HOPPE-SEYLER'S Z. PHYSIOL. CHEM.
Bd. 350, S. 1521—1530, Dezember 1969

Kinetik der Reaktion von Imidazol-SH-Verbindungen mit *N*-Äthyl-maleinimid

Von FRIEDHELM SCHNEIDER* und HELMUT WENCK

Aus dem Physiologisch-Chemischen Institut der Universität Tübingen (Direktor: Prof. Dr. Dr. G. Weitzel)

(Der Schriftleitung zugegangen am 4. August 1969)

Zusammenfassung: Die pH-Abhängigkeit der Geschwindigkeit der Reaktion einer Reihe einfacher Cystein-Derivate und -Peptide sowie einiger Imidazol-SH-Verbindungen mit *N*-Äthyl-maleinimid wurde bestimmt und für jede Verbindung eine Geschwindigkeitsgleichung formuliert, die die Abschätzung der Geschwindigkeitskonstanten und Halbwertszeiten für beliebige pH-Werte erlaubt.
Das pH-abhängige Glied dieser Gleichungen läßt sich zum p*K*-Wert der SH-Gruppe in Beziehung setzen und daraus eine „nucleophile Reaktionskonstante" errechnen, die um so größer ist, je höher der p*K*-Wert der SH-Gruppe liegt.
Die „nucleophilen Reaktionskonstanten", sowie die Geschwindigkeitskonstanten und Halbwertszeiten der Reaktion der SH-Verbindungen mit *N*-Äthyl-maleinimid bei pH 7 werden berechnet.
Unter den einfachen Cysteinderivaten zeigt *N*-Acetyl-cystein eine Reaktionsgeschwindigkeit, die erheblich niedriger liegt als aufgrund des p*K*-Wertes zu erwarten ist, während 4-Mercaptomethyl-imidazol bedeutend schneller reagiert als sein p*K*-Wert erwarten läßt. Der p*K*-Wert allein gibt bei diesen Verbindungen keinen Aufschluß über die nucleophile Reaktivität gegenüber *N*-Äthyl-maleinimid.
Die Synthese des *N*-Acetyl-cysteinamids, *cyclo*-(Cysteinyl-glycyls) und des 1-Methyl-5-[2-mercapto-äthyl]-imidazols wird beschrieben.

Summary: *Kinetics of the reaction of imidazole-SH compounds with N-ethylmaleimide.* The rate of reaction of some derivatives and peptides of cysteine and a number of imidazole-SH-compounds with *N*-ethylmaleimide as well as the dependence of the reaction rate upon pH were investigated; for each compound an equation is given by which the rate constants and half reaction times can be estimated for various pH values.
The pH-dependent term of these equations is related to the p*K* values of the SH-groups, thus a "nucleophilic reaction constant" can be calculated which increases with increasing p*K* value of the SH group.
"Nucleophilic reaction constants", rate constants and half reaction times at pH 7 were calculated for the compounds investigated.
N-acetylcysteine reacts much more slowly with *N*-ethylmaleimide than would be expected on the basis of its p*K* value while 4-mercaptomethyl-imidazole reacts much faster. For these compounds the p*K* is no criterion of their nucleophilic reactivity with *N*-ethylmaleimide.
The synthesis of *N*-acetylcysteinamide, *cyclo*-(cysteinyl-glycyl) and 1-methyl-5-[2-mercapto-ethyl]-imidazole is described.

---

* Postanschrift: Prof. Dr. FR. SCHNEIDER, D-74 Tübingen, Hoppe-Seyler-Straße 1.

Enzyme:
β-Amylase, α-1.4-Glucan-Malto-Hydrolase (EC 3.2.1.2)
Ficin (EC 3.4.4.12)
Kreatin-Kinase, ATP:Kreatin-Phosphotransferase (EC 2.7.3.2)
Papain (EC 3.4.4.10)

Brought to you by | Purdue University Libraries
Authenticated
Download Date | 5/26/15 9:52 AM

Die Reaktivität der Sulfhydryl-Gruppen von Enzymen wird in erster Linie bestimmt von der durch die dreidimensionale Struktur des Makromoleküls bedingten mikroskopischen Umgebung der SH-Gruppen, von Nachbargruppeneffekten sowie Wechselwirkungen mit anderen funktionellen Gruppen. Wegen seiner vielfältigen Reaktionsmöglichkeiten ist der Imidazolrest des Histidins ein besonders interessanter Partner einer Wechselwirkung mit SH-Gruppen. Eine solche Wechselwirkung kann in Enzymen z. B. als kooperative Imidazol-SH-Katalyse zum Ausdruck kommen, wie sie u. a. für das Papain, die Kreatin-Kinase, β-Amylase und eine Streptococcen-Proteinase postuliert wird[1].

Modellreaktionen zur kooperativen Imidazol-SH-Katalyse haben in der Tat gezeigt, daß z. B. die nucleophile Reaktivität von SH-Gruppen gegenüber *p*-Nitro-phenylacetat durch Wechselwirkung mit einem Imidazol-Rest über das aufgrund des p*K*-Wertes der SH-Gruppe zu erwartende Maß hinaus erhöht wird[1]: Die Geschwindigkeitskonstanten der durch Imidazol-SH-Verbindungen katalysierten Hydrolyse von *p*-Nitro-phenylacetat gehorchen nicht dem BRÖNSTEDTschen Katalysegesetz[1], die Aktivierungsenergie der durch diese Verbindungen katalysierten Hydrolyse wird auf ein Viertel bis ein Fünftel derjenigen der Spontanhydrolyse des *p*-Nitro-phenylacetats erniedrigt und liegt damit um die Hälfte niedriger als bei der durch Imidazol oder Sulfhydrylverbindungen allein katalysierten Hydrolyse dieses Esters[2].

In Fortführung unserer Untersuchungen zur kooperativen Imidazol-SH-Katalyse berichten wir in der vorliegenden Arbeit über kinetische Untersuchungen zur Reaktion von Imidazol-SH-Verbindungen sowie vergleichsweise einiger einfacher SH-Verbindungen mit *N*-Äthyl-maleinimid, einem „Sulfhydryl-Reagenz" das in der Enzym- und Proteinchemie eine breite Verwendung zur Blockierung von SH-Gruppen und Beurteilung ihrer Reaktivität gefunden hat[3], aber auch bei Studien an intakten Zellen wertvolle Informationen über die Funktion von SH-Gruppen z. B. in Transportsystemen und bei Zellteilungsprozessen geliefert hat[4].

