

## 28. Enzymatische Peptidsynthese.

4. Mitteilung<sup>1)</sup>

### Inkubation von D-Methionin-isopropylester mit Homogenaten: Bildung von D-Methionyl-D-methionin-isopropylester und D-Methionyl-D-methionin<sup>2)</sup>

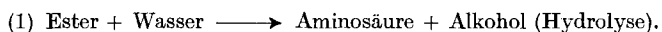
von M. Brenner, H. R. Müller und Eva Lichtenberg.

(14. XII. 51.)

Nachdem unsere bisherigen Arbeiten<sup>3)</sup> ergeben hatten, dass die Ester gewisser Aminosäuren unter dem Einfluss des Pankreasfermentes Chymotrypsin in Peptide umgewandelt werden, stellte sich die Frage nach der Existenz von weiteren, insbesondere intrazellulären Enzymen mit ähnlicher Peptid-synthetisierender Wirkung<sup>4)</sup>. Es wurde daher eine Reihe von Rattenorganen nach der Technik von *Potter & Elvehjem* homogenisiert und die enzymatische Aktivität der Homogenate gegenüber DL-, D- und L-Methionin-isopropylester untersucht. Während sich die Wirkung des Chymotrypsins im wesentlichen auf den L-Ester und die im racemischen Ester vorhandene L-Komponente beschränkt, ergab sich überraschenderweise, dass die Homogenate auch den Ester der unnatürlichen D-Form des Methionins verändern. Diese Umwandlungen des D-Esters bilden den Gegenstand der vorliegenden Mitteilung. Über die Reaktionsweise der L-Form soll später ausführlich berichtet werden.

Am eingehendsten ist das Verhalten des D-Esters in frischem und autolytiertem Leberhomogenat untersucht worden. Die Analyse der Reaktionsgemische erfolgte, in Anlehnung an unsere früheren Erfahrungen, papierchromatographisch; die Methode ist inzwischen, wie im experimentellen Teil beschrieben wird, in einigen wesentlichen Punkten ergänzt worden. Als Resultat ergab sich folgendes:

In frischem Leberhomogenat wird ein grosser Teil (80–90%) des zugesetzten Esters (Anfangskonzentration 0,17-m.) nach Gleichung (1) verseift. Der Rest des Esters geht gleichzeitig nach Gleichung (2) in Dipeptidester (D-Methionyl-D-methionin-isopropylester) über:



<sup>1)</sup> 3. Mitteilung: *M. Brenner, E. Sailer & K. Rüfenacht*, *Helv.* **34**, 2096 (1951).

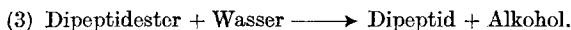
<sup>2)</sup> Auszugsweise mitgeteilt am Diamond Jubilee Meeting der American Chemical Society in New York, 4.–7. Sept. 1951.

<sup>3)</sup> Vgl. 1.–3. Mitteilung.

<sup>4)</sup> *M. Brenner & H. R. Müller*, *Helv. Physiol. Acta* **9**, C 20–C 21 (1951).

Beide Reaktionen, Hydrolyse und Aminolyse, verlaufen bei pH 7 (Reaktionsdauer 4 Stunden; 25°) langsamer als bei pH 8 und 9 (Reaktionsdauer 60 bzw. 30 Min.; 25°). Die Aminolyse wird aber durch pH-Erhöhung stärker begünstigt als die Hydrolyse; entsprechend ist die Peptidesterausbeute bei pH 9 und 8 grösser als bei pH 7. Versuche beim Eigen-pH der Reaktionsgemische durchlaufen bei einem Anfangswert von 9 und einem Endwert von 7–8 immer den für die Dipeptidesterbildung günstigen Bereich 9–8. Die meisten Experimente sind daher ohne pH-regulierende Zusätze durchgeführt worden.

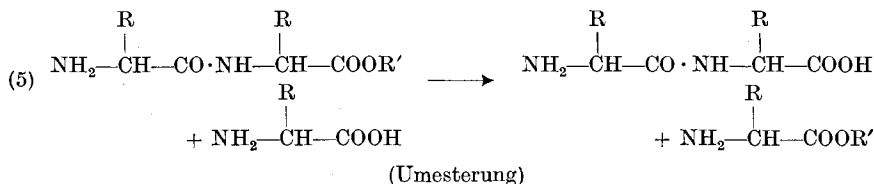
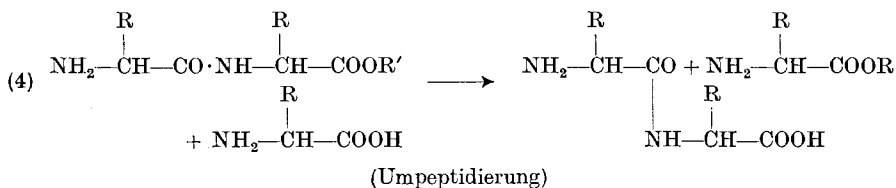
Der Dipeptidester wird je nach dem verwendeten Leberhomogenat innert 50 Std. weitgehend, manchmal sogar vollständig, nach Gleichung (3) zum Dipeptid (D-Methionyl-D-methionin) abgebaut:



In autolysierten Homogenaten dagegen, die wie frische Homogenate den Dipeptidester mit Leichtigkeit bilden, wird er kaum mehr angegriffen; in einzelnen Fällen ist seine Umwandlung zu Diketopiperazin beobachtet worden.

