

Cyclische Peptide

Bei der zunehmenden Anzahl biologisch wirksamer Stoffe, die sich als cyclische Peptide herausstellen, kommt den präparativen Möglichkeiten zur Gewinnung solcher Verbindungen ein gewisses Interesse zu. Die dabei einzuschlagenden Wege sind im Prinzip Anwendungen bekannter Methoden zur Verknüpfung, die hier zwischen der Amino-Gruppe und der Carboxyl-Gruppe derselben Molekel einzutreten hat. Daraus ergibt sich die Notwendigkeit, in Verdünnung zu arbeiten.

Zu kristallisierten, Ninhydrin-negativen Produkten führt z. B. die Behandlung von Glycyl-DL-alanyl-DL-phenylalanin-methylester in Methanol mit Ammoniak oder Piperidin¹⁰³), ferner die Umsetzung von Triglycin-azid-hydrochlorid in verdünnter, wäßriger Lösung mit Hydrogencarbonat¹⁰⁴), durch das die Amino-Gruppe zur intramolekularen Reaktion mit dem Säureazid-Rest freigesetzt wurde. In diesem Falle stellte sich das ursprünglich als Cyclo-tripeptid aufgefaßte Produkt als das cyclische Hexaglycyl heraus^{90, 105, 106}), nachdem diese Verbindung analog aus Hexaglycylazid in authentischer Weise erhalten worden war. Das cyclische Hexaglycyl entsteht neben anderen, wie schon oben erwähnt, auch aus dem inneren Carbaminsäureanhydrid des Glycins⁹⁰).

Ein kristallisiertes Cyclopentapeptid wurde nach dem im hiesigen Arbeitskreis aufgefundenen Prinzip der reaktionsfähigen Aminoacylmercaptan-Gruppierung durch intra-

¹⁰³) H. Brockmann, H. Tummes u. F. A. v. Metzsch, Naturwissenschaften 41, 37 [1954].

¹⁰⁴) J. C. Sheehan u. W. L. Richardson, J. Amer. chem. Soc. 76, 6329 [1954].

¹⁰⁵) J. C. Sheehan, M. Goodman u. W. L. Richardson, ebenda 77, 6391 [1955].

¹⁰⁶) C. H. Bamford u. F. J. Weymouth, J. Amer. chem. Soc. 77, 6368 [1955].

molekulare Peptid-Synthese aus Glycyl-L-leucyl-glycyl-L-leucyl-glycyl-p-nitrothiophenol erhalten⁵⁴). Ähnlich gelang die Darstellung von Cyclotetraglycyl und Cyclohexaglycyl aus den S-Peptidyl-Derivaten der Thioglykolsäure¹⁰⁷) und aus den aktiven Cyanmethylestern des Tetraglycins und, unter Dimerisierung, des Triglycins. Zur Cyclisierung eines Dekapeptids wurde bei der bemerkenswerten Synthese des cyclischen Gramicidin S durch R. Schwyzer von der Aktivierung des Carboxyls des offenen Polypeptids durch Veresterung mit p-Nitrophenol Gebrauch gemacht⁶⁹).

Nach eigenen Befunden¹) eignet sich auch Dicyclohexylcarbodiimid in methanolisch-wäßriger Lösung sehr gut für Peptid-Cyclisierungen. So konnten aus 500 mg Glycyl-valyl-glycyl-glycyl-valyl-glycin gelöst in 0,5 l 80proz. Methanol nach mehrtägigem Aufbewahren bei Zimmertemperatur 45% des kristallisierten cyclischen Hexapeptids gewonnen werden.

Mit den hier betrachteten zahlreichen präparativen Methoden hat die Peptid-Chemie heute einen Stand erreicht, der es ermöglicht, Polypeptide auch komplizierteren Baues unter Erhaltung der optischen Aktivität ihrer Bausteine zu synthetisieren. Die plangerechte Knüpfung anderer Bindungen als des grundlegenden NH-CO-Strukturelements, z.B. von Disulfid- oder Phosphodiester-Brücken, die Darstellung großer wasserlöslicher abwechslungsreicher Polypeptide und die künstliche Faltung solcher Ketten zur eigenartigen Protein-Struktur mit ihrer biologischen Wirkung sind nun die nächsten Aufgaben, deren Bewältigung allerdings noch in fernerer Zukunft liegen dürfte.

Eingegangen am 29. April 1957 [A 813]

¹⁰⁷) R. Schwyzer, B. Iselin, W. Rittel u. P. Sieber, Helv. chim. Acta 39, 872 [1956].

Lactonacetale, eine neue Klasse von Carbonsäure-Derivaten

Zur Theorie des isosbestischen Punktes in ihrer Bedeutung für die Erkennung von Reaktionszwischenprodukten

Von Prof. Dr. RICHARD KUHN und Dipl.-Chem. D. WEISER

Max-Planck-Institut für Medizinische Forschung, Institut für Chemie, Heidelberg

Bei der UV-spektroskopischen Verfolgung der Hydrolyse von 3-Phenyl-cumarinimid (A_I) in $\text{CH}_3\text{OH}/\text{H}_2\text{O}/\text{HCl}$ -Gemischen zeigte sich, daß nicht sofort 3-Phenyl-cumarin (C_{III}) gebildet wird. Beim isosbestischen Punkt des Systems $A_{II}-C_{III}$ sinkt nämlich die Extinktion vorübergehend stark ab. Das dafür verantwortliche Reaktionszwischenprodukt ist ein Lactonacetal, das präparativ isoliert werden konnte (Fp 68–69°C). Der weitere hydrolytische Zerfall dieses Dimethylacetals (B_{II}) zum 3-Phenyl-cumarin erfolgt wiederum in 2 Stufen, wie Messungen am isosbestischen Punkt des Systems $B_{II}-C_{III}$ erkennen ließen. Hier tritt das Halbacetal C_I als Reaktionszwischenprodukt in Erscheinung. — Alle Umsetzungen gehorchen der Reaktionsgeschwindigkeits-Gleichung 1. Ordnung.

Verbindungen, in denen die Carbonyl-Gruppe eines Lactons in $>\text{C}(\text{OR})_2$ verwandelt ist, scheinen noch nicht beschrieben worden zu sein. Acetalisierungsmittel wie Orthokohlensäureester, Orthoameisensäureester, Orthokieselsäureester, Dimethylsulfit u. a., mit deren Hilfe sich Aldehyde und Ketone in die entsprechenden Acetale verwandeln lassen, wirken, wie wir gefunden haben, auf Lactone nicht ein. Es ist jedoch kein Grund ersichtlich, warum Lactonacetale nicht existenzfähig sein sollten. Denn sie erscheinen als Orthocarbonsäureester, deren Besonderheit nur darin liegt, daß die eine von den drei Hydroxyl-Gruppen, die schematisch mit dem Carbonsäure-Hydrat $-\text{C}(\text{OH})_3$ unter Wasseraustritt reagieren, der Molekel der Carbonsäure selbst angehört.

