

# Über Fermentmodelle und ihre Beziehungen zu den Einschlußverbindungen

Von Prof. Dr. W. LAUTSCH\*), Dr. W. BROSER, Dr. W. BIEDERMANN und H. GNICHTEL  
Aus dem Institut für Organische Chemie der Freien Universität Berlin

Es werden Synthesen von Hochpolymeren mit Wirkungsgruppen aus der Hämin- und Chlorophyll-Reihe und ihre optischen Eigenschaften besprochen. Die Verschiebungen der Bandenmaxima und die Veränderung der Säuredissoziationskonstanten der Wirkungsgruppen werden diskutiert. Dies berührt die Frage der Existenz von Einschlußverbindungen in Lösung. Durch Anwendung des Massenwirkungsgesetzes auf mehrere, bereits bekannte Einschlußsysteme ergab sich das Vorliegen echter Verbindungen in Lösung. Prototropiegleichgewichte führten zur Ermittlung der Säuredissoziationskonstanten einiger Farbstoffe und deren Cyclodextrin-Einschlußverbindungen. Das System Serumalbumin/Methylorange und hochmolekulare Verbindungen mit Wirkungsgruppen aus der Hämin- und Chlorophyll-Reihe zeigen Ähnlichkeit mit echten Einschlußverbindungen in Lösung, so daß man geneigt ist, den betr. Hochpolymeren Einschlußbezirke zuzuweisen. Ferner werden Synthesen von mit Wirkungsgruppen substituierten D-, L- und D,L-Formen von Polyphenylalaninen, ihre optischen und katalytischen Eigenschaften sowie erste Versuche zur Synthese von Cytochrom-c-Modellen behandelt.

1922 teilte Richard Willstätter seine als Trägertheorie<sup>1)</sup> bezeichnete Vorstellung über den Aufbau der Enzyme mit: „Die Erscheinungen der Enzymspezifität, die Beobachtungen über Zersetzung und Stabilisierung ... führen zu der Auffassung, daß das Molekül eines Enzyms aus einem kolloiden Träger und einer rein chemisch wirkenden aktiven Gruppe besteht“. Aber erst 1934 wurde von H. Theorell im Warburgschen Laboratorium am gelben Atmungsferment diese Auffassung bewiesen: H. Theorell zeigte, daß das gelbe Ferment gegen Salzsäure dialysiert, in Farbstoff- und Eiweißkomponente aufspaltbar ist und daß jede Komponente für sich als Sauerstoff-Überträger unwirksam ist. „Bei Mischungen elektrolytfreier Wasserlösungen der Komponenten in der Kälte kehrt die reine gelbe Farbe und die Wirksamkeit größtenteils zurück. Es ist also zum ersten Mal die reversible Spaltung eines Fermentes in Wirkungsgruppe und kolloidalen Träger gelungen“<sup>2)</sup>.

Es ist u.W. bisher nicht versucht worden, Willstätters Trägertheorie von der synthetischen Seite her zu prüfen. Derartige Untersuchungen sind durch unsere Kenntnisse über den Aufbau der Eiweißmolekel begrenzt. Es scheint jedoch möglich, zu prüfen, wie sich eine an einer Makromolekel haftende Wirkungsgruppe im Vergleich zu ihrem Zustand in molekular-disperser Lösung verhält, und einen Versuch zur Deutung der Unterschiede zu unternehmen.

## I. Makromolekulare Verbindungen mit Wirkungsgruppen

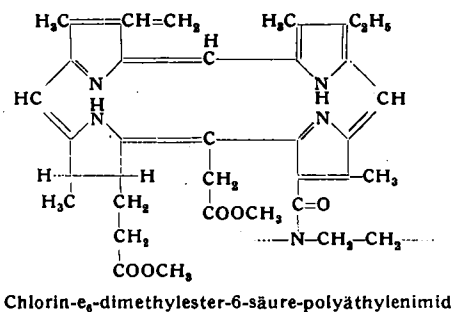
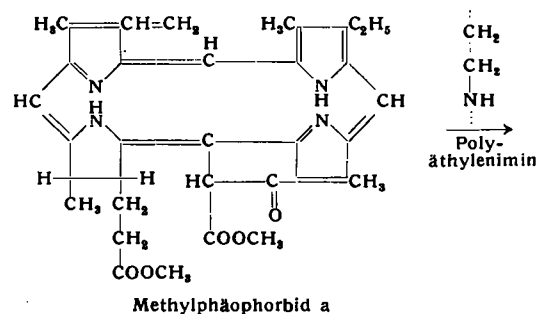
Wir haben deshalb in Modelluntersuchungen<sup>3)</sup> organische, hochpolymere Verbindungen mit homöopolar gebundenen Wirkungsgruppen ausgestattet durch:

1. Einführung der betr. Wirkungsgruppe in bereits hochpolymere Verbindungen<sup>4)</sup>
2. Mischpolymerisation<sup>5)</sup>
3. Einbeziehung der prosthetischen Gruppe in den Polykondensationsvorgang<sup>6)</sup>.

Wir haben uns zunächst beschränkt auf Wirkungsgruppen aus der Chlorophyll- und Hämin-Reihe, um Ferment-

modelle mit Oxydase- und Cytochrom-Charakter aufzubauen.

Zu 1): Als Beispiel für die Einführung von Wirkungsgruppen in bereits hochpolymere Verbindungen verwendeten wir die von H. Fischer und S. Goebel<sup>7)</sup> beobachtete Aufspaltungsreaktion des isocyclischen Fünfringes im Methylphäophorbid a unter dem Einfluß von prim. und sek. Aminen. Mit Polyäthylenimin erhält man das im wäßrigen Medium über einen weiten p<sub>H</sub>-Bereich lösliche Chlorin-e<sub>8</sub>-dimethylester-6-säure-polyäthylenimid.



Die Reaktion ist mit einer starken spektralen Verschiebung und Umwandlung des Phorbin- in den Chlorin-Typ verbunden. Das Absorptionsspektrum des Poly-äthylenimin-Derivates gleicht im Sichtbaren dem Chlorin-e<sub>8</sub> und ist im übrigen identisch mit dem analog hergestellten Chlorin-e<sub>8</sub>-dimethylester-6-säure-äthylamid<sup>8)</sup> (Bild 1).

Das Spektrum der einfach geladenen Kationensäure des Chlorin-e<sub>8</sub>-dimethylester-6-säure-polyäthylenimids zeigt

\*) Vorgetragen auf dem XIII. Internat. Kongreß für Reine u. Angew. Chemie in Stockholm, 31. 7. 1953, und zur Vortragstagung des GDCh-Ortsverbandes Berlin am 17. 7. 1953.

<sup>1)</sup> R. Willstätter, Ber. dtsch. chem. Ges. 55, 3606 [1922].

<sup>2)</sup> H. Theorell, Biochem. Z. 272, 155 [1934].

<sup>3)</sup> W. Lautsch u. Mitarb., J. Polymer Sci. 8, 191 [1952].

<sup>4)</sup> W. Lautsch, W. Broser, U. Doering u. H. Zoschke, Naturwiss. 38, 210 [1951].

<sup>5)</sup> W. Broser u. W. Lautsch, ebenda 38, 208 [1951].

<sup>6)</sup> W. Lautsch, W. Biedermann u. W. Broser, ebenda 38, 478 [1951].

<sup>7)</sup> H. Fischer u. S. Goebel, Liebigs Ann. Chem. 524, 269 [1936].

<sup>8)</sup> W. Broser u. W. Lautsch, Naturwiss. 38, 209 [1951].

beim Vergleich mit dem der einfach geladenen Kationensäure des Chlorin-e<sub>8</sub>-dimethylester-6-säureäthylamids eine Rotverschiebung der langwelligen Bande von 632 mμ

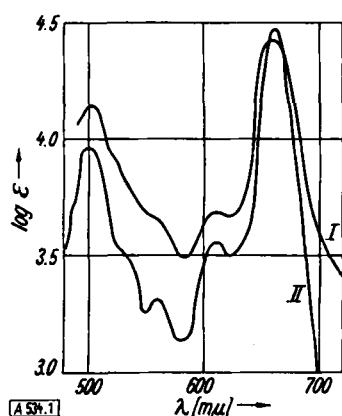


Bild 1

Absorptionsspektrum von I. Chlorin-e<sub>8</sub>-dimethylester-6-säureäthylamid; II. Chlorin-e<sub>8</sub>-dimethylester-6-säurepolyäthylenimid

auf 644 mμ (Bild 2), während die Spektren der freien Base und des doppelt geladenen Kations der nieder- und hochmolekularen Verbindung übereinstimmen. Der aus dem Spektrum ermittelte p<sub>K</sub>-Wert der einfach geladenen Kationensäure wurde im Falle der niedermolekularen

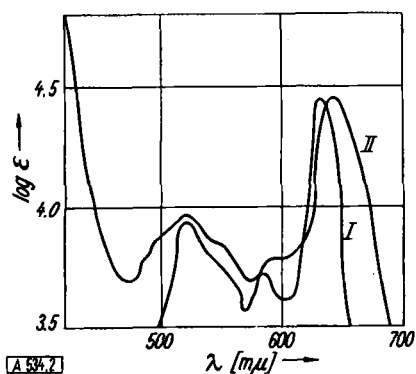
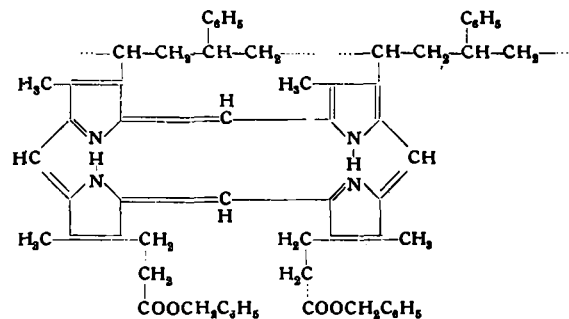
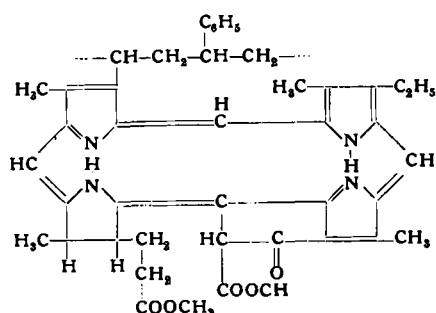


Bild 2

Absorptionsspektren von I. Kationensäure<sup>1(+)</sup> von Chlorin-e<sub>8</sub>-dimethylester-6-säureäthylamid; II. Kationensäure<sup>1(+)</sup> von Chlorin-e<sub>8</sub>-dimethylester-6-säurepolyäthylenimid

Verbindung zu 2,7 gefunden; im Falle der hochmolekularen Verbindung lag der diesem p<sub>K</sub>-Wert entsprechende Wendepunkt bei p<sub>H</sub> 3,75 (s. a. Bilder 16–17).

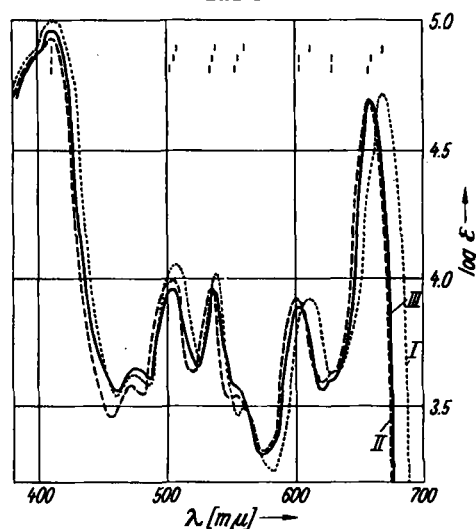
Zu 2): Durch Entdeckung der Polymerisations- bzw. Einpolymerisationsfähigkeit der Vinyl-Gruppe in 2- bzw. in 2- und 4-Stellung von Derivaten des Chlorophylls bzw. des Hämins erhielten wir durch Mischpolymerisation von Styrol und Methylphäophorbid a bzw. Protoporphyrinester Präparate, deren Wirkungsgruppen in die Polystyrol-Kette homöopolar eingebaut sind.



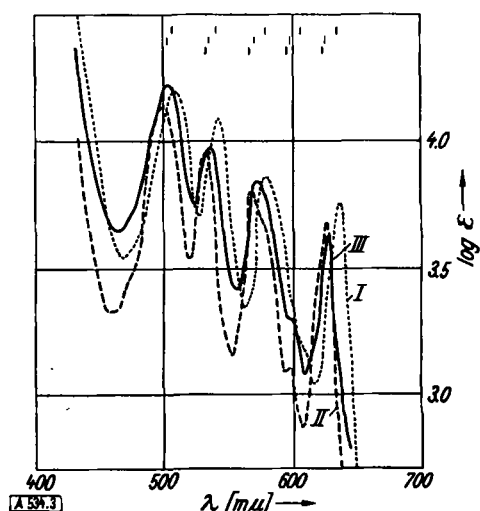
Die Präparate enthalten, je nach Molverhältnis Styrol/Methylphäophorbid a, auf 1000 bis 5000 Einheiten 1 Wirkungsgruppe; das viscosimetrisch bestimmte Molekulargewicht beträgt etwa 40000.

Konstitutionsbeweisend ist der Spektralbefund, wonach in beiden Fällen die durch Ausschaltung der Vinylchromophore zu beobachtende Blauverschiebung der Bandenmaxima (durch Ausbildung des Meso-Typs) eintritt (Bild 3).

Bild 3



Absorptionsspektren von  
I. Methylphäophorbid a II. Meso-Methylphäophorbid a  
III. Polystyrol mit prosthetischer Gruppe



I. Protoporphyrin-dibenzylester II. Mesoporphyrin-IX-dibenzylester  
III. Prosthetische Gruppe im Polystyrol

Man beobachtete jedoch in beiden Copolymerisaten, bes. beim Polystyrol mit einpolymerisiertem Protoporphyrin-dibenzylester eine geringe, aber deutliche Rotverschiebung gegenüber dem Spektrum der molekular dispers

gelösten Meso-Verbindungen (vgl. Bild 3, II u. III). Rotverschiebungen der Spektren prosthetischer Gruppen bei Fixierung an hochmolekulare Träger sind aus der Fermentchemie bekannt<sup>9)</sup>.

Energetisch ist die Anordnung des Porphin- bzw. Phorbin-Ringes (Bild 4) zwischen den benachbarten Benzol-Ringen — die Wirkungsgruppe wird von den benachbarten Benzolringen eingeschlossen<sup>10)</sup> — die wahrscheinlichste.

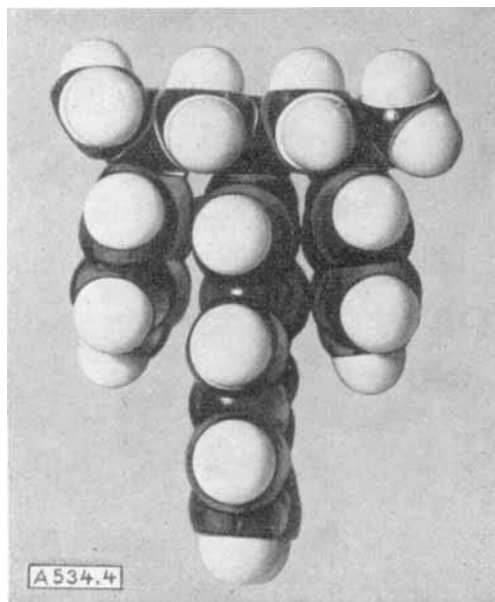


Bild 4. Räumliche Anordnung des Porphin- bzw. Phorbide-Ringes zwischen den benachbarten Benzolringen im Mischpolymerisat

Sie richtete unsere Aufmerksamkeit auf Rotverschiebungen der Bandenmaxima der Einschlussverbindungen, wie sie an Cyclodextrinen und zugesetzten Farbstoffen von F. Cramer<sup>11)</sup> beobachtet wurden. Sind also die genannten Verbindungen mit Wirkungsgruppen als Einschlussverbindungen bzw. als Einschlussbezirke enthaltende Verbindungen aufzufassen?

## II. Problemstellungen

### 1. Zur Existenz von Einschlussverbindungen im gelösten Zustand

Der Begriff der Einschlussverbindungen muß als bekannt vorausgesetzt werden<sup>12)</sup>. Die hier näher untersuchten Cyclodextrin-Einschlussverbindungen gehören zu den ältest bekannten der organischen Chemie. Sie wurden von F. Schardinger<sup>13)</sup> entdeckt und von K. Freudenberg<sup>14)</sup> als Cycloglucose, an deren Aufbau 6, 7 und 8 Glucose-Einheiten in Maltose-Bindung beteiligt sind, erkannt.

K. Freudenberg<sup>15)</sup> deutete bereits 1939 die Addukte der Cyclodextrine mit einer großen Zahl von hydrophoben organischen Verbindungen als Kanaleinschlussverbindungen. Der Begriff Einschlussverbindung wurde von W. Schlenk jr.<sup>16)</sup> geprägt. M. F. Bengen<sup>17)</sup> entdeckte die Addukte des Harnstoffes mit Paraffinen und aliphatischen Sauerstoff-Verbindungen.

- <sup>9)</sup> O. Warburg u. W. Christian, ebenda 20, 980 [1932]. (Vgl. auch A. Seybold u. K. Egle, Biolog. Arch. 47, 578 [1940].)
- <sup>10)</sup> Eine Reihe anderer untersuchter Vinyl-Verbindungen (Vinyläther, Vinylster, Vinylamine, insbes. Vinylpyrrolidon) ließ sich weder thermisch noch katalytisch mit den genannten, vinylsubstituierten Chlorophyll- und Hämin-Derivaten copolymerisieren.
- <sup>11)</sup> F. Cramer, Chem. Ber. 84, 851, 855 [1951].
- <sup>12)</sup> F. Cramer, diese Ztschr. 64, 437 [1952].
- <sup>13)</sup> F. Schardinger, Z. Unters. Nahrungsmittel 6, 874 [1903]; F. Schardinger, Zbl. Bakteriol. Abt. II, 22, 98 [1909]; 29, 188 [1911].
- <sup>14)</sup> K. Freudenberg u. R. Jacobi, Liebigs Ann. Chem. 578, 102 [1935]. K. Freudenberg u. M. Meyer-Delius, Ber. dtsh. chem. Ges. 77, 1596 [1938]. K. Freudenberg, E. Plankenhorn u. H. Knauber, Liebigs Ann. Chem. 558, 1 [1945]. K. Freudenberg u. F. Cramer, Z. Naturforsch. 3b, 464 [1948]. W. Borchert, Z. Naturforsch. 3b, 464 [1948]. K. Freudenberg u. F. Cramer, Chem. Ber. 83, 296 [1950].
- <sup>15)</sup> K. Freudenberg, E. Schaaf, G. Dumpert u. Th. Ploetz, Naturwiss. 27, 850 [1939].
- <sup>16)</sup> W. Schlenk jun., Liebigs Ann. Chem. 565, 204 [1949]; 573, 142 [1951]. Fortschr. chem. Forsch. 2, 92 [1951]. Vgl. auch diese Ztschr. 62, 299 [1950].
- <sup>17)</sup> M. F. Bengen, diese Ztschr. 63, 207 [1951].

Die Harnstoff-Einschlussverbindungen sind nur kristallisiert beständig. Versuche, die Gastmolekeln zu entfernen, führen zum Zusammenbruch des Gitters. Aus den kristallisierten Cyclodextrin-Einschlussverbindungen lassen sich hingegen Leerstellen schon durch Aufbewahren an der Luft, wobei die flüchtige Komponente teilweise verdampft, erzeugen. Cramers Befunde über die spektralen Verschiebungen deuten sogar auf das Vorliegen von Einschlussverbindungen bereits in Lösung hin. Es erhob sich deshalb die Frage, ob das Prinzip der Einschlussverbindungen bei den Enzymen und deren Wirkungsweise eine Rolle spielt. Insbesondere angesichts der Befunde von H. Sobotka und Mitarbeitern<sup>18)</sup> an den Choleinsäuren, wonach sich L- und D-Formen optisch aktiver Gastmolekeln vermutlich durch Ausbildung diastereomerer Einschlussverbindungen bisweilen unterscheiden und enolisierbare Ketone bevorzugt in der Enolform eingeschlossen werden. Zu ähnlichen Ergebnissen gelangte F. Cramer<sup>19)</sup>: Bevorzugter Einschluss des einen Antipoden von „passenden“ racemischen Gastmolekeln und Beschleunigung der Oxydation enolisierbarer Ketone in Gegenwart von Cyclodextrinen als Folge der Einschließung.

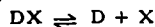
### 2. Einschlussbezirke

Schließlich war zu prüfen, ob die häufig beobachtete Verschiebung der Bandenmaxima von Farbstoffen in Lösungen makromolekularer Stoffe oder das Auftreten neuer Banden in Agarlösungen (L. Michaelis<sup>20)</sup>), der Umschlag von Indikatoren in geeigneten Konzentrationen oberflächenaktiver Stoffe (wie Seifen, G. S. Hartley<sup>21)</sup>) oder auch die spektralen Veränderungen, die Azofarbstoffe wie Methylorange in Gegenwart von manchen Eiweißstoffen (z.B. Rinderserumalbumin) erleiden, auf die Bildung von Einschlussverbindungen bzw. Einschlussbezirken zurückzuführen sind.

## III. Einschlussgleichgewichte

Sind die in Lösung beobachteten Effekte auf die Bildung von Verbindungen, d. h. von Molekelverbindungen etwa im Sinne Briegleb's<sup>21a)</sup> oder auf Assoziat-Bildung ohne definierte stöchiometrische Zusammensetzung („Schwarmbildung“) zurückzuführen? Für echte Einschlussverbindungen müßte gefordert werden, daß ihre Komponenten mit der Verbindung in einem, dem Massenwirkungsgesetz gehorchenden Gleichgewicht stehen.

Absorptionsspektrometrisch<sup>22)</sup> läßt sich die Gleichgewichtskonstante  $K_F$  durch Anwendung des Massenwirkungsgesetzes auf den Bildungs- bzw. Dissoziationsvorgang der Einschlussverbindung bestimmen:



$$\frac{[X][D]}{[DX]} = K_F$$

$$E = [E_X] + [E_{DX}]$$

wenn  $\epsilon' = \epsilon d$ , erhält man:

$$E = [X] \epsilon'_X + [DX] \epsilon'_{DX}$$

$$\text{da: } [X] + [DX] = c_X$$

erhält man:

$$\frac{\epsilon - c_X \cdot \epsilon'_{DX}}{c_X \epsilon'_X - E} = \frac{E - E_{DX}}{E_X - E} = \frac{K_F}{[D]}$$

D = Cyclodextrin  
X = Gastmolekel  
DX = Einschlussverbindung

E = Gesamtextinktion  
 $E_X$  und  $E_{DX}$  = Extinktion der Gastmolekel frei und im Einschluss

$\epsilon$  = molarer Extinktionskoeffizient

d = Schichtdicke

$c_X$  = Gesamtkonzentration der Gastmolekel

<sup>18)</sup> H. Sobotka u. A. Goldberg, Biochemic. J. 26, 905 [1932]. H. Sobotka u. J. Kahn, ebenda 26, 898 [1932].

<sup>19)</sup> F. Cramer, diese Ztschr. 64, 136 [1952].

<sup>20)</sup> L. Michaelis u. S. Granick, J. Amer. chem. Soc. 67, 1212 [1945].

<sup>21)</sup> G. S. Hartley, Trans. Faraday Soc. 30, 444 [1934].

<sup>21a)</sup> G. Briegleb: Zwischenmolekulare Kräfte u. Molekülstruktur; Stuttgart 1937.

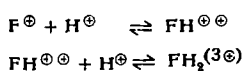
<sup>22)</sup> W. Broser u. W. Lautsch, Z. Naturforsch. 8b, 711 [1953].

Die Teilextinktionen  $E_X$  lassen sich bei der Dextrin-Konzentration Null,  $E_{DX}$  bei einem sehr großen Dextrin-Überschuß ermitteln. Anders ausgedrückt, man mißt die Extinktionen, wenn das Gleichgewicht einmal praktisch auf die linke, ein weiteres Mal auf die rechte Seite hin verschoben ist.

Es wurden mehrere Einschlußgleichgewichte von Cyclodextrinen mit Farbstoffen aus der Triphenylmethan-Reihe und mit Azofarbstoffen untersucht. Dafür war es erforderlich, zunächst die Prototropiegleichgewichte der Farbstoffe, die sich durch Variation des  $p_H$ -Wertes ergeben, zu ermitteln.

## 1. Das System $\beta$ -Dextrin/Kristallviolett

Im Falle des Kristallvioletts selbst liegen im  $p_H$ -Gebiet  $-1$  bis  $+3,5$  nebeneinander das ein-, zwei- und drei-säurige Farbstoffkation vor. Die Säure-Dissoziationskonstanten der Abdissoziation eines Protons aus dem 2- bzw. 3-fach geladenen Farbstoffkation erhält man durch Extinktionsbestimmung nach einer, dem Einschlußgleichgewicht entsprechenden Beziehung.



$$\frac{[F^{\oplus}][H^{\oplus}]}{[FH^{\oplus\oplus}]} = K_{S_1}$$

$$\frac{[FH^{\oplus\oplus}][H^{\oplus}]}{[FH_2^{\oplus\oplus\oplus}]} = K_{S_2}$$

$$\frac{E - E_{FH(2\oplus)}}{E_{F^{\oplus}} - E} = \frac{K_{S_1}}{[H]}$$

$$\frac{E - E_{FH_2(3\oplus)}}{E_{FH(2\oplus)} - E} = \frac{K_{S_2}}{[H]}$$

$$K_{S_1} = 1,09 \cdot 10^{-2}$$

$$pK_{S_1} = 1,96$$

$$K_{S_2} = 1,56 \cdot 10^{-1}$$

$$pK_{S_2} = 0,81$$

Prototropiegleichgewicht des Kristallviolett

$F^{\oplus}$  violetter, einsäuriger Farbstoffkation des Kristallviolett

$FH(2^+)$  – grünes, zweisäuriges Farbstoffkation

$FH_2(3^+)$  – gelbes, dreisäuriges Farbstoffkation

$K_{S_1}$  und  $K_{S_2}$  – Säuredissoziationskonstanten der Kationsäuren  $FH(2^+)$  bzw.  $FH_2(3^+)$

Bild 5 zeigt die auf Grund der Gleichgewichtskonstanten berechneten Prozentgehalte der einzelnen Ionen. Der  $p_H$ -Bereich von etwa 3,5–5, in denen das Kristallviolett ausschließlich als einwertiges Kation vorliegt, ist zur Messung von Einschlußgleichgewichten geeignet.

