

ÜBER DIE VERWENDUNG VON CLELAND'S REAGENZ FÜR DIE REDUKTION VON METHIONINSULFOXID UND FÜR DIE ABSPALTUNG VON Nps- UND N^{im}-Dnp-SCHUTZGRUPPEN*

K. P. POLZHOFFER und K. H. NEY

Unilever Forschungslaboratorium Hamburg

(Received in Germany 7 December 1970; Received in the UK for publication 11 January 1971)

Abstract—Methionine sulphoxide can be quantitatively reduced with Cleland's reagent (threo-2,3-dihydroxy-1,4-dithiolbutan, DTT) to methionine (Met). Peptides containing Met can be protected with DTT against oxidation during column chromatography. Excess or oxidised DTT does not interfere with the ninhydrin reaction.

The quantitative cleavage of o-nitrophenylsulfenyl and 2,4-dinitrophenyl protective groups are attained by using DTT.

Zusammenfassung—Mit Cleland's Reagenz (threo-2,3-Dihydroxy-1,4-dithiolbutan, DTT) lässt sich Methioninsulfoxid quantitativ zu Met reduzieren. Met-haltige Peptide können mit DTT z.B. bei der Säulenchromatographie vor Oxydation geschützt werden. Überschüssiges oder oxydiertes DTT stört die Ninhydrin-Reaktion nicht.

Mit Hilfe von DTT gelingt die quantitative Abspaltung von o-Nitrophenylsulfenyl- und N^{im}-Dinitrophenyl-Schutzgruppen.

WÄHREND der Isolierung von Met-haltigen Peptiden und während der Met-Bestimmung nach Moore und Stein wird Met meist teilweise zu Met(O) oxydiert. Zur Vermeidung dieser Nebenreaktion wurden den Lösungsmitteln oder Puffergemischen Natriumpyrosulfit (Na₂S₂O₅),^{1,2} Natriumdithionit (Na₂S₂O₄) oder Schwefelwasserstoff,² ferner Cystein, Glutathion, 2-Thioäthanol, 2,3-Dithiopropanol, Thio-glykolsäure oder Thiodiglykol zugestzt. Leichter gelang die reduktive Abspaltung des Sulfoxid-Sauerstoffs mit wässriger Thioglykolsäure,³⁻⁵ doch können dabei freie Aminogruppen acetyliert werden.⁶ Alle diese Antioxidantien sind gegenüber Luft-sauerstoff empfindlich, lösen sich z.T. schlecht in wässrigen Medien und besitzen bisweilen einen intensiven, unangenehmen Geruch.

Vor kurzem wurde von W. W. Cleland ein Reagenz (threo-2,3-Dihydroxy-1,4-dithiolbutan, DTT†) beschrieben,⁷ das heute allgemein als Cleland's Reagenz für die Reduktion von Disulfid-Brücken in Proteinen und zum Schutz freier Thiolgruppen⁸ verwendet wird. DTT wie auch der isomere Dithioerithrit besitzen das gleiche

* Abkürzungen im Text:

Met(O) = Methioninsulfoxid

Nps = o-Nitrophenylsulfenyl-

N^{im}-Dnp = 2,4-Dinitrophenyl- (als Substituent im Imidazolring des His)

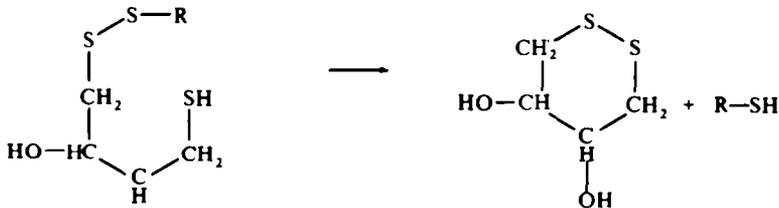
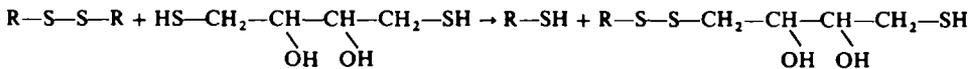
DTT = Dithiothreit (threo-2,3-Dihydroxy-1,4-dithiolbutan: Cleland's Reagenz)

Boc = tert.-Butyloxycarbonyl-

DCHA = Dicyclohexylamin

† Cleland's Reagenz, Fa. Calbiochem. Los Angeles, Calif.

