

Schema 8 beschreibt den mit Hilfe der Blitzlichtmethoden bisher ermittelten Elektronentransport bei der Photosynthese. Es erklärt den Emerson-Effekt (Abschnitt I,7) und eine Vielzahl von bisher unverstandenen Phänomenen; es steht in Einklang mit neueren Ergebnissen, die mit anderen Methoden ermittelt wurden [1–4]. Es läßt aber auch neue Probleme sichtbar werden (Abschnitt

XII,3). Durch weitere Messungen wird man das Schema ergänzen und verfeinern müssen. Von besonderem Interesse sind Einzelheiten über den Mechanismus der Wasserspaltung im Reaktionscyclus II, über den Mechanismus der Phosphorylierung und über die Struktur des beschriebenen Elektronentransportsystems.

Eingegangen am 21. April 1965 [A 466]

Neue Untersuchungen mit Hilfe des optischen Circular dichroismus

VON PROF. DR. L. VELLUZ UND DR. M. LEGRAND [*]

CENTRE DE RECHERCHES ROUSSEL-UCLAF, PARIS (FRANKREICH)

Ein erstmals 1961 beschriebenes Gerät, mit dem sich der Circular dichroismus bis herab zu 220 m μ messen ließ, ist verbessert worden und gestattet jetzt Messungen bis herab zu 185 m μ . Untersuchungen an Dienen, konjugierten Ketonen und Verbindungen mit aromatischem Ring werden an Hand einiger Beispiele beschrieben. Besonders eingehend wurden Proteine analysiert mit folgenden Ergebnissen: 1. Polypeptide mit Helixstruktur zeigen im fernen Ultraviolett einen komplexen Circular dichroismus mit drei Komponenten bei 192, 204 und 225 m μ , die für eine helixartige Anordnung der Peptidgruppen charakteristisch sind. – 2. Menschliches Serumalbumin zeigt einen ähnlichen Circular dichroismus wie die helixartig gebauten Polypeptide, woraus sich schließen läßt, daß es zu 60 % Helixstruktur hat. – 3. Messungen des Circular dichroismus zeigen, daß die Protein-Denaturierung mit Harnstoff reversibel ist. – 4. 2-Chloräthanol erhöht den Helixgehalt von menschlichem Serumalbumin und von Clupein, hat aber auf die Struktur von Poly-L-glutaminsäure nur einen geringen Einfluß. – 5. Die Öffnung von Disulfidbrücken im menschlichen Serumalbumin erleichtert den Angriff von Denaturierungsmitteln (z. B. Harnstoff). – 6. Oberflächenaktive Stoffe unterstützen die Aufrechterhaltung der Struktur des menschlichen Serumalbumins nach der Öffnung von Disulfidbrücken.

Einleitung

Seit das erste Gerät zur Messung des optischen Circular dichroismus im ultravioletten und sichtbaren Spektralbereich in unserem Laboratorium [1] entwickelt wurde, hat die Methode vielfache Anwendung zur Analyse optisch aktiver Strukturen gefunden. Die Zahl der Arbeiten, die seit unserer ersten Veröffentlichung [2] erschienen sind, zeigt, wie nützlich diese Methode zur Aufklärung räumlicher Strukturen ist und wie leicht sie sich anwenden läßt.

Aus früher genannten Gründen [2] sind bisher vor allem mono-, bi- oder polycyclische Strukturen, d. h. Terpene und Steroide, untersucht worden, die eine Carbonylgruppe als Chromophor enthalten. Hier konnte in zahlreichen Fällen aus dem Circular dichroismus die absolute Konfiguration abgeleitet werden [3], und kürzlich gelang es auch, Konformationen aufzuklären, vor

allem durch Untersuchungen bei niedrigen Temperaturen [4]. Einzelheiten darüber finden sich in einer kürzlich erschienenen Monographie [5].

Dagegen blieben andere Funktionen als die Carbonylgruppe bisher außerhalb des Anwendungsbereiches der Methode, weil sie entweder zu kräftig oder bei zu kurzer Wellenlänge absorbieren. Einfache Moleküle ließen sich mit Hilfe indirekter Verfahren untersuchen; beispielsweise kann man einer funktionellen Gruppe einen Chromophor anfügen, dessen durch die asymmetrische Umgebung induzierter Dichroismus meßbar ist. So wurde etwa die OH-Gruppe durch die Gruppierung $-\text{ONO}$ ersetzt oder die Aminogruppe durch $-\text{N}=\text{CH}-\text{C}_6\text{H}_4\text{OH}$ [5]. Dadurch ist der Anwendungsbereich der Methode beträchtlich erweitert worden. Bei komplizierteren Molekülen, wie Polypeptiden und Proteinen, läßt sich eine Beziehung zwischen Konformation und optischer

[*] In Zusammenarbeit mit R. Viennet und M. Mansart.

[1] M. Grosjean u. M. Legrand, C. R. hebd. Séances Acad. Sci. 251, 2150 (1960).

[2] L. Velluz u. M. Legrand, Angew. Chem. 73, 603 (1961).

[3] R. Bucourt u. M. Legrand, C. R. hebd. Séances Acad. Sci. 258, 3491 (1964).

[4] G. Snatzke, D. Becher u. J. R. Bull, Tetrahedron 20, 2443 (1964).

[5] L. Velluz, M. Legrand u. M. Grosjean: Optical Circular Dichroism. Verlag Chemie, Weinheim/Bergstr. u. Academic Press, New York-London 1965.

Aktivität dagegen nur aus einer direkten Messung des Circulardichroismus ableiten.

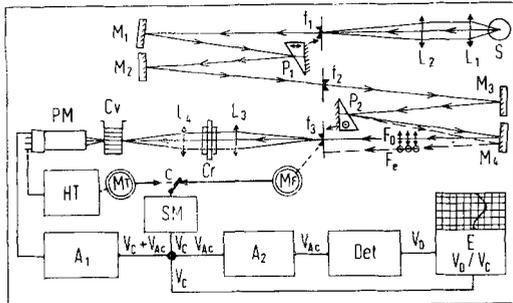
Der vorliegende Beitrag beschäftigt sich mit diesen Fragen und berichtet über Untersuchungen an Verbindungen, die im mittleren UV-Bereich stark absorbieren, und an einigen Polypeptiden und Proteinen.

I. Apparative Entwicklungen

Für die meisten bisher publizierten Untersuchungen über den Circulardichroismus wurden Geräte verwendet, die dem von Grosjean und Legrand 1959 in unserem Laboratorium [1] gebauten Apparat gleichen. Hinsichtlich der Meßgenauigkeit und -schnelligkeit ist dieser Gerätetyp außerordentlich vorteilhaft. Er hat jedoch seine Grenzen.

Vor allem führt die beschränkte Intensität des Lichtstrahls im nutzbaren Wellenlängenbereich nur zu einem mäßigen Verhältnis von Signal zu Geräusch, wodurch genaue Messungen unmöglich werden, wenn das Anisotropieverhältnis $\Delta\varepsilon/\varepsilon$ für eine Verbindung kleiner als 5×10^{-4} ist. Für die Messung des Dichroismus erlaubter Übergänge bei symmetrischen Chromophoren, deren optische Aktivität durch die Umgebung induziert ist, hat das Gerät also nur begrenzten Wert. Der Absorptionskoeffizient ist in diesem Fall mehr als hundertmal größer als derjenige eines verbotenen Übergangs, etwa des $n \rightarrow \pi^*$ -Übergangs der Carbonylgruppe. Die Lösungen müssen daher sehr verdünnt sein, damit eine ausreichende Lichtmenge die Photozelle erreicht. Da die $\Delta\varepsilon$ -Werte für diese Übergänge meist nur in der Größenordnung einiger weniger Einheiten liegen, ist das dichroitische Signal am Ausgang der Photozelle sehr schwach und im Untergrund nur schwierig zu entdecken.

Außerdem begrenzt die Quarz-Optik die nutzbare Wellenlänge. Die kürzeste Wellenlänge, bei der man noch messen kann, beträgt 2100 Å. Unterhalb dieses Punktes nimmt die Durchlässigkeit der optischen Teile des Gerätes steil ab.



[4476.]

Abb. 1. Schema des neuen Dichrographen.

- S: Lichtquelle.
- L_1-L_4 : Linsen.
- f_1-f_3 : Spalte.
- M_1-M_4 : Spiegel.
- P_1, P_2 : Prismen.
- Cr: Polarisationsmodulator (Ammoniumdihydrogenphosphat).
- Cv: Küvette.
- PM: Verstärker.
- HT: Spannungsquelle für die Dynode.
- MT: Servomotor für die Dynodenspannung.
- MF: Servomotor für die Veränderung des Spaltes f_3 .
- SM: Servomechanismus für den Spalt f_3 oder (c) für die Dynodenspannung.
- A_1, A_2 : Verstärker.
- Det: Detektor.
- E: Registrierung.
- V_c : Gleichspannung.
- V_{Ac} : Wechselfspannung.
- V_D : Gleichgerichtete Spannung.

Um den Anwendungsbereich des Dichrographen zu erweitern, mußte also die Optik verändert werden. Versuche von Grosjean und Tari [6] haben zu einem Gerät geführt, das in Abbildung 1 skizziert ist. Es enthält einen additiv arbeitenden doppelten Monochromator, der das Licht gleichzeitig bricht und polarisiert. Ein von der Lichtquelle S (Deuterium-Lampe) kommender Lichtstrahl wird auf den Eingangsspalt f_1 fokussiert und am Prisma P_1 zum erstenmal gebrochen. Dieses Prisma besteht aus kristallinem Quarz und ist so geschnitten, daß seine optische Achse auf der mit einem Aluminiumspiegel überzogenen Fläche senkrecht steht, so daß eine Doppelbrechung ausgeschlossen ist. Ein nicht-polarisierter monochromatischer Lichtstrahl erreicht also durch den Spalt f_2 das zweite Prisma P_2 , dessen optische Achse zu der des ersten Prismas senkrecht steht. Der Lichtstrahl wird am zweiten Prisma ein zweites Mal gebrochen und gleichzeitig polarisiert. Da die beiden senkrecht zueinander polarisierten Lichtstrahlen, die dieses Prisma verlassen, einen Winkel miteinander bilden, kann man mit Hilfe des Spiegels M_4 und des Spaltes f_3 einen Strahl aussondern.

Die spektrale Reinheit des monochromatischen Lichtstrahls ist größer als im früheren Gerät. Das ist besonders für Messungen im Bereich kurzer Wellenlängen von Wichtigkeit, weil sich dort „parasitäres“ Licht besonders störend bemerkbar macht. Außerdem sind im neuen Gerät die Funktionen des Monochromators und des Polarisators zusammengefaßt, und das ermöglicht die Verwendung zusätzlicher optischer Teile ohne Lichtverlust. Schließlich sind die Prismen aus Einkristallen von synthetischem Quarz geschnitten worden, und dieses Material ist unterhalb von 2100 Å stärker lichtdurchlässig. Diese Verbesserungen haben dazu geführt, daß die Lichtmenge oberhalb 2000 Å im neuen Gerät größer ist, und daß die Meßgrenze erst bei 1850 Å liegt.

Im übrigen unterscheidet sich das neue Gerät nur wenig vom alten: Infolge einer kleinen Änderung im Potentiometer benötigt man jetzt nur noch zwei Verstärker. Außerdem kann das neue Gerät entweder mit variabler Spaltbreite arbeiten (wie bisher) oder bei festgelegter Spaltbreite mit variabler Dynoden-Spannung.

Die genannten Änderungen haben die Empfindlichkeit des Gerätes von $1,5 \times 10^{-4}$ auf 10^{-5} Einheiten der optischen Dichte pro mm Schreibstreifen erhöht. Die nutzbare Wellenlänge reicht jetzt bis herab zu 185 m μ . Unterhalb 200 m μ läßt sich optische Aktivität noch erkennen, wenn $\Delta\varepsilon/\varepsilon = 2 \times 10^{-5}$ beträgt. Im nahen Ultraviolett beträgt dieser Grenzwert etwa 10^{-5} , da hier die Leistung der Strahlungsquellen sehr viel höher ist.

Mit dem neuen Gerät kann man stark absorbierende Chromophore, wie Diene, Triene, konjugierte Ketone ($\pi \rightarrow \pi^*$ -Übergang), aromatische Ringe usw., untersuchen. Sein wichtigster Vorteil ist aber die Möglichkeit, Circulardichroismus noch unterhalb 220 m μ zu messen, wodurch die so wichtigen Stoffklassen der Polypeptide, Proteine und Nucleinsäuren diesem Analysenverfahren zugänglich werden.

Im Bereich kurzer Wellenlängen verwendet man Quarzküvetten, deren Dicke oberhalb 210 m μ $1/10$ mm und unterhalb dieser Wellenlänge $1/100$ mm beträgt. So geringe Schichtdicken reduzieren den durch das Lösungsmittel verursachten Absorptionseffekt, der besonders bei kurzen Wellenlängen oft eine große Rolle spielt. Es empfiehlt sich aber, darauf zu achten, daß die isotrope UV-Absorption einer zu untersuchenden Lösung 1,5 Einheiten der optischen Dichte (Basis10) nicht überschreitet.

Um die Reproduzierbarkeit zu prüfen, haben wir sechs Messungen mit einer Lösung von Poly-L-glutaminsäure vorgenommen und eine relative Standardabweichung σ von $\pm 5\%$ zwischen 185 und 210 m μ gefunden. Bei größeren Wellenlängen betrug die Abweichung $\pm 2,5\%$.

[6] M. Grosjean u. M. Tari, C. R. hebd. Séances Acad. Sci. 258, 2034 (1964).

II. Circulardichroismus von Chromophoren, die im nahen Ultraviolett stark absorbieren

a) Dien-Steroide

Abbildung 2 zeigt das Dichrogramm und die Kurve der isotropen Absorption zweier Dien-Steroide, des Ergosterins und des Lumisterins. Man erkennt die Ähnlichkeit zwischen den Kurven für die UV-Absorption und den Circulardichroismus, was der Theorie von *Moffitt*

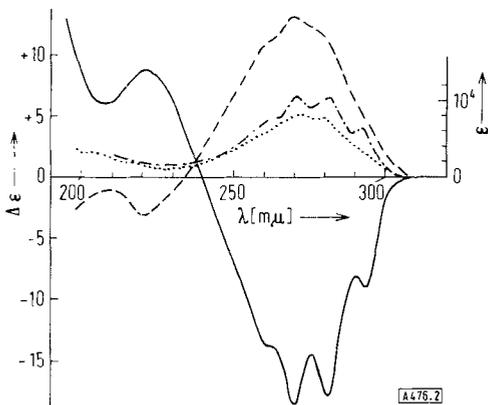
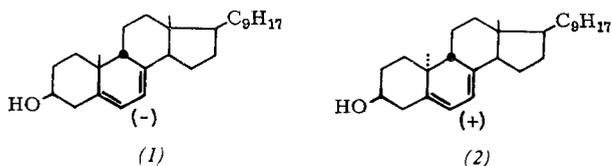


Abb. 2. Circulardichroismus und UV-Absorption von Ergosterin (1) und Lumisterin (2) in Äthanol.
 (—) Circulardichroismus des Ergosterins.
 (---) UV-Absorption des Ergosterins.
 (---) Circulardichroismus des Lumisterins.
 (....) UV-Absorption des Lumisterins.

und *Moscowitz* [7] entspricht, da der Übergang bezüglich des elektrischen Dipols hier erlaubt ist. Der antipodenhafte Verlauf der beiden Kurven für den Dichroismus ist damit zu erklären, daß in den untersuchten Verbindungen eine Umkehrung der Konformation an den C-Atomen 9 und 10 auch zu einer Umkehrung der Konformation führt.

Die hohe Amplitude des Dichroismus ist durch den Winkel bedingt, den die Bindungen zwischen den C-Atomen 5, 6, 7 und 8 miteinander bilden. Nach *Moscowitz et al.* [8] ist dieser Winkel im Ergosterin (1) negativ, im Lumisterin (2) dagegen positiv [8a].



b) Konjugierte Ketone

Konjugierte Ketone sind im Gebiet der $n \rightarrow \pi^*$ -Absorption sehr eingehend untersucht worden [5,9]. Dagegen hat die hohe Absorption dieser Verbindungen im Bereich um 240 mμ bisher die Messung der optischen Aktivität

[7] *W. Moffitt u. A. Moscovitz*, J. chem. Physics 30, 648 (1959).

[8] *A. Moscovitz, E. Charney, U. Weiss u. H. Ziffer*, J. Amer. chem. Soc. 83, 4661 (1961).

[8a] Die Vorzeichen der Diederwinkel entsprechen der Regel von *R. Bucourt*, Bull. Soc. chim. France 1964, 2080.

[9] *G. Snatzke*, Tetrahedron 21, 413, 421, 439 (1965).

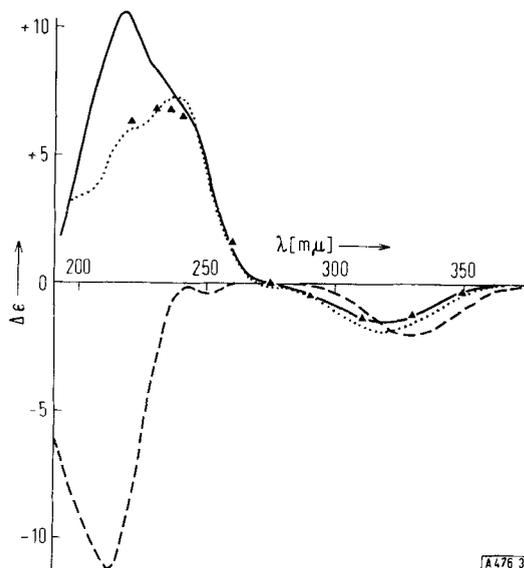
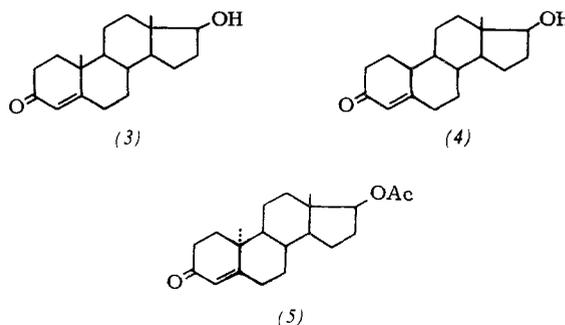


Abb. 3. Circulardichroismus einiger Δ^4 -3-Ketosteroide, in Äthanol.
 ▲ Testosteron (3) (mit dem alten Dichrograph gemessen).
 (—) Testosteron (mit dem neuen Dichrograph gemessen).
 (....) 19-nor-Testosteron (4).
 (---) 10 α -Testosteron-acetat (5).

des $\pi \rightarrow \pi^*$ -Übergangs verhindert. Abbildung 3 zeigt den Circulardichroismus der drei Δ^4 -3-Ketosteroide Testosteron (3), 19-nor-Testosteron (4) und 10 α -Testosteron-acetat (5) [9a] in beiden Spektralbereichen. Es war bereits bekannt, daß die drei Verbindungen in der Gegend um 330 mμ einen sehr ähnlichen Circular-dichroismus haben. Bei kürzeren Wellenlängen ist die Situation vollkommen anders. Man findet hier zwei Banden, deren relative Amplituden mit der Struktur der Verbindungen variieren. So führt etwa das Fehlen der Methylgruppe an C-10 im 19-nor-Testosteron (4) zu einer deutlichen Verminderung der Bande bei 220 mμ,



während die Bande 235 mμ unverändert bleibt. Dagegen fehlt im Dichrogramm des 10 α -Testosterons (5) die Bande bei 235 mμ. Besonders bemerkenswert ist die Umkehrung des Vorzeichens der Bande bei 220 mμ bei der Epimerisierung an C-10, die auf die optische Aktivität im nahen Ultraviolett keinen Einfluß hat. Dieses Phänomen gestattet also den Nachweis einer Epimerie an C-10, es macht aber eine von uns früher aufgestellte Hypothese ungültig, nach der die Banden bei 240 und 330 mμ stets entgegengesetztes Vorzeichen haben sollten.

[9a] Wir danken Dr. *R. Wenger*, Zürich, für eine Probe von 10 α -Testosteron.

c) Aromatische Ringe

Abbildung 4 zeigt den Circular dichroismus des Östradiols (6) und des 9-Isoöstradiols (7). Man erkennt, daß die Absorption des phenolischen Bestandteils dieser Verbindungen empfindlich auf die Asymmetrie der Um-

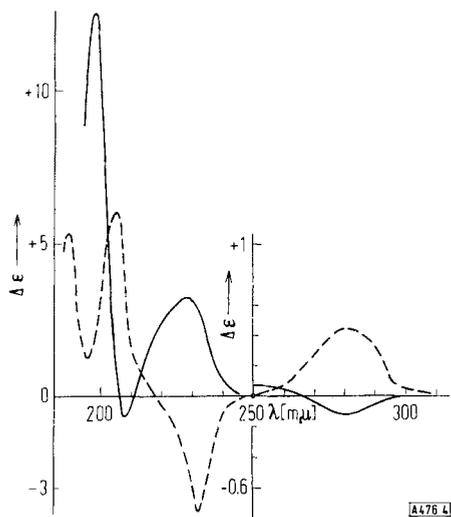
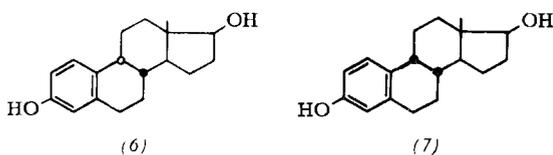


Abb. 4. Circular dichroismus von (—) Östradiol (6) und (- - -) 9-Isoöstradiol (7) in Äthanol.

gebung reagiert. Insbesondere ändert sich mit einer Inversion an C-9 das Vorzeichen der beiden Banden bei längeren Wellenlängen, während die Bande bei 200 mμ unbeeinflusst bleibt.



Für diese Art von Chromophoren entsprechen die Maxima des Dichroismus nicht den Maxima der isotropen Absorption. Das gilt besonders für die Dichroismusbande bei 230 mμ, denn bei dieser Wellenlänge hat die isotrope Absorption ein deutliches Minimum.

d) Allgemeine Bemerkungen

Bei den wenigen hier gegebenen Beispielen für konjugierte Chromophore variiert der Anisotropiefaktor zwischen $1,5 \times 10^{-3}$ (Ergosterin) und ca. 5×10^{-5} (Phenolbande bei 280 mμ). Im ungünstigsten Fall hat die Amplitude auf dem Schreibstreifen eine Höhe von 9 mm, während die Maxima des Untergrundes eine Höhe von 3 mm nicht überschreiten. Wird der Untergrund durch Mittelung ausgeglichen, so erhält man für die Meßkurve eine Genauigkeit von etwa 15%.

Das von Grosjean und Tari [6] entwickelte neue Gerät gestattet also die Messung der optischen Aktivität von Chromophoren, für die $\Delta\epsilon/\epsilon$ ungefähr 2×10^{-5} ist. Für schwach absorbierende Chromophore reicht der gegenwärtig im Handel [9b] befindliche erste Dichrograph vollkommen aus,

[9b] Hersteller: Jouan, Paris 6e, 113 Bd. St. Germain.

und das neue Gerät bietet hier kaum einen Vorteil. Im Gebiet zwischen 220 mμ und dem sichtbaren Spektralbereich sind auch mit dem alten Gerät halbquantitative Bestimmungen bis zu $(\Delta\epsilon/\epsilon)$ -Werten von 5×10^{-4} möglich. Es kommt dabei nur darauf an, die Verdünnung der Lösung so zu wählen, daß die isotrope optische Dichte unterhalb 1,5 bleibt. Auf dem Schreibstreifen des Dichrographen erhält man dann Amplituden, die wenige Millimeter hoch sind. Wiederholt man die Messungen jedoch genügend oft, so kann man eine Genauigkeit von etwa 30% erreichen, da der Geräuschpegel des Gerätes sehr niedrig liegt. Für qualitative Diskussionen reicht diese Genauigkeit oftmals aus. Als Beispiel sind in Abbildung 3 die für Testosteron mit dem ersten Dichrographen gemessenen Punkte eingetragen.

Dagegen liegen die interessanten Absorptionen von Peptiden und Proteinen unterhalb 220 mμ, so daß die optischen Aktivitäten dieser Verbindungen nur mit dem neuen Gerät gemessen werden können.

III. Circular dichroismus einiger Proteine und verwandter Substanzen

Die Helixstruktur von Polypeptiden und Proteinen, wie sie zuerst von Pauling, Corey und Branson [10] vorgeschlagen und später durch die Röntgenanalyse einiger Substanzen bestätigt wurde, führte dazu, daß man sich für die Rotationsdispersion dieser Verbindungen interessierte. Die räumliche Anordnung der Peptidbindungen in der Helix führt zu Wechselwirkungen zwischen den Amidgruppen, zur Aufspaltung einiger Übergänge und zu einem für diese Konformation typischen Dichroismus. Holzwarth und Doty [11] haben kürzlich gezeigt, daß zwischen experimentellen Befunden und den theoretischen Voraussagen von Moffitt [12] und Woody [13] eine gute Übereinstimmung besteht. Wir haben den Circular dichroismus der Poly-L-glutaminsäure untersucht, da diese Verbindung als Modell für Proteine gelten kann.

a) Dichroismus von Poly-L-glutaminsäure [13a]

Bei einem pH-Wert in der Nähe von 4 hat Poly-L-glutaminsäure zu 100% Helixstruktur. Abbildung 5 zeigt ihr Dichrogramm. Man erkennt drei Banden, eine positive bei 191 mμ und zwei negative bei 209 und 222 mμ. Die Bande bei 191 mμ entspricht dem $n \rightarrow \pi^*$ -Übergang der Amidgruppe. Der NV_1 -Übergang des gleichen Chromophors ist durch Koppelung mit Peptidbindungen, die in der Helixstruktur benachbart sind, aufgespalten und führt zu den Banden bei 209 und 222 mμ. Die Kurve ließ sich durch Anwendung einer Methode der kleinsten Quadrate in drei Gauss-Kurven zerlegen. Die dabei erhaltenen Werte sind in Tabelle 1 zusammengestellt. Sie

[10] L. Pauling, R. B. Corey u. H. R. Branson, Proc. nat. Acad. Sci. USA 37, 205 (1951).

[11] G. Holzwarth u. P. Doty, J. Amer. chem. Soc. 87, 218 (1965).

[12] W. Moffitt, J. chem. Physics 25, 467 (1956); Proc. nat. Acad. Sci. USA 42, 736 (1956).

[13] R. W. Woody, Dissertation, University of California, 1962.

[13a] Zur Analyse wurde ein Präparat des Mann Research Laboratory verwendet, dessen Molekulargewicht 50000 betrug.

stimmen mit den von *Holzwarth* und *Doty* [11] für den Methylester der Poly-L-glutaminsäure angegebenen Daten befriedigend überein. Bei pH-Werten oberhalb 6 ist die Poly-L-glutaminsäure statistisch geknäuel. Ihr Circular dichroismus zeigt dann zwei Banden (Abb. 5),

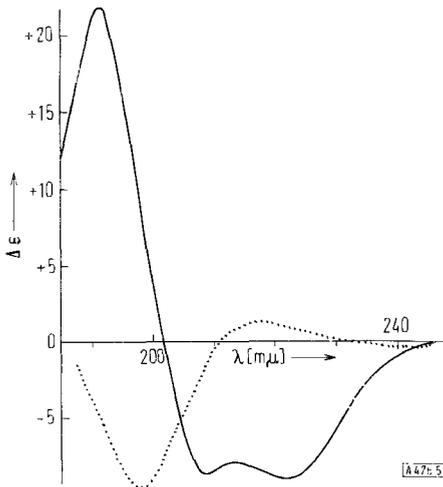


Abb. 5. Circular dichroismus von Poly-L-glutaminsäure in wässriger Lösung (—) bei pH = 4,3 (Helix) und (····) bei pH = 11 (statistisches Knäuel).

von denen die schwächere bei 218 mμ dem $n \rightarrow \pi^*$ -Übergang des Amidchromophors entspricht. Die zweite Bande bei 198 mμ ist wesentlich stärker und kann wahrscheinlich dem NV_1 -Übergang zugeschrieben werden,

Tabelle 1. Zerlegung des Dichrogramms der Poly-L-glutaminsäure in drei Gauss-Kurven.

	λ_{\max} [mμ]	H [mμ] [a]	$\Delta\epsilon/n$ [b]	$R \cdot 10^{-40}$ [cgs-E.] [c]
1. Gauss-K.	192	8,9	27,1	51
2. Gauss-K.	204	12,7	9,7	29
3. Gauss-K.	224	10	8,1	15

[a] Halbwertsbreite (= Breite der Bande bei $\Delta\epsilon_{\max}/c$).
 [b] n = Zahl der Monomeren im Molekül.
 [c] R = Drehvermögen.

obwohl ihr Maximum bei einer größeren Wellenlänge (198 mμ) liegt als das Maximum der isotropen Absorption (191 mμ).

