

# Untersuchungen über die Kinetik der Spaltung von Di- und Tripeptiden

## III. Mitt.: Über die rasche Spaltung von Serinpeptiden in rein wässriger Lösung<sup>1</sup>

Von HERMANN HARTMANN und JOACHIM HEIDBERG

Aus dem Institut für physikalische Chemie an der Universität Frankfurt am Main

(Z. Naturforschg. **19 b**, 1095—1100 [1964]; eingegangen am 22. September 1964)

The kinetic data of the hydrolysis of some serine peptides in diluted hydrochloric acid and in pure water and of the rearrangement of *O*-glycyl-DL-serine to glycyl-DL-serine were determined.

The hydrolysis of glycyl-DL-serine and DL-alanyl-DL-serine proceeds surprisingly rapidly in pure water as compared with the hydrolysis of those peptides in 0.5 N hydrochloric acid as well as the hydrolysis of glycyl-DL-alanine in purely aqueous solution. The O → N migration of the glycyl residue in *O*-glycyl-DL-serine which probably is an intermediate in the cleavage of glycyl-DL-serine in purely aqueous solution represents a three center reaction in which the nucleophilic attack on the *O*-peptide and peptide bond, respectively, involves a free basic amino group. The analogy between the serine peptide interconversion and the hydrolysis catalyzed by certain proteolytic enzymes is referred to.

Under the conditions of freeze drying are formed in hydrochloric acid solutions of DL-alanyl-DL-serine *O*-peptide and depsi-peptide.

Die bevorzugte Spaltung von Peptidbindungen in der Nachbarschaft von Hydroxygruppen in saurem Medium ist seit langem bekannt<sup>2</sup>. Sie wird auf die intermediäre Bildung cyclischer Strukturen und deren Spaltung in leicht hydrolysierbare Ester zurückgeführt. Kürzlich wurde die selektive Labilisierung von Peptidbindungen durch die Umwandlung des Serin- in den Dehydroalaninrest beschrieben<sup>3</sup>. Bei  $p_{\text{H}} 2$  und  $100^{\circ}\text{C}$  wird die der Doppelbindung benachbarte Peptidbindung nach 1 Stde. unter Bildung von Peptidamid und Brenztraubensäure hydrolysiert. An dieser Stelle soll über den Befund berichtet werden, daß die Selektivität der Spaltung von Serinpeptidbindungen schon bei Anwendung von reinem Wasser als hydrolysierendes Agens besonders ausgeprägt ist.

Zur Ermittlung der kinetischen Konstanten der Peptidbindungen sind die Peptidhydrolysate quantitativ zu analysieren. Die Hydrolysate der im Hinblick auf diese vollständige Analyse geeignet mit <sup>14</sup>C markierten Peptide wurden mit Hilfe der Papierchromatographie und Zonenelektrophorese getrennt und die isolierten Komponenten auf Grund ihrer Radioaktivität bestimmt<sup>4</sup>. Wegen der sauberen Trennbarkeit seiner Hydrolysate verwandten wir

DL-Alanyl-DL-serin als Substrat bei den Hydrolyseversuchen in saurer Lösung. In rein wässriger Lösung wurde zunächst die Spaltung von Glycyl-DL-serin untersucht, da angenommen wurde, daß dieses Peptid von allen Serinpeptiden mit einer bifunktionellen Aminosäure am schnellsten gespalten wird. Seine Hydrolysate wurden ausschließlich elektrophoretisch getrennt.

Die Synthese der <sup>14</sup>C-markierten Peptide wurde nach dem Anhydridverfahren ausgeführt<sup>5</sup>.

Da *O*-Glycyl-DL-serin bei der Hydrolyse von Glycyl-DL-serin möglicherweise als Zwischenkörper auftritt, wurde das Verhalten dieses Esters im isoelektrischen Bereich von Glycyl-DL-serin studiert. Die hierbei beobachtete rasche Umlagerung des *O*-Peptids in das Peptid wurde nach der  $p_{\text{H}}$ -Stat-Methode verfolgt.

## Experimenteller Teil

### Substanzen

#### <sup>14</sup>C-DL-Alanyl-DL-serin und <sup>14</sup>C-Glycyl-DL-serin

Centimolare Mengen des nach BERGMANN<sup>6</sup> dargestellten, an der Carboxylgruppe markierten <sup>14</sup>C-Carboxybenzoylalanin(-glycin) und des nach WAELSCH<sup>7</sup> ge-

<sup>1</sup> II. Mitt.: H. HARTMANN, J. FERNANDEZ, J. HEIDBERG u. H. JUNG, Z. Naturforschg. **18 b**, 269 [1963].

<sup>2</sup> E. FISCHER u. E. ABDERHALDEN, Ber. dtsch. chem. Ges. **40**, 3544 [1907]; B. WITKOP, Advances Protein Chem. **16**, 225 [1961].