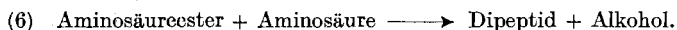
Das Dipeptid und das Diketopiperazin widerstehen jedem weiteren Abbau durch das frische oder autolysierte Homogenat. Sie sind deshalb die Endprodukte der Reaktionsfolge. Hinweise auf die Bildung höherer Peptidester oder Peptide konnten nicht aufgefunden werden.

Im obigen haben wir die Dipeptidbildung einer Aufeinanderfolge der Reaktionen (2) und (3) zugeschrieben. An sich bestand auch die Möglichkeit für einen Mechanismus nach Gleichung (4) oder (5):



In beiden Fällen wäre die Ausbeute an Dipeptid von der Methionin-Konzentration abhängig. Entsprechende Versuche über die Verseifung von synthetischem Dipeptidester in Leberhomogenat haben ergeben, dass ein Zusatz von D-Methionin ohne Einfluss ist. Die Vorgänge (4) und (5) können deshalb nicht oder nur in untergeordnetem Masse an der Entstehung des Dipeptids beteiligt sein.

Bei der Peptidsynthese durch Chymotrypsin haben wir seinerzeit<sup>1)</sup> noch einen weiteren Mechanismus nach Gleichung (6) in Betracht gezogen:



Es ist uns bisher nicht gelungen, Hinweise für die Existenz dieses Reaktionstypus zu finden. Es ist wahrscheinlicher, dass auch bei der Chymotrypsin-katalysierten Reaktion der Dipeptidester als Zwischenprodukt bei der Synthese des Dipeptids und der höheren Peptidester bzw. Peptide auftritt. Kürzlich durchgeführte weitere Versuche über den Verlauf jener Umsetzung haben nämlich ergeben, dass der *L*-Methionyl-*L*-methionin-isopropylester hinsichtlich Reaktionsgeschwindigkeit und Ausbeute an höheren Peptiden ein viel günstigeres Ausgangsmaterial darstellt als der *L*-Methionin-isopropylester.

Reihenversuche bei wechselnder Homogenat- und Substratkonzentration zeigen die zu erwartende Abhängigkeit in der Reaktionsdauer und in der Ausbeute an Peptidester: Erstere nimmt bei konstanter Ester-Anfangskonzentration bis zu 20facher Verkleinerung der Homogenatkonzentration stetig zu. Letztere hängt vom Verhältnis Aminolyse zu Hydrolyse ab und wird deshalb bei zunehmender Verdünnung des Methioninesters (konstante Ferment-Konzentration) kleiner; bei  $c = 0,017\text{-m.}$  (10fache Verdünnung des Esters gegenüber Normalansatz) ist sie nur noch minim.

Die enzymatische Natur der Synthese ergibt sich im übrigen daraus, dass in Hitze-inaktivierten Homogenaten und Autolysaten keine Umsetzung erfolgt. Erwähnenswert ist noch, dass die Reaktionen durch Zugabe von Cyanid-Ionen nicht gehemmt werden. Schliesslich haben bakteriologische Untersuchungen gezeigt<sup>2)</sup>, dass die Peptidbildung auch unter sterilen Bedingungen erfolgt und Bakterien somit nicht als Träger der Aktivität in Frage kommen.

Es ist nun interessant, dass eine ganze Reihe weiterer Organe der Ratte Fermente enthalten, welche, wenn auch in wechselndem Masse, diese Synthese des Methionin-dipeptid-esters katalysieren. Die Fähigkeit zur Dipeptidbildung aus dem Dipeptidester ist weniger verbreitet. Tab. 1 enthält eine Zusammenstellung unserer diesbezüglichen qualitativen Beobachtungen und orientiert ausserdem über einige Resultate mit Leberautolysat und Lebermitochondrien. Die Tatsache, dass letztere ebenfalls befähigt sind, den Dipeptidester aufzubauen, ist besonders hervorzuheben. Es sind Versuche im Gange, weitere Leberfraktionen auf ihre Peptid-synthetisierende Wirkung zu prüfen.

Aus Tab. 1 geht hervor, dass in Leber- und Hodenhomogenat am meisten Dipeptidester entsteht. Etwas geringer ist die Ausbeute in Nierenhomogenat; noch kleinere, papierchromatographisch aber immer noch gut nachweisbare Mengen werden in Pankreas-, Herz-, Muskel- und Knochenmarkhomogenaten sowie in Ansätzen mit Hautschnitteln gebildet. Milz- und Hirnhomogenate sind praktisch inaktiv.

<sup>1)</sup> Helv. **33**, 580 (1950).

<sup>2)</sup> Wir danken Herrn Dr. H. Reber bestens für die Durchführung dieser Versuche.

Tabelle I.

Vergleich der enzymatischen Bildung von Methionin-dipeptid-ester und Methionin-dipeptid aus D-Methionin-isopropylester in Homogenaten verschiedener Rattenorgane.

