

Chem. C. 1931 II, 1941; K. Kindler és W. Peschke, Arch. Pharm. 272, 236 (1934); G. Hahn és O. Schales, Ber. deutsch. Chem. Ges. 67, 1486 (1934).

38. Igen jó összefoglalást találunk az isochinolin synthesisekre vonatkozólag Fodor Gábor összefoglaló dolgozatában: Wiener Chem. Ztg. 45, 241 (1942).

39. H. Wieland, Liebigs Ann. Chem. 328, 154 (1903); O. Wallach, Liebigs Ann. Chem. 332, 335 (1904).

40. Vinkler Elemér, „Tanulmányok egy új isochinolinbasis-synthesis köréből“. Doktori értekezés, Szeged, 1935.

41. Goro Shima, Chem. C. 1928 I, 2391; 1928 II, 2331; 1929 I, 2978.

42. C. Pomeranz, Chem. C. 1901 II, 477; 1901 II, 567.

43. D. R. P. 459309, Chem. C. 1928 II, 1619; E. P. 285156 és 284199, Chem. C. 1929 I, 3036, 3037; F. P. 666593 és E. P. 316444, 317347, 317381, Chem. C. 1930 I, 586.

44. E. Pacsu, Ber. deutsch. Chem. Ges. 59, 2818 (1929).

Institut für organische und pharmazeutische Chemie der K. Ung. Horthy Miklós Universität in Szeged. Direktor: Prof. V. Bruckner.

---

## Über das natürliche d-Glutaminsäure-polypeptid.

Von Viktor Bruckner und Margarete Kovács Oskolás.

(Eingegangen am 16. März 1943.)

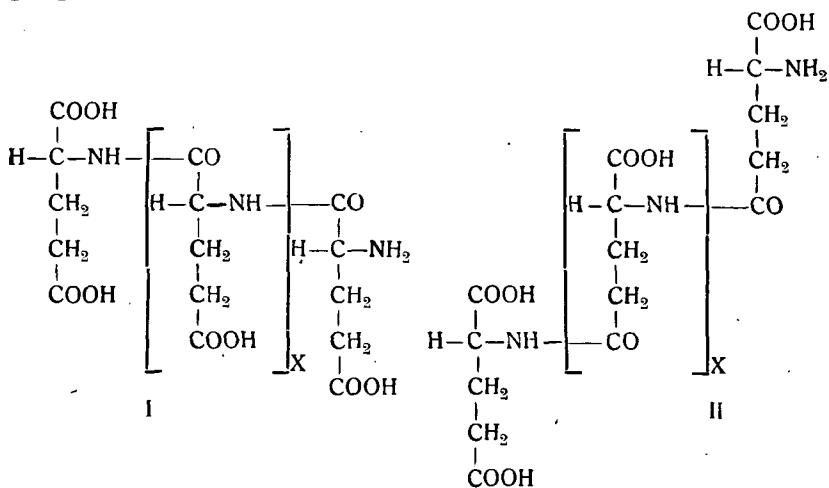
Vor einigen Jahren berichtete der eine von uns in Gemeinschaft mit G. Ivánovics<sup>1</sup> über die Isolierung der immun-spezifischen Kapselsubstanz des Milzbrandbacillus und der mit dieser identischen spezifischen Substanz der Mesentericus-bacillen. Diese Substanz liess sich über ihre, in Wasser schwer lösliche Metallsalze (z. B. Kupfer-II-, Quecksilber-II-salz), weiterhin durch Dialyse weitgehend reinigen und war in dieser Form als chemisch einheitlicher Stoff zu betrachten, der eine stickstoffhaltige, hochmolekulare, mehrwertige Säure darstellt und durch folgende Analysenzahlen gekennzeichnet ist: Gesamtstickstoff 10.4%, Aminostickstoff 0.2%, Säureäquivalent 147.7, Aschegehalt 2.3%,  $[\alpha]_D^{20} = + 21.1^\circ$ .

Da die Substanz keine Eiweissreaktion (z. B. Biuret) gab, war das Ergebnis ihres hydrolytischen Abbaues um so über-

raschender. Durch Hydrolyse mittels starker Salzsäure konnte man nämlich aus 1.8 g Substanz 2.2 g optisch vollkommen reines d(—)-Glutaminsäure-hydrochlorid gewinnen. Dieses Ergebnis, wie auch die Inbetrachtung anderer chemischen und einiger physikalischen Eigenschaften der Substanz, führte zur Annahme, dass in ihr ein d(—)-Glutaminsäure-polypeptid vorliegt.

