

Seitenkettenwechselwirkung in serin- oder threoninhaltenen Asparagylpeptiden

Von

Friedhelm Schneider

Aus dem Physiologisch-Chemischen Institut der Universität Tübingen

(Direktor: Prof. Dr. Dr. G. Weitzel)

(Der Schriftleitung zugegangen am 12. Oktober 1962)

Professor Dr. Adolf Butenandt zum 60. Geburtstage

Nach dem gegenwärtigen Stand unserer Kenntnisse über den Mechanismus der Enzymkatalyse ist das Zusammenwirken mehrerer funktioneller Gruppen, die sich zueinander und zum Substrat in einer speziellen, räumlich günstigen Anordnung befinden, von grundsätzlicher Bedeutung¹. Für diese multifunktionelle Katalyse stehen in erster Linie die funktionellen Gruppen der in den Fermentproteinen vorhandenen Aminosäuren sowie die Peptidbindungen zur Verfügung. Das gilt insbesondere für Fermente, die kein Coenzym enthalten, wie z. B. für Proteinasen, Esterasen, Hydratasen, Glykosidasen u. a. Die organische Chemie hat an einer Anzahl eindrucksvoller Modellreaktionen die hohe Wirksamkeit der multifunktionellen Katalyse demonstriert. Diese Reaktionen umfassen z. B. die Beschleunigung der Mutarotation von Tetramethylglucose², die Hydrolyse von Phenylestern und Aniliden³, die Amidspaltung⁴ und neuerdings auch die Hydratation⁵. Besonderes Interesse verdienen hier

¹ H. Gutfreund u. J. M. Sturtevant, Proc. nat. Acad. Sci. USA **42**, 719 [1956]; G. H. Dixon u. H. Neurath, J. Amer. chem. Soc. **79**, 4558 [1957]; S. A. Bernhard u. H. Gutfreund, Progress in Biophysics and Biophysic. Chem. Vol. X, S. 146—149, Pergamon Press, New York 1960; E. A. Barnard u. W. D. Stein, Advances in Enzymol. **20**, 96 [1958]; L. L. Ingraham, Biochemical Mechanisms, John Wiley & Sons 1962; M. Dixon u. E. C. Webb, Enzymes, S. 311, Longmans, Green & Co. Ltd. London 1960.

² C. G. Swain u. J. F. Brown, jr., J. Amer. chem. Soc. **74**, 2534, 2538 [1952].

³ H. Morawetz u. J. Oreskes, J. Amer. chem. Soc. **80**, 2591 [1958]; E. W. Westhead, jr. u. H. Morawetz, ebenda **80**, 237 [1958]; P. R. Zimmerman, E. W. Westhead, jr. u. H. Morawetz, Biochim. biophysica Acta [Amsterdam] **25**, 376 [1957].

⁴ M. L. Bender, J. Amer. chem. Soc. **79**, 1258 [1957]; T. C. Bruice u. J. M. Sturtevant, ebenda **81**, 2860 [1959]; M. L. Bender, Y. L. Chow u. F. Chloupek, ebenda **80**, 5380 [1958].

⁵ M. L. Bender u. K. A. Connors, J. Amer. chem. Soc. **84**, 1980 [1962].

die Arbeiten, die sich mit der Rolle der Säureamid- oder Peptidbindung als möglichem Partner multifunktionaler intramolekularer Katalyse beschäftigen⁶.

Da die in Fermenten katalytisch wirksamen Gruppen aus den trifunktionellen Aminosäuren der Proteine stammen, erhebt sich die Frage, inwieweit den einzelnen Aminosäuren selbst bereits katalytische Eigenschaften zukommen, ob diese in Peptiden durch Zusammenwirken mehrerer Gruppen gesteigert werden können bzw. in Peptiden aus mehreren trifunktionellen Aminosäuren intramolekulare Wechselwirkungen möglich sind, die für Fermentreaktionen von Bedeutung sein können. Über das katalytische Verhalten von Aminosäuren liegen vor allem mit Histidin⁷ und Cystein⁸ Untersuchungen vor, die eine wertvolle Stütze für das mutmaßliche Vorkommen dieser Aminosäuren im aktiven Zentrum von Fermenten darstellen. Unsere Kenntnisse über Besonderheiten des chemischen Verhaltens von Aminosäuren infolge Wechselwirkung ihrer funktionellen Gruppen in Peptiden sind bisher gering.

Wir berichten in dieser Arbeit über eine Seitenkettenwechselwirkung in Asparagylpeptiden, welche zugleich Serin oder Threonin enthalten. Das chemische Verhalten solcher Peptide ist deshalb von besonderem Interesse, weil die Sequenz Gly-Asp-Ser-Gly Teil des aktiven Zentrums einer Reihe von Proteasen und Esterasen ist, wie zahlreiche Untersuchungen der letzten Jahre gezeigt haben⁹. Zum Vergleich zogen wir auch Peptide heran, die anstelle von Asparaginsäure Glutaminsäure enthalten, um die Spezifität der Effekte zu kontrollieren. Ausgangspunkt dieser Untersuchungen bildete unsere Beobachtung¹⁰, daß sich unter den Cbo*-Aminosäure-*p*-nitrophenylestern, die als Substrate der Imidazolkatalyse studiert wurden, der Cbo-Asparagin-*p*-nitrophenylester durch außergewöhnlich hohe spontane Zerfallsgeschwindigkeit auszeichnet; diese ist bei pH 6,2 in Phosphatpuffer etwa dreihundertmal größer als die des Cbo-Valin-*p*-nitrophenylesters. Wir prüften daraufhin die Hydrolysegeschwindigkeit weiterer Ester der Asparaginsäure, vor allem von Cbo-Peptidestern; außerdem wurde die Reaktionsgeschwindigkeit dieser Cbo-Peptidester mit Hydroxylamin gemessen und das Verhalten der Peptide gegenüber *p*-Nitro-phenylacetat getestet.

* Cbo = Carbobenzyloxy.

⁶ E. Schätzle u. M. Rottenberg, *Helv. chim. Acta* **45**, 1008 [1962]; E. Wenger, H. Urheim u. M. Rottenberg, ebenda **45**, 1003 [1962]; H. N. Rydon, *Nature* [London] **182**, 928 [1958]; M. Brenner, *J. cellular comparat. Physiol.* **54** (Suppl. 1) 221 [1959]; L. A. Cohen u. B. Withop, *Angew. Chem.* **73**, 253 [1960]; M. L. Bender, *J. Polymer. Sci.* **49**, 80 [1961].

⁷ E. A. Barnard u. W. D. Stein, *Advances in Enzymol.* **20**, 51 [1958]; M. Bender, *Chem. Reviews* **60**, 53 [1960]; Th. C. Bruce u. R. M. Topping, *J. Amer. chem. Soc.* **84**, 2448 [1962].

⁸ L. Perényi, *Enzymologia* [Den Haag] **22**, 208 [1960]; J. R. Whitaker, *J. Amer. chem. Soc.* **84**, 1900 [1962].

⁹ J. A. Cohen, R. A. Oosterbaan, H. S. Jansz u. F. Berends, *J. cellular comparat. Physiol.* **54** (Suppl. 1) 244 [1959].

¹⁰ F. Schneider, erscheint demnächst in dieser Zeitschrift.

Für diese Untersuchungen war die Synthese einer Anzahl neuer Peptide erforderlich, die in der vorliegenden Arbeit ebenfalls beschrieben werden.

