftausschluß führte zur Spaltung der Peptidbindungen und der Thiazoline. Dabei wurde die ursprüngliche Kurve wieder nahezu erreicht (Kurve 3). Die gaschromatographische Untersuchung dieser Probe auf Racemisierung ergab die in Tab. 5 angeführten Werte.

Nach statistischer Korrektur über die Anzahl der Aminosäuren in der Sequenz bedeutet das nahezu vollständige Racemisierung der betroffenen Aminosäuren.

Tab. 5. D-Anteile der Insulinkette $A(SSO_3^-)_4$ nach 45 Stunden Stehenlassen in 12 N HCl bei 20°C und anschließender Hydrolyse mit 6 N HCl. In Klammern Anzahl der jeweiligen Aminosäure in der Sequenz

Ala	Val	Ile	Ser	Leu	Asp	Cys	Glu	Tyr
(1)	(2)	(1)	(2)	(2)	(2)	(4)	(4)	(2)
4.6	21	*)	0.2	0.2	0.2	13.4	11.1	23.0

*) Unvollständige Spaltung Val-Ile¹³⁾.

Diskussion

Bei den untersuchten cysteinhaltigen Modellpeptiden werden die dem Cystein *N*-ständigen Aminosäuren während des Hydrolyseschrittes racemisiert, wobei diese Reaktion immer dann besonders stark auftritt, wenn am Cystein-Schwefel eine säurelabile Gruppierung vorhanden ist.

UV-Spektroskopische Untersuchungen legen den Schluß nahe, daß es im Hydrolyseschritt vor der Spaltung der Peptidbindungen zur Ausbildung von Thiazolinen kommt.

In der Vergangenheit wurde für Bacitracin A die Racemisierung des am Cystein *N*-ständigen Isoleucinrestes über ein Thiazolinderivat in anderem Zusammenhang diskutiert³⁻⁷⁾.

In der vorliegenden Untersuchung wurde der Thiazolinmechanismus durch massenspektrometrische Untersuchungen nach der Hydrolyse der Proben mit 6 N ²HCl in ²H₂O bewiesen: Nach der gaschromatographischen Enantiomerentrennung über eine Kapillare, belegt mit Chirasil-Val, wurden die CI-Massenspektren der D- und L-Aminosäuren aufgenommen. Die D-Enantiomeren hatten zu mehr als 95% Deuterium am α -C-Atom eingelagert.

Es wurden nahezu gleiche Mengen deuterierte D- und L-Aminosäuren gefunden, wie es der Reaktionsverlauf über ein tautomeres Thiazolinderivat mit sp²-hybridisiertem α -C-Atom der am Cystein *N*-ständigen Aminosäure erwarten läßt.

Die Kenntnis dieser Reaktion ist wichtig für die Interpretation von Racemisierungsstudien.

Gleichzeitig ist diese Untersuchung ein Anwendungsbeispiel für die von uns entwickelten chiralen polymeren Phasen zur Enantiomerentrennung, die in Kombination mit Deuteriummarkierung und massenspektrometrischer Analyse eine Unterscheidung zwischen dem bei der Hydrolyse entstehenden und dem ursprünglich vorhandenen D-Enantiomeren-Anteil gestatten.

Wir danken Dr. P. Hartter, Physiologisch-Chemisches Institut der Universität Tübingen, für die Überlassung der *S*-Trityl-Cystein-Peptide und der Fa. Hoechst AG für die Überlassung von Rinderinsulin. Der Deutschen Forschungsgemeinschaft danken wir für die Gewährung einer Sachbeihilfe.

Experimenteller Teil

UV-Spektren: Spektrophotometer Zeiss RPQ M Q III. — IR-Spektren: KBr-Preßlinge, 1 mg Peptid/300 mg KBr, IR-Spektrograph Perkin-Elmer Infracord.

Die Spaltung von Rinderinsulin und Auftrennung der Thiosulfatketten erfolgten nach Bailey und Cole¹⁰⁾.

