

Synthese und katalytische Eigenschaften hydrolytisch aktiver Peptide

Synthesis and Catalytic Properties of Peptides with Hydrolytic Activity

Dorothee Petz und Friedhelm Schneider

Physiologisch-Chemisches Institut II, Universität Marburg

(Z. Naturforsch. 31 c, 534–543 [1976]; eingegangen am 24. Juni 1976)

Peptide Synthesis, Peptides with Hydrolytic Activity

The synthesis by conventional methods of the peptides Z-Asp-Cys-NH₂, Z-Asp-Gly-Cys-NH₂, Z-Glu-Gly-Cys-NH₂, Z-His-Ala-Gly-Gly-Cys-NH₂, Z-His-Ala-Asp-Gly-Cys-NH₂ and Z-His-Ala-Asp-Gly-OCH₃ is described. Cystin was used for SH-protection; reduction of the disulfides was performed by mercaptoethanol. The hydrolytic activity of these peptides with *p*-nitrophenylacetate as substrate was compared with the activity of a number of peptides described in the literature.

Zahlreiche hydrolytisch aktive Enzyme benötigen keine Cofaktoren oder Cosubstrate; katalytisch wirksam werden bei ihnen ausschließlich die funktionellen Grupepn der Enzymproteine^{1, 2}. Wesentliche Faktoren für das Verständnis des molekularen Mechanismus dieser Enzyme sind Orientierung, Kooperation und Nachbargruppeneffekte der unmittelbar an der Katalyse beteiligten funktionellen Gruppen^{1, 3}. Diese Vorstellungen werden durch Modellstudien⁴, Modifizierungsexperimente⁵ und Röntgenstrukturanalysen¹ zahlreicher Enzyme gestützt. Unter den funktionellen Gruppen der Proteine nehmen in Hinblick auf ihre mögliche Rolle bei der Enzymkatalyse SH- und Carboxylgruppen sowie Imidazolreste eine besondere Stellung ein, die sich aus den chemischen und physikalisch-chemischen Eigenschaften vor allem des Imidazolrestes⁶ und der SH-Gruppe⁷ ergeben.

Während die katalytischen Eigenschaften der SH-Gruppe und des Imidazols in monofunktionellen Katalysen an zahlreichen Modellsystemen untersucht wurden^{4, 8}, gibt es bisher nur wenige Untersuchungen zur multifunktionellen, kooperativen Katalyse unter Beteiligung von SH-, Imidazol- und Carboxylgruppen^{9–15}.

In Fortsetzung unserer früheren Untersuchungen^{9, 11} zur kooperativen Katalyse mit niedermole-

kularen Verbindungen wie 4(β -Mercaptoäthyl)imidazol und 4-Mercaptomethylimidazol haben wir eine Anzahl von Histidin-, Cystein- und Asparaginsäurehaltigen Peptiden synthetisiert und versucht, Hinweise auf mögliche kooperative Effekte der funktionellen Gruppen der Peptide aus einer eingehenden kinetischen Analyse ihrer katalytischen Eigenschaften bei der Esterhydrolyse zu erhalten¹⁴. Wir berichten in der vorliegenden Arbeit über die Synthese der Peptide und einen Vergleich ihrer katalytischen Effektivität mit der anderer in der Literatur beschriebener „Esterase-Modelle“ mit Peptidstruktur.

Synthese der Peptide

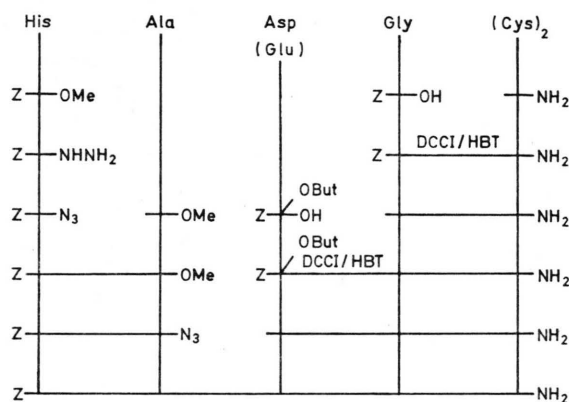
Die Synthese der Peptide Z-Asp-Cys-NH₂, Z-Asp-Gly-Cys-NH₂, Z-Glu-Gly-Cys-NH₂, Z-His-Ala-Gly-Gly-Cys-NH₂, Z-His-Ala-Asp-Gly-Cys-NH₂ und Z-His-Ala-Asp-Gly-OCH₃ wurde nach konventionellen Methoden durchgeführt, deren wesentliche Merkmale sich wie folgt zusammenfassen lassen: In allen Fällen wurde Cystin für die Synthese verwendet¹⁵ und damit ein spezieller SH-Schutz umgangen. Reduktion der Peptiddisulfide erfolgte mit Mercaptoäthanol. Als Schutz der β - bzw. γ -Carboxylgruppe der Asparaginsäure und Glutaminsäure wurde der *tert*-Butylester¹⁷ verwendet. Die Kupplung der Peptidbindungen wurde hauptsächlich nach der DCCI/HOBt-Methode¹⁸, in einigen Fällen auch über *p*-Nitrophenylester durchgeführt, Histidin wurde nur über die Azidmethode ohne Schutz des Imidazolrestes gekuppelt. Die N-terminale Aminogruppe und C-terminale Carboxylgruppe der Endprodukte blieben geschützt, um ihren möglichen Einfluß bei der Katalyse auszuschalten. Zur Synthese der Pentapeptide wurden verschiedene Wege beschritten; von die-

Sonderdruckanforderungen an Prof. Dr. Fr. Schneider, Physiologisch-Chemisches Institut II der Universität, Lahnberge, D-3550 Marburg.

Abkürzungen: DCCI, Dicyclohexylcarbodiimid; DC-Harnstoff, Dicyclohexylharnstoff; DC, Dünnschichtchromatogramm; DMF, Dimethylformamid; HOBt, 1-Hydroxybenzotriazol; ONp, *p*-Nitrophenylester; Obu^t, *tert*-Butylester; OBzl, Benzylester; NPA, *p*-Nitrophenylacetat; TAA, Triäthylamin; TFA, Trifluoressigsäure; Z, Benzyloxycarbonyl.



sen erwies sich der in Schema I beschriebene am geeignetsten: Dabei wurde Z-His-Ala-azid, das aus dem Hydrazid nach dem Rudinger-Verfahren¹⁹ hergestellt worden war, mit den Tripeptiddisulfiden (Asp-Gly-Cys-NH₂)₂ bzw. (Glu-Gly-Cys-NH₂)₂ mit freier β - bzw. γ -Carboxylgruppe gekuppelt. Die Kupplung des Dipeptidazids mit dem Disulfid (Glu-Gly-Cys-NH₂)₂ führte zu einem sehr schwer löslichen Pentapeptidderivat, dessen Löslichkeit auch durch Reduktion mit Mercaptoäthanol nicht wesentlich verbessert werden konnte. Wegen Löslichkeitsschwierigkeiten und den sich daraus ergebenden Reinigungsproblemen war dieses Peptid für katalytische Messungen nicht geeignet. Im Falle des geschützten Pentapeptids Z-His-Ala-Gly-Gly-Cys-NH₂ führte eine schrittweise Synthese beginnend mit Cystindiamid zum Ziel.