Beschreibung der Versuche

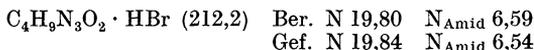
Peptidsynthesen

Cbo-L-Asparaginsäure- β -benzylester: a) Durch Halbverseifung des Dibenzylesters (Schmp. 66°)¹¹ mit Natronlauge in Dioxan/Wasser oder besser mit Lithiumhydroxyd in Aceton/Wasser¹². Schmp. 108° (Lit. 108°).

b) 11,2 g (50 mMol) L-Asparaginsäure- β -benzylester (Schmp. 223°), dargestellt nach l. c.¹³ oder besser nach l. c.¹⁴, wurden in 100 ml Wasser und 25 ml Dioxan gelöst. Man gab 2 g NaOH und 8,4 g Natriumhydrogencarbonat zu und ließ innerhalb von 3 Stdn. 8,5 g Carbobenzoychlorid unter kräftigem Rühren bei 10° zutropfen. Unter Kühlung wurde angesäuert, 3mal mit 50 ml Essigester extrahiert, die vereinigten Extrakte getrocknet und das Lösungsmittel verdampft. Der Rückstand wurde aus Benzol/Petroläther umkristallisiert. Schmp. 107—109°; Ausb. 13,2 g (72% d. Th.).



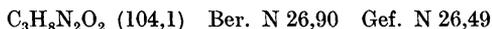
Glycyl-glycin-amid-hydrobromid: 7 g der Cbo-Verbindung (Schmp. 179—180°)¹⁵ wurden mit 100 ml 2*n* HBr/Eisessig 2 Stdn. geschüttelt, danach im Vak. eingengt und abzentrifugiert. Umkristallisiert wurde aus Methanol. Schmp. 202—204°; Ausb. 6 g (90% d. Th.).



Cbo-DL-Serin-amid: 4,5 g DL-Serin-methylester-hydrochlorid¹⁶ wurden nach l. c.¹⁷ in die Cbo-Verbindung übergeführt, in 50 ml absol. Methanol gelöst, in der Kälte mit Ammoniak gesättigt und nach 3 Tagen bei Zimmertemperatur zur Trockne eingedampft. Der Rückstand wurde aus Essigester umkristallisiert. Schmp. 103—105°; Ausb. 3,5 g.



DL-Serin-amid: Die Abspaltung des Cbo-Restes erfolgte wie üblich mit Palladium/Wasserstoff in Methanol. Nach Ende der Reaktion dampfte man auf ein kleines Volumen ein und brachte durch Zugabe von etwas Petroläther zur Kristallisation. Schmp. 115—120°.



Cbo-DL-Threonin-amid: DL-Threonin-methylester-hydrochlorid (Schmp. 125°)¹⁸, bereitet aus 6 g DL-Threonin, wurde nach l. c.¹⁷ in die Cbo-Verbindung übergeführt und der erhaltene Cbo-DL-Threonin-methylester in 100 ml

¹¹ A. Berger u. E. Katchalski, J. Amer. chem. Soc. **73**, 4084 [1951].

¹² P. M. Bryant, R. H. Moore, P. J. Pimlott u. G. T. Young, J. chem. Soc. [London] **1959**, 3868.

¹³ E. M. Bradbury, A. R. Downie, A. Elliot u. W. E. Hanby, Proc. Roy. Soc. [London] Ser. A. **259**, 110 [1960].

¹⁴ L. Benoiton, Canad. J. Chem. **40**, 570 [1962].

¹⁵ J. S. Fruton u. M. Bergmann, J. biol. Chemistry **145**, 253 [1942].

¹⁶ E. Fischer u. U. Suzuki, Ber. dtsch. chem. Ges. **38**, 4173 [1905].

¹⁷ J. S. Fruton, J. biol. Chemistry **146**, 463 [1942].

¹⁸ M. Kinoshita u. S. Umezawa, J. chem. Soc. Japan, pure Chem. Sect. [Nippon Kagaku Zasshi] **72**, 382 [1951], Chem. Abstr. **46**, 3005 g [1952].

Methanol gelöst und in der Kälte mit Ammoniak gesättigt. Nach 3 Tagen bei Zimmertemperatur verdampfte man das Lösungsmittel im Vak. und kristallisierte den Rückstand zweimal aus Essigester und einmal aus Äthanol/Essigester/Petroläther um. Schmp. 115—117°; Ausb. 4,2 g.

$C_{12}H_{16}N_2O_4$ (252,3) Ber. N 11,10 Gef. 11,22

DL-Threonin-amid: Die Cbo-Verbindung wurde in Methanol gelöst und wie üblich gespalten. Aus der eingeeengten Lösung kristallisierte das Produkt über Nacht im Kühlschränk. Schmp. 111—113°.

$C_4H_{10}N_2O_2$ (118,1) Ber. N 23,70 Gef. N 23,48

Cbo-DL-Seryl-glycyl-glycin-äthylester: 4,8 g Cbo-DL-Serin (Schmp. 125°)¹⁹ (20 mMol) und 4 g Glycyl-glycin-äthylester-hydrochlorid (Schmp. 182—183°)²⁰ (20 mMol) wurden unter Erwärmen in 40 ml Dimethylformamid gelöst, abgekühlt und mit 2,9 ml Triäthylamin, danach mit 4,3 g Dicyclohexylcarbodiimid²¹ versetzt. Nach mehreren Stunden im Eisbad ließ man über Nacht bei Zimmertemperatur stehen, filtrierte und verdampfte das Lösungsmittel im Vak. bei 40°. Man kristallisierte den Rückstand dreimal aus Essigester. Schmp. 130—131°; Ausb. 5 g (60% d. Th.).

$C_{17}H_{23}N_3O_7$ (381,3) Ber. N 11,01 Gef. N 11,20

Cbo-DL-Seryl-glycyl-glycin-amid: a) 10 g des Cbo-Peptidesters wurden in 500 ml absol. Äthanol gelöst, in der Kälte mit Ammoniak gesättigt und 4 Tage bei Zimmertemperatur belassen. Man filtrierte, dampfte auf ein kleines Volumen ein und trennte die Kristalle ab. Man extrahierte das erhaltene Produkt mit Äthanol, filtrierte vom Ungelösten ab und verdampfte das Lösungsmittel. Umkristall. aus wenig Äthanol; Schmp. 152—153°; Ausb. 3 g (30% d. Th.).

$C_{15}H_{20}N_4O_6$ (352,4) Ber. N 15,90 Gef. N 16,05

Der in Alkohol schwer lösliche Anteil erwies sich als Hydantoin, das durch Abspaltung der Schutzgruppe und Cyclisierung entstanden ist²². Schmp. 188°.

$C_8H_{13}N_4O_5$ (244,2) Ber. N 22,81 Gef. N 22,60

b) 2,12 g Glycyl-glycin-amid-hydrobromid (10 mMol) wurden in 20 ml Dimethylformamid unter Zusatz von 1,4 ml Triäthylamin gelöst, das Triäthylamin-hydrobromid abfiltriert, 2,4 g (10 mMol) Cbo-DL-Serin zugesetzt, auf —5° gekühlt und 2,2 g Dicyclohexylcarbodiimid hinzugefügt. Nach Aufbewahren über Nacht im Kühlschränk und einigen Stunden bei Zimmertemperatur filtrierte man und verdampfte das Lösungsmittel im Vak. Umkristallisiert wurde mehrere Male aus Äthanol. Zur Entfernung von geringen Mengen Dicyclohexylharnstoff wurde in siedendem Wasser gelöst, filtriert, im Vak. eingedampft und nochmals aus Äthanol umkristallisiert. Schmp. 156°; Ausbaute 1,9 g (61% d. Th.).