Es ist nicht unsere Zielsetzung gewesen, die anscheinend bestehende kleine Lücke in der Systematik der Kohlenstoff-

Verbindungen zu schließen. Wir waren vielmehr daran interessiert, die Eigenschaften und Reaktionen von Iminolactonen zu studieren, da deren Bildung bei der von R. Kuhn und W. Kirschenlohr¹) aufgefundenen Aminosucker-Synthese in manchen Fällen eine unerwünschte Rolle spielt. Während die meisten Aminonitrile der Zuckerreihe als solche existieren, d.h. die der Gruppierung $-\text{CH}\cdot\text{NH}_2-\text{CN}$ entsprechende IR-Bande bei ca. $4,5\ \mu$ zeigen und sich zu den Aminosuckern katalytisch hydrieren lassen, fehlt mitunter die genannte IR-Bande, und dann versagt auch die Hydrierungsmethode²). Es ist recht wahrscheinlich geworden, daß die Ursache in der spontan erfolgenden Cyclisierung gewisser Hydroxynitrile zu Iminolactonen besteht.

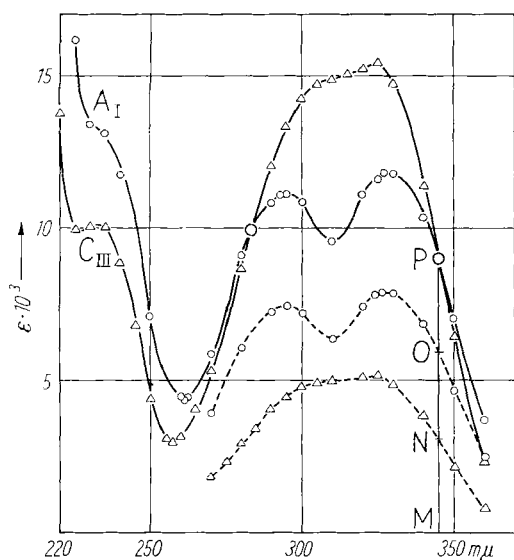
¹) R. Kuhn u. W. Kirschenlohr, diese Ztschr. 67, 786 [1955].

²) R. Kuhn u. W. Kirschenlohr, Liebigs Ann. Chem. 600, 126 [1956]; R. Kuhn u. D. Weiser, ebenda 602, 208 [1957].

Die isosbestischen Punkte

Zur Klärung der Verhältnisse haben wir Modellversuche am 3-Phenyl-cumarinimid (A_I) angestellt³⁾, weil man bei diesem auch an Hand der UV-Absorption das Reaktionsgeschehen verfolgen kann, was bei den UV-durchlässigen Zuckerderivaten nicht der Fall ist. Es war zu erwarten, daß die Hydrolyse des Iminolactons A_I zum 3-Phenyl-cumarin (C_{III}) sich in mehreren Stufen abspielt. Das Ergebnis umfangreicher Meßreihen über die Kinetik der Hydrolyse von A_I , wobei wir die H^+ -Konzentration, die Temperatur und die Natur der Lösungsmittel variiert haben, läßt sich kurz wie folgt zusammenfassen:

In Bild 1 sind die UV-Spektren des Iminolactons A_I und des Lactons C_{III} dargestellt. Man erkennt, daß sich die Kurven bei 283 $m\mu$ ($\epsilon = 9900$) und 345 $m\mu$ ($\epsilon = 9000$) schneiden. An diesen Schnittpunkten, den sog. isosbestischen Punkten⁴⁾, muß aus rein geometrischen Gründen



A 808.1

Bild 1

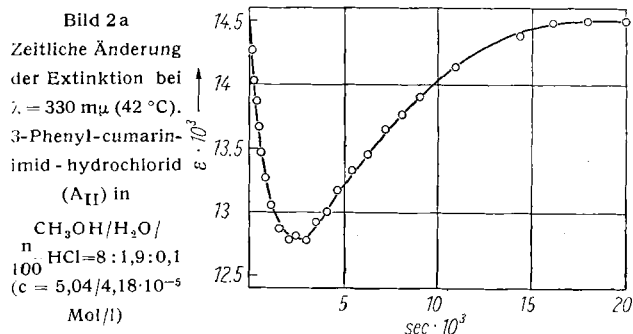
UV-Spektren in Methanol bei 23 °C. o—o—o 3-Phenyl-cumarinimid (A_I); o---o $\frac{2}{3}$ der Ordinaten von Kurve A_I ; Δ—Δ—Δ 3-Phenyl-cumarin (C_{III}); Δ---Δ $\frac{1}{3}$ der Ordinaten von Kurve C_{III}

die Extinktion unverändert bleiben, wenn A_I ohne die Bildung von längerlebigen Zwischenprodukten in C_{III} übergeht. Denn wenn z. B. $\frac{1}{3}$ von A_I in C_{III} übergegangen ist (Abfall P → O), so bleibt doch bei 345 $m\mu$ die Absorption unverändert, weil sich die Strecken \overline{MO} ($\epsilon = 6000$) ($\frac{2}{3}$ noch vorhandenes A_I) und \overline{MN} ($\epsilon = 3000$) ($\frac{1}{3}$ neu gebildetes C_{III}) wieder zu \overline{MP} ($\epsilon = 9000$) ergänzen.

In saurer Lösung verändert sich wegen der eintretenden Salzbildung das Spektrum des Iminolactons A_I . Die sofort einsetzende Reaktion mit hydroxyl-haltigen Lösungsmitteln (s. u.) und die Unlöslichkeit des Hydrochlorids in anderen organischen Lösungsmitteln erlaubte uns nicht, ein Spektrum des Salzes aufzunehmen. Es gelang uns jedoch, aus den Konzentration/Zeit-Kurven der kinetischen Messungen in saurer, methanolischer Lösung den isosbestischen Punkt des Hydrochlorids A_{II} und des Cumarins C_{III} in Methanol/Wasser zu bestimmen ($\lambda = 330 m\mu$; $\epsilon = 14500$).

