

Abb. 1. Struktur des Diethylammonium-Salzes (7a) [4].

In wasserhaltigen Lösungsmitteln entsteht aus (2) und (3) als Hauptprodukt der neutrale, gemischte Chalkogenid-Komplex (8)^[3].

Im Molverhältnis 1:1 reagieren (2) und (3) in siedendem wasserfreiem Ethanol zum zweikernigen Komplex (9), der nach dem $^{31}\text{P}\{^1\text{H}\}$ -NMR-Spektrum (Abb. 2) die angegebene Struktur hat. Ähnliche Verbindungen mit Platin(II) vom Typ $[\text{Pt}(\text{PR}_3)\text{R}_2\text{PS}]_2$ sind schon früher aus $[\text{Pt}(\text{PPh}_3)_4]$ und (3)^[5] oder $[\text{R}_2\text{PS}]_2$ ^[6] synthetisiert worden.

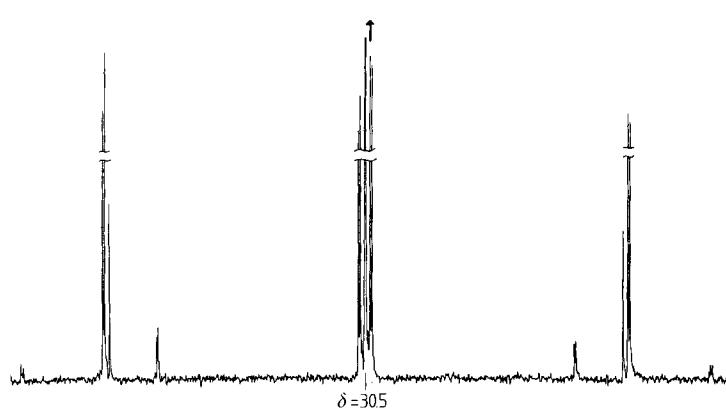


Abb. 2. $^{31}\text{P}\{^1\text{H}\}$ -NMR-Spektrum von (9a) in CDCl_3 bei 301 K. $J_{\text{PP}}=3656.4$, $J_{\text{PH}}=80.5$, $J_{\text{PP}}=13.6$, $J_{\text{PH}}=940$ Hz.

Die Verbindungen (7), (8) und (9) könnten durch oxidative Addition von (3) an (2), gefolgt von einer reduktiven Eliminierung von $\text{R}_2\text{NCS}_2\text{H}$ – das selbst schnell zu R_2NH und CS_2 zerfällt^[7] – entstanden sein (Schema 1).

Nach vorläufigen Untersuchungen bilden sich analoge Komplexe auch aus (2) und $\text{PF}_2(\text{S})\text{H}$, und die Thioverbindungen (7) und (8) können wie die Verbindungen vom Typ (1) mit Lewis-Säuren und Übergangsmetall-Ionen reagieren.

Eingegangen am 23. Juli 1980 [Z 712]

trope Temperaturfaktoren. Die Benzolringe wurden als planar mit C—C-Abständen von 1.395 Å angenommen.

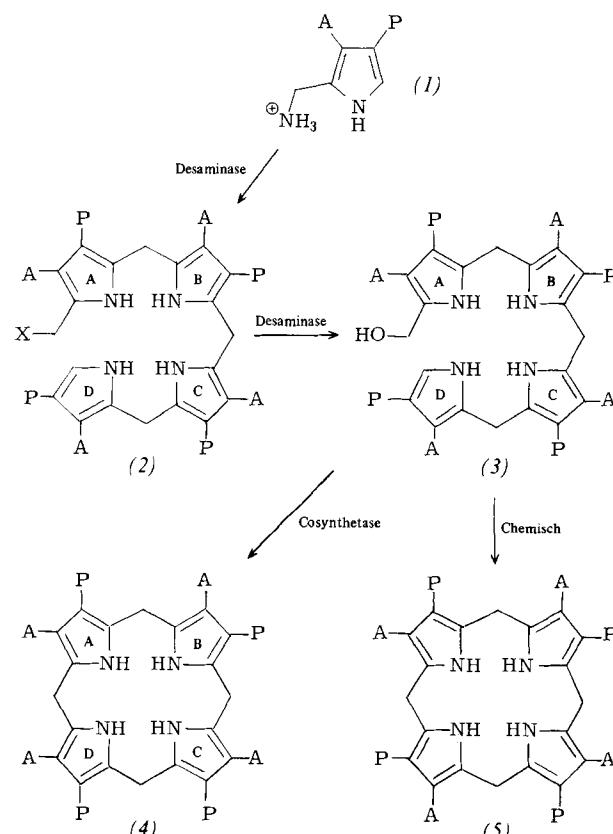
- [5] B. Walther, B. Messbauer, H. Meyer, Inorg. Chim. Acta 37, L525 (1979).
- [6] K. P. Wagner, R. W. Hess, P. M. Treichel, J. C. Calabrese, Inorg. Chem. 14, 1121 (1975).
- [7] E. E. Reid: Organic Chemistry of Bivalent Sulfur. Vol. IV. Chemical Publishing, New York 1962, S. 209.

Biosynthese von natürlichen Porphyrinen: Spezifität und Wirkung von Cosynthetase an isomeren Hydroxymethylbilanen^[**]

Von Alan R. Battersby, Christopher J. R. Fookes,
George W. J. Matcham und Pramod S. Pandey^[†]

Professor Hans Herloff Inhoffen
zum 75. Geburtstag gewidmet

Uroporphyrinogen-III (4) ist Vorläufer der natürlichen Porphyrine, Chlorine und Corrine; seine Biosynthese aus Porphobilinogen (1) erfordert die Enzyme Desaminase und Cosynthetase^[1]. Bei der Biosynthese folgt der Bildung eines nicht umgelagerten Tetrapyrrols, des Bilan-Derivats (2)^[3,4], eine einzige intramolekulare Umlagerung^[2,3]. Ein enzymatischer Austausch der Amino-Funktion von (2), $\text{X}=\text{NH}_3^+$, und von (1) gegen ein anderes Nucleophil [als X in (2) gezeigt] vor der abschließenden Cyclisierung mit Umlagerung wird z. B. in^[3] diskutiert. Wenn nur Desaminase auf Porpho-



[1] Siehe D. M. Roundhill, R. P. Sperline, W. B. Beaulieu, Coord. Chem. Rev. 26, 263 (1978), zit. Lit.

[2] M. C. Cornock, R. O. Gould, C. L. Jones, T. A. Stephenson, J. Chem. Soc. Dalton Trans. 1977, 1307.

[3] Spektroskopische Daten einiger neuer Verbindungen (CDCl_3 , 301 K): (7a), $^{31}\text{P}\{^1\text{H}\}$ -NMR: $\delta=27.3$ (t, $J_{\text{PP}}=3427.3$ Hz); ^1H -NMR: $\delta=1.05$ (t), 1.52 (t), 3.43 (q), 7.0–8.0 (m), $J_{\text{HH}}=7.0$ Hz. (8a), $^{31}\text{P}\{^1\text{H}\}$ -NMR: $\delta=65.4$ (td, $J_{\text{PP}}=3774.0$ Hz, $J_{\text{PP}}=28.0$ Hz), 31.2 (td, $J_{\text{PP}}=3172.0$ Hz, $J_{\text{PP}}=28.0$ Hz).

[4] Raumgruppe $P_{21}2_12_1$, $a=21.098$ (18), $b=11.679$ (8), $c=14.816$ (18) Å, $Z=4$, $\rho_c=1.546 \text{ g cm}^{-3}$. Die Struktur wurde für 1480 unabhängige Reflexe (MoK_{α}) mit $1 > 3\sigma(I)$ bis $R=0.064$ verfeinert. Die Pt-, S- und P-Atome haben aniso-

Uroporphyrinogen-III

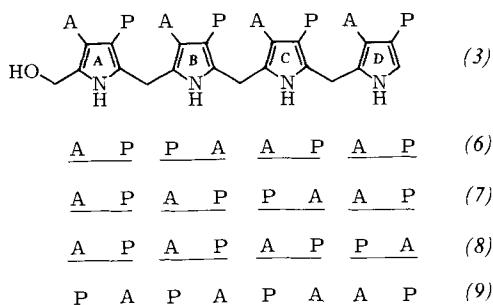
$$\text{A} = \text{CH}_2\text{CO}_2\text{H}, \quad \text{P} = \text{CH}_2\text{CH}_2\text{CO}_2\text{H}$$

[*] Prof. Dr. A. R. Battersby, Dr. C. J. R. Fookes, Dr. G. W. J. Matcham, Dr. P. S. Pandey
University Chemical Laboratory
Lensfield Road, Cambridge, CB2 1EW (England)

[**] Diese Arbeit wurde vom Science Research Council und von der Roche Products Ltd. unterstützt. Dr. K. Frobel danken wir für die Übersetzung ins Deutsche.