Ansatz: je 16 mg Ester + 0,5 cm<sup>3</sup> Homogenat (1:5,5)

(Eigen-pH des Reaktionsgemisches, 25<sup>0</sup>)

Analyse: papierchromatographisch.

Homogenat von	Peptid-Synthese <sup>a)</sup>				pH nach 24 Std.
	Dipeptidester nach		Dipeptid nach		
	3 Std.	24 Std.	3 Std.	24 Std.	
Leber . . . . .	++++ <sup>b)</sup>	+	—	+++	7,3
Hoden . . . . .	++++	+++	—	+	7,5
Nieren . . . . .	+++	++	—	+	7,2
Haut <sup>c)</sup> . . . . .	++	++	—	(+)	7,4
Skelett-Muskeln . . . . .	++	++	—	—	7,8
Herz . . . . .	++	++	—	—	7,8
Dünndarm . . . . .	++	++	—	—	7,8
Pankreas . . . . .	+	+	—	—	7,8
Knochenmark . . . . .	+	+	—	—	8,0
Hirn . . . . .	Spuren	Spuren	—	—	8,3
Milz . . . . .	Spuren	Spuren	—	—	8,2
Zum Vergleich folgen die entsprechenden Daten mit:					
Leber-Autolysat . . . . . (14 Tage alt, dialysiert)	++++	+++	—	+	7,5
Lebermitochondrien . . . . .	++++	+++(+)	—	(+)	7,5

<sup>a)</sup> Parallel zur Synthese verläuft überall eine Verseifung des D-Esters zum freien Methionin: in Leber- und Hodenhomogenat ist aller Ausgangsester nach 3 Std., in Nierenhomogenat und Ansätzen mit Hautschnitzeln nach 26 Std. aufgebraucht. Homogenate von Muskeln, Herz, Darm, Pankreas und Knochenmark verseifen den Ester innerhalb von 26 Std. nur teilweise, solche von Hirn und Milz praktisch gar nicht.

<sup>b)</sup> + + + entspricht einer Ausbeute von ca. 10%, bezogen auf den eingesetzten D-Ester.

<sup>c)</sup> Da Haut nicht homogenisierbar ist, wurden Hautschnitzel verwendet (Haut epiliert, von subcutanem Bindegewebe befreit, mit Toluol gewaschen und fein zerschnitten.)

Abschliessend sei noch darauf hingewiesen, dass die Ester des Methionins als Substrate für solche Untersuchungen in analytischer Beziehung besonders geeignet sind: einerseits ist das papierchromatographische Verhalten ( $R_F$ -Werte) des Ausgangsmaterials und der Reaktionsprodukte in den verwendeten Lösungsmitteln derart, dass die in biologischem Material üblichen ninhydrinpositiven Substanzen nicht stören; andererseits bietet die Möglichkeit einer Oxydation des Methioninschwefels und die damit verbundene charakteristische Änderung der  $R_F$ -Werte Gewähr für eine sichere Identifizierung der in den Chromatogrammen auftretenden Flecken.

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

## Experimenteller Teil.

### 1. Darstellung des Substrates<sup>1)</sup> und der Fermentpräparate.

**D-Methionin-isopropylester:** Das Hydrochlorid<sup>2)</sup> wird in wenig Wasser gelöst und mit Essigester überschichtet. Dann wird unter ständigem Umschwenken mit 1-n. NaOH versetzt, bis die wässrige Phase Phenolphthaleinpapier eben schwach rot anfärbt, und erschöpfend mit Essigester ausgeschüttelt. Man trocknet die vereinigten Essigesterfraktionen mit Natriumsulfat und dampft den Essigester am Vakuum (Bad 30°) ab. Der als Öl zurückbleibende freie Ester wird sofort verwendet.

**Homogenate<sup>3)</sup>:** Ausgewachsene, männliche Ratten werden durch Dekapitieren getötet, die gewünschten Organe herausgenommen, gewogen und sofort nach der Methode von Potter<sup>4)</sup> im Verhältnis 1:5 (bzw. 1:4 für pH-konstante Versuche) mit Wasser homogenisiert. Wasser besitzt hier gegenüber isotonischer NaCl-Lösung den Vorteil, dass bei der nachfolgenden papierchromatographischen Analyse keine Salzeffekte auftreten. Die Homogenate werden durch Gaze filtriert und die Filtrate direkt als Fermentpräparate verwendet.

**Leberautolysat:** Leber wird wie oben mit Wasser im Verhältnis 1:5 homogenisiert, durch Gaze filtriert, das Filtrat mit Toluol überschichtet und gut verschlossen unter zeitweiligem Umschwenken bei Zimmertemperatur einige Tage bis mehrere Wochen stehengelassen. Für die Fermentreaktionen verwendet man jedoch nicht die Vollautolysate, sondern deren klare Filtrate (Filtration durch eine dünne Schicht von Standard Super Cel<sup>5)</sup>). Diese Filtrate werden teils direkt, teils erst nach Dialyse bei 4° (Toluol) und nochmaligem Filtrieren verwendet. Nach 12stündigem Dialysieren in bewegter Apparatur, wobei das Wasser alle zwei Stunden gewechselt wird, sind die Lösungen praktisch frei von niedermolekularen Substanzen. Papierchromatographisch können keine ninhydrinpositiven Substanzen mehr nachgewiesen werden. Die saubersten Chromatogramme werden demgemäss bei Fermentreaktionen mit solchen Lösungen erhalten (vgl. dazu Fig. 1).

Über die Löslichkeit der Fermente in frischen Homogenaten kann nichts ausgesagt werden, weil es nicht gelang, klare Filtrate zu erhalten. Fest steht einzig, dass Filtration des Homogenates nach 2–3 Tagen aktive Filtrate liefert, ferner, dass selbst 12wöchige Autolysate noch stark aktiv sind und die synthetisierenden Fermente somit eine grosse Stabilität besitzen müssen.

**Lebermitochondrien:** Diese werden nach der Vorschrift von Leuthardt & Müller dargestellt<sup>6)</sup> und als Suspension in isotonischer Mannitlösung verwendet<sup>7)</sup>.

### 2. Versuchsanordnung.

a) Versuche bei pH 7, 8 und 9: Zu 325 mg D-Ester in 2,75 cm<sup>3</sup> Wasser (pH 9) bzw. 2,45 cm<sup>3</sup> Wasser + 0,3 cm<sup>3</sup> 1-n. HCl (pH 8) bzw. 1,75 cm<sup>3</sup> Wasser + 1,0 cm<sup>3</sup> 1-n. HCl (pH 7) gibt man 6 cm<sup>3</sup> Leberhomogenat (1:4) und unverzüglich genügend 0,5-n. (pH 9 und 8) bzw. 1-n. (pH 7) NaOH, um das Reaktionsgemisch auf das gewünschte Anfangs-pH zu bringen (Glaselektrode, magnetischer Rührer). Die Reaktion setzt sofort ein, und das pH wird nun durch weitere sorgfältige Zugabe von Lauge konstant

<sup>1)</sup> Über die Darstellung von D,D-Methionin-dipeptid und D,D-Methionin-dipeptid-isopropylester, die zu Vergleichszwecken synthetisiert wurden, vgl. die nachfolgende Mitteilung.

<sup>2)</sup> Vgl. Helv. 33, 590 (1950).

<sup>3)</sup> Wir danken Herrn Dr. G. Viollier für die Anleitung bei der Herstellung der Homogenate.

<sup>4)</sup> V. R. Potter & C. A. Elvehjem, J. Biol. Chem. 114, 495 (1936), vgl. auch: Methods in Medical Research 1, 323 (1948).

<sup>5)</sup> Produkt der Celite Corporation, erhältlich bei der Firma Schneider & Co., Winterthur.

<sup>6)</sup> F. Leuthardt & A. F. Müller, Exper. 4, 478 (1948).

<sup>7)</sup> Wir danken Herrn Prof. Leuthardt für ein Vergleichspräparat, das er uns freundlicherweise für unsere Versuche zur Verfügung gestellt hat.

gehalten. Aus schon früher angegebenen Gründen verzichten wir auf eine Wiedergabe des zeitlichen Laugeverbrauches<sup>1)</sup>. Volumenmässig ist der Laugezusatz relativ unbedeutend; die Konzentrationsverschiebungen, die er bewirkt, dürfen bei der angewandten Analysetechnik vernachlässigt werden. Die Peptidbildung lässt sich sehr schön verfolgen, indem nach 15, 30, 60, 120, 240 und 480 Min. Proben von je 0,005 cm<sup>3</sup> entnommen, auf Filterpapier gebracht, getrocknet und in Butanol-Eisessig-Wasser bzw. Collidin-Wasser eindimensional chromatographiert werden (vgl. unten). Man erhält dabei Bilder von der Art der Fig. 1. Sie zeigen bei pH 8 und 9 hinsichtlich Geschwindigkeit und Ausbeute eine deutliche Begünstigung der Dipeptidesterbildung. Der Ausgangsester ist bei pH 7 nach 4 Std., bei pH 8 nach 1 Std. und bei pH 9 nach ½ Std. aufgebraucht.

b) Versuche ohne pH-Regulierung: Zu 16 mg D-Ester werden je 0,5 cm<sup>3</sup> einer Mischung von 3,6 cm<sup>3</sup> Homogenat oder Leberautolysat bzw. Mitochondriensuspension und 0,4 cm<sup>3</sup> Wasser bzw. isotonische Mannitlösung gegeben<sup>2)</sup>. Man fügt etwas Toluol zu und lässt bei Zimmertemperatur bis zu 48 Std. reagieren. Der Reaktionsverlauf wird durch periodische Probeentnahmen papierchromatographisch verfolgt.

