

- [39] P. von R. Schleyer, G. M. Van Dine, U. Schöllkopf u. J. Paust, J. Amer. Chem. Soc. 88, 2868 (1966); U. Schöllkopf, Angew. Chem. 80, 603 (1968); Angew. Chem. internat. Edit. 7, 588 (1968).
- [40] D. Kurland, Dissertation, Harvard University 1967; R. Lehr, Dissertation, Harvard University 1968; R. B. Woodward, Chemical Society Symposium on Aromaticity, Sheffield 1966.
- [41] R. B. Bates u. D. A. McCoombs, Tetrahedron Lett. 1969, 977.
- [42] G. L. Closs u. P. E. Pfeffer, J. Amer. Chem. Soc. 90, 2452 (1968).
- [43] N. C. Baird u. M. J. S. Dewar, J. Amer. Chem. Soc. 91, 352 (1969).
- [44] J. F. M. Oth, Angew. Chem. 80, 633 (1968); Angew. Chem. internat. Edit. 7, 646 (1968).
- [45] M. G. Evans u. M. Polanyi, Trans. Faraday Soc. 32, 1340 (1936); R. P. Bell, Proc. Roy. Soc. A 154, 414 (1936); Acid-Base Catalysis. Oxford University Press, Oxford 1941.
- [46] M. J. S. Dewar, Discuss. Faraday Soc. 2, 261 (1947).
- [47] W. R. Roth, Tetrahedron Lett. 1964, 1009.
- [48] J. A. Berson u. G. L. Nelson, J. Amer. Chem. Soc. 89, 5503 (1967); J. A. Berson, Accounts Chem. Res. 1, 152 (1968).
- [49] W. L. Mack, J. Amer. Chem. Soc. 91, 5682 (1969).
- [50] M. J. S. Dewar, Bull. Chim. France 18, C71 (1951).
- [51] M. J. S. Dewar u. A. P. Marchand, Annu. Rev. Phys. Chem. 16, 321 (1965).
- [52] P. S. Skell u. A. Y. Garner, J. Amer. Chem. Soc. 78, 5430 (1956).
- [53] W. T. A. M. van der Lugt u. L. J. Oosterhoff, J. Amer. Chem. Soc. 91, 6042 (1969).
- [54] R. Dougherty, J. Amer. Chem. Soc., im Druck.
- [55] M. J. S. Dewar, J. Chem. Soc. 1952, 3532.
- [56] H. J. Dauben jr. u. D. J. Bertelli, J. Amer. Chem. Soc. 83, 4657 (1961).
- [57] J. Kolc u. J. Michl, J. Amer. Chem. Soc. 92, 4147 (1970).
- [58] L. Cassar, P. E. Eaton u. J. Halpern, J. Amer. Chem. Soc. 92, 3515, 6366 (1970).
- [59] G. F. Emerson, L. Watts u. R. Pettit, J. Amer. Chem. Soc. 87, 131 (1965); M. P. Cava u. M. J. Mitchell: Cyclobutadiene and Related Compounds. Academic Press, New York 1967.
- [60] A. Streitwieser jr. u. U. Müller-Westerhoff, J. Amer. Chem. Soc. 90, 7364 (1968).
- [61] W. Merk u. R. Pettit, J. Amer. Chem. Soc. 89, 4788 (1967); Professor R. Pettit, persönliche Mitteilung.
- [62] M. J. S. Dewar u. C. de Llano, J. Amer. Chem. Soc. 91, 789 (1969); M. J. S. Dewar u. T. Morita, ibid. 91, 796 (1969).
- [63] M. J. S. Dewar u. A. J. Harget, Proc. Roy. Soc. A 315, 443, 457 (1970).
- [64] D. H. Lo u. M. A. Whitehead, Can. J. Chem. 46, 2027, 2041 (1968); J. Chem. Soc. A 1971, 481, und dort zit. Lit.
- [65] M. J. S. Dewar, M. C. Kohn u. N. Trinajstić, J. Amer. Chem. Soc., im Druck.
- [66] M. J. S. Dewar u. E. Haselbach, J. Amer. Chem. Soc. 92, 590 (1970); N. Bodor, M. J. S. Dewar, A. J. Harget u. E. Haselbach, ibid. 92, 3852 (1970).
- [67] M. J. S. Dewar, Fortschr. Chem. Forsch., im Druck.
- [68] M. J. S. Dewar u. S. Kirschner, unveröffentlicht.
- [69] A. Brown, M. J. S. Dewar u. W. W. Schoeller, J. Amer. Chem. Soc. 92, 5516 (1970).
- [70] M. J. S. Dewar u. W. W. Schoeller, J. Amer. Chem. Soc. 93, 1481 (1971).

Bifunktionelle Reagenzien zur Quervernetzung von Proteinen

Von Hugo Fasold, Jürgen Klappenberger, Christa Mayer und Heinz Remold^[*]

Proteine können durch chemische Verbindungen quervernetzt werden, ohne daß die komplizierte Raumstruktur sich dabei ändert. Man kennt inzwischen viele bifunktionelle Reagenzien, die mit funktionellen Gruppen in den Seitenketten der Aminosäuren zu reagieren vermögen. Aus der bekannten Länge der eingeführten Brücke kann nicht nur auf den Abstand der verknüpften Aminosäurereste geschlossen werden, sondern es lassen sich u. a. auch Aussagen über Konformationsänderungen während anderer Reaktionen und über die Anordnung der Bestandteile einer Quartärstruktur gewinnen.

1. Einleitung

Die monotone Verknüpfung von α -Aminosäuren über ihre α -Amino- und α -Carboxygruppen zu Peptidbindungen läßt als Rückgrat eines Proteinmoleküls die *Hauptkette* oder *Peptidkette* entstehen. Von ihr zweigen an den α -C-Atomen die charakteristischen Reste der Aminosäuren als *Seitenketten* ab. Die Konformation der Haupt- und Seitenketten ergibt sich am Ort der Protein-Biosynthese offensichtlich zwangsläufig aus der genetisch festgelegten Reihenfolge der Aminosäuren. Dabei zwingen Wechselwirkungen zwischen den Seitenketten das Gesamtprotein in

eine rigide, nur in kleinen Teilbereichen geringfügig verschiebbliche Raumstruktur.

Die *Sequenz* der Aminosäuren bezeichnet man als *Primärstruktur*. Die Konformation der Hauptkette und aller ihrer Seitenketten erhielt den Namen *Tertiärstruktur*; charakteristische Untereinheiten wie Wendeln (Helices) lassen sich als *Sekundärstruktur* abgrenzen (siehe auch Abb. 1). Manchmal bilden mehrere Hauptketten, kovalent durch Disulfidbrücken verknüpft, gemeinsam eine *Tertiärstruktur* (siehe Abb. 3). Setzen jedoch mehrere *Tertiärstrukturen* ohne kovalente Bindung in einem festen Aggregat ein *Gesamtprotein* zusammen, so gilt hierfür die Bezeichnung *Quartärstruktur*.