Material und Methoden

SYNTHESEN

1-Methyl-5-[2-mercapto-äthyl]-imidazol-hydrochlorid (I)

a) α-Methylamino-γ-butyrolacton-hydrobromid (II)

115,5 g (0,7 Mol) *α-Brom-γ-butyrolacton*[5] werden unter starkem Rühren und Eiskühlung zu 348,1 m*l* (3,7 Mol) 33proz. wäßrigem *Methylamin* getropft; die Temperatur darf 25°C nicht übersteigen. Nach Stehenlassen über Nacht wird mit Wasser auf 700 m*l* verdünnt und 280 m*l* 2,5N KOH zugegeben. Der nach Eindampfen im Vak. gewonnene Rückstand wird in einer Mischung aus 93 g (0,6 Mol) 53proz. Bromwasserstoff, 630 m*l* Äthanol und 70 m*l* Wasser aufgenommen und $^1/_2$ Std. auf dem Wasserbad auf 70°C erhitzt. Nach Abkühlen wird Kaliumbromid abfiltriert, Alkohol unter Normaldruck abdestilliert und danach im Vak. zur Trockene eingedampft. Den Rückstand behandelt man bei 65°C mit 500 m*l* absol. Methanol, kühlt ab und filtriert das Kaliumbromid ab; die methanol. Lösung wird wieder eingedampft, das gewonnene Produkt in 100 m*l* 53proz. Bromwasserstoff 1 Std. gekocht und die Lösung im Vak. zur Trockene eingedampft. Der Rückstand wird in 200 m*l* heißem Äthanol gelöst, gekühlt und das ausgefallene Produkt abgesaugt und noch einmal aus Äthanol umkristallisiert: Ausbeute 96 g (70% d. Th.); Schmp. 171—172°C.

$C_5H_{10}BrNO_2$ (196,0) Ber. N 7,1 Br 40,8
Gef. N 7,2 Br 41,1

b) 1-Methyl-5-[2-hydroxy-äthyl]-imidazol-thion-(2) (III)

19,6 g (0,1 Mol) *II* werden in einer Mischung aus 50 m*l* Wasser und 50 m*l* Äthanol gelöst und auf —20°C gekühlt. Man gibt 230 g 3proz. Natriumamalgam in 7 Portionen in Abständen von 6 Min. zu, und hält die Lösung durch gleichzeitige Zugabe von insgesamt 60 m*l* 5N HCl stark sauer. Es wird noch weitere 10—20 Min. intensiv bei —10 bis —20°C unter ständiger Kontrolle des pH-Wertes gerührt und danach vom Quecksilber dekantiert; das Quecksilber wird mit 50 m*l* Wasser gewaschen, das Waschwasser mit der Reaktionslösung vereinigt und mit 15,2 g (0,2 Mol) *Ammoniumthiocyanat* versetzt. Nach 20 Min. bei Zimmertemperatur wird zur Trockene eingedampft und der Rückstand dreimal mit absol. Äthanol extrahiert. Nach Einengen der Extraktionslösung erfolgt Kristallisation. Man kristallisiert noch

[1] FR. SCHNEIDER, diese Z. **348**, 1034 [1967].

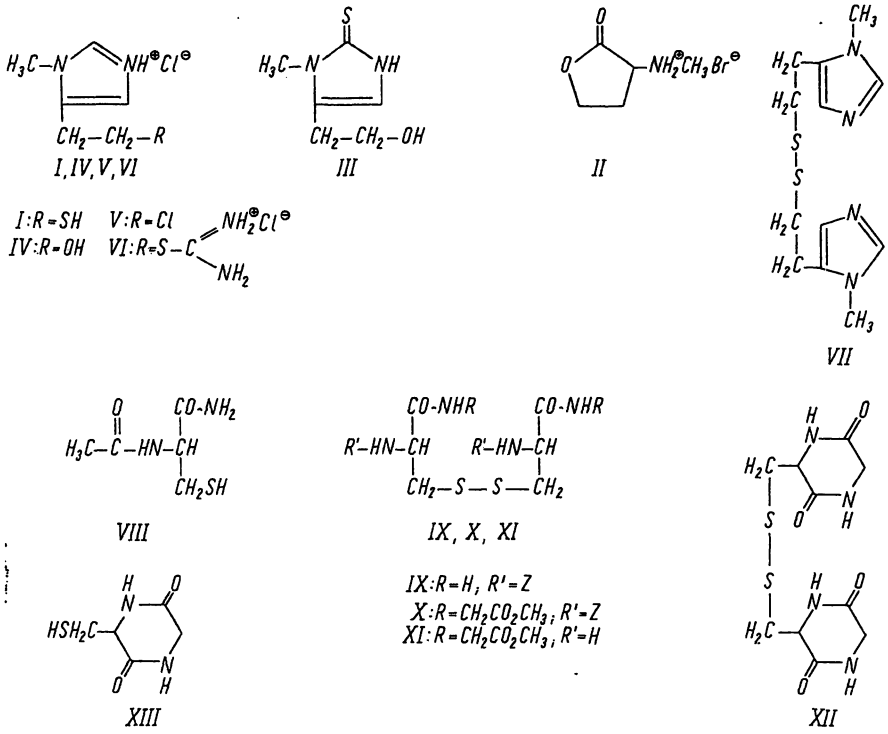
[2] FR. SCHNEIDER, E. SCHAICH u. H. WENCK, diese Z. **349**, 1525 [1968].

[3] E. FRIEDMANN, Biochim. biophysica Acta [Amsterdam] **9**, 65 1952]; J. D. GREGORY, J. Amer. chem. Soc. **77**, 3922 [1955]; N. M. ALEXANDER, Analytic Chem. **30**, 1292 [1958]; P. D. BOYER in P. D. BOYER, H. LARDY u. K. MYRBÄCK: The Enzymes, Bd. I, S. 511 u. zwar S. 529, Acad. Press, New York 1959; R. CECIL u. J. R. MCPHEE in C. B. AUFINSEN jr., M. L. ANSON, K. BAILEY u. J. T. EDSALL: Advances in Protein Chemistry, Bd. XIV, S. 255 u. zwar S. 267, Acad. Press New York 1959.

[4] F. FOX u. E. P. KENNEDY, Proc. nat. Acad. Sci. USA **54**, 891 [1965].

[5] J. E. LIVAK, E. C. BRITTON, J. C. VANDERWEELE u. M. F. MURRAY, J. Amer. chem. Soc. **67**, 2218 [1945].

Brought to you by | Purdue University Libraries
Authenticated
Download Date | 5/26/15 9:52 AM



dreimal aus Äthanol um und erhält ein Produkt vom Schmp. 163°C. Ausbeute 5,2 g (33% d. Th.).

