Zusammenhänge zwischen Struktur, p*K*-Werten und katalytischen Eigenschaften von Imidazolderivaten und Histidylpeptiden*

Von

Friedhelm Schneider

Aus dem Physiologisch-Chemischen Institut der Universität Tübingen
(Direktor: Prof. Dr. Dr. G. Weitzel)

(Der Schriftleitung zugegangen am 1. März 1963)

Herrn Professor Dr. Karl Thomas zum 80. Geburtstag

Zahlreiche Untersuchungen der letzten Jahre haben gezeigt, daß der Imidazolrest des Histidins häufig Teil des aktiven Zentrums von Fermenten ist, d. h. jenes kleinen Bereiches des Fermentproteins, der in unmittelbare Wechselwirkung mit dem Substrat tritt und direkt am katalytischen Prozeß beteiligt ist[1]. Hierzu gehören so verschiedenartige Fermente, wie z. B. bestimmte Esterasen[2] und Proteasen[3], die Phosphorsäureester oder -amid spaltenden Enzyme Ribonuclease[4], Phosphokreatinkinase[5] und Phosphoglucomutase[6], die Fumarat-[7] und Phosphopyruvat-Hydratasen[8] (bisher bekannt als Fumarase und Enolase) sowie die Carbohydrase Galaktosidase[9].

Die zunächst überraschende Tatsache, daß der Imidazolrest — in den meisten Fällen im Zusammenwirken mit weiteren funktionellen Gruppen der in den Fermentproteinen vorhandenen trifunktionellen Aminosäuren — so verschiedenartige Prozesse katalysiert, wie es die erwähnten Fermente demonstrieren, findet ihre Erklärung in den vielfältigen chemischen Möglichkeiten dieses Heterocyclus und seiner Derivate[1].

---

* Auszugsweise vorgetragen auf der Tagung für Physiolog. Chemie, Zürich 1960.

[1] E. A. Barnard u. W. D. Stein, Advances in Enzymol. **20**, 63 [1958].

[2] R. M. Krupka u. K. J. Laidler, J. Amer. chem. Soc. **83**, 1458 [1961].

[3] P. Desnuelle, The Enzymes, Vol. IV, p. 127, Academic Press, London 1960; M. L. Bender, G. R. Schonbaum u. G. A. Hamilton, J. polymer. Sci. **49**, 75 [1961].

[4] D. Findlay, D. G. Herries, A. P. Mathias, B. R. Rabin u. C. A. Ross, Nature [London] **190**, 781 [1961].

[5] B. R. Rabin u. D. C. Watts, Nature [London] **188**, 1163 [1960].

[6] D. E. Koshland, W. J. Ray u. M. J. Erwin, Federat. Proc. **17**, 1145 [1958].

[7] R. A. Alberty, Review mod. Physics **31**, 177 [1959].

[8] F. Wold u. C. E. Ballou, J. biol. Chemistry **227**, 313 [1957].

[9] K. Wallenfels u. Om Prakash Malhotra, The Enzymes, Vol. IV, p. 409, Academic Press, London 1960.

Brought to you by | University of Wisconsin Madison Librari
Authenticated | 128.104.1.219
Download Date | 9/4/12 12:27 PM

So kann Imidazol in einer allgemeinen Basenkatalyse wirksam werden, d. h. als nucleophiler Partner ein Wasserstoffatom, z. B. des Wassers, aufnehmen, es kann in der protonisierten Form als Säurekatalysator wirken, indem es ein Proton zur Verfügung stellt, es kann als nucleophiler Katalysator reagieren, indem das nucleophile Zentrum, der „Pyridinstickstoff", direkt z. B. am Carbonyl-Kohlenstoffatom eines Esters angreift[10]; es kann schließlich als Acyl- oder Phosphoryl-Acceptor unter Bildung energiereicher Zwischenprodukte fungieren, wie sie neuerdings bei der oxydativen Phosphorylierung aufgefunden wurden[11]; auch seine Fähigkeit zur Bildung von Wasserstoffbrückenbindungen[1,12] und Chelatkomplexen[13,14] mit Schwermetallen ist für die katalytischen Funktionen von Bedeutung.

Als leicht zu bestimmende physikalisch-chemische Größe, die über die Basizität oder nucleophile Reaktivität Aufschluß gibt und damit für alle katalytischen Prozesse von Bedeutung ist, kann der pK-Wert des „Pyridinstickstoffs" herangezogen werden. Zur Prüfung der katalytischen Eigenschaften von Imidazolderivaten und Histidylpeptiden läßt sich die Spaltung von Phenylestern, besonders von *p*-Nitrophenyl-acetat, verwenden. Die Hydrolyse dieses Esters wird sowohl durch Enzyme, wie z. B. Chymotrypsin, als auch durch einfache Imidazolderivate beschleunigt[15]. Nach den Untersuchungen von Bruice und Mitarbeitern[16] ist diese Reaktion eine intermolekulare nucleophile Katalyse, bei der als instabiles Zwischenprodukt ein Acetyl-imidazol entsteht, das man spektrophotometrisch nachweisen kann[17] und das den Acetylrest leicht auf einen Acceptor überträgt.

Über die imidazolkatalysierte Spaltung von Phenylacetaten liegen Untersuchungen vor, die sich mit Imidazol selbst und Derivaten des Imidazols befassen[18]. Dagegen ist die Zahl der Untersuchungen, die sich mit den katalytischen Eigenschaften von Histidylpeptiden beschäftigen, bisher gering[19].

Die vorliegende Arbeit befaßt sich mit der strukturbedingten Abstufung der katalytischen Wirkungen von Imidazol- und Histidin-

[10] M. Bender, Chem. Rev. **60**, 53 [1960], u. zwar S. 89, 88 bzw. 82.

[11] P. D. Boyer, M. De Luca, K. E. Ebner, D. E. Hultquist u. J. B. Peter, J. biol. Chemistry **257**, PC 3306 [1962].

[12] A. Lukton, Nature [London] **192**, 433 [1961].

[13] G. Weitzel, F. Schneider, A. M. Fretzdorff u. H. E. Heyke, diese Z. **307**, 14 [1957]; G. Weitzel, F. Schneider u. A. M. Fretzdorff, ebenda **307**, 23 [1957]; G. Weitzel, W. Schaeg u. F. Schneider, Liebigs Ann. Chem. **632**, 124 [1960]; W. Schaeg u. F. Schneider, diese Z. **326**, 40 [1961].

[14] F. Schneider u. W. Schaeg, diese Z. **327**, 74 [1962].

[15] B. S. Hartley u. V. Massey, Annu. Rep. Progr. Chem. **51**, 311 [1954].

[16] Th. C. Bruice u. G. L. Schmir, J. Amer. chem. Soc. **79**, 1663 [1957].

[17] W. L. Koltun, R. N. Dexter, R. E. Clark u. F. R. N. Gurd, J. Amer. chem. Soc. **80**, 4188 [1958].

[18] Th. C. Bruice u. G. L. Schmir, J. Amer. chem. Soc. **80**, 148 [1958].

[19] A. S. Brecher u. A. K. Balls, J. biol. Chemistry **277**, 845 [1957]; A. Lukton u. H. S. Olcott, Biochim. biophysica Acta [Amsterdam] **32**, 267 [1959]; W. Woolley, Federat. Proc. **17**, 275 [1958].

Brought to you by | University of Wisconsin Madison Librari
Authenticated | 128.104.1.219
Download Date | 9/4/12 12:27 PM

derivaten sowie Histidylpeptiden und ihrer Abhängigkeit von den pK-Werten der untersuchten Verbindungen. Dazu war es erforderlich, eine größere Zahl von Derivaten des Imidazols und Histidins sowie Histidylpeptide zu synthetisieren und die pK-Werte durch potentiometrische Titration zu bestimmen.

Synthesen

1. Imidazolderivate

Unter der großen Zahl möglicher Imidazolderivate interessierten uns vor allem solche, deren Basizität gegenüber dem Imidazol durch Substitution deutlich erhöht oder erniedrigt ist, sowie solche, die weitere funktionelle Gruppen mit vorwiegend nucleophilem Charakter besitzen. Hier werden nur die Verbindungen erwähnt, die im Rahmen dieser Arbeit zum ersten Male dargestellt wurden.

