

Untersuchungen über die Kinetik der Spaltung von Di- und Tripeptiden

IV. Mitt.: Das hydrolytische Verhalten einiger Serinpeptide in rein wäßriger Lösung

HERMANN HARTMANN und RUDOLF BRÜSSAU *

Institut für physikalische Chemie an der Johann Wolfgang Goethe-Universität, Frankfurt am Main

(Z. Naturforschg. 22 b, 380—388 [1967]; eingegangen am 25. Oktober 1966)

Gegenstand der vorliegenden Untersuchung ist das hydrolytische Verhalten von Glycyl-seryl-alanin beim Erhitzen in einer rein wäßrigen Lösung bei einem pH -Wert in der Nähe des isoelektrischen Punktes. Die Reaktionsmöglichkeiten des Tripeptids und aller Folgeprodukte, die Alanin enthalten, wurden qualitativ aufgeklärt und die kinetischen Daten der einzelnen Reaktionen durch quantitative Hydrolyseversuche an den mit dem Kohlenstoffisotop ^{14}C geeignet radioaktiv markierten Verbindungen Glycyl-seryl-alanin, Seryl-alanin, Alanyl-serin und Seryl-alanyl-diketopiperazin bei mehreren Temperaturen zwischen 55 und 95 °C bestimmt. Die Trennung der Hydrolysatproben erfolgte mit Hilfe der Papierchromatographie bzw. der Papierelektrophorese; für die Konzentrationsbestimmung der radioaktiven Substanzen wurde ein Verfahren ausgearbeitet, das eine Radioaktivitätsmessung mit hoher reproduzierbarer Ausbeute direkt auf den zur Trennung benutzten Filterpapieren nach der Flüssigkeitsszintillations-Methode ermöglicht.

Alle beobachteten Reaktionen verlaufen unter den Versuchsbedingungen nach einem Zeitgesetz 1. Ordnung. Die Konzentrations-Zeit-Funktionen der einzelnen Reaktionsteilnehmer wurden durch Auflösung der simultanen linearen Differentialgleichungen 1. Ordnung bestimmt und zur Berechnung der Reaktionsgeschwindigkeits-Konstanten nach einem iterativen Ausgleichsverfahren herangezogen.

In der Diskussion wird versucht, die beobachteten thermodynamischen Daten in ihrer Größenordnung aus anderen Eigenschaften und aus der Molekularstruktur der einzelnen Verbindungen abzuleiten und durch bestimmte Reaktionsmechanismen zu interpretieren.

Frühere Untersuchungen¹ hatten ergeben, daß die beiden Dipeptide Glycyl-serin und Alanyl-serin beim Erhitzen in einer rein wäßrigen Lösung sehr schnell in die Aminosäuren gespalten werden. Im Gegensatz dazu wird mit anderen Dipeptiden unter diesen Reaktionsbedingungen bevorzugt die Bildung von Diketopiperazinen beobachtet. Zur Interpretation dieses besonderen Verhaltens wurde angenommen, daß sich die *N*-Peptide vom Typ X-Serin intramolekular in die entsprechenden *O*-Peptide umlagern, die leichter als ein *N*-Peptid hydrolysieren sollten. Dabei wurde angenommen, daß die unter den Reaktionsbedingungen in geringer Menge deprotonisierte endständige Aminogruppe als Protonenakzeptor wirksam wird.

Im Anschluß an diese Arbeiten wollten wir untersuchen, ob in die Interpretation des außergewöhnlichen Verhaltens dieser beiden Dipeptide auch eine Beteiligung der endständigen Carboxylgruppe einbezogen werden muß oder nicht. Der einfachste Weg, um experimentelle Anhaltspunkte für diese Hypothese zu erhalten, schien uns zu sein, die Carboxylgruppe durch eine Peptidbindung zu blockieren,

d. h. wir wollten die Hydrolyse der X-Serin-Bindung in dem Tripeptid X-Ser-Y untersuchen und die Ergebnisse mit dem Verhalten des Dipeptids X-Ser vergleichen. Als Tripeptid wählten wir für diese Experimente Glycyl-DL-seryl-DL-alanin. Unter den genannten Versuchsbedingungen zeigten diese Verbindung und ihre Spaltprodukte eine überraschende Vielfalt von Reaktionsmöglichkeiten im Gegensatz zu den Experimenten mit anderen Peptiden in alkalischer und saurer Lösung, die i. a. eindeutig im Sinn einer hydrolytischen Spaltung in Aminosäuren und niedrigere Peptide verlaufen. Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde versucht, das hydrolytische Verhalten dieser Substanzen qualitativ aufzuklären und quantitativ zu beschreiben.

Für die quantitativen Untersuchungen waren einzelne Aminosäuren der Peptide mit dem Kohlenstoffisotop ^{14}C radioaktiv markiert worden. Die Hydrolyseprodukte wurden mit Hilfe der Papierchromatographie und der Hochspannungselektrophorese getrennt und die Konzentrationen durch Radioaktivitätsmessungen bestimmt. Diese Methoden sind z. T. bereits in früheren Untersuchungen beschrieben

* Teil der Dissertation, Frankfurt am Main 1966.

¹ III. Mitt.: H. HARTMANN u. J. HEIDBERG, Z. Naturforschg. 19b, 1095 [1964].

worden², die Anforderungen der vorliegenden Probleme machten es jedoch notwendig, für die experimentelle Durchführung und numerische Auswertung der Messungen neue, wesentlich verfeinerte Verfahren auszuarbeiten.

Experimenteller Teil

Substanzen

Das radioaktiv markierte Tripeptid Glycyl-DL-seryl-1-¹⁴C-DL-alanin wurde nach einer Parallelvorschrift für Glycyl-seryl-glycin³ dargestellt: Cbo-glycyl-DL-seryl-DL-alanin-benzylester, Ausbeute 35–40% d. Th., Schmp. 174–176 °C korrigiert.

Glycyl-DL-seryl-DL-alanin, Ausbeute 60–70% d. Th., kein Schmp., Braunfärbung und Zersetzung ab 212 °C korrr., Elementaranalyse: C 41,07 (ber. 41,20), H 6,41 (ber. 6,48), N 17,21 (ber. 18,03).

Das radioaktiv markierte Dipeptid 1-¹⁴C-DL-Seryl-DL-alanin wurde nach der Carbodiimidmethode (Ausführung vgl. bei l. c.³) dargestellt. Die Einführung der Cbo-Schutzgruppe in die Aminosäure Serin erfolgte mit reproduzierbar guten Ausbeuten nach einem Vorschlag von RILEY u. a.⁴ in gesättigter NaHCO₃-Lösung als Reaktionsmedium.