$C_6H_{10}N_2OS$ (158,1) Ber. N 17,7 S 20,2
Gef. N 17,4 S 19,8

c) 1-Methyl-5-[2-hydroxy-äthyl]-imidazol-hydrochlorid (IV)

29 g *III* werden in 370 m*l* Wasser, das 28,0 m*l* gesättigte wäßrige Natriumcarbonatlösung enthält, gelöst und destilliert, bis das Destillat frei von Ammoniak ist (NESSLER-Reagenz). Man gibt 100 g RANEY-*Nickel*[6], in 50 m*l* absol. Äthanol suspendiert, hinzu und erhitzt $5^1/_2$ Std. unter Rückfluß und Rühren. Danach wird die Suspension filtriert, der Filterinhalt mit 50 m*l* Wasser $^1/_2$ Std. unter Rühren am Rückfluß gekocht und filtriert. Die vereinigten Filtrate werden mit 49 m*l* konz. Salzsäure angesäuert und im Vak. zur Trockene eingedampft. Der halbfeste Rückstand wird dreimal mit absol. Äthanol versetzt und im Vak. eingedampft. Danach löst man in 60 m*l* heißem absol. Propanol und filtriert von unlöslichen Salzen ab; die Salze werden mit Propanol gewaschen, die Propanol-Lösungen vereinigt und im Vak. eingedampft. Umkristallisiert wird aus absol. Äthanol. Schmp. 89—90°C. Ausbeute 19,0 g (64% d. Th.). Die Substanz ist hygroskopisch.

$C_6H_{11}ClN_2O$ (162,6) Ber. N 17,2 Cl 21,8
Gef. N 17,0 Cl 21,5

d) 1-Methyl-5-[2-chlor-äthyl]-imidazol-hydrochlorid (V)

19 g *IV* werden mit 28 m*l* *Thionylchlorid* versetzt und $^1/_2$ Std. am Rückflußkühler unter Feuchtigkeitsausschluß erhitzt. Nach Abkühlen gibt man 30 m*l* absol. Benzol hinzu und destilliert im Vak. ab. Der Rückstand wird in heißem absol. Propanol gelöst und durch Zugabe von Essigsäure-äthylester zur Kristallisation gebracht. Schmp. 171—173°C. Ausbeute 13,6 g.

$C_6H_{10}Cl_2N_2$ (181,1) Ber. N 15,5 Cl 38,6
Gef. N 15,4 Cl 38,3

e) S-[2-(1-Methyl-imidazolyl-(5))-äthyl]-isothioharnstoff-dihydrochlorid (VI)

7,4 g *V* und 3,3 g *Thioharnstoff* werden getrennt in der Mindestmenge absol. Äthanol in der Wärme gelöst, vereinigt und 42 Std. am Rückfluß gekocht. Während der Reaktion kristallisiert das Endprodukt aus. Nach Abkühlen wird abfiltriert und die Mutterlauge mit weiteren 1,2 g Thioharnstoff versetzt und erneut 48 Std. gekocht. Dabei erhält man eine zweite Fraktion. Schmp. 226—228°C. Ausbeute 9 g (85% d. Th.).

$C_7H_{14}Cl_2N_4S$ (257,2) Ber. N 21,8 Cl 27,7 S 12,4
Gef. N 21,7 Cl 27,2 S 12,3

f) Bis-[2-(1-methyl-imidazolyl-(5))-äthyl]-disulfid (VII)

8,0 g *V* werden in 170 m*l* Wasser gelöst und mit Natronlauge auf pH 11—12 gebracht. Unter Rühren und Kontrolle des pH-Wertes wird so lange *Sauerstoff* durch die Lösung geleitet, bis die Nitroprussidreaktion negativ

[6] A. A. PAVLIC u. H. ADKINS, J. Amer. chem. Soc. **68**, 1471 [1946].

Brought to you by | Purdue University Libraries
Authenticated
Download Date | 5/26/15 9:52 AM

ausfällt. Während der Reaktion scheidet sich das Disulfid als Öl ab. Man engt die Lösung im Vak. auf die Hälfte ein, zentrifugiert das Öl ab, wäscht es mit kaltem Wasser aus und löst in verdünnter Salzsäure. Die salzsaure Lösung wird mit Aktivkohle behandelt und danach zur Trockene eingedampft. Man löst das so erhaltene Dihydrochlorid in der Mindestmenge Wasser und bringt durch Zugabe von absol. Äthanol, danach Äther zur Kristallisation. Schmp. ab 240°C (Zers.). Ausbeute 3,8 g (69% d. Th.).

$C_{12}H_{20}Cl_2N_4S_2$ (355,2)

Zur weiteren Reinigung des chromatographisch noch leicht verunreinigten Produktes wird auf folgendem Wege in die kristallisierte Base übergeführt: Man löst das Salz in Wasser und gibt gesättigte Natriumhydrogencarbonatlösung zu, wobei ein Öl ausfällt, das in der Kälte abzentrifugiert wird. Das Öl wird in heißem Wasser gelöst; beim Abkühlen kristallisiert VII in feinen Nadeln aus. Schmp. 37—38°C. Ausbeute 60—70% d. Th.

$C_{12}H_{18}N_4S_2$ (282,2) Ber. N 19,8 S 22,7
Gef. N 19,8 S 22,7

Dieses Produkt ist papierchromatographisch einheitlich. Laufmittel: n-Butanol/Eisessig/Wasser 4:1:1; Sprühreagenz: J_2/KJ-Lösung.

g) 1-Methyl-5-[2-mercapto-äthyl]-imidazol-hydrochlorid (I)

1,0 g *VII* wird in 20 ml Eisessig gelöst, dann fügt man 500 mg *Zinkstaub* zu. Nach 4 Std. Rühren ergab eine Probe bei chromatographischer Prüfung mit Natriumnitroprussiat und Jod/Kaliumjodid-Lösung ein einheitliches Produkt. Man filtriert vom Zinkstaub ab, dampft im Vak. ein und beseitigt die Essigsäure durch mehrmaliges Lösen in Äthanol und Abdampfen im Vak. Der gewonnene Rückstand wird in Wasser gelöst und das Zink mit Schwefelwasserstoff gefällt. Die zinkfreie Lösung wird mit Salzsäure angesäuert und im Vak. zur Trockene gebracht. Das zunächst ölige Produkt wird im Exsikkator fest und aus absol. Äthanol durch Zugabe von Äther zur Kristallisation gebracht. Schmp. 144 bis 145°C. Ausbeute 85%.

$C_6H_{11}ClN_2S$ (178,7) Ber. N 15,7 S 17,9 Cl 19,8
Gef. N 15,5 S 17,8 Cl 19,6

SH-Gehalt nach ELLMAN[7] 96—98% d. Th.

N-Acetyl-cysteinamid (VIII)

a) Dibenzyloxycarbonyl-cystindiamid (IX)

10,2 g (20 mMol) *Dibenzyloxycarbonyl-cystin*[8] werden in 150 ml Dimethylformamid mit 5,6 ml Triäthylamin gelöst. Bei —5° werden 4 ml (40 mMol) *Chlorameisensäure-äthylester* zugegeben und nach 15 Min. unter weiterer Kühlung 1/2 Std. ein mäßiger Strom von *Ammoniak* eingeleitet. Nach Ende der Reaktion wird in 400 ml Wasser eingegossen, der Niederschlag abfiltriert und dreimal aus Äthanol umkristallisiert. Schmp. 188 bis 190°C. Ausbeute 60% d. Th.