<sup>3</sup> A. PATCHORNIK u. M. SOKOLOVSKY, J. Amer. chem. Soc. **86**, 1206 [1964].

<sup>4</sup> H. HARTMANN, J. HEIDBERG, J. HEINTGES u. H. JUNG, Z. analyt. Chem. **181**, 533 [1961].

<sup>5</sup> TH. WIELAND u. H. BERNHARD, Liebigs Ann. Chem. **572**, 190 [1951]; R. A. BOISSONNAS, Helv. chim. Acta **34**, 874 [1951]; J. R. VAUGHAN, J. Amer. chem. Soc. **73**, 3547 [1951].

<sup>6</sup> M. BERGMANN u. L. ZERVAS, Ber. dtsch. chem. Ges. **65**, 1192 [1932].

<sup>7</sup> H. K. MILLER u. H. WAELSCH, J. Amer. chem. Soc. **74**, 1092 [1952].

wonnenen Serinbenzylesters verknüpften wir in 20 ml absolutem Tetrahydrofuran mit Hilfe von Chlorkohlensäureäthylester zum  $^{14}\text{C}$ -Carbobenzoxy-DL-alanyl-DL-serinbenzylester (-glycyl-DL-serinbenzylester). Nicht umgesetzte Ausgangskörper wurden aus Essigesterlösung mit 1-n. Salzsäure bzw. 5-proz. Natriumbicarbonatlösung extrahiert. Der beim Abdestillieren des Essigesters im Vakuum erhaltene ölige Rückstand wurde aus Chloroform/Petroläther umkristallisiert. Die Ausbeuten an kristallinem Produkt betragen 70 bis 80 Prozent.

	Schmp.		Analyse				
	°C	C		H		N	
	ber.	gef.	ber.	gef.	ber.	gef.	
$^{14}\text{C}$ -Carbobenzoxy-DL-alanyl-DL-serinbenzylester	118	63,0	63,0	6,04	5,93	6,99	6,95
$^{14}\text{C}$ -Carbobenzoxy-glycyl-DL-serinbenzylester	139	62,1	61,9	5,73	5,62	7,25	7,34

Das reine Peptid wurde dargestellt, indem in 1-proz. Lösung der Carbobenzoxy- und Benzylrest gleichzeitig in mit 1 Vol.-% Eisessig versetztem Methanol p. A. durch katalytische Hydrogenolyse (Pd-Mohr) entfernt und das erhaltene Produkt aus Wasser/abs. Äthanol umkristallisiert wurde. Die Ausbeuten lagen bei 70 Prozent.

	Schmp.		Analyse				
	°C	C		H		N	
	ber.	gef.	ber.	gef.	ber.	gef.	
$^{14}\text{C}$ -DL-Alanyl-DL-serin	211 <sup>8</sup>	40,9	40,8	6,87	6,95	15,9	15,5
$^{14}\text{C}$ -Glycyl-DL-serin	198 <sup>8</sup>	37,0	36,4	6,22	6,33	17,3	17,1

Es ist bekannt, daß Glycyl-DL-serin Wasser gebunden enthält<sup>8</sup>. Die Peptide waren chromatographisch und elektrophoretisch einheitlich.

#### *O-Glycyl-DL-serin*

Dieses nur in Form seines Monohydrochlorids darstellbare *O*-Peptid wurde im Rahmen der Strukturklärung von Azaserin nach dem Anhydridverfahren synthetisiert<sup>9</sup>. Bei seiner Gewinnung hielten wir uns an diese Vorschrift; die hierbei nicht zu vermeidende Verunreinigung des *O*-Peptids durch Glycin und Serin, die elektrophoretisch nachgewiesen wurde, störte in diesem Zusammenhang nicht. Schmelzpunkt (163 °C) und IR-Spektrum stimmten mit den Literaturangaben ebenso überein wie die chromatographischen Eigenschaften<sup>9</sup>.

#### *Hydrolysierende Agenzien*

Bei den Hydrolyseversuchen in saurer Lösung wurde eingestellte Salzsäure (Merck p. A.), deren Gehalt zu 1% bekannt war, angewendet. — Für die Hydrolyse in reinem Wasser wurde dest. Wasser des Handels in

einer Quarzapparatur zweimal destilliert und das Destillat im  $\text{O}_2$ -Strom aufgeköcht und abgekühlt. Die spezifische Leitfähigkeit des gereinigten Wassers betrug bei 20 °C  $8,5 \cdot 10^{-7} \text{ Ohm}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ .

### Kinetische Messungen

#### *Hydrolyse der Peptide*

Ausführung der Hydrolyse, Gefriertrocknung, zonen-elektrophoretische und papierchromatographische Trennung der Hydrolysate sowie die Aktivitätsbestimmung der isolierten Hydrolyseprodukte wurden bereits beschrieben<sup>4</sup>.

#### *Umlagerung von O-Glycyl-DL-serin*

Wie Vorversuche zeigten, erniedrigt sich im Laufe der Umlagerung von *O*-Glycyl-DL-serin zu Glycyl-DL-serin bei gleichzeitiger Verminderung der Reaktionsgeschwindigkeit der  $p_{\text{H}}$ -Wert der Lösung. Es war daher zweckmäßig, bei Erueierung der Reaktionsordnung bezüglich des reagierenden Peptids den  $p_{\text{H}}$ -Wert während der Umlagerung konstant zu halten. Dies geschah nach der  $p_{\text{H}}$ -Stat-Methode. Mit ihrer Hilfe konnte der Fortgang der Umlagerung quantitativ verfolgt werden, da die Menge der gebildeten Säure ein Maß für den Reaktionsumsatz darstellt.

Ihres geringen Raumbedarfs wegen diente die Einstabmeßkette Typ 403 der Fa. Dr. W. Ingold, Frankfurt am Main, in Verbindung mit dem Präzisions- $p_{\text{H}}$ -Meter  $p_{\text{H}}$  35 der Fa. Knick, Berlin, zur Messung des  $p_{\text{H}}$ -wertes. Die Schwankung des  $p_{\text{H}}$ -wertes während eines kinetischen Versuchs betrug höchstens  $\pm 0,01$   $p_{\text{H}}$ -Einheiten. Wie bekannt ist jedoch die Absolutgenauigkeit der elektrometrischen  $p_{\text{H}}$ -Bestimmung wegen der Vernachlässigung der Konzentrationsabhängigkeit der Diffusionspotentiale, die an den beiden Grenzflächen der gesättigten KCl-Brücke zur Bezugselektrode auftreten, bezüglich dem unter Zugrundelegung der Debye-Hückel-Theorie definierten  $p_{\text{H}}$ -Begriff nur etwa  $\pm 0,05$   $p_{\text{H}}$ -Einheiten.

Überdies weisen gerührte und ruhende Lösungen bei elektrometrischer  $p_{\text{H}}$ -Messung scheinbare  $p_{\text{H}}$ -Differenzen auf. Bei konstanter Rührgeschwindigkeit war diese scheinbare  $p_{\text{H}}$ -Verschiebung während eines kinetischen Versuchs unveränderlich sowie unabhängig von Temperatur und  $p_{\text{H}}$   $-0,070 \pm 0,005$   $p_{\text{H}}$ -Einheiten. Diese Potentialveränderung wurde vor und nach jedem kinetischen Versuch gemessen.

Zur Aufrechterhaltung eines konstanten  $p_{\text{H}}$ -wertes wurde unter Rühren und gleichzeitiger Beobachtung des  $p_{\text{H}}$ -Meßgerätes 0,1-n. Natronlauge aus einer manuell über eine Mikrometerschraube gesteuerten Glasschliff-Kolbenbürette der Lösung zugesetzt. Der Vorschub des Kolbens und damit der Verbrauch an Alkali als Funktion der Zeit wurde von einem an die Mikrometerschraube gekoppelten Schreiber, dem Titrigraphen SBR 2c der Fa. Radiometer, Kopenhagen, auf

<sup>8</sup> H. ZAHN u. E. SCHNABEL, Liebigs Ann. Chem. **605**, 212 [1957].

<sup>9</sup> E. D. NICOLAIDES, R. D. WESTLAND u. E. L. WITTLE, J. Amer. chem. Soc. **76**, 2887 [1954].

gezeichnet. Die Genauigkeit der Registrierung des zugesetzten Volumens an Lauge betrug 0,7%, die Genauigkeit der Zeitbestimmung je nach Einstellung 5 sec bis 1 Minute. Diese Fehler fielen gegen die Unbestimmtheit der  $p_{\text{H}}$ -Messung nicht ins Gewicht.