Dieser Befund war so aus immunologischem, wie auch aus chemischem Standpunkt bemerkenswert; denn erstens: konnte die weitgehende Parallelität zwischen Virulenz und Kapselbildungsfähigkeit der Anthrax-Stämme dadurch sehr gut gedeutet werden, dass die Grundsubstanz der Kapsel als d-Polypeptid die Bacillenkörper gegen den Eingriff der l-polypeptid-spezifischen Proteasen höherer Organismen weitgehend schützt, und zweitens: wurde zum ersten Mal gezeigt, dass d(—)-Glutaminsäure auch natürlich vorkommt, weiterhin, dass aus einer einzigen Aminosäure aufgebaute Polypeptide, die bisher nur als Kunstprodukte bekannt waren, auch als Naturprodukte vorzufinden sind.

Auf Grunde der oben angeführten Befunde liessen sich auf die Konstitution der Substanz ziemlich weitgehende Schlüsse ziehen, die eigentlich schon durch die Feststellung, dass die Substanz ein hochmolekulares Polypeptid der d(—)-Glutaminsäure darstellt, zwangsweise gegeben waren. Ernst in Erwägung kamen nur die Formeln I und II:

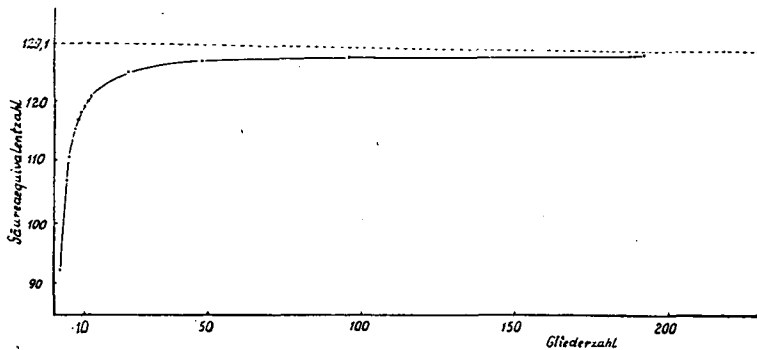


Es wurde früher — nicht ganz willkürlich, aber eigentlich ohne Beweis — Formel I als die wahrscheinlichere angenommen. Wir möchten nun für diese Formel vier Argumente hervorheben: 1. Die  $\alpha$ -ständige Carboxylgruppe der Glutaminsäure ist der Regel nach etwas reaktionsfähiger als die  $\gamma$ -ständige; dafür spricht z. B. die Bildung des einheitlichen Monoesters<sup>2</sup>, ferner die zum Isoglutamin führende Aufspaltung des Glutaminsäureanhydrids durch Ammoniak<sup>3</sup>, usw. Es ist somit wahrscheinlich, dass die Kupplung der Aminosäurereste auch in vivo durch die reaktionsfähigere  $\alpha$ -ständige Carboxylgruppe erfolgt ist. 2. Von den zwei isomeren Glutaminyl-glutaminsäuren (III und IV) zeigt nach Beobachtungen von M. A. Blanchetière<sup>4</sup> nur Verbindung IV eine positive Biuretreaktion. Da die Biuretprobe bei unserem Polypeptid negativ ausfiel, so muss in ihm das Peptidbindungsprinzip vom Typ III. angenommen werden. 3. Das von der Aminogruppe weiter entfernte, zweite Carboxyl einer Amino-dicarbonsäure ist in den Proteinen nicht peptidartig verknüpft, sondern liegt als Säureamidgruppe vor<sup>5</sup>; Glutaminsäurereste sind also in den Proteinen so eingebaut, wie dies bei Formel I mit den Zwischengliedern (in der Formel eingeklammert) der Fall ist. 4. Der negative Charakter der Strömungsdoppelbrechung des Polypeptids (s. unten) lässt sich auch eher mit Formel I erklären.

