

# Thiophile Substanzen in der Eiweiß- und Enzymchemie

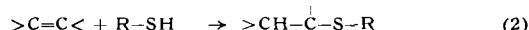
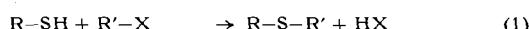
Von Prof. Dr. A. SCHÖBERL

Chemisches Institut der Tierärztlichen Hochschule Hannover\*)

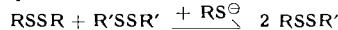
Thiophile Substanzen sind SH-Blocker und besitzen wegen ihres Einflusses auf SH-Enzyme ausgeprägten Gift- bzw. Wirkstoffcharakter. N-substituierte Maleinimide und Vinylsulfone sind SH-Blocker mit besonders günstigen Eigenschaften, wie an Umsetzungen mit Cystein bewiesen wird. Die Ergebnisse der Modellreaktionen lassen sich auf Makromolekülen übertragen. Neu erzeugte SH-Gruppen in Haarkeratinen konnten schonend und spezifisch mit Maleinimiden und Vinylsulfonen blockiert werden, woraus sich eine Methode zur Bestimmung von SH- und SS-Gruppen nebeneinander ergab. Divinylsulfon führt in Schafwolle zu Vernetzungsreaktionen. Succinodehydrase kann als SH-Enzym mit Maleinimiden und Vinylsulfonen gehemmt werden.

## Einleitung

Thiophile Substanzen sind Verbindungen, die sich leicht und rasch mit SH-Gruppen von Mercaptanen und Thiophenolen (Thiolen) zu stabileren Verbindungstypen umsetzen. Die beiden, vielseitig auswertbaren Haupttypen ihrer Reaktionsmöglichkeiten<sup>1, 2)</sup> sind:



Wesentlich ist stets, daß aus der reaktionsfähigen SH-Gruppe eine reaktionsträgere Gruppe entsteht. Neben präparativen Möglichkeiten<sup>3)</sup>, bieten sich damit für die Eiweiß- und Enzymchemie Reaktionen zur Beseitigung von SH-Gruppen, die an der Eigenart und Aktivität der hochmolekularen Stoffe mitbeteiligt sein können<sup>4, 5, 6)</sup>. Das Interesse an „SH-Blockern“, d. h. an Substanzen, die sich rasch und unter gelindenden Reaktionsbedingungen mit diesen funktionellen Gruppen umsetzen, ist deshalb erheblich. Bei solchen Umsetzungen muß u. U. peinlichst vermieden werden, daß sich SH-Gruppen zu SS-Gruppen (vor allem in Eiweißstoffen und Enzymen) oxydieren, weil damit beträchtliche Molekelvergrößerungen oder Vernetzungsreaktionen zwischen Peptidketten verbunden sein können. Letzteres kann den Gesamthabitus der Makromolekel stark verändern und ein völlig anderes Verhalten bedingen. Überdies böten diese SS-Bindungen mit ihrer mannigfaltigen Reaktionsfähigkeit viele neue Möglichkeiten von Veränderungen. Dazu gehören etwa sog. „Disulfid-Austauschreaktionen“, bei denen unter dem katalytischen Einfluß von Spuren von Mercaptid-Ionen an benachbarten SS-Bindungen Substituenten gegeneinander ausgetauscht werden können<sup>7)</sup>. Dies ist wiederum eine Möglichkeit, neue Bindungen zu knüpfen:



\*) Dieser Aufsatz berichtet auszugsweise über Vorträge vor den Ortsverbänden Gießen und Köln der GDCh am 9. 7. und 22. 11. 1957 (vgl. diese Ztschr. 70, 61 [1958]) und auf dem IV. Internat. Kongreß f. Biochemie in Wien am 4. 9. 1958.

1) A. Schöberl, diese Ztschr. 53, 227 [1940].

2) A. Schöberl u. G. Lange, Liebigs Ann. Chem. 599, 140 [1956].

3) A. Schöberl u. A. Wagner, in *Houben-Weyl-Müller: Methoden der organischen Chemie*, Georg Thieme Verlag, Stuttgart 1955, Bd. IX, S. 93 u. 195.

4) Vgl. etwa E. S. G. Barron, Advances in Enzymol. 11, 201 [1951]; R. Tschesche, diese Ztschr. 62, 153 [1950] (u. zwar S. 157); K. Wallenfels u. Mitarb., Biochem. Z. 329, 17, 31, 41, 48, 59, 75 [1957].

5) A. Schöberl in G. M. Schwab-Crieger: *Handbuch der Katalyse*, Bd. 7/I, Springer-Verlag, Wien 1943, S. 479.

6) A. Schöberl u. A. Wagner, Chem. Ber. 80, 379 [1947].

7) Vgl. L. Hellerman, F. P. Chinard u. V. R. Deitz, J. biol. Chemistry 177, 443 [1943]; C. Huggins, D. F. Tapley u. E. V. Jensen, Nature [London] 167, 592 [1951]; M. Halwer, J. Amer. chem. Soc. 76, 183 [1954]; R. W. Burley, Nature [London] 175, 510 [1955]; Proc. int. Wool Textile Res. Conf. Australia 1955, Verlag Commonwealth Scientific and Industrial Research Organization, Melbourne 1956, Bd. D, S. 88; D. Mazia in: Glutathione, Proc. of the Symposium 1953, Ridgefield/Conn., Academic Press, Inc., New York 1954, S. 209; A. P. Ryle u. F. Sanger, Biochem. J., 60, 535 [1955]; H. Zahn, Z. ges. Textilind. 60, 114 [1958]; H. Gräfje, Dissert., Hannover 1958; A. Schöberl u. H. Gräfje, Liebigs Ann. Chem., im Druck.

Für die Zweckmäßigkeit irreversibler Blockierung von SH-Gruppen zumal in Naturstoffen lassen sich also mehrere Begründungen geben. Man tut gut daran, in Eiweißstoffen und Enzymen nicht nur die nativen, sondern auch durch eine übersichtliche Reduktion neu erzeugte SH-Gruppen zu blockieren. Zusätzliche SH-Gruppen erhält man besonders leicht aus cystin-reichen Makromolekülen, beispielsweise den Keratinen der Haare, wenn man die vorhandenen SS-Bindungen durch Mercaptane spezifisch und schonend reduktiv aufspaltet.

Zur Untersuchung empfindlicher Systeme sollten thiophile Substanzen drei Hauptbedingungen erfüllen:

1. Die zu maximalem Umsatz führenden Reaktionsbedingungen sollten sehr schonend sein, d. h. die Umsetzungen sollten in sehr verdünnter, wäßriger Lösung in der Nähe des Neutralpunktes und bei tiefer Temperatur verlaufen.

2. Die Reaktionsgeschwindigkeit sollte hoch sein.

3. Die neu erzeugten Bindungen sollten stabil sein.

## Thiophile Substanzen als Gifte und Wirkstoffe

Eine Überprüfung der in der Literatur bekannten und benutzten thiophilen Substanzen zeigt überraschenderweise, daß diese im allgemeinen eine hohe Giftwirkung gegenüber pflanzlichen und tierischen Organismen besitzen.

Bereits L. Rapkin<sup>8)</sup> hat 1930 an befruchteten Seegeleieren nachweisen können, daß der Mechanismus der Zellteilung einen sehr empfindlichen Angriffspunkt für solche Stoffe darstellt. Entsprechend der Konzentration an SH-Gruppen läßt sich die Mitose mit Quecksilber(II)-chlorid oder mit Jodacetat anhalten und mit SH-Glutathion oder Cystein wieder in Gang setzen.

Erinnert sei an die erstmalige Hemmung des SH-Enzyms Glyoxalase mit Jodacetat durch F. Dickens<sup>9)</sup>. Ferner haben E. J. Morgan und E. Friedman<sup>10)</sup> die Hemmung der Glyoxalase, des Papains, des anaeroben Glucoseabbaues und der Succinodehydrase mit Maleinsäure beobachtet. Auch die in fleischigen Früchten vorkommenden Blastokoline sind Hemmstoffe, die die Keimung der Samen verhindern. Nach R. Kuhn und Mitarbeitern<sup>11)</sup> handelt es sich bei diesen Blastokolinen um Substanzen vom Typ des Sorbinöls (IV) oder des Cumarinins (V), d. h. um  $\alpha, \beta$ -ungesättigte Lactone, die SH- und NH<sub>2</sub>-Gruppen von Enzymen anlagern können<sup>12)</sup>.

H. Lettré<sup>13)</sup> führt auch die Hemmung der Zellteilung durch Chinone (VI) auf die leichte Addition von SH-Gruppen zurück<sup>14)</sup>. Adrenochrom (VII) wirkt ebenfalls in diesem Sinne als Mitotoxin<sup>15)</sup>. In diesem Zusammenhang sollte man auch daran denken, daß P. Müller und Mitarbeiter<sup>16)</sup> für die Giftwirkung natürlicher

8) C. R. hebdo. Séances Acad. Sci. 191, 871 [1930].

9) Biochem. J. 27, 1141 [1933].

10) Ebenda 32, 862 [1938].

11) R. Kuhn, B. Jerchel, F. Moewus, E. F. Möller u. H. Lettré, Naturwissenschaften 37, 468 [1943]; F. Moewus, Naturforsch. Med. Dtschl. 1939–1946 40, 184 [1953].

12) Vgl. C. J. Cavallito u. F. J. Kirchner, J. Amer. chem. Soc. 69, 3030 [1947].

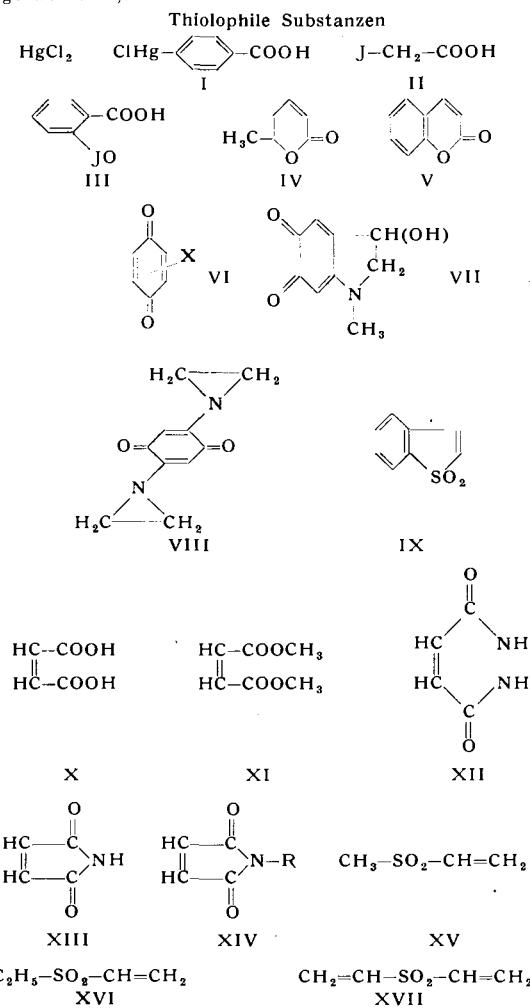
13) Diese Ztschr. 63, 421 [1951].

14) Vgl. R. Kuhn u. J. Hämer, Chem. Ber. 84, 91 [1951].

15) H. Lettré, R. Lettré u. W. Riemenschneider, Naturwissenschaften 38, 282 [1951].

16) P. Länger, H. Martin u. P. Müller, Helv. chim. Acta 27, 892 [1944].

Insektizide die Gruppierung  $>\text{C}=\text{C}-\text{C}=\text{O}$  verantwortlich machen, eine gewiß überzeugende Annahme. Es steht dies in guter Übereinstimmung mit der Eignung von N-Aryl-maleinimiden (XIV) als Fliegenbekämpfungsmittel<sup>17</sup>). Eine antimitotische Wirksamkeit der Maleinimide konnte von E. Friedman und Mitarbeitern bestätigt werden<sup>18</sup>).



Auch Maleinsäurehydrazid (XII), das Cystein addieren kann<sup>19</sup>), hemmt Zellteilungen<sup>20</sup>). Eine Spritzung mit einer 0,2proz. Lösung des Diäthanolaminsalzes des Maleinsäurehydrazids kann Pflanzenwachstum bis zu zwei Monaten aufhalten<sup>21</sup>).

Wie H. Schlesinger und D. T. Mowry<sup>22</sup>) fanden, kommt die phytotoxische Wirkung des Cumarsins auch dem analog gebauten Benzothiophen-1,1-dioxid (IX) zu; es enthält eine durch die Sulfonyl-Gruppe aktivierte C=C-Doppelbindung. Die gleichen Autoren berichteten über Keimungshemmungen durch Methylvinylsulfon (XV) und Divinylsulfon (XVII).

Chinon-Derivate mit bakteriostatischen und cytostatischen Eigenschaften haben S. Petersen und Mitarbeiter beschrieben<sup>23</sup>) (VIII). Man kann sich vorstellen, daß auch dieser Verbindungstyp wie andere chinoide Systeme (VI) als Zellgift teilungshemmend wirksam ist. Enzymblockierung oder Quervernetzung an SH- und NH<sub>2</sub>-Gruppen in Eiweißstoffen werden Teilungsvorgängen entgegen wirken können. H. Holzer und Mitarbeiter<sup>24</sup>) haben die carcinostatische Wirkung der Chemotherapeutika von Chinon-Struktur oder mit Äthylenimin- und Halogenalkyl-Gruppen auf eine Blockierung des SH-Enzyms Triosephosphat-dehydrase zurückgeführt. Die in den Zellen vorhandene Enzymaktivität wird normalerweise nur zu einem geringen Teil für Atmungsprozesse benötigt. Bei der durch malignes Wachstum gesteigerten Glykolyse

<sup>17)</sup> E. J. du Pont de Nemours & Co., Erf. H. W. Arnold u. N. E. Searle, AP. 2462835, 1949.

<sup>18)</sup> E. Friedman, D. H. Marrian u. J. Simon-Reuss, Brit. J. Pharmacol. Chemotherapy 4, 150 [1949].

<sup>19)</sup> G. Täuber, unveröffentl.

<sup>20)</sup> G. Deyson u. A. Rollen, Chem. Abstr. 46, 4068 [1952].

<sup>21)</sup> D. L. Schoene u. O. L. Hoffmann, Science [New York] 109, 588 [1949].

<sup>22)</sup> J. Amer. chem. Soc. 73, 2614 [1951].

<sup>23)</sup> S. Petersen, W. Gauss u. E. Urbschat, diese Ztschr. 67, 217 [1955]; W. Gauss u. S. Petersen, ebenda 69, 252 [1957].

<sup>24)</sup> H. Holzer, G. Sedlmayr u. A. Kemnitz, Biochem. Z. 328, 163 [1956].

aber ist das Enzym voll ausgelastet. Es soll mit SH-Blockern vom genannten Typ gelingen, die Glykolyse der Tumorzellen zu hemmen, ohne die Atmungsprozesse zu beeinflussen. Parallel zur Hemmung der Glykolyse wurde eine Verlangsamung der Wachstums- und Vermehrungsgeschwindigkeit der Zellen gefunden.

Erinnert sei auch an das p-Chlor-quecksilber(II)-benzoat (I) und an o-Jodosobenzozat (III), die in letzter Zeit häufig zur Blockierung von SH-Fermenten benutzt wurden<sup>25</sup>).

Alle Substanzen, die besonders schnell mit SH-Gruppen reagieren, wie z. B. Bromacetone,  $\alpha$ -Halogenfettsäuren, Bromcyan, Chinone, aber auch leicht flüchtige Maleinimide und Vinylsulfone, üben eine starke Reizwirkung auf die Schleimhäute aus<sup>26</sup>). Man kann diese Reizwirkung geradezu als Gradmesser für eine gesteigerte Reaktionsfähigkeit ausnutzen.

Angesichts dieses heterogenen und verwinkelten Fragenkomplexes war es notwendig, Vorgänge dieser Art in ihren Auswirkungen an wichtigen SH-Blockern zu studieren. Wir haben in diesem Zusammenhang in den letzten Jahren die additionsfreudigen Maleinimide (XIII und XIV) und Vinylsulfone (XVI und XVII) an niedrig- und hochmolekularen Substraten (Reaktionsschema 2) untersucht<sup>27</sup>.

### Die Addition von Cystein an Maleinimide

Es war qualitativ bekannt, daß N-Äthyl-maleinimid (XIV, R = C<sub>2</sub>H<sub>5</sub>) rasch mit Thiolen reagiert und sie durch Addition in stabile Thioäther überführt<sup>28</sup>). C. S. Hanes und Mitarbeiter<sup>29</sup>) verwendeten es erstmals zur Papierchromatographie von Cystein-peptiden. Seine aktivierte Doppelbindung addiert z. B. Cystein unter Bildung von S-(N-Äthyl-succinimidio)-cystein und SH-Glutathion zu einer analogen Verbindung. Auch beim SH-Glutathion läßt sich der Thioäther papierchromatographisch vorteilhaft ausnutzen<sup>30</sup>).

Zur Blockierung von SH-Gruppen sind die Eigenschaften von N-Äthyl-maleinimid nicht ideal. Es löst sich in Wasser nur zu etwa 1% und die Thioäther mit Cystein und SH-Glutathion sind wasserlöslich. Man erhält es nur in schlechter Ausbeute und es unterliegt schon im pH-Bereich 7 bis 8 einer schnellen Hydrolyse. Auch die Grundsubstanz (XIII) ist nur schwer zugänglich. Es sollten daher zunächst N-substituierte Maleinimide (XIV) mit besseren Eigenschaften hergestellt werden. Hierfür lag eine günstige Synthese von N. E. Searle vor, die von den Monoamiden der Maleinsäure ausgeht<sup>31</sup>). In guter Ausbeute wurden dargestellt:

- N-Phenyl-maleinimid,
- p-Phenetetyl-maleinimid,
- Benzyl-maleinimid,
- Cyclohexyl-maleinimid,
- m- und p-Carboxyphenyl-maleinimid.

