

Zur Frage der Unterscheidung sterischer und induktiver Einflüsse beim Abbau synthetischer Polypeptide¹

K. HEYNS, W. WALTER, und H. F. GRÜTZMACHER, *Chemisches Staatsinstitut, Universität Hamburg, Deutsche Bundesrepublik*

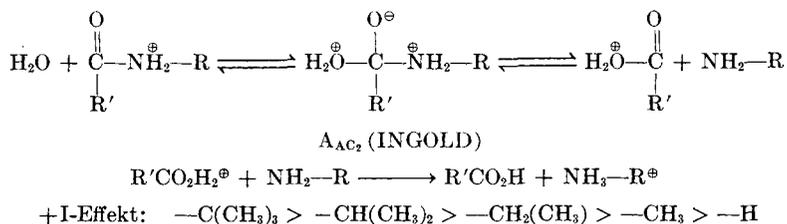
Schon vor 25 Jahren sind in der Schule von Aberhalden und von Levene Regeln über die Stabilität von Polypeptidbindungen, an denen Monoaminomonocarbonsäuren beteiligt sind, aufgestellt worden.²

1. Die Stabilität einer Peptidbindung wächst mit der Länge des aliphatischen Restes am α -C-Atom.

2. Sind die aliphatischen Reste verzweigt, so weisen sie eine stärker stabilisierende Wirkung auf, deren Wirkung in dem Masse wächst, wie die Verzweigungsstelle an das α -C-Atom heranrückt.

Voraussetzung für ein Verständnis der Einflüsse, die von der Polypeptidmolekel her die Stabilität der Peptidbindung beeinflussen, ist die Kenntnis des Mechanismus, nach dem die Hydrolyse einer Peptidbindung verläuft.

Formelschema 1:



Der im Formelschema 1 dargestellte Mechanismus für die Hydrolyse einer Peptidbindung wurde von Ingold als A_{AC_2} -Reaktion klassifiziert, wobei "AC" besagt, dass die Spaltung der Molekel in Analogie zu dem entsprechenden Mechanismus der Esterversiefung an der C-N-Bindung erfolgt.

Man erkennt, dass das Wesentliche des Mechanismus in einem nucleophilen Angriff des Wassers auf das α -C-Atom der Carbonylgruppe besteht. Es ist also zu erwarten, dass solche Substituenten, welche die Elektronenverteilung an diesem C-Atom beeinflussen, sich auf die Hydrolyse auswirken werden.

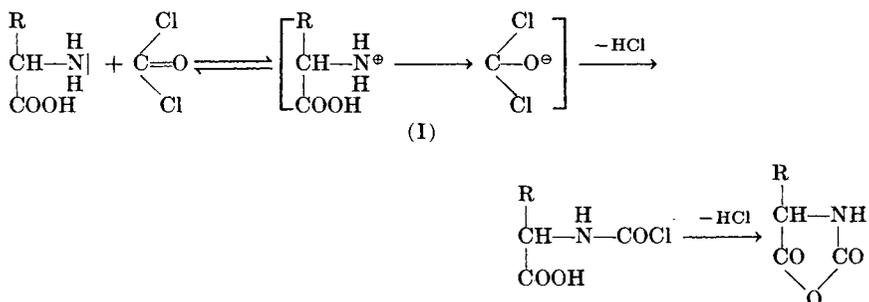
Hier interessiert uns besonders der Rest R' , der in dieser Hinsicht den grössten Einfluss haben wird, da er unmittelbar am C-Atom der Carbonylgruppe sitzt. In der 3. Zeile des Schemas 1 ist die Abstufung des +I-

Effektes verschiedener Alkylgruppen dargestellt. Da mit steigendem +I-Effekt des Restes R' das Elektronenangebot am α -C-Atom der Carbonylgruppe zunehmen muss, ist mit einer Verlangsamung der Hydrolyse in der Reihe der Substituenten R' zu rechnen, wenn wir in der 3. Reihe des Schemas 1 von rechts nach links fortschreiten. Dies ist aber auch die Reihenfolge der Beeinflussung der Stabilität der Peptidbindungen durch aliphatische Substituenten, wie sie in den beiden Regeln, die eingangs erwähnt wurden, zum Ausdruck kommt.

Ebenso gut lässt sich aber diese Regel mit Hilfe der Vorstellung von der sterischen Hinderung deuten, denn die Raumerfüllung des Substituenten R' steigt in der gleichen Reihenfolge wie der +I-Effekt, der ihnen zugeordnet werden kann. Da beide Einflüsse in der gleichen Richtung laufen, ist eine Unterscheidung zwischen ihnen zunächst nicht möglich gewesen.