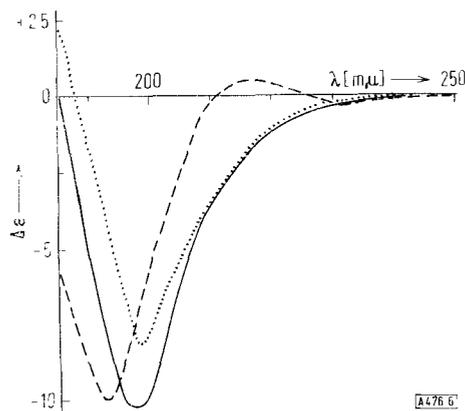


Abb. 6. Circular dichroismus von α -Glycyl-L-lysyl-L-glutaminsäure bei (---) pH = 3,1, (—) pH = 5,9 und (····) pH = 10,75 in wässriger Lösung.

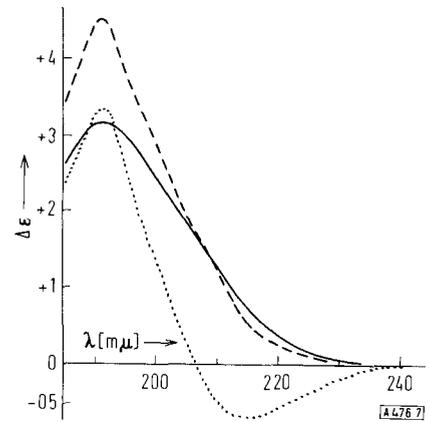
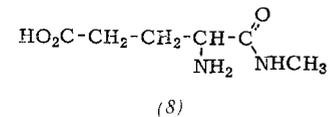


Abb. 7. Circular dichroismus von L-N'-Methylisoglutamin (8) in wässriger Lösung bei (---) pH = 3,4, (—) pH = 6,5 und (····) pH = 10,4.

Die Abbildungen 6 und 7 zeigen, daß man für das Tripeptid α -Glycyl-N-lysyl-L-glutaminsäure sowie für das L-N'-Methylisoglutamin (8) [13b] ähnliche Dichroismuskurven findet. Der Dichroismus der zuletzt genannten Verbindung hat jedoch das entgegengesetzte Vorzeichen, obwohl die Substanz zur gleichen optischen



Reihe gehört. Wahrscheinlich ist dafür die Tatsache verantwortlich, daß sich in α -Stellung zur Amidgruppe eine Aminogruppe befindet und nicht eine zweite Amidgruppe. Variationen des pH-Wertes haben auf den Dichroismus der beiden Substanzen nur einen geringen Einfluß, und die Änderungen haben keine Ähnlichkeit mit denen, die man bei der Poly-L-glutaminsäure beobachtet. Das zeigt, daß der Dichroismus der Poly-L-glutaminsäure für die Helixstruktur der Kette charakteristisch ist und nicht durch eine unterschiedliche Solvation der Monomereinheiten [14] hervorgerufen wird.

b) Helixstruktur in nativem menschlichem Serumalbumin

Die Abbildungen 8a-c zeigen den Circular dichroismus von menschlichem Serumalbumin in wässriger Lösung, nach der Denaturierung mit Harnstoff (Konzentration: 9 M) und nach der Ultrafiltration einer denaturierten Lösung, durch die die Harnstoffkonzentration im Rückstand auf ca. 4 M herabgesetzt wurde. Da Harnstoff unterhalb 200 mμ absorbiert, enden die in Abbildungen 8b und c wiedergegebenen Kurven bei dieser Wellenlänge.

Die schwache dichroitische Absorption in der Nähe von 250 mμ wird durch Tyrosin-, Tryptophan-, Histidin- und vor allem durch Cystin-Reste verursacht. Wir haben

[13b] Diese Verbindung (Fp = 200 °C) haben *G. Amiard* und *R. Heymes* in unserem Laboratorium aus dem Anhydrid des N-Trityl-L-glutaminsäure- ω -methylesters synthetisiert durch Bildung des Methylamids mit Methylamin, alkalische Hydrolyse der Methoxycarbonyl-Gruppe und saure Hydrolyse der Tritylgruppe.
 [14] *L. I. Katzin* u. *E. Gulyas*, *J. Amer. chem. Soc.* 86, 1655 (1964).

kürzlich gezeigt [15], daß diese Aminosäuren bei der genannten Wellenlänge einen schwachen Dichroismus zeigen, der auf die chromophoren Phenol-, Indol- und Imidazol-Reste bzw. auf die Disulfid-Brücke zurückgeht. Man findet jedoch keine quantitative Übereinstimmung, vermutlich weil im Protein die optische Aktivität jedes dieser Chromophore durch die Umgebung modifiziert wird.

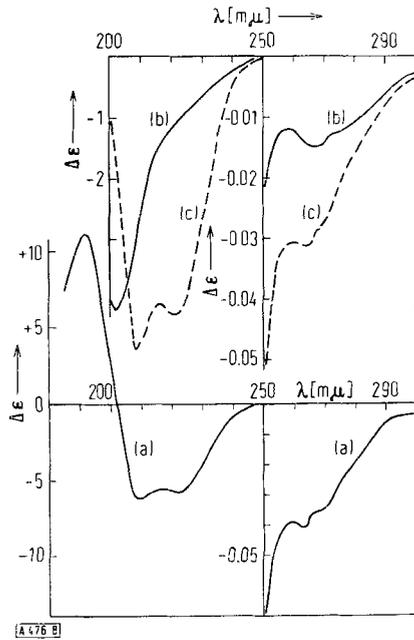


Abb. 8. Circulardichroismus von menschlichem Serumalbumin (a) im nativen Zustand, (b) in 9 M Harnstofflösung nach einstündigem Erhitzen auf 78 °C und (c) in einer Lösung, deren Harnstoffgehalt zunächst 9 M betrug und anschließend durch Ultrafiltration auf 3,9 M verringert wurde.

Im Gebiet zwischen 185 und 250 m μ gleicht die Kurve für natives menschliches Serumalbumin derjenigen für die helixartig gebaute Poly-L-glutaminsäure (Abb. 8a und 5). In beiden Fällen führt auch der Übergang von der Helixstruktur zum statistischen Knäuel zu ähnlichen Änderungen des Dichrogramms.

