

CIRCULARDICHROISMUS DES DISULFIDCHROMOPHORS IN S-ALKYLTHIO-L-CYSTEINEN UND L-GLUTATHION

M. OTTNAD,* C. OTTNAD,* P. HARTTER* und G. JUNG**

Chemisches Institut* und Physiologisch-Chemisches Institut* der Universität Tübingen, D-7400 Tübingen

(Received in Germany 2 March 1974; Received in the UK for publication 15 August 1974)

Zusammenfassung—Der inhärent dissymmetrische Disulfid-Chromophor ruft in Molekülen, die dem Cystin verwandt sind und eine Disulfidgruppierung C-S-S-C mit P- oder M-helikaler Anordnung besitzen, zwei optisch aktive Übergänge mit entgegengesetztem Vorzeichen bei 250 nm hervor. Der Übergang dieses intrinsisch optisch aktiven Chromophors zeigt eine starke Abhängigkeit der Rotationsstärke vom Torsionswinkel ϕ . Die offenkettigen S-Alkylthio-L-cysteine zeigen grosse Temperaturkoeffizienten ihrer beiden negativen Cotton-Effekte bei 250 nm und 200 nm im Bereich von 0°C bis 100°C in saurer wässriger Lösung. Für den S-S-Chromophor von oxidiertem L-Glutathion wird eine ähnlich ausgeprägte Temperaturabhängigkeit gefunden. Demgegenüber zeigen die Carbonylübergänge dieser Moleküle lediglich den normalen Kauzmann-Eyring-Effekt. Die Grösse und Lage der Disulfid-Cotton-Effekte wird stark von den Dissoziationsgleichgewichten beeinflusst, wobei mit zunehmendem pH bathochrome Verschiebungen der 250 nm-Disulfidbande gefunden werden.

Abstract—The inherently dissymmetric disulfide chromophore imparts two optically active transitions with opposite signs at 250 nm to molecules related to L-cystine and possessing a disulfide grouping C-S-S-C with P- or M-helical arrangement. The transition of this intrinsically optically active chromophore exhibits a strong dependence of its rotational strength on the torsional angle ϕ . The open-chain S-alkylthio-L-cysteines show large temperature coefficients of their two negative Cotton effects at 250 nm and 200 nm in the range of 0°C to 100°C in acidic aqueous medium. For the S-S-chromophore of oxidized L-glutathione a similarly strong temperature dependence is found. On the other hand, the carbonyl part of these molecules shows the normal Kauzmann-Eyring effect. The size and position of the disulfide Cotton effects are largely influenced by the magnitude and position of the dissociation equilibria. With increasing pH bathochromic shifts of the 250 nm disulfide band are found.

Verbindungen, die an zwei benachbarten Atomen freie Elektronenpaare besitzen, können in zwei enantiomeren Formen auftreten, wenn die stabilste Form diejenige ist, bei der die Anordnung der betreffenden Atome nicht koplanar ist. Sofern ein weiteres Chiralitätszentrum im Molekül vorhanden ist, ergeben sich Diastereomere, die jeweils z.B. die Konfiguration R am chiralen Zentrum und M-helikale bzw. P-helikale Strukturelemente aufweisen.¹ Auch die von uns untersuchten Moleküle mit Disulfidgruppen, wie die S-Alkylthio-L-cysteine und oxidiertes L-Glutathion (GSSG), gehören zu diesen Verbindungen. In diesen Verbindungen kann man wegen der Wechselwirkung der beiden nichtbindenden 3p-Orbitale der Schwefelatome² zwei gewinkelte Formen erwarten,³ wobei der Torsionswinkel ϕ der C-S-S-C-Gruppe ungefähr 90° betragen sollte.

Zur Untersuchung der Konformation biologisch interessanter Verbindungen mit Disulfidbrücken wäre ein volles Verständnis der Beziehung zwischen Stereochemie und Circulardichroismus (CD) der Disulfide vorteilhaft. Bisher durchgeführte CD-Studien befassen sich meist mit cyclischen, konformativ festgelegten Verbindungen.⁴⁻¹⁷ Untersuchungen an offenkettigen Disulfiden¹⁸⁻²⁷ zeigen, dass hier die Aussagen aus den CD-Spektren wegen der Umwandlungsmöglichkeit der beiden Diastereomeren durch Rotation um die S-S-Bindung wesentlich unklarer

sind. Der thermodynamische Stabilitätsunterschied sowie die Rotationsbarrieren²⁸⁻³¹ sind nämlich relativ klein. So findet man bei manchen Molekülen wie z.B. Lysozym³² beide Helizitäten der S-S-Brücke; in Kristallen von L-Cystin³³ kommt die entgegengesetzte Helizität wie in solchen von L-Cystin × 2 HCl,³⁴ L-Cystin × 2 HBr³⁵ oder N,N'-Diglycyl-L-cystin × 2 H₂O³⁶ vor. In Lösung sollte man also eine temperaturabhängige Verteilung der diastereomeren Disulfide erwarten. Darauf weisen die starke Temperaturabhängigkeit des Drehwerts³⁷ sowie des CD von Lösungen von L-Cystin³⁸ und von N,N'-Diacyl-L-cystin-bismethylamid³² hin.

Bereits bei L-Cystin oder oxidiertem L-Glutathion lassen sich sterische, elektronische und elektrostatische Effekte auf den Disulfidchromophor nicht differenziert untersuchen. Daher haben wir einen Cysteinylrest durch Alkylthiogruppen ersetzt und die Temperaturabhängigkeit der CD-Spektren einiger dieser S-Alkylthio-L-cysteine sowie von L-Glutathion und einem seiner Derivate untersucht.

