

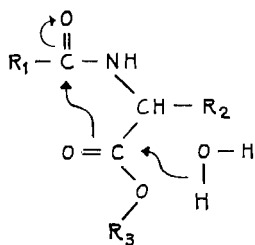
115. Substrat-bedingte Nachbargruppeneffekte als bestimmende Faktoren bei der enzymatischen Hydrolyse.

II. Kinetische Untersuchungen an Chymotrypsin-Substraten

von Ernst Wenger, Hans Urheim und Max Rottenberg

(6. III 62)

Unter den Endo-peptidasen¹⁾ des Pankreas ist das α -Chymotrypsin bis heute das am besten charakterisierte und untersuchte Enzym^{1b)2)}. Nachdem wir bei der durch Cholinesterase katalysierten Hydrolyse die Mitwirkung von substratbedingten Nachbargruppen-Effekten wahrscheinlich machen konnten³⁾, schien es interessant, experimentell zu prüfen, ob nicht auch bei der Chymotrypsin-Wirkung derartige intramolekulare Substrat-Effekte eine Rolle spielen könnten. Einen ersten Anhaltspunkt für diese Möglichkeit bot die bekannte Tatsache, dass ausser den bevorzugten Substraten mit Protein- oder Peptid-Struktur gewisse N-Acyl-aminosäure-ester durch Chymotrypsin hydrolytisch gespalten werden, und es liess sich vermuten, dass die Enzym-Wirkung durch strukturbedingte Effekte der Substrat-Molekel (im Sinne von Schema 1) wesentlich unterstützt wird.



Schema 1

Zur Prüfung dieser Hypothese synthetisierten wir Hippursäurecholinester (I)⁴⁾ und untersuchten sein reaktives Verhalten bei der alkalischen und bei der neutralen Hydrolyse im Vergleich zum Verhalten des Benzoylcholins, einem schon sehr eingehend studierten³⁾ Standard-Substrat für Serum-Cholinesterase, bei dem jedoch kein intramolekularer Nachbargruppeneffekt auftritt. Durch potentiometrische Titration beim konstanten pH 9,0⁵⁾ fanden wir, dass der Hippursäureester mehr als 20mal schneller reagiert als der Benzoesäureester (vgl. Tab. S. 1017), und auch

¹⁾ Vgl. BOYER-LARDY-MYRBÄCK, *The Enzymes*, Vol. 4 (Part A), Academic Press, New York 1960, a) E. L. SMITH, S. 1; b) P. DESNUELLE, S. 93.

²⁾ J. M. STURTEVANT, *Brookhaven Symposia* Nr. 13, 151 (1960); M. L. BENDER, *J. Polymer Sci.*, 49, 75 (1961).

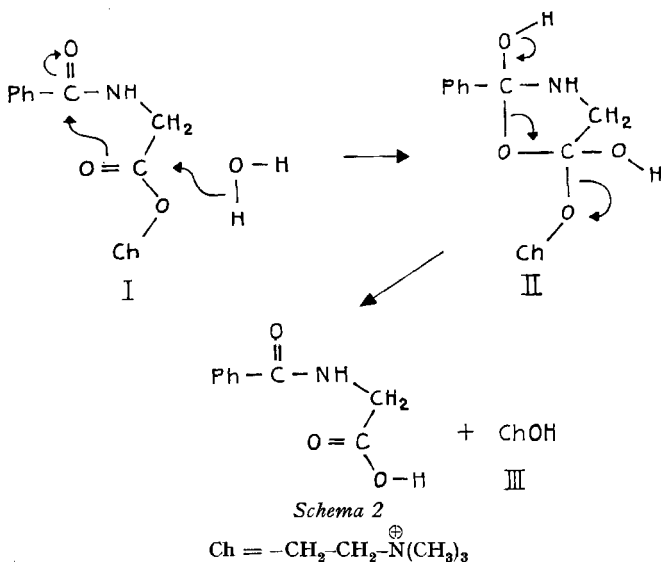
³⁾ Vgl. I. Mitteilung, *Helv.* 45, 1008 (1962).