*Behandlung von Rinderinsulin-A-Ketten-6,7,11,20-tetrakis(thiosulfat) mit Bromwasserstoff in Trifluoressigsäure*¹¹⁾: In die Lösung von 15 mg $A(SSO_3^-)_4$ in 10 ml Trifluoressigsäure wird nach Versetzen mit 0.2 ml Anisol bei Raumtemp. 1 h ein gereinigter und getrockneter Bromwasserstoffstrom eingeleitet. Das Peptid wird anschließend mit Diethylether gefällt. Unter reduziertem Druck wird stark eingeeengt, um den Bromwasserstoff zu entfernen. Nach erneuter Etherzugabe wird dieser Vorgang wiederholt. Die Suspension des Rückstands in Ether wird zentrifugiert. Das Zentrifugat wird in 4 ml 0.02 M Ammoniumhydrogencarbonatpuffer suspendiert und mit verd. Ammoniak tropfenweise bis zum vollständigen Lösen versetzt. Die Entsalzung des Produktes wird durch Chromatographie über Sephadex G-25 mit 0.02 M Ammoniumhydrogencarbonatlösung als Elutionsmittel erreicht (Säule 2.5 cm \times 100 cm). Bei 280 nm zeigt das resultierende Chromatogramm zwei Peaks, von denen einer gegenüber natürlichem Material zu höherer Molmasse verschoben ist. Die jeweiligen Fraktionen werden vereinigt und lyophilisiert. Insgesamt werden 10 mg Peptid zurückgewonnen.

In den IR-Spektren der Proben fehlte die Bande bei 1025 cm^{-1} (SO-Valenzschwingung) völlig.

Nach der unten beschriebenen Derivatisierung weisen beide Fraktionen nahezu gleiche Racematanteile auf.

Die Reduktion zur Thiol-Kette erfolgte nach *Katsoyannis*¹²⁾.

*Derivatisierung der Proben für die gaschromatographische Racemattrennung*¹³⁾:

1. *Hydrolyse der Proben*: 0.3 μmol des betreffenden Peptids werden in 1 ml 6 N HCl aufgenommen. Nach sorgfältigem Evakuieren wird im Einschlußrohr 2 h bei 110°C gehalten. Bei den A-Ketten-Derivaten wird unter diesen Bedingungen nur die Isoleucyl-Valyl-Peptidbindung unvollständig gespalten¹³⁾.

2. *Veresterung der Carboxylgruppen*: Das Hydrolysegemisch wird eingedampft, mit 0.5 ml 1.5 N HCl/2-Propanol versetzt und 1 h bei 110°C belassen.

3. *Acetylierung der Aminogruppen*: Nach der Veresterung wird das Lösungsmittel mit Stickstoff abgeblasen. Nach Aufnehmen in 250 μl Methylenchlorid und Zugabe von 50 μl Perfluorpropionsäureanhydrid wird auf 110°C erhitzt und 10 min bei 110°C belassen. Nach Abblasen des Lösungsmittels mit Stickstoff wird zur Analyse in wenig Methylenchlorid aufgenommen.

Gaschromatographie: Die Trennungen erfolgten auf einer Glaskapillarsäule mit den Abmessungen 20 m \times 0.3 mm, beschichtet mit Chirasil-Val^{1,8)}. Als Trägergas diente Helium mit einem Druck von 0.7 bar. Die Aufnahme der Chromatogramme erfolgte 5 min isotherm bei 80°C , anschließend mit einem Temperaturprogramm von $3^\circ\text{C}/\text{min}$ bis 180°C . Die Messungen wurden an einem Gaschromatographen der Firma Carlo Erba, Modell 2101, durchgeführt.

Derivate für die Massenspektrometrie: Darstellung wie oben. Jedoch wurde der eingedampfte Rückstand nach der Hydrolyse mit 6 N ^2HCl in $^2\text{H}_2\text{O}$ mehrfach in 1 ml Wasser oder 1 ml 0.1 proz. NH_3 -Lösung aufgenommen und die Lösung erneut eingedampft, um austauschbares Deuterium zu entfernen.

Nach der gaschromatographischen Trennung über Chirasil-Val wurden die EI-Massenspektren auf einem Massenspektrometer MAT-112 der Firma MAT, Bremen, aufgenommen. Als Reaktionsgas diente Methan. Parameter: Elektronenenergie 160 eV, 0.7 mA, Temperatur der Ionenquelle 220°C , Interface 220°C , SEV-Spannung ca. 1.9 kV.

¹⁰⁾ J. L. Bailey und R. D. Cole, J. Biol. Chem. **234**, 1733 (1959).

¹¹⁾ J. M. Stewart und J. D. Young, Solid Phase Peptide Synthesis, S. 40, W. H. Freeman and Company, San Francisco 1969.

¹²⁾ P. G. Katsoyannis, A. M. Tometsko, C. Zalut und K. Fukuda, J. Am. Chem. Soc. **88**, 5625 (1966).

¹³⁾ H. Zahn, H. Bremer, W. Sroka und J. Meienhofer, Z. Naturforsch., Teil B **20**, 646 (1965).