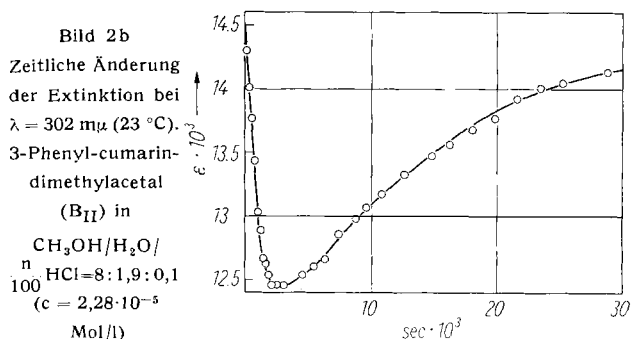
Es hat sich gezeigt, daß bei der Reaktion $A_I \rightarrow C_{III}$ die Extinktion im isosbestischen Punkt ($\lambda = 345 m\mu$; $\epsilon = 9000$) sich nicht verändert. Im sauren Gebiet oberhalb einer bestimmten HCl-Konzentration konnten wir ebenfalls keine

Änderung der Extinktion im isosbestischen Punkt ($\lambda = 330 m\mu$; $\epsilon = 14500$) während der Hydrolyse feststellen. In schwach saurer Lösung unterhalb einer bestimmten HCl-Konzentration sinkt die Extinktion im isosbestischen Punkt unter den in Bild 2a angegebenen Bedingungen auf $\epsilon = 12800$ ab, um dann langsam anzusteigen. Nach völligem Ablauf der Reaktion hat die Extinktion wieder den Anfangswert von $\epsilon = 14500$ erreicht.



A 808.2a

Ähnliches gilt für die Hydrolyse des Dimethylacetals B_{II} . Wie aus Bild 4 hervorgeht, besitzen das Dimethylacetal B_{II} und das Cumarin C_{III} einen isosbestischen Punkt P bei $\lambda = 302 m\mu$ ($\epsilon = 14500$). Unter den bei Bild 2b angegebenen Bedingungen ändert sich die Extinktion im isosbestischen Punkt zeitlich, um nach Durchlaufen eines Minimums wieder den Ausgangswert zu erreichen.



A 808.2b

Aus den Bildern 2a und 2b ist ersichtlich, daß bei beiden Umsetzungen ein Reaktionszwischenprodukt mit anderer Extinktion auftritt, das sich vorübergehend anhäuft und dann wieder verschwindet. Die maximale Menge des Zwischenproduktes findet man in beiden Fällen nach ca. $2,5 \cdot 10^3$ sec (unter den für Bild 2a bzw. 2b angegebenen Bedingungen; s. a. Bild 6).

Präparative Darstellung des Zwischenproduktes

Da das Zwischenprodukt im Bereich $\lambda = 325\text{--}335 m\mu$ schwächer absorbiert als A_I bzw. A_{II} und C_{III} , d. h. ein Extinktionsabfall beobachtet wurde, war die Schlußfolgerung naheliegend, daß auf dem Weg vom Iminolacton zum Lacton die Doppelbindung $>C=NH$ bzw. $>C=O$, die in Konjugation zum übrigen Doppelbindungs-System steht, vorübergehend aufgehoben wird. Das Zwischenprodukt läßt sich präparativ isolieren, wenn man 3-Phenyl-cumarinimid-hydrochlorid in abs. Methanol drei Tage stehen läßt. Es kristallisiert in Rhomben (Bild 3) vom Fp 68–69 °C und erweist sich als 3-Phenyl-cumarin-dimethylacetal (B_{II}). Mit abs. Äthanol erhält man das entsprechende Diäthylacetal ($Kp_{0,001} = 122$ °C). Das UV-Spektrum von B_{II} zeigt Bild 4. Die Bildung des Acetals entspricht dem von Pinner entdeckten Übergang von Iminoäthern in Orthocarbonsäureester.

³⁾ R. Kuhn u. D. Weiser, ebenda 600, 144 [1956].

⁴⁾ A. Thiel, Fortschr. Chem., Physik, physikal. Chem. 18, 38 [1924]. Dieser leitet den Ausdruck ab von: *ισος* gleich, *σπείρος* Auslöschung. Über die Bedeutung isosbestischer Punkte für die spektrometrische Untersuchung chemischer Zeitreaktionen und Gleichgewichte vgl. H. L. Schläfer u. O. Kling, diese Ztschr. 68, 667 [1956].

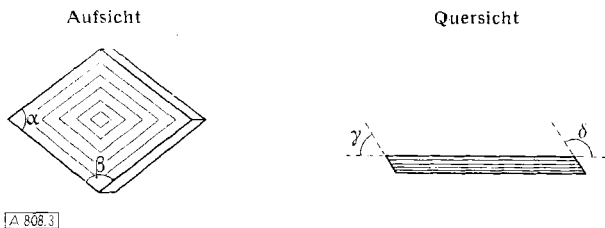


Bild 3
Kristalle des 3-Phenyl-cumarin-dimethylacetals (natürliche Größe). Glimmerartige Rhomben mit symmetrischer Auslöschung, ohne Pleochroismus. $\alpha = 76^\circ$, $\beta = 104^\circ$, $\gamma = 60^\circ$, $\delta = 120^\circ$

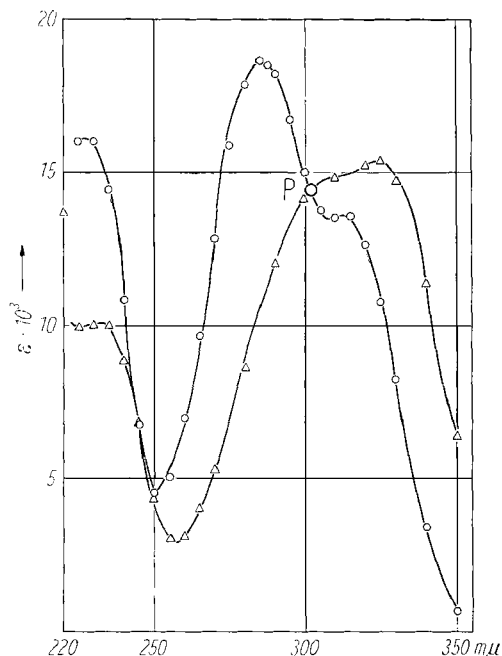


Bild 4
UV-Spektren in Methanol bei 23°C; o—o—o 3-Phenyl-cumarin-dimethylacetal (BII); Δ—Δ—Δ 3-Phenyl-cumarin (CIII)

Das UV-Spektrum von B_{II} ist dem des *trans*-Stilbens, mit dem es das Chromophor-System gemeinsam hat, auffallend ähnlich. Acetal B_{II}: Hauptmax. 285 mμ ($\epsilon = 18600$), Nebenmax. 313 mμ ($\epsilon = 13600$) in Methanol. — *trans*-Stilben⁵⁾: Hauptmax. 295 mμ ($\epsilon = 27000$), Nebenmax. 314 mμ ($\epsilon = 24000$) in Methanol. — *cis*-Stilben⁵⁾: Hauptmax. 280 mμ ($\epsilon = 10000$), Nebenmax. 260 mμ ($\epsilon = 7600$) in Methanol.

3-Phenyl-cumarin-dimethylacetal (B_{II}). 10 g Imidhydrochlorid A_{II} wurden in 30 cm³ mit Magnesium getrocknetem Methanol gelöst und drei Tage stehen gelassen (20°C, Feuchtigkeitsausschluß). Während dieser Zeit schied sich reichlich NH₄Cl ab. Von diesem wurde abfiltriert, einmal mit wenig Methanol nachgewaschen und die gelbliche Lösung durch Aufkochen mit etwas Aktivkohle aufgehellt. Nach Filtrieren kristallisierte das Acetal in prächtigen, meist bis zu 1 cm großen Rhomben. Ausbeute 8,2 g (79% d.Th.) nach 3maligem Umkristallisieren aus Methanol, Fp 68–69°C (Berl-Block).

C₁₇H₁₆O₃ (268,3) Ber. C 76,10 H 6,01 OCH₃ 23,11
Gef. 76,53 5,90 23,79
75,74 5,67 23,57

IR-Spektrum: Äther-Banden bei 9,05, 9,70 und 9,90 μ; keine Carbonyl-Bande; Phenyl-Banden bei 6,70 und 13,25 μ.

3-Phenyl-cumarin-diäthylacetal. Im Gegensatz zum Dimethylacetal konnte das auf die gleiche Weise mit Äthanol dargestellte Diäthyl-Derivat nicht kristallin erhalten werden. Es bildet ein klares viscoses Öl vom Kp 122°C/10⁻³ Torr; $n_D^{21,5} = 1,6070$; Ausbeute 55% d.Th.

C₁₉H₂₀O₃ (296,4) Ber. C 77,00 H 6,80 OC₂H₅ 30,37
Gef. 76,82 6,85 30,91

⁵⁾ A. Smakula u. A. Wassermann, Z. physik. Chem., Abt. A, 155, 353 [1931].

Reaktionsgeschwindigkeits-Konstanten

Kinetische Messungen

Die Reaktionen wurden spektrophotometrisch an einem Beckman-Spektralphotometer Modell DU verfolgt. Wir hatten uns davon überzeugt, daß bei Gegenwart von Wasser in jedem Fall 3-Phenyl-cumarin als Endprodukt entsteht. Zu diesem Zweck hatten wir kleinere Ansätze aufgearbeitet und durch Fp-Vergleich das entstandene 3-Phenyl-cumarin identifiziert. Das Lambert-Beersche Gesetz ist erfüllt: Eingewogene Gemische von Imid und Cumarin wurden schnell in Methanol/Wasser (4:1) gelöst und sofort spektrophotometrisch bei 325 mμ gemessen. Durch graphisches Auftragen (Ordinate $\epsilon \cdot 10^3$, Abszisse % Imid bzw. % Cumarin) erhielten wir eine Gerade. Die gemessene Extinktion ergab sich als Summe der Teilextinktionen von Imid und Cumarin.

Gemessen wurde meist bei 325 mμ, weil sich bei dieser Wellenlänge die Spektren von Anfangs- und Endprodukt am meisten unterscheiden (s. Bild 1). Sofern das Acetal als Zwischenprodukt auftrat — bzw. bei der Acetalhydrolyse — wurde bei 285 mμ gemessen (Bild 4). Die Reaktionen wurden in Quarzküvetten (Q 63, d = 10,0 mm) vorgenommen, die sich in einem Beckman-Küvettenhalter befanden. Dieser wurde mit Hilfe der handelsüblichen Beckman-Thermozellen, die an einem Umlaufthermostaten angeschlossen waren, auf der gewünschten Temperatur gehalten. Die jeweilige Reaktionslösung wurde in einem Thermostaten mit vorgewärmten Lösungsmittel, Meßkolben und Küvetten hergestellt. Unter gleichen Bedingungen wurden stets mindestens zwei Messungen mit jeweils verschiedenen Einwaagen vorgenommen. Methanol und Äthanol waren Merck-Präparate. Tetrahydrofuran wurde durch 1-stündiges Kochen mit KOH und anschließende Kolonnen-Destillation gereinigt. Als H₂O wurde Leitfähigkeitswasser benutzt.

Zur Auswertung der gemessenen Daten wurde die Konzentration des Ausgangsproduktes zum Zeitpunkt $t = 0$ der Differenz der molaren Extinktionen von Ausgangs- und Endprodukt gleichgesetzt. Die Differenz der konstanten Extinktion des Endproduktes und der gemessenen Extinktion zum Zeitpunkt t ergab die Konzentration an Ausgangsprodukt zum Zeitpunkt t . Durch Einsetzen in die integrierte Reaktionsgeschwindigkeits-Gleichung 1. Ordnung wurden Gerade erhalten. Die Reaktionsgeschwindigkeits-Konstante wurde durch graphische Auswertung der $\log c_t/t$ -Geraden bestimmt.

Ergebnisse

a) 3-Phenyl-cumarinimid-Hydrolyse: Die Umsetzung von Imid A_I zum Lacton C_{III} ist nach Tabelle 1 eine ionische Reaktion, die vom Lösungsgemisch abhängig ist. In der Reihe Tetrahydrofuran/Äthanol/Methanol/Wasser nimmt die Anzahl der Protonen und auch die Reaktionsgeschwindigkeit zu.