Synthese - Schema 1.

Katalytische Eigenschaften

Über die pH-Abhängigkeit der scheinbaren und wahren Geschwindigkeitskonstanten zweiter Ordnung k_2' und k_2 der durch die beschriebenen Peptide katalysierten Hydrolyse von NPA und *tert*-Butyloxycarbonyl-Ala-ONp wurde bereits in einer vorangehenden Arbeit²⁰ berichtet. Ein Vergleich der katalytischen Aktivität der Peptide und derjenigen der SH-Proteasen Papain und Streptokokken-Protease hatte außerdem gezeigt, daß Papain 10³mal und Streptokokken-Protease 10mal aktiver gegenüber Boc-Ala-ONp als Substrat sind, als die aktivsten der hier beschriebenen Peptide^{14, 20}.

In der vorliegenden Arbeit wird die katalytische Effektivität verschiedener, in der Literatur beschriebener hydrolytisch aktiver Peptide unterschiedlich-

ster Struktur mit NPA als Substrat mit der Aktivität der von uns synthetisierten Peptide verglichen. Dieser Vergleich ist anhand der nachstehenden Tabellen I und II auf der Basis der Geschwindigkeitskonstanten zweiter Ordnung der Hydrolyse von NPA möglich.

In Tab. I sind Peptide zusammengefaßt, die als Modellverbindungen der Serinproteasen die Amino-

Tab. I. Geschwindigkeitskonstanten 2ter Ordnung der durch Histidin—Peptide katalysierten Hydrolyse von NPA.

Peptide	k_2 [l·mol ⁻¹ ·min ⁻¹]	Bedingungen	Lit.
c-His-Ser	8,3	pH 8,0; 24°	21
c-His-Tyr	10,6	pH 8,0; 24°	21
c-His-His	11,4	pH 8,0; 24°	21
Ser-His-Asp	45,0	pH 7,5; 25°	22
Ser- γ -Abu-His- γ -Abu-Asp	147,0	pH 7,5; 25°	22
Gly-His-Ser	15,0	pH 7,8; 28°	23
His-Ala-Asp-Gly-Ser	210,0	—	24
His-Ala-Glu-Gly-Ser	87,0	—	24
His-Ala-Gly-Ser	15,0	—	24
His-Gly-Asp-Ser-Phe	179,0	—	24
His-Gly-Glu-Ser-Phe	93,0	—	24
His-Asp-Gly-Ser	150,0	—	24
His-Glu-Gly-Ser	63,0	—	24
His-Gly-Tyr-Ser	21,0	—	24
Gly-His-Gly-Ser	17,0	—	24
Thr-Ala-Ser-His-Asp	92,0	pH 7,7; 25°	25
Glu-Ser-Gly-Gly-His-OCH ₃	5,3	pH 6,2; 20°	26
Glu-Gly-Gly-His-OCH ₃	5,3	pH 6,2; 20°	26
Z-His-Ala-Asp-Gly-OCH ₃	19,8	pH 7,5; 25°	20
c(Gly-His-Ser-Gly-His-Ser)	7,0	pH 7,8; 24°	22
Ser-Gly-Gly-His-Gly-Gly-His-Gly-Asp	9,0	pH 7,7; 27°	31
Ser-Gly-Gly-His-Gly-Gly-His-Gly-Asp-OCH ₃	12,0	pH 7,7; 27°	31

säuren Histidin, Serin und Asparaginsäure im Molekül vereinen, oder den Effekt eines Austausches dieser Aminosäuren auf die katalytische Effizienz der Peptide wiedergeben. Tab. II faßt Cysteinpeptide zusammen, die für Modellstudien zum Mechanismus der SH-Proteasen wie Papain, Ficin oder Streptokokken-Protease herangezogen wurden; ein großer Teil von ihnen enthält als weitere trifunktionelle Aminosäure ebenfalls Histidin.

Unter den Peptiden in Tab. I fallen vier auf, deren Geschwindigkeitskonstanten erheblich über 10² [l·mol⁻¹·min⁻¹] liegen. Gemeinsam ist diesen das Vorkommen von Histidin, Asparaginsäure und Serin in verschiedenen Positionen und Abständen. Bei der Synthese des Ser- γ -Abu-His- γ -Abu-Asp streb-

Tab. II. Geschwindigkeitskonstanten zweiter Ordnung der durch Cystein-Peptide katalysierten Hydrolyse von NPA.

Peptide	[l·mol ⁻¹ ·min ⁻¹] <i>k</i> ₂	Bedingun- gen *	Lit.
c-Cys-Gly	480		12
c-Cys-His	552		12
c-Cys-Ser	440		12
Glu-γ-Cys-Gly	380		30
Ac-Cys-His-Asp	1226		10
Z-Asp-Cys-NH ₂	718		20
Z-Asp-Gly-Cys-NH ₂	859		20
Z-Glu-Gly-Cys-NH ₂	1221		20
Thr-Ala-Cys-His-Asp	30 **	pH 7,7; 23°	27, 28
Ac-Cys-γ-Abu-His-γ- Abu-Asp	1940		10
Z-His-Ala-Gly-Gly-Cys- NH ₂	1531		20
Z-His-Ala-Asp-Gly-Cys- NH ₂	2534		20
c(His-Gly-Cys-D-Phe- Gly) ₂	19,6 **	pH 7,7; 24°	29
Ser-Pro-Cys-Ser-Glu- Thr-Tyr	1350	pH 8,3; 25°	15

* pH 7,5 25°C.

** Scheinbare Geschwindigkeitskonstante zweiter Ordnung k_2' : k_1/c .

ten die Autoren²² an, die Flexibilität und damit die Möglichkeit von Wechselwirkungen der funktionellen Gruppen zu erhöhen. Aus der im Vergleich zu anderen, ähnlich gebauten Peptiden erheblich gesteigerten Aktivität schließen sie, daß bei der Katalyse kooperative Effekte wirksam werden. Die Sequenz Thr-Ala-Ser-His-Asp²⁵ ist Teil des aktiven Zentrums der Phosphoglucomutase. Die hydrolytische Aktivität dieses Peptids wurde wegen des Vorkommens von Serin, Histidin und Asparaginsäure gemessen. Besonderes Interesse verdient an diesem Peptid die Beobachtung, daß mit N-Methoxycarbonyl-phenylalanin-*p*-nitrophenylester als Substrat eine Stereoselektivität der Hydrolyserate beobachtet wird, indem die L-Verbindung mit der doppelten Geschwindigkeit wie die D-Verbindung umgesetzt wird: $k_2 = 62$ [l·mol⁻¹·min⁻¹] für die L-Verbindung; $k_2 = 32$ [l·mol⁻¹·min⁻¹] für die D-Verbindung²⁵.