Cbo-DL-Serin, Ausbeute 83–95% d. Th., Schmp. 123–125 °C korrr.; Cbo-DL-seryl-DL-alanin-benzylester, Ausbeute 30–40% d. Th., Schmp. 94–96 °C korrr.; DL-Seryl-DL-alanin, Ausbeute 50% d. Th., kein Schmp., Braunfärbung ab 210 °C, Zersetzung ab 215 °C korrr., Elementaranalyse: C 39,71 (ber. 40,91), H 6,99 (ber. 6,87), N 15,51 (ber. 15,90).

Die Darstellung von 1-¹⁴C-DL-Alanyl-DL-serin ist in einer früheren Veröffentlichung beschrieben¹.

Das 1-¹⁴C-DL-Seryl-DL-alanyl-diketopiperazin erhielten wir durch Erhitzen des freien Alanyl-serin-methylesters in Methanol, die Darstellung des Dipeptidesters erfolgte nach dem Anhydridverfahren aus Cbo-Alanin und Serin-methylester-hydrochlorid (Darstellung mit Thionylchlorid nach BRENNER u. a.⁵).

Cbo-DL-alanyl-DL-serin-methylester, Ausbeute 53% d. Th., Schmp. 100–102 °C korrigiert.

Die Cbo-Schutzgruppe wurde in essigsauerm Methanol durch Hydrieren mit Pd-Mohr als Katalysator entfernt. Nach der Hydrierung wurde der Katalysator abfiltriert, das Filtrat mit ammoniakalischem Methanol neutralisiert, i. Vak. zur Trockene eingedampft und in p. a. Methanol wieder aufgenommen. Diese Lösung wurde 2–3 Stdn. zum Sieden erhitzt. Das Diketopiperazin kristallisiert bereits beim Abkühlen teilweise aus.

DL-Alanyl-DL-seryl-diketopiperazin, Ausbeute 35% d. Th., Schmp. 210 °C korrr., unter Zersetzung. Elementar-

analyse: C 45,86 (ber. 45,56), H 6,39 (ber. 6,37), N 17,21 (ber. 17,71).

Dieses Verfahren erwies sich auch zur Synthese von Glycyl-DL-seryl-diketopiperazin, L-Alanyl-L-seryl-diketopiperazin und D-Alanyl-L-seryl-diketopiperazin geeignet.

Zur Darstellung der radioaktiv markierten Peptide benutzten wir käufliche, an dem Carbonyl-C-atom mit ¹⁴C markierte Aminosäuren, die vor ihrer Verwendung mit den entsprechenden inaktiven Aminosäuren auf eine spezifische Radioaktivität von 2–3 mC/Mol verdünnt worden waren.

Durchführung und Auswertung der Hydrolyseversuche

Für die quantitativen Hydrolyseversuche wurden 0,005-m. Lösungen der Substanzen hergestellt. Als Lösungsmittel benutzten wir Wasser, das aus dem handelsüblichen dest. Wasser durch zweimalige Destillation in einer Quarzapparatur gereinigt worden war. Leitfähigkeitsmessungen und pH-Bestimmungen an Blindproben zeigten, daß während der Hydrolyseexperimente wieder Substanzen aus dem Glas der Reaktionsgefäße herausgelöst werden, wir konnten daher auf eine weitergehende Reinigung des Wassers verzichten. Je 1,5 bis 2,5 ml der Probelösung schmolzen wir in Ampullen aus Fiolaxglas ein und erhitzen sie in Ultrathermostaten. Zu gegebener Zeit wurden einzelne Ampullen entnommen, 1 ml der Probelösung gefriergetrocknet und der wiederaufgelöste Rückstand chromatographisch oder elektrophoretisch getrennt. Trennbedingungen:

a) Papierchromatographie: Durchlaufchromatogramme auf Papier Schleicher & Schüll Nr. 2043 b säuregewaschen; flüssige Phase: Lösungsmittel H (750 ml sec-Butanol, 133,2 ml Ameisensäure 100%, 116,8 ml bidest. Wasser). Die Laufzeit wurde auf 30 bis 36 Stdn. begrenzt, weil die Diketopiperazin-Zonen den Papierrand schon nach etwa 40 Stdn. erreichen und anschließend durch Elution verloren gehen.

b) Hochspannungselektrophorese: Phorograph Original Frankfurt, Filterpapier Macherey & Nagel 2214, Pufferlösung: 893 ml bidest. H₂O + 7 ml Pyridin + 100 ml Eisessig, Hochspannung ca. 2000 V (60 bis 80 mA) bei –4 bis 0 °C für 2 bis 2,5 Stunden.

Für eine zufriedenstellende quantitative Trennung können die Filterpapiere maximal mit 0,03 mg Substanzgemisch pro cm Startlinie belastet werden, die Probelösungen wurden daher über eine Länge von 25–38 cm aufgetragen.

Zu Beginn unserer Untersuchungen wurden die Zonen der radioaktiven Substanzen auf den Chromatogrammen und Pherogrammen nach einer bereits früher beschriebenen Methode² einzeln eluiert und die Radioaktivität der eingetrockneten Eluate im Methandurchflußzähler gemessen. Eine der Hauptfehlerquellen dieses Verfahrens liegt in der experimentellen Schwierigkeit, die einzelnen Zonen vor der Elution gegeneinander abzugrenzen, denn die Anwendung der allgemein üb-

² H. HARTMANN, J. HEIDBERG, J. HEINTGES u. H. JUNG, Z. analyt. Chem. **181**, 533 [1961].

³ G. FÖLSCH, Acta chem. scand. **12**, 561 [1958].

⁴ G. RILEY, J. H. TURNBULL u. W. WILSON, J. chem. Soc. [London] **1957**, 1375.

⁵ N. BRENNER u. W. HUBER, Helv. chim. Acta **36**, 1109 [1953].

lichen Nachweisreagenzien führt durchweg zu unkontrollierbaren Ausbeuteverlusten bei der Radioaktivitätsmessung. Als Kriterien können daher nur die sehr schwache Fluoreszenz der einzelnen Zonen im UV-Licht und der Vergleich mit der Auftrennung von Testgemischen benutzt werden. Diese ähnlich wie die Hydrolysatproben zusammengesetzten nicht radioaktiven Lösungen wurden auf dem Rand der Filterpapierbögen aufgetragen, nach der Trennung abgeschnitten und mit den üblichen Sprühreagenzien entwickelt.

Um die genannten Schwierigkeiten zu vermeiden, haben wir zur Bestimmung der Radioaktivitätsverteilung auf den zur Trennung benutzten Filterpapieren ein weiteres Verfahren ausgearbeitet: WANG und JONES⁶ hatten als erste darauf hingewiesen, daß die i. a. benutzten Filterpapiere in den toluolhaltigen Szintillatorlösungen für die Radioaktivitätsmessung nach der Flüssigkeitsszintillations-Methode transparent werden, so daß die Radioaktivität ¹⁴C-haltiger toluolunlöslicher Substanzen, die sich feinverteilt auf einem Stück Filterpapier befinden, mit hoher Ausbeute (ca. 65%) gemessen werden kann. Eigene Vorversuche ergaben, daß bei einer Begrenzung der Filterpapiermenge auf etwa 80 cm² (Flächengewicht 12–14 mg/cm²) die Ausbeuteschwankungen in Abhängigkeit von Papiermenge und unterschiedlicher Anordnung der Papierstreifen relativ zu den beiden in Koinzidenz betriebenen Photomultiplerröhren kleiner als ±1,5% der Gesamtradioaktivität sind. Löscheffekte durch Lösungsmittelreste von der chromatographischen oder elektrophoretischen Trennung sind nach einer Trocknung der Filterpapiere im Ofen bei 80–100 °C nicht mehr zu befürchten. Die zur Trennung der Hydrolysatproben benutzten Filterpapierbögen werteten wir nach der folgenden Vorschrift aus:

Das Chromatogramm oder Pherogramm wird senkrecht zur Laufrichtung in etwa 50–100 schmale Streifen zerschnitten, deren Breite bei einem Filterpapierbogen konstant gehalten wird und i. a. 6 mm betrug. Diese Streifen wurden gefaltet und in Probefläschchen aus einem kaliumarmen Spezialglas mit genau 5,0 ml Szintillatorlösung (5 g PPO + 0,5 g POPOP + 1 l Toluol) bedeckt (der Nulleffekt ist von der Menge der Szintillatorflüssigkeit abhängig). Die Chromatogramme und Pherogramme wurden in Laufrichtung soweit zerschnitten, daß vor und nach den Substanzzonen noch Gebiete erfaßt wurden, die mit Sicherheit keine Radioaktivität mehr enthielten. Die Zählrate dieser Proben diente zur Berechnung des Nulleffektes, der innerhalb einer Meßreihe pro Streifen zu berücksichtigen war. Die Zählrate jeder Probe wurde mindestens zweimal unabhängig voneinander je 10 min gemessen. Die Ergebnisse sind mittlere Zählraten pro Streifenfläche. Ihre Hintereinanderordnung ergibt einen Überblick über den Radioaktivitätsverlauf auf dem Chromatogramm oder Pherogramm und ermöglicht eine genaue Zuord-

nung der Zählraten der einzelnen Streifen zu den verschiedenen Hydrolyseprodukten. Die Gesamtradioaktivität einer Hydrolysatprobe wurde als Einheit definiert und die Mengen der einzelnen Substanzen in relativen Konzentrationen angegeben.

Um eine Vorstellung über die Genauigkeit dieser Methode zu erhalten, verglichen wir in einer Versuchsreihe alle Konzentrationsmessungen mit den durch eine Ausgleichsrechnung bestimmten Werten und berechneten aus der Abweichung der einzelnen Meßpunkte folgende mittlere prozentuale Fehler (vgl. Tab. 1):

Relative Konzentration	mittlerer prozentualer Fehler [%]	Radioaktivitätsbereich [nC]
1,000 – 0,500	± 0,3	ca. 13 – 6
0,500 – 0,100	± 1,7	ca. 6 – 1
0,100 – 0,001	± 7,3	ca. 1 – 0,01

Tab. 1. Mittlerer prozentualer Fehler der Meßmethode.

Einige Hydrolysatproben wurden geteilt und in zwei unabhängigen Parallelbestimmungen untersucht. Die mittlere prozentuale Abweichung der einander entsprechenden Konzentrationsmessungen vom Mittelwert, die ein Maß für die Reproduzierbarkeit der Methode darstellt, betrug ohne Berücksichtigung der Konzentrationsbereiche ± 2 Prozent. Die Nachweisgrenze einer Substanz lag etwa bei 1–2‰ der Gesamtmenge einer Hydrolysatprobe, das entspricht unter den Versuchsbedingungen etwa 0,01–0,02 nC oder 5 bis 10·10⁻⁹ Mol.

Numerische Auswertung

Die Anordnung der Meßpunkte der Ausgangsverbindungen in einem Konzentrations-Zeit-Diagramm läßt sich in allen Versuchsreihen durch ein Zeitgesetz 1. Ordnung darstellen; da alle Zwischenprodukte einzeln untersucht worden sind, folgt daraus, daß sich die zusammengesetzten Reaktionssysteme durch das allgemeine Schema

$$S_i \xrightarrow[k_{ji}]{} S_j \quad i, j = 1 \dots n$$

und die Zeitabhängigkeit der Konzentrationen durch die Differentialgleichungen

$$\frac{dC_i}{dt} = \sum_{j=1}^n k_{ji} \cdot C_j(t) \quad i = 1 \dots n$$

mit

$$k_{ii} = -(k_{i,1} + \dots + k_{i,i-1} + k_{i,i+1} + \dots + k_{i,n})$$

beschreiben lassen. Die allgemeine Lösung dieses Systems simultaner Differentialgleichungen 1. Ordnung lautet:

$$C_i(t) = \sum_{j=1}^n (a_{ij} \cdot \exp(-\beta_j \cdot t)) + A_i \quad i = 1 \dots n.$$

Durch Einsetzen dieser Lösung in die Differentialgleichungen und durch Einführen der experimentell vorge-

⁶ C. H. WANG u. D. E. JONES, Biochem. biophysic. Res. Commun. 1, 203 [1959]. Eine Zusammenfassung weiterer Arbeiten findet sich in: E. A. DAVIDSON, Packard Technical Bulletin Nr. 4, Juli 1962.

