

Über die Bindung zwischen Kohlenhydrat und Protein  
in Glykoproteiden.

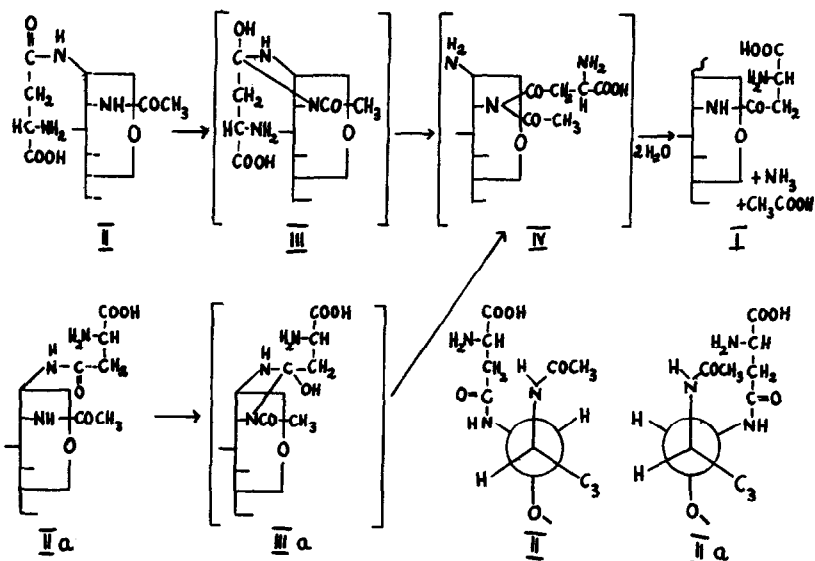
Von F. Micheel, Y. Tanaka<sup>+)</sup> und K.R. Römer  
[Aus dem Organisch-Chemischen Institut der Universität  
Münster/W.]

(Received 9 November 1964)

In einer früheren Mitteilung<sup>1)</sup> wurde gezeigt, daß beim chemischen Abbau verschiedener Kohlenhydrat-Protein-Verbindungen (Hühnereier-Albumin,  $\gamma$ -Globulin aus Rinderserum, Gelatine u.a.) durch alkalische Hydrolyse mit Dimethyl-oxyäthylamin (Bildung eines Glykopeptides) und anschließende saure Hydrolyse mit verd. HCl das N-[L-Asparagyl- $\beta$ ]-D-glucosamin (I) erhalten wird<sup>1)</sup>. I wurde mit synthetischem Material als identisch befunden. Im Gegensatz dazu fanden Forschergruppen, die den Abbau der Proteide nach enzymatischen Methoden durchführten, als Bindungskomponente das 2-Desoxy-2-aminoacetyl-D-glucosyl-1- $\beta$ -N-[L-asparagyl- $\beta$ ]-amin (II)<sup>2-5)</sup>, das sich auf Grund seines IR-Spektrums mit synthetischem Material als identisch erwies. Wir haben angesichts dieses Widerspruches die Möglichkeit geprüft, ob sich bei der chemischen Hydrolyse II in I umwandelt. Diese Vermutung hat sich bestätigt. Behandelt man II unter

+ ) Dr. Y. Tanaka dankt der Heinrich-Hertz-Stiftung für ein Stipendium.

- 1) a) F. Micheel, E.A. Ostmann† u. G. Pielmeier, Tetrahedron Letters 1963, 115  
Diplomarbeiten Univ. Münster: b) G. Pielmeier (1961),  
c) K.R. Römer (1963); Dissertationen Univ. Münster:  
d) W. Klöcker (1961), e) G. Pielmeier (1963).
- 2) G.S. Marks, R.D. Marshall u. A. Neuberger, Biochem. J. 87, 274 (1963)
- 3) E.D. Kaverzneva, V. Bogdanov u. A. Andrejeva, Biochem. Biophys. Acta, 65, 168 (1962)
- 4) V.P. Bogdanov, E.D. Kaverzneva u. A.P. Andrejeva, ibid. 83, 69 (1964)
- 5) I. Yamashina, K. Ban-I. u. M. Makino, ibid. 78, 382 (1963)  
u.a.



