

Reaktivität cyclischer Dipeptide des Histidins in Beziehung zur Fermentkatalyse*

Von

Friedhelm Schneider

Aus dem Physiologisch-Chemischen Institut der Universität Tübingen

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

(Der Schriftleitung zugegangen am 22. April 1964)

Die Wechselwirkung von funktionellen Gruppen der Eiweißstoffe ist für das Verständnis der molekularen Konfiguration der Proteine und des Mechanismus der enzymatischen Katalyse von grundsätzlicher Bedeutung, denn es wird heute angenommen, daß die enzymatische Katalyse — vor allem der Enzyme ohne Cofaktoren — durch cooperative Effekte der Aminosäureseitenreste nach Art einer multifunktionellen Katalyse zustande kommt¹ und die Tertiärstruktur durch die Primärstruktur determiniert wird; diese bestimmt wiederum, welche Aminosäuren in Wechselwirkung treten können².

Für das Studium solcher Wechselwirkungen sollten sich cyclische Peptide eignen, in denen die Bewegungsfreiheit der Aminosäureseitenketten gegenüber derjenigen linearer Peptide eingeschränkt ist³. Wir haben daher eine Anzahl von *cyclo*-Peptiden, und zwar unsymmetrische Diketopiperazine dargestellt, die außer Histidin noch Aminosäuren enthalten, die für die obige Fragestellung von Interesse sind, u. a. Serin, Tyrosin, Threonin, Asparaginsäure und Methionin. Die *pK*-Werte dieser Verbindungen wurden bestimmt, ihr Verhalten gegenüber *p*-Nitrophenylacetat geprüft und mit demjenigen strukturverwandter Imidazol-derivate verglichen. Im Hinblick auf das Vorkommen von *O*-Acyl-Derivaten als Zwischenprodukte der Fermentkatalyse⁴ haben wir die *O*-Acetyl-Verbindungen des *cyclo*-Histidyl-seryls und *cyclo*-Histidyl-threonyls dargestellt und ihre Verseifungsgeschwindigkeit mit derjenigen einfacher *O*-Acetyl-Derivate des Serins verglichen. Die dabei gewonnenen Ergebnisse werden unter dem Gesichtspunkt des mutmaßlichen Mechanismus enzymatischer Reaktionen diskutiert.

* Auszugsweise vorgetragen auf der deutsch-französischen Biochemiker-Tagung, Straßburg, 20. Sept. 1963.

¹ Literatur s. F. Schneider, diese Z. **332**, 38 [1963].

² C. B. Anfinsen, E. Haber, M. Sela u. F. H. White jr., Proc. nat. Acad. Sci. USA **47**, 1309 [1961].

³ R. Schwyzer in Ciba Foundation Sympos. on Amino Acids and Peptides with Antimetabolic Activity, S. 191, Churchill Ltd., London 1958.

⁴ M. L. Bender, G. R. Schonbaum u. B. Zerner, J. Amer. chem. Soc. **84**, 2540 [1962]; M. L. Bender u. B. Zerner, ebenda **84**, 2550 [1962].

Struktur und Synthese unsymmetrischer Diketopiperazine

Die räumliche Struktur unsymmetrischer Diketopiperazine, die prinzipiell zwei *cis*- und zwei *trans*-Formen zuläßt, die sich jeweils wie Bild und Spiegelbild verhalten, ist in Abb. 1 dargestellt. Die beiden *cis*- und *trans*-Formen bilden jeweils ein racemisches Gemisch. Bestimmend für die Anzahl der Stereoisomeren ist die Zahl der Asymmetriezentren der beteiligten Aminosäuren. Im Rahmen dieser Arbeit wurden die *cis*-Formen untersucht, in denen beide Aminosäuren der L-Reihe angehören. Über mögliche Wechselwirkungen der funktionellen Gruppen unter Ausbildung von H-Brücken im *cyclo*-Histidyl-seryl, *cyclo*-Histidyl-asparagyl, *cyclo*-Histidyl-tyrosyl und *cyclo*-Histidyl-histidyl gibt Abb. 2 Auskunft. Wie sich am Kalottenmodell zeigen läßt, bilden sich diese Molekül-Konfigurationen leicht aus, wobei man aber zunächst nicht ohne weiteres sagen kann, ob und in welchem Ausmaß solche H-Brücken im festen Zustand oder in Lösung auftreten.

Die Synthese unsymmetrischer Diketopiperazine erfolgt durch Cyclisierung der entsprechenden Dipeptidester oder Amide, die beim Kochen in Methanol eintritt⁵. In vielen Fällen tritt Ringschluß auch durch Erhitzen der freien Dipeptide auf über 100° im Vak. über Phosphor-pentoxid ziemlich leicht ein⁶. Die Bildungstendenz dieses Ringsystems ist relativ groß; die Cyclisierung erfolgt mit unterschiedlicher Geschwindigkeit in Abhängigkeit von der Struktur der Peptide. So ist bekannt⁷, daß z. B. Prolyl-histidin-methylester besonders leicht in das Diketopiperazinderivat übergeht (1 Stde. bei 80°), wofür räumliche und induktive Effekte verantwortlich sind. Wir haben die Bildung der Cyclopeptide papierchromatographisch am Verschwinden der Ninhydrinreaktion verfolgt, wobei die ninhydrinnegativen, cyclischen Reaktionsprodukte mit Pauly-Reagenz nachgewiesen wurden.

Racemisierung tritt bei der Synthese der Benzyloxycarbonyldipeptidester und bei der Cyclisierung nicht ein⁸. In allen hier beschriebenen Fällen wurden kristallisierte Endprodukte erhalten; ihre sterische (*cis*-Form) und optische (L-L) Einheitlichkeit ist durch die Synthese gegeben⁹ und wurde papierchromatographisch in vier Lösungsmittelsystemen im Rundchromatogramm geprüft. Von diesen Systemen erlaubt das Gemisch Butanol/Wasser 4:1 die Auftrennung von *cis-trans*-Isomeren⁹, das Gemisch Essigester/Pyridin/Eisessig/Wasser 5:5:1:3 die Trennung racemischer Gemische von Peptiden¹⁰; auch in Pyridin/Wasser

⁵ J. P. Greenstein u. M. Winitz, Chemistry of the Amino Acids, Bd. II, S. 793, John Wiley & Sons, Inc., New York 1961.