Wir wurden auf die Möglichkeit, eine solche Entscheidung zu treffen, aufmerksam, als wir in anderem Zusammenhang synthetische Polypeptide benötigten, die wir durch Polymerisation der entsprechenden 2,5-Oxazolidione darstellen. Die letzteren haben wir nach dem Verfahren von Fuchs³ durch Einleiten von Phosgen in eine Suspension der entsprechenden Aminosäure in Dioxan hergestellt.

Formelschema 2:



Die Reaktion ist auf Formelschema 2 dargestellt. Der Endpunkt der Reaktion ist erreicht, wenn die zunächst in dem Dioxan suspendierte Aminosäure vollständig in Lösung gegangen ist.

Wir fanden nun, dass die Zeit, in der dies unter vergleichbaren Bedingungen geschieht, in charakteristischer Weise von der verwendeten Aminosäure abhängt. 0,1 Mol Glycin konnte unter den von uns verwendeten Bedingungen innerhalb 6 Stunden nur zur Hälfte umgesetzt werden; beim DL-Pseudoleucin (R = tert.-Butyl) war die Umsetzung in 5-10 Minuten beendet. Zwischen diese beiden Extremwerte ordnen sich die übrigen untersuchten Aminosäuren in der Reihenfolge Alanin, α -Aminobuttersäure, Norleucin, Leucin, Isoleucin ein. Man erkennt, dass es sich um die gleiche Reihenfolge handelt, die die Aminosäuren annehmen müssen, wenn man sie nach den Regeln von Abderhalden und Levene so anordnet, dass sie die von ihnen gebildete Peptidbindung in steigendem Masse stabilisieren, mit dem Unterschied, dass bei dieser Reaktion die-

gruppe der ursprünglichen Aminosäure wiedererkennen. Auch in diesem Falle verlaufen die elektrostatischen und sterischen Effekte in ihrer Auswirkung parallel.

Nach diesen Ergebnissen schien uns eine quantitative Behandlung des Problems aussichtsreich zu sein, und wir haben diese am Beispiel der sauren Hydrolyse der Polypeptide durchgeführt.

Mit Ausnahme des Polyglycins, das in LiCl-Lösung untersucht wurde, wurden die Polypeptide in Dichloressigsäure mit 4 *N* hydrolysiert und der Abbau durch Bestimmung der freien Aminogruppen nach van Slyke in einer von Kainz angegebenen Apparatur⁵ verfolgt. Daneben wurden die in Freiheit gesetzten Aminosäuren durch Oxydation mit Chloramin T nach Kemble und MacPherson⁷ bestimmt, wobei das bei der Oxydation freiwerdende CO₂ in der Warburg-Apparatur quantitativ erfasst wurde. Auf diese Weise kann zwischen der Hydrolyse der endständigen Peptidbindungen (K_E), die zur Bildung von Aminosäuren führt, und der Hydrolyse der inneren Bindungen (K_I), durch welche nur neue Polypeptide entstehen, unterschieden werden. Die Spaltung der inneren Bindungen ergibt sich aus der Differenz zwischen den Werten für die Zunahme der Aminogruppen und der Bildung der Aminosäuren.

Eine Sonderstellung nehmen bei der Hydrolyse die Dipeptide ein, die etwa zwei- bis acht mal langsamer hydrolysiert werden als die mehr als drei Aminosäuren enthaltenden Polypeptide.⁸ Die Dipeptide reichern sich also im Verlauf der Hydrolyse an und verschieben daher in zunehmendem Mass die Reaktionsgeschwindigkeitskonstante. Es kann also nur eine Anfangsgeschwindigkeitskonstante festgestellt werden.

Formelschema 4:

$$\frac{d[A]}{dt} = K_E[H_3O^+]N_E$$

$$\frac{d[A]}{dt} = K_E[H_3O^+]2[NH_2-]_{t=0}; \quad t \longrightarrow 0$$

$$\frac{d[P]}{dt} = K_I[H_3O^+]N_I$$

$$\frac{d[P]}{dt} = K_I[H_3O^+]([Ar]-3[NH_2-]_{t=0}); \quad t \longrightarrow 0$$

[A] Konz. der Aminosäuren

[P] Konz. der Polypeptide

[Ar] Konz. der Aminosäurereste

N_E Anzahl der äusseren Peptidbindungen

N_I Anzahl der inneren Peptidbindungen

Diese wurde auf Grund der Schema 4 dargestellten Beziehungen ermittelt.