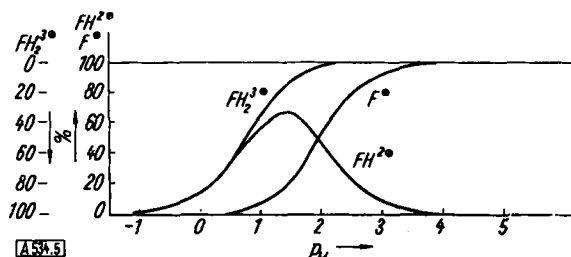


Bild 5  
Prototropiegleichgewicht von Kristallviolett

Wie F. Cramer<sup>23)</sup> beobachteten auch wir (Bild 6) bei 1000fachem Überschuß an  $\beta$ -Dextrin, verglichen mit dem ohne Zusatz von Dextrin ermittelten Spektrum des Kristallviolett bei  $p_H$  4,95 die Rotverschiebung von etwa 10  $m\mu$ . Die Auswahl einer geeigneten Wellenlänge, die eine möglichst große Extinktionsdifferenz ergibt (640  $m\mu$ ), die Bestimmung der Extinktionen in Abhängigkeit von der Dextrin-Konzentration, die in weiten Grenzen variiert wurde, liefern für 20° und 25 °C Meßpunkte, die auf den berechneten Kurven liegen (Bild 7), und damit das Vorliegen wirklicher Einschlußverbindungen in Lösung zeigen, schließlich die Ermittlung der Gleichgewichtskonstanten

<sup>23)</sup> F. Cramer, Chem. Ber. 84, 851, 855 [1951].

zulassen und die aus ihnen erchenbaren Reaktionsarbeiten bzw. Reaktionswärmen finden lassen.

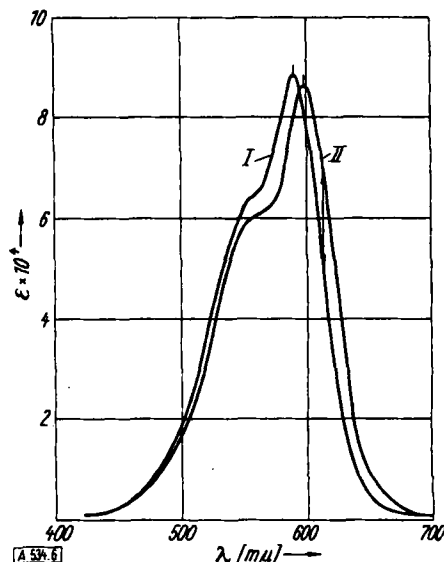
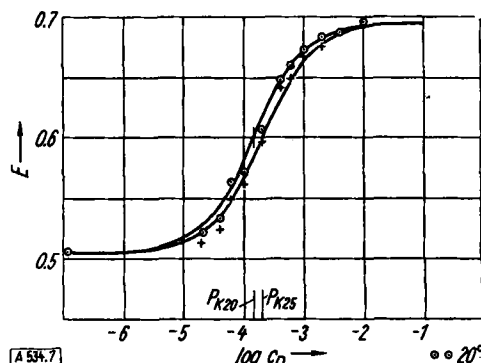


Bild 6. Spektrum von Kristallviolett ohne (I) und mit  $\beta$ -Dextrin (II)  
 $c_F = 10^{-4}$ ,  $c_D = 0,01$ ;  $p_H = 4,95$



$$K_{F_{20}} = 1,41 \cdot 10^{-4} \text{ mol/l}$$

$$pK_{20} = 3,85$$

$$K_{F_{25}} = 2,00 \cdot 10^{-4} \text{ mol/l}$$

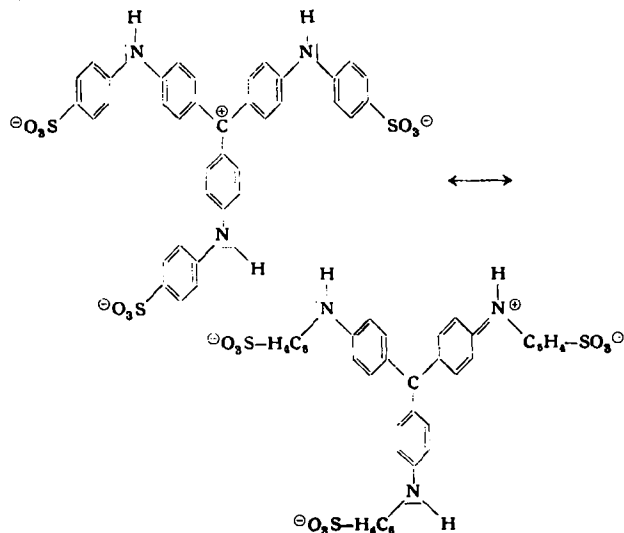
$$pK_{25} = 3,70$$

Aus:  $-RT \ln K_F = \Delta G^0 = \Delta H^0 - T\Delta S^0$   $\Delta G^0$  = Reaktionsarbeit  
 $\Delta H^0$  = Reaktionswärme  
 $\Delta S^0$  = Reaktionsentropie  
findet man:  $\Delta G^0_{20} = 5,16 \text{ kcal/mol}$ ,  $\Delta H^0_{22,5} = 12,2 \pm 3 \text{ kcal/mol}$

Bild 7. Gleichgewichte, Gleichgewichtskonstanten und Reaktionsarbeit bzw. Reaktionswärmen des Systems  $\beta$ -Dextrin-Kristallviolett

## 2. Das System $\beta$ -Dextrin/Wasserblau

Das System  $\beta$ -Dextrin/Wasserblau liegt (Bild 8) in 0,08n Salzsäure als mesomeres Ion vor. Die Rotbande



weist in Gegenwart von  $\beta$ -Dextrin wiederum eine Rotverschiebung von etwa 10  $m\mu$  auf. Die Vermessung der Extinktionen bei der Wellenlänge 653  $m\mu$  (geeignete Extinktionsdifferenz) führt (Bild 9) zu einem echten Gleichgewicht mit der aus der Kurve ermittelten Dissoziationskonstanten und aus ihr berechneten Reaktionsarbeit.

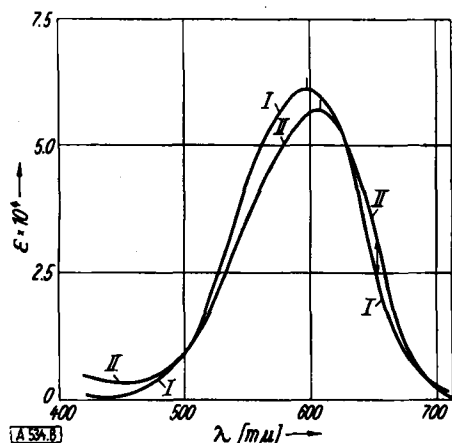


Bild 8  
Spektrum von Wasserblau ohne (I) und mit  $\beta$ -Dextrin (II)  
 $c_F = 10^{-5}$ ;  $c_D = 0,01$ ;  $0,08$  n HCl

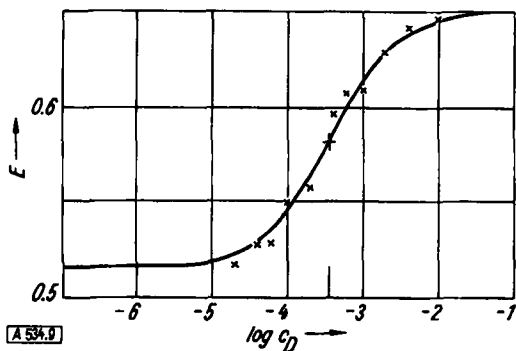


Bild 9  
Gleichgewicht  $\beta$ -Dextrin-Wasserblau.  $20^\circ\text{C}$ .  $0,08$  n HCl;  $653$   $m\mu$ ;  
 $c_F = 10^{-5}$ ;  $d = 1$  cm.  $K_F = 3,55 \cdot 10^{-4}$ ;  $pK_F = 3,45$ ;  $\Delta G^\circ = 4,62$  kcal/mol

### 3. Das System $\beta$ -Dextrin/Methylorange

Das System  $\beta$ -Dextrin/Methylorange sei erwähnt, weil es für die Befunde von J. M. Klotz<sup>24</sup>) an Eiweißlösungen und deren Deutung von Interesse ist. Die in Gegenwart von  $\beta$ -Dextrin für die alkalische und saure Form des Methylorange beobachteten Bandenveränderungen zeigt Bild 10.

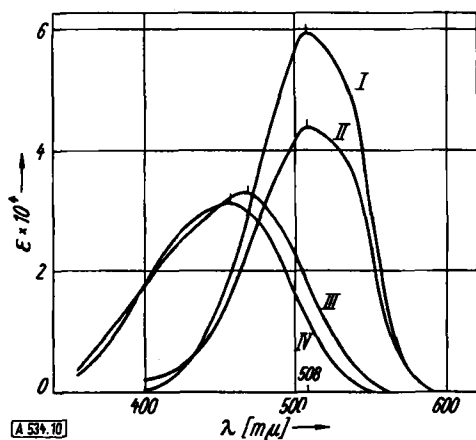


Bild 10  
Spektren von  $\beta$ -Dextrin-Methylorange;  $c_F = 10^{-4}$ ;  $c_D = 0,004$ ;  
I ohne Dextrin; II mit Dextrin in  $0,08$  n HCl; III ohne Dextrin;  
IV mit Dextrin bei  $pH = 6,08$

<sup>24</sup>) J. M. Klotz, J. Amer. chem. Soc. 68, 2299 [1946].

Das Bandenmaximum der alkalischen Form zeigt Blauverschiebung um etwa 12  $m\mu$ . Die Vermessung der Wellenlänge 508  $m\mu$  (Bild 11) bei wechselnder Dextrin-Konzentration ergibt das Vorliegen eines einfachen Gleichgewichtes

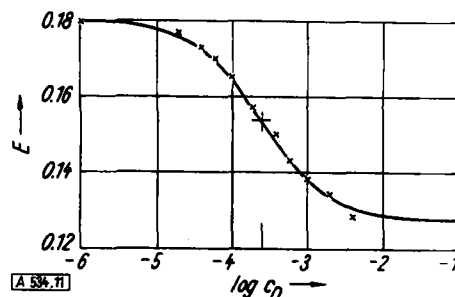


Bild 11  
Gleichgewicht  $\beta$ -Dextrin-Methylorange  $20,00^\circ\text{C}$ ;  $pH = 6,08$ ;  
 $508$   $m\mu$ ;  $c_F = 10^{-5}$ ;  $d = 1$  cm;  $K_F = 2,51 \cdot 10^{-4}$ ;  $pK_F = 3,60$ ;  
 $\Delta G^\circ = 4,8$  kcal/mol

in Lösung. Die Gleichgewichtskonstante ergab wiederum die Reaktionsarbeit. Tabelle 1 zeigt die Gleichgewichtskonstanten und Reaktionsarbeiten einiger Systeme.

Substanz	$K_F$ (mol/l)	$pK_F$	$\Delta G^\circ$ (kcal/mol)
$\beta$ -Dextrin-Kristallviolett	$1,41 \cdot 10^{-4}$	3,85	5,16
$\beta$ -Dextrin-Fuchsin	$1,26 \cdot 10^{-3}$	2,90	3,89
$\beta$ -Dextrin-Wasserblau	$3,55 \cdot 10^{-4}$	3,45	4,62
$\beta$ -Dextrin-Methylorange	$2,51 \cdot 10^{-4}$	3,60	4,80
$\gamma$ -Dextrin-Methylorange	$1,12 \cdot 10^{-4}$	3,95	5,25

Tabelle 1  
Gleichgewichtskonstanten und Reaktionsarbeiten der  
Einschluß-Verbindungen

Je größer die Reaktionsarbeit, um so größer ist die Stabilität der sich bildenden Einschlußverbindung. Man gelangt zu der Auffassung, daß die Einschlußverbindung des Methylorange mit  $\alpha$ -Dextrin stabiler ist als die mit  $\beta$ -Dextrin. Die Untersuchungen beweisen die strenge Gültigkeit des Massenwirkungsgesetzes und deuten damit auf das Vorliegen wirklicher Verbindungen in Lösung hin. Damit kann der Begriff der Einschlußverbindung bei den Cyclodextrinen auf den gelösten Zustand angewendet werden. Wir wollen unter Einschlußverbindungen in Lösung Gebilde verstehen, die dem Massenwirkungsgesetz gehorchen, deren Existenz dadurch bedingt ist, daß die Wirtsmolekel die Gastmolekel in sich einschließt, der räumliche Bau also entscheidend für das Zustandekommen der Verbindungsbildung ist.