Fig. 1 zeigt als Beispiel die Bildung von Dipeptidester in einem 2wöchigen, dialysierten, klar filtrierten Leberautolysat beim Eigen-pH der Lösung:

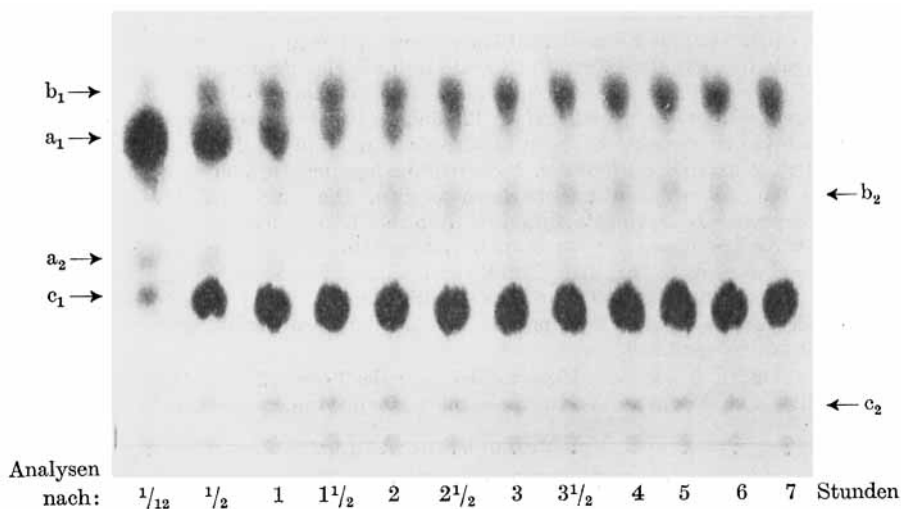


Fig. 1.

Zeitlicher Verlauf der Umsetzung von 16 mg D-Methionin-isopropylester in 0,5 cm<sup>3</sup> dial. Leberautolysat.

Chromatographie in Butanol-Eisessig-Wasser (4:1:5).

Beladung je 0,005 cm<sup>3</sup>, entsprechend 150  $\gamma$  Ausgangsester.

a<sub>1</sub> = D-Methionin-isopropylester.

a<sub>2</sub> = Autoxydationsprodukt von D-Methionin-isopropylester.

b<sub>1</sub> = D,D-Methionin-dipeptid-isopropylester.

b<sub>2</sub> = Autoxydationsprodukt von D,D-Methionin-dipeptid-isopropylester.

c<sub>1</sub> = D-Methionin.

c<sub>2</sub> = D-Methionin-sulfoxyd.

<sup>1)</sup> Helv. **33**, 580 (1950).

<sup>2)</sup> Dieser Wasser- bzw. Mannitzusatz ermöglicht unter speziellen Versuchsbedingungen den Zusatz gelöster Puffer, Aktivatoren, Inhibitoren usw., ohne dass dabei die Gesamtkonzentration verändert wird.

Man kann in Fig. 1 deutlich den innerhalb von 4 Stunden erfolgenden Übergang von Ausgangsester in Dipeptidester und freies Methionin verfolgen. Die schwach sichtbaren zusätzlichen Flecken entsprechen verschiedenen Oxydationsprodukten<sup>1)</sup>.

Ein Abbau des Dipeptidesters zum Dipeptid findet hier, wie eine Analyse nach 48stündiger Reaktionsdauer zeigte, nur in beschränktem Ausmasse statt. Dies liess sich jedoch in einem Butanol-Eisessig-Wasser-Chromatogramm nicht feststellen, weil sich dort Dipeptid und oxydierter Dipeptidester überlagern. Es war dazu ein zusätzliches Chromatogramm in Collidin-Wasser nötig. Dieser Fall stellt ein praktisches Beispiel für die Anwendung der unten beschriebenen Analyiertechnik dar.

Aus Intensität und Grösse des Dipeptidesterfleckens lässt sich durch Vergleich mit Kontrollflecken abschätzen, dass die Ausbeute an Dipeptidester, bezogen auf den Ausgangsester, etwa 10% beträgt. Entsprechend ist die Ausbeute an Dipeptid bei Versuchen mit frischem Homogenat nach vollständigem Abbau des Dipeptidesters ebenfalls zu rund 10% bestimmt worden.

### 3. Die papierchromatographische Analyiertechnik.

a) Methodik: Sämtliche Chromatogramme wurden wie bereits beschrieben<sup>2)</sup> nach der „ascending method“ mit *Whatman*-Papier Nr. 1 durchgeführt. Als mobile Phase wurde wiederum Collidin-Wasser<sup>3)</sup> und neu n-Butanol-Eisessig-Wasser (4:1:5) verwendet. Die Laufzeit des letzteren beträgt für eine Höhe von 27 cm bei 22° ungefähr 13 Std.

b) Analyiertechnik und Fleckenkarten: Für serienmässige papierchromatographische Untersuchungen (vgl. Fig. 1) ist die eindimensionale Chromatographiertechnik mit 15–20 Analysen pro Blatt viel speditiver als das zweidimensionale Verfahren mit einer einzigen Analyse pro Blatt. Es war deshalb wichtig, eine Variante zu finden, die es erlaubte, trotz der komplexen Zusammensetzung der Ferment-Reaktionsgemische mit dem eindimensionalen Verfahren auszukommen.