⁴⁾ Der Methylester ist ein gutes Substrat für Chymotrypsin; vgl. S. A. BERNHARD, W. C. COLES & J. F. NOWELL, *J. Amer. chem. Soc.* 82, 3043 (1960).

⁵⁾ C. F. JACOBSEN, J. LÉONIS, K. LINDERSTRÖM-LANG & M. OTTESEN, *Methods of Biochemical Analysis*, Vol. 4, 171 (1957).

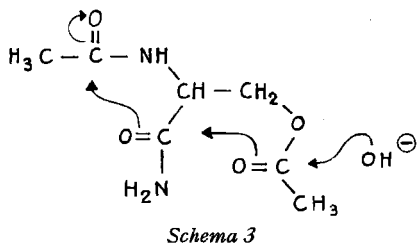
bei der Neutral-Hydrolyse ergaben die Messungen eine Beschleunigung derselben Grössenordnung⁶⁾.

Damit waren die spekulativen Vorstellungen grundsätzlich bestätigt; den detaillierten Mechanismus der anchimer beschleunigten Hydrolyse des Hippursäureesters formulieren wir nach Schema 2 wie folgt: Der Ester-carbonyl-Sauerstoff macht einen intramolekularen nucleophilen Angriff auf das elektrophile Amid-Kohlenstoffatom. Dadurch wird die Polarisation der C=O-Doppelbindung des Esters verstärkt und die Addition der Wassermolekel bzw. des OH⁻-Ions im geschwindigkeitsbestimmenden Schritt erleichtert (Schema 2, I). Das so entstandene, kurzlebige Zwischenprodukt II zerfällt spontan in die Endprodukte Säure und Alkohol (III).



Mit diesem Mechanismus lassen sich eine Reihe von Beobachtungen aus der neuen und älteren Literatur zwanglos deuten, wie wir an zwei uns besonders interessierenden Beispielen zeigen wollen.

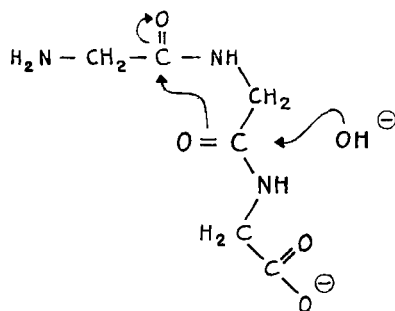
1. Die überraschend hohe Reaktivität der Acetyl-Esterguppe im N,O-Diacetylserinamid und auch im Acetyl-Chymotrypsin bei der Basen-katalysierten Hydrolyse⁷⁾ formulieren wir als Nachbargruppen-Effekt nach dem Schema 3.



⁶⁾ Diese Arbeit, Experimenteller Teil.

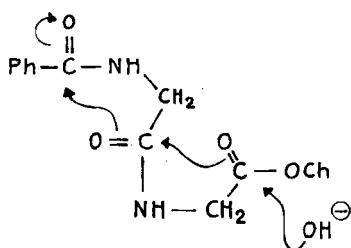
⁷⁾ B. M. ANDERSON, E. H. CORDES & W. P. JENCKS, J. biol. Chemistry 236, 455 (1961).

2) Vor dreissig Jahren stellte KUHN⁸⁾ fest, dass Tripeptide bei der alkalischen Hydrolyse bedeutend schneller reagieren als die entsprechenden Dipeptide. Den Grund dafür sehen wir darin, dass beim Tripeptid (und in gleicher Weise auch bei allen Polypeptiden) die Hydrolyse durch den intramolekularen Amid-Nachbargruppen-effekt unterstützt wird; der Mechanismus ist am Beispiel des Diglycylglycins (Schema 4) skizziert; beim Glycylglycin hingegen kann dieser Effekt nicht auftreten.