2-Guanido-imidazol sowie 2-Guanido-1-methyl-imidazol wurden durch Cyclisierung des Biguanid-acetaldehyd-diäthylacetals erstmalig dargestellt. Das Biguanid-acetal konnte durch Kondensation von Aminoacetal mit Dicyandiamid als roter kristallisierter Kupferkomplex isoliert werden, den man mit Schwefelwasserstoff zerlegte, wobei die Substanz als kristallines Sulfat anfiel. In 4- oder 5-Stellung substituierte 2-Guanido-imidazole sind in der Literatur beschrieben[20]; die dort angegebene Synthese ist jedoch auf die Darstellung der unsubstituierten sowie 1-substituierter 2-Guanido-imidazole nicht anwendbar.

Das 2-Guanido-imidazol gibt im Papierchromatogramm mit Pauly-Reagenz eine blaue Farbe, es reagiert außerdem positiv mit Sakaguchi- und Fearons-Reagenz. Die 1-Methyl-Verbindung reagiert nicht mit Pauly-Reagenz, gibt aber eine Farbreaktion mit Jodlösung, sowie Sakaguchi- und Fearons-Reagenz.

Während zahlreiche Derivate des Imidazols mit Mercapto-Substitution in 2-Stellung bekannt sind, wurde bisher kein Imidazolderivat beschrieben, das eine SH-Gruppe in einer Seitenkette trägt wie z. B. 4-[Mercapto-methyl]-imidazol oder 4-[2-Mercapto-äthyl]-imidazol.

Wir haben Versuche zur Darstellung dieser Verbindungen unternommen. Zur Einführung der SH-Gruppe wurden Benzylmercaptan und Thioharnstoff verwendet, wobei mit 4-Chlormethyl-imidazol das 4-[Benzylmercapto-methyl]-imidazol-hydrochlorid[21], mit Thioharnstoff das S-[Imidazolyl(4)-methyl]-isothioharnstoff-dihydrochlorid[22] entstehen. Die Abspaltung des Benzylrestes führte man auf dem üblichen Weg mit Natrium in flüssigem Ammoniak durch. Es konnte jedoch kein 4-[Mercapto-methyl]-imidazol isoliert werden. Auch die alkalische Spaltung des Isothioharnstoff-Derivates, die unter verschiedenen Bedingungen durchgeführt wurde, lieferte nicht das gewünschte Produkt, jedoch eine kristallisierte Verbindung, die sich auf Grund der Analysenwerte und Ti-

[20] T. O. Noris u. R. L. Mc Kee, J. Amer. chem. Soc. **77**, 1056 [1955].
[21] R. A. Turner, Ch. F. Huebner u. C. R. Scholz, J. Amer. chem. Soc. **71**, 2801 [1949].
[22] R. A. Turner, J. Amer. chem. Soc. **70**, 3523 [1948].

Brought to you by | University of Wisconsin Madison Librar
Authenticated | 128.104.1.219
Download Date | 9/4/12 12:27 PM

trationskurve als Bis-[Imidazolyl(4)-methyl]-sulfid erwies und in einer Ausbeute von etwa 40% anfiel. Sie gab eine positive Pauly-Reaktion.

Um dieselben Umsetzungen mit 4-[2-Chlor-äthyl]-imidazol durchzuführen, mußte zunächst das 4-[2-Hydroxy-äthyl]-imidazol dargestellt werden. Die Synthese dieser Verbindung ist relativ mühsam. Nachdem eine Weidenhagen-Synthese über 2-Oxo-butandiol-(1.4), wie sie von Bruice und Sturtevant[23] angegeben wird, keine befriedigenden Ergebnisse lieferte, haben wir die Substanz nach Turner[24] aus α-Amino-butyrolacton dargestellt und anschließend die Chlorverbindung mit Benzylmercaptan oder Thioharnstoff kondensiert. 4-[2-Chlor-äthyl]-imidazol ist erwartungsgemäß viel weniger reaktionsfähig als die entsprechende Chlormethyl-Verbindung. Als Kondensationsprodukte erhielt man *S*-[2-Imidazolyl-(4)-äthyl]-isothioharnstoff-dihydrochlorid und 4-[2-Benzylmercapto-äthyl]-imidazol-hydrochlorid. Versuche zur alkalischen Spaltung des Isothiuronium-Salzes führten bisher noch nicht zu einem einheitlichen Reaktionsprodukt.

2. Derivate des Histidins

Die Synthesen des Histidin-hydrazids[25], 1-Benzyl-histidinamids[14], des Imidazolyl-glycins[26] und einiger Derivate wurden von uns bereits früher beschrieben. Dagegen ist das DL-Homohistidin bisher nicht in der Literatur bekannt. Wir erhielten die Verbindung durch Kondensation von 4-[2-Chlor-äthyl]-imidazol mit Acetaminomalonsäure-dimethylester[27] und nachfolgende Säurespaltung als Dihydrochlorid, das sich im Papierchromatogramm und bei der potentiometrischen Titration einheitlich verhielt.

3. Peptidsynthesen

Die Synthese der in dieser Arbeit untersuchten Peptide wurde mit Ausnahme des Histidyl-tyrosins bereits an anderer Stelle beschrieben[25,28].

Beschreibung der Versuche

In Tab. 1 sind die verwendeten bekannten Imidazolverbindungen zusammengestellt.

2-Guanido-imidazol-dihydrochlorid

a) Biguanid-acetaldehyd-diäthylacetal: 15,4 g Aminoacetal*, 5 g Dicyandiamid und 5 g Kupfersulfat wurden in 50 m*l* Wasser im geschlossenen Kolben 3 Stdn. auf 80° erhitzt, das gebildete Kupfersalz durch Zugabe von viel Wasser gelöst, filtriert und auf ein kleines Volumen eingedampft. Dabei erfolgte Kristallisation; man kristallisierte noch einmal aus Wasser um, löste in heißem Wasser und fällte mit Schwefelwasserstoff. Nach Abtrennung des Kupfersulfids wurde mit Kohle geklärt, eingedampft und aus Wasser umkristallisiert. Schmp. 163°; Ausb. 6 g.

$C_8H_{19}N_5O_2 \cdot {}^1/_2H_2SO_4$ (266,2) Ber. N 26,30 Gef. N 26,61

Der Gehalt an Schwefelsäure schwankt zwischen $^1/_2$ und $1\,H_2SO_4$: Das Produkt zeigt im Papierchromatogramm mit Sakaguchi- und Fearons-Reagenz einen Flecken.

---

* Handelspräparat der Fa. Cilag, Schaffhausen.

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

[24] R. A. Turner, J. Amer. chem. Soc. **71**, 3476 [1949].

[25] F. Schneider, diese Z. **320**, 82 [1960].

[26] F. Schneider, diese Z. **324**, 206 [1961].

[27] H. Hellmann u. F. Lingens, diese Z. **297**, 283 [1954].

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

Brought to you by | University of Wisconsin Madison Librari
Authenticated | 128.104.1.219
Download Date | 9/4/12 12:27 PM

Tab. 1. Verwendete Imidazolderivate.