In Methanol/Wasser-Gemischen ist die Hydrolyse außerdem konzentrationsabhängig und wird zu einer Reaktion 2. Ordnung. Da im gleichen Volumen die gleiche Zahl von Protonen vorliegt, muß diese in Methanol/Wasser, um die Konzentrationsabhängigkeit zu bewirken, die gleiche

Lösungsgemisch	Temp. °C	c*)	k**) A _I → C _{III}
C ₄ H ₈ O/H ₂ O (4:1)	42	2,76 4,26	0,05
C ₂ H ₅ OH/H ₂ O (4:1)	52	2,82 4,66	0,46
CH ₃ OH/H ₂ O (4:1)	52	2,95 5,46	4,94 3,08
CH ₃ OH/H ₂ O (7:3)	52	3,02 5,09	6,60 4,71
CH ₃ OH/H ₂ O (3:2)	52	2,95 4,11	9,66 7,12
CH ₃ OH/H ₂ O (1:1)	52	2,45 3,50	16,55 11,72
CH ₃ OH/H ₂ O (4:1)	42	2,89 5,28	1,78 1,30
CH ₃ OH/H ₂ O (4:1)	32	2,34 4,04	1,00 0,74
CH ₃ OH/ ⁿ / ₁₀₀ NH ₃ (4:1)	42	3,74 5,50	0,78

*) Konzentration an Imid in 10⁻⁵ Mol/l.

**) Reaktionsgeschwindigkeits-Konstante der Reaktion 1. Ordnung in 10⁻⁶ sec⁻¹.

Tabelle 1

Reaktionsgeschwindigkeits-Konstanten der Hydrolyse des 3-Phenyl-cumarinimids in verschiedenen Lösungsmitteln ohne Säure-Zusatz

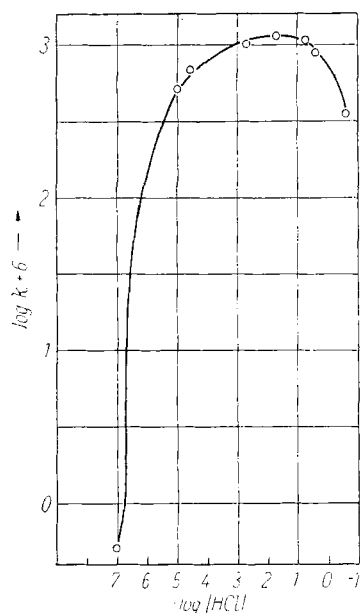
Größenordnung wie die Konzentration an Imid A_I besitzen. Bei größerer Einwaage verläuft daher die Verseifung langsamer; ein deutlicher Beweis für die H^+ -Abhängigkeit.

b) 3 - Phenyl - cumarinimid - hydrochlorid - Hydrolyse: Bei Zugabe von HCl tritt in Tetrahydrofuran-Wasser zunächst eine starke Reaktionsbeschleunigung ein. Wird die HCl-Konzentration weiter erhöht, so verlangsamt sich die Reaktion wieder. Trägt man die in Tabelle 2 angegebenen k -Werte als $\log k + 6$ gegen den negativen Logarithmus der HCl-Konzentration auf, so erhält man die in Bild 5 dargestellte Kurve.

Lösungsgemisch	$-\log[HCl]$	k $A_{II} \rightarrow C_{III}$
$C_4H_8O/H_2O/\frac{n}{100} HCl$		
(8:1,9:0,1)	5	51,5
(8:1,75:0,25)	4,6	69,0
C_4H_8O/HCl (4:1)		
$n/100$	2,7	102,7
$n/10$	1,7	115,0
$1n$	0,7	106,7
$2n$	0,4	88,5
$6n$	-0,08	35,4

Tabelle 2

Reaktionsgeschwindigkeits-Konstanten k ($10^{-5} \cdot \text{sec}^{-1}$) der Hydrolyse des 3-Phenyl-cumarinimid-hydrochlorids in Tetrahydrofuran (C_4H_8O)-Wasser-HCl-Gemischen bei $42^\circ C$



[A 808.5]

Benutzt man statt Tetrahydrofuran ein hydroxyl-haltiges organisches Lösungsmittel, so ändern sich die Reaktionsgeschwindigkeits-Konstanten. Innerhalb eines HCl-Bereiches tritt ein zeitlich begrenzt beständiges Zwischenprodukt in Erscheinung. In Tabelle 3 sind die Reaktionsgeschwindigkeits-Konstanten für die Reaktionen 1. Ordnung angegeben, wobei sich k_1 auf die Bildung des Zwi-

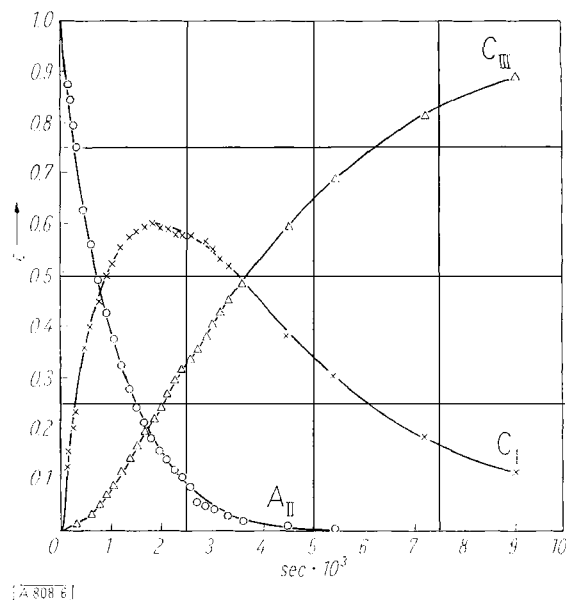
Lösungsgemisch	$-\log[HCl]$	k_1 $A_{II} \rightarrow C_I$	k_2 $C_I \rightarrow C_{III}$
$CH_3OH/H_2O/\frac{n}{100} HCl$			
(8:1,9:0,1)	5	122	19,1
(8:1,75:0,25)	4,6	94,4	28,4
(8:1,5:0,5)	4,3	52,4	40,0
$C_2H_5OH/H_2O/\frac{n}{100} HCl$			
(8:1,75:0,25)	4,6	253	12,2

Tabelle 3

Reaktionsgeschwindigkeits-Konstanten k_1 und k_2 ($10^{-5} \cdot \text{sec}^{-1}$) der Zweistufen-Hydrolyse des 3-Phenyl-cumarinimid-hydrochlorids in Methanol-Wasser-HCl-Gemischen bei $42^\circ C$

schenproduktes, k_2 auf dessen Verseifung bezieht. Bild 6 zeigt die Konzentration/Zeit-Kurven vom Ausgangs-, Zwischen- und Endprodukt in Methanol/Wasser/ $\frac{n}{100} HCl$ (8:1,75:0,25).

