

## Die Perameisensäure-Umlagerung eines Trypsin-derivates

GÜNTHER SCHÖLLMANN

Department of Ophthalmology, School of Medicine,  
Tulane University, New Orleans, USA(Z. Naturforschg. **21 b**, 194 [1966]; eingegangen am 4. November 1965)

Es konnte kürzlich gezeigt werden, daß durch Perameisensäure-Umlagerung und anschließender Säurehydrolyse des mit dem spezifischen Inhibitor TPCM\* im aktiven Zentrum modifizierten Chymotrypsin der Nachweis der Alkylierung des Stickstoffs-3 im Histidinrest-57 geführt werden kann<sup>1</sup>. Gleichzeitig wurde die Vermutung geäußert, daß es sich bei dieser Reaktion um eine allgemeine Methode handeln könnte, die zur raschen Identifizierung eines mit einem Chlorketon alkylierten Histidinrestes führen sollte. Die Richtigkeit dieser Voraussage ließ sich nun durch Anwendung der Umlagerungsreaktion auf Trypsin beweisen.

Ein nach beschriebenen Vorstellungen<sup>2</sup> synthetisiertes Chlorketon-Derivat des *N*- $\alpha$ -Tosyl-L-lysin reagiert im aktiven Zentrum von Trypsin unter Alkylierung eines Histidinrestes<sup>3-5</sup>. TOMAŠEK und Mitarbb.<sup>5</sup> konnten inzwischen Histidinrest-46 in der Aminosäuresequenz von Trypsin als Angriffsstelle der Alkylierung festlegen.

Trypsin und mit dem Chlorketon modifiziertes Trypsin wurden nach dem bereits beschriebenen Verfahren mit Perameisensäure behandelt und dann der quantitativen Aminosäureanalyse unterworfen<sup>6</sup>. In der Tab. 1

\* Verwendete Abkürzungen: TPCM, *N*-Tosyl-L-phenylalanyl-chlormethan; TLCM, *N*- $\alpha$ -Tosyl-L-lysin-chlormethan.

<sup>1</sup> G. SCHÖLLMANN, Biochem. Z., **343**, 103 [1965].

<sup>2</sup> G. SCHÖLLMANN u. E. SHAW, a) Biochem. biophysic. Res. Commun. **7**, 36 [1962]; b) Biochemistry **2**, 252 [1963].

<sup>3</sup> G. SCHÖLLMANN, unveröffentlichte Versuche.

## Zur Struktur der Cyclopropenone

A. KREBS

Organisch-Chemisches Institut der Universität Heidelberg

und

B. SCHRADER

Institut für Spektrochemie und Angewandte Spektroskopie,  
Dortmund(Z. Naturforschg. **21 b**, 194-195 [1966]; eingeg. am 10. Dezember 1965)

Ein Hinweis<sup>1</sup> auf unveröffentlichte Arbeiten von R. C. LORD veranlaßt uns, unsere Ergebnisse auf dem Gebiet der IR- und Raman-Spektroskopie von Cyclopropenonen mitzuteilen.

<sup>1</sup> S. ANDREADES, J. Amer. chem. Soc. **87**, 3941 [1965].

<sup>2</sup> Übersichtsreferat: A. W. KREBS, Angew. Chem. **77**, 10 [1965].

<sup>3</sup> R. BRESLOW et al., J. Amer. chem. Soc. **87**, 1320, 1326 [1965].

<sup>4</sup> Siehe z. B. W. v. E. DOERING u. T. MOLE, Tetrahedron [Lon-

	Trypsin	Trypsin oxydiert	Trypsin-TLCM	Trypsin-TLCM oxydiert
Histidin	3,12	2,95	2,30	2,21
3-Carboxymethyl-Histidin	0	0	0	0,78
1/2 Cystin	10,8	0	10,5	0
Cysteinsäure	0	11,4 <sup>2</sup>	0	11,2 <sup>2</sup>

Tab. 1. Aminosäureanalyse von Trypsin und Trypsin-TLCM vor und nach Oxydation mit Perameisensäure<sup>1</sup>. <sup>1</sup> Kalkuliert auf der Basis von 25 Glycerinresten pro Molekül Trypsin. <sