

Über Proteine und deren Abbauprodukte, XIX*
 STERISCHE UND INDUKTIVE EFFEKTE BEI DER
 HYDROLYSE VON POLYPEPTIDEN

VON KURT HEYNS und HANS FRIEDRICH GRÜTZMACHER

Aus dem Chemischen Staatsinstitut der Universität Hamburg, Institut für Organische Chemie

Eingegangen am 2. Dezember 1960

Die Hydrolyse von Poly-DL-[*p*-methoxy-phenyl]-alanin, Poly-DL-phenylalanin und Poly-DL-[*p*-nitro-phenyl]-alanin in einer Mischung von Dichloressigsäure und wäßrigem HCl (DCE-HCl) bei 37° wurde untersucht. Weder die Spaltung einer Endbindung noch die Spaltung einer inneren Bindung der Peptidkette wird durch induktive Effekte der Aminosäureseitenkette beeinflusst. — Dialanyl-¹⁵N-alanin wurde dargestellt und dessen Hydrolyse bei 37° massenspektrometrisch verfolgt. In wäßrigem HCl wird dieses Tripeptid an der C-endständigen Bindung gespalten, in DCE-HCl an der N-endständigen Bindung. — Die Aktivierungsenergien und Aktivierungsentropien der sauren Hydrolyse von Poly-DL-alanin, Poly-DL- α -amino-buttersäure, Poly-DL-norleucin, Poly-DL-phenylalanin, Poly-DL-leucin und Poly-DL-isoleucin wurden ermittelt. Die Ergebnisse lassen sich durch sterische Einflüsse der Aminosäureseitenketten hinreichend erklären.

Es wurde versucht, über den Zusammenhang der Struktur von Aminosäuren und der Stabilität der von ihnen gebildeten Peptidbindungen gegenüber der sauren Hydrolyse weiteren Aufschluß zu bekommen.

Durch Messung der Hydrolysegeschwindigkeit in DCE-HCl bei 37°^{1,2)} wurden für die Stabilität der Peptidbindungen folgende Reihen gefunden: *Spaltung einer endständigen Peptidbindung* (RG-Konstante k_E): Polyglycin < Poly-DL-alanin < Poly-DL- α -amino-buttersäure \cong Poly-DL-phenylalanin < Poly-DL-norleucin < Poly-DL-leucin < Poly-DL-isoleucin. *Spaltung einer inneren Peptidbindung* (RG-Konstante k_I): Polyglycin < Poly-DL-alanin < Poly-DL- α -amino-buttersäure \cong Poly-DL-norleucin \cong Poly-DL-leucin \cong Poly-DL-phenylalanin < Poly-DL-isoleucin. — Es wurde angenommen, daß die Stabilität einer inneren Peptidbindung vorwiegend durch sterische Effekte bewirkt wird, während an einer Endbindung auch induktive Effekte wirksam sind. Dafür sprach die Stellung des Phenylalanins in beiden Reihen: die dem Isobutylrest vergleichbare Raumerfüllung der Benzylgruppe weist ihm einen Platz an der Seite des Leucins an (k_I), während der -I-Effekt des Benzylrestes zu einer Verminderung der Stabilität führt (k_E).

*) XVIII. Mitteilung: K. HEYNS und G. LEGLER, Hoppe-Seyler's Z. physiol Chem. 321, 184 (1960).

¹⁾ K. HEYNS, W. WALTER und H. F. GRÜTZMACHER, Liebigs Ann. Chem. 609, 209 (1957).

²⁾ K. HEYNS, H. F. GRÜTZMACHER und W. WALTER, Liebigs Ann. Chem. 609, 224 (1957).

Vor allem sollte jetzt überprüft werden, ob an den Endbindungen tatsächlich induktive Effekte auftreten. Dazu wurden folgende Versuchsreihen durchgeführt:

A. Hydrolyse von Polypeptiden, bei denen die sterischen Einflüsse weitgehend konstant gehalten werden, die induktiven Effekte jedoch variieren. Für diesen Zweck bieten sich substituierte aromatische Aminosäuren an. Gemessen wurde die Hydrolyse von Poly-DL-phenylalanin, Poly-DL-[*p*-methoxy-phenyl]-alanin und Poly-DL-[*p*-nitro-phenyl]-alanin bei 37°.

B. Bestimmung der Hydrolysegeschwindigkeit der C- und N-endständigen Peptidbindung. Mit Ausnahme von Polyglycin werden die untersuchten Polyamino-säuren vorwiegend vom Kettenende her abgebaut, dabei wird k_E des Poly-DL-alanins beim Übergang vom Wasser zu DCE als Lösungsmittel wesentlich stärker erhöht als k_I . Zwischen einem Abbau vom Amino- und Carboxylende her konnte mit den verwendeten Methoden nicht unterschieden werden. Wir haben daher ein Dialanylalanin synthetisiert, dessen C-endständiges Alanin mit ^{15}N markiert war, und haben dessen Hydrolyse in wäßrigem HCl und in DCE-HCl verfolgt.

C. Bestimmung der Aktivierungsenergie und Aktivierungsentropie. Dazu wurde die Hydrolyse der Polyamino-säuren bei 25°, 37°, 45° und 54.4° gemessen.

METHODIK UND KINETIK

Die Polyamino-säuren wurden durch Polymerisation der entsprechenden Oxalozolidione-(2.5) in Dioxan mit Wasser als Polymerisationsstarter hergestellt. Der mittlere Polymerisationsgrad lag zwischen 10 und 55. Einzelheiten des Hydrolysenverfahrens²⁾: Bestimmt wurden die entstehenden freien Aminosäuren nach KEMBLE und MACPHERSON³⁾ und die freiwerdenden Aminogruppen nach VAN SLYKE in einer Mikroapparatur⁴⁾. Die Werte für die Aminosäurekonzentration und die der Peptidkonzentration, die sich aus den Differenzen der Konzentration der freien Aminogruppen und der Aminosäurekonzentration ergeben, wurden gegen die Hydrolysenzeit aufgetragen und die RG-Konstanten graphisch ermittelt. Diese Methode zur Bestimmung der Anfangsgeschwindigkeit ist nicht sehr genau; der Fehler der einzelnen RG-Konstanten kann $\pm 20\%$ betragen.

