

Aus dem Deutschen Wollforschungsinstitut an der Technischen Hochschule Aachen

## N,O-Peptidylverschiebung, Disulfidaustausch und Lanthioninbildung in Wolle und anderen cystinhaltigen Proteinen<sup>1</sup>

Von HELMUT ZAHN

### Einleitung

#### Der Platz der Wolle innerhalb der Proteinforschung

Es ist zunächst von Interesse, den Standort der Keratine und damit der Wolle innerhalb unserer heutigen Kenntnisse über die Proteine zu bestimmen. Die von dem verstorbenen LINDERSTRÖM-LANG<sup>2</sup> geprägten Begriffe Primär-, Sekundär- und Tertiärstruktur eignen sich für diese Einstufung vorzüglich.

Primärstruktur ist die chemische Konstitution eines Proteins, d.h. Zahl der Peptidketten oder -ringe und Reihenfolge der Aminosäuren innerhalb der Ketten. Aufgeklärte Primärstrukturen liegen vor für Insulin<sup>3</sup>, ein heterodet bitykisches Zweikettenprotein aus 51 Aminosäureresten, oder Ribonuclease<sup>4</sup>, ein Einkettenmolekül aus 124 Aminosäuren mit 4 intrachenaren Cystinbrücken. Auch das Molekül vom Tabakmosaikvirus<sup>5</sup> mit 158 Aminosäureresten ist aufgeklärt worden.

Was das Wollkeratin anbelangt, so sind wir leider noch weit davon entfernt, die Primärstruktur zu kennen, lediglich einzelne Peptide sind bekannt<sup>6</sup>.

Sekundärstruktur ist die intramolekulare Konfiguration des Polypeptidgerüsts. Hier nehmen Wolle und andere Faserkeratine einen hervorragenden Platz ein. Zwei Jahrzehnte, beginnend mit den Pionierarbeiten von W. T. ASTBURY<sup>7</sup>, hat man sich Vorstellungen über die Gestalt der Peptidkette im normalen, gedehnten und geschrumpften Haar gemacht, bis L. PAULING<sup>8</sup> die  $\alpha$ -Schraube als Sekundärstruktur der  $\alpha$ -Proteine ableitete. Die Peptidketten in den  $\alpha$ -Proteinen – darunter Keratin und Wolle – bilden eine  $\alpha$ -Helix. Die Peptidketten im gedehnten Haar und ähnlich im Seidenfibroin liegen fast gestreckt in der Struktur des gefalteten Blattes vor<sup>9</sup>.

Unter Tertiärstruktur versteht man die komplette Raumstruktur eines Proteinmoleküls einschließlich Lage der einzelnen Seitenketten. Die Tertiärstrukturen von Myoglobin<sup>10</sup> und Hämoglobin<sup>11</sup> sind als erste durch dreidimensionale Fourier-Synthese aufgeklärt worden. Bei Wolle liegen nur erste Ansätze über Abstände zwischen den Seitenketten des Lysin, Tyrosin und Cystein vor<sup>12</sup>.

Tabelle 1: Stand der Proteinstrukturforschung

Protein	Mol.-Gew.	Primärstruktur	Sekundärstruktur	Tertiärstruktur
Glucagon . . . . .	3 482	BROMER, SINN, BEHRENS (1957)		
Insulin (Rind) . . . . .	5 733	F. SANGER (1955)	HODGKIN (1957)	
Ribonuclease . . . . .	13 683	HIRS, MOORE, STEIN (1960)		
Tabakmosaikvirus . . . . .	17 500	SCHRAMM (1960), FRAENKEL-CONRAT (1960)		
Myoglobin . . . . .	17 000		KENDREW (1948)	KENDREW (1960)
Hämoglobin . . . . .	68 000	BRAUNITZER (1960)	PERUTZ (1949)	PERUTZ (1960)
Seidenfibroin . . . . .			PAULING (1955)	
Wollkeratin . . . . .			PAULING (1950)	
Kollagen . . . . .			RICH, CRICK (1955)	

<sup>1</sup> Nach Vorträgen in Heidelberg, Februar 1960; Zürich, 9. November 1960; Bonn, Dezember 1960; München, Januar 1961; Karlsruhe, April 1961.

<sup>2</sup> K. LINDERSTRÖM-LANG, *Proteins and Enzymes*, Stanford University Press, 1952, S. 58. B. W. LOW und J. T. EDSALL, *Currents in Biochemical Research*, Interscience, New York 1956, S. 387.

<sup>3</sup> F. SANGER und H. TUPPY, *Biochem. J.* 49 (1951) 463, 481. F. SANGER und E. O. P. THOMPSON, *Biochem. J.* 53 (1953) 353, 366.

<sup>4</sup> C. H. W. HIRS, S. MOORE und W. H. STEIN, *J. Biol. Chem.* 235 (1960) 633.

<sup>5</sup> F. A. ANDERER, H. UHLIG, E. WEBER und G. SCHRAMM, *Nature* 186 (1960) 922. A. TSUGITA, D. T. GISH, J. YOUNG, H. FRAENKEL-CONRAT, C. A. KNIGHT und W. M. STANLEY, *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A.* 46 (1960) 11, 1463.

<sup>6</sup> M. FELL, N. H. LA FRANCE und KL. ZIEGLER, *J. Textile Inst. Trans.* 51 (1960) 797.

<sup>7</sup> W. T. ASTBURY und A. STREET, *Philos. Trans. Roy. Soc. (London)* A 230 (1931) 75.

<sup>8</sup> L. PAULING, R. B. COREY und H. R. BRANSON, *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A.* 37 (1951) 205.

<sup>9</sup> L. PAULING und R. B. COREY, *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A.* 39 (1953) 247.

<sup>10</sup> J. C. KENDREW, R. E. DICKERSON, B. E. STRANDBERG, R. G. HART und D. R. DAVIES, *Nature* 185 (1960) 422.

<sup>11</sup> M. F. PERUTZ, M. G. ROSSMANN, A. F. CULLIS, H. MUIRHEAD, G. WILL und A. C. T. NORTH, *Nature* 185 (1960) 416.

<sup>12</sup> H. STEUERLE, Dissertation Univ. Heidelberg 1957.

Tabelle 1 versucht, einen Überblick über den heutigen Stand der Proteinforschung an einigen ausgewählten Proteinen zu geben.

*Dynamische Proteinchemie*

Das vorliegende Referat beschäftigt sich allerdings nicht mit der Primär-, Sekundär- und Tertiärstruktur der Wolle, sondern mit Beispielen aus der dynamischen Proteinchemie. Es wird gezeigt, wie sich das Protein Wolle unter der Einwirkung von Reagenzien und bei pH-Änderungen chemisch verändert. Diese dynamische Betrachtungsweise ist notwendig, um Vorgänge wissenschaftlich zu klären, die sich bei der Verarbeitung von Wolle in der Industrie und während des Verbrauchs abspielen. Die klassische Textilchemie beschäftigt sich mit den chemischen Vorgängen beim Ausrüsten und Veredeln der Faser. Typische Arbeitsgebiete der chemischen Technologie der Wolle sind z.B. die Rohwollwäsche, das Färben und das Carbonisieren. Man hat sich früher auf die Technologie dieser Vorgänge konzentriert und z.B. untersucht, wie man am zweckmäßigsten das Wollwachs, den Wollschweiß und den Schmutz entfernt. Wie sich die Wollproteine selbst unter der Einwirkung der schwach alkalischen Wollwaschlauge verändern, wurde nicht genügend geklärt. Beim Färben studierte man vor allem die Kräfte zwischen Farbstoff und Faser und weniger die Einwirkung der kochenden Farbstofflotten auf die Wollproteine selbst. Beim Carbonisieren interessierte die erwünschte Zerstörung der Cellulose-Begleitstoffe und die technische Kontrolle der Verfahren, um eine Schädigung der Wollfaser zu vermeiden.

Die heutige Textilchemie der Wolle hat die zusätzliche Aufgabe, die Einzelvorgänge, die sich bei der Veredlung in den Wollproteinen selbst abspielen, aufzuklären. Es stehen hierfür empfindliche Analysenmethoden zur Verfügung, seit die Verteilungschromatographie 1941 und die Papierchromatographie 1944 in den Laboratorien der «Wool Industries Research Association» entdeckt worden sind<sup>13</sup>. Eine weitere Grundlage für eine vertiefte Betrachtungsweise bildet die physikalisch-organische Chemie<sup>14</sup>. So kann man leicht zeigen, daß Wolle verschiedenartige nucleophile Gruppen enthält, die Bestandteile der Seitenketten sind. Tabelle 2 nennt Beispiele für nucleophile Seitenkettengruppen, deren Konzentration in der Wolle in  $\mu\text{Mol/g}$  angegeben ist.

Tabelle 2: Nucleophile Gruppen der Wolle

Nucleophile Seitenkettengruppen	Zugehörige Aminosäure	Mikromole/ Gramm Wolle
Mercaptan . . . . .	Cystein	20 bis 30
Primäres Amin . . . .	Lysin	192
Sekundäres Amin . . .	Histidin	58
Phenol . . . . .	Tyrosin	353
Primäres Hydroxyl . .	Serin	856
Sekundäres Hydroxyl .	Threonin	554

Wolle oder allgemein Proteine können demnach als reaktionsfähige Systeme angesehen werden. Intramolekulare Reaktionen sind unter geeigneten Bedingungen denkbar. Mit einigen dieser Proteinreaktionen beschäftigt sich das vorliegende Referat.

**A. N,O-Peptidylverschiebung**

Unter N,O-Peptidylverschiebung verstehen wir die Öffnung von Peptidbindungen an der Serin- oder Threoninaminogruppe bei gleichzeitiger Bildung von O-Serin- oder Threoninpeptiden, d.h. Estern auf dem Wege der Selbstveresterung. Formal wandert ein ursprünglich an der Aminogruppe des Serins oder Threonins befindlicher Acyl- oder Peptidylrest an den Hydroxylsauerstoff der Seitenkette dieser beiden Aminosäurereste. Diese Reaktion ist ein Spezialfall der schon von E. FISCHER entdeckten Acylwanderung. 1921 fanden M. BERGMANN, E. BRAND und F. DREYER<sup>15</sup> beim Dibenzoylderivat des 1-Amino-2,3-dihydroxypropan eine Wanderung des Benzoylrestes vom Stickstoff zum benachbarten Sauerstoff beim Erhitzen mit  $\text{PCl}_5$ . Eine anschließende Behandlung mit Sodalösung bei Zimmertemperatur führt zur Rückbildung des N-Benzoylderivats, und die Hydroxygruppe am Kohlenstoffatom 2 wird wieder freigelegt. In Tabelle 3 sind einige Beispiele für die N,O-Acylwanderung an niedermolekularen Verbindungen, in Tabelle 4 Beispiele an Proteinen wiedergegeben.

Man nimmt überwiegend an, daß die Peptidylverschiebung über einen Hydroxyoxazolidinring verläuft<sup>16</sup>. Man kann die Bildung des Esterpeptidyls nach einem  $A_{AC}2$ -Mechanismus nach der Abb. 1 formulieren. Allerdings ist es wahrscheinlich richtiger, eine Protonisierung nicht der NH-Gruppe der Peptidbindung, sondern der Carbonylgruppe anzunehmen.

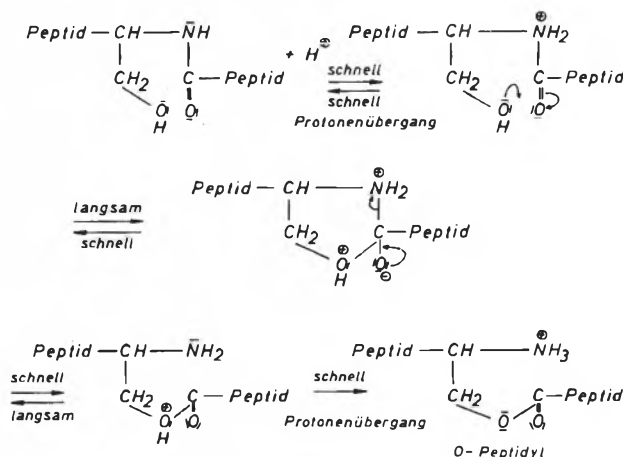


Abb. 1. N → O-Peptidylverschiebung nach dem  $A_{AC}2$ -Mechanismus

<sup>13</sup> R. CONSDEN, A. H. GORDON und A. J. P. MARTIN, *Biochem. J.* 38 (1944) 224. A. J. P. MARTIN und R. I. M. SYNGE, *Biochem. J.* 35 (1941) 1358.  
<sup>14</sup> C. K. INGOLD, *Structure and Mechanism in Organic Chemistry*, G. Bell & Sons, London 1953.  
<sup>15</sup> M. BERGMANN, E. BRAND und F. DREYER, *Ber. dtsch. chem. Ges.* 54 (1921) 936.  
<sup>16</sup> L. A. COHEN und B. WITKOP, *Angew. Chem.* 73 (1961) 253.

Die Rückbildung der Peptidgruppe ist eine Esteramidierung, die nach einem  $B_{AC}2$ -Mechanismus (vgl. Abb. 2) formuliert werden kann.