Optische und chiroptische Eigenschaften der Disulfidgruppe

Gegenüber der längstwelligen Absorptionsbande organischer Thiole und Sulfide ist die der Disulfide stark bathochrom verschoben. Während die Zuordnung der

Übergänge des Sulfidchromophors^{14,15} noch umstritten ist, lässt sich die längstwellige Absorption der Disulfide^{2,16,40-45} genau zuordnen. Es handelt sich dabei um die Anregung von Elektronen aus den durch Kombination der nichtbindenden 3p-Orbitale des Schwefels entstandenen n.-n.-Orbitalen in ein antibindendes σ -Orbital der Disulfidgruppe. Da die Orbital-energie der n.- und n.-Orbitale stark vom Torsionswinkel ϕ abhängt, die Energie des σ^* -Orbitals dagegen kaum, findet man bei Änderung von ϕ eine starke Verschiebung des langwelligen Absorptionsmaximums. Bei $\phi = 90^\circ$ sind die n.- und n.- σ^* -Übergänge entartet und ergeben die breite Absorptionsbande offenkettiger Disulfide bei ungefähr 250 nm. Beim Übergang zu cyclischen Disulfiden verschiebt sich diese Bande bathochrom, und in manchen Fällen^{4,16} lassen sich die den beiden Übergängen entsprechenden Banden getrennt beobachten, deren Lage symmetrisch zu 250 nm ist. Dies stimmt mit den Voraussagen der Theorie überein.

Bei Molekülen mit Torsionswinkeln um 90° folgt aus der Theorie, dass sich die den beiden entarteten Übergängen entsprechenden Cotton-Effekte, die entgegengesetzte Vorzeichen ihrer Rotationsstärke besitzen, aufheben sollten. Die noch zu beobachtende restliche optische Aktivität im langwelligen Bereich kann auf zwei Ursachen zurückgeführt werden: Einerseits tritt bei Torsionswinkeln um 90° noch keine völlige Aufhebung der Cotton-Effekte auf, und die restliche geringe optische Aktivität wird von der Helizität der Disulfidgruppe bestimmt. Andererseits "induzieren" der Disulfidgruppe benachbarte asymmetrische Reste die optische Aktivität des Disulfidübergangs. Es ist dabei nicht ohne weiteres möglich, diese intrinsischen bzw. extrinsischen Effekte getrennt zu erfassen.

Ein weiterer um 200 nm auftretender Cotton-Effekt ist wahrscheinlich auf den σ - σ^* -Übergang der Disulfidgruppe zurückzuführen. Dieser Cotton-Effekt enthält ausserdem Anteile des π - π^* -Übergangs der CO-Gruppe der S-Alkylthio-L-cysteine bzw. des L-Glutathions; seine sehr hohen Rotationsstärken liegen in dem Bereich, den man für intrinsisch optisch aktive Chromophore erwartet.⁴⁶

CD-Spektren von asymmetrischen Disulfiden des L-Cysteins und L-Glutathion

Die CD-Spektren von S-Methyl- (1), S-Äthyl- (2), S-Propyl- (3), S-Butyl- (6), S-Octyl- (7), S-neo-Pentyl- (8), S-Benzyl- (9), S-Tolyl- (10), S-iso-Propyl- (4), S-sek.-Butyl-

(11), S-Cyclohexyl- (12), S-tert.-Butyl- (5) und S-tert.-Pentyl-thio-L-cystein (13), sowie von L-Glutathion (G-SH) (16), oxidiertem L-Glutathion (GSSG) (14) und S-Methylthio-L-glutathion (GSSMe) (15) wurden im Bereich von 350 nm bis 195 nm gemessen.

Als Lösungsmittel diente 1 N HCl, ausser bei 7 und 10, die wegen geringer Löslichkeit in einem Gemisch von Isopropanol/1 N HCl (2:3, v/v) gemessen werden mussten. 1, 2, 3, 4, 5 und 9 wurden in 0.1 N HCl bei sechs verschiedenen Temperaturen (5, 15, 35, 55, 75 und 95°C) gemessen, nach den Messungen bei höherer Temperatur abgekühlt und nochmals bei 25°C gemessen, um eventuelle chemische Veränderungen bzw. sonstige irreversible Umwandlungen feststellen zu können. Ebenso wurden 10 in Isopropanol/1 N HCl (2:3) bei 25, 50 und 70°C, 16 in neutraler Phosphatpuffer-Lösung bei -5, 15, 25, 35 und 45°C, 14 im selben Lösungsmittel im Bereich von 10°C bis 70°C, in einem Gemisch von Äthanol/1 N HCl (9:1, v/v) zwischen -24°C und 45°C und in Hexafluoraceton-Trihydrat zwischen -24°C und 10°C gemessen. 15 wurde in 1 N HCl bei 25, 50, 70 und 90°C gemessen. Die Messung der pH-Abhängigkeit von 1 erfolgte bei 25°C.

Diskussion der Spektren

Disulfid- und Carboxyl-Banden der S-Alkylthio-L-cysteine. Der Substitutionsgrad der Alkylgruppe der S-Alkylthio-L-cysteine äussert sich in einer ausgeprägten regelmässigen hypsochromen Verschiebung der Maxima des längstwillingen Cotton-Effekts in der Reihenfolge CH₃ < primäre < sekundäre < tertiäre Alkylgruppe. Dies wird auch bei UV-Untersuchungen an symmetrischen und asymmetrischen Dialkydisulfiden und -diseleniden beobachtet,⁴⁷ bei denen diese Verschiebung auf Hyperkonjugation beruhen könnte.^{47,48} Die CD-Maxima der S-Alkylthio-L-cysteine liegen bei einer Wellenlänge, die der Mitte zwischen dem UV-Maximum von Diäthyldisulfid (für den Cysteinteil) und dem des entsprechenden symmetrischen Dialkydisulfids entspricht (λ_{max} von 4 bei 248 nm, λ_{max} von Diäthyldisulfid bei 251.5 nm und von Diisopropyldisulfid bei 245 nm). Ausnahmen bilden 1 (257 nm) und die tertiären S-Alkylthio-L-cysteine, deren Cotton-Effekte wesentlich längerwellig liegen, als man aus obiger Mittelung erwarten würde. In Di-tert.-butyldisulfid verursacht eine starke sterische Behinderung der Methylgruppen an der Disulfidbrücke eine Aufweitung des Torsionswinkels auf ca. 110°. Diese Behinderung ist beim gemischten primär-tertiären Disulfid bereits aufgehoben. Dagegen

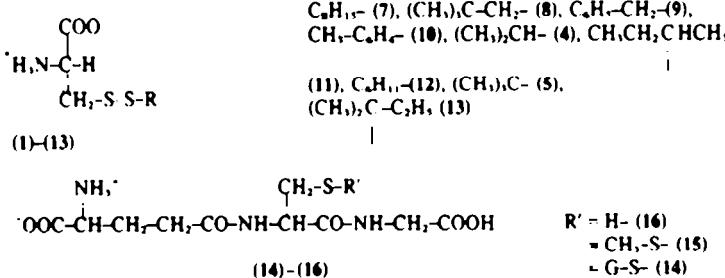


Tabelle 1. Lage und molare Elliptizitäten der Cotton-Effekte der S-Alkylthio-L-cysteine bei 25°C in 1 N HCl

	$\lambda_{\text{max}} \text{ (nm)}$	$[\Theta] \text{ [grad cm}^2 \text{ dMol}^{-1}]$
S-Methylthio-L-cystein (1)	257	-1130
	221	8620
S-Aethylthio-L-cystein (2)	252.5	-1440
	221	8260
S-Propylthio-L-cystein (3)	253	-1300
	221	7830
S-iso-Propylthio-L-cystein (4)	248	-1520
	220	8220
S-tert.-Butylthio-L-cystein (5)	244.5	-1560
	218.5	8560
S-Butylthio-L-cystein (6)	251.5	-1450
	221	10600
S-Octylthio-L-cystein (7)	252.5	-1520
	221.5	8670
S-neo-Pentylthio-L-cystein (8)	252.5	-1310
	221	8390
S-Benzylthio-L-cystein (9)	273	550
	250	-930
	223	4630
S-Tolylthio-L-cystein (10)	282.5	-4130
	238	-29350
	218.5	5390
S-sec-Butylthio-L-cystein (11)	248	-1450
	221	8260
S-Cyclohexylthio-L-cystein (12)	250	-1430
	221	8220
S-tert.-Pentylthio-L-cystein (13)	247	-1370
	220	9400

lässt sich keine eindeutige Abhängigkeit der Elliptizität bzw. Rotationsstärke des längstwelligen Disulfid-Cotton-Effekts vom Alkylrest feststellen.

Bei allen S-Alkylthio-L-cysteinen, bis auf 1, beobachtet man molare Elliptizitäten im Bereich von -1300 bis -1500 grad cm² dMol⁻¹. Bei L-Cystin findet man unter vergleichbaren Bedingungen -1800 grad cm² dMol⁻¹. Trotz zweier Chiralitätszentren in der Nachbarschaft der Disulfidgruppe des Cystins ist dessen Elliptizität nur wenig grösser als in den S-Alkylthio-L-cysteinen. Somit ist der Nachbargruppenbeitrag zum CD von Disulfiden mit Diedwinkeln um 90° also nur gering.

Der positive Carboxyl-Cotton-Effekt zeigt weder für die Lage noch die Elliptizität eine Abhängigkeit von der S-Alkylgruppe. Die Orientierung der S-S-Gruppe relativ zur Carboxylgruppe sollte also in allen S-Alkylthio-L-cysteinen gleich sein. In L-Cystin tritt bei 220 nm der Carboxylübergang nur mit doppelt so hoher Elliptizität auf, was als Beweis für das Fehlen spezifischer intramolekulärer Wechselwirkungen, z. B. Wasserstoffbrückenbindungen,²⁰ in L-Cystin gewertet werden kann.¹⁹

Fast alle S-Alkylthio-L-cysteine zeigen bei 200 nm oder etwas kürzerwellig einen weiteren stark negativen Cotton-Effekt, dessen Lage und Elliptizität ebenfalls nur wenig vom Alkylsubstituenten abhängt. Ähnlich starke Cotton-Effekte treten bei L-Cystin (196 nm)²⁰ und auch bei trans-2,3-Dithiadekalin (203 nm in n-Heptan)^{11,19} auf.

Die Deutung der UV- und CD-Spektren von 9 und 10 ist

durch die Anwesenheit des Benzyl- bzw. Tolylrestes erschwert. Während sich bei 9 das CD-Spektrum nur in den Elliptizitätswerten sowie durch die Andeutung eines langwelligen Minimums bei 273 nm von den Spektren der S-Alkylderivate unterscheidet, dominiert im Spektrum von 10 der aromatische Ring mit seinen Übergängen.²⁰ Der Disulfidübergang wird sowohl im UV- als auch im CD-Spektrum vollständig verdeckt und der Carboxyl-Cotton-Effekt zeigt sich mit verminderter Intensität bei 218.5 nm. Im UV-Spektrum ist dieser Übergang jedoch nicht zu sehen, da er durch Maxima bei 208 nm und 235 nm überdeckt wird.

Disulfid- und Amid-Banden in Glutathion. Während man bei GSH 16 in neutraler Phosphatpufferlösung nur Cotton-Effekte unterhalb von 220 nm beobachtet, die auf den $n-\pi^*$ -Übergang der Cysteinyl-glycin-Amidbindung sowie auf Übergänge des Schwefels zurückzuführen sind, findet man für GSSG 14 erwartungsgemäss einen langwelligen Cotton-Effekt im Bereich der Disulfidabsorption bei 263 nm. Weitere Cotton-Effekte treten bei 227 nm und 202 nm auf.