$C_{22}H_{26}N_4O_6S_2$ (506,4) Ber. N 11,0 S 12,6
Gef. N 11,2 S 12,3

b) Cystindiamid-dihydrobromid

10 g *Dibenzyloxycarbonyl-cystindiamid* werden in 50 ml Eisessig suspendiert und 50 ml 4N *Bromwasserstoff/Eisessig* zugegeben; es tritt rasch Lösung ein und nach kurzer Zeit fällt das Hydrobromid aus. Nach 1 Std. bei Zimmertemperatur wird abzentrifugiert, mehrere Male mit absol. Äther gewaschen und über Kaliumhydroxyd und Phosphorpentoxyd getrocknet. Ausbeute 90% d.Th. Das Produkt ist chromatographisch einheitlich.

$C_6H_{16}Br_2N_4O_2S_2$ (400,2) Ber. N 14,0
Gef. N 13,7

c) Diacetylcystindiamid

8,0 g (20 mMol) *Cystindiamid-dihydrobromid* werden in 20 ml Dimethylformamid gelöst, in der Kälte 5,6 ml (40 mMol) Triäthylamin und 7,3 g (40 mMol) *p-Nitrophenylacetat* zugesetzt. Nach 24 Std. bei Zimmertemp. ist die Lösung ninhydrinnegativ. Man gießt in 80 ml Wasser ein und läßt einige Stunden im Kühlschrank stehen. Man filtriert den Niederschlag ab (wird verworfen) und dampft das Filtrat zur Trockene ein. Der Rückstand wird mehrmals mit absol. Äthanol ausgekocht. Man erhält ein farbloses, kristallines Produkt vom Schmp. 238—240°C. Ausbeute 60—70%.

$C_{10}H_{18}N_4O_4S_2$ (322,3) Ber. N 17,4 S 19,9
Gef. N 17,2 S 20,2

d) *N-Acetyl-cysteinamid (VIII)*

1 g *Diacetylcystindiamid* wird in 25 ml Eisessig gelöst und 2 Std. mit 500 mg *Zinkstaub* behandelt; danach wird filtriert, das Filter mit Eisessig gewaschen und das Filtrat zur Trockene eingedampft. Den Rückstand löst man in Wasser und entfernt das Zink mit Schwefelwasserstoff. Man filtriert das Zinksulfid ab, wäscht mit Schwefelwasserstoffwasser nach und dampft das Filtrat im Vak. ein. Der Rückstand wird in wenig heißem Äthanol gelöst, bis zur Trübung mit absol. Äther versetzt und im Kühlschrank zur Kristallisation gebracht. Schmp. 145—146°C. Ausbeute 80% d.Th. $[\alpha]_D^{29,5} = -12,88^0$ ($c = 1$ in Wasser).

$C_5H_{10}N_2O_2S$ (162,2) Ber. N 17,3 S 19,8
Gef. N 17,2 S 19,6

SH-Gehalt nach ELLMAN bis 98%.

[7] G. L. ELLMAN, Arch. Biochem. Biophysics **82**, 70 [1959].

[8] V. DU VIGNEAUD u. G. L. MILLER, in E. G. BALL: Biochemical Preparations, Vol. 2, 75, Wiley & Sons, New York 1952.

Brought to you by | Purdue University Libraries
Authenticated
Download Date | 5/26/15 9:52 AM

cyclo-(Cysteinyl-glycyl) (XIII)

a) *Bis-[benzyloxycarbonyl]-cystinyl-bis-[glycin-methylester] (X)*

2,75 g (22 mMol) *Glycin-methylester-hydrochlorid* werden unter Eiskühlung mit 3,1 m*l* Triäthylamin in 50 m*l* Chloroform gelöst und mit 7,5 g *Bis-[benzyloxycarbonyl]-cystin-bis-[p-nitro-phenylester]*[9] unter Rühren versetzt. Nachdem sich alles gelöst hat, läßt man über Nacht stehen. Das ausgefallene Produkt wird abfiltriert und das Filtrat eingeengt; man erhält daraus eine zweite Fraktion. Beide Fraktionen werden in heißem Äthanol gelöst. Beim Abkühlen erhält man eine Gallerte. Schmp. 170—171 °C. Ausbeute 6,5 g (50 % d.Th.)

$C_{28}H_{34}N_4O_{10}S_2$ (650,7) Ber. N 8,6 S 9,8
Gef. N 8,3 S 9,6

b) *Cystinyl-bis-[glycin-methylester]-dihydrobromid (XI)*

5 g *X* werden in 25 m*l* Eisessig gelöst, 25 m*l* 4N *Bromwasserstoff/Eisessig* zugesetzt und 1 Std. bei Zimmertemperatur belassen. Man gießt in 150 m*l* absol. Äther ein, zentrifugiert ab, wäscht den Niederschlag mehrere Male mit absol. Äther und trocknet über Natronlauge und Schwefelsäure im Exsikkator. Ausbeute 3,9 g.

$C_{12}H_{24}Br_2N_4O_6S_2$ (544,5)

c) *Oxydiertes cyclo-(Cysteinyl-glycyl) (XII)*

4 g *XI* werden in wenig gesättigter Natriumhydrogencarbonatlösung gelöst; der pH-Wert wird durch Zugabe von festem Natriumhydrogencarbonat auf 8,5 eingestellt. Nach 3täg. Stehenlassen bei Zimmertemperatur wird der Niederschlag abfiltriert, mit Wasser gewaschen und aus Wasser umkristallisiert. Schmp. 289 °C (Zers.) Ausbeute 2 g. $[\alpha]_D^{29,5} = -184{,}1$ ($c = 1$ in HCO_2H).

$C_{10}H_{14}N_4O_4S_2$ (318,3) Ber. N 17,6 S 20,1
Gef. N 17,5 S 20,0

d) *cyclo-(Cysteinyl-glycyl) (XIII)*

500 mg *XII* werden in 15 m*l* *Mercaptoäthanol* unter Rühren und Erhitzen auf 70—80 °C in Lösung gebracht. Nachdem sich alles gelöst hat, wird in 100 m*l* absol. Äther eingegossen und nach Stehenlassen im Kühlschrank abzentrifugiert und mehrere Male mit absol. Äther gewaschen, bis der Geruch nach Mercaptoäthanol verschwunden ist. Die Verbindung hat keinen definierten Schmelzpunkt. Ausbeute 50—60 %.

$C_5H_8N_2O_2S$ (160,2) Ber. N 17,5 S 20,0
Gef. N 17,2 S 20,4

SH-Gehalt nach ELLMAN: 98 %; $[\alpha]_D^{29,5} = +32{,}58^0$ ($c = 1$ in Wasser).