Jeder kinetische Versuch wurde mit 5 ml 0,015-*m*. wäßriger Lösung von *O*-Glycyl-DL-serinmonohydrochlorid, die einen  $p_{\text{H}}$ -Wert von 3,5 aufwies, in einem thermostatisierten Glasgefäß von 14 ml Inhalt ausgeführt. Die Temperaturkonstanz belief sich auf 0,01°. Beim Start des Versuchs wurde die Lösung durch raschen Zusatz von 0,1-*n*. Natronlauge auf einen etwas höheren als den gewünschten  $p_{\text{H}}$ -Wert gebracht. Sobald dieser infolge der eingetretenen Reaktion erreicht war, begann der kinetische Versuch. Die Umlagerung wurde je nach den Versuchsbedingungen 1 bis 8 Halbwertszeiten verfolgt. Der Fortgang langsamer Reaktionen wurde mindestens eine Halbwertszeit gemessen und der für  $t \rightarrow \infty$  benötigte Meßwert durch Temperaturerhöhung bei konstantem  $p_{\text{H}}$ -Wert erhalten. Wenn sich in der Nachperiode der Reaktion der  $p_{\text{H}}$ -Wert nicht mehr änderte, wurden 0,5 ml der Lösung entnommen und durch Gefriertrocknung, Elektrophorese und Entwicklung der Pherogramme mit Ninhydrin analysiert. Da in keinem Fall das bei Anwesenheit nachweisbare *O*-Glycyl-DL-serin zu erkennen war, hatte sich dieses zu mindestens 99% in das einwandfrei nachzuweisende Glycyl-DL-serin umgewandelt. Dieser Befund wurde durch Wiederholung des Experiments mit *O*-(<sup>14</sup>C-Glycyl)-DL-serin bestätigt. Überdies zeigt dieser Versuch, daß eine meßbare Spaltung zu den Aminosäuren neben der Umlagerung nicht stattfindet.

## Ergebnisse

### Reaktionen in saurer Lösung: Die Bildung von *O*-Peptiden und Depsipeptiden

Ein Teil von DL-Alanyl-DL-serin wandelt sich unter den Bedingungen der Gefriertrocknung seiner salzsauren Hydrolysatlösungen in *O*-DL-Alanyl-DL-serin und Depsipeptide um. Führte man nämlich die chromatographische bzw. elektrophoretische Trennung der Hydrolysate ohne vorherige Gefriertrocknung unter sonst gleichen Bedingungen aus, so ließen sich die beiden Substanzen nicht nachweisen. Den Strukturbeweis für *O*-DL-Alanyl-DL-serin führten wir durch Vergleich der chromatographischen und elektrophoretischen Eigenschaften des isolierten und eines nach der oben beschriebenen Anhydridmethode synthetisierten Präparates sowie durch Abbau in saurer Lösung zu den Aminosäuren. Die Struktur des Depsipeptids wurde durch seine Hydrolyse in 0,6-*n*. Salzsäure bei 32 °C zu DL-Alanyl-DL-serin sowie durch sein IR-Spektrum, das im Gegensatz zu jenem von DL-Alanyl-DL-serin bei 1750  $\text{cm}^{-1}$  die bekannte,

der Valenzschwingung der Carbonylgruppe im Ester zuzuordnende Bande aufweist<sup>9</sup>, sichergestellt. Die quantitative Verfolgung der Spaltung des Depsipeptids ergab, daß die Esterbindung um den Faktor  $\sim 100$  schneller gespalten wird als die Amidbindung.  $k_{\text{Ester}} = 2,0 \cdot 10^{-1} \text{ (d}^{-1}\text{)}$ ,  $k_{\text{Amid}} = 2,6 \cdot 10^{-3} \text{ (d}^{-1}\text{)}$ . Die Reaktionen bei der Gefriertrocknung finden wahrscheinlich in dem die feste Phase umgebenden Flüssigkeitsfilm statt. Wasser und Chlorwasserstoff bilden nämlich ein eutektisches System, dessen eutektischer Punkt bei  $-86 \text{ }^{\circ}\text{C}$  und bei einem HCl-Gehalt von 25 Gew.-% liegt<sup>10</sup>. Trotz dieser Nebenreaktionen unterwarfen wir die Hydrolysate vor ihrer Trennung zur Entfernung überschüssiger Säure der Gefriertrocknung, da bei Abwesenheit von Säureüberschuß die Zonen bei der Chromatographie und Elektrophorese schärfer und damit die Substanzen sauberer zu isolieren waren. Für die kinetische Auswertung wurde die Radioaktivität von DL-Alanyl-DL-serin zur Hydrolysenzeit  $t$  gleich der Summe der Radioaktivitäten von Depsipeptid, *O*-Peptid und gemessenem DL-Alanyl-DL-serin gesetzt.

Überdies wurde in Hydrolysatlösungen, die bei über 70 °C erhalten wurden, Ammoniak und ein weiterer Stoff nachgewiesen, der ähnliche chromatographische und elektrophoretische Eigenschaften wie DL-Alanyl-DL-serin besaß; beim Entwickeln mit Ninhydrin lieferte diese Substanz jedoch zunächst einen gelben Farbstoff, der nach einiger Zeit in den bekannten violetten überging. Vermutlich stellt die Substanz Alanyldehydroalanin dar. DL-Seryl-DL-alanin besitzt ähnliche chromatographische und elektrophoretische Eigenschaften und zeigt ein ähnliches Verhalten beim Entwickeln wie die fragliche Substanz, so daß unter den geschilderten Bedingungen die Inversion des Ausgangspeptids ebenfalls nicht ausgeschlossen werden kann. Da in dieser Arbeit die Hydrolysentemperaturen weit niedriger als 70 °C waren, traten diese Nebenreaktionen nicht in Erscheinung.