Der positive Amid-Cotton-Effekt von GSSG bei 227 nm ist wie bei GSH hauptsächlich auf die Amidbindungen zwischen Cystin und Glycin zurückzuführen, denn die Peptidbindungen zwischen den beiden Glutaminsäureresten und Cystin sind so weit vom C_α der Glutaminsäure entfernt, dass sie von diesen Chiralitätszentren nicht mehr beeinflusst werden.²¹ Die Vorzeichenumkehr und bathochrome Verschiebung gegenüber GSH muss auf einer Wechselwirkung zwischen der Disulfidgruppe und den Amidgruppen beruhen (vgl. die bathochromic Verschiebung des Carboxylübergangs des Cystins gegenüber Cystein"). Der durch die Carboxylgruppen der zwei Glutaminsäurereste verursachte Cotton-Effekt ist offenbar so gering, dass er von den Amid-Cotton-Effekten verdeckt wird.

In saurer äthanolischer Lösung zeigt GSSG ein ähnliches CD-Spektrum wie in neutraler Pufferlösung. In Hexafluoracetone-Trihydrat ist jedoch der Disulfid-Cotton-Effekt um etwa 10 nm nach kürzeren Wellenlängen verschoben und seine Elliptizität um die Hälfte reduziert. Diese starke Lösungsmittelabhängigkeit bestätigt den nichtbindenden Charakter der Ausgangsorbitale des Disulfidübergangs. Der $n-\pi^*$ -Amid-Cotton-Effekt ist in Hexafluoracetonlösungen nicht mehr zu beobachten, da er so sehr hypsochrom verschoben ist, dass er von dem kürzerwelligeren, hier unterhalb von 200 nm liegenden Cotton-Effekt überdeckt wird, was auch bei anderen Amiden beobachtet wird.²² Das CD-Spektrum des GSH-Derivats 15 in 1 N HCl unterscheidet sich wenig von den GSSG-Spektren, jedoch ist die Elliptizität des Amid-Cotton-Effekts erwartungsgemäss wesentlich kleiner als bei GSSG.

Temperaturabhängigkeit des Circular dichroismus von Disulfiden

Die CD-Spektren aller hier untersuchten Disulfide zeigen eine starke Temperaturabhängigkeit des längstwelligen Disulfid-Cotton-Effekts.

Auch für andere schwefelhaltige Aminosäuren^{11,14}

Tabelle 2. Lage und molare Elliptizitäten der Cotton-Effekte von Glutathion

	$\lambda_{\text{max}} \text{ (nm)}$	$[\Theta] \text{ (grad cm}^2 \text{ dMol}^{-1})$
Oxidiertes L-Glutathion (GSSG, 14)	262.5	-950
Phosphatpuffer pH = 7, T = 30°C	228	1050
Oxidiertes L-Glutathion (GSSG, 14)	267.5	-1360
Äthanol/1 N HCl (9:1), T = 25°C	225	6250
Oxidiertes L-Glutathion (GSSG, 14)	251	-500
Hexafluoracetone $\times 3 \text{ H}_2\text{O}$, T = 5°C		
S-Methylthio-L-glutathion (GSSMe, 15)	267	-790
1 N HCl, T = 25°C	226	1940
Reduziertes L-Glutathion (GSH, 16)	217.5	-4940
Phosphatpuffer pH = 7, T = 20°C		

wurde eine im Vergleich zu den übrigen Aminosäuren ausgeprägte Temperaturabhängigkeit beobachtet. Die Änderungen der CD-Spektren mit der Temperatur im Bereich der Disulfidabsorption sind jedoch mehr als doppelt so stark. Die Ursache dafür liegt in der Struktur des Disulfidchromophors; dabei sind die verschiedenen Beiträge zur optischen Aktivität des Disulfidübergangs zu berücksichtigen.

Verschiedentlich wurde darauf hingewiesen,^{19,41,43} dass das Vorzeichen des längstwelligen Cotton-Effekts offenkettiger Disulfide von der Umgebung der Disulfidgruppe bestimmt werde. Der Versuch, die beobachtete Temperaturabhängigkeit nur durch Änderungen dieser Umgebung zu erklären, erscheint aber ungenügend. Solche Änderungen könnten nur aufgrund von Rotationen um C-S- und C-C-Bindungen auftreten; die Barrieren für solche Rotationen sind jedoch so niedrig,¹¹ dass Temperaturänderungen im Bereich von 0°C bis 100°C die Verteilung dieser Rotameren nur wenig beeinflussen. So zeigen z. B. die Cotton-Effekte aromatischer Aminosäuren, bei denen die optische Aktivität der

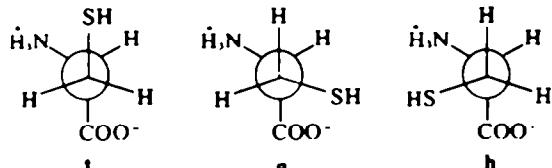


Abb. 2. Newman-Projektionsformeln der Rotameren g, h und t.

Aromatenabsorption nur durch die asymmetrische Umgebung bedingt ist, wesentlich geringere Temperaturkoeffizienten.²⁰ Eine starke Gleichgewichtsverschiebung der Rotameren g, h und t bei einer Temperaturänderung scheidet also aus, wie auch durch ¹H-NMR-Spektroskopie bewiesen werden konnte.¹⁹ Es wäre auch prinzipiell eine vermehrte Population einer energetisch höher liegenden Disulfidkonformation mit steigender Temperatur denkbar, die gegenüber der bei Zimmertemperatur stabilsten Form einen verengten bzw. aufgeweiteten Torsionswinkel besitzt, was sich jedoch in einer Verschiebung des Maximums des Disulfid-Cotton-Effekts äußern sollte.

