

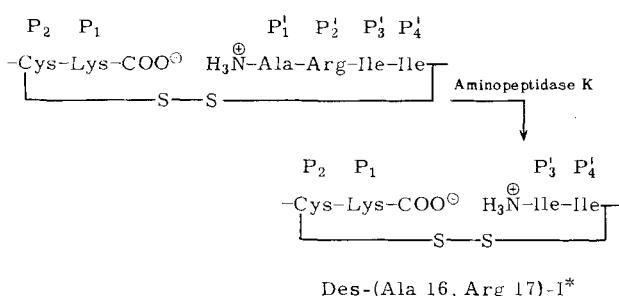
Inaktivierung des Trypsin-Kallikrein-Inhibitors (Kunitz) durch Abspaltung des Dipeptids Ala 16—Arg 17 im reaktiven Zentrum^[**]

Von Helmut Jering und Harald Tschesche^[*]

Die Abspaltung des Restes P_1 (Lys 15) aus dem reaktiven Zentrum des modifizierten Trypsin-Kallikrein-Inhibitors I* (Kunitz)^[1] inaktiviert den Inhibitor^[2]. Es stellt sich die Frage, ob die Entfernung des Restes P'_1 (Ala 16) den Inhibitor ebenfalls inaktiviert, obwohl an P_1 die Bildung eines Acyl-Enzym-Komplexes als Zwischenstufe auf dem Weg zum stabilen Enzym-Inhibitor-Komplex C^[3] noch möglich ist.

Die Abspaltung des Restes P'_1 (Ala 16) aus I* gestaltete sich schwierig, da der Edman-Abbau infolge Inaktivierung des Inhibitors (N^{α} -Derivatisierung) nicht anwendbar ist und mehrere Aminopeptidasen [Leucin-Aminopeptidase aus Rinderaugenlinsen (MG 300000^[4]), Aminopeptidase M u.a.] I* nicht angreifen. Aminopeptidase K (Merck AG) ist infolge ihres kleinen Molekulargewichtes (19000^[5]) wirksam und spaltet innerhalb 20 min die Reste P'_1 und P'_2 (Ala 16 und Arg 17) ab (0.5 μ mol I*, 0.2 Mol-% Aminopeptidase K in 1.5 ml 0.025 M Diäthylbarbiturat-Puffer, pH = 8.3) (Schema 1).

Die Reaktion kann so gelenkt werden, daß zu 95% modifizierter Des-(Ala 16, Arg 17)-Inhibitor entsteht. Längere Enzymeinwirkung spaltet auch noch Ile 18 ab. Darauf kommt die Reaktion zum Stillstand.



Schema 1

Der modifizierte Des-(Ala 16, Arg 17)-Inhibitor ließ sich durch Molekularsiebfiltration an Sephadex G-50 in 0.1 M Essigsäure vom Enzym trennen und wurde durch Ionenaustauschchromatographie an CM-Sephadex C-25 in 0.01 M Natriumborat-Puffer pH = 8.6 gereinigt (linearer NaCl-Gradient von 0 bis 0.3 M). Das homogene Material ist durch seine Aminosäure-Zusammensetzung charakterisiert. Nativer Inhibitor wird am N-Terminus (Arg-Pro-Asp-Phe-) durch Aminopeptidase K nicht angegriffen.

Nach Abspaltung der Reste P'_1 und P'_2 ist I* im üblichen Test^[6] gegen Trypsin inaktiv, d.h. die Assoziationskonstante K_{Ass} (Bildung des Enzym-Inhibitor-Komplexes) ist um 8 bis 10 Zehnerpotenzen verringert. Ob der Acyl-Enzym-Komplex als Zwischenstufe noch entsteht, wird zur Zeit untersucht. Da Arg 17 einen wesentlichen Beitrag zur Stabilisierung des Komplexes liefert^[3], war mit einer drastischen Verringerung von K_{Ass} zu rechnen; dennoch sollten nach den Röntgen-Strukturdaten des kristallisierten Komplexes^[3] noch genügend Wechsel-

[*] Priv.-Doz. Dr. H. Tschesche und Dr. H. Jering
Organisch-Chemisches Laboratorium,
Lehrstuhl für Organische Chemie und Biochemie der Technischen Universität
8 München 2, Arcisstraße 21

[**] Diese Arbeit wurde von der Deutschen Forschungsgemeinschaft unterstützt. Fräulein C. Frank danken wir für die Durchführung der Aminosäure-Analysen. Der Bayer AG, Wuppertal, danken wir für die Überlassung von Trasylol® (Trypsin-Kallikrein®-Inhibitor (Kunitz) aus Rinderlunge).

selwirkungen zur orientierten Einlagerung des Des-(Ala 16, Arg 17)-Inhibitors an das Enzym vorhanden sein.