[9] D. F. ELLIOT u. D. W. RUSSEL, Biochem. J. **66**, 49 p [1957].

SUBSTANZEN

Cystein-hydrochlorid: Präparat der Firma Merck;

N-Acetyl-cystein wurde nach l.c.[10] dargestellt;

4-Mercaptomethyl-imidazol-hydrochlorid, 4-Mercaptoäthyl-imidazol-hydrochlorid und *cyclo*-(Cysteinyl-histidyl) wurden nach l.c.[1] dargestellt.

Acetyl-cysteinyl-histidyl-asparaginsäure, Acetyl-cysteinyl-γ-aminobutyryl-histidyl-γ-aminobutyryl-asparaginsäure s. l.c.[2].

N-Äthyl-maleinimid (NEM), Präparat der Firma Nutritional Biochemicals Corp. Cleveland/Ohio, Schmp. 46 °C.

Alle für die Herstellung der Puffer verwendeten Salze waren p.a. Substanzen.

MESSUNGEN

Die *Ermittlung der Geschwindigkeitskonstanten* erfolgte im wesentlichen wie von GORIN und Mitarbeitern[11] beschrieben. Die Reaktion wurde an der Abnahme der Extinktion bei 300 nm im Spektralphotometer Zeiss PMQ II verfolgt. Die Umsetzung mit Mercaptomethyl-imidazol wurde bei pH 4,5 und 5 wegen der außerordentlichen Geschwindigkeit am Eppendorf-Photometer mit Schreiber bei 313 nm gemessen ($\varepsilon_{313} = 476$). Zur Ermittlung des E_∞-Wertes wurde durch Zugabe von festem $Na_2HPO_4 \cdot 2H_2O$ (20 mg/3 m*l* Küvetteninhalt) der pH-Wert etwa auf den Neutralpunkt gebracht und dadurch 10 Min. nach Ablesen des letzten Meßwertes der Endwert erreicht. Die Temperatur der Reaktionsmischung wurde im thermostatisierten Küvettenhalter mit Hilfe eines Colora-Ultra-Thermostaten auf 25,00 ±0,03 °C gehalten.

Die *Berechnung der Geschwindigkeitskonstanten zweiter Ordnung* erfolgte nach der Gleichung

$$k = \frac{2{,}303 \cdot \varepsilon}{E_\infty \cdot t} \lg \frac{E_t\,(E_0 - E_\infty)}{E_0\,(E_t - E_\infty)}$$

ε = molarer Extinktionskoeffizient des *N*-Äthyl-maleinimids (620 bei 300 nm bzw. 476 bei 313 nm); E_t = Extinktion zur Zeit t; E_0 = Anfangsextinktion zur Zeit $t = 0$; E_∞ = Extinktions-Endwert; t = Zeit in Sek.

Bei pH 4 bis 5 wurden die Meßpunkte von 90 bis 900 Sek., bei pH 3,5 von 180 bis 1800 Sek. ausgewertet. Alle Meßreihen wurden mindestens zweifach gesichert. Mit $\ln [E_t(E_0 - E_\infty)/(E_0(E_t - E_\infty)]$ gegen t wurde eine Ausgleichsrechnung nach der Methode der kleinsten Fehlerquadrate für jede einzelne Meßreihe ausgeführt und aus der Neigung der so gewonnenen Geraden die Geschwindigkeitskonstante ermittelt. Alle Berechnun-

[10] H. A. SMITH u. G. GORIN, J. org. Chemistry **26**, 820 [1961].

[11] G. GORIN, P. A. MARTIC u. G. DOUGHTY, Arch. Biochem. Biophysics **115**, 593 [1966].

Brought to you by | Purdue University Libraries
Authenticated
Download Date | 5/26/15 9:52 AM

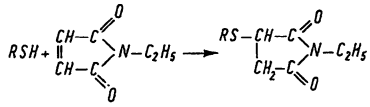
gen wurden in ALGOL programmiert und mit einer Datenverarbeitungsanlage Control Data 3300 ausgeführt.*

Bei Ac-Cys-His-Asp und Ac-Cys-γAbu-His-γAbu-Asp wurde im Verlauf der Reaktion eine Abnahme der Konstanten beobachtet; in diesen Fällen wurde der in den ersten Minuten der Reaktion erhaltene maximale Wert der Geschwindigkeitskonstanten verwendet.

Um zu prüfen, ob die Reaktionsprodukte einheitlich sind, wurden die Reaktionsmischungen nach Ende der Reaktion dünnschichtchromatographisch untersucht: Identifizierung der Flecken erfolgte durch Fluoreszenzlöschung, PAULY-Reagenz und Nitroprussiat-Reaktion. Während der Meßzeit erfolgt bei allen untersuchten Verbindungen keine Abnahme des SH-Gehaltes durch Oxydation, wie mit Hilfe der ELLMAN-Reaktion in Abwesenheit von *N*-Äthyl-maleinimid festgestellt wurde. Die Extinktion des *N*-Äthyl-maleinimids ändert sich in dem hier untersuchten pH-Bereich unter Einfluß von Imidazol-Verbindungen nicht.

Ergebnisse und Diskussion

Wie bereits aus Untersuchungen zur Stöchiometrie der Reaktion bekannt ist, reagieren SH-Verbindungen mit *N*-Äthyl-maleinimid im Verhältnis 1:1 in einer sehr stark pH-abhängigen nucleophilen Additionsreaktion[12] nach folgender Gleichung:



Außer für Cystein[11] liegen bisher keine Untersuchungen zur Kinetik dieser Reaktion vor. Vor allem gibt es bisher keine Untersuchungen über den möglichen Einfluß weiterer funktioneller Gruppen, die sich in „idealer Nachbarschaft" zur reagierenden SH-Gruppe befinden, auf die Geschwindigkeit der Umsetzung. Gerade dieses Problem ist im Hinblick auf die Reaktivität der SH-Gruppen von Proteinen von besonderer Bedeutung. Zur Klärung der Frage, wie sich die Nachbarschaft eines Imidazol-Restes oder eine mögliche Kooperation mit einem Imidazol-Rest auf die Reaktivität einer SH-Gruppe mit *N*-Äthyl-maleinimid auswirken, wurde eine nähere kinetische Analyse dieser Reaktion für einige einfache SH-Verbindungen und eine Reihe von Imidazol-SH-Verbindungen durchgeführt.

Die Geschwindigkeitskonstanten zweiter Ordnung der Reaktion einfacher Derivate und Peptide des Cysteins sowie einer Anzahl von Imidazol-SH-Verbindungen mit *N*-Äthyl-maleinimid bei verschiedenen pH-Werten sind in Tab. 1 zusammengestellt.