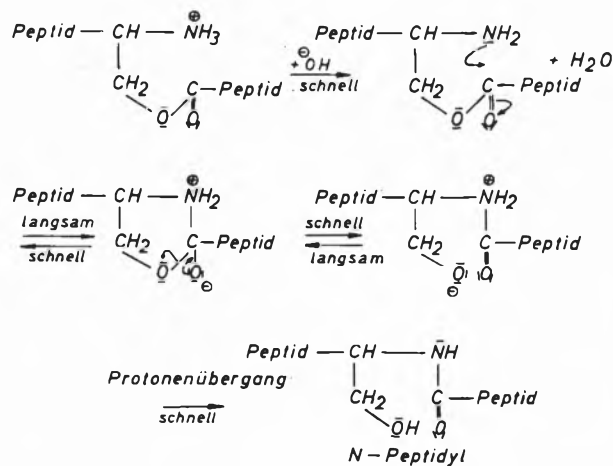


Abb. 2.  $O \rightarrow N$ -Peptidylverschiebung nach dem  $B_{AC}2$ -Mechanismus

Das sicherste analytische Kennzeichen einer Acylwanderung bei Proteinen ist der Nachweis der bei der  $N \rightarrow O$ -Peptidylreaktion freigesetzten Serin- und Threoninaminogruppen und ihr Verschwinden bei der Esteramidierung. Mit Hilfe des Reagenzes nach SANGER<sup>17</sup>, 1-Fluor-2,4-dinitrobenzol, ist es leicht, die Konzentration der endständigen Aminogruppen eines Proteins zu bestimmen. Diese Methode wurde von D. F. ELLIOTT<sup>18</sup> zum Studium der Acylwanderung beim Seidenfibroin angewendet. In Abänderung der Dinitrophenylierungsvorschrift von SANGER muß man allerdings nach ELLIOTT bei  $pH$  5 dinitrophenylieren, weil bei  $pH$  8 die Esteramidierung bereits zum Abschluß gekommen ist und keine freien Serin- und Threoninaminogruppen mehr nachweisbar sind.

Beim Carbonisieren von mit pflanzlichen Resten belegter Waschwolle oder von cellulosefaserhaltigen Tüchern wird mit etwa 5prozentiger Schwefelsäure imprägniert, abgeschleudert, getrocknet, und die Wolle, welche 4 bis 8 Gewichtsprozent Schwefelsäure enthält, in Brennöfen auf Temperaturen zwischen 100 und 125°C erhitzt.

Es war naheliegend, anzunehmen, daß unter diesen Bedingungen auch bei Wolle eine Acylwanderung stattfindet<sup>19</sup>. Um diese nachzuweisen, wurden in einer Carbonisieranstalt Muster von Buenos-Aires-Wolle direkt von den einzelnen Maschinen entnommen, und zwar:

- 1 = Rohwolle
- 2 = nach dem Waschen mit Seife und Soda,
- 3/0 = nach dem Brennen,
- 4 = nach dem Spülen mit Wasser,
- 5 = nach dem Entsäuern,
- 3/9 = nach dem Neutralisieren.

<sup>17</sup> F. SANGER, *Biochem. J.* 39 (1945) 507.

<sup>18</sup> D. F. ELLIOTT, *Biochem. J.* 50 (1952) 542.

<sup>19</sup> H. ZAHN und E. HILLE, *Z. Naturforsch.* 13b (1958) 824. E. HILLE, *Melliand Textilber.* 40 (1959) 893. H. ZAHN, *J. Soc. Dyers Colourists* 76 (1960) 226. E. HILLE und H. ZAHN, *J. Textile Inst. Trans.* 51 (1960) 1162.

Die Muster wurden bei  $pH$  5 dinitrophenyliert. Die gelbgefärbten DNP\*-Wollpräparate wurden hydrolysiert, das

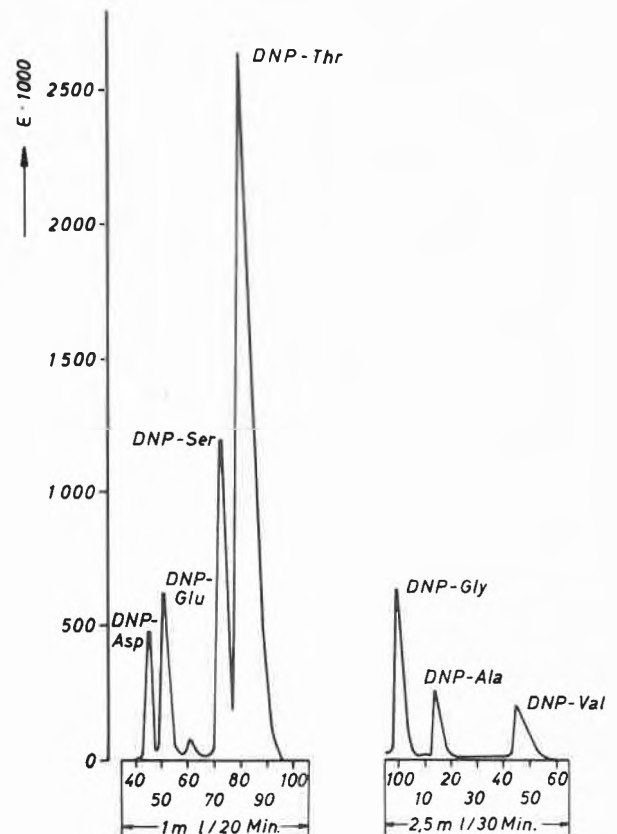


Abb. 3. Ätherlösliche DNP-Aminosäuren im Hydrolysat dinitrophenylierter ( $pH$  8) unbehandelter Wolle, nach H. STEUERLE und E. HILLE<sup>20</sup>

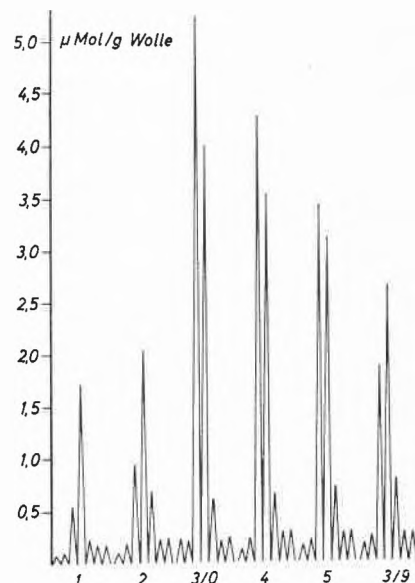
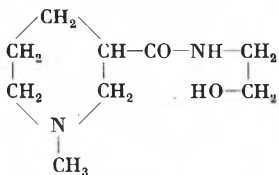
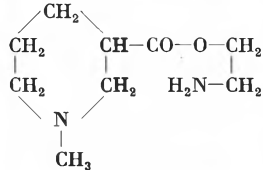


Abb. 4. Ätherlösliche DNP-Aminosäuren im Hydrolysat von Industriemustern nach Dinitrophenylierung bei  $pH$  5, nach E. HILLE und H. ZAHN<sup>19</sup>

\* DNP = Abkürzung für Dinitrophenyl.

Tabelle 3: Beispiele für N,O-Acylwanderung bei niedermolekularen Verbindungen

N-Acylform	O-Acylform	Literatur
$\begin{array}{c} \text{H}_2\text{C} - \text{CH} - \text{CH}_2 \\   \quad   \quad   \\ \text{O} \quad \text{OH} \quad \text{NH} \\   \quad   \quad   \\ \text{CO}-\text{C}_6\text{H}_5 \quad \text{CO}-\text{C}_6\text{H}_5 \\ (\text{Soda}, 20^\circ) \end{array}$	$\begin{array}{c} \text{H}_2\text{C} - \text{CH} - \text{CH}_2 \\   \quad   \quad   \\ \text{O} \quad \text{O} \quad \text{NH}_2 \\   \quad   \quad   \\ \text{CO}-\text{C}_6\text{H}_5 \quad \text{CO}-\text{C}_6\text{H}_5 \\ (\text{PCl}_5, 100^\circ, 2 \text{ Min.}) \end{array}$	M. BERGMANN, E. BRAND und F. DREYER, <i>Ber. dtsh. chem. Ges.</i> 54 (1921) 936
$\begin{array}{c} \text{H}_2\text{C} - \text{CH} - \text{CH}_2 - \text{COOH} \\   \quad   \\ \text{NH} \quad \text{OH} \\   \quad   \\ \text{CO}-\text{C}_6\text{H}_5 \\ (2 \text{ Mol Alkali}, 20^\circ) \end{array}$	$\begin{array}{c} \text{H}_2\text{C} - \text{CH} - \text{CH}_2 - \text{COOH} \\   \quad   \\ \text{NH}_2 \quad \text{O} \\   \quad   \\ \text{CO}-\text{C}_6\text{H}_5 \\ (\text{SOCl}_2, 20^\circ, 5\text{-}n \text{ HCl}, 60^\circ) \end{array}$	M. BERGMANN, E. BRAND und F. WEINMANN, <i>Hoppe Seyler's Z. physiol. Chem.</i> 131 (1923) 1
$\begin{array}{c} \text{H}_2\text{C} - \text{CH} - \text{COOCH}_3 \\   \quad   \\ \text{OH} \quad \text{NH} \\   \quad   \\ \text{CO}-\text{CH}_2-\text{NH}_2 \\ (\text{Alkali}, 20^\circ) \end{array}$	$\begin{array}{c} \text{H}_2\text{C} - \text{CH} - \text{COOCH}_3 \\   \quad   \\ \text{O} \quad \text{NH}_2 \\   \quad   \\ \text{CO}-\text{CH}_2-\text{NH}_2 \\ (\text{SOCl}_2, 20^\circ) \end{array}$	M. BERGMANN und A. MIEKELEY, <i>Hoppe Seyler's Z. physiol. Chem.</i> 140 (1924) 128
	 (HCl in Alkohol, Siedetemperatur)	A. P. PHILLIPS und R. BALTZLY, <i>J. Amer. Chem. Soc.</i> 69 (1947) 200
$\begin{array}{c} \text{H}_2\text{C} - \text{CH} - \text{COOH} \\   \quad   \\ \text{OH} \quad \text{NH} \\   \quad   \\ \text{CO}-\text{CH}_2-\text{NH}_2 \\ \text{in NaOH (pH 7,5)} \end{array}$	$\begin{array}{c} \text{H}_2\text{C} - \text{CH} - \text{COOH} \\   \quad   \\ \text{O} \quad \text{NH}_2 \\   \quad   \\ \text{CO}-\text{CH}_2-\text{NH}_2 \\ (100\% \text{ H}_2\text{SO}_4, 25^\circ) \end{array}$	J. A. MOORE, J. R. DICE, E. D. NICOLAIDES, R. D. WESTLAND und E. L. WITTLE, <i>J. Amer. Chem. Soc.</i> 76 (1954) 2884
$\begin{array}{c} \text{CH}_2 - \text{CH} - \text{COOH} \\   \quad   \\ \text{OH} \quad \text{NH} \\   \quad   \\ \text{CO}-\text{CH}_3 \\ (10\% \text{ NH}_3, 20^\circ) \end{array}$	$\begin{array}{c} \text{CH}_2 - \text{CH} - \text{COOH} \\   \quad   \\ \text{O} \quad \text{NH}_2 \\   \quad   \\ \text{CO}-\text{CH}_3 \end{array}$	K. NARITA, <i>J. Amer. Chem. Soc.</i> 81 (1959) 1751
$\begin{array}{c} \text{CH}_2 - \text{CH} - \text{CO} - \text{Gly} - \text{Gly} - \text{OH} \\   \quad   \\ \text{OH} \quad \text{NH} \\   \quad   \\ \text{CO}-\text{CH}_3 \\ (\text{pH 7,8}) \end{array}$	$\begin{array}{c} \text{CH}_2 - \text{CH} - \text{CO} - \text{Gly} - \text{Gly} - \text{OH} \\   \quad   \\ \text{O} \quad \text{NH}_2 \\   \quad   \\ \text{CO}-\text{CH}_3 \end{array}$	L. BENOITON und H. N. RYDON, <i>J. Chem. Soc. (London)</i> 3328 (1960)

Hydrolysat ausgeäthert und die im Ätherauszug befindlichen gelben Dinitrophenylaminosäuren nach H. STEUERLE und E. HILLE<sup>20</sup> an einer Nylonpulversäule chromatographiert. Abb. 3 zeigt ein Nylon-Chromatogramm der ätherlöslichen DNP-Aminosäuren eines Hydrolysates von dinitrophenylierter unbehandelter Wolle. Man erkennt, daß in Wolle die Aminosäuren Asparaginsäure, Glutaminsäure, Serin, Threonin, Glycin, Alanin und Valin N-terminale Gruppen bilden.

<sup>20</sup> H. STEUERLE und E. HILLE, *Biochem. Z.* 331 (1959) 220.

In Abb. 4 ist das Säulenchromatogramm der DNP-Aminosäuren aus den Hydrolysaten der bei pH 5 dinitrophenylierten sechs Muster aus der Carbonisieranstalt in vereinfachter Weise wiedergegeben. Die Industriemuster liefern dieselben DNP-Aminosäuren, jedoch in abweichenden Proportionen. In Waschwolle (Nr. 2) ist die Konzentration des N-terminalen Glycin gegenüber der Rohwolle (Nr. 1) auffallend erhöht. In der gebrannten Wolle (Nr. 3/0) ist die Konzentration der Serin- und Threoninaminogruppen stark erhöht, während die Zahl der übrigen Endgruppen sich praktisch nicht verändert

Tabelle 4: Beispiele für N,O-Acylwanderung bei Proteinen

Protein	Umlagerungsbedingung		Literatur
	N → O	O → N	
Seidenfibroin	Hydrolyse mit 10-n HCl bei 37°	—	P. DESNUELLE und A. CASAL, <i>Biochim. Biophys. Acta</i> 2 (1948) 64 P. DESNUELLE und G. BONJOUR <i>Biochim. Biophys. Acta</i> 7 (1951) 451
Seidenfibroin Lysozym	Konz. H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> ; 21° 3 Tage	pH 9; 21°	D. F. ELLIOTT, <i>Biochem. J.</i> 50 (1952) 542 <i>Ciba Foundation Symposium on the Chemical Structure of Proteins</i> (1953)
Insulin	Veresterung mit Säurekatalyse	—	A. C. CHIBNALL und M. W. REES, <i>Ciba Foundation Symposium on the Chemical Structure of Proteins</i> (1953)
Gluten	100 % H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> 24 Stdn. bei -20° + 5 Tage bei +20°	—	L. WISEBLATT, L. WILSON und W. B. McCONNELL, <i>Can. J. Chem.</i> 33 (1955) 1295
Gliadin	H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> ; 0°; 24 Std. (Umlagerung 60–70 %)	—	L. K. RAMACHANDRAN und W. B. McCONNELL, <i>Can. J. Chem.</i> 33 (1955) 1638
Kristalliner Bereich des Seidenfibroins	Konz. H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> ; 27° 100 % H <sub>3</sub> PO <sub>4</sub> ; 40°	—	F. LUCAS, J. T. B. SHAW und S. G. SMITH, <i>Biochem. J.</i> 66 (1957) 468
Wolle	Carbonisieren	Neutralisieren	H. ZAHN und E. HILLE, <i>Z. Naturforsch.</i> 13b (1958) 824

hat. Damit ist eines der analytischen Merkmale einer N→O-Acylwanderung – nämlich die spezifische Bildung von Serin- und Threoninaminogruppen – erfüllt. Man erkennt ferner, daß beim Spülen mit Wasser (Nr. 4), beim Entsäuern (Nr. 5) und vor allem beim Neutralisieren (Nr. 3/9) die Konzentration der Serin- und Threoninogruppen wieder abnimmt. Es ergibt sich eine klare Funktion zwischen der pH-Zunahme der Wolle beim Spülen, Entsäuern und Neutralisieren und der Abnahme der Konzentration der Serin- und Threoninaminogruppen (vgl. Abb. 5). Wir finden demnach, daß zur Rückbildung der Peptidbindungen Wolle gründlich entsäuert und sogar ins schwach alkalische Milieu gebracht werden muß.

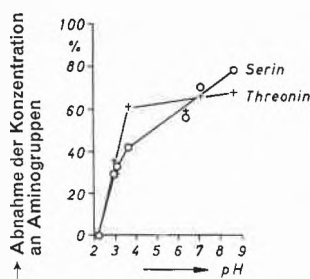


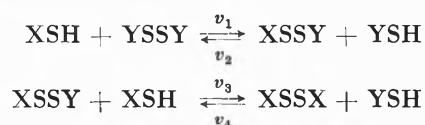
Abb. 5. Abnahme der Konzentration der freien Serin- und Threoninaminogruppen in Abhängigkeit vom pH-Wert, auf welchen carbonisierte Wolle durch Spülen und Neutralisieren eingestellt wird, nach E. HILLE und H. ZAHN<sup>19</sup>

Die praktische Anwendung dieser proteinchemischen Arbeit ist der Rat an die Carbonisieranstalten, nicht nur zu entsäuern, sondern richtig zu neutralisieren, um möglichst viele der für die Festigkeit der Wolle wesentlichen Peptidbindungen zu regenerieren. Soda kann nicht länger lediglich als ein Neutralisationsmittel für die Carbonisiersäure aufgefaßt werden, sondern ist wesentlich zur Einleitung und Vervollständigung der Rückbildungsreaktion der Peptidylverschiebung.

Läßt man gebrannte Wolle ohne Spülen, Entsäuern und Neutralisieren unter der Einwirkung der normalen Luftfeuchtigkeit lagern, so beobachtet man einen progressiven Abbau der Wollproteine, erkennbar an einer Zunahme der Alkalilöslichkeit und der Konzentration an freien Aminogruppen.

#### B. Disulfidaustausch

Unter Disulfidaustausch oder genauer Thiol-Disulfid-Austausch versteht man die Substitution eines Mercaptanrestes in einem Disulfid durch ein anderes Mercaptan, etwa nach dem folgenden Schema nach L. ELDJARN<sup>21</sup>:



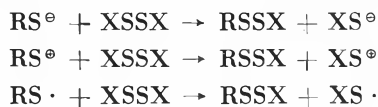
$$K_1 = \frac{kv_1}{kv_2}; \quad K_2 = \frac{kv_3}{kv_4}$$

<sup>21</sup> L. ELDJARN und A. PIHL, *Acta Chem. Scand.* 10 (1956) 1054.

Ein Disulfidaustausch im System Cystin + Thioglykolsäure wurde 1938 von THEODOR BERSIN und JULIANE STEUDEL<sup>22</sup> im Physiologischen Institut der Universität Marburg aufgefunden. Es gelang ihnen der Nachweis, daß es die Mercaptidanionen RS<sup>⊖</sup> sind, welche mit dem Disulfid reagieren. In der heutigen Formulierung – man vergleiche den Handbuchaufsatz von A. J. PARKER und N. KHARASCH<sup>23</sup> – kann man sagen, daß die stärkere Base die schwächere aus ihrer Disulfidbindung verdrängt.



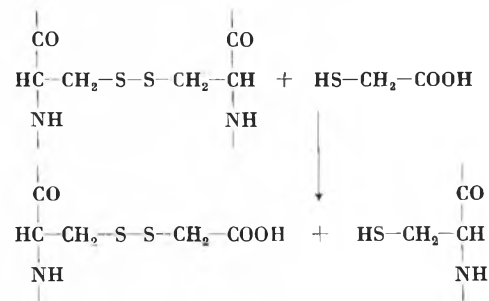
1953 entdeckte F. SANGER<sup>24</sup>, daß es auch einen Disulfid-austausch im stark sauren Gebiet gibt, der demnach sicher nicht von Mercaptidanionen ausgehen kann. Nach R. E. BENESCH und R. BENESCH<sup>25</sup> reagieren im stark sauren Gebiet Sulfoniumkationen, die sich aus Disulfiden und Mineralsäuren bilden können. Wir unterscheiden nach R. E. BENESCH und R. BENESCH drei Typen von Thiol-Disulfid-Austauschreaktionen nach dem Zustand des angreifenden Thiols: Anion, Kation oder Radikal:



In der Wollchemie werden Thiol-Disulfid-Austauschreaktionen seit der Arbeit von R. W. BURLEY<sup>26</sup> mehrfach zur Erklärung des Verhaltens beim Dehnen, Schrumpfen, Altern usw. herangezogen. Es ist jedoch bisher nicht gelungen, derartige Reaktionen, die in Wolle intramolekular ablaufen, mit Sicherheit nachzuweisen. Zwar enthält Wolle 20 bis 40 μMole Cystein und 500 μMole Cystin pro Gramm (vgl. Tabelle 5), so daß eine Thiol-Disulfid-Austauschreaktion im Innern der Wollproteine durchaus möglich ist, doch kann man die bei der intramolekularen Disulfidaustauschreaktion in den

Wollproteinen gebildeten gemischten Disulfide derzeit noch nicht aufklären, da ja die Primärstruktur der Wollproteine noch unbekannt ist.

Wir kennen jedoch gesicherte Beispiele sowohl für eine alkalisch wie sauer katalysierte Thiol-Disulfid-Austauschreaktion bei Wolle. P. H. SPRINGELL<sup>27</sup> sowie A. SCHÖBERL und H. GRÄFJE<sup>28</sup> übertrugen den Mechanismus des Disulfidaustausches auf die Reaktion von Thioglykolsäure mit Woll- bzw. Haarkeratin.



Das gemischte Disulfid wurde von SCHÖBERL und GRÄFJE<sup>28</sup> in Thioglykolsäure-behandelten Haaren papierchromatographisch nachgewiesen.

Besprüht man Wolle mit einer 2prozentigen Ammoniumthioglykolatlösung, legt das Gewebe in Falten und dämpft anschließend auf einer Dampfbügelpresse etwa 15 bis 20 Sekunden unter Druck, so erhält man eine dauerhafte Bügelfalte (SI-RO-SET-Verfahren), die selbst von Wasser nicht gelöst wird<sup>27</sup>. Man kann beweisen, daß auch hier das gemischte Disulfid gebildet wird, indem man ein mit Methanol extrahiertes SI-RO-SET-Gewebe mit 6-normaler Salzsäure bei 105 °C 24 Stunden totalhydrolysiert und ein Papierchromatogramm anfertigt. Nach Abb. 6 enthält das Muster SI-RO-SET A<sub>2</sub> im Hydrolysat neben Cystin einen deutlichen Fleck für das gemischte Disulfid mit dem R<sub>F</sub>-Wert 0,52.

Tabelle 5: Makromolekulare Mercaptane und Disulfide

Name	Mol.-Gew.	Cystein		Cystin	
		μMole/Gramm			
Insulin (Rind) . . . . .	5 733	–	–	520	–
Hämoglobin . . . . .	68 000	88	–	–	–
Eialbumin . . . . .	40 000	125	–	25	–
Rinderserumalbumin . . . . .	69 000	10	–	260	–
Rinder-Gamma-Globulin . . . . .	150 000	60	–	100	–
Myosin . . . . .	850 000	70	–	6	–
Fibrinogen . . . . .	330 000	30	–	90	–
Federkeratin . . . . .	10 000	–	–	400	–
Wollkeratin . . . . .		20–40	–	500	–

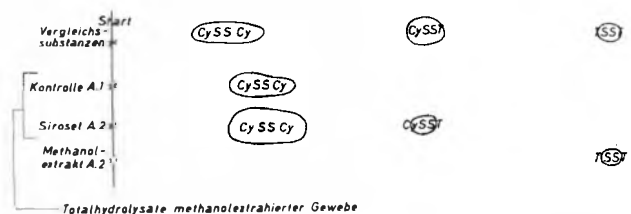


Abb. 6. Papierchromatographischer Nachweis von gemischtem Disulfid CySSCy in SI-RO-SET-behandelten Wollgeweben, nach T. GERTHSEN und H. ZAHN<sup>29</sup>

Im Rahmen dieser gemeinsam mit Frau T. GERTHSEN ausgeführten Untersuchung wurde auch ein Beispiel für sauer katalysierten Disulfidaustausch gefunden<sup>29</sup>. Erhitzt man Wolle gemeinsam mit Dithiodiglykolsäure in 6- oder 12-normaler Salzsäure 24 Stunden auf 105 °C, so

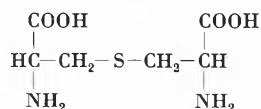
<sup>22</sup> TH. BERSIN und J. STEUDEL, *Ber. dtsh. chem. Ges.* 71 (1938) 1015.  
<sup>23</sup> A. J. PARKER und N. KHARASCH, *Chem. Rev.* 59 (1959) 583.  
<sup>24</sup> A. P. RYLE und F. SANGER, *Biochem. J.* 60 (1955) 535; F. SANGER, *Nature* 171 (1953) 1025.  
<sup>25</sup> R. E. BENESCH und R. BENESCH, *J. Amer. Chem. Soc.* 80 (1958) 1666.  
<sup>26</sup> R. W. BURLEY, *Proceedings of the International Wool Textile Research Conference, Australia 1955*, Vol. D, S. 88.

<sup>27</sup> P. H. SPRINGELL, *Textile Res. J.* 28 (1958) 874.  
<sup>28</sup> A. SCHÖBERL und H. GRÄFJE, *Fette, Seifen, Anstrichmittel* 60 (1958) 1057.  
<sup>29</sup> T. GERTHSEN und H. ZAHN, *Melliand Textilber.* 41 (1960) 757.

verschwindet die Dithiodiglykolsäure restlos, und das gemischte Disulfid kann im Hydrolysat der Wolle eindeutig nachgewiesen werden. Erst wenn man einen Überschuß an Dithiodiglykolsäure, bezogen auf das Wollcystin, einsetzt, bleibt freie Dithiodiglykolsäure nach der sauren Hydrolyse der Wolle übrig.

### C. Lanthioninbildung

1941 isolierten M. J. HORN, D. B. JONES und S. J. RINGEL<sup>30</sup> Mesolanthionin aus einem Säurehydrolysat von Wolle, die zuvor mit Sodalösung gekocht worden war.



Lanthionin

In der Folgezeit konnte Lanthionin unter anderem nach Einwirkung von Sodalösung auf Menschenhaar, Hühnerfedern und Lactalbumin<sup>31</sup>, nach Behandlung von Insulin<sup>32</sup> mit Sodalösung oder *n*/30 Natronlauge und nach Reaktion von Wolle mit Natronlauge oder Natriumsulfidlösung erhalten werden<sup>31, 33</sup>. Schon 1929 hatten W. KÜSTER und W. IRION<sup>34</sup> eine Thioätherdiaminodicarbonsäure aus mit Natriumsulfid behandelter Wolle isoliert, die – wie später IRION 1950 zeigte<sup>35</sup> – Lanthionin gewesen ist. Aus Wolle ließ sich auch nach Vorbehandlung mit konzentriertem Ammoniak (A. SCHÖBERL<sup>36</sup>) Kaliumcyanidlösung und verschiedenen Pufferlösungen (CUTHBERTSON und PHILLIPS<sup>37</sup>) Lanthionin isolieren. Die Geschwindigkeit der Bildung nimmt mit der Temperatur und steigendem pH-Wert zu<sup>37, 38</sup>. Im Hydrolysat desaminiertes Wolle, die mit schwach alkalischen Pufferlösungen behandelt worden war, konnte Lanthionin papierchromatographisch nachgewiesen werden<sup>39</sup>.

Bis 1955 war es noch nicht gelungen, Cystin in Lanthionin im Modellversuch umzuwandeln. ALEXANDER und HUDSON<sup>40</sup> nahmen an, daß die Disulfidbindung in Wolle in einer völlig anderen Weise als die Disulfidbindung in einfachen Verbindungen reagiert. 1955 fanden SCHÖBERL und WAGNER<sup>41</sup>, daß beim Erhitzen von

Cystin mit Cystein in Soda- oder Bariumhydroxydlösung und bei der Einwirkung von Zinkstaub auf Cystin in 3-normaler Natronlauge Lanthionin gebildet wird. Es konnte gezeigt werden, daß die Thioätherbildung auch beim Erhitzen von Cystein in Bariumhydroxydlösung und bei der Einwirkung von 5prozentiger Sodalösung auf Cystin bei 110°C stattfindet. SWAN<sup>42</sup> gelang der Nachweis einer Lanthioninbildung aus Cystin und zahlreichen Derivaten, beispielsweise Bis-carbobenzoxy-L-cystin-dihydrazid, nach dreistündigem Erhitzen in 0,1-normaler Sodalösung (pH 11) oder 0,2-normaler Natriumcyanidlösung (pH 10,1) auf 100°C.