⁶ R. W. Holley u. E. Sondheimer, J. Amer. chem. Soc. **76**, 1326 [1954].

⁷ R. H. Mazur u. J. M. Schlatter, J. org. Chemistry **28**, 1025 [1963].

⁸ Siehe l. c.⁵, Bd. II, S. 948 u. 1060.

⁹ K. D. Kopple, R. R. Jarabak u. P. L. Bhatia, Biochemistry **2**, 958 [1963].

¹⁰ E. Taschner, T. Sokolska, J. F. Biernat, A. Chimiak, C. Wasielewski u. B. Rzeszotarska, Liebigs Ann. Chem. **663**, 197 [1963].

65:35 und Butanol/Eisessig/Wasser 4:1:1 erwiesen sich sämtliche Produkte als einheitlich.

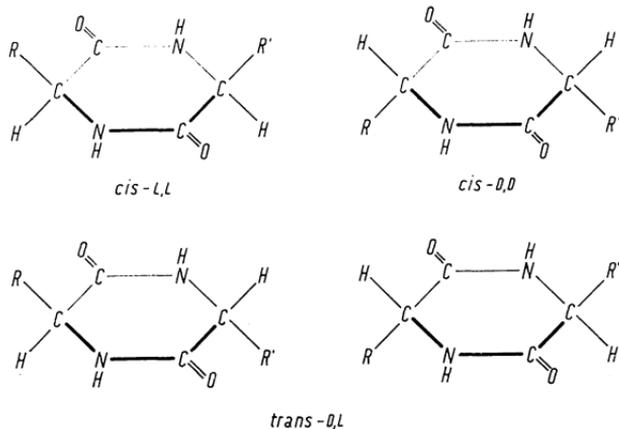


Abb. 1. Struktur unsymmetrischer Diketopiperazine.

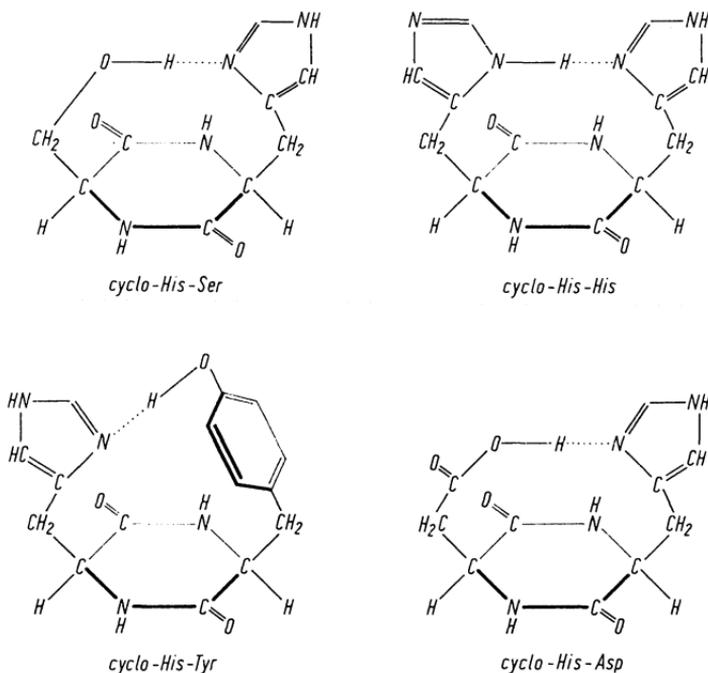


Abb. 2. Mögliche Seitenkettenwechselwirkungen in unsymmetrischen Diketopiperazinen unter Ausbildung von H-Brücken.

Die bei der hydrogenolytischen Abspaltung des Benzyloxycarbonyl-Restes vom Benzyloxycarbonyl-methionyl-histidin-methylester auftretenden Nebenprodukte ließen sich durch je zweimaliges Umkristallisieren aus Äthanol und Wasser abtrennen und man erhielt ein kristallines, einheitliches Endprodukt.

Die Acetylierung der cyclischen serin-, threonin- und tyrosinhaltigen Verbindungen wurde in Essigsäure/Acetanhydrid bei Zimmertemperatur im Dunkeln durchgeführt; Erwärmen führt zu Nebenreaktionen, Lichtwirkung zur Violettfärbung der Lösungen. Der Verlauf der Reaktion kann papierchromatographisch verfolgt werden. Man erhält unter diesen Bedingungen die N_{Im},O -Diacetyl-derivate in kristallisierter Form. Bei der papierchromatographischen Prüfung wird der N_{Im} -Acetylrest abgespalten; daher zeigen die Verbindungen eine positive Pauly-Reaktion. Diese Acetylierungsreaktionen sind imidazolkatalysiert¹¹, denn N -Acetyl-serinamid, -threoninamid oder -tyrosinamid lassen sich unter

Tab. 1. Unsymmetrische Diketopiperazine des Histidins (*cis*-L,L-Formen).

cyclo- Peptid	Formel Molgewicht	Schmp. °C	pK- Werte	Analysen			[α] _D ²³
				C	H	N	
His-Gly	C ₈ H ₁₀ N ₄ O ₂ (194,2)	244—246	6,30	Ber. 49,48 Gef. 49,27	5,17 5,39	28,85 30,10	+ 65° (c = 2,78, Wasser)
His-Leu	C ₁₂ H ₁₈ N ₄ O ₂ · H ₂ O (268,3)	204—206	6,40	Ber. 53,70 Gef. 53,76	7,48 7,50	20,09 20,12	—17,2° (c = 1,16, Wasser)
His-Ser	C ₉ H ₁₂ N ₄ O ₃ (224,2)	209—210	6,27	Ber. 48,20 Gef. 48,20	5,40 5,62	24,98 24,92	—79,6° (c = 2,70, Wasser)
His-Thr	C ₁₀ H ₁₄ N ₄ O ₃ (238,3)	251—252	6,59	Ber. 50,38 Gef. 50,15	5,88 6,08	23,50 23,56	—124,2° (c = 1,2, Wasser)
His-Tyr	C ₁₅ H ₁₈ N ₄ O ₃ (300,3)	274—276	6,48 9,70	Ber. — Gef. —	— —	18,66 18,75	—53° (c = 1,0, Eisessig)
His-Phe	C ₁₅ H ₁₆ N ₄ O ₂ · 1/2H ₂ O (293,3)	267—268	6,50	Ber. 61,12 Gef. 61,13	5,80 5,95	19,10 19,10	—72° (c = 2,0, Eisessig)
His-Met	C ₁₁ H ₁₆ N ₄ O ₂ S (268,3)	217—218	6,21	Ber. 49,23 Gef. 49,19	5,97 5,99	20,88 20,81	—63,8° (c = 2,0, Eisessig)
His-Asp	C ₁₀ H ₁₂ N ₄ O ₄ (252,2)	> 160 sintern	6,43 2,98	Ber. 47,58 Gef. 47,05	4,76 4,82	22,22 22,42	—51,8° (c = 2,0, Wasser)
His-His	C ₁₂ H ₁₄ N ₆ O ₂ (274,3)	300	5,61 6,77	Ber. — Gef. —	— —	30,64 30,57	—38,5° (c = 1,3, Eisessig)

¹¹ H. A. Staab, *Angew. Chem.* **74**, 407 [1962].

denselben Bedingungen mit Acetanhydrid/Essigsäure nur sehr langsam acetylieren. Auch mit einem größeren Überschuß von Acetyl-imidazol in Essigsäure sind diese Acylierungen möglich. Acetyl-imidazol wurde in neuester Zeit¹² auch zur spezifischen Acetylierung von Fermentproteinen verwendet. Über die quantitative Abstufung der Acetylierungsgeschwindigkeit von Derivaten und Peptiden des Serins und Threonins sowie ihre Katalyse durch Imidazolderivate berichten wir in einer folgenden Arbeit. Es soll hier nur erwähnt werden, daß Threoninderivate erheblich langsamer acetyliert werden als die des Serins. Die *cyclo*-Peptide, deren Synthese nachfolgend beschrieben wird, sind in Tab. I zusammengestellt.

Beschreibung der Versuche*

cyclo-Histidyl-glycyl: Benzylloxycarbonyl-glycyl-histidin-methylester¹³ wurde in Methanol in der üblichen Weise mit Pd/Wasserstoff behandelt, der Katalysator abgetrennt und 48 Stdn. unter Rückfluß gekocht. Nach Verdampfen des Lösungsmittels wurde der Rückstand 3mal aus Wasser/Aceton umkristallisiert. Ausb. 40–50%.

cyclo-Histidyl-leucyl

a) Benzylloxycarbonyl-leucyl-histidin-methylester: 3,9 g Benzylloxycarbonyl-leucin-*p*-nitrophenylester¹⁴, 2,6 g Histidin-methylesterdihydrochlorid und 3 ml Triäthylamin wurden nach bekannter Methode in 50 ml Chloroform kondensiert; nach 24 Stdn. wurde bei Zimmertemperatur mit verd. Ammoniak (1:10), danach mit Wasser ausgeschüttelt, mit Natriumsulfat getrocknet und das Lösungsmittel verdampft. Beim Versuch zur Umkristallisation aus Essigester erhielt man eine Gallerte. Ausb. 3,35 g (80% d. Th.); Schmp. 134–135°.

$C_{21}H_{28}N_4O_5$ (416,5) Ber. N 13,47 Gef. N 13,64

b) Abspaltung der Schutzgruppe und Cyclisierung: Nach Abspaltung des Benzylloxycarbonyl-Restes in Methanol mit Pd/Wasserstoff wurde 60 Stdn. unter Rückfluß gekocht, zur Trockne eingedampft und der Rückstand zweimal aus Wasser umkristallisiert. Ausb. 50–60% d. Th.

cyclo-Histidyl-seryl: Benzylloxycarbonyl-histidyl-serin-methylester⁶ wurde von der Schutzgruppe befreit und durch 48stdg. Kochen in Methanol cyclisiert. Nach Entfernen des Lösungsmittels wurde 2mal aus Wasser/Aceton umkristallisiert. Ausb. maximal 60%.

cyclo-Histidyl-threonyl: Benzylloxycarbonyl-threonyl-histidin-methylester¹⁵ wurde wie oben beschrieben behandelt und nach Umkristallisation aus Wasser/Aceton in einer Ausbeute von 55% das cyclische Produkt erhalten.

cyclo-Histidyl-tyrosyl: Darstellung erfolgte nach l. c.⁹ aus Benzylloxycarbonyl-histidyl-tyrosin-methylester. Ausb. 35–45%.

cyclo-Histidyl-histidyl: Darstellung nach l. c.¹⁶ aus Histidin-methylester, wobei die Cyclisierung bei 40–50° durchgeführt wurde. Ausb. 40–50%.

cyclo-Histidyl-methionyl

a) Benzylloxycarbonyl-methionyl-histidin-methylester wurde aus 4,0 g Benzylloxycarbonyl-methionin-*p*-nitrophenylester und 2,64 g

* Es wurden nur L-Aminosäuren verwendet.

¹² R. T. Simpson, J. F. Riordan u. B. L. Vallee, *Biochemistry* **2**, 616 [1963].

¹³ F. Schneider, diese Z. **321**, 38 [1960].

¹⁴ M. Bodansky u. V. Du Vigneaud, *J. Amer. chem. Soc.* **81**, 5688 [1959].

¹⁵ R. B. Merrifield, *J. biol. Chemistry* **232**, 43 [1958].

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

Histidin-methylester-dihydrochlorid und 3 ml Triäthylamin in 50 ml Chloroform erhalten. Aufarbeitung erfolgte wie beim *cyclo*-Histidyl-leucyl beschrieben; umkristallisiert wurde aus Äthanol/Petroläther. Ausb. 3,7 g (85% d. Th.). Schmp. 143—144°.