### Kinetische Daten

Der Reaktionsablauf der Hydrolyse von DL-Alanyl-DL-serin in Salzsäure wird durch ein Zeitgesetz 1. Ordnung bezüglich des Peptids beschrieben. Aus den entsprechenden graphischen Darstellungen ließen sich die Halbwertszeiten  $\tau$  ablesen und daraus die

<sup>10</sup> LANDOLT-BÖRNSTEIN, Physikalisch-chemische Tabellen, Springer-Verlag, Berlin 1923, Bd. I, S. 626.

zugehörigen Geschwindigkeitskonstanten  $k$  berechnen. Die Arrheniusche Aktivierungsenergie  $E_A$  und Aktionskonstante  $A$  wurden unter Zugrundelegung der Arrheniusschen Gleichung durch Ausgleichsrechnung ermittelt. Entsprechend wurde bei der Auswertung der Daten der Hydrolyse von Glycyl-DL-serin und DL-Alanyl-DL-serin in neutraler Lösung sowie bei der Umlagerung von *O*-Glycyl-DL-serin vorgegangen. Auch diese Reaktionen schreiten nach einem Zeitgesetz 1. Ordnung bezüglich des Peptids fort. Für die Umlagerung wurde überdies bei der Berechnung von  $k$  die sog. Schrittformel

$$k t_i + \log_e ([H^\oplus]_i - [H^\oplus]_i') = \text{const.} \quad (1)$$

herangezogen. Bezeichnet man mit  $\Delta$  ein konstantes Zeitintervall,  $\Delta \geq$  Halbwertszeit, so bedeuten  $[H^\oplus]_i$  und  $[H^\oplus]_i'$  die Konzentrationen der nach der Zeit  $t_i$  bzw.  $t_i + \Delta$  gebildeten Wasserstoffionen.

Der mittlere Fehler der Geschwindigkeitskonstanten der Hydrolyse beträgt 3 Prozent. Für die Umlagerung ergibt sich wegen der Unsicherheit der  $p_H$ -Messung,  $\Delta p_H = \pm 0,02 \cong \Delta [H^\oplus] / [H^\oplus] \cong 5\%$ , und der besonderen  $p_H$ -Abhängigkeit von  $k$

$$k = k_0 [H^\oplus]^n, \quad (2)$$

mit  $n = -1,7$ , der erheblich größere Fehler von etwa 9 Prozent. Der einzelne  $k$ -Wert ohne Bezugnahme auf den absoluten  $p_H$ -Wert der Lösung läßt sich genauer zu  $\pm 1\%$  bestimmen.

$[H^\oplus]$ [Mol/l]	Temperatur [°C]	$k \cdot 10^3$ d <sup>-1</sup>	$(k/[H^\oplus]) \cdot 10^3$ d <sup>-1</sup> l Mol <sup>-1</sup>
0,500	32,0	2,14	4,28
0,600	32,0	2,61	4,36
1,00	32,0	4,96	4,96
2,00	32,0	13,3	6,65
0,500	36,9	3,9	7,8
1,00	36,9	9,2	9,2
0,500	41,6	6,9	13,8
1,00	41,6	15,8	15,8
0,500	44,9	9,6	19,2

Tab. 1. Geschwindigkeitskonstante  $k$  der Hydrolyse von DL-Alanyl-DL-serin in Salzsäure.

	Temperatur [°C]	$k \cdot 10^2$ d <sup>-1</sup>
Glyc-Ser	59,9	2,44
Glyc-Ser	70,3	7,36
Glyc-Ser	78,5	16,5
Glyc-Ser	85,4	30,8
Ala-Ser	76,2	22,5

Tab. 2. Geschwindigkeitskonstante  $k$  der Hydrolyse von Glycyl-DL-serin und DL-Alanyl-DL-serin in reinem Wasser.

	$[H^\oplus]$ [Mol/l]	$E_A$ [kcal/Mol]	$[\log_{10} A$ (d <sup>-1</sup> )] <sup>11</sup>
Ala-Ser	0,500	22,6 ± 0,6	13,5
Ala-Ser	1,00	23,0 (± 0,6)	14,2
Glyc-Ser	~ 10 <sup>-6</sup>	23,6 ± 0,3	13,9

Tab. 3. Arrheniussche Aktivierungsenergien  $E_A$  und Aktionskonstante  $A$  der Hydrolyse.

$p_H$	Temperatur [°C]	$k \cdot 10^2$ min <sup>-1</sup>
5,57	22,04	0,49
5,57	27,72	1,29
5,57	32,38	2,38
5,57	35,21	3,61
6,07	12,09	0,57
6,07	20,01	2,14
6,07	20,00	2,47
6,07	24,18	4,66
6,07	24,18	4,76
6,07	27,45	8,08

Tab. 4. Geschwindigkeitskonstante  $k$  der Umlagerung von *O*-Glycyl-DL-serin zu Glycyl-DL-serin.

$p_H$	$E_A$ [kcal/Mol]	$[\log_{10} A$ (d <sup>-1</sup> )] <sup>11</sup>
5,57	27,2 (± 2,0)	21,0
6,07	29,4 (± 2,0)	23,5

Tab. 5. Arrheniussche Aktivierungsenergien  $E_A$  und Aktionskonstante  $A$  der Umlagerung.

## Diskussion

Die Hydrolyse von Glycyl-DL-serin und DL-Alanyl-DL-serin in reinem Wasser verläuft sowohl im Vergleich zur Hydrolyse in 0,5 n Salzsäure als auch im Hinblick auf die Hydrolyse von Glycyl-DL-alanin in reinem Wasser überraschend schnell. Wie aus Tab. 6 hervorgeht, ist die Selektivität der Spaltung der Serinpeptidbindungen in reinem Wasser erheblich stärker ausgeprägt als in wäßriger Säure.

Das für Peptide, die aus bifunktionellen Aminosäuren aufgebaut sind, in 0,25 bis 1-n. Salzsäure in einer vorhergehenden Arbeit eruierte Zeitgesetz<sup>1</sup>

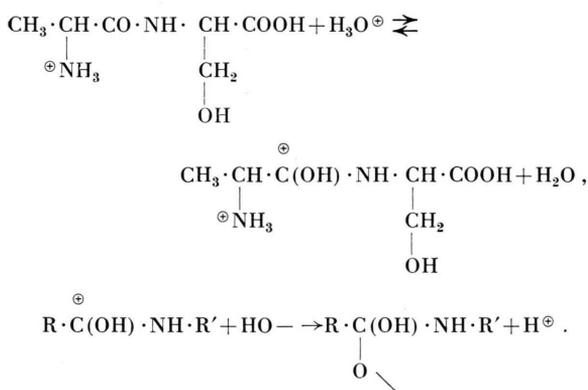
$$-\frac{d[\text{Peptid}^\oplus]}{dt} = k[H^\oplus][\text{Peptid}^\oplus] \quad (3)$$

ist in der gleichen Näherung für DL-Alanyl-DL-serin gültig. Als Folge der Erhöhung der Wasserstoffionen-Aktivität nimmt die Geschwindigkeitskonstante  $k$  mit steigender Wasserstoffionen-Konzentration schwach zu. Im Einklang mit dem empirischen Zeitgesetz und dem umfangreichen Versuchsmaterial über die

Medium	Substanz	$k_{76^\circ\text{C}}$ $\text{d}^{-1}$	$E_A$ [kcal/Mol]	$[\log_{10} A(\text{d}^{-1})]^{11}$
Wasser	Glyc-Ser	$1,3 \cdot 10^{-1}$	23,6	13,9
Wasser	Ala-Ser	$2,3 \cdot 10^{-1}$	23,2 <sup>12</sup>	13,9 <sup>12</sup>
Wasser	Glyc-Ala <sup>13</sup>	$< 1 \cdot 10^{-3}$	$> 27$	$> 14$
0,5 n HCl	Ala-Ser	$2,7 \cdot 10^{-1}$	22,6	13,5
0,5 n HCl	Glyc-Ala <sup>1</sup>	$1,8 \cdot 10^{-1}$	20,2	11,9
0,5 n HCl	Ala-Glyc <sup>1</sup>	$1,3 \cdot 10^{-1}$	21,3	12,5

Tab. 6. Die kinetischen Daten der Hydrolyse von Serinpeptiden und verwandten Peptiden.

Hydrolyse von Peptiden stellt die Spaltung von DL-Alanyl-DL-serin in Salzsäure eine Folge von mindestens zwei Elementarprozessen dar: der geschwindigkeitsbestimmenden Anlagerung einer nucleophilen Gruppe an das Carbonyl-Kohlenstoffatom und einem diesem Schritt vorgelagerten prototropen Gleichgewichtsvorgang:



Die kinetischen Größen für die Hydrolyse von DL-Alanyl-DL-serin in Säure ordnen sich in die Reihe der bisher bekannten Daten über die Peptidspaltung zwanglos ein. Deshalb dürfte diese Hydrolyse den gleichen direkten Reaktionsweg wie die Spaltung der bisher untersuchten, bifunktionellen Peptide nehmen. Die im Vergleich zum DL-Alanylglycin erhöhte Aktivierungsenergie wird auf die verstärkte sterische Hinderung der Atome in allen Konformationen des Übergangskomplexes als Folge des vergrößerten Raumbedarfs der hydratisierten CH<sub>2</sub>OH-Gruppe zurückgeführt. Der relativ hohe Betrag der Aktionskonstanten kann durch den Kompensationseffekt allein nicht gedeutet werden, da nach unseren bisherigen Erfahrungen der Gang der Geschwindigkeitskonstanten in einer Gruppe verwandter Reaktionen

durch die Abstufungen der Aktivierungsenergien bestimmt wird. Doch dürfte in Analogie zu den Unterschieden der Bildungsentropien der als Bausteine fungierenden Aminosäure-Ammoniumionen<sup>14</sup> die Abnahme der Entropie bei der Bildung des Amidiniumions von DL-Alanyl-DL-serin geringer als von DL-Alanylglycin sein; denn bei der Bildung des Amidiniumions von DL-Alanyl-DL-serin sollte der Solvatationsgrad wegen der bereits im Ausgangszustand ausgeprägten Wechselwirkung mit dem Wasser weniger stark zunehmen.

Da in konzentriert salzsaurer, wäßriger Lösung – sogar unter den Bedingungen der Gefriertrocknung beobachtbar – die Umlagerung von DL-Alanyl-DL-serin zu O-DL-Alanyl-DL-serin erheblich schneller vor sich geht als die Hydrolyse, kann der über den Ester verlaufende Reaktionsweg ebenfalls nicht ausgeschlossen werden. Der hohe Betrag der Aktionskonstanten ließe sich auf die hohe Stoßzahl zwischen der Serinhydroxygruppe und dem zu dieser günstig gelagerten Carbonyl-Kohlenstoffatom zurückführen. Es ist schwierig, eine begründete Aussage über die relative Bedeutung dieser beiden, wahrscheinlich gleichzeitig beschrittenen Reaktionswege zu machen.

In neutraler wäßriger Lösung spalten sich Glycyl-DL-serin und DL-Alanyl-DL-serin im Gegensatz zu Glycyl-DL-alanin, das sich unter diesen Bedingungen teilweise in das cyclische Anhydrid, ein Diketopiperazin, umwandelt, rasch ohne erkennbare Störung zu den Aminosäuren. Für die Hydrolyse von Glycyl-DL-serin und DL-Alanyl-DL-serin in reinem Wasser ergab sich ein Zeitgesetz 1. Ordnung:

$$-\frac{d[\text{Peptid}^{\oplus}]}{dt} = k[\text{Peptid}^{\oplus}] \quad (4)$$

Der  $p_{\text{H}}$ -Wert der Lösung änderte sich während eines kinetischen Versuchs praktisch nicht, da die isoelek-

<sup>11</sup> Die Aktionskonstanten A sind bezüglich der Wasserstoffionen- und Wasserkonzentrationen nicht normiert.

<sup>12</sup> P. MARTINEZ, unveröffentlichte Ergebnisse, Frankfurt 1964.

<sup>13</sup> J. FERNANDEZ, unveröffentlichte Ergebnisse, Frankfurt 1962.

<sup>14</sup> E. J. COHN u. J. T. EDSALL, Proteins, Amino Acids and Peptides as Ions and Dipolar Ions. Reinhold Publ. Corp., New York 1943.

trischen Punkte der Aminosäuren und Peptide dicht beisammen liegen; (bei 25 °C<sup>8, 14</sup>:  $pI_{\text{Glyc}} = 5,97$ ,  $pI_{\text{Ala}} = 6,02$ ,  $pI_{\text{Ser}} = 5,68$ ,  $pI_{\text{Glyc-Ser}} = 5,65$ ,  $pI_{\text{Ala-Ser}} = 5,63$ ). Die Geschwindigkeitskonstante  $k$  kann daher  $p_{\text{H}}$ -abhängig sein.

Die gemessene Aktivierungsenergie für die Spaltung von Glycyl-DL-serin in Wasser ist unerwartet niedrig. Aus dem Zeitgesetz (3) folgt, daß die nichtkatalysierte Hydrolyse in saurer Lösung, wahrscheinlich wegen zu hoher Aktivierungsenergie, keine Rolle spielt. Führt man die Hydrolyse in reinem Wasser aus, so ist eine weitere Erhöhung der Aktivierungsenergie gegenüber jener der nichtkatalysierten Reaktion in saurer Lösung als Folge der Zunahme der negativen Ladung des Peptids und damit des anzugreifenden Carbonyl-Kohlenstoffs zu erwarten. Tatsächlich verläuft die Hydrolyse von Glycyl-DL-alanin in reinem Wasser außerordentlich langsam. Zwischen den Aktivierungsenergien für die Spaltung von Serinpeptiden in saurer und neutraler Lösung besteht jedoch kein Unterschied. Die Neutralreaktion dürfte deshalb nach einem anderen Mechanismus als die saure Hydrolyse ablaufen. In Übereinstimmung damit tritt das Glied für die Neutralreaktion in dem empirischen Zeitgesetz (3) für die saure Hydrolyse nicht auf, obwohl die Hydrolyse von DL-Alanyl-DL-serin in neutraler Lösung fast ebenso schnell wie in 0,5- $n$ -Salzsäure fortschreitet.

Es liegt nahe, diese Sonderstellung der Serinpeptide mit ihrer besonderen Struktur und Reaktionsweise zu begründen. Das Peptid steht mit dem *O*-Peptid im Gleichgewicht, das bei  $p_{\text{H}} 5 - 6$  auf der Seite des Peptids liegt. In diesem  $p_{\text{H}}$ -Bereich stellt sich das Gleichgewicht im Vergleich zur Hydrolyse sehr rasch ein. Ist der Quotient der Geschwindigkeitskonstanten  $k_{\text{O}}/k_{\text{P}}$  der *O*-Peptid- bzw. Peptidspaltung größer als das reziproke Verhältnis ihrer Gleichgewichtskonzentrationen,

$$\frac{k_{\text{O}}}{k_{\text{P}}} > \frac{c_{\text{P}}}{c_{\text{O}}} \geq 100,$$

so verläuft die Hydrolyse über das *O*-Peptid. Eine direkte Prüfung dieser Bedingung ist wegen der raschen Einstellung des Umlagerungsgleichgewichts nicht möglich. In Anbetracht der über die Labilität von Esterbindungen gemachten Erfahrungen dürfte die Bedingung jedoch erfüllt sein.

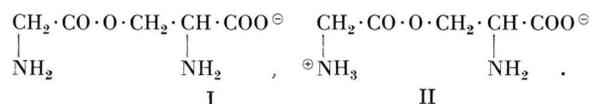
Die unerwartet schnell fortschreitende Hydrolyse der Serinpeptide in neutraler Lösung ist in diesem Reaktionsschema eng mit der raschen Einstellung des Umlagerungsgleichgewichts verknüpft. Die Verschiebung des Gleichgewichts zuungunsten des *O*-Peptids und die Erhöhung der Geschwindigkeit der Gleichgewichtseinstellung mit steigendem  $p_{\text{H}}$  in schwach saurem bis neutralem Bereich kompensieren sich zumindest teilweise in ihrem Einfluß auf die Hydrolysegeschwindigkeit. Setzt man den Ansatz

$$k = k_0 [\text{H}^+]^n \quad (5)$$

für die Geschwindigkeitskonstante der Umlagerung des *O*-Peptids als gültig voraus, so ergibt sich für die kinetische Ordnung in bezug auf das Wasserstoffion bei  $p_{\text{H}} 5,6$

$$n = -1,7.$$

Die Nichtganzzahligkeit der kinetischen Ordnung wird durch die Annahme gedeutet, daß mindestens zwei Ionensorten des *O*-Peptids an der Umlagerung beteiligt sind:



Die wichtige, völlig deprotonierte Struktur I beschreibt demnach den Übergangskomplex einer 3-Zentrenreaktion. Der hohe Betrag der Arrheniuschen Aktivierungsenergie  $E_{\text{A}}$  für die Umlagerung ist mit einer fast vollständigen Deprotonierung des Übergangskomplexes konsistent. Denn die in  $E_{\text{A}}$  enthaltenen Dissoziations-Enthalpien betragen je Ammoniumgruppe etwa 10 kcal/Mol.

Nach dem Prinzip der mikroskopischen Reversibilität verläuft jeder Prozeß über den gleichen Übergangszustand wie sein Umkehrprozeß. Der wichtige Übergangszustand für die Umlagerung des Peptids zum *O*-Peptid sollte demnach ebenfalls vollständig deprotoniert sein, und die N  $\rightarrow$  O-Glycylwanderung sollte in diesem  $p_{\text{H}}$ -Bereich durch OH<sup>⊖</sup>-Ionen beschleunigt werden. Schließlich sei bemerkt, daß die N  $\rightarrow$  O-Peptidylwanderung in neutralem Milieu ein Modell für die Enzymwirkung von Chymotrypsin<sup>15</sup> und anderen Enzymen darstellt, indem wie im Enzym die nucleophile Serinhydroxygruppe im Verein mit einem freien basischen Rest Peptidbindungen – wahrscheinlich sehr rasch – zu lösen vermag.

<sup>15</sup> M. L. BENDER, Chem. Reviews **60**, 53 [1960].