Bei der Einschließung treten folgende Phänomene auf:

### IV. Prototropiegleichgewichte

Durch Einschließung wird die Säure-Dissoziationskonstante der Gastmolekeln verändert. Indikatoren, z. B. die in Cyclodextrine eingeschlossenen, behalten ihre Farbe in  $pH$ -Gebieten, in welchen sie sonst umzuschlagen pflegen. F. Cramer führte daher den Begriff „Raumalkalität“ ein.

Bild 12 zeigt die Prototropiegleichgewichte von Wasserblau bei wechselnden  $pH$ -Werten mit und ohne Zusatz von  $\beta$ -Dextrin. Die  $K_S$ -Werte unterscheiden sich um eine Zehnerpotenz. Tabelle 2 zeigt die allgemeine Gültigkeit dieser Beobachtung, wie auch ein Vergleich der  $pK_S$ -Werte für das 1- und 2-säurige Farbstoffkation des Fuchsin ergibt. Die Erniedrigung der  $pK_S$ -Werte bedeutet eine Azidifizierung durch Einschließung.

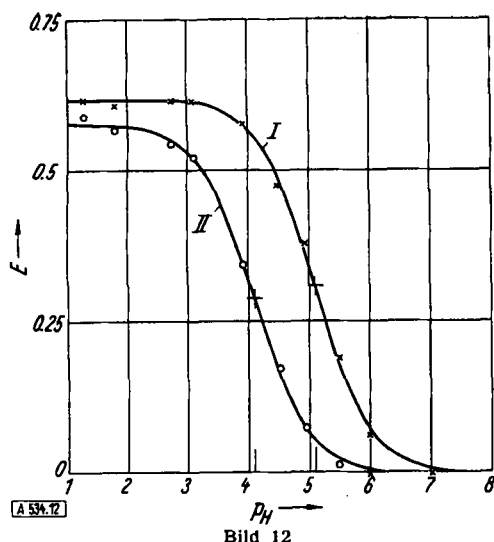


Bild 12

Prototropiegleichgewichte von Wasserblau (I) und  $\beta$ -Dextrin-Wasserblau (II), 20,00 °C;  $c_F = 10^{-5}$ ;  $c_D = 0,01$ ; 598 m $\mu$  (I) bzw. 608 m $\mu$  (II);  $K_S = 7,9 \cdot 10^{-6}$ ;  $K_{DS} = 7,9 \cdot 10^{-5}$ ;  $pK_S = 5,1$ ;  $pK_{DS} = 4,1$

Prototropiegleichgewicht	$pK_S$	$K_S$ (mol/l)
Wasserblau ohne Dextrin $F^\oplus + H_2O \rightleftharpoons FOH + H^\oplus$	5,1	$7,9 \cdot 10^{-6}$
mit Dextrin $DF^\oplus + H_2O \rightleftharpoons DFOH + H^\oplus$	4,1	$7,9 \cdot 10^{-5}$
Fuchsin ohne Dextrin $FH^\oplus \rightleftharpoons F^\oplus + H^\oplus$	1,48	$3,32 \cdot 10^{-2}$
mit Dextrin $DFH^\oplus \rightleftharpoons DF^\oplus + H^\oplus$	1,13	$7,42 \cdot 10^{-2}$
ohne Dextrin $F^\oplus + H_2O \rightleftharpoons FOH + H^\oplus$	7,60	$2,52 \cdot 10^{-8}$
mit Dextrin $DF^\oplus + H_2O \rightleftharpoons DFOH + H^\oplus$	7,12	$7,60 \cdot 10^{-8}$

Tabelle 2. Säuredissoziationskonstanten einiger Farbstoffe und deren Cyclodextrin-Einschlußverbindungen

## V. Redoxgleichgewichte<sup>24a)</sup>

Auch die  $p_K$ -Werte der Redoxgleichgewichte entspr. Systeme (z. B. Chinon/Hydrochinon, Leuko-/Carbinolbase des Kristallviolett) werden bei der Einschließung verändert. Für Chinon/Hydrochinon fanden wir für die Dextrin-freie Lösung  $p_K = +12,102$ , für die  $\alpha$ -Dextrin-haltige Lösung  $p_K = +12,085$ , und für das Redoxsystem Carbinol-/Leukobase des Kristallviolett bestimmten wir für die Dextrin-freie Lösung  $p_K = +10,04$  und in Gegenwart von  $\beta$ -Dextrin  $+10,31$ . Diese Ergebnisse bedürfen noch der Überprüfung und Ergänzung, sie gewinnen besondere Bedeutung angesichts der Tatsache, daß bei den meisten bisher untersuchten Hochpolymeren mit Redoxwirkungsgruppen eine Veränderung des Reduktionspotentials beim Vergleich mit den monomolekular dispers gelösten Wirkungsgruppen beobachtet wurde.

## VI. Die Frage der Einschlußbezirke von Hochpolymeren

### a) Eiweißkörper

Hinweise zur Frage, ob Eiweißkörper bisweilen zur Bildung von Einschlußverbindungen befähigt sind, finden sich in einer Arbeit von M. F. Perutz<sup>25)</sup> angedeutet.

<sup>24a)</sup>Anmerkg. b. d. Korrektur: Vgl. auch F. Cramer, diese Ztschr. 65, 320 [1953].

<sup>25)</sup>M. F. Perutz, Trans. Faraday Soc. 42, 187 [1946].

Wir haben diese Frage geprüft an den schon von J. M. Klotz<sup>24)</sup> beobachteten Verschiebungen der Bandenmaxima, die das Methylorange in Gegenwart von Rinderserumalbumin erleidet (Bild 13).

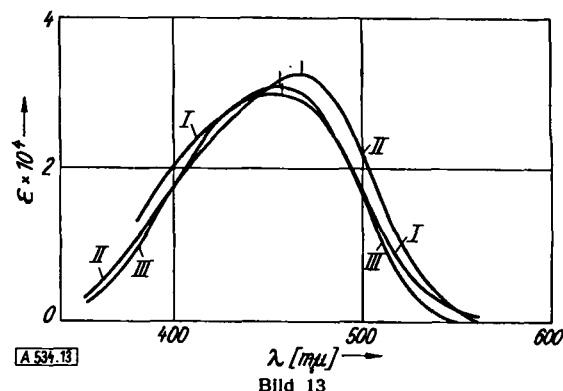


Bild 13

Spektren von: I. Rinderserumalbumin-Methylorange  $c_F = 10^{-5}$ ;  $p = 0,2\%$ ;  $p_H = 7,08$ . II. Methylorange  $c_F = 10^{-5}$ ;  $p_H = 6,08$ . III.  $\beta$ -Dextrin-Methylorange  $c_F = 10^{-5}$ ;  $c_D = 0,004$ ;  $p_H = 6,08$

Kurve I zeigt das Bandenmaximum der alkalischen Form des Methylorange in Gegenwart von Rinderserumalbumin bei 457 m $\mu$ . Es stimmt überein (Kurve III) mit dem Maximum der alkalischen Form des Methylorange in Gegenwart von  $\beta$ -Dextrin. Beide (nahezu identischen) Maxima zeigen demnach eine Verschiebung um 11 m $\mu$  gegenüber dem Absorptionsspektrum des Methylorange in Abwesenheit von Dextrin bzw. Albumin (Kurve II). Das Ergebnis der Gleichgewichtsmessungen, wobei der Albumin-Gehalt in % aufgetragen und innerhalb der Grenzen 0,002–2% variiert wurde, zeigt Bild 14.

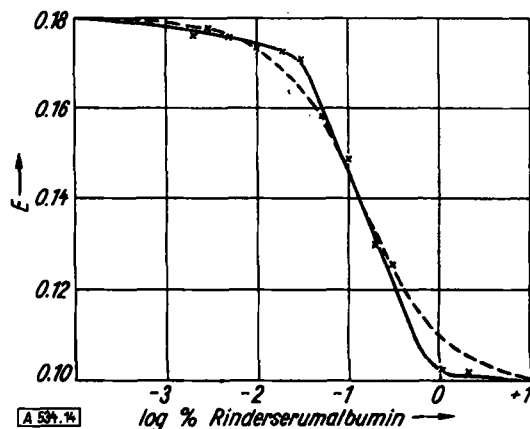


Bild 14

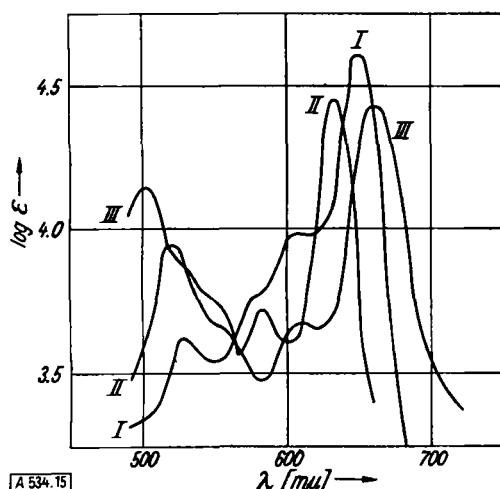
Abhängigkeit der Farbstärke des Methylorange von der Konzentration des Rinderserumalbumins, 20,00 °C.  $p_H = 7,08$ ; 508 m $\mu$ ;  $c_F = 10^{-5}$ ;  $d = 1$  cm

Die berechnete, gestrichelte Kurve weicht von der ausgezogenen, durch Verbindung der Meßpunkte erhaltenen ab. Das bedeutet, daß ein einfaches Gleichgewicht nicht vorliegt (Abweichungen bei niederen und hohen Albuminkonzentrationen), daß aber qualitativ eine auffallende Ähnlichkeit mit dem Verhalten von echten Einschlußverbindungen in Lösung besteht, so daß man geneigt ist, dem untersuchten Serumeiweißkörper Bezirke zuzuweisen, die zur Einschließung von Gastmolekeln befähigt sind. Demnach sind Verbindungen mit Einschlußbezirken durch eine eingeschränkte Gültigkeit des Massenwirkungsgesetzes gekennzeichnet, aber es tritt infolge vorhandener oder sich ausbildender räumlicher Verhältnisse auch hier vollständiger oder teilweiser Einschluß der Gastmolekel durch die Wirtsmolekel ein.

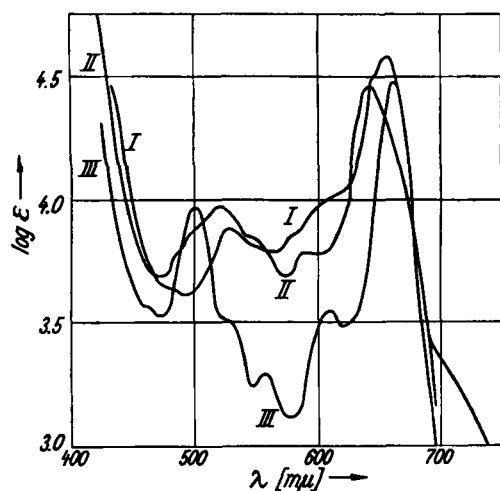
## b) Fermentmodelle

Einschlußbereiche wird man auch den von uns hergestellten Hochpolymeren mit Wirkungsgruppen zuweisen müssen (s. o.). Der Beweis sei durch Vergleich der Prototropiegleichgewichte<sup>26)</sup> des Chlorin-*e*<sub>8</sub>-dimethylester-6-säure-polyäthylenimids und des -äthylamids erbracht.

Bild 15



Spektrum des Chlorin-*e*<sub>8</sub>-dimethylester-6-säure-äthylamids in:  
I. 4,5n HCl II. Glykokollpufferlösung  $p_H = 1,7$   
III. Boratpufferlösung  $p_H = 8,5$



Spektrum des Chlorin-*e*<sub>8</sub>-dimethylester-6-säure-polyäthylenimids in:  
I. 1n HCl II. Acetatpufferlösung  $p_H = 4,0$   
III. Boratpufferlösung  $p_H = 8,5$

Die in Bild 15 sich entsprechenden Kurven I, II und III stellen die Absorptionsspektren des 2fach geladenen Kations (I), des einfach geladenen Kations (II) und der Base (III) dar. Nur die Rotbande des einfach geladenen Kations der Wirkungsgruppe in der hochmolekularen Verbindung zeigt gegenüber dem monomeren Amid eine Rotverschiebung von 12 mμ (vgl. Bild 1).

Die Ermittlung der Prototropiegleichgewichte für das monomere Amid führt zu  $p_{KS}$ -Werten von 0 und 2,7 (Bild 16).