Es fiel auf, daß die N-Aryl-Derivate mehr oder weniger gelb sind; dies ist vielleicht durch Konjugation des aromatischen Systems mit mesomeren Formen des Maleinimid-Ringes zu erklären. Trotz der guten Zugänglichkeit waren aber diese Substanzen wegen ihrer zunehmenden Wasserunlöslichkeit für viele Zwecke ungeeigneter als das N-Äthyl-maleinimid. Auch ihre Thioäther waren in Wasser keineswegs schwerer löslich und die Hydrolysenbeständigkeit war ebenfalls gering. Jedoch reagieren alle Maleinimide

<sup>25)</sup> Vgl. E. C. Slater, Biochem. J. 45, 130 [1949]; H. A. Rothschild u. E. S. G. Barron, J. biol. Chemistry 209, 511 [1954]; R. M. Hochster, Canad. J. Microbiol. 1, 589 [1955]; A. P. Nygaard, Acta chem. scand. 10, 397 [1956]; W. R. Frisell u. L. Hellerman, J. biol. Chemistry 225, 53 [1957]; A. O. M. Stoppani u. C. Milstein, Biochem. J. 67, 406 [1957]; J. B. Neelands, J. biol. Chemistry 208, 225 [1954].

<sup>26)</sup> W. N. Aldridge, Biochem. J. 48, 271 [1951], und eigene Versuche.

<sup>27)</sup> G. Täuber, Dissert., Hannover 1957 und unveröffentlichte Untersuchungen von K. H. Jung an Succinodehydrase.

<sup>28)</sup> H. D. Marrian u. J. Simon-Reuss, Brit. J. Pharmacol. Chemotherapy 4, 150 [1949].

<sup>29)</sup> C. S. Hanes, F. J. R. Hird u. F. A. Isherwood, Nature [London] 166, 288 [1950].

<sup>30)</sup> Vgl. auch N. O. Kermack u. N. A. Matheson, Biochem. J. 65, 45 [1957].

<sup>31)</sup> E. J. du Pont de Nemours & Co., Erf. N. E. Searle, AP. 2444536 vom 14. 5. 1946.

sehr rasch mit Cystein. Maleinimid (XIII) und seine N-substituierten Derivate (XIV) sind zum Abfangen von Thiolen aus verdünnten Lösungen besonders geeignet. Man kann sie zunächst für chromatographische Trennungen und zur Bestimmung von Disulfiden neben Mercaptanen verwenden. Der analytische Anwendungsbereich ist recht ausgeprägt. Auch für die Eiweiß- und Enzymchemie bieten sich diese Substanzen an.

Die Maleinimide sind nicht sonderlich alkalistabil, was ihre Anwendung gelegentlich einschränken mag. In der Literatur sind zwar auch alkalistabile SH-Blocker beschrieben, jedoch reagieren die meisten von ihnen sehr träge oder nicht spezifisch. Dies gilt z. B. für die besonders in biologischen Systemen oft benutzte Jodessigsäure (II) oder das Jodacetatamid. Die Geschwindigkeit ihrer Umsetzung ist um Größenordnungen langsamer als die Thiol-Addition der Maleinimide<sup>32)</sup>. Außerdem tritt dabei eine Alkylierung von NH<sub>2</sub>-Gruppen ein.

Modellreaktion konnte in allen Fällen die Umsetzung des SH-Blockers mit Cystein sein (Reaktionsschema 2). Die kinetische Untersuchung gestattete die Festlegung sämtlicher typischer Merkmale dieser Reaktion. Es galt, die günstigsten Versuchsbedingungen, die Reaktionsgeschwindigkeit und die Lage des Gleichgewichts zu ermitteln. Hierbei wurde die empfindliche polarographische Meßtechnik eingesetzt.

Maleinimide lassen sich in saurer Lösung polarographisch gut bestimmen. Sie dürfen dabei an der Hg-Tropfelektrode elektrolytisch zu Bernsteinsäure-Derivaten reduziert werden. Oberhalb des Neutralpunktes werden die Maleinimide sehr schnell hydrolytisch gespalten. So war N-Äthylmaleinimid in wäßriger Lösung bei pH 7,65 und Zimmertemperatur in 16 h bereits zu etwa 70% hydrolysiert. Es war daher zweckmäßig, mit N-Äthylmaleinimid die Strom/Spannungskurven nur in schwach saurer bis neutraler Lösung aufzunehmen, wobei in sehr verdünnter Lösung gearbeitet werden konnte. Es bestand Proportionalität zwischen Konzentration und Diffusionsstromstärke. Meistens wurde bei pH 5,1 gemessen<sup>33)</sup>. Die für die Malein-

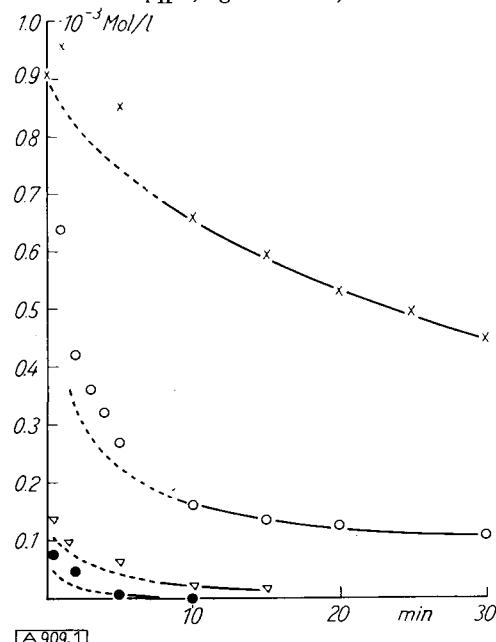


Abb. 1. Umsetzung von Cystein mit N-Äthyl-maleinimid bei pH 3,75 (x), 5,10 (o), 6,70 (▽) und 7,65 (●). (Polarographische Messung der Abnahme der Maleinimid-Konzentrationen, Anfangskonzentration = 0,001 Mol/l)

<sup>32)</sup> Vgl. L. Michaelis u. M. P. Schubert, J. biol. Chemistry 106, 331 [1934].

