

Modellversuche zur präbiologischen Entstehung von Polypeptiden

Von G. LOSSE und R. BÖHM

Inhaltsübersicht

Im Hinblick auf die präbiologische Bildung der Proteine wird die Polymerisation der niederen α -Aminonitrile an Bleicherde untersucht sowie am Polyglycin eine Reihe von einfachen Modellreaktionen zur Einführung von Aminosäureseitenketten in Polyglycinreste geprüft. Weiter wird die prinzipielle Möglichkeit von Umamidierungen zwischen Polyglycin und Aminosäuren in einfachen Reaktionsmischungen unter Mitwirkung organischer Säuren und Basen gezeigt.

Über die präbiologische Bildung der biochemischen grundlegenden Verbindungsklassen Peptide, Saccharide und Nucleinsäuren bestehen heute feste, auch experimentell begründete Vorstellungen¹⁻⁶).

Für Polypeptide nimmt Fox⁴) als primäres Bildungsprinzip die thermische Polykondensation der Monomeren unter Mitwirkung saurer und basischer Aminosäuren an. SCHRAMM⁷) zeigte, daß als Kondensationsmittel für den statistischen Aufbau von Polypeptiden Polyphosphorsäureester wirksam ist.

AKABORI⁸⁾⁹) fordert aus energetischen Gründen für die präbiologische Bildung der Proteine eine Polymerisation der niederen α -Aminonitrile, speziell des Glycinnitrils und anschließende Alkylierungs- sowie Transpeptidierungsreaktionen der gebildeten Polyaminosäuren. Durch Aufbau niederer Glycinpeptide aus Aminoacetonitril an Kaolin konnte der experimentelle

1) H. H. PATTEE, *Advances in Enzymol.* **27**, 381 (1965).

2) A. I. OPARIN, *Advances in Enzymol.* **27**, 347 (1965).

3) S. W. FOX, *Science (Washington)* **132**, 200 (1960).

4) S. W. FOX, *Nature (London)* **205**, 328 (1965).

5) A. WACKER, *Angew. Chem.* **70**, 519 (1958).

6) R. BÖHM u. G. LOSSE, *Z. Chem.* **7**, 409 (1967).

7) G. SCHRAMM, H. GRÖTSCH u. W. POLLMANN, *Angew. Chem.* **74**, 53 (1962).

8) S. AKABORI, K. OKAWA u. M. SATO, *Bull. chem. Soc. Japan* **29**, 608 (1956).

9) S. AKABORI, *Kagaku (Science)* **25**, 54 (1955).

Beweis dieser Vorstellung erbracht und durch Umsetzung der Methylengruppen solcher Glycinpeptide mit Formaldehyd und Acetaldehyd zu Seryl- bzw. Threonylpeptiden die Möglichkeit zur nachträglichen Einführung von Aminosäureseitenketten gezeigt werden.

Aufbauend auf dieser Vorstellung und eigenen früheren Versuchen¹⁰⁾ haben wir uns jetzt ausführlicher mit der Polymerisation verschiedener α -Aminonitrile an anorganischen Trägern und im präparativen Maßstab beschäftigt. Dabei wurde versucht, weitere experimentelle Stützen für Seitenkettenbildung an Glycinpeptiden sowie für die Möglichkeit von Transpeptidierungsreaktionen unter präbiologischen Bedingungen zu erbringen.

A. Polymerisation von α -Aminonitrilen an Bleicherde

Zu den Polymerisationsversuchen haben wir Glycin-, Alanin-, Valin- und Leuzinnitril im Mischungsverhältnis Nitril-Bleicherde = 1:2 am Träger adsorbiert, anschließend 50 Stunden auf 80 °C (Glycinnitril 50 °C) erhitzt und die primär gebildeten Polyamide durch 5stündiges Behandeln mit Wasser bei 50 °C in die Polyaminosäuren übergeführt. Tabelle 1 zeigt die erhaltenen Ausbeuten an Polyaminosäuren sowie ihre nach der DNP-Methode bestimmten Molgewichte. Wegen der Unlöslichkeit des Polyglycins erfolgte seine Molgewichtsbestimmung direkt am Träger. Um bei den anderen, wasserlöslichen Polyaminosäuren zu vergleichbaren Resultaten zu gelangen, wurden diese aus der wäßrigen Lösung des Reaktionsansatzes wieder quantitativ auf den Träger niedergeschlagen und analog verfahren.

