

Reaktionen mit Imidsäureestern, XIII<sup>1)</sup>

## Darstellung Fluoreszenz-aktiver Nitrile und Imidsäureester

Anwendungsmöglichkeit als Indikatoren in der Peptidchemie

von Walter Ried<sup>\*)</sup>, Detlef Piechaczek<sup>2)</sup> und Erhard Vollberg<sup>3)</sup>

Aus dem Institut für Organische Chemie der Universität, D-6 Frankfurt

Eingegangen am 18. November 1969

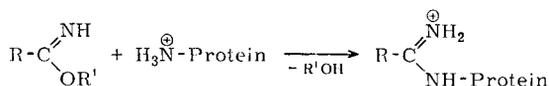
Die Darstellung fluoreszierender Nitrile (1) und Imidsäureester (2) wird beschrieben. Die Imidsäureester werden zur Fluoreszenzmarkierung von Proteinen vorgeschlagen.

*Reactions with Imidoesters, XIII<sup>1)</sup>. Preparation of Fluorescent Nitriles and Imidoesters. Possible Application as Indicators in Peptide Chemistry*

The synthesis of fluorescent nitriles (1) and imidoesters (2) is described. The imidoesters are proposed for labeling proteins.

Bei biochemischen oder medizinischen Experimenten ist es oft notwendig, Proteine zu markieren, ohne deren biochemische Funktionsfähigkeit wesentlich zu beeinträchtigen. Hierzu sollten Verbindungen geeignet sein, die mit den Aminogruppen der Proteine reagieren, ohne deren positive Ladung zu neutralisieren.

Zur Modifikation von Proteinen wurde deshalb mehrfach die Imidsäureester-Gruppe vorgeschlagen<sup>4–11)</sup>. Imidsäureester reagieren z. B. mit den  $\epsilon$ -Amino-Gruppen von Lysin-Resten ( $pK \approx 10.5$ ) unter Bildung einer Imidopeptid-Brücke ( $pK \approx 12$ ):



<sup>\*)</sup> Herrn Prof. Dr. R. Tschesche zum 65. Geburtstag gewidmet.

<sup>1)</sup> XII. Mitteilung: W. Ried und P. Schomann, Liebigs Ann. Chem. 714, 122 (1968).

<sup>2)</sup> D. Piechaczek, Dissertation Univ. Frankfurt/M. 1969.

<sup>3)</sup> E. Vollberg, Staatsexamensarbeit Univ. Frankfurt/M. 1966.

<sup>4)</sup> M. J. Hunter und M. L. Ludwig, J. Amer. chem. Soc. 84, 3491 (1962).

<sup>5)</sup> L. Wofsy, H. Metzger und S. J. Singer, Biochemistry 1, 1031 (1962).

<sup>6)</sup> L. Wofsy und S. J. Singer, Biochemistry 2, 104 (1963).

<sup>7)</sup> W. B. Lawson und H. J. Schramm, Biochemistry 4, 377 (1965); H. J. Schramm, Biochem. Z. 342, 139 (1965).

<sup>8)</sup> A. Dutton, M. Adams und S. J. Singer, Biochem. biophys. Res. Commun. 23, 730 (1966).

<sup>9)</sup> F. C. Hartmann und F. Wold, J. Amer. chem. Soc. 88, 3890 (1966).

<sup>10)</sup> W. Stephan, Z. Immunitätsforschung, Allergie und klinische Immunologie 133, 153 (1967).

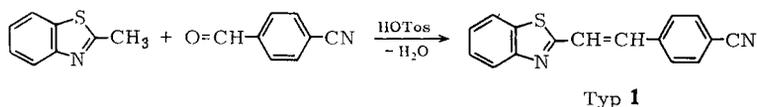
<sup>11)</sup> H. J. Schramm, Hoppe-Seyler's Z. physiol. Chem. 348, 289 (1967).

Die Ladungsverteilung der Proteine wird daher durch diese Art der Markierung im biochemisch interessanten pH-Bereich nicht verändert. Hinzu kommt, daß die Imidsäureester mit Eiweißmolekülen unter relativ milden Bedingungen reagieren. Derart modifizierte Proteine zeigen — selbst bei einem hohen Grad der Imidoacylierung — keine merkliche Änderung im elektrophoretischen Verhalten und kaum veränderte Aktivität der Antikörperfunktion<sup>6, 8, 10</sup>.

Während bisher zur Markierung farbige (gelbe) Imidsäureester vorgeschlagen wurden<sup>11</sup>), haben Fluoreszenz-aktive Ester den Vorteil, daß ein Protein für eine hinreichend erkennbare Markierung in geringerem Maße als mit farbigen Verbindungen imidoacyliert werden muß. Ausgangssubstanzen für die Darstellung der Imidsäureester sind die entsprechenden Nitrile.