A. HYDROLYSE DER POLYPHENYLALANINE

Die Ergebnisse der Versuche mit Poly-DL-[*p*-methoxy-phenyl]-alanin, Poly-DL-phenylalanin und Poly-DL-[*p*-nitro-phenyl]-alanin in DCE-HCl (ca. 65 Vol.-% DCE; 3.6–4.3 *n* HCl) sind in Tabelle 1 zusammengefaßt. Um die einzelnen Hydrolysenkonstanten vergleichen zu können, wurden sie durch die jeweilige analytische HCl-Konzentration dividiert.

³⁾ A. R. KEMBLE und H. T. MACPHERSON, *Biochem. J.* 56, 548 (1954).

⁴⁾ G. KAINZ, *Mikrochim. Acta* 1953, 349.

Tabelle 1. Hydrolysenkonstanten der Poly-DL-phenylalanine bei 37° in Sek.⁻¹

| | | |
|--|----------------------------|---------------------------|
| Poly-DL-[<i>p</i> -methoxy-phenyl]-alanin | $k_E = 23.0 \cdot 10^{-8}$ | $k_I = 6.1 \cdot 10^{-8}$ |
| Poly-DL-phenylalanin | 21.3 | 7.6 |
| Poly-DL-[<i>p</i> -nitro-phenyl]-alanin | 11.7 | 8.0 |

Mit Ausnahme von k_E des Poly-DL-[*p*-nitro-phenyl]-alanins sind k_E und k_I der drei Polyaminosäuren praktisch gleich. Im Gegensatz zu der ursprünglich gemachten Annahme tritt also auch bei der Hydrolyse einer Endbindung kein induktiver Effekt auf.

Den tiefen k_E -Wert des Poly-DL-[*p*-nitro-phenyl]-alanins kann man nicht erklären durch den -I-Effekt der *p*-Nitro-benzyl-Seitenkette, da bei einer direkten Wirkung die Hydrolysen-geschwindigkeit erhöht werden müßte. Nimmt man an, daß der Spaltung der Peptidbindung die Anlagerung eines Protons an die -CO-NH-Gruppe vorausgeht und daß die *p*-Nitro-benzyl-Gruppe dieses Gleichgewicht zu Ungunsten der protonierten Peptidbindung verschiebt, so sollte nicht nur die Endbindung, sondern auch eine innere Bindung langsamer gespalten werden, was aber nicht beobachtet wurde. Ein Wechsel vom A₂- zum A₁-Mechanismus, wie ihn MARTIN⁵⁾ bei der Hydrolyse in reiner Essigsäure fand, scheidet wegen des relativ großen Wassergehaltes des Hydrolysiergemisches aus. Möglicherweise kommt in dem kleinen k_E des Poly-DL-[*p*-nitro-phenyl]-alanins die herabgesetzte Basizität der Aminogruppe des Nitrophenylalanins ($pK \sim 8.4$ gegenüber 9.7 der anderen Aminosäuren) zum Ausdruck. Die Bedeutung der NH₃[⊕]-Endgruppe der Peptide bei der Hydrolyse in DCE-Mischungen zeigte sich in der Versuchsreihe B.

Von den früher²⁾ für Poly-DL-phenylalanin angegebenen k -Werten ist $k_E = 49.7 \cdot 10^{-8}$ Sek.⁻¹ zu hoch.

Zu große k_E -Werte entstehen auf folgende Weise: Wir haben den Polymerisationsgrad der Polyaminosäuren durch Bestimmung der Endaminogruppen nach VAN SLYKE ermittelt und zur Kontrolle auch die CO₂H-Endgruppen durch Titration mit CH₃ONa in Dioxan oder Dimethylformamid bestimmt⁶⁾. Man erfaßt jedoch gar nicht die CO₂H-Endgruppen, sondern adsorbiertes CO₂. Für diese Auffassung können wir folgendes anführen: Titriert man Poly-alanin, das aus dem Polymerisationsansatz durch Absaugen des Dioxans und Trocknen i. Vak. über KOH isoliert wurde, so findet man einen beträchtlichen Verbrauch an Natrium-methylat. Löst man das gleiche Polyalanin in Wasser und dampft i. Vak. ein, so findet man nach Trocknen über KOH überhaupt keine „CO₂H-Gruppen“ mehr. Fällt man das Poly-alanin aus seiner wäßrigen Lösung mit Aceton oder Dioxan unter Einleiten von CO₂ aus, so wird sogar mehr CH₃ONa verbraucht als vom ursprünglichen Polyalanin.

Die übrigen Polyaminosäuren sind in Wasser unlöslich, so daß hier analoge Reaktionen nicht durchgeführt werden können. Polyphenylalanin verbraucht regelmäßig besonders viel CH₃ONa. Das gebundene CO₂ läßt sich auch durch tagelanges Aufbewahren im Hoch-vakuum über KOH nicht entfernen. Wir nehmen an, daß es an die Aminoendgruppen ge-bunden ist. Zur Bestimmung der Aminosäurekonzentration müssen DCE und HCl neutrali-

⁵⁾ R. J. L. MARTIN, Austral. J. Chem. 10, 268 (1957) [C. A. 52, 5295 (1958)].

⁶⁾ M. SELA und A. BERGER, J. Amer. chem. Soc. 77, 1893 (1955).

siert werden. Die dabei ausfallenden Peptide nehmen CO_2 auf und geben es bei der anschließenden Desaminierung mit Chloramin T wieder ab. Dadurch wird eine größere Aminosäurekonzentration und ein zu hoher k_E -Wert vorgetäuscht. Da auch relativ niedermolekulare Phenylalanyl-peptide schon unlöslich in Wasser sind, ist hier diese Gefahr besonders groß. Wir haben daher bei der Hydrolyse der Polyphenylalanine Polymerisate mit geringem Polymerisationsgrad als Ausgangsstoffe gewählt.

Der jetzt erhaltene k_E -Wert des Polyphenylalanins liegt zwischen denen des Polynorleucins und Polyleucins, wie es bei einem sterischen Einfluß der Seitenketten auf die Hydrolysegeschwindigkeit erwartet werden muß.

