Über die Temperaturabhängigkeit der Dunkelgleichgewichte von Kohlenoxyd-Hämochromogenen von Fermentmodellen und deren Wirkungsgruppe

Von W. BROSER und W. LAUTSCH

Aus dem Institut für Organische Chemie der Freien Universität Berlin

(Z. Naturforschg. **13 b**, 48—50 [1958]; eingegangen am 11. November 1957)

Herrn Prof. Dr. PAUL GÜNTHER zum 65. Geburtstag in Verehrung gewidmet

Es wird die Temperaturabhängigkeit der Dissoziations-Gleichgewichte der Kohlenoxyd-Hämochromogene des Fermentmodells Mesohäm IX-poly-(phenylalanin-glutaminsäure) und dessen Wirkungsgruppe Mesohäm IX im Dunkeln untersucht. Dabei ergibt sich, daß unter dem Einfluß der Polypeptidkette das Kohlenoxyd-Hämochromogen gegenüber dem kohlenoxydfreien Eisen-Porphyrin-Komplex um 3,9 kcal energieärmer und um 13,9 Cl entropieärmer wird. Unterhalb von 11° C erhöht die Polypeptidkette die Reaktionsarbeit, die bei der Bildung der CO-Verbindung gewonnen werden kann durch Vergrößerung von ΔH° . Oberhalb von 11° C erhöht die Polypeptidkette die Reaktionsarbeit, die bei der Spaltung der CO-Verbindung erhalten werden kann, unter gleichzeitiger Vergrößerung der Wärmeaufnahme aus der Umgebung.

Die bisher an Fermentmodellen vom Polypeptidtypus beobachtete Aktivierung² der Wirkungsgruppe haben wir auf Redoxpotential-Verschiebung³ durch Bildung von Einschlußsystemen⁴ sowie auf die energiefortleitenden Eigenschaften⁵ zurückführen können. Zu der kürzlich ausgesprochenen Arbeitshypothese der gerichteten Übertragung von kinetischer Energie⁵ durch die thermisch angeregten Schwingungen der Peptidwendel (α -Helix von Pauling) auf die prosthetische Gruppe, die durch Vergleich des *Dunkelzerfalls* der CO-Hämochromogene von prosthetischer Gruppe und Fermentmodell bei verschiedenen Temperaturen oder durch Einstrahlung von Infrarot variierender Wellenlänge der Prüfung zugänglich sein sollte, haben wir methodisch an frühere Untersuchungen über die Reaktions-Arbeiten, -Wärmen und -Entropien von Cyclodextrin-Einschlußverbindungen⁶ angeknüpft sowie an die radio-metrisch⁷ erfolgte Bestimmung der Stöchiometrie der CO-Verbindungen von Fermentmodell [Mesohäm · ¹⁴CO · Py]-Poly-(phenylalanin-glutaminsäure) und prosthetischer Gruppe [Mesohäm · ¹⁴CO · Py] in Bestätigung früherer manometrischer Befunde

von WARBURG und NEGELEIN⁸ über die Zusammensetzung von CO-Häm-(chromogen-) Verbindungen.

Wir haben in der vorliegenden Arbeit die Temperaturabhängigkeit der *Dunkelgleichgewichte*

der CO-Hämochromogene des genannten Fermentmodells und deren Wirkungsgruppe unter genau gleichen Bedingungen untersucht und insbesondere die Entropie-Änderungen berücksichtigt, da nach BOLTZMANN die Entropie *geordneter* Zustände stets geringer ist als die Entropie *ungeordneter* Zustände.

Die Messungen wurden spektrophotometrisch bei der Wellenlänge 546 m μ durchgeführt. Sowohl beim Fermentmodell wie auch beim freien Mesohäm gingen wir von einer in bezug auf den Porphyrin-Eisen-Komplex $2,5 \cdot 10^{-5}$ -m., in bezug auf Pyridin 5-m. Lösung aus. Jede dieser Lösungen wurde in drei Teile geteilt. Lösung I wurde mit Natrium-dithionit reduziert, sie enthält also das Pyridin-

¹ 36. Mitt. über Fermentmodelle von W. LAUTSCH u. Mitarbeitern; 35. Mitt. W. LAUTSCH u. G. SCHULZ, Naturwissenschaften, im Druck.

