

Histidin im aktiven Zentrum von Enzymen

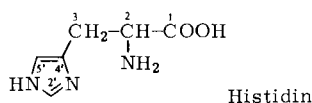
Von Friedhelm Schneider^[*]

Professor Peter Karlson zum 60. Geburtstag gewidmet

Das Vorkommen von Histidin im aktiven Zentrum eines Enzyms läßt sich z. B. durch kinetische Messungen, chemische Modifizierung, NMR-Spektroskopie oder Röntgen-Strukturanalyse beweisen. Histidin ist die einzige natürliche Aminosäure, die einen Imidazolrest als Seitenkette enthält. Die Rolle des Histidins bei der Enzymkatalyse beruht u. a. auf den Besonderheiten des Imidazolrestes: So neigt er zur Bildung von Wasserstoffbrücken, vereinigt Donor- und Acceptoreigenschaften und kann in einer nucleophilen Katalyse oder in einer Basekatalyse wirksam werden. – Bei einigen dieser Enzyme ist die Lage jedes Atoms bekannt, und doch sind die Vorstellungen über den Ablauf der Katalyse auf molekularer Ebene kontrovers.

1. Einleitung

Die Aminosäure Histidin wurde 1896 gleichzeitig von *Kossel*^[1] aus Sturin, einem Protein aus Störspermien, und von *Hedin*^[2] aus Hydrolysaten mehrerer Proteine (u. a. Casein und Ovalbumin) isoliert. *Pauly*^[3] gelang die Aufklärung der Struktur des Histidins, die 1904 von *Knoop* und *Windaus*^[4] endgültig bewiesen wurde. Als das bei weitem wichtigste Stoffwechselprodukt des Histidins fanden *Best et al.*^[5] das Histamin, das bereits 1907 von *Windaus* und *Vogt*^[6] synthetisiert worden war.



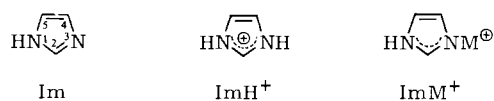
Mit dem Histidingehalt der Proteine hat sich die Wissenschaft zunächst vor allem unter ernährungsphysiologischen Gesichtspunkten befaßt. Die Funktion des Histidins in Proteinen, besonders in Enzymen, rückte erst Anfang der fünfziger Jahre in den Vordergrund des Interesses, als das Konzept des aktiven Zentrums der Enzyme konkrete Gestalt annahm^[7]. Modellreaktionen^[8, 9] gaben den Enzymologen und Proteinchemikern wertvolle Impulse bei ihren Bemühungen, die Rolle des Histidins bei der Enzymkatalyse aufzuklären. Voraussetzung dafür war vor allem die Entwicklung spezifischer Methoden zur Identifizierung von Histidin im aktiven Zentrum. Über die möglichen Funktionen des Histidins bei der Enzymkatalyse konnten jedoch erst fundierte Überlegungen angestellt werden, nachdem man genaue Kenntnisse der chemischen, physikalisch-chemischen und katalytischen Eigenschaften des Imidazols besaß.

2. Eigenschaften des Imidazols

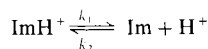
2.1. Chemische und physikalisch-chemische Eigenschaften

Imidazol (Im) ist ein ebenes heterocyclisches Molekül mit sechs π -Elektronen^[10]; seine Resonanzenergie beträgt 15,4 kcal/mol^[11]. Es ist strukturell sowohl dem Pyridin als auch dem Pyrrol (Resonanzenergie 20,9 bzw. 8,5 kcal/mol) verwandt.

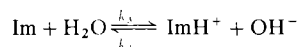
Durch Aufnahme eines Protons oder Komplexbildung mit einem Metallion entstehen die aromatischen Kationen ImH^+ bzw. ImM^+ . N-1 und N-3 sind im Imidazolium-Ion ImH^+ äquivalent.



In wäßriger Lösung stellt sich ein Tautomerie-Gleichgewicht über einen Protonenaustausch mit dem Lösungsmittel ein. Die vorherrschende Austauschreaktion in saurer Lösung ist



und in alkalischer Lösung

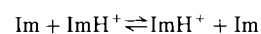


Thermodynamisch sind die Rückreaktionen begünstigt; sie zeigen Geschwindigkeitskonstanten, wie sie für diffusionskontrollierte Prozesse typisch sind, nämlich $k_2 = 10^{10.2}$ und $k_4 = 10^{10.4} \text{ s}^{-1} \text{ l mol}^{-1}$ ^[12]. Da der pK-Wert des Imidazols 7,0 beträgt, mithin $k_1/k_2 = K_a = 10^{-7}$, errechnet sich für k_1 $10^{3.2}$ und für k_3 $10^{3.4} \text{ s}^{-1}$. Die Ähnlichkeit dieser beiden Zahlenwerte ist darauf zurückzuführen, daß

$$K_a = 10^{-7} = \sqrt{K_w} = [\text{H}^+] = [\text{OH}^-]$$

Daher ist Imidazol in wäßriger Lösung in der Nähe des Neutralpunktes ein optimaler Katalysator und Puffer^[12]. Die Protonierung des neutralen Imidazols durch Wasser (k_3) ist der langsamste Schritt beim Austausch des stickstoffgebundenen Wasserstoffs durch Lösungskomponenten in alkalischer Lösung.

Die Protonierung kann durch allgemeine Säurekatalyse beschleunigt werden. Fungiert das Imidazolium-Ion als Säure, verläuft die Reaktion nach der Gleichung



Die Geschwindigkeitskonstante der Hin- und Rückreaktion beträgt etwa $10^{8.5} \text{ s}^{-1} \text{ l mol}^{-1}$.

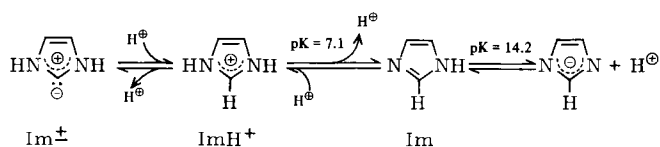
[*] Prof. Dr. Fr. Schneider
Physiologisch-Chemisches Institut II der Universität
Lahnberge, D-3550 Marburg

Imidazol kann nicht nur an N-3 zum Kation ImH^+ (Imidazolium-Ion) protoniert werden ($\text{pK} = 7.1$; 25°C , Ionenstärke 0.2), sondern in stark alkalischer Lösung an N-1 zum Anion (Imidazolid-Ion) deprotoniert werden ($\text{pK} = 14.2$ bis 14.6)^[13]. Das Anion, ebenfalls aromatisch, besitzt zwei äquivalente Koordinationsstellen und ist damit ein potenter brückenbildender Ligand.

Obgleich quantitativ von untergeordneter Bedeutung in wäßriger Lösung im Gleichgewicht, muß die Bildung des Ylids Im^\pm durch Deprotonierung des Imidazolium-Ions an C-2 erwähnt werden. Der Austausch des Protons an C-2 in D_2O geht rasch vor sich; die Halbwertszeit bei 65°C und $\text{pD} = 6.9$ beträgt 10.9 min ^[14].



Die Protonierungsgleichgewichte des Imidazols lassen sich wie folgt zusammenfassen:



Abschließend sollen noch kurz die Komplexbildungseigenschaften des Imidazols erörtert werden^[15]. In neutraler Lösung bildet unprotoniertes Imidazol Komplexe über das freie Elektronenpaar an N-3. (Eine Metallbindung über N-1 ist sehr unwahrscheinlich.) Zu nucleophilen Reaktionen ist komplexgebundenes Imidazol nicht mehr befähigt, da das nucleophile Zentrum durch die koordinative Bindung an das Metallion beansprucht wird. Bei der Bildung von Imidazol-Metall-Komplexen bleibt der aromatische Charakter des Imidazols erhalten. Auf die Struktur von Metallkomplexen des Imidazols und seiner Derivate sowie des Histidins und der Histidinpeptide kann hier nicht näher eingegangen werden (Übersicht siehe ^[15]). Die Ähnlichkeit der Bindungskonstanten von Proteinen mit denen von Imidazol-Derivaten und von Histidinpeptiden führte zur Annahme einer Beteiligung von Imidazolresten an der Metallbindung von Proteinen; diese Annahme wurde in neuerer Zeit durch Röntgen-Strukturanalysen auch direkt bestätigt.

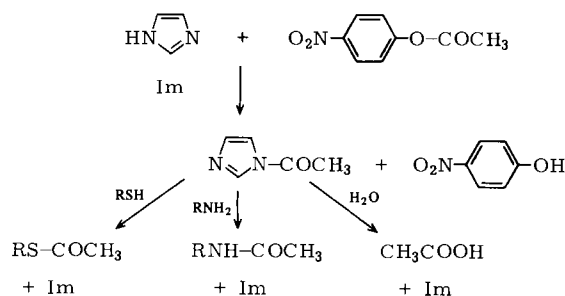
Zu den physikalisch-chemischen Eigenschaften des Imidazols, die für seine Rolle bei der Enzymkatalyse von Bedeutung sein können, gehört die Neigung zur Bildung von Wasserstoffbrücken^[16]. Der „Pyrrolstickstoff“ (N-1) tendiert zur Abgabe des Protons, während der „Pyridinstickstoff“ (N-3) zur Übernahme eines Protons befähigt ist. So vereinigen sich im Imidazol Donor- und Acceptoreigenschaften – und das bei pH-Werten um den Neutralpunkt! Diese Eigenschaft macht Imidazol zu einem idealen Wasserstoffbrückenbildner in biologischen Systemen, besonders in Enzymen.

2.2. Katalytische Eigenschaften

Ein intensives Studium der katalytischen Eigenschaften des Imidazols setzte ein, nachdem *Hartley* und *Massey*^[17] beobachtet hatten, daß Benzoylhistidinmethylester die Hydrolyse von *p*-Nitrophenylacetat katalysiert. Imidazol war damit die erste organische Base, die als Katalysator für eine Esterhydrolyse erkannt wurde. In zahlreichen Untersuchungen konnte

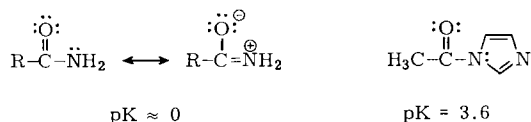
gezeigt werden, daß Imidazol, je nach Struktur des Esters, in einer nucleophilen Katalyse oder einer Basekatalyse wirksam werden kann.