<sup>33)</sup> N-Äthyl-maleinimid zeigt wie Maleinsäure bei pH 7,65 eine zweistufige Reduktion.

imide gefundenen Halbstufenpotentiale  $E_{1/2}$  lagen zwischen -0,90 V (N-p-Phenetyl-maleinimid) und -0,59 V (N-Äthyl-maleinimid).

Da der zweite Reaktionspartner Cystein in schwach saurer bis neutraler Lösung polarographisch nicht bestimmbar ist, konnte die Umsetzung nur durch polarographische Verfolgung der Diffusionsströme des betreffenden Maleinimids studiert werden. Es wurden also äquivalente Mengen von Maleinimid- und Cystein-Lösungen in der Zelle vermischt und in geeigneten Zeitabständen die Höhe der polarographischen Stufe des Maleinimids registriert. Die Diffusionsströme waren den Konzentrationen an Maleinimid proportional. So konnten schließlich Konzentrations-/Zeit-Kurven für die Umsetzung Maleinimid + Cystein gezeichnet werden, welche die Abnahme der Maleinimid-Konzentration, die parallel der des Cysteins verläuft, mit der Zeit wiedergeben (Abb. 1).

Mit steigendem pH nimmt die Reaktionsgeschwindigkeit stark zu. Dies weist auf die Anlagerung von Mercaptid-Ionen hin, deren Konzentration bei steigenden pH-Werten rasch anwachsen muß.

Auf diese Weise wurde die Reaktionsgeschwindigkeit der Umsetzung sämtlicher Maleinimide mit Cystein bei pH 5,1 ermittelt und dafür die Konzentrations-/Zeit-Kurven gezeichnet (Abb. 2).

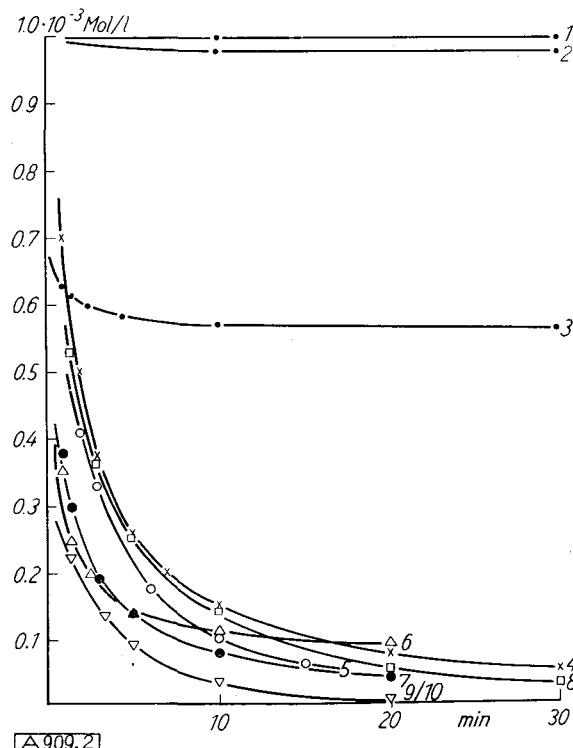


Abb. 2. Umsetzung von Cystein mit Maleinsäurehydrazid (1), Maleinsäure-dimethylester (2), N-p-Phenetyl-maleinimid (3), Maleinimid (4), N-Äthyl-maleinimid (5), N-Phenyl-maleinimid (6), N-Benzyl-maleinimid (7), N-Cyclohexyl-maleinimid (8), N-p-(m)-Carboxyphenyl-maleinimid (9). (Polarographische Messung der Abnahme der Maleinimid-Konzentration)

Die N-Aryl-maleinimide setzten sich besonders schnell um. N-p-Phenetyl-maleinimid erreicht das Reaktionsgleichgewicht schon bei etwa 45 proz. Umsatz. Am raschesten reagierten bei günstiger Gleichgewichtslage m- und p-Carboxyphenyl-maleinimid. Es ist beachtenswert, daß sich Maleinsäure-hydrazid (XII) und Maleinsäure-dimethyl-ester (XI) bei pH 5,1 nicht mit Cystein umsetzen. In dem sauren Bereich ergab sich polarographisch kein Hinweis auf eine Reaktion auch mit NH<sub>2</sub>-Gruppen.

Die Reaktion zwischen N-Äthyl-maleinimid und SH-Glutathion wurde polarographisch ebenfalls überprüft. Man fand im Gegensatz zu Angaben von J. D. Gregory<sup>34)</sup> eine dem Cystein vergleichbare Additions geschwindigkeit.

### Die Addition von Cystein an Vinylsulfone

Neben den Maleinimiden waren Vinylsulfone als SH-Blocker besonders geeignet. Diese Verbindungsklasse wurde bisher in diesem Zusammenhang nicht systematisch studiert. Es wurden Äthyl-vinylsulfon (XVI), Divinylsulfon (XVII) und  $\alpha$ -Butadiensulfon untersucht.  $\alpha$ -Butadiensulfon reagiert mit Cystein zu langsam. Die beiden anderen Vinylsulfone sind aber sehr gut brauchbare thiophile Substanzen. Beides sind Flüssigkeiten, die die Haut und die Schleimhäute sehr stark reizen. Auch bei ihnen sollten die Additionsreaktionen polarographisch verfolgt werden. Jedoch lieferte die Polarographie von Äthylvinylsulfon nur in neutraler, ungepufferter Lösung eine auswertbare Strom/Spannungskurve, während in sauren oder alkalischen Lösungen keine Messungen möglich waren. Divinylsulfon gab ebenfalls nur in ungepufferter, neutraler und in ungepufferter alkalischer Lösung gut ausgebildete polarographische Stufen. Letzteres war aber beim Studium der Additionsreaktionen nicht ausnutzbar.