² W. LAUTSCH u. E. SCHRÖDER, Z. Naturforschg. **9 b**, 277 [1954].

³ W. LAUTSCH, W. BIEDERMANN u. W. BROSER, Naturwissenschaften **38**, 478 [1951].

⁴ W. LAUTSCH, W. BROSER u. KL. BECKER, Z. Elektrochem., Ber. Bunsenges., physik. Chem. **61**, 174 [1957]; W. LAUTSCH u. Mitarbb., Kolloid-Z. **144**, 82 [1955].

⁵ W. BROSER u. W. LAUTSCH, Naturwissenschaften **42**, 513 [1955]; Z. Naturforschg. **11 b**, 453 [1956].

⁶ W. LAUTSCH, W. BROSER, W. BIEDERMANN u. H. GNICHTEL, Angew. Chem. **66**, 123 [1954] (vgl. Bild 7 und Tab. 1); W. BROSER u. W. LAUTSCH, Naturwissenschaften **40**, 220 [1953].

⁷ W. LAUTSCH, H. RAUHUT, W. GRIMM u. W. BROSER, Z. Naturforschg. **12 b**, 307 [1957].

⁸ O. WARBURG u. E. NEGELEIN, Biochem. Z. **200**, 414 [1928].

Abb. 1. Zeit- und Temperaturabhängigkeit der gemessenen Extinktionswerte. $\lambda = 546 \text{ m}\mu$.

Hämochromogen (E_{Py} in Abb. 1). Durch Lösung II wurde unter Reduktion mit Natriumdithionit bei 25° ein reiner CO-Strom geleitet. Wie Vorversuche ergaben, liegt in ihr der Eisen-Porphyrin-Komplex praktisch vollständig als Kohlenoxyd-Hämochromogen vor (E_{CO}). Durch Lösung III wurde unter Reduktion mit Dithionit ein CO-N₂-Gemisch mit $0,75 \cdot 10^{-2} \text{ atm}$ CO-Partialdruck geleitet. In ihr liegt ein Gemisch beider Reaktionspartner vor (E). Die Lösungen wurden bei 25° in Küvetten gedrückt, die fest verstöpselt wurden. Die Extinktionen dieser Lösungen wurden bei 25° gemessen, dann auf 15° abgekühlt, gemessen, wieder auf 25° erwärmt, gemessen und erneut auf 15° abgekühlt (Abb. 1). Man erkennt, daß sich die Gleichgewichte reversibel einstellen.

Die durch Anwendung des Massenwirkungsgesetzes auf die obengenannten Gleichgewichte

$$\frac{[\text{FeII}Py_2]}{[\text{FeII}PyCO]} = \frac{K_{CPy}}{[CO]} = \frac{\bar{K}}{p_{CO}} = \frac{E_{CO} - E}{E - E_{Py}}$$

K_{Py} = Bruttokonzentration des Pyridins,
 p_{CO} = CO-Partialdruck.

errechneten Werte sind aus der Beziehung

$$-RT \ln K = \Delta F^\circ = \Delta H^\circ - T \Delta S^\circ$$

gefunden und in Tab. 1 zusammengestellt. Man erkennt, daß das Gleichgewicht des Fermentmodells weiter auf der rechten Seite liegt (kleinere p_K -Werte!) als das der freien Wirkungsgruppe und daß in beiden Fällen durch Temperaturerhöhung eine

Abb. 2. Temperaturabhängigkeit der p_K -Werte.
 (I: Mesohämin, II: Fermentmodell.)