Schema 4

In den höheren Peptiden und in den Proteinen kommen die als potentielle Nachbargruppen wirksamen Amid-Bindungen in grosser Zahl und in regelmässiger Folge vor; es schien deshalb unerlässlich, zu prüfen, ob und in welchem Umfang eine zusätzliche benachbarte Amid-Gruppe den Hydrolyse-fördernden Effekt der ersten Amidgruppe noch verstärkt. Zu diesem Zweck synthetisierten wir einen Dipeptid-ester mit 2 Amidgruppen, und zwar das Benzoylglycyl-glycyl-cholinchlorid und untersuchten die Geschwindigkeit seiner alkalischen Hydrolyse beim konstanten pH 9,0. Die kinetische Messung ergab (Tabelle), dass dieser Ester nur noch knapp um den Faktor 2 schneller reagiert als Hippurylcholin. Der Effekt (Mechanismus in Schema 5



Schema 5
(Ch = Cholinrest)

angedeutet) klingt demnach mit zunehmendem Abstand vom Reaktions-Zentrum rasch ab, offenbar deshalb, weil bei einer intramolekularen Häufung der reagierenden Nachbargruppen eine zunehmende Anzahl von Amid-Bindungen aus der bevorzugten *trans*-Konfiguration herausgedreht werden müssten.

Auf Grund der vorliegenden Untersuchungen lässt sich mit Sicherheit voraussagen, dass der Peptidbindung in Enzym-Proteinen keinesfalls nur die Rolle eines Trägers

⁸⁾ W. KUHN, C. C. MOLSTER & K. FREUDENBERG, Ber. deutsch. chem. Ges. 65, 1179 (1932); vgl. auch E. BAMANN, J. G. HAAS & H. TRAPMANN, Arch. Pharmaz. 294, 569 (1961).

oder Skelettes für die funktionellen Gruppen zukommt; im Gegenteil ist jetzt quantitativ gezeigt, dass die Amid-Gruppe selbst als aktiver Partner am enzymatischen Geschehen teilnehmen kann. Abschliessend möchten wir noch darauf hinweisen, dass sich dieses Arbeitsgebiet heute in stürmischer Entwicklung befindet. Vor weniger als einem Jahr haben COHEN & WITKOP⁹⁾ in einem schönen Sammelreferat Beispiele zitiert, wo die Amid-Gruppe als nucleophiles Zentrum mit Carbonium-Ionen verschiedenster Bildungsart intramolekular in Wechselwirkung tritt; nicht viel früher hat BENDER¹⁰⁾ die Vermutung ausgesprochen, dass die Peptid-Bindung in Proteinen grosse Möglichkeiten als reaktionsbeeinflussende Nachbargruppe besitzt, und ganz neuerdings ist es amerikanischen Forschern¹¹⁾ gelungen, eine durch intramolekulare Amid-Katalyse beschleunigte Amid-Hydrolyse in einem Spezialfall der aromatischen Chemie zu verwirklichen. Gegen diesen Hintergrund der heute laufenden Strömung sieht man klar, dass die in der vorliegenden Arbeit gewonnenen Erkenntnisse keinen plötzlichen Durchbruch bieten werden, sondern nur einen kleinen Vorwärtsschritt bedeuten auf dem langen und mühevollen Weg zum besseren Verständnis der Enzym-Wirkung.

Experimenteller Teil¹²⁾

1) *Substrate.* – a) *Hippurylcholin-chlorid.* Zunächst wurde durch cyanidkatalysierte Umesterung von Methylhippurat mit Dimethylaminoäthanol und anschliessende Behandlung mit Methyljodid das *Hippurylcholinjodid* hergestellt.

50 mMol (9,7 g) Hippursäure-methylester⁴⁾ wurden mit überschüssigem Dimethylaminoäthanol unter Zusatz von 1 g Kaliumcyanid umgeestert; diese Operation haben wir in einer früheren Arbeit¹³⁾ ausführlich beschrieben. Die Lösung des Rohproduktes in 250 ml Äthylacetat wurde mit 50 ml 2M Kaliumhydrogencarbonat gewaschen, getrocknet (wasserfreies Kaliumcarbonat + Natriumsulfat, je 70 g), filtriert und eingedampft. Das zurückbleibende Öl wurde in 100 ml Äthylacetat gelöst und mit 10 ml Methyljodid im Dunkeln stehengelassen. Nach 7 Tagen hatte sich ein gelber, krist. Niederschlag gebildet (15,0 g Rohprodukt). Er wurde in der Minimalmenge Acetonitril gelöst und bis zur Trübung mit Äther versetzt. Man erhielt 13,8 g (70% Ausb.) *Hippuryl-cholin-jodid* vom Smp. 160–164°.

