

Fehlerrechnung ergibt eine Abweichungsmöglichkeit von $\pm 5\%$, bedingt vor allem durch die Unsicherheit des Diffusionskoeffizienten.

Ausser der niedrigen ATP-ase Aktivität liegen die Resultate auch im Bereich der Werte, die an Skelettmiosin gewonnen wurden¹, so dass offensichtlich erst eine Feinstrukturanalyse etwaige Unterschiede aufdecken kann¹⁴.

Summary. Sedimentation and diffusion coefficients, partial specific volume, intrinsic viscosity, ATP-ase activity and molecular weight of cardiac myosin from calf hearts were determined. The values agree well with the

results of MUELLER et al.⁴ for cardiac myosin of the dog, and are not essentially different from values reported for skeletal myosins¹.

E. JENNY und P. G. WASER

Pharmakologisches Institut, Universität Zürich
(Schweiz), 25. Februar 1965.

¹⁴ Diese Arbeit wurde vom Schweizerischen Nationalfonds zur Förderung der wissenschaftlichen Forschung (Projekt 3046) in dankenswerter Weise unterstützt.

Geschwindigkeit der imidazolkatalysierten O-Acetylierung von Derivaten und Peptiden des Serins und Threonins

Modelluntersuchungen zur enzymatischen Katalyse haben gezeigt, dass bei Reaktion von *p*-Nitrophenylacetat mit hydroxylgruppenhaltigen Imidazolderivaten, wie z.B. 4-Hydroxymethyl- oder 4-Hydroxyäthyl-imidazol, sowie serin- oder threoninhaltigen Histidinpeptiden, wie z.B. *cis* cyclo-L-his-L-ser oder *cis* cyclo-L-his-L-thr, Acetylierung der OH-Gruppe eintritt¹. Als energiereiches Acyl-derivat, das den Acetylrest auf die OH-Gruppe überträgt, tritt dabei N-Acetyl-imidazol auf²; das rückgebildete Imidazol reagiert erneut mit *p*-Nitrophenylacetat, übt also eine katalytische Funktion aus.

Um Aufschluss zu erhalten, inwieweit die Acetylierungsgeschwindigkeit strukturabhängig ist und ob es sich um intra- oder intermolekulare Acylübertragung handelt, bestimmten wir die o-Acetylierungsgeschwindigkeit der oben genannten Verbindungen und einiger anderer Derivate des Serins und Threonins in Gegenwart und Abwesenheit von Imidazolderivaten in Essigsäure/Acetanhydrid mit der Hydroxamsäurereaktion nach Hestrin³. Bei Reaktion mit Acetanhydrid tritt ebenfalls Acetimidazol auf⁴, das seinen Acetylrest auf die OH-Gruppe überträgt. Die Messung der Abhängigkeit der Acetylierungsgeschwindigkeit von der Konzentration der hydroxylgruppenhaltigen Imidazolderivate sollte außerdem eine Aussage über die Frage erlauben, ob eine intra- oder intermolekulare Katalyse vorliegt.

Derartige Untersuchungen in wasserfreiem Medium sind im Hinblick auf die enzymatische Katalyse von Interesse, da anzunehmen ist, dass Reaktionen an der Fermentoberfläche in praktisch wasserfreier, hydrophober Umgebung ablaufen können, wobei andere kinetische und energetische Verhältnisse herrschen als in wässrigem Milieu.

Messvorgang. 0,1 mM der Verbindung wurde in 5 ml Essigsäure gelöst und 1 ml (10 mM) Acetanhydrid zugesetzt; man liess bei Zimmertemperatur (25°) stehen und entnahm in bestimmten Zeitabständen Proben von 0,5 ml, die mit 2 ml Wasser versetzt wurden, um das Acetanhydrid und das Acetyl-imidazol zu zerstören. Nach 60 min und kurzem Erwärmen wurde im Vacuum zur Trockne eingedampft. Der Rückstand wurde in 2 ml Wasser gelöst, 0,6 ml alkalische Hydroxylaminlösung (2 ml 3,5N NaOH + 1 ml 4N Hydroxylamin-hydrochlorid) zugesetzt. Nach 15 min bei Zimmertemperatur

gab man 2,5 ml einer 10 prozentigen Eisenchloridlösung zu (10 prozentiges $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ in 0,5N HCl) und bestimmte nach 1 min die Extinktion gegen Wasser. Abgezogen wurde die Extinktion einer Lösung, die alle Bestandteile enthielt, aber in umgekehrter Reihenfolge gemischt; gemessen wurde bei 546 nm in 10 mm Küvetten. Zur Bestimmung des E_∞ Wertes wurde die Extinktion derselben Mischung mit den o-Acetyl-derivaten bestimmt. Die Berechnung erfolgte unter Zugrundelegung einer Reaktion erster Ordnung nach

$$kt = 2,3 \lg \frac{E_\infty}{E_\infty - E_t}$$

Ergebnisse. Die Ergebnisse der Messungen sind in der Tabelle aufgeführt und lassen sich in den folgenden Punkten zusammenfassen:

(1) N-Acetyl-serinamid wird in Essigsäure/Acetanhydrid etwa $2^{1/2}$ mal schneller acetyliert als das entsprechende Threoninderivat. Im Vergleich mit N-Acetyl-serinamid ist die Acetylierungsgeschwindigkeit des *cis* cyclo-asp-ser erniedrigt. Die Reaktionsfähigkeit des Serins wird also durch die benachbarte Asparaginsäure beeinflusst, was im Hinblick auf das Auftreten von -asp-ser im aktiven Zentrum der Serinproteasen von Interesse ist, während die geringe Reaktionsgeschwindigkeit des Threoninderivates einen Hinweis gibt, warum Threonin in Fermenten bisher nicht an Stelle von Serin gefunden wurde.

(2) Dieselbe Abstufung – N-Acetyl-serinamid > cyclo-asp-ser > N-Acetyl-threoninamid – findet sich auch bei den durch Imidazolderivate katalysierten Acetylierungsgeschwindigkeiten. Von den geprüften Imidazolderivaten ist Imidazol selbst der wirksamste Katalysator, α -Acetyl-histidin ist etwa halb so wirksam. Das ist auf Grund der Behinderung eines Stickstoffs des Imidazols durch die Seitenkette des Histidins zu erwarten. Die Methylgruppe im 2-Methyl-imidazol führt zu einer starken sterischen Hinderung, wodurch die katalytische Wirksamkeit dieser

¹ F. SCHNEIDER, Hoppe-Seyler's Z. 338, 131 (1964); dort weitere Literatur.

² TH. BRUICE und G. L. SCHMID, J. Am. chem. Soc. 79, 1663 (1957).

³ S. HESTRIN, J. biol. Chem. 180, 249 (1949).

⁴ G. S. REDDY, LEON MANDELL und I. H. GOLDSTEIN, J. chem. Soc. 1963, 1414.

Verbindung im Vergleich zum Imidazol erheblich absinkt. Denselben Effekt beobachtet man auch bei Reaktion mit *p*-Nitrophenylacetat⁵.

(3) Von den Verbindungen, die eine Hydroxylgruppe und den Imidazolring im *selben* Molekül enthalten, zeigt das 4-Hydroxyäthyl-imidazol die höchste Acetylierungsgeschwindigkeit. Die Werte für das 4-Hydroxymethyl-imidazol sind nicht zu ermitteln, da in alkalischer Hydroxylaminlösung eine Eliminierungsreaktion neben der Hydroxylaminolyse abläuft⁶. Die hohe Acetylierungsgeschwindigkeit des 4-Hydroxyäthyl-imidazols ist auf

eine intramolekulare Acylübertragung zurückzuführen, die durch die mögliche Ausbildung eines Sechsringes begünstigt ist. Für diese intramolekulare Reaktion spricht die Unabhängigkeit der Acetylierungsgeschwindigkeit von der Konzentration. Die *o*-Acetylierungsgeschwindigkeit des 4-Hydroxyäthyl-imidazols ist 14mal grösser als die des *c-his-ser* und 32mal grösser als die des *c-his-thr*. Die Acetylierungsgeschwindigkeit der letztgenannten Peptide ist proportional ihrer Konzentration, d.h. es findet keine intramolekulare Acetylierung statt. Das zeigt auch die Übereinstimmung der Acetylierungsgeschwindigkeit des *c-his-ser* mit derjenigen von Acetylserinamid in Gegenwart von Acetyl-histidin. Gegenüber *cis* cyclo-*his-ser* ist die Acylierungsgeschwindigkeit des *cis* cyclo-*his-thr* stark erniedrigt.

Geschwindigkeitskonstanten sowie Halbwertzeiten der *o*-Acetylierung in Essigsäure/Acetanhydrid

	$k \cdot 10^5 \text{ min}^{-1}$	$t \cdot 10^{-2} \text{ min}$
Hydroxyäthyl-imidazol ⁷	973,0	0,71
Hydroxymethyl-imidazol ⁸	nicht messbar	—
N-Acetyl-DL-serinamid ⁹	2,3	300,0
N-Acetyl-DL-serinamid + Imidazol	165,0	4,2
N-Acetyl-DL-serinamid + Acetyl-histidin ¹⁰	70,5	9,8
N-Acetyl-DL-serinamid + 2-Methyl-imidazol ¹¹	21,0	33,0
c-his-ser ¹	70,0	98,5
N-Acetyl-DL-threoninamid ¹²	0,9	770,0
N-Acetyl-DL-threoninamid + Imidazol	30,1	23,0
N-Acetyl-DL-threoninamid + Acetyl-histidin	14,2	48,8
c-his-thr ¹	3,3	208,0
c-aspart-ser ¹²	2,0	346,0
c-aspart-ser + Imidazol	115,8	6,0
c-aspart-ser + Acetyl-histidin	50,3	13,7

c = cyclo

Summary. *o*-Acetylation of cyclo-*his-ser* and cyclo-*his-thr* in acetic acid/acetanhydride proceeds via intermolecular, and in the case of 4-hydroxyethyl-imidazole via intramolecular, acyl transfer. The highest rate of acetylation is observed with 4-hydroxyethyl-imidazole, and the most effective catalyst in the case of intermolecular acyl transfer is imidazole; derivatives of imidazole are less effective. Derivatives and peptides of serine are generally more reactive than those of threonine.

F. SCHNEIDER

Physiologisch-Chemisches Institut der Universität
Tübingen (Deutschland), 2. Januar 1965.

- ⁵ F. SCHNEIDER, Hoppe-Seyler's Z. 334, 26 (1964).
- ⁶ TH. BRUICE und TH. FIFE, J. Am. chem. Soc. 83, 1124 (1961).
- ⁷ W. REPPÉ et al., Liebigs Ann. 596, 1 (1955) und zwar p. 68.
- ⁸ J. R. TOTTER und W. J. DARBY, Org. Synthesis 24, 64 (1944).
- ⁹ E. ROTHSTEIN, J. chem. Soc. 1949, 1968.
- ¹⁰ A. NEUBERGER, Biochem. J. 32, 1452 (1938).
- ¹¹ I. W. CORNFORTH und H. T. HUANG, J. chem. Soc. 1948, 1960.
- ¹² F. SCHNEIDER, erscheint demnächst in Hoppe-Seyler's Z.

Use of *Escherichia coli* A.T.C.C. 9637 for the Asymmetric Hydrolysis of Amino Acid Derivatives

In the course of research work carried out with *Escherichia coli* A.T.C.C. 9637 cells¹, we made the following observations.

The enzymatic system present in *E. coli* cells acts on some amides producing the hydrolytic cleavage² of the amide linkage. Among the compounds tried, the following were hydrolysed³: phenylacetamide, desthiobenzylpenicillin, D- α -desthiobenzylpenicilloic acid⁴, phenylacetyl-L-alanine, phenylacetyl-L-valine, phenylacetyl-L- α -amino-n-butyric acid, phenylacetyl-L-leucine, phenylacetyl-L-phenylalanine, chloroacetyl-L-phenylalanine, chloroacetyl-L-alanine, chloroacetyl-L-leucine.

In the case of the phenylacetyl derivatives, we followed the cleavage by determining the phenylacetic acid produced (see Table).

Among the compounds tested, the following did not undergo any appreciable cleavage of the amide linkage: phenylacetyl-D-alanine, phenylacetyl-D-valine, phenylacetyl-D- α -amino-n-butyric acid, chloroacetyl-D-alanine, chloroacetyl-D-phenylalanine, chloroacetyl-D-leucine,

- ¹ While this work was in progress, M. COLE published a note concerning substrates hydrolysed by the acylases present in *E. coli* B.R.L. 1040 cells. Nature 203, 519 (1964).
- ² All the hydrolysis experiments were carried out at pH 7.5 and at 37°C. For one milli-mole of substrate we used 100 mg lyophilized cells of *E. coli* in 40 ml of buffer solution.
- ³ It should be noted that all the experiments made refer to *E. coli* cells, in which it is not yet known if there is more than one acylase present.
- ⁴ The asymmetric carbon atom to which the phenyl acetamido group is linked has the L-configuration. A. ROMEO and G. DI MAIO, Ann. Chim. (Rome) 47, 676 (1957).