Aus diesen und anderen Arbeiten konnte man den Eindruck gewinnen, daß für die Lanthioninbildung aus Wolle, Peptiden und Cystin eine Einwirkung alkalisch reagierender Lösungen wesentlich ist.

#### 1. Lanthioninbildung aus Cystin und thiophilen Reagenzien

Die Zersetzung von Disulfiden bei Einwirkung von Alkalien ist nur eine der zahlreichen bekannten Abbaureaktionen. PARKER und KHARASCH<sup>23</sup> haben z.B. in ihrem Handbuchaufsatz «The Scission of the Sulfur-Sulfur Bond» folgende nucleophile Substitutionsreaktionen am Disulfidschwefel zusammengestellt:

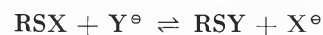


Tabelle 6: Y-Gruppen mit abnehmender S-Nucleophilie

AsO(OH) <sub>2</sub> <sup>⊖</sup> , PO(OR) <sub>2</sub> <sup>⊖</sup>	OH <sup>⊖</sup>
P(OR) <sub>3</sub> , RAsO(OH) <sup>⊖</sup>	HOOC · CH <sub>2</sub> · S <sup>⊖</sup>
R <sub>3</sub> N	RSO <sub>2</sub> <sup>⊖</sup>
RCH <sub>2</sub> S <sup>⊖</sup>	S <sub>2</sub> O <sub>3</sub> <sup>2⊖</sup>
R <sub>3</sub> P, R <sub>3</sub> As	RSO <sub>2</sub> S <sup>⊖</sup>
C <sub>6</sub> H <sub>5</sub> S <sup>⊖</sup> , CN <sup>⊖</sup>	SCN <sup>⊖</sup>
SO <sub>3</sub> <sup>2⊖</sup>	

Betrachtet man die Tabelle vom Standpunkt der Lanthioninbildung aus Cystin, so findet man zwei Reagenzien, Cyanid- und Hydroxytionen, wieder, deren lanthioninbildende Wirkung bekannt ist. Wir gelangten zu der Arbeitshypothese, ob nicht allgemein Reagenzien, die Cystein aus Cystin freisetzen, in der Lage sind, Lanthionin zu bilden.

In der angeführten Arbeit von SCHÖBERL und WAGNER<sup>41</sup> wurde z.B. eine starke Lanthioninbildung beim gemeinsamen Erhitzen von Cystin und Cystein mit Barytlauge gefunden. In Anbetracht der starken S-Nucleophilie des Mercaptans Cystein war es naheliegend, anzunehmen, daß hier nicht das System Cystin + Barytlauge allein, sondern die zusätzliche Anwesenheit von Cystein von Bedeutung ist.

Tatsächlich konnte gemeinsam mit H. W. KEUPER<sup>43</sup> gezeigt werden, daß sich beim Erhitzen von Cystin oder

<sup>30</sup> M. J. HORN, D. B. JONES und S. J. RINGEL, *J. Biol. Chem.* 138 (1941) 141.

<sup>31</sup> M. J. HORN, D. B. JONES und S. J. RINGEL, *J. Biol. Chem.* 144 (1942) 87 und 93.

<sup>32</sup> V. DU VICNEAUD, G. B. BROWN und R. W. BONSNES, *J. Biol. Chem.* 141 (1941) 707.

<sup>33</sup> M. J. HORN und D. B. JONES, *J. Biol. Chem.* 139 (1941) 473.

<sup>34</sup> W. KÜSTER und W. IRION, *Hoppe Seyler's Z. physiol. Chem.* 184 (1929) 225.

<sup>35</sup> W. IRION, *Hoppe Seyler's Z. physiol. Chem.* 286 (1950) 241.

<sup>36</sup> A. SCHÖBERL, *Biochem. Z.* 313 (1942) 214; A. SCHÖBERL, *Ber. dtsh. chem. Ges.* 76 (1943) 970.

<sup>37</sup> W. R. CUTHBERTSON und H. PHILLIPS, *Biochem. J.* 39 (1945) 7.

<sup>38</sup> S. BLACKBURN und G. R. LEE, *Biochim. Biophysica Acta* 19 (1956) 505.

<sup>39</sup> R. COCKBURN, B. DRUCKER und H. LINDLEY, *Biochem. J.* 43 (1948) 438.

<sup>40</sup> P. ALEXANDER und R. F. HUDSON, *Wool: Its Chemistry and Physics*, Chapman & Hall, London 1954, S. 257.

<sup>41</sup> A. SCHÖBERL und A. WAGNER, *Proceedings of the International Wool Textile Research Conference, Australia 1955*, Vol. C, S. 11.

<sup>42</sup> J. M. SWAN, *Proceedings of the International Wool Textile Research Conference, Australia 1955*, Vol. C, S. 25.

<sup>43</sup> H. W. KEUPER, Diplomarbeit, Abteilung Chemie, TH Aachen 1960.

Cystein *allein* mit 10prozentiger Sodalösung unter Stickstoff im siedenden Wasserbad kein Lanthionin bildet. Cystin wird unter diesen Bedingungen noch nicht verändert, die Zersetzung beginnt nach E. GOLSCH<sup>44</sup> erst beim Erhitzen bei pH-Werten oberhalb von 11. Cystein ist im stark alkalischen Gebiet (pH 14) beständiger als Cystin, weil es unter diesen Bedingungen zwei negative Ladungen trägt, die das Molekül gegen den Angriff der OH-Ionen schützen. Gemeinsam mit E. GOLSCH wurde nun gefunden, daß Cystein im schwach alkalischen Gebiet zersetzlicher ist als Cystin. Das Maximum der Zersetzung liegt zwischen pH 8 und 9,5; hier werden drei bis 4 Mol-Prozente Schwefelwasserstoff abgespalten (vgl. Abb. 7). Wir erklären diesen Befund durch das Dissoziationsgleichgewicht der Mercaptan- und Ammoniumgruppe, deren pK-Werte bei etwa 8,5 liegen<sup>45</sup>. In diesem pH-Gebiet ist Cystein nur noch einfach negativ geladen und daher gegen den Angriff von Hydroxylionen weniger geschützt.

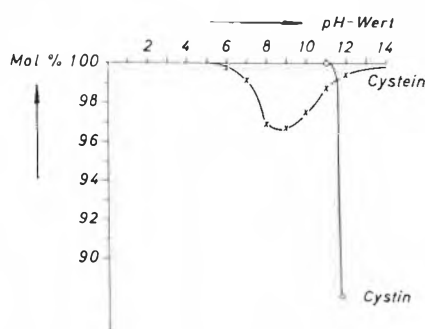


Abb. 7. pH-Abhängigkeit der Zersetzung von Cystein (×-×-×) und Cystin (—) bei 100°C, 1 Stunde, nach E. GOLSCH<sup>44</sup>

Erhitzt man jedoch Cystin und Cystein gemeinsam 6 Stunden auf 100°C, so findet man in einem pH-Bereich von 7 bis 10 sowohl beim Molverhältnis 1:1 wie 10:1 nach Versuchen mit H. W. KEUPER<sup>43</sup> Lanthionin. Die Reaktionslösung ist gelb gefärbt, Schwefelwasserstoff wird schon während der Reaktion, besonders aber beim Ansäuern entwickelt, außerdem wird beim Ansäuern freier Schwefel abgeschieden. Der schon von SCHÖBERL und WACNER<sup>41</sup> gefundene, jedoch nicht identifizierte ninhydrinpositive Fleck erweist sich bei der elektrophoretischen Prüfung als ein Gemisch saurer Aminosäuren, darunter Asparagin- und Glutaminsäure.

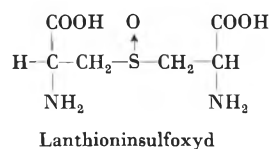
Ferner wurde Cystin mit Thioglykolsäure unter ähnlichen Bedingungen umgesetzt und wiederum Lanthioninbildung im pH-Gebiet 8 bis 12 festgestellt. Die Lanthioninbildung aus Cystin und Thioglykolsäure wurde vor uns bereits von J. M. SWAN erwähnt<sup>46</sup>. Lanthionin wird auch gebildet, wenn man Cystin in einer

1-normalen Äthylaminlösung 6 Stunden lang unter Einleiten von Schwefelwasserstoff im siedenden Wasserbad erhitzt. Die Reaktion zwischen Cystin, Cystein und Äthylamin wurde von ELLIOTT, ASQUITH und HOBSON<sup>47</sup> erstmalig studiert.

Erhitzen von Cystin in 2prozentiger Natriumsulfid-lösung bei pH 8 führt zur Bildung von Lanthionin. Eine derartige Reaktion war bisher nicht bekannt.

Durch diese Versuche wurde die eingangs erwähnte Hypothese, wonach Reagenzien, welche aus Cystin Cystein freisetzen, zur Bildung von Lanthionin führen, stark gestützt. Es war daher naheliegend, nunmehr auch Umsetzungen im sauren Milieu zu studieren. So wurde gefunden, daß sich beim gemeinsamen Erhitzen von Cystin und Cystein bei pH-Werten zwischen 7 und 0,5 Lanthionin bildet. Die Lanthioninbildung zeigt ein Minimum bei pH 2, bei pH 0,5 ein Maximum. Cystin und Cystein geben bereits allein in 6-normaler Salzsäure erhitzt wenig Lanthionin, was im Falle des Cysteins vielleicht analog zur bekannten sauer katalysierten Ätherbildung aus 2 Molekülen Alkohol erklärt werden kann. Die Reaktion zwischen Cystin und Thioglykolsäure bei pH 2,5 führte zur Bildung von Lanthionin neben dem gemischten Disulfid.

Entscheidend für diese Untersuchungen war der Nachweis von Lanthionin neben einem größeren Überschuß an Cystein und Cystin sowie den übrigen im Proteinhydrolysat vorhandenen Aminosäuren. Diese Analysenmethode<sup>48</sup> stützt sich auf das 1955 von zwei verschiedenen Arbeitskreisen erstmalig in Substanz dargestellte Monoxyd des Lanthionins, das Lanthioninsulfoxyd<sup>41, 49</sup>.



Der  $R_f$ -Wert des Sulfoxyds ist von dem der Cysteinsäure genügend verschieden, um eine qualitative und quantitative Analyse zu ermöglichen. Das in einem Proteinhydrolysat oder im Cystin-Reaktionsgemisch nachzuweisende Lanthionin wird dadurch in das Sulfoxyd übergeführt, daß man auf der Startlinie des Papierchromatogramms mit  $\text{H}_2\text{O}_2$  oxydiert. Cystin bildet Cysteinsäure, Lanthionin das Sulfoxyd. Bei der anschließenden Papierchromatographie in dem Lösungsmittelgemisch *n*-Butanol-Eisessig-Wasser (4:1:5) wandert das Sulfoxyd am langsamsten, es folgen die Cysteinsäure und dann erst die übrigen Aminosäuren.

<sup>44</sup> E. GOLSCH, unveröffentlichte Versuche im Rahmen einer Dissertationsarbeit.

<sup>45</sup> R. E. BENESCH und R. BENESCH, *J. Amer. Chem. Soc.* 77 (1955) 5877.

<sup>46</sup> J. M. SWAN, *Sulfur in Proteins*, Proceedings of the Symposium of Falmouth (Mass.), Academic Press, New York 1959, S. 4.

<sup>47</sup> R. L. ELLIOTT, R. S. ASQUITH und M. A. HOBSON, *J. Soc. Dyers Colourists* 74 (1958) 859.

<sup>48</sup> G. DECROIX und G. MAZINGUE, Fédération Lanrière Internationale, Commission Technique, *Rapport N° 11*, Paris 1957; *Bull. Inst. Text. France* 73 (1958) 41; *Bull. Trim. C.T.C.R.S.* 38 (1958) 5.

<sup>49</sup> H. ZAHN und F. OSTERLOH, *Proceedings of the International Wool Textile Research Conference, Australia 1955*, Vol. C, S. 144; *Liebigs Ann. Chem.* 595 (1955) 237.



Das auf diese Weise abgetrennte Sulfoxyd wird mit Zitratpuffer bei pH 3,25 eluiert, das Eluat mit Ninhydrin in Eisessig erhitzt und colorimetriert. Man kann mit dieser Methode noch Lanthioningehalte in Proteinen unter 0,1% bestimmen.

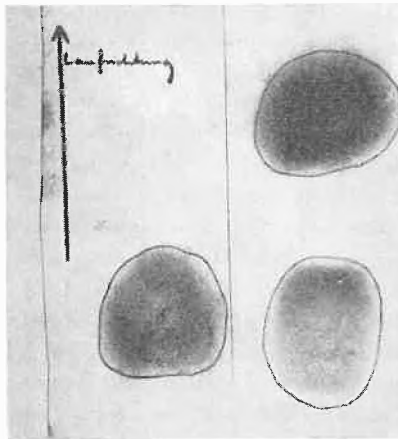


Abb. 8. Papierchromatogramm von Lanthioninsulfoxyd (links) und einem Gemisch von Lanthioninsulfoxyd und Cysteinsäure (Butanol-Eisessig-Wasser 4:1:5, 72 Stunden) nach B. KAFFER<sup>50</sup>

Eine andere Analysenmethode ist das Arbeiten mit Radioisotopen. Gemeinsam mit H. W. KEUPER<sup>51</sup> wurde die Reaktion zwischen inaktivem Cystein und am Schwefel markiertem Cystin bei pH 9 und 37°C sowie 100°C studiert. Die Konzentration des radioaktiven Cystin sinkt durch Disulfidaustausch mit dem inaktiven Cystein rasch ab, dafür entstehen radioaktives Cystein und gleichzeitig radioaktives Lanthionin. Radioaktives Cystein und Buntessalz bilden in gleichzeitiger Reaktion Cystin und Lanthionin<sup>52</sup>.

Zusammenfassend ergibt sich aus den geschilderten Versuchen, daß sich immer dann Lanthionin aus Cystin bildet, wenn dieses Disulfid mit S-nucleophilen Reagenzien umgesetzt wird.

<sup>50</sup> B. KAFFER, Diplomarbeit, Abteilung Chemie, TH Aachen 1960.

<sup>51</sup> H. W. KEUPER, unveröffentlichte Versuche im Rahmen einer Disser-tationsarbeit.

<sup>52</sup> B. KAFFER, unveröffentlichte Versuche im Rahmen einer Disser-tationsarbeit.

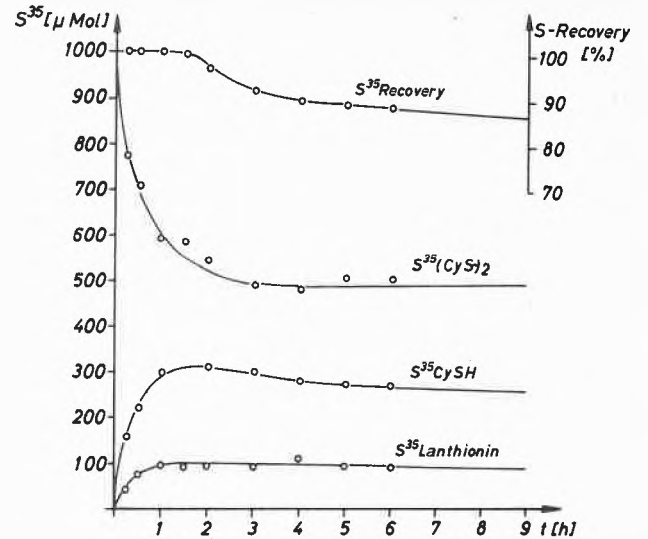


Abb. 9. Reaktion von Cystin-S<sup>35</sup> mit inaktivem Cystein im Molver-hältnis 1:1 bei 37° und pH 9, nach H. W. KEUPER<sup>51</sup>

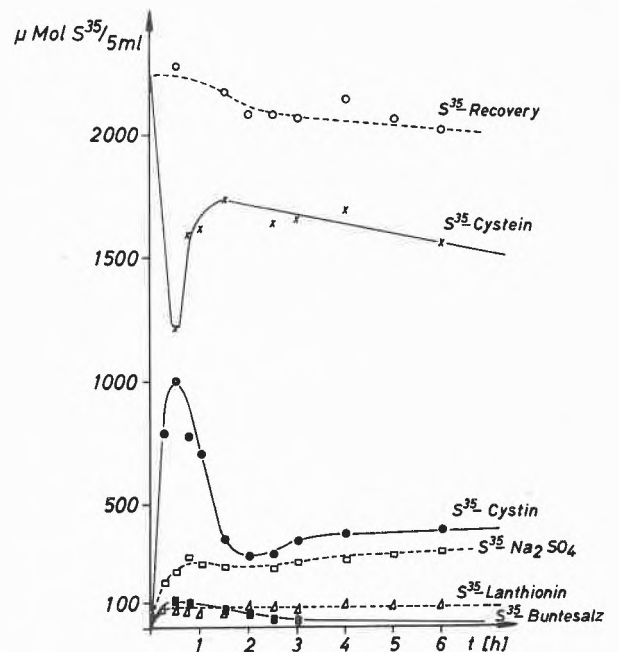


Abb. 10. Reaktion von Cystin-S<sup>35</sup> mit inaktivem Buntessalz im Mol-verhältnis 10:1 bei 100° und pH 8 bis 9, nach B. KAFFER<sup>52</sup>

Tabelle 7. Disulfidaustausch bei Proteinen

Protein	Reaktionsbedingungen	Methode	Autoren	Jahr
Serumalbumin	8-m Harnstoff, pH 8, 37°	Gelbildungszeit	CH. HUGGINS, D. F. TAPLEY und E. V. JENSEN	1951
	6-m Harnstoff, pH 8, 30°	Viskosität	V. D. HOSPELHORN, B. CROSS und E. V. JENSEN	1954
	8-m Harnstoff, pH 3,1 bis 9,7, 30°	Löslichkeit in Natriumsulfat	W. KAUFMANN und R. G. DOUGLAS jr.	1956
	0,2prozentige Lösung in Acetatpuffer	Bindung Disulfid-Farbstoff	I. M. KLOTZ, J. AYERS, J. Y. C. HO, M. G. HOROWITZ und R. E. HEINEY	1958
Eialbumin	8-m Harnstoff, pH 8, 37°	Gelbildungszeit	CH. HUGGINS, D. F. TAPLEY und E. V. JENSEN	1951
	6-m Harnstoff, pH 8, Hitze	Lichtstreuung	M. HALWER	1954
Fibrinogen	8-m Harnstoff, pH 8, 37°	Gelbildungszeit	CH. HUGGINS, D. F. TAPLEY und E. V. JENSEN	1951

2. Lanthioninbildung in löslichen Proteinen

Die nächste Frage betraf die Lanthioninbildung in löslichen, cystinhaltigen Proteinen. Bei den Modellversuchen mit Cystin selbst wurde unter relativ energischen Reaktionsbedingungen gearbeitet. Es ist jedoch seit langem bekannt, daß die im Peptidverband eingebauten Cystinreste wesentlich reaktionsfähiger sind als freies Cystin. Die cystinhaltigen, löslichen Proteine Rinder-Serumalbumin, Rinder- $\gamma$ -Globulin, Eialbumin, Hämoglobin und Insulin wurden mit schwach alkalischen Harnstofflösungen bei 30°C bis zu 2 Stunden erwärmt und der Cystin- und Lanthioningehalt ermittelt. Wie bereits aus der Tabelle 5 hervorging, enthalten die genannten und einige andere Proteine Cystin und/oder Cystein.

CHARLES HUGGINS *et al.*<sup>53</sup> haben 1951 gezeigt, daß solche Proteine, die gleichzeitig Cystin- und Cysteinreste enthalten, beim Stehenlassen in schwach alkalischen Harnstofflösungen eine zwischenmolekulare Vernetzungsreaktion durchmachen, die man u. a. durch Gelbildung, Zunahme der Viskosität, Abnahme der Löslichkeit, Nachweis des Dimeren, Trimeren usw. in der Ultrazentrifuge nachweisen kann (vgl. Tabelle 7).

HUGGINS hat zur Deutung dieses Phänomens die Hypothese aufgestellt, daß die Vernetzungsreaktion, die zur Unlöslichkeit führt, in einem zwischenmolekularen Disulfidaustausch zwischen der Cysteingruppe des einen Moleküls und der Disulfidgruppe des benachbarten Moleküls besteht. Dabei wird im benachbarten Molekül ein Cysteinrest freigesetzt, der wiederum eine Cystingruppe eines weiteren Nachbarmoleküls unter Bildung einer weiteren Cystinbrücke angreifen kann. Man vergleiche hierzu Abb.11.

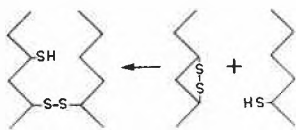


Abb. 11. Mechanismus der Bildung einer Disulfidquerbrücke zwischen benachbarten Proteinketten durch Thiol-Disulfid-Austausch, nach CH. HUGGINS *et al.*<sup>53</sup>

Diese Hypothese des Disulfidaustausches wird besonders dadurch gestützt, daß Proteine, deren SH-Gruppen durch Umsetzung mit sogenannten Thiolblockern ausgeschaltet sind, bei der gleichen Einwirkung schwach alkalischer Lösungen nicht mehr unlöslich werden. Die zwischenmolekulare Disulfidaustauschreaktion hat sich in der heutigen Literatur als ein wichtiger Teil der irreversiblen Denaturierung cystinhaltiger Proteine durchgesetzt. Man vergleiche die folgenden Arbeiten<sup>53-57</sup>.

<sup>53</sup> CH. HUGGINS, D. F. TAPLEY und E. V. JENSEN, *Nature* 167 (1951) 592.  
<sup>54</sup> V. D. HOSPELHORN, B. CROSS und E. V. JENSEN, *J. Amer. Chem. Soc.* 76 (1954) 2827.  
<sup>55</sup> M. HALWER, *J. Amer. Chem. Soc.* 76 (1954) 183.  
<sup>56</sup> W. KAUZMANN und R. G. DOUGLAS jr., *Arch. Biochem. Biophys.* 65 (1956) 106.  
<sup>57</sup> I. M. KLOTZ, J. AYERS, J. Y. C. HO, M. G. HOROWITZ und R. E. HEINEY, *J. Amer. Chem. Soc.* 80 (1958) 2132.

Trotz des anscheinend geklärten Reaktionsweges haben wir uns die Frage vorgelegt, ob es nicht denkbar ist, daß bei der irreversiblen Denaturierung cystinhaltiger Proteine Lanthionin gebildet wird, da ja dasselbe thiophile Reagenz – nämlich die Mercaptangruppe des proteingebundenen Cysteins – für die Vernetzungsreaktion maßgebend ist. Vielleicht hat man eine Lanthioninbildung übersehen, weil bis vor kurzem eine empfindliche Analysenmethode für die Bestimmung dieser Aminosäure nicht bekannt war. Bei einer reinen Thiol-Disulfid-Austauschreaktion sollten der Cystin- und Cysteingehalt unverändert bleiben.

Zur experimentellen Prüfung der gestellten Frage bot sich uns eine Nacharbeitung der Experimente von W. KAUZMANN und R. G. DOUGLAS jr.<sup>56</sup> über die Abhängigkeit der Löslichkeit von Rinder-Serumalbumin von Vorbehandlungen in Harnstofflösungen bei pH-Werten zwischen 3,1 und 9,7 an. Die Abb. 12 zeigt die zunehmende Unlöslichkeit von Serumalbumin in einer 1,31-molaren Natriumsulfatlösung nach Erwärmen in Harnstofflösungen bei zunehmenden pH-Werten.

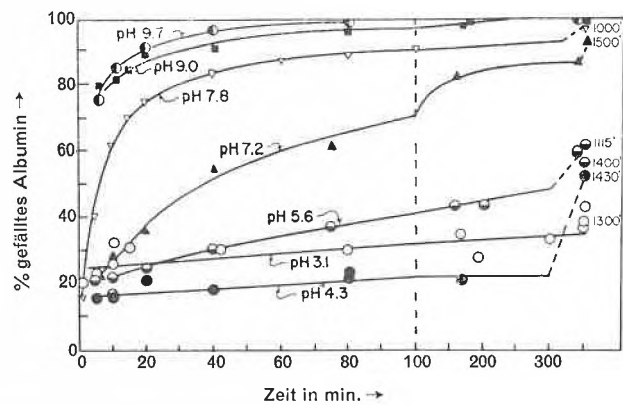


Abb. 12. Bildung von unlöslichem Protein in 1,31-molarer Natriumsulfatlösung nach Umsetzung von 1prozentigem Rinder-Serumalbumin in 8-molarer Harnstofflösung bei 30°C bei verschiedenen Zeiten und pH-Werten, nach W. KAUZMANN und R. G. DOUGLAS jr.<sup>56</sup>

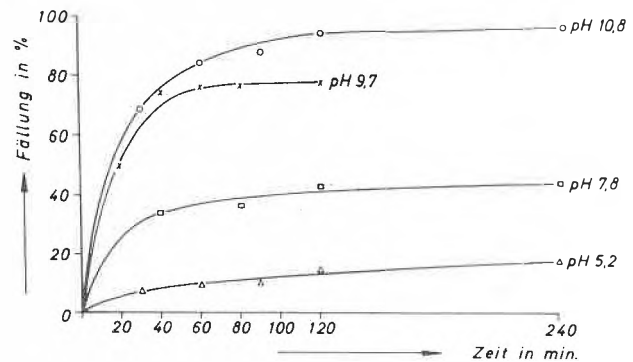


Abb. 13. Bildung von unlöslichem Protein in 1,31-molarer Natriumsulfatlösung nach Umsetzung von 1prozentigem Rinder-Serumalbumin in 8-molarer Harnstofflösung bei 30°C bei verschiedenen Zeiten und pH-Werten nach Abtrennung anorganischer Salze durch Dialyse, nach F.-W. KUNITZ<sup>58</sup>

Die Wiederholung dieser Versuche im pH-Bereich 5,2 bis 10,8 bestätigte den Befund der Autoren, daß sich bei Verlängerung der Einwirkungszeit immer mehr Protein mit 1,31-molarer Natriumsulfatlösung (pH 5) ausfallen läßt.

Wir haben jedoch darüber hinaus das gefällte Protein durch Dialyse und Gefriertrocknung in Substanz salzfrei isoliert und Cystin- sowie Lanthioninanalysen ausgeführt. Wie die Abb. 14 zeigt, sinkt der Cystingehalt nach zwei Stunden bei pH 9,7 von rund 6,4 auf 5,4%, während der Lanthioningehalt von annähernd Null auf 0,6% steigt. Demnach hat sich das abgebaute Cystin weitgehend in Lanthionin umgewandelt.

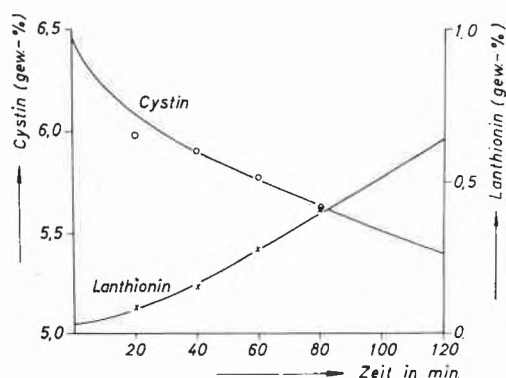


Abb. 14. Cystinabbau und Lanthioninbildung nach Einwirkung einer 8-molaren Harnstofflösung auf Rinder-Serumalbumin in 1-prozentiger Lösung (pH 9,7, 30°C), nach F.-W. KUNITZ<sup>58</sup>

Die nächste Abbildung zeigt die Abhängigkeit des ausgefällten Albumins vom Lanthioningehalt bei zwei pH-Werten.