Verschiebung nach rechts erfolgt. Entsprechend ergeben sich bei Auftragung der p_K -Werte gegen $1/T$ bei identischen Gleichgewichtslagen für Fermentmodell und Wirkungsgruppe unterschiedene Temperaturwerte (Abb. 2). Die 3. Zeile („Differenz“) in Tab. 1 gibt an, um wieviel die einzelnen Werte

	p_K^{25}	p_K^{15}	ΔH_{298}° [kcal]	ΔF_{298}° [kcal]	$298 \cdot \Delta S_{298}^\circ$ [kcal]	ΔS_{298}° Cl
Fermentmodell	6,0	6,3	11,8	8,2	3,6	12,0
Mesohämin	6,2	6,4	7,9	8,4	-0,5	-1,9
Differenz	-0,2	-0,1	3,9	-0,2	4,1	13,9

Tab. 1. Zusammenstellung der Werte.

des Fermentmodells größer sind als die der freien Wirkungsgruppe, bringt also den Einfluß der Polypeptidkette zum Ausdruck. Bei einem Formelumsatz von links nach rechts vermag bei isotherm-reversibler Leitung das Fermentmodell eine um 0,2 kcal größere Reaktionsarbeit (ΔF) zu leisten als die Wirkungsgruppe, dabei nimmt die innere Energie (ΔH°) um 3,9 kcal und die Aufnahme an Wärmeenergie ($T \Delta S$) aus der Umgebung um 4,1 kcal stärker zu als bei der Wirkungsgruppe. Unter dem Einfluß der Polypeptidkette ist also der Umgebung eine größere Wärmemenge entzogen und in Reaktionsarbeit verwandelt worden.

Die Vergrößerung von ΔH° ist ein Maß für den Unterschied der Wechselwirkung der Wirkungsgruppe in der Kohlenoxydform einerseits und in der Hämochromogenform andererseits mit der Polypeptidkette. Die Kohlenoxydform ist der Hämochromo-

genform gegenüber um 3,9 kcal energieärmer, was vermutlich auf Polarisierungseffekten beruht.

Aus Abb. 2 entnimmt man, daß unterhalb von 11°C der Einfluß auf das Energieglied überwiegt, d. h. daß das Gleichgewicht nach links verschoben und die Differenz von ΔF° positiv wird. Oberhalb von 11°C überwiegt der Einfluß auf das Entropieglied, was vermutlich so zu deuten ist, daß die Polypeptidkette die Umwandlung der aus der Umgebung entnommenen Wärme in Arbeit begünstigt.

Die Untersuchungen werden fortgeführt an auf Grund von IR- und Röntgenspektroskopie eindeutig als α -strukturiert ausgewiesenen Fermentmodellen, um mit Hilfe der Entropien Aussagen machen zu können auch über den Einfluß des Ordnungsgrades und über dessen Bedeutung für das Aktivierungsproblem.

Versuche

Das verwendete Fermentmodell Mesohämin-IX-poly-DL-phenylalanin-L-glutaminsäure wurde nach dem bereits früher beschriebenen Verfahren² dargestellt und besaß nach spektrophotometrischen Messungen ein Mol.-Gew. von 62 600.

Die zur Untersuchung gelangenden Lösungen wurden wie folgt hergestellt:

- Fermentmodell: 78,25 mg Fermentmodell in 12,5 ml Boratpuffer p_H 10,3 gelöst, mit 20 ml Pyridin versetzt und mit Wasser auf 50 ml aufgefüllt.
- Mesohämin: 16,44 mg Mesohämin-IX in 50 ml Boratpuffer p_H 10,3 gelöst; 5 ml dieser Lösung werden mit 24 ml Boratpuffer p_H 10,3 auf 100 ml aufgefüllt.

Im übrigen wurde die Versuchsdurchführung bereits weiter oben ausführlich beschrieben.

Herrn Prof. I. N. STRANSKI sind wir für die Diskussion der Meßergebnisse zu Dank verpflichtet.