Der gewählte pH-Bereich wird zu niederen Werten hin begrenzt durch die mit sinkendem pH-Wert stark abfallende Reaktionsgeschwindigkeit sowie die im stärker sauren Bereich z. B. beim Pentapeptid auftretende Hydrolyse; mit steigendem pH-Wert gelangt man dagegen zu Reaktionsgeschwindig-

Tab. 1. Geschwindigkeitskonstanten zweiter Ordnung der Reaktion von einfachen SH-Verbindungen sowie von Imidazol-SH-Verbindungen mit *N*-Äthyl-maleinimid bei verschiedenen pH-Werten bei 25°C.

SH-Verbindung	k [$l \cdot \text{Mol}^{-1} \cdot \text{sec}^{-1}$]			
	pH 3,5	pH 4,0	pH 4,55	pH 5,0
Cystein**	0,68	1,73	5,03	15,5
N-Acetyl-cystein	0,23	0,41	0,97	2,44
N-Acetyl-cysteinamid	0,51	1,36	4,52	13,4
cyclo-(Cys-Gly)	0,50	1,50	4,54	13,5
Glutathion**	0,50	1,30	4,30	11,9
4-Mercaptomethyl-imidazol	3,20	9,40	29,2	94,5
4-[2-Mercapto-äthyl]-imidazol	0,40	1,10	3,62	11,0
1-Methyl-5-[2-mercapto-äthyl]-imidazol (I)	0,51	1,39	4,45	13,5
cyclo-(Cys-His)	0,52	1,20	3,52	10,7
Ac-Cys-His-Asp	0,60	1,33	3,62	10,4
Ac-Cys-γ-Abu-His-γ-Abu-Asp	0,64	1,71	4,40	12,8

** Werte nach den Angaben von l. c.[11] berechnet.

* Der Leitung des RECHENZENTRUMS DER UNIVERSITÄT TÜBINGEN danken wir für die freundliche Unterstützung.

[12] C. C. LEE u. E. R. SAMUELS, Canad. J. Chem. **42**, 168 [1964].

Brought to you by | Purdue University Libraries
Authenticated
Download Date | 5/26/15 9:52 AM

keiten, die mit der hier verwandten Methode nicht mehr meßbar sind; außerdem tritt in der Nähe des Neutralpunktes und vor allem oberhalb pH 7 Acylierung von Aminogruppen und Imidazol-Resten durch *N*-Äthyl-maleinimid ein, der im Falle des Imidazols eine durch Imidazol katalysierte Polymerisation des *N*-Äthyl-maleinimids folgt[13]. Solche Nebenreaktionen sollten bei den vorliegenden Untersuchungen auf jeden Fall vermieden werden und traten, wie die dünnschichtchromatographische Prüfung der Reaktionsgemische zeigte, in dem gewählten pH-Bereich auch nicht auf. (Eine bisher nicht bekannte Nebenreaktion tritt wahrscheinlich nach längerer Zeit bei den Peptiden auf.)

Die in der Tabelle aufgeführten „einfachen" SH-Verbindungen sind sämtlich Derivate des Cysteins. Aus dem Vergleich der Konstanten ist ersichtlich, in welchem Ausmaß die Reaktivität der SH-Gruppe durch Variation der Struktur beeinflußt wird; so unterscheiden sich die *k*-Werte dieser Gruppe bei pH 5 maximal um den Faktor 6—7. Unter den Imidazol-SH-Verbindungen zeigt das Mercaptomethylimidazol die höchste bisher überhaupt gemessene Reaktionsgeschwindigkeit einer SH-Verbindung mit *N*-Äthyl-maleinimid. Sie ist bei pH 5 fast zehnmal so groß wie bei den übrigen Verbindungen. Wir führen die enorme Reaktivität der SH-Gruppe dieser Verbindung auf eine Aktivierung durch den Imidazol-Rest zurück; Mercaptomethylimidazol bietet aufgrund seiner Struktur besonders günstige Voraussetzungen für eine solche Aktivierung (vgl. dazu l. c.[1]).

Eine genauere kinetische Analyse der pH-Abhängigkeit der Reaktion unter Berücksichtigung der p*K*-Werte der SH-Gruppen ermöglicht eine exaktere Aussage über die nucleophile Reaktivität als die Geschwindigkeitskonstanten. Dazu trägt man die Geschwindigkeitskonstanten der Tab. 1 gegen die pH-Werte auf und erhält die Kurvenschar der Abb. 1a; durch Auftragung der Geschwindigkeitskonstanten gegen die reziproke Wasserstoffionenkonzentration erhält man dagegen die in Abb. 1b dargestellten Geraden. Diese Geraden lassen sich durch die in Tab. 2 aufgeführten Gleichungen beschreiben.

Diese Gleichungen enthalten ein pH-abhängiges und ein pH-unabhängiges Glied. Wenn man annimmt, daß das pH-unabhängige Glied auf die Reaktion von *N*-Äthyl-maleinimid (NEM) mit RSH und das pH-abhängige auf die Reaktion mit

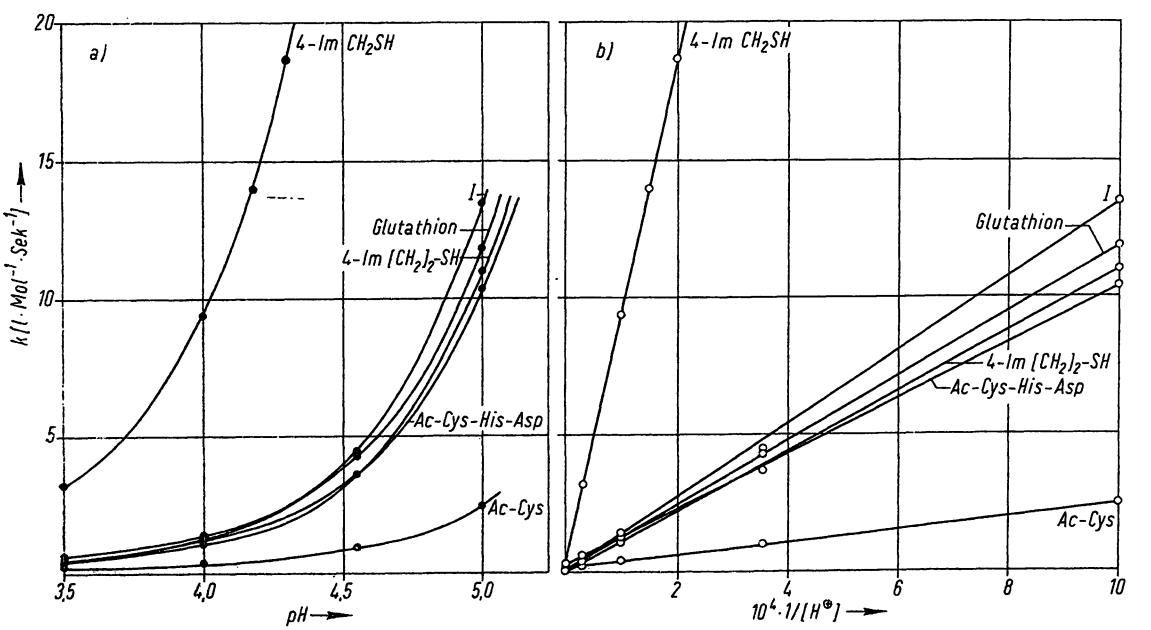


Abb. 1. pH-Abhängigkeit der Geschwindigkeitskonstanten zweiter Ordnung bei der Reaktion einer Auswahl von SH-Verbindungen mit *N*-Äthyl-maleinimid.

[13] D. G. Smyth, A. Nagamatsu u. J. S. Fruton, J. Amer. chem. Soc. **82**, 4600 [1960].

Brought to you by | Purdue University Libraries
Authenticated
Download Date | 5/26/15 9:52 AM

Tab. 2. Gleichungen für die pH-Abhängigkeit der Geschwindigkeitskonstanten zweiter Ordnung k der Reaktion von SH-Verbindungen mit *N*-Äthyl-maleinimid bei 25°C, sowie errechnete k- und $t_{1/2}$-Werte** bei pH 7.

SH-Verbindung	k [$l \cdot Mol^{-1} \cdot Sek.^{-1}$]	k [$l \cdot Mol^{-1} \cdot Sek.^{-1}$] bei pH 7 (berechnet)	$t_{1/2}$ [Sek.] bei pH 7 (berechnet)
Cystein*	$(0{,}2 + 1{,}53 \cdot 10^{-4})/[H^{\oplus}]$	1530	0,7
N-Acetyl-cystein	$(0{,}2 + 0{,}23 \cdot 10^{-4})/[H^{\oplus}]$	230	4,4
N-Acetyl-cysteinamid	$(0{,}08 + 1{,}33 \cdot 10^{-4})/[H^{\oplus}]$	1330	0,75
cyclo-(Cys-Gly)	$(0{,}08 + 1{,}34 \cdot 10^{-4})/[H^{\oplus}]$	1340	0,75
Glutathion*	$(0{,}2 + 1{,}18 \cdot 10^{-4})/[H^{\oplus}]$	1180	0,85
4-Mercaptomethyl-imidazol	$(0{,}3 + 9{,}45 \cdot 10^{-4})/[H^{\oplus}]$	9450	0,1
4-[2-Mercapto-äthyl]-imidazol	$(0{,}1 + 1{,}1 \cdot 10^{-4})/[H^{\oplus}]$	1100	0,9
1-Methyl-5-[2-mercapto-äthyl]-imidazol (I)	$(0{,}1 + 1{,}34 \cdot 10^{-4})/[H^{\oplus}]$	1340	0,75
cyclo-(Cys-His)	$(0{,}1 + 1{,}05 \cdot 10^{-4})/[H^{\oplus}]$	1050	0,95
Ac-Cys-His-Asp	$(0{,}3 + 1{,}0 \cdot 10^{-4})/[H^{\oplus}]$	1000	1,0
Ac-Cys-γAbu-His-γAbu-Asp	$(0{,}5 + 1{,}2 \cdot 10^{-4})/[H^{\oplus}]$	1200	0,8

* Siehe l. c.[11]. ** $t_{1/2} = \frac{1}{k \cdot c_0}$; $c_0 = 10^{-3}$M.

$RS^{\ominus}$ zurückzuführen ist, läßt sich folgende allgemeine Geschwindigkeitsbeziehung formulieren[11]:

$$-\frac{d\,[NEM]}{dt} = k_{RSH}\,[NEM] \times [RSH] + k_{RS^{\ominus}}\,[NEM \times [RS^{\ominus}] \quad (1)$$

substituiert man $RS^{\ominus}$ mit Hilfe der Dissoziationsgleichung

$$[RS^{\ominus}] = \frac{K_D \cdot [RSH]}{[H^{\oplus}]}$$

so erhält man aus (1) die Gleichung[11]

$$-\,d\,[NEM]/dt = [NEM] \times [RSH] \left(k_{RSH} + \frac{k_{RS^{\ominus}} \times K_D}{[H^{\oplus}]}\right) k_{RS^{\ominus}} \times \frac{K_D}{[H^{\oplus}]} \quad (2)$$

Integration dieser Gleichung ergibt die in Tab. 2 aufgeführten Ausdrücke, wobei die Neigung der Geraden $a = K_D \cdot k_{RS^{\ominus}}$ entspricht. (K_D = Dissoziationskonstante der SH-Gruppe = 10^{-pK}, $k_{RS^{\ominus}}$ = „nucleophile Reaktionskonstante"). Aus dieser Beziehung errechnet sich die „nucleophile Reaktionskonstante":

$$k_{RS^{\ominus}} = \frac{a}{K_D} = \frac{a}{10^{-pK}}.$$

In Tab. 3 sind die „nucleophilen Reaktionskonstanten", die Konstanten k_{RSH} sowie die pK-Werte der untersuchten Verbindungen zusammengestellt. Aus dieser Tabelle geht hervor, daß die „nucleophilen Reaktionskonstanten" die höchsten Werte bei den Imidazol-SH-Verbindungen erreichen. Mit steigendem pK-Wert der SH-Gruppe nehmen die $k_{RS^{\ominus}}$-Werte als Ausdruck zunehmender nucleophiler Reaktivität zu. Eine etwa siebenmal so hohe Reaktivität, wie nach Lage des pK-Wertes zu erwarten war, zeigt das 4-Mercaptomethyl-imidazol. Dagegen besitzt das *N*-Acetyl-cystein eine Reaktivität, die nur etwa ein Sechstel des Wertes beträgt, den man an Hand des pK-Wertes finden müßte.

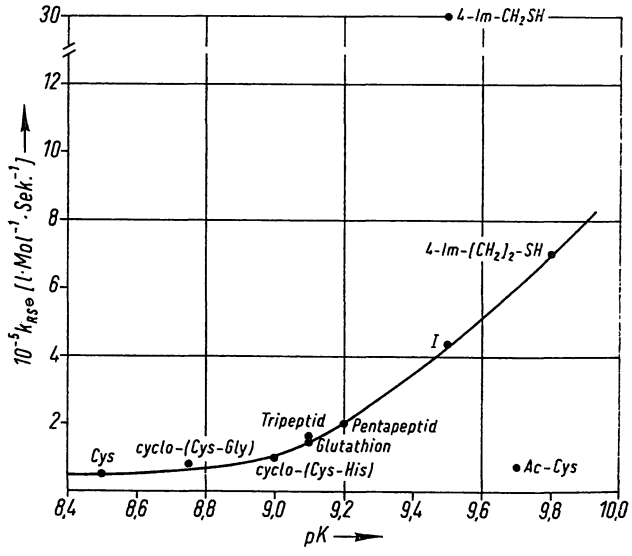


Abb. 2. Abhängigkeit der „nucleophilen Reaktionskonstanten" $k_{RS^{\ominus}}$ von den pK-Werten der SH-Gruppen.

Brought to you by | Purdue University Libraries
Authenticated
Download Date | 5/26/15 9:52 AM

Tab. 3. „Nucleophile Reaktionskonstanten", pH-unabhängige Reaktionskonstanten und p*K*-Werte.

SH-Verbindung	$pK_{SH}^{25°C}$	Nucleophile Reaktionskonstante $10^4 \cdot k_{RS\ominus}$ [$l \cdot Mol^{-1} \cdot Sek.^{-1}$]	pH-unabhängige Reaktionskonstante k_{RSH} [$l \cdot Mol^{-1} \cdot Sek.^{-1}$]
Cystein	8,5*	4,8	0,2
N-Acetyl-cystein	9,7**	1,1	0,2
N-Acetyl-cysteinamid	8,75**	7,4	0,08
cyclo-(Cys-Gly)	8,75**	7,5	0,08
Glutathion	9,1*	14,8	0,2
4-Mercaptomethyl-imidazol	9,5	300	0,3
4-[2-Mercapto-äthyl]-imidazol	9,8	70	0,1
1-Methyl-5-[2-mercapto-äthyl]-imidazol (I)	9,5**	43	0,1
cyclo-(Cys-His)	9,0	10	0,1
Ac-Cys-His-Asp	9,1	16	0,3
Ac-Cys-γAbu-His-γAbu-Asp	9,2	20	0,5

* Nach l. c.[14]. ** Nach l. c.[15].

Trägt man die $k_{RS\ominus}$-Werte gegen die p*K*-Werte auf, so erhält man die in Abb. 2 dargestellte Kurve.

Der p*K*-Wert der SH-Gruppe stellt somit ein direktes Maß ihrer nucleophilen Reaktivität dar, falls keine Aktivierung z. B. durch Nachbargruppeneffekte oder eine Inhibierung z. B. durch sterische Faktoren auftritt.

Die graphisch ermittelte, pH-unabhängige Konstante k_{RSH} fällt bei höheren pH-Werten nicht ins Gewicht, sie gewinnt erwartungsgemäß bei niedrigen pH-Werten an Bedeutung, wenn $[H^{\oplus}]$ groß wird. Außerdem hängt ihr Einfluß auf die Geschwindigkeitskonstante noch von der absoluten Größe der letzteren ab.

Aus den Gleichungen der Tab. 2 lassen sich unter der Voraussetzung ihrer Gültigkeit über einen größeren als den gemessenen pH-Bereich die Geschwindigkeitskonstanten sowie Halbwertszeiten der Reaktion der untersuchten SH-Verbindungen mit *N*-Äthyl-maleinimid bei beliebigen pH-Werten berechnen, oder falls die Gleichungen für andere pH-Bereiche nicht exakt gültig sind, zumindestens abschätzen. Die für pH 7 und eine Anfangskonzentration von 10^{-3}M berechneten Geschwindigkeitskonstanten und Halbwertszeiten sind in Tab. 2 zusammengefaßt. Die Halbwertszeiten bei pH 7 liegen im Bereich von Zehntelsekunden bis Sekunden, d. h. daß bei Reaktion von SH-Verbindungen mit *N*-Äthyl-maleinimid unter neutralen Bedingungen praktisch sofort quantitative Umsetzung eintritt (Tab. 2).

Vergleicht man die nucleophile Reaktivität von Imidazol-SH-Verbindungen gegenüber *p*-Nitrophenylacetat und *N*-Äthyl-maleinimid, so erkennt man, daß eine erheblich höhere als auf der Basis der p*K*-Werte zu erwartende Reaktivität gegenüber *N*-Äthyl-maleinimid nur beim 4-Mercaptomethyl-imidazol gefunden wird, während man gegenüber *p*-Nitro-phenylacetat eine katalytische Aktivität findet, die bei allen Imidazol-SH-Verbindungen mehr oder weniger über eine Summation von Imidazol und SH-Effekten hinausgeht[1, 2]. Der primäre Grund für dieses unterschiedliche Verhalten ist in den unterschiedlichen Reaktionstypen zu suchen. Im einen Fall handelt es sich um eine nucleophile Verdrängungsreaktion an einem Estercarbonyl-Kohlenstoffatom, im zweiten Fall um eine nucleophile Addition an eine polarisierte Doppelbindung. Daß man bei nucleophilen Reaktionen verschiedenen Typs sehr unterschiedliche Abstufungen der Geschwindigkeiten beobachten kann, wurde u. a. auch an Enzymen, z. B. dem Ficin gezeigt.

Wie verhält es sich nun mit der Geschwindigkeit der Reaktion von *N*-Äthyl-maleinimid mit SH-Gruppen von Proteinen, vor allem Enzymen? Wäh-

[14] R. E. Benesch u. R. Benesch, J. Amer. chem. Soc. 77, 5877 [1955].

[15] H. Wenck, Z. Naturforsch., eingereicht.

Brought to you by | Purdue University Libraries
Authenticated
Download Date | 5/26/15 9:52 AM

rend die Inhibitorwirkung von *N*-Äthyl-maleinimid auf SH-abhängige Enzyme an zahlreichen Beispielen demonstriert wurde, gibt es nur wenige Untersuchungen zur Kinetik der Reaktion. So fanden RABIN und Mitarbeiter[16] für die Reaktion von Ficin mit *N*-Äthyl-maleinimid bei pH 6,68 eine Geschwindigkeitskonstante zweiter Ordnung von $6{,}5 \cdot 10^{-4}$ [$l \cdot \text{Mol}^{-1} \cdot \text{Sek.}^{-1}$]. Verglichen mit den in dieser Arbeit gefundenen Werten für niedermolekulare SH-Verbindungen ist die Reaktivität der essentiellen SH-Gruppe dieses Enzyms gegenüber *N*-Äthyl-maleinimid also sehr stark herabgesetzt. Man findet dagegen eine im Vergleich zum Cystein auf das 20fache erhöhte Reaktivität der SH-Gruppe des Enzyms mit Chloracetamid. Für dieses unterschiedliche Verhalten werden einmal der unterschiedliche Reaktionstyp, zum anderen Nachbargruppeneffekte verantwortlich gemacht. Über die Reaktivität der hier untersuchten SH-Verbindungen mit Bromacetamid berichten wir in einer nachfolgenden Arbeit.

[16] M. R. HOLLAWAY, A. P. MATHIAS u. B. R. RABIN, Biochim. biophysica Acta [Amsterdam] **92**, 111 [1964].

Der DEUTSCHEN FORSCHUNGSGEMEINSCHAFT und dem FOND DER CHEMISCHEN INDUSTRIE danken wir für die Unterstützung dieser Arbeit.

Brought to you by | Purdue University Libraries
Authenticated
Download Date | 5/26/15 9:52 AM