Zur Überführung ins *Chlorid* wurden 7,8 g (20 mMol) Jodid in 100 ml Wasser mit viermal vorkonditioniertem Ionen-Austauscher Dowex 2 × 8, Chlorid-Form (35 ml Schüttvolumen), 5 Min. unter Eiskühlung langsam gerührt und das Harz noch zweimal mit je 100 ml Wasser auf gleiche Weise extrahiert. Den Überstand filtrierte man jeweils durch eine Säule (14 mm Ø), die weitere 15 ml Dowex enthielt. Die vereinigten Eluate (frei von I⁻; Prüfung mit Jodsäure + Stärke) wurden bei 35° im Vak. eingedampft. Der ölige Rückstand kristallisierte nach dreimaligem Abdampfen im Vak. mit je 50 ml Benzol. Umkristallisieren aus Acetonitril-Äthylacetat gab 5,7 g Chlorid vom Smp. 83–87°. Das für die Messungen verwendete Analysen-Präparat erhielt man durch Filtrieren einer Lösung von 5,4 g des obigen Rohproduktes in 12 ml heissem Acetonitril, Kühlen im Eisbad und Versetzen mit Äthylacetat bis zur Trübung (2 ml): 4,7 g, Smp. 89–92°. Nach Elementar-Analyse¹⁴⁾ und Wasserbestimmung¹⁵⁾ nach KARL FISCHER handelt es sich um das Mono-Hydrat:

$C_{14}H_{21}O_3N_2Cl + 1H_2O$	Ber. C 52,90	H 7,29	N 8,81	Cl 10,84	H ₂ O 5,66%
(317,8)	Gef. „ 52,9	„ 7,3	„ 9,0	„ 11,1	„ 5,1 %

⁹⁾ L. A. COHEN & B. WITKOP, *Angew. Chem.* **73**, 253 (1961).

¹⁰⁾ M. L. BENDER, *J. Polymer. Sci.* **49**, 80 (1961).

¹¹⁾ T. COHEN & J. LIPOWITZ, *J. Amer. chem. Soc.* **83**, 4866 (1961).

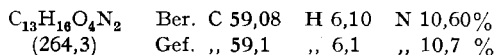
¹²⁾ Die Smp. sind unkorrigiert; Fehlergrenze ca. ± 3°.

¹³⁾ E. SCHÄTZLE, M. ROTTENBERG & M. THÜRKAUF, *Helv.* **42**, 1708 (1959).

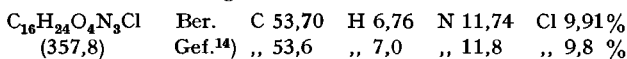
¹⁴⁾ Halbmikro-Analysen von Herrn H. WALTER, Laboratorium Wimmis.

¹⁵⁾ Diese Bestimmung hat Herr A. SOPRANETTI freundlicherweise für uns ausgeführt.

b) *Hippurylglycyl-cholin-chlorid*. Zunächst wurde *Hippurylglycin-äthylester* nach dem Verfahren von BOISSONNAS¹⁶⁾ aus Hippursäure über deren gemischtes Anhydrid mit Äthylkohlen-säure hergestellt. 50 mMol Hippursäure (9 g) und 50 mMol (7 ml) Triäthylamin in 100 ml Dimethylformamid wurden auf ca. -10° gekühlt. Nach 10 Min. gab man 50 mMol Chlorameisensäure-äthylester (4,8 ml) zu, liess 25 Min. bei -10° stehen und versetzte dann unter Kühlung mit einer Mischung, hergestellt aus 50 mMol Glycin-äthylester-HCl (7 g) und 50 mMol Triäthylamin in 100 ml Dimethylformamid. Nach 20 bis 24 Std. bei ca. 20° wurde im Rotationsverdampfer im Vak. eingedampft; den Rückstand löste man in 350 ml Äthylacetat, wusch die Lösung nacheinander mit 2×100 ml 1M Weinsäure, 4×100 ml Wasser, 2×100 ml 2M Kaliumhydrogencarbonat und 4×100 ml Wasser. Dann wurde getrocknet (120 g Natriumsulfat), filtriert und eingedampft. Den krist. Rückstand löste man in 50 ml heissem Äthylacetat und versetzte die Lösung mit Pentan bis zur Trübung (ca. 40 ml). Die so erhaltenen Kristalle (6,5 g; 48% d. Th.) vom Smp. $106-110^{\circ}$ waren analysenrein¹⁴⁾.



Hippurylglycylcholin-chlorid. 100 mMol Hippurylglycin-äthylester (26,4 g) wurden, wie oben beschrieben, katalytisch (4 g KCN) mit überschüss. Dimethylaminoäthanol umgeestert. Die Lösung dieses basischen Esters in Äthylacetat wurde mit viel Hydrogencarbonatlösung gewaschen, getrocknet, filtriert und eingedampft. Der Rückstand wurde in Äthylacetat gelöst und mit 40 ml Methyljodid 24 Std. bei ca. 20° umgesetzt. Die gelbe Kristallmasse wurde abgesaugt, sogleich in 300 ml Wasser gelöst und mit Silberchlorid (aus 200 mMol Silbernitrat frisch bereitet) geschüttelt bis die Probe auf Jodid negativ war (5 Min.). Nach Abfiltrieren der Silberhalogenide wurde die klare Lösung bei 40° im Vak. eingedampft. Der Rückstand (gelbes Öl) wurde in 100 ml Dimethylformamid gelöst und mit Äthylacetat bis zur Trübung versetzt (90 ml). Die Kristalle wurden ausgiebig mit Äthylacetat und zuletzt mit Äther gewaschen. Nach dem Trocknen über Phosphor-pentoxid im Vak. erhielt man 23,1 g farblose, analysenreine Kristalle (64%) vom Smp. $222-225^{\circ}$. Sie wurden für die kinetischen Messungen verwendet.



2) *Kinetische Untersuchungen*. – a) *Alkalische Hydrolyse*. Die Hydrolyse wurde durch potentiometrische Titration bei konstantem pH⁵⁾ verfolgt, und wiederum kam der selbstgebaute pH-Stat³⁾ zur Anwendung. Die Messdaten wurden nach GUGGENHEIM¹⁷⁾ ausgewertet (s. Tab.).

Geschwindigkeitskonstanten k_1 der Hydrolyse von Benzoylcholin-chlorid (A), Hippurylcholin-chlorid (B) und Hippurylglycyl-cholin-chlorid (C)

pH = $9,00 \pm 0,04$; Temp. $19,6^{\circ}$; Ionenstärke $\mu = 0,5\text{M}$ (KCl). Mittelwerte aus 4 Messreihen

Ester	A	B	C
$k_1 \cdot 10^3$ (min ⁻¹)	$0,18 \pm 0,02$	$4,4 \pm 0,4$	$8,2 \pm 0,4$

b) *Neutral-Hydrolyse* (bearbeitet von Fr. ELSEBETH SCHÄTZLE). Sie wurde, wie früher beim Benzoylcholin beschrieben¹⁸⁾, bei 100° durchgeführt. Direkte Titration der durch Hydrolyse gebildeten Säure war hier nicht möglich, weil der unverbrauchte Hippursäureester während des Lauge-Zusatzes schon merkliche alkalische Hydrolyse erleidet. Es wurde deshalb folgendes quantitatives Extraktionsverfahren entwickelt.