Die Frage des Molekulargewichtes liess sich aus dem Wert des Aminostickstoffes nicht ohne Vorbehalt lösen. Man kam zum Ergebnis, dass das Polypeptid aus 40—50 Glutaminsäureresten aufgebaut ist, also sein Molekulargewicht ungefähr 5500—6700 beträgt. Da nun der Wert des Aminostickstoffes sehr niedrig (0.2%) ist, so darf das Ergebnis der Molekulargewichtsberechnung nur mit Vorbehalt angenommen werden, da die Fehlergrenze der angewandten *Van Slyke*-schen Aminostickstoff-Bestimmung zu schwer in die Waage fällt.

Es drängt sich nun die Frage auf, wie die vermutete Formel (I) und das aus dem Aminostickstoff berechnete Molekulargewicht mit der Säureäquivalentzahl des Polypeptids zu vereinbaren ist? Alkalimetrische Bestimmungen ergaben die Äquivalentzahl 147.7. Diese ist um rund 12% höher als die berechnete, die im Falle von  $X=40$  den Wert 126.4 bei  $X=50$  aber den Wert 126.9 zeigt. Selbstredend hängt die

Aequivalentzahl beim Polypeptid von der Molekulargrösse ab, mit der sie allmählich ansteigt, man kann sich aber durch eine einfache Rechnung überzeugen, dass bei der Grössenordnung des in Betracht kommenden Molekulargewichtes die Aenderung der Aequivalentzahl mit dem Molekulargewicht praktisch kaum mehr in Frage kommt. In Abbild. 1. haben wir die Aenderung der Aequivalentzahl mit der ansteigenden Gliederzahl des Polypeptids graphisch dargestellt; man sieht, dass die Aequivalentzahl nur bei unendlich grosser Gliederzahl den Maximalwert von 129.1 (d. h. die Aequivalentzahl des Zwischenradikals) erreichen könnte. Selbst dieser, bei einer genügend hohen Gliederzahl praktisch erreichbare Maximalwert zeigt aber eine erhebliche Abweichung vom experimentell ermittelten Wert.

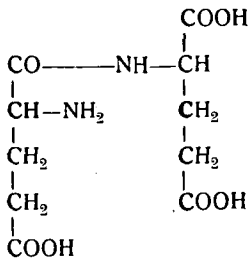


Abbild. 1.

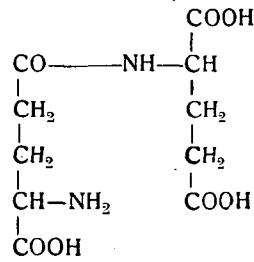
Änderung der Säureäquivalentzahl mit der Gliederzahl des Polypeptids.

Zur Erklärung dieser Abweichung könnte man einerseits den Aschegehalt, anderseits die Möglichkeit von stellenweise eingebauten Pyrrolidonringen (V) heranziehen. Die Möglichkeit derartiger Zwischenglieder ist nicht nur durch die Leichtigkeit der Bildung von Pyrrolidincarbonsäure (Pyroglutaminsäure) aus Glutaminsäure geboten<sup>6</sup>, sondern auch dadurch augenscheinlich, dass das aus Glutaminsäure erhältliche tricyclische Cyclopeptid, welchem *M. A. Blanchetière*<sup>4</sup> die Formel VI zuschreibt, ebenfalls sekundäre Säureamidgruppen enthält.

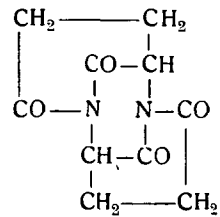
Immerhin könnte auch die Möglichkeit bestehen, dass ausser der Glutaminsäure auch andere Glieder (z. B. einbasische Aminosäuren) in die Polypeptidkette eingebaut wären;



