

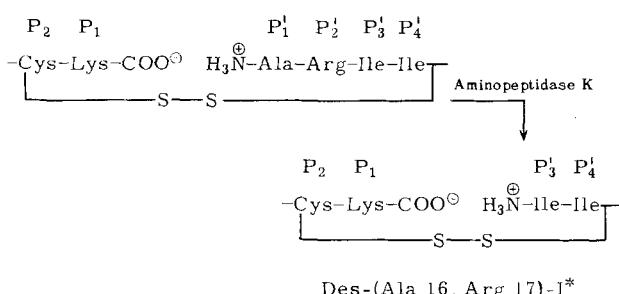
Inaktivierung des Trypsin-Kallikrein-Inhibitors (Kunitz) durch Abspaltung des Dipeptids Ala 16—Arg 17 im reaktiven Zentrum^[**]

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).

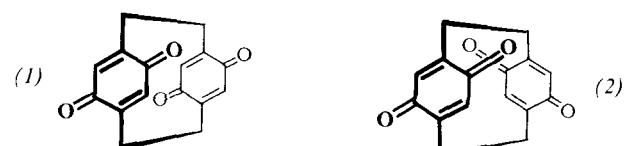
[5] N. Henrich, M. Klockow, H. D. Orth, U. Femfert, P. Cichocki u. K. Jany, Hoppe-Seylers Z. Physiol. Chem. 354, 1339 (1973).

[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