B. HYDROLYSE DES DIALANYL- ^{15}N -ALANINS

Bei der Hydrolyse von Poly-DL-alanin in wäßrigem HCl und in DCE-HCl hat sich ergeben²⁾, daß die Geschwindigkeit, mit der endständiges Alanin in Freiheit gesetzt wird, in DCE-HCl fast doppelt so groß ist wie in wäßrigem HCl. Da die gemessene Hydrolysenkonstante $k_E = (k_\alpha + k_\beta)/2$ das Mittel aus den Konstanten für die N- und C-ständige Endbindung ist, könnte 1) k_α und k_β beim Wechsel des Reaktionsmediums gleichzeitig erhöht werden; 2) in wäßrigem HCl eine Peptidkette nur von einem Ende her abgebaut werden, in DCE von beiden Enden her. Wegen der relativ großen Säurestabilität von Dipeptiden ist zu erwarten, daß in wäßrigem HCl Peptidketten vorwiegend vom Carboxylende her abgebaut werden, denn die NH_3^\oplus -Endgruppe stößt das angreifende $\text{H}_3\text{O}^\oplus$ ab.

Um diese Frage zu entscheiden, wurde mit Hilfe der gemischten Anhydridmethode und der Azidmethode ein Dialanyl-alanin synthetisiert, dessen C-endständiges Alanin mit ^{15}N markiert war.

Für die Hydrolyse des Tripeptids gelten nachstehende Gleichungen:

k_α = Hydrolysenkonstante der N-endständigen Peptidbindung

k_β = Hydrolysenkonstante der C-endständigen Peptidbindung

k_D = Hydrolysenkonstante des Dipeptids

T = Konzentration des Tripeptides

D = Konzentration des Dipeptids

A = Konzentration der Aminosäure

Index 0 = jeweilige Anfangskonzentration

Index 15 = ^{15}N -Gehalt des betreffenden Stoffes

Ohne Berücksichtigung der ^{15}N -Markierung gilt:



$$-d\text{T}/dt = (k_\alpha + k_\beta) \text{T} = 2k_E \text{T}; \quad d\text{D}/dt = 2k_E \text{T} - k_D \text{D}; \quad d\text{A}/dt = 2k_E \text{T} + 2k_D \text{D}$$

$$3d\text{T}/dt + 2d\text{D}/dt + d\text{A}/dt = 0; \quad \text{mit } \text{D}_0 = 0 \text{ und } \text{A}_0 = 0 \text{ ist dann}$$

$$3\text{T} + 2\text{D} + \text{A} = 3\text{T}_0 \text{ oder } \text{A} = 3\text{T}_0 - 3\text{T} - 2\text{D}, \text{ ferner ist } \text{T} = \text{T}_0 e^{-2k_E t}$$

$$\text{und } \text{D} = \text{T}_0 \cdot \frac{2k_E}{k_D - 2k_E} \cdot (e^{-2k_E t} - e^{-k_D t}).$$

Durch Einsetzen erhält man dann für die Aminosäurekonzentration A:

$$A = T_0 \left[3 - \left(3 + \frac{4 k_E}{k_D - 2 k_E} \right) e^{-2k_E t} + \frac{4 k_E}{k_D - 2 k_E} \cdot e^{-k_D t} \right] \quad (1)$$

Beschränkt man sich auf die Bestimmung der Anfangshydrolysegeschwindigkeit und/oder ist $k_D \ll k_E$, so kann die Hydrolyse der Dipeptide vernachlässigt werden. Die Gleichung (1) geht dann in Gleichung (2) über:

$$A = T_0 (1 - e^{-2k_E t}) \quad \text{und} \quad 2.303 \log \frac{T_0}{T_0 - A} = 2 k_E t \quad (2)$$

Entsprechend gelten für die Geschwindigkeit der ^{15}N -Alanin-Abspaltung die Gleichungen:



$$-d^{15}\text{T}/dt = (k_{\alpha} + k_{\beta})^{15}\text{T}; \quad d^{15}\text{D}/dt = k_{\alpha}^{15}\text{T} - k_D^{15}\text{D}; \quad d^{15}\text{A}/dt = k_{\beta}^{15}\text{T} + k_D^{15}\text{D}$$

Hier gilt: $^{15}\text{A} = ^{15}\text{T}_0 - ^{15}\text{T} - ^{15}\text{D}$; mit $^{15}\text{T} = ^{15}\text{T}_0 e^{-2k_E t}$ und

$$^{15}\text{D} = \frac{k_{\alpha} ^{15}\text{T}_0}{k_D - 2 k_E} (e^{-2k_E t} - e^{-k_D t}), \quad \text{erhält man für die Konzentration } ^{15}\text{A} \text{ an } ^{15}\text{N}\text{-Alanin}$$

Gleichung (3)

$$^{15}\text{A} = ^{15}\text{T}_0 \left[1 - \frac{k_D - k_{\beta}}{k_D - 2 k_E} e^{-2k_E t} + \frac{2 k_E - k_{\beta}}{k_D - 2 k_E} e^{-k_D t} \right] \quad (3)$$

Um diese Formeln zu vereinfachen, wird versuchsweise $k_{\alpha} \approx k_D$ gesetzt. Wenn die Nachbarschaft einer positiven Ladung auf die Spaltung der Peptidbindung einen großen Einfluß hat, ist diese Annahme gerechtfertigt, denn die Dipeptidbindung und die N-endständige Bindung des Tripeptids sind von der NH_3^{\oplus} -Gruppe gleich weit entfernt. Es sind nun zwei Grenzfälle möglich:

a) $k_{\alpha} > k_{\beta}$; das Tripeptid wird vom Aminoende her abgebaut. Die Anfangsgeschwindigkeit, mit der ^{15}N -Alanin abgespalten wird, ist sehr klein. Je weiter die Hydrolyse fortschreitet, desto größer wird die Bildungsgeschwindigkeit des ^{15}N -Alanins.

b) $k_{\alpha} < k_{\beta}$; das Tripeptid wird vom Carboxylende her abgebaut. In diesem Fall geht für die Anfangsgeschwindigkeit der ^{15}N -Alanin-Bildung Gleichung (3) in Gleichung (4) über:

$$^{15}\text{A} = ^{15}\text{T}_0 (1 - e^{-k_{\beta} t}) \quad \text{und} \quad 2.303 \log \frac{^{15}\text{T}}{^{15}\text{T}_0 - ^{15}\text{A}} = k_{\beta} t \quad (4)$$

Die Hydrolyse des Dialanyl- ^{15}N -alanins wurde einmal durch Bestimmung des insgesamt freiwerdenden Alanins durch Umsetzen mit Chloramin T verfolgt, zum anderen wurden Proben der Hydrolysenmischung in einer Hochvakuumapparatur mit HNO_2 desaminiert und der entstehende Stickstoff massenspektrometrisch auf seinen ^{15}N -Gehalt hin untersucht.