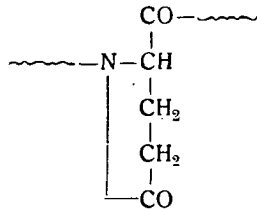
III



IV



VI



V

dieser Umstand würde sich auch in einer höheren Aequivalentzahl auswirken. Die Fassung derartiger Glieder aus dem Hydrolysat bietet aber erhebliche Schwierigkeiten, da sie nur in verschwindend kleiner Menge anwesend sein könnten. Dies erhellt schon aus dem Umstand, dass aus 1.8 g Polypeptid 2.2 g Glutaminsäure-hydrochlorid herausgewonnen werden konnte, während die berechnete Menge für ein aus 48 Glutaminsäureresten aufgebautes Polypeptid 2.55 g Hydrochlorid ist. Zieht man noch den bei der Isolierung des Hydrochlorids unvermeidlichen Verlust in Betracht, so ist hier eine derartige Übereinstimmung zu verzeichnen, die höchstens verschwindend kleine Mengen „fremder“ Aminosäuren zulässig macht. Trotzdem haben wir das Filtrat der Glutaminsäure-hydrochlorid-Krystallisation auf andere Aminosäuren untersucht, wir konnten aber auf diese Weise keine anderen Bausteine des Polypeptids nachweisen. Besonders grosses Gewicht wurde auf den Nachweis von d(+)-Prolin gelegt, und zwar aus 2 Gründen: erstens besteht zwischen Prolin und Glutaminsäure ein genetischer Zusammenhang, zweitens konnten *W. A. Jacobs* und *C. Craig*<sup>7</sup> eben d(+)-Prolin, welches in seiner rechtsdrehenden Modifikation bis damals für „unnatürlich“ galt, aus dem Hydrolysat des Ergotinins, also eines Naturproduktes, abtrennen.

Wir haben das Prolin in Form seines schwerlöslichen Rhodanilates, das erstmals von *M. Bergmann*<sup>8</sup> zu seiner Isolierung empfohlen wurde, aus dem Polypeptid-Hydrolysat abzuscheiden und somit nachzuweisen versucht. Zu diesem Zwecke wurde das salzsaure Hydrolysat von 2 g Polypeptid trocken gedampft und der krystalline Rückstand aus konz. Salzsäure umgelöst. Dadurch war die Hauptmenge der Glutaminsäure als Hydrochlorid abgetrennt. Das Filtrat wurde nun trocken gedampft, der geringe Rückstand in Wasser gelöst, dann eingedampft, nachher mit wenig Natriumacetat versetzt und abermals eingedampft. Der so erhaltene Rückstand sollte (ausser NaCl und Natriumacetat) Glutaminsäure und — wenn vorhanden — Prolin enthalten. Da letzteres in abs. Alkohol löslich ist, wurde der Rückstand mit abs. Alkohol ausgezogen und der Rückstand dieser Lösung — nach entsprechender Vorbereitung — mit Ammoniumrhodanilat geprüft. Auf diese Weise konnten wir keine Spur von Prolin nachweisen.

Um die noch offenen Strukturfragen der einwandfreien Beantwortungsmöglichkeit näher zu bringen, haben wir vor allem eine noch eingehendere Reinigung des Polypeptids angestrebt. Aus diesem Grunde wurde ein Praeparat, das in a. a. O<sup>1</sup> beschriebener Weise als reinstes Endprodukt gewonnen worden war, im *Pauly*-Apparat der andauernden Elektrodialyse unterworfen. Die Arbeitsweise war folgend: 1 g Polypeptid wurde in 70 cm<sup>3</sup> dest. Wasser gelöst, die Lösung mit 2 Tropfen verdünnter Schwefelsäure versetzt und mit einer Stromstärke von 10 mamp. 24 Tage, unter Anwendung von Cellophanmembranen, dialysiert. Durch die äusseren Kammern des Apparates liessen wir in fortwährendem Strom täglich 30—40 l dest. Wasser fliessen, wobei in den letzten Tagen Leitfähigkeitswasser zur Anwendung gelangte. Nach der Dialyse wurde die Lösung bei Unterdruck eingedampft, der gelatinartige Rückstand einige Tage im Vacuumexsiccator über Calciumchlorid aufbewahrt, dann zerpulvert und bei 30—40° in der Trockenpistole über Phosphorpentoxyd bei 2 mm bis zur Gewichtkonstanz getrocknet. Letztere Operation nahm einige Wochen in Anspruch.

