

tionen^[11] – sind nämlich nur möglich, wenn stark elektropositive Metalle und gute Solvatbildner aus dem Spiele bleiben. TMEDA, einmal zugegen, bleibt aber mit der Organolithium-Verbindung in dauerhafter Assoziat-Bindung vergesellschaftet^[9, 12]. Dagegen lässt sich das vom Kalium-tert.-butanolat eingebrachte Metall durch nachträglichen Austausch gegen Lithium vollständig entfernen und damit die Aktivierung wieder „abschalten“.

Benzyllithium (1):

Unter Inertgas wurden in einem Dreihalskolben mit Frittausgang^[13] 100 mmol doppelt sublimiertes Kalium-tert.-butanolat in 100 ml trockenem Toluol aufgeschlämmt. Beim Zutropfen einer äquivalenten Menge n-Butyllithium (15-proz. Hexan-Lösung) fiel ein leuchtend roter Niederschlag aus. Nachdem noch 30 min gerührt worden war, preßte man die Lösung durch die Fritte ab, digerierte den Rückstand mit frischem Toluol (100 ml) und ließ die Flüssigkeit wieder durch die Fritte passieren. Der Waschvorgang wurde zweimal wiederholt. Das feste rote Produkt wurde 1 h bei 0.3 Torr getrocknet; dann fügte man bei -78°C 200 ml Diäthyläther und während des Aufwärmens auf Raumtemperatur 100 mmol trockenes LiBr zu. Zur Abtrennung des unlöslichen KBr wurde die orangefarbene Lösung durch die Fritte in eine Schlenk-Bürette filtriert. Der durch Doppeltitration^[14] mit 1,2-Dibromäthan bestimmte Titer entsprach einer Ausbeute von 85%; Derivatisierung mit Trimethylchlorsilan lieferte 89% Benzyltrimethylsilan^[15] (gaschromatographischer Vergleich mit authentischem Material^[16]: 2.5 m 20% Apiezon L, 100 \rightarrow 230 $^{\circ}\text{C}$; Decan als „innerer“ Standard, gewichtbezogener Eichfaktor: 2.1). Laut Flammenspektrometrie betrug das Li/K-Verhältnis 44:1; durch Nachbehandlung mit LiBr lässt sich der Kalium-Anteil weiter herabsetzen.

Isobutenyllithium (2):

Abweichend von der oben mitgeteilten Vorschrift wurde bei -20°C metalliert. Das überschüssige Isobuten ließ man abdampfen; gewaschen wurde mit Benzol statt mit Toluol. Da in Diäthyläther praktisch unlöslich, nahm man das gelbe Isobutenyllkalium in Tetrahydrofuran auf und versetzte es mit LiBr. Der Titer (Doppeltitration) der filtrierten gelbbraunen Lösung entsprach einer Ausbeute von 80%; im Hydrolysat ließ sich weder flammenspektrometrisch noch durch Kalignost-Fällung Kalium nachweisen.

Durch Carboxylierung erhielt man 3-Methyl-3-butensäure (3)^[15] (60%; $K_p = 67-68^{\circ}\text{C}/17$ Torr), mit Äthylenoxid bei 0°C 4-Methyl-4-penten-1-ol (4)^[15] (72%; $K_p = 144$ bis $146^{\circ}\text{C}/760$ Torr).

2-Naphthylmethylkalium (5):

2-Methylnaphthalin wurde nur in stöchiometrischer Menge eingesetzt, aber ansonsten wie bei Benzyllithium beschriebenen metalliert. Carboxylierung überführte die entstandene schwarzrote Lösung in 2-Naphthylsäure^[15] (75%; $F_p = 139-141^{\circ}\text{C}$; ^[17]: 137-139 $^{\circ}\text{C}$).

Eingegangen am 24. April 1973 [Z 830]

[1] M. Schlosser, J. Organomet. Chem. 8, 9 (1967).

[2] L. Lochmann, J. Pospisil u. D. Lím, Tetrahedron Lett. 1966, 257.

[3] Allerdings gelang es weder mit Butyllithium in Gegenwart von Kalium-tert.-butanolat noch mit Butylkalium, das aus Dibutylquecksilber bereitet wurde, gesättigte Kohlenwasserstoffe wie Octan oder Cyclohexan zu metallieren. Anderslautende Angaben von R. A. Finnegan (Tetrahedron Lett. 1963, 429) haben daher als fragwürdig zu gelten.

[4] L. Lochmann, persönliche Mitteilung (1967).

[5] Lithiumperchlorat eignet sich nicht, da es Organometall-Verbindungen u. a. zu Alkoholaten oxidiert.

[6] Umwandlungen von Organometall-Verbindungen mit Metallsalzen: R. G. Jones u. H. Gilman, Chem. Rev. 54, 847 (1954).

[7] Die bislang gebräuchlichste Darstellungsmethode (D. Seyferth, R. Suzuki, C. J. Murphy u. C. R. Sabet, J. Organomet. Chem. 2, 431 (1964)) liefert Benzyllithium in Gegenwart von Tetramethylstannan, mit welchem es, wie wir gefunden haben, langsam zu Äthylbenzol reagiert.

[8] (6) ist ferner erhältlich durch Behandeln von 2-Methylnaphthalin mit n-Butyllithium in Tetrahydrofuran (5 h bei 0°C , 75% Ausb.) und mit sek.-Butyllithium in Diäthyläther (48 h bei -35°C , 50%) oder Tetrahydrofuran (9 h bei -78°C , 65%). Nebenprodukte – u. a. durch Ätherzersetzung und Anlagerung von sek.-Butyllithium an dabei freiwerdendes Äthylen! – sind jedoch unvermeidlich.

[9] G. G. Eberhardt u. W. A. Butte, J. Org. Chem. 29, 2928 (1964).

[10] M. Schlosser: Struktur und Reaktivität polarer Organometalle. Springer, Heidelberg 1973, S. 142ff.

[11] M. Schlosser, Angew. Chem. 76, 124 (1964), bes. S. 139-141; Angew. Chem. internat. Edit. 3, 287 (1964), bes. S. 301-304.

[12] Vgl. auch J. J. Brooks u. G. D. Stucky, J. Amer. Chem. Soc. 94, 7333 (1972); R. P. Zerger u. G. D. Stucky, Chem. Commun. 1973, 44.

[13] M. Schlosser u. V. Ladenberger, J. Organomet. Chem. 8, 193 (1967).

[14] H. Gilman u. F. Schulze, J. Amer. Chem. Soc. 47, 2002 (1925).

[15] Mikroanalyse sowie Massen- und Kernresonanzspektrum bestätigen die angenommene Struktur.

[16] C. R. Hauser u. C. R. Hance, J. Amer. Chem. Soc. 73, 5846 (1951).

[17] H. Gilman, H. A. Pacevitz u. O. Baine, J. Amer. Chem. Soc. 62, 1514 (1940).

VERSAMMLUNGSBERICHTE

Struktur und Funktion natürlicher Proteinase-Inhibitoren

Von Harald Tschesche^[*]

Die Hemmung proteolytischer Aktivitäten durch Proteinase-Inhibitoren ist einer der natürlichen Steuerungs-

[*] Doz. Dr. H. Tschesche
Organisch-Chemisches Laboratorium der
Technischen Universität
8 München 2, Arcisstraße 21

mechanismen enzymatischer Aktivitäten im Organismus, der der Reprimierung der Enzymsynthese auf der Stufe der DNA-RNA-Transkription und der allosterischen Hemmung fertig gebildeter Enzyme an die Seite zu stellen ist. Proteolytische Aktivitäten wie die von Trypsin können durch permanente Inhibitoren wie den Trypsin-Kallikrein-Inhibitor aus Rinderorganen^[1] oder temporär^[2] wie durch die sekretorischen Trypsin-Inhibitoren des Säugetierpankreas lokal und zeitlich begrenzt werden. Der Inhibierung liegt eine kompetitive Hemmung unter stöchiometrischer Bildung eines 1:1-Komplexes C von Enzym T und Inhibi-

tor I bzw. I^* zugrunde, die nach *Laskowski, Jr.*^[3] über einen losen Anlagerungskomplex L bzw. L^* erfolgt:



Abbildung 1 zeigt die vollständige kovalente Struktur des sekretorischen Trypsin-Inhibitors I aus Schweinepankreas^[4]. Sie ist gekennzeichnet durch eine kompakte Anordnung, bei der das aktive Zentrum (Lys^{18} - Ile^{19}) in Form eines „cyclischen Substrates“ innerhalb eines über eine Disulfidbrücke geschlossenen Ringes liegt, entsprechend der Hypothese von *Ozawa* und *Laskowski, Jr.*^[3]. Der C-Terminus ist in einer parallel zum aktiven Zentrum verlaufenden Kette an den Rest des Moleküls fixiert und enthält die „Sollbruchstelle“ (Arg^{44} - Gln^{45}) zur Inaktivierung des Moleküls im Verlauf der temporären Hemmung. Die Inaktivierung wird eingeleitet durch eine partielle Proteolyse im aktiven Zentrum unter Spaltung der Bindung Lys^{18} - Ile^{19} , wodurch ein modifizierter, aber noch aktiver Inhibitor I^* entsteht. Die anschließende Spaltung der Bindung Arg^{44} - Gln^{45} inaktiviert das Molekül. Die Blockierung dieser Bindung gegen tryptische Spaltung mittels Butandion-Derivatisierung der Arg^{44} -Seitenkette verlangsamt die Inaktivierung daher um den Faktor 25.

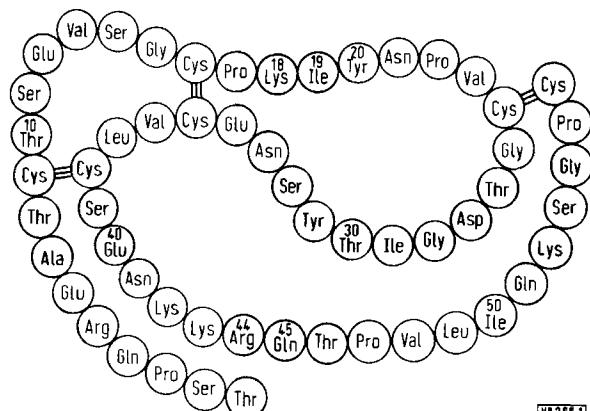


Abb. 1. Kovalente Struktur des Trypsin-Inhibitors I aus Schweinepankreas.

Aus der kovalenten Struktur ist zu schließen, daß der parallele Verlauf der Polypeptidketten, die das aktive Zentrum bzw. die Sollbruchstelle enthalten, die Inaktivierung erleichtern, indem nur eine Umorientierung des Enzymmoleküls aus dem losen Anlagerungskomplex L^* vom aktiven Zentrum auf die Sollbruchstelle erfolgen muß. Der Vergleich der Primärstrukturen der Inhibitoren von Schwein und Schaf (und Rind^[5]) ergibt für die C-terminalen Teilsequenzen (Reste 44–56) eine geringere Mutationshäufigkeit,

was die Wichtigkeit dieses Teilstückes für die biologische Funktion des Moleküls unterstreicht.

Die physiologische Aufgabe der Pankreasinhibitoren ist wahrscheinlich in einer Verhinderung der vorzeitigen Zymogenaktivierung des enzymatischen Verdauungspotentials im Gangsystem der Drüse zu suchen. Der Mechanismus der temporären Hemmung gestattet biologisch die spätere Rückgewinnung der gehemmten Enzyme.

Das Phänomen der temporären Hemmung zeigen auch zwei Isoinhibitoren aus Säugetiersperma bei der Inaktivierung von Trypsin (aus Rinderpankreas und aus Schweinepankreas), die erstmals in reiner Form aus dem Seminalplasma vom Eber isoliert wurden. Seminal Inhibitor I enthält 67 Aminosäuren, Galaktosamin und Glucosamin, Inhibitor II fehlen ein Lysin- und ein Argininrest. Nach der Aminosäure-Zusammensetzung und der N-terminalen Sequenz bestehen keine Homologien zwischen diesen beiden von der Vesiculardrüse sezernierten Inhibitoren und dem vom Pankreas sezernierten Inhibitor (Abb. 1). Beide Seminalinhibitoren hemmen in einer 1:1-stöchiometrischen Reaktion Trypsin temporär oder das Ei-Penetrationsezyklen Akrosin aus Eberspermien^[6] permanent. Dieser letzte Befund könnte von besonderer Bedeutung für den Kapazierungsvorgang der Spermien, d.h. für die Erlangung ihrer Befruchtungsfähigkeit im weiblichen Genitaltrakt und damit für die Fähigkeit zur Penetration der Eizellenmembran (zona pellucida) sein, die in vivo unter Beteiligung des Akrosins erfolgt^[7, 8].

[GDCh-Ortsverband Bonn, am 9. Januar 1973] [VB 366]

- [1] R. Vogel, I. Trautschold u. E. Werle: *Natural Proteinase Inhibitors*. Academic Press, New York 1968.
- [2] M. Laskowski, Sr. u. F. C. Wu, *J. Biol. Chem.* 204, 797 (1953).
- [3] M. Laskowski, Jr. u. R. W. Sealock in P. D. Boyer: *The Enzymes*. Academic Press, New York 1971, S. 375; K. Ozawa u. M. Laskowski, Jr., *J. Biol. Chem.* 241, 3955 (1966).
- [4] H. Tschesche, E. Wachter, S. Kupfer u. K. Niedermeier, *Hoppe-Seylers Z. Physiol. Chem.* 350, 1247 (1969); H. Tschesche u. E. Wachter, *Eur. J. Biochem.* 16, 187 (1970); H. Tschesche, E. Wachter, S. Kupfer, R. Obermeier, G. Reidel, G. Haenisch u. M. Schneider in H. Fritz u. H. Tschesche: *Proceedings International Research Conference on Proteinase Inhibitors*. de Gruyter, Berlin 1971, S. 207; H. Tschesche, M. Schneider, G. Reidel u. H. Klein, *Hoppe-Seylers Z. Physiol. Chem.* 352, 763 (1972).
- [5] L. J. Greene u. J. S. Giordano, Jr., *J. Biol. Chem.* 244, 285 (1969); L. J. Greene u. D. C. Bartelt, *ibid.* 244, 2646 (1969).
- [6] E. Fink, H. Schießler, M. Arnhold u. H. Fritz, *Hoppe-Seylers Z. Physiol. Chem.* 353, 1633 (1972); H. Schießler, H. Fritz, M. Arnhold, E. Fink u. H. Tschesche, *ibid.* 353, 1638 (1972); H. Fritz, H. Schießler, B. Förög-Brey, H. Tschesche u. E. Fink, *ibid.* 353, 1013 (1972); H. Fritz, B. Förög-Brey, E. Fink, H. Schießler, E. Jaumann u. M. Arnhold, *ibid.* 353, 1007 (1972).
- [7] R. Stambaugh u. J. Buckley, *J. Reprod. Fert.* 19, 423 (1969).
- [8] L. J. D. Zaneveld, K. L. Polakoski, R. T. Robertson u. W. L. Williams in H. Fritz u. H. Tschesche: *Proceedings International Research Conference on Proteinase Inhibitors*. de Gruyter, Berlin 1971, S. 236.