In den bisher aufgeklärten *Tertiärstrukturen* liegen die meisten hydrophoben Seitenketten unter Wasserausschluß

[*] Prof. Dr. H. Fasold, Dr. J. Klappenberger, Ch. Mayer und Dr. H. Remold
Institut für Biochemie der Universität
6 Frankfurt/Main-Sachsenhausen, Sandhofstraße

eng im Inneren des Moleküls zusammengepackt, während die ionisierbaren und polaren Seitenketten an der Moleküloberfläche in Kontakt mit der Wasserhülle stehen. Diese zweite Gruppe ist substituierenden chemischen Reaktionen zugänglich; als Beispiele seien die Acylierung der ϵ -Lysin-Aminogruppen, die Alkylierung der Cystein-SH-Gruppen oder die Nitrierung der phenolischen Tyrosin-Seitenketten mit Tetranitromethan genannt. Von Zahn^[1-3] stammt der Vorschlag, derartige Reaktionen mit bifunktionellen Brückenreagentien durchzuführen und so künstliche Quervernetzungen in das Protein einzufügen.

2. Anwendungsmöglichkeiten

Die Quervernetzungs-Methodik wurde bisher für drei Arten von Fragestellungen vorgeschlagen:

1. Um den Abstand zwischen zwei funktionellen Gruppen in einem Proteinmolekül bestimmen zu können, müssen sie durch ein starr gebautes bifunktionelles Reagens verknüpft werden. Nach enzymatischem Abbau des quervernetzten Proteins stellt sich dann die Aufgabe, die an den beiden „Fußpunkten“ der Brücken gelegenen Teilesequenzen in der Primärstruktur des Proteins zu identifizieren. Viele polare Seitenketten an der Proteinoberfläche sind in begrenztem Umfang beweglich; die Auswertung der Quervernetzungsreaktion ergibt deshalb einen Wert für den Abstand, der zwischen oberem und unterem Grenzwert liegt (siehe Tabelle 1).

2. Manche Proteine gehen charakteristische und physiologisch bedeutsame Konformationsänderungen ein. Allosterische Enzyme etwa werden durch ein niedermolekulares Produkt des Stoffwechsels mit eigener Haftstelle am Protein so umgelagert, daß ihre enzymatische Aktivität bei der Anheftung dieses Liganden zu- oder abnimmt. Man kann versuchen, durch Quervernetzung diese Konformationsänderung zu blockieren, um aus der Lokalisation der eingefügten Brücken Schlüsse über den Mechanismus der Umlagerung zu ziehen. Auch können manche Querverbindungen nur in einem der Konformeren möglich sein. Dies erlaubt es, den bevorzugt von der Umlagerung betroffenen Molekülbezirk aufzufinden.

3. Quervernetzungen zwischen zwei Proteinmolekülen sollen dazu beitragen, die Lagerung und die Kontaktflächen der einzelnen Proteine in Multi-Enzym-Komplexen, in Membranpräparationen oder anderen Protein-Aggregaten aufzuklären. Mehr und mehr wird aus den Untersuchungen der bisher bekannten Enzyme mit Quartärstrukturen und der Membranenzyme deutlich, wie stark die katalytische Aktivität der Untereinheiten solcher Systeme durch Kontakt mit ihren Nachbarn reguliert werden kann.

3. Reagentien und Auswertung der Versuche

Tabelle 1 zeigt jeweils nur einige Vertreter der für den Zweck der Quervernetzung synthetisierten Substanzklassen. Azofarbstoff-Reagentien weisen zusätzlich zum starren Bau den Vorteil auf, daß sie in schonender Reaktion durch

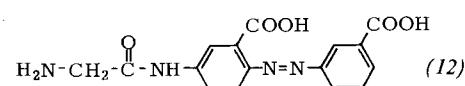
Dithionit spaltbar sind. Nach enzymatischem Abbau eines damit quervernetzten Proteins können aus den Azo-Peptiden die beiden Fußpunkt-Peptide getrennt isoliert werden. Auch läßt sich eine Verbindung zwischen verschiedenen Proteinmolekülen vorsichtig wieder lösen.

Der erste Schritt bei der Auswertung solcher Quervernetzungsversuche zur Ermittlung des Abstandes besteht stets im Nachweis der eingebauten Brücken mit dem „Fingerprint-Verfahren“. Zunächst ist dazu der Abbau der Proteine mit Enzymen notwendig, die, wie etwa Trypsin, reproduzierbar nur an wenigen Stellen der Sequenz die Peptidverbindungen hydrolysieren. Das so erhaltene Peptidgemisch wird in zweidimensionaler Kombination von Papier-Hochspannungselektrophorese und Papierchromatographie aufgetrennt. So entsteht für jedes Protein ein charakteristisches Peptidmuster. Bei quervernetzten Proteinen ermöglicht das Muster der hier neu hinzutretenden Brückenpeptide eine Charakterisierung der Tertiärstruktur des Proteins. Die Raumstrukturen verwandter Sequenzen können damit verglichen werden. Anwendungsbeispiele bieten das Verdauungsenzym Chymotrypsin und seine Vorstufe Chymotrypsinogen^[14].

4. Fehlerquellen und Störungen

Die Ankupplung der vorwiegend hydrophoben Reagentien an das Protein kann die natürliche Faltung der Moleküle angreifen und aufbrechen. Nach der Quervernetzung muß deshalb die Unversehrtheit der Raumstruktur bestätigt werden, z. B. durch enzymkinetische Messungen, durch Bestimmung der Zugänglichkeit einzelner Seitenketten-Familien für chemische Modifikationen oder durch Messungen der Rotationsdispersion und des Molekülvolumens^[13].

Ein Teil der Moleküle des Reagens wird nur einseitig mit dem Protein reagieren, denn die zweite kupplungsfähige funktionelle Gruppe wird nicht immer einen Reaktionsteilnehmer in geeignetem Abstand finden. Während der Aufarbeitung entstehen dadurch fehlerhafte Quervernetzungen. In einigen Fällen wurde es nötig, die Quervernetzung abzustoppen, etwa mit dem Farbstoff (12).



Unerwünschte Verknüpfungen des bifunktionellen Reagens mit zwei Proteinmolekülen zu künstlichen Doppelmolekülen lassen sich leicht vermeiden.