An drei Beispielen wird der Effekt des Austausches von Asparaginsäure gegen Glutaminsäure deutlich²⁴. Dieser Austausch führt immer zu einem deutlichen Abfall der k_2 -Werte, prozentual um etwa 50–60%. Peptide, in denen eine saure Aminosäure überhaupt fehlt, erreichen meistens nur geringe k_2 -Werte; auf diesen Punkt weisen besonders Kapoor und Trimboli²⁴ hin. Es gibt aber auch Bei-

spiele, bei denen trotz Vorhandensein von Histidin, Serin und Asparaginsäure nur sehr geringe Aktivitäten beobachtet werden³¹.

Nach den aus der Tabelle zu entnehmenden Aktivitäten der cyclischen Peptide führt eine Einschränkung der Flexibilität durch Cyclisierung eher zu einer Erniedrigung der katalytischen Effektivität; es gibt allerdings auch andere Beobachtungen²⁸.

Tab. II gibt eine Übersicht über die katalytischen Konstanten der durch verschiedene Cysteinpeptide katalysierten Hydrolyse von NPA. Generell liegen die Konstanten wegen der größeren nucleophilen Reaktivität von SH-Verbindungen³⁰ im Vergleich zum Imidazol eine Größenordnung über denen der Histidinpeptide der Tab. I. Besonders zu erwähnen ist, daß bei den Verbindungen Thr-Ala-Cys-His-Asp^{27, 28}, Z-His-Ala-Asp-Gly-Cys-NH₂^{14, 20}, Z-His-Ala-Gly-Gly-Cys-NH₂^{14, 20} und c(His-Glu-Cys-D-Phe-Gly)₂²⁹ mit steigenden NPA-Konzentrationen eine Sättigungskinetik beobachtet wird und aus den Lineweaver-Burck-Diagrammen scheinbare K_m -Werte für NPA bestimmt werden können. Wie man aus Tab. II weiter erkennt, werden die höchsten Aktivitäten mit Peptiden beobachtet, die Cystein, Histidin und Asparaginsäure im Molekül enthalten; außerdem wird deutlich, daß mehrere Sequenzen Cystein-Analoga der Peptide aus Tab. I darstellen, in denen Serin gegen Cystein ausgetauscht wurde^{27, 10}. Dabei beobachtet man auf einem höheren Aktivitätsniveau dieselbe Abstufung der Aktivität wie bei den Serinpeptiden.

Ser-Pro-Cys-Ser-Glu-Thr-Tyr¹⁵ stellt die Sequenz 159–165 der Carboxypeptidase dar. Für den Wirkungsmechanismus dieses Peptids bei der Esterhydrolyse formuliert Fridkin¹⁵ eine konzertierte SäureBasen-Katalyse unter Beteiligung einer Carboxylgruppe und Tyrosin-OH-Gruppe.

In einigen Fällen wurde auch die pH-Abhängigkeit der k_2 -Werte untersucht. Bei dem einzigen Cyclopeptid der Tabelle wurde eine glockenförmige pH-Abhängigkeit mit einem Optimum bei 7,6 gefunden²⁹; das Cyclopeptid war außerdem dreimal aktiver als das entsprechende lineare Peptid²⁹. Bei einigen anderen Peptiden zeigt k_2 ebenfalls deutliche pH-Abhängigkeit, wobei die Werte mit sinkendem pH-Wert ansteigen^{20, 14, 12}.

Aus Tab. II wird ersichtlich, daß die in dieser Arbeit beschriebenen Pentapeptide Z-His-Ala-Asp-Gly-Cys-NH₂ und Z-His-Ala-Gly-Gly-Cys-NH₂ zu den aktivsten bisher bekannten Cysteinpeptiden gehören.

Da sie außerdem Sättigungskinetik bei der Esterhydrolyse zeigen¹⁴ und die nukleophile Reaktivität ihrer SH-Gruppen über das hinausgeht, was man aufgrund der pK-Werte erwarten sollte¹⁴, wäre eine Untersuchung ihrer Konformation in Lösung von Interesse.

Eine eingehende kinetische Analyse des katalytischen Verhaltens der in dieser Arbeit synthetisierten Peptide wird in einer nachfolgenden Arbeit beschrieben.

Beschreibung der Versuche

Allgemeines

Die Schmelzpunkte wurden in dem Gerät nach Dr. Tottoli in offenen Kapillaren bestimmt, sie sind nicht korrigiert. Optische Drehungen wurden mit dem lichtelektrischen Polarimeter 141 Perkin Elmer bestimmt. C,H,N-Analysen wurden in der zentralen Analytik des Fachbereichs Chemie ausgeführt. Aminosäureanalysen wurden am Beckman Unichrom durchgeführt. Die Peptide wurden in 6 N HCl nach Begasung mit Argon 24 Stunden bei 110 °C hydrolysiert. Für die Dünnschichtchromatographie wurden Kieselgel-beschichtete Aluminiumfolien der Firma Riedel de Haen verwendet. Als Laufmittel dienten:

I: *n*-Butanol/Eisessig/Wasser 4:1:1; II: *n*-Butanol/Pyridin/Eisessig/Wasser 30:20:6:24; III: *n*-Butanol/Eisessig/Methanol/Pyridin/Methylendchlorid/Wasser 4:1:1:1:2:1; IV: Propanol/Ammoniak/Wasser 6:3:1; V: Chloroform/Eisessig 9:1; VI: Chloroform/Cyclohexan/Eisessig 9:9:2.

Als Sprühreagenzien dienten:

5-prozentige Ninhydrinlösung in *n*-Butanol zum Nachweis von Verbindungen mit freier Amino-Gruppe.

Pauly Reagenz (Diazosulfanilsäure)³² zum Nachweis histidinhaltiger Peptide.

Eine 10-prozentige Lösung von Ellman Reagenz³³ in Phosphatpuffer pH 8 zum Nachweis von Verbindungen mit freier SH-Gruppe. Außerdem wurde die Chlor-Tolidin-Reaktion³⁴ angewandt. Die aus den Disulfiden durch Reduktion mit Mercaptoäthanol gewonnenen Thiolverbindungen wurden vorwiegend durch Dünnschichtchromatographie und Bestimmung des SH-Gehaltes charakterisiert, da sich die C,H,N-Analysen von S-S- und SH-Verbindungen nicht unterscheiden.

Synthese der Peptide

(Z-Asp-Cys-NH₂)₂

4 g Cystindiamid × 2 HBr³⁵ (10 mmol) werden in 100 ml DMF gelöst, mit 2,8 ml TAA versetzt und

solange auf 40 °C erhitzt, bis alles ausgefallene Cystindiamid wieder gelöst ist. Anschließend tropft man 7,5 g Z-Asp-Anhydrid³⁶ (30 mmol) in 50 ml THF zu. Man läßt den Reaktionsansatz unter ständigem leichtem Erwärmen über Nacht rühren, kühlt ab, filtriert und fällt mit Äther. Zur Entfernung des überschüssigen Z-Asp-Anhydrid bzw. Z-Asp rührt man das Produkt mehrmals mit 200 ml Essigester bei 60 °C. Nach Abfiltrieren versetzt man den Niederschlag zweimal mit je 100 ml 5-prozentiger Zitronensäure, um nicht umgesetztes Cystindiamid zu entfernen, danach wird mit Wasser neutral gewaschen und getrocknet. Zur weiteren Reinigung kristallisiert man aus Methanol um.

