

Über die Methylierung von Dipeptiden.

Von

A. Kossel und S. Edlbacher.

(Aus dem physiologischen Institut in Heidelberg.)

Die ersten Versuche ¹⁾, um aus der Methylierung von Protein-
stoffen einen Schluß auf den Bau der Proteine zu ziehen, sind
von Skraup und seinen Mitarbeitern Krause und Böttcher ²⁾
ausgeführt worden. Die Proteinstoffe — Casein und Gelatine —
wurden in alkalisch-alkoholischer Lösung in der Wärme der
Einwirkung von Methyljodid unterworfen und das methylierte
Produkt sodann hydrolysiert. Hierbei ergab sich, „daß aus
dem methylierten Casein Tyrosin und Lysin überhaupt nicht,
Histidin und Arginin, wenn überhaupt, so in viel geringerer
Menge zu gewinnen sind als aus dem Casein selbst“; „Glut-
aminsäure und Leucin wurden aber in sehr erheblicher Menge
erhalten“. Ähnlich verliefen die Versuche mit Gelatine; nur
ergab sich hier ein Unterschied gegenüber dem Casein: durch
die Methylierung wurde die Ausbeute an Glutaminsäure be-
deutend herabgesetzt. Man wird geneigt sein, aus diesen
Ergebnissen den Schluß zu ziehen, daß diejenigen Protein-
bausteine, welche in dem Gemisch der hydrolytischen Spaltungs-
produkte fehlten, durch die Aufnahme von Methylgruppen
verändert worden sind, daß diese also auch in ihrer ursprüng-
lichen Lage im Proteinmolekül dem Methyljodid irgendwelche
Angriffspunkte dargeboten haben. Gegen diese Schlußfolgerung
ist aber einzuwenden, daß die Einwirkung des Jodmethyls

¹⁾ Diese Untersuchungen sind mit Unterstützung der Heidelberger
Akademie der Wissenschaften (Stiftung Lanz) ausgeführt und am 10. April
1919 eingereicht worden.

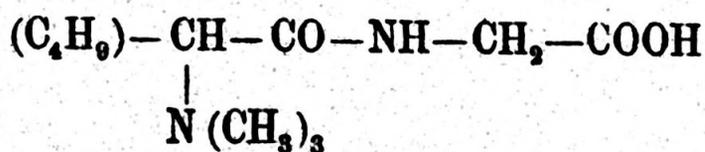
²⁾ Monatshefte für Chemie Bd. 30, S. 447 (1909); Bd. 31, S. 1035
(1910).

unter Bedingungen stattfand, durch welche das Proteinmolekül verändert werden konnte. Die Einwirkung der alkoholischen Alkalilauge in der Siedehitze konnte neue, im ursprünglichen Proteinmolekül nicht vorhandene, Angriffspunkte für die Methylierung schaffen. Diese Möglichkeit haben Skraup und Krause auch schon selbst in Betracht gezogen.

Rogoczinski¹⁾ führte daher die Methylierung mit Dimethylsulfat aus, einem Reagens, welches in kürzerer Zeit und bei gewöhnlicher Temperatur zu arbeiten gestattet und dessen Einwirkung auf Amidosäuren schon von Novak untersucht war²⁾. Die Versuche Rogoczinskis mußten jedoch bald abgebrochen werden und blieben auf das Clupein beschränkt; aber auch hier zeigte sich in Übereinstimmung mit Skraup und seinen Mitarbeitern, daß ein erheblicher Teil des Arginins unter der Einwirkung der Methylierung verschwindet.

Um aus solchen Versuchen einen Schluß auf die freien und reagierenden Gruppen des Proteinmoleküls zu ziehen, ist es zunächst notwendig, das Verhalten derjenigen Atomgruppen festzustellen, deren freies Vorkommen im Proteinmolekül vorausgesetzt werden kann, in erster Linie der in der Peptidkettung vorhandenen Imidgruppe. Von diesen Gesichtspunkten aus haben wir einige Versuche über die Methylierung mit Dimethylsulfat ausgeführt.

Das dl-Leucylglycin ist in dieser Richtung bereits von Abderhalden und Kautzsch untersucht worden³⁾. Hier entstand unter der Einwirkung des Jodmethyls dl-N-Tri-methylleucylglycin



oder das entsprechende Betain. Die Imidgruppe war somit nicht angegriffen.

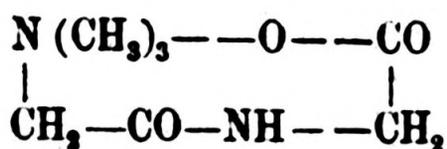
Wir untersuchten zunächst die Einwirkung von Dimethyl-

¹⁾ Diese Zeitschr. Bd. 80, S. 371 (1912).