### Fluoreszenzaktive Nitrile 1

Die Kondensation von 4-Cyan-benzaldehyd mit 2-Methyl-substituierten Heterocyclen gelang in Toluol mit *p*-Toluolsulfonsäure als Katalysator.



Die so dargestellten heterocyclisch-aromatischen, disubstituierten Äthylenverbindungen vom Typ 1 weisen eine relativ *starke Fluoreszenz* bei Bestrahlung mit UV-Licht auf. Die Ausbeuten der reinen Produkte liegen, je nach Reaktivität des heterocyclischen Reaktionspartners, zwischen 14 und 91 % d. Th. (Tab. 1).

### Fluoreszenzaktive Imidsäureester 2

Die Darstellung der Imidsäureester 2 aus den Nitrilen 1 gelingt auf zwei Wegen: 1) Das durch alkalische Verseifung von 1 bei 50° in Äthanol/Dimethylformamid unter Zusatz von 6*n* NaOH und Perhydrol analog Lit.<sup>12</sup>) dargestellte Säureamid wird mit Triäthylxonium-tetrafluorborat in siedendem absol. Chloroform am Carbonyl-Sauerstoff alkyliert. Aus dem Salz wird der Imidsäureester in absol. Tetrahydrofuran durch Triäthylamin freigesetzt (Tab. 2, Nr. 1, S. 17).

Nach dieser Methode<sup>13</sup>) gelang es<sup>14</sup>), aus geschützten  $\alpha$ -Aminosäureamiden die entsprechenden Imidsäureester-Salze darzustellen. Das Triäthylxoniumtetrafluorborat ist durch Einwirkung von Bortrifluorid-ätherat auf Epichlorhydrin in ätherischer Lösung leicht herstellbar<sup>15, 16</sup>).

<sup>12</sup>) C. R. Noller, Org. Syntheses, Coll. Vol. II, 586 (1959).

<sup>13</sup>) H. Meerwein und Mitarbeiter, J. prakt. Chem. [2] 154, 83 (1940); Chem. Ber. 89, 2060 (1956).

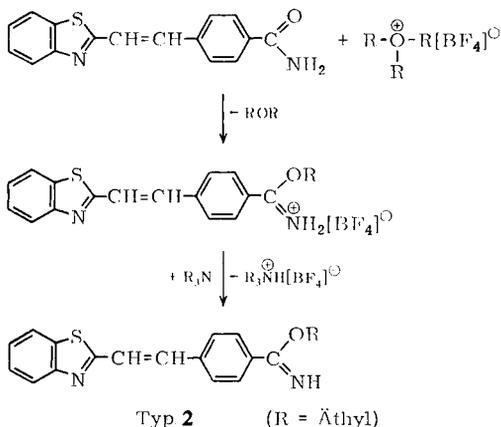
<sup>14</sup>) W. Ried und E. Schmidt, Liebigs Ann. Chem. 695, 217 (1966).

<sup>15</sup>) H. Meerwein, in Houben-Weyl-Müller, Methoden der organischen Chemie, 4. Aufl., Bd. 6/3, S. 336, Thieme-Verlag, Stuttgart 1962.

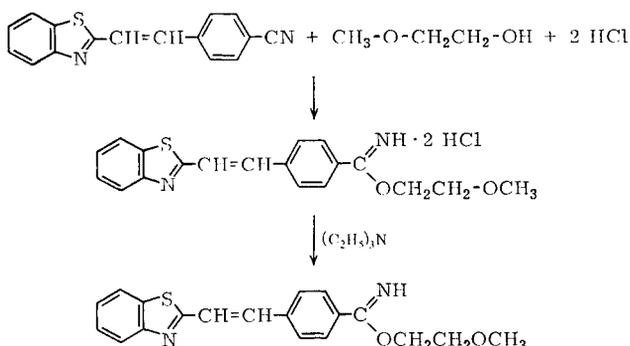
<sup>16</sup>) H. Meerwein und Mitarbeiter, J. prakt. Chem. [2] 147, 257 (1937).