gebenen Randbedingungen lassen sich die Koeffizienten a_{ij} , die Exponenten β_j und die Integrationskonstanten A_i als Funktionen der Reaktionsgeschwindigkeits-Konstanten k_{ij} darstellen. Aus diesen Exponentialfunktionen für den Konzentrationsverlauf lassen sich i. a. die Reaktionsgeschwindigkeits-Konstanten k aber nicht eliminieren; für die Berechnung der k -Werte nach der Methode der kleinsten Fehlerquadratsumme wurden diese Funktionen daher nach folgendem Ansatz linearisiert:

$$k_r = K_r + x_r \quad r = 1 \dots (n^2 - n)$$

$$C_i(t_s) \approx C_i(K, t_s) + \sum_{r=1}^{(n^2-n)} \frac{\partial C_i(K, t_s)}{\partial k_r} \cdot x_r, \quad i = 1 \dots n.$$

Zur Durchführung der Rechnung müssen für die Reaktionsgeschwindigkeits-Konstanten k_r möglichst gute Näherungswerte K_r bekannt sein, berechnet werden die Verbesserungen x_r . Die Anwendung der Bedingung für eine minimale Fehlerquadratsumme

$$\frac{\partial}{\partial x_r} \sum_{i,s} (C_i(t_s) - C_{i\text{beob}}(t_s))^2 = 0 \quad r = 1 \dots (n^2 - n)$$

führt auf ein lineares inhomogenes Gleichungssystem für die x_r ; aus den Diagonalelementen qq der zur Koeffizientenmatrix inversen Matrix lassen sich die Fehler Δx_r der x_r und damit der k_r nach

$$\Delta x_r = \pm m \cdot \sqrt{qq_r}$$

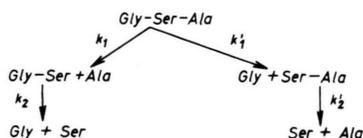
berechnen; dabei ist m der mittlere Fehler einer einzelnen Konzentrationsmessung gemäß

$$m = \pm \sqrt{\frac{\text{Fehlerquadratsumme}}{(\text{Anzahl der Meßpunkte}) - (\text{Anzahl der } x_r\text{-Werte)}}$$

Die Durchführung dieser umfangreichen Rechnungen erfolgte auf der elektronischen Digitalrechenmaschine Zuse Z 23 am Institut für physikalische Chemie in Frankfurt/Main, die einzelnen Probleme wurden in der Programmierungssprache ALGOL formuliert.

Versuchsergebnisse

Auf Grund früherer Untersuchungen⁷ mit anderen Tripeptiden in saurer und alkalischer Lösung erwarteten wir auch für die Hydrolyse des Glycyl-seryl-alanins in neutraler Lösung folgendes Zerfallschema:



Auf den Chromatogrammen der Hydrolysatproben der qualitativen Vorversuche mit nicht radioaktiv markiertem Glycyl-seryl-alanin fanden wir mit Ninhydrin dementsprechend neben den Aminosäuren als weiteres Zersetzungsprodukt nur noch Seryl-alanin; Glycyl-serin konnten wir nicht nachweisen; als schnell hydrolysierbares Zwischenprodukt sollte es ohnehin nur in sehr geringen Mengen auftreten. Das Alanin in den Hydrolysatproben konnte sowohl direkt aus dem Tripeptid als auch aus dem Folgeprodukt Seryl-alanin entstanden sein. Die Abnahme der Konzentration des Tripeptids war damit nicht mehr eindeutig auf die Spaltung der Glycyl-serin-Bindung allein zurückzuführen. Für eine vollständige quantitative Auswertung war es daher notwendig, zunächst das Verhalten des Dipeptids unter den Reaktionsbedingungen qualitativ und quantitativ zu untersuchen. In den Chromatogrammen der Hydrolysatproben von nicht radioaktiv markiertem Seryl-alanin konnten wir nach einiger Zeit mit Ninhydrin neben dem Ausgangspeptid auch die Aminosäuren Alanin und Serin nachweisen. Zusätzlich fanden wir zwischen den Zonen von Serin und Seryl-alanin eine weitere ninhydrinpositive Substanz; die Lage deutete auf das Peptid mit der inversen Aminosäuresequenz, auf Alanyl-serin hin. Die Vermutung lag nahe, daß dieses Dipeptid aus der Ausgangssubstanz über ein ringförmiges Dipeptid entstanden war; da dieses sog. Diketopiperazin keine ungebundene Aminogruppe mehr enthält, mit Ninhydrin also nicht nachgewiesen werden kann, behandelten wir die Chromatogramme mit *tert*-Butylhypochlorit und *o*-Toluidin zum Nachweis von Peptidbindungen⁸. Wir erhielten vor der bisher frontnächsten Zone des Alanins zwei weitere Substanzflecken. Durch Synthese konnten wir zeigen, daß es sich um die beiden diastereomeren Antipodenpaare des DL-Seryl-DL-alanyl-diketopiperazins handelt; die langsamer laufende Zone ist der *cis*-Form (L-Seryl-L-alanyl- bzw. D-Seryl-D-alanyl-diketopiperazin) und die frontnähere der *trans*-Form (L-Seryl-D-alanyl- bzw. D-Seryl-L-alanyl-diketopiperazin) zuzuordnen.

Die Anwendung der Nachweismethode mit *tert*-Butylhypochlorit auf die Chromatogramme der Tripeptidhydrolysat-Proben ergab neben den beiden Seryl-alanyl-diketopiperazin-Flecken noch eine dritte Ninhydrin-negative Zone. Die Wanderungsgeschwin-

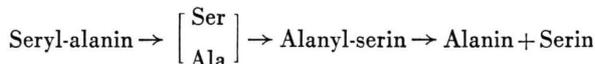
⁷ H. HARTMANN, J. HEINTGES, H. JUNG u. J. HEIDBERG, Z. Naturforsch. **17b**, 143 [1962]; H. HARTMANN, J. FERNÁNDEZ, J. HEIDBERG u. H. JUNG, Z. Naturforsch. **18b**, 269 [1963].

⁸ R. H. MAZUR u. a., J. biol. Chemistry **237**, 1619 [1963].

digkeit dieser unbekanntes Substanz lag bei der Papierchromatographie mit Lösungsmittel H zwischen der von Alanin und der von *cis*-Seryl-alanyl-diketopiperazin. Durch Synthese und Vergleich der Wanderungsgeschwindigkeiten konnten wir zeigen, daß es sich dabei um das unsymmetrische Diketopiperazin aus Glycin und Serin handelt. Die früheren Versuche mit dem Dipeptid Glycyl-serin¹ hatten ergeben, daß dieses Peptid in neutraler wäßriger Lösung direkt in die Aminosäuren gespalten wird, ohne daß die Bildung von Nebenprodukten beobachtet werden konnte. Das Glycyl-seryl-diketopiperazin in unseren Hydrolyseversuchen muß daher unmittelbar aus dem Tripeptid Glycyl-seryl-alanin unter Abspaltung von Alanin entstanden sein. Die Frage, ob in geringem Umfang daneben auch noch Glycyl-serin direkt gebildet wird, konnte nicht geklärt werden.