Ausbeute: 5,0 g (68%). Schmelzpunkt: 199 °C. $[\alpha]_D^{24} = -95,9$; (*c* = 1; DMF). DC: I, II, III einheitlich.

C₃₀H₃₆N₆O₁₂S₂ (736,8)

	C	H	N
ber.	48,90	4,89	11,41;
gef.	48,68	4,65	11,42.

Z-Asp-Cys-NH₂

Reduktion des Disulfids

1 g Disulfid wird in 5 ml DMF gelöst und mit 10 ml Mercaptoäthanol versetzt. Man rührt das Reaktionsgemisch 3 Stunden bei 35 °C und über Nacht bei Raumtemperatur. Die reduzierte Verbindung wird mit Äther ausgefällt und zweimal aus Methanol/Äther umkristallisiert. Wegen der schlechten Löslichkeit des Disulfids in Mercaptoäthanol ist die Reduktion ohne Zusatz von DMF nicht zufriedenstellend.

Ausbeute: 700 mg (70%). Schmelzpunkt 161 – 162 °C DC: I, II, III einheitlich, aber vom Disulfid chromatographisch nicht zu unterscheiden. C₁₅H₁₉N₃O₆S (369,4).

SH-Gehalt nach zweimaliger Reduktion: 90%.

(Z-Gly-Cys-NH₂)₂

12 g Cys-diamid × 2 HBr (30 mmol), 18,6 g Z-Gly³⁷ (80 mmol) werden in 150 ml DMF gelöst, auf –10 °C abgekühlt und nacheinander mit 9,2 g HOBT (66 mmol), 8,4 ml TAA (60 mmol) und 12,1 g DCCI (66 mmol) in 30 ml DMF versetzt. Man läßt das Reaktionsgemisch über Nacht auf Raumtemperatur kommen, saugt den ausgefallenen DC-Harnstoff ab und gießt die DMF-Lösung in Eiswasser. Die wäßrige Phase wird mit viel Essigester ausgeschüttelt. Man wäscht die Essigester-Phase nacheinander mit 5-prozentiger NaHCO₃-Lösung 5-prozentiger Zitronensäure und mit Wasser säurefrei. Die Reinigungsschritte müssen schnell erfolgen, da das Produkt sehr schlecht in Essigester löslich ist

und zunehmend ausfällt. Das aus dem Essigester ausgefallene Produkt wird, nachdem es vollständig getrocknet ist, zur weiteren Reinigung mit Essigester ausgekocht.

Ausbeute: 12,3 g (65%). Schmelzpunkt: 165 °C. $[\alpha]_D^{24} = -93,9$ ($c = 1$; DMF). DC: I, II, III, IV einheitlich.

$C_{26}H_{32}O_8N_6S_2$ (620,68)

	C	H	N
ber.	50,31	5,16	13,54;
gef.	50,51	5,02	13,54.

(Gly-Cys-NH₂)₂ × 2 HBr

Zu einer Suspension von 12,5 g (Z-Gly-Cys-NH₂)₂ (20 mmol) in 80 ml Eisessig gibt man 40 ml 4 N HBr/Eisessig; es tritt sofort Lösung ein. Nach 5–10 min Rühren bei Raumtemperatur beginnt das Reaktionsprodukt auszufallen. Der Niederschlag wird nach 60 min abgesaugt und mit viel Äther gewaschen. Zur Reinigung kristallisiert man aus Methanol/Äther um.

Ausbeute: 9,4 g (90%). Schmelzpunkt: 221 °C unter Zersetzung. DC: I, II, IV einheitlich.

$C_{10}H_{20}O_4N_6S_2 \times 2 \text{ HBr}$ (514,3)

Die Substanz ist sehr hygroskopisch.

(Z-Asp-(β-OBu^t)-Gly-Cys-NH₂)₂

8,1 g Z-Asp(β-OBu^t)³⁸ (25 mmol) und 5,2 g (Gly-Cys-NH₂)₂ × 2 HBr (10 mmol) werden in 100 ml DMF gelöst, auf –20 °C gekühlt und nacheinander mit 3,0 g HOBt (22 mmol), 2,8 ml TAA und 4,5 g DCCI (22 mmol) versetzt. Nach sechsstündigem Rühren, bei langsamer Erwärmung auf Raumtemperatur, wird der ausgefallene DC-Harnstoff abfiltriert und der Ansatz wie üblich aufgearbeitet. Läßt man den Ansatz 8–10 Stunden rühren, so kommt es unter Braunfärbung zu erheblichen Nebenreaktionen. Die Essigester-Phase wird eingeeengt, das Reaktionsprodukt fällt dabei aus. Nach Absaugen wird mit Petroläther nachgefällt. Das Endprodukt wird in viel Essigester unter Zusatz von möglichst wenig Methanol gelöst und mit wenig Äther gefällt.

Ausbeute: 6,3 g (66%). Schmelzpunkt: 189–191 °C. $[\alpha]_D^{24} = -86,3$ ($c = 1$; DMF). DC: I, III, IV einheitlich.

$C_{42}H_{58}N_8O_{14}S_2$ (963,1)

	C	H	N
ber.	52,38	6,07	11,64;
	51,80	5,92	11,60.

(Z-Asp-Gly-Cys-NH₂)₂

1 g (Z-Asp-Gly-Cys-NH₂)₂ wird mit 10 ml TFA übergossen und bei Raumtemperatur gerührt. Nach 20 min wird das Reaktionsprodukt zur Trockne ein-

rotiert. Beim Überschreiten der Reaktionszeit tritt ein leichter Ninhydrin-positiver Schatten im Chromatogramm auf. Der trockne Rückstand wird mit Äther solange nachgewaschen, bis kein TFA-Geruch mehr feststellbar ist. Zur weiteren Reinigung wird aus Methanol/Äther umkristallisiert.

Ausbeute: 600 mg (70%). Schmelzpunkt: 196–199 °C. $[\alpha]_D^{24} = -98,0$ ($c = 1$; DMF). DC:

I, II, III einheitlich.

$C_{34}H_{42}N_8O_{14}S_2$ (850,9)

	C	H	N
ber.	47,98	4,98	13,17;
gef.	47,83	4,92	12,98.

Z-Asp-Gly-Cys-NH₂

Reduktion des Disulfids

1 g des Disulfids wird mit 10 ml Mercaptoäthanol versetzt. Nach zwei-stündigem Rühren bei 50 °C ist alles gelöst, zur Vervollständigung der Reaktion läßt man den Ansatz über Nacht bei Raumtemperatur rühren. Das Reaktionsprodukt fällt man mit Äther aus und wäscht solange bis kein Mercaptoäthanol-Geruch mehr feststellbar ist. Anschließend kristallisiert man aus Methanol/Äther um.

Ausbeute: fast quantitativ. Schmelzpunkt: 165–167 °C. DC: I, IV einheitlich, in III auch nach mehrfachem Umkristallisieren leichter Schatten (vermutlich Disulfid).

$C_{17}H_{22}N_4O_7S$ (426,).
SH-Gehalt: 92%.