$C_{15}H_{20}N_4O_6$ (352,4) Ber. N 15,90 N_{Amid} 3,98
Gef. N 15,91 N_{Amid} 4,01

DL-Seryl-glycyl-glycin-amid: Die Abspaltung des Cbo-Restes erfolgte in der üblichen Weise; Krist. vom Schmp. 156°.

$C_7H_{14}N_4O_4$ (218,2) Ber. N 25,69 N_{Amid} 6,42
Gef. N 25,70 N_{Amid} 6,42

¹⁹ M. Bergmann u. L. Zervas, Ber. dtsh. chem. Ges. **65**, 1192 [1932].

²⁰ H. F. Schott, J. B. Larkin, L. B. Rockland u. M. S. Dunn, J. org. Chemistry **12**, 490 [1947].

²¹ J. C. Sheehan u. G. P. Hess, J. Amer. chem. Soc. **77**, 1067 [1955].

²² J. S. Fruton, Advances in Protein Chem. **5**, 1 [1949]; S. Goldschmidt u. M. Wick, Liebigs Ann. Chem. **575**, 217 [1952].

Cbo- α -L-Asparagyl(β -benzylester)-DL-serin-amid: 1,1 g Cbo-L-Asparaginsäure- β -benzylester (3 mMol) und 312 mg DL-Serin-amid wurden in 6 ml Dimethylformamid gelöst, bei -5° mit 650 mg Dicyclohexylcarbodiimid versetzt und über Nacht im Eisschrank, danach mehrere Stunden bei Zimmertemperatur belassen. Der Harnstoff wurde abfiltriert, das Dimethylformamid im Vak. verdampft und der Rückstand dreimal aus Essigester/Petroläther umkristallisiert, wobei eine Gallerte erhalten wurde. Ausb. 870 mg (70% d. Th.); Schmp. 148—150°.

$C_{22}H_{25}N_3O_7$ (443,4) Ber. N 9,48 Gef. N 9,82

Cbo- α -L-Asparagyl(β -benzylester)-DL-threonin-amid: 1,1 g Cbo-L-Asparaginsäure- β -benzylester (3 mMol), 360 mg DL-Threonin-amid und 650 mg Dicyclohexylcarbodiimid wurden wie oben beschrieben in 5 ml Dimethylformamid umgesetzt. Die Aufarbeitung erfolgte in derselben Weise wie bei der Serin-Verbindung beschrieben. Man erhielt nach zweimaligem Umkristallisieren aus Essigester/Petroläther eine Gallerte. Ausb. 960 mg (75% d. Th.); Schmp. 150—152°.

$C_{23}H_{27}N_3O_7$ (457,5) Ber. N 9,18 Gef. N 9,35

Cbo- α -L-Asparagyl(β -benzylester)-DL-seryl-glycyl-glycin-amid: 1,1 g DL-Seryl-glycyl-glycin-amid (5 mMol) wurden in 20 ml Dimethylformamid in der Wärme gelöst, 1,83 g Cbo-L-Asparaginsäure- β -benzylester (5 mMol) zugesetzt, im Eisbad auf -5° gekühlt und 1,1 g Dicyclohexylcarbodiimid hinzugefügt. Die Reaktionsmischung wurde über Nacht in der Kälte gerührt, der Harnstoff abfiltriert, das Lösungsmittel im Vak. verdampft und der Rückstand dreimal aus Methanol umkristallisiert. Ausb. 1,7 g (60% d. Th.); Schmp. 178—180°.

$C_{26}H_{31}N_5O_9$ (557,5) Ber. N 12,57 Gef. N 12,53

Cbo- α -L-Asparagyl(β -benzylester)-glycyl-glycin-amid: 850 mg Glycyl-glycin-amid-hydrobromid (4 mMol) wurden in 10 ml Dimethylformamid unter Zusatz von 0,6 ml Triäthylamin gelöst, 1,47 g Cbo-L-Asparaginsäure- β -benzylester und 850 mg Dicyclohexylcarbodiimid in 2 ml Dimethylformamid in der Kälte zugesetzt. Die Aufarbeitung erfolgte wie üblich. Beim Versetzen des öligen Rückstandes mit Essigester erfolgte Kristallisation. Krist. aus Essigester/Petroläther. Ausb. 1,2 g (65% d. Th.); Schmp. 168°.

$C_{23}H_{26}N_4O_7$ (470,5) Ber. N 11,91 Gef. N 12,02

L-Asparagyl-glycyl-glycin-amid*: 800 mg der Cbo-Verbindung wurden in 80 ml 90proz. Essigsäure mit Palladium/Wasserstoff behandelt, der Katalysator abgetrennt, die Essigsäure im Vak. entfernt, der Rückstand mit Äthanol behandelt und dieses im Vak. verdampft. Man löste in 2 ml Wasser und brachte durch Zusatz von absol. Äthanol zur Kristallisation. Ausb. 380 mg (90% d. Th.); Schmp. 126—128°.

$C_8H_{14}N_4O_5$ (246,2) Ber. C 39,00 H 5,70 N 22,80
Gef. C 38,68 H 5,92 N 22,57

L-Asparagyl-DL-seryl-glycyl-glycin-amid: 1,2 g des Cbo-Benzylesters wurden in 100 ml 90proz. Essigsäure 8 Stdn. mit Palladium/Wasserstoff behandelt und aufgearbeitet wie üblich. Umkristallisation erfolgte aus 2 ml Wasser durch Zusatz von absol. Äthanol. Ausb. 620 mg (92% d. Th.); Schmp. 140—142°.

$C_{11}H_{19}N_5O_7$ (333,3) Ber. C 39,60 H 5,70 N 21,00
Gef. C 39,63 H 5,82 N 20,94

L-Asparagyl-DL-serin-amid: Aus 300 mg der Cbo-Verbindung wurden durch Hydrierung 130 mg (90% d. Th.) erhalten und aus Wasser/Äthanol umkristallisiert. Schmp. ab 198° Zers.

$C_7H_{13}N_3O_5$ (219,2) Ber. C 38,35 H 5,93 N 19,16
Gef. C 38,41 H 6,32 N 18,96

* Alle Peptide wurden papierchromatographisch auf ihre Reinheit geprüft.

L-Asparagyl-DL-threonin-amid: Aus 500 mg Cbo-Benzylester wurden, wie oben beschrieben, 210 mg (90% d. Th.) Peptid erhalten und aus Wasser/Äthanol umkristallisiert. Dabei wird eine Gallerte erhalten. Schmp. ab 153° Zers.

$C_8H_{15}N_3O_5$ (233,2) Ber. N 18,01 N_{Amid} 6,00
Gef. N 17,79 N_{Amid} 6,12

Cbo- α -L-Glutamyl(γ -methylester)-DL-serin-amid: 900 mg Cbo-L-Glutaminsäure- γ -methylester (Schmp. 72—74°)²³ (3 mMol), 310 mg DL-Serin-amid und 650 mg Dicyclohexylcarbodiimid wurden in der üblichen Weise zur Reaktion gebracht und aufgearbeitet. Man erhielt aus Essigester/Petroläther ein gallertiges Produkt vom Schmp. 154—157°; Ausb. 850 mg (78% d. Th.).