Am eingehendsten wurde die nucleophile Katalyse einer Esterhydrolyse durch Imidazol am Beispiel von *p*-Nitrophenylacetat studiert^[18–22]; dies ist zugleich ein Beispiel für die Katalyse eines Acyltransfers. Imidazol vermag wegen seines schwach basischen Charakters die stark basischen Alkoholat-Ionen aus normalen Estern nicht zu verdrängen; die nucleophile Katalyse wird deshalb nur bei der Hydrolyse aktivierter Ester (Anhydridcharakter) beobachtet, denen schwach basische Alkoholate zugrunde liegen. Die Hydrolyse verläuft über die intermediäre Bildung von *N*-Acetylimidazol, dessen Zerfall der langsamste Schritt der Gesamtreaktion ist. In Gegenwart anderer nucleophiler Agentien wie SH-Verbindungen oder Amine tritt an die Stelle der Hydrolyse ein Acyltransfer, eine Reaktion von hoher Selektivität, die auch bei großem Überschuß von Wasser stattfindet^[9, 19]:



Imidazol hat mehrere Eigenschaften, die es als nucleophilen Katalysator besonders effektiv machen^[12]: Es ist ein tertiäres Amin, dessen *N*-Substituenten so fixiert sind, daß sie nur eine geringe sterische Hinderung bewirken, weil der Stickstoff seinerseits Bestandteil eines fünfgliedrigen aromatischen Ringsystems ist. Dadurch kommt die im Vergleich zu primären und sekundären Aminen erhöhte nucleophile Reaktivität voll zur Wirkung (im Gegensatz zu gewöhnlichen tertiären Aminen). Außerdem ist Imidazol mit einem pK -Wert von 7 die stärkste Base am Neutralpunkt (siehe Abschnitt 2.1).

Das intermediär gebildete *N*-Acetylimidazol ist wegen seiner geringen Resonanzstabilisierung gegenüber Nucleophilen viel reaktiver als normale Amide. Das einsame Elektronenpaar am Stickstoffatom, das bei normalen Amiden mit der Carbonylgruppe in Wechselwirkung tritt, ist im Acetylimidazol in das π -Elektronensystem des Imidazols integriert und somit nicht verfügbar.

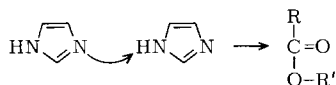


Die Basizität des Acetylimidazols ($\text{pK} = 3.6$) ist relativ hoch, da ein anderes N-Atom als das acylsubstituierte protoniert wird^[23]. Es gibt zur Zeit keinen überzeugenden Beweis dafür, daß enzymgebundenes Imidazol bei enzymatischen Acyltransfer-Reaktionen als nucleophiler Katalysator wirkt; bei den meisten biologischen Acyltransfer-Reaktionen hat man es nicht mit aktivierten Acylverbindungen als Substraten zu tun.

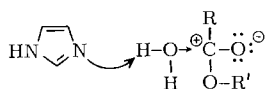
Einige Untersuchungen sprechen dafür, daß Imidazol als nucleophiler Katalysator in Enzymen wirksam werden kann, die einen Phosphattransfer katalysieren. So wurde *N*-Phospho-

noimidazol in mehreren Enzymen als Intermediat nachgewiesen (siehe Tabelle 1). Bei nichtenzymatischen Modellreaktionen zeigte sich, daß Imidazol kein besonders gutes Nucleophil gegenüber monosubstituierten Phosphorsäureestern ist; unter bestimmten Bedingungen können Imidazol oder Phosphonoimidazol aber die Hydrolyse von Phosphorsäureestern bzw. den Phosphattransfer katalysieren^[24–26]. Phosphonoimidazole sind etwa ebenso reaktionsfähig wie andere Phosphorsäureamide.

Mit zunehmender Basizität des einem Ester zugrundeliegenden Alkoholats wird die nucleophile Katalyse durch Imidazol weniger effektiv; man findet schließlich in den Geschwindigkeitsgleichungen eine Abhängigkeit zweiter Ordnung von der Imidazolkonzentration, was durch eine allgemeine Basekatalyse folgenden Typs erklärt werden kann^[27, 28]:



Falls das Carbonylkohlenstoffatom des Esters positiv polarisiert ist, wie z. B. im Chloressigsäureethylester, wirkt Imidazol als allgemeiner Basekatalysator der Esterhydrolyse. In diesem Fall übernimmt Imidazol ein Proton eines Wassermoleküls, dessen OH-Gruppe das Carbonylkohlenstoffatom angreift^[29]:



Obwohl bisher keine eindeutige Modellreaktion mit Imidazol als allgemeinem Säurekatalysator bekannt ist, wird angenommen, daß es in Enzymen nach Art einer allgemeinen Säure-Base-Katalyse wirksam werden kann.

Die allgemeine Basekatalyse der Esterhydrolyse durch Imidazol erfordert die Übernahme des Protons eines Wassermoleküls. Da die Geschwindigkeitskonstante des Protonentransfers von einem Wassermolekül 10^3 s^{-1} beträgt, sollte die Geschwindigkeit dieser Reaktion die obere Grenze für hydrolytische, allgemein basekatalysierte Prozesse mit Imidazol sein. Stärkere Basen als Imidazol werden zwar schneller protoniert, doch werden ihre konjugierten Säuren langsamer deprotoniert als das Imidazolium-Ion. Bei einem Katalysator müssen Protonierung und Deprotonierung nacheinander erfolgen; demnach wird die Geschwindigkeit der katalysierten Reaktion jeweils durch die langsamere Protonenübertragung bestimmt. In der Nähe des Neutralpunktes ist aus den oben dargelegten Gründen Imidazol der wirksamste allgemeine Basekatalysator. Da die Umsatzzahlen der hydrolytischen Enzyme $10\text{--}10^5 \text{ s}^{-1}$ betragen und die obere Grenze für Katalysen unter Beteiligung von Imidazol bei 10^3 s^{-1} liegt, muß man annehmen, daß benachbarte saure oder basische Gruppen die Protonierungs- und Deprotonierungsgeschwindigkeit erhöhen können. In Modellexperimenten wurden durch Nachbargruppeneffekte Steigerungen der Umsatzzahlen bis zum Faktor 100 beobachtet^[30]. Damit werden Geschwindigkeitskonstanten bis 10^5 s^{-1} erreicht, die denen der effektivsten enzymkatalysierten Reaktionen entsprechen. Geschwindigkeitskonstanten unter 10^3 s^{-1} treten dann auf, wenn andere Teilschritte geschwindigkeitsbestimmend werden.

Die große Bedeutung der allgemeinen Säure-Base-Katalyse für die Enzymwirkung liegt darin, daß auf diesem Wege derselbe Effekt erzielt wird wie durch intermediäre Bildung von

Hydroxid- oder Wasserstoff-Ionen. Die Base übernimmt ein Proton vom angreifenden Wassermolekül und erhöht so die nucleophile Reaktivität des Wassers, ohne daß sich freie Hydroxid-Ionen bilden. Trotzdem gibt es nur wenige enzymatische Reaktionen, für welche eine allgemeine Säure-Base-Katalyse als bewiesen gelten kann (siehe Abschnitt 4).

3. Methoden zur Identifizierung von Histidin im aktiven Zentrum von Enzymen

Die Frage, ob eine bestimmte Aminosäure am katalytischen Prozeß eines Enzyms beteiligt oder Teil des aktiven Zentrums ist, läßt sich im wesentlichen auf folgenden Wegen untersuchen:

1. durch kinetische Messungen,
2. durch chemische Modifizierung und kovalente Markierung,
3. durch NMR-spektroskopische Messungen,
4. durch Röntgen-Strukturanalyse.

3.1. Kinetische Untersuchungen

Durch kinetische Studien zur pH-Abhängigkeit der Enzymaktivität läßt sich in günstigen Fällen der pK-Wert einer für die Katalyse essentiellen Aminosäure bestimmen, falls diese Aminosäure eine dissoziationsfähige Gruppe enthält. Untersuchungen des Einflusses des pH-Wertes auf V_{max} und K_m erlauben unter Umständen noch eine Differenzierung zwischen Gruppen, die sich direkt an der Katalyse beteiligen, und Gruppen, die primär für die Substratbindung verantwortlich sind^[31]. Zur Ergänzung kann die Temperaturabhängigkeit der pH-Abhängigkeit dienen, wodurch man die Dissoziationsenergie der zum gemessenen pK-Wert gehörenden funktionellen Gruppe erhält. pK-Wert und Dissoziationsenergie können manchmal einer bestimmten, für die Katalyse essentiellen, dissoziationsfähigen Gruppe zugeordnet werden.

Es ist evident, daß kinetische Methoden allein nur in günstigen Fällen die Identifizierung essentieller Gruppen ermöglichen, da sich z. B. die pK-Wert-Bereiche der funktionellen Gruppen der Proteine zum Teil überlappen und wir über ihre möglichen Extremwerte in Enzymen nur unvollkommen unterrichtet sind. Es gibt weitere Faktoren, die zu scheinbaren pK-Werten führen, die zu den an der Katalyse beteiligten funktionellen Gruppen nicht in Beziehung stehen; das ist besonders bei hohen und niedrigen pK-Werten der Fall. Dieselben Überlegungen gelten mutatis mutandis auch für die Dissoziationsenergie von funktionellen Gruppen im Proteinverband.

Für Imidazolreste werden im allgemeinen pK-Werte zwischen 5.6 und 7.0 angenommen bei einer Dissoziationsenergie von 6.9 bis 7.5 kcal/mol. Die Imidazol-pK-Werte liegen also in einem pH-Bereich, in dem es kaum zu einer Denaturierung der Proteine kommt und die Enzymaktivität daher meistens unproblematisch bestimmt werden kann.