Tabelle 1

Bildung von Polyaminosäuren aus α -Aminonitriten an Bleicherde

Aus Nitril gew. Polyaminosäure	Ausbeute (% bez. auf Nitril)	Peptid-N-Gehalt des Trägers (%)	Mittleres Molgewicht
Polyglycin	90	9,4	15 500
Polyalanin	50—60	2,4	3 500
Polyvalin	5	2,2	400
Polyleuzin	5	2,3	550

Die Versuchsreihe zeigt hinsichtlich der Polymerisationsfähigkeit eine deutliche Bevorzugung des Glycinnitrils, welches nach AKABORI⁸⁾⁹⁾ die Schlüsselverbindung für die urzeitliche Bildung der Peptide und Proteine darstellt. Demgegenüber betragen die mittleren Polymerisationsgrade von Valinnitril und Leuzinnitril nur etwa 3—6. Das Papierchromatogramm dieser

¹⁰⁾ G. LOSSE u. K. ANDERS, Hoppe-Seylers Z. physiol. Ch. **323**, 111 (1961).

Polyaminosäuren weist in Übereinstimmung hiermit 5 bzw. 4 ninhydrin-positive Komponenten auf, unter denen jeweils das Monomere und Dipeptid identifiziert wurde.

B. Modellversuche zur Seitenkettenbildung

Hydroxyaminosäuren

Für die Umsetzungen zu Hydroxyaminosäure-Seitenketten setzten wir ein nach AKABORI⁸⁾ aus dem N-Carboxyanhydrid hergestelltes und an Bleicherde adsorbiertes Polyglycin, dessen Molgewichtsbestimmung am Träger den Wert 3500 lieferte (NCA-Polyglycin) wie auch das aus Glycinnitril in Gegenwart von Bleicherde gebildete Polymere (Nitril-Polyglycin, Tab. 1) ein. Tabelle 2 zeigt die aus jeweils 1 g des mit Polyverbindung beladenen Trägers und 30proz. Formalinlösung bzw. 20proz. wäßriger Acetaldehydlösung in Gegenwart von 1 m Mol Base bei 50 Stunden und 70 °C resultierenden, durch quantitative Papierchromatographie¹¹⁾ erhaltenen Ergebnisse.

Tabelle 2

Serin- bzw. Threoninbildung aus Polyglycin

Base	Serin/Glycin in NCA/Polyglycin	Molverhältnis Serin/Glycin in Nitril-Polyglycin	Threonin/Glycin in NCA-Polyglycin
Triäthylamin	—	—	—
Dicyandiamid	0,17	—	—
Dicyandiamid 10 mMol	0,32	—	—
NaHCO ₃	0,03	—	—
K ₂ CO ₃	0,20	0,23	0,03
CaO	0,18	0,16	—
NaOH	0,15	—	—

Ohne Basenzusatz oder bei Einsatz von trägerfreiem Polyglycin konnte keine Bildung der Hydroxyaminosäuren nachgewiesen werden.

Die Zeitabhängigkeit der Serinausbeute am NCA-Polyglycin mit 1 mMol CaO unter sonst gleichen Standardbedingungen weist Tabelle 3 aus.

Tabelle 3

Zeitabhängigkeit der Serinausbeute

Dauer (Std.)	2	6	12	48	96
Serin/Glycin (Molverhältnis)	0,04	0,07	0,11	0,18	0,22

¹¹⁾ C. BARBIROLI, Mikrochemica Acta (Wien) 1965, 652.