Reduktionsvermögen und werden im Verlauf der Reduktion zum 4,5-Dihydroxy-o-dithian oxydiert:



4,5-Dihydroxy-o-dithian

Die Reduktion verläuft bei pH 8 und 20°C in einigen Minuten quantitativ. DTT ist kristallin, sehr gut wasserlöslich, besitzt nur schwachen Geruch und ist gegenüber Luftsauerstoff weitgehend unempfindlich.

DTT könnte also als Reduktionsmittel für Met(O) geeignet sein.

DTT soll auch hinsichtlich seiner Fähigkeit zur Entfernung der Nps-Schutzgruppe^{6, 9-21} geprüft werden, die allgemein mit HCl/Äther bzw. mit HCl/Eisessig oder mit Thiolen¹⁰ abgespalten wird. Bei der Abspaltung mit HCl entsteht o-Nitrophenylsulfenyl-chlorid, das anwesendes Tryptophan zu 2-Nps-tryptophan¹⁹ und Cystein zu S-Nps-cystein²² umsetzen kann.

Für die Blockierung des Imidazolstickstoffes im Histidin wird neuerdings die 2,4-Dinitrophenyl-Gruppe verwendet.²³⁻²⁶ Abgespalten wird die Schutzgruppe nach vollzogener Synthese mittels 2-Mercaptoäthanol.²⁷ Die Abspaltung der N^{im}-Dnp-Schutzgruppe sollte auch mit DTT versucht werden.

METHODEN UND ERGEBNISSE

Reduktion von Met(O) zu Met

Die Reduktion von Met(O) zu Met wurde mit Cleland's Reagenz (DTT) in wässriger Lösung von schwach alkalischem pH versucht. Wir wählten eine Reaktionstemperatur von 50°C, setzten 5-10 Äquivalente DTT bez. auf Met(O) ein und verfolgten die Met-Bildung mit Hilfe eines Aminosäure-Analysators. Die Proben für die Aminosäure-Analyse konnten direkt auf die Ionenaustauschersäule des Analysators aufgegeben werden, da überschüssiges DTT oder entstehendes 4,5-Dihydro-o-dithian weder die Trennung des Met(O) vom Met noch die Ninhydrin-Reaktion beeinflussten.

Mit 5 Äquivalenten DTT bei pH 7.1 wurden bis zu 94% Met(O) reduziert (Tab. 1). Bei pH 8.9 verlief die Reduktion mit 5 Äquivalenten DTT nach 48 h quantitativ. Eine Erhöhung der DTT-Konzentration brachte keine wesentliche Verbesserung im Umsatz.

Die aus den Reaktionsgemischen isolierten, wasserlöslichen Substanzen zeigten nach 100%igem Umsatz im IR-Spektrum nicht mehr die charakteristischen S→O-Banden bei 9.74 und 9.87 μ .

TABELLE 1. REDUKTION VON MET(O) ZU MET MIT DTT

Reaktionsbedingungen pH/Äquiv. DTT	Reaktionszeit Std. bei 50°C	Verhältnis Met/Met(O)%
7-1/5	1	9-9/90-1
7-1/5	5	39-8/60-2
7-1/5	8	55-9/44-1
7-1/5	24	86-0/14-0
7-1/5	68	94-2/ 5-8
8-9/5	1	12-0/88-0
8-9/5	5	33-9/66-1
8-9/5	8	45-2/54-8
8-9/5	15	65-0/35-0
8-9/5	24	85-9/14-1
8-9/5	48	100 / 0
8-9/10	1	15-2/84-8
8-9/10	5	41-5/58-5
8-9/10	8	62-5/37-5
8-9/10	15	78-1/21-9
8-9/10	24	92-3/7-7
8-9/10	48	100 / 0

Das UV-Spektrum des ebenfalls isolierten 4,5-Dihydroxy-o-dithians zeigte ein Absorptionsmaximum bei 288 m μ (nach Lit. 28: 283 m μ).

Die Eliminierung des Sulfoxid-Sauerstoffes durch DTT könnte auch für die Peptidsynthese von Bedeutung sein, zumal die Thioäther-Funktion des Methionins während der Synthese meist als Sulfoxid geschützt wird.²⁸⁻³³

Reduktive Abspaltung der o-Nitrophenylsulfenyl-Schutzgruppe

Bei der Umsetzung von Nps-Alanin mit 2 Äquiv. DTT in wässriger Sodalösung vom pH 8-9 wurde lt. DC die Nps-Gruppe nach 2 Std. quantitativ abgespalten.

Reduktive Abspaltung der 2,4-Dinitrophenyl-Schutzgruppe

Cleland's Reagenz besitzt die gleiche Wirkung wie 2-Mercaptoäthanol²⁷ und spaltet lt. DC die N^{lm}-Dnp-Schutzgruppe des N^ε-Boc-N^{lm}-Dnp-His²⁹ nach 2 Std. bei pH 8-9 quantitativ ab.

TABELLE 2. RF-WERTE (IN BPEW)

Nps-Ala-OH · DCHA	0-86
Reaktionsgemisch	0-35
H-Ala-OH	0-35
N ^ε -Boc-N ^{lm} -Dnp-His-OH	0-63
Reaktionsgemisch	0-48
N ^ε -Boc-His-OH	0-48

E X P E R I M E N T E L L E S

Für die Dünnschichtchromatographie auf Kieselgel G (Merck) wurde folgendes Fließmittel verwendet: BPEW = n-Butanol:Pyridin:Eisessig:Wasser = 30:20:6:24 (v/v). Die Substanzen wurden mit Ninhydrin angefärbt. L-Methionin-DL-sulfoxid (Met(O)) der Fa. Fluka, Buchs, wurde dreimal aus Wasser/Aceton umkristallisiert. Nps-Ala-OH·DCHA und N^m-Boc-N^m-Dnp-His wurden nach Lit. 14 bzw. Lit. 23 synthetisiert.

Reduktion von Met(O). Eine Lösung von 16.5 mg (100 µMol) Met (O) in 1 ml wässr. gesättigter Na₂CO₃-Lösung wurde mit 77.1 mg (500 µMol) bzw. 154.3 mg (1000 µMol) Cleland's Reagenz, gelöst in 1 ml Wasser, versetzt, mit N₂ begast und auf 50°C erwärmt. Die Lösungen hatten einen pH von 8.9. Der pH von 7.1 (Tab. 1) wurde mit verd. HCl eingestellt. Nach 1, 5, 8, 15, 24, 48 und 68 Std. wurden dem Gemisch Proben entnommen, mit Citratpuffer vom pH 2.2 verdünnt (~0.4 µMol/ml) und für die Aminosäure-Analyse verwendet. Überschüssiges DTT oder 4,5-Dihydroxy-o-dithian brauchten nicht entfernt zu werden.

Aminosäure-Analysen. Die Aminosäure-Analysen der Proben aus 3.1 wurden mit Hilfe des Aminosäure-Analysators BC 200* nach dem Einsäulenprogramm (0.9 cm × 60 cm-Säule, Aminex A6, 55°C, Citratpuffer pH 3.25; 4.25; 6.25) durchgeführt. Die Retentionszeiten für Met(O) und Met betragen 40 bzw. 101 min

Isolierung von Met und 4,5-Dihydroxy-o-dithian. Die Ansätze mit 5 und 10 Äquiv. DTT und einer Reaktionszeit von 48 Std. (100%iger Umsatz) wurden vereinigt und dreimal mit je 2 ml Äthylacetat extrahiert. Die Extrakte wurden vereinigt, über Na₂SO₄ getrocknet und i. Vak. eingedampft. Es resultierte ein farbloses Öl, das in EtOH gelöst und für die UV-Aufnahme am Perkin-Elmer-Spektrophotometer 137 UV verwendet wurde. Die Substanz erwies sich als 4,5-Dihydroxy-o-dithian.

Die wässr. Lösung wurde mit verd. HCl neutralisiert, i. Vak. eingengt und mit Äthanol versetzt. Die ausgefällte Substanz wurde zweimal aus EtOH/Wasser umkristallisiert und i. Vak. über P₄O₁₀ bei 50°C getrocknet. Die Substanz wurde als KBr-Pressling für die IR-Aufnahme am Perkin-Elmer Infracord 137 verwendet. Sie war identisch mit Met.

Abspaltung von Nps- und N^m-Dnp-Schutzgruppen. 42.3 mg (100 µMol) Nps-Ala-OH·DCHA bzw. 42.1 mg (100 µMol) N^m-Boc-N^m-Dnp-His-OH wurden in je 1 ml wässr., gesättigter Na₂CO₃-Lösung aufgenommen (pH 8) und mit 30.9 mg (200 µMol) DTT versetzt. Man liess 2 Std. bei 20°C reagieren und stoppte die Reaktion mit einigen Tropfen Essigsäure.