Den Verlauf der Hydrolyse des ^{15}N -Peptides zeigen die Abbildungen 1 und 2. Die entsprechenden Hydrolysekonstanten sind in Tabelle 2 aufgeführt.

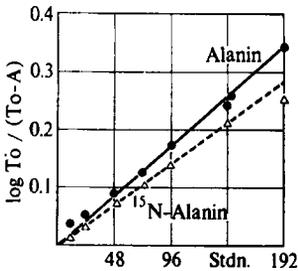


Abbildung 1
Hydrolyse des Dialanyl- ^{15}N -alanins
bei 37° in 3.07 n HCl

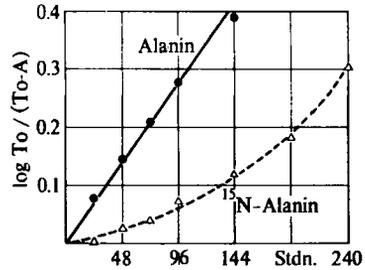


Abbildung 2
Hydrolyse des Dialanyl- ^{15}N -alanins
bei 37° in $\text{DCE-}4.28\text{ n HCl}$

Tabelle 2. RG-Konstanten der sauren Hydrolyse des Dialanyl- ^{15}N -alanins, bezogen auf die analytische HCl -Konzentration = 1 n

| RG-Konstante | in $\text{H}_2\text{O-HCl}$ | in $\text{H}_2\text{O-DCE-HCl}$ |
|-------------------|-------------------------------------|-------------------------------------|
| 2 k_E | $38 \cdot 10^{-8}\text{ Sek.}^{-1}$ | $43 \cdot 10^{-8}\text{ Sek.}^{-1}$ |
| k_β | 30 | ~ 9 |
| k_α | 8 | ~ 34 |

Zwei Tatsachen fallen auf: 1) Im Gegensatz zum Poly-DL-alanin wird die Gesamtgeschwindigkeit der Hydrolyse des Tripeptids durch DCE nur wenig erhöht. 2) In wäßrigem HCl wird das Tripeptid bevorzugt an der C-endständigen Bindung gespalten, in DCE-HCl jedoch an der N-endständigen Peptidbindung.

Der bevorzugte Abbau einer Peptidkette am Carboxylende bei der sauren Hydrolyse wurde schon wiederholt angenommen⁷⁾. Er ist für Wasser als Lösungsmittel durch diese Versuche endgültig bewiesen. Die Ursache dürfte der elektrostatische Feldeffekt der NH_3^+ -Endgruppe des Peptids sein, der die Ausbildung einer zweiten positiven Ladung (Protonierung) an der benachbarten Peptidbindung verhindert. Der gleiche Effekt kann jedoch nicht die Bevorzugung der N-endständigen Bindung bei der Hydrolyse in 60–70-proz. DCE bewirken, da die herabgesetzte Dielektrizitätskonstante der Mischung die Reichweite eines Feldeffektes verstärken müßte. Wir nehmen an, daß in DCE-HCl die Aminoendgruppe spezifisch durch die Dichloressigsäure solvatisiert wird. Dadurch würde die positive Ladung der NH_3^+ -Gruppe abgeschirmt; daneben wäre es denkbar, daß auf die benachbarte Peptidbindung Protonen direkt von DCE -Molekülen der Solvathülle übertragen werden. Die effektive Protonenkonzentration wäre dann hier höher als in der Lösung. Einen ähnlichen

⁷⁾ A. H. GORDON, A. J. P. MARTIN und R. L. M. SYNGE, *Biochem. J.* **35**, 1369 (1941).

Effekt diskutieren KERN und SCHERHAG⁸⁾ bei dem günstigen Einfluß von Polyvinylsulfonsäuren auf die saure Hydrolyse von Peptiden. Eigenartigerweise wird die C-endständige Bindung des Trialanins in der DCE-Lösung kaum angegriffen. Vielleicht wird diese Bindung durch die CHCl_2 -Gruppen der solvatisierenden DCE-Moleküle für einen hydrolytischen Angriff blockiert. Längere Peptidketten, deren Carboxylende aus dem „Solvatationsknäuel“ der Aminoendgruppe herausragt, müßten dann an der C-endständigen Bindung normal hydrolysiert werden. Die Verdoppelung von k_E bei der Hydrolyse des Poly-DL-alanins in DCE-HCl im Vergleich zur Hydrolyse in wäßrigem HCl stützt diese Vorstellung.

Einige Versuche, die über die alkalische Hydrolyse des Dialanyl-¹⁵N-alanins angestellt wurden, zeigen, daß hier die Hydrolyse wesentlich schneller verläuft, k_α , k_β und k_D jedoch ungefähr gleich groß sind.

C. AKTIVIERUNGSENERGIEN UND AKTIVIERUNGSENTROPIEN

In dem untersuchten Bereich von 25–55° folgt die Temperaturabhängigkeit der Hydrolysegeschwindigkeit der Polyamino-säuren der ARRHENIUSSchen Gleichung $k = A \cdot e^{-\Delta E/RT}$ (Abb. 3). Die Übereinstimmung ist in Anbetracht der relativ ungenauen Methode in den meisten Fällen gut. Eine Ausnahme ist Poly-DL-isoleucin, das aber – selbst bei einem mittleren Polymerisationsgrad von nur 10 – in den verwendeten Hydrolysiermischungen nicht vollständig löslich ist, sondern nur stark aufquillt. Die Hydrolyse ist daher auch von der Lösungsgeschwindigkeit abhängig. Die einzelnen ARRHENIUSSchen Aktivierungsenergien, Aktionskonstanten, die Aktivierungsenthalpien und -entropien sowie die freien Aktivierungsenthalpien sind in Tabelle 3 angegeben.