	Schmp.	Bruttoformel	Mol.-Gew.	N Ber.	N Gef.
Imidazol*	90°	$C_3H_4N_2$	68,05	—	—
1-Methyl-imidazolium-nitrat[29]	68—69°	$C_4H_6N_2 \cdot HNO_3$	145,1	28,27	28,30
2-Methyl-imidazol[30]	140—141°	$C_4H_6N_2$	82,1	34,2	34,2
4.5-Dimethyl-imidazol[31]	119—120°	$C_5H_8N_2$	96,1	29,14	29,21
Imidazolyl-(4)-essigsäure · HCl[32]	225—226°	$C_5H_6N_2O_2 \cdot HCl$	162,1	17,18	17,40
Imidazol-carbonsäure-(4)[33]	282—283°	$C_4H_4N_2O_2$	112,1	25,00	24,90
4-Nitro-imidazol[34]	312—313°	$C_3H_3N_3O_2$	113,1	37,20	37,48
4-Nitro-2-methyl-imidazol[34]	254°	$C_4H_5N_3O_2$	127,1	33,00	33,30
2-Amino-imidazol · HCl[35]	154—155°	$C_3H_5N_3 \cdot HCl$	119,6	35,10	35,00
2-Amino-1-methyl-imidazol · HCl[35]	84°	$C_4H_7N_3 \cdot HCl \cdot H_2O$	151,6	26,10	25,90
Imidazol-aldehyd-(4)[34]	173—174°	$C_4H_4N_2O$	96,1	29,10	29,18
Imidazol-dicarbonsäure-(4.5)[34]	288°	$C_5H_4N_2O_4$	156,1	18,01	18,10
2-Mercapto-imidazol[36]	225—227°	$C_3H_4N_2S$	100,1	28,00	28,00
2-Mercapto-1-methyl-imidazol**	143—144°	$C_4H_6N_2S$	114,1	—	—
2-Mercapto-4-methyl-imidazol[37]	244—245°	$C_4H_6N_2S$	114,1	24,00	23,80
2-Mercapto-1-methyl-4-carboxymethyl-imidazol[38]	193—194°	$C_6H_8N_2O_2S$	172,2	—	—
S-[Imidazolyl-(4)-methyl]-isothioharnstoff · 2HCl[22]	228—229°	$C_5H_8N_4S \cdot 2HCl$	229,2	24,39	24,40
4-[2-Chlor-äthyl]-imidazol · HCl[24]	121—122°	$C_5H_7ClN_2 \cdot HCl$	167,2	—	—

* Präparat der Fa. Bayer.
** Präparat der Fa. Asta, Brackwede.

[29] M. Häring, Helv. chim. Acta **42**, 1845 [1959].
[30] J. W. Cornforth, u. H. T. Huang J. chem. Soc. [London] **1948**, 1960.
[31] R. Weidenhagen, R. Herrmann u. H. Wegner, Ber. dtsch. chem. Ges. **70**, 570 [1937].
[32] H. Bauer u. H. Tabor, Biochem. Prep., Vol. V, p. 97, J. Wiley & Sons, London 1957.
[33] F. Pyman, J. chem. Soc. [London] **109**, 191 [1916].
[34] R. G. Fargher u. F. Pyman, J. chem. Soc. [London] **115**, 217 [1919].
[35] A. Lawson, J. chem. Soc. [London] **1956**, 307.
[36] W. Marckwald, Ber. dtsch. chem. Ges. **25**, 2354 [1892].
[37] S. Gabriel u. G. Pinkus, Ber. dtsch. chem. Ges. **26**, 2197 [1893]; S. Gabriel u. J. Colman, ebenda **35**, 3805 [1902].
[38] R. G. Jones, J. Amer. chem. Soc. **71**, 644 [1949].

Brought to you by | University of Wisconsin Madison Librari
Authenticated | 128.104.1.219
Download Date | 9/4/12 12:27 PM

Tab. 2. Verwendete Histidinderivate.

	Schmp.	Bruttoformel	Mol.-Gew.	N Ber.	N Gef.
L-Histidin*	—	$C_6H_9N_3O_2$	155,1	—	—
L-Histidin-methylester · 2HCl[39]	199—200°	$C_7H_{11}N_3O_2 \cdot 2HCl$	242,2	—	—
L-Histidinamid · HCl[40]	233°	$C_6H_{10}N_4O \cdot HCl$	190,5	29,41	29,67
L-Histidin-hydrazid[25]	120—121°	$C_6H_{11}N_5O$	169,1	41,40	41,15
L-Histidinol · 2HCl[41]	196—197°	$C_6H_{11}N_3O \cdot 2HCl$	214,1	19,62	19,78
DL-Histidin-anhydrid[42]	—	$C_{12}H_{14}N_6O_2 \cdot H_2O$	310,2	27,13	27,50
Histamin · 2HCl*	—	$C_5H_8N_3 \cdot 2HCl$	183,2	—	—
4-Aminomethyl-imidazol · 2HCl[21]	245—247°	$C_4H_7N_3 \cdot 2HCl$	170,2	24,70	24,60
N^{α}-Acetyl-DL-histidin[43]	169°	$C_8H_{13}N_3O_4$	215,2	—	—
1-Methyl-DL-histidin[44]	268—270°	$C_7H_{11}N_3O_2$	169,1	24,80	24,75
1-Methyl-DL-histidin-methylester · 2HCl	193°	$C_8H_{13}N_3O_2 \cdot 2HCl$	256,2	16,40	16,48
Triazolyl-(3)-DL-alanin[45]	263—264°	$C_5H_8N_4O_2$	156,1	35,88	35,85
Spinacin[46]	265°	$C_7H_9N_3O_2$	167,1	—	—
Pyrazolyl-(3)-alanin[47]	226—228°	$C_6H_9N_3O_2$	155,1	27,11	27,00
Imidazolyl-(2)-alanin[48]	254—255°	$C_6H_9N_3O_2$	155,1	27,10	27,10
Imidazolyl-(4)-glycin[26]	225°	$C_5H_7N_3O_2$	141,1	29,80	30,02

* Präparat der Biochimica Roche.

[39] N. C. Davis, J. biol. Chemistry **223**, 935 [1956].
[40] L. Levintow, V. E. Price u. J. P. Greenstein, J. biol. Chemistry **184**, 55 [1950].
[41] H. Bauer, E. Adams u. H. Tabor, Biochem. Prep. Vol. IV. p. 46, J. Wiley & Sons, London 1955.
[42] E. Fischer u. U. Suzuki, Ber. dtsch. chem. Ges. **38**, 4173 [1905].
[43] A. Neuberger, Biochem. J. **32**, 1452 [1938].
[44] R. G. Jones, J. Amer. chem. Soc. **71**, 2444 [1949].
[45] R. G. Jones u. C. Ainsworth, J. Amer. chem. Soc. **77**, 1538 [1955].
[46] D. Ackermann u. S. Skraup, diese Z. **284**, 129 [1949].
[47] R. G. Jones, J. Amer. chem. Soc. **71**, 3994 [1949].
[48] R. G. Jones, J. Amer. chem. Soc. **71**, 383 [1949].

Brought to you by | University of Wisconsin Madison Library
Authenticated | 128.104.1.219
Download Date | 9/4/12 12:27 PM

b) Cyclisierung: 5 g Biguanid-acetal-sulfat wurden in 30 m*l* heißem Wasser gelöst und mit Bariumchlorid die Schwefelsäure entfernt. Die Lösung wurde zur Trockne eingedampft und in 10 m*l* konz. Salzsäure gelöst. Man erhitzte 15 Min. auf dem Wasserbad und verdampfte die Säure im Vakuum. Der Rückstand kristallisierte beim Behandeln mit Äthanol. Ausbeute praktisch quantitativ. Schmp. 248—250°.

$C_4H_7N_5 \cdot 2HCl$ (198,2)	Ber.	C 24,21	H 4,58	Cl 35,85	N 35,33
	Gef.	C 24,62	H 4,34	Cl 35,43	N 35,51

2-Guanido-1-methyl-imidazol-sulfat

a) Methyl-biguanid-acetaldehyd-diäthylacetal: 16 g Methylaminoacetal*, 5 g Dicyandiamid und 5 g Kupfersulfat wurden in 50 m*l* Wasser wie oben beschrieben zur Reaktion gebracht und das rote Kupfersalz mit Schwefelwasserstoff zerlegt. Das erhaltene Produkt wurde aus Äthanol umkristallisiert. Schmp. 180°; Ausb. 5 g.

$C_9H_{21}N_5O_2 \cdot {}^1/_2H_2SO_4$ (280,3) Ber. N 25,00 Gef. N 24,72

b) Cyclisierung: Die Cyclisierung wurde in konz. Salzsäure durchgeführt und das Produkt durch Behandeln mit Äthanol in kristallisierter Form erhalten. Ausb. fast quantitativ. Schmp. 217—218°.

$C_5H_9N_5 \cdot H_2SO_4 \cdot H_2O$ (255,2)	Ber.	N 27,42	H_2O 7,0
	Gef.	N 27,51	H_2O 5,8

Das Dihydrochlorid, das man durch Umsetzung mit Bariumchlorid erhält, hat einen Schmp. von 208—209°.