(Z-Glu(γ-OBu^t)-Gly-Cys-NH₂)₂

Der Ansatz wird analog der Asparaginsäureverbindung durchgeführt. Statt Z-Asp(β-OBu^t) werden äquimolaren Mengen (8,4 g) des entsprechenden Glutaminsäureesters³⁹ eingesetzt.

Ausbeute: 8,2 g (63%). Schmelzpunkt: 189–190 °C. DC: I, IV einheitlich, II, III zwei Banden.

$C_{44}H_{62}N_8O_{14}S_2$ (991,2)

	C	H	N
ber.	53,32	6,31	11,31;
gef.	52,79	6,18	11,46.

(Z-Glu-Gly-Cys-NH₂)₂

Die Spaltung des *tert*-Butylesters erfolgte analog zur Asparaginsäure-Verbindung mit TFA. Die Reaktion verlief mit gleicher Ausbeute.

$[\alpha]_D^{24} = -91,7$ ($c = 1$; DMF). Schmelzpunkt: 181–185 °C. DC: I, II, III einheitlich.

$C_{36}H_{46}N_8O_{14}S_2$ (878,9)

	C	H	N
ber.	49,19	5,28	12,75;
	48,53	4,93	12,37.

Z-Glu-Gly-Cys-NH₂

Die Reduktion des Disulfids erfolgte analog zur Reduktion des Asparaginsäure-haltigen Dipeptids. Der Ansatz muß allerdings eine Stunde unter Rückfluß gekocht werden, um vollständige Reduktion zu erhalten.

DC: I, II, III einheitlich bis auf leichten Disulfid-schatten. Schmelzpunkt: 174–176 °C.

$C_{18}H_{24}N_4O_7S$ (440,5)

SH-Gehalt nach mehrfacher Reduktion: 94%.

$(\text{Glu-Gly-Cys-NH}_2)_2 \times 2 \text{ HBr}$

5 g (Z-Glu(γ -OBu^t)-Gly-Cys-NH₂)₂ (5 mmol) werden in 30 ml Essigsäure suspensiert, mit 20 ml 4 N HBr/Eisessig versetzt und eine Stunde bei Raumtemperatur gerührt. Anschließend engt man zur Trockne ein, nimmt den Rückstand in Äther auf und rührt 30 min. Nach Absaugen kristallisiert man aus Methanol/Äther um.

Ausbeute: 3,3 g (83%). Schmelzpunkt: 191 °C Aufschäumen; 197 °C Schmelzen unter Zersetzung.

DC: I, II, III, IV einheitlich.

$C_{20}H_{36}N_8O_{10}S_2Br_2$ (772,5)

$(\text{Asp-Gly-Cys-NH}_2)_2 \times 2 \text{ HBr}$

5 g (Z-Asp(β -OBu^t)-Gly-Cys-NH₂)₂ werden in 30 ml Essigsäure mit 20 ml 4 N HBr/Eisessig versetzt und 90 min bei Raumtemperatur gerührt. Der Reaktionsansatz wird bei niedriger Temperatur zur Trockne eingedampft, der feste Rückstand in Methanol gelöst und mit Äther gefällt. Man kristallisiert das Reaktionsprodukt mehrere Male aus Methanol/Äther um.

Ausbeute: 3,5 g (90%). Schmelzpunkt: 219 °C.

DC: I, II, III, IV einheitlich. $[\alpha]_D^{24} = -100,7$ ($c = 1$; DMF).

$C_{18}H_{32}N_8O_{10}S_2Br_2$ (744,5)

	C	H
ber.	29,04	4,33;
gef.	28,96	4,36.

Z-His-Ala-OCH₃

1) Vorbereitung der Carboxylkomponente

33 g Z-His-Hydrazid⁴⁰ (110 mmol) werden in 150 ml 2 N HCl gelöst und auf –5 °C abgekühlt. Zu dieser Lösung tropft man 7,7 g NaNO₂ in 50 ml Wasser. Fünf min nach Zugabe wird die Reaktions-

lösung mit 300 ml kaltem Essigester überschichtet. Man setzt auf einmal 200 ml 50-prozentige K₂CO₃-Lösung zu. Nach Abtrennen der Essigester-Phase extrahiert man das Azid noch zweimal mit je 200 ml Essigester und trocknet die vereinigten Essigesterphasen kurz im Eisbad über Natriumsulfat.

2) Vorbereitung der Aminkomponente

14 g Ala-OCH₃ × HCl⁴¹ (0,1 mol) werden in 150 ml DMF gelöst, mit 14 ml TAA neutralisiert und auf 0 °C gekühlt.

Kupplung

1) wird in 2) filtriert, nach einigen Stunden der Essigester bei Raumtemperatur i. Vak. eingedampft und weitere 50 ml DMF zugesetzt. Nach 48 h Rühren filtriert man den weißen Niederschlag ab, engt das Filtrat ein und versetzt mit 2 l Äther. Nach einigen Stunden im Eisbad setzt Kristallisation ein. Zur weiteren Reinigung wird noch zweimal aus wenig abs. Äthanol umkristallisiert.

Ausbeute: 30 g (80%). Schmelzpunkt: 132 °C.

$[\alpha]_D^{24} = -16,2$ ($c = 1$; DMF). DC: I, II, III, IV einheitlich.

$C_{18}H_{22}O_5N_4$ (374,4)

	C	H	N
ber.	57,74	5,92	14,96;
gef.	56,83	5,93	14,84.

Z-His-Ala-Hydrazid

18,7 g Z-His-Ala-OCH₃ (0,05 mol) werden in möglichst wenig Methanol gelöst und nach Zugabe von 26 ml Hydrazinhydrat über Nacht bei Raumtemperatur gerührt. Der größte Teil des Produkts fällt während der Reaktion aus, der Rest wird mit Äther gefällt. Zur Reinigung kristallisiert man aus wenig Äthanol um.

Ausbeute: 16,6 g (89%). Schmelzpunkt: 178 °C.

$[\alpha]_D^{24} = -5,4$ ($c = 1$; DMF). DC: I, II, III einheitlich.

$C_{17}H_{22}N_6O_4$ (374,4)

	C	H	N
ber.	54,55	5,88	22,40;
gef.	54,73	6,05	22,33.

(Z-His-Ala-Asp-Gly-Cys-NH₂)₂

3,74 g Z-His-Ala-Hydrazid (10 mmol) werden in 10 ml 4 N HCl/Dioxan und 40 ml DMF gelöst und auf –40 °C abgekühlt. Man setzt 1,62 ml *iso*-Amylnitrit (12 mmol) zu und rührt 30 min bei –40 °C.