Läßt man die Werte für Poly-DL-alanin außer Betracht, so erhält man für die übrigen Polyamino-säuren im Mittel eine Aktivierungsenergie von 24 kcal für eine Endbindung und 23 kcal für eine innere Bindung.

Die Unterschiede in den Hydrolysegeschwindigkeiten dieser Polyamino-säuren werden durch Unterschiede in den Aktionskonstanten bzw. Aktivierungsentropien bestimmt. Die Streuung der einzelnen Aktivierungsenergien (± 1.5 kcal) war jedoch so groß, daß ein Gang in den Aktionskonstanten nicht erkennbar war. Diese Konstanten (Tabelle 3) sind daher mit den mittleren Aktivierungsenergien berechnet worden.

Die Aktionskonstanten und Aktivierungsentropien in der Reihe Poly-DL- α -aminobuttersäure bis Poly-DL-isoleucin, wie auch die Abstufung der Werte für die Endbindung und die Unterschiede zwischen den Werten für die Endbindungen und inneren Bindungen, sprechen für einen sterischen Effekt der Aminosäureseitenketten. Gleiches gilt für die Werte des Poly-DL-alanins. Die stark negativen Aktivierungsentropien ΔS^\ddagger ,

⁸⁾ W. KERN und B. SCHERHAG, Makromolekulare Chem. 28, 209 (1958).

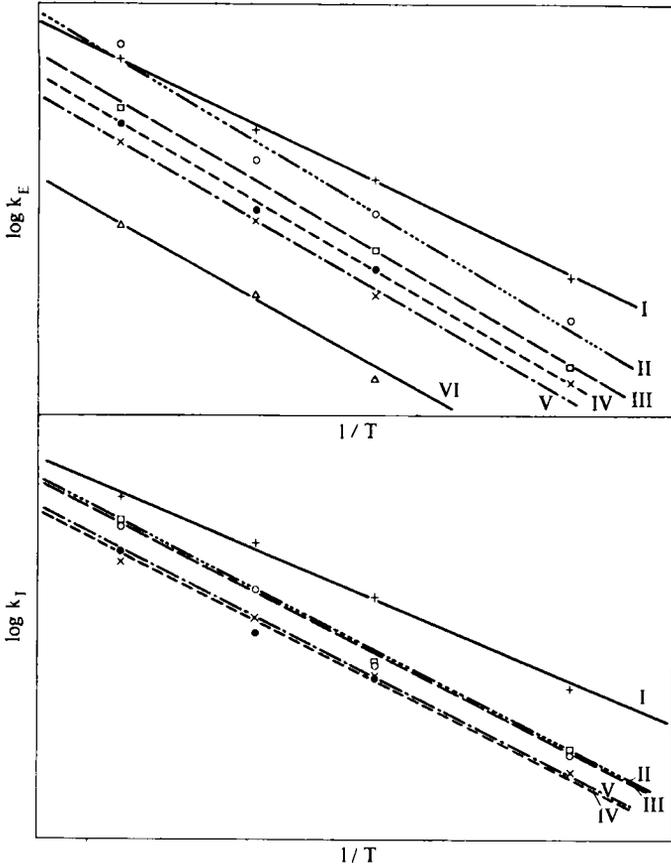


Abbildung 3. Temperaturabhängigkeit der Hydrolyse der Poly- α -amino-säuren

- I —+— Poly- α -alanin
- II ---o--- Poly- α -amino-buttersäure
- III ---□--- Poly-norleucin
- IV ---●--- Poly-phenylalanin
- V ---x--- Poly-leucin
- VI ---Δ--- Poly-isoleucin

Tabelle 3. Konstanten der sauren Peptidhydrolyse bei 37°

| Poly-aminosäure | ΔE | für die <i>Endbindung</i> | | | | für eine <i>innere Bindung</i> | | | | |
|------------------------|------------|---------------------------|---------------------|---------------------|---------------------|--------------------------------|--------------------|---------------------|---------------------|---------------------|
| | | A | ΔH^\ddagger | ΔS^\ddagger | ΔG^\ddagger | ΔE | A | ΔH^\ddagger | ΔS^\ddagger | ΔG^\ddagger |
| Poly-DL-ala | 21 | $7.7 \cdot 10^8$ | 20.7 | -20 | 27 | 20 | $2.3 \cdot 10^7$ | 19.2 | -27 | 28 |
| Poly-DL- α -amb | 23 | $5.8 \cdot 10^{10} *$ | 22.6 | -15 | 27 | 22 | $1.3 \cdot 10^9 *$ | 21.6 | -21 | 28 |
| Poly-DL-norleu | 25 | $3.2 \cdot 10^{10} *$ | 24.8 | -9 | 28 | 23 | $1.1 \cdot 10^9 *$ | 22.4 | -18 | 28 |
| Poly-DL-phe | 25 | $2.4 \cdot 10^{10} *$ | 23.9 | -12 | 29 | 24 | $0.8 \cdot 10^9 *$ | 23.4 | -16 | 28 |
| Poly-DL-leu | 24 | $2.0 \cdot 10^{10} *$ | 23.3 | -15 | 28 | 22 | $0.8 \cdot 10^9 *$ | 21.4 | -22 | 28 |
| Poly-DL-isoleu | 24 | $0.5 \cdot 10^{10} *$ | 23.4 | -17 | 29 | — | — | — | — | — |

*) berechnet aus der mittleren Aktivierungsenergie 24 kcal bzw. 23 kcal

–20 cal/Grad für die Endbindung und –27 cal/Grad für die innere Bindung, zeigen eine geringe Bildungswahrscheinlichkeit des Übergangszustandes der Hydrolyse an. Kalottenmodelle zeigen, daß die Methylseitenkette im Polyalanin die Peptidbindung relativ wenig sterisch hindert. Infolgedessen steigt hier die sterische Hinderung beim Übergang zum tetraedrischen Übergangszustand stärker an als bei den anderen Polyaminosäuren, da schon die Äthylseitenkette in der Poly-DL- α -amino-buttersäure die Peptidbindung auch im Ausgangszustand stark behindert. Da nach diesen Vorstellungen Freiheitsgrade der inneren Rotation und Schwingung im Übergangszustand des Poly-DL-alanins „einfrieren“, wodurch der Beitrag an kinetischer Energie zur Aktivierungsenergie herabgesetzt wird, ist auch die um jeweils 3 kcal kleinere Aktivierungsenergie der Hydrolyse des Poly-DL-alanins kein Beweis für das Auftreten induktiver Effekte bei der sauren Peptidhydrolyse.