Cystein und Cystin

Für die mögliche Umwandlung von Serylresten in Cysteinreste unter präbiologischen Bedingungen durch Mitwirkung von SH⁻-Ionen existieren bis jetzt keine sicheren präparativen Beweise¹⁻⁵). In diesbezüglichen Vorversuchen haben wir zunächst DL-Serin bzw. DL-Serinanhydrid 24 Stunden in gesättigter Na₂S-Lösung auf 100 °C erhitzt und konnten hierbei Anteile von 0,03–0,04% an Cystein nachweisen. Die quantitative Bestimmung des Cysteins neben viel Serin erfolgte nach Entfernung anderer Schwefelverbindungen polarographisch¹²⁾ direkt in den Reaktionslösungen bzw. ihren Hydrolysaten. Analoge Versuche mit DL-Serin bzw. DL-Serinanhydrid unter Zusatz der doppelten Menge K₂CO₃ oder Na₂S in geschmolzenem Schwefel zeigten bezüglich des Temperatur- und Zeiteinflusses der Cysteinbildung die in Tab 4 verzeichneten Ergebnisse.

Tabelle 4
Cysteinbildung aus Serin mit Sulfid

Dauer (Min)		5	10	20	30	60
Ausbeute an Cystein	125°		0,04			
	150°	0,16	0,30	0,60	0,91	1,98
	200°		1,90			

Ohne Zusätze oder mit solchen, die in der Schwefelsäure keine Sulfidionen liefern, entsteht kein Cystein. Zur Übertragung dieser Ergebnisse auf die Polyverbindung haben wir 1 g mit NCA-Polyglycin beladener Bleicherde unter verschiedenen Bedingungen mit Formalinlösung und überschüssigem Natriumsulfid umgesetzt. Die halbquantitative Bestimmung des Cysteins in den stark gefärbten Hydrolysaten ergab im Bereich von 50 Stunden und Temperaturen von 80 °C einen in Cysteinreste umgewandelten Anteil von etwa 0,5% der Glycinreste. Daneben waren größere Anteile Serin nachweisbar.

Homologe des Glycins

Zur Demonstration einer möglichen Bildung von Seitenketten aliphatischer Aminosäuren durch Alkylierung von Glycin-CH₂-Gruppen mit Olefinen dienten uns als Grundlage Versuche von ELAD¹³⁾. In Abänderung dieser Arbeitsweise versuchten wir jedoch weigehend einfache, den urzeitlichen Verhältnissen nahekommenden Bedingungen einzuhalten. Dazu wurden die in Tab. 5 wiedergegebenen Verbindungen in 0,1–0,5 g-Ansätzen in Wasser/

¹²⁾ M. BREZINA u. P. ZUMAN, Die Polarographie in der Medizin, Biochemie und Pharmacie, Akad. Verlagsges. Leipzig 1956.

¹³⁾ D. ELAD u. J. SINNREICH, Chem. Commun. 1965, S. 471; Chem. and Ind. 1966, 1180.

Alkohol 1:1 mit überschüssigem Isobutylen 48 Stunden auf 125 °C in Gegenwart von 1 cm³ H₂O₂ bzw. 50 mg Dibenzoylperoxid erhitzt.

Zum Nachweis des entstandenen Leuzins wurde mit 6n HCl hydrolysiert sowie nach papierchromatographischer Trennung und Entwicklung der Aminosäuren spektralphotometrisch ausgewertet. Ohne Katalysator war keine Reaktion zu beobachten.