Nach der gewünschten Zeit t wird das Röhrchen ins Eisbad gestellt und dadurch die Reaktion zum Stillstand gebracht. Es wurden vier Scheidetrichter S_1-S_4 bereitgestellt; es enthalten S_1 25 ml, S_2-S_4 je 20 ml sehr reines Äthylacetat. Der Rohrinhalt wird quantitativ in S_1 übergeführt (Nachwaschen mit total 5 ml Wasser). Nach Zusatz von 1 ml 6N HCl folgt eine vierstufige Gegenstrom-Extraktion mit gleichzeitigem Auswaschen zuerst mit 10 ml, dann noch dreimal mit je 5 ml Wasser. Die quantitativ (Nachspülen mit Äthylacetat) vereinigten Äthylacetat-Phasen

¹⁶⁾ R. A. BOISSONNAS, Helv. 34, 874 (1951).

¹⁷⁾ E. A. GUGGENHEIM, Phil. Mag. [7] 2, 538 (1926).

trocknet man über Natriumsulfat (30 g), dann wird filtriert und im Vak. abgedampft (Rotations-Verdampfer). Den Rückstand löst man in 5 ml Äthanol und titriert mit 0,1N NaOH gegen Phenolphthalein. Test-Versuche mit bekannten Mengen von Ester plus Hippursäure ergaben die berechneten Werte. Parallel zu jeder Messung lief eine «Kontrolle» mit 10,0 ml des für die Hydrolyse verwendeten Lösungsmittels (bidest. Wasser). Jede Kontrolle wurde demselben quantitativen Gegenstrom-Extraktionsverfahren unterworfen und ergab regelmässig den geringen Leerwert von 0,04 ml NaOH, der vom kinetischen Messwert subtrahiert wurde. Ein Doppelversuch mit je 8 Röhrchen ergab in guter Näherung eine Kinetik erster Ordnung mit der Geschwindigkeitskonstante

$$k_1 = \frac{1}{t} \cdot \ln \frac{c_0}{c_t} \text{ min}^{-1}.$$

Bei Neutral-Hydrolyse bei $100^\circ \pm 0,2^\circ$; Anfangs-pH: 4,24; End-pH: 2,80; Anfangskonzentration $c_0 = 0,025M$ fanden wir für:

$$\text{Hippurylcholin-chlorid: } k_1 = 5,1 \cdot 10^{-4} \pm 0,5 \cdot 10^{-4} \text{ min}^{-1}.$$

Unter identischen Bedingungen wurde für *Benzoylcholin-chlorid* gefunden¹³⁾:

$$k_1 = 2 \cdot 10^{-5} \pm 0,3 \cdot 10^{-5} \text{ min}^{-1}.$$

SUMMARY

Kinetic evidence is presented to demonstrate that α -acylamino esters and N-acyl-dipeptide esters exhibit unusually high reactivities toward neutral and alkaline hydrolysis. The authors infer that the same must be true for other typical chymotrypsin substrates such as dipeptide amides, higher peptides and proteins, the peptide carbonyl acting in each case as a rate-enhancing neighbouring group. They conclude that, quite generally, the peptide bond in enzyme proteins does not merely serve as a backbone to support the functional groups but that, on the contrary, the amide groups may themselves participate both as nucleophilic and as electrophilic centers in the enzymatic reactions.

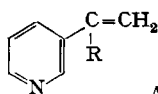
KTA Laboratorium Wimmis (Bern)

116. Enamine und Amide 3-substituierter Pyridinderivate

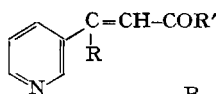
von K. M. Naef¹⁾ und H. Schaltegger

(6. III. 62)

Wir interessieren uns für Enamine und Enaminamide vom Typus A und B, welche dem Nicotinsäureamid nahestehen.



A



B

R = aliphatische offene und cyclische Aminreste,

R' = Alkyl, Aryl, Pyridyl, Alkoxy, bzw. Aminreste wie unter R.

¹⁾ Auszug aus der Dissertation K. M. NAEF, Bern 1961. Alle Belegdiagramme (IR.-Spektren und Gas-chromatogramme) können dort eingesehen werden. (Mikrofilmkopien sind auf der Stadt- und Hochschulbibliothek Bern leihweise erhältlich.)