Tabelle 1. Aus 4-Cyan-benzaldehyd und  $\alpha$ -methylsubstituierten Heterocyclen erhaltene Äthylenverbindungen **1** (R = CH=CH-C<sub>6</sub>H<sub>4</sub>-CN-*p*)

Nitril <b>1</b>	Schmp. (% Aus- beute)	Aussehen (umkrist. aus)	Bruttoformel (Mol.-Gew.)	Oben Ber., darunter Gef.		
				C	H	N
	198° (65)	gelbe Nadeln (Aceton)	C <sub>16</sub> H <sub>10</sub> N <sub>2</sub> S (262.3)	73.26 73.26	3.84 3.82	10.68 10.52
	223° (91)	gelbe Nadeln (Äthanol)	C <sub>18</sub> H <sub>14</sub> N <sub>2</sub> S (290.4)	— —	— —	9.65 9.38
	204° (38)	gelbliche Mikro- kristalle (Äthanol)	C <sub>16</sub> H <sub>10</sub> N <sub>2</sub> O (246.3)	78.04 78.01	4.09 4.04	11.37 11.17
	196° (14)	bläßgelbe Nadeln (Äthanol)	C <sub>17</sub> H <sub>12</sub> N <sub>2</sub> O (262.3)	— —	— —	10.68 10.40
	225° (15)	orange Nadeln (Äthanol)	C <sub>16</sub> H <sub>9</sub> N <sub>2</sub> OCl (280.7)	68.30 68.10	3.23 3.26	9.98 9.90
	209° (15)	farblose Blätt- chen (Aceton)	C <sub>16</sub> H <sub>13</sub> N <sub>3</sub> O (263.3)	72.99 72.95	4.98 5.00	15.96 16.02
	150° (50)	farblose verfilzte Blättchen (Äthanol)	C <sub>18</sub> H <sub>12</sub> N <sub>2</sub> (256.3)	84.36 84.38	4.72 4.51	10.92 10.75
	215° (20)	farblose Nadeln (Benzol)	C <sub>19</sub> H <sub>14</sub> N <sub>2</sub> (270.3)	84.42 83.90	5.22 5.22	10.36 9.82
	128° (19)	gelbes Kristall- pulver (Äthanol)	C <sub>19</sub> H <sub>14</sub> N <sub>2</sub> (270.3)	84.42 84.94	5.22 5.15	10.36 9.96
	157° (35)	hellgelbe Nadelchen (Äthanol)	C <sub>20</sub> H <sub>16</sub> N <sub>2</sub> (284.4)	84.48 84.57	5.67 5.92	9.83 9.46
	135° (31)	hellgelbe Nadeln (Äthanol)	C <sub>21</sub> H <sub>18</sub> N <sub>2</sub> (298.4)	84.53 84.40	6.08 5.75	9.39 9.14
	158° (28)	bläßgraue Kristalle (Benzol)	C <sub>18</sub> H <sub>13</sub> N <sub>3</sub> (271.3)	79.68 79.30	4.83 4.76	15.49 14.98
	262° (26)	gelbe Nadeln (Dioxan)	C <sub>26</sub> H <sub>16</sub> N <sub>4</sub> (384.4)	81.23 80.81	4.20 4.30	14.57 14.22



2) Bei der zweiten Methode werden die Nitrile **1** durch Protonen-katalysierte Alkohol-Addition direkt in die Imidsäureester **2** übergeführt. Diese erstmals von *Pinner*<sup>17)</sup> beschriebene Synthese gelang mit den vorliegenden Verbindungen nur durch Einleiten von trockenem Chlorwasserstoff in eine Lösung des Nitrils in 2-Methoxy-äthanol, das gleichzeitig als Lösungsmittel und Reagenz wirkt. Auch hierbei wird der Imidsäureester am vorteilhaftesten durch Triäthylamin in absol. Tetrahydrofuran freigesetzt (Tab. 2, Nr. 2–7).



Varianten<sup>18)</sup> der Pinner'schen Methode führten nicht zum Ziel.

Freie *Anthranilsäure* reagiert mit freien *Imidsäureestern* zu Derivaten des *4-Hydroxy-chinazolins*<sup>19)</sup>. Bei der Umsetzung von *Anthranilsäure* mit einigen der neu dargestellten

<sup>17)</sup> A. Pinner, *Die Iminoäther und ihre Derivate*, Verlag R. Oppenheim, Berlin 1892.

<sup>18)</sup> Siehe z. B. R. Roger und D. G. Neilson, *Chem. Reviews* **61**, 179 (1961).

<sup>19)</sup> W. Ried und W. Stephan, *Chem. Ber.* **95**, 3042 (1962).

Imidsäureestern in siedendem absolutem Äthanol wurden Reaktionsprodukte (3) isoliert, die nach dem IR-Spektrum Chinazolon-(4)-Struktur aufweisen<sup>2)</sup>. Diese Verbindungen (Tab. 4, S. 18) haben die gleichen stark fluoreszierenden Eigenschaften wie die Imidsäureester.

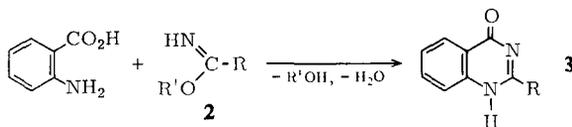


Tabelle 2. Fluoreszenz-aktive Imidsäureester (R bei Nr. 1 = OC<sub>2</sub>H<sub>5</sub>, sonst = OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>OCH<sub>3</sub>)

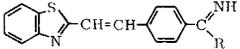
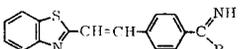
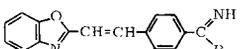
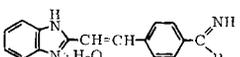
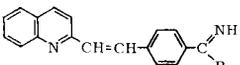
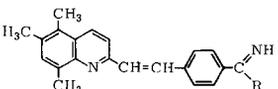
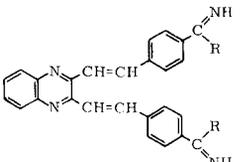
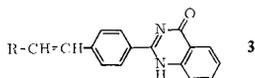
Nr.	Ester	Schmp. (%Aus- beute)	umkrist. aus	Bruttoformel (Mol.-Gew.)	Oben Ber., darunter Gef.		
					C	H	N
1		137° (57)	Cyclohexan	C <sub>18</sub> H <sub>16</sub> N <sub>2</sub> OS (308.4)	70.10 69.86	5.23 5.20	9.08 9.01
2		132° (62)	Cyclohexan	C <sub>19</sub> H <sub>18</sub> N <sub>2</sub> O <sub>2</sub> S (338.4)	67.43 67.19	5.36 5.43	8.28 8.36
3		121° (65)	Tetrahydrofuran/ Cyclohexan	C <sub>19</sub> H <sub>18</sub> N <sub>2</sub> O <sub>3</sub> (322.4)	70.80 70.36	5.63 5.71	8.69 8.70
4		190° (12)	Tetrahydrofuran	C <sub>19</sub> H <sub>21</sub> N <sub>3</sub> O <sub>3</sub> (339.4)	67.24 67.10	6.24 6.09	12.38 12.35
5		72° (12)	Cyclohexan	C <sub>21</sub> H <sub>20</sub> N <sub>2</sub> O <sub>2</sub> (332.4)	75.88 75.91	6.06 6.10	8.43 8.47
6		90° (18)	Tetrahydrofuran/ Cyclohexan	C <sub>24</sub> H <sub>26</sub> N <sub>2</sub> O <sub>2</sub> (374.5)	76.97 76.71	7.00 7.03	7.48 7.47
7		120° (32)	Tetrahydrofuran/ Cyclohexan	C <sub>32</sub> H <sub>32</sub> N <sub>4</sub> O <sub>2</sub> (536.6)	71.62 71.64	6.01 5.99	10.44 10.51

Tabelle 3. Charakteristische IR-Banden [cm<sup>-1</sup>] der Imidsäureester 2  
(Nr. aus Tab. 2)

Nr.	N—H-Valenz	C=N-Valenz	C—O-Valenz
1	3300	1642	1327
2	3300	1642	1325
3	3300	1635	1326
4	3310?	1635	1328
5	3285	1626	1320
6	3322	1620	1320
7	3293	1637	1326

Tabelle 4. Dargestellte 2-[4-(2-Substit.-vinyl)-phenyl]-chinazolone-(4) 3



R	Zers.-P. (%Ausbeute)	Bruttoformel (Mol.-Gew.)	Analysen		
			C	H	N
	250° (32)	C <sub>23</sub> H <sub>15</sub> N <sub>3</sub> OS (381.5)	Ber. 72.42 Gef. 72.26	3.96 3.92	11.02 10.81
	260° (35)	C <sub>23</sub> H <sub>15</sub> N <sub>3</sub> O <sub>2</sub> (365.4)	Ber. 75.60 Gef. 75.58	4.23 4.23	11.50 10.90
	255° (59)	C <sub>25</sub> H <sub>17</sub> N <sub>3</sub> O (375.4)	Ber. 79.98 Gef. 80.03	4.56 4.65	11.19 10.80

### Anwendungsmöglichkeiten in der Proteinchemie

Die Reaktion von Imidsäureestern mit Aminosäuren und Peptiden ist schon in mehreren Arbeiten beschrieben worden<sup>4-10, 14, 20, 21</sup>). Um Hinweise auf den Einsatz der Fluoreszenz-aktiven Imidsäureester in der Peptidchemie zu erhalten, wurde der 4-[2-Benzthiazolyl-(2)-vinyl]-benzimidäure-[2-methoxy-äthyl]-ester mit vier *Modellsubstanzen* umgesetzt: DL-Alanin, N<sup>α</sup>-Acetyl-lysin, Ribonuclease und denaturiertem Rinderserumalbumin, das durch Behandlung mit Essigsäure aufgefaltet worden war.

