

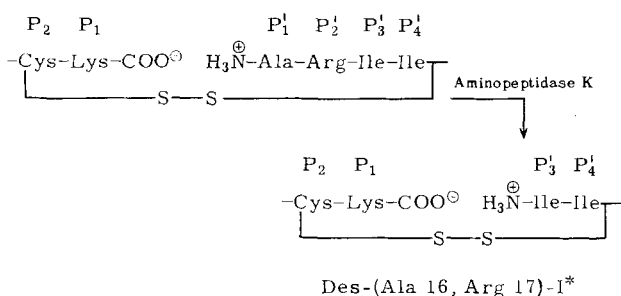
# Inaktivierung des Trypsin-Kallikrein-Inhibitors (Kunitz) durch Abspaltung des Dipeptids Ala 16—Arg 17 im reaktiven Zentrum<sup>[\*\*]</sup>

Von Helmut Jering und Harald Tschesche<sup>[\*]</sup>

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

Die Abspaltung des Restes P<sub>1</sub> (Ala 16) aus I\* gestaltete sich schwierig, da der Edman-Abbau infolge Inaktivierung des Inhibitors (N<sup>ε</sup>-Derivatisierung) nicht anwendbar ist und mehrere Aminopeptidasen [Leucin-Aminopeptidase aus Rinderaugenlinsen (MG 300000<sup>[4]</sup>), Aminopeptidase M u. a.] I\* nicht angreifen. Aminopeptidase K (Merck AG) ist infolge ihres kleinen Molekulargewichtes (19000<sup>[5]</sup>) wirksam und spaltet innerhalb 20 min die Reste P<sub>1</sub> und P<sub>2</sub> (Ala 16 und Arg 17) ab (0.5 μmol 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<sub>1</sub> und P<sub>2</sub> ist I\* im üblichen Test<sup>[6]</sup> gegen Trypsin inaktiv, d. h. die Assoziationskonstante K<sub>Ass</sub> (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<sup>[3]</sup>, war mit einer drastischen Verringerung von K<sub>Ass</sub> zu rechnen; dennoch sollten nach den Röntgen-Strukturdaten des kristallisierten Komplexes<sup>[3]</sup> noch genügend Wechselwirkungen zur orientierten Einlagerung des Des-(Ala 16, Arg 17)-Inhibitors an das Enzym vorhanden sein.

[\*] 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. Trusheit: 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. Himmelhoch u. E. A. Peterson, Biochemistry 7, 2085 (1968).

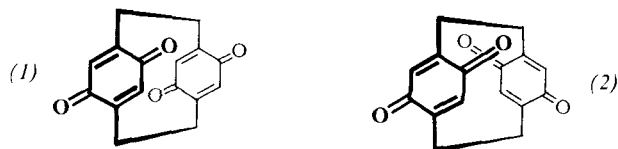
[5] N. Hemrich, M. Klockow, H. D. Orth, U. Femfert, P. Cichocki u. K. Jany, Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem. 354, 1339 (1973).

[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<sup>[1]</sup>

Von Hermann Irngartinger, Rolf-Dieter Acker, Walter Rebafka und Heinz A. Staab<sup>[\*]</sup>

Rebafka und Staab<sup>[2]</sup> haben kürzlich im Rahmen der Synthese „intramolekularer Chinhydrone“ 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<sup>[3]</sup> 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<sub>1</sub>/n mit zwei Molekülen in der Elementarzelle [a = 7.930(2), b = 9.280(2), c = 8.024(2) Å; β = 93.30(2)°; d<sub>ber.</sub> = 1.51 g·cm<sup>-3</sup>]. Zur Strukturbestimmung wurden 1440 (einschl. 420 „unbeobachteter“) Reflexe bis sin Θ/λ = 0.66 auf einem Computergesteuerten Siemens-Einkristalldiffraktometer mit MoK<sub>α</sub>-Strahlung nach der Differenz-Filter-Methode vermessen. Die Struktur konnte anhand von 120 E(hkl)-Werten mit direkten Methoden<sup>[4]</sup> 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 Cycles bis zu einem R-Wert von 5.1% verfeinert werden.

Das Molekül (1) (Abb. 1) hat im Kristall die Symmetrie 1 (C<sub>1</sub>); die Abweichung von der Symmetrie 2/m(C<sub>2h</sub>) beruht im wesentlichen auf einer Parallelverschiebung der beiden Chinon-Ringe um 0.24 Å senkrecht zu C<sup>3</sup>...C<sup>6</sup>. 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