Die mittels Elektrodialyse gereinigte Substanz lieferte folgende Analysenwerte: C 45.30—45.51%, H 5.88—5.84%,

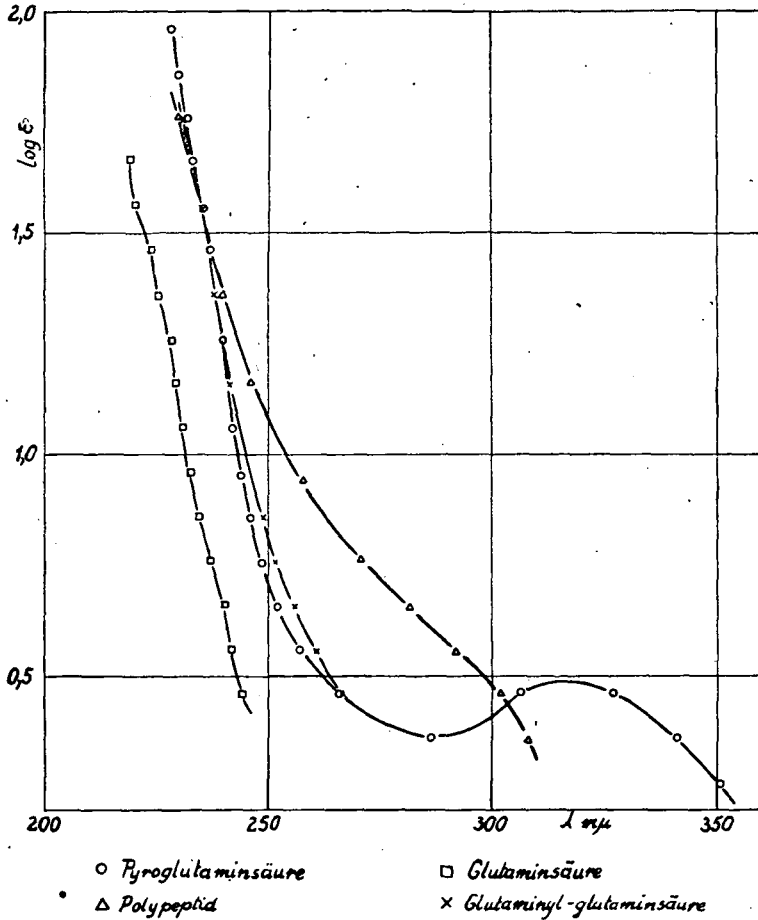


Gesamtsickstoff 10.24%, Aminostickstoff 0.50%, Asche 0.60%; Aequivalentzahl: a) alkalimetrisch bestimmt 139.9, b) elektrometrisch bestimmt 132.0.

Vergleicht man einige dieser Werte mit den früher gewonnenen (s. oben), so lässt sich vor allem feststellen, dass der Aschegehalt durch Elektrodialyse bis fast auf den viertel Teil herabgedrängt werden konnte. Man muss aber auch zugeben, dass die andauernde Elektrodialyse auf die Substanz nicht ganz ohne schädliche Wirkung war. Ihr serologischer Titer blieb zwar unverändert, jedoch stieg der Wert des Aminostickstoffes von 0.23% auf 0.50%, ein Zeichen dafür, dass schon eine — wenn auch ganz geringe — Hydrolyse stattgefunden hat. Dieser Wert des Aminostickstoffes kann somit zur Molekulargewichtsberechnung kaum mehr herangezogen werden. — Der Wert der Aequivalentzahl wird auch schon durch eine geringe Hydrolyse ziemlich stark beeinflusst, so dass man das Sinken dieses Wertes nicht nur dem Entfernen der Aschebestandteile, sondern zum Teil auch der partiellen Hydrolyse zuschreiben muss. Aber auch unbeachtet des letzteren bleibt weiterhin die Tatsache bestehen, dass die Aequivalentzahl für ein Glutaminsäurepolypeptid etwas zu hoch ist, was kaum mit dem geringeren Aschegehalt erklärlich wäre. Die Annahme von stellenweise eingebauten Pyroglutaminsäureresten scheint also auch weiterhin berechtigt zu sein.