$C_{17}H_{23}N_3O_7$ (381,4) Ber. N 11,01 N_{Amid} 3,67
Gef. N 11,40 N_{Amid} 3,54

Cbo- α -L-Glutamyl(γ -methylester)-DL-threonin-amid: 900 mg Cbo-L-Glutaminsäure- γ -methylester (3 mMol), 360 mg DL-Threonin-amid (3 mMol) und 650 mg Dicyclohexylcarbodiimid wurden in 5 ml Dimethylformamid in gewohnter Weise in der Kälte umgesetzt und nach zweimaligem Umkristallisieren aus Essigester/Petroläther ein gallertiges Produkt isoliert. Schmp. 98—101°; Ausb. 1,1 g (92% d. Th.).

$C_{18}H_{25}N_3O_7$ (395,4) Ber. N 10,62 N_{Amid} 3,54
Gef. N 10,60 N_{Amid} 3,64

Cbo- α -L-Asparagyl(β -benzylester)-L-histidin-amid: 580 mg L-Histidin-amid-hydrochlorid²⁴ (3 mMol) und 0,45 ml Triäthylamin wurden in 40 ml Dimethylformamid gelöst, 1,1 g Cbo-L-Asparaginsäure- β -benzylester (3 mMol) und bei -5° 630 mg Dicyclohexylcarbodiimid zugesetzt. Man rührte über Nacht im Eisbad, filtrierte, entfernte das Dimethylformamid im Vak. und versetzte den öligen Rückstand mit Äther. Das erhaltene Produkt wurde zweimal aus Äthanol/Petroläther umkristallisiert. Schmp. 120—122°; Ausb. 620 mg (53% d. Th.).

$C_{25}H_{27}N_5O_6$ (493,5) Ber. N 14,20 Gef. N 14,21

Cbo- α -L-Glutamyl(γ -methylester)-glycin-amid: 2,95 g Cbo-L-Glutaminsäure- γ -methylester (10 mMol) wurden in 20 ml Tetrahydrofuran gelöst, 1,4 ml Triäthylamin zugesetzt und nach Abkühlen auf -5° 1 ml Chlorameisensäureäthylester. Nach 15 Min. im Eisbad wurde eine Lösung von 1,6 g Glycin-amid-hydrobromid und 1,4 ml Triäthylamin in 4 ml Wasser zugegeben und mehrere Stunden gerührt. Man ließ auf Zimmertemperatur kommen, dampfte im Vak. ein, löste den Rückstand in Chloroform und schüttelte mit Wasser, Hydrogencarbonatlösung, verd. Salzsäure und Wasser aus. Man trocknete die Chloroformlösung mit Natriumsulfat, dampfte im Vak. ein und kristallisierte den Rückstand zweimal aus Essigester um. Schmp. 135°; Ausb. 2,4 g (69% d. Th.).

$C_{16}H_{21}N_3O_6$ (351,3) Ber. N 11,95 N_{Amid} 3,99
Gef. N 12,02 N_{Amid} 3,96

Aufnahme der Hydrolysekurven

Die Messung der Verseifungsgeschwindigkeiten wurde nach der pH-Stat-Methode mit einem Autotitrator der Firma Radiometer Kopenhagen in Dioxan/Wasser-Mischungen bei 24° durchgeführt. Die Konzentration an Ester betrug in

²³ R. A. Boissonnas, St. Guttman, P. A. Jaquenoud u. J. P. Waller, Helv. chim. Acta 38, 1491 [1955].

²⁴ L. Levintor, V. E. Price u. J. P. Greenstein, J. biol. Chemistry 184, 55 [1950].

allen Fällen $5 \times 10^{-3}m$. Titriert wurden 10 ml der Esterlösung mit 0,2*n* NaOH unter Stickstoff, der mit 50proz. Kalilauge gewaschen war; 100proz. Spaltung entsprach ein Verbrauch von 0,25 ml Lauge. Die Konstanten der Tabelle wurden unter Zugrundelegung einer Reaktion erster Ordnung für den protonenverbrauchenden Schritt berechnet nach $\ln \frac{C_\infty}{C_\infty - C_t} = k \cdot t$. Direkt vergleichbar sind nur

die Werte, die für die gleiche Konzentration an Dioxan ermittelt wurden, da sich die Dielektrizitätskonstante und damit Verseifungsgeschwindigkeit mit dem Dioxan-Gehalt ändert.

Der Zerfall von *p*-Nitro-phenylacetat wurde in 0,066*m* Phosphatpuffer bei pH 7,5 spektrophotometrisch bei 402 nm und 24° verfolgt. Die Konzentration des *p*-Nitro-phenylacetats betrug $2,5 \cdot 10^{-3}m$, die Konzentration der zugesetzten Peptide $3 \cdot 10^{-4}m$.

Ergebnisse und Diskussion

Die Hydrolysegeschwindigkeit der Carbobenzoxy-peptidester

Die Verseifungsgeschwindigkeit der Cbo-Asparaginsäureester liegt in derselben Größenordnung wie die anderer Cbo-Aminosäure- und -Peptidester und ist bei pH 10 gerade mit ausreichender Genauigkeit meßbar. Wie die Geschwindigkeitskonstanten der Hydrolyse des Cbo-Asparagyl-(β -benzylester)-glycyl-glycin-amids und Cbo-Asparagyl(β -benzylester)-histidin-amids unter Berücksichtigung des pH-Wertes in Tab. 1 erkennen lassen, führt die Einführung einer Peptidbindung zu einer Erhöhung der Hydrolysegeschwindigkeit um etwa drei Zehnerpotenzen. Der zum Vergleich untersuchte Cbo-Isoasparagin-methylester²⁵ zeigt dieselbe Alkali-stabilität, doch ist der Einfluß einer Peptidbindung auf die Verseifungsgeschwindigkeit größer als der einer einfachen Amidbindung (vgl. auch Abb. 1). Dasselbe gilt für Cbo-Asparagin-methylester²⁵ (pH 9, $k = 0,7 \times 10^{-2}$; pH 10, $k = 13 \times 10^{-2}$), der aber bedeutend schneller zerfällt als der Cbo-Isoasparaginester.

Tab. 1. Hydrolyse-Konstanten von Cbo-Asparaginsäure-estern und -peptidestern (Meßmethodik s. Versuchsteil).

	Mischungs- verhältnis Dioxan/Wasser	10 ² <i>k</i> [Min. ⁻¹]		
		pH 8,5	pH 9	pH 10
Cbo-Asp(β -OCH ₂ C ₆ H ₅)	1:4	—	—	0,008
Cbo-Asp(β -OCH ₃)-NH ₂	1:4	—	0,2	2,7
Cbo-Asp(β -OCH ₂ C ₆ H ₅)-Gly-Gly-NH ₂	1:1	0,2	0,4	—
Cbo-Asp(β -OCH ₂ C ₆ H ₅)-His-NH ₂	1:1	—	0,4	—
Cbo-Asp(β -OCH ₂ C ₆ H ₅)-Ser-NH ₂	3:7	0,6	1,6	—
Cbo-Asp(β -OCH ₂ C ₆ H ₅)-Thr-NH ₂	3:7	0,6	1,6	—
Cbo-Asp(β -OCH ₂ C ₆ H ₅)-Ser-Gly-Gly-NH ₂	1:1	0,7	2,0	—
Cbo-Asp(β -OCH ₂ C ₆ H ₅)-Ser(COCH ₃)- Gly-Gly-NH ₂ *	1:1	0,2	0,7	—

* Über die Synthese berichten wir in einer späteren Arbeit.