5. Beispiele

5.1. Insulin

Die erste Identifizierung einer Quervernetzung gelang Zahn im Insulin^[4]; sie lag bei Verwendung des Reagens (2) zwischen den Amino-Endgruppen der beiden durch

Tabelle 1. Reagentien zur Quervernetzung in Proteinen.

Formel	erfaßte Seitenketten	erfaßter Abstand in der Hauptkette (Å)	Lit.
	Lysine (Cysteine, Tyrosine, Histidine)	6-18	[1]
	Lysine (Cysteine, Tyrosine, Histidine)	3-12	[1]
	Lysine (Cysteine, Tyrosine, Histidine, Serine)	3-12	[4]
	Cysteine (Histidine, Lysine)	4-14	[5, 6]
	Cysteine (Histidine, Lysine)	4-14	[5, 6]
	Lysine	abhängig von n	[7]
	Lysine (Cysteine, Tyrosine, Serine, Histidine)	4-14	[8]
	Lysine (Cysteine, Tyrosine, Serine, Histidine)	6-24	[9]
	Lysine (Cysteine, Tyrosine, Serine, Histidine)	6-24	[9]
	Lysine (Cysteine, Tyrosine, Serine, Histidine)	16-34	[11]
	Lysine (Cysteine, Tyrosine, Serine, Histidine)	3-10	[11]
	Cysteine (Histidine, Lysine)	6-22	[10]
	Cysteine (Histidine, Lysine)	4-16	[12]

Disulfidbrücken verknüpften Peptidketten des Moleküls. Die kürzlich vollendete Röntgen-Strukturanalyse an Insulinkristallen bestätigte diesen Befund. Zugleich ermöglichen die Versuche mit dem gleichen Reagens die erste Verknüpfung – zwischen einer Amino-Endgruppe und einer Lysin-Seitenkette – zweier Proteinmoleküle. Dies wurde als Indiz für eine parallele Lagerung der Moleküle in den festen, in Lösung stabilen Aggregaten des Insulins gewertet.

5.2. Wal-Myoglobin

Die bekannte Tertiärstruktur des Wal-Myoglobins diente als Testobjekt für die Ausmessung intramolekularer Abstände mit einer Reihe der Reagentien auf Azofarbstoff-Basis vom Typ (7)–(10). Die gefundenen Verbrückungen waren alle mit möglichen Abständen im Einklang, die sich aus dem Modell des Moleküls ergaben (Abb. 1). Erst bei

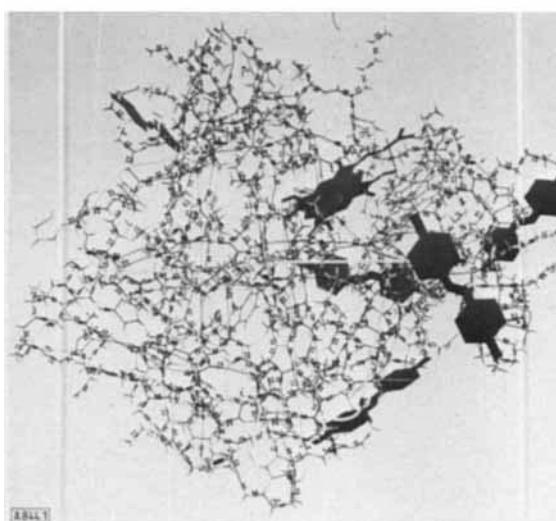
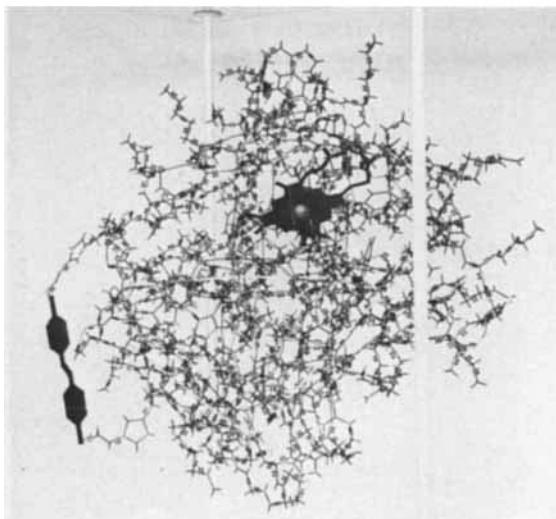


Abb. 1. Oben: Gezeichneter Verlauf der Peptid-Hauptkette des Wal-Myoglobins (nach R. E. Dickerson). NH₂, COOH: Amino- bzw. Carboxyende der Kette. Die in gerade verlaufende Linien eingefassten helicalen Bereiche der Hauptkette wurden vom Aminoende her mit großen Buchstaben A, B, C und so fort markiert. Die schwarze Scheibe stellt den Umriß des Porphyrinrings dar. Zu ihm ziehen zwei Histidin-Seitenketten (P und D) aus der F-Helix (proximal) bzw. der E-Helix (distal). An der Seite des distalen Histidins heftet sich das Sauerstoffmolekül an den Eisenkomplex an. Eingezeichnet sind die fünf mit den Reagentien (7a) und (7b) erzielten Quervernetzungen zwischen Lysinen (ausgezogen) und die mit dem Reagens (10a) erreichte Quervernetzung zwischen zwei Histidin-Seitenketten (gestrichelt). Mitte: Stäbchen-Modelle des Wal-Myoglobins mit eingefügten Quervernetzungen zwischen Histidin-Seitenketten [Reagens (10a)]. Unten: Gleches Modell mit Quervernetzungen zwischen Lysin-Seitenketten [Reagen-
tien (7a) und (7b)].

Beladung mit sechs Azofarbstoff-Brücken je Molekül ließ sich eine teilweise Denaturierung nachweisen. Sie war am hämtragenden Protein besonders leicht durch Änderung des Absorptionsspektrums zu erkennen; außerdem wurde die Zugänglichkeit der Imidazolringe des Histidins gemessen^[11, 13, 14].

5.3. Ribonuclease

In der Rinder-Pankreas-Ribonuclease, die Phosphorsäure-ester-Bindungen in Ribonucleinsäuren stets bei Pyrimidinbasen zu spalten vermag, konnten zwei Lysin-Seitenketten (Position 7 und 41) durch das Reagens (2) verknüpft werden. Die Änderung der enzymatischen Aktivität wies darauf hin, daß die Vernetzung in unmittelbarer Nähe des aktiven Zentrums liegen mußte (Abb. 2)^[15].

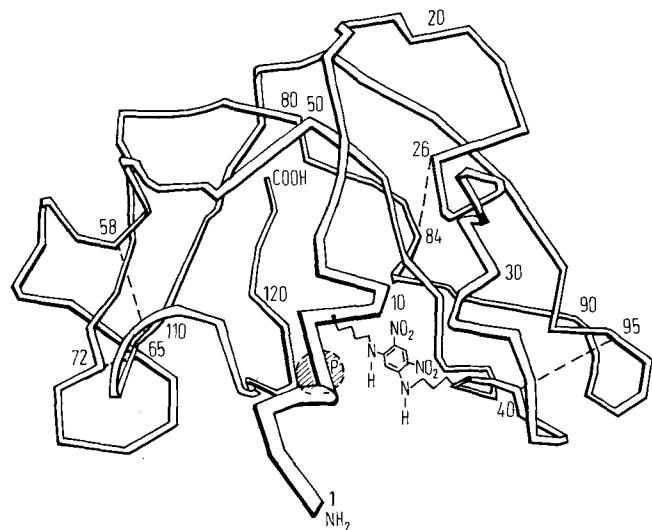


Abb. 2. Gezeichneter Verlauf der Peptid-Hauptkette der Ribonuclease aus Rinder-Pankreas (nach [17, 18]). NH₂, COOH: Amino- bzw. Carboxyende der Kette. Die Zahlen beziehen sich auf die Positionen der Aminosäuren in der Sequenz des Moleküls. Gestrichelte Linien: Disulfidbrücken. P: Anheftungsstelle des Substrates an das Enzymmolekül. Eingezeichnet ist die Quervernetzung zwischen zwei Lysin-Seitenketten durch das Reagens (2) (Positionen 7 und 41) (nach [15]).

Die Aufklärung der Peptidsequenz in der Nachbarschaft der Brücke förderte im Verein mit Ergebnissen stufenweiser Blockierungsversuche an Histidin-Seitenketten die Aufklärung der Wirkungsweise des Enzyms. Demnach vollziehen hier die beiden Imidazolringe der Seitenketten 12 und 119 gemeinsam die wesentlichen Schritte der Katalyse^[16]. Durch die Auswertung der Röntgen-Strukturanalyse wurde diese Hypothese eindrucksvoll bestätigt.

5.4. Chymotrypsin und Chymotrypsinogen

Das in Pankreas-Drüsen synthetisierte inaktive Chymotrypsinogen geht im Darm unter Abspaltung von zwei Di-peptiden in das aktive Verdauungsenzym Chymotrypsin über (siehe Abb. 3). Die Hauptkette des Proenzymes wird somit in drei – durch Disulfidbrücken verbundene – Teilketten zerlegt. Zwei Aminosäure-Seitenketten im aktiven

Zentrum des Moleküls, Histidin in Position 57 und Serin in Position 195, rücken dabei in unmittelbare räumliche Nachbarschaft; die Aktivierung des Proenzymes löst also eine Umfaltung der Tertiärstruktur aus. An Chymotrypsinogen und Chymotrypsin wurden nach Quervernetzung mit den Reagentien (7a) und (7b) reproduzierbare Fingerprints der Azo-Brückenpeptide gewonnen. Die Fingerprints stimmten nahezu völlig überein. Dies ließ den Schluß

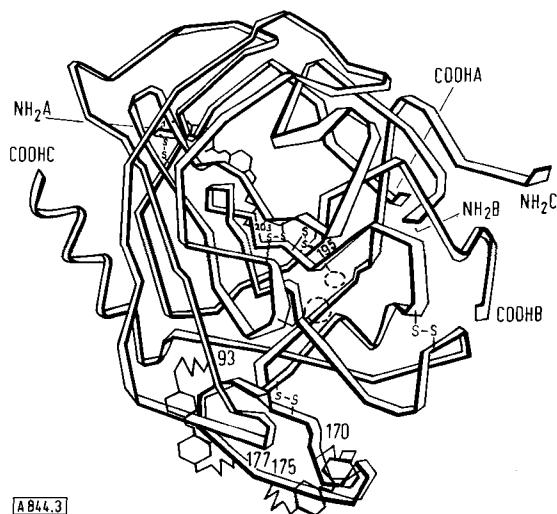


Abb. 3. Gezeichnete Verlauf der Peptid-Hauptkette des Chymotrypsins aus Rinder-Pankreas (nach [19]). Durch Abspaltung zweier Dipeptide (Positionen 14 und 15 sowie 147 und 148) aus der Peptidkette der inaktiven Vorstufe Chymotrypsinogen bei der Aktivierung im Darm entstehen die drei durch Disulfidbrücken verbundenen Einzelketten A, B, C. NH₂A, COOHC: Amino- bzw. Carboxyende der ursprünglichen Peptid-Hauptkette des Chymotrypsinogens. NH₂B, COOHA: Neugeschaffenes Amino- bzw. Carboxyende nach Abspaltung des Dipeptids in den Positionen 14–15 der Chymotrypsinogenkette. NH₂C, COOHB: Neu geschaffenes Amino- bzw. Carboxyende nach Abspaltung des Dipeptids 147–148 aus der Chymotrypsinogenkette. Gestrichelte Kreise: Schematisch angegebene Lokalisation der beiden Seitenketten im aktiven Zentrum, Histidin (Position 57) und Serin (Position 195). Eingezeichnet sind die drei durch die Reagentien (7a) und (7b) im Chymotrypsinogen identifizierten Quervernetzungen (nach [11]). —S—S: Natürliche Disulfidbrücken. Die Zahlen beziehen sich auf die Positionen der Aminosäuren in der Sequenz des Chymotrypsinogens.

zu, daß die Umfaltung der Tertiärstruktur bei der Aktivierung des Chymotrypsinogens nur einen begrenzten Teil des gefalteten Moleküls betreffen konnte. Der Bauplan der Peptid-Hauptkette mußte in beiden Proteinen fast völlig gleich sein, da jede größere Veränderung das Quervernetzungsmuster stark beeinflußt. Drei der Azo-Peptide ließen sich aus quervernetztem Chymotrypsinogen isolieren und identifizieren. Sie sind in Abbildung 3 in die inzwischen röntgen-strukturanalytisch aufgeklärte Tertiärstruktur des Chymotrypsins eingezeichnet^[19]. Die vergleichende Röntgen-Strukturanalyse des Chymotrypsinogens erhärtete in der Zwischenzeit diesen Befund.

5.5. Hämoglobin

Mehrere Arbeitskreise haben es unternommen, Quervernetzungen an Hämoglobin auszuführen und in ihrer Stellung zu identifizieren. Beim Hämoglobin sind vier Tertiärstrukturen zu einer Quartärstruktur zusammengelagert.