Da aber die Höhe der anodischen Cystein-Stufe ab  $p_{\text{H}}$  9 wieder eine strenge Konzentrationsproportionalität zeigt, ließ sich die Addition von Cystein an beide Vinylsulfone in 0,0005 mol. alkalischen Lösungen bei  $p_{\text{H}}$  9,7 und  $p_{\text{H}}$  13 durch Konzentrationsbestimmungen des Cysteins verfolgen (Abb. 3). Hierbei mußte allerdings auf die außerordentliche Empfindlichkeit des Cysteins in alkalischer Lösung gegenüber Luftsauerstoff Rücksicht genommen werden.

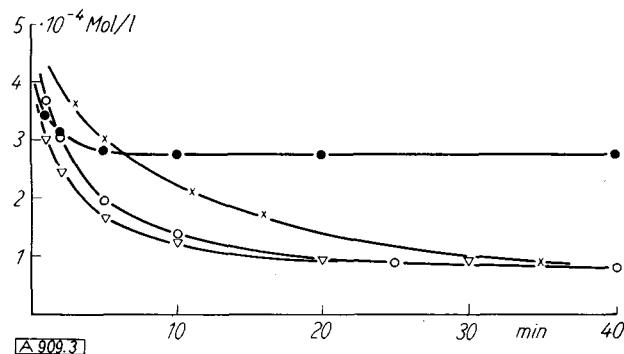


Abb. 3. Umsetzung von Cystein mit Äthylvinylsulfon bei  $p_{\text{H}}$  9,70 (x) und 13 (o) und mit Divinylsulfon bei  $p_{\text{H}}$  9,70 (v) und 13 (•) (Polarographische Messung der Abnahme der Cystein-Konzentration)

Auch hier nimmt die Reaktionsgeschwindigkeit bei ansteigendem  $p_{\text{H}}$  etwas zu, obwohl bei  $p_{\text{H}}$  9,7 die SH-Gruppe des Cysteins bereits weitgehend dissoziert vorliegt.

Die kinetischen Messungen zeigten also, daß die Vinylsulfone sich in alkalischer Lösung rasch mit Cystein umsetzen, d. h. Thioäther bilden. Diese Thioäther konnten auch leicht in guter Ausbeute dargestellt werden. In zu stark alkalischer Lösung (schon bei  $p_{\text{H}}$  13) können sie wieder in die Ausgangskomponenten zerfallen, so daß unter solchen Bedingungen die Additionsreaktion zu einem Gleichgewicht führt.

### Blockierung von SH-Gruppen in reduzierten Haarkeratinen mit Maleinimiden und Vinylsulfonen

Es ist in der Eiweiß- und Enzymforschung ein akutes Problem, den Gehalt an eingebaumtem Cystein und damit den Gehalt an SH-Gruppen zu bestimmen. Dabei kommt es häufig gerade auf das Verhältnis von Cystein zu seinem

<sup>34)</sup> J. Amer. chem. Soc. 77, 3922 [1955].

Oxydationsprodukt Cystin an. Bestimmungsmethoden dürfen also dieses Verhältnis nicht verschieben. Bei einfachen Hydrolysen kann es selbst bei sorgfältigen Versuchsbedingungen zu einer Oxydation von SH-Gruppen kommen. So wird vielfach bei Bausteinanalysen in sauren Hydrolysaten von Proteinen oder Enzymen gar nicht zwischen Cystein und Cystin unterschieden. Besonders wichtig sind Bestimmungen von SH-Gruppen in den cystinreichen Keratinen, z. B. in Haaren, und in den sog. SH-Enzymen.

Als Modellsubstanz für solche Untersuchungen eignet sich das Haarkeratin, in dem ohne Zerstörung der Faserstruktur die zahlreich vorhandenen SS-Bindungen ganz oder teilweise mit spezifischen Reduktionsmitteln zu SH-Gruppen reduziert werden können. Dieser Reduktionsprozeß ist für die Haarverformung, z. B. bei der sog. „Kaltwelle“ von großer praktischer Bedeutung. Auch völlig unbehandelte Haare können, allerdings in verschwindend kleiner Menge, infolge von Sekundärreaktionen SH-Gruppen enthalten, deren exakte Erfassung auch heute noch als ungelöst bezeichnet werden muß. Man hat dafür aber bereits Verfahren angegeben.

So behandelten H. Lindley und Mitarbeiter<sup>35)</sup> Wollhaare mit überschüssiger Jodosobenzoesäure (III) und titrierten das nicht reduzierte Reagens jodometrisch zurück. R. W. Burley<sup>36)</sup> behandelte Wolle mit 1-(4-Chlorquecksilber-phenylazo)-naphthol-2, dem sog. Bennetts Reagens; das nicht verbrauchte Reagens konnte dabei photometrisch bestimmt werden. Für beide Analysenmethoden bedeuten aber schwer abschätzbare Adsorptionseffekte an den Faseroberflächen einen erheblichen Unsicherheitsfaktor. Bei einem Verfahren von H. Zahn und Mitarbeitern<sup>37)</sup> werden vorhandene SH-Gruppen in Haaren mit 2,4-Dinitro-fluorbenzol umgesetzt und das dabei entstehende S-DNP-Cystein nach Hydrolyse und elektrophoretischer Trennung spektralphotometrisch erfaßt.

Die Möglichkeit einer raschen Umsetzung von SH-Gruppen in Haaren mit Maleinimiden und Vinylsulfonen ergab eine Differenzmethode. Nach der Festlegung der SH-Gruppen in stabilen Thioäther-Bindungen konnten nach der sauren Hydrolyse die als Cystin vorhandenen SS-Bindungen in üblicher Weise bestimmt werden.