²⁵ M. Bergmann u. L. Zervas, Ber. dtsch. chem. Ges. 65, 1192 [1932].

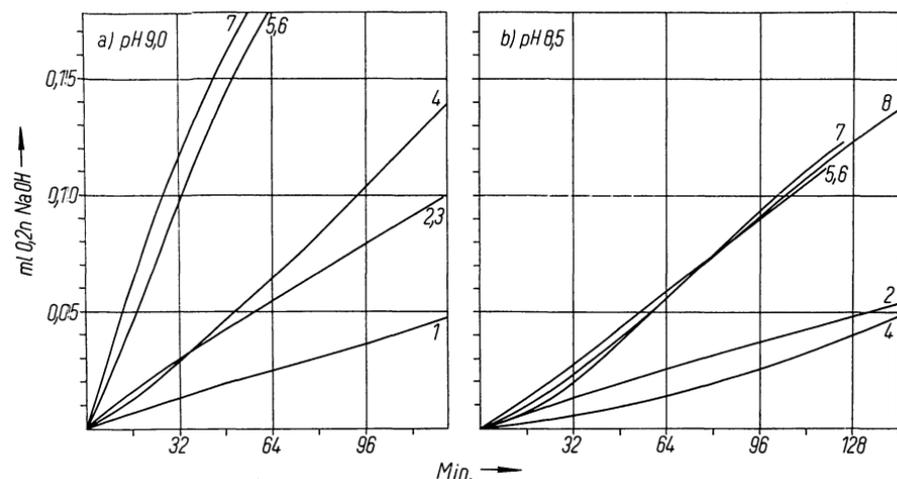


Abb. 1. Verseifungsgeschwindigkeit von Cbo-Asparaginsäure- β -ester- α -amiden bei 24^o und pH 9 (a) bzw. pH 8,5 (b). 1. Cbo-Isoasparagin-methylester; 2. Cbo-Asparagyl(β -benzylester)-glycyl-glycin-amid; 3. Cbo-Asparagyl(β -benzylester)-histidin-amid; 4. Cbo-Asparagyl(β -benzylester)-*O*-acetyl-seryl-glycyl-glycin-amid; 5. Cbo-Asparagyl(β -benzylester)-serin-amid; 6. Cbo-Asparagyl(β -benzylester)-threonin-amid; 7. Cbo-Asparagyl(β -benzylester)-seryl-glycyl-glycin-amid; 8. Oxalsäure-diäthylester.

Eine ungewöhnliche Labilisierung der Ester beobachtet man bei den Peptiden mit Serin und Threonin z. B. beim Cbo- α -Asparagyl(β -benzylester)-serin-amid, -threonin-amid oder -seryl-glycyl-glycin-amid (Kurven 5—7). Diese Ester zerfallen mit hoher Geschwindigkeit bereits bei pH-Werten, bei denen normale Peptidester noch völlig stabil sind. Acetyliert man die OH-Gruppe des Serins (Kurve 4), so sinkt die Hydrolysegeschwindigkeit auf die Größenordnung derjenigen des Cbo- α -Asparagyl(β -benzylester)-glycyl-glycin-amids. Um einen Vergleich mit einem sehr schnell hydrolysierenden aliphatischen Ester unter denselben Bedingungen zu erhalten, wurde in Abb. 1 b die Verseifungskurve des Oxalsäure-diäthylesters bei pH 8,5 aufgenommen. Sie folgt der Kurve des Cbo-Asparagyl(β -benzylester)-serin-amids oder -threonin-amids. Von Oxalsäure-diäthylester ist aber bekannt, daß seine Verseifungsgeschwindigkeit etwa um den Faktor $2 \cdot 10^5$ größer ist als z. B. die des Essigsäure-äthylesters²⁶.

Die entsprechenden Verbindungen mit Glutaminsäure- γ -methylester zeigen bei der Verseifung ein völlig anderes Verhalten als die Asparaginsäure- β -benzylester (Tab. 2). Zwar beobachtet man auch hier eine Erhöhung der Verseifungsrate beim Übergang von Cbo-Glutaminsäure- γ -methylester zum Cbo-Isoglutamin-methylester und den Peptiden wie Cbo- α -Glutamyl(γ -methylester)-glycin-amid oder -serin-amid; diese Er-

²⁶ J. Hine, Reaktivität und Mechanismus, S. 266, Thieme-Verlag, Stuttgart 1960.

höhung beträgt aber keine zwei Zehnerpotenzen. Besondere Beachtung verdient der Befund, daß Cbo- α -Glutamyl(γ -methylester)-glycin-amid die höchste Hydrolyserate der untersuchten Glutaminsäureester besitzt. Diese liegt etwa 45mal höher als diejenige des Cbo-Glutaminsäure- γ -methylesters; in derselben Größenordnung liegt die Spaltungsgeschwindigkeit des Cbo-Glutamin-methylesters²⁷ ($k = 0,8 \cdot 10^{-2} \text{ Min.}^{-1}$), während die übrigen Peptidester erheblich stabiler sind.

Die Verseifung der Glutaminsäure-Verbindungen wurde in 20proz. Dioxan/Wasser durchgeführt, die der Asparaginsäure-Verbindungen in 30- bis 50proz. Dioxan/Wasser. Da die Dielektrizitätskonstante und damit die Verseifungsgeschwindigkeit mit zunehmendem Dioxangehalt abnimmt, sind die Hydrolysenkonstanten nur unter Berücksichtigung des Mischungsverhältnisses direkt vergleichbar. Aus demselben Grunde sind Vergleiche mit den Hydrolysenkonstanten anderer Ester, die in der Literatur zu finden sind, nur unter Berücksichtigung der Dielektrizitätskonstante des Verseifungsmediums möglich.

Tab. 2. Hydrolyse-Konstanten von Cbo-Glutaminsäure- γ -estern und -peptiden. (Alle Messungen bei pH 10 in Dioxan/Wasser 1:4 und 24°.)

	$10^2 k \text{ [Min.}^{-1}\text{]}$
Cbo-Glu(γ -OCH ₃)	0,02
Cbo-Glu(γ -OCH ₃)-NH ₂	0,2
Cbo-Glu(γ -OCH ₃)-Ser-NH ₂	0,05
Cbo-Glu(γ -OCH ₃)-Thr-NH ₂	0,05
Cbo-Glu(γ -OCH ₃)-Gly-NH ₂	0,9

Mechanismus der Verseifungsreaktionen

Die Verseifungsgeschwindigkeiten der hier untersuchten Cbo-Peptidester erreichen Maximalwerte, wie man sie bisher nur in seltenen Fällen beobachtet hat. Dieses außergewöhnliche Verhalten wirft die Frage nach dem Mechanismus der Hydrolyse auf.