den Bedingungen der Hydrolyse des erhaltenen Glykopeptides mit Säure, so tritt neben einer hydrolytischen Aufspaltung die Umlagerung in zwei Stoffe ein, deren einer in allen Eigenschaften identisch mit I ist<sup>6)</sup>. Ammoniak und Essigsäure werden abgespalten. Wir haben festgestellt, daß II ( $[\alpha]_D = +21,4^\circ$ ;  $c = 1,0$  in W.) in Dimethyl-oxyäthylamin Mutarotation zeigt und in ein Isomeres (IIa) übergeht ( $[\alpha]_D = +24,4^\circ$ ;  $c = 0,805$  in W.). Auch bei der Hydrolyse von II ist die Bildung von IIa nachweisbar. Vielleicht handelt es sich um  $\alpha/\beta$ -Isomerie. Die IR-Spektren sind nicht identisch. Auch IIa geht bei der Hydrolyse mit Säure in I über. Wahrscheinlich dürften sich in beiden Fällen als Zwischenprodukte cyclische Derivate (III und IIIa) bilden, die als ortho-Säurederivate mit freier OH-Gruppe über IV zu I hydrolysiert werden. Die Bildung eines Zwischenproduktes vom Typ III und IIIa ist sowohl aus II wie aus IIa spannungsfrei möglich. Im Aminosäure-Analysator (Stein-Moore) lassen sich die Verbindungen II und I gut von-

6) Mitteilung von F. Micheel auf dem Internationalen Symposium über die Chemie der Kohlenhydrate, Münster/Westf., 13.-17. Juli 1964.

einander trennen, während die Verbindungen II und IIa als getrennte Gipfel nicht mit Citrat-Puffer  $p_H$  3,28, sondern nur mit Pyridin-acetat-formiat-Puffer  $p_H$  3,05 auftreten, wie es in Abb. 1 aufgezeichnet ist.

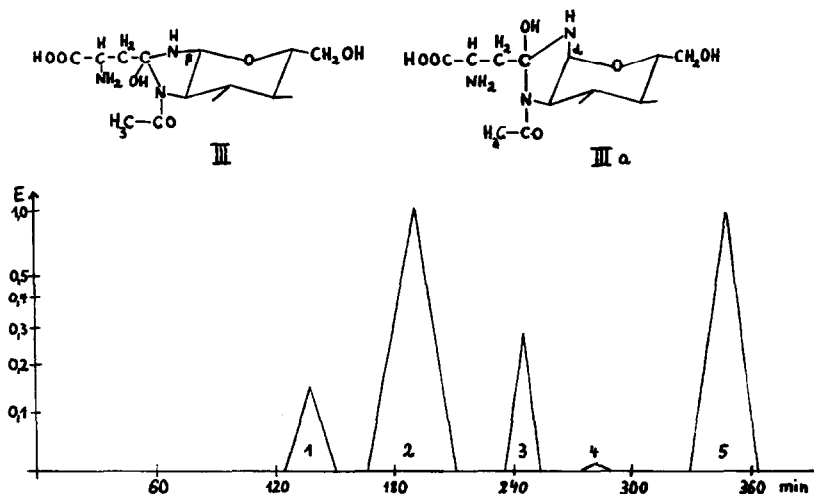


Abb. 1: Trennung in Pyridin-acetat-formiat-Puffer  $p_H$  3,05

- 1: identisch mit dem Mutarotationsprodukt in 10-proz. Dimethyl-oxyäthylamin (IIa)
- 2: 2-Desoxy-2-aminoacetyl-D-glucosyl-1- $\beta$ -N-[L-asparagyl- $\beta$ ]-amin (II)
- 3: N-[L-Asparagyl- $\beta$ ]-D-glucosamin (I)
- 4: nicht isoliert
- 5: Asparaginsäure

#### V e r s u c h e :

2-Desoxy-2-aminoacetyl-3.4.6-O-triacetyl-D-glucosyl-1- $\beta$ -N-[ $\alpha$ -benzyl-N-carbobenzoxy-L-asparagyl- $\beta$ ]-amin<sup>2)</sup> wurde mit Lithiumhydroxyd in Aceton/Wasser hydrolysiert. Die Lösung wurde mit Amberlite IR-120 ( $H^+$ -Form) neutralisiert und im Vakuum bei Raumtemperatur eingedampft. Hierbei wurde ein kristallines Produkt erhalten, welches dann im Vakuumexsikkator getrocknet und anschließend mit Essigester und Äther extrahiert wurde, um den Benzylalkohol zu beseitigen. Durch Umkristallisieren aus Wasser wurde farbloses, chromatographisch reines 2-Desoxy-2-aminoacetyl-D-glucosyl-[N-carbobenzoxy-L-asparagyl- $\beta$ ]-amin er-