Bei dem hochmolekularen Polyäthylenimid (Bild 17) führen die Extinktionsmessungen der Banden bei 644 und 664 mμ — deren Reversibilität der einigermaßen ausgeprägte isobestische Punkt zeigt — bei Variation des  $p_H$ -Wertes zu Wendepunkten beider Kurven im  $p_{KS}$ -Wert, der für das 1-säurige Kation bei  $p_K$  3,75 liegt und der

<sup>26)</sup> W. Broser u. W. Lautsch, Naturwiss. 38, 209 [1951].

von dem  $p_{KS}$ -Wert für das 1-säurige Kation des Monoamids um 1 bzw. deren Säuredissoziationskonstanten um

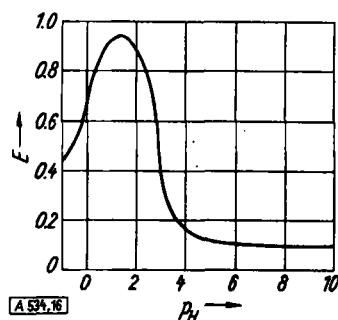
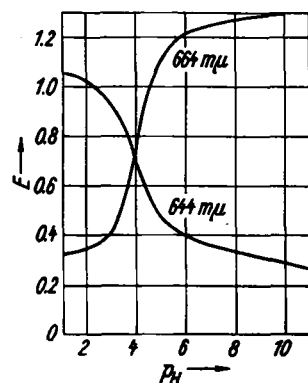
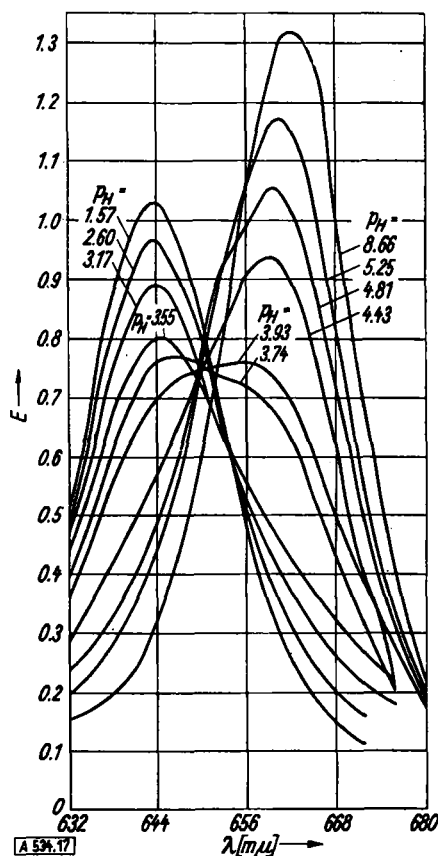


Bild 16  
Die  $p_H$ -Abhängigkeit der Extinktion des Chlorin-*e*<sub>8</sub>-dimethylester-6-säureäthylamids bei 639 mμ

eine Zehnerpotenz unterschieden sind. Es wird auf ähnliche Effekte bei den Säuredissoziationskonstanten der Dextrin-Einschlußverbindungen verwiesen.



Die  $p_H$ -Abhängigkeit der Extinktion bei I.  $\lambda = 644$  mμ, II  $\lambda = 664$  mμ.

Bild 17  
Die Abhängigkeit der langwelligen Bande des Chlorin-*e*<sub>8</sub>-dimethylester-6-säure-polyäthylenimids

Bei den besprochenen wirkungsgruppensubstituierten, hochmolekularen Verbindungen sowie den sog. „Adsorbaten“ des Rinderserumalbumins handelt es sich also um Systeme, welche die Einschließungsphänomene (Verschiebung der Bandenmaxima, Änderung der Säuredissoziationskonstanten und der Redoxgleichgewichtskonstanten) beinhalten. Auf Grund der bisherigen Untersuchungen scheint als Voraussetzung zu Einschließungsvorgängen durch hochmolekulare Stoffe das Vorhandensein (homöopolare Bindung) oder die Ausbildung (heteropolare Bindung) von Haftstellen notwendig zu sein. Es sei denn, daß durch bestimmte Konzentrationen die Annäherung von Wirts- und Gastmolekel erzwungen wird (System Polyvinylalkohol/Jod) oder daß die Makromolekel zum mindesten abschnittsweise in Lösung eine spiralförmige Anordnung der Kette zeigt (Systeme Amylose- bzw. Amylosepektin/Jod).

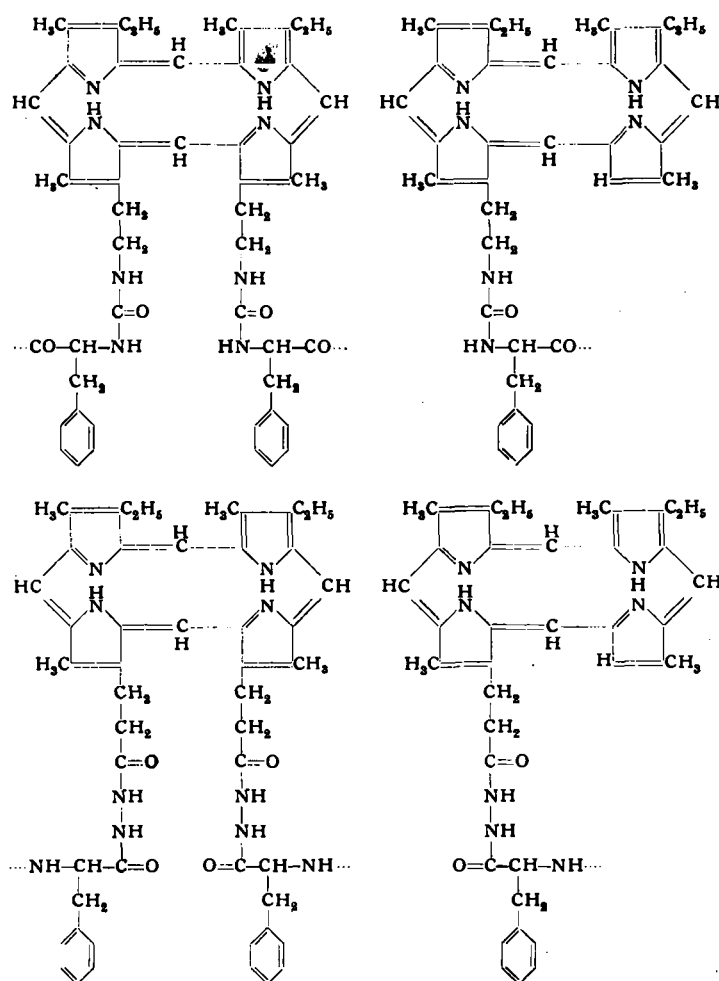
## VII. Polypeptide mit Wirkungsgruppen aus der Chlorophyll- und Hämin-Reihe

Biologisches Interesse, u. U. als Fermentmodelle, sollten Verbindungen besitzen, deren prosthetische Gruppen an einem Polypeptid haften<sup>9)</sup>.

### 1. Oxydase-Modelle

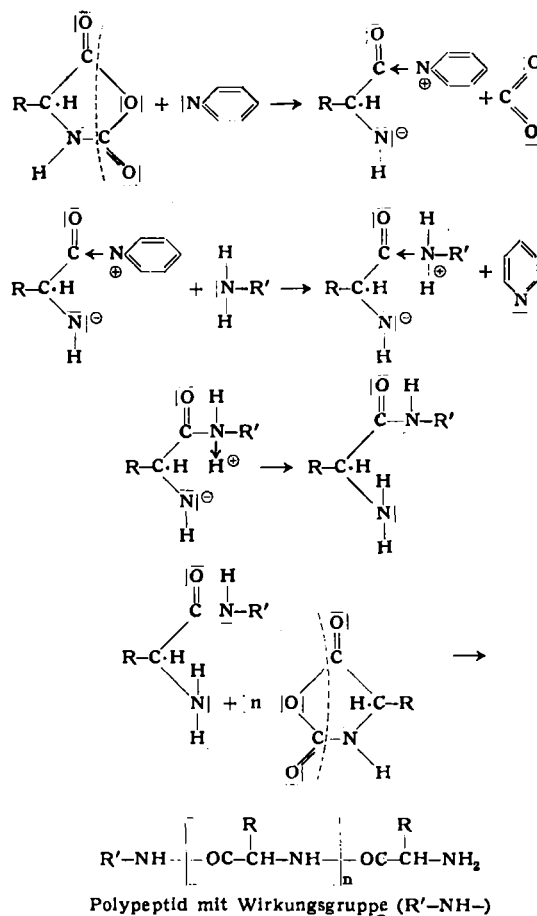
Wir stellten mit Wirkungsgruppen aus der Hämin- und Chlorophyll-Reihe substituierte D-, L- und D,L-Formen von Polyphenylalaninen<sup>27)</sup> durch Polykondensation der entspr. stereoisomeren N-Carbonsäureanhydride des Phenylalanins nach Th. Curtius<sup>28)</sup> bzw. F. Wessely<sup>29)</sup> dar. Die Polykondensation der N-Carbonsäureanhydride wird in Gegenwart der Azide bzw. Hydrazide des Mesoporphyrins-IX bzw. Pyrroporphyrins-XV vorgenommen.

Die Polykondensation führt im Falle des bifunktionellen Hydrazids bzw. Azids des Mesoporphyrins-IX zu einer in-mitten der Polypeptidkette, im Falle des Pyrroporphyrin-XV-hydrazids am Anfang bzw. Ende derselben stehenden prosthetischen Gruppe.



Mesoporphyrin-IX, bzw. Pyrroporphyrin-XV-polyphenylalanine

Mit Th. Wieland<sup>30)</sup> kann man sich die in Pyridin allein als Lösungsmittel bereits ablaufende Polykondensation über ein betainartiges Zwischenprodukt vorstellen; in Gegenwart der zugesetzten Hydrazide, die in einem nichtpolaren Lösungsmittel wie Benzol als die Polykondensation anstoßenden Initiatoren wirken, in Pyridin aber nur zusätzlich beschleunigen, kann man folgenden Reaktionsmechanismus diskutieren:



Die von uns auf ihre katalytischen Eigenschaften geprüften, wirkungsgruppensubstituierten Polypeptide (s.u.) stellen je nach Wirkungsgruppengehalt blaßrosa bis tiefrote, über 300 °C schmelzende, lichtempfindliche Pulver dar mit einem viscosimetrisch in m-Kresol bestimmten Polymerisationsgrad von etwa 50 (D,L-Form). Die D- und L-Formen sind in allen in Betracht kommenden Lösungsmitteln unlöslich; ihre optische Drehung läßt sich nicht bestimmen. Wir haben, wie an anderer Stelle gezeigt wird<sup>31)</sup>, die grundmolekulare Drehung unsubstituierter D- und L-Polyphenylalanine durch Extrapolation ermittelt (D-Form -175°, L-Form +175°). Die geprüften Pyrroporphyrin-XV-polyphenylalanine enthielten für die D,L-Form auf etwa 1200, für die Antipoden auf 600 Einheiten 1 Wirkungsgruppe. Es ist also nur etwa jede 12.-24. Polypeptidkette durch eine Wirkungsgruppe substituiert.

Die Absorptions- bzw. Reflexionsspektren der Poly-D,L-, L- und D-Phenylalanine mit Mesoporphyrin-IX bzw. Pyrroporphyrin-XV als Wirkungsgruppen zeigen Bild 18a und b.

Das Spektrum der Poly-L- und Poly-D-Verbindungen konnte nur durch Aufnahme des Reflexionsspektrums gewonnen werden.

Die Bandenmaxima der Mesoporphyrin-IX substituierten Polyphenylalanine stimmen untereinander und mit denjenigen der Wirkungsgruppe selbst (Mesoporphyrin-IX-dihydrazid) überein. Im Falle der Pyrroporphyrin-XV substituierten Polyphenylalanine hingegen zeigen die Polypeptide eine deutliche Rotverschiebung bis zu etwa 10 mμ, verglichen mit dem molekular dispers gelösten Pyrroporphyrin-XV-hydrazid.

In alle genannten Polyphenylalanine läßt sich mit Eisen(II)-acetat/Kochsalz Eisen komplex einführen. Die Häminspektren zeigt Bild 19.

<sup>27)</sup> W. Lautsch u. W. Biedermann, im Druck.

<sup>28)</sup> Th. Curtius u. W. Sieber, Ber. dtsch. chem. Ges. 55, 1543 [1922].

<sup>29)</sup> F. Wessely u. Mitarb., Hoppe-Seyler's Z. physiol. Chem. 146, 72 [1925]; 157, 91 [1926]; 159, 102 [1926].

<sup>30)</sup> Th. Wieland, diese Ztschr. 63, 11 [1951].

<sup>31)</sup> W. Lautsch, R. Schütze u. W. Broser, Kolloid-Z. 133, 1 [1953].



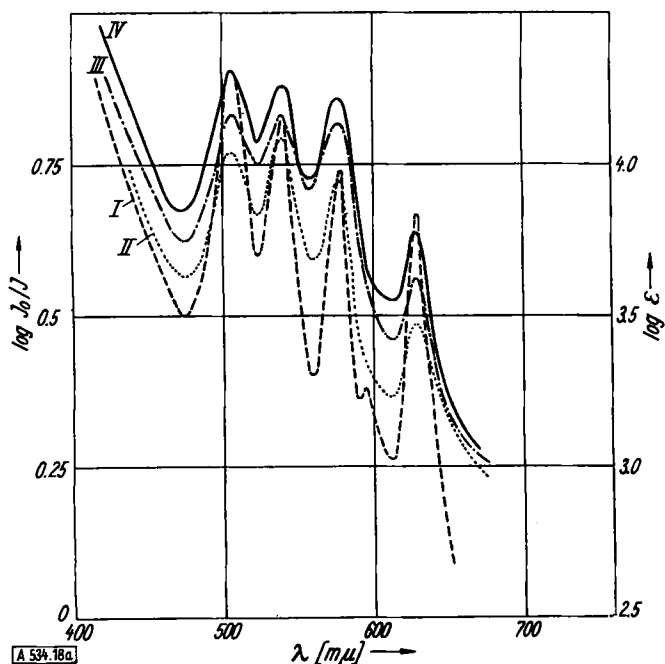


Bild 18a  
Absorptionsspektren von: I. Mesoporphyrin-IX-hydrazid;  
II. Mesoporphyrin-IX-poly-D,L-phenylalanin. Reflexionsspektren von  
III. Mesoporphyrin-IX-poly-L-phenylalanin; IV. Mesoporphyrin-IX-  
poly-D-phenylalanin

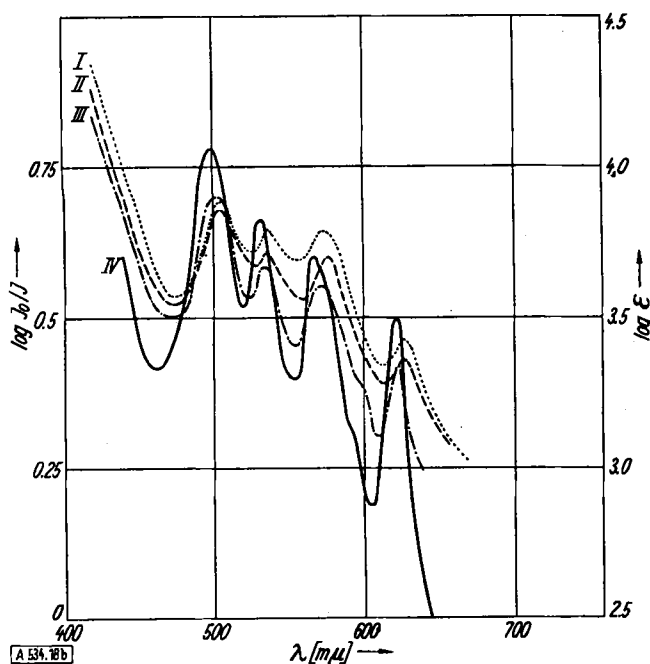


Bild 18b  
Reflexionsspektren von: I. Pyrroporphyrin-XV-poly-L-phenylalanin;  
II. Pyrroporphyrin-XV-poly-D-phenylalanin. Absorptionsspektren  
von: III. Pyrroporphyrin-IV-poly-D,L-phenylalanin; IV. Pyrropor-  
phyrin-XV-hydrazid

Wir haben den oxydativen Charakter der genannten Meso- und Pyrrohämin-Polyphenylalanine gegenüber L- und D,L-Cystein sowie L-Glutathion mit Hilfe der Warburg-Technik geprüft. Aus räumlichen Gründen seien nur die Meßergebnisse der drei Mesohämin-polyphenylalanine gegenüber L-Glutathion<sup>23)</sup> mitgeteilt (Bild 20).

Alle drei Polypeptide unterscheiden sich in ihrer katalytischen Wirksamkeit, insbes. beschleunigten die optischen Antipoden (Kurve 4 und 6) die Sauerstoff-Übertragung wesentlich stärker als die D,L-Form (Kurve 3). Sie

<sup>23)</sup> Die ausführlichen Ergebnisse der Dehydrierungen von L- und D,L-Cystein mit Hilfe von Oxydase-Modellen vgl. W. Lautsch u. W. Biedermann, im Druck.

unterscheiden sich jedoch auch untereinander. Dies ist durch Annahme diastereomerer Zwischenverbindungen ohne weiteres verständlich. Wir haben jedoch entsprechende Effekte auch gegenüber D,L-Cystein erhalten, die noch der Aufklärung bedürfen. Ob die beobachteten Unterschiede mikromorphologischen Ursprungs sind, wird noch untersucht. Die Meßergebnisse mit dem Pyrrohämin-Polyphenylalanin gegenüber L-Glutathion entsprechen denjenigen mit Mesohäminpolypeptid.

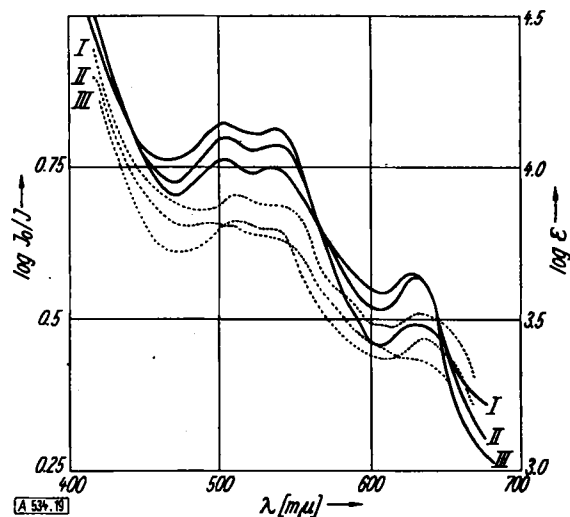


Bild 19  
Absorptionsspektren (D,L-Verbindungen) und Reflexionsspektren (D- und L-Verbindungen) von I, II, III (—) Eisenkomplexsalzen der Mesoporphyrin-IX-poly-phenylalanine (D,L-, D- und L-Form) und I, II, III (---) Eisenkomplexsalzen der Pyrroporphyrin-XV-poly-phenylalanine (D,L-, D- und L-Form)

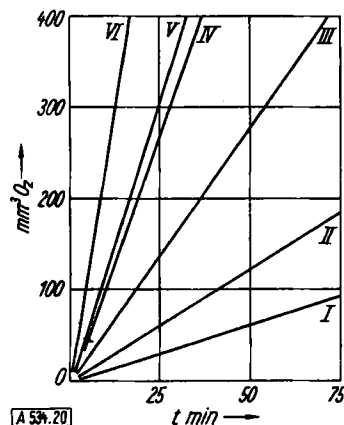


Bild 20  
1. Blindwert; 2. Eisenion 1 γ; 3. Mesohämin-IX-D,L-polyphenylalanin (15 γ Fe); 4. Mesohämin-IX-L-polyphenylalanin (15 γ Fe); 5. Katalytische Wirksamkeit von Mesohämin-IX-D-polyphenylalanin bei gleicher Substanzmenge wie bei 4. 6. Mesohämin-IX-D-polyphenylalanin (15 γ Fe). 20,00 °C; p<sub>H</sub> = 8,0; Phosphat-Boratpuffer + 50 mg L-Glutathion in je 7,5 cm³ Gesamtvolumen

## 2. Versuche zur Synthese von Cytochrom-Modellen

In der Reihe der Sauerstoff-übertragenden, Eisen-haltigen Fermente kommt den von D. Keilin<sup>24)</sup> entdeckten Cytochromen besondere biologische Bedeutung zu, hat doch O. Warburg<sup>25)</sup> gezeigt, daß die gesamte Atmung in aeroben Zellen über das Cytochrom-System verläuft. Unter den Cytochromen ist die Konstitutionsaufklärung der C-Komponente, die 1939 von H. Theorell<sup>26)</sup> zum 1. Mal (mit einem Eisengehalt von 0,43 %) aus Herzmuskulatur rein dargestellt wurde, durch Abbaureaktionen von H. Theorell<sup>26)</sup> und K. Zeile<sup>27)</sup> sowie durch die synthetischen

<sup>24)</sup> D. Keilin, Proc. Roy. Soc. [London] B 98, 312 [1925]; 100, 129 [1926]; 104, 206 [1929]; 106, 418 [1930].

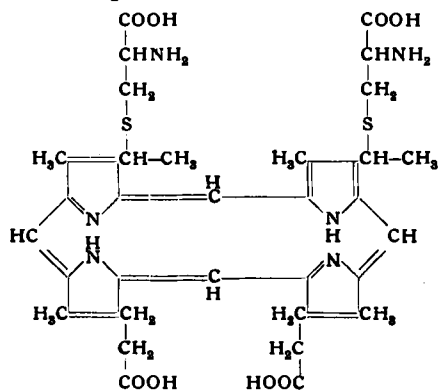
<sup>25)</sup> O. Warburg, Naturwiss. 22, 441 [1934].

<sup>26)</sup> H. Theorell u. A. Akeson, Science [New York] 90, 67 [1939].

<sup>27)</sup> K. Zeile u. F. Reuter, Hoppe-Seylers Z. physiol. Chem. 221, 101 [1933]. H. Theorell, Biochem. Z. 298, 242 [1938]. K. Zeile u. H. Meyer, Naturwiss. 27, 596 [1939]; s. a. Hoppe-Seylers Z. physiol. Chem. 262, 178 [1939/40].

<sup>28)</sup> K. Zeile u. H. Meyer, Hoppe-Seylers Z. physiol. Chem. 262, 178 [1939/40].

Arbeiten von K. Zeile im Hinblick auf die Struktur und die Bindungsart der prosthetischen Gruppe, sowie im Hinblick auf die am Aufbau der Protein-Komponente beteiligten Aminosäuren am weitesten vorangeschritten.



Konstitution der prosthetischen Gruppe nach K. Zeile.

Fraktion	Anzahl von Mol/Mol	Anzahl von N-Atomen	% von Gesamt-N
Porphyrin c	1	6	4,2
Histidin	3	9	6,3
Arginin	2	8	5,6
Lysin	22	44	30,8
Cystin	1 ?	2	1,4
Tyrosin	5	5	3,5
Tryptophan	1	2	1,4
Glutamin- + Asparaginsäure	19	19	13,3
Amid-N	8	8	5,6
Leucin (+ Isoleucin + Phen.ala. ?)	9	9	6,3
(Alanin + Glycin + Valin + Oxycalin)-Fraktion	33	33	23,1
Summe		143	100,0

Tabelle 3

N-Verteilung auf die verschiedenen Aminosäuren nach H. Theorell

Das Problem ist von H. Theorell mit folgenden Worten gekennzeichnet worden<sup>28)</sup>: „Man hat sich alleu lange damit begnügt, ganz allgemein der Proteinkomponente eine differenzierende Rolle zuzuschreiben. Denkt man näher über diese Rolle nach, so findet man folgendes: die katalytische Funktion findet am Eisenatom statt. Daraus kann man schließen, daß die Bindungsart des Eisens und die Natur der mit dem Eisen verknüpften oder benachbarten Gruppen für die Wirkungsweise des Eisens bestimmend sind“. Mit dieser, zweifellos den Kern des Problems treffenden Auffassung soll nicht die Bedeutung der Proteinkomponente etwa bei der Energiefortleitung übersehen werden.

<sup>28)</sup> H. Theorell, „Einige neue Untersuchungen über Cytochrome, Peroxydasen und Katalasen“, Erg. Enzym. IX, 233 [1943].

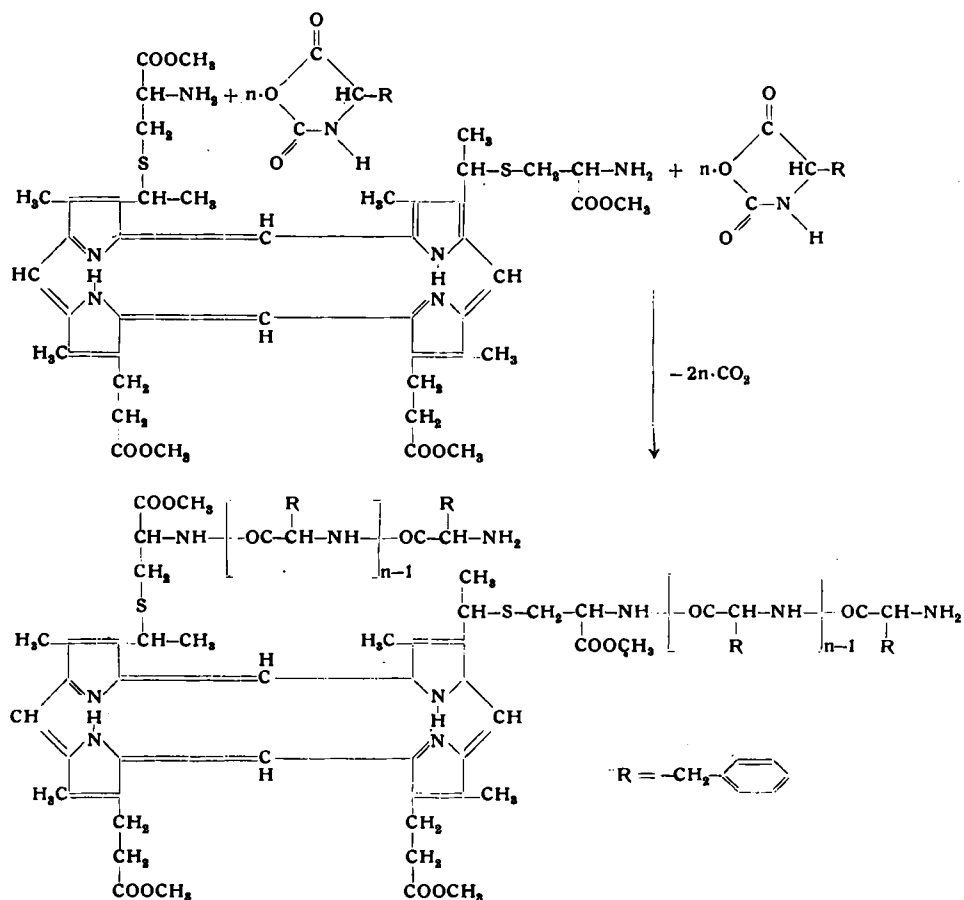
Unsere ersten Bemühungen, Cytochrom-Modelle aufzubauen, bestanden in der Umsetzung des nach K. Zeile durch Anlagerung von Bromwasserstoff an Protoporphyrin IX und anschließender Umsetzung des mit L-Cystein zugänglichen Cytoporphyrinesters mit den N-Carbonsäureanhydriden des D-, L- und D,L-Phenylalanins durch Polykondensation in benzolischer oder pyridinischer Lösung. Die prosthetische Gruppe ist in echter Peptid-Bindung mit den Polyphenylalanin-Ketten verbunden. (Formeln s. unten).