Aus diesen Beobachtungen sowie aus der Tatsache, daß die Kurve ihre ursprüngliche Gestalt zurückgewinnt, wenn man die Harnstoffkonzentration herabsetzt, läßt sich schließen, daß menschliches Serumalbumin im nativen Zustand mindestens teilweise Helixstruktur hat. Um den prozentualen Gehalt an Helixstruktur zu ermitteln, verglichen wir die Kurve in Abbildung 8a mit einer Kurve, die aus den Daten für vollkommen denaturiertes Serumalbumin und vollkommen helixartige Poly-L-glutaminsäure (Abb. 8b und 5) berechnet worden war. Durch die Wahl der Koeffizienten m und n, die nach einer Methode der kleinsten Quadrate über mehrere Wellenlängen bestimmt wurden, ließen sich die normalisierten Kurven der Komponenten f(λ) (helixartige Poly-L-glutaminsäure) und $\varphi(\lambda)$ (denaturiertes menschliches Serumalbumin) so zusammensetzen,

$$m f(\lambda) + n \varphi(\lambda)$$

daß die in Abbildung 8a wiedergegebene Kurve möglichst genau erreicht wurde [15a]. Die Standardabweichung

[15] M. Legrand u. R. Viennet, Bull. Soc. chim. France, 1965, 679.

$$\sigma = \sqrt{\frac{\sum [\Delta\epsilon_{\lambda}(\text{gef.}) - \Delta\epsilon_{\lambda}(\text{ber.})]^2}{n-2}}$$

muß von der gleichen Größenordnung sein wie der experimentelle Fehler, wenn die Koeffizienten richtig gewählt wurden. Für natives menschliches Serumalbumin führte diese Methode zu einer Standardabweichung σ von $\pm 2\%$, die in der Größenordnung des experimentellen Fehlers liegt. Die Hypothese, daß natives menschliches Serumalbumin zum Teil Helixstruktur hat und zum Teil ein statistisches Knäuel ist, wird dadurch gerechtfertigt, und man berechnet einen Helixgehalt von etwa 60%. Wir sind der Ansicht, daß dieses Ergebnis sowie die aus der Rotationsdispersion von Rinderserumalbumin um 200 m μ abgeleiteten Resultate [16] den bisher direktesten Beweis dafür liefern, daß einige Proteine auch in Lösung Helixstruktur haben können [16a].

c) Denaturierung von Serumalbumin

1. Einfluß der Ionenstärke

Der Einfluß der Ionenstärke wurde bei drei pH-Werten (1,5, ca. 6 und 12) für drei NaCl-Konzentrationen (0,05 M, 0,2 M und 0,4 M) untersucht. Signifikante Änderungen ließen sich nicht beobachten, und daher wurde bei späteren Messungen auf eine Konstanz der Ionenstärke nicht mehr geachtet.

2. Einfluß des pH-Wertes

Bei pH-Werten zwischen 4 und 10 bleibt der Dichroismus menschlichen Serumalbumins praktisch konstant. Die Denaturierung außerhalb dieses Bereichs ist jedoch nicht zu vernachlässigen. Abbildung 9 zeigt die Änderung des Helixgehaltes in Abhängigkeit vom pH-Wert. Die Kurve hat einige Ähnlichkeit mit derjenigen, die Jirgensons und Sirotzky [18] für die Abhängigkeit von $[\alpha]_D$ vom pH-Wert fanden und die gleichfalls in Abbildung 9 wiedergegeben worden ist. Die Kurve für den Helix-

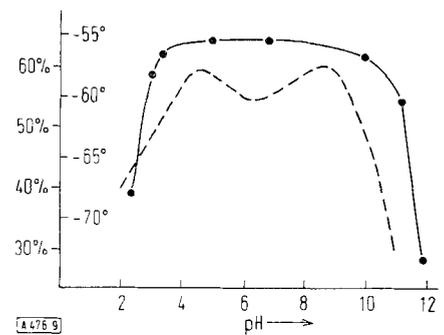


Abb. 9. Helixgehalt [%] von menschlichem Serumalbumin in wäßriger Lösung, aus dem Circulardichroismus bestimmt (Kurve — und linke Ordinatenenteilung) sowie $[\alpha]_D$ einer wäßrigen Lösung von menschlichem Serumalbumin nach Jirgensons und Sirotzky (Kurve - - - und rechte Ordinatenenteilung).

[15a] Wir haben das gleiche Verfahren bereits bei der Untersuchung von Diketonen angewendet [2].

[16] E. R. Blout, I. Schmier u. N. S. Simmons, J. Amer. chem. Soc. 84, 3193 (1962).

[16a] Die Helixstruktur im festen Zustand ist durch Röntgenanalyse eindeutig nachgewiesen worden [17].

[17] P. Urnes u. P. Doty, Advances Protein Chem. 16, 483 (1961).

[18] B. Jirgensons u. S. Sirotzky, J. Amer. chem. Soc. 76, 1367 (1954).

gehalt ändert ihre Neigung bei pH = 3 etwas stärker als die Kurve für das Drehungsvermögen, doch sind diese Unterschiede fast innerhalb des experimentellen Fehlers.

3. Einfluß der Temperatur

Die optische Aktivität menschlichen Serumalbumins ist bis hinauf zum Koagulationspunkt nicht sehr temperaturabhängig [19]. Oberhalb des Koagulationspunktes läßt sich der Dichroismus nur messen, wenn man die Aggregate durch Zusatz weniger Tropfen konzentrierten Ammoniaks wieder in Lösung bringt. Abbildung 10

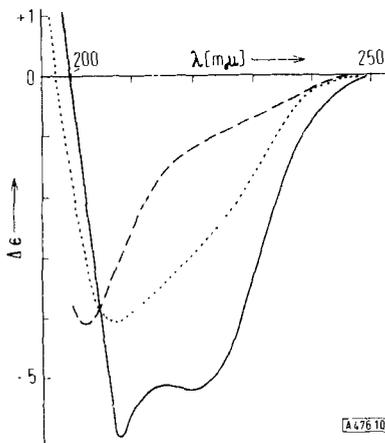


Abb. 10. Wärmedenaturierung von menschlichem Serumalbumin. (—) Circular dichroismus von menschlichem Serumalbumin in wäßrigem Ammoniak. (.....) Circular dichroismus von menschlichem Serumalbumin in wäßrigem Ammoniak nach einstündigem Erhitzen auf 110 °C. (---) Circular dichroismus von menschlichem Serumalbumin in 9 M Harnstofflösung nach einstündigem Erhitzen auf 75 °C.

zeigt den unter diesen Bedingungen beobachteten Dichroismus und enthält außerdem die Dichrogramme des nativen Proteins in ammoniakalischer Lösung und von menschlichem Serumalbumin, das in 9 M Harnstofflösung denaturiert und anschließend auf 75 °C erhitzt wurde. Aus der Abbildung ist zu schließen, daß Ammoniak die optische Aktivität nativen menschlichen Serumalbumins nicht beeinflusst und daß die Denaturierung durch Erhitzen allein einen geringeren Einfluß hat als die Denaturierung mit Harnstoff bei anschließendem mildem Erwärmen.

4. Denaturierung durch Harnstoff

Gibt man zu einer wäßrigen Lösung von menschlichem Serumalbumin bei pH = 6,9 steigende Mengen Harnstoff, so ändert sich der Circular dichroismus des Proteins beträchtlich (Abb. 11). Besonders das Maximum bei 222 mμ nimmt stark ab. Obwohl sich Änderungen des Maximums bei 192 mμ infolge der Absorption des Harnstoffs nicht erkennen lassen, zeigen die Kurven in Abbildung 11 und die Analogie zur Denaturierung von Poly-L-glutaminsäure (Abb. 5), daß Harnstoff die Helixstruktur im Serumalbumin zerstört, womit die Befunde von Callaghan und Martin [20] eine Bestätigung finden.

[19] M. A. Golub u. E. E. Pickett, J. Polymer Sci. 13, 427 (1954).

[20] P. Callaghan u. N. H. Martin, Biochem. J. 83, 144 (1962).