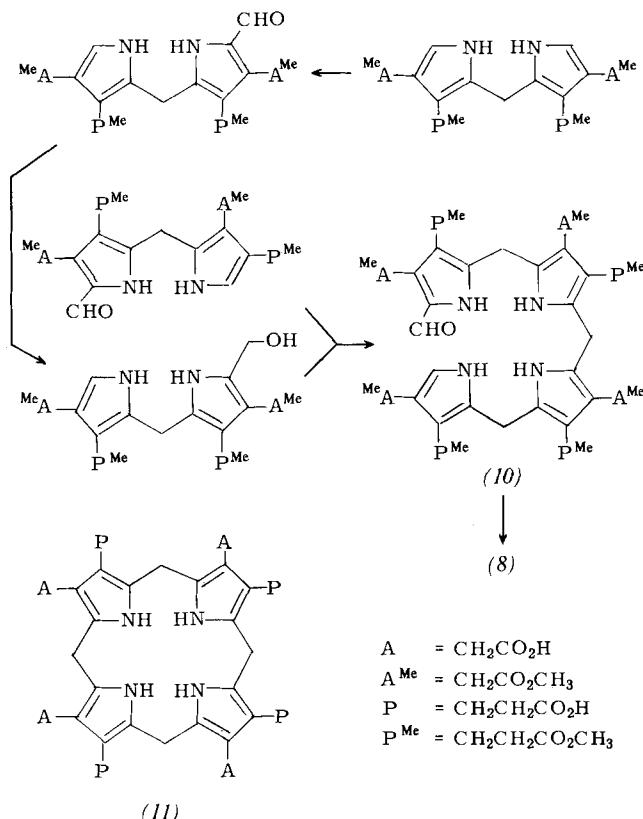
bilinogen (1) einwirkt, entsteht das nicht umgelagerte Hydroxymethylbilan (3)^[5,6]. Natürliches und synthetisches^[5] (3) waren für Cosynthetase identische Substrate; das Produkt war Uroporphyrinogen-III (4).

Wir haben jetzt die Wirkung von Cosynthetase an vier synthetischen Isomeren des natürlichen Hydroxymethylbilans (3) untersucht, bei denen Ring B (6), Ring C (7), Ring D (8) und die Ringe A, B, C (9) invertiert sind. (6)–(9) wurden auf ähnlichen Wegen wie für (8) skizziert gewonnen. Die fünf NMR- und massenspektroskopisch charakterisierten Formylbilanester, z. B. (10), zeigten im HPL-Chromatogramm keine Verunreinigungen mit anderen Isomeren.



Die frisch erzeugten Bilan-Derivate (3) sowie (6)–(9) wurden mit Cosynthetase inkubiert ($\text{pH}=8.25$), die frei von Desaminase aus *Euglena gracilis* isoliert worden war; der nicht-enzymatische („chemische“) Ringschluß jedes Bilan-Derivats wurde bei demselben pH-Wert durchgeführt.

Hydroxymethylbilan (3) stellte sich als das bei weitem beste Substrat für Cosynthetase heraus. Interessanterweise wird auch der Ringschluß von (7) und (8) enzymatisch beschleunigt. Im Gegensatz dazu fungieren (6) und (9) praktisch nicht als Enzymsubstrate (siehe Tabelle 1). Die Produkte der



umgesetzt wurden. Diese Experimente ließen sich schwierig auswerten, weil zwei Enzyme beteiligt waren. Die Umwandlung eines Aminomethylbilans in das entsprechende Hydroxymethylbilan mit Desaminase^[4] würde die Bildung von

Tabelle 1. Chemischer und durch Cosynthetase katalysierter Ringschluß von Hydroxymethylbilan (3) sowie von Isomeren (6)–(9). Produkte: Uroporphyrinogen-I [= (5)]; Uroporphyrinogen-III [= (4)]; Uroporphyrinogen-IV. [= (11)].

