

DIE BINDUNG DER KOHLENHYDRATKOMPONENTE IN PROTEINEN

F. Micheel, E.-A. Ostmann † u. G. Fielmeier

aus dem Organisch-Chemischen Institut  
der Universität Münster (Westf.)

(Received 22. Oktober 1962)

MICHEEL und SUTHAUS<sup>1</sup> isolierten aus verschiedenen  $\gamma$ -Globulinen durch Abbau mit Triäthylamin Glykopeptide, die einen Gesamtkohlenhydratgehalt bis ca. 80 % aufwiesen. Durch Verfeinerung des Verfahrens gelangten MICHEEL und KLÖKER<sup>2</sup>, von Rinderserum- $\gamma$ -globulin ausgehend, zu einem Glykopeptid, das neben der Oligosaccharidkomponente und  $\alpha$ -Glucosamin lediglich Glutaminsäure, Asparaginsäure, Tyrosin und Phenylalanin enthält. Der relativ hohe Anteil an Asparaginsäure und  $\alpha$ -Glucosamin legte die Vermutung nahe, daß die Asparaginsäure die Bindung zum  $\alpha$ -Glucosamin-Baustein der Kohlenhydratkomponente vermittelt. Solche Vermutungen sind wiederholt<sup>3,4,5,6</sup> auf Grund der Ergebnisse des enzymatischen

---

† verstorben 29. 9. 62.

<sup>1</sup> F. Micheel u. F. Suthaus, Naturwissenschaften 45, 188 (1958), Dissertation F. Suthaus, Universität Münster 1958.

<sup>2</sup> F. Micheel u. W. Klöcker, unveröffentlicht: Dissertation W. Klöcker, Universität Münster 1961.

<sup>3</sup> F. R. Jevons, Nature (London) 181, 1345 (1958).

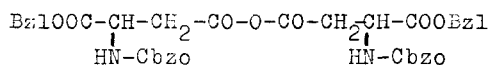
<sup>4</sup> J.W. Rosevear u. E.L. Smith, J. biol. Chemistry, 236, 425 (1961).

<sup>5</sup> P.G. Johansen, R.D. Marshall u. A. Neuberger, Biochem. J. 78, 518 (1961).

<sup>6</sup> R.H. Nuenke, Diss. Abs. 22, 54 (1961).

Abbaues von Ovalbumin geäußert worden. KAVLERSNEVA und Mitarbeiter <sup>7,8</sup> erhielten durch enzymatischen Abbau von Ovalbumin eine Fraktion, die neben Polysaccharid ausschließlich Asparaginsäure enthielt. Über die Art der Bindung konnten jedoch keine näheren Angaben gemacht werden.

Wir beschreiben im folgenden den chemischen Abbau von Ovalbumin. Die Aminosäuren und das Hexosamin werden in dem isolierten Glykopeptid quantitativ mit dem Aminosäure-Analysator <sup>+</sup> nach SELIN und MOORE <sup>9</sup> bestimmt. Um die bei der Hydrolyse der Glykopeptide anfallenden Bruchstücke identifizieren zu können, wurden die  $\alpha$ - und  $\beta$ -Peptide aus L-Asparaginsäure und D-Glucosamin synthetisiert. In Abänderung des in einer vorausgehenden Arbeit <sup>10</sup> beschriebenen Verfahrens wurde N-Cbzo-L-asparaginsäure- $\alpha$ -benzylester <sup>++</sup> (Schmp. 85°) nach G.T. YOUNG und Mitarbeitern <sup>11</sup> durch Hydrolyse des Dimerisationsproduktes  $\alpha,0$ -Bzl-N-Cbzo- $\beta$ ,L-asparaginsäure-anhydrid <sup>+++</sup>



in reiner Form gewonnen. Aus 1,3,4,6-Tetracetyl- $\beta$ ,D-galactosamin <sup>12</sup>, N-Cbzo-L-asparaginsäure- $\alpha$ -benzylester und der

<sup>7</sup> E.D. Kaversneva u. V. Bogdanov, Biochimija 26, 105 (1961).

<sup>8</sup> E.D. Kaversneva u. Tsi de Fan, ebenda 26, 420 (1961).

<sup>+</sup> Modell der Firma Beckman/Spinco

<sup>9</sup> S. Moore u. W.H. Stein, J. biol. Chemistry 192, 663 (1951).

<sup>10</sup> F. Nicheel, E.-A. Ostmann u. F. Alfes, Tetrahedron 18, 1155 (1962).