BESCHREIBUNG DER VERSUCHE

Die Polypeptide

Die Darstellung von Poly-DL-alanin, Poly-DL- α -amino-buttersäure, Poly-DL-norleucin, Poly-DL-phenylalanin, Poly-DL-leucin und Poly-DL-isoleucin wurde bereits beschrieben¹⁾.

Poly-DL-[p-methoxy-phenyl]-alanin

a) 4-[*p*-Methoxy-benzyl]-DL-oxazoliddion-(2.5). — 9.5 g DL-[*p*-Methoxy-phenyl]-alanin wurden in 250 ccm Dioxan suspendiert und bei ca. 45° mit Phosgen behandelt. Nach 50 bis 60 Min. war die Aminosäure in Lösung gegangen. Nach Abdestillieren des Dioxans i. Vak. kristallisierte der Rückstand sofort. Aus Chloroform sechseckige oder rhombische Blättchen, Schmp. 146–148° (unkorr.). Ausbeute 10.3 g (95% d. Th.).

b) Poly-DL-[*p*-methoxy-phenyl]-alanin. — 9.5 g des Oxazoliddions-(2.5) wurden in 190 ccm Dioxan gelöst und nach Zusatz von 9.5 ccm Wasser auf dem Wasserbad erhitzt. Nach ca. 30 Min. trübte sich die Lösung, und das Polypeptid flockte aus. Ausbeute, nach Auskochen mit Wasser und Trocknen über KOH und H₂SO₄, 7.3 g (93% d. Th.). In der Polyaminosäure konnten chromatographisch keine mit Ninhydrin anfärbbaren Peptide nachgewiesen werden. Mittlerer Polymerisationsgrad 19.9.

Poly-DL-[p-nitro-phenyl]-alanin

a) 4-[*p*-Nitro-benzyl]-DL-oxazoliddion-(2.5). — 10.6 g DL-[*p*-Nitro-phenyl]-alanin hat man in 250 ccm Dioxan suspendiert und bei 45° Phosgen eingeleitet. Nach 330 Min. war die Lösung klar. Das Dioxan wurde i. Vak. abgedampft und der kristalline Rückstand zweimal aus Dioxan/Petroläther umkristallisiert. Schwach gelbliche, derbe Nadeln, die beim langsamen Erhitzen ohne zu schmelzen polymerisieren. Beim schnellen Erhitzen Schmp. 182° (unkorr.). Ausbeute 9.8 g (83% d. Th.).

b) Poly-DL-[*p*-nitro-phenyl]-alanin. — 9.2 g des Oxazoliddions-(2.5) wurden in 185 ccm Dioxan gelöst und 1.9 ccm Wasser zugesetzt. Beim Erwärmen trat schnell eine leichte Trübung auf, die sich jedoch auch bei längerem Kochen nicht verstärkte. Erst nach Erhöhung des

Wassergehaltes auf 3% und 5 stdg. Kochen auf dem Wasserbad flockte die Polyaminosäure aus. Nach Abfiltrieren und Waschen mit Dioxan und heißem Wasser wurden 3.2 g (43% d. Th.) eines ockergelben Pulvers erhalten. Das Chromatogramm in Butanol/Eisessig zeigte keine mit Ninhydrin anfärbbaren Anteile. Das Polymerisat ist ebenso wie *p*-Nitro-phenylalanin gegen Alkalien empfindlich.

Synthese des Dialanyl-¹⁵N-alanins

¹⁵N-Alanin wurde aus Phthalimid-¹⁵N und α -Brom-propionsäureäthylester dargestellt⁹). Der ¹⁵N-Gehalt des Alanins betrug 9.47%. Carbobenzoxyalanylalaninmethylester wurde nach der gemischten Anhydridmethode durch Kuppeln der beiden Komponenten mittels Chlorameisensäureäthylesters dargestellt und nach bekannter Vorschrift¹⁰) in das Azid übergeführt.

Eine Lösung von 3.9 g frisch hergestelltem Carbobenzoxyalanylalaninazid in Äther wird zu einer ätherischen Lösung von 0.02 Mol ¹⁵N-Alaninbenzylester gegeben. Über Nacht scheidet sich der Carbobenzoxy-dialanyl-¹⁵N-alaninbenzylester kristallin ab. Die Kristalle werden abgesaugt, in Essigester aufgenommen und die Lösung mit verd. Salzsäure, verd. NaHCO₃-Lösung und zum Schluß mit Wasser durchgeschüttelt. Nach dem Trocknen über Na₂SO₄ wird der Essigester abdestilliert. Ausbeute an Carbobenzoxytripeptid-benzylester 5.5 g (61% d. Th.). Der Ester wird in 200 ccm absol. Methanol gelöst, mit 10 ccm Eisessig und Pd-Katalysator (aus 2 g PdCl₂) versetzt und die Benzylgruppe und der Carbobenzoxyrest bei 60° abhydriert. Das Tripeptid fällt aus der methanolischen Lösung aus. Ausbeute 2.8 g. Der ¹⁵N-Gehalt wurde nach Totalhydrolyse mit 6 n HCl bei 110° zu 9.51% bestimmt.

Hydrolyse der Polypeptide

Als Beispiel für die Hydrolyse der Polyaminosäuren sei in Tabelle 4 der Hydrolysenverlauf des Poly-DL-alanins bei 37° angegeben.