Von den drei Formen ist nur die DL-Form Pyridin-löslich. Die aktiven Formen scheiden sich schon während der Polykondensation aus. Aus dem viscosimetrisch bestimmten Molekulargewicht der Pyridin-löslichen D,L-Form ergab sich, daß an der bifunktionellen Wirkungsgruppe je eine Polyphenylalanin-Kette mit etwa 100 Einheiten hängt. In alle Präparate wurde Eisen komplex eingeführt. Eisengehalte:

Cytohämin-poly-D,L-phenylalanin 0,12% Fe  
Cytohämin-poly- D-phenylalanin 0,13% Fe  
Cytohämin-poly- L-phenylalanin 0,08% Fe

Bild 21 zeigt die Absorptionsspektren des Cytoporphyrin-tetramethylesters (1) und des Cytoporphyrin-poly-D,L-phenylalanins (2). Die Bandenmaxima stimmen unter sich und mit dem Porphyrin c des Cytochroms c überein.

Bild 22 zeigt die Absorptionsspektren in Pyridin des Cytohämin-tetramethylesters (1), des Cytohämin-poly-D,L-phenylalanins (3) und die durch Reduktionsmittelzusatz aus ihnen erzeugten reinen Hämochromogen-Spektren (2 u. 4). Aus den Spektren ist zu entnehmen: in pyridinischer Lösung liegen beide Hämine überwiegend als Hämochromogene vor, ihre Bandenmaxima stimmen mit denen



der reinen Hämochromogen-Spektren überein. Beim Vergleich des Spektrums der pyridinischen Lösung des Cytohäminesters mit demjenigen des Cytoporphyrinpoly-D,L-phenylalanins ergibt sich im ersteren Falle ein stärker ausgeprägtes Hämochromogen-Spektrum. Im übrigen stimmen die Bandenmaxima der Hämochromogene der synthetischen Verbindungen (550 und 521  $m\mu$ ) mit denen der

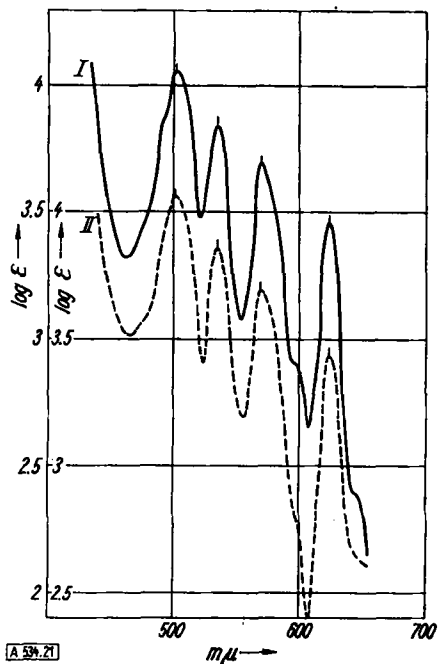


Bild 21  
Absorptionsspektren in Pyridin. 1.) Cytoporphyrin-tetramethylester; 2.) Cytoporphyrin-poly-D,L-phenylalanin

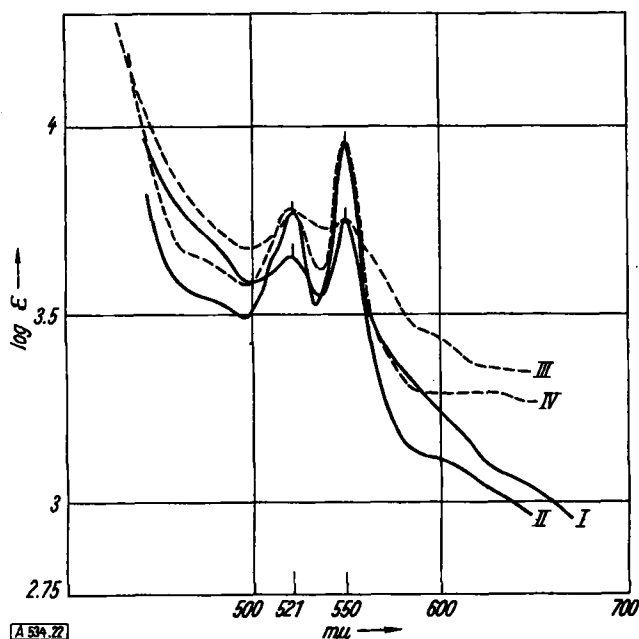


Bild 22  
Absorptionsspektren in Pyridin; 1.) Cytohämin-tetramethylester; 2.) Hämochromogen; 3.) Cytohämin-poly-D,L-phenylalanin; 4.) Hämochromogen

Pyridin-Hämochromogene des Cytochroms c nach D. Keilin und Mitarbeitern<sup>39)</sup> (550 und 520  $m\mu$ ) überein. Das Reflexionsspektrum des Cytohämin-poly-D,L-phenylalanins (Trockenpräparat) zeigt Bild 23.

<sup>39)</sup> R. Hill, D. Keilin, Proc. Roy. Soc. [London] B 107, 291 [1930].  
M. Dickson, R. Hill u. D. Keilin, ebenda 109, 29 [1932].

Auf die Übereinstimmung der Bandenmaxima mit den Eisen(III)-cytochrom c (Form I nach H. Theorell und A. Akeson<sup>40)</sup> bei  $p_H = -0,3$  wird hingewiesen.

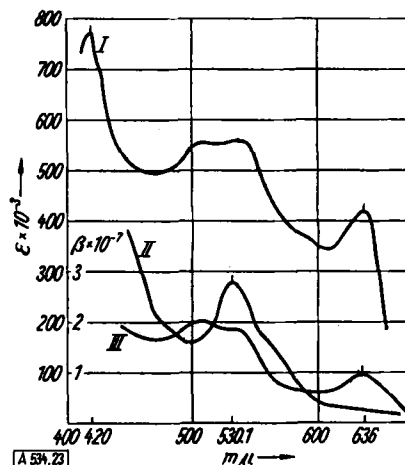


Bild 23  
I. Reflexionsspektrum des Cytohämin-poly-D,L-phenylalanins; II. Absorptionsspektrum von Eisen(III)-cytochrom C bei  $p_H = 7$  (n. Theorell); III. Absorptionsspektrum von Eisen(III)-cytochrom C bei  $p_H = -0,3$  (n. Theorell)

#### b) Messung der katalytischen Wirksamkeit

Die katalytischen Eigenschaften der mit Cytohämin-Wirkungsgruppen substituierten Polyphenylalanine wurden auf die Beschleunigung der Sauerstoff-Übertragung bei der Dehydrierung von p-Phenylendiamin unter vergleichbaren Bedingungen (5  $cm^3$  Phosphatpuffer  $p_H$  7,3, enthaltend  $5/100$  m p-Phenylendiamin) untersucht und mit dem molekular dispers gelösten Cytohäminester verglichen. Bild 24 unterrichtet über die Meßergebnisse an der D,L-Form: Ein Vergleich der katalytischen Wirksamkeit des

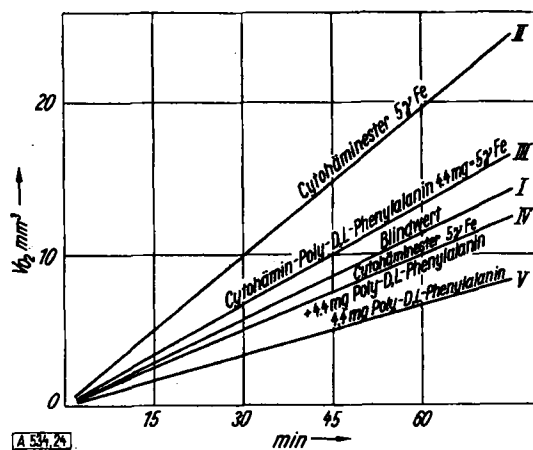


Bild 24  
Dehydrierung von 27 mg p-Phenylendiamin in 5  $cm^3$  Phosphatpuffer  $p_H = 7,3 + 0,1$   $cm^3$  Pyridin; 20,0 °C

molekular dispers gelösten Cytohäminesters mit den Wirkungsgruppen-substituierten Polyphenylalaninen muß den Adsorptionsverhältnissen Rechnung tragen, da es sich in einem Fall um eine homogene, im anderen um eine heterogene Katalyse handelt. Es ist also nur zulässig, die Geschwindigkeit der Sauerstoff-Übertragung durch das Cytohäminpoly-D,L-phenylalanin mit dem sich ergebenden Blindwert in Gegenwart derselben zugesetzten Menge an nichtsubstituiertem Poly-D,L-phenylalanin zu vergleichen, die der Menge des Wirkungsgruppen-substituierten Polyphenylalanins entspricht.

<sup>40)</sup> H. Theorell u. A. Akeson, J. Amer. chem. Soc. 63, 1812 [1941].

Kurve	Modell	$\frac{\Delta v_{O_2}}{\Delta t}$ mm <sup>3</sup> h <sup>-1</sup> Pyridin	katalytische Wirkung mm <sup>3</sup> h <sup>-1</sup> Pyridin
I	$\frac{5}{100}$ m p-Phenylendiamin (5 cm <sup>3</sup> )	12,5	
II	+ Cytohäminester (5 $\gamma$ Fe)	21,3	+ 8,8
III	+ Cytohämin-poly-D,L-Phenylalanin 4,4 mg = 5 $\gamma$ Fe	14,4	+ 7,0
IV	+ 4,4 mg Poly-D,L-Phenylalanin + Cytohäminester 5 $\gamma$ Fe	10,9	+ 3,5
V	+ 4,4 mg Poly-D,L-Phenylalanin	7,4	- 5,1

Tabelle 4

Dehydrierung von p-Phenylendiamin durch Modelle mit Poly-D,L-phenylalanin in Phosphatpuffer  $p_H = 7,3$  bei 20,0 °C

Unter diesem Gesichtswinkel (s. Tabelle 4) zeigt überraschenderweise das Cytohämin-poly-D,L-phenylalanin (III) eine doppelt so große katalytische Wirksamkeit wie die entsprechend zusammengesetzte Mischung der Komponenten aus Polypeptid + gelöster Wirkungsgruppe (IV). Die katalytische Wirkung des Fermentmodells (III) entspricht nahezu derjenigen der gelösten Wirkungsgruppe.

Wir sind hier zum erstenmal einer Erhöhung der katalytischen Wirksamkeit durch Fixierung der Wirkungsgruppe an einen hochmolekularen Träger begegnet. Dies trat besonders in Erscheinung beim Studium der stereoisomeren Polyphenylalanine.

Beim Cytohämin-poly-D-phenylalanin (wie auch bei seinem Antipoden) sind die Adsorptionseigenschaften der Polypeptidkette noch stärker ausgeprägt, wie Bild 25 zeigt.

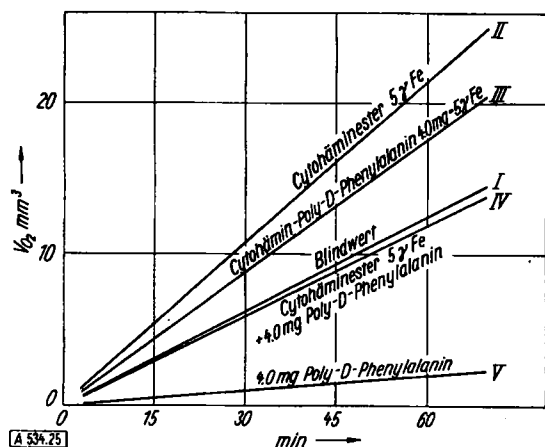


Bild 25

Dehydrierung von 27 mg p-Phenylendiamin in 5 cm<sup>3</sup> Phosphatpuffer  $p_H = 7,3$  + 0,1 cm<sup>3</sup> Pyridin; 20,0 °C

In Gegenwart der dem Fermentmodell entsprechenden zugesetzten Menge an Poly-D-phenylalanin sinkt der Quotient  $\frac{\Delta v_{O_2}}{\Delta t}$  auf etwa  $\frac{1}{6}$ . Die erstaunlich hohe Hemmung durch die zugesetzte D-Form wurde besonders untersucht (Bild 26).