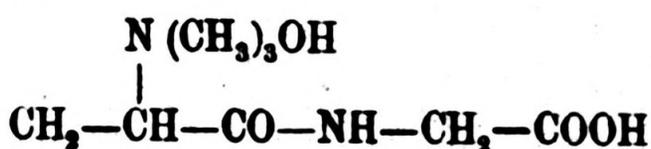
²⁾ Ber. d. deutsch. chem. Ges. Bd. 45, S. 834 (1912). Später haben Herzig und Landsteiner (Biochem Zeitschr. Bd. 61, S. 458 [1914]) auch das Diazomethan zur Methylierung der Proteine angewandt.

³⁾ Diese Zeitschr. Bd. 72, S. 44 (1911).

sulfat auf Glycylglycin und beobachteten ebenfalls den Eintritt von drei Methylgruppen in das Dipeptid. Die Hydrolyse zeigte, daß die Methylgruppen alle an ein und dasselbe Stickstoffatom angefügt waren, denn das Produkt zerfiel bei der Hydrolyse im Betain und Glykokoll. Es ist daher offenbar folgendes Betain entstanden:



Die Annahme dieser Formel findet eine Stütze in dem Verhalten des dl-Alanylglycins. Dieses ergab ein Trimethyl-derivat von folgender Konstitution



oder das entsprechende Betain. Bei der Hydrolyse zerfiel dieser Körper in das dl-Trimethyl- α -propiobetain und Glykokoll.

Nach diesen Ergebnissen darf man voraussetzen, daß die auch im unzersetzten Proteinmolekül an der Peptidbindung beteiligte Imidgruppe in der Regel nicht angegriffen wird. Hingegen ist es bekannt, daß der Eintritt anderer Säureradikale in die Amidogruppe der Amidosäuren die Methylierung am Stickstoff nicht verhindert; hat doch E. Fischer¹⁾ die Substitution durch Naphthalinsulfosäure benutzt, um N-Monomethyl-derivate von physiologisch wichtigen Amidosäuren darzustellen.

Experimenteller Teil.

Methylierung von Glycylglycin.

18,6 g Glycylglycinchlorhydrat ($\frac{1}{10}$ Mol.) werden in 100 cm³ Wasser gelöst und dazu eine Lösung von 28 g Natronhydrat (ungefähr 7 Mol.) in 100 cm³ Wasser hinzugesetzt. Man fügt nun unter kräftigem Umschütteln und zeitweiliger Kühlung allmählich 38 g Dimethylsulfat²⁾ (3 Mol.) hinzu. Nach $\frac{1}{4}$ Stunde

¹⁾ E. Fischer und M. Bergmann, Ann. d. Chem. Bd. 398, S. 96 (1913). E. Fischer und W. Lipschitz, Ber. d. deutsch. chem. Ges. Bd. 48, S. 360 (1915); auch O. Hinsberg, Ann. d. Chem. Bd. 265, S. 178 (1891.)

²⁾ Der Badischen Anilin- und Sodafabrik stanno wir für die Übersendung des für unsere Untersuchungen erforderlichen Dimethylsulfats unseren Dank ab.

ist die Reaktion im wesentlichen beendet. Nach 2stündigem Stehen wird die Flüssigkeit mit verdünnter Salzsäure schwach angesäuert und unter vermindertem Druck zur Trockne gebracht. Der Rückstand wird mit heißem Methylalkohol mehrfach ausgezogen und von den anorganischen Salzen abfiltriert. Aus dem eingedampften Filtrat kristallisiert Natriummethylsulfat, welches abfiltriert wird. Durch Wiederholung dieses Verfahrens gelingt es, die Hauptmenge des bei der Reaktion gebildeten methylschwefelsauren Salzes zu entfernen. Man erhält zum Schluß einen fast farblosen Sirup; dieser wird in ganz wenig Wasser gelöst und mit einer alkoholischen Lösung von Pikrinsäure gefällt. Das ausgeschiedene Pikrat wird zur Reinigung von Natriumpikrat aus Alkohol umkristallisiert, worin es in der Kälte sehr wenig löslich ist. Das Pikrat wird in Wasser gelöst und mit Schwefelsäure zersetzt. Die Hauptmenge der Pikrinsäure fällt aus und wird abgesaugt, das Filtrat ausgeäthert, die Schwefelsäure mit Baryt gefällt und der Überschuß des Baryts durch Kohlensäure entfernt. Die wässerige Lösung lieferte beim Eindunsten eine weiße Kristallmasse, welche nach zweimaligem Umkristallisieren aus Alkohol bei 141° schmolz.