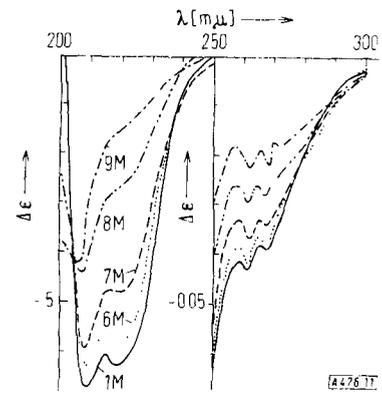


Abb. 11. Circular dichroismus von menschlichem Serumalbumin nach der Denaturierung durch Harnstofflösungen verschiedener Konzentration.

Aus dem Dichroismus zwischen 220 und 210 mμ lassen sich folgende Helixgehalte berechnen:

Harnstoffkonzentration [Mol/l]	2	4	6	7	8	9
Helixgehalt [%]	55	55	53	41	22	7

Die Denaturierung beginnt danach erst bei Harnstoffkonzentrationen oberhalb 6 M und ist auch bei 9 M noch nicht vollständig. Das Maximum bei 222 mμ (n→π*-Übergang der Helixform) verschwindet erst bei schwachem Erhitzen.

Die Denaturierung scheint ein reversibler Vorgang zu sein, mindestens soweit sich das aus dem Verhalten des Dichroismus ablesen läßt. Entfernt man nämlich den Harnstoff durch Ultrafiltration der denaturierten Lösung teilweise (9 M → 4 M), so erhält man praktisch wieder das anfängliche Dichrogramm. Erhitzt man aber die Lösung des Proteins in 9 M Harnstoff auf 75 °C, so ist die Denaturierung nicht mehr reversibel und das Dichrogramm bleibt das der denaturierten Form, auch wenn man die Harnstoffkonzentration vermindert. Offenbar führt die gemeinsame Einwirkung von Wärme und Harnstoff zur Umordnung einiger Disulfidbrücken [21].

5. Einfluß von Lösungsmitteln

Einige Lösungsmittel begünstigen die Bildung der Helixstruktur in Polypeptiden und Proteinen. Wir arbeiteten mit 2-Chloräthanol, da es im fernen Ultraviolett gut lichtdurchlässig ist. Abbildung 12 zeigt an Hand des Circular dichroismus, daß das Protein Clupein-sulfat in wäßriger Lösung vollkommen als statistisches Knäuel vorliegt, in 2-Chloräthanol dagegen Helixstruktur hat. Dieser Effekt sollte bei einem Polypeptid, das schon in wäßriger Lösung vollkommen als Helix vorliegt, nicht auftreten. Bringt man Poly-L-glutaminsäure in ein Gemisch aus gleichen Volumenteilen Wasser und 2-Chloräthanol [21a], so beobachtet man dennoch einen scheinbaren Anstieg des Helixgehaltes um etwa 6%, was aber vermutlich darauf zurückzuführen ist, daß das Lösungsmittel den Dichroismus der Helix beeinflusst.

Menschliches Serumalbumin hat in 2-Chloräthanol einen deutlichen höheren Helixgehalt als in wäßriger

[21] V. D. Hospelhorn u. E. V. Jensen, J. Amer. chem. Soc. 76, 2830 (1954).

[21a] Man verwendet dieses Lösungsmittelgemisch, um die Substanz löslich zu machen.

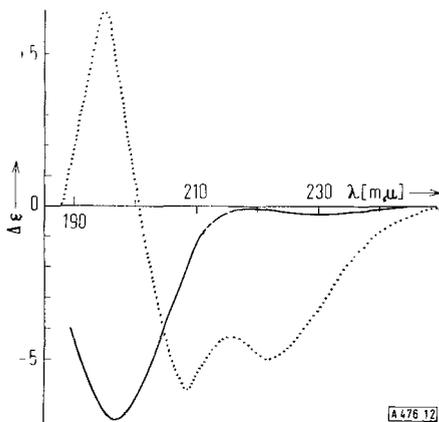


Abb. 12. Circulardichroismus von Clupeinsulfat in wäßriger Lösung bei pH = 6,15 (—) und in 2-Chloräthanol (.....).

Lösung. Wendet man das im Abschnitt IIIb beschriebene Verfahren der kleinsten Quadrate an und berücksichtigt den Einfluß des Lösungsmittels auf den Dichroismus der Helix, so findet man für menschliches Serumalbumin in 2-Chloräthanol einen Helixgehalt von 75%. Dieser Wert ist größer als in wäßriger Lösung (60%), aber immer noch weit von 100% entfernt. Nach Callaghan und Martin [20] ist die Unfähigkeit menschlichen Serumalbumins, einen Helixgehalt von 100% zu erreichen, auf Eigenheiten der Struktur wie beispielsweise die Disulfidbrücken zurückzuführen.

6. Reduktion von Disulfid-Bindungen

In Proteinen wie dem menschlichen Serumalbumin, in denen Disulfidbrücken mehr oder weniger entfernte Punkte der Proteinkette miteinander verknüpfen, muß die Öffnung solcher Brücken zu Änderungen der Konformation führen. Dieses Phänomen ist jedoch schwierig zu untersuchen, da das Protein zunächst denaturiert werden muß, bevor die Disulfidbrücken mit chemischen Mitteln geöffnet werden können. Die Denaturierung läßt sich entweder mit einer oberflächenaktiven Substanz, z. B. Dodecylsulfat, oder mit Harnstoff erreichen [22, 23].

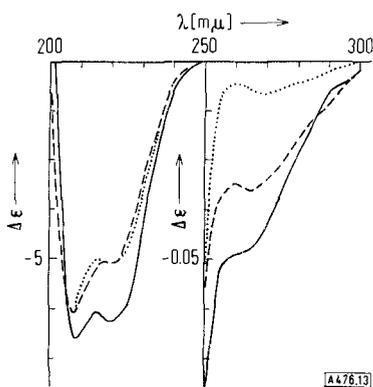


Abb. 13. Reduktion von Disulfidbrücken in menschlichem Serumalbumin durch 2-Mercaptoäthanol in Gegenwart von Dodecylsulfat. (—) Menschliches Serumalbumin in wäßriger Lösung mit 2-Mercaptoäthanol. (---) Menschliches Serumalbumin in wäßriger Lösung mit Dodecylsulfat. (.....) Menschliches Serumalbumin in wäßriger Lösung mit Dodecylsulfat und 2-Mercaptoäthanol.

[22] G. Markus u. F. Karush, J. Amer. chem. Soc. 79, 134 (1957).

[23] H. Würz u. F. Haurowitz, J. Amer. chem. Soc. 83, 280 (1961).

Wir denaturierten menschliches Serumalbumin mit Dodecylsulfat und reduzierten die Disulfidbrücken nach der Methode von Würz und Haurowitz [23] mit 2-Mercaptoäthanol. Abbildung 13 zeigt die Änderung des Dichroismus. Folgende Schlüsse lassen sich ziehen:

α) Mercaptoäthanol allein reduziert die Disulfidbrücken im menschlichen Serumalbumin nicht.

β) Dodecylsulfat setzt den Helixgehalt des Proteins auf 40% herab (Methode der kleinsten Quadrate), wenn es in einer Konzentration von 0,2 M vorliegt.

γ) Dodecylsulfat und 2-Mercaptoäthanol bringen den Dichroismus zwischen 250 und 300 m μ fast vollständig zum Verschwinden. Das bestätigt die Zuordnung des größten Teils der optischen Aktivität in diesem Bereich zu den Disulfidbrücken.

δ) Der Dichroismus zwischen 200 und 250 m μ ändert sich bei der Einwirkung von 2-Mercaptoäthanol nicht. Daraus folgt, daß die Zunahme des molaren Drehvermögens $[M]_D$ bei der Reduktion von Disulfidbrücken auf die Öffnung dieser Bindungen zurückzuführen ist [23] und nicht auf eine Zunahme des Helixgehaltes im Anschluß an diese Bindungsspaltung [22]. Eine quantitative Deutung ist dagegen nicht einfach. Die Zunahme des $[M]_D$ -Wertes um 27° kann nicht der Abnahme des negativen Dichroismus bei 270 m μ (der Beitrag der Dichroismus-Änderung zur Zunahme des $[M]_D$ -Wertes beträgt nur 2 bis 3°) zugeschrieben werden. Es muß vielmehr angenommen werden, daß es unterhalb 200 m μ eine starke für die Disulfidbrücken charakteristische

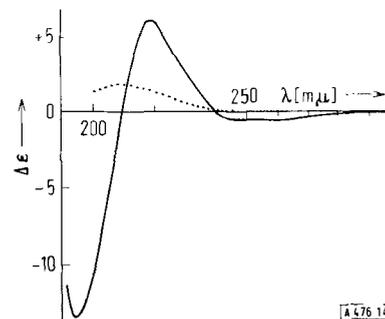


Abb. 14. Circulardichroismus von (—) L-Cystin und (.....) L-Cystein in 0,1 N HCl.

negative Bande gibt, die in diesen Versuchen infolge der Absorption des Dodecylsulfates und des 2-Mercaptoäthanol nicht gemessen werden konnte. Tatsächlich zeigt das Dichrogramm des Cystins eine solche Bande, die im Dichrogramm des Cysteins (Abb. 14) fehlt. Eine ungefähre Rechnung, die auf dieser Hypothese basiert, ergibt die richtige Größenordnung (+20 bis +25°).

Verwendet man als Denaturierungsmittel nicht Dodecylsulfat, sondern Harnstoff, so sehen die Dichrogramme vollkommen anders aus (Abb. 15). Ein Vergleich mit Abbildung 11 zeigt, daß Harnstoff in Gegenwart von 2-Mercaptoäthanol wesentlich wirksamer ist, denn der Helixgehalt sinkt in Gegenwart von 2-Mercaptoäthanol schon bei einer Harnstoffkonzentration von 5 M auf den Wert ab, der in Abwesenheit von 2-Mercaptoäthanol erst bei einer Harnstoffkonzentration von 7 M erreicht

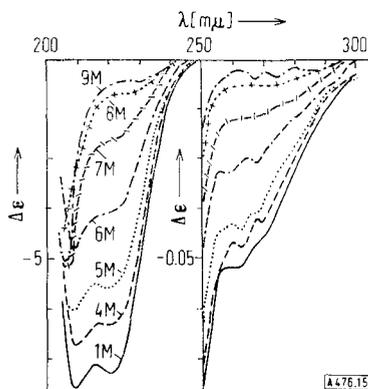


Abb. 15. Circulardichroismus von menschlichem Serumalbumin in wäßriger Lösung nach Reduktion der Disulfidbrücken mit 2-Mercaptoäthanol in Gegenwart von Harnstoff verschiedener Konzentration.

wird. Darüberhinaus ist die Kurve bei einer Harnstoffkonzentration von 9 M und gleichzeitiger Anwesenheit des Reduktionsmittels verschieden von der Kurve, die man mit 9 M Harnstoff allein erhält. Sie scheint aber mit der Kurve für statistisch geknäuelte Poly-L-glutaminsäure ähnlich zu sein.

Diese Unterschiede sind möglicherweise durch eine erhöhte Flexibilität des Proteins zu erklären, wenn die Disulfidbrücken geöffnet worden sind. Andererseits beobachtet man ähnliche Unterschiede mit Dodecylsulfat als Denaturierungsmittel nicht; hier haben die Kurven vielmehr vor und nach der Reduktion den gleichen Verlauf.

Wir schließen aus diesen Beobachtungen, daß die Disulfidbrücken die Proteinstrukturen (Helix und statistisches Knäuel) stabilisieren [23a], möglicherweise indem sie eine Konformation aufrechterhalten, in der empfindliche Gruppen gegen das umgebende Medium abgeschirmt sind [24]. Es scheint, daß Dodecylsulfat den Zusammenbruch der Strukturen verhindern kann, wenn die Disulfidbrücken geöffnet worden sind.

Schluß

Diese wenigen Beispiele aus dem Gebiet der Polypeptide und Proteine zeigen, welche Folgerungen aus Messungen des Dichroismus im fernen Ultraviolett gezogen werden können. Infolge der Absorption der normalerweise verwendeten Lösungsmittel sind Untersuchungen in diesem Spektralbereich nicht ganz einfach, doch werden diese Schwierigkeiten ausgeglichen durch die Möglichkeit, die optische Aktivität derjenigen Übergänge direkt zu beobachten, die das Rotationsvermögen im nahen Ultraviolett und im sichtbaren Spektralbereich bestimmen.

Eingegangen am 23. Februar 1965 [A 476]

[23a] Im nativen Protein sind die nicht helixartig gebauten Bereiche nicht periodisch angeordnet, ihre Positionen lassen sich aber durch die Angabe von drei Koordinaten beschreiben (siehe Röntgendiagramme von Proteinen). Dagegen ist die Proteinkette nach der Denaturierung flexibel.

[24] G. Markus in H. Peeters: Proceedings 11th Colloquium on Protides of the Biological Fluids, Burges (Belgien) 1963. Elsevier, Amsterdam 1964.

Neuere Methoden der präparativen organischen Chemie IV [*]

Neue Reaktionen von Phosphinalkylenen und ihre präparativen Möglichkeiten III [**]

Phosphinalkylene und Reagentien mit Mehrfachbindungen

VON PROF. DR. H. J. BESTMANN

INSTITUT FÜR ORGANISCHE CHEMIE DER UNIVERSITÄT ERLANGEN-NÜRNBERG

Als Beispiele für präparativ brauchbare Synthesen mit Phosphinalkylenen und Substanzen, die eine CN- oder CC-Doppelbindung enthalten, seien die Darstellung von Olefinen, Allenen, Pyran- und Cyclopropanderivaten genannt. Olefine, Ketone, mono- und polycyclische Verbindungen sind durch Autoxydation von Phosphinalkylenen erhältlich, während man z. B. α,β -Dioxoverbindungen – auch cyclische – gut durch Persäureoxydation darstellen kann. Phosphinalkylene können ebenfalls zur Synthese von Azinen und Schiffchen Basen dienen. – Von den vielen Möglichkeiten der Wittig-Reaktion wird nur die Darstellung T-markierter Aldehyde und Olefine besprochen.

Inhaltsübersicht:

Teil I. Der Säure-Base-Charakter von Phosphoniumsalzen und Phosphinalkylenen

A. Einleitung

B. Phosphoniumsalze und Phosphinalkylene als korrespondierende Säure-Base-Paare

C. Die Umylidierung

D. Zur Darstellung von Phosphoniumsalzen und Phosphinalkylenen

1. Phosphoniumsalze

2. Phosphinalkylene