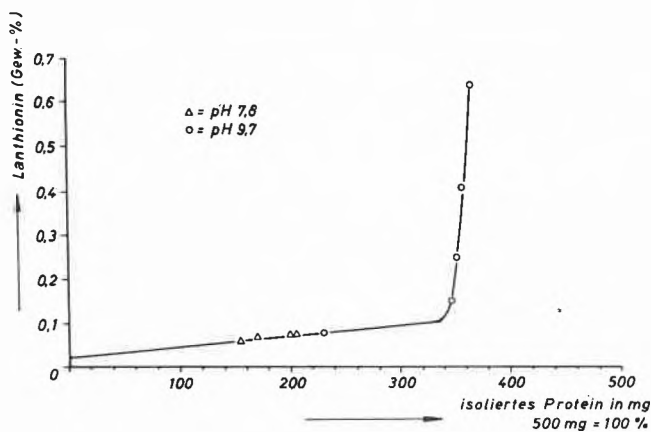


Abb. 15. Lanthioningehalt im isolierten Protein nach Denaturierung von Rinder-Serumalbumin in 8-molarer Harnstofflösung bei pH 7,8 und 9,7, 30°C, nach F.-W. KUNITZ<sup>58</sup>

Wiederholt man den Versuch in Gegenwart des Thiolblockers<sup>59</sup> N-Äthylmaleinimid bei einem pH-Wert von 9,7, so ist eine deutliche Verzögerung der Lanthioninbildung festzustellen (s. Abb. 16).

<sup>58</sup> F.-W. KUNITZ, Dissertation, TH Aachen 1960.

<sup>59</sup> E. FRIEDMANN, D. H. MAHRMAN und I. SIMON-REUSS, *Brit. J. Pharmacol. Chemotherapy* 4 (1949) 105.

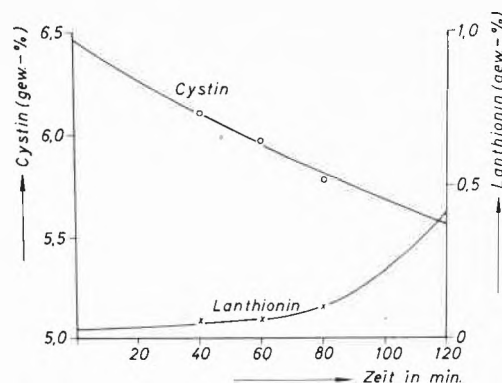


Abb. 16. Cystinabbau und Lanthioninbildung nach Einwirkung einer 8-molaren Harnstofflösung vom pH 9,7 bei 30°C auf 1-prozentiges Rinder-Serumalbumin in Gegenwart von N-Äthylmaleinimid, nach F.-W. KUNITZ<sup>58</sup>

Ähnliche Versuche mit Rinder- $\gamma$ -Globulin bei einem pH-Wert von 9,7 ergaben einen Cystinverlust von 18% des Ausgangswertes und eine quantitative Umwandlung des abgebauten Cystins in Lanthionin (s. Abb. 17).

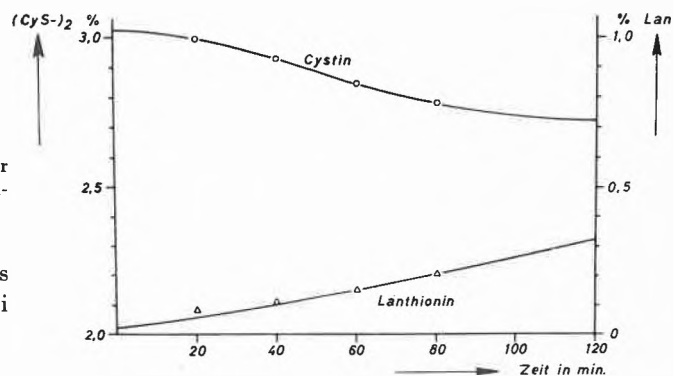


Abb. 17. Cystinabbau und Lanthioninbildung bei Denaturierung von Rinder- $\gamma$ -Globulin in 8-molarer Harnstofflösung bei pH 9,7 und 30°C, nach F.-W. KUNITZ<sup>58</sup>

Die Einwirkung einer alkalischen Harnstofflösung (pH 9,7, 2 Stunden) auf Hämoglobin führt zur Bildung von 0,28% Lanthionin. Nach einstündigem Kochen von Hühnerweiß (durch Gefriertrocknung hergestellt) in dest. Wasser wurde ein Lanthioningehalt von 0,19% gefunden.

Schon diese wenigen Beispiele, die der Dissertation von F.-W. KUNITZ<sup>58</sup> entnommen sind, zeigen, daß die Frage nach einer Lanthioninbildung bei der irreversiblen Denaturierung von cystinhaltigen Proteinen positiv zu beantworten ist. Lanthionin bildet sich demnach nicht nur bei der Einwirkung von thiophilen Reagenzien auf Cystin, sondern bereits bei der Einwirkung von schwach alkalischen Harnstofflösungen bei Temperaturen von 20 bis 30°C, ohne daß thiophile Reagenzien von außen zugefügt werden müssen. Hier genügen die wenigen, in den Proteinen eingebauten Cysteingruppen zur Auflösung der Lanthioninbildung.

Was ergibt sich aus diesen Befunden für die Theorie der irreversiblen Denaturierung cystinhaltiger Proteine?

Man kann die Hypothese aufstellen, daß unter den Bedingungen der irreversiblen Denaturierung cystinhaltiger Proteine neben dem bereits bekannten Disulfidaustausch Lanthionin gebildet wird. Es ist jetzt verständlich, daß es bisher noch keinem Autor gelungen ist, ein irreversibel denaturiertes Protein zu renaturieren. Würde es sich hier nur um Disulfidaustausch handeln, so müßte es durch Einwirkung von thiophilen Reagenzien gelingen, die vernetzenden Cystinbrücken zu spalten und das unlösliche Produkt wieder zu depolymerisieren. Die Ursache für das Mißlingen dieser Versuche ist in der partiellen Umwandlung von Cystin in Lanthionin zu sehen. Die Thioäthergruppe des Lanthionins ist gegen Reduktionsmittel stabiler als die Disulfidbindung, wenigstens unter den bisher studierten milden Bedingungen.

Es sei hier bemerkt, daß peptidgebundenen Lanthionin gegen Alkalien in der Hitze beinahe ebenso empfindlich ist wie peptidgebundenen Cystin und in einer  $E2$ -Reaktion zerfällt<sup>60</sup>. Eine Anwendung unserer neuen Hypothese besteht darin, daß die zwar langwierige, aber immerhin routinemäßig ausführbare Lanthioninanalyse ein sicherer Indikator für eine eingetretene irreversible Denaturierung von Proteinen ist.

### 3. Lanthioninbildung in Wolle

Es wurde in der Einleitung bereits daran erinnert, daß Lanthionin aus Wolle isoliert worden ist, die mit Soda-lösung gekocht worden war. Es stellt sich jetzt die Frage, ob nicht bei Wolle Lanthionin auch unter wesentlich mildereren Bedingungen gebildet wird und ob nicht eine Parallele zwischen den Reaktionsbedingungen der irreversiblen Denaturierung von cystinhaltigen Proteinen und verschiedenen, in der chemischen Wolltechnologie üblichen Einwirkungsbedingungen besteht. Man beachte hierbei, daß das molare Verhältnis zwischen Cystin und Cystein in Wolle etwa gleich ist wie in Serumalbumin. Bei den löslichen Proteinen war die Abnahme der Löslichkeit ein klares Kriterium für die Denaturierung. Bei der bereits unlöslichen Wolle mußten wir uns auf indirekte Methoden stützen. So bestimmten wir die Veränderung der Löslichkeit von Wolle in  $n/10$  Natronlauge bei 65°C (Alkalilöslichkeit) oder in einer Harnstoff-Bisulfitlösung vom pH 7 (Harnstoff-Bisulfit-Löslichkeit). Die am ehesten zu deutende Löslichkeitsprobe ist die Ammoniaklöslichkeit von Wolle nach Oxydation des Wollecystins mit Peressigsäure nach P. ALEXANDER und Mitarbeitern<sup>61</sup>. Unbehandelte, native Wolle löst sich bei dieser Methode zu 90 Gewichts-Prozenten. Wenn die Cystinreste durch Lanthioninreste ersetzt sind, muß die Peressigsäure-Ammoniaklöslichkeit abnehmen, weil ja Lanthionin von Peressigsäure nur in das Monoxyd übergeführt und nicht wie die Disulfidgruppe des Cy-

stins in zwei Sulfonsäuregruppen gespalten wird (vgl. Abb. 18).

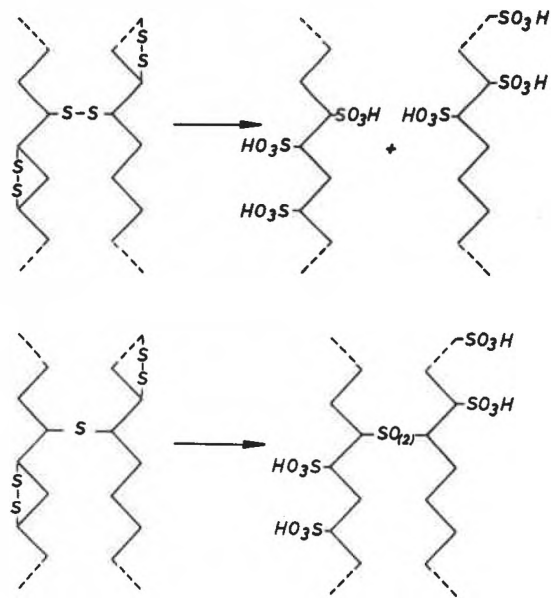


Abb. 18. Schematische Darstellung disulfid- und lanthioninvernetzter Proteine nach Oxydation mit Peressigsäure, nach F.-W. KUNITZ<sup>58</sup>

R. CONSDEN, A. H. GORDON und A. J. P. MARTIN<sup>62</sup> konnten in Hydrolysaten der Spitzen unbehandelter Wolle Lanthionin papierchromatographisch nachweisen. Dieses Lanthionin kann sich nur auf dem Rücken des lebenden Schafes unter Einwirkung von Licht und Feuchtigkeit gebildet haben. Wir untersuchten den Lanthioningehalt von zehn typischen Rohwollqualitäten, wie sie für die Herstellung von Wolltextilien verwendet werden, und fanden Lanthioningehalte zwischen 0,2 und 0,6%. Es ergab sich<sup>63</sup>, daß diejenigen Wollen, deren wäßrige Extrakte infolge eines größeren Gehaltes an alkalischen Schweißsalzen erhöhte pH-Werte zeigten, mehr Lanthionin enthielten als schwach alkalische Schweißwollen (vgl. Abb. 19). Daraus geht hervor, daß

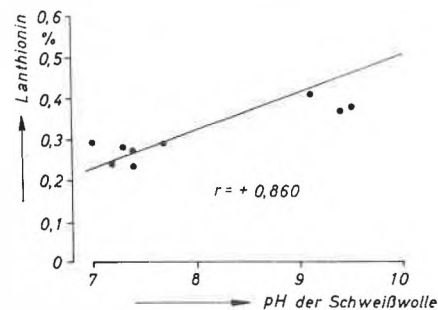


Abb. 19. Beziehung zwischen dem pH-Wert des wäßrigen Extraktes von Schweißwollen und dem Lanthioningehalt, nach H. ZAHN und G. SATLOW<sup>63</sup>

<sup>60</sup> H. ZAHN und H. KESSLER, *Makromol. Chem.* 27 (1958) 218.

<sup>61</sup> P. ALEXANDER, M. FOX und R. F. HUDSON, *Biochem. J.* 49 (1951) 129.

<sup>62</sup> R. CONSDEN, A. H. GORDON und A. J. P. MARTIN, *Biochem. J.* 40 (1946) 580.

<sup>63</sup> H. ZAHN und G. SATLOW, *Fédération Lanière Internationale, Commission Technique, Rapport N° 5*, Paris 1959.

Lanthionin ein Sekundärprodukt, nicht ein normaler Bestandteil von Wolle ist. Eine schwach saure, frische Australwolle bester Provenienz hatte einen Lanthionin-gehalt von unter 0,1%.

Lagert man alkalische Schweißwolle zwei Jahre im Klimaraum, so findet man, daß der Lanthioningehalt nach dieser Zeit zugenommen hat.

In den Wollwäschereien wird die Schweißwolle auch heute noch überwiegend mit Seife oder synthetischen Waschmitteln und Sodalösung bei pH-Werten zwischen 9 und 11 und Temperaturen um 50°C gewaschen. Als Modellversuch zur Prüfung der Frage, ob sich auch unter diesen Bedingungen Lanthionin bildet, wurde die Einwirkung einer  $n/10$  Sodalösung bei 45°C bis zu 120 Stunden lang untersucht. Wie aus der Abb.20 hervorgeht, setzt die Lanthioninbildung bereits nach etwa 30 Minuten ein. Die Summe Cystin und Lanthionin bleibt bis zu einer Einwirkungszeit von 20 Stunden annähernd konstant.