Eine Unsicherheit dieser Methode liegt jedoch darin, daß unter Umständen dabei auch freie NH<sub>2</sub>-Gruppen des Keratins reagieren können. Es wurde beispielsweise native Wolle 2 h bei  $p_{\text{H}}$  8,70 mit einer 0,5 proz. Divinylsulfon-Lösung behandelt. Man fand eine Erhöhung des S-Gehaltes der Haare um 0,6 %, was nur durch einen Einbau von Divinylsulfon erklärt werden kann. Die Ermittlung der eingebauten Divinylsulfon-Menge als Maß für den SH-Gehalt würde also ein fehlerhaftes Resultat liefern. Auch muß die Gewichtszunahme des Haares durch das eingebaute Reagens beachtet werden.

Es wurden absichtlich größere Mengen von SH-Gruppen in Wolle durch Reduktion mit  $\beta$ -Mercapto-äthanol oder Thioglykolsäure erzeugt. Das Mercapto-äthanol ließ man beispielsweise in 0,5 mol. Lösung bei bestimmten  $p_{\text{H}}$ -Werten und einem Flottenverhältnis von 1:75 bei 35 °C 1 h auf Wolle einwirken. Die anschließende Blockierung der nunmehr in der Wolle vorhandenen Cystein-Reste mit Äthylvinylsulfon (XVI) geschah bei  $p_{\text{H}}$  8,70 mit einer 0,5 proz. Lösung, wobei der Überschuß des SH-Blockers nur das 2,5fache betrug. Die Verätherung war in 3 bis 5 h völlig beendet. Bei  $p_{\text{H}}$  5,1 so reduzierte und blockierte Wolle enthielt nur noch 5,95 % Cystin (Anfangswert 11,65 %) und 4,53 % S (Anfangswert 3,35 %). Die Reduktion mit Mercapto-äthanol bei  $p_{\text{H}}$  7,65 unter analogen Be-

<sup>35)</sup> H. Lindley, W. J. Ellis u. J. M. Gillespie, Nature [London] 165, 545 [1950].

<sup>36)</sup> Textile Res. J. 26, 332 [1956].

<sup>37)</sup> Proc. int. Wool Textile Res. Conf. Australia 1955, Verlag Commonwealth Scientific and Industrial Research Organization, Melbourne 1956, Bd. C, S. 127.

dingungen lieferte einen Abfall des Cystin-Gehaltes auf 2,28%, bei  $p_H$  9,20 auf nur noch 1,98%.

Auch mit Thioglykolsäure wurden die SS-Bindungen in Wolle bei  $p_H$  5,1 und 7,65 reduziert. Nach der Blockierung mit Äthylvinylsulfon fiel hier der noch verbleibende Cystin-Gehalt des Keratins auf 5,62 bzw. 1,80%. In den Wollhydrolysaten war das Additionsprodukt aus Cystein und Äthylvinylsulfon papierchromatographisch glatt nachweisbar.

Der Vorteil der Verwendung der Vinylsulfone liegt vor allem in der Geschwindigkeit, mit der sie mit den SH-Gruppen im Eiweiß reagieren. Demgegenüber erfordert die SH-Blockierung etwa mit Jodessigsäure (II) mehr als 16 Stunden.

Zusatz von Harnstoff begünstigt Reduktion und Blockierung. Man darf annehmen, daß Harnstoff Wasserstoff-Brückenbindungen auflöckt und so das Eindringen der Reagenzien in die Fasern erleichtert. Durch 5malige Reduktion mit 2-Mercaptoäthanol bei  $p_H$  7,65 und SH-Blockierung mit Äthylvinylsulfon im Wechsel wurde schließlich eine Wolle dargestellt, die 6,66% S und nur noch 0,98% Cystin enthielt.

Verhältnismäßig schnell setzte sich auch noch Maleinsäure-dimethylester (XI) mit Keratin um<sup>38</sup>). N-p-Phenetyl-maleinimid wurde bei  $p_H$  5,1 in 50proz. Methanol mit Wollekeratin umgesetzt; es vermochte die SH-Gruppen in weniger als einer Stunde zu blockieren.

Besonders rasch reagierte das Divinylsulfon (XVII) mit reduzierter Wolle. Sein bifunktioneller Charakter muß eine Quervernetzung erzeugen. Eine bei  $p_H$  5,1 reduzierte Wolle setzte sich in  $1\frac{1}{2}$  h mit Divinylsulfon (1 cm<sup>3</sup> auf 4 g Wolle) völlig um, wobei nur mehr ein Cystin-Gehalt von 2,67% übrig blieb. In einem anderen Versuch reagierte das Divinylsulfon nur 45 min mit dem Keratin und verringerte den Cystin-Gehalt auf 2,21%. Der hohe Vernetzungsgrad so mit Divinylsulfon behandelter Wollen zeigt sich darin, daß die Präparate im Standardtest gegenüber nativer Wolle sich nicht in Säure oder Natronlauge lösen und vor allem auch der Peressigsäure-Test eine viel geringere Ammoniak-Löslichkeit aufwies (12% statt rund 70%). Die Alkalilöslichkeit der unbehandelten Wolle hatte im Kontrollversuch 11,5% betragen.

Divinylsulfon kann aber auch neben den SH-Gruppen mit anderen Gruppen im Eiweiß, wahrscheinlich mit NH<sub>2</sub>-Gruppen, reagieren. Jedenfalls ließ sich auch native Wolle etwas mit Divinylsulfon vernetzen.

Infolge der hohen Reaktionsgeschwindigkeit sind Vinylsulfone auch zum Auffangen von intermedial bei Umsetzungen des Eiweißes auftretenden SH-Gruppen zu verwenden. Wurde Wolle in Gegenwart von Vinylsulfonen z. B. mit Natronlauge, mit KCN oder mit Sulfit behandelt, so entstanden primär SH-Gruppen, die sofort mit den Vinylsulfonen reagieren. Es konnte so bewiesen werden, daß die Lanthionin-Bildung in Haaren<sup>39</sup>) auf der primären Erzeugung von SH-Gruppen im Faserverband beruht.