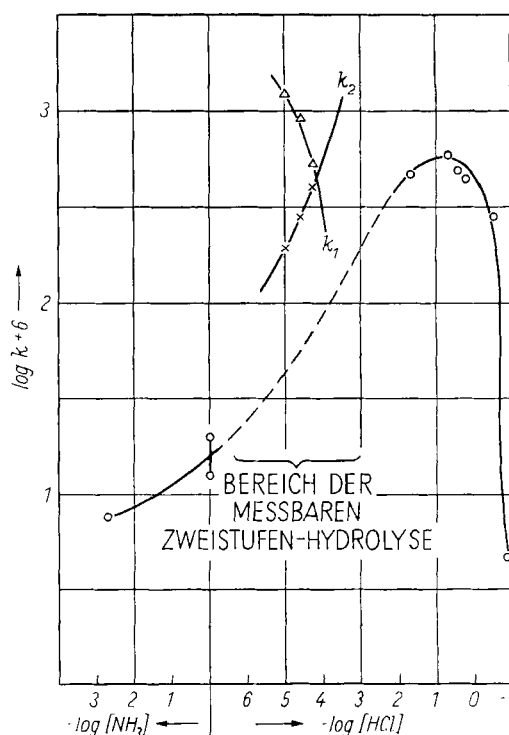
Man erkennt, daß das Zwischenprodukt nach $1,8 \cdot 10^3$ sec, d. h. nach 30 min seine maximale Konzentration erreicht.



[A 808.6]

Bild 6

Zweistufen - Hydrolyse des 3 - Phenyl - cumarinimid - hydrochlorids (A_{II}) in $CH_3OH/H_2O/\frac{n}{100} HCl$ (8:1,75:0,25) bei $42^\circ C$; $\lambda = 325 m\mu$, $c = 1$. o—o—o Zeitliche Abnahme des Imid-hydrochlorids A_{II} ; x—x—x Zeitliche Zu- und Abnahme des Zwischenproduktes C_I ; $\Delta-\Delta-\Delta$ Zeitliche Zunahme des 3-Phenyl-cumarin C_{III} . Reaktionsgeschwindigkeits-Konstanten: $k_1 = 94,4 \cdot 10^{-5} \text{ sec}^{-1}$, $k_2 = 28,4 \cdot 10^{-5} \text{ sec}^{-1}$



[A 808.7]

Bild 7

Reaktionsgeschwindigkeits-Konstanten ($\log k + 6$) der Hydrolyse des 3-Phenyl-cumarinimid-hydrochlorids A_{II} in $CH_3OH/H_2O/HCl$ -Gemischen bei $42^\circ C$ als Funktion des negativen Logarithmus der HCl-Konzentration; $c = 2 \cdot 7 \cdot 10^{-6} \text{ Mol/l}$; $\lambda = 325 m\mu$

Bei mehr als 0,02n HCl kommt es nicht mehr zur meßbaren Bildung eines Zwischenproduktes. Die Reaktionsgeschwindigkeits-Konstanten steigen zunächst mit zunehmender HCl-Konzentration an, um nach weiterer Erhöhung von [HCl] wieder abzusinken (Tabelle 4 und Bild 7).

Lösungsgemisch	$-\log [\text{HCl}]$	$k_{\text{AII} \rightarrow \text{CIII}}$
$\text{CH}_3\text{OH}/\text{HCl}$ (4:1)		
n/10	1,7	44,3
1n	0,7	56,7
2n	0,4	48,5
3n	0,22	44,8
12n	-0,48	28,1
$\text{CH}_3\text{OH}/12\text{nHCl}$ (1:1)	-0,78	0,47

Tabelle 4

Reaktionsgeschwindigkeits-Konstanten k (10^{-5}sec^{-1}) der Hydrolyse des 3-Phenyl-cumarinimid-hydrochlorids in Methanol-Wasser-HCl-Gemischen bei 42 °C

c) Acetal-Hydrolyse: In Tabelle 5 sind die Meßdaten angegeben.

Lösungsgemisch	Temp. °C	$-\log [\text{HCl}]$	$k_1 \text{ BII} \rightarrow \text{CI}$	$k_2 \text{ CI} \rightarrow \text{CIII}$
$\text{CH}_3\text{OH}/\text{H}_2\text{O}/\frac{n}{100} \text{HCl}$ (8:1,9:0,1)	23	5	88,4	7,7
(8:1,5:0,5)	23	4,3	497	15,2
$\text{CH}_3\text{OH}/1\text{nHCl}$ (4:1)	23	0,7	∞	∞
$\text{CH}_3\text{OH}/\text{H}_2\text{O}/\frac{n}{100} \text{HCl}$ (8:1,5:0,5)	42	4,3	∞	50,2
$\text{CH}_3\text{OH}/1\text{nHCl}$ (4:1)	42	0,7	∞	∞
$\text{CH}_3\text{OH}/\text{H}_2\text{O}$ (4:1)	42	0	1,47	—
$\text{C}_4\text{H}_8\text{O}/\text{H}_2\text{O}/\frac{n}{100} \text{HCl}$ (8:1,9:0,1)	23	5	3,56	0,14
(8:1,5:0,5)	23	4,3	16,9	0,55
(8:1,5:0,5)	42	4,3	77,3	3,66

Tabelle 5

Reaktionsgeschwindigkeits-Konstanten k_1 und k_2 (10^{-5}sec^{-1}) der Hydrolyse des 3-Phenyl-cumarin-dimethylacetals (B_{II}) in Methanol- bzw. Tetrahydrofuran ($\text{C}_4\text{H}_8\text{O}$)-Wasser-HCl-Gemischen bei verschiedenen Temperaturen

Die zweistufige Hydrolyse des Dimethylacetals

Die Meßergebnisse, besonders im isobestischen Punkt (P in Bild 4) zeigen, daß die Acetalhydrolyse unter geeigneten Bedingungen in zwei deutlich hintereinander verlaufenden Stufen erfolgt, die beide durch Erhöhung der HCl-Konzentration beschleunigt werden. Wir deuten dieses Verhalten so, daß die erste Stufe in dem Übergang $\text{B}_{\text{II}} \rightarrow \text{C}_{\text{I}}$ besteht. Das Halbacetal C_{I} kann durch Mesomerie eine gewisse Beständigkeit erreichen.

Das Auftreten des Halbacetals C_{I} ist bemerkenswert, weil unseres Wissens bisher noch kein Fall in der Ortho-ester-Reihe bekannt geworden ist, in dem eine Verbindung $\begin{array}{c} \text{OH} \\ | \\ \text{C} \\ / \quad \backslash \\ \text{OR} \quad \text{OR} \end{array}$ existiert, wenn auch nur kurzzeitig⁶⁾. In unserem Fall ist noch hinzuzufügen, daß die 1. Stufe, der Übergang Vollacetal \rightarrow Halbacetal ($\text{B}_{\text{II}} \rightarrow \text{C}_{\text{I}}$), etwa um eine Zehnerpotenz schneller erfolgt, als die sich anschließende 2. Stufe, die Hydrolyse des Halbacetals zum Lacton ($\text{C}_{\text{I}} \rightarrow \text{C}_{\text{III}}$).

Reaktionsschema

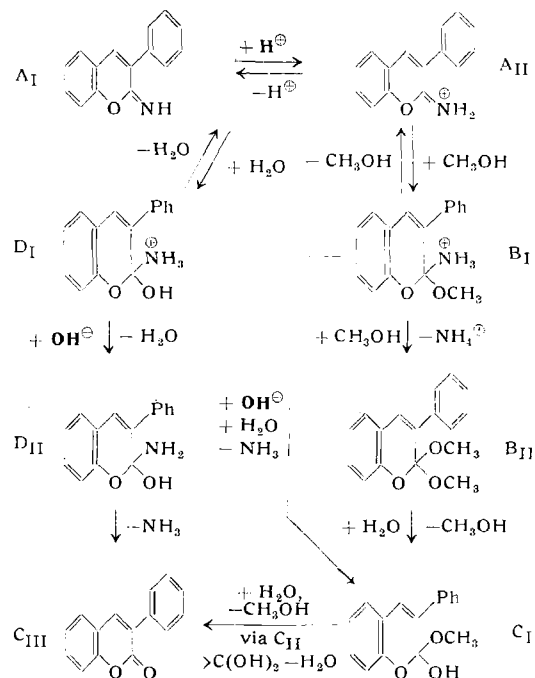
In den folgenden Formelbildern ist bei Substanzen, die kristallisiert vorliegen, der 3-ständige Phenyl-Rest ausgeschrieben; bei den nicht isolierten Zwischenprodukten steht dafür Ph. Halbfett hervorgehoben sind die H^+ - und OH^- -Ionen, deren gegenläufige Wirkungen das p_{H} -Optimum der Hydrolysegeschwindigkeiten erklären.

Gesichert sind: der wechselseitige Übergang $\text{A}_{\text{I}} \rightleftharpoons \text{A}_{\text{II}}$ zwischen dem kristallisierten Cumarinimid und seinem kri-

⁶⁾ A. Skrabal u. O. Ringer, Mh. Chem. 42, 9 [1921]; A. Skrabal u. M. Baltadschiewa, ebenda 45, 19 [1924].

stallisierten Hydrochlorid; ferner der einsinnige Übergang des kristallisierten Dimethylacetals B_{II} in das kristallisierte Cumarin C_{III} , wobei das als Halbacetal formulierte Zwischenprodukt C_{I} durch die im voranstehenden Abschnitt und in Tabelle 5 gemachten Angaben, d. h. durch die getrennt bestimmbar Reaktionsgeschwindigkeits-Konstanten k_1 für $\text{B}_{\text{II}} \rightarrow \text{C}_{\text{I}}$ und k_2 für $\text{C}_{\text{I}} \rightarrow \text{C}_{\text{III}}$, gekennzeichnet ist. Auf dem Weg von C_{I} nach C_{III} mag die Stufe des Lacton-Hydrats durchlaufen werden.

Hypothetisch sind: die durch Addition von H_2O bzw. von CH_3OH an A_{II} hervorgehenden Kationen D_{I} bzw. B_{I} und die daraus durch Abspaltung eines Protons bzw. durch



Reaktions-Schema

Einwirkung von OH^- hervorgehenden ungeladenen Verbindungen $-\text{O}-\text{C}(\text{OH})(\text{NH}_2)-$ (D_{II}) bzw. $-\text{O}-\text{C}(\text{OCH}_3)(\text{NH}_2)-$ (nicht im Formel-Schema). Da das Cumarinimid A_{I} auch in alkalischer Lösung — langsam — NH_3 abspaltet und C_{III} bildet, nehmen wir an, daß mit geringer Geschwindigkeit auch der direkte Übergang $\text{A}_{\text{I}} \rightarrow \text{D}_{\text{II}}$ erfolgen kann.

Das zur Diskussion gestellte Reaktions-Schema ist in vieler Hinsicht vergleichbar demjenigen, das H. S. Isbell und H. L. Frush⁷⁾ in einer sorgfältigen Studie für die Hydrolyse von Glykosylaminen vorgeschlagen haben. L-Arabinosylamin, das als Beispiel genannt sei, zerfällt in wäßriger Lösung bei p_{H} 5 mit maximaler Geschwindigkeit hydrolytisch in L-Arabinose + Ammoniak; bei p_{H} -Werten unterhalb von 2 und oberhalb von 9 findet man keine meßbare Hydrolyse. Die von den Autoren gegebene Deutung des p_{H} -Optimums bei p_{H} 5 läuft darauf hinaus, daß unter der Einwirkung von H^+ -Ionen sich zunächst Imonium-Ionen $-\text{CH}=\text{NH}_2^+$ bilden, an deren Doppelbindung sich H_2O zu $-\text{CH}(\text{OH})-\text{NH}_3^+$ addiert. Die so gebildeten Ammonium-Ionen zerfallen aber erst dann, wenn sie durch OH^- -Ionen unter Bildung von Wasser wieder entladen werden, wobei Aldehyd-Ammoniak $-\text{CH}(\text{OH})-\text{NH}_2$ entsteht, das spontan in NH_3 und L-Arabinose zerfällt. Unser Schema für den Übergang des Imino-lactons in das Cumarin zeigt in entsprechender Weise Reaktionsschritte, die einerseits durch H^+ , andererseits durch OH^- katalysiert werden, und macht daher die gefundenen p_{H} -Maxima der Hydrolysegeschwindigkeiten auf analoge Art

⁷⁾ J. Research Nat. Bureau of Standards 46, 132 [1952].

gut verständlich. Da unser Cumarin-imid schwächer basisch ist als die Glykosylamine, versteht man auch, daß unsere Maxima der Hydrolysegeschwindigkeiten erst bei viel höherer Säurekonzentration in Erscheinung treten ($-\log[\text{HCl}] = 2$ bzw. 0,8, Bild 5 bzw. 7) als bei Isbell und Frush ($p_{\text{H}} 5$). Man beachte, daß bei Isbell und Frush die

Imonium-Ionen hypothetisch sind, während sie bei uns in Form des Imid-hydrochlorids A_{11} kristallisiert vorliegen. Die zu beiden Seiten des Atlantik an recht verschiedenen Stoff-Systemen entwickelten Vorstellungen stützen und ergänzen sich somit wechselseitig.