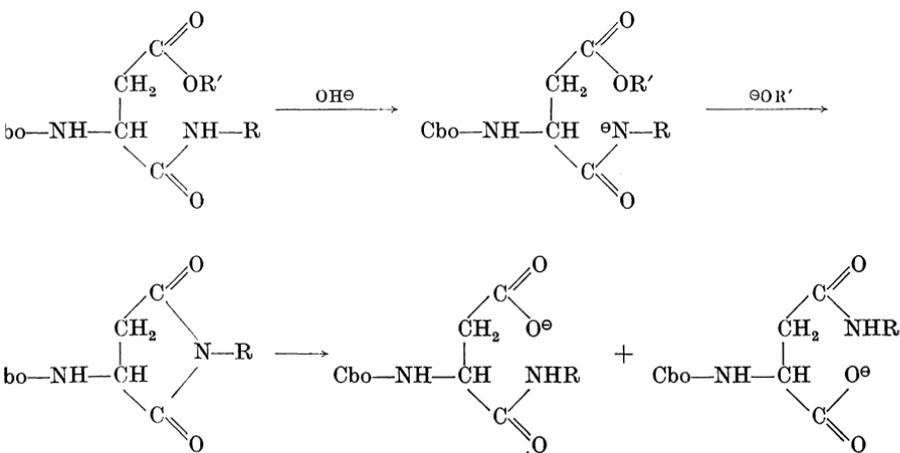
Über die Zwischenprodukte der Verseifung von Cbo-Asparagin-estern liegen Untersuchungen von Sondheimer und Holley²⁷ vor, die gezeigt haben, daß Cbo-Amino-succinimid als erstes Produkt der Alkali-Behandlung auftritt. Die Reaktion ist für die präparative Darstellung dieser Verbindung geeignet. Die erste Phase der Verseifung stellt somit eine nucleophile Verdrängungsreaktion unter Bildung eines cyclischen Produktes *cis*, der eine hydrolytische Ringöffnung folgt. Der Beweis für diese intermediäre Cyclisierung wurde in eleganter Weise auch durch Verfolgung der zeitlichen Änderung der optischen Drehung, die durch die Cyclisierung stark zunimmt, geliefert. Da die Ringöffnung in zwei Richtungen erfolgen kann (s. Formeln), treten als Endprodukte der Verseifungsreaktion die isomeren Amide auf²⁸. Diese Isomerisierung ist den

²⁷ E. Sondheimer u. R. W. Holley, J. Amer. chem. Soc. **76**, 2467 [1954].

²⁸ M. Goodman u. G. W. Kenner, Advances in Protein Chem. **12**, 499 [1957].

Peptid-Chemikern als unerwünschte Nebenreaktion der Verseifung von Cbo-Peptidestern mit Asparaginsäure bekannt und führt zum Auftreten eines Gemisches von α - und β -Peptiden unter Durchlaufen des cyclischen Imids.

Prinzipiell verläuft demnach die Verseifung von Cbo-Asparagin-methylester und Cbo- α -Asparagyl(β -benzylester)-peptiden nach demselben Mechanismus über eine intramolekulare nucleophile Katalyse unter intermediärer Bildung eines cyclischen Imids (s. Formelschema).



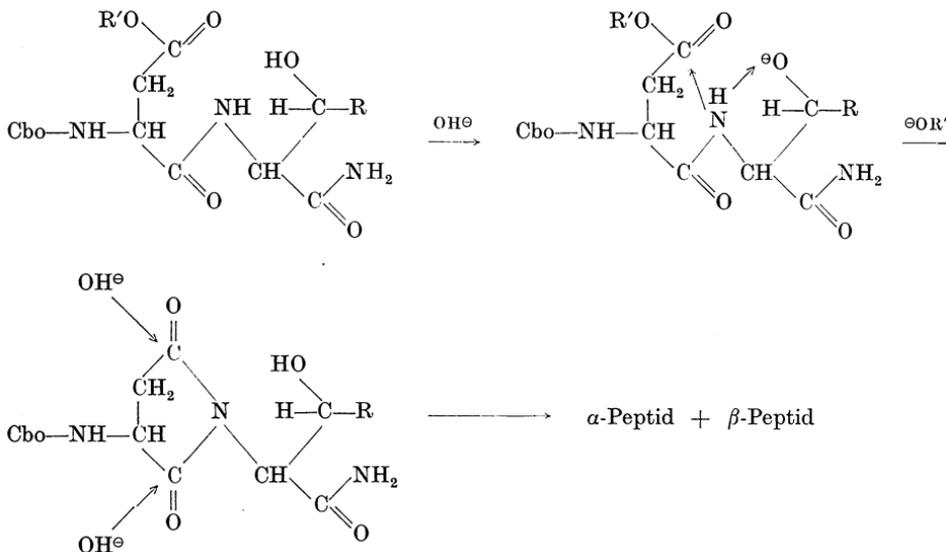
Mechanismus der Verseifung eines Cbo-Asparaginsäurepeptidesters.

Da die Abgabe eines Protons von der Peptidbindung mit zunehmender Säurestärke oder abnehmender Basenstärke des Stickstoffs erleichtert ist, werden alle Substituenten, die den $\text{p}K$ -Wert des Stickstoffs erniedrigen, Ringschluß und Hydrolyse des Esters erleichtern. Dadurch erklärt sich in unseren Versuchen die Zunahme der Verseifungsgeschwindigkeit beim Übergang von Cbo-Asparagin-methylester zum Cbo- α -Asparagyl(β -benzylester)-glycyl-glycin-amid oder -histidin-amid.

Für die weitere Erhöhung der Hydrolysegeschwindigkeit der serin- oder threoninhaltigen Peptidester [wie z. B. des Cbo- α -Asparagyl(β -benzylester)-serin-amids oder -threonin-amids] muß die Beteiligung der OH-Gruppe dieser Aminosäuren als nucleophiler Partner einer intramolekularen Katalyse angenommen werden. Daß die OH-Gruppe des Serins eine hohe nucleophile Reaktivität besitzt, ist aus Versuchen von Jencks²⁹ bekannt. Eine starke Stütze für diese Annahme ist außerdem darin zu sehen, daß nach Acetylierung der OH-Gruppe die Verseifungsgeschwindigkeit dieser Ester auf die Größenordnung derjenigen des Cbo-

²⁹ B. M. Anderson, E. H. Cordes u. W. P. Jencks, J. biol. Chemistry **236**, 455 [1961].

α -Asparagyl(β -benzylester)-glycyl-glycin-amids absinkt. Wie unsere Versuche zeigen, kann Serin durch Threonin ersetzt werden, ohne daß sich die Geschwindigkeitskonstante der Hydrolyse ändert, woraus zu schließen ist, daß die zusätzliche Methylgruppe des Threonins die Verfügbarkeit der OH-Gruppe nicht beeinträchtigt.



Mechanismus der Verseifung von Cbo- α -Asparagyl(benzylester)-serin- oder -threonin-amid. R = H oder CH_3 ; R' = $\text{CH}_2\text{-C}_6\text{H}_5$.

Obwohl durch die Untersuchungen von Sondheimer und Holley³⁰ gezeigt wurde, daß Cbo-Glutamin-methylester im Alkalischen ebenfalls über das cyclische Imid hydrolysiert und das Amino-glutar-imid viel schneller gespalten wird als Amino-succin-imid, zeigen die Verseifungskurven der entsprechenden Cbo-Glutamyl-peptidester, daß die protonenverbrauchende Reaktion bei diesen Estern bedeutend langsamer abläuft als bei den Estern der Asparaginsäure. Dieser Befund zeigt, daß der Ringschluß zum Glutar-imid langsamer erfolgt als zum Succin-imid. Daß die Bildung von Fünfringen leichter vor sich geht als die von Sechsringen und letztere weniger stabil sind als die ersteren, ist aus zahlreichen organisch-chemischen Reaktionen bekannt.

