

20. Zum Komplexbildungsvermögen von Histidin und Histidinderivaten

von **Iphigenia Photaki, D. Schäuferle, S. Fallab und H. Erlenmeyer.**

(14. XII. 56.)

Das besonders ausgeprägte Vermögen des Histidins, Metallionen komplex zu binden, ist vielleicht mit der biologischen Eigenart wichtiger, Histidin als Baustein enthaltender Naturstoffe in Zusammenhang zu bringen. Wir hatten früher festgestellt¹⁾, dass das Dipeptid Histidyl-histidin unter bestimmten vergleichbaren Bedingungen – pH = 5,2 und gleiche Konzentration an Komplexbildner – pro Mol mehr Cu²⁺ zu binden vermag als Histidin.

Bei pH 5,2 liegt die α -Aminogruppe des Histidins bzw. des Dipeptids protonisiert vor (abgekürzt RH⁺). Bei der Untersuchung der Metallkomplexbildung solcher Verbindungen ist somit neben Cu²⁺ als saure Partikel, die mit dem Komplexbildner R reagieren kann, auch H⁺ zu berücksichtigen (1), (2),



und das mit der früher beschriebenen colorimetrischen Methode¹⁾ erfasste Komplexbildungsvermögen ist ein Mass für die Gleichgewichtskonstante k* (3), die dieses Konkurrenzverhältnis der beiden sauren Partikel wiedergibt²⁾.

$$k^* = \frac{[H^+][CuR^{2+}]}{[RH^+][Cu^{2+}]} \quad (3)$$

Das unterschiedliche Bindungsvermögen für Cu²⁺ bei Histidin und Histidylhistidin ist insofern als anomal zu bezeichnen, als andere, komplexchemisch untersuchte Dipeptide – wie z. B. Glycylglycin – gegenüber der entsprechenden Aminosäure ein deutlich schwächeres Komplexbildungsvermögen aufweisen³⁾.

Im folgenden soll in diesem Zusammenhang noch über das mit der erwähnten Methode ermittelte Komplexbildungsvermögen einiger anderer Derivate des Histidins berichtet werden.

Den in Fig. 1 zusammengestellten Ergebnissen ist zu entnehmen, dass Histidyl-glycin ein von Histidin kaum verschiedenes Komplexbildungsvermögen zeigt, dass aber Histidinamid und Histidin-methylester mehr Cu²⁺ binden als Histidin. Das Bindungsvermögen von Acetylhistidin ist mit der von uns benützten Versuchsanordnung kaum

¹⁾ G. Wolff, S. Fallab & H. Erlenmeyer, *Experientia* **11**, 440 (1955).

²⁾ S. Fallab & H. Erlenmeyer, *Experientia* **11**, 174 (1955).

³⁾ H. Dobbie & W. O. Kermack, *Biochem. J.* **59**, 246 (1955).

mehr messbar. Die im Vergleich zum Bindungsvermögen von Histidin erhöhten k^* -Werte des Histidinamids, Histidylhistidins und Histidinmethylesters bei pH 5,2 bedeuten, dass Cu^{2+} unter diesen Bedingungen eine gewisse Begünstigung gegenüber H^+ erfährt.

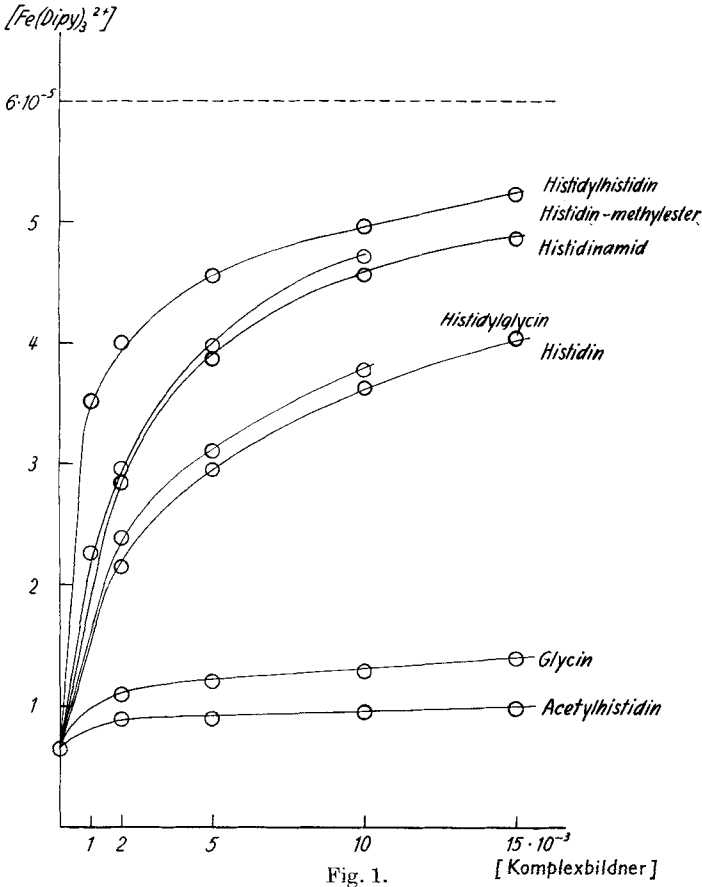


Fig. 1.

Mit der gleichen Messmethode untersuchten wir noch das Verhalten von Amid- und Dipeptiden neutraler Aminosäuren wie Glycin und Phenylalanin. Gegenüber Histidin und seinen Derivaten ist das Cu^{2+} -Bindungsvermögen dieser Verbindungen gering. Mit absteigendem Cu^{2+} -Bindungsvermögen ergab sich die Reihenfolge: Glycin > Glycylglycin > Phenylalanin > Phenylalaninamid > Glycylglycinamid.

Wir gingen seinerzeit²⁾ von der Beobachtung aus, dass im Organismus bei gewissen Erkrankungen der Cu^{2+} -Gehalt im Plasma erhöht ist. So kann im Falle einer Leukämie und einiger Infektionskrankheiten die Cu-Menge im Plasma verdoppelt werden. Fasst man diese Erhö-

hung des Kupferspiegels als eine Erhöhung der Cu^{2+} -Bindungskapazität des Systems bei gleichbleibender Cu-Zufuhr von aussen – d. h. bei gleichbleibender Konzentration an freien Cu^{2+} – auf, so kann dies durch verschiedene Faktoren bedingt sein, wie z. B. durch eine Erhöhung der Gesamtligandenkonzentration bzw. durch eine Verkleinerung des mittleren Molekulargewichts der in diesem System vorhandenen Proteine. Andererseits ist aber aus den vorliegenden Messungen zu entnehmen, dass auch durch Peptide, die z. B. Histidin in einer besonderen Folge aufweisen, eine solche Verminderung bzw. Vermehrung des Cu^{2+} -Spiegels verursacht werden kann. Dass eine solche Änderung des $p\text{Cu}^{2+}$ in biologischen Systemen sich auf andere Gleichgewichte, insbesondere auf Metallferment-Systeme, auswirken kann, wurde bereits in anderem Zusammenhang erwähnt⁴⁾.

Bei der Darstellung von L-Histidyl-glycin verfahren wir nach der von R. Holley & E. Sondheimer beschriebenen Methode⁵⁾. Der durch Umsetzung von Carbobenzoxy-L-histidinazid mit Glycinäthylester erhaltene Carbobenzoxy-L-histidyl-glycin-äthylester wurde mit der berechneten Menge NaOH verseift. Die Hydrierung mit Palladium-Kohle ergab in guter Ausbeute das erwartete L-Histidyl-glycin.

Während unsere Synthese im Gange war, erhielten wir Kenntnis von den Arbeiten von Amiard, Heymes & Velluz⁶⁾, die das Dipeptid aus N,N-Ditrityl-L-histidin herstellten.

Acetylhistidin und Histidinamid stellten wir nach bekannten Vorschriften dar⁷⁾⁸⁾. Glycyl-glycinamid⁹⁾ erhielten wir nach der von R. Schwyzer, M. Feuer & B. Iselin beschriebenen Methode¹⁰⁾ durch Umsetzung von Glycin-äthylester mit Carbobenzoxy-glycin-cyanmethylester, anschliessende Verseifung zum Amid und Hydrierung mit Palladium-Kohle.

Experimenteller Teil.

Carbobenzoxy-L-histidyl-glycin-äthylester. Die Lösung von 6 g (20 mM) Carbobenzoxy-L-histidinhydrazid in 60 cm³ 1-n. HCl wurde mit 80 cm³ Essigester vermischt, auf 0° abgekühlt, mit einer ebenfalls auf 0° gekühlten Lösung von 1,40 g Natriumnitrit in 5 cm³ Wasser und nach 5 Min. mit 25 cm³ einer kalten 50-proz. K₂CO₃-Lösung versetzt. Nach kräftigem Schütteln wurde die organische Phase bei 0° über Natriumsulfat getrocknet und filtriert.

Aus 3,28 g (23 mM) Glycinester-hydrochlorid, in 80 cm³ Äther suspendiert, wurde durch Zugabe von 30 cm³ 50-proz. K₂CO₃, Schütteln, Trocknen der Ätherschicht über Na₂SO₄ bei 0° und Filtrieren eine ätherische Lösung des freien Glycinesters gewonnen. Diese Lösung wurde mit der nach der obigen Vorschrift bereiteten Azidlösung versetzt. Nach 24stündigem Stehen der Reaktionslösung bei 0° erhielt man eine gelatinöse Masse,

⁴⁾ G. H. Wolff & S. Fallab, Helv. **39**, 999 (1956).

⁵⁾ J. Amer. chem. Soc. **76**, 1326 (1954).

⁶⁾ G. Amiard, R. Heymes & L. Velluz, Bull. chim. Soc. France **1955**, 1464.

⁷⁾ A. Neuberger, Biochem. J. **32**, 1452 (1938).

⁸⁾ K. Zeile & P. Piutti, Z. physiol. Chem. **218**, 52 (1933).

⁹⁾ P. Bergell, Z. physiol. Chem. **97**, 293 (1916).

¹⁰⁾ Helv. **38**, 83 (1955).

aus welcher beim Abnutschen 5 g rohe Substanz gewonnen wurde. Aus absolutem Alkohol erhielt man als erste Fraktion 1,9 g Carbobenzoxy-L-histidyl-glycin-äthylester in kleinen Nadeln vom Smp. 108—110°. $[\alpha]_D^{26} = -18,4^\circ \pm 1,5^\circ$ ($c = 1,36$ in abs. Alkohol).

$C_{18}H_{22}O_5N_4$	Ber. C 57,74	H 5,92	O 21,37	N 14,97%
	Gef. ,, 57,59	,, 5,98	,, 21,49	,, 14,73%

Carbobenzoxy-L-histidyl-glycin. Die Lösung von 1 g des oben dargestellten Esters in 10 cm³ Methanol wurde mit 2,72 cm³ 0,98-n. NaOH (1 Äquiv.) versetzt. Nach $\frac{1}{2}$ Std. wurden 2,67 cm³ 1-n. HCl (1 Äquiv.) zugegeben und die Lösung im Vakuum zur Trockne eingedampft. Nach Umkristallisieren des Rückstands aus 7 cm³ Wasser erhielt man 0,9 g flache, unregelmässige Kristalle. Zur Analyse wurde nochmals aus Wasser und dann aus Wasser/Alkohol umkristallisiert. Smp. 230° (Präparate, die bei 140—190° eine Veränderung zeigen, enthalten Hydrochlorid).

$C_{16}H_{18}O_5N_4$	Ber. C 55,48	H 5,24	N 16,18%
	Gef. ,, 55,27	,, 5,37	,, 16,17%

L-Histidylglycin. 450 mg reine Carbobenzoxy-Verbindung wurden in 15 cm³ Eisessig und 2 cm³ Wasser mit Palladium-Kohle als Katalysator hydriert. Die Lösung wurde filtriert und zur Trockne eingedampft, der Rückstand mit Wasser gut verrührt und erneut eingedampft. Letztere Operation wurde noch zweimal wiederholt, sodann wurde in gleicher Weise dreimal mit Alkohol verrührt und jeweils zur Trockne eingedampft. Der Rückstand ergab nach Umkristallisieren aus Wasser/Alkohol 180 mg (60%) des Dipeptids in dünnen, langen Prismen vom Smp. 167—170° (Zers.), bei schnellem Erhitzen 185—190° (Zers.) nach Veränderung bei 165°. $[\alpha]_D^{22} = +23,5^\circ \pm 1^\circ$ (Lit.⁶) + $25^\circ \pm 1^\circ$) auf wasserfreies Produkt berechnet ($c = 1,2$ in Wasser).

$C_8H_{12}O_3N_4, \frac{1}{2} H_2O$	Ber. C 43,43	H 5,92	O 25,31	N 25,33%
	Gef. ,, 43,54	,, 6,03	,, 25,57	,, 25,44%

Hydrochlorid. 22,1 mg des Dipeptids wurden in wenig Wasser gelöst und mit 0,1 cm³ 1-n. HCl (1 Äquiv.) versetzt. Nach Zugabe von Alkohol fiel das Hydrochlorid aus. Es wurde abfiltriert und mit wenig 75-proz. Alkohol gewaschen. Man erhielt 17 mg Hydrochlorid vom Smp. 217—218° (Zers.) in kugeligen Aggregaten aus kleinen, kurzen Prismen. $[\alpha]_D^{22} = -33,6^\circ \pm 2^\circ$ ($c = 1,01$ in Wasser).

$C_8H_{12}O_3N_4, HCl$	Ber. C 38,63	H 5,27	O 19,30	Cl 14,26%
	Gef. ,, 38,89	,, 5,30	,, 19,53	,, 14,03%

Die auf Grund potentiometrischer Titrations ermittelten Molgewichte betragen für L-Histidylglycin $\cdot \frac{1}{2} H_2O$ 219,0 (ber. 221,2), für das Monohydrochlorid 248,7 (ber. 251,4).

Bei der Ermittlung des Cu²⁺-Bindungsvermögens verfahren wir nach der früher beschriebenen Methode¹). Die in Fig. 1 als Ordinaten aufgetragenen Werte bedeuten die im System vorhandene Indikatorkonzentration $[Fe(Dipy)_3^{3+}]$. Auf der Abszisse ist die Konzentration der zu untersuchenden Komplexbildner aufgetragen.

Die Mikroanalysen verdanken wir dem mikroanalytischen Laboratorium der CIBA Aktiengesellschaft (Dr. H. Gysel).

Dem Schweizerischen Nationalfonds zur Förderung der wissenschaftlichen Forschung danken wir für einen Beitrag an die Kosten unserer Untersuchungen.

SUMMARY.

The capacity of binding Cu²⁺ of histidine and derivatives is compared under certain standard conditions.

Anstalt für anorganische Chemie der Universität Basel.