Danach wird der Reaktionsansatz mit 5,6 ml TAA (40 mmol) in 10 ml DMF neutralisiert und sofort mit einer vorgekühlten Lösung von 2,23 g (Asp-Gly-Cys-NH₂)₂ (3,3 mmol) in 30 ml DMF und 1,84 ml TAA versetzt. Man läßt den Reaktionsansatz zwei Stunden bei -40 °C, je 12 h bei -20 °C und 0 °C und einen Tag bei Raumtemperatur rühren. Durch gelegentliche tropfenweise Zugabe von TAA wird der pH zwischen 7,5 und 8,0 gehalten. Nach 24 Stunden ist im Chromatogramm keine Aminkomponente mehr nachweisbar. Zur Aufarbeitung kühlt man auf -30 °C ab, um die Ausfällung des Salzes zu vervollständigen. Nach Abtrennung vom ausgefallenen Salz wird das Reaktionsprodukt mit viel Essigester aus der Lösung gefällt. Die im Chromatogramm zahlreichen histidinhaltigen Nebenprodukte bleiben neben weiteren Reaktionsprodukten in Lösung. Zur Vervollständigung der Ausbeute fällt man nach Einengen mit Äther, löst die Ätherfällung in wenig DMF und setzt nochmals Essigester zu. Die vereinigten Essigester-Fällungen werden mit Methanol ausgekocht; wegen der schlechten Löslichkeit in organischen Lösungsmitteln konnte das Produkt auf diesem Wege nicht weiter gereinigt werden. Wegen der Löslichkeitsschwierigkeiten wurde das Pentapeptid-Disulfid in das Hydrochlorid umgewandelt. Das mehrfach durch Auskochen mit verschiedenen organischen Lösungsmitteln gereinigte Produkt wird mit 4 N HCl/Dioxan übergossen, 10 min bei Raumtemperatur gerührt und am Rotationsverdampfer eingengt. Das entstandene Hydrochlorid war aus Methanol/Äther umkristallisierbar.

Ausbeute: 2 g (45%). Schmelzpunkt: 157 °C Zersetzung, $[\alpha]_D^{24} = -73,5$ ($c = 1$; DMF). DC: I, II, III, IV bis auf leichten Pauly-positiven Schatten einheitlich.

$C_{52}H_{66}N_{16}O_{18}S \times 2 HCl$ (1340,3)

	C	H	N
ber.	46,60	5,11	16,72;
gef.	46,91	5,08	16,06.

Aminosäureanalyse:

	His	Ala	Asp	Gly	Cys
ber.	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00;
gef.	1,09	1,01	0,96	1,00	1,00.

Z-His-Ala-Asp-Gly-Cys-NH₂

Reduktion des Disulfids

1 g Disulfid wird in 5 ml DMF unter Erhitzen gelöst, danach setzt man 10 ml Mercaptoäthanol zu und rührt 24 Stunden bei 40 °C, es bildet sich im Verlauf der Reaktion eine Gallerte. Zur Vervollständigung der Reduktion setzt man nochmals Mercaptoäthanol zu und erhitzt eine Stunde auf 80 °C. Beim

Abkühlen fällt das Reaktionsprodukt als Gallerte an. Nach Zusatz von Äther und längerem Stehen im Eisbad wird abgesaugt und mehrfach unter Zusatz von wenig Wasser aus Methanol umkristallisiert.

Ausbeute: 300 mg. Schmelzpunkt: 181 °C. DC: I, II, III einheitlich.

$C_{26}H_{34}N_8O_9S$ (634,7)

	C	H
ber.	49,21	5,40;
gef.	49,00	5,45.

(Z-His-Ala-Glu-Gly-Cys-NH₂)₂

Die Umsetzung erfolgte analog dem entsprechenden Asparaginsäure-Peptid. Die Reinigung erfolgte durch mehrfaches Auskochen mit verschiedenen organischen Lösungsmitteln. Selbst in heißem DMF ist das Reaktionsprodukt unlöslich. Die Umwandlung in das entsprechende Hydrochlorid brachte eine geringe Verbesserung der Löslichkeitseigenschaften.

$[\alpha]_D^{25} = -51,4$ ($c = 1$; DMF). Schmelzpunkt: 180 °C unter Zersetzung. DC: I, II, III leichter Pauly-positiver Schatten.

$C_{54}H_{72}N_{16}S_2O_{18}Cl_2$ (1367,4)

	C	H	N
ber.	47,50	5,27	16,38;
gef.	47,68	4,98	15,67.

Aminosäureanalyse:

	His	Ala	Glu	Gly	Cys
ber.	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00;
gef.	1,05	1,08	0,99	1,00	n.b.

(Z-Gly-Gly-Cys-NH₂)₂

5,2 g (Gly-Cys-NH₂)₂ \times 2 HBr (10 mmol) und 6,4 g Z-Gly (30 mmol) werden in 100 ml DMF gelöst, auf -20 °C abgekühlt und nacheinander mit 4,5 g HOBt (33 mmol), 2,8 ml TAA und 6,2 g DCCI (30 mmol) versetzt. Man läßt über Nacht bei Raumtemperatur rühren; der ausgefallene DC-Harnstoff wird abfiltriert und das Filtrat in 1 l Eiswasser gegossen. Nach 60 min im Eisbad scheidet sich eine feinkristalline Masse aus, die nach dem Trocknen zur weiteren Reinigung nacheinander mit Essigester und Methanol ausgekocht wird.

Ausbeute: 5,0 g (69%). Schmelzpunkt: 224 – 226 °C unter Zersetzung. $[\alpha]_D^{24} = -83,2$ ($c = 1$; DMF). DC: I, II, III, IV einheitlich.

$C_{30}H_{38}O_{10}N_8S_2$ (734,8)

	C	H	N
ber.	49,03	5,21	15,25;
gef.	48,77	5,02	15,21.

$(\text{Gly-Gly-Cys-NH}_2)_2 \times 2 \text{ HBr}$

7,4 g $(\text{Z-Gly-Gly-Cys-NH}_2)_2$ (10 mmol) werden in 40 ml Eisessig suspensiert; nach Zugabe von 20 ml 4 N HBr/Eisessig tritt sofort Lösung ein und fast gleichzeitig beginnt das Reaktionsprodukt auszufallen. Der Niederschlag wird nach 1 h Rühren bei Raumtemperatur abgesaugt, mit viel Äther gewaschen und aus Methanol/Äther umkristallisiert.

Ausbeute: 6,0 g (95%). Schmelzpunkt: 186–190 °C unter Zersetzung. DC: I, II, III, IV einheitlich.

 $\text{C}_{14}\text{H}_{28}\text{N}_8\text{O}_6\text{S}_2\text{Br}_2$ (628,4)

	C	H
ber.	26,75	4,49;
gef.	26,70	4,51.

 $(\text{Z-Ala-Gly-Gly-Cys-NH}_2)_2$

3,2 g $(\text{Gly-Gly-Cys-NH}_2)_2 \times 2 \text{ HBr}$ (5 mmol) und 5,2 g Z-Ala-ONp⁵² (15 mmol) werden in 100 ml DMF gelöst und auf 0 °C gekühlt; dann setzt man 1,4 ml TAA (10 mmol) zu und läßt 8 Stunden bei 0 °C rühren. Nach Stehen über Nacht bei Raumtemperatur läßt sich im Reaktionsgemisch chromatographisch keine freie NH_2 -Gruppe mehr nachweisen. Die DMF-Lösung wird in 300 ml kalten Äther getropft; nach kurzem Stehen setzt Kristallisation ein. Zur Reinigung wird zweimal aus DMF/Äther umkristallisiert und mehrfach mit Essigester ausgekocht.

Ausbeute: 3,9 g (88%). Schmelzpunkt: 178–180 °C. $[\alpha]_D^{24} = -71,4$ ($c = 1$; DMF). DC: II, III, IV einheitlich, I leichter Schatten am Start.

 $\text{C}_{36}\text{H}_{48}\text{O}_{12}\text{N}_{10}\text{S}_2$ (877,0)

	C	H	N
ber.	49,30	5,52	15,97;
gef.	49,00	5,45	15,72.

Aminosäureanalyse:

	Ala	Gly	Cys
ber.	1,00	2,00	1,00;
gef.	1,02	2,00	n.b.

 $(\text{Ala-Gly-Gly-Cys-NH}_2)_2 \times \text{HBr}$

8,8 g $(\text{Z-Ala-Gly-Gly-Cys-NH}_2)_2$ (10 mmol) werden in 100 ml 2 N HBr/Eisessig 1 h bei Raumtemperatur gerührt. Das Ausgangsprodukt löst sich sofort und nach ca. 10 min beginnt das Reaktionsprodukt auszufallen. Nach Absaugen und Nachwaschen mit Äther wird aus Methanol/Äther umkristallisiert. Ausbeute: 5,1 g (83%). Schmelzpunkt: 210 °C Aufschäumen, 222 °C Zersetzung. DC: II, III, IV

einheitlich, I leichter Chlor-Tolodin-positiver Schatten läuft vor.

 $\text{C}_{20}\text{H}_{38}\text{N}_{10}\text{O}_8\text{S}_2\text{Br}_2$ (771,8) $(\text{Z-His-Ala-Gly-Gly-Cys-NH}_2)_2$

Aus 12 g Z-His-Hydrazid (40 mmol) wird wie üblich das Azid hergestellt. Die das Azid enthaltende Essigester-Phase filtriert man zu einer Lösung von 6,14 g $(\text{Ala-Gly-Gly-Cys-NH}_2)_2$ (10 mmol) in 100 ml DMF und 2,8 ml TAA. Der Essigester wird i. Vak. bei Raumtemperatur abgezogen und die Reaktionslösung 48 h gerührt. Während dieser Zeit fällt der größte Teil des Reaktionsproduktes als weißer Niederschlag aus, der nach dem Absaugen zur Entfernung mitausgefallener Salze mehrfach mit Wasser gewaschen wird. Zur Reinigung wird wiederholt aus DMF/Äther und Methanol/Äther umkristallisiert. Die Reaktionslösung wird zur Vervollständigung der Ausbeute mit viel Äther versetzt, und der resultierende Niederschlag ebenfalls nach Behandlung mit Wasser mehrfach umkristallisiert.

Ausbeute: 3,7 g (32%). Schmelzpunkt: 207 °C. $[\alpha]_D^{24} = -49,5$ ($c = 1$; DMF). DC: I, IV einheitlich, II, III schwacher, ebenfalls Pauly-positiver Fleck.

 $\text{C}_{48}\text{H}_{62}\text{N}_{16}\text{O}_{14}\text{S}_2$ (1151,2)

	C	H	N
ber.	50,07	5,43	19,47;
gef.	49,43	5,34	18,67.

Aminosäureanalyse:

	His	Ala	Gly	Cys
ber.	1,00	1,00	2,00	1,00;
gef.	0,92	1,00	2,03	n.b.

Z-His-Ala-Gly-Gly-Cys-NH₂

Reduktion des Disulfids

1 g Disulfid wird mit 10 ml Mercaptoäthanol über Nacht reduziert. Nach vollständigem Lösen bildet sich eine Gallerte. Man gießt in Äther und rührt einige Zeit bei Raumtemperatur, es bildet sich ein feiner kristalliner Niederschlag. Nach Absaugen wird mehrfach aus Methanol/Äther umkristallisiert.

Ausbeute: fast quantitativ. Schmelzpunkt: 163–165 °C. DC: I, II, IV einheitlich bis auf eine Spur Disulfid.

 $\text{C}_{24}\text{H}_{32}\text{N}_8\text{O}_7\text{S}$ (576,7)

	C	H	N
ber.	49,98	5,59	19,43;
gef.	49,04	5,40	18,85.

SH-Gehalt: 98%.

Z-Asp(β -OBzl)-Gly-OCH₃

7,0 g Gly-OCH₃ \times HCl³⁸ (50 mmol), 17,9 g Z-Asp(β -OBzl)⁴³ und 7,5 g HOBt werden in 200 ml DMF gelöst, in der Kälte mit 7,0 ml TAA und 11,3 g DCCI versetzt, über Nacht gerührt und nach Abfiltrieren des ausgefallenen DC-Harnstoffs in 1 l Eiswasser gegossen. Nach Ausschütteln mit Essigester reinigt man wie üblich, engt ein und fällt mit Petroläther. Es wird mehrfach aus Essigester/Petroläther umkristallisiert.

Ausbeute: 17,1 g (79%). Schmelzpunkt: 118 °C. $[\alpha]_D^{24} = -15,3$ ($c = 1$; DMF). DC: I, III, IV einheitlich.

C₂₂H₂₄N₂O₇ (428,5)

	C	H	N
ber.	61,66	5,65	6,54;
gef.	61,53	5,40	6,69.

Asp-Gly-OCH₃ \times CH₃COOH

4,4 g Z-Peptidester werden in 200 ml Methanol gelöst und nach Katalysatorzugabe hydriert. Um Nebenreaktionen zu verhindern, wird dem Ansatz eine äquimolare Menge Essigsäure zugesetzt. Nach beendeter Wasserstoffaufnahme filtriert man vom Katalysator ab und engt die Lösung ein. Das zurückbleibende Öl wird in Methanol gelöst und mit Äther gefällt.

Ausbeute: 2,3 g (83%). Schmelzpunkt: 134–136 °C. $[\alpha]_D^{24} = -20,35$ ($c = 1$; DMF). DC: I, II, III einheitlich.

C₉H₁₆O₇N₂ (264,0).

Z-His-Ala-Asp-Gly-OCH₃ \times HCl

3,74 g Z-His-Ala-Hydrazid (10 mmol) werden in 50 ml DMF gelöst und nach Zugabe von 10 ml 4 N HCl/Dioxan bei –40 °C mit 1,62 ml Isoamylnitrit (12 mmol) versetzt. Nach 30 min neutralisiert man langsam mit 5,6 ml TAA (40 mmol), dabei fällt ein weißer Niederschlag aus, wahrscheinlich

handelt es sich um Triäthylammoniumchlorid. Zu der so vorbereiteten Carboxylkomponente gibt man sofort nach der Neutralisation 2,64 g Asp-Gly-OCH₃ \times CH₃COOH (10 mmol), das man zuvor in 40 ml DMF löst und mit 2,8 ml TAA versetzt. Nach 2 h Rühren bei –30 °C rührt man je 12 h bei –20 °C und bei 0 °C und läßt anschließend langsam auf Raumtemperatur kommen. Nach Filtration wird das Reaktionsprodukt mit Äther gefällt. Das Rohprodukt wird mehrfach aus Methanol umkristallisiert. Da das Peptid in Methanol stark quillt, ist der Reinigungseffekt nicht groß, so daß zur Entfernung der Pauly-positiven Nebenprodukte mehrere Reinigungsschritte notwendig sind. Es erweist sich als günstig, das Hydrochlorid herzustellen, das ohne Gallerte-bildung gut in Methanol löslich ist.