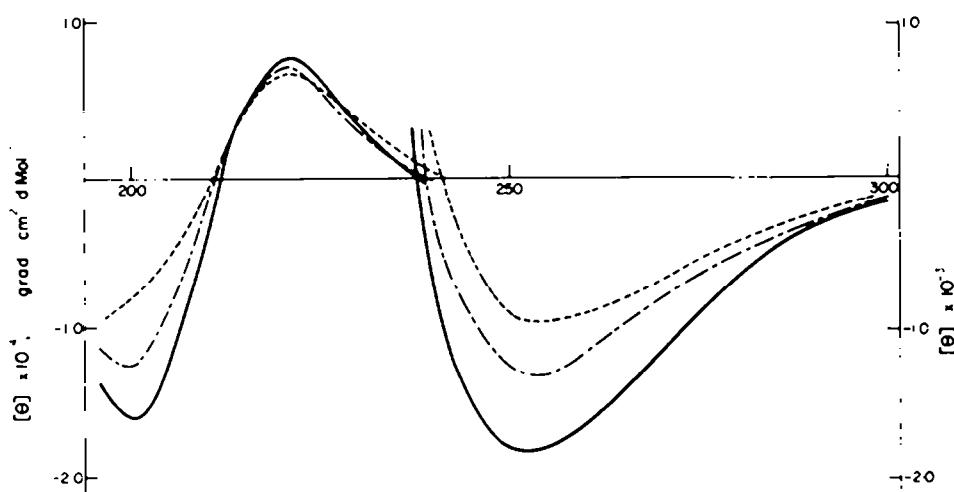


Abb. 1. CD-Spektrum von S-Äthylthio-L-cystein (2) in Abhängigkeit von der Temperatur in 0.1 N HCl. — T = 5°C. - - - T = 55°C, - - - T = 95°C.

Ausserdem sollte der bei 200 nm gelegene Cotton-Effekt, der zum Teil auf einem torsionswinkelunabhängigen Disulfidübergang beruht, nur eine geringe Temperaturabhängigkeit, vergleichbar mit der anderer Amide, auf-

weisen. Als wichtigster Faktor, der die starke Temperaturabhängigkeit des langwelligen Disulfid-Cotton-Effekts bestimmt, bleibt also die Verteilung der beiden möglichen M- bzw. P-helikalen Konformeren. Diese Konformerenumwandlung sollte sich auf den kurzweligen Cotton-Effekt mit Disulfidanteil in ähnlicher Weise auswirken wie auf den längstwelligen Cotton-Effekt.

In der Reihe der S-Alkylthio-L-cysteine beobachtet man eine Abnahme der Temperaturkoeffizienten des längstwelligen Disulfid-Cotton-Effekts $\delta(\Delta\epsilon)/\delta T$ in der Reihenfolge 3 (8.88), 2 (8.5), 5 (7.88), 4 (6.88), 1 (6.38). Der Carboxyl-Cotton-Effekt zeigt dagegen nur eine geringe Temperaturabhängigkeit (Abnahme um etwa 15% bezogen auf die Elliptizität bei 5°C) im Temperaturbereich von 5°C bis 95°C, die mit der anderer Aminosäuren vergleichbar ist. Ausgeprägter ist wieder die Abhängigkeit des kurzweligen Cotton-Effekts von der Temperatur. Die prozentuale Elliptizitätsabnahme, bezogen auf die molare Elliptizität bei 5°C, ist in allen Fällen geringer als beim längstwelligen Cotton-Effekt, jedoch wesentlich grösser als beim Carboxyl-Cotton-Effekt.

Da der Torsionswinkel der Disulfidgruppe von L-Cystin und den S-Alkylthio-L-cysteinen in Lösung nicht bekannt ist, ist eine Entscheidung über die bevorzugte Helizität dieser Moleküle nicht möglich. Tritt jedoch beim Übergang von kristallinem L-Cystin-dihydrochlorid¹¹ mit M-Helizität in eine 1 N HCl Lösung keine Veränderung des Torsionswinkels auf, so ergibt sich aus dem negativen Vorzeichen des längstwelligen Disulfid-Cotton-Effekts nach der Quadrantenregel¹² ein Überwiegen der Konformation mit ebenfalls M-Helizität in Lösung. Aus der Ähnlichkeit der S-Alkylthio-L-cysteine mit L-Cystin kann man schliessen, dass bei Zimmertemperatur die M-helikale Konformation dieser Disulfide in Lösung begünstigt ist und dass mit steigender Temperatur vermehrt Übergänge in die P-helikale Form stattfinden. Besonderheiten treten bei der Temperaturabhängigkeit von 9 und 10 auf. Bei 9 nimmt die Elliptizität des längstwelligen Cotton-Effekts stärker ab als bei allen S-Alkylthio-L-cysteinen. Im Gegensatz zu diesen verschiebt sich dieser Cotton-Effekt jedoch gleichzeitig stark nach längeren Wellenlängen mit steigender Temperatur von 246 nm bei 5°C auf 262.5 nm bei 95°C. Der Carboxyl-Cotton-Effekt wird mit steigender Temperatur grösser, seine Elliptizität vergrössert sich um 39% im Temperaturintervall von 5°C bis 95°C. In ähnlicher Weise beobachtet man eine Verstärkung des positiven Cotton-Effekts von 10 bei 217–218 nm. Seine Elliptizität vergrössert sich um 27% im Intervall von 25°C bis 70°C. Andererseits nehmen die beiden längerwelligen Cotton-Effekte in diesem Temperaturbereich um 33% (238 nm) bzw. 28% (282.5 nm) ab.

16 zeigt erwartungsgemäss nur eine schwache Temperaturabhängigkeit des negativen Cotton-Effekts bei 218 nm. Für 14 in saurer äthanolischer Lösung findet man eine den S-Alkylthio-L-cysteinen vergleichbare Temperaturabhängigkeit, ebenso für das Derivat 15. Ab 45°C tritt bei 14 jedoch allmählich ein zusätzlicher Cotton-Effekt bei ungefähr 240 nm auf, der auf einer

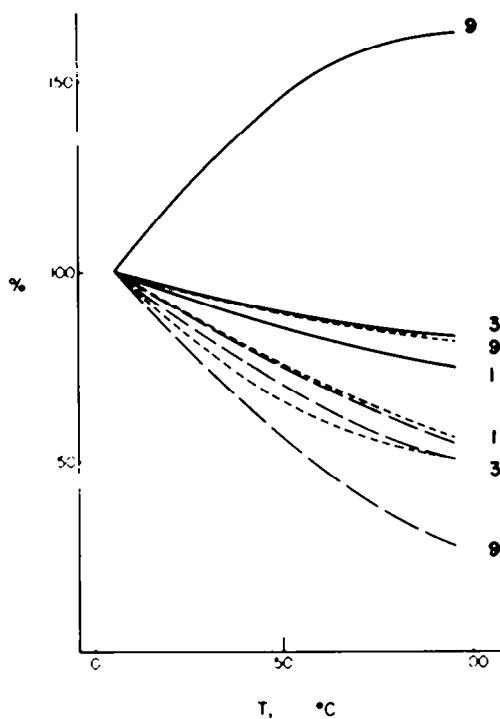


Abb. 3a. Prozentuale Temperaturabhängigkeit der Cotton-Effekte von S-Methylthio-L-cystein (1), S-Propylthio-L-cystein (3) und S-Benzylthio-L-cystein (9) in 0.1 N HCl (die Elliptizität der Cotton-Effekte bei 5°C wurde 100% gesetzt). — Cotton-Effekt bei ca. 250 nm, — Cotton-Effekt bei ca. 220 nm, Cotton-Effekt bei ca. 200 nm.

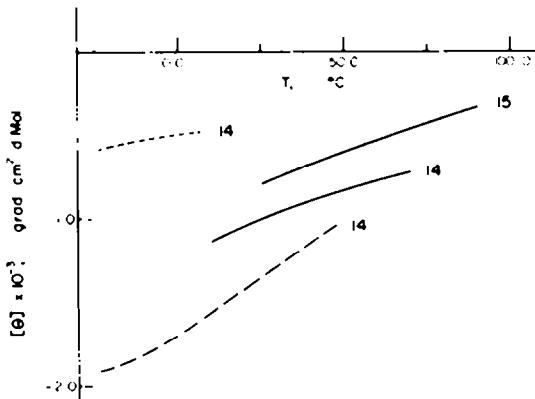


Abb. 3b. Temperaturabhängigkeit des längstwelligen Cotton-Effekts der Disulfidgruppe in L-Glutathion (14) und S-Methylthio-L-glutathion (15). — (14) in Phosphatpuffer-Lösung, pH = 7.0 — (14) in Äthanol/1 N HCl (9:1, v/v), (14) in Hexafluoracetone Trihydrat (15) wurde in 1 N HCl aufgenommen.

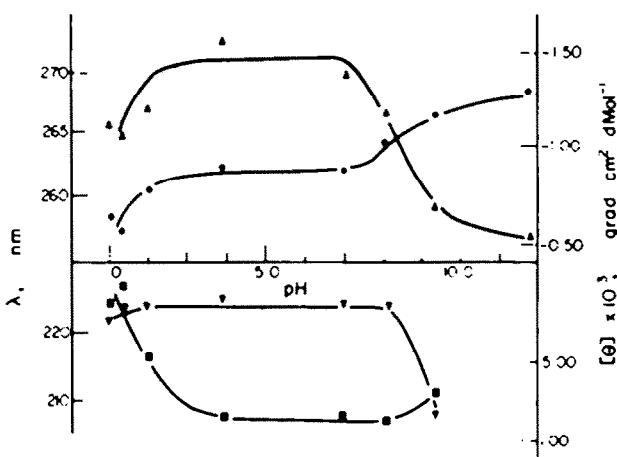


Abb. 4. pH-Abhängigkeit des langwelligen Disulfid-Cotton-Effekts und des Carboxyl-Cotton-Effekts von S-Methylthio-L-cystein (1). ●●● Lage des langwelligen Disulfid-Cotton-Effekts, ▲▲▲ Elliptizität des langwelligen Disulfid-Cotton-Effekts, ■■■ Lage des Carboxyl-Cotton-Effekts, ▼▼▼ Elliptizität des Carboxyl-Cotton-Effekts.

irreversiblen Umwandlung von 14 beruht. Dagegen beobachtet man in neutraler Pufferlösung, dass sich der Amid-Cotton-Effekt oberhalb von 50°C umkehrt.²⁷ Temperatur- und pH-abhängige ¹³C-NMR-Untersuchungen²⁸ zeigen, dass sich die Wechselwirkungen zwischen den Peptid-Carbonylkohlenstoffatomen und der Disulfidgruppe etwa ab 45°C ändern. Es ist jedoch noch unklar, ob man mit CD in diesem Falle denselben Effekt beobachtet wie mit der ¹³C-NMR-Spektroskopie.

Ausserst gering sind dagegen die Änderungen der CD-Spektren von 14 in Hexafluoraceton-Trihydrat. Es scheint, dass in diesem Lösungsmittel eine Konformation schon bei tiefer Temperatur stabilisiert wird, die in den anderen beiden Lösungsmitteln erst bei höherer Temperatur merklich stabilisiert ist. Bei dieser Stabilisierung spielen Wasserstoffbrückenbindungen zwischen 14 und Hexafluoraceton wahrscheinlich eine entscheidende Rolle.