Die Erhöhung der Verseifungsgeschwindigkeit beim Übergang von Cbo-Isoglutamin-methylester zum Cbo- α -Glutamyl(γ -methylester)-glycin-amid erklärt sich auch hier, wie bei den Asparaginsäure-Verbindungen, durch die Abnahme der Basizität des Amidstickstoffs der Peptidbindung.

³⁰ E. Sondheimer u. R. W. Holley, J. Amer. chem. Soc. **79**, 3767 [1957].

Die Beobachtung, daß Cbo- α -Glutamyl(γ -methylester)-glycin-amid schneller hydrolysiert wird als die anderen untersuchten Peptidester mit Glutaminsäure, kann man nur dadurch erklären, daß die Bildung des Sechsrings durch Einführung von verzweigten Substituenten am Stickstoff erschwert wird, denn in den Peptiden Cbo- α -Glutamyl(γ -methylester)-threonin-amid und -serin-amid trägt die zweite Aminosäure eine zusätzliche Seitenkette. Daß diese Seitenkette den Angriff des Amidstickstoffs der Peptidbindung auf das Carbonylkohlenstoffatom des Esters erschwert, läßt sich am Molekülmodell demonstrieren. Dadurch wird nochmals deutlich, daß der Ringschluß den geschwindigkeitsbestimmenden Schritt der Hydrolyse darstellt.

Reaktionen mit Hydroxylamin und *p*-Nitro-phenylacetat

Um ein weiteres Kriterium für die Reaktionsfähigkeit der Cbo-Peptidester mit den sehr hohen Verseifungsgeschwindigkeiten zu erhalten, wurde die Geschwindigkeit der Umsetzung mit Hydroxylamin bei pH 7 orientierend geprüft. Dabei zeigte sich, daß schon im neutralen

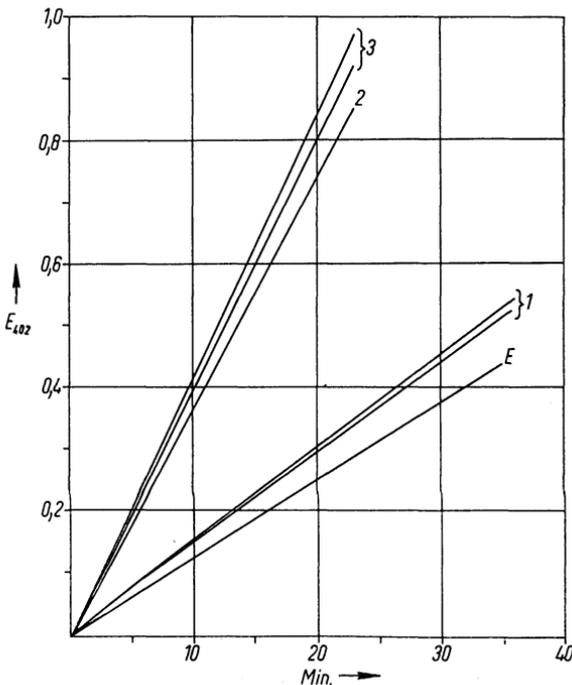
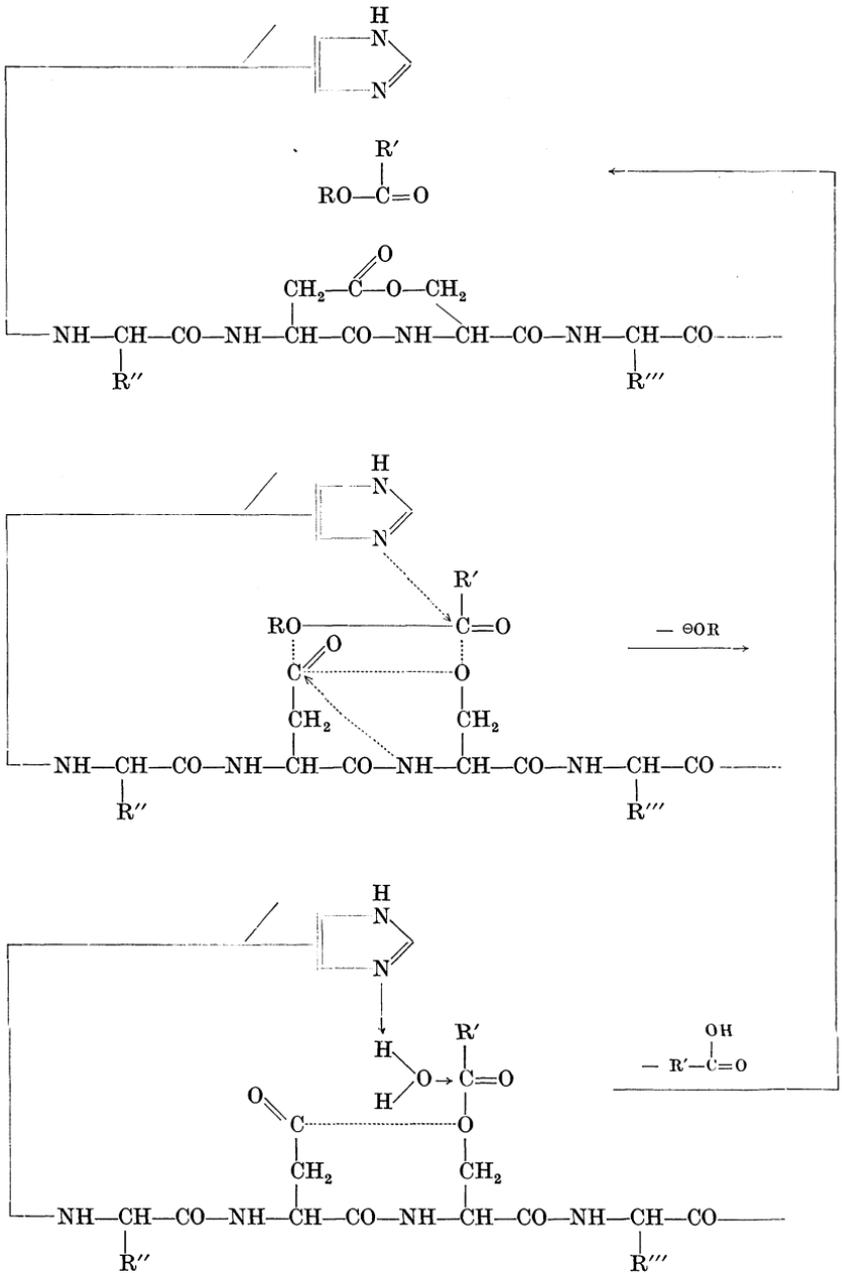


Abb. 2. *p*-Nitro-phenylacetat-Hydrolyse bei pH 7,5, 24°. E: Eigenhydrolyse. 1. In Gegenwart von Asp-Gly-Gly-NH₂, Asp-Ser-Gly-Gly-NH₂, Asp-Ser-NH₂ oder Asp-Thr-NH₂; 2. In Gegenwart von Imidazol; 3. In Gegenwart von Imidazol und Peptiden.