Um eine weitere Stütze der Berechtigung dieser Annahme geben zu können, haben wir die Ultraviolett-Absorptionsspektren einiger Verbindungen und des Polypeptids mit einander verglichen. Nun standen wir aber auch hier vor einer Schwierigkeit, da in der Molekel des Polypeptids Pyrrolidonringe erwartungsgemäss im Verhältniss zu den offenkettigen Glutaminsäureresten nur sehr vereinzelt eingebaut sein können und somit zum spektralen Nachweis dieser Gruppe eine derart konzentrierte Lösung des Polypeptids nötig wäre, die man nicht herstellen konnte. Die in Abbild. 2. abgebildeten Kurven zeigen allerdings, dass das Spektrum des Polypeptids im untersuchten Wellenbereich nicht den geradlinigen Verlauf des Spektrums der Glutaminsäure und der Glutaminyl-glutaminsäure zeigt, es ist aber auch keine Übereinstimmung mit der Absorptionskurve der Pyroglutaminsäure zu verzeichnen, was übrigens auch nicht

zu erwarten war. Eine richtige Vergleichsverbindung wäre eigentlich die Pyroglutaminyl-glutaminsäure (oder noch eher ein synthetisches Pyroglutaminyl-glutaminsäure-oligopeptid) gewesen, trotz vielen Bemühungen gelang es uns aber nicht diese Substanz darzustellen.



Abbild. 2.

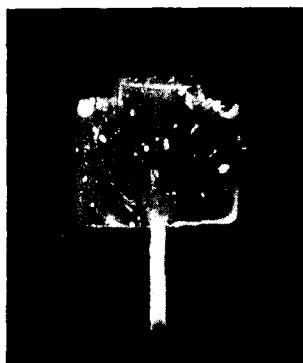
Lichtabsorption in wässriger Lösung.

(Konzentration: Pyroglutaminsäure und Glutaminylglutaminsäure 0.1-mol, Glutaminsäure 0.05-mol, Polypeptid 1.29-pröz., d. i. 0.1-mol auf die Glutaminsäureglieder berechnet.)

Zu einem merkwürdigen Ergebnis führte die Untersuchung der Strömungsdoppelbrechung einer 10-proz. wässrigen

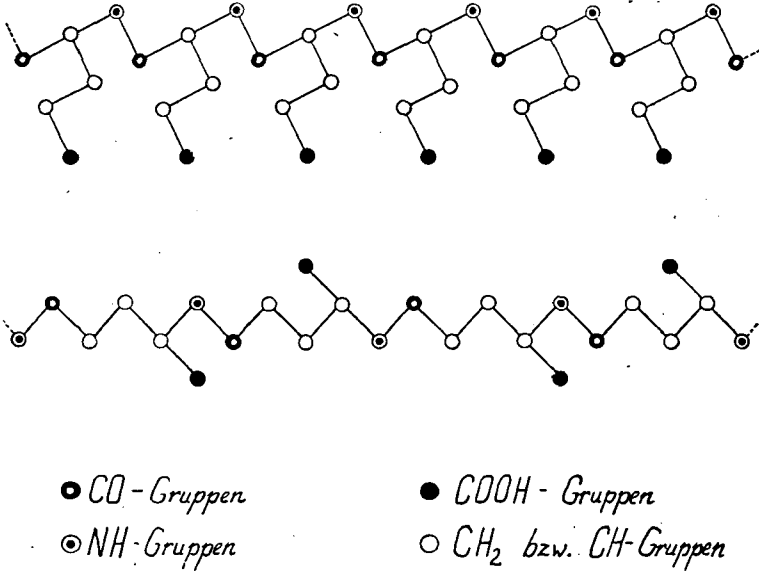


Lösung des Polypeptids. Diese Untersuchung verdanken wir Herrn Doz. *M. Gerendás*, der zu diesem Zwecke einen von ihm konstruierten Apparat<sup>9</sup> verwendete. Nach seinen Untersuchungen zeigte die wässrige Lösung des Polypeptids eine sehr deutliche Strömungsdoppelbrechung (Abbild. 3.) und wies hierbei einen *negativen Charakter* auf. Dadurch ist einerseits die langgestreckte Struktur erwiesen, — die übrigens auch mit der Eigenschaft des Polypeptids in Einklang steht, dass seine wässrige Lösung schon bei kleiner Konzentration hochviskos ist, — andererseits (wegen des negativen Charakters des Phenomens) die Annahme wiederholter, nicht zu kurzer Seitenketten zwingend geboten. Die schematisiert projizierten Raumbilder von Formel I (Abbild. 4, oben) und II (Abbild. 4, unten) lassen sofort erkennen, dass eine Strömungsdoppelbrechung vom negativen Charakter eher mit Formel I zu erklären wäre, da nur bei dieser von einer ausgeprägten Kammstruktur die Rede sein kann.