$C_5H_9N_5 \cdot 2HCl$ (212,2) Ber. N 33,00 Gef. N 32,91

Bis-[Imidazolyl-(4)-methyl]-sulfid: 8 g (35 mMol) des *S*-[Imidazolyl-(4)-methyl]-isothioharnstoff-dihydrochlorids wurden mit 53 m*l* 2*n* NaOH 2 Tage bei Zimmertemperatur belassen. Danach wurde mit Essigsäure angesäuert. Nach einigen Stdn. beginnt die Kristallisation. Die Kristalle wurden abfiltriert, mit Wasser gewaschen und getrocknet. Schmp. 185°; Ausb. 3 g.

$C_8H_{10}N_4S$ (194,2)	Ber.	C 49,50	H 5,15	N 28,86	S 16,50
	Gef.	C 49,66	H 5,18	N 28,80	S 16,71

S-[2-Imidazolyl-(4)-äthyl]-isothioharnstoff-dihydrochlorid: 760 mg (10 mMol) Thioharnstoff und 1,67 g (10 mMol) 4-[2-Chlor-äthyl]-imidazol-hydrochlorid wurden in 15 m*l* absol. Äthanol 48 Stdn. unter Rückfluß gekocht. Man ließ über Nacht im Kühlschrank stehen und kristallisierte das ausgefallene Produkt zweimal aus Äthanol um. Schmp. 205—207°; Ausb. 1,9 g (80% d. Th.).

$C_6H_{10}N_4S \cdot 2HCl$ (243,2)	Ber.	C 29,61	H 4,93	N 23,02	S 13,16
	Gef.	C 30,32	H 4,94	N 23,01	S 13,21

4-[2-Benzylmercapto-äthyl]-imidazol-hydrochlorid: 2,5 g Benzylmercaptan (20 mMol) wurden in 20 m*l* 1*m* methanol. Natriummethylat und 20 m*l* absol. Äthanol unter Rühren und Kochen mit einer Lösung von 1,67 g (10 mMol) 4-[2-Chlor-äthyl]-imidazol-hydrochlorid in 20 m*l* absol. Äthanol versetzt. Man kochte 4 Stdn. unter Rückfluß, säuerte mit alkohol. Salzsäure an, trennte das Natriumchlorid ab und dampfte die Lösung zur Trockne ein. Der Rückstand wurde in Wasser gelöst, mit Äther ausgeschüttelt und mit einer siedenden Lösung von 2,6 g Pikrinsäure in 60 m*l* Wasser versetzt. Das ausgefallene Pikrat wurde zweimal aus Wasser umkristallisiert. Schmp. 118—120°.

---

* Handelspräparat der Fa. Cilag, Schaffhausen.

Brought to you by | University of Wisconsin Madison Librari
Authenticated | 128.104.1.219
Download Date | 9/4/12 12:27 PM

Man suspendierte das Pikrat in konz. Salzsäure und schüttelte bis fast zur Farblosigkeit mit Äther aus. Die Lösung wurde mit Kohle geklärt, zur Trockne eingedampft und der Rückstand zweimal aus absol. Äthanol/Äther umkristallisiert, Schmp. 100—101°.

$C_{12}H_{14}N_2S \cdot HCl$ (254,7) Ber. C 56,60 H 5,90 N 11,00 Cl 13,95
Gef. C 56,09 H 5,92 N 11,00 Cl 13,75

Die verwendeten Histidinderivate sind, soweit sie schon bekannt waren, in Tab. 2 angeführt.

DL-Homohistidin: 2,53 g (110 mMol) Natrium werden in 40 m*l* absol. Äthanol gelöst, 13,8 g Acetaminomalonsäure-dimethylester[27] (73 mMol) zugesetzt, im Eisbad gekühlt und innerhalb von 30 Min. 6 g 4-[2-Chlor-äthyl]-imidazol-hydrochlorid in 70 m*l* absol. Äthanol zugetropft, danach 2 Stdn. bei Zimmertemperatur gerührt und 3 Stdn. auf dem Wasserbad erhitzt. Man dampft im Vak. ein und löst den Rückstand in kalter 2*n* HCl, schüttelt 3mal mit Essigester aus und macht die wäßr. Phase mit Natriumhydrogencarbonat alkalisch. Man extrahiert die alkalische Lösung 3mal mit Chloroform und erhält nach Verdampfen des Chloroforms einen Rückstand, der nach Umkristallisation aus Äthanol papierchromatographisch einheitlich ist (Pauly-Reagenz) und einen Schmp. von 116—118° besitzt.

3,6 g des Kondensationsproduktes werden in 20 m*l* konz. HCl 20 Stdn. unter Rückfluß gekocht, im Vak. eingedampft und in Wasser gelöst, abgedampft und diese Prozedur so oft wiederholt, bis fast alle überschüssige Salzsäure entfernt ist. Der amorphe Rückstand wird aus Äthanol/Äther umkristallisiert. Schmp. 192 bis 195°.

Die Substanz verhält sich papierchromatographisch einheitlich in Butanol/Eisessig/Wasser 4:1:1 und Pyridin/Wasser 65:35. Sie reagiert positiv mit Ninhydrin und Pauly-Reagenz und zeigt bei der potentiometrischen Titration das berechnete Äquivalentgewicht. p*K*-Werte s. Tab. 4.

$C_7H_{11}N_3O_2 \cdot 2HCl$ (242,2) Ber. N 17,33 Cl 29,30 Gef. N 17,15 Cl 29,20

Carbobenzoxy-L-histidyl-L-tyrosin* wurde durch Verseifung des Cbo-Peptidesters[49] in Methanol mit der äquivalenten Menge Natronlauge auf dem üblichen Wege erhalten. Nach Neutralisation mit der äquivalenten Menge Säure kristallisierte das Produkt beim Einengen der Lösung aus. Umkristallisiert wurde aus Äthanol; papierchromatographisch einheitlich (Pauly-Reagenz). Schmp. 238—239°.

$C_{23}H_{24}N_4O_6$ (452,3) Ber. N 12,41 Gef. N 12,40

L-Histidyl-L-tyrosin: Die Abspaltung der Schutzgruppe erfolgte mit Palladium/Wasserstoff in 80proz. Eisessig. Umkristallisiert wurde aus Wasser/Äthanol. Die Verbindung verhielt sich im Chromatogramm und bei der potentiometrischen Titration einheitlich. Schmp. 179—180°.

$C_{15}H_{18}N_4O_4$ (318,3) Ber. N 17,60 Gef. N 17,44

Bestimmung der p*K*-Werte

Man titrierte in einem thermokonstanten Raum bei 25° unter reinstem, mit 50proz. Kalilauge gewaschenem Stickstoff mit 0,5*n* KOH. Zur pH-Messung diente der Titrator (TTTl) mit Titrigraph (SBR2) der Firma Radiometer, Kopenhagen. Die p*K*-Werte wurden den Titrationskurven direkt entnommen. Weitere Einzelheiten s. l. c.[50].

---

* Cbo = Carbobenzoxy.

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

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

Brought to you by | University of Wisconsin Madison Libra
Authenticated | 128.104.1.219
Download Date | 9/4/12 12:27 PM

Messung der *p*-Nitrophenyl-acetat-Hydrolyse

Die Spaltung der *p*-Nitrophenyl-acetats[51] (Schmp. 80—81°) und des Cbo-Aminosäure-*p*-nitrophenylesters wurde spektrophotometrisch bei 402 nm mit einem Zeiss-Spektralphotometer in 0,066*m* Phosphatpuffer verfolgt. Gemessen wurde gegen Pufferlösung ohne Zusatz von Imidazolkörper, da bei 402 nm keiner der Katalysatoren Eigenabsorption besitzt. Die Küvettenkammer des Spektralphotometers wurde mit Hilfe eines Thermostaten mit Wasser von 24 ± 1° durchströmt, im selben Thermostaten wurde die Pufferlösung gehalten. Der Ablauf der Reaktion wurde mit einer Stoppuhr verfolgt, beginnend mit der Zugabe des *p*-Nitrophenyl-acetats, das in einer Konzentration von 0,125*m* in Aceton gelöst war. Die Endkonzentration an *p*-Nitrophenyl-acetat betrug bei pH 6,2 $25 \times 10^{-4}m$, bei pH 7,5 und pH 8 $12{,}5 \times 10^{-4}m$; die Endkonzentration an Katalysator betrug bei pH 6,2 $6 \times 10^{-4}m$, bei pH 7,5 $3 \times 10^{-4}m$, bei pH 8 $1{,}5 \times 10^{-4}m$. Innerhalb der gemessenen Zeiten wurden in allen Fällen Geraden erhalten, wenn man die Extinktion gegen die Zeit auftrug. Der für die Berechnung der relativen Konstanten erforderliche E_∞-Wert wurde durch Messung der Extinktion bis zum praktisch konstanten Wert ermittelt. E_0 wurde der jeweiligen Geraden entnommen.