Versuche mit künstlichen Gemischen aus D,D-Methionin-dipeptid-isopropylester, D-Methionin-isopropylester, D,D-Methionindipeptid und D-Methionin haben ergeben, dass diese vier Substanzen durch eindimensionale Chromatographie in Butanol-Eisessig-Wasser sauber voneinander getrennt werden (vgl. Fig. 2). Sie sind auf diese Weise auch in Fermentreaktionsgemischen leicht nebeneinander nachweisbar. Die Identifizierung der jeweils vorhandenen Komponenten und ihre halbquantitative Bestimmung kann durch direkten Vergleich mit entsprechenden Kontrollchromatogrammen erfolgen. Wegen der leichten Oxydierbarkeit des Methioninschwefels ergeben sich aber gewisse Unsicherheiten, indem in den Chromatogrammen gelegentlich mehr oder weniger intensive Flecken von Oxydationsprodukten auftreten. Diese Schwierigkeit hat sich jedoch durch ein sorgfältiges papierchromatisches Studium der Oxydationsprodukte (Fig. 2 und 3) beheben lassen. Es zeigte sich nämlich, dass diejenigen Flecken, welche von Oxydationsprodukten herrühren und leicht verwechselt werden, sich mit Sicherheit identifizieren lassen, wenn ausser in Butanol-Eisessig-Wasser zusätzlich eindimensional in Collidin-Wasser chromatographiert wird.

Im übrigen wurde die schon früher<sup>4)</sup> verwendete „Wasserstoffperoxyd-Technik“ verfeinert und in Zweifelsfällen als unabhängige zweidimensionale Methode zur Sicherstellung der Resultate herangezogen.

Eindimensionales Verfahren: In Fig. 2 und 3 sind die  $R_F$ -Werte und relativen Fleckengrössen zusammengestellt, welche beobachtet werden, wenn man in äquivalenten Mengen

die Reinsubstanzen Methionin-dipeptid-isopropylester, Methionin-isopropylester, Methionin-dipeptid und Methionin,

<sup>1)</sup> Vgl. die Fleckenkarte (Fig. 2) auf S. 224.

<sup>2)</sup> Helv. **33**, 582 (1950).

<sup>3)</sup> „Collidin“ der *Schweiz. Teerindustrie AG.*, Pratteln, Kp. 164–171°.

<sup>4)</sup> Helv. **33**, 583 (1950)

die Reinsubstanzen nach längerer Einwirkung von Luft (Autoxydation) und die Reinsubstanzen nach Behandlung mit steigenden Mengen Wasserstoffperoxyd im System Collidin-Wasser bzw. Butanol-Eisessig-Wasser aufsteigend auf *Whatman*-Papier Nr. 1 chromatographiert:

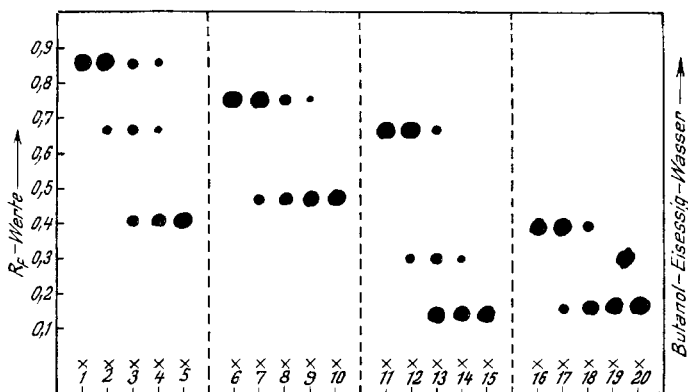


Fig. 2.

Fleckenkarte für das System n-Butanol-Eisessig-Wasser (4:1:5).

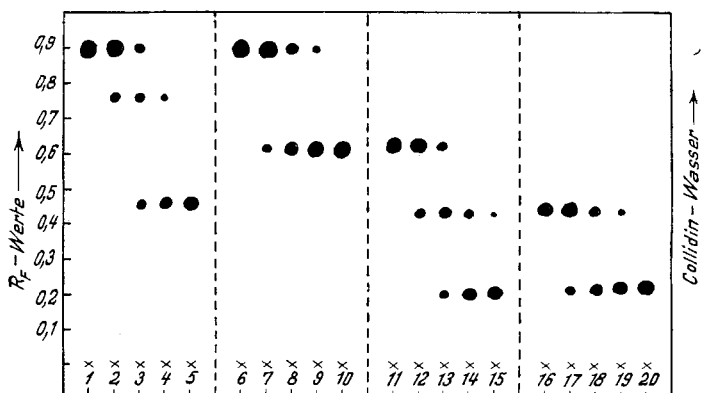


Fig. 3.

Fleckenkarte für das System Collidin-Wasser.

Legende zu Fig. 2 und 3:

1. D, D-Methionin-dipeptid-isopropylester (30  $\gamma$ )
2. D, D-Methionin-dipeptid-isopropylester (30  $\gamma$ ) teilweise autoxydiert
3. D, D-Methionin-dipeptid-isopropylester (30  $\gamma$ ) + 0,005 cm<sup>3</sup> 3<sup>3</sup>/<sub>4</sub>-proz. H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Lösung<sup>1)</sup>
4. D, D-Methionin-dipeptid-isopropylester (30  $\gamma$ ) + 0,005 cm<sup>3</sup> 7<sup>1</sup>/<sub>2</sub>-proz. H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Lösung
5. D, D-Methionin-dipeptid-isopropylester (30  $\gamma$ ) + 0,005 cm<sup>3</sup> 15-proz. H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Lösung
6. D-Methionin-isopropylester (17  $\gamma$ )
7. D-Methionin-isopropylester (17  $\gamma$ ) teilweise autoxydiert

<sup>1)</sup> Die H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Behandlung erfolgte, abgesehen von der angewandten Peroxydmenge, nach den Angaben in *Helv.* **33**, 583, Fussnote <sup>2)</sup> (1950). Dort wurde mit 30-proz. H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> oxydiert; die niederen Oxydationsstufen wurden dadurch zum Teil dem Nachweis entzogen.