Eingegangen am 13. April 1957

[A 808]

Induzierter Funktionswandel von Proteinen in Biologie und Medizin

Von Prof. Dr. M. G. SEVAG*)

Department of Microbiology, School of Medicine, University of Pennsylvania, Philadelphia (USA)

Dedicated to Professor Heinrich Wieland, an inspiring teacher and friend, a pioneer and idealist, as I have known him. M. G. Sevag

Diese Übersicht behandelt Proteine und Nucleinsäuren, Bausteine von hereditären Einheiten, als vielfach wandelbare Körper infolge von Reaktionen mit Fremdstoffen wie Toxinen, Proteinen, Arzneimitteln, Strahlen usw. Diese Umwandlungen werden als Ursachen von anormalem Zellstoffwechsel im Sinne von krankhaften Zuständen, Überempfindlichkeit, Allergie, Sucht, Arzneimittelresistenz, pathologischem Wachstum, Mutationen, genetischen Blocks usw. angesehen. Strukturelle Veränderungen können durch Einwirkung artfremder, antigen-wirksamer, natürlicher wie künstlicher Eiweißkörper auf die normale Globulin-Synthese unter Antikörper-Bildung erzeugt werden. Derartige Vorgänge werden als Modell entsprechender Veränderungen von Gewebsproteinen und unizellulären Systemen diskutiert. Verschiedene Theorien werden vom chemischen und enzymatischen Gesichtspunkt aus betrachtet. Es wird der Schluß gezogen, daß Antigene in Konjugation mit Globulin-bildenden Zellen als Biokatalysatoren wirksam sind. Weiter wird gezeigt, daß gebildete Antikörper-Molekeln als spezifische Inhibitoren von biologischen Funktionen der verantwortlichen antigenen Proteine reagieren. Da Eiweiß-Substanzen, wenn sie als Antikörper-Bildner in ihren Mutterzellen wirksam würden, die Synthese von spezifisch hemmenden Antikörpern stimulieren und damit den Zelltod verursachen würden, wird die Antigeneigenschaft von Proteinen als artfremdes Verhalten betrachtet. Da weiterhin eine Antigeneigenschaft nur in einem artfremden multizellulären lebenden System manifest wird, kann sie nicht als eine native Charakteristik betrachtet werden, sondern als ein von außen herrührendes Verhalten sowie eine Auswirkung einer anderen genetisch determinierten Charakteristik eines Proteins. Antigen-Spezifität sowie biokatalytische Spezifität werden auf die gleichen Zentren zurückgeführt. Nur auf dieser Grundlage können gleichwertige Spezifitäten, die Neutralisation der biologischen Wirksamkeiten von Proteinen, der Konkurrenzantagonismus zwischen spezifischen Substraten und Antikörpern sowie der Mechanismus des Immunschutzes gegenüber infektiös wirksamen Stoffen erklärt werden. Hochgereinigte und mehrfach umkristallisierte Proteinpräparationen bestehen, wie man heute weiß, aus mikro-heterogenen Molekelpopulationen. Die Gründe für dieses Verhalten sind nicht bekannt. Gleichfalls können bekanntlich mehrfach umkristallisierte Enzyme multi-katalytische Funktionen entwickeln. Die möglichen Ursachen für diese Zusammenhänge werden diskutiert. Es ist zu hoffen, daß Physik, Chemie und Biologie die Rätsel der Protein-Molekel lösen werden.

Einleitung. — Antikörper-Globuline als Beispiele für den Strukturwandel von Proteinen. — Mechanismus des Strukturwandels der Globulin-Molekel. — Antikörper-Synthese und adaptive Enzym-Bildung. — Vorgänge bei der Induktion der Antikörper-Bildung durch Antigene. — Wie beeinflusst ein Antigen die Globulin-Synthese, so daß spezifisches Antikörper-Globulin gebildet wird? — Kritik der Einwände gegen die Auffassung von den Antigenen als Co-Katalysatoren. — Energetische Grundlagen der Antikörper-Synthese. — Wie wirken haptene Gruppen als Co-Katalysatoren? — Über die Parallelität von Antigen-Wirkung und enzymatischen Funktionen. — Ursachen und Auswirkungen von An-

tigen-Eigenschaften. — Über die Einheitlichkeit der Zentren von antigenen und enzymatischen Spezifitäten. — Größe der determinanten oder katalytischen Zentren von spezifischen Protein- und Enzym-Funktionen. — Aktivierungszustände von katalytischen Zentren und aktiven Gruppen. — Grundlage der serologischen Kreuzreaktion zwischen künstlichen Antigenen gleicher haptener Gruppen im Gegensatz zur Abwesenheit von Kreuzreaktionen zwischen Enzymen mit gleicher aktiver Gruppe oder gleichen Coenzymen. — Heterogenität der Molekel-Population innerhalb einer molekularen Art. — Multikatalytische Funktionen von Enzymen. — Zusammenfassende Bemerkung. — Summary. — Literatur.

Einleitung

Emil Fischer berechnete 1923, daß 30 Aminosäuren von achtzehn verschiedenen Arten $1,28 \cdot 10^{27}$ Protein-Isomere bzw. daß zwanzig der natürlichen bekannten Aminosäuren $2,4 \cdot 10^{18}$ Isomere bilden können. Bedenkt man die Möglichkeiten des Auftretens einer oder mehrerer tautomerer Formen einer jeden Molekel, so können noch weitere Isomere existieren. Die Anzahl der Isomeren kann schließlich weiter gesteigert werden, wenn man die zusätzlichen molekularen Strukturen, die durch intramolekulare räumliche Umla-

gerung und Wasserstoffbrückenbindungen zustande kommen können, mit in Betracht zieht. Man kann sich vorstellen, daß derartige molekulare Varianten unter normalen dynamischen physiologischen Bedingungen, wie sie innerhalb lebender, proteinbildender Zellen existieren, auftreten. In Zusammenhang hiermit steht die Tatsache, daß anormale oder umgebaute neue Proteine unter dem Einfluß von fremden toxischen oder nicht-toxischen Substanzen von Eiweiß- oder Nichteiweißnatur entstehen können, die die lebende Zelle nicht zerstören oder unmittelbar eliminieren kann. Derartige Umbauvorgänge an genetisch determinierten Proteinen werden allgemein als sekundärer Ausdruck von primären Veränderungen der Desoxyribonucleinsäure-

*) Die Arbeit wurde durch einen Vertrag mit dem Office of Naval Research, Department of the Navy, und die Universität von Pennsylvania unterstützt.