Man wird sich heute mit einer Zuordnung von essentiellen Gruppen eines Enzyms nur aufgrund kinetischer Messungen nicht zufrieden geben, sondern mehrere voneinander unabhängige Untersuchungsverfahren kombinieren.

3.2. Chemische Modifizierung

In vielen biochemischen Laboratorien wird die katalytische Aktivität von Enzymen untersucht, bei denen einzelne Amino-

säuren chemisch modifiziert wurden^[32]. Die Modifizierungsreagentien sollten

1. eine möglichst hohe Spezifität für eine bestimmte Aminosäure besitzen und
2. unter möglichst milden Bedingungen mit der Aminosäure reagieren.

Obwohl der Imidazolrest des Histidins im Prinzip zahlreichen Reaktionen zugänglich ist – z. B. Acylierungen, Alkylierungen und elektrophilen Substitutionen – ist die Zahl der für eine spezifische Modifizierung unter milden Bedingungen geeigneten Reaktionen gering. Wie ein Blick in die Literatur zeigt, haben nur wenige Reaktionen ausgedehntere Anwendung gefunden; von diesen muß an erster Stelle die Photooxidation erwähnt werden.

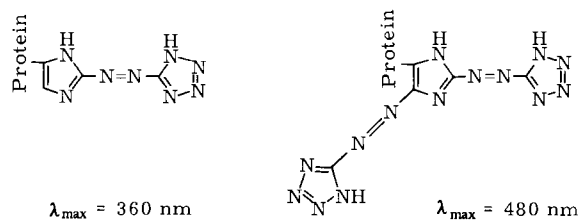
3.2.1. Chemische Modifizierung durch Photooxidation

Die Photooxidation in Gegenwart von Methyleneblau^[33] oder Rose Bengale^[34] als Sensibilisatoren wird am häufigsten zur chemischen Modifizierung von Histidinresten in Proteinen verwendet. Das Verfahren ist schonend, läßt aber in Hinblick auf die Spezifität etwas zu wünschen übrig, denn es können auch Tyrosin, Tryptophan, Cystein und Methionin oxidiert werden, wobei die Spezifität zum Teil vom pH-Wert der Reaktionslösung abhängt^[35]. So ist Histidin in neutraler Lösung in Gegenwart von Rose Bengale besonders empfindlich gegen Photooxidation. Reaktionsprodukte sind Asparaginsäure und Harnstoff^[36].

Um eine sichere Aussage über die Beziehungen zwischen Histidinoxidation und Aktivitätsverlust eines Enzyms zu erhalten, sollte man die pH-Abhängigkeit des Aktivitätsverlustes durch Photooxidation in die Untersuchungen einbeziehen und über eine Aminosäureanalyse auch den Tryptophan-, Tyrosin- und Methioningehalt des photooxidierten Proteins kontrollieren. Eventuell gebildetes Methionin-S-oxid kann häufig durch Reduktion mit SH-Verbindungen (z. B. Thioglykolsäure, Mercaptoethanol) zu Methionin reduziert werden. Der Farbstoff wird nach der Reaktion am besten durch Gelfiltration entfernt, was bei Rose Bengale manchmal Schwierigkeiten bereitet. Bei der Dialyse dauert die restlose Entfernung der Farbstoffe häufig sehr lange.

3.2.2. Chemische Modifizierung durch Azokupplung

Bereits 1904 beobachtete Pauly^[37], daß Histidin und Tyrosin in Proteinen mit aromatischen Diazoniumsalzen zu Azofarbstoffen kuppeln. Diese Reaktion wird seitdem häufig in der Immunologie und Enzymologie zur Modifizierung von Proteinen angewendet; sie findet bereits unter milden Bedingungen statt. Gut geeignet ist das 1964 von Horinishi^[37, 38] eingeführte Tetrazoldiazonium-Ion. Es besitzt den Vorteil, daß es keine farbigen Nebenprodukte bildet, die den Leerwert bei optischen Messungen stark erhöhen. Bei der Kupplung mit Histidin- und Tyrosinresten können Mono- und Bisazo-Verbindungen entstehen, die sich zum Teil in ihren Absorptionsmaxima erheblich unterscheiden und daher unter günstigen Bedingungen (nicht zuviel kupplungsfähige Reste, ausschließliche Bildung der Bisazo-Produkte) eine spektroskopische Bestimmung des Modifizierungsgrades erlauben; Bis(tetrazolyazo)histidin und Mono(tetrazolyazo)tyrosin unterscheiden sich allerdings praktisch nicht in ihren Absorptionsmaxima. Es ist daher auf jeden Fall wünschenswert, den Modifizierungsgrad über eine Aminosäureanalyse zu kontrollieren.



Die Geschwindigkeit der Kupplung von Histidin- und Tyrosinresten mit dem Tetrazoldiazonium-Ion nimmt mit sinkendem pH-Wert stark ab.

Obwohl durch derartige Kupplungsexperimente wertvolle Informationen über essentielle Histidinreste von Enzymen gewonnen wurden, darf nicht übersehen werden, daß die Spezifität der Reaktion gering ist. Außer Histidin und Tyrosin, die farbige Kupplungsprodukte bilden, setzen sich Aminogruppen, Tryptophan und Arginin um, und zwar mit höherer Reaktivität als Histidin und Tyrosin^[39, 40]. Unter bestimmten Voraussetzungen eignet sich daher das Tetrazoldiazonium-Ion auch sehr gut zur Modifizierung von Tryptophan^[39]; der Modifizierungsgrad der Tryptophanreste muß über eine Aminosäureanalyse ermittelt werden^[41]. Nicht unerwähnt bleiben soll die Explosivität des Tetrazoldiazonium-Ions, das man sich nur in kleinen Mengen aus dem Amin herstellen darf.

3.2.3. Chemische Modifizierung durch Diethyldicarbonat

Wie 1967 gezeigt wurde^[42], ist Diethyldicarbonat („Diethylpyrocarbonat“) (DEP) ein unter milden Bedingungen verwendbares Protein-Modifizierungsreagens von erheblicher Spezifität für Histidin. Außer Histidin können sich Tyrosin, Tryptophan und Aminogruppen^[43] umsetzen. DEP reagiert mit Histidin bei pH=4–7 zu *N*tm-Ethoxycarbonylhistidin (1), das ein Absorptionsmaximum bei 240 nm besitzt und zur spektrophotometrischen Bestimmung des Modifizierungsgrades herangezogen wird. Die Reaktion ist reversibel: *N*tm-Ethoxycarbonylhistidin kann z. B. mit Hydroxylamin unter milden Bedingungen wieder gespalten werden.

Nachdem sich bei einigen Enzymen Schwierigkeiten bei der Berechnung des Modifizierungsgrades aufgrund der publizierten Extinktionskoeffizienten von (1) ergeben hatten^[44, 45], zeigten Loosemore und Pratt 1976^[46], daß der Imidazolring in einer unerwünschten Folgereaktion (Bamberger-Reaktion) auch unter milden Bedingungen gespalten werden kann. Diese Folgereaktion verfälscht die Ergebnisse der spektrophotometrischen Untersuchungen, denn die Spektren von (1), (2) und (3) überlagern sich. Man sollte daher unbedingt eine Aminosäureanalyse des modifizierten Proteins durchführen, um die Zahl der zerstörten Histidinreste zu ermitteln. Die Bedingungen, die eine quantitative Ringspaltung von (1) im Proteinmolekül begünstigen oder sie auch vollständig verhindern, sind nicht genau bekannt.

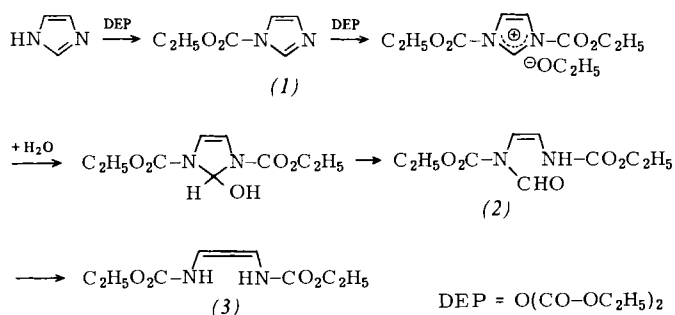


Tabelle 1. Zusammenstellung von Enzymen mit essentiellen Histidinresten und der verwendeten Methoden zum Nachweis des Histidins.