TABELLE I

Reaktionsgeschwindigkeitskonstanten der untersuchten Polypeptide bezogen auf gleiche Säurekonzentration und Poly-DL-alanin = 1

Polypeptid	K_E	K_I	K_E/K_I
Poly-glycin	256	500	0,53
Poly-DL-alanin	100	100	1,41
Poly-DL- α -aminobuttersäure	71	22	4,58
Poly-DL-phenylalanin	72	13	7,53
Poly-DL-norleucin	39	20	2,75
Poly-DLLeucin	20	17	1,69
Poly-DL-isoleucin	6,0	5	1,62

Die Werte dieser Konstanten bezogen auf gleiche Säurekonzentration und Poly-DL-Alanin = 100 sind in Tabelle I verzeichnet. Hier fallen zwei Punkte besonders auf. Man erkennt erstens, dass sich die Konstante der Hydrolyse der inneren Peptidbindungen der Polypeptide aus unverzweigten Aminosäuren von der α -Aminobuttersäure ab praktisch nicht mehr ändert. Die Abweichungen liegen in der Fehlergrenze. In der Mitte der Polypeptidkette wirken sich also sterische Einflüsse auf den Abbau der Peptidbindungen beherrschend aus. Dass dies an den Enden der Kette nicht der Fall ist, zeigen die Werte für das Phenylalanin. Dieses zeigt eine Geschwindigkeitskonstante der Spaltung der äusseren Peptidbindungen in der Grössenordnung der α -Aminobuttersäure. Dieser Befund ist nicht zu erklären, wenn man nur sterische Faktoren heranziehen will. In diesem Falle müsste des Polyphenylalanin eine Hydrolysenkonstante der äusseren Bindung von der Grösse des Leucins haben, mit dem es bezüglich der Spaltbarkeit seiner inneren Bindungen vergleichbar ist. Das andersartige Verhalten der äusseren Bindungen kann aber bei Berücksichtigung des +I-Effektes des Benzolkernes, der eine Verminderung des Elektronenangebotes am C-Atom der Carbonylgruppe und damit eine leichtere Spaltbarkeit der Peptidbindung bewirkt, erklärt werden. Daher scheint uns das unterschiedliche Verhalten der inneren und der äusseren Peptidbindungen bei der Hydrolyse darauf zurückgeführt werden zu können, dass die Eigenschaften der äusseren Peptidbindungen in erheblichem Masse von den induktiven Einflüssen der Substituenten bestimmt werden, während die Kinetik des Abbaues der inneren Peptidbindungen von den sterischen Eigenschaften der Substituenten beherrscht wird.

Literatur

- (1) Weitere Einzelheiten in *Ann. Chem. Liebigs*, **609**, 209, 225 (1957).
- (2) E. Abderhalden u. Sh. Suzuki, *Z. physiol. Chem., Hoppe-Seyler's* **170**, 158 (1927); **173**, 250 (1928). E. Abderhalden u. E. Haase, *Fermentforschung* **13**, 303 (1932). E. Abderhalden u. E. Fleischmann, *Fermentforschung* **9**, 524 (1928). E. A. Levene, P. E. Steiger, u. A. Rothen, *J. Biol. Chem.*, **97**, 717 (1932).
- (3) F. Fuchs, *Ber. deut. chem. Ges.*, **55**, 2943 (1922).
- (4) M. Gordon, I. G. Miller, u. A. R. Day, *J. Am. Chem. Soc.*, **70**, 1946 (1948). E. Mc. C. Arnett, I. G. Miller, u. A. R. Day, *J. Am. Chem. Soc.*, **72**, 5635 (1950).

- (5) S. G. Waley u. J. Watson, *Proc. Roy. Soc. [London]*, **A199**, 499 (1949).
 (6) G. Kainz, *Mikorchim. Acta* **1953**, 349. G. Kainz u. F. Schöller, *Z. physiol. Chem., Hoppe-Seyler's*, **301**, 529 (1955); *Biochem. Z.* **327**, 292 (1955/56).
 (7) A. R. Knuth u. H. T. MacPherson, *Biochem. J.*, **56**, 548 (1954).
 (8) R. L. M. Synge, *Biochem. J.*, **39**, 351 (1945). L. Lawrence u. W. J. Moore, *J. Am. Chem. Soc.*, **73**, 3973 (1951). P. Cristol, C. Benezech, u. A. Castres de Paulet, *Bull. soc. chim. France*, **21**, 684 (1954).

Zusammenfassung

Durch Anwendung geeigneter Analysenmethoden kann die Kinetik des Abbaues der inneren und äusseren Peptidbindungen von Polypeptiden unterschieden werden, wenn diese aus den gleichen Aminosäuren aufgebaut sind. Es wurden Polypeptide untersucht, die aus Monoaminomonocarbonsäuren mit verschiedenen aliphatischen und aromatischen Resten am α -Kohlenstoffatom aufgebaut waren. Bei der sauren Hydrolyse dieser Polypeptide zeigten die Hydrolysenkonstanten der inneren bzw. der äusseren Peptidbindungen jeweils einen charakteristischen Gang in Abhängigkeit von der Substitution, der in der Weise gedeutet werden kann, dass der Abbau der äusseren Peptidbindungen im wesentlichen von induktiven Einflüssen, derjenige der inneren Peptidbindungen aber überwiegend von sterischen Einflüssen beherrscht wird. Bei der Bildung der 2,5-Oxazoliddione bei der Einwirkung von Phosgen auf in Dioxan suspendierte Aminosäuren sind vorwiegend induktive Einflüsse von Bedeutung für die Reaktionsgeschwindigkeit.

Synopsis

Using appropriate analytical methods, the kinetics of the degradation of inner and outer peptide bonds in polypeptides can be distinguished, if these are build up by the same amino acids. Polypeptides built up by mono-amino acids containing different aliphatic and aromatic residues on the α -carbon atom are studied. In the acid hydrolysis of these polypeptides the hydrolysis constants for the inner and outer peptide bonds, respectively, show a characteristic variation with the substitution. This may be explained by assuming that the degradation of outer peptide bonds mainly depends on inductive effects, but the degradation of inner peptide bonds depends on steric effects. For the formation of oxazolidine-2,5-diones by the action of phosgene on amino acids suspended in dioxane, inductive effects are most important for the reaction rate.

Résumé

Par l'utilisation de méthodes analytiques appropriées on peut arriver à distinguer la cinétique de dégradation des liaisons peptidiques internes et externes de polypeptides, si ceux-ci sont constitués des mêmes acides aminés. On a ainsi examiné des polypeptides, constitués d'acides monocarboxylés monoaminés porteurs de groupes aliphatiques et aromatiques à l'atome de carbone en α . Soumis à l'hydrolyse acide ces polypeptides fournissent des constantes d'hydrolyse des liaisons peptidiques internes et externes qui manifestent une variation caractéristique suivant le substituant. On peut ainsi montrer que la dégradation des liaisons peptidiques externes est déterminée principalement par des effets inductifs, tandis que celle des liaisons peptidiques internes l'est par des effets stériques. Lors de la formation de 2,5-oxazolide-dione par l'action du phosgène sur les acides aminés en suspension dans le dioxane, ce sont également les effets inductifs qui déterminent principalement les vitesses de réactions.

Discussion

A. G. Pasynskii (Moscow): (1) Es wäre interessant die induktiven und sterischen Effekte durch die thermodynamischen Grössen der inneren Energie und der Aktivierungsennergie ΔF^* auszudrücken, die der Peptidbindung entsprechen würden.

(2) Die kleinere Geschwindigkeit der Hydrolyse von Dipeptiden (2–8 mal), wie aus der Mitteilung ersichtlich ist, kann mit der Angabe von Linderström-Lang über sehr grössere Peptidbindung-bildungsenergie in Dipeptiden und über deren Erniedrigung in Peptiden höherer Ordnung in Einklang gestellt werden.

W. Walter (*Hamburg*): (1) Da die Ergebnisse aus kinetischen Messungen erhalten wurden, können Sie zunächst auch nur kinetisch interpretiert werden. Wir beabsichtigen die Erweiterung unserer Untersuchungen zur Bestimmung der Aktivierungsenergie und der Aktivierungsentropie.

(2) Die besonders langsame Hydrolyse der Dipeptide hat neben dem von Herrn Prof. Pasynskii herausgestellten thermodynamischen auch einen eindeutigen kinetischen Aspekt. Die $-\text{C}-\text{HN}-$ Bindung eines Dipeptides unterscheidet sich prinzipiell von



den Peptidbindungen höherer Peptide dadurch, dass sich in einer unmittelbaren Nähe eine starke positive Ladung (in saurer Lösung die NH_3^+ -Gruppe) oder eine starke negative Ladung (in alkalischer Lösung eine $-\text{COO}^-$ -Gruppe) befindet. Dies hat zur Folge, dass die Annäherung des hydrolysierenden Agens (bei der sauren Hydrolyse des H_3O^+ -Ions) erschwert wird und damit die Reaktionsgeschwindigkeit sinkt.