Tabelle 5
Leuzinbildung aus Glycinderivaten mit Isobutylen

Eingesetztes Glycinderivat	Katalysator	Ausbeute an Leuzin
Glycin	Peroxid	0,5%
Glycinanhydrid	Peroxid	2,0%
Glycinanhydrid	H ₂ O ₂ (3proz.)	4,5%
Glycinanhydrid	H ₂ O ₂ (30proz.)	3,1%
NCA-Polyglycin (trägerfrei)	Peroxid	1,3%
NCA-Polyglycin (trägerfrei)	H ₂ O ₂ (30proz.)	3,0%

C. Transpeptidierungen

Nach der Theorie von AKABORI⁸⁾⁹⁾ werden unter präbiologischen Bedingungen durch Reaktionen am Polyglycin zunächst verschiedenartige Polyaminosäuren gebildet, die dann durch Transpeptidierungsreaktionen in peptidartige Stoffe übergehen können. Um den Nachweis für unter primitiven Bedingungen mögliche Umamidierungen zu erbringen, wurde von uns aus dem N-Carboxyanhydrid gewonnenes wasserunlösliches Polyglycin ohne Träger mit verschiedenen Aminosäuren im äquimolaren Verhältnis in direkter Mischung oder mit diesen als Suspension in verschiedenen hochsiedenden, inerten, sauren oder basischen Lösungsmitteln umgesetzt. Die quantitative Bestimmung der Einbaurate an Fremdaminosäure in Polyglycin er-

Tabelle 6
Einbau von Aminosäuren in Polyglycin (Mischung)

Aminosäure	Einbaurate (% bez. auf Polyglycin)
DL-Alanin	11,5
DL-Aminobutters.	12,5
DL-Valin	8,5
DL-Leuzin	9,0
DL-Isoleuzin	10,5

folge nach vollständiger extraktiver Entfernung nicht chemisch gebundener Anteile der Aminosäure aus der Polyverbindung und anschließender Totalhydrolyse.

Tab. 6 zeigt die Ergebnisse bei 24 Stunden und 180 °C in direkter Mischung, Tab. 7 die bei 6 Stunden und 180 °C in verschiedenen hochsiedenden Lösungsmitteln.

Tabelle 7
Einbau von Alanin in Polyglycin (Suspension)

Lösungsmittel	Einbauraten an Alanin (% bez. auf Polyglycin)
Glykol	3,5
Dekalin	3,8
Chinolin	4,4
m-Kresol	5,1

Aus Tab. 8 geht hervor, daß hierbei bereits schwache Säuren katalytisch wirksam sind. Es wurden 0,1 g NCA-Polyglycin und 0,1 g Alanin in Dekalin 6 Stunden in Gegenwart von 1 mMol Carbonsäure auf 180 °C erhitzt.

Tabelle 8
Einfluß von Säuren auf den
Einbau des Alanins in Polyglycin

Katalysator	Einbauraten an Alanin (% bez. auf Polyglycin)
ohne	3,8
Bernsteinsäure	4,8
Oxalsäure	5,7

Die Versuche zeigen prinzipiell, daß die nach der Vorstellung von AKA-BORI gebildeten Polyaminosäuren nicht nur durch gegenseitige Transpeptidierung, sondern auch durch zusätzlichen Einbau monomerer Aminosäuren in peptidartige Stoffe übergehen können. Für monomere Aminosäuren konnten zahlreiche primäre Entstehungsmöglichkeiten experimentell bewiesen werden¹⁻⁶). Es ist anzunehmen, daß sich die präbiologische Bildung der Peptide und Proteine nicht nur auf einem einzigen der eingangs erwähnten Wege, sondern durch Ineinandergreifen einer größeren Anzahl von primären Aufbaureaktionen vollzogen hat.

Beschreibung der Versuche

1. Polymerisation der α -Aminonitrile

14 g handelsüblicher, mit HCl ausgekochter, dann neutralgewaschener und bei 100 °C getrockneter Bleicherde werden mit 7 g α -Aminonitril vermischt, so daß das Nitril völlig adsorbiert ist und im geschlossenen Rohr 50 Stunden auf 80 °C (Glycinnitril auf 50 °C) erhitzt.

Zur Überführung des gebildeten Polyamidins in die Polyaminosäure wird mit 150 cm³ Wasser 5 Stunden auf 50 °C erhitzt. Durch Eindampfen der wäßrigen Suspension im Vakuum wird der gebildete Ammoniak quantitativ vertrieben und alle peptidartigen Bestandteile quantitativ auf den Träger zurücküberführt. Die Molgewichtsbestimmungen der Polyaminosäure erfolgten direkt am Träger.