$C_{20}H_{26}N_4O_5S$ (434,4) Ber. N 12,95 Gef. N 12,73

b) Die Abspaltung des Benzyloxycarbonyl-Restes wurde in Essigsäure innerhalb von zwei Tagen nach viermaligem Wechsel des Katalysators quantitativ erreicht. Danach wurde die Essigsäure soweit wie möglich entfernt und der Rückstand durch 60stdg. Kochen in Methanol unter Stickstoffschutz cyclisiert. Umkristallisiert wurde je 2mal aus Äthanol und Wasser. Ausb. 35—40%.

cyclo-Histidyl-phenylalanyl: Nach Abspaltung der Schutzgruppe vom Benzyloxycarbonyl-phenylalanyl-histidin-methylester¹⁷ wurde durch 60stdg. Kochen in Methanol cyclisiert und nach Entfernen des Lösungsmittels 3mal aus Wasser umkristallisiert. Ausb. 40—50%.

cyclo-Histidyl-asparagyl: Benzyloxycarbonyl- α -asparaginsäure-(β -benzylester)-histidin-methylester¹⁸ wurde in Eisessig/Wasser (90proz.) mit Pd/Wasserstoff behandelt und der erhaltene Asparagyl-histidin-methylester durch 4tägiges Kochen in Methanol cyclisiert. Umkristallisiert wurde 3mal aus Wasser/Aceton. Ausb. 45—50%.

Nim.O-Diacetyl-*cyclo*-histidyl-seryl: 1g *cyclo*-Histidyl-seryl wurde in 50 ml Eisessig gelöst und innerhalb mehrerer Stdn. mit insgesamt 6 ml Acetanhydrid versetzt. Man ließ im Dunkeln 3 Tage bei Zimmertemperatur stehen, dampfte im Vak. zur Trockne ein und kristallisierte aus Methanol/Äther um. Ausb. fast quantitativ. Schmp. 216—217°.

$C_{13}H_{16}N_4O_5$ (308,3) Ber. C 50,07 H 5,20 N 18,15
Gef. C 50,02 H 5,87 N 18,35

O-Acetyl-*cyclo*-histidyl-seryl: Die Diacetylverbindung wurde in Wasser unter Zusatz von etwas Essigsäure gelöst und 24 Stdn. bei Zimmertemperatur stehengelassen. Danach dampfte man im Vak. ein und kristallisierte den Rückstand aus Wasser/Aceton um. Ausb. 80%. Schmp. 156—158°.

$C_{11}H_{14}N_4O_4$ (266,3) Ber. N 21,05 Gef. N 21,03

Nim.O-Diacetyl-*cyclo*-histidyl-threonyl: Die Synthese erfolgte wie bei der Serinverbindung beschrieben; man ließ aber 10—12 Tage bei Zimmertemperatur im Dunkeln stehen. Umkristallisiert wurde aus Äthanol/Äther. Ausb. 75%. Schmp. 198—200°.

$C_{14}H_{18}N_4O_5$ (322,3) Ber. N 17,71 Gef. N 17,54

O-Acetyl-*cyclo*-histidyl-threonyl: Behandlung der Diacetylverbindung wie oben beschrieben, führte zu einem kristallinen Produkt. Ausb. 80%. Schmp. >170° Zers.

$C_{12}H_{16}N_4O_4$ (280,3) Ber. N 19,98 Gef. N 20,12

Benzyloxycarbonyl-methionin-*p*-nitrophenylester: 5,6 g Benzyloxycarbonyl-methionin¹⁹ wurden in 20 ml Essigester gelöst, 3,2 g *p*-Nitrophenol zugesetzt, gekühlt und 4,3 g Dicyclohexylcarbodiimid in 5 ml Essigester zugegeben. Man ließ 1/2 Stde. im Eisbad und 1 Stde. bei Zimmertemperatur stehen. Der Harnstoff wurde abfiltriert, das Filtrat eingedampft und der Rückstand aus Essigester/Petroläther umkristallisiert. Ausb. 6,8 g (84%). Schmp. 97—98°.

$C_{19}H_{20}N_2O_6S$ (404,4) Ber. N 6,94 Gef. N 6,76

¹⁷ G. Losse u. G. Müller, Chem. Ber. **94**, 2768 [1961].

¹⁸ J. Noguchi u. T. Saito in Polyamino Acids, Polypeptides and Proteins, Proc. of an Internat. Sympos. held at the University of Wisconsin, 1961, The University of Wisconsin Press, S. 313, Madison 1962.

¹⁹ C. A. Dekker u. J. S. Fruton, J. biol. Chemistry **180**, 155 [1949].

N,O-Diacetyl-DL-serinamid²⁰ wurde erhalten

a) durch Acetylierung von *N*-Acetyl-DL-serinamid²¹ in Pyridin/Acetanhydrid und Umkristallisation des Produktes aus Äthanol; Schmp. 157—158°.

$C_7H_{12}N_2O_4$ (188,2) Ber. N 14,88 Gef. N 14,92

b) mit Acetanhydrid/Essigsäure/Imidazol: 1,5 g *N*-Acetyl-DL-serinamid wurden in 10 ml Essigsäure gelöst, 100 mg Imidazol und 1,2 ml Acetanhydrid zugesetzt; nach 12 Stdn. bei Zimmertemperatur wurde zur Trockne eingedampft und der Rückstand 2mal aus Äthanol umkristallisiert; Schmp. 157—158°.

N,O-Diacetyl-tyrosinamid: 2 g Tyrosinamid²² wurden in der Mindestmenge Eisessig bei Zimmertemperatur gelöst, 2 ml Acetanhydrid und 150 mg Imidazol zugesetzt. Nach 12 Stdn. bei Zimmertemperatur wurde im Vak. zur Trockne eingedampft und der Rückstand 2mal aus Äthanol umkristallisiert. Ausb. 1,2 g; Schmp. 216—217°.

$C_{13}H_{16}N_2O_4$ (264,3) Ber. N 10,60 Gef. N 10,45

Die *O*-Acylierung läßt sich spektroskopisch am Verschwinden der Absorption bei 275 nm verfolgen.

Unter denselben Reaktionsbedingungen wurde ohne Zusatz von Imidazol nach 3 Tagen bei Zimmertemperatur *N*-Acetyl-tyrosinamid, Schmp. 225—226° (Lit.²³ 226—228°), erhalten.

$C_{11}H_{14}N_2O_3$ (222,2) Ber. N 12,60 Gef. N 12,66

UV-Spektrum mit authent. Probe identisch.

4-[2-Hydroxy-äthyl]-imidazol: Die Synthese erfolgte nach l. c.²⁴; nach 2maliger Destillation besaß das Produkt einen Schmp. von 89—90° und verhielt sich chromatographisch einheitlich.

$C_5H_8N_2O$ (112,1) Ber. N 25,00 Gef. N 24,63

4-[2-Acetoxy-äthyl]-imidazol²⁵: Schmp. 74—75°.

$C_7H_{10}N_2O_2$ (154,1) Ber. N 18,17 Gef. N 18,31

4-Hydroxymethyl-imidazol-hydrochlorid: Die Synthese erfolgte nach l. c.²⁶. Schmp. 108—109°.

$C_4H_8N_2O \cdot HCl$ (134,6) Ber. N 20,80 Gef. N 20,72

4-Acetoxy-methyl-imidazol-hydrochlorid²⁷: Schmp. 137—139°.

$C_6H_8N_2O_2 \cdot HCl$ (176,7) Ber. N 15,95 Gef. N 16,01

Messung der *p*-Nitro-phenylacetat-Hydrolyse: Die *p*-Nitro-phenylacetat-Hydrolyse wurde in 0,066*m* Phosphatpuffer bei pH 8 und 24° gemessen. Die Endkonzentration an *p*-Nitro-phenylacetat betrug $4 \times 10^{-4}m$, an Katalysator 10⁻³*m*. Die Eigenhydrolyse des *p*-Nitro-phenylacetats wurde gesondert bestimmt und berücksichtigt. Weitere Einzelheiten und die Berechnungen der Hydrolysekonstanten siehe l. c.²⁸.

²⁰ B. M. Anderson, E. H. Cordes u. W. P. Jencks, J. biol. Chemistry **236**, 455 [1961].

²¹ E. Rothstein, J. chem. Soc. [London] **1949**, 1968.

²² K. Blau u. S. G. Waley, Biochem. J. **57**, 538 [1954].

²³ D. W. Thomas, R. V. McAllister u. C. Niemann, J. Amer. chem. Soc. **73**, 1548 [1951].

²⁴ W. Reppe u. Mitarbeiter, Liebigs Ann. Chem. **596**, 1 [1955], u. zwar S. 68.

²⁵ Th. C. Bruice u. J. M. Sturtevant, J. Amer. chem. Soc. **81**, 2860 [1959].

²⁶ J. R. Totter u. W. J. Darby, Org. Syntheses **24**, 64 [1944].

²⁷ Th. C. Bruice u. Th. H. Fife, J. Amer. chem. Soc. **83**, 1124 [1961].

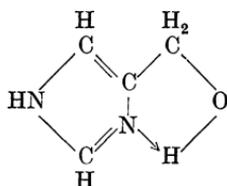
²⁸ F. Schneider, diese Z. **334**, 26 [1963].

Messung der Verseifungsgeschwindigkeit: Die Verseifungsgeschwindigkeit wurde in 20% Dioxan/Wasser bei 24° mit einem Autotitrator der Firma Radiometer, Kopenhagen, gemessen. Die Konzentration an Ester betrug $5 \times 10^{-3} m$. Titriert wurde mit 0,5*n* NaOH unter Stickstoff. 100proz. Spaltung entsprach ein Verbrauch von 0,1 ml Lauge. Weitere Einzelheiten und die Berechnung der Hydrolysekonstanten siehe l. c.²⁹.

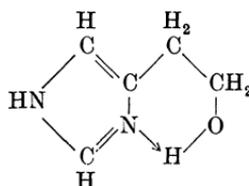
Ergebnisse

p*K*-Werte

Zur Beurteilung der nucleophilen Reaktivität des Imidazolrestes, einer Größe, die für das katalytische Verhalten von Bedeutung ist, wurden die p*K*-Werte durch potentiometrische Titrations ermittelt³⁰. Wie Tab. 1 zeigt, liegen diese mit Ausnahme des *cyclo*-Histidyl-histidyls zwischen 6,1 und 6,6. Die entsprechenden p*K*-Werte von linearen Peptiden mit Histidin als N-terminaler Aminosäure liegen im Bereich von $6,1 \pm 0,2$, mit Histidin als C-terminaler Aminosäure im Bereich von $6,8 \pm 0,1$ und mit Histidin als mittelständiger Aminosäure im Bereich von $6,6 \pm 0,2$ ²⁸. Die p*K*-Werte der cyclischen Peptide liegen also im selben Bereich wie die der linearen Histidylpeptide. Stärkere Abweichungen zeigt das *cyclo*-Histidyl-histidyl, dessen erster p*K*-Wert gegenüber Histidin (p*K* 6,1) um 0,7 erhöht, der zweite um 0,5 erniedrigt ist. Für Histidyl-glycin, Glycyl-histidin und *cyclo*-Histidyl-glycyl betragen die entsprechenden Werte 5,96, 6,79 und 6,30. Der p*K*-Wert des *cyclo*-Histidyl-glycyls ist etwa das arithmetische Mittel aus den p*K*-Werten der entsprechenden linearen Peptide Glycyl-histidin und Histidyl-glycin.



4-Hydroxymethyl-imidazol



4-Hydroxyäthyl-imidazol

Tab. 2. Vergleich der p*K*-Werte linearer und cyclischer Peptide, die zur Bildung von H-Brücken befähigt sind.

lineares Peptid	p <i>K</i> -Wert	<i>cyclo</i> -Peptid	p <i>K</i> -Wert
His-Ser	6,34	<i>cyclo</i> -His-Ser	6,27
His-Tyr	6,22	<i>cyclo</i> -His-Tyr	6,48
	10,04		9,70
His-His	5,40	<i>cyclo</i> -His-His	5,61
	6,81		6,77
His-Asp	6,21	<i>cyclo</i> -His-Asp	6,43
	4,10		2,98
Asp-His	6,82		
	3,02		

²⁹ F. Schneider, diese Z. **332**, 38 [1963].

³⁰ G. Weitzel, J. Engelmann u. A. M. Fretzdorff, diese Z. **315**, 236 [1959].

Verschiebungen von pK -Werten sind unter bestimmten Bedingungen geeignet, über die Bildung von Wasserstoffbrückenbindungen Auskunft zu geben. So ist im 4-Hydroxymethyl-imidazol der pK -Wert des Imidazols infolge Wasserstoffbrückenbildung um größenordnungsmäßig 0,5 Einheiten gesenkt³¹; dasselbe gilt für das 4-Hydroxyäthyl-imidazol, das eine Erniedrigung um etwa 0,3 Einheiten gegenüber dem theoretisch errechneten Wert³¹ zeigt. Diese Verbindungen bieten durch den entstehenden Fünf- bzw. Sechsering besonders günstige Voraussetzungen für eine Wasserstoffbrücke.

Vergleicht man unter diesem Gesichtspunkt die pK -Werte von linearen und cyclischen Peptiden, bei denen die Ausbildung einer H-Brücke möglich ist, so ergibt sich das aus Tab. 2 ersichtliche Bild.

Zum Vergleich sind in Tab. 3 die pK -Werte der oben erwähnten Imidazolderivate und ihrer Acetylierungsprodukte zusammengestellt. Zur Beurteilung der Änderungen der Basizität sind außer Wasserstoffbrückenbindungen noch die induktiven Effekte der Substituenten zu berücksichtigen.

Tab. 3. Vergleich der pK -Werte des 4-Hydroxymethyl- und 4-Hydroxyäthyl-imidazols und ihrer *O*-Acetylderivate.

Imidazolderivat	pK -Wert
4-Methyl-	7,61
4-Hydroxymethyl- .	6,54
4-Hydroxyäthyl- . .	7,26
4-Acetoxyethyl- . .	6,20
4-Acetoxyäthyl- . .	6,97

Die bei den *cyclo*-Peptiden gewonnenen Ergebnisse geben unter Berücksichtigung der Fehlergrenze und der durch die Stellung des Histidins bedingten pK -Wert-Verschiebungen keine Anhaltspunkte für das Vorhandensein von H-Brücken. Vgl. dazu auch die Diskussion in l. c.^{28, 31}.

Verhalten gegenüber *p*-Nitro-phenylacetat*

Für die katalytische Beschleunigung der *p*-Nitro-phenylacetat-Hydrolyse ist in erster Linie der pK -Wert maßgebend. In Tab. 4 sind einige der bei pH 8 und 24° in Phosphatpuffer gemessenen Hydrolysekonstanten wiedergegeben; aufgenommen wurden auch die Kurven für Imidazol, 4-Hydroxymethyl-imidazol, 4-Hydroxyäthyl-imidazol sowie ihrer *O*-Acetylderivate, also Imidazolderivate, die in räumlich günstiger Anordnung eine OH-Gruppe besitzen.

Die katalytischen Wirkungen und ihre Abstufungen liegen im selben Bereich wie die des Histidins und seiner Derivate. Kooperative Effekte, wie man sie auf Grund günstiger sterischer Verhältnisse erwarten könnte, sind aus der Beschleunigung der *p*-Nitro-phenylacetat-Hydrolyse durch

* Literatur-Zusammenfassung s. l. c.²⁸.

³¹ K. D. Kopple u. D. E. Nitecki, J. Amer. chem. Soc. 84, 4457 [1962].

diese Verbindungen nicht zu entnehmen. Das gilt für die *cyclo*-Peptide genau so wie für das 4-Hydroxymethyl- oder 4-Hydroxyäthyl-imidazol. Zwar sinken bei Acetylierung der OH-Gruppe in den letztgenannten Derivaten auch die katalytischen Konstanten, was aber in erster Linie auf die mit der Acetylierung verbundene Senkung der *pK*-Werte zurückzuführen ist (Tab. 3). Obwohl die Geschwindigkeit der *p*-Nitro-phenylacetat-Hydrolyse keine Hinweise auf kooperative Effekte liefert, ergeben sich diese doch aus der Untersuchung der Reaktionsprodukte.

Tab. 4. Geschwindigkeitskonstanten* der *p*-Nitro-phenylacetat-Hydrolyse in Gegenwart von Imidazolderivaten.

	k_2 [l × Mol ⁻¹ × Min. ⁻¹]
4-Acetoxymethyl-imidazol.	3,0
<i>cyclo</i> -Histidyl-leucyl . . .	5,0
<i>cyclo</i> -Histidyl-glycyl . . .	6,6
<i>cyclo</i> -Histidyl-seryl . . .	8,3
Histidin	9,9
<i>cyclo</i> -Histidyl-tyrosyl . . .	10,6
<i>cyclo</i> -Histidyl-histidyl . . .	11,4
4-Hydroxymethyl-imidazol	10,5
4-Acetoxyäthyl-imidazol .	28,3
4-Hydroxyäthyl-imidazol .	33,4

* Zur Berechnung s. 1. c.³².

Wie die papierchromatographische Prüfung der Reaktionsmischung zeigt, kommt es bei Reaktion von *cyclo*-Histidyl-tyrosyl, *cyclo*-Histidyl-seryl, *cyclo*-Histidyl-threonyl, 4-Hydroxymethyl-imidazol und 4-Hydroxyäthyl-imidazol mit *p*-Nitro-phenylacetat zur Acetylierung der OH-Gruppen, und zwar in quantitativ verschiedenem Ausmaß, wobei *cyclo*-Histidyl-threonyl und 4-Hydroxymethyl-imidazol unter gleichen Bedingungen den geringsten Anteil an Acetyl-Verbindung bilden.

Während *O*-Acetylierung von Tyrosin bei Reaktion z. B. von *N*-Acetyl-tyrosinamid mit *p*-Nitro-phenylacetat durch Umesterung eintritt, reagieren *N*-Acetyl-serinamid oder *N*-Acetyl-threoninamid als aliphatische Alkohole unter denselben Bedingungen nicht. Die Acetylierung der OH-Gruppe in *cyclo*-Histidyl-seryl, *cyclo*-Histidyl-threonyl, 4-Hydroxyäthyl-imidazol und 4-Hydroxymethyl-imidazol kommt unter der katalytischen Wirkung des Imidazolrestes zustande, ähnlich wie bei Reaktion mit Acetanhydrid unter sauren Bedingungen. Sowohl bei Reaktion mit *p*-Nitro-phenylacetat als auch Acetanhydrid tritt als energiereiches Zwischenprodukt *N*-Acetyl-imidazol¹¹ auf, das seine Acetylgruppe auf die OH-Gruppe überträgt. Da bei bestimmten Fermentreaktionen *O*-Acyl-Fermente als Zwischenprodukte auftreten, haben wir die *O*-Acetyl-derivate der obengenannten Verbindungen dargestellt,

³² F. Schneider u. M. Liefländer, diese Z. **334**, 279 [1963].

ihre Verseifungsgeschwindigkeit unter Standardbedingungen gemessen und mit derjenigen einfacher *O*-Acetyl-serin-Derivate verglichen.

Verseifungsgeschwindigkeit der *O*-Acetylverbindungen

Die Verseifungsgeschwindigkeiten der *O*-Acetylverbindungen, die bei pH 10 in 20proz. Dioxan/Wasser gemessen wurden, sind in Tab. 5 zusammengestellt. Sie liegen zwischen derjenigen des 4-Acetoxyethylimidazols und des 4-Acetoxyäthylimidazols, wobei bekannt ist, daß letzteres etwa 10mal²³, ersteres etwa 10⁴mal²⁵ schneller gespalten wird als ein gewöhnlicher aliphatischer Ester. Die Verseifungsgeschwindigkeit des *O*-Acetyl-*cyclo*-histidyl-seryls liegt demnach größenordnungsmäßig 10³-mal über derjenigen eines gewöhnlichen aliphatischen Esters; beim *O*-Acetyl-*cyclo*-histidyl-threonyl beträgt der Faktor nur noch etwa 300. Untersucht man die Hydrolysegeschwindigkeit z. B. des *N.O*-Diacetyl-serinamids in Gegenwart der doppelten molaren Menge Imidazols unter gleichen Bedingungen, so findet man keine Erhöhungen. Dieser Befund ist ein Hinweis darauf, daß es sich um eine basenkatalysierte Esterhydrolyse handelt³³.

Tab. 5. Hydrolysekonstanten der *O*-Acetylderivate in 20proz. Dioxan/Wasser, pH 10, Temp. 24⁰.

	$k_{\text{beob.}} \times 10^2$ [Min. ⁻¹]	$k_{\text{OH}} \times 10^{-2}$ [l × Mol ⁻¹ × Min. ⁻¹]
4-Acetoxyäthylimidazol	0,003	0,012
<i>N.O</i> -Diacetyl-serinamid	0,08	0,4
<i>O</i> -Acetyl- <i>cyclo</i> -Histidyl-threonyl	0,10	0,4
<i>O</i> -Acetyl- <i>cyclo</i> -Histidyl-seryl	0,26	1,0
4-Acetoxyethylimidazol	6,95	29,0

Diskussion

Einer der möglichen Wege, auf dem die komplizierten Probleme des Mechanismus der enzymatischen Katalyse angegangen werden können, ist das Studium von Modellreaktionen zur nichtenzymatischen Katalyse. Diese Modellreaktionen besitzen den Vorteil, daß sie erheblich einfacher und übersichtlicher sind.

Besonderes Interesse als Modellsubstanzen haben Imidazolderivate gefunden, da Imidazol an zahlreichen enzymatischen Reaktionen als katalytisch aktive Gruppe — vor allem am Chymotrypsin eingehend studiert — beteiligt ist²⁸. Außer dem Imidazolrest des Histidins ist im Chymotrypsin mindestens noch eine OH-Gruppe des Serins am katalytischen Prozeß beteiligt. Diesen Befunden ist bei der Synthese aller Modellsubstanzen Rechnung zu tragen, die sich mit nichtenzymatischen Analogien der Chymotrypsin-Reaktion befassen.

Die bisher bekannten nichtenzymatischen Katalysatoren auf Imidazolbasis besitzen eine Esteraseaktivität gegenüber *p*-Nitro-phenyl-

³³ M. L. Bender, Chem. Rev. **60**, 53 [1960].

acetat, die etwa drei Zehnerpotenzen unter derjenigen des Chymotrypsins liegt. Dieselbe Aktivität finden wir bei den in dieser Arbeit untersuchten Verbindungen. Das gilt auch für das *cyclo*-Histidyl-seryl und *cyclo*-Histidyl-tyrosyl. Letztere Verbindung wurde auch von Kopple und Mitarbeitern^{9, 31} untersucht. Die Autoren synthetisierten sowohl das *cis*-Isomere *cyclo*-L-Histidyl-L-tyrosyl als auch die optisch inaktiven Formen *cis*- und *trans*-*cyclo*-DL-Histidyl-DL-tyrosyl und fanden, daß bei Reaktion mit *p*-Nitro-phenylacetat die OH-Gruppe des Tyrosins im *cis*-Isomeren mit größerer Geschwindigkeit acetyliert wird als im *trans*-Isomeren, also eine intramolekulare Acylübertragung stattfindet. Diese intramolekularen Acylübertragungen weisen nahe Verwandtschaft zu Teilprozessen der Esterasemechanismen des Chymotrypsins auf, wie sie in der Literatur vorgeschlagen wurden³⁴.

Allen bisher untersuchten Katalysatoren fehlt im Vergleich zum Ferment das Bindungszentrum für das Substrat, das gleichsam ständig eine Erhöhung der Konzentration an Substrat in der Nähe des aktiven Zentrums bewirkt. Es liegen bereits Beobachtungen vor, die vermuten lassen, daß eine solche „Bindung“ von *p*-Nitro-phenylacetat durch aromatische oder quasi-aromatische Reste erfolgen kann über zwischenmolekulare Kräfte, wie man sie z. B. zwischen Phenylalaninresten in Proteinen annimmt. So zeigen Benzyloxycarbonyl-Derivate von Histidin- und Histidylpeptiden größere Aktivität als Histidin und freie Histidylpeptide, wobei die Änderungen der *pK*-Werte für die Erklärung der erhöhten Aktivität nicht ausreichen^{18, 35}. Ähnlich liegen die Verhältnisse z. B. beim Phthalylhistidin, das dieselbe Aktivität wie Imidazol zeigt³⁵; der *pK*-Wert des Imidazols im Phthalylhistidin besitzt zwar denselben Wert wie Imidazol selbst (*pK* 7,0), aber alle Imidazolderivate mit gleichem oder gar erhöhtem *pK*-Wert, jedoch ohne aromatischem Rest, sind weniger aktiv als Imidazol selbst, wie z. B. das 4-Hydroxyäthylimidazol zeigt, das bei einem *pK*-Wert von 7,26 weniger aktiv ist als Imidazol (85proz. der Imidazolwirkung). In den Benzyloxycarbonyl-Derivaten sowie dem Phthalylhistidin könnten die aromatischen Reste eine Art Bindungsfunktion für das Substrat *p*-Nitro-phenylacetat vermitteln. Wenn die beobachteten Effekte auch nicht groß sind, bieten sie doch Hinweise für die Richtung weiterer Untersuchungen.

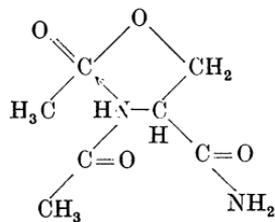
Bei der Beurteilung der Hydrolysegeschwindigkeit der untersuchten *O*-Acetylverbindungen ist zu berücksichtigen, daß die Spaltung des 4-Acetoxyethylimidazols, das von allen geprüften Verbindungen am raschesten zerfällt, nach einem Eliminierungsmechanismus abläuft²⁷, während wir bei den anderen Estern eine intramolekulare basenkatalysierte Hydrolyse annehmen dürfen²⁵.

Bei der Verseifung des *N,O*-Diacetylserinamids ist an eine Beteiligung der Säureamidgruppe zu denken, wie sie bei der Hydrolyse von

³⁴ Th. C. Bruice, Proc. nat. Acad. Sci. USA **47**, 1924 [1961].

³⁵ F. Schneider, unveröffentlichte Versuche.

Benzyloxycarbonyl-Peptidestern der Asparaginsäure gezeigt wurde^{29, 36} (vgl. dazu auch die Untersuchungen von l. c.³⁷). Dabei ist erwartungsgemäß die durch Verlängerung der Peptidkette verursachte Änderung der Basizität der an der Reaktion beteiligten Amidgruppe auf die Hydrolysegeschwindigkeit von Einfluß³⁵.



N,O-Diacetyl-serinamid

Herrn Dr. W. Schaeg danken wir für die Aufnahme der Titrationskurven.

Die Arbeit wurde dankenswerterweise aus den Mitteln des Fonds der Chemischen Industrie unterstützt.

Zusammenfassung

Zur Untersuchung der Seitenkettenwechselwirkung in Peptiden wurden die folgenden *cyclo*-Dipeptide des Histidins dargestellt: *cyclo*-Histidyl-glycyl, -leucyl, -seryl, -threonyl, -tyrosyl, -phenylalanyl, -methionyl, -asparagyl und -histidyl.

Die *pK*-Werte des Imidazolrestes dieser Verbindungen liefern keine Hinweise für die Bildung von Wasserstoffbrücken zwischen der OH-Gruppe des Serins, Threonins oder Tyrosins und dem Imidazolring.

Die katalytische Aktivität der Peptide gegenüber *p*-Nitro-phenylacetat liegt in derselben Größenordnung wie diejenige vergleichbarer linearer Peptide. Die Reaktion mit *p*-Nitro-phenylacetat führt in den serin-, threonin- und tyrosinhaltigen Verbindungen zur Acetylierung der OH-Gruppe infolge einer Übertragung eines Acetylrestes vom Imidazol auf die OH-Gruppe; dieselbe Reaktion läuft bei der Einwirkung von Acetanhydrid in Essigsäure ab.

Die Verseifungsgeschwindigkeit der *O*-Acetylverbindungen des *cyclo*-Histidyl-threonyls und des *cyclo*-Histidyl-seryls wurde bei pH 10 gemessen und mit derjenigen des *N,O*-Diacetyl-serinamids, des Acetoxymethyl- und Acetoxyäthyl-imidazols verglichen. Die Beziehungen dieser Befunde zu Teilprozessen der Chymotrypsinreaktion werden diskutiert.

Summary

In connection with studies on the side chain exchange action in peptides, the following *cyclo*-dipeptides of histidine were prepared: *cyclo*-histidyl-glycyl, -leucyl, -seryl, threonyl, -tyrosyl, -phenylalanyl, -methionyl, -asparagyl and -histidyl.

³⁶ S. A. Bernhard, A. Berger, J. H. Carter, E. Katchalski, M. Sela u. Y. Shalitin, J. Amer. chem. Soc. **84**, 2421 [1962].

³⁷ B. M. Anderson, E. H. Cordes u. W. P. Jencks, J. biol. Chemistry **236**, 455 [1961]; E. Wenger, H. Urheim u. M. Rottenberg, Helv. chim. Acta **45**, 1013 [1962].

The pK values of the imidazole residue of these compounds give no indication of hydrogen bonding between the OH-group of serine, threonine or tyrosine and the imidazole ring.

The catalytic action of the peptides on *p*-nitrophenylacetate is in the same order of magnitude as that of comparable linear peptides. In the reaction with *p*-nitrophenylacetate, the OH-groups of the serine-, threonine- and tyrosine-containing compounds are acetylated by transfer of an acetyl residue from the imidazole; the same reaction occurs by the action of acetic anhydride in acetic acid.

The rate of saponification of the *O*-acetyl compounds of *cyclo*-histidyl-threonyl and *cyclo*-histidyl-seryl was measured at pH 10 and compared with that of *N,O*-diacetyl-serinamide, acetoxymethyl- and acetoxymethyl-imidazole. The relationship of these results to the partial reactions of chymotrypsin is discussed.

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