Tabelle 4. Hydrolyse von Poly-DL-alanin

| t (Std.n.) | [A] (Mol/l) | [NH ₂] _t (Mol/l) | [NH ₂] _t - [A] (Mol/l) | Poly-DL-alanin: mittlerer Polymerisationsgrad 53.9. HCl- Konzentration: [H ₃ O ⁺] = 4.85 n. Konzentration der gesamten Ala- ninreste: [AR] = 50.0 · 10 ⁻² Mol/l. Anfangskonzentration der Aminoendgruppen: [NH ₂] _{t=0} = 0.93 · 10 ⁻² Mol/l. Anfangskonzentration des Alanins: [A] _{t=0} = 0 |
|---------------|-------------------------|--|--|---|
| 3 | 0.13 · 10 ⁻² | — | — | |
| 6 | 0.26 | 2.82 · 10 ⁻² | 2.56 · 10 ⁻² | |
| 12 | 0.38 | 4.25 | 3.87 | |
| 18 | 0.58 | 6.87 | 6.29 | |
| 24 | 0.81 | 6.47 | 5.66 | |
| 32 | 1.25 | 8.52 | 7.27 | |
| 38 | 1.44 | 9.67 | 8.23 | |
| 48 | 1.87 | 11.22 | 9.35 | |

⁹) vgl. R. SCHOENHEIMER und S. RATNER, J. biol. Chemistry 127, 301 (1939).

¹⁰) M. BERGMANN und L. ZERVAS, J. biol. Chemistry 113, 341 (1936).

Aus den Kurven für $[A]$ und $([NH_2]_t - [A])$ (Abb. 4 und 5) wurden nach dem bereits in den vorhergehenden Mitteilungen beschriebenen Verfahren graphisch k_E zu $83.3 \cdot 10^{-8} \text{ Sek.}^{-1}$ und k_I zu $27.3 \cdot 10^{-8} \text{ Sek.}^{-1}$ ermittelt.

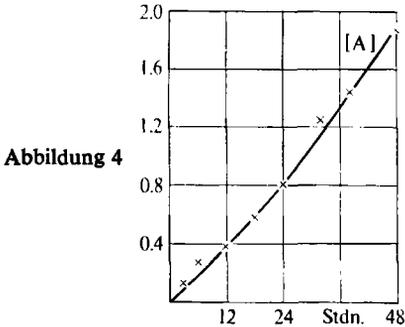


Abbildung 4

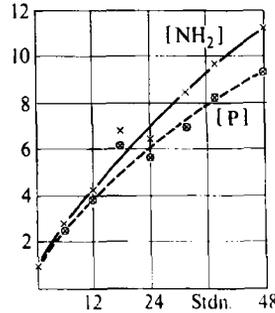


Abbildung 5

Hydrolyse des Poly-DL-alanins bei 37°

Abb. 4. Ordinaten: $[A]$ in 10^{-2} Mol/l ; Abb. 5. Ordinaten: $[NH_2]$ und $[NH_2]_t - [A] = [P]$ (Konzentration an polymerem Alanin) in 10^{-2} Mol/l

Die auf gleiche Weise bestimmten Hydrolysekonstanten der Polyamino-säuren sind in Tabelle 5 zusammengefaßt *).

Tabelle 5. Hydrolysekonstanten

| Poly-aminosäure | $k_E \cdot 10^8 \text{ Sek.}^{-1}$ | | | | $k_I \cdot 10^8 \text{ Sek.}^{-1}$ | | | |
|------------------------|------------------------------------|------|-------|-------|------------------------------------|------|------|-------|
| | 25° | 37° | 45° | 54.4° | 25° | 37° | 45° | 54.4° |
| Poly-DL-ala | 19.2 | 83.3 | 173.0 | 486 | 7.0 | 27.3 | 62.3 | 130 |
| Poly-DL- α -amb | 10.1 | 49.5 | 107.6 | 498 | 2.7 | 10.8 | 32.0 | 81.9 |
| Poly-DL-norleu | 5.2 | 27.2 | — | 238 | 2.7 | 9.9 | — | 88.7 |
| Poly-DL-leu | 4.3 | 14.0 | 43.6 | 138 | 2.0 | 8.3 | 22.5 | 47.3 |
| Poly-DL-phe | — | 21.3 | 50.7 | 180 | — | 7.6 | 15.6 | 60.9 |
| Poly-DL-isoleu | — | 4.1 | 14.7 | 40.6 | — | 2.5 | 5.3 | 9.8 |

Die ARRHENIUSschen Aktivierungsenergien wurden aus einem Diagramm $\log(k)$ gegen $1/T$ graphisch bestimmt. Die Aktivierungsenthalpien wurden nach $\Delta H^\ddagger = \Delta E - RT$ berechnet, die freien Aktivierungsenthalpien und die Aktivierungsentropien mit Hilfe der Gleichung

$$k_E \text{ bzw. } k_I = (kT/h) \cdot e^{\Delta S^\ddagger/R} \cdot e^{-\Delta H^\ddagger/RT} = (kT/h) \cdot e^{-\Delta G^\ddagger/RT}$$

Hydrolyse des Dialanyl-¹⁵N-alanins: 2.5 mMol des Tripeptids wurden in 50 ccm der jeweiligen Hydrolysenmischung gelöst und in einem Meßkolben in einen Thermostat von 37° getaucht. Der Mischung wurden in bestimmten Zeitabständen 1 ccm zur Aminosäurebestimmung nach der Chloramin-T-Methode und 4 ccm zur Bestimmung der ¹⁵N-Konzentration entnommen. Zur ¹⁵N-Bestimmung wurden die 4 ccm mit NaOH neutralisiert, mit

*) Die einzelnen Meßwerte sind in der Dissertation H. F. GRÜTZMACHER, Univ. Hamburg 1959, angegeben.