2. Herstellung von Polyglycin und Polyalanin über die N-Carboxyanhydride (NCA-Polyaminosäuren)

Glycin-N-carboxyanhydrid¹⁴⁾ und DL-Alanin-N-carboxyanhydrid¹⁵⁾ werden nach I. c.¹⁴⁾ in die Polyaminosäure übergeführt. Über das N-Carboxyanhydrid gewonnenes und an Bleicherde adsorbiertes Polyglycin wurde nach I. c.⁸⁾ hergestellt.

3. Molekulargewichtsbestimmungen

0,05 g Polyaminosäure oder 0,2 g Träger mit bekanntem, aus der Elementaranalyse (s. Tab. 1) resultierenden Polyaminosäuregehalt werden mit 0,8 g 2,4-Dinitrofluorbenzol in 20 cm³ Äthanol und 20 cm³ 40proz. wäßriger Natriumcarbonatlösung 6 Stunden bei Raumtemperatur geschüttelt. Die alkalische Lösung wird viermal mit 50 cm³ Äther ausgeschüttelt, der wäßrige Teil mit dem gleichen Volumen konz. HCl angesäuert und 6 Stunden am Rückfluß erhitzt. Nach dem Eindampfen im Vakuum wird auf 10 cm³ aufgefüllt und ein aliquoter Teil aufsteigend in Pyridin/Isoamylalkohol/1 n Ammoniak = 3/7/10 chromatographiert. Die abgetrennten N-(2,4-Dinitrophenyl)-Aminosäuren werden mit 5 cm³ 1proz. wäßriger Bicarbonatlösung 15 Minuten bei 55 °C extrahiert und spektral-photometrisch bei 360 nm vermessen. Zu Kontrolle werden bekannte Mengen Dinitrophenylderivat mitchromatographiert (Ergebnisse Tab. 1).

4. Serin- und Threoninbildung

a) 1 g NCA- oder Nitril-Polyglycin auf Bleicherde werden mit 10 cm³ 30proz. Formalin bzw. 10 cm³ 20proz. wäßriger Acetaldehydlösung und 1 mMol Katalysator im geschlossenen Rohr 50 Stunden auf 70 °C erhitzt.

b) Je 1 g NCA-Polyglycin auf Bleicherde werden mit 10 cm³ 30proz. Formalin und 1 mMol CaO 2, 6, 12, 48 und 96 Stunden auf 70 °C erhitzt.

Nach dem Filtrieren wird mit überschüssigem 2 n Ba(OH)₂ 6 Stunden bei 100 °C hydrolysiert und nach anschließender Neutralisation mit 2 n H₂SO₄ in der eingengten wäßrigen Lösung der gebildete Anteil an Hydroxyaminosäure nach BARBIROLI¹¹⁾ durch quantitative Papierchromatographie im Laufmittelsystem Pyridin/Wasser = 100/35 und Picolin/Wasser = 3/1 bestimmt (Ergebnisse Tab. 2 u. 3).

5. Cysteinbildung

a) In wäßriger Lösung

0,1 g DL-Serin oder DL-Serinanhydrid (Schmp. 234–235°) werden in 5 cm³ gesättigter Natriumsulfidlösung 24 Stunden auf 100 °C erhitzt. Nach quantitativer Entfernung des

¹⁴⁾ A. C. FASTING u. D. COLEMAN, J. chem. Soc. (London) 1950, 3213.

¹⁵⁾ D. BEN-ISHAÏ u. E. KATCHALSKY, J. Amer. chem. Soc. 74, 3688 (1952).