<sup>++</sup> Cbzo =  $-\text{OCOCH}_2\text{C}_6\text{H}_5$

<sup>11</sup> G.T. Young u. Mitarb., J. chem. Soc. (London) 1959, 3868.

<sup>+++</sup> Bzl =  $-\text{CH}_2\text{C}_6\text{H}_5$

<sup>12</sup> M. Bergmann u. L. Zervas, Ber. dtsch. chem. Ges. 64, 975 (1931).

äquimolaren Menge Dicyclohexyl-carbodiimid<sup>13</sup> wurde N-[N-Cbz-o-L-asparagyl- $\alpha$ -benzyl- $\beta$ ]-1,3,4,6-tetracetyl- $\beta$ ,D-glucosamin (I) erhalten.

Ausb. 79 %, Schmp. 211<sup>o</sup>,  $[\alpha]_D^{23} = + 6,6^o$  (c = 4, Pyridin).

MARKS und NEUBERGER<sup>14</sup> geben Schmp. 209,5 - 210,5<sup>o</sup> und  $[\alpha]_D^{22} = + 6,3^o$  (c = 1,27, Aceton) an.

$C_{33}H_{38}N_2O_{14}$  (686,6). Ber.: C 57,70, H 5,58, N 4,08,  $H_2CO$  25,07  
Gef.: C 57,89, H 5,52, N 3,99,  $H_2CO$  25,15

I wurde mit PdO-BaSO<sub>4</sub><sup>15</sup> katalytisch zu N-[L-Asparagyl- $\beta$ ]-1,3,4,6-tetracetyl- $\beta$ ,D-glucosamin (II) hydriert<sup>++++</sup>.

85 %, Schmp. 203 - 205<sup>o</sup> (Zers.),  $[\alpha]_D^{22} = + 28,3^o$  (c = 4, Wasser).

$C_{18}H_{26}N_2O_{12}$  (462,4). Ber.: C 46,75, H 5,67, N 6,06  
Gef.: C 46,44, H 5,65, N 6,06

Zur Abspaltung der Acetylgruppen wurde II 40 Stdn. mit 2 n H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> behandelt, die Lösung mit Ba(OH)<sub>2</sub> auf P<sub>H</sub> 4-5 gebracht und nach dem Abfangen und Eindampfen das N-[L-Asparagyl- $\beta$ ]-D-glucosamin als Ba-Komplex isoliert. Dieses Komplexsalz enthält auf 2 Moleküle Glykopeptid 1 Molekül BaSO<sub>4</sub>, was den Valenzbeziehungen entspricht. Es zeigt im Aminosäure-Analysator-Diagramm einen einzigen scharfen "Peak" (Elution nach 190 - 200 Minuten mit Citratpuffer P<sub>H</sub> = 3,25  $\pm$  0,02), so daß eine Transpeptidierung ausgeschlossen werden kann.

Ausb. 87 %, Schmp. 300<sup>o</sup> (fortschreitende Zersetzung ab 150<sup>o</sup>).

$C_{20}H_{36}BaN_4O_{20}S$  (822,0), Ber.: C 29,22, H 4,41, N 6,82  
Gef.: C 29,52, H 4,67, N 5,76

<sup>13</sup> J.C. Sheehan u. G.P. Hess, J.Amer.chem.Soc. 77, 1067 (1955).

<sup>14</sup> G.S. Marks u. A. Neuberger, J.chem.Soc.(London) 1961, 4872.

<sup>15</sup> R. Kuhn u. H.J. Haas, Angew. Chem. 67, 785 (1955).

<sup>++++</sup> Dieses Hydrierungsprodukt ist dem Aminosäure-Analysator-Diagramm zufolge einheitlich und frei von seinem  $\alpha$ -Isomeren.