NOTIZEN

Vereinfachte Darstellung von *N*-Carbobenzoxyl-L-glutaminsäure-L-äthylester

VON FRIEDRICH WEYGAND UND KLAUS HUNGER

Organisch-chemisches Institut der Technischen Universität
Berlin, Berlin-Charlottenburg 2

(Z. Naturforsch. **13 b**, 50—51 [1958]; eingeg. am 29. November 1957)

Bei der Aufspaltung von *N*-Carbobenzoxyl-L-glutaminsäureanhydrid mit Äthanol entstehen der 1- und der 5-Äthylester nebeneinander^{1,2}. Die Trennung geschah bisher durch fraktionierte Extraktion aus ätherischer Lösung mit Soda, in die zunächst der 5-Äthylester geht. Die Ausbeuten an dem für die Synthese von γ -Glutamylpeptiden so wertvollen *N*-Carbobenzoxyl-L-glutaminsäure-L-äthylester betragen bis zu 40% (d. Th.).

Analog der Darstellung von *N*-Trifluoracetyl-L-glutaminsäure-L-äthylester³ haben wir nun das Carbobenzoxyl-L-glutaminsäureanhydrid mit Äthanol in der Siedehitze aufgespalten und dann den 1-Äthylester direkt als krist. Dicyclohexylammoniumsalz isoliert. Dieses läßt sich leicht aus heißem Wasser umkristallisieren. Mit einem saueren Ionenaustauscher kann daraus der freie *N*-Carbobenzoxyl-L-glutaminsäure-L-äthylester praktisch quantitativ erhalten werden. Die Ausbeute, berechnet auf das eingesetzte Carbobenzoxyl-L-glutaminsäureanhydrid, beträgt etwa 50% (d. Th.).

Daß der Carbobenzoxyl-L-glutaminsäure-L-äthylester vorliegt, ergibt sich aus folgenden Beobachtungen: 1. Der nach GOLDSCHMIDT² dargestellte Ester gibt mit Dicyclohexylamin ein Salz vom gleichen Schmp. und Mischschmp. 2. Mit Ammoniak wird das bekannte Carbobenzoxyl-L-isoglutamin¹ erhalten.

Beschreibung der Versuche

N-Carbobenzoxyl-L-glutaminsäure-L-äthylester-5-dicyclohexylaminsalz: 13,15 g (0,05 Mol) frisch hergestelltes Carbobenzoxyl-L-glutaminsäureanhydrid, Schmp. 93 bis 94°, wurden 1 Stde. lang mit 75 cm³ abs. Äthanol unter Rückfluß (CaCl₂-Rohr) gekocht. Nach Einengen i. Vak. auf etwa das halbe Volumen wurde unter Eiskühlung mit 9,05 g (0,055 Mol) Dicyclohexylamin in wenig Äthanol versetzt und über Nacht im Eisschrank aufbewahrt. Das ausgefallene Salz wurde abgesaugt und zweimal mit kaltem Petroläther gewaschen. Nach Umkristallisation aus heißem Wasser lagen 13,65 g (56% d. Th.) in Form feiner Nadelchen vor, Schmp. 160—161° [α]_D²¹: $-7,84^\circ$ ($c=1,0$ in abs. Methanol). C₂₇H₄₂O₆N₂ (490,6) Ber. C 66,08 H 8,63 N 5,72. Gef. C 65,78 H 8,54 N 5,95.

Das Salz vom gleichen Mischschmp. und Schmp. erhielt man aus den beiden letzten nach dem Verfahren von GOLDSCHMIDT² anfallenden Fraktionen von Carbo-

¹ E. J. LE QUESNE u. G. T. YOUNG, J. chem. Soc. London **1950**, 1954.

² ST. GOLDSCHMIDT u. CH. JUTZ, Chem. Ber. **86**, 1116 [1953].

³ F. WEYGAND u. M. REIHER, Chem. Ber. **88**, 26 [1955]; F. WEYGAND u. R. GEIGER, Chem. Ber. **90**, 634 [1957].