Vorschlag für einen Esterase-Mechanismus über eine Transesterifizierungsreaktion.

Bereich, also unter Bedingungen, unter denen z. B. Säureanhydride oder Säurechloride schnell reagieren, rasche Umsetzung mit diesen Estern erfolgt. Die hohe Reaktionsgeschwindigkeit ist ein weiterer Hinweis auf die außergewöhnliche Labilität dieser Peptidester.

Zur Prüfung der naheliegenden Frage, ob die hier untersuchten Peptide eine Beschleunigung der Spaltung solcher Ester bewirken, deren Zerfall z. B. durch Histidin- oder Histidyl-peptide katalysiert wird, haben wir den Einfluß von Asparagyl-glycyl-glycin-amid, Asparagyl-seryl-glycyl-glycin-amid, Asparagyl-serin-amid und Asparagyl-threonin-amid auf die Hydrolysegeschwindigkeit von *p*-Nitro-phenylacetat in Phosphatpuffer bei pH 7,5 untersucht. Dabei zeigte sich, daß diese Peptide eine leichte Beschleunigung der Spontan-Hydrolyse hervorbringen, die jedoch nicht über diejenige hinausgeht, die man mit anderen Peptiden oder Aminosäuren vergleichbarer *pK*-Werte beobachtet. Auch in Gegenwart von Imidazol zeigen diese Peptide eine nur geringfügig über die Imidazolwirkung hinausgehende Beschleunigung der Zerfallsgeschwindigkeit (s. Abb. 2). Setzt man die entsprechenden Cbo-Verbindungen ein, so verschwinden auch diese geringen Effekte, die an das Vorhandensein der freien Aminogruppe gebunden sind.

Die mögliche Bedeutung dieser Befunde für den Mechanismus von Fermentreaktionen liegt darin, daß die Sequenz Gly-Asp-Ser-Gly- Teil des aktiven Zentrums der sog. Serinproteasen ist, während in einigen Pseudo-Esterasen an Stelle von Asparaginsäure die Glutaminsäure tritt. Die Esterase-Wirkung dieser Pseudo-Esterasen ist aber geringer als die der Serinproteasen. Einem Vorschlag (s. Formel) für den Mechanismus der Esterasewirkung unter Berücksichtigung der hier erhobenen Befunde liegen die folgenden Überlegungen zugrunde: Am Modell läßt sich zeigen, daß zwischen der β -Carboxylgruppe der Asparaginsäure und der OH-Gruppe des Serins die Bildung eines intramolekularen Esters möglich ist. Dieser Ester ist durch die räumliche Nachbarschaft der Peptidbindung labilisiert, wie oben gezeigt wurde, und könnte durch die Tertiärstruktur des Eiweißmoleküls stabilisiert sein. Die Bildung des Enzym-Substrat-Komplexes ist mit einer Änderung der Tertiärstruktur verbunden, wodurch die leichte Spaltbarkeit des Esters wieder hergestellt und in einer Transesterifizierungsreaktion nutzbar gemacht werden könnte, die zu einer Acylierung der OH-Gruppe des Serins führt. Die Entacylierung der OH-Gruppe erfolgt in einer nucleophilen oder allgemeinen Basenkatalyse unter Beteiligung eines Imidazolrestes. Nach Rückbildung des intramolekularen Esters kann sich dieser Prozeß wiederholen. Weitere Untersuchungen an Modellsubstanzen sollen zeigen, inwieweit diese oder ähnliche Reaktionswege möglich sind.

Zusammenfassung

Die Synthese folgender Carbobenzoylpeptidester der Asparaginsäure und Glutaminsäure wird beschrieben:

- Cbo- α -Asparagyl(β -benzylester)-glycyl-glycin-amid (I)
- Cbo- α -Asparagyl(β -benzylester)-histidin-amid (II)
- Cbo- α -Asparagyl(β -benzylester)-serin-amid (III)
- Cbo- α -Asparagyl(β -benzylester)-threonin-amid (IV)
- Cbo- α -Asparagyl(β -benzylester)-seryl-glycyl-glycin-amid (V)
- Cbo- α -Glutamyl(γ -methylester)-glycin-amid (VI)
- Cbo- α -Glutamyl(γ -methylester)-serin-amid (VII)
- Cbo- α -Glutamyl(γ -methylester)-threonin-amid (VIII)

Ein Teil dieser Cbo-peptidester wurde in die freien Peptidamide übergeführt und deren Wirkung auf die *p*-Nitro-phenylacetat-Hydrolyse geprüft.

Die Messung der Verseifungsgeschwindigkeit der Ester zeigte, daß diese für I und II sowie für Cbo-Isoasparagin-methylester um größenordnungsmäßig drei Zehnerpotenzen über derjenigen des Cbo-Asparaginsäure- β -benzylesters liegt. Eine weitere Erhöhung der Hydrolysegeschwindigkeit beobachtet man bei III, IV und V. Diese liegt etwa um den Faktor 10^5 bis 10^6 höher als diejenige gewöhnlicher aliphatischer Ester.

Die entsprechenden Verbindungen mit Glutaminsäure- γ -methylester zeigen eine Hydrolyserate, die höchstens etwa 50mal höher liegt als die des Cbo-Glutaminsäure- γ -methylesters. Die höchste Zerfallsgeschwindigkeit unter den Glutaminsäureestern besitzt Cbo- α -Glutamyl(γ -methylester)-glycin-amid.

Der Mechanismus der Verseifungsreaktion und die Bedeutung der Befunde für den Wirkungsmechanismus esterspaltender Enzyme werden diskutiert.

Summary

The following carbobenzoxy-peptide esters of aspartic acid and glutamic acid were synthesised:

- Cbo- α -asparagyl(β -benzyl ester)-glycyl-glycine-amide (I)
- Cbo- α -asparagyl(β -benzyl ester)-histidine-amide (II)
- Cbo- α -asparagyl(β -benzyl ester)-serine-amide (III)
- Cbo- α -asparagyl(β -benzyl ester)-threonine-amide (IV)
- Cbo- α -asparagyl(β -benzyl ester)-seryl-glycyl-glycine-amide (V)
- Cbo- α -glutamyl(γ -methyl ester)-glycine-amide (VI)
- Cbo- α -glutamyl(γ -methyl ester)-serine-amide (VII)
- Cbo- α -glutamyl(γ -methyl ester)-threonine-amide (VIII)

Some of these Cbo-peptide esters were converted into free peptide amides, which were tested for their action on the *p*-nitrophenyl-acetate hydrolysis.

The rate of hydrolysis of I, II and Cbo-iso-asparagine-methyl ester was in the order of three tenth powers higher than that of Cbo-aspartic acid- β -benzyl ester. A further increase was observed in the rates of hydrolysis of III, IV and V, which were 10^5 – 10^6 times those of ordinary aliphatic esters.

The rates of hydrolysis of the corresponding compounds with glutamic acid- γ -methyl ester were, at the most, approx. 50 times higher than that of Cbo-glutamic acid- γ -methyl ester. Cbo- α -glutamyl(γ -methyl ester)-glycine-amide was the most rapidly hydrolysed of the glutamic acid esters.

The mechanism of the hydrolysis and the relevance of these results to the mechanism of esterase action are discussed.

Dr. Friedhelm Schneider, Physiologisch-Chemisches Institut der Universität, 74 Tübingen, Gmelinstraße 8.