Abbild. 3.  
Strömungsdoppelbrechung des Polypeptids  
in 10-proz. wässriger Lösung.

*E. Pacsu*<sup>10</sup> hat vor einigen Jahren die thermische Autokondensation des Glycin-tripeptid- und hexapeptid-methylesters untersucht und gefunden, dass die schon von *Th. Curtius*<sup>11</sup> und *E. Fischer*<sup>12</sup> beobachtete Polypeptidbildung immer nur aus den gleichen Peptiden nach einem bimolekularen Reaktionstyp hervorgeht. Erhitzt man z. B. Diglycyl-glycin-methylester, so entsteht unter Austritt von Methanol vorerst das Hexapeptid-me-



Abbild. 4.

thylester, welches dann durch eine bimolekulare Kondensation in das Dodekapeptid-ester übergeht, während die Bildung eines Nonapeptid-esters nicht beobachtet werden kann, also eine Kondensation zwischen Hexapeptid-ester und Tripeptid-ester nicht stattfindet. Diese eigentümliche Gesetzmässigkeit konnte bis zum 96-Peptid verfolgt werden und somit liess sich die Gliederzahl der durch Autokondensation erhältlichen Polypeptide durch die Formel  $3 \times 2^n$  charakterisieren, wo  $n$  eine ganze Zahl bedeutet. Es drängt sich nun die Frage auf, ob sich bei unserem nativem Polypeptid die Gliederzahl auch mit dieser Formel wiedergeben lässt? Eine sichere Antwort auf diese Frage könnte nur dann erteilt werden, wenn das Molekulargewicht des Polypeptids schon einwandfrei bestimmt wäre. Trotzdem dies nicht der Fall ist, möchten wir doch schon eine Tabelle anführen, in der die berechnete Zusammensetzung des 48-Peptids (Gliederzahl =  $3 \times 2^4$ ) mit den gefundenen Analysenwerten verglichen wird; eine gut annähernde Übereinstimmung ist ganz augenscheinlich:

	C %	H %	Gesamt-N %	Amino-N %	Aequivalentzahl	Aus 1.8 g. Sbst. erhältliches Glutaminsäure-HCl	Molekulargewicht
Gef.	45.30	5.88	10.24**	(0.50)	139.9	2.20 g	6087****
	45.51*	5.84*		0.23	132.0***		
Ber.	46.38	5.48	10.82	0.22	126.5	2.55 g	6215

Weitere Untersuchungen sind im Gange.

Die spektrographischen Aufnahmen wurden von Fr. E. Major und Hr. L. Némethi durchgeführt; es sei ihnen auch an dieser Stelle gedankt.

#### Schrifttum :

1. G. Ivánovics u. V. Bruckner: Naturw. 25, 250 (1937); Z. f. Immunitätsforschung 90, 304, 91, 175 (1938).
2. E. Abderhalden u. H. Nienburg: Z. physiol. Chem. 219, 155 (1933).
3. M. Bergmann u. L. Zervas: Ber. Deutsch. Chem. Ges. 65, 1192 (1932).
4. M. A. Blanchetière: Bull. Soc. Chim. France 35, IV. 1317 (1924).
5. W. Grassmann: Angew. Chem. 50, 65 (1937).
6. A. Menozzi u. G. Appiani: Gazz. Chim. Ital. 24, I. 373 (1894).
7. W. A. Jacobs u. C. Craig: Journ. biol. Chem. 110, 522 (1935).
8. M. Bergmann: Journ. biol. Chem. 110, 471 (1935).
9. M. Gerendás: Enzymologia Acta Biocat. 9, 123 (1940).
10. E. Pacsu: Nature (London) 144, 551 (1939).
11. Th. Curtius: Ber. Deutsch. Chem. Ges. 37, 1289 (1904).
12. E. Fischer: Ber. Deutsch. Chem. Ges. 39, 453 (1906); E. Fischer u. E. Fourneau: Ber. Deutsch. Chem. Ges. 34, 2868 (1901).

\* Mit Bleichromat vermischt verbrennt.

\*\* Kjeldahl-Methode.

\*\*\* Elektrometrisch bestimmt.

\*\*\*\* Aus dem niedrigeren Aminostickstoffwert berechnet.