Die optimale Hemmung wird unter den genannten Bedingungen durch 4 mg zugesetztes Poly-D-phenylalanin herbeigeführt. Diese Polypeptid-Menge stimmt zufällig überein mit der verwendeten Menge an Fermentmodell im Oxydasetest: d. h. daß bei den oxydatischen Messungen mit derjenigen kleinsten Peptidmenge gearbeitet wurde, die die maximale Hemmung verursachte.

Aus Tabelle 5 ist zu entnehmen, daß das Fermentmodell unter den bei der D,L-Form besprochenen Voraussetzungen für den Vergleich der katalytischen Wirksamkeit eine um

50% größere katalytische Leistung entfaltet als die mengenmäßig gleiche Mischung der Komponenten und eine beinahe doppelt so große wie der molekular dispers gelöste Cytohäminester.

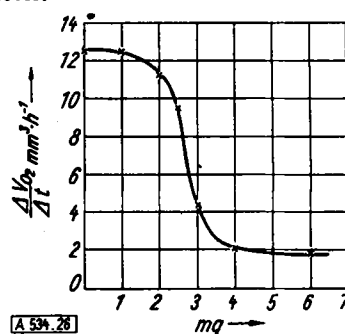


Bild 26

Dehydrierung von p-Phenylendiamin in Gegenwart von Poly-D-phenylalanin und 0,1 cm<sup>3</sup> Pyridin; 20,0 °C; 5 cm<sup>3</sup> Phosphatpuffer  $p_H = 7,3$

Kurve	Modell	$\frac{\Delta v_{O_2}}{\Delta t}$ mm <sup>3</sup> h <sup>-1</sup> Pyridin	katalytische Wirkung mm <sup>3</sup> h <sup>-1</sup> Pyridin
I	$\frac{5}{100}$ m p-Phenylendiamin (5 cm <sup>3</sup> )	12,5	
II	+ Cytohäminester (5 $\gamma$ Fe)	21,3	+ 8,8
III	+ Cytohämin-poly-D-Phenylalanin 4,0 mg = 5 $\gamma$ Fe	17,6	+ 15,5
IV	+ 4 mg Poly-D-Phenylalanin + Cytohäminester (5 $\gamma$ Fe)	12,1	+ 10,0
V	+ 4 mg Poly-D-Phenylalanin	2,1	- 10,4

Tabelle 5

Dehydrierung von p-Phenylendiamin durch Modelle mit Poly-D-phenylalanin in Phosphatpuffer  $p_H = 7,3$  bei 20,00 °C

Das Cytohämin-poly-L-phenylalanin verhält sich wie sein Antipode. Die etwas größere Einwaage an Polypeptid und Fermentmodell (6 statt 4 mg) wird durch den etwas geringeren Eisengehalt des L-Antipoden bedingt.

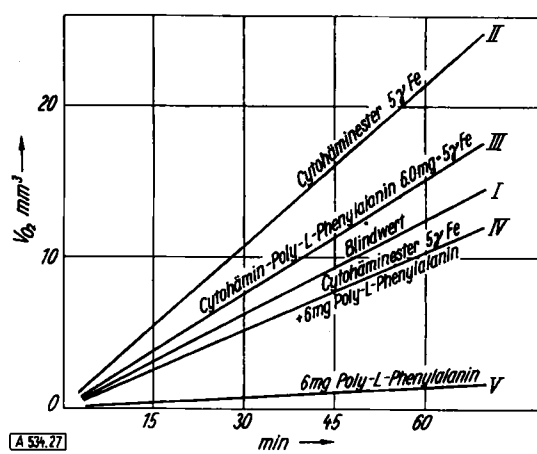


Bild 27

Dehydrierung von 27 mg p-Phenylendiamin in 5 cm<sup>3</sup> Phosphatpuffer  $p_H = 7,3$  + 0,1 cm<sup>3</sup> Pyridin; 20,0 °C

Bild 27 zeigt die der höheren Peptidmenge im Vergleich zum D-Antipoden entsprechend größere Hemmung durch das zugesetzte Peptid (V), die auf diesen „Blindwert“ zu beziehende katalytische Wirkung des Fermentmodells (III) und die wesentlich geringere katalytische Leistung der gewichtsentsprechenden Mischung der Komponenten (IV).

Auf den „Blindwert“ (V) bezogen, ergibt sich, wie Tabelle 6 zeigt, daß das Fermentmodell (III) ein innerhalb

Kurve	Modell	$\frac{\Delta v_{O_2}}{\Delta t}$ mm <sup>3</sup> h <sup>-1</sup> Pyridin	katalytische Wirkung mm <sup>3</sup> h <sup>-1</sup> Pyridin
I	$\frac{5}{100}$ m p-Phenylendiamin (5 cm <sup>3</sup> )	12,5	
II	+ Cytohäminester (5 $\gamma$ Fe)	21,3	+ 8,8
III	+ Cytohämin-poly-L-Phenylalanin 6 mg = 5 $\gamma$ Fe	15,1	+ 13,3
IV	+ 6 mg Poly-L-Phenylalanin + Cytohäminester (5 $\gamma$ Fe)	10,1	+ 8,6
V	+ 6 mg Poly-L-phenylalanin	1,8	- 10,7

Dehydrierung von p-Phenylendiamin durch Modelle mit Poly-L-phenylalanin in Phosphatpuffer  $p_H = 7,3$  bei 20,00 °C

der Fehlergrenze der Messungen (bei den ungelösten Präparaten mindestens 10%) entsprechendes Verhältnis im Hinblick auf seine katalytische Wirkung aufweist wie das Wirkungsgruppen-substituierte D-Polypeptid. Es beschleunigt die Sauerstoff-Übertragung stärker als die Mischung der Komponenten und als die monomolekulardispers gelöste prosthetische Gruppe.

### c) Diskussion der Ergebnisse

Die genannten Cytohämin-polyphenylalanine stellen Oxydasen dar, d. h. sie sind autoxydabel im Gegensatz zum Cytochrom c. Dies ist aus den letztgenannten Formeln verständlich: Die Amino-Gruppen des Cytohämins sind peptidartig mit der Polyphenylalanin-Kette verbunden und scheiden als intramolekulare Hämochromogen-Bildner aus. Daraus folgt auch, daß der Cytohäminester eine geringere oxydatische Wirkung entfaltet als die drei Wirkungsgruppen-substituierten Polypeptide.

Cytochrom c ist weder autoxydabel, noch ist es unter physiologischen Bedingungen — sogar innerhalb eines weiten  $p_H$ -Bereichs (etwa 2–10) — durch Kohlenoxyd hemmbar. H. Theorell<sup>38)</sup> hat auf Grund spektrophotometrischer Messungen beide Tatsachen gedeutet: Das Cytochrom c liegt in vier Formen bei verschiedenen  $p_H$ -Werten vor, deren  $p_K$ -Werte zu 0,42, 2,5, 9,35 und 12,76 ermittelt wurden. Nur in stark saurer Lösung ist das Eisenatom an vier N-Atome gebunden. Es liegt hier (im reduzierten Zustande) als Häm vor, ist autoxydabel und liefert eine Kohlenoxyd-Verbindung.

Die Untersuchungen über das Säure- und Basen-Bindungsvermögen des Eisen(III)- bzw. Eisen(II)-cytochroms führten H. Theorell<sup>38)</sup> zur Auffindung einer schwach wirkenden Gruppe mit einem  $p_K$ -Wert von etwa 9,8, ein  $p_H$ -Bereich, in dem ausschließlich Imidazol-Gruppen titriert werden, woraus geschlossen wurde, daß im Cytochrom c zwei Imidazol-Gruppen des Histidins als intramolekulare Hämochromogenbildner fungieren. Unter physiologischen Bedingungen (Form III) werden beide Imidazol-Gruppen zur Hämochromogen-Bildung beansprucht.

Auf die hohe Affinität des Imidazol-Ringes zum Hämatin hatte übrigens bereits 1932 W. Langenbeck<sup>41)</sup> hingewiesen. Unter physiologischen Bedingungen ist das Eisen(II)-cytochrom zur Eisen(III)-Form erst mit Hilfe von Oxydationsmitteln oxydierbar, die „stärker“ sind als molekularer Sauerstoff ( $H_2O_2$  z. B.). Ein solches Oxydationsmittel ist das Eisen(III) des Sauerstoff-übertragenden Fermentes (O. Warburg<sup>34)</sup>). Vermutlich ist die Cytochromoxydase mit dem Warburgschen Ferment identisch.

<sup>41)</sup> W. Langenbeck, Ber. dtsh. chem. Ges. 65, 842 [1932].

Wir haben trotz der oxydatischen Eigenschaften unseres Fermentmodells geprüft, ob das Hämin IX als Oxydase des Cytohämin-poly-D,L-phenylalanins fungieren kann. Zunächst wurde das System Cytohäminester/Hämin, also die Verhältnisse in Lösung untersucht.

Wie zu erwarten, liegt keine Übertragungsreaktion vor. Die von uns gemessenen Kurven laufen parallel, die Differenz der  $\frac{\Delta v_{O_2}}{\Delta t}$ -Werte ist gleich der Wirkung des Cytohäminesters allein.

Am System Cytohämin-poly-D,L-phenylalanin/Hämin schienen die Messungen zunächst auf eine Übertragungsreaktion hinzudeuten:

Bis zum Molverhältnis Cytohämineisen/Hämineisen = 4:1 steigen die  $\frac{v_{O_2}}{\Delta t}$ -Werte mit wachsendem Hämin-Zusatz steil an. Bei höherem Zusatz von Hämin beobachtet man aber einen linearen Verlauf. Die Befunde erklären sich aus der starken Hemmung der Sauerstoff-Übertragung bei kleinen Hämin-Zugaben durch Absorptionserscheinungen am Polypeptid.

Zu ähnlichen Ergebnissen sind wir bei der Prüfung der Systeme Cytohämin-poly-D- bzw. L-phenylalanin/Hämin gelangt. Die  $\frac{\Delta v_{O_2}}{\Delta t}$ -Werte für die drei Fermentmodelle stehen in guter Übereinstimmung mit den Werten, wie sie bei den Oxydasetesten (vgl. Tabellen 4, 5 und 6) erhalten wurden.

Zum Vergleich sei das Zusammenwirken des natürlichen Cytochromoxydase/Cytochrom-c-Systems nach E. Stoltz, A. E. Sidwell und T. R. Hogness<sup>42)</sup> wiedergegeben (Bild 28).

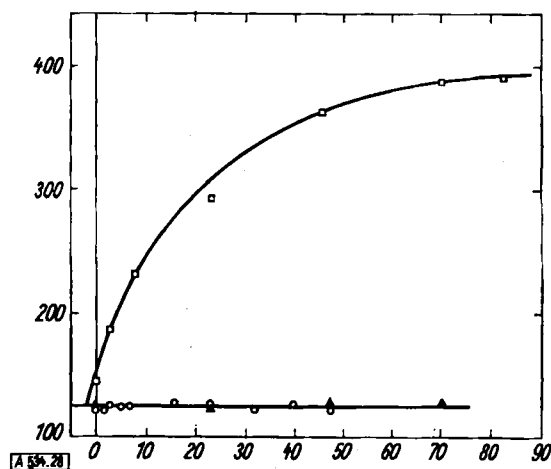


Bild 28

Oxydation von Hydrochinon durch das Oxydase-Cytochrom-System  
○: Zugabe von Cytochrom C allein Δ: Cytochrom C + kurz erhitzte Oxydase (5 min auf 85 °C) □: Cytochrom C + Oxydase-Rohprodukt  
T = 38 °C;  $p_H = 7,15$ ; Hydrochinon 0,033 mM (nach Stoltz)

Cytochrom c allein beschleunigt die Autoxydation des Hydrochinons nicht, desgleichen ist die auf 85 °C erhitzte Mischung des Cytochroms c und der Cytochromoxydase unwirksam. Dagegen zeigt die Zugabe von Cytochrom c und Cytochromoxydase eine starke Steigerung der Reaktionsgeschwindigkeit mit steigender Cytochrom c-Menge.

Die Arbeit wurde aus Mitteln des Marshall-Plans (ERP-Mittel) und mit Spenden aus dem Fonds Chemie ausgeführt. Wir sprechen den zuständigen Stellen für die Gewährung dieser Beihilfen unseren verbindlichsten Dank aus. Den Behring-Werken danken wir für die Überlassung von reinem Serum-Albumin und -Globulin.

Eingeg. am 22. Juli 1953

[A 534]

<sup>42)</sup> E. Stoltz, A. E. Sidwell u. T. R. Hogness, J. biol. Chemistry 124, 736 [1938].