4 ccm Eisessig-Acetat-Puffer versetzt und in ein Zersetzungskölbchen gegeben, das in einem schwenkbaren seitlichen Ansatz 2 ccm 30-proz. NaNO_2 -Lösung enthält. Nach Anschließen des Kölbchens an eine Hochvakuumapparatur und Evakuieren wurde durch Schwenken des seitlichen Ansatzes die NaNO_2 -Lösung mit der Aminosäurelösung gemischt. Nach halbstündiger Reaktion wurde das reichlich entstandene NO mit flüssiger Luft ausgefroren und das restliche Gas mit Hilfe einer TÖPLER-Pumpe in ein Probengefäß übergeführt. Der ^{15}N -Gehalt des Gases wurde mit einem CH_4 -Massenspektrometer der ATLAS-WERKE, Bremen, bestimmt. Durch Kombination eines Massenprogrammwählers mit einer Kompensations-schaltung konnte direkt das Verhältnis der Intensitäten der Ionenströme der Massen 29 und 28 abgelesen werden. Bezeichnet man dieses Verhältnis I_{29}/I_{28} als χ , so ist der Prozentgehalt an ^{15}N in der Probe: $\%^{15}\text{N} = 100 \chi / (2 + \chi)$.

Im Anfangsstadium der Hydrolyse ist die Gesamtkonzentration der Aminogruppen gleich der Anfangskonzentration des Tripeptids (T_0) und der Konzentration der Aminosäuren (A). Mit Hilfe des ^{15}N -Prozentgehaltes der C-endständigen Peptidbindung von 9.515 und des ^{15}N -Prozentgehaltes des normalen Stickstoffes von 0.365 erhält man so für die Konzentration der vom Carboxylende des Tripeptids stammenden Aminosäure

$$^{15}\text{A} = (T_0 + A) \frac{2 (\%^{15}\text{N} - 0.365)}{9.515 - 0.365}$$

Die Meßwerte für die Hydrolyse des Dialanyl- ^{15}N -alanins in 3.07 *n* HCl und in DCE-4.28 *n* HCl sind in den Tabellen 6 und 7 aufgeführt:

Tabelle 6. Hydrolyse in 3.07 *n* HCl bei 37°
 $T_0 = 0.047 \text{ Mol/l}$, $A_0 = 0.010 \text{ Mol/l}$, $^{15}A_0 = 0.0035 \text{ Mol/l}$

| t (Std.n.) | A | $T_0 - A$ | $\log (T_0/T_0 - A)$ | $1/t \cdot \log (T_0/T_0 - A)$ |
|---------------|--------|-----------|----------------------|--------------------------------|
| 6 | 0.0103 | 0.0463 | 0.0065 | (0.0011) |
| 12 | 0.0140 | 0.0430 | 0.0386 | (0.0032) |
| 24 | 0.0153 | 0.0417 | 0.0520 | 0.0021 |
| 48 | 0.0189 | 0.0381 | 0.0912 | 0.0019 |
| 72 | 0.0221 | 0.0349 | 0.1293 | 0.0018 |
| 96 | 0.0256 | 0.0314 | 0.1752 | 0.0018 |
| 144 | 0.0302 | 0.0268 | 0.2440 | 0.0017 |
| 148 | 0.0312 | 0.0258 | 0.2605 | 0.0018 |
| 192 | 0.0358 | 0.0212 | 0.3458 | 0.0018 |

| t (Std.n.) | $\%^{15}\text{N}$ | ^{15}A | $T_0 - ^{15}\text{A}$ | $\log (T_0/T_0 - ^{15}\text{A})$ | $1/t \cdot \log (T_0/T_0 - ^{15}\text{A})$ |
|---------------|-------------------|-----------------|-----------------------|----------------------------------|--|
| 12 | 0.761 | 0.0053 | 0.0452 | 0.0170 | 0.0014 |
| 24 | 0.874 | 0.0070 | 0.0435 | 0.0336 | 0.0014 |
| 50 | 1.124 | 0.0110 | 0.0395 | 0.0755 | 0.0015 |
| 74 | 1.249 | 0.0134 | 0.0371 | 0.1027 | 0.0014 |
| 96 | 1.399 | 0.0164 | 0.0341 | 0.1393 | 0.0014 |
| 144 | 1.685 | 0.0216 | 0.0289 | 0.2112 | 0.0015 |
| 192 | 1.701 | 0.0243 | 0.0262 | 0.2538 | 0.0013 |

Tabelle 7. Hydrolyse in DCE-HCl-Mischung (4.28 n HCl)
 $T_0 = 0.0470$ Mol/l, $A_0 = 0.010$ Mol/l, $^{15}A_0 = 0.0061$ Mol/l

| t (Stdn.) | A | $T_0 - A$ | $\log (T_0/T_0 - A)$ | $1/t \cdot \log (T_0/T_0 - A)$ |
|--------------|--------|-----------|----------------------|--------------------------------|
| 6 | 0.0124 | 0.0446 | 0.0228 | (0.0038) |
| 12 | 0.0177 | 0.0393 | 0.0777 | 0.0032 |
| 48 | 0.0230 | 0.0340 | 0.1406 | 0.0029 |
| 71 | 0.0278 | 0.0292 | 0.2067 | 0.0029 |
| 96 | 0.0318 | 0.0252 | 0.2707 | 0.0028 |
| 144 | 0.0378 | 0.0192 | 0.3888 | 0.0027 |
| 192 | 0.0470 | 0.0100 | 0.6721 | (0.0035) |
| 240 | 0.0652 | — | — | (—) |

| t (Stdn.) | % ^{15}N | ^{15}A | $T_0 - ^{15}A$ | $\log (T_0/T_0 - ^{15}A)$ | $1/t \log (T_0/T_0 - ^{15}A)$ |
|--------------|------------|----------|----------------|---------------------------|-------------------------------|
| 24 | 0.818 | 0.0064 | 0.0467 | 0.0028 | 0.00011 |
| 48 | 0.958 | 0.0091 | 0.0440 | 0.0286 | 0.00060 |
| 71 | 1.088 | 0.0105 | 0.0426 | 0.0427 | 0.00060 |
| 96 | 1.147 | 0.0135 | 0.0396 | 0.0744 | 0.00078 |
| 144 | 1.298 | 0.0173 | 0.0358 | 0.1182 | 0.00079 |
| 192 | 1.433 | 0.0223 | 0.0308 | 0.1835 | 0.00096 |
| 240 | 1.575 | 0.0297 | 0.0234 | 0.3029 | 0.00126 |