können sich ohne Behinderung den positivierten H-Atomen der NH-Bindung von (1) unter Ausbildung zunächst lockerer Additionsverbindungen nähern. Im weiteren Schritt kommt es dann unter Abspaltung von HCl und Addition des Acylkations zur Bildung von (3). Mit zunehmendem $+I$ -Effekt der in 3.6-Stellung von (1) vorhandenen Substituenten nimmt die Polarität der NH-Bindung ab, weil nunmehr die Protonen stärker von den Stickstoffatomen angezogen werden. Damit erfolgt eine Verschiebung des Gleichgewichts I nach (1) hin. Die für die Abspaltung von HCl notwendige Aktivierungsenergie muß sich mit zunehmendem $+I$ -Effekt der Substituenten erhöhen. Während die Umsetzungen mit $R=H$ in 70–80-proz. Ausbeute verlaufen, betragen dieselben für $R=-CH_2-CH(CH_3)_2$ nur noch 40–50 Prozent.

Die N,N' -Di-Myristoyl- und N,N' -Di-Palmitoyl-2.5-diketopiperazine zeichnen sich durch besondere Eigenschaften aus. Sie lösen sich leicht in den meisten orga-

nischen Lösungsmitteln, eine für 2.5-Diketopiperazine recht ungewöhnliche Eigenschaft. Außerdem wird durch Anwesenheit langer aliphatischer Reste der Schmelzpunkt im Verhältnis zur unsubstituierten Verbindung um fast 200° erniedrigt. Weitere Untersuchungen dieser Verbindungen sind im Gange.

Arbeitsvorschrift

10 mMol des 2.5-Diketopiperazins werden im Mörser fein zerrieben, in einen 250-ml-Kolben gebracht und mit 80 ml absolutem Xylol versetzt. Dann konnten 20 ml Myristoyl- bzw. Palmitoylchlorid auf einmal zugesetzt werden. Anschließend wurde am Rückfluß gekocht, bis die HCl-Entwicklung nachgelassen hatte (6 h). Nach dem Abkühlen der Lösung fielen einige Reaktionsprodukte sofort aus und konnten aus Benzol oder Aceton umkristallisiert werden. Ansonsten wurde das Xylol im Vakuum abgezogen und die Rückstände aus den genannten Lösungsmitteln umkristallisiert.

Aerobe Photoreaktion zwischen 3.4-Benzpyren und Tryptophan in wäßriger Lösung

G. RESKE

Institut für physikalische Biochemie und Kolloidchemie im
Institut für physikalische Chemie der Universität Frankfurt/M.

(Z. Naturforschg. 21 b, 1241–1242 [1966]; eingeg. am 2. September 1966)

In einer früheren Arbeit¹ ist gezeigt worden, daß durch 3.4-Benzpyren und UV-Licht der Wellenlänge $366\text{ m}\mu$ ähnliche Effekte in wäßrigen Protein-Lösungen hervorgerufen werden, wie allein durch UV-Licht mit Wellenlängen im Absorptionsbereich der aromatischen Aminosäuren ($280\text{ m}\mu$). Das schien darauf hinzudeuten, daß die beobachteten Veränderungen an den Proteinen (Verschwinden der SH-Gruppen, anomales Hitze-denaturierungs-Verhalten von β -Lactoglobulin) über Reaktionen der aromatischen Aminosäuren der beteiligten Proteine verlaufen.

Bequemer und sicherer als die bestrahlten Protein-Benzpyren-Lösungen aufzuarbeiten, erschien es, zur Untersuchung der Frage einer primären, aeroben Photoreaktion zwischen 3.4-Benzpyren und aromatischen Aminosäuren die fraglichen Komponenten selbst einzeln und zusammen mit 3.4-Benzpyren in wäßrigen Lösungen zu bestrahlen ($366\text{ m}\mu$) und zu beobachten, ob dabei Veränderungen auftreten. Zur Solubilisierung des in reinem Wasser sehr schwer löslichen Kohlenwasserstoffs wurde Na-Laurylsulfonat verwendet, das in Analogie zu Proteinen durch hydrophobe Wechselwirkung solubilisierend wirkt. Aus Suspensionen des Kohlenwasserstoffs und der schwer löslichen Aminosäuren in wäßrigen Lösungen des Solubilisators wurden die reinen Lösungen wie früher¹ beschrieben hergestellt und

Abb. 1. Rel. Abnahme der Fluoreszenzintensität (J) von 3.4-Benzpyren mit der Bestrahlungszeit (t) (eingestrahle Wellenlänge: $366\text{ m}\mu$, Bestrahlungsanordnung wie früher² beschrieben) in wäßriger Lösung vom pH 7,3 (Trispuffer, $0,2\text{-m.}$) mit $0,2\%$ Na-Laurylsulfonat bei Anwesenheit verschiedener aromatischer Aminosäuren; Fluoreszenzintensität der unbestrahlten Lösungen = 100 Prozent. Kurve 1: (—) $2 \cdot 10^{-5}\text{-m.}$ 3.4-Benzpyren. Kurve 2: (···) $1,3 \cdot 10^{-5}\text{-m.}$ 3.4-Benzpyren + $5 \cdot 10^{-3}\text{-m.}$ Tryptophan. Kurve 3: (---) $2 \cdot 10^{-5}\text{-m.}$ 3.4-Benzpyren + $4,5 \cdot 10^{-2}\text{-m.}$ Phenylalanin. Kurve 4: (-.-.-) $2 \cdot 10^{-5}\text{-m.}$ 3.4-Benzpyren + $3,6 \cdot 10^{-3}\text{-m.}$ Tyrosin. Kurve 5: (-.-.-.-) $2 \cdot 10^{-5}\text{-m.}$ 3.4-Benzpyren + $5 \cdot 10^{-3}\text{-m.}$ Histidin. Kurve 6: (○○○○) $1,3 \cdot 10^{-5}\text{-m.}$ 3.4-Benzpyren + $5 \cdot 10^{-3}\text{-m.}$ Tryptophan + $1,65 \cdot 10^{-2}\text{-m.}$ Cystein. Histidin und Cystein wurden eingewogen, alle anderen Konzentrationen aus den Extinktionen berechnet.

¹ G. RESKE u. J. STAUFF, Z. Naturforschg. 19 b, 716 [1964].

² G. RESKE u. J. STAUFF, Z. Naturforschg. 18 b, 774 [1963].

nach verschiedenen Bestrahlungszeiten Absorptions- und Fluoreszenzspektren aufgenommen. Abb. 1 zeigt die Abnahme der 3,4-Benzpyrenfluoreszenz mit der Bestrahlungszeit bei Anwesenheit verschiedener aromatischer Aminosäuren. Die Fluoreszenz der reinen 3,4-Benzpyren-Sulfonatlösungen verschwindet entsprechend der Kurve 1. Diese Photooxydation verläuft wesentlich schneller, wenn Tryptophan anwesend ist (Kurve 2). Zwischen 300 und 350 m μ wird gleichzeitig eine Zunahme der Extinktion beobachtet, die wesentlich größer ist als bei bestrahlten Tryptophanlösungen, die kein 3,4-Benzpyren enthalten. Durch Phenylalanin und Tyro-

sin wird im Rahmen der Toleranz die Photooxydation des Kohlenwasserstoffs nicht beeinflusst (Kurven 3 und 4), d. h. die Geschwindigkeit der Reaktion mit diesen Aminosäuren ist mindestens in der Größenordnung kleiner als die Geschwindigkeit der Photoreaktion von 3,4-Benzpyren mit Tryptophan. Histidin scheint die Photooxydation des Kohlenwasserstoffs zu hemmen. Kurve 5 liegt zwar noch innerhalb der Toleranz; die Hemmung wird aber mit steigender Konzentration von Histidin stärker. Ebenso wie Sauerstoffentzug blockiert Cystein in hinreichender Konzentration die Photooxydationen vollständig (Kurve 6).