8. D-Methionin-isopropylester (17 $\gamma$ )	+ 0,005 cm <sup>3</sup> 3 <sup>3</sup> / <sub>4</sub> -proz. H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> -Lösung
9. D-Methionin-isopropylester (17 $\gamma$ )	+ 0,005 cm <sup>3</sup> 7 <sup>1</sup> / <sub>2</sub> -proz. H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> -Lösung
10. D-Methionin-isopropylester (17 $\gamma$ )	+ 0,005 cm <sup>3</sup> 15-proz. H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> -Lösung
11. D, D-Methionin-dipeptid (20 $\gamma$ )	
12. D, D-Methionin-dipeptid (20 $\gamma$ )	teilweise autoxydiert
13. D, D-Methionin-dipeptid (20 $\gamma$ )	+ 0,005 cm <sup>3</sup> 3 <sup>3</sup> / <sub>4</sub> -proz. H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> -Lösung
14. D, D-Methionin-dipeptid (20 $\gamma$ )	+ 0,005 cm <sup>3</sup> 7 <sup>1</sup> / <sub>2</sub> -proz. H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> -Lösung
15. D, D-Methionin-dipeptid (20 $\gamma$ )	+ 0,005 cm <sup>3</sup> 15-proz. H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> -Lösung
16. D-Methionin (10 $\gamma$ )	
17. D-Methionin (10 $\gamma$ )	teilweise autoxydiert (Sulfoxyd)
18. D-Methionin (10 $\gamma$ )	+ 0,005 cm <sup>3</sup> 3 <sup>3</sup> / <sub>4</sub> -proz. H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> -Lösung
19. D-Methionin (10 $\gamma$ )	+ 0,005 cm <sup>3</sup> 7 <sup>1</sup> / <sub>2</sub> -proz. H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> -Lösung
20. D-Methionin (10 $\gamma$ )	+ 0,005 cm <sup>3</sup> 15-proz. H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> -Lösung

Die Autoxydationsflecken treten auf, wenn die Reinsubstanzen in Lösung oder auf Filterpapier aufgetropft längere Zeit der Luft oder flüchtigen oxydierenden Stoffen ausgesetzt sind. Man findet sie auch regelmässig in den Ansätzen mit Organpräparaten. Inwiefern letztere direkt an dieser Oxydation beteiligt sind, ist nicht untersucht worden. Wie aus Fig. 2 und 3 ersichtlich ist, entsprechen die durch Autoxydation gebildeten Produkte der jeweils mit der niedersten Wasserstoffperoxyd-Konzentration erhaltenen Oxydationsstufe. Ihre  $R_F$ -Werte liegen zum Teil so, dass die Chromatogramme leicht falsch interpretiert werden können. Man sieht aber wiederum aus Fig. 2 und 3, dass Verwechslungen ausgeschlossen sind, wenn man gleichzeitig in Butanol-Eisessig-Wasser und in Collidin-Wasser eindimensional chromatographiert.

Im speziellen sei darauf hingewiesen, dass sich das Autoxydationsprodukt des Ausgangsesters nur in Butanol-Eisessig-Wasser vom Dipeptid trennt, dasselbe gilt vom Ausgangsester und Dipeptidester. Umgekehrt wandert das Autoxydationsprodukt des Dipeptidesters in Butanol-Eisessig-Wasser ungefähr auf gleiche Höhe wie das Dipeptid und ist nur in Collidin-Wasser von diesem zu unterscheiden.

*Zweidimensionales Verfahren (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Technik):* Das Reaktionsgemisch wird zweidimensional chromatographiert, und zwar beide Male in Collidin-Wasser. Nach dem ersten Collidinlauf entwickelt man das zuvor abgetrennte Leitchromatogramm mit Ninhydrin, wodurch die mit Peroxyd zu behandelnden Stellen bei I und II auf dem Hauptblatt ermittelt werden können (Fig. 4). Nach der Oxydation chromatographiert man in der zweiten Dimension erneut in Collidin-Wasser.

Zur sicheren Unterscheidung von Dipeptidester und Methioninester kann vor dem zweiten Collidinlauf auf die mit einem Kreuz (×) bezeichnete leere Stelle bei IV etwas Methioninester aufgetropft und dieser ebenfalls mit Wasserstoffperoxyd oxydiert werden. Das Methionin bei III wird vorteilhaft nicht mit Peroxyd behandelt<sup>1)</sup>.

c) Beladung und Salzeffekte: Bei Reaktionsabbruch können Homogenat- und Mitochondrienansätze direkt auf das Filterpapier aufgetropft werden, wenn die Volumina 0,005 bis 0,01 cm<sup>3</sup> und die Beladungen 150 bis 300  $\gamma$  (berechnet als Ausgangsester) nicht übersteigen. Oft aber ist es auf diese Art nicht zu vermeiden, dass die Chromatogramme unsauber werden. Es empfiehlt sich deshalb, die Reaktionsgemische vor dem Auftropfen durch Standard Super Cel zu filtrieren oder wenigstens die sedimentierbaren Komponenten abzuzentrifugieren. Vergleichende Versuche ergaben, dass die Verluste durch Adsorption an Super Cel klein sind.