Je zwei von ihnen – α - und β -Ketten genannt – sind identisch. Die im Arbeitskreis von M. F. Perutz ausgeführten Röntgen-Strukturanalysen ergaben zunächst die räumliche Lagerung der vier Ketten zueinander (siehe auch Abb. 5) und sind heute bis zur genauen Lokalisation der Atome dieser Raumstruktur vorgedrungen^[20].

Schon frühzeitig wurde erkannt, daß sich die Quartärstruktur bei der Sauerstoff-Aufnahme oder -Abgabe ändert. Diese Umlagerung ist das Resultat der gegenseitigen Beeinflussung der vier Ketten, die auch in der charakteristischen Sauerstoff-Sättigungskurve des Proteins zum Ausdruck kommt (Abb. 4). Gegenüber der des monomeren

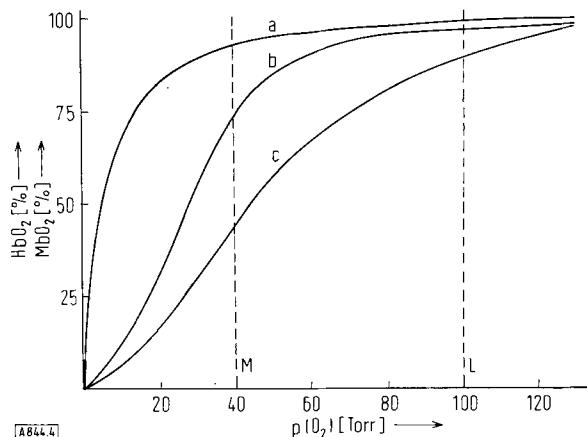


Abb. 4. Verlauf der Sauerstoff-Bindungskurven für Myoglobin (a) und Hämoglobin bei pH = 7.4 (b) sowie pH = 6.8 (c). Gestrichelte Linien: Sauerstoff-Partialdruck im peripheren Gewebe, z. B. im Muskelgewebe (M) und in der Lunge (L).

Häm-Proteins Myoglobin ist sie zu deutlich sigmoidalem Verlauf verändert, da die Bindung des Sauerstoffmoleküls an eine oder mehrere Untereinheiten die Affinität der übrigen für das Substrat erhöht. Für die optimale O₂-Aufnahme in der Lunge und die optimale O₂-Abgabe im peripheren Gewebe ist diese Eigenschaft notwendig (Abb. 4). Ein zweites Charakteristikum der Wechselwirkung äußert sich im alkalischen Bohr-Effekt: Bei der Sauerstoff-Abgabe steigt der pK-Wert mehrerer funktioneller Gruppen an; das Protein nimmt im physiologischen pH-Bereich des Blutes 0.8 Protonen je Untereinheit auf, die es in der Lunge bei der Sauerstoff-Abgabe wieder freisetzt. Diese Pufferwirkung ermöglicht den Abtransport des Kohlendioxids aus dem Gewebe.

Die Tertiärstrukturen des Myoglobins und der Hämoglobinketten sind nahezu identisch. Bei der Sauerstoff-Aufnahme oder -Abgabe ändern sie sich nur geringfügig. Die Verschiebungen einzelner Atome in der Umgebung des Häms dabei liegen unter 1 Å. Die Umlagerung der Quartärstruktur bedingt hingegen Verschiebungen bis zu 8 Å.

Die Affinität des Desoxy-Hämoglobins und damit die der Untereinheiten zum Sauerstoff ist geringer als die der Oxy-Form. Zu welchem Zeitpunkt der Oxygenierung des Moleküls sich die Affinitäten, die Quartärstruktur und die pK-Werte (Bohr-Effekt) ändern, ist noch unklar. Bis vor kurzem blieb auch völlig ungewiß, wie die gegenseitige Beein-

flussung an den Grenzflächen zwischen den vier Untereinheiten zustandekommt.

Auch hier konnten Quervernetzungsreaktionen zur Aufklärung beitragen. Im Innern der Tertiärstrukturen fest eingefügte Quervernetzungen sollten das Sauerstoff-Bindungsvermögen des Gesamt moleküls dann beeinflussen, wenn sie sich in der Nähe eines für Wechselwirkungen zwischen den Untereinheiten besonders wichtigen Bezirks der Grenzflächen befinden. Insbesondere versuchte man, Brücken zwischen verschiedenen Untereinheiten zu schlagen. Dabei sollte beobachtet werden, wie die Sauerstoffbindung durch Behinderung der Konformationsänderung der Quartärstruktur beeinflusst wird. Verwendet wurden die Reagenzien (4), (4a) und (10b), weil sie mit Sicherheit zunächst mit den beiden an der Molekül-Oberfläche gelegenen SH-Gruppen der Cysteine in Position 93 der β -Ketten reagieren müssten. Die beiden von Maleinimid abgeleiteten Reagenzien erzielten Quervernetzungen von Maleinimid abgeleiteten Reagenzien erzielten Quervernetzungen innerhalb der β -Ketten [(4) zu Histidin 97 und (4a) zur Amino-Endgruppe der β -Ketten]^[16]. Bei der Quervernetzungsreaktion mit (10b) ließen sich zwei Hämoglobin-Derivate isolieren, deren Struktur Abbildung 5 zeigt. Alle diese Derivate veränderten die sigmoidale O_2 -Bindungskurve zur hyperbolischen Form des monomeren Myoglobins, sie schalteten also die Wechselwirkungen der Untereinheiten aus (Abb. 4).

Die drei Quervernetzungen innerhalb der beiden β -Ketten des Moleküls zeigen – in das detaillierte Modell des Hämoglobins eingefügt^[21] – übereinstimmend die gleiche Wirkung auf die Molekülstruktur: Die Carboxy-Endgruppen der β -Ketten werden um mehrere Å aus ihrer natürlichen Lage herausgedrängt.

Dabei war die beidseitige kovalente Bindung des Reagens zur Ablenkung notwendig; die entsprechenden monofunktionellen Reagenzien vermochten die Sauerstoffbindung nach Anheftung an Cystein β 93 nur geringfügig zu verändern.