Schwefelwasserstoffes wird filtriert, eingeeengt und die ammoniakalische Lösung polarographisch in NH_4Cl -Puffer unter Zusatz von 0,01 Mol CoCl_2 bei $E = 6 \cdot 10^{-8}$ Amp/Skt polarographiert¹²).

b) In Schwefelschmelze

Jeweils 0,05 g DL-Serin bzw. Serinanhydrid werden mit 1,0 g Schwefel 5, 10, 20, 30 und 60 Stunden auf 150°C sowie bei 10 Stunden auch auf 125° und 200°C unter Zusatz von 0,1 g K_2CO_3 bzw. Na_2S erhitzt. Nach Abkühlen wird die Schmelze zur quantitativen Entfernung der Sulfidionen mit 40 cm³ verd. HCl ausgekocht, ammoniakalisch gemacht und polarographisch untersucht (Ergebnisse Tab. 4).

c) Umsetzung von Polyglycin

Die Suspension von 1 g NCA-Polyglycin auf Bleicherde nach AKABORI⁸) in 10 cm³ 30proz. Formalinlösung, welche mit überschüssigem Na_2S versetzt war, wurde 50 Stunden auf 80°C erhitzt, anschließend 6 Stunden bei 100°C mit $\text{HCOOH}/\text{HCl} = 4:1$ hydrolisiert und nach Aufarbeitung wie unter 5a der Cysteinanteil ermittelt.

6. Leuzinbildung

0,1–0,5 g Glycin, Glycinanhydrid bzw. trägerfreies NCA-Polyglycin werden in 4 cm³ Wasser/Äthanol = 1:1 mit überschüssigem Isobutylen unter Zusatz von 1 cm³ 30proz. H_2O_2 bzw. 0,05 g Dibenzoylperoxid 48 Stunden auf 125°C erhitzt. Nach Verkochen des Peroxides und Hydrolyse des Peptides mit 6 n HCl bei 100°C sowie Neutralisation wird das Leuzin durch Rundfilterpapierchromatographie von Glycin (Laufmittel:n-Butanol/Eisessig/Wasser = 4:1:1, α -Picolin/Wasser = 3:1 und Pyridin/Wasser = 1:3:5) getrennt. Die quantitative Bestimmung des Leuzins wird nach BARBIROLI¹¹) spektralphotometrisch bei 560 nm durchgeführt.

7. Transpeptidierung

a) Ohne Lösungsmittel

0,1 g trägerfreies NCA-Polyglycin werden mit 0,1 g DL- α -Aminosäure vermischt und 24 Stunden auf 180°C erhitzt. Anschließend wird die Aminosäure durch 25stündiges Extrahieren mit Wasser im Soxhlet-Apparat quantitativ entfernt. Der unlösliche Rückstand wird mit 20 cm³ 6 n HCl hydrolisiert und nach Abdampfen der Säure der Rest in wenig Wasser aufgenommen. Der Nachweis und die quantitative Abtrennung der eingebauten Aminosäure erfolgen durch quantitative Papierchromatographie¹¹) im Laufmittelsystem n-Propanol/Wasser = 3:1 und Pyridin/Wasser = 100:35 (Ergebnisse Tab. 6).

b) In Suspensionsmitteln

In je 3 cm³ Glykol Dekalin, Chinolin oder m-Kresol werden 0,1 g trägerfreies NCA-Polyglycin und 0,1 g DL-Alanin 6 Stunden auf 180°C erhitzt. Der unlösliche Teil wird wie unter 7a) beschrieben extrahiert, hydrolisiert und der eingebaute Aminosäureanteil quantitativ bestimmt (Ergebnisse Tab. 7).

c) Mit Carbonsäuren

In 3 cm³ Dekalin werden 0,1 g NCA-Polyglycin und 0,1 g DL-Alanin mit 1 mMol Oxal- bzw. Bernsteinsäure 6 Stunden auf 180°C erhitzt. Die Aufarbeitung erfolgt wie unter 7a) beschrieben (Ergebnisse Tab. 8).

Dresden, Institut für Organische Chemie der Technischen Universität und

Halle (Saale), Institut für Organische Chemie der Martin-Luther-Universität.

Bei der Redaktion eingegangen am 2. November 1967.