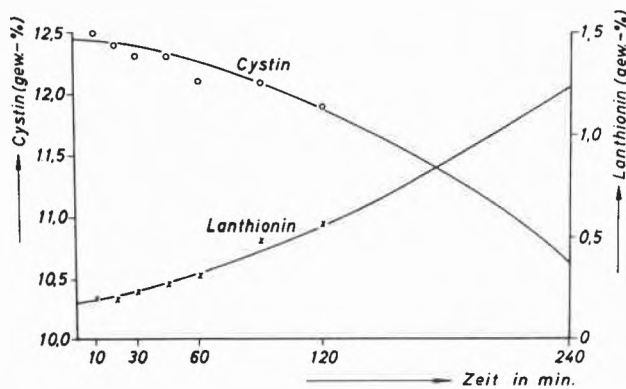


Abb. 20. Cystinzerersetzung und Lanthioninbildung in Wolle bei Einwirkung von  $n/10$  Sodalösung bei 45°C, nach F.-W. KUNITZ<sup>68</sup>

Mit der Bildung von Lanthionin nimmt die Ammoniaklöslichkeit der oxydierten Präparate ab (vgl. Abb. 21).

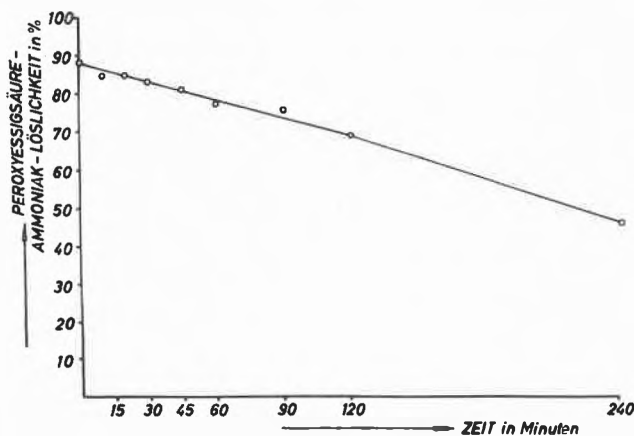


Abb. 21. Peroxyessigsäure-Ammoniak-Löslichkeit von Wolle in Abhängigkeit von der Dauer der Behandlung mit  $n/10$   $\text{Na}_2\text{CO}_3$  bei 45°C, nach F.-W. KUNITZ<sup>58</sup>

Dies ist ein sicheres Zeichen dafür, daß ein Teil der Cystinbrücken in Lanthioninbrücken umgewandelt worden ist. Die Harnstoff-Bisulfit-Löslichkeit sinkt ebenfalls mit Zunahme des Lanthioningehalts. Die statistische Auswertung von 60 unter den verschiedensten Bedingungen alkalisch behandelten Wollpräparaten ergibt die Kurve der Abb.22<sup>64</sup>. Man kann auf Grund dieser Beziehung bei alkalisch vorbehandelten Wollproben aus der Harnstoff-Bisulfit-Löslichkeit den zugehörigen Lanthioningehalt graphisch ermitteln.

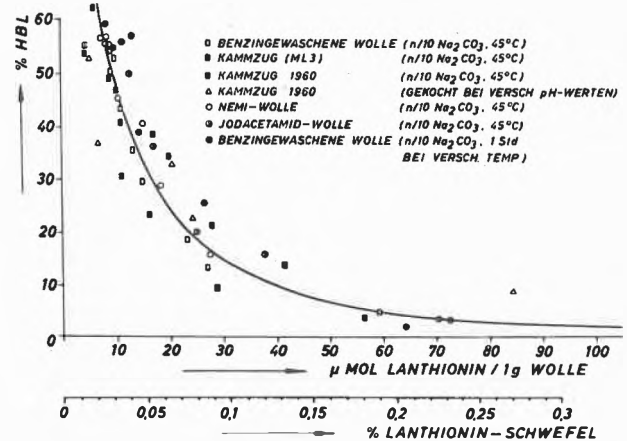


Abb. 22. Zusammenhang zwischen Lanthioningehalt und Harnstoff-Bisulfit-Löslichkeit alkalisch behandelter Wollen, nach F.-W. KUNITZ<sup>64</sup>

Die Anwendungen dieser Befunde für die chemische Technologie der Wolle lassen sich heute noch nicht absehen. Nicht nur beim Lagern von alkalischen Schweißwollen und bei der Seife-Soda-Wäsche von Schweißwollen, sondern auch beim Dämpfen von Kammgarnen zum Fixieren der Fasern, ferner beim Dekatieren von Geweben bildet sich stets Lanthionin. Eine geringfügige Lanthioninbildung bedeutet eine gewisse chemische Stabilisierung, da die Löslichkeit entsprechender Wollpräparate in Alkalien und Harnstoff-Bisulfit-Lösung absinkt. Wollen mit erhöhten Lanthioningehalten verhalten sich jedoch trotz ihrer chemischen Stabilisierung technologisch ungünstiger. Dies hängt vermutlich damit zusammen, daß simultan zur Lanthioninbildung chemische Abbaureaktionen vor sich gehen, die wir bis jetzt analytisch noch nicht erfassen können.

Auch beim Färben von Wolle in kochenden Flotten entsteht bereits im schwach sauren Gebiet Lanthionin<sup>64</sup>. Die Lanthioninbildung ist nach Abb.23 bis zum pH-Wert 7 verhältnismäßig gering und steigt oberhalb dieses Wertes rasch an. Die Feststellung eines erhöhten Lanthioningehalts in gefärbter Wolle ist die sicherste direkte Methode zum Nachweis einer Färbeschädigung im neutralen oder schwach alkalischen Gebiet.

<sup>64</sup> F.-W. KUNITZ, unveröffentlichte Versuche, 1960.

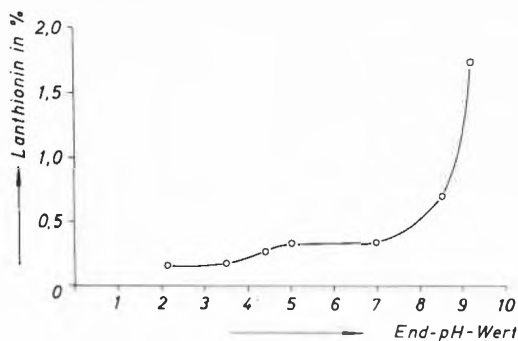


Abb. 23. Lanthioningehalt von Wolle nach einstündigem Erhitzen auf 100°C bei verschiedenen pH-Werten, nach F.-W. KUNITZ<sup>64</sup>

#### 4. Vergleich der Lanthioninbildung in Wolle bei der Einwirkung verschiedener thiophiler Reagenzien

Nach dem Studium der Lanthioninbildung unter der Einwirkung von Sodalösung bei 45°C und wässrigen Lösungen bei 100°C zwischen pH-Werten von 2 und 9 erschien es interessant, die Wirksamkeit verschiedener thiophiler Reagenzien, wie Kaliumcyanid, Natriumsulfid – von denen man bereits weiß, daß sie Lanthionin in Wolle bilden – Sulfid, Hydrogensulfid und Thioglykolsäure, in Vergleichsversuchen zu studieren. In der Abb. 24 ist wiedergegeben, wie die genannten Reagenzien den Lanthioningehalt der Wolle nach einer Einwirkung bei 45°C bis zu 240 Minuten beeinflussen.

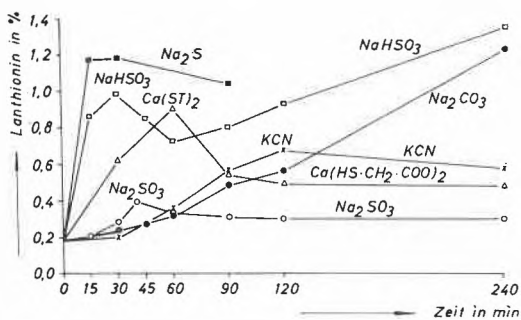


Abb. 24. Lanthioninbildung in Wolle nach Reaktion mit  $n/10$  Lösungen bei 45°C, nach F.-W. KUNITZ<sup>65</sup>

Man erkennt, daß Natriumsulfid (pH 12) und Natriumbisulfid\* (pH 5) mehr Lanthionin in Wolle bilden als Soda oder Natriumsulfid (pH 7) oder Kaliumcyanid (pH 10). Daraus geht hervor, daß nicht pH-Wert und Art des Alkalis maßgebende Faktoren sind, sondern die Thiophilie der jeweiligen Verbindung. Die Frage, ob

\* Schon W. R. MIDDLEBROOK und H. PHILLIPS<sup>66</sup> studierten die Reaktion zwischen Natriumbisulfid und Wolle. Danach spaltet das primär gebildete Bunesalz Thiosulfat ab unter Bildung von Aminoacrylsäure. Durch Vereinigung mit Cystein kann nach den Autoren Lanthionin entstehen. In einer späteren Arbeit<sup>66</sup> wird jedoch mitgeteilt, daß auf diese Weise nur wenig, wenn überhaupt Lanthionin gebildet werden kann, da es den Autoren nicht gelungen ist, Lanthionin aus einer mit Bisulfid behandelten Wolle zu isolieren.

<sup>65</sup> W. R. MIDDLEBROOK und H. PHILLIPS, *Biochem. J.* 36 (1942) 428.

<sup>66</sup> E. G. H. CARTER, W. R. MIDDLEBROOK und H. PHILLIPS, *J. Soc. Dyers Colourists* 62 (1946) 203.

eine Lanthioninbildung in Wolle nur mit Alkalien erfolgt, ist zu verneinen, vielmehr tritt eine Lanthioninbildung in Wolle immer dann ein, wenn thiophile Reagenzien in einem weiten pH-Bereich auf Wolle einwirken. Die Lanthioninbildung setzt bereits bei Bedingungen ein, die bei löslichen Proteinen zur irreversiblen Denaturierung führen.

Die praktischen Anwendungen dieser Erkenntnis sind ebenso vielfältig, wie dies oben für die Einwirkung von schwach alkalischen Lösungen auf Wolle angedeutet worden ist. Es ist keine Überraschung mehr, in Wolle, die zur Herstellung einer dauerhaften Bügelfalte mit Thioglykolat behandelt worden ist, einen erhöhten Lanthioningehalt zu finden.

Natriumhydrogensulfid und Natriumsulfid sind nach J. B. SPEAKMAN bekannte Mittel, um Wolle dauerhaft zu fixieren<sup>67</sup>.

Wir finden in bisulfid- oder sulfidbehandelter Wolle (Garne, Gewirke und Tuche) daher auch einen erhöhten Lanthioningehalt. Schon MIZELL und HARRIS haben 1943<sup>68</sup> in einer Arbeit über die Einwirkung von Alkalien auf Wolle in einer Fußnote die Vermutung geäußert, daß sich bei der dauerhaften Fixierung von Wolle Lanthionin bildet.

Eine wichtige praktische Anwendung der Lanthioninanalyse ergibt sich für die Beurteilung von filzfremd ausgerüsteten Wollmaterialien. Hier wird die Wolle zuerst mit Chlor oder einem anderen Oxydationsmittel behandelt und anschließend zur Beseitigung der überschüssigen Oxydationsmittel mit Bisulfid nachbehandelt. Bisulfid reagiert jedoch nicht nur mit dem überschüssigen Oxydationsmittel, sondern greift auch Cystin an<sup>69</sup>. Damit ist nach unseren Vorstellungen eine Voraussetzung für eine Lanthioninbildung gegeben. Tatsächlich finden wir in filzfremd ausgerüsteten Kammzügen, die mit überschüssigem Sulfid nachbehandelt worden waren, erhöhte Lanthioningehalte. Eine zu intensive Sulfidnachbehandlung wirkt sich beim Verspinnen und Färben ungünstig aus.

#### 5. Zur Deutung der Lanthioninbildung

Man kann sich fragen, ob die hier zusammengefaßten Untersuchungsergebnisse neue Gesichtspunkte für die Chemie cystinhaltiger Proteine gebracht haben. Es war schon lange bekannt, daß nicht nur Alkalien, sondern auch Kaliumcyanid und Natriumsulfid mit Wolle und anderen Proteinen Lanthionin bilden. Eigentlich ist es demnach nicht verwunderlich, daß cystinspaltende Reagenzien, wie Thioglykolsäure, Sulfid und Hydrogensulfid, wirksame Lanthioninbildner sind.

Wenn hier gezeigt worden ist, daß unter den Bedingungen der irreversiblen Denaturierung löslicher, cystinhaltiger Proteine Lanthionin gebildet wird, so ist zu

<sup>67</sup> J. B. SPEAKMAN, *Nature* 132 (1933) 930, *J. Soc. Dyers Colourists* 52 (1936) 335 und 423.

<sup>68</sup> L. R. MIZELL und M. HARRIS, *J. Res. Nat. Bur. Stand.* 30 (1943) 47.

<sup>69</sup> F. F. ELSWORTH und H. PHILLIPS, *Biochem. J.* 32 (1938) 837.

fragen, ob nicht die bisherige Theorie des Thiol-Disulfid-Austausches ausreicht, um die Denaturierung zu erklären, und was die von uns gefundene Lanthioninbildung Neues bringt.

Diesen Einwänden gegenüber muß jedoch festgestellt werden, daß vor unseren Arbeiten die Lanthioninbildung ein Spezialkapitel der Keratinchemie gewesen ist und daß man erst jetzt weiß, daß sich in allen cystinhaltigen Peptiden und Proteinen stets Lanthionin bildet, wenn man Reagenzien einwirken läßt, welche zu einer Spaltung der Disulfidbindung des Cystins unter Freisetzung von Cystein führen. Die Lanthioninbildung ist nunmehr als eine allgemeine Reaktion der Cystinchemie zu werten.

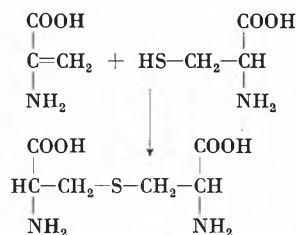
Der Thiol-Disulfid-Austausch wird demgegenüber in seiner Allgemeingültigkeit eingeschränkt. Diese Reaktion ist zwar weitverbreitet, kann aber nur auftreten, wenn cystinhaltige Substanzen von einem *Mercaptan* angegriffen werden, während die Lanthioninbildung, wie oben gezeigt, mit den verschiedensten thiophilen Reagenzien gelingt. Man spricht von intramolekularem Disulfidaustausch, wenn das angreifende Mercaptan demselben Molekül angehört, und von intermolekularem Disulfidaustausch bei Reaktion zwischen

- gleichen Molekülen,
- verschiedenartigen Molekülen, z. B. Thioglykolsäure und Wolle.