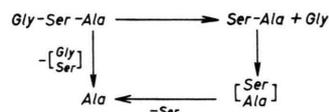
Die qualitativen und quantitativen Versuche mit Seryl-alanyl-diketopiperazin ergaben, daß der Diketopiperazinring sehr stabil ist und hydrolytisch nur langsam geöffnet wird. Dabei entsteht als einziges Folgeprodukt Alanyl-serin, das schnell weiterhydrolysiert; die Bildung von Seryl-alanin konnte nicht beobachtet werden. Diese Experimente zeigten weiterhin, daß das Seryl-alanyl-diketopiperazin beim Erhitzen in neutraler wäßriger Lösung nicht Konfigurations-stabil ist, es findet eine gegenseitige Umwandlung der beiden diastereomeren Antipodenpaare statt, das Gleichgewicht ist in dem untersuchten Temperaturintervall zwischen 80 und 95 °C auf die Seite der *cis*-Form verschoben.

Die qualitativen Vorversuche zur Hydrolyse des Seryl-alanins lassen keine Aussage zu, ob unter den Reaktionsbedingungen eine Spaltung des Dipeptids direkt in die Aminosäuren möglich ist, denn durch die Reaktionsfolge

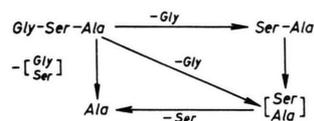


werden die Produkte Alanin und Serin auf jeden Fall gebildet. Unsere Versuche, die Meßergebnisse der Seryl-alanin-Hydrolyse nach diesem Schema unter Vernachlässigung einer möglichen Direkt-hydrolyse in die Aminosäuren auszuwerten, ergaben für die Bildungsgeschwindigkeit des Alanyl-serins aus dem Diketopiperazin Reaktionsgeschwindigkeits-Konstanten, die um etwa eine Zehnerpotenz größer waren, als wir bei den Versuchen mit Seryl-alanyl-diketopiperazin als Ausgangsverbinding be-

obachtet hatten. Außerdem weist die Abweichung der berechneten Konzentrations-Zeit-Kurven des Serins von dem experimentellen Verlauf darauf hin, daß die Aminosäuren nicht nur über eine Reihe von Zwischenprodukten, sondern auch direkt durch eine Hydrolyse des Ausgangspeptides Seryl-alanin gebildet werden müssen. In ähnlicher Weise ergab die numerische Auswertung der Tripeptidhydrolyse nach dem Schema



daß die berechneten Konzentrationen des Seryl-alanyl-diketopiperazins merklich niedriger lagen als die gemessenen Werte. Dieser Befund deutet darauf hin, daß dieses Diketopiperazin nicht nur über Seryl-alanin, sondern auch direkt aus dem Tripeptid unter Abspaltung von Glycin gebildet werden kann. Auch hier ist ein eindeutiger Nachweis durch qualitative Experimente nicht möglich, weil die Produkte auf jeden Fall entstehen. Wir halten die Existenz dieser Reaktion aber für sehr wahrscheinlich. Dafür spricht einmal, daß bei einer Auswertung nach dem Schema

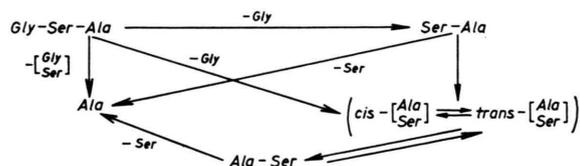


der berechnete Konzentrations-Zeitverlauf für alle beobachteten Substanzen zufriedenstellend mit den Meßergebnissen übereinstimmt. Zum anderen läßt sich die Temperaturabhängigkeit der Geschwindigkeitskonstanten der direkten Seryl-alanyl-diketopiperazin-Bildung befriedigend durch die Arrhenius-Gleichung beschreiben.

Eine Wiederholung der Hydrolyseversuche mit Alanyl-serin und Auswertung der Chromatogramme nach dem empfindlicheren Verfahren mit Hilfe der Flüssigkeitsszintillations-Zählung ergab, daß auch dieses Dipeptid in neutraler wäßriger Lösung Seryl-alanyl-diketopiperazin bildet. Diese Reaktion spielt aber neben der Hydrolyse in die Aminosäuren keine Rolle und kann bei der quantitativen Auswertung vernachlässigt werden.

Das Verhalten des Tripeptids Glycyl-seryl-alanin und seiner Folgeprodukte beim Erhitzen in einer

neutralen rein wäßrigen Lösung läßt sich in folgendem Schema zusammenfassen:



Die Rechenprogramme zur numerischen Auswertung der einzelnen Versuchsreihen wurden immer nur für die notwendigen Teilsysteme des oben angegebenen Reaktionsschemas ausgearbeitet; waren einzelne Reaktionsgeschwindigkeitskonstanten bereits aus vorhergehenden Versuchen genau bekannt, so wurden sie in der Ausgleichsrechnung als konstante Größen behandelt.

Temp. [°C]	Gly-Ser-Ala →		
	→ Ser-Ala + Gly k [h^{-1}]	→ Ala + $\begin{bmatrix} Gly \\ Ser \end{bmatrix}$ k [h^{-1}]	→ $\begin{bmatrix} Ala \\ Ser \end{bmatrix}$ + Gly k [h^{-1}]
57,2	$(0,229 \pm 0,017) \cdot 10^{-3}$	$(0,110 \pm 0,022) \cdot 10^{-3}$	$(0,12 \pm 0,08) \cdot 10^{-4}$
63,7	$(0,422 \pm 0,016) \cdot 10^{-3}$	$(0,306 \pm 0,022) \cdot 10^{-3}$	$(0,28 \pm 0,08) \cdot 10^{-4}$
70,3	$(0,86 \pm 0,06) \cdot 10^{-3}$	$(0,68 \pm 0,09) \cdot 10^{-3}$	$(0,56 \pm 0,28) \cdot 10^{-4}$
83,4	$(0,233 \pm 0,012) \cdot 10^{-2}$	$(0,402 \pm 0,023) \cdot 10^{-2}$	$(0,70 \pm 0,07) \cdot 10^{-3}$
Aktivierungsenergie	$20,9 \pm 0,9$ kcal/Mol	$31,9 \pm 0,8$ kcal/Mol	$36,0 \pm 4,2$ kcal/Mol
$\ln A$ ($[A] = h^{-1}$)	$23,4 \pm 1,3$	$39,5 \pm 1,1$	$43,4 \pm 6,1$

Tab. 2. Kinetische Daten der Reaktionen des Tripeptids Glycyl-seryl-alanin.

Temp. [°C]	Seryl-alanin	
	→ $\begin{bmatrix} Ser \\ Ala \end{bmatrix}$ k [h^{-1}]	→ Serin + Alanin k [h^{-1}]
58,1	$(0,160 \pm 0,006) \cdot 10^{-3}$	$(0,12 \pm 0,05) \cdot 10^{-4}$
63,7	$(0,348 \pm 0,006) \cdot 10^{-3}$	$(0,27 \pm 0,05) \cdot 10^{-4}$
70,5	$(0,547 \pm 0,007) \cdot 10^{-3}$	$(0,58 \pm 0,06) \cdot 10^{-4}$
75,0	$(0,882 \pm 0,005) \cdot 10^{-3}$	$(0,112 \pm 0,005) \cdot 10^{-3}$
80,0	$(0,1489 \pm 0,0007) \cdot 10^{-2}$	$(0,238 \pm 0,006) \cdot 10^{-3}$
83,4	$(0,299 \pm 0,028) \cdot 10^{-2}$	$(0,356 \pm 0,014) \cdot 10^{-3}$
85,0	$(0,259 \pm 0,018) \cdot 10^{-2}$	$(0,554 \pm 0,016) \cdot 10^{-3}$
Aktivierungsenergie	$24,8 \pm 1,6$ kcal/Mol	$32,4 \pm 1,2$ kcal/Mol
$\ln A$ ($[A] = h^{-1}$)	$28,9 \pm 2,2$	$37,9 \pm 1,8$

Tab. 3. Kinetische Daten der Reaktionen des Dipeptids Seryl-alanin.

Temp. [°C]	Seryl-alanyl-diketopiperazin		
	→ Ala-Ser k [h^{-1}]	$cis \rightarrow trans$ k [h^{-1}]	$trans \rightarrow cis$ k [h^{-1}]
85,0	$(0,184 \pm 0,004) \cdot 10^{-3}$	$(0,143 \pm 0,028) \cdot 10^{-2}$	$(0,193 \pm 0,018) \cdot 10^{-2}$
90,0	$(0,259 \pm 0,005) \cdot 10^{-3}$	$(0,244 \pm 0,022) \cdot 10^{-2}$	$(0,277 \pm 0,016) \cdot 10^{-2}$
95,0	$(0,367 \pm 0,005) \cdot 10^{-3}$	$(0,395 \pm 0,047) \cdot 10^{-2}$	$(0,442 \pm 0,044) \cdot 10^{-2}$
Aktivierungsenergie	$18,1 \pm 0,3$ kcal/Mol	$27,5 \pm 0,2$ kcal/Mol	$22,0 \pm 1,1$ kcal/Mol
$\ln A$ ($[A] = h^{-1}$)	$16,8 \pm 0,4$	$32,1 \pm 0,3$	$24,6 \pm 1,6$

Tab. 4. Kinetische Daten der Reaktionen des Seryl-alanyl-diketopiperazins.

Alanyl-serin		
Temp. [°C]	→ Alanin + Serin	→ [Ser] [Ala]
	k [h^{-1}]	k [h^{-1}]
50,0 ⁹	$0,604 \cdot 10^{-3}$	
60,0 ⁹	$0,188 \cdot 10^{-2}$	
65,0	$(0,305 \pm 0,008) \cdot 10^{-2}$	$(0,6 \pm 0,6) \cdot 10^{-4}$ *
70,0 ⁹	$0,496 \cdot 10^{-2}$	
75,0 ¹	$0,821 \cdot 10^{-2}$	
80,0	$(0,1187 \pm 0,0014) \cdot 10^{-1}$	$(0,13 \pm 0,11) \cdot 10^{-3}$ *
Aktivierungs- energie	$22,6 \pm 0,4$ kcal/Mol	
$\ln A$ ($[A] = h^{-1}$)	$27,9 \pm 0,6$	

Tab. 5. Kinetische Daten der Reaktionen des Dipeptids Alanyl-serin.

* Im Verlauf der Hydrolyseversuche bildete sich neben den Aminosäuren nur wenig Diketopiperazin, die Mengen lagen in der Nähe der Nachweisgrenze. Auf Grund der geringen Meßgenauigkeit sind die angegebenen Geschwindigkeitskonstanten nur als eine Abschätzung der Größenordnung zu werten.

Diskussion

Hydrolyse der X-Serin-Peptidbindung

In dem untersuchten Temperaturintervall von 55 bis 85 °C verläuft die Hydrolyse der Glycyl-serin-Bindung in dem Tripeptid Glycyl-seryl-alanin um den Faktor 3–4 langsamer als die Spaltung derselben Bindung im Dipeptid Glycyl-serin. Dieses unterschiedliche kinetische Verhalten wird durch eine Erniedrigung der Arrhenius'schen Aktionskonstante beim Übergang vom Dipeptid zum Tripeptid hervorgerufen, obwohl sich gleichzeitig die Aktivierungsenergie dieser Reaktion verringert. Die Resultate der Untersuchungen an Tripeptiden in alkalischer und saurer Lösung⁷ zeigen, daß ganz allgemein beim Übergang vom Dipeptid zum Tripeptid Aktivierungsenergie und Aktionskonstante gleichzeitig erniedrigt werden. Eine Peptidbindung am Aminoende wird dadurch in dem untersuchten Temperaturbereich zwischen 30 und 100 °C gleichschnell oder etwas langsamer als im Dipeptid hydrolysiert. Im Gegensatz dazu erhöht sich die Spaltungsgeschwindigkeit der C-terminalen Bindung i. a. um den Faktor 2–4. Das Verhalten der Glycylserinbindung im Glycyl-seryl-alanin schließt sich also zwanglos an allgemeine Regelmäßigkeiten an, die unabhängig von dem pH -Wert der Reaktionslösung gültig sind. Die Blockierung der Carboxylgruppe in Glycyl-serin durch eine weitere Peptidbindung läßt also keine Rückschlüsse auf den tatsächlichen Reaktionsmechanismus der außergewöhnlich raschen Hydrolyse der Peptide vom Typ X-Serin zu. Die Vermutung liegt nahe, daß der Geschwindigkeitsbestim-

mende Schritt der Hydrolyse – die Aufhebung der Mesomerie der Peptidbindung und die Bildung eines tetragonalen Übergangszustandes – durch einen intramolekularen Angriff der Serin-OH-Gruppe auf das Carbonyl-C-atom erleichtert wird. Die Aminogruppe wird dann durch eine S_N2 -Reaktion des Übergangskomplexes mit einem Wassermolekül abgespalten. Dabei muß nicht notwendig die Wechselwirkung zwischen Carbonyl-C-atom und O-Atom der Serin-OH-Gruppe als kovalente Bindung erhalten bleiben und, wie in einer früheren Untersuchung ausgeführt, ein leichter hydrolysierbares O-Peptid entstehen.

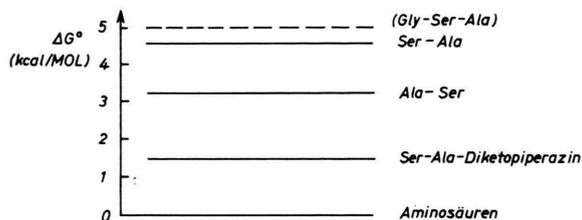
Die Bildung von Diketopiperazinen aus Di- und Tripeptiden

Die Diketopiperazin-Bildung beim Erhitzen einer rein wäßrigen Lösung von Dipeptiden ist interessant durch die Spontanbildung einer Peptidbindung. Dabei sind im Gleichgewicht die Konzentrationen von Dipeptid und Diketopiperazin entweder von der gleichen Größenordnung, oder, wie im Fall des Serylalanins, das Dipeptid ist nicht mehr nachzuweisen. Dagegen liegt das Gleichgewicht für die Bildung von Dipeptiden aus den Aminosäuren bzw. von Tripeptiden aus Dipeptiden und Aminosäuren ganz auf der Seite der Bruchstücke. Theoretische Überlegungen¹⁰ über die energetischen Vorgänge bei der Bildung einer Peptidbindung aus Zwitterionen zeigen, daß die Bilanz der Änderung der

⁹ P. MARTINEZ, Dissertation, Frankfurt/Main 1964.

¹⁰ H. BORSOOK, *Advance in Protein Chemistry* **8**, 127 [1953].

Freien Enthalpie ΔG wesentlich durch Dissoziationsprozesse bestimmt ist. Wir haben diese Rechnungen¹¹ für die hier untersuchten Verbindungen durchgeführt. Die Differenzen der Freien Enthalpie für die Bildung bzw. Umwandlung der einzelnen Verbindungen unter Standardbedingungen sind in folgendem Schema zusammengestellt:



(Der Wert für Glycylserylalanin mußte aus den ΔG -Differenzen zwischen Serylglycin bzw. Glycylserin und Glycylserylglycin abgeschätzt werden.) Nach diesem Schema ist die Bildung des Diketopiperazins aus den beiden Dipeptiden exergon, die spontane Bildung der zweiten Peptidbindung läßt sich also theoretisch vorausberechnen; ebenso wird verständlich, daß die Hydrolyse eines Tripeptids in Aminosäure und Diketopiperazin gegenüber der Bildung eines Dipeptids und einer Aminosäure bevorzugt ist. Werden aus diesen ΔG -Werten Gleichgewichtskonstanten berechnet, so ergibt sich aus der Gleichgewichtsbedingung

$$k_{P \rightarrow D} \cdot [\text{Dipeptid}]_{G1} = k_{D \rightarrow P} \cdot [\text{Diketopiperazin}]_{G1},$$

daß die Reaktionsgeschwindigkeits-Konstante der Bildung von Serylalanin aus Serylalanyl-diketopiperazin um 2 bis 3 Größenordnungen kleiner sein soll als die der Umkehrreaktion, im Fall des Gleichgewichtes zwischen Alanylserin und Serylalanyl-diketopiperazin dagegen sollen beide Geschwindigkeitskonstanten etwa gleichgroß sein. Unsere Experimente haben gezeigt, daß diese Größenverhältnisse, die hier für 25 °C abgeschätzt worden sind, auch bei höheren Temperaturen erhalten bleiben.

Die Größenordnung der Reaktionsgeschwindigkeits-Konstanten der Diketopiperazin-Bildung war zunächst überraschend, denn die freie Drehbarkeit um die C-N-Bindung zwischen den Aminosäuren ist durch die Mesomerie der Peptidbindung erschwert, und nach allgemeiner Ansicht liegt auch in

Lösung das Gleichgewicht ganz auf der Seite der für einen Ringschluß sterisch ungünstigen *trans*-Form. Auf Grund der Messungen von ROGERS u. a.¹² an disubstituierten Säureamiden – entsprechende Versuche mit Peptiden sind bisher in der Literatur noch nicht beschrieben – erfolgt die Rotation um die C-N-Bindung aber so schnell, daß anzunehmen ist, auch im Fall der Peptide wird das für die Diketopiperazin-Bildung wichtige *cis*-Isomere in einem relativ zur Weiterreaktion sehr schnellen Vorgleichgewicht nachgeliefert.

Die rasche Bildung eines Diketopiperazins aus einem Tripeptid unter Abspaltung der die Carboxylgruppe tragenden Aminosäuren ist keine spezielle Eigenschaft der hier untersuchten Verbindung Glycylserylalanin. Eigene qualitative Experimente mit Valylglycylalanin und Serylglycylalanin sowie Hinweise in der Literatur¹³ zeigen, daß es neben der X-Serin-Gruppierung noch einen weiteren Typ einer Peptidbindung gibt, der in rein wäßriger Lösung bei einem p_H -Wert in der Nähe des isoelektrischen Punktes ohne die Einwirkung eines intermolekularen Katalysators relativ leicht gespalten wird. Das Auftreten eines Diketopiperazins als Folgeprodukt legt die Vermutung nahe, daß es sich dabei um eine intramolekulare nukleophile Katalyse der deprotonierten Aminoendgruppe handelt. Die Aufhebung der Mesomerie der C-terminalen Peptidbindung und der Übergang des Carbonyl-C-Atoms aus dem trigonalen in den tetragonalen Valenzzustand wird durch eine intramolekulare Anlagerung des Stickstoffatoms mit seinem freien Elektronenpaar erleichtert. Aus diesem Übergangszustand kann sich der trigonale Valenzzustand unter Abspaltung einer der beiden C-N-Bindungen wieder zurückbilden, und es entsteht entweder das Ausgangspeptid oder ein Diketopiperazin und eine freie Aminosäure. Für diesen Reaktionsmechanismus spricht das Verhalten der Ester von Dipeptiden, die außerordentlich rasch den Alkoholrest abspalten und intramolekular Diketopiperazine bilden, vorausgesetzt die endständige Aminogruppe liegt frei, d. h. nicht als Ammoniumion vor. Die Diketopiperazin-Bildung aus dem Tripeptid erfolgt langsamer als aus dem Dipeptidester; dieses Verhalten ist zu erwarten, denn unter den Hydrolysebedingungen ist das Dissoziationsgleichge-

¹¹ H. NETTER, Theoretische Biochemie, S. 524, Springer-Verlag, Berlin-Göttingen-Heidelberg 1959.