Eingegangen am 18. Juni 1974,
ergänzt am 16. Juli 1974 [Z 68d]

[1] H. Jering u. H. Tschesche, Angew. Chem. 86, 702 (1974); Angew. Chem. internat. Edit. 13, Nr. 10 (1974).

[2] H. Jering u. H. Tschesche, Angew. Chem. 86, 703 (1974); Angew. Chem. internat. Edit. 13, Nr. 10 (1974).

[3] R. Huber, D. Kukla, W. Steigemann, J. Deisenhofer u. A. Jones in H. Fritz, H. Tschesche, L. J. Greene u. E. Truscott: Proteinase Inhibitors, 2nd International Research Conference – Bayer Symposium V. Springer, Berlin, im Druck; s. auch H. Tschesche, Angew. Chem. 86, 21 (1974); Angew. Chem. internat. Edit. 13, 10 (1974).

[4] S. R. Himmelfarb u. E. A. Peterson, Biochemistry 7, 2085 (1968).

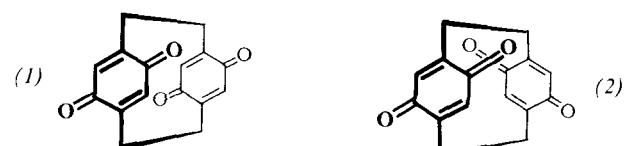
[5] N. Henrich, M. Klockow, H. D. Orth, U. Femfert, P. Cichocki u. K. Jany, Hoppe-Seylers Z. Physiol. Chem. 354, 1339 (1973).

[6] H. Fritz, I. Trautschold u. E. Werle in H. U. Bergmeyer: Methoden der enzymatischen Analyse. Verlag Chemie, Weinheim 1970. 2. Aufl., Vol. 1, S. 1011ff.

[2.2](2,5)Benzochinonophane: Struktur und Photochemie^[1]

Von Hermann Irngartinger, Rolf-Dieter Acker, Walter Rebafka und Heinz A. Staab^[*]

Rebafka und Staab^[2] haben kürzlich im Rahmen der Synthese „intramolekularer Chinhydron“ zwei Diastereomere [2.2](2,5)Benzochinonophane beschrieben, für die die Zuordnung zur achiralen „pseudo-geminalen“ Struktur (1) und zur chiralen „pseudo-ortho“-Struktur (2) aufgrund der Synthesewege vorgenommen wurde. Röntgen-Strukturanalysen waren nicht nur zur Bestätigung dieser Zuordnung von Interesse, sondern auch zur Klärung der Frage, wie die beim [2.2]Paracyclophan beobachtete Moleküldeformation^[3] durch den Ersatz der Benzol-Ringe durch die nicht-aromatischen p-Benzochinon-Einheiten verändert würde, sowie im Zusammenhang mit dem zu erwartenden unterschiedlichen photochemischen Verhalten von (1) und (2).



(1) kristallisiert aus Dioxan in der monoklinen Raumgruppe $P2_1/n$ mit zwei Molekülen in der Elementarzelle [$a = 7.930(2)$, $b = 9.280(2)$, $c = 8.024(2)$ Å; $\beta = 93.30(2)$ °; $d_{\text{per.}} = 1.51 \text{ g} \cdot \text{cm}^{-3}$]. Zur Strukturbestimmung wurden 1440 (einschl. 420 „unbeobachteter“) Reflexe bis $\sin \Theta/\lambda = 0.66$ auf einem Computergesteuerten Siemens-Einkristalldiffraktometer mit $\text{MoK}\alpha$ -Strahlung nach der Differenz-Filter-Methode vermessen. Die Struktur konnte anhand von 120 E(hkl)-Werten mit direkten Methoden^[4] gelöst und nach dem Verfahren der kleinsten Quadrate mit anisotropen Temperaturfaktoren für die C- und O-Atome und mit isotropen Temperaturfaktoren für die H-Atome in mehreren Cyclen bis zu einem R-Wert von 5.1% verfeinert werden.

Das Molekül (1) (Abb. 1) hat im Kristall die Symmetrie T (C_i); die Abweichung von der Symmetrie $2/m(C_{2h})$ beruht im wesentlichen auf einer Parallelverschiebung der beiden Chinon-Ringe um 0.24 Å senkrecht zu $C^3 \dots C^6$. Während Bindungslängen und -winkel innerhalb der Chinon-Ringe von

[*] Priv.-Doz. Dr. H. Irngartinger, Dipl.-Chem. R.-D. Acker, Dr. W. Rebafka und Prof. Dr. H. A. Staab
Institut für Organische Chemie der Universität
69 Heidelberg, Im Neuenheimer Feld 7

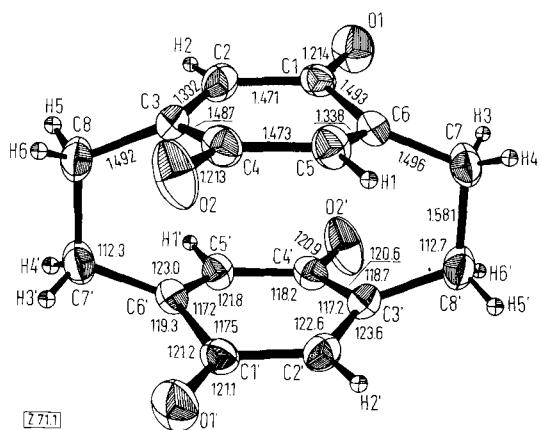


Abb. 1. Bindungslängen (\AA , Standardabweichung 0.002 \AA) und Bindungswinkel ($\text{^{\circ}}$, Standardabweichung 0.1–0.2 $\text{^{\circ}}$) von (7). Die ORTEP-Zeichnung der Schwingungsellipsoide ist mit 50 % Wahrscheinlichkeit für die C- und O-Atome durchgeführt; die H-Atome wurden auf 0.1 \AA festgesetzt.)

(1) mit den Werten für 2,5-Dimethyl-1,4-benzochinon^[5] gut übereinstimmen, ist die Bindung C⁷—C⁸, die parallel zu den Abstoßungskräften innerhalb des Moleküls verläuft, auf 1.581 Å gedehnt. Aufgrund der transanularen Abstoßung erfolgt ferner eine beträchtliche bootförmige Deformation der Chinon-Ringe (Abb. 2). Zur Ebene E1 durch die Atome C¹, C², C⁴ und C⁵ sind die Ebenen E2 durch C¹, C⁵ und C⁶ bzw. C², C³ und C⁴ um durchschnittlich 16° geneigt (bei [2.2]Paracyclophan beträgt die entsprechende Deformation 12.6°^[3b]). Die Kohlenstoff-Sauerstoff-Bindungen weichen in entgegengesetzter Richtung um 5.5° von E1 ab (O¹...O²: 3.37 Å). Besonders kurze Kontakte von 2.73 Å und 3.11 Å werden für C³...C⁶' und C²...C⁵', d.h. für die einander paarweise gegenüberliegenden Kohlenstoff-Kohlenstoff-Doppelbindungen der beiden *p*-Benzochinon-Systeme, gefunden. Da diese Doppelbindungen zudem in der Projektion auf E1 parallel zueinander angeordnet sind (in der durch sie festgelegten Ebene bilden sie einen Winkel von 16.5° miteinander), liegen hier günstige Voraussetzungen für intramolekulare photochemische [2+2]-Cycloadditionen vor.

Demgegenüber sind die Bedingungen für die sonst bei *p*-Benzochinonen beobachteten zwischenmolekularen Photo-Cycloadditionen wesentlich ungünstiger: zwar wird ein Mittelpunktsabstand zwischen der Doppelbindung C²—C³ und der

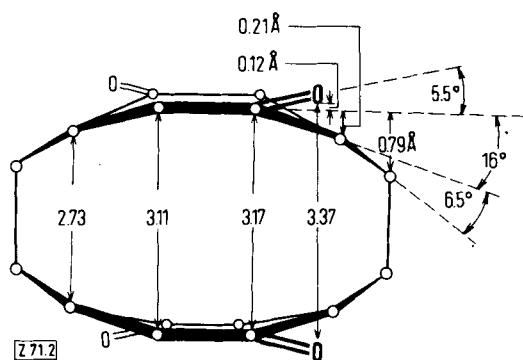
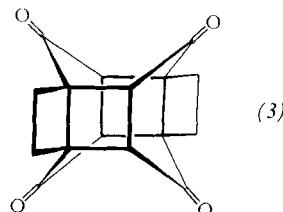


Abb. 2. Transanulare Abstände (\AA) und gemittelte Abweichungen von der Ebene E1 durch C¹, C², C⁴ und C⁵ in (1).

Doppelbindung C⁵—C⁶ eines Nachbarmoleküls mit 3.80 Å unterhalb des topochemischen Maximalabstands von 4.2 Å^[6] gefunden, doch kreuzen sich diese beiden Doppelbindungen unter einem Winkel von 53.3°.

Die Festkörper-Bestrahlung von (1) (900W-Hg-Hochdrucklampe, Duran-Filter, 24 h) ergibt in der Tat durch doppelte

intramolekulare Cycloaddition in etwa 90-proz. Ausbeute eine farblose Verbindung (Zers. > 230 °C, aus Dioxan), der die Käfig-Struktur (3) zukommt:¹ H-NMR (PFT, 3540 Durchläufe, in D₂O): δ = 2.0–3.6 (m, 8 Methylen-H), 3.76 (s, 4 Methin-H); IR: ν_{C=O} = 1710 cm⁻¹ (in Dioxan); UV: kein Maximum oberhalb 200 nm; MS: M⁺ ber. für C₁₆H₁₂O₄ 268.0734, gef. 268.0736. Für die massenspektrometrische Fragmentierung ist die sukzessive Abspaltung der vier Carbonyl-Gruppen bis zu C₁₂H₁₂ und entsprechend in der um 1 H ärmeren Reihe typisch; weitere wichtige Fragment-Ionen sind m/e = 214 (80%), 201 (100%), 115 (43%). (1) nimmt ähnlich wie die strukturverwandten, durch Photodimerisierung von Dimethylbenzochinonen erhaltenen Käfig-Verbindungen^[7] Wasser zu einem Dihydrat auf.



Im Gegensatz zu (1) ließ sich beim Diastereomeren (2) bei der Festkörper-Bestrahlung unter den gleichen Bedingungen und auch nach längerer Bestrahlungszeit erwartungsgemäß keine intramolekulare Cycloaddition der *p*-Benzochinon-Einheiten beobachten. In einer wesentlich langsameren Umsetzung tritt vielmehr eine zwischenmolekulare Photoreaktion zu einem Produkt höheren Molekulargewichts ein (nach 72 h Bestrahlung 40% Ausb.). Eine Deutung dieser Photoreaktion aufgrund der topochemischen Verhältnisse ist bisher nicht möglich, da bei der Röntgen-Aufnahme von (2) [$a = 9.09$, $b = 23.65$, $c = 11.44 \text{ \AA}$; $\beta = 90.9^\circ$; Raumgruppe: $P2_1/c$, $Z = 8$; $D_{\text{ber.}} = 1.45$] ebenfalls Veränderungen auftreten.

Eingegangen am 3. Juli 1974 [Z 71]

CAS-Registry-Nummern:

(1): 52729-66-5 / (2): 50874-32-3 / (3): 52571-23-0.

- [1] Transanulare Wechselwirkungen bei [2.2]Phanen, 7. Mitteilung. - 6. Mitteilung: *M. Haenel*, Tetrahedron Lett., im Druck.

[2] *W. Rebafka u. H. A. Staab*, Angew. Chem. 85, 831 (1973); 86, 234 (1974); Angew. Chem. internat. Edit. 12, 776 (1973); 13, 203 (1974).

[3] a) *C. J. Brown*, J. Chem. Soc. 1953, 3265; b) *H. Hope*, J. Bernstein u. K. N. Trueblood, Acta Crystallogr. B 28, 1733 (1972).

[4] Programm LSAM von *G. Germain*, *P. Main* u. *M. M. Woolfson*, Acta Crystallogr. A 27, 368 (1971).

[5] *D. Rabinovich* u. *G. M. J. Schmidt*, J. Chem. Soc. 1964, 2030.

[6] *G. M. J. Schmidt*, J. Chem. Soc. 1964, 2014; Pure Appl. Chem. 27, 647 (1971).

[7] *R. C. Cookson*, *D. A. Cox* u. *J. Hudec*, J. Chem. Soc. 1961, 4499; s. auch *H. Hopf* u. *H. Musso*, Chem. Ber. 106, 143 (1973).

Photoisomerisierung des Tricyclo[5.2.1.0^{4,10}]deca-2,5,8-triens (Triquinacens)^[**]

Von Dieter Bosse und Armin de Meijere^[*]

Die thermische Isomerisierung des Diademans (1)^[1] führt zum Triquinacen (2). Die Umkehrreaktion (2) → (1) dagegen ist nur über einen photochemischen Mehrstufenprozeß denk-

[*] Dipl.-Chem. D. Bosse und Doz. Dr. A. de Meijere
Organisch-Chemisches Institut der Universität
34 Göttingen, Windausweg 2

[**] Auszugsweise vorgetragen auf der Chemiedozententagung in Stuttgart, 31.3.-4.4.1974 und auf der 15th Conference on Reaction Mechanisms in Fort Collins, Colorado (USA), 24.-28.6.1974. – Diese Arbeit wurde von der Deutschen Forschungsgemeinschaft und dem Fonds der Chemischen Industrie unterstützt.