Das Dihydrochlorid ist im Gegensatz zum freien Imidsäureester gut wasserlöslich. Da zur Reaktion mit dem Imidsäureester freie Aminogruppen als Nucleophile benötigt werden, muß bei pH ≥ 9 gearbeitet werden. Um eine höhere Imidsäureester-Konzentration zu erhalten, haben bereits *Hunter* und *Ludwig*<sup>4)</sup> in Wasser unter Zusatz von 30–50% des Gemischvolumens an Äthanol bzw. Dimethylformamid

<sup>20)</sup> W. Ried, W. Stephan und W. von der Emden, Chem. Ber. **95**, 728 (1962).

<sup>21)</sup> W. Ried und D. Piechaczek, Liebigs Ann. Chem. **696**, 97 (1966).

gearbeitet. Wir haben Alanin,  $N^{\alpha}$ -Acetyl-lysin bzw. denaturiertes Rinderserumalbumin in Wasser, den Imidsäureester in Chloroform gelöst und beide Phasen durch Zusatz von Methanol homogenisiert. Der pH-Wert dieser Lösungen wurde zwischen 9.1 und 10.4 eingestellt. Die Fluoreszenzmarkierung der Ribonuclease erfolgte in wäßrigem, Natriumborat-gepuffertem Medium bei pH 9.8, wobei durch den zum größten Teil ausgefallenen Imidsäureester ein heterogenes Reaktionsgemisch vorlag.

Die Umsetzung der beiden Aminosäuren wurde bei 37°, die Markierung von Ribonuclease und denaturiertem Rinderserumalbumin bei 25° durchgeführt. In allen Fällen wurden Fluoreszenz-aktive Produkte erhalten. Nach Isolierung des markierten Alanins und  $N^{\alpha}$ -Acetyl-lysin durch Dünnschichtchromatographie und der markierten Ribonuclease durch Gelchromatographie wurden diese Substanzen neben dem freien Imidsäureester auf gemeinsame spektroskopische Daten hin untersucht. Die Aufnahme der Spektren erfolgte an  $10^{-5}m$  (bei Ribonuclease  $10^{-4}m$ ) Lösungen der Substanzen in Chloroform/Methanol/Wasser (1:4:1). Ein *charakteristisches Absorptionsmaximum* ergab sich für alle Substanzen bei 345  $m\mu$ .

Die Maxima der Anregungs- und Emissionswellenlängen variierten jeweils nur innerhalb eines kleinen Bereichs, wie Tab. 5 zeigt.

Tabelle 5. Anregungs- und Emissionsmaxima Fluoreszenz-markierter Modellsbstanzten

Substanz	Anregung $\lambda_{\max}$ [ $m\mu$ ]	Emission $\lambda_{\max}$ [ $m\mu$ ]
Imidsäureester	355	426
markiertes Alanin	355	440
$N^{\epsilon}$ -markiertes $N^{\alpha}$ -Acetyl-lysin	375	440
markierte Ribonuclease	365	445

Diese Resultate weisen darauf hin, daß die optischen Eigenschaften des Fluoreszenz-aktiven Imidoacyl-Restes wenig vom Bindungspartner beeinflußt werden. Man kann demnach von einem markierten Protein, gleichgültig welcher Struktur, praktisch das gleiche Absorptionsmaximum erwarten, welches der Imidsäureester **2** aufweist.

Wir danken dem *Fonds der Chemischen Industrie* und der *Deutschen Forschungsgemeinschaft* für die Unterstützung dieser Arbeit, den *Farbwerken Hoechst* für Chemikalienspenden. Unser spezieller Dank gilt dem *Biotest-Serum-Institut Frankfurt a. M.*, insbesondere Herrn Dr. *H. Schleussner*, für die großzügige Förderung der Untersuchung.

## Beschreibung der Versuche

Die *Schmelzpunkte* sind unkorrigiert. — Die *IR-Spektren* wurden in KBr aufgenommen.

*Darstellung der Nitrile 1* (Tab. 1). — *Allgemeine Vorschrift*: 0.04 Mol 2-Methyl-substit. Heterocyclus und 0.04 Mol 4-Cyan-benzaldehyd sowie eine Spatelspitze *p-Toluolsulfonsäure* werden in 120 ccm Toluol gelöst und unter Rückfluß am Wasserabscheider zum Sieden erhitzt. Nach Abscheiden der äquiv. Menge *Wasser* (Reaktionsdauer ca. 16 Stdn.) wird das Toluol i. Vak. abgezogen. Das Reaktionsprodukt wird mehrmals aus dem in Tab. 1 angegebenen Lösungsmittel umkristallisiert.

Bei der *Kondensation* mit 2-Methyl-benzimidazol bleibt die Abscheidung von Wasser aus. Das entstehende 2-[4-Cyan-styryl]-benzimidazol enthält nach der Analyse 1 Mol H<sub>2</sub>O, das auch beim Erhitzen bis zum Schmelzpunkt (209°) nicht abgespalten wird und bei der Umsetzung des Nitrils zum Imidsäureester im Molekül verbleibt.

Bei größeren Ansätzen empfiehlt es sich, gerade so viel Toluol einzusetzen, daß beide Reaktionspartner in Lösung gehalten werden. Die Reaktionszeit kann sich erheblich ausdehnen: Bei einem 0.7-Mol-Ansatz zur Darstellung von 2-[4-Cyan-styryl]-benzthiazol waren 86 Stdn. erforderlich. — Bei Einsatz der minimal erforderlichen Menge an Toluol scheidet sich oft nach der Kondensation bei langsamer Abkühlung auf Raumtemperatur die Hauptmenge des Reaktionsproduktes ab.

*Darstellung der Imidsäure-[2-methoxy-äthylester] 2* (Tab. 2). — *Allgemeine Vorschrift*: 0.01 Mol *Nitril 1* werden bei Raumtemperatur in der geringstmöglichen Menge absol. 2-Methoxy-äthanol (meist 30—40 ccm) gelöst und unter Feuchtigkeitsausschluß mit über konz. Schwefelsäure getrocknetem *HCl*-Gas innerhalb von ca. 9 Stdn. gesättigt (Temperatur  $\leq 40^\circ$ ). Nach 1 Woche wird der Niederschlag abgesaugt und mit absol. Tetrahydrofuran (THF) und absol. Äther gewaschen. — Das *Imidsäureester-hydrochlorid* wird in ca. 100 ccm absol. THF suspendiert und unter Rühren mit absol. Triäthylamin bis zur „alkalischen Reaktion“ versetzt: Ein Tropfen des Gemisches, auf feuchtes Indikatorpapier gebracht, soll pH 9 anzeigen. Nach 20 Stdn. bei 4° wird abgesaugt und eingedampft (Rotationsverdampfer). Der Rückstand wird aus Cyclohexan, THF bzw. einem Gemisch beider Lösungsmittel umkristallisiert und i. Vak. über P<sub>2</sub>O<sub>5</sub>/KOH/Paraffin getrocknet. Alle Arbeiten werden unter Feuchtigkeitsausschluß ausgeführt.

*Darstellung der Chinazalone-(4) 3* (Tab. 4). — *Allgemeine Vorschrift*: 0.01 Mol *Imidsäureester 2* werden mit 0.01 Mol *Anthranilsäure* in 50—250 ccm absol. Äthanol 3 Stdn. unter Rückfluß gekocht (Feuchtigkeitsausschluß). Nach 15 Stdn. bei Raumtemperatur wird abgesaugt, mit absol. Äthanol gewaschen und aus Amylalkohol umkristallisiert. Gelbe, verfilzte Nadelchen.

*1-[4-Carbamoyl-phenyl]-2-benzthiazolyl-(2)-äthylen*. — 6.5 g (24.8 mMol) 2-[4-Cyan-styryl]-benzthiazol werden in 375 ccm Äthanol + 190 ccm Dimethylformamid bei 50° gelöst. Nach Zugabe von 10 ccm 6*n* NaOH bis zur alkalischen Reaktion werden allmählich 10 ccm *Perhydrol* zutropft. Nach 3 Stdn. bei 50° und 17 Stdn. bei Raumtemperatur wird eingedampft (Rotationsverdampfer). Der Rückstand wird in Wasser aufgeschlämmt, 2 Stdn. gerührt, nach 15 Stdn. abgesaugt, mit Wasser gewaschen und aus 100—110 ccm siedendem Dioxan um-

krystallisiert; Trocknung über  $P_2O_5/KOH/Paraffin$  i. Vak. Ausbeute 5 g (72%); Schmp. 288–290°.

$C_{16}H_{12}N_2OS$  (280.4) Ber. C 68.55 H 4.31 N 9.99 Gef. C 68.48 H 4.31 N 9.97

4-[2-Benzthiazolyl-(2)-vinyl]-benzimid säure-äthylester. — 0.56 g (2 mMol) 1-[4-Carbamoyl-phenyl]-2-benzthiazolyl-(2)-äthylester werden in 350 ccm siedendem, absol. Chloroform (Rückflußkühler mit  $CaCl_2$ -Rohr) gelöst. Nach Zugabe von 1.52 g (8 mMol) Triäthylxonium-tetrafluorborat wird 3.5 Std. gekocht, dann bei Raumtemperatur stehengelassen, mit ca. 1.3 ccm absol. Triäthylamin (pH 9 auf angefeuchtetem Indikatorpapier) versetzt und eingedampft (Rotationsverdampfer). Der Rückstand wird mit 100 ccm absol. Benzol aufgekocht, unter Rühren auf Raumtemperatur gebracht und nach 1 Stde. abgesaugt. Nach Abziehen des Benzols wird der Rückstand aus 40 ccm siedendem absol. Cyclohexan umkrystallisiert und i. Vak. über  $P_2O_5/KOH/Paraffin$  getrocknet. Ausbeute 0.35 g (57%).

### Markierungen

1-(4-[2-Benzthiazolyl-(2)-vinyl]-benzimidoylamino)-äthansäure. — 1 mMol (340 mg) 4-[2-Benzthiazolyl-(2)-vinyl]-benzimid säure-[2-methoxy-äthylester] werden in 5 ccm Chloroform gelöst. Man versetzt mit 90 mg DL-Alanin in 5 ccm Wasser und homogenisiert beide Phasen durch Zugabe von 20 ccm Methanol. Nach Einstellen des pH-Werts 9.6 mittels 10*n* NaOH wird 20 Std. bei 37° gerührt. Der gelbe Niederschlag wird nach 72 Std. bei 4° abgesaugt, mit Chloroform und 10proz.  $Na_2CO_3$ -Lösung behandelt, mit dest. Wasser bis zur neutralen Reaktion gewaschen und i. Vak. über  $P_2O_5$  getrocknet. Ausbeute 200 mg (57%).

1-Acetamino-5-(4-[2-benzthiazolyl-(2)-vinyl]-benzimidoylamino)-pentansäure. — 2 mMol (380 mg)  $N^\alpha$ -Acetyl-lysin und 2 mMol (820 mg) 4-[2-Benzthiazolyl-(2)-vinyl]-benzimid säure-[2-methoxy-äthylester]-dihydrochlorid werden in 5 ccm dest. Wasser gelöst. Mit einigen Tropfen 10*n* NaOH wird auf pH 10.4 gebracht und der Imidsäureester mit 10 ccm Chloroform gelöst; dabei bilden sich zwei Phasen, die mit 95 ccm Methanol homogenisiert und dann 16 Std. bei 37° gerührt werden. Danach wird eingedampft (Rotationsverdampfer), der Rückstand zweimal mit je 100 ccm absol. THF je 2 Std. unter Rückfluß gekocht und filtriert, wobei die Filtrate verworfen werden. Der Rückstand löst sich in dest. Wasser; die Lösung hat etwa pH 10. Beim Ansäuern beginnt das Produkt unterhalb von pH 3.0 auszufallen, ist bei pH 0.6 aber wieder gelöst. Bei pH 1.6, dem Maximum der Ausfällung, wird der Niederschlag abfiltriert und mit salzsaurem Wasser vom pH 1.6 gewaschen. Die Umfällung wird noch einmal wiederholt, der Niederschlag anschließend i. Vak. über  $P_2O_5/KOH$  getrocknet.

Dünnschichtchromatographie: Auf Kieselgel (Merck; Schichtdicke 0.25 mm) können der Imidsäureester und seine Reaktionsprodukte an der intensiven Fluoreszenz unter einer UV-Lampe (366 m $\mu$ ) erkannt werden, die Aminosäuren durch Ninhydrin-Anfärbung. Zum Auftragen des markierten Alanins wird dieses in Äthanol suspendiert und durch Zusatz einiger Tropfen konz. Salzsäure gelöst. Es kann auch Aceton/Wasser (1:2) verwendet werden. Das markierte  $N^\alpha$ -Acetyl-lysin löst sich wie die Aminosäuren in Wasser, der Imidsäureester in Chloroform. Alle Substanzen werden gemeinsam aufgetragen und mit n-Butanol/Eisessig/Wasser (4:1:1) [Kammersättigung] entwickelt. —  $R_F$ -Werte: Imidsäureester 0.85, markiertes Alanin 0.59, markiertes  $N^\alpha$ -Acetyl-lysin 0.44,  $N^\alpha$ -Acetyl-lysin 0.23, DL-Alanin 0.22.

**Elektrophorese:** Die Elektrophorese lief in einem wassergekühlten Camag-Apparat mit Pyridin/Essigsäure-Puffer (pH 6.0) 1 Stde. bei 250 V (68 mA), dann 1 Stde. bei 350 V (80 mA). **Wanderung zur Kathode** [in mm]: Imidsäureester 0, markiertes  $N^{\alpha}$ -Acetyl-lysin 10, markiertes Alanin 13,  $N^{\alpha}$ -Acetyl-lysin 25.5, DL-Alanin 28.

**4-[2-Benzthiazolyl-(2)-vinyl]-benzimidoyl-ribonuclease.** — 137 mg ( $10^{-2}$  mMol,  $10^{-1}$  mMol freie  $NH_2$ -Gruppen) *Ribonuclease* werden in 10 ccm wäbr. Natriumborat-Puffer (pH 9.8) gelöst. Der pH-Wert der Lösung (9.6) stellt sich nach Zugabe von 206 mg (0.55 mMol) **4-[2-Benzthiazolyl-(2)-vinyl]-benzimidäure-[2-methoxy-äthylester]-dihydrochlorid** auf 7.6 ein. Mit ca. 0.1 ccm 10 *n* NaOH erfolgt die Korrektur auf pH 9.8, dann wird 24 Stdn. bei Raumtemperatur gerührt. Der unlösliche *Imidsäureester* wird durch Zentrifugieren (20 Min. bei 5800 U/Min.) abgetrennt, eine weitere Klärung erfolgt durch Membranfilter Sartorius MF 125 (0.45  $\mu$  max. Porenweite). — Die weitere Reinigung erfolgt durch *Gelfiltration*: 4 ccm Filtrat werden auf eine Säule (10  $\times$  900 mm) von Sephadex G-10 aufgetragen; Laufmittel: dest. Wasser, Durchfluß: 20.76 ccm/Stde., Fraktionsgröße: 2.38 ccm. Elutionsvolumina (Maximum der Extinktion): 1) markierte Ribonuclease 30.95 ccm, 2) zweite fluoreszierende Fraktion 45.45 ccm, 3) zwei nicht-fluoreszierende Fraktionen 94.35 ccm, 4) Natriumborat + Natriumchlorid 100.85 ccm.

**Fluoreszenzmarkierung von denaturiertem Rinderserumalbumin:** 1 g *Rinderserumalbumin* „Povite“ [1.125 mMol freie  $NH_2$ -Gruppen (Lysin)] wird in 110 ccm Wasser + 5 ccm Eisessig gelöst. Nach 30 Min. auf dem siedenden Wasserbad wird langsam erkalten gelassen. Die klare Lösung wird bei Raumtemperatur mit ca. 12 ccm 10 *n* NaOH auf pH 10.2 eingestellt (*Lösung I*). — Eine Lösung von 4.63 g (11.25 mMol) **4-[2-Benzthiazolyl-(2)-vinyl]-benzimidäure-[2-methoxy-äthylester]-dihydrochlorid** und 5 ccm (36 mMol) *Triäthylamin* in 100 ccm Chloroform zeigt auf feuchtem Indikatorpapier pH 9 (*Lösung II*). — Die *Lösungen I und II* werden mit 300 ccm Methanol unter Rühren zu einer homogenen Phase (pH 9.1) vermischt und 3.5 Stdn. bei Raumtemperatur gerührt. Danach wird mit 6 *n* HCl auf pH 7.2 eingestellt, mit 100 ccm dest. Wasser verdünnt und nach Zusatz einiger Tropfen *n*-Decylalkohol eingengt (Rotationsverdampfer, Badtemperatur  $\leq 35^\circ$ ). Nach Filtration von Imidsäureester, Nebenprodukten sowie denaturiertem Rinderserumalbumin und anschließender Feinklärung durch ein Sartorius-Membranfilter MF 125 verbleibt eine stark fluoreszierende Protein-Lösung. — *Gelchromatographie*: 2 ccm der Lösung werden auf eine Säule (10  $\times$  895 mm) von Sephadex G-10 aufgetragen. Laufmittel: dest. Wasser, Durchfluß: 21.2 ccm/Stde., Fraktionsgröße: 1.85 ccm. Elutionsvolumina (Maximum der Extinktion): 1) markiertes, denaturiertes Rinderserumalbumin 28.0 ccm, 2) fluoreszierende Substanz ohne Protein 60.75 ccm.

Eine Probe von Frakt. 1 wanderte auf *Agar-Gel* anodisch wie unmarkiertes, denaturiertes und natives Rinderserumalbumin. Die Stelle der Amidoschwarz-Anfärbung ist dem Ort der Fluoreszenz gleich. **Elektrophorese-Anordnung:** Elektrodenabstand 6.5 cm, Elektrodenspannung 50 V, Stromstärke 2 mA, Laufzeit 100 Min., Camag-HR-Puffer (Tris/Barbiturat, pH 8.8). Die Fixierung nach der Elektrophorese erfolgt durch ein Gemisch aus 450 ccm Methanol + 50 ccm Eisessig + 10 ccm  $H_2O$ . Unter diesen Bedingungen wandert das Fluoreszenz-markierte Rinderserumalbumin 21 mm (Maximum 15 mm).