Aus den Reaktionsgemischen wurden die Proben für die DC entnommen. Die R_f-Werte sind in Tab. 2 angegeben. DTT oder 4,5-Dihydroxy-o-dithian wurde auf den DC-Platten mit Ninhydrin nicht angefärbt. Fräulein A. Weiss danken wir für fleissige und gewissenhafte Mitarbeit.

L I T E R A T U R

- ¹ F. Micheel und H. Schmitz, *Ber. Dtsch. Chem. Ges.* **72**, 992 (1939)
- ² A. Stoll und E. Seebeck *Helv. Chim. Acta* **31**, 189 (1948)
- ³ M. L. Dedman, T. H. Farmer und C. J. Morris, *Biochem. J.* **66**, 166 (1957)
- ⁴ J. I. Harris und P. Roos, *Biochem. J.* **71**, 434 (1959)
- ⁵ B. Iselin, *Helv. Chim. Acta* **44**, 61 (1961)
- ⁶ W. Kessler und B. Iselin, *Ibid.* **49**, 1330 (1966)
- ⁷ W. W. Cleland, *Biochemistry* **3**, 480 (1964)
- ⁸ R. Powell in *Cleland's Reagent, a Current Bibliography from Calbiochem*, Los Angeles, Calif. 1969
- ⁹ V. A. Najjar und R. B. Merrifield, *Biochemistry* **5**, 3765 (1966)
- ¹⁰ A. Fontana, F. Marchiori, L. Moroder und E. Scoffone, *Tetrahedron Letters* 2985 (1966)
- ¹¹ E. Wünsch, A. Fontana und F. Drees, *Z. Naturforsch.* **22b**, 607 (1967)
- ¹² D. Brandenburg, *Tetrahedron Letters* 6201 (1966)
- ¹³ E. Wünsch und A. Fontana, *Ber. Dtsch. Chem. Ges.* **101**, 323 (1968)
- ¹⁴ L. Zervas, D. Borovas und E. Gazis, *J. Am. Chem. Soc.* **85**, 3660 (1963)
- ¹⁵ L. Zervas und Ch. Hamalidis *Ibid.* **87**, 99 (1965)
- ¹⁶ E. Wünsch und F. Drees *Ber. Dtsch. Chem. Ges.* **100**, 816 (1967)
- ¹⁷ E. Wünsch, A. Zwick und A. Fontana, *Ibid.* **101**, 326 (1968)
- ¹⁸ E. Wünsch, *Z. Naturforsch.* **22b**, 1269 (1967)
- ¹⁹ H. Faulstich, *Chimia (Aarau)* **23**, 150 (1969)

* Aminosäure-Analysator BC 200, Fa. Bio Cal, München.

- ²⁰ K. Poduska und H. Maassen van den Brink-Zimmermannova, *Coll. Czech. Chem. Commun.* **33**, 3769 (1968)
- ²¹ K. Poduska, *Coll. Czech. Ibid.* **33**, 3779 (1968)
- ²² E. Boccu, F. M. Veronese, A. Fontana und C. A. Benassi, *Eur. J. Biochem.* **13**, 188 (1970)
- ²³ F. Chillemi und R. B. Merrifield, *Biochemistry* **8**, 4344 (1969)
- ²⁴ F. Chillemi, 10. Europ. Peptid-Symposium, Abano Terme, Italien 1969
- ²⁵ E. Margoliash, *Nature* **175**, 293 (1955)
- ²⁶ M. E. Lombardo, R. Piasio und J. M. Stewart in *Solid Phase Peptide Synthesis*, S. 11, Verlag W. H. Freeman, San Francisco, Calif. 1969
- ²⁷ S. Shaltiel, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **29**, 178 (1967)
- ²⁸ K. Hofmann, W. Haas, M. J. Smithers und G. Zanetti, *J. Am. Chem. Soc.* **87**, 631 (1965)
- ²⁹ K. Hofmann, R. Schmiechen, M. J. Smithers, R. D. Wells, Y. Wolman und G. Zanetti *Ibid.* **87**, 640 (1965)
- ³⁰ F. M. Finn und K. Hofmann, *Ibid.* **87**, 645 (1965)
- ³¹ K. Hofmann, F. M. Finn, M. Limetti, J. Montibeller und G. Zanetti, *Ibid.* **88**, 3633 (1966)
- ³² K. Hofmann, J. P. Visser und F. M. Finn, *Ibid.* **91**, 4883 (1969)
- ³³ B. Gutte und R. B. Merrifield, *Ibid.* **91**, 501 (1969)