pH-Abhängigkeit des Circulardichroismus der S-Alkylthio-L-cysteine

Erwartungsgemäss sind die CD-Spektren der S-Alkylthio-L-cysteine sehr stark vom pH-Wert der Lösung abhängig. Wie bei den übrigen Aminosäuren^{29,33,34} beobachtet man eine hypsochrome Verschiebung des positiven Carboxyl-Cotton-Effekts bei der Dissoziation des Protons von der Carboxylgruppe. Bei der Dissoziation des Protons von der Aminogruppe verschiebt sich dieser Cotton-Effekt wieder bathochrom.²⁷ Überraschenderweise zeigt auch der langwellige Disulfid-Cotton-Effekt eine starke Abhängigkeit vom Dissoziationsgrad trotz der Entfernung der Disulfidgruppe von COOH- bzw. NH₃⁺-Gruppe. Dies kann zum einen auf elektrostatische Effekte, zum anderen auf unterschiedliche Population der Rotameren h, g und t^{35,36} bei den einzelnen dissozierten Formen zurückgeführt werden. Im Alkalischen kommt

noch eine bathochrome Verschiebung des langwelligen Absorptionsmaximums der Disulfidgruppe selbst hinzu. Ein solcher Effekt wurde auch bei Zusatz von Alkali zu Dimethyldisulfid-Lösungen beobachtet.²⁴

EXPERIMENTELLER TEIL

Die zu den Untersuchungen eingesetzten S-Alkylthio-L-cysteine 1-13 sowie S-Methylthio-L-glutathion 15 wurden alle durch Umsetzung mit den Thiosulfinsäureestern der entsprechenden Dialkyldisulfide² dargestellt. Alle Produkte sind in zwei Lösungsmittelsystemen dünnenschichtchromatographisch einheitlich und durch Elementaranalysen, Drehwerte und Schmelzpunkte charakterisiert.²⁴⁻²⁷ Reduziertes und oxidiertes L-Glutathion 16 bzw. 14 wurden von der Firma Serva (Heidelberg) bezogen. Zur Aufnahme der UV-Spektren wurden Lösungen von ca. 1.5 mg/10 ml, zur Aufnahme der CD-Spektren Lösungen von ca. 6 mg/10 ml hergestellt. Die UV-Spektren wurden bei Raumtemperatur mit dem UV-Spektrometer Cary 15 (Firma Varian, Darmstadt) in Kävetten der Schichtdicken 0.5, 0.2 und 0.1 cm aufgenommen. Die CD-Spektren wurden mit dem Dichrograph II (Firma Roussel-Jouan, Paris) mit Kävetten der Schichtdicken 2.0, 0.5, 0.1 und 0.02 cm gemessen. Die CD-Messungen wurden mit einer Lösung von D-10-Camphersulfonsäure in Wasser überprüft, wobei ein [θ]-Wert von 7260 grad cm² dMol⁻¹ bei 291 nm als Standard angenommen wurde. Die ermittelten molaren Elliptizitäten erwiesen sich im Bereich 10³ molarer Lösungen als konzentrationsunabhängig.

Die Messung der Temperaturabhängigkeit im Bereich von 5-95°C erfolgte unter Thermostatisierung ($\pm 0.5^\circ\text{C}$) des Kävettenraumes mit einem Thermostat FK 2 (Firma Haake, Karlsruhe). Die pH-Werte wurden mit 2 N NaOH und 2 N HCl p.a. mit Hilfe des Precision Potentiometers E 353 B (Firma Metrohm, Herisau, Schweiz) mit einer Kalomel-Mikrostabelektrode pH 0-12 (Firma Ingold, Frankfurt) unter Verwendung von Eichpuffern vergleichbarer Ionenstärke eingestellt.

Danksagung—Wir danken der Deutschen Forschungsgemeinschaft und dem Fonds der Chemischen Industrie für finanzielle Unterstützung mit einer Sachbeihilfe.