Enzymatische Tritierung DPNH-reduzierbarer Substanzen über Glutamat-2-T mit HTO als Ausgangsprodukt *

MARTIN WENZEL und MARGARETE BRÜHMÜLLER

Physiologisch-chemisches Institut der Freien Universität Berlin

(Z. Naturforsch. **21 b**, 1242—1243 [1966]; eingeg. am 31. August 1966)

Mit Hilfe der Glutamat-Pyruvat-Transaminase wird bei der Inkubation von HTO mit Glutaminsäure bei pH 8,2 Glutamat-2-T gebildet. Nur ein Wasserstoffatom der Glutaminsäure setzt sich mit den Tritium-Ionen des Wassers ins Gleichgewicht [vgl. Tab. 1].

Spez. Aktivität HTO im Ansatz [$\mu Ci/\mu Atom H$]	Spez. Aktivität Glu [$\mu Ci/\mu M$]	Spez. Akt. Glu Spez. Akt. HTO
0,061	0,060	0,99
0,784	0,778	0,98
33,5	33,6	1,00

Tab. 1. Molspezifische Aktivität der Glutaminsäure als Funktion der spezifischen Aktivität des HTO. Ansatz: 15 mg 1-[+]-Glutaminsäure [100 μM], mit KOH neutralisiert, 0,5 ml Phosphatpuffer pH 8,2 [50 μM], 0,05 ml Pyridoxalphosphat [0,5 μM]. Nach Gefriertrocknung wurde zum trockenen Rückstand 0,2 mg Glutamat-Pyruvat-Transaminase [5 Einh.] und 1,0 ml HTO [4,09 Ci] zugegeben. Gesamtvolumen: 1,1 ml. Inkubation: 24 Stdn. bei 38 °C. Nach Reaktionsende wurde der Ansatz gefriergetrocknet und ein Aliquot des in H_2O gelösten Rückstandes chromatographiert. Laufmittel: Butanol—Eisessig—Wasser = 4 : 1 : 1.

Ein weiterer T-Einbau [am C-Atom 3] ist nicht nachweisbar, was im Gegensatz zu den Befunden von OSHIMA und Mitarb.¹ bei der Inkubation von Alanin und Transaminase mit D_2O steht, wonach bei der Transaminase-Reaktion auch die H-Atome am β -C-Atom labilisiert werden sollen. Durch gekoppelte Enzymreaktionen gelingt es mittels DPN und Glutamat-Dehydrogenase auf diese Weise, aus HTO über Glutamat-2-T intermediär

Abb. 1. Radiochromatogramme der Synthesansätze zur Herstellung von L- α -Glycerophosphat-2-T. Die Methodik ist in l. c.² beschrieben. Bei diesen Ansätzen war aus technischen Gründen das Glutamat-2-T vorher isoliert worden. Ansatz: 0,66 ml Glutamat-2-T-Lösung [0,62 μM , 20,6 μCi], 0,2 ml Phosphatpuffer pH 7,6 [20 μM], 0,01 ml EDTA [1,0 μM], 0,03 ml Glutamat-DH [0,3 mg, 1 Einh.], 0,2 ml α -Glycerophosphat-DH/Triosephosphatisomerase [0,3 mg, 10 Einh.], 0,2 ml Triosephosphatester [3,5 μM DAP + 3,5 μM GAP]. Das Gesamtvolumen von 1,3 ml wurde in zwei gleiche Hälften zu je 0,65 ml [0,31 μM Glu] geteilt: 5 Mol-%: 0,015 ml DPN [0,015 μM] einer 0,81 mg/ml Lösung. 500 Mol-%: 0,06 ml DPN [1,5 μM] einer 20 mg/ml Lösung. Inkubation: 12 Stdn. bei 38 °C. Nach Gefriertrocknung und Inaktivierung der

* 3. Mitt.: „Enzymatische Reaktionen in Tritium-Wasser“.

¹ T. OSHIMA u. N. TAMIYA, Biochem. J. **78**, 116 [1961].

² M. WENZEL u. TH. GÜNTHER, Hoppe-Seylers Z. physiol. Chem. **333**, 286 [1963]; **335**, 63 [1963].