Zur Berechnung der in den Tabellen aufgeführten relativen Konstanten, wurde $\lg [(E_\infty - E_0)/(E - E_t)]$ gegen die Zeit aufgetragen und die Neigung der Geraden bestimmt nach

$$\lg \frac{E_\infty - E_0}{E_\infty - E_{t_2}} - \lg \frac{E_\infty - E_0}{E_\infty - E_{t_1}} = k\,(t_2 - t_1).$$

Von der so erhaltenen Konstante wurde die Konstante der Eigenhydrolyse (ohne Zusatz von Katalysator) abgezogen und die erhaltenen Werte durch die Konstante des Imidazols* geteilt und mit 10 multipliziert. Dadurch wurden alle Werte bezogen auf den Wert für Imidazol = 10. Die maximalen Schwankungen der gemessenen Werte betrugen ± 4%.

Die Cbo-Aminosäure-*p*-Nitrophenylester wurden in Puffer, der 40% Dioxan enthielt, und einer Konzentration von $6{,}25 \times 10^{-4}m$ gemessen. Die Konzentration des Katalysators betrug $6 \times 10^{-4}m$.

Ergebnisse

I. Katalyse durch Imidazolderivate

In Tab. 3 sind die relativen Hydrolysekonstanten einiger Imidazolderivate zusammengestellt. Nicht aufgenommen sind die Derivate, deren katalytische Wirkung bei pH 7,5 gegenüber der des Imidazols auf 5% oder weniger abgefallen ist. Aus den Messungen sind die folgenden Gesetzmäßigkeiten zu entnehmen:

1. Substitution in 2-Stellung führt in jedem Fall zur Erniedrigung der katalytischen Wirkung, auch dann, wenn es zur Erhöhung des p*K*-Wertes kommt wie beim 2-Methyl-imidazol. Hierfür sind sterische Gründe verantwortlich. Die Annäherung des nucleophilen Stickstoffatoms an den Ester wird behindert.

2. Substitution in 4- und 5-Stellung bewirkt Erniedrigungen der katalytischen Aktivität wie Substitution in 2-Stellung. Obwohl z. B. in 4.5-Dimethyl-imidazol der p*K*-Wert auf 8,3 erhöht ist, sinkt die relative

* Absolutwerte für die Konstanten des Imidazols finden sich l. c.[16] und bei M. L. Bender u. B. W. Turnquist, J. Amer. chem. Soc. **79**, 1652 [1957].

[51] A. Kaufmann, Ber. dtsch. chem. Ges. **42**, 3480 [1909].

Brought to you by | University of Wisconsin Madison Librari
Authenticated | 128.104.1.219
Download Date | 9/4/12 12:27 PM

Tab. 3. Relative Geschwindigkeitskonstanten der *p*-Nitrophenyl-acetat-Hydrolyse unter Katalyse durch Imidazolderivate sowie deren p*K*-Werte. (Für alle pH-Werte gilt Imidazol = 10.)

Imidazolderivat	$k_{rel.}$ pH 6,2	pH 7,5	pH 8	$pK_N \leqslant$
Imidazolyl-(4)-essigsäure	3,9	6,8	4,6	7,46
1-Methyl-imidazol	9,0	11,5	9,7	7,25
Imidazol-carbonsäure-(4)	3,0	1,3	—	6,15
4-Nitro-imidazol	0,8	3,9	10	—0,05[52]
4.5-Dimethyl-imidazol	0,5	1,2	—	8,28
2-Amino-imidazol	0,2	1,5	5,3	2,23
2-Methyl-imidazol	0,8	1,0	—	7,86
4-Nitro-2-methyl-imidazol	0,4	0,6	1,9	1,59[52]
2-Amino-1-methyl-imidazol	1,0	2,0	—	1,5
Bis-[imidazolyl-(4)-methyl]-sulfid	—	10	—	6,56 6,88

Geschwindigkeitskonstante bei pH 7,5 auf $^1/_{10}$ des Imidazol-Wertes. In den 4.5-disubstituierten Imidazolen schirmen die Substituenten die Stickstoffatome in noch stärkerem Maße ab als in den 2-substituierten.

3. Diejenigen Imidazolderivate, in denen durch Substitution nicht nur der p*K*-Wert des „Pyridinstickstoffs" unter 4, sondern auch der des „Pyrrolstickstoffs" erheblich gesenkt ist, zeigen insofern ein besonderes Verhalten, als bei ihnen das Anion katalytisch wirksam wird. Dieser Vorgang macht sich vor allem bei höheren pH-Werten bemerkbar, so daß z. B. bei pH 8 4-Nitro-imidazol ein ebenso wirksamer Katalysator ist wie Imidazol. Der p*K*-Wert des „Pyridinstickstoffs" ist in 4-Nitro-imidazol auf —0,5 gesenkt (Imidazol 7,0) der des „Pyrrolstickstoffs", auf 9,1 (Imidazol 14,5). Bei pH 8 liegen demnach etwa 10% des 4-Nitro-imidazols als Anion vor. Einführung einer Methylgruppe in 2-Stellung bewirkt auch hier einen starken Abfall der katalytischen Aktivität aus den oben dargelegten Gründen.

4. Die Änderung der katalytischen Wirkung in Abhängigkeit vom pH-Wert wird bei den Verbindungen, die keiner sterischen Hinderung unterliegen, vorwiegend durch den p*K*-Wert bestimmt, der den Protonisierungsgrad festlegt. Verbindungen mit p*K*-Werten < 4 liegen von pH 6 an praktisch vollständig entprotonisiert vor, während Verbindungen mit einem p*K*-Wert von 7 z. B. bei pH 6 nur noch zu 10% als freie Base vorliegen. Katalytisch wirksam ist aber nur die freie Base. Verbindungen mit niedrigem p*K*-Wert sind deshalb schwache Katalysatoren, weil ihr nucleophiler Charakter, der für die Katalyse entscheidend ist, zu stark abgeschwächt ist. Bei pH 8 werden die Verbindungen, deren Anionen katalytisch wirksam sind, besonders aktiv, z. B. 2-Amino-imidazol und 4-Nitro-imidazol.

[52] A. Grimison, J. H. Ridd u. B. V. Smith, J. chem. Soc. [London] **1960**, 1352, 1357, 1363.

Brought to you by | University of Wisconsin Madison Libra
Authenticated | 128.104.1.219
Download Date | 9/4/12 12:27 PM

5. Bei folgenden Verbindungen ist im Vergleich zum Imidazol die katalytische Wirkung bei pH 7,5 auf weniger als 5% abgesunken (die Zahlen in Klammern geben die pK-Werte des „Pyridinstickstoffs" an): Imidazol-aldehyd-(4) (3,84), Imidazol-dicarbonsäure-(4.5) (8,0), 2-Mercapto-imidazol (1,75), 2-Mercapto-1-methyl-imidazol (1,98), 2-Mercapto-1-methyl-4-carboxymethyl-imidazol (2,12), 2-Mercapto-4-methyl-imidazol (1,87), 2-Guanido-1-methyl-imidazol (3,05), 2-Guanido-imidazol (3,16).

II. Katalyse durch Derivate und Analoge des Histidins

Die relativen Geschwindigkeitskonstanten der Tab. 4 sind bei gleichem pH-Wert direkt mit den Werten der Tab. 3 vergleichbar. Diejenigen Substanzen, deren $k_{rel.}$-Wert bei pH 7,5 unter 5% gegenüber dem des Imidazols abfällt, sind nicht in Tab. 4 aufgeführt. Dazu gehören 3-Benzyl-histidinamid (4,91), 1.3-Dibenzyl-histidin, Spinacin (4,91), Pyrazolyl-(3)-alanin (2,1), Imidazolyl-(4)-glycin (4,62), Imidazolyl-(4)-glycin-methylester (3,42), 1-Acetyl-imidazolyl-(4)-glycin (6,18), Imidazolyl-(2)-alanin (6,15) (die Zahlen in Klammern geben die p$K_{N\leqslant}$-Werte an).

Tab. 4. Relative Geschwindigkeitskonstanten der p-Nitrophenyl-acetat-Hydrolyse unter Katalyse durch Histidinderivate sowie deren pK-Werte. (Für beide pH-Werte gilt Imidazol = 10).

Histidinderivate	$k_{rel.}$		pK-Werte	
	pH 6,2	pH 7,5	p$K_{N\leqslant}$	pK_{NH_2}
L-Histidin*	5,1	1,6	6,1	9,2
L-Histidin-methylester	3,8	2,9	5,39	7,6
L-Histidin-hydrazid	3,7	2,8	5,32	7,58
DL-Histidinamid	3,7	2,8	5,42	7,53
Histamin	4,2	2,2	6,25	9,96
4-Aminomethyl-imidazol	1,1	1,7	4,71	9,4
Histidinol	5,6	1,4	6,0	8,98
DL-Histidin-anhydrid	12,6	3,8	5,61 6,77	—
N^{α}-Acetyl-DL-histidin	7,1	6,2	7,08	—
1-Methyl-DL-histidin**	9,7	4,0	6,48	8,85
1-Methyl-DL-histidin-methylester	6,6	8,6	5,71	7,26
Triazolyl-(3)-DL-alanin	0,5	1,5	1,95	8,6
DL-Homohistidin***	—	6,2	6,9	9,15

* pK_{CO_2H} 1,82; ** pK_{CO_2H} 1,69; *** pK_{CO_2H} 1,90.

Das Ergebnis der Messungen läßt sich nach Tab. 4 in folgenden Punkten zusammenfassen:

1. Die Katalyse wird bei Derivaten und Analogen des Histidins weitgehend durch die Änderungen der pK-Werte bestimmt, wobei zunächst nur die Änderungen der Basizität des Imidazolringes zu berücksichtigen sind. Auf dieser Basis erklären sich die Steigerungen beim N^{α}-Acetyl-histidin, Homohistidin, 1-Methyl-histidin, Histamin, Histidin-

Brought to you by | University of Wisconsin Madison Librarie
Authenticated | 128.104.1.219
Download Date | 9/4/12 12:27 PM

anhydrid oder die Erniedrigungen bei Imidazolyl-(4)-glycin, Spinacin, Triazolyl-(4)-alanin, Pyrazolyl-(3)-alanin gegenüber Histidin. Imidazolyl-(2)-alanin gehört in die Gruppe der 2-substituierten Imidazole, die aus sterischen Gründen schwach wirksam sind (s. Abschnitt I).

2. In einigen Fällen sind die pK-Änderungen der Aminogruppe von Bedeutung; man muß hier eine Beteiligung der Aminogruppe berücksichtigen. So kommt es z. B. bei pH 7,5 beim Übergang von Histidin zu Histidin-methylester, Histidin-hydrazid oder Histidinamid oder von 1-Methyl-histidin zu 1-Methyl-histidin-methylester zu einer erheblichen Erhöhung der $k_{\text{rel.}}$-Werte, obwohl ein Abfall der pK-Werte des Imidazolrestes eintritt. Bei pH 6,2 liegen die Verhältnisse umgekehrt, d. h. die Verbindungen mit dem niedrigeren pK-Wert haben auch niedrigere katalytische Aktivität. Bei pH 7,5 liegt die Aminogruppe des Histidins zu etwa 1% im entprotonisierten Zustand vor, hat also auf die Katalyse praktisch keinen Einfluß; beim Histidin-methylester dagegen liegen bei pH 7,5 etwa 50% der Aminogruppen als freie Basen vor. Entweder dienen sie in dieser Form als zusätzliche Acceptoren des Acylrestes bei der Spaltung des Acetyl-imidazols, oder sie greifen auf Grund ihres nucleophilen Charakters direkt den Ester an. Bei pH 6,2 ist der Anteil an freien entprotonisierten Aminogruppen im Histidin auf etwa 0,1% abgesunken; beim Histidin-methylester steigt er auf Grund des Abfalls des pK-Wertes der Aminogruppe auf annähernd 10%. Dieser Anstieg an freien Aminogruppen kann den Verlust an katalytischer Aktivität durch den Abfall des pK-Wertes des Imidazols nicht kompensieren; dadurch ist bei pH 6,2 Histidin-methylester ein schwächerer Katalysator als Histidin. Die freie Carboxylgruppe liegt in jedem Fall in vollständig dissoziiertem Zustand vor, so daß ihr möglicher Einfluß bei allen Derivaten derselbe ist.

3. Besonders interessant verhält sich das Homohistidin, dessen p$K_{N\leqslant}$ annähernd mit dem des Imidazols übereinstimmt. Hierfür ist u. a. die Unmöglichkeit zur Ausbildung eines Sechsringes zwischen dem „Pyridinstickstoff" und dem α-Aminostickstoff über eine Wasserstoffbrücke verantwortlich; denn diese Sechsringstruktur ist für die Basizität des Histidins mitbestimmend. Die Unsymmetrie des Moleküls ist einer der Hauptgründe dafür, daß Homohistidin trotz gleichen pK-Wertes nur etwa $^2/_3$ der katalytischen Aktivität des Imidazols erreicht.

4. Histidin-anhydrid ist mehr als doppelt so wirksam wie Histidin. Hierfür sind zwei Imidazolreste verantwortlich, von denen einer einen erhöhten pK-Wert aufweist.

5. Obwohl das Triazolyl-(3)-alanin im Vergleich zu Histidin viel schwächer basisch ist, zeigt es bei pH 7,5 dieselbe katalytische Aktivität. Hierzu trägt das Anion des Iminostickstoffs bei, ähnlich wie es beim 4-Nitro-imidazol beobachtet wurde (s. Tab. 3). Pyrazolyl-(3)-alanin ist dagegen praktisch unwirksam.

Brought to you by | University of Wisconsin Madison Libra
Authenticated | 128.104.1.219
Download Date | 9/4/12 12:27 PM

III. Katalyse durch Histidylpeptide

Die von uns geprüften Peptide lassen sich in solche mit Histidin als aminoendständiger, carboxylendständiger und mittelständiger Aminosäure unterteilen.

Tab. 5. Relative Geschwindigkeitskonstanten der *p*-Nitrophenyl-acetat-Hydrolyse unter Katalyse durch Histidylpeptide sowie deren p*K*-Werte. (Für beide pH-Werte gilt Imidazol = 10.)

Histidylpeptid	$k_{rel.}$		p*K*-Werte	
	pH 6,2	pH 7,5	$pK_{N\leqslant}$	pK_{NH_2}
L-Histidyl-glycin	3,3	4,6	5,96	7,82
L-Histidyl-L-glutaminsäure	3,2	4,3	6,37	7,96
L-Histidyl-L-asparaginsäure	3,1	4,4	6,15	7,78
L-Histidyl-L-serin	4,1	5,1	6,34	7,71
L-Histidyl-DL-tryptophan	1,8	3,5	6,48	7,89
L-Histidyl-L-tyrosin*	3,5	5,2	5,98	7,60
DL-Histidyl-DL-histidin	9,1	7,8	5,40 6,80	7,95
Glycyl-L-histidin	4,2	5,6	6,79	8,2
L-Carnosin (β-Alanyl-L-histidin)	6,5	5,5	6,86	9,51
L-Glutamyl-L-histidin	3,9	5,4	6,88	8,07
L-Anserin (β-Alanyl-1-methyl-L-histidin)	8,0	9,5	7,15	9,49
Glycyl-glycyl-L-histidinamid	5,3	4,4	6,61	8,11
Glycyl-L-histidyl-L-leucin	5,5	4,6	6,68	8,09
Glycyl-L-histidyl-L-glutaminsäure	5,5	4,5	6,65	—

* $pK_{OH} = 10{,}05$.

Aus Tab. 5 geht hervor, daß Histidyl-serin und Histidyl-tyrosin die höchste und Histidyl-tryptophan die niedrigste Aktivität unter den Peptiden mit Histidin als *N*-terminaler Aminosäure besitzen. Prüft man Tyrosin allein, so zeigt sich, daß seine katalytische Aktivität über derjenigen gewöhnlicher α-Aminosäuren liegt. Dieser zusätzliche Effekt macht sich auch im Histidyl-tyrosin bemerkbar. Die OH-Gruppe des Tyrosins wird bei Einwirkung von *p*-Nitrophenyl-acetat acetyliert.

Besonderes Interesse verdient das Histidyl-serin. Es ist bekannt, daß *N*-Acetyl-serinamid die durch Imidazol katalysierte Hydrolyse von *p*-Nitrophenyl-acetat zusätzlich beschleunigt[53], und einen solchen zusätzlichen Effekt des Serins beobachtet man auch im Histidyl-serin. Serin selbst sowie seine Derivate und Peptide ohne Histidin zeigen nur eine sehr geringe katalytische Wirkung, die nicht über diejenige gewöhnlicher α-Aminosäuren hinausgeht. Die Frage, ob im Histidyl-serin eine echte Seitenkettenwechselwirkung zwischen dem Imidazolrest des Histidins und der OH-Gruppe des Serins möglich ist, sowie das katalytische Verhalten weiterer histidin- und serinhaltiger Peptide behandeln wir in einer folgenden Arbeit. Über die Ursache der Aktivitätserniedrigung im Histidyl-tryptophan im Vergleich etwa zu Histidyl-glycin sind wir uns

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

Brought to you by | University of Wisconsin Madison Librari
Authenticated | 128.104.1.219
Download Date | 9/4/12 12:27 PM

noch nicht klar. Allgemein liegen die Peptide mit Histidin als *N*-terminaler Aminosäure in ihrer Aktivität bei pH 6,2 unter, bei pH 7,5 über dem Histidin, ähnlich wie es bei Derivaten des Histidins mit verschlossener Carboxylgruppe beobachtet wurde.

Histidyl-histidin bildet das Übergangsglied zur Gruppe der Peptide mit *C*-terminalem Histidin; auf Grund seiner zwei Imidazolringe, von denen einer einen erhöhten p*K*-Wert besitzt, ist es erwartungsgemäß ein besonders wirksamer Katalysator. Die höchste Aktivität unter den Peptiden mit *C*-terminalem Histidin besitzt jedoch das Anserin, bedingt durch den p*K*-Wert des 1-Methyl-histidins, der über dem des Imidazols liegt. Im ganzen sind diese Peptide wirksamere Katalysatoren als die der ersten Gruppe.

Schließlich wurden noch einige Peptide geprüft, in denen sowohl die Amino- als auch Carboxylgruppe des Histidins an einer Peptidbindung beteiligt ist. Diese Verbindungen zeigen die höchste Aktivität bei pH 6,2, während sie bei pH 7,5 dieselben katalytischen Wirkungen entfalten wie die Peptide mit Histidin als *N*-terminaler Aminosäure.

Vergleicht man die p*K*-Werte des Imidazolringes der untersuchten Peptide, so ergibt sich Folgendes:

Peptide mit *C*-terminalem Histidin p*K* 6,8—7,2;
Peptide mit *N*-terminalem Histidin p*K* 6,0—6,4;
Peptide mit mittelständigem Histidin p*K* 6,6—6,7.

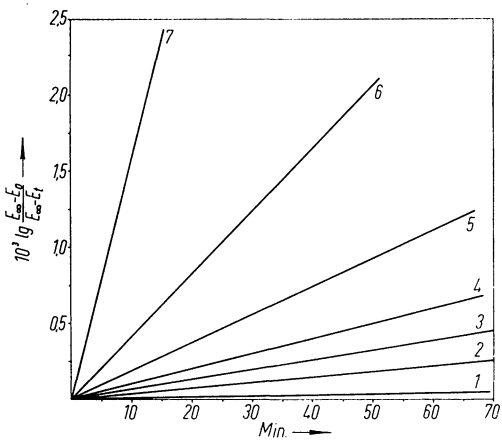
Wenn die p*K*-Werte des Imidazols in erster Linie für das katalytische Verhalten verantwortlich sind, sollte man erwarten, daß die aktivsten Verbindungen die mit *C*-terminalem Histidin sind. Dies ist auch tatsächlich der Fall. Daneben ist der direkte Einfluß der freien Carboxylgruppe auf die Katalyse von untergeordneter Bedeutung. Die freie Carboxylgruppe liegt in allen Fällen als Anion vor, und es ist bekannt, daß ihre nucleophile Reaktivität nur sehr schwach ausgeprägt ist.

Eine Aminogruppe sollte nur in den Fällen, in denen sie als freie Base vorliegt, als Acceptor des Acetylrestes wirken. Wegen ihrer hohen p*K*-Werte liegen die Aminogruppen in den gemessenen pH-Bereichen aber fast vollständig protonisiert vor.

IV. Cbo-Aminosäure-*p*-nitrophenylester als Substrate der Imidazol-Katalyse

Außer *p*-Nitrophenyl-acetat prüften wir als weitere Substrate in der Imidazol-Katalyse eine Reihe von Cbo-Aminosäure-*p*-nitrophenylestern, die in der Peptidchemie ausgedehnte Verwendung finden und deren Reaktionsfähigkeit daher auch von allgemeinem Interesse ist. In der Abbildung sind die Kurven der Eigenhydrolyse bei pH 6,2 und 24° dargestellt. Man erkennt, daß sich je nach Natur des Aminosäurerestes die *p*-Nitrophenylester sehr erheblich in ihrem spontanen Zerfall unterscheiden. Die bei weitem stärkste Eigenhydrolyse zeigt der Cbo-Asparagin-*p*-nitrophenylester. Hier dürfte der leichte Spontanzerfall durch

Brought to you by | University of Wisconsin Madison Librari
Authenticated | 128.104.1.219
Download Date | 9/4/12 12:27 PM



Eigenhydrolyse von Cbo-X-*p*-Nitrophenylestern bei pH 6,2 und 24°.
X: 1 = Valin; 2 = Leucin und *S*-Benzylcystein; 3 = Glutaminsäure-γ-methylester; 4 = Glutamin; 5 = Glycin; 6 = Glycyl-glycin; 7 = Asparagin.

Ausbildung eines Fünfring-Zwischenproduktes unter Beteiligung der Carbonamid-Gruppierung zustande kommen. Ein ähnliches Verhalten beobachtet man bei Cbo-Asparaginsäure-β-ester-α-peptiden[54]. Cbo-Glutamin-*p*-nitrophenylester dagegen zeigt ein solches Verhalten nicht[54]. Die starke Abschirmung der Carboxylgruppe durch die Seitenkette des Valins kommt in der niedrigen Eigenhydrolyse des Cbo-Valin-*p*-nitrophenylesters zum Ausdruck. Im Vergleich dazu ist Leucin bedeutend reaktionsfähiger, denn die abschirmende Isopropylgruppe ist bei Leucin (im Gegensatz zu Valin) durch eine CH_2-Gruppe vom α-C-Atom getrennt. Der Einfluß von Peptidbindungen auf die Reaktionsfähigkeit von *p*-Nitrophenylestern wirkt sich in der erheblichen Zunahme der Eigenhydrolyse beim Übergang vom Cbo-Glycin zum Cbo-Glycyl-glycin-*p*-nitrophenylester aus.