### Hemmung der Succinodehydrase durch Maleinimide und Vinylsulfone

In der Enzymchemie schien zur Kontrolle der thiophilen Substanzen Hemmungsversuche am Succinodehydrase-System geeignet, das auf die Dehydrierung von Bernsteinsäure zu Fumarsäure eingestellt ist und an dem Cytochrom b mit beteiligt sein soll<sup>40</sup>). Seit den Unter-

<sup>38</sup>) Reduziertes Haarkeratin wird auch als Keratin bezeichnet.

<sup>39</sup>) A. Schöberl u. A. Wagner, Hoppe-Seyler's Z. physiol. Chem. 301, 97 [1956].

<sup>40</sup>) E. C. Slater, Biochem. J. 45, 1 [1949].

suchungen von F. G. Hopkins und Mitarbeitern<sup>41</sup>) rechnet man auch die Succinodehydrase zu den SH-Enzymen und erklärt ihre Inaktivierung durch oxydierende, mercaptidbildende oder alkylierende Agentien mit einer Blockierung und Ausschaltung der für die Aktivität mit verantwortlichen SH-Gruppe<sup>42</sup>.

Wie Tabelle 1 zeigt, gelang es, die Succinodehydrase durch Maleinimid, N-Äthyl-maleinimid, Divinylsulfon und Vinyl-äthylsulfon wirksam und spezifisch zu hemmen, wobei die Jodessigsäure als SH-Blocker bei weitem übertrffen wird<sup>43</sup>). Mit über 90% ist die Hemmung nach einstündiger Inkubation in 5·10<sup>-4</sup>-molaren Lösungen von Maleinimid und N-Äthyl-maleinimid besonders ausgeprägt. Jedoch findet man auch noch bei wesentlich geringerer Blockerkonzentration weitgehende Inaktivierung.

Inhibitor	Konz. mol.	mEE/ml d. unge- hemmten Vergleichs- Lösg.	Aktivität nach In- kubation	% Hemmung
Maleinimid .....	5·10 <sup>-5</sup>	35	19,1	45,4
Maleinimid .....	5·10 <sup>-4</sup>	35	3,3	90,6
N-Äthylmaleinimid	5·10 <sup>-5</sup>	35	11,4	67,4
N-Äthylmaleinimid	5·10 <sup>-4</sup>	35	2,0	94,3
Divinylsulfon ....	1,33·10 <sup>-3</sup>	26	19,6	24,7
Divinylsulfon ....	1,33·10 <sup>-2</sup>	26	5	80,8
Vinyläthylsulfon ...	1,70·10 <sup>-3</sup>	26	26	0
Vinyläthylsulfon ...	1,70·10 <sup>-2</sup>	26	11,3	56,5
Jodessigsäure ....	5·10 <sup>-3</sup>	35	26,8	23,4

Tabelle 1. Hemmung von Succinodehydrase durch SH-Blocker<sup>43</sup>)

Der geringere Hemmeffekt bei den Vinylsulfonen stimmt ausgezeichnet mit dem nicht optimalen  $p_H$ -Bereich 7,2 überein. Denn die früher beschriebenen Modellversuche zeigten eindeutig, daß diese thiophilen Substanzen sich im Gegensatz zu den Maleinimiden erst in starker alkalischen Lösungen rasch und quantitativ mit SH-Gruppen umsetzen. Außerdem ist die stärkere Wirksamkeit von Divinylsulfon gegenüber dem Vinyl-äthylsulfon zu erkennen. Auch dies war für den zugrunde gelegten Reaktionstyp zu erwarten; das gegenüber Thiolen zweiwertige Divinylsulfon kann auch bei nicht optimalen Reaktionsbedingungen mehr SH-Gruppen als eine monofunktionelle Verbindung addieren.

### Ausblicke

Maleinimide und Vinylsulfone können allgemein zur Blockierung von SH-Gruppen in Eiweißstoffen und Enzymen empfohlen werden. Sie eröffnen bei vielen Systemen neue Möglichkeiten und sollten auch zu Stoffwechseluntersuchungen herangezogen werden. Gerade das feine Abtasten von aktiven Haftstellen in empfindlichen Makromolekülen kann auf den Modellversuch, der präparative und kinetische Gesichtspunkte erarbeitet, nicht verzichten.

Der Deutschen Forschungsgemeinschaft und dem Fonds der Chemischen Industrie sei auch hier bestens für jahrelang gewährte Unterstützung gedankt.

Eingegangen am 22. September 1958 [A 909]

<sup>41</sup>) F. G. Hopkins, E. J. Morgan u. C. Lutwark-Mann, Biochem. J. 32, 1829 [1938]; F. G. Hopkins u. E. J. Morgan, ebenda 32, 611 [1938].

<sup>42</sup>) Vgl. E. J. Morgan u. E. Friedman, ebenda 32, 862 [1938]; H. v. Euler u. H. Hellström, Hoppe-Seyler's Z. physiol. Chem. 255, 159 [1938]; V. R. Potter u. K. P. Dubois, J. gen. Physiol. 26, 391 [1943]; E. S. G. Barron u. G. Kalnitsky, Biochem. J. 41, 346 [1947]; E. C. Slater, ebenda 45, 130 [1948]; W. Franke u. E. Holz, Liebigs Ann. Chem. 608, 168 [1957].

<sup>43</sup>) Die Enzymaktivitäten wurden nach der spektrophotometrischen Methode von E. C. Slater u. W. D. Bonner (Biochem. J. 52, 185 [1952]) mittels Trikalium-hexacyanoferrat bestimmt; die mEE = Milli-Enzymeinheit wurde aus der Extinktionsabnahme der Substratlösungen errechnet, die neben der Enzymlösung Natriumsuccinat, KCN und K<sub>3</sub>Fe(CN)<sub>6</sub> in Phosphatpuffer vom  $p_H$  7,2 enthielten.