Zur Analyse wurde die Base in das Goldsalz übergeführt, indem die Kristalle in wenig Wasser gelöst unter Zusatz von Salzsäure mit Goldchlorid versetzt wurden. Es schied sich ein Öl aus, welches bald zu gelben Kristallen erstarrte. Dieselben wurden aus wenig Salzsäure umkristallisiert und zur Analyse über Schwefelsäure getrocknet. Sie schmolzen bei 155° .¹⁾

1. 9.76 mg ergaben $0.467 \text{ cm}^3 \text{ N}$ (766 mm, 18°), gef. $5.65\% \text{ N}$;

2. 6.921 mg ergaben 1.76 mg H_2O ; 4.20 mg CO_2 ; 2.645 mg Au; gef. $2.85\% \text{ H}$; $16.53\% \text{ C}$; $38.22\% \text{ Au}$;

3. 6.145 mg ergaben 8.10 mg AgJ; gef. $8.43\% \text{ CH}_3$.

Ber. f. $\text{C}_7\text{H}_{13}\text{N}_2\text{O}_3\text{Cl}_1\text{Au}$: $16.34\% \text{ C}$; $2.94\% \text{ H}$; $5.45\% \text{ N}$;

$38.35\% \text{ Au}$; $8.76\% \text{ CH}_3$.²⁾

Gef.: $16.53\% \text{ C}$; $2.65\% \text{ N}$;

$38.22\% \text{ Au}$; $8.43\% \text{ CH}_3$.

¹⁾ Die Kohlenstoff-, Wasserstoff- und Stickstoffbestimmungen wurden stets nach Pregl ausgeführt. Die N-Methylbestimmungen nach Edlbacher.

²⁾ Berechnet für 3 CH_3 .

Das Goldsalz hat somit die Zusammensetzung



Zur Darstellung des Silbersalzes wurde 1 g der kristallisierten Base mit etwas mehr als 2 Mol. Silbernitrat in möglichst wenig Wasser gelöst und ein Überschuß von absolutem Alkohol hinzugefügt. Es kristallisierte ein Silbersalz aus, welches durch Auflösen in sehr wenig Wasser und Zusatz von absolutem Alkohol umgelöst werden konnte. Die Kristalle lösen sich leicht in Alkohol, welcher mehr als 3–4% Wasser enthält, und sind lichtempfindlich. Der Schmelzpunkt liegt bei 180°. Die Analyse führte zu folgenden Zahlen:

1. 5.920 mg ergaben 0.613 cm³ N (759 mm, 20°) gef. 12.05% N
Ber. f. C₇H₁₄N₂O₈Ag 12.22% N
2. 3.895 mg ergaben 7.56 mg AgJ; gef. 12.42% CH₃ (Methyl am Stickstoff)
Ber. f. 3 CH₃ in obiger Formel 13.08 CH₃

Das Silbersalz hat also die Zusammensetzung



Zur Hydrolyse wurden 20 g der freien Base, welche über das Pikrat gereinigt war, mit 200 cm³ 30 vol% Schwefelsäure 28 Stunden am Rückflußkühler im Sieden erhalten, dann wurde die Schwefelsäure mit Barythydrat quantitativ entfernt, Filtrat und Waschwässer eingedampft. Aus dem Rückstand kristallisierte Glykokoll aus, welches durch den Schmelzpunkt und die Überführung in Hippursäure (Schmp. gef. 187°) identifiziert wurde. Weitere Mengen von Glykokoll schieden sich nach dem Zusatz von Alkohol ab. Aus der alkoholischen von Glykokoll befreiten Lösung schossen große tafelförmige Kristalle an, welche alle Eigenschaften des Betains zeigten.

Ein Teil der Kristalle wurde in Wasser gelöst und mit Goldchlorid und Salzsäure versetzt. Das sofort auskristallisierte Goldsalz wurde im luftverdünnten Raum über Schwefelsäure getrocknet und ergab folgende Zahl für Methyl am Stickstoff:

- | | |
|--|-----------------------|
| 11.535 mg gaben 17.14 mg AgJ; gef. | 9.50% CH ₃ |
| Berechnet für Betaingoldchlorid | 9.80% CH ₃ |

Die alkoholische Lösung schied auf Zusatz von alkoholischer

Pikrinsäure ein kristallisiertes Pikrat aus, dessen Schmelzpunkt (181°) mit dem des Betainpikrats übereinstimmte. Beim Versetzen der wässerigen Lösung mit Jodjodkalium trat die von Griess angegebene Reaktion ein: es bildete sich ein brauner Niederschlag, der sich nach einiger Zeit in grüne Kristalle verwandelte.

Methylierung von dl-Alanylglycin.