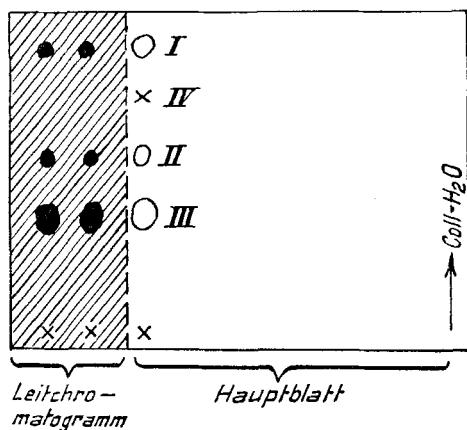
Am zweckmässigsten erwies sich bei der üblichen Substrat- und Homogenatkonzentration (Ester 0,17-m., Homogenat 1:5) für Butanol-Eisessig-Wasser eine Beladung von

<sup>1)</sup> Methionin und alle seine Derivate geben nach der Oxydation mit Wasserstoffperoxyd verhältnismässig diffuse Flecken. Oxydiert man nun das hier in grosser Menge anwesende Methionin, so wird der Flecken des gebildeten Methioninsulfoxyds manchmal derart diffus, dass er den benachbarten, wichtigen Flecken des Dipeptid-Oxydationsproduktes teilweise überdeckt (vgl.  $R_F$ -Werte in Fig. 3).

0,005 cm<sup>3</sup>, für Collidin-Wasser eine solche von 0,01 cm<sup>3</sup>. In beiden Fällen sind auch, sofern vorgängig filtriert und zentrifugiert wird, höhere Beladungen (viermal 0,01 cm<sup>3</sup>) möglich, aber nicht notwendig.

Fig. 4.

Schema des Methionin-dipeptid- und Methionin-dipeptid-isopropylester-Nachweises.



Blatt nach dem ersten Collidinlauf:

- I = Me-isopr. ester + Me-dip.isopr.ester
- II = Me-dipeptid
- III = Methionin
- IV = nachträglich aufgetropfter Me-isopr.ester (Vergleichssubstanz)

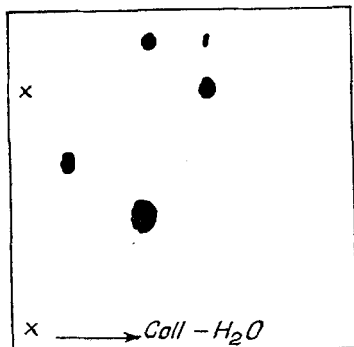
Kreise bei I und II und Kreuz bei IV: mit H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (15%) zu behandelnde Stellen.

Schraffierte Fläche: mit Ninhydrin entwickeltes Leitchromatogramm.

Blatt nach dem zweiten Collidinlauf:

Oxydationsprodukte von:

- ... Me-dip.isopr.ester + Me-isopr.ester
- ... Me-isopr.ester (Vergleichssubstanz)
- ... Me-dipeptid
- .. Methionin (nicht oxydiert)



Filtrierte oder zentrifugierte Reaktionsgemische geben beim Chromatographieren trotz ihres natürlichen Gehaltes an Salzen, zahlreichen ninhydrinpositiven und anderen löslichen Substanzen sehr schöne Bilder. Eine Entsalzung oder eine Ausfällung der Eiweißkörper mit Trichloressigsäure ist nicht nötig. Letzteres ist besonders wichtig, denn trichloressigsäurehaltige Filtrate lassen sich zwar in Collidin-Wasser, nicht aber in Butanol-Eisessig-Wasser chromatographieren. Aus diesem Grunde wurde auch bei der zeitlichen Verfolgung der Reaktion darauf verzichtet, die Fermenteinwirkung mit Trichloressigsäure zu unterbrechen; statt dessen wurden die auf das Filterpapier aufgetropften Proben möglichst rasch getrocknet. Dieses Vorgehen ist allerdings weniger exakt, vermag aber gleichwohl ein gutes Bild über den Reaktionsablauf zu liefern (vgl. Fig. 1). Was den Salzeffekt anbetrifft, so vermindert selbst ein Salzzusatz (0,1-m.) von NaCl, Soda-Hydrogencarbonat-Puffer oder KCN kaum die Qualität der Bilder; phosphatpufferhaltige Lösungen dagegen lassen sich schlecht chromatographieren. Der Mannitzusatz in den Mitochondriensuspensionen beeinträchtigt die Chromatogramme nicht.

### 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 Analysetechnik 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. Mitteilung<sup>1)</sup>.

### **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 Analysen<sup>1)</sup>. Obschon diese

---

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