Nr. (EC)	Enzym	Nachweismethode [a]	Lit.
1.1.1.1	Alkohol-Dehydrogenase	DEP	[81]
1.1.1.30	D-3-Hydroxybutyrat-Dehydrogenase	DEP	[82]
1.1.1.37	Malat-Dehydrogenase	DEP	[83]
1.1.1.40	„Malic enzyme“	DEP	[84]
1.1.1.41	Isocitrat-Dehydrogenase	DEP, Photoox. (M), Alk. (α -Hal.)	[85]
1.1.1.64	Östradiol-Dehydrogenase	Alk.	[86]
1.1.3.9	Galaktose-Oxidase	Alk. (α -Hal.)	[87]
1.4.3.2	L-Aminosäure-Oxidase	Kin., Thermodyn.	[88]
1.4.3.4	Monoamin-Oxidase	DEP, Photoox. (R), Azo	[89]
1.5.1.11	Octopin-Dehydrogenase	Photoox. (R)	[90]
1.13.12.4	Lactat-2-Monooxygenase	DEP	[91]
1.15.1.1	Superoxid-Dismutase	Br ⁺ (Pulsradiolyse)	[92]
2.1.3.2	Aspartat-Transcarbamylase	Photoox. (P), Alk.	[93, 94]
2.2.1.2	Transaldolase	Photoox. (R), [b]	[95, 96]
2.4.1.1	Phosphorylase	Photoox. (R)	[97]
2.4.2.1	Purinnucleosid-Phosphorylase	Kin.	[98]
2.6.1.1	Aspartat-Aminotransferase	Photoox. (M), Alk., Kin.	[99]
2.7.1.11	6-Phosphofructo-Kinase	Photoox. (M)	[100]
2.7.1.37	c-AMP-abhängige Histon-Kinase	[³² P]-P-His	[78, 101]
2.7.1.40	Pyruvat-Kinase	DEP	[102]
2.7.3.2	Kreatin-Kinase	DEP	[103]
2.7.3.3	Arginin-Kinase	DEP	[104]
2.7.4.3	Adenylat-Kinase	NMR	[105]
2.7.4.6	Nucleosiddiphosphat-Kinase	Kin.	[106]
2.7.9.1	Pyruvatphosphat-Dikinase	P-His	[107]
3.1.1.3	Lipase	[³² P]-P-His	[108]
3.1.1.4	Phospholipase A ₂	Photoox., Kin.	[109]
3.1.1.7	Acetylcholin-Esterase	DEP	[110]
3.1.3.1	Alkalische Phosphatase	Alk. (p-Bromph.)	[111]
3.1.3.2	Saure Phosphatase	Kin.	[112]
3.1.3.9	Glucose-6-phosphatase	Photoox. (M, R)	[113]
3.1.4.3	Phospholipase C	Photoox. (R)	[114]
3.1.4.5	Desoxyribonuclease	P-His	[115]
3.1.4.22	Ribonuclease (Pankreas)	Kin.	[116, 117]
3.1.4.23	Ribonuclease T ₁	P-His	[76]
3.1.6.1	Arylsulfatase A	DEP	[118]
3.2.1.1	Arylsulfatase B	Alk. (Iodacetat)	[119]
3.2.1.2	α -Amylase	Photoox.	[120]
3.2.1.4	β -Amylase	Alk. (α -Hal.)	[121]
3.2.1.26	Cellulase	Kin.	[122]
3.4.11.1	Invertase	NMR	[123, 124]
3.4.12.2	Leucin-Aminopeptidase	Photoox.	[125]
3.4.12.4	Carboxypeptidase A	Alk. (Iodacetamid)	[126]
3.4.21.1	Carboxypeptidase Y	NMR	[127, 128]
3.4.21.1	Chymotrypsin	Kin., DEP	[129]
		Azo	[130]
		DEP, Azo	[131]
		Kin., Thermodyn.	[132]
		Photoox.	[133]
		Kin., Azo	[134]
		Kin.	[135, 136]
		Photoox., DEP	[137]
		Röntgen	[72, 138, 139]
		Alk. (Z-Phe-CK)	[140]
		Kin.	[141]
		Alk. (TPCK)	[142]
		Photoox.	[143]
		Röntgen	[144]

[a] Abkürzungen: Alk. = Alkylierung mit Bromacetyl-argininmethylester (BrAc-Arg-OMe), mit *p*-Bromphenacylbromid (*p*-Brph.), mit α -Halogenacetaten (α -Hal.), mit Tosylsilylchloromethylketon (TLCK), mit Tosylphenylalanylchloromethylketon (TPCK), mit Benzyloxycarbonyl-L-phenylalanylchloromethylketon (Z-L-PheX) und mit Benzyloxycarbonyl-Phe-chloromethylketon (Z-Phe-CK); Azo = Azokupplung; DEP = Diethylidicarbonat („Diethylpyrocarbonat“); Kin. = kinetische Daten; P-His = *N*-Phosphonohistidin; Photoox. = Photooxidation mit Methylenblau (M), mit Pyridoxalphosphat (P) und mit Rose Bengale (R); Röntgen = Röntgen-Strukturanalyse; Thermodyn. = thermodynamische Daten.

Da sich die Spektren von (1), (2) und (3) überlagern, ist eine spektrophotometrische Auswertung des Modifizierungsgrades bei 240 nm nicht möglich, wenn II und III in nennenswertem Ausmaß gebildet werden.

3.2.4. Chemische Modifizierung durch α -Halogenacetate, Chlormethylketone und Iod

In diesem Abschnitt sollen einige Reagentien erwähnt werden, die in speziellen Fällen wertvolle Aufschlüsse über die Funktion des Histidins bei der Enzymkatalyse geliefert haben.

α -Halogenacetate reagieren normalerweise nur sehr langsam mit Imidazolresten in Proteinen. In einigen Enzymen besitzen bestimmte Histidinreste jedoch eine ungewöhnliche Reaktivität, die diejenige des Imidazols im Histidin selbst übersteigt^[47–49]. Für diese ungewöhnliche Reaktivität ist eine hohe Affinität der Modifizierungsreagentien zum aktiven Zentrum des Enzyms verantwortlich, in dem sich der Histidinrest befindet. Dieses Prinzip liegt den K_s -Inhibitoren zugrunde. Sie verdanken ihre hohe Spezifität einer Bindung im aktiven Zentrum, der eine kovalente Reaktion mit einer funktionellen Gruppe folgt^[50]. Zu den K_s -Inhibitoren gehören Chlormethyl-

Tabelle 1. (Fortsetzung).

Nr. (EC)	Enzym	Nachweismethode [a]	Lit.
3.4.21.4	Trypsin	Kin. Alk. (TLCK) Alk. (Bromaceton)	[145] [146] [147]
3.4.21.5	Thrombin	Alk. (TLCK)	[148]
3.4.21.11	Elastase	Kin., Röntgen	[149]
3.4.21.14	Subtilisin	Kin. Photoox. Alk. (Z-L-PheX)	[150] [151] [152]
3.4.22.2	Papain	Photoox. Azo Röntgen	[153–155] [156] [157]
3.4.22.3	Ficin	[c]	[158]
3.4.22.4	Bromelain	[c]	[159]
3.4.22.6	Chymopapain	Photoox.	[160]
3.4.22.10	Streptococcen-Protease	Alk. (BrAc-Arg-OMe)	[161]
3.4.24.3	Kollagenase	Photoox. (M)	[162]
3.4.24.4	Thermolysin	DEP	[163]
3.4.99.26	Urokinase	[d]	[164]
3.5.1.5	Urease	Kin.	[165, 166]
3.5.1.14	Amino-Acylase	Photoox. (M) DEP	[167] [168]
4.1.1.15	Glutamat-Decarboxylase	Photoox. (P)	[169]
4.1.2.13	Fructose-bisphosphat-Aldolase	Photoox. (P)	[170, 171]
4.1.3.8	ATP-Citrat-Lyase	P-His	[172, 173]
4.1.99.2	Tyrosin-Phenol-Lyase	DEP	[174]
4.2.1.1	Carboanhydrase	Röntgen	[71]
4.2.1.2	Fumarase	Kin. NMR Affinitätsmark.	[175] [176] [177]
4.2.1.11	Enolase	Photoox. Kin.	[178] [179]
4.2.1.24	Porphobilinogen-Synthase	Photoox. (M), DEP	[180]
4.2.1.60	3-Hydroxyoctanoyl-[acyl-carrier-protein]-Dehydratase	Kin., Alk. (Bromacetat), Photoox.	[181]
4.3.2.2	Adenylosuccinat-Lyase	Photoox.	[182]
5.3.1.1	Triosephosphat-Isomerase	Photoox. Azo, [e]	[183] [184]
5.3.1.8	Mannose-6-phosphat-Isomerase	Kin.	[185]
5.3.1.9	Glucose-6-phosphat-Isomerase	Kin. Photoox. DEP	[186] [187, 188] [189]
5.3.3.1	Δ^5 -3-Ketosteroid-Isomerase	DEP	[190]
5.4.2.1	3-Phosphoglycerat-Mutase	[b]	[77]
6.1.1.20	Phe-tRNA-Synthetase	DEP, Photoox. (R)	[191]
6.2.1.5	Succinatthiokinase	P-His	[75]
—	Luciferase	[^{14}C]-DEP	[192, 193]
—	Actin	DEP	[194]
—	β -Cyclopiazonat-Oxidocyclase	DEP	[195]
—	Phosphoenolpyruvat-abhängiges Phosphotransferasesystem aus <i>Staph. aureus</i>	NMR	[196]
—	Anchrod	Kin.	[197]
—	unspezifische Lipase	Photoox. (R)	[198]
—	Secotransferrin	{ DEP	[199]
—	Lactotransferrin	{	
—	Hämopexin	Photoox. (R)	[200]
—	Hämocyanin	Photoox.	[201]
—	Colipase	NMR	[202]
—	α -Lactalbumin	DEP	[203]
—	Ovotransferrin	DEP, Photoox. (M)	[204]

[b] „active-site-peptide“-Methode.

[c] Vernetzung der essentiellen SH-Gruppe mit einem Histidinrest.

[d] Alkylierung mit Chlormethylketonen und anschließende Oxidation mit Perameisensäure.

[e] Carboxymethylierung.

ketone wie Tosyllysylchlormethylketon^[51] und Tosylphenylalanylchlormethylketon^[52], die zur kovalenten Markierung der Imidazolreste im aktiven Zentrum des Trypsins bzw. des Chymotrypsins herangezogen wurden.

Bei der Interpretation der Alkylierungsexperimente mit α -Halogenacetaten und Chlormethylketonen ist zu berücksichtigen, daß 1- und/oder 3-substituiertes und schließlich 1,3-disubstituiertes Imidazol entstehen können. Bei Carboxymethyl-Derivaten ist die Identifizierung der Stellungsisomere durch konventionelle Aminosäureanalyse möglich, da die Derivate die Säurehydrolyse überstehen.

Es gibt bisher kaum Beispiele, bei denen die Iodierung zur Identifizierung essentieller Histidinreste eingesetzt wurde^[53]. Die Iodierung des Histidins führt zu 5'-Iod- und danach zu 2',5'-Diiodhistidin^[54, 55], die beide durch Säurehydrolyse zerstört werden, so daß nur eine indirekte Bestimmung der Iodierung über eine Aminosäureanalyse möglich ist. Histidin wird nur geringfügig langsamer als Tyrosin iodiert. Das Verhältnis der Tyrosin- zur Histidin-Iodierung hängt sehr stark vom Protein und von den Bedingungen ab^[56]; es scheint, daß die Zahl reagierender Histidinreste häufig um so niedriger gefunden wird, je höher der Tryptophangehalt des Proteins

ist. Bei pH-Werten >9 ist die Iodierung des Histidins gegenüber derjenigen des Tyrosins begünstigt; für die Tyrosin-Iodierung wird ein pH-Optimum von 8.5 angegeben.

3.3. NMR-spektroskopische Messungen

Wie aus Tabelle 1 hervorgeht, haben NMR-spektroskopische Messungen an einer Reihe von Enzymen wertvolle Aufschlüsse über Funktion und Zustand von Histidinresten ergeben. Obwohl die NMR-Spektroskopie zuverlässige Informationen über Struktur und dynamische Eigenschaften niedermolekularer Verbindungen liefert, ist die Anwendung dieser Methode auf Makromoleküle und die Interpretation der Ergebnisse nicht immer unproblematisch^[57]. Vor allem muß genügend Substanz mit ausreichender Löslichkeit in D_2O vorliegen. Die Signale müssen im Spektrum deutlich getrennt und bekannten chemischen Gruppen des Systems zuzuordnen sein; ferner müssen sich die Daten in Hinblick auf Struktur und Dynamik des Systems interpretieren lassen.

Durch Protonierung des Imidazolstickstoffs im Histidin wird das 1H -NMR-Signal des C-2'-Protons um 1 ppm zu niedrigeren Feldstärken verschoben^[58]. Über die pH-Abhängigkeit dieser Verschiebung können demnach pK-Werte des Imidazols bestimmt werden. Die pK-Werte werden durch Wechselwirkungen des Imidazols mit Nachbargruppen sowie mit Ionen, Substraten, Inhibitoren oder anderen Effektoren beeinflusst. Aus den Änderungen der Signalbreite können außerdem Rückschlüsse auf die Geschwindigkeit des Wechsels zwischen zwei oder mehreren Zuständen des C-2'-Protons gezogen werden. Damit erlauben NMR-Messungen Aussagen über Zustandsänderungen von Imidazolresten in Proteinen, die mit Änderungen der pK-Werte einhergehen.

4. Enzyme mit essentiellen Histidinresten

In Tabelle 1 sind Enzyme zusammengefaßt, die essentielle Histidinreste im aktiven Zentrum enthalten; außerdem sind die Nachweismethoden angegeben. Es besteht kein Zweifel, daß in zahlreichen Fällen zusätzliche Experimente erforderlich sind, um den essentiellen Charakter der Histidinreste für die Katalyse zu erhärten. In anderen Fällen sind die Beweise für die unmittelbare Beteiligung von Histidinresten an der Katalyse lückenlos; trotzdem ist die Diskussion um ihre spezielle Funktion nicht abgeschlossen, wie z. B. bei Pankreas-Ribonuclease oder Papain (s. u.). Bei diesen Enzymen ist die Lage jedes Atoms bekannt – und doch sind die Vorstellungen über den Ablauf der Katalyse auf molekularer Ebene kontrovers. Bei einigen Enzymen ist die Rolle des Histidins besonders eingehend und sorgfältig studiert worden; zu ihnen gehören Chymotrypsin, Pankreas-Ribonuclease, Papain, Carboanhydrase, Carboxypeptidase und Aldolase. An diesen Beispielen soll kurz erläutert werden, welche Funktion dem Histidin beim Ablauf der Katalyse zugeschrieben werden kann.

Bei den Serinproteasen^[59] Chymotrypsin, Trypsin, Thrombin, Elastase und Subtilisin wird angenommen, daß der Imidazolrest des Histidins in einer allgemeinen Säure-Base-Katalyse wirksam wird; er erleichtert die Abspaltung eines Protons von der Hydroxylgruppe eines Serinrestes oder aus Wasser und erhöht dadurch die nucleophile Reaktivität des verbliebenen Anions^[60]. Die Wechselwirkung des Imidazols mit der

Carboxylatgruppe eines Asparaginsäurerestes kann über ein „Charge-relay“-System die Nucleophilie des Serinsauerstoffs weiter steigern und die tetraedrische Zwischenstufe der Katalyse stabilisieren (Abb. 1)^[61].

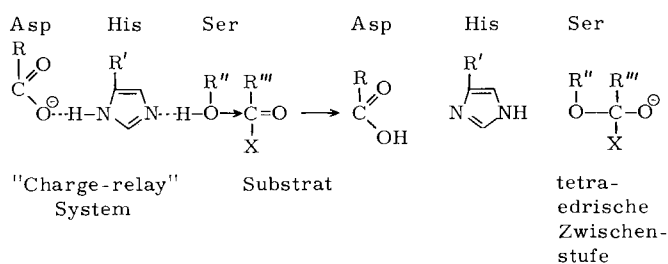


Abb. 1. Wirkungsweise der Serinproteasen [59–61].

Eine allgemeine Säure-Base-Katalyse durch Imidazol wird auch bei den Cysteinproteasen Papain, Ficin, Bromelain und Streptococcen-Protease angenommen, wobei die Art des Zusammenwirkens von Imidazol und SH-Gruppe im aktiven Zentrum noch nicht klar ist^[62]. Manches spricht für eine Verwandtschaft mit der Wirkungsweise der Serinproteasen (Abb. 2)^[63].

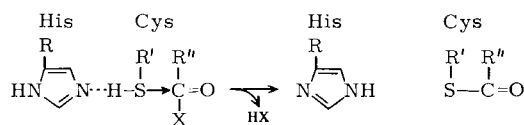


Abb. 2. Vorstellungen über die Wirkungsweise der Cysteinproteasen [62, 63].

Obwohl die genaue Struktur des aktiven Zentrums der Pankreas-Ribonuclease bekannt ist, werden mehrere Reaktionsmechanismen diskutiert, die sich zum Teil erheblich unterscheiden^[64]. Einige Autoren nehmen eine allgemeine Säure-Base-Katalyse unter Beteiligung von zwei Histidinresten an^[65–67]; andere betrachten ein wasserstoffverbrücktes System aus zwei Imidazolresten, das nicht als Säure-Base-Katalysator wirkt, sondern nur zur Erhaltung der Geometrie des aktiven Zentrums und der erforderlichen Elektrophilie eines Protons dient, als Teil des katalytischen Zentrums (Abb. 3)^[68].

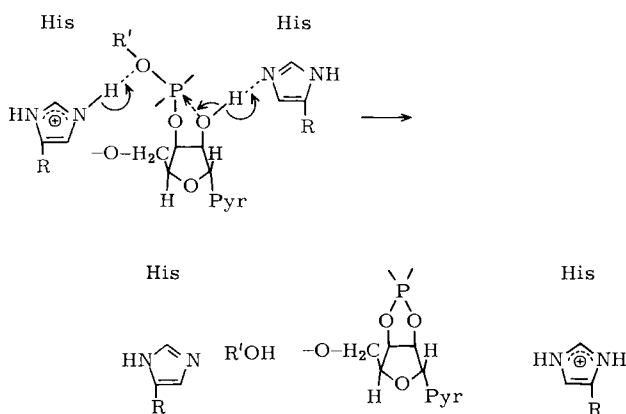


Abb. 3. Säure-Base-Katalyse bei der Ribonuclease [65]. Pyr = Pyrimidinbase.

Als Protonenüberträger auf ein intermediär gebildetes Carbanion wirkt Imidazol auch in der Fructose-1,6-bisphosphat-Aldolase. Dieses Carbanion entsteht aus Fructose-1,6-bisphosphat durch Aldolspaltung und Freisetzung des ersten Produktes Glycerinaldehyd-3-phosphat (Abb. 4)^[69].

Zeitweilig hat das Konzept der konzertierten Säure-Base-Katalyse unter Beteiligung von Imidazolresten besondere Beachtung gefunden. *Jencks*^[70] hat jedoch darauf aufmerksam gemacht, daß eine konzertierte allgemeine Säure-Base-Kataly-

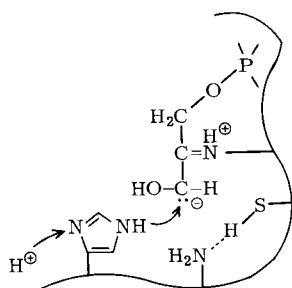


Abb. 4. Protonenübertragung durch einen Imidazolrest bei der Fructose-1,6-bisphosphat-Aldolase [69].

se komplexer Reaktionen in wäßriger Lösung nur möglich ist, wenn im Laufe der Reaktion eine starke Änderung des pK-Wertes auftritt und wenn der pK-Wert des Katalysators zwischen dem Ausgangs- und End-pK-Wert des Substrates liegt. Da diese Kriterien nicht oft erfüllt sind, verlaufen die meisten Reaktionen schrittweise und nicht konzertiert.

Carboanhydrase C aus menschlichen Erythrocyten ist das am besten untersuchte Enzym, in dem Imidazolreste von Histidinen als Liganden zur Bindung des für die Aktivität essentiellen Zinks dienen. Das Zink wird in diesem Enzym durch drei Imidazolreste in einem verzerrten Tetraeder gebunden, dessen vierte Koordinationsstelle von einem Wassermolekül eingenommen wird^[71]. In Carboxypeptidase A ist ebenfalls ein Imidazolrest an der Zinkbindung beteiligt^[72].

Wie bereits in Abschnitt 2.2 erwähnt, konnte bei einigen Phosphotransferasen und Hydrolasen N-Phosphonohistidin als Zwischenstufe der enzymatischen Reaktionen nachgewiesen werden. Zu diesen Enzymen gehören z. B. die saure Phosphatase^[73, 74], Succinatthiokinase^[75], Glucose-6-phosphatase^[76], Phosphoglycerat-Mutase^[77], Histon-Kinase^[78] und Pyruvatphosphat-Dikinase^[79]. Während bei der sauren Phosphatase angenommen werden muß, daß sich ein Imidazolrest des Histidins an einer nucleophilen Reaktion beteiligt und ein Phosphonohistidin als direkte Zwischenstufe auf dem Wege vom Substrat zum Produkt auftritt, ist die Bedeutung des nachgewiesenen Phosphonohistidins bei den Phosphotransferasen (Kinasen) nicht völlig klar. Zumindest in einigen Fällen scheint das Phosphoenzym (Phosphohistidin) ein Nebenprodukt und keine Zwischenstufe der eigentlichen enzymatischen Reaktion zu sein^[80].

In Tabelle 1 sind zahlreiche Enzyme mit essentiellen Histidinresten sowie die verwendete Methode zum Nachweis des Histidins zusammengestellt.

Unter den insgesamt mehr als 1800 bisher klassifizierten und durch eine spezifische Reaktion charakterisierten Enzymen wird man sicherlich in Zukunft weitere finden, die essentielle Histidinreste enthalten, denn erfahrungsgemäß bedient sich die Evolution bewährter Prinzipien möglichst oft.

Wir danken der Deutschen Forschungsgemeinschaft und dem Fonds der Chemischen Industrie für die Unterstützung der hier zitierten eigenen Arbeiten.

Eingegangen am 22. September 1977 [A 224]

- [1] A. Kossel, Z. Physiol. Chem. 22, 176 (1896).
- [2] S. G. Hedin, Z. Physiol. Chem. 22, 191 (1896).
- [3] H. Pauly, Z. Physiol. Chem. 42, 508 (1904).
- [4] F. Knoop, A. Windaus, Beitr. Chem. Physiol. Pathol. 7, 144 (1904).
- [5] C. H. Best, H. H. Dole, H. W. Dudley, W. W. Thorpe, J. Physiol. 62, 397 (1927).
- [6] A. Windaus, W. Vogt, Ber. Dtsch. Chem. Ges. 40, 3691 (1907).
- [7] R. R. Porter in H. Neurath, K. Bailey: The Proteins. Academic Press, New York 1953, Vol. 1 B, S. 973.
- [8] W. Langenbeck, Adv. Enzymol. Relat. Subj. Biochem. 14, 163 (1953).
- [9] Th. C. Bruice, St. Benkovic: Bioorganic Mechanisms. W. A. Benjamin, Amsterdam 1966.
- [10] S. Martinez-Carrera, Acta Crystallogr. 20, 783 (1966).
- [11] M. J. S. Dewar, A. J. Harget, N. Trinajstić, J. Am. Chem. Soc. 91, 6321 (1969).
- [12] M. Eigen, Angew. Chem. 75, 489 (1963); Angew. Chem. Int. Ed. Engl. 3, 1 (1964).
- [13] G. Yagil, Tetrahedron 23, 2855 (1967).
- [14] J. E. Letter, Jr., R. B. Jordan, Inorg. Chem. 10, 2692 (1971).
- [15] R. J. Sundberg, R. B. Martin, Chem. Rev. 74, 471 (1974).
- [16] M. Eigen, Naturwissenschaften 50, 426 (1963).
- [17] B. S. Hartley, V. Massey, Annu. Rep. Prog. Chem. 51, 311 (1954).
- [18] T. C. Bruice, G. Schmir, J. Am. Chem. Soc. 79, 1663 (1957); 80, 148 (1958).
- [19] M. L. Bender, B. W. Turnquist, J. Am. Chem. Soc. 79, 1652, 1656 (1957).
- [20] F. Schneider, Hoppe-Seylers Z. Physiol. Chem. 334, 26 (1963).
- [21] W. P. Jencks, J. Carriulo, J. Biol. Chem. 234, 1272, 1280 (1959).
- [22] R. Wolfenden, W. P. Jencks, J. Am. Chem. Soc. 83, 4390 (1961).
- [23] W. P. Jencks: Catalysis in Chemistry and Enzymology. McGraw-Hill, New York 1969, S. 69.
- [24] T. Rathlev, T. Rosenberg, Arch. Biochem. Biophys. 65, 319 (1956).
- [25] T. Müller, T. Rathlev, T. Rosenberg, Biochim. Biophys. Acta 19, 563 (1956).
- [26] D. Theodoropoulos, J. Gazapoulos, J. Souchleris, J. Chem. Soc. 1960, 5257.
- [27] T. C. Bruice, S. J. Benkovic, J. Am. Chem. Soc. 86, 418 (1964).
- [28] M. Caplow, W. P. Jencks, Biochemistry 1, 773 (1962).
- [29] W. P. Jencks, J. Carriulo, J. Am. Chem. Soc. 83, 1743 (1961).
- [30] T. C. Bruice, Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol. 36, 21 (1971).
- [31] M. Dixon, J. Webb: Enzymes. Longmans, London 1964.
- [32] G. E. Means, R. E. Feeney: Chemical Modification of Proteins. Holden Day, San Francisco 1971.
- [33] L. Weil, Arch. Biochem. Biophys. 110, 57 (1965).
- [34] E. W. Westhead, Biochemistry 4, 2139 (1965).
- [35] S. Martinez-Carrion, M. R. Kuczenski, D. C. Tice, D. L. Peterson, J. Biol. Chem. 242, 1426 (1967).
- [36] M. Tomita, M. Irie, T. Ukita, Biochemistry 8, 5149 (1969).
- [37] H. Horinishi, Y. Hachimori, K. Kurihara, K. Shibata, Biochim. Biophys. Acta 86, 477 (1964).
- [38] M. Sokolovsky, B. L. Vallee, Biochemistry 5, 3574 (1966).
- [39] H. G. Löffler, Fr. Schneider, Biochim. Biophys. Acta 386, 221 (1975).
- [40] W. Kördel, Fr. Schneider, Hoppe-Seylers Z. Physiol. Chem. 357, 1109 (1976).
- [41] H. Matsubara, R. M. Sasaki, Biochem. Biophys. Res. Commun. 35, 175 (1969).
- [42] H. Mühlrad, G. Hegyi, G. Toth, Acta Biochim. Biophys. Acad. Sci. Hung. 2, 19 (1967).
- [43] C. G. Rosen, J. Fedorcsak, Biochim. Biophys. Acta 130, 401 (1966).
- [44] K. Röhm, Dissertation, Universität Marburg 1972.
- [45] W. Kördel, Dissertation, Universität Marburg 1976.
- [46] M. J. Loosemore, R. F. Pratt, FEBS Lett. 72, 155 (1976).
- [47] P. A. Price, S. Moore, W. H. Stein, J. Biol. Chem. 244, 924 (1969).
- [48] R. L. Henrikson, W. H. Stein, A. M. Crestfield, S. Moore, J. Biol. Chem. 240, 2921 (1965).
- [49] K. Takahashi, J. Biochem. (Tokyo) 80, 1267 (1976).
- [50] Fr. Schneider, Acta Histochem. Suppl. 18, 65 (1977).
- [51] G. Schoellmann, E. Shaw, Biochem. Biophys. Res. Commun. 7, 36 (1962).
- [52] G. Schoellmann, E. Shaw, Biochemistry 2, 252 (1963).
- [53] J. Covelli, J. Wolff, J. Biol. Chem. 241, 4444 (1966).
- [54] K. J. Brunings, J. Am. Chem. Soc. 69, 205 (1947).
- [55] C. T. Holloway, R. P. Bond, J. G. Knight, R. B. Beechey, Biochemistry 6, 19 (1967).
- [56] J. Wolff, J. Corelli, Eur. J. Biochem. 9, 371 (1969).
- [57] R. A. Dwek: Nuclear Magnetic Resonance in Biochemistry: Applications to Enzyme Systems. Clarendon Press, Oxford 1973.
- [58] C. C. McDonald, W. D. Phillips, J. Am. Chem. Soc. 85, 3736 (1963).
- [59] B. S. Hartley, Annu. Rev. Biochem. 29, 45 (1960).
- [60] R. Henderson, C. S. Wright, G. P. Hess, D. M. Blow, Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol. 36, 63 (1971).
- [61] D. M. Blow, J. J. Birkhofer, B. S. Hartley, Nature 221, 337 (1969).
- [62] G. Lowe, Phil. Trans. Roy. Soc. London B 257, 237 (1971).

- [63] J. Drenth, J. N. Jansonius, R. Koekoek, L. A. Sluyterman, B. G. Wolthers, Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol. 36, 231 (1971).
- [64] F. M. Richards, H. W. Wyckoff in P. D. Boyer: The Enzymes. Academic Press, New York 1971, Bd. 4, S. 647.
- [65] D. Findlay, D. G. Herries, A. P. Mathias, B. R. Rabin, C. A. Ross, Biochem. J. 85, 152 (1962).
- [66] A. Deavin, A. P. Mathias, B. R. Rabin, Biochem. J. 101, 14c (1966).
- [67] G. C. Roberts, L. A. Dennis, D. H. Meadows, J. S. Cohen, D. Jardetzky, Proc. Nat. Acad. Sci. USA 62, 1151 (1969).
- [68] H. G. Gassen, H. Witzel, Eur. J. Biochem. 1, 36 (1967).
- [69] B. L. Horecker, D. Tsolas, C. Y. Lai in P. D. Boyer: The Enzymes. Academic Press, New York 1972, Bd. 7, S. 213.
- [70] W. P. Jencks, J. Am. Chem. Soc. 94, 4731 (1972).
- [71] K. K. Kannan, A. Liljas, J. Woara, P. C. Bergstein et al., Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol. 36, 221 (1971).
- [72] W. N. Lipscomb, J. A. Hartsuck, G. N. Racke, F. A. Quiocho, Proc. Nat. Acad. Sci. USA 64, 28 (1969).
- [73] M. E. Hickey, R. L. Van Etten, Arch. Biochem. Biophys. 152, 423 (1972).
- [74] R. L. Van Etten, M. E. Hickey, Arch. Biochem. Biophys. 174, 432 (1977).
- [75] R. F. Ramaley, W. A. Bridger, R. W. Moyer, P. D. Boyer, J. Biol. Chem. 242, 4287 (1967).
- [76] F. Feldman, L. G. Butler, Biochim. Biophys. Acta 268, 698 (1972).
- [77] Z. B. Rose, N. Hamasaki, S. Dube, J. Biol. Chem. 250, 7939 (1975).
- [78] S. N. Kochetkov, T. V. Bulargina, L. P. Sahchenko, E. S. Severin, FEBS Lett. 71, 212 (1976).
- [79] A. M. Spronk, H. Yoshida, H. G. Wood, Proc. Nat. Acad. Sci. USA 73, 4415 (1976).
- [80] A. S. Mildvan, Annu. Rev. Biochem. 43, 357 (1974).
- [81] C. Dickenson, F. M. Dickinson, Eur. J. Biochem. 52, 595 (1975).
- [82] N. Latruffe, Y. Gaudemer, Biochimie 75, 849 (1975).
- [83] J. J. Holbrook, A. Lodola, N. P. Illsley, Biochem. J. 139, 797 (1974).
- [84] Gu Gang Chang, R. Ying Hsu, Biochim. Biophys. Acta 483, 228 (1977).
- [85] C. C. Fan, W. J. Stegeman, G. W. Plaut, Arch. Biochem. Biophys. 184, 125 (1977).
- [86] A. M. Boussioux, M. Pons, J. C. Nicolas, B. Descomps, A. Crastes de Paulet, FEBS Lett. 36, 27 (1973).
- [87] L. D. Kwiatkowski, L. Siconolfi, R. E. Weiner, R. S. Giordano, R. D. Bereman, M. J. Ettinger, D. J. Kosman, Arch. Biochem. Biophys. 182, 712 (1977).
- [88] D. S. Page, R. L. Van Etten, Biochim. Biophys. Acta 227, 16 (1971).
- [89] A. Hiramatsu, S. Tsurushiin, K. T. Yasunobu, Eur. J. Biochem. 57, 587 (1975).
- [90] F. Thomé-Beau, A. Olomucki, Eur. J. Biochem. 39, 557 (1973).
- [91] Y. S. Choong, M. G. Shepard, P. A. Sullivan, Biochem. J. 165, 385 (1977).
- [92] E. M. Fielden in G. E. Adams, E. M. Fielden, B. D. Michael: Fast Processes Radiat. Chem. Biol. Proc. 5th Gray Conf. 1973. Wiley, London 1975, S. 319.
- [93] P. Greenwell, S. L. Jewett, G. R. Stark, J. Biol. Chem. 248, 5994 (1973).
- [94] D. S. Gregory, J. B. Wilson, Biochemistry 10, 154 (1971).
- [95] K. Brand, O. Tsolas, B. L. Horecker, Arch. Biochem. Biophys. 130, 52 (1969).
- [96] O. Tsolas, S. C. Sun, Arch. Biochem. Biophys. 167, 525 (1975).
- [97] A. Kamogawa, T. Fukui, Biochim. Biophys. Acta 403, 326 (1975).
- [98] R. P. Agarwal, R. E. Parks, Jr., J. Biol. Chem. 244, 644 (1969).
- [99] M. Yamasaki, S. Tanase, Y. Morino, Biochem. Biophys. Res. Commun. 65, 652 (1975).
- [100] T. E. Mansour, Adv. Enzyme Regul. 8, 37 (1970).
- [101] N. Kochetkov, V. Bulargina, P. Sashchenko, S. Severin, Eur. J. Biochem. 81, 111 (1977).
- [102] L. Bornemann, B. Hess, Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem. 355, 1073 (1974).
- [103] C. Rouston, L. A. Pradel, R. Kassab, A. Fattoum, N. Van Thoi, Biochim. Biophys. Acta 206, 369 (1970).
- [104] C. Rouston, L. A. Pradel, R. Kassab, N. Van Thoi, Biochim. Biophys. Acta 250, 103 (1971).
- [105] M. Cohen, J. S. Leigh, Jr., G. H. Reed, Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol. 36, 533 (1972).
- [106] R. P. Agarwal, R. E. Parks, J. Biol. Chem. 246, 2258 (1971).
- [107] A. W. Norman, R. T. Wedding, M. K. Black, Biochem. Biophys. Res. Commun. 20, 703 (1965).
- [108] Y. Milner, H. G. Wood, Proc. Nat. Acad. Sci. USA 69, 2463 (1972).
- [109] M. Semeriva, C. Dufour, P. Desnuelle, Biochemistry 10, 2143 (1971).
- [110] C. Chapus, M. Semeriva, Biochemistry 15, 4988 (1976).
- [111] J. J. Volwerk, W. A. Pieterse, G. H. de Haas, Biochemistry 13, 1446 (1974).
- [112] R. M. Krupka, Biochemistry 5, 1983, 1988 (1966).
- [113] G. H. Tait, B. L. Vallee, Proc. Nat. Acad. Sci. USA 56, 1247 (1966).
- [114] J. Rybarska, W. Ostrowski, Acta Biochim. Pol. 21, 377 (1974).
- [115] M. E. Hickey, R. L. Van Etten, Arch. Biochem. Biophys. 152, 423 (1972).
- [116] R. C. Nordlie, D. G. Lygve, J. Biol. Chem. 241, 3136 (1966).
- [117] R. C. Nordlie in P. D. Boyer: The Enzymes. Academic Press, New York 1971, Bd. 4, S. 574.
- [118] C. Little, Biochem. J. 167, 399 (1977).
- [119] P. A. Price, S. Moore, W. H. Stein, J. Biol. Chem. 244, 924 (1969).
- [120] L. Weil, T. S. Seibles, Arch. Biochem. Biophys. 54, 368 (1955).
- [121] R. L. Heinrichson, W. H. Stein, A. M. Crestfield, S. Moore, J. Biol. Chem. 240, 2921 (1965).
- [122] U. W. Kenhare, F. M. Richards, J. Biol. Chem. 241, 3197 (1966).
- [123] H. Rüterjans, H. Witzel, Eur. J. Biochem. 9, 118 (1969).
- [124] H. Shindo, M. B. Hayes, J. S. Cohen, J. Biol. Chem. 251, 2644 (1976).
- [125] K. Takahashi, J. Biochem. (Tokyo) 67, 833 (1970).
- [126] K. Takahashi, J. Biochem. (Tokyo) 80, 1267 (1976).
- [127] H. Rüterjans, H. Witzel, O. Pongs, Biochem. Biophys. Res. Commun. 37, 247 (1969).
- [128] Y. Arata, S. Kimura, H. Matsuo, K. Narita, Biochem. Biophys. Res. Commun. 73, 133 (1976).
- [129] G. D. Lee, R. L. Van Etten, Arch. Biochem. Biophys. 171, 424 (1975).
- [130] A. Jerfy, A. B. Roy, Biochim. Biophys. Acta 371, 76 (1974).
- [131] A. A. Farooqui, Experientia 32, 1377 (1976).
- [132] E. W. Westhead, Biochemistry 4, 2139 (1965).
- [133] N. A. Zherebtsov, Biokhimiya 33, 435 (1968).
- [134] G. Petterson, Arch. Biochem. Biophys. 126, 776 (1968).
- [135] S. Shell, A. Waheed, Biochem. J. 111, 33P (1969).
- [136] K. Myrbäck, Ark. Kemi 27, 507 (1967).
- [137] M. Lindewig, M. Frohne, J. Marquardt, H. Hanson, Eur. J. Biochem. 54, 155 (1975).
- [138] W. N. Lipscomb, J. A. Hartsuck, G. N. Reche, F. A. Quiocho, Proc. Nat. Acad. Sci. USA 64, 28 (1969).
- [139] R. A. Bradshaw, L. H. Eriessson, K. A. Walsh, H. Neurath, Proc. Nat. Acad. Sci. USA 63, 1389 (1969).
- [140] R. Hayashi, Y. Bai, T. Hata, J. Biol. Chem. 250, 5221 (1975).
- [141] B. R. Hammond, H. Gutfreund, Biochem. J. 61, 187 (1955).
- [142] G. Schoellmann, E. Shaw, Biochem. Biophys. Res. Commun. 7, 36 (1962).
- [143] E. B. Ong, E. Shaw, G. Schoellmann, J. Am. Chem. Soc. 86, 1271 (1964).
- [144] J. J. Birktoft, D. M. Blow, R. Henderson, T. A. Steitz, Phil. Trans. Roy. Soc. London B 257, 67 (1970).
- [145] H. Gutfreund, Trans. Faraday Soc. 51, 441 (1955).
- [146] W. Mares Guia, E. Shaw, Fed. Proc. 22, 528 (1963).
- [147] G. Beeley, H. Neurath, Biochemistry 7, 1239 (1968).
- [148] E. Shaw, W. Mares Guia, W. Cohen, Biochemistry 4, 2219 (1965).
- [149] B. S. Hartley, D. M. Shotton in P. D. Boyer: The Enzymes. Academic Press, New York 1971, Bd. 3, S. 323.
- [150] L. Polgar, M. L. Bender, Biochemistry 6, 610 (1967).
- [151] R. A. Oosterbaan, J. A. Cohen in: Structure and Activity of Enzymes. Academic Press, New York 1964, S. 87.
- [152] E. Shaw, J. Ruscica, J. Biol. Chem. 243, 6312 (1968).
- [153] A. Ohara, S. S. Fujimoto, H. Kamazawa, T. Nakagawa, Chem. Pharm. Bull. 23, 967 (1975).
- [154] K. Okumura, T. Murachi, J. Biochem. (Tokyo) 77, 913 (1975).
- [155] M. G. Loeffler, Fr. Schneider, Biochim. Biophys. Acta 386, 221 (1975).
- [156] P. Clark, G. Lowe, FEBS Lett. 61, 25 (1976).
- [157] J. Drenth, J. N. Jansonius, R. Koekoek, B. G. Wolthers, Adv. Protein Chem. 25, 79 (1971).
- [158] S. S. Hussain, G. Love, Biochem. J. 110, 53 (1968).
- [159] S. S. Husain, G. Lowe, Biochem. J. 110, 53 (1968).
- [160] H. Kamazawa, S. Ishimitsu, M. Sakane, K. Aoki, S. Furuta, A. Ohara, Chem. Pharm. Bull. 24, 3088 (1976).
- [161] T. Y. Liu, J. Biol. Chem. 242, 4029 (1967).
- [162] S. Takahashi, S. Seifner, Biochim. Biophys. Acta 214, 556 (1970).
- [163] Y. Burstein, K. A. Walsh, H. Neurath, Biochemistry 13, 205 (1974).
- [164] E. B. Ong, A. J. Johnson, G. Schoellmann, Biochim. Biophys. Acta 429, 252 (1976).
- [165] K. R. Lyne, Biochim. Biophys. Acta 146, 205 (1967).
- [166] F. J. Reithel in P. D. Boyer: The Enzymes. Academic Press, New York 1971, Bd. 4, S. 20.
- [167] W. Kördel, Fr. Schneider, Z. Naturforsch. C 32, 337 (1977).
- [168] W. Kördel, Fr. Schneider, Z. Naturforsch. C 32, 342 (1977).
- [169] J. Cozzani, C. Santoni, G. Jori, G. Gennari, A. M. Tamburro, Biochem. J. 141, 463 (1974).
- [170] P. Hoffee, C. Y. Lei, E. L. Pugh, B. L. Horecker, Proc. Nat. Acad. Sci. USA 57, 107 (1967).
- [171] L. C. Davis, L. W. Brox, R. W. Gracey, G. Ribereau-Gayon, B. L. Horecker, Arch. Biochem. Biophys. 140, 215 (1970).
- [172] G. L. Cottam, P. A. Srere, Biochem. Biophys. Res. Commun. 35, 895 (1969).
- [173] S. Mardh, O. Ljungström, S. Hagstedt, O. Zetterquist, Biochim. Biophys. Acta 251, 419 (1971).
- [174] H. Kumagai, T. Utagawa, H. Yamada, J. Biol. Chem. 250, 1661 (1975).
- [175] C. Frieden, R. A. Alberty, J. Biol. Chem. 212, 859 (1955).