halten. Smp.: 232°C (Zers.), Ausbeute: 43 %. ( $[\alpha]_D = +11,9^\circ$ ;  $c = 1,0$  in W.). Gef.: C 51,24; H 5,89; N 8,84, 8,90. Ber.  $C_{20}H_{27}N_3O_{10}$ : C 51,20; H 5,80; N 8,95. Ein Hydrolysat dieser Verbindung ergab laut Aminosäure-Analysator-Diagramm ein molares Verhältnis von Asparaginsäure : Glucosamin : Ammoniak = 1:1:1. 2-Desoxy-2-aminoacetyl-D-glucosyl-[N-carbobenzoxy-L-asparagyl- $\beta$ ]-amin wurde in Wasser 2 Stunden lang mit 8 % Palladium-Aktivkohle hydriert. Durch Einengen der Lösung und Ausfällen mit Äthanol wurde II isoliert. Das Rohprodukt wurde aus Äthanol/Wasser umkristallisiert. Smp.: ca. 220°C (Zers.)<sup>7)</sup> ( $[\alpha]_D = +24,4^\circ$ ;  $c = 1,0$  in W.). Ausbeute: 71 %. Gef.: C 40,96; H 6,67; N 11,64. Ber.  $C_{12}H_{21}N_3O_8 \cdot H_2O$ : C 40,8; H 6,53; N 11,9. Molgew. in Wasser: gef. 343, ber. 335. Das Produkt zeigte im Aminosäure-Analysator-Diagramm einen Gipfel, der eine schwache Schulter aufwies. Nach Hydrolyse wurde mit dem Analysator ein molares Verhältnis von Asparaginsäure : Glucosamin : Ammoniak = 1:1:1 gefunden.

N-[L-Asparagyl- $\beta$ ]-D-glucosamin (I): N-[L-Asparagyl- $\beta$ ]-1.3.4.6-tetracetyl- $\beta$ -D-glucosamin<sup>(a)</sup> wurde zur Abspaltung der Acetylgruppen 48 Stunden mit 2n  $H_2SO_4$  behandelt, wobei der Hydrolysegrad an Hand des Drehwertes verfolgt wurde. Die Lösung wurde mit Amberlite IR-4 B (Acetat-Form) neutralisiert und zu einem Sirup eingedampft, der aus Äthanol/Wasser umgefällt wurde. Ausbeute: 83 %. Smp.: 300°C (Zers., Dunkelfärbung ab 250°C).  $[\alpha]_D = +33,2^\circ \rightarrow +28,2^\circ$ , 160 Min. ( $c = 0,184$  in W.). Gef.: C 40,76, 40,84; H 6,42, 6,38; N 9,80, 9,73. Ber.  $C_{10}H_{18}N_2O_8$ : C 40,81; H 6,17; N 9,52. Die Analyse mit Hilfe des Aminosäure-Analysators ergab ein molares Verhältnis von Asparaginsäure : Glucosamin = 1,00 : 0,99 neben einer Spur von  $NH_3$ . Mutarotation in Dimethyl-oxyäthylamin: II wurde in 10-proz. Dimethyl-oxyäthylamin gelöst und die Änderung der spez. Drehung der Lösung wurde bei 24°C bis zu einem konstanten Enddrehwert verfolgt. Nach Eindampfen und Umkristallisieren aus Äthanol/Wasser wurde ein reines kristallines Produkt erhalten. Ausbeute: 84 %. Smp.: 260°C (Zers.);  $[\alpha]_D = +24,4^\circ$  ( $c = 0,805$  in W.).

7) Bei ca. 200°C trat eine Dunkelfärbung auf, dann bei 220°C und weiter bei 252°C Zersetzung.

Gef.: C 41,23; H 6,22; N 11,98. Ber.  $C_{12}H_{21}N_3O_8 \cdot H_2O$ : C 40,8; H 6,53; N 11,9.

Umlagerung von II in I: Zunächst wurde II unter den Bedingungen der Eiweißhydrolyse mit Dimethyl-oxyäthylamin behandelt. Hierbei trat an der Stelle von I im Diagramm des Aminosäure-Analysators ein sehr kleiner Peak auf. Durch anschließende Säureeinwirkung des mit Dimethyl-oxyäthylamin behandelten Produktes wurde eine Verstärkung des betreffenden Peaks erreicht. Hierauf wurde II nur mit HCl auf 100°C erhitzt, wobei auch ein Peak an der Stelle von I im Analysator-Diagramm erhalten wurde. Die Höhe dieses Gipfels ist, wie an Hand einer Hydrolysenreihe festgestellt wurde, bei Anwendung von HCl optimal unter folgenden Bedingungen:

30 - 45 minütige Einwirkung von 1n HCl bei 100°C, wobei die Lösung 1-proz. an II gewählt wurde. Zur Isolierung von I wurden dann 200 mg II unter den angegebenen Bedingungen umgelagert. Durch säulenchromatographische Auftrennung des erhaltenen Hydrolysenmischs an einer präparativen Säule des Aminosäure-Analysators (1,9 cm Ø, 150 cm Länge; Beckman-Ionenaustauscherharz 150-A; Säulentemperatur: 49,5°C) in Pyridin-acetat-formiat-Puffer  $p_H$  3,05 konnte neben reinem II, IIa und Asparaginsäure das Produkt I rein und kristallin isoliert werden. Die Identifizierung erfolgte durch vergleichende Chromatogramme, IR-Spektren und Schmelz- bzw. Zersetzungspunkte.

Wir danken dem Landesamt für Forschung Nordrhein-Westfalen und dem Fonds der Chemie für die Unterstützung unserer Arbeiten.