Im Oxy-Hämoglobin sind die Carboxy-Endgruppen aller vier Ketten frei beweglich. Im Desoxy-Hämoglobin hingegen ist jede dieser vier Aminosäuren durch zwei Salzbrücken fest verankert (Abb. 5): Die Carboxygruppen der Arginine in den α -Ketten sind mit den Amino-Endgruppen

der Valine der gegenüberliegenden α -Ketten verbunden, während ihre Guanidogruppen mit den Carboxygruppen der Asparaginsäure in Position 126 (Helix H) der gegenüberliegenden α -Kette zusammentreffen. Ähnlich sind die Carboxygruppen der Histidine am Ende der β -Ketten mit den ϵ -Aminoendgruppen der Lysine in Position 40 (Helix C) der benachbarten α -Kette (etwa β_1 mit α_2) verknüpft,

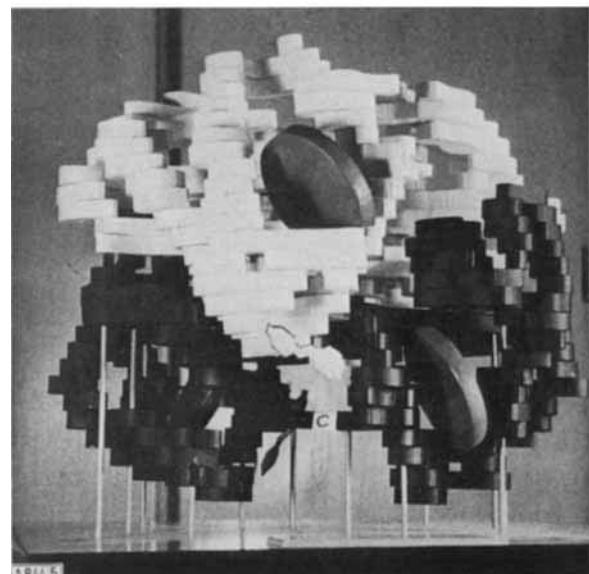
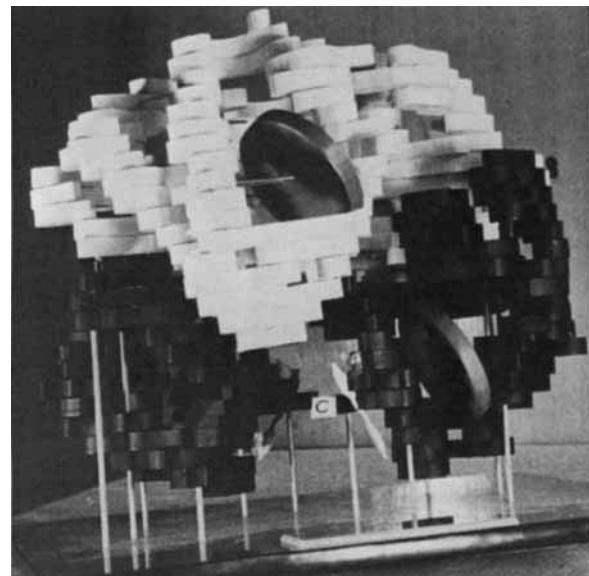
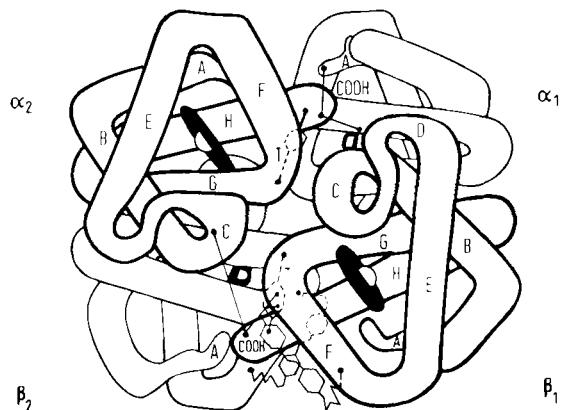


Abb. 5. Oben: Gezeichnete Verlauf der vier Peptid-Hauptketten des Hämoglobin-Moleküls analog zu Abb. 1. Die Buchstaben A–H bezeichnen helicale Bereiche wie in Abb. 1 angegeben, A ist jeweils am Aminoende der Einzelketten und am Anfang der A-Helix eingezeichnet. COOH: Carboxyenden der Ketten. Die schwarzen Scheiben mit eingelagerten weißen Kugeln bedeuten die Porphyrinringe mit Eisen-Atomen. An den Carboxyenden der β_1 - und der α_2 -Ketten im Vordergrund sind schematisch die beiden Salzbrücken der endständigen Histidin bzw. Arginine als Striche angegeben. Außerdem ist bei diesen Ketten die Einlagerung der Seitenketten der Tyrosine (T) in vorletzter Position in die Tertiärstruktur mit ihren Wasserstoffbrücken zu einer Peptidbindung im Bereich des F–G-Überganges angegeben (siehe Text). Eingezeichnet sind ferner die beiden mit dem Reagens (10b) innerhalb der beiden β -Ketten erreichten Quervernetzungen. Mitte: Hämoglobin-Modell mit eingefügten Quervernetzungen durch das Reagens (10b). C: Carboxyende einer der beiden β -Ketten (schwarz). Die Quervernetzungen innerhalb der beiden β -Ketten verlaufen von Cystein in Position 93 zu Lysin in Position 82 in der Nähe des Carboxyendes. Unten: Gleiches Modell mit Quervernetzung innerhalb einer β -Kette (im Hintergrund, wie mittlere Abb.) und Zwischenketten-Quervernetzung von Cystein in Position 93 der β_1 -Kette zu Histidin 45 der benachbarten α_2 -Kette (im Vordergrund [22]).

während der Imidazolring mit der Carboxygruppe der Asparaginsäure in Position 94 der eigenen β -Kette verbunden ist.

Zusammen mit dieser Verankerung der Carboxy-Endgruppen beim Übergang von Oxy- zu Desoxy-Hämoglobin werden die Seitenketten der in allen vier Ketten an vorletzter Position stehenden Tyrosine dabei im Inneren der vier Tertiärstrukturen gebunden (siehe Abb. 5). Durch die Fixierung der Carboxy-Endgruppen werden sie in Nischen zwischen den jeweiligen Helices F und H eingeschoben und dort zum Teil durch van-der-Waals-Kräfte, zum Teil durch die in Abbildung 5 eingezeichneten Wasserstoffbrücken zwischen ihren Hydroxygruppen und den Carbonylgruppen der Peptidbindung von Valin am Übergang von der F- zur G-Helix festgehalten. Dabei können die Tyrosine nicht aus diesen Taschen austreten, ohne gleichzeitig die Salzbrücken der Carboxy-Endgruppen aufzulösen. Die an der Oxy-Form vorgenommenen und charakterisierten Quervernetzungen mit den Reagentien (4), (4a) und (10a) (Abb. 5) verhindern jedenfalls den Eintritt der Carboxy-Enden und der Tyrosine in die vorgesehenen Bindungen beim Übergang zur Desoxy-Form und fixieren damit die beiden β -Ketten in der Oxy-Form.

Der kürzlich von *M. F. Perutz*^[23] veröffentlichte Verlauf der Hämoglobin-Umlagerung bei der Sauerstoff-Aufnahme stützt sich denn auch neben anderen Befunden auf die Blockierung des Überganges in typische Desoxy-Strukturen, wenn das Molekül derartige Quervernetzungen enthält. Aus der Röntgen-Strukturanalyse von Hämoglobinkristallen ließ sich ablesen, daß bei der Oxygenierung der einzelnen Ketten die Eisenatome, die in der Desoxy-Form etwa 0.8 Å aus der Ebene der Porphyrinringe in Richtung auf die F-Helices herausragen, tiefer in diese Ebene hineinrücken. Wie der Zug, der dabei die Imidazolgruppe im Histidin aus der F-Helix (siehe Abb. 1) um mindestens 0.2 Å auf den Porphyrinring zu bewegt, in eine Änderung der Tertiärstruktur im Bereich der E-, F- und H-Helix übersetzt wird, ist nicht bekannt. Wahrscheinlich reagieren zunächst die beiden α -Ketten mit Sauerstoffmolekülen, da sie sowohl in der Oxy- als auch in der Desoxy-Form Platz für die Anlagerung an der sechsten Koordinationsstelle des Eisens aufweisen. In jedem Fall läßt sich zeigen, daß die F-Helices etwas auf die H-Helices zuwandern und anscheinend die Bindungen der erwähnten Tyrosin-Seitenketten unmöglich machen. Werden die Bindungen bei den beiden α -Ketten gelöst, so müssen auch die endständigen Arginine ihre Salzbrücken aufgeben. Da diese zu anderen Ketten führen, lockert sich die Quartärstruktur nunmehr soweit, daß sie in die Oxy-Form umspringen kann. Zugleich wird ein Teil der Protonen frei und verursacht den Bohr-Effekt. Die Salzbrücken zwischen den Carboxy-Enden der β -Ketten und den benachbarten α -Untereinheiten werden durch die Umlagerung aber zerissen, so daß nur die beiden Salzbrücken innerhalb der β -Ketten bestehen bleiben. Dies genügt offenbar, um die Anlagerung von Sauerstoff unter Freisetzung des Carboxy-Endes sehr zu erleichtern, wobei nun die restlichen „Bohr-Effekt-Protonen“ freiwerden. In den quervernetzten Derivaten können diese Vorgänge nicht ablaufen, da die Anheftung der Tyrosine und Carboxy-Endgruppen bei der Sauerstoff-Abgabe bei beiden β -Ketten behindert ist

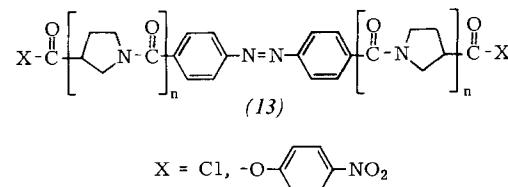
und deshalb die Quartärstruktur in der Oxy-Form verbleibt.

Die zweite mit dem Reagens (10b) quervernetzte Komponente (Abb. 5) trägt in einer β -Kette dieselbe Quervernetzung wie das symmetrische Derivat. Die zugängliche SH-Gruppe der anderen β -Kette ist mit dem Imidazolring des Histidins 46 der benachbarten α -Kette verknüpft. Aus anderen Versuchen ist bekannt^[24], daß die Modifikation nur einer β -Kette nicht ausreicht, um die Wechselwirkung des Gesamt moleküls mit Sauerstoff zu blockieren. Da dieses Derivat ebenfalls die Sauerstoff-Bindungskurve des Myoglobin-Typs zeigt, muß die Zwischenketten-Quervernetzung, nach dem Modell also die Fixierung der Quartärstruktur des Proteins, ebenso effektiv wie die Umlagerung von der Desoxy- in die Oxy-Form verhindern können wie die Blockierung der endständigen Histidine der β -Ketten. Die Änderung der Quartärstruktur ist nach diesen Versuchen eine notwendige Bedingung für den Übergang zwischen Oxy- und Desoxy-Form auch der Tertiärstrukturen.

6. Ausblick

Außer den genannten Versuchen an Insulin und Hämoglobin sind nur sehr wenige Verknüpfungen zweier Tertiärstrukturen oder Proteinmoleküle mit bifunktionellen Reagentien gelungen^[25]. Die meisten bisher angewandten Reagentien sind zu kurz; längere unter ihnen besitzen zu stark hydrophoben Charakter und verursachen schon bei Einführung von ein bis zwei Molekülen je Tertiärstruktur die Auffaltung des Proteins.

Speziell für Quervernetzungen wurden Reagentien der Formel (13) synthetisiert. Oligoprolin hat schon ab $n=5$



die Struktur einer gestreckten, starren Helix^[26]. Das Molekül ist hydrophil, der denaturierende Einfluß auf Proteine sehr gering. Da sich der Oligoprolin-Anteil willkürlich vergrößern läßt, können derartige Reagentien zur Untersuchung zahlreicher biologischer Protein-Assoziate dienen.

Eingegangen am 11. März 1971 [A 844]

- [1] H. Zahn, Angew. Chem. 67, 56 (1955).
- [2] H. Zahn u. D. Wegerle, Kolloid-Z. 172, 29 (1960).
- [3] F. Wold, Methods Enzymol. 11, 617 (1967).
- [4] H. Zahn u. J. Meyenhofer, Makromol. Chem. 26, 153 (1958).
- [5] S. Simon u. W. Konigsberg, Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. 56, 749 (1966).
- [6] W. Konigsberg, S. Simon, D. Arndt u. K. Moffat, 8. Int. Congr. Biochem., Abstr., S. 10, 1970.
- [7] F. C. Hartman u. F. Wold, J. Amer. Chem. Soc. 88, 3890 (1966).
- [8] A. F. Schick u. S. J. Singer, J. Biol. Chem. 236, 2477 (1961).
- [9] H. Fasold, Biochem. Z. 339, 482 (1964).
- [10] H. Fasold, U. Gröschel-Stewart u. F. Turba, Biochem. Z. 339, 487 (1964).
- [11] H. Fasold u. C. J. Lustig, 7. Int. Congr. Biochem., Coll. I, 1 (1967).

- [12] C. B. Hiremath u. R. A. Day, *J. Amer. Chem. Soc.* 86, 5027 (1964).
 [13] H. Fasold, *Biochem. Z.* 342, 288 (1965).
 [14] H. Fasold, *Biochem. Z.* 342, 294 (1965).
 [15] P. S. Marsey, M. Uziel u. J. Little, *J. Biol. Chem.* 240, 3270 (1965).
 [16] H. Follmann, H. J. Wieker u. H. Witzel, *Europ. J. Biochem.* 1, 243 (1967).
 [17] G. Kartha, J. Bello u. D. Harker, *Nature* 213, 862 (1967).
 [18] H. W. Wyckoff, K. D. Hardman, N. M. Allewell, T. Inagami, D. Tsermoglou, L. N. Johnson u. F. M. Richards, *J. Biol. Chem.* 242, 3749 (1967).
 [19] B. M. Matthews, P. B. Sigler, R. Henderson u. D. H. Blow, *Nature* 214, 652 (1967).

- [20] M. F. Perutz, *Proc. Roy. Soc. (London) B* 173, 113 (1969).
 [21] M. F. Perutz, H. Muirhead, J. M. Cox u. C. G. Goaman, *Nature* 219, 131 (1968).
 [22] H. Fasold u. G. Steinkopff, 8. Int. Congr. Biochem., Abstr., S. 10, 1970.
 [23] M. F. Perutz, *Nature* 228, 726 (1970).
 [24] J. E. Haber u. D. E. Koshland jr., *Biochem. Biophys. Acta* 194, 339 (1969).
 [25] B. H. Harsteen, „Biopolymere“, Tagung Gesellsch. Biol. Chem., Würzburg 1970.
 [26] H. Strassmair, S. Knoferl u. J. Engel, *Hoppe-Seylers Z. Physiol. Chem.* 350, 1153 (1969).

ZUSCHRIFTEN

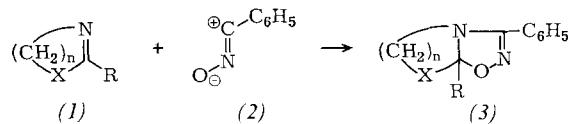
1,3-Dipolare Cycloaddition von Nitriloxiden an cyclische Imidsäureester und Amidine

Von Karl-Heinz Magosch und Roland Feinauer^[*]

Herrn Professor Karl Hamann zum 65. Geburtstag gewidmet

Nitriloxide addieren sich in einer 1,3-dipolaren Cycloaddition an zahlreiche ungesättigte Systeme unter Bildung von Derivaten des 1,2-Oxazols^[1]. Cycloadditionen von cyclischen Imidsäureestern und Amidinen sind z. B. mit Epoxiden bekannt^[2].

Wir untersuchten die Reaktion von Nitriloxiden mit cyclischen Imidsäureestern und Amidinen und fanden, daß sich aus Benzonitriloxid und Oxazol-2-inen, 5,6-Dihydro-4H-1,3-oxazinen, Imidazol-2-inen sowie 1,4,5,6-Tetrahydro-pyrimidinen neuartige bicyclische 1,2,4-Oxadiazol-Derivate (3) bilden.



n	X	R	(3)	
			Ausb. [%]	Fp [°C]
2	O	CH ₃	87	64
3	O	CH ₃	26	87
3	N—CH ₃	CH ₃	32	100
3	N—C ₂ H ₅	CH ₃	41	95
3	N—n-C ₄ H ₉	CH ₃	31	37

[a] Die Ausbeuten wurden noch nicht optimiert.

Anstelle von Benzonitriloxid (2) kann man von Benzhydroxamsäurechlorid ausgehen und dieses mit Triäthylamin erst unmittelbar vor der Umsetzung mit (1) in das Benzonitriloxid überführen^[1].

Zur Herstellung der Verbindungen (3) werden die Ausgangskomponenten (1) und (2) in einem Lösungsmittel, z. B. Diäthyläther, bei 0°C umgesetzt (5 Std.); anschließend werden die Heterobicyclen (3) durch Eindampfen und Kristallisation isoliert.

[*] Dr. K.-H. Magosch und Dr. R. Feinauer
Forschungslaboratorien der Chemische Werke Hüls AG
437 Marl

Durch wässrige Säuren und wässriges Alkali werden die gut kristallisierenden, farblosen Verbindungen (3) leicht verfeuchtet. Ihre Struktur ist durch Elementaranalyse sowie IR- und NMR-Spektren gesichert.

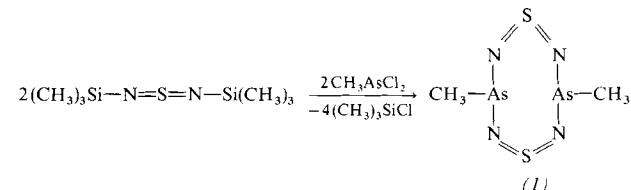
Eingegangen am 25. August 1971 [Z 495]

- [1] R. Huisgen, *Angew. Chem.* 75, 604 (1963); *Angew. Chem. internat. Edit.* 2, 565 (1963); *Houben-Weyl-Müller*, Methoden der Organischen Chemie, 4. Aufl., Bd. X/3, Thieme-Verlag, Stuttgart 1965, S. 838ff; C. Grundmann, *Fortschr. Chem. Forsch.* 7, 62 (1966); *Synthesis* 1970, 344.
 [2] W. Seeliger, E. Aufderhaar, W. Diepers, R. Feinauer, R. Nehring, W. Thier u. H. Hellmann, *Angew. Chem.* 78, 913 (1966); *Angew. Chem. internat. Edit.* 5, 875 (1966); R. Feinauer, *Synthesis* 1971, 16.

(CH₃As)₂S₂N₄ – Ein neuer Arsen-Schwefel-Stickstoff-Heterocycloclus

Von Otto J. Scherer und Reinhard Wies^[*]

Denkt man sich im Tetraschwefel-tetranitrid (S₄N₄) zwei Schwefelatome durch je eine CH₃As-Gruppe ersetzt, so gelangt man formal zu 3,7-Dimethyl-1,5,2,4,6,8,3,7-dithia(iv)-tetrazadiarsocin (1), das in 76-proz. Ausbeute bei der Spaltung der Si—N-Bindungen^[1] des N,N'-Bis(trimethylsilyl)-schwefeldiimids durch CH₃AsCl₂ gebildet wird.



(1) ist eine hydrolyseempfindliche, in Äther, Benzol und Tetrachlorkohlenstoff gut, in Hexan mäßig lösliche rote Flüssigkeit (sie erstarrt bei tiefer Temperatur glasartig), die bei K_p=84–86°C/0.05 Torr unzersetzt destilliert werden kann. Mehrständiges Erwärmen auf 110–120°C führt zu geringfügiger Zersetzung^[2].

Umsetzung von (1) mit SCl₂ im Molverhältnis 1:2 ergibt neben CH₃AsCl₂ unter anderem S₄N₄ in ca. 40-proz. Ausbeute.

[*] Prof. Dr. O. J. Scherer und Dipl.-Chem. R. Wies
Universität Trier-Kaiserslautern und z. Z.
Institut für Anorganische Chemie der Universität
87 Würzburg, Landwehr