- [176] G. A. Rogers, *Anal. Biochem.* 78, 406 (1977).
 [177] R. A. Bradshaw, G. W. Robinson, G. M. Hess, R. L. Hill, *J. Biol. Chem.* 244, 1755 (1969).
 [178] E. W. Westhead, *Biochemistry* 4, 2139 (1965).
 [179] F. Wold, C. E. Ballou, *J. Biol. Chem.* 227, 313 (1957).
 [180] J. Tsukamoto, T. Yoshinaga, S. Sano, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 67, 294 (1975).
 [181] K. Block in P. D. Boyer: *The Enzymes*. Academic Press, New York 1971, Bd. 5, S. 453.
 [182] W. A. Bridger, L. H. Cohen, *Can. J. Biochem.* 47, 665 (1969).
 [183] P. M. Burton, S. G. Waley, *Biochem. J.* 100, 702 (1966).
 [184] P. M. Burton, S. G. Waley, *Biochem. J.* 104, 3 P (1967).
 [185] R. W. Gracy, E. A. Noltmann, *J. Biol. Chem.* 243, 5410 (1968).
 [186] J. E. D. Dyson, E. A. Noltmann, *J. Biol. Chem.* 243, 1401 (1968).
 [187] G. C. Chatterjee, E. A. Noltmann, *Eur. J. Biochem.* 2, 9 (1967).
 [188] U. P. Schnachery, E. A. Noltmann, *J. Biol. Chem.* 245, 6417 (1970).
 [189] P. Talalay, *Annu. Rev. Biochem.* 34, 347 (1965).
 [190] P. Talalay, A. M. Benson in P. D. Boyer: *The Enzymes*. Academic Press, New York 1972, Bd. 6, S. 595.
 [191] H. Hennecke, A. Böck, *Eur. J. Biochem.* 50, 157 (1974).
 [192] J. Cousineau, E. Meighen, *Biochemistry* 15, 4992 (1976).
 [193] J. Cousineau, E. Meighen, *Can. J. Biochem.* 55, 433 (1977).
 [194] G. Hegyi, G. Premecz, B. Sain, A. Múhlrad, *Eur. J. Biochem.* 44, 7 (1974).
 [195] D. J. Steenkamp, J. C. Schabert, C. Holzapfel, N. P. Ferreira, *Biochim. Biophys. Acta* 358, 126 (1974).
 [196] M. Gassner, D. Stehlik, O. Schrecker, W. Hengstenberg, W. Maurer, H. Rüterjans, *Eur. J. Biochem.* 75, 287 (1977).
 [197] J. P. Collins, J. G. Jones, *Eur. J. Biochem.* 42, 81 (1974).
 [198] P. W. Albroy, B. J. Corbett, A. D. Latimer, *Biochim. Biophys. Acta* 424, 351 (1976).
 [199] M. A. Krysteva, J. Mazurier, G. Spik, J. Montreuil, *FEBS Lett.* 56, 337 (1975).
 [200] W. T. Morgan, U. Müller-Eberhard, *J. Biol. Chem.* 250, 6439 (1975).
 [201] L. Tallandini, B. Salvato, G. Jori, *FEBS Lett.* 54, 283 (1975).
 [202] T. Wielsch, K. E. Falk, *FEBS Lett.* 85, 271 (1978).
 [203] M. Schindler, N. Sharon, J. P. Prieels, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 69, 167 (1976).
 [204] T. B. Rogers, R. A. Gold, R. E. Feeney, *Biochemistry* 16, 2299 (1977).

ZUSCHRIFTEN

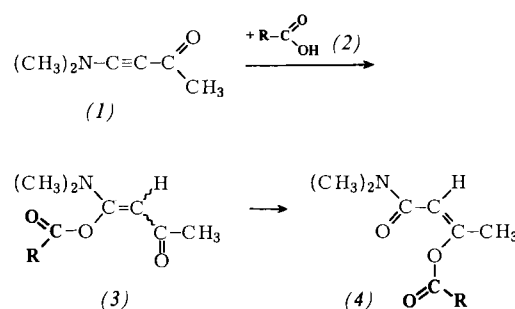
Zuschriften sind kurze vorläufige Berichte über Forschungsergebnisse aus allen Gebieten der Chemie. Vom Inhalt der Arbeiten muß zu erwarten sein, daß er aufgrund seiner Bedeutung, Neuartigkeit oder weiten Anwendbarkeit bei sehr vielen Chemikern allgemeine Beachtung finden wird. Autoren von Zuschriften werden gebeten, bei Einsendung ihrer Manuskripte der Redaktion mitzuteilen, welche Gründe in diesem Sinne für eine vorzügliche Veröffentlichung sprechen. Die gleichen Gründe sollen im Manuskript deutlich zum Ausdruck kommen. Manuskripte, von denen sich bei eingehender Beratung in der Redaktion und mit auswärtigen Gutachtern herausstellt, daß sie diesen Voraussetzungen nicht entsprechen, werden den Autoren mit der Bitte zurückgesandt, sie in einer Spezialzeitschrift erscheinen zu lassen, die sich direkt an den Fachmann des behandelten Gebietes wendet.

4-Dimethylamino-3-buten-2-on als Aktivierungsmittel für Peptidsynthesen^[**]

Von Hans-Joachim Gais^[*]

Die chemoselektive Aktivierung von Carboxygruppen in polyfunktionellen Molekülen gelingt sehr einfach mit 4-Dimethylamino-3-buten-2-on (1)^[1]. Die dabei anfallenden aktivierten Enolester (4) erwiesen sich als ausgezeichnete Acylüberträger, z. B. bei der Synthese von Thiol- und Selenolestern^[1].

Es schien daher reizvoll, die Verwendbarkeit des Acetylendi-derivats (1) als Aktivierungsmittel für Peptidsynthesen zu prüfen. Wir fanden, daß (1) mit N-Acylaminosäuren (2a-i) oder N-Acylpeptiden (2j-m) in wasserfreien aprotischen Lösungsmitteln bei -60 bis 0°C schnell und nahezu quantitativ zu N-Acylaminosäure- (4a-i) bzw. N-Acylpeptid-(Z)-1-



methyl-2-dimethylcarbamoyl-vinylestern (4j-m) reagiert (Tabelle 1)^[2]. Diese Ester sind in der Regel gut kristallisierende, nicht hydrolyseempfindliche und bis auf (4e) haltbare Verbindungen. Die Primäraddukte (3) entziehen sich selbst bei -60°C dem NMR-spektroskopischen Nachweis^[1].

Tabelle 1. N-Acylaminosäure- (4a-i) und N-Acylpeptid-(Z)-1-methyl-2-dimethylcarbamoyl-vinylester (4j-m).

Aminosäure oder Peptid	Enolester	Ausb. [%] [a]
(2a) Boc-L-Tyr	(4a)	97
(2b) Boc-L-Ser	(4b)	96
(2c) Z-L-Ser	(4c)	97
(2d) Z-L-Hyp	(4d)	98
(2e) Ac-L-Cys	(4e)	92 [b, c]
(2f) Z-L-Gln	(4f)	94
(2g) Boc-L-Asn	(4g)	91
(2h) Z-L-Phe	(4h)	98
(2i) Bz-L-Leu	(4i)	99
(2j) Z-Gly-L-Phe	(4j)	95
(2k) Boc-Gly-L-Pro	(4k)	93
(2l) Z-Gly-L-Met	(4l)	96
(2m) Z-L-Leu-L-Val	(4m)	96

[a] Die Ausbeuten beziehen sich auf die isolierten reinen Verbindungen.

[b] Wandelt sich bei Raumtemperatur unter Abspaltung von Acetessigsäure-dimethylamid um.

[c] NMR-spektroskopisch bestimmt.

Die chemoselektive Aktivierung der Carboxygruppe in Boc-Tyrosin (2a), Boc-Serin (2b), Z-Hydroxyprolin (2d), Ac-Cystein (2e), Z-Glutamin (2f) und Boc-Asparagin (2g) gelingt glatt; die ungeschützten Seitenkettenfunktionen werden selbst von überschüssigem (1) nicht angegriffen. Bei einem Unterschub an (1) bildet sich kein Carbonsäureanhydrid.

[*] Dr. H.-J. Gais
 Institut für Organische Chemie der Technischen Hochschule
 Petersenstraße 22, D-6100 Darmstadt

[**] Teilweise vorgetragen auf der Chemiedozententagung in Berlin (5. April 1978).