N-[L-Asparagyl- $\beta$ ]-D-glucosamin und N-[L-Asparagyl- $\alpha$ ]-D-glucosamin, das aus N-[L-Asparagyl- $\alpha$ ]-1,3,4,6-tetracetyl- $\beta$ ,D-glucosamin<sup>10</sup> ebenfalls durch Hydrolyse mit 2 n H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> dargestellt wurde, unterschieden sich in ihren Aminosäure-Analysator-Diagrammen beträchtlich. Die  $\alpha$ -Verbindung wird 3 Stdn. später als die  $\beta$ -Verbindung eluiert. Nachdem so die beiden N-Asparagyl-derivate des D-Glucosamins in reiner Form bekannt waren, wurde aus Hühnereiweiß von höchstens 1 Tag alten Eiern nach einer von uns modifizierten Vorschrift von WOODWORTH u. SCHADE<sup>16</sup> ein reines Albumin isoliert und dieses mit Dimethyl-amino-äthanol<sup>17</sup> in Wasser hydrolysiert. Nach Dialysen und fraktionierten Fällungen mit Äthanol und Isopropanol wurde ein Glykopeptidgemisch mit einem Gesamtgehalt an Kohlenhydrat (Hexosen u. Hexosamin) von 45 % erhalten. Dies wurde mit 6 n HCl (100° 6 Stdn.) hydrolysiert und das Hydrolysat nach entsprechender Vorbereitung im Aminosäure-Analysator untersucht. Neben geringen Spuren der im Albumin enthaltenen Aminosäuren enthielt das Glykopeptid 6 Aminosäuren, und zwar in folgendem Verhältnis:

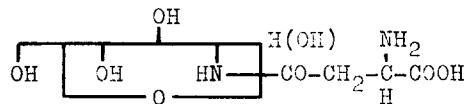
Leuc.	Al.	Glyc.	Lys.	Glut.	Asp.:	Glucos- amin
1	2	2	3	3	3	3

Es zeigte sich ferner, daß vor der Asparaginsäure, der ersten im Diagramm erscheinenden Aminosäure, ein hoher "Peak" auftritt, der keiner bekannten, aber auch keiner eventuell noch unbekanntes Aminosäure wegen seiner Lage im Diagramm zugeordnet werden kann. Es muß sich um ein Peptid handeln, das bei der Hydrolyse nicht gespalten worden war. Die Zeitdifferenz zwischen dem Auftreten dieses Peptids und der Asparaginsäure beträgt 40 Minuten. Die beiden Peptide N-[L-Asparagyl- $\beta$ ]-D-glucosamin und die entsprechende  $\alpha$ -Verbindung erwiesen sich als sehr stabil gegen saure Hydrolyse, so daß vermutet wurde, daß der unbekannte Peak einem von ihnen entspricht. Aus einer Mischung beider Peptide er-

<sup>16</sup> R.C. Woodworth u. A.L. Schade, Arch. Biochem. Biophys. **82**, 78 (1959).

<sup>17</sup> Diplom-Arbeit G. Pielmeier, Universität Münster 1961.

schien das N-[1-Asparagyl- $\beta$ ]-D-Glucosamin nach genau der Zeit (190 Min.) im Diagramm des Aminosäure-Analysators wie die unbekannte Substanz aus dem Hydrolysat, während das  $\alpha$ -Peptid erst drei Stunden nach dem  $\beta$ -Peptid erschien. Jetzt wurden etwa 20  $\mu$  des synthetischen  $\beta$ -Peptids zum Hydrolysat des Glykopeptids zugesetzt. In diesem Diagramm war der entsprechende "Peak" sehr stark vergrößert. Weder am aufsteigenden noch am absteigenden Ast der sehr steilen Kurve war jedoch eine Schulter vorhanden. Beide Substanzen waren also identisch. Es gelang daraufhin, aus dem Hydrolysat des Glykoproteids mit Hilfe des Analysators das Dipeptid präparativ zu isolieren, jedoch bisher nur in Pufferlösung. Nach Entfernung von Brij 35, Thiodiglykol und Phenol aus dem Citratpuffer wurde die Lösung des Peptids der Hydrolyse unterworfen. Die Bestimmung im Aminosäure-Analysator ergab ausschließlich Glucosamin und Asparaginsäure. Damit ist bewiesen, daß die Bindung zwischen Kohlenhydrat und Protein im Albumin aus Hühnereiern über die  $\beta$ -ständige Carboxylgruppe der Asparaginsäure peptidartig an einen D-Glucosaminrest erfolgt.



Aus Hydrolysaten von kohlenhydratreichen Glykopeptiden aus Rinderserum- $\gamma$ -Globulin und Gelatine<sup>18</sup> wurden die gleichen Peaks im Aminosäure-Analysator registriert. Daraus darf gefolgert werden, daß die peptidartige Bindung einer  $\beta$ -Carboxylgruppe der Asparaginsäure an die  $\text{NH}_2$ -Gruppe des D-Glucosamins allgemeiner in den Proteinen verbreitet ist.

<sup>18</sup> Dissertation W. Klöcker, Universität Münster 1961.