In Tab. 6 sind die relativen Geschwindigkeitskonstanten der Eigenhydrolyse bei pH 6,2, bezogen auf Cbo-Valin-*p*-nitrophenylester = 1, zusammengestellt. Außerdem enthält Tab. 6 die Hydrolysekonstanten bei Einwirkung der Katalysatoren Histidyl-histidin, Imidazol und Anserin. Dabei ist die Konstante für Cbo-Valin-*p*-nitrophenylester ebenfalls = 1 gesetzt; die Werte lassen die Abhängigkeit der katalytischen Effekte sowohl von der Struktur des Esters als auch von der Natur des Katalysators erkennen. Die Ergebnisse sind untereinander direkt vergleichbar, da in allen Fällen unter gleichen Bedingungen gemessen wurde. Im Valin-Ester behindert die Seitenkette die Annäherung der Katalysatoren so erheblich, daß dieser Ester die geringsten Beschleunigungen unter dem Einfluß von Imidazolen zeigt; ähnlich liegen die Ver-

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

Brought to you by | University of Wisconsin Madison Librar
Authenticated | 128.104.1.219
Download Date | 9/4/12 12:27 PM

Tab. 6. Relative Hydrolysekonstanten der Eigenhydrolyse und der imidazolkatalysierten Spaltung von Cbo-X-*p*-Nitrophenylestern bei pH 6,2 und 24°.

X	$k_{rel.}$			
	Eigenhydrolyse	mit Histidylhistidin	mit Imidazol	mit Anserin
L-Asparagin	275	7,0	96	—
Glycyl-glycin	65	15,4	71	66
Glycin	31,6	18,3	50	47
L-Glutamin	16,6	8,3	34	36
L-Glutaminsäure-γ-methylester	13,3	17,8	62	42
L-Leucin	5,5	8,0	24	26,4
S-Benzyl-L-cystein	5,0	16,6	63	36
L-Valin	1	1	1	1

hältnisse beim Leucin. Die Abhängigkeit der Katalyse von der Struktur der Ester ist theoretisch nicht in allen Fällen zu deuten. Es ist verständlich, daß Imidazol als kleines, symmetrisches Molekül mit einem p*K*-Wert von 7,0 die höchsten katalytischen Wirkungen zeigt, es ist aber schwer einzusehen, warum Cbo-Glutaminsäure-γ-methylester-α-*p*-nitrophenylester durch Imidazol und Histidyl-histidin doppelt so schnell gespalten wird wie Cbo-Glutamin-*p*-nitrophenylester, während die Verhältnisse beim Anserin umgekehrt liegen.

Diskussion

Die organische Chemie hat die hohe Wirksamkeit der multifunktionellen Katalyse, die in Fällen intramolekularer Reaktionen die Umsetzungsgeschwindigkeiten der Enzyme erreicht, an zahlreichen eindrucksvollen Beispielen demonstriert. Die Zahl der Versuche, solche Katalysatoren auf der Basis niedermolekularer synthetischer Peptide zu verwirklichen, ist bisher gering, wie auch unsere Kenntnisse über die mögliche Kooperation von Aminosäureseitenketten in Peptiden unvollkommen sind (vgl. dazu l. c.[54]). Eine systematische Untersuchung dieser Probleme umfaßt die Synthese einer größeren Zahl von Peptiden und die Prüfung ihrer chemischen und katalytischen Eigenschaften. Nur dadurch wird man Aufschluß erhalten über die Reaktionsmöglichkeiten, die für die enzymatische Katalyse von Bedeutung sind.

Faßt man die beobachteten katalytischen Effekte aller in dieser Arbeit untersuchten Imidazolderivate und Histidylpeptide zusammen, so ergibt sich, daß die katalytische Wirkung durch Änderung der Struktur der Imidazolverbindung um etwa den Faktor 100 variiert werden kann. Eklatante Erhöhungen der katalytischen Wirkung, die über die Effekte des Imidazols hinausgehen, sind auch durch vielfältige Variationen der Peptidsequenz nicht erzielt worden; der p*K*-Wert des „Pyridinstickstoffs" des Imidazolrestes ist in erster Linie der bestimmende Faktor für die katalytischen Eigenschaften der Peptide.

Brought to you by | University of Wisconsin Madison Librarie
Authenticated | 128.104.1.219
Download Date | 9/4/12 12:27 PM

Dieser Befund steht im Einklang mit den Ergebnissen, die bei der Prüfung der katalytischen Eigenschaften von Histidylpeptiden von anderen Autoren erzielt wurden. In diesem Zusammenhang sind besonders Untersuchungen von Sheehan[55] über die katalytische Wirkung von *cyclo*-[Ser-His-Gly]$_2$ sowie von Kopple und Nitecki[49] über *cyclo*-Tyr-Gly-Gly-Gly-His-Gly zu erwähnen. Auch diese Peptide, in denen man die Seitenketten durch Cyclisierung fixierte, um dadurch besonders günstige Voraussetzungen für eine Seitenkettenwechselwirkung zu schaffen, gehen in ihrer katalytischen Aktivität gegenüber *p*-Nitrophenyl-acetat nicht über Imidazol hinaus.

Über Synthesen weiterer Peptide mit Asparaginsäure, Serin und Histidin und über ihre katalytischen und chemischen Eigenschaften berichten wir in Kürze.

Zusammenfassung

Die strukturabhängigen katalytischen Eigenschaften einer größeren Anzahl von Imidazol- und Histidinderivaten sowie Histidylpeptiden wurden an der Spaltung von *p*-Nitrophenyl-acetat untersucht.

Für diese Untersuchungen wurden folgende neue Imidazolderivate synthetisiert: 2-Guanido-imidazol-hydrochlorid, 2-Guanido-1-methyl-imidazol-hydrochlorid, Bis-[imidazolyl-(4)-methyl]-sulfid, *S*-[Imidazolyl-(4)-2-äthyl]-isothioharnstoff-dihydrochlorid, 4-[2-Benzylmercapto-äthyl]-imidazol-hydrochlorid sowie DL-Homohistidin-dihydrochlorid und Histidyl-tyrosin.

Als charakteristische Größen des physikalisch-chemischen Verhaltens von Imidazolverbindungen wurden die p*K*-Werte der untersuchten Verbindungen ermittelt und zur Struktur und den katalytischen Eigenschaften in Beziehung gesetzt.

Die bei verschiedenen pH-Werten ausgeführten Messungen ergaben, daß die katalytischen Eigenschaften der synthetisierten Imidazolverbindungen und Histidylpeptide durch die p*K*-Werte, durch sterische Faktoren und durch weitere funktionelle Gruppen innerhalb des Moleküls bestimmt werden. Durch Änderung der Struktur ist es möglich, die katalytischen Eigenschaften um den Faktor 100 zu variieren.

Außer *p*-Nitrophenyl-acetat wurden Carbobenzoxy-aminosäure-*p*-nitrophenylester als Substrate der Imidazolkatalyse untersucht und ihre strukturabhängige Eigenhydrolysegeschwindigkeit ermittelt.

Summary

The structural requirements of a large number of imidazole and histidine derivatives and histidyl peptides were studied for their catalytic cleavage of *p*-nitrophenyl-acetate.

---

[55] J. C. Sheehan u. D. N. McGregor, J. Amer. chem. Soc. 84, 3000 [1962].

Brought to you by | University of Wisconsin Madison Librarie
Authenticated | 128.104.1.219
Download Date | 9/4/12 12:27 PM

The following new imidazole derivatives were synthesised: 2-guanido-imidazole-hydrochloride, 2-guanido-1-methyl-imidazole-hydrochloride, bis-[imidazolyl-(4)-methyl]-sulphide, *S*-[imidazolyl-(4)-2-ethyl]-isothiourea-dihydrochloride, 4-[2-benzyl-mercapto-ethyl]-imidazole-hydrochloride, DL-homohistidine-dihydrochloride and histidyl-tyrosine.

p*K* values are taken as a characteristic measure of physical-chemical behaviour and related to the structure and catalytic properties of the imidazole compounds.

Measurements at different pH values showed that the catalytic properties of the synthesised imidazole compounds and histidyl peptides are determined by the p*K* values, steric factors and by other functional groups in the molecule. The catalytic properties can be altered 100 fold by variation of the structure.

Carbobenzoxy-amino acid-*p*-nitrophenyl esters were also investigated as substrates for the imidazole catalysis; their rates of hydrolysis, which are structurally dependent, are given.

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

Brought to you by | University of Wisconsin Madison Librar
Authenticated | 128.104.1.219
Download Date | 9/4/12 12:27 PM