Ausbeute: 2,9 g (50%). Schmelzpunkt: 160–161 °C. $[\alpha]_D^{24} = -22,2$ ($c = 1$; DMF). DC: I, II, IV einheitlich.

C₂₄H₃₀N₆O₉Cl (583,01)

	C	H	N
ber.	49,44	5,36	14,41;
gef.	49,24	5,29	13,84.

Aminosäureanalyse:

	His	Ala	Glu	Gly
ber.	1,00	1,00	1,00	1,00;
gef.	0,95	1,02	1,00	1,00.

Kinetische Messungen

Die Bestimmung der pK-Werte der Imidazol- und SH-Gruppen der Peptide und die kinetischen Messungen finden sich in l.c. 20 und 14. Die Geschwindigkeitskonstanten zweiter Ordnung errechnen sich nach $k_2 = k_1/\alpha \cdot c$, wobei k_1 die Geschwindigkeitskonstante erster Ordnung darstellt, c die Katalysatorkonzentration und α den Dissoziationsgrad der katalytisch aktiven Gruppe, die bei Kenntnis des pK-Wertes aus der Henderson-Hasselbach-Gleichung $\text{pH} - \text{pK} = \alpha/(1 - \alpha)$ errechnet wird.

¹ Cold Spring Harbor Symposium Vol. XXXVI, 1971. Structure and Function of Proteins, Cold Spring Harbor, New York.

² Biochemical Society Symposium No. 31 (ed. R. Smellie). Chemical Reactivity and Biological Role of Functional Groups in Enzymes, Academic Press, London 1970.

³ W. P. Jencks, Catalysis in Chemistry and Enzymology, McGraw-Hill Book Company, New York 1969.

⁴ T. C. Bruice and S. J. Benkovic, Bioorganic Mechanisms I and II, W. A. Benjamin, Inc., New York 1966.

⁵ G. E. Means u. R. E. Feeney, Chemical Modification of Proteins, Holden-Day, Inc., London, Amsterdam.

⁶ M. Eigen, Naturwissenschaften 50, 426 [1963].

⁷ M. Friedman, The Chemistry and Biochemistry of the Sulfhydryl Groups in Amino Acids, Peptides and Proteins, Pergamon Press, London 1972.

⁸ M. L. Bender, Mechanisms of Homogeneous Catalysis from Protons to Proteins, Wiley Interscience, Wiley & Sons, New York 1971.

⁹ Fr. Schneider, Hoppe Seyler's Z. Physiol. Chem. 348, 1034 [1967].

¹⁰ Fr. Schneider, E. Schaich u. H. Wenck, Hoppe Seyler's Z. Physiol. Chem. 349, 1525 [1968].

¹¹ Fr. Schneider u. H. Wenck, Hoppe Seyler's Z. Physiol. Chem. 350, 1653 [1969].

¹² V. Rossbach, Fr. Schneider u. H. Wenck, Z. Naturforsch. 26b, 1144 [1970].

¹³ R. v. Kleinsorge, H. G. Löffler u. Fr. Schneider, Chimia 29, 385 [1975].

¹⁴ D. Petz, Dissertation, Marburg 1975.

¹⁵ M. Fridkin u. H. J. Goren, Europ. J. Biochem. 41, 273 [1974].

- ¹⁶ V. Du Vigneaud, C. Kessler, J. M. Swann, C. W. Roberts, P. G. Katsoyannis u. S. Gordon, J. Amer. Chem. Soc. **75**, 4879 [1953].
- ¹⁷ E. Wünsch u. A. Zwick, Hoppe Seyler's Z. Physiol. Chem. **328**, 235 [1962].
- ¹⁸ K. König u. R. Geiger, Chem. Ber. **103**, 788 [1970].
- ¹⁹ J. Honzl u. J. Rudinger, Coll. Czech. Chem. Commun. **26**, 2333 [1961].
- ²⁰ D. Petz u. Fr. Schneider, FEBS Lett. **67**, 32 [1976].
- ²¹ Fr. Schneider, Hoppe Seyler's Z. Physiol. Chem. **338**, 131 [1964].
- ²² J. C. Sheehan, G. B. Bennett u. J. A. Schneider, J. Amer. Chem. Soc. **88**, 3455 [1966].
- ²³ J. C. Sheehan u. D. N. McGregor, J. Amer. Chem. Soc. **84**, 3000 [1960].
- ²⁴ A. Kapoor, N. Azeza, N. H. Somaiya u. M. A. Trimboli, J. Pharm. Science **60**, 956 [1971].
- ²⁵ P. Cruickshank u. J. C. Sheehan, J. Amer. Chem. Soc. **86**, 2070 [1964].
- ²⁶ G. Losse u. H. Weddige, Liebigs Ann. Chem. **678**, 148 [1964].
- ²⁷ I. Photaki u. V. Bardakos, Chem. Comm. **1967**, 275.
- ²⁸ I. Photaki, V. Bardakos, A. W. Lake u. G. Lowe, J. Chem. Soc. **1968**, 1860.
- ²⁹ K. Nakajima u. K. Okawa, Bull. Chem. Soc. Japan **46**, 1811 [1973].
- ³⁰ J. W. Olgilvie, J. T. Tildon u. B. S. Strauch, Biochemistry **3**, 754 [1964].
- ³¹ I. Photaki u. M. Sakarellou-Daitsiotou, J. Chem. Soc. **1976**, 589.
- ³² H. Pauly, Hoppe Seyler's Z. Physiol. Chem. **42**, 517 [1904].
- ³³ G. L. Ellman, Arch. Biochem. Biophys. **82**, 70 [1959].
- ³⁴ F. Reindel u. W. Hoppe, Chem. Ber. **87**, 1103 [1954].
- ³⁵ Y. Hirotsu, T. Shiba u. T. Kaneko, Bul. Chem. Soc. Jap. **432**, 1564 [1970].
- ³⁶ W. J. Le Quesne u. G. T. Young, J. Chem. Soc. **1950**, 1954.
- ³⁷ M. Bergmann u. L. Zervas, Chem. Ber. **65**, 1192 [1932].
- ³⁸ E. Wünsch u. A. Zwick, Hoppe Seyler's Z. Physiol. Chem. **333**, 108 [1963].
- ³⁹ E. Klieger u. H. Gibian, Liebigs Ann. Chem. **640**, 145 [1961].
- ⁴⁰ R. W. Holley u. E. Sondheimer, J. Amer. Chem. Soc. **76**, 1326 [1954].
- ⁴¹ H. Zahn u. H. Schüssler, Liebigs Ann. Chem. **641**, 176 [1961].
- ⁴² M. Goodman u. K. C. Stueben, J. Amer. Chem. Soc. **81**, 3980 [1959].
- ⁴³ J. Wiley u. Sons, Biochem. Prep. **2**, 75 [1952].