7.3 g dl-Alanylglycin (5 Mol.) wurden in 100 cm^3 Wasser gelöst, dazu eine Lösung von 25 g Natronhydrat (50 Mol.) in 100 cm^3 Wasser und allmählich 31 g Dimethylsulfat (25 Mol.) hinzugefügt. Die Verarbeitung der Reaktionsflüssigkeit geschah ebenso, wie es beim Glycylglycin angegeben ist. Die nach Entfernung des Natriummethylsulfats erhaltene methylalkoholische Lösung wurde nach dem Verdunsten in wenig Wasser gelöst und mit Pikrinsäure gefällt, die Fällung aus Alkohol umkristallisiert. Das auf diese Weise erhaltene Pikrat ist im Gegensatz zu der aus Glycylglycin erhaltenen Verbindung in Alkohol viel leichter löslich, als das Natriumpikrat. Das Pikrat wurde wie oben beschrieben in die freie Base übergeführt, die wir als einen nicht kristallisierenden Sirup erhielten.

Ein Teil davon wurde mit verdünnter Salzsäure und Goldchlorid in das Goldsalz übergeführt, welches sich als ein bald kristallisierendes Öl ausschied. Nach dem Umkristallisieren aus einprozentiger Salzsäure erschien es in Form dunkelgelber Nadelchen, die bei 90° zu sintern begannen und bei 105° schmolzen.

1. 5.055 mg gaben 6.55 mg AgJ; gef. 8.29% CH_3 ;
2. 6.800 mg gaben 2.25 mg H_2O ; 4.44 mg CO_2 ; 2.430 Au gef. 3.70% H; 17.82% C; 35.78% Au
3. 5.660 mg gaben 0.274 cm^3 N (737 mm, 22°); gef. 5.44% N
Ber. f. $\text{C}_8\text{H}_{19}\text{N}_2\text{Cl}_4\text{AuO}_4$: 17.59% C; 3.51% H; 5.13% N; 8.26% CH
Gefunden: 17.82% C; 3.70% H; 5.44% N; 8.29% CH.

Das Goldsalz hat hiernach die Zusammensetzung



Zur Hydrolyse wurden 20 g der Base mit 200 cm^3 $30\text{ vol}\%$ Schwefelsäure 28 Stunden am Rückflußkühler ge-

kocht und die Schwefelsäure sodann durch Baryt entfernt. Es bleibt ein etwas bräunlich gefärbter Eindampfungsrückstand, welcher kristallinisch erstarrt. Derselbe wird mit kaltem Alkohol ausgelaugt und abgesaugt. Der in Alkohol unlösliche Teil bestand im wesentlichen aus Glykokoll, das Alkoholextrakt enthielt ein Betain.

Der Nachweis des Glykokolls wurde durch Überführung in Hippursäure erbracht. Die Hippursäure kristallisierte in langen farblosen Nadeln vom Schmelzpunkt $187-188^{\circ}$ und ergab bei der Stickstoffbestimmung folgende Werte:

3.13 mgr gaben $0.480 \text{ cm}^3 \text{ N}$ (757 mm, 16°); gef. 18.04% N
 Berechnet für Hippursäure 18.60% N

Der alkohollösliche Teil verblieb nach dem Verdunsten des Alkohols als hygroskopische Kristallmasse. Ein Teil davon wurde in mäßig verdünnter Salzsäure gelöst und mit Goldchlorid versetzt. Es entstand eine ölige Abscheidung, die sich zunächst in mikroskopische Kriställchen verwandelte; diese erfuhren nach Verlauf einiger Stunden eine weitere Umwandlung in größere Nadeln. Sie schmolzen nach zweimaligem Umkristallisieren aus einprozentiger Salzsäure bei 240° . Zur Analyse wurden sie im luftverdünnten Raum über Schwefelsäure getrocknet.

1. 11.170 mg gaben 2.86 mg HO_2 ; 6.37 mg CO_2 ; 4.64 mgr Au;
2. 9.96 mg gaben $0.279 \text{ cm}^3 \text{ N}$ (752 mm, 16°);
3. 10.11 mg gaben 14.31 mg AgJ.

Gefunden: 15.55% C; 2.86% H; 3.27% N; 41.54% Au; 9.05% CH_3 .

Berechnet für Homobetain: 15.28% C; 2.99% H; 2.98% N;
 41.83% Au; 9.50% CH_3 .

Die aus dem dl-Alanylglycin erhaltene Base muß somit das dl-Trimethyl- α -priobetain sein. Hierdurch ist die in der Einleitung für das Methylprodukt aufgestellte Formel erwiesen.

Die Untersuchungen werden fortgesetzt.