LITERATUR

- ¹R. S. Cahn, C. Ingold und V. Prelog, *Angew. Chem.* **78**, 413 (1966); *Angew. Chem., Int. Ed. Engl.* **5**, 385 (1966)
- ²G. Bergson, *Ark. Kemi* **18**, 409 (1962)
- ³W. G. Penney und G. B. B. M. Sutherland, *J. Chem. Phys.* **2**, 492 (1934)
- ⁴M. Carmack und L. A. Neubert, *J. Am. Chem. Soc.* **89**, 7134 (1967); G. Jung und M. Ottnad, *Chemiker-Ztg.* **98**, 147 (1974)
- ⁵R. M. Dodson und V. C. Nelson, *J. Org. Chem.* **33**, 3966 (1968)
- ⁶G. Claeson, *Acta Chem. Scand.* **22**, 2429 (1968)
- ⁷A. F. Beecham, J. Fridrichsons und A. McL. Mathieson, *Tetrahedron Letters* **3131** (1966)
- ⁸R. Nagarajan, N. Neuss und M. M. Marsh, *J. Am. Chem. Soc.* **90**, 6518 (1968)
- ⁹D. Hauser, H. P. Weber und H. P. Sigg, *Helv. Chim. Acta* **53**, 1061 (1970)
- ¹⁰U. Ludescher und R. Schwyzer, *Ibid.* **54**, 1637 (1971)
- ¹¹B. Donzel, B. Kamber, K. Wüthrich und R. Schwyzer, *Ibid.* **55**, 947 (1972)
- ¹²R. Nagarajan und R. W. Woody, *J. Am. Chem. Soc.* **95**, 7212 (1973)
- ¹³A. F. Beecham, J. W. Loder und G. B. Russell, *Tetrahedron Letters* **1785** (1968)
- ¹⁴A. F. Beecham und A. McL. Mathieson, *Ibid.* **3139** (1966)
- ¹⁵S. Beychok und E. Breslow, *J. Biol. Chem.* **243**, 151 (1968)
- ¹⁶S. Kukolja, P. V. Demarco, N. D. Jones, M. O. Chaney und J. W. Paschal, *J. Am. Chem. Soc.* **94**, 7592 (1972)
- ¹⁷D. W. Urry, F. Quadrifoglio, R. Walter und I. L. Schwartz, *Proc. Natl. Acad. Sci. US.* **60**, 967 (1968)
- ¹⁸D. L. Coleman und F. R. Blout, *J. Am. Chem. Soc.* **90**, 2405 (1968)
- ¹⁹J. P. Casey und R. B. Martin, *Ibid.* **94**, 6141 (1972)
- ²⁰T. Takagi und N. Ito, *Biochim. Biophys. Acta* **257**, 1 (1972)
- ²¹N. Ito und T. Takagi, *Ibid.* **221**, 430 (1970)
- ²²T. Takagi, R. Okano und T. Miyazawa, *Ibid.* **310**, 11 (1973)
- ²³P. C. Kahn und S. Beychok, *J. Am. Chem. Soc.* **90**, 4168 (1968)
- ²⁴A. Imawishi und T. Isomura, *J. Biochem. (Tokyo)* **65**, 309 (1969)
- ²⁵L. Fowden, P. M. Scopes und R. N. Thomas, *J. Chem. Soc. (C)* **833** (1971)
- ²⁶M. Legrand und R. Viennet, *Bull. Soc. Chim. France* **679** (1965)
- ²⁷M. Ottnad, C. Ottnad, P. Hartter und G. Jung in "Glutathione", L. Flohé, Ed., G. Thieme, Stuttgart 1974
- ²⁸R. R. Fraser, G. Boussard, J. K. Saunders, J. B. Lambert und C. E. Mixan, *J. Am. Chem. Soc.* **93**, 3822 (1971)
- ²⁹D. W. Scott, H. L. Finke, M. E. Gross, G. B. Guthrie und H. M. Huffman, *Ibid.* **72**, 2424 (1950)
- ³⁰D. W. Scott, H. L. Finke, J. P. McCullough, M. E. Gross, R. E. Pennington und G. Waddington, *Ibid.* **74**, 2478 (1952)
- ³¹G. A. Crowder und D. W. Scott, *J. Mol. Spectr.* **16**, 122 (1965)
- ³²C. C. Blake, G. A. Mair, A. C. T. North, D. C. Philips und V. R. Salma, *Proc. Roy. Soc., Ser. B* **167**, 365 (1967)
- ³³B. M. Oughton und P. M. Harrison, *Acta Cryst.* **10**, 479 (1957)
- ³⁴L. K. Steinrauf, J. Peterson und L. H. Jensen, *J. Am. Chem. Soc.* **80**, 3835 (1958)
- ³⁵J. Peterson, L. K. Steinrauf und L. H. Jensen, *Acta Cryst.* **13**, 104 (1960)
- ³⁶H. L. Yakel, Jr. und E. W. Hughes, *Ibid.* **7**, 291 (1954)
- ³⁷G. Toennies und T. F. Lavine, *J. Biol. Chem.* **89**, 153 (1930)
- ³⁸S. D. Thompson, D. G. Carroll, F. Watson, M. O'Donnell und S. P. McGlynn, *J. Chem. Phys.* **45**, 1367 (1966)
- ³⁹J. S. Rosenfield und A. Moskowitz, *J. Am. Chem. Soc.* **94**, 4797 (1972)
- ⁴⁰D. B. Boyd, *Ibid.* **94**, 8799 (1972)
- ⁴¹J. Lindberg und J. Michl, *Ibid.* **92**, 2619 (1970)
- ⁴²R. W. Woody, *Tetrahedron* **29**, 1273 (1973)
- ⁴³J. Webb, R. W. Strickland und F. S. Richardson, *J. Am. Chem. Soc.* **95**, 4775 (1973)
- ⁴⁴G. Bergson, G. Claeson und L. Schotte, *Acta Chem. Scand.* **16**, 1159 (1962)
- ⁴⁵H. Yamabe, H. Kato und T. Yonezawa, *Bull. Chem. Soc. Japan* **44**, 604 (1971)
- ⁴⁶A. Moskowitz, *Tetrahedron* **13**, 48 (1961)
- ⁴⁷H. Bock und G. Wagner, *Angew. Chem.* **84**, 119 (1972); *Angew. Chem., Int. Ed. Engl.* **11**, 150 (1972)
- ⁴⁸G. Wagner und H. Bock, *Chem. Ber.* **107**, 68 (1974)
- ⁴⁹L. F. Fieser, *Rec. Trav. Chim. Pays-Bas* **69**, 410 (1950)
- ⁵⁰E. Campagne, J. Tsunugi und W. W. Meyer, *J. Org. Chem.* **26**, 2486 (1961)
- ⁵¹F. A. Fehnel und M. Carmack, *J. Am. Chem. Soc.* **71**, 84 (1949)
- ⁵²M. Tichy, E. Duskova und K. Blaha, *Tetrahedron Letters* **237** (1974)
- ⁵³G. Jung, M. Ottnad und M. Rimpler, *Eur. J. Biochem.* **35**, 436 (1973)
- ⁵⁴K. Blaha, I. Fric und P. Hermann, *Coll. Czech. Chem. Comm.* **30**, 304 (1965)
- ⁵⁵G. Jung, E. Breitmaier, W. A. Günzler, M. Ottnad, W. Voelter und L. Flohé in "Glutathione", L. Flohé, Ed., G. Thieme, Stuttgart 1974
- ⁵⁶L. I. Katzin und E. Gulyas, *J. Am. Chem. Soc.* **90**, 247 (1968)
- ⁵⁷G. Jung, M. Ottnad, W. Voelter und E. Breitmaier, *Z. Anal. Chem.* **261**, 328 (1972)
- ⁵⁸R. B. Martin und R. Mathur, *J. Am. Chem. Soc.* **87**, 1065 (1965)
- ⁵⁹I. D. Small, J. H. Bailey und C. J. Cavallito, *Ibid.* **71**, 3565 (1949)
- ⁶⁰U. Weber, P. Hartter und L. Flohé, *Z. Physiol. Chem.* **351**, 1384 (1970)
- ⁶¹U. Weber, P. Hartter und L. Flohé, *Ibid.* **351**, 1389 (1970)
- ⁶²P. Hartter und U. Weber, *Ibid.* **354**, 365 (1973)