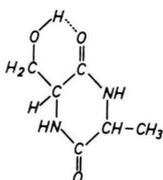
¹² M. T. ROGERS u. J. C. WOODBREY, J. phys. Chem. **66**, 540 [1962].

¹³ E. WÜNSCH, Peptides (5. Europ. Symp., Oxford 1962); R. H. MAZUR u. J. M. SCHLATTER, J. org. Chemistry **28**, 1025 [1963]; J. C. SHEEHAN u. D. N. MCGREGOR, J. Amer. chem. Soc. **84**, 3000 [1962].

wicht ganz auf die Seite der geladenen Ammoniumgruppe verschoben und die katalytisch wirksame Aminogruppe nur in sehr geringer Konzentration vorhanden.

Das Verhalten des Seryl-alanyl-diketopiperazins beim Erhitzen in neutraler wäßriger Lösung

Eine hydrolytische Öffnung des heterocyclischen Ringes des Seryl-alanyl-diketopiperazins konnte nur an der Seryl-alanin-Peptid-Bindung unter Bildung von Alanyl-serin beobachtet werden. Wie oben gezeigt wurde, läßt sich dieses Verhalten theoretisch vorausberechnen, vom Standpunkt einer Interpretation aus der Molekularstruktur kann es nur aus der besonderen Anordnung der beiden Seitenketten $-\text{CH}_3$ und $-\text{CH}_2\text{OH}$ bezüglich der gespaltenen Bindung abgeleitet werden. Auf Grund der Erfahrungen früherer Untersuchungen⁷ ist der Einfluß sterischer und induktiver Effekte zu gering, um eine derartig unterschiedliche Reaktionsfähigkeit wie im vorliegenden Fall zu erklären. Wir nehmen daher an, daß der wahrscheinlich wie im Glycyl-glycyl-diketopiperazin¹⁴ nahezu ebene Diketopiperazinring eine Wasserstoffbrückenbindung zwischen der Hydroxylgruppe der Seitenkette des Serins und dem Carbonyl-O-atom ermöglicht:



Ähnlich wie bei einer Katalyse durch H^+ -Ionen kommt es dadurch über die partielle Aufrichtung der Carbonyldoppelbindung zu einer Verstärkung der Positivierung des Serin-Carbonyl-C-Atoms. Die nukleophile Anlagerung eines Wassermoleküls wird gegenüber dem anderen Carbonyl-C-Atom erleichtert, und man beobachtet makroskopisch nur die Hydrolyse der einen Peptidbindung. Die relativ niedrigen Arrheniuschen Konstanten sprechen für eine derartig intramolekular energetisch begünstigte Reaktion, die intermolekular ausgelöst wird.

Wesentlich schneller als die Ringöffnungsreaktion verläuft in neutraler wäßriger Lösung in dem von uns untersuchten Temperaturintervall die gegenseitige Umwandlung der diastereomeren Formen des Seryl-alanyl-diketopiperazins. Eine Abnahme der optischen Aktivität von Diketopiperazinen mit einer

einheitlichen geometrischen Konfiguration wurde in alkalisch-wäßriger Lösung schon mehrfach beobachtet¹⁵. Dieses Verhalten wurde als eine Folge der Diketopiperazin-Struktur gedeutet, denn in allen Fällen ergaben Parallelversuche, daß die entsprechenden Dipeptide unter den gleichen experimentellen Bedingungen keine derartigen Veränderungen erkennen lassen. Dieses unterschiedliche Verhalten kann dadurch erklärt werden, daß im Diketopiperazin auf jedes der beiden asymmetrisch substituierten α -C-Atome von zwei Seiten der positivierende Effekt einer Peptidbindung wirksam ist und zu einer Lockerung der C-H-Bindung führt; in gleicher Weise wirkt die Serinseitenkette. Trotzdem waren wir überrascht, die Gleichgewichtseinstellung zwischen den Diastereomeren bereits in rein wäßriger Lösung zu beobachten. Theoretisch kann diese Umlagerung durch eine Konfigurationsänderung sowohl am Serin als auch am Alanin erfolgen, unsere Experimente mit einem optisch inaktiven Gemisch der vier möglichen Stereoisomeren geben aber keine Auskunft, welchen Anteil jedes der beiden α -C-Atome an der Gesamtreaktion hat. Vorversuche ergaben, daß L-Alanin beim Erhitzen in einer rein wäßrigen Lösung keine Racemisierungserscheinungen zeigt, die optische Aktivität einer Lösung von L-Serin nimmt unter den gleichen Bedingungen jedoch ab.

Aus den experimentellen Geschwindigkeitskonstanten läßt sich berechnen, daß im Gleichgewicht das *cis*-Diastereomere des Seryl-alanyl-diketopiperazins überwiegt, obwohl in dieser Form die CH_3 - und die CH_2OH -Gruppe auf derselben Seite des Diketopiperazinringes liegen. Wir schließen daraus, daß infolge einer nahezu ebenen Struktur des Diketopiperazinringes die gegenseitige sterische Behinderung der Seitenketten der beiden Aminosäuren keine große Rolle spielt und sich deshalb der Carbeniat-Übergangszustand der Umlagerung auch nicht bevorzugt aus der *cis*-Form bildet. Dagegen wird die Annäherung des Protons an das intermediär trigonale α -C-Atom durch eine Wechselwirkung seiner Hydrathülle mit der Seitenkette der anderen Aminosäure sterisch erschwert, so daß die Anlagerung bevorzugt von der Gegenseite des Diketopiperazinringes unter Bildung einer *cis*-Form erfolgt.

¹⁴ B. D. SYKES u. a., *Biochemistry* **5**, 697 [1966].

¹⁵ M. BERGMANN, *Ber. dtsh. chem. Ges.* **62**, 1901 [1929]; P. A. LEVENE, R. E. STEIGER u. R. E. MARKER, *J. biol. Chemistry* **93**, 605 [1931].