Substrat	V_{\max} (rel.)	K_m [M]	Uroporphyrinogen-Isomere					
			chemisch			enzymatisch		
			I	III	IV	I	III	IV
kein Ring invertiert (3) [5]	100	11.3	100	—	—	8	92	—
Ring B invertiert (6)	<0.5	—	—	98	—	—	96	—
Ring C invertiert (7)	5	105	—	99	—	—	49	51
Ring D invertiert (8)	13	11.4	—	97	—	35	64	—
Ringe A, B, C invertiert (9)	<0.5	—	—	98	—	—	98	—

[a] Ausbeute an Uroporphyrinogen-II <3%. Ein Strich bedeutet: Ausbeute <3%.

Cosynthetase-Reaktion an (3), (7) und (8) sowie des chemischen Ringschlusses wurden durch HPLC untersucht^[5]. Der chemische Ringschluß fand praktisch ohne Umlagerung statt. Bemerkenswert ist, daß bei der enzymatischen Umwandlung von (8) ca. ein Drittel des Produkts Uroporphyrinogen-I (5) war, das unter enzymatischer Inversion von Ring D entstand. Aus der bekannten Isomerenzusammensetzung des Produktes und den ebenfalls bekannten Geschwindigkeiten für die chemische und die enzymatische Cyclisierung ergab sich, daß ca. 45% des mit Cosynthetase cyclisierten Bilans (8) Inversion von Ring D erfahren hatte. Nach analogen Berechnungen bildet sich aus (7), einem relativ schlechten Substrat für Cosynthetase, das Produkt Uroporphyrinogen-IV (11) mit einer Effizienz von mehr als 95%, und zwar wahrscheinlich unter Inversion von Ring D^[8].

Diese Ergebnisse sind in Einklang mit Befunden früherer Versuche^[9], bei denen isomere Aminomethylbilane vom Typ (2), $X=\text{NH}_3^+$, mit Desaminase und Cosynthetase zusammen

Uroporphyrinogen auch dann beschleunigen, wenn Cosynthetase hierbei keine Rolle spielte, wie z. B. bei (6). Der vorliegende Beitrag befaßt sich nur mit Cosynthetase und verdeutlicht folgendes: a) Cosynthetase ist kein absolut spezifisches Enzym: alle untersuchten Modifikationen der Pyrrolringe riefen jedoch einen substantiellen Effekt auf Bindungsaffinität, Reaktionsgeschwindigkeit und/oder Effizienz des Inversionsprozesses hervor, der dem Effekt des natürlichen Hydroxymethylbilans (3) entgegengerichtet war. b) Cosynthetase hat die Aufgabe, den terminalen Ring D von (3) während des Ringschlusses zu intervertieren. Eine ähnliche (aber langsamere) Inversion findet statt, wenn das Isomer (7) als Substrat dient. c) Cosynthetase lagert Ring D eines Isomers wie (8) selbst dann um, wenn dieser Ring schon die inverse Anordnung der Substituenten aufweist. Dieser Befund schließt die Möglichkeit aus, daß die Bildung von Uroporphyrinogen-III (4) aus natürlichen Hydroxymethylbilan (3) mit der Umlagerung vom (3) in (8) beginnt.

- [1] Übersicht: A. R. Battersby, E. McDonald in K. M. Smith: Porphyrins and Metalloporphyrins. Elsevier, Amsterdam 1975, S. 61.
- [2] A. R. Battersby, G. L. Hodgson, E. Hunt, E. McDonald, J. Saunders, J. Chem. Soc. Perkin Trans I, 1976, 273.
- [3] A. R. Battersby, E. McDonald, D. C. Williams, H. K. W. Wurziger, J. Chem. Soc. Chem. Commun. 1977, 113; A. R. Battersby, C. J. R. Fookes, E. McDonald, M. J. Meegan, ibid. 1978, 185; H. O. Dauner, G. Günzer, I. Heiger, G. Müller, Hoppe-Seylers Z. Physiol. Chem. 357, 147 (1976).
- [4] A. R. Battersby, C. J. R. Fookes, G. W. J. Matcham, E. McDonald, J. Chem. Soc. Chem. Commun. 1979, 539; P. Jordan, J. S. Seehra, FEBS Lett. 104, 364 (1979).
- [5] A. R. Battersby, C. J. R. Fookes, G. W. J. Matcham, E. McDonald, K. E. Gustafson-Potter, J. Chem. Soc. Chem. Commun. 1979, 316; A. R. Battersby, C. J. R. Fookes, K. E. Gustafson-Potter, G. W. J. Matcham, E. McDonald, ibid. 1979, 1155.
- [6] A. R. Battersby, R. G. Brereton, C. J. R. Fookes, E. McDonald, G. W. J. Matcham, J. Chem. Soc. Chem. Commun. 1980, 1124.
- [7] Das von Desaminase gebildete Zwischenprodukt wurde unabhängig auch in Texas gefunden, ebenso, daß es ein Substrat für Cosynthetase ist (siehe G. Burton, P. E. Fagerness, S. Hosozawa, P. M. Jordan, A. I. Scott, J. Chem. Soc. Chem. Commun. 1979, 202). Es wurde jedoch fälschlich als N-Alkylpyrrol-Makrocyclus angesehen (siehe G. Burton, H. Nordlöv, S. Hosozawa, H. Matsumoto, P. M. Jordan, P. E. Fagerness, L. M. Pryde, A. I. Scott, J. Am. Chem. Soc. 101, 3114 (1979)).
- [8] Prinzipiell könnte Uroporphyrinogen-IV auch aus (7) durch Inversion von Ring B hervorgegangen sein; dies erscheint jedoch unter Berücksichtigung der Gesamtheit aller Resultate sehr unwahrscheinlich.
- [9] A. R. Battersby, C. J. R. Fookes, G. W. J. Matcham, E. McDonald, J. Chem. Soc. Chem. Commun. 1978, 1064.

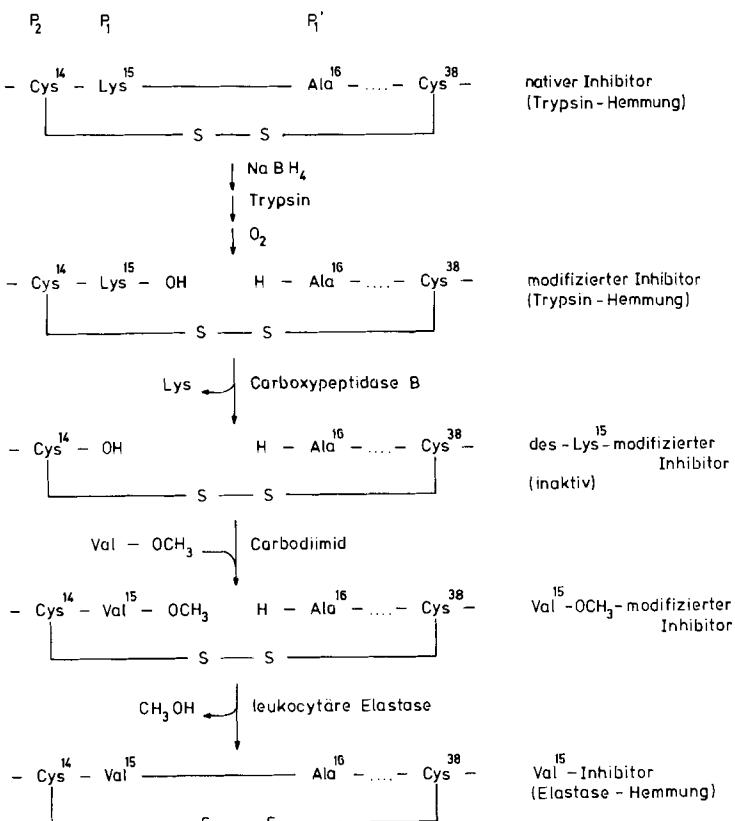
„Chemische Mutation“ durch Aminosäureaustausch im reaktiven Zentrum eines Proteinase-Inhibitors und Änderung seiner Hemmspezifität^[**]

Von Herbert R. Wenzel und Harald Tschesche^[*]
Professor Gerhard Pfleiderer zum 60. Geburtstag gewidmet

Niedermolekulare Proteinase-Inhibitoren hemmen Serin-Proteinasen durch reversible, substratanaloge Einlagerung in das aktive Zentrum der Enzyme^[2]. Die Spezifität eines Inhibitors wird durch die Geometrie der Aminosäurereste an der Kontaktfläche festgelegt und meistens von der Aminosäure im reaktiven Zentrum P_1 ^[3a], bestimmt^[3b]. Dies ist durch Sequenzvergleiche homologer Inhibitoren^[4a] und in zwei Fällen durch semisynthetische Aminosäureaustausche^[4b] belegt: So ließen sich durch enzymatische Reaktionen im Sojabohnen-Inhibitor (Kunitz) $P_1 = \text{Arg}$ gegen Lys und im Inhibitor (Kunitz) aus Rinderorganen $P_1 = \text{Lys}$ gegen Arg austauschen. Die anti-tryptische Aktivität beider Proteine blieb dabei erhalten. Ersatz der basischen Aminosäure durch Trp wandelte die beiden Inhibitoren mit primärer Spezifität gegen Trypsin in Inhibitoren mit primärer Spezifität gegen Chymotrypsin um. Die „enzymatische Mutation“ gelang bisher nur bei basischen und aromatischen Aminosäuren, da für andere Aminosäuren keine geeigneten Enzymsysteme gefunden werden konnten.

Wir beschreiben hier eine Methode, die auf rein peptidchemischem Wege den Einbau fast jeder Aminosäure in die Position P_1 des Inhibitors (Kunitz) aus Rinderorganen ermöglicht. Der natürliche Inhibitor ($P_1 = \text{Lys}^{15}$) hemmt Trypsin äußerst stark, Chymotrypsin stark, leukocytäre Elastase

kaum und Pankreas-Elastase überhaupt nicht. (Eine Projektion der α -Kohlenstoffatome des Inhibitors^[5] ist in ^[2b], Abb. 11, dargestellt.)



Schema 1. Austausch von Lys¹⁵ gegen Val in der Position P_1 des Inhibitors (Kunitz) aus Rinderorganen.

Im nativen Inhibitor wird nach erprobten Verfahren die Lys¹⁵-Ala¹⁶-Bindung im reaktiven Zentrum geöffnet; mit Carboxypeptidase B erhält man dann den inaktiven des-Lys¹⁵-modifizierten Inhibitor^[6]. Wasserlösliche Carbodiimide ermöglichen eine Verknüpfung von Val-OMe mit der freien Carboxygruppe von Cys¹⁴^[7] (Schema 1).

Das Produkt ist ein sehr guter Inhibitor für Elastase aus menschlichen Leukocyten. Die maximale Hemmung wird erst nach mehreren Minuten erreicht; der Komplex zwischen Elastase und Val¹⁵-Inhibitor bildet sich nur langsam. Wird dieser Komplex durch drastische pH-Erniedrigung dissoziiert (kinetisch kontrollierte Dissoziation), so erhält man einen Inhibitor, der Elastase sofort maximal hemmt. Dies spricht für die Knüpfung der Peptidbindung Val¹⁵-Ala¹⁶ durch die Proteinase während der Komplexbildung^[8].

Die Semisynthese wurde nach dem gleichen Schema bisher außerdem mit den Methylestern von Arg, Phe, Met, Leu, Ala und Gly durchgeführt. Nach Aminosäure-Analyse wurden etwa 2.2 bis 4.1 Aminosäurereste pro Inhibitormolekül eingebaut, davon bis zu 0.3 in die entscheidende Position P_1 . Der weitere Anteil wurde an die fünf schon im unmodifizierten Inhibitor vorhandenen Carboxygruppen (Asp³, Glu⁷, Glu⁴⁹, Asp⁵⁰, Ala⁵⁸) gekoppelt. Diese sind vom reaktiven Zentrum so weit entfernt, so daß ihre Derivatisierung auf die Inhibitoraktivität kaum Einfluß hat.

Die Hemmspezifität der neuen semisynthetischen Inhibitoren ließ sich aus dem Rest in P_1 und der bekannten Spaltungsspezifität der einzelnen Proteinasen weitgehend vorher sagen: Die Insertion von Arg stellt die ursprüngliche anti-tryptische Aktivität wieder her. Einführung von Phe oder Met führt zu starken Chymotrypsin-Inhibitoren, die auch

[*] Prof. Dr. H. Tschesche, Dr. H. R. Wenzel
Fakultät für Chemie, Lehrstuhl Biochemie der Universität
Postfach 8640, 4800 Bielefeld 1

[**] Zum Teil vorgetragen auf der Frühjahrstagung der Gesellschaft für Biologische Chemie, Münster, März 1980 [1]. Diese Arbeit wurde von der Deutschen Forschungsgemeinschaft, der Stiftung Volkswagenwerk und dem Fonds der Chemischen Industrie unterstützt. Wir danken der Bayer AG für Trasylol® [Trypsin-Kallikrein[®]-Inhibitor (Kunitz) aus Rinderlunge].