Daher wird es jetzt klar, daß es in Wolle zwar Lanthioninbildung ohne Disulfidaustausch, nicht aber Disulfidaustausch ohne Lanthioninbildung geben kann.

Was nun die Reaktionswege anbelangt, die zur Bildung von Lanthionin aus Cystin führen, so braucht man formal nur ein Schwefelatom der Disulfidgruppe zu entnehmen und erhält Lanthionin. In Wirklichkeit ist bis heute der Mechanismus der Lanthioninbildung trotz verschiedener Hypothesen, auf die jetzt kurz eingegangen werden soll, nicht bekannt.

Am leichtesten zu verstehen und von den meisten Autoren gleich formuliert ist die letzte Stufe der Lanthioninbildung, die Addition von Cystein an Aminoacrylsäure.



Wohl erstmalig und unabhängig voneinander wurde diese Addition von A. SCHÖBERL<sup>66, 70</sup> und B. H. NICOLET

<sup>70</sup> A. SCHÖBERL, *Kleppzigs Textil-Z.* 45 (1942) 41.

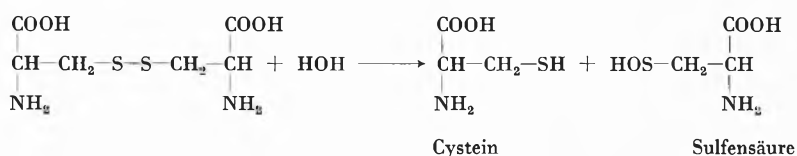
und L. A. SHINN<sup>71</sup> vorgeschlagen. Die Synthese von Monoacetyllanthionin aus Cystein und Aminoacrylsäure nach SCHÖBERL und WAGNER<sup>72</sup> hat diesen Weg präparativ ausgewertet.

Man erinnere sich an die Leichtigkeit der Addition von Thiolen an olefinische Verbindungen, die man u. a. auch für die analytisch-präparative Charakterisierung beider Verbindungsklassen ausnutzt.

Wir finden diese Stufe der Lanthioninbildung u. a. bei den folgenden Autoren: W. R. MIDDLEBROOK und H. PHILLIPS, 1942<sup>65</sup>; L. R. MIZELL und M. HARRIS, 1943<sup>68</sup>; W. R. CUTHBERTSON und H. PHILLIPS, 1945<sup>37</sup>; R. L. ELLIOTT, R. S. ASQUITH und M. A. HOBSON, 1958<sup>47</sup> und 1960<sup>73</sup>.

Nicht einig sind sich die verschiedenen Autoren über die Bildung von Cystein und Aminoacrylsäure aus einerseits freiem Cystin, andererseits peptidgebundenem Cystin. Im wesentlichen kann man zwei Reaktionswege, Hydrolyse oder  $\beta$ -Eliminierung unterscheiden.

#### Hydrolyse:



Eine hydrolytische Aufspaltung der Disulfidbindung in gebundenem Cystin wurde bereits 1933 von A. SCHÖBERL<sup>74</sup> sowie von J. B. SPEAKMAN<sup>67</sup> erwogen. Die anschließende Bildung von Aminoacrylsäure verläuft nach A. SCHÖBERL<sup>75</sup> über Schwefelwasserstoffabspaltung aus Cystein sowie über Abspaltung von Schwefel und Wasser aus der unbeständigen Sulfensäure.

#### $\beta$ -Eliminierung:

Im Gegensatz zur hydrolytischen Spaltung der Disulfidbindung wurde von M. BERGMANN und F. STATHER<sup>76</sup> und später von B. H. NICOLET und L. A. SHINN<sup>71</sup> sowie von L. R. MIZELL und M. HARRIS<sup>68</sup> eine Spaltung der C-S-Bindung bei der Einwirkung von Alkali auf peptidgebundenem Cystin angenommen. D. S. TARBELL und D. P. HARNISH<sup>77</sup> haben die Reaktion 1951 als exak-

<sup>71</sup> B. H. NICOLET und L. A. SHINN, *Abstracts of the 103 Meeting of the American Chemical Society*, April 1942.

<sup>72</sup> A. SCHÖBERL und A. WAGNER, *Chem. Ber.* 80 (1947) 379.

<sup>73</sup> R. L. ELLIOTT, R. S. ASQUITH und M. A. HOBSON, *J. Textile Inst. Trans.* 51 (1960) 692.

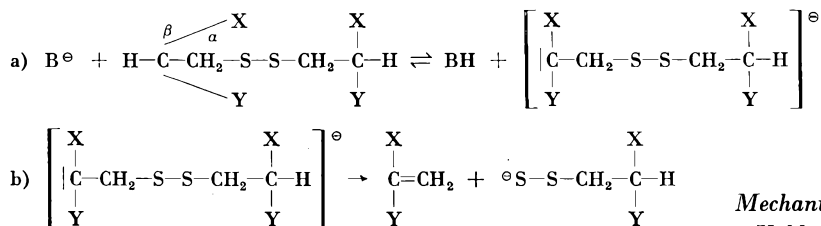
<sup>74</sup> A. SCHÖBERL und M. WIESNER, *Liebigs Ann. Chem.* 507 (1933) 111.

<sup>75</sup> A. SCHÖBERL, *Biochem. Z.* 306 (1940) 269; A. SCHÖBERL, P. RAMBACHER und A. WAGNER, *Biochem. Z.* 317 (1944) 171.

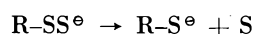
<sup>76</sup> M. BERGMANN und F. STATHER, *Hoppe Seyler's Z. physiol. Chem.* 152 (1926) 189.

<sup>77</sup> D. S. TARBELL und D. P. HARNISH, *Chem. Rev.* 49 (1951) 1.

ten bimolekularen nucleophilen Eliminierungsmechanismus (*E2*-Reaktion) formuliert:



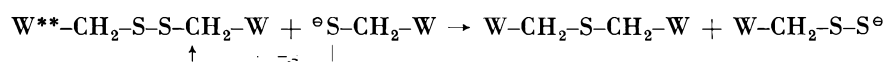
Die Reaktionsfähigkeit des Cystin wird darauf zurückgeführt, daß das Molekül ein aktiviertes H-Atom in  $\beta$ -Stellung zur Disulfidbindung besitzt. Bei Reaktion mit einer Base  $\text{B}^\ominus$  erfolgt  $\beta$ -Eliminierung, die zur Bildung von Aminoacrylsäure und Thiocystein führt. Thiocystein verliert ein Schwefelatom und bildet Cystein:



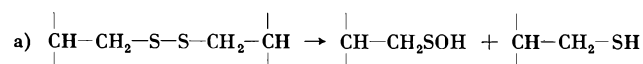
#### Mechanismus der Lanthioninbildung nach Elliott, Asquith und Hobson

Diese Autoren haben einen weiteren Mechanismus vorgeschlagen<sup>47, 73</sup>. Danach kommt dem Cystein für die Lanthioninbildung eine überragende Bedeutung zu. Cystein spaltet nach B. H. NICOLET<sup>78</sup> Schwefelwasserstoff ab unter Bildung von Aminoacrylsäure. Dieser Schwefelwasserstoff reduziert Cystin unter Bildung von zwei Molekülen Cystein.

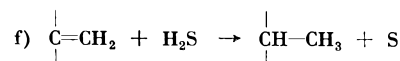
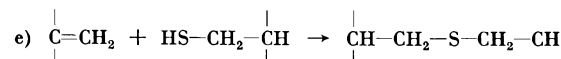
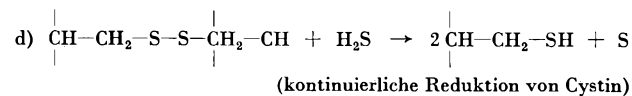
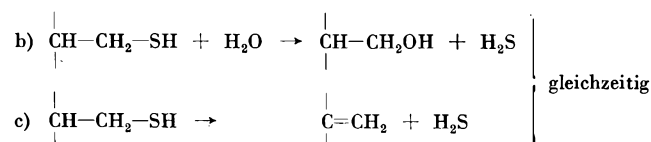
Die Autoren haben ihren Mechanismus bei der zweiten Internationalen Wolltextilforschungskonferenz wie folgt zusammengefaßt:



Die Zersetzung von Cystin bei Abwesenheit von Cystein beginnt mit der Bildung einer Spur von Cystein, z. B. durch Hydrolyse.



Sobald Cystein entstanden ist, verläuft die Reaktion über die folgenden Stufen:

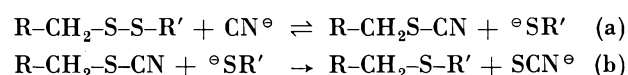


<sup>78</sup> B. H. NICOLET, *J. Amer. Chem. Soc.* 53 (1931) 3066.

Dieses Schema erklärt das Vorkommen von freiem Thiol, Schwefelwasserstoff, Schwefel, Serin, Alanin und Lanthionin in alkalisch zersetzten Cystinlösungen.

#### Mechanismus der nucleophilen Substitution am Kohlenstoffatom neben der Disulfidbindung

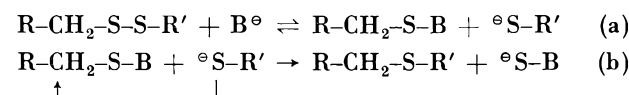
Man kann sich eine Thioätherbildung auch ohne das Zwischenprodukt Aminoacrylsäure vorstellen\*. A. J. PARKER und N. KHARASCH<sup>23</sup> formulierten die Reaktion von Cyanidionen mit der Disulfidbindung folgendermaßen:



Die Möglichkeit einer Reaktion nach (b) wurde bereits von J. M. SWAN<sup>80</sup> vorgeschlagen.

Gleichzeitig und unabhängig von diesen Autoren stellten H. ZAHN und D. HILDEBRAND für die Lanthioninbildung aus in Wolle eingebautem Cystin und Cystein einen ganz ähnlichen Mechanismus als Arbeitshypothese auf, in dem gefordert wird, daß neben der S-nucleophilen Substitution durch eingebautes Cysteinat (Disulfidaustausch) aus thermodynamischen Gründen auch eine direkte C-nucleophile Substitution durch das Cysteinat erfolge, unter direkter Bildung von Lanthionin.

Bei der experimentellen Prüfung dieser Hypothese mit Modellsubstanzen durch H. ZAHN und H. W. KEUPER<sup>43</sup> konnte gezeigt werden, daß der von A. J. PARKER und N. KHARASCH für die Lanthioninbildung aus Cystin und Kaliumcyanid angegebene Mechanismus ganz allgemein auf den Angriff S-nucleophiler Reagenzien auf Cystin zu erweitern ist:



Hierbei steht  $\text{B}^\ominus$  für die bekannten S-nucleophilen Reagenzien. Dieser allgemeine Mechanismus der Lanthioninbildung wurde, auf Wolle übertragen, im Rahmen der Arbeit H. ZAHN, F.-W. KUNITZ und D. HILDEBRAND<sup>81</sup> zur Diskussion gestellt und für die Einwirkung von z. B. Sulfit oder Thioglykolsäure formuliert:

\* Vgl. hierzu auch C. EARLAND und D. J. RAVEN<sup>79</sup>.

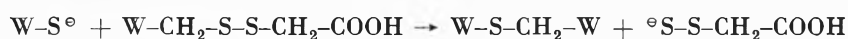
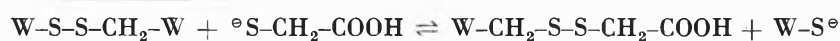
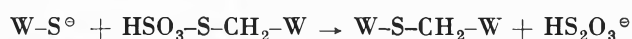
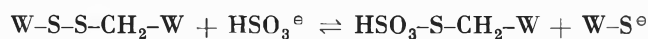
\*\* W = Wollmolekül.

<sup>79</sup> C. EARLAND und D. J. RAVEN, *J. Textile Inst. Trans.* 51 (1960) 678.

<sup>80</sup> J. M. SWAN, *Current Trends in Heterocyclic Chemistry*, Butterworths Scientific Publications, London 1958, S. 65.

<sup>81</sup> H. ZAHN, F.-W. KUNITZ und D. HILDEBRAND, *J. Textile Inst. Trans.* 51 (1960) 740.





Bei dieser Reaktion wird stets das eingebaute Cystin in ein Cysteinmolekül und ein Cysteinderivat, z. B. Bunesalz oder gemischtes Disulfid, gespalten. Mit diesen Cysteinderivaten reagiert das freigesetzte Cystein sowohl thiophil, wodurch sich das Disulfid zurückbildet, als auch in gleichzeitiger Nebenreaktion am Kohlenstoffatom, so daß sich Lanthionin bildet.

In Analogie zu diesem Mechanismus wird von ZAHN, KUNITZ und HILDEBRAND<sup>81</sup> angenommen, daß bei der Einwirkung von Sodalösung auf Wolle die Cysteingruppen in einer direkten  $S_N2$ -Reaktion mit benachbarten Cystingruppen Lanthionin und Thiocystein bilden. Dieses Thiocystein verliert Schwefel und geht in Cystein über, welches weitere Cystingruppen in Lanthionin verwandelt.

Man kann die Gleichzeitigkeit der Cystinspaltung durch thiophile Reagenzien und der Lanthioninbildung hypothetisch mit einem anionischen Dreierkomplex veranschaulichen, der gleichzeitig in Lanthionin + Schwefelakzeptor oder in Basenanlagerungsprodukt (gemischtes Disulfid, wenn  $B = \text{RS}^\ominus$ ; Bunesalz, wenn  $B = \text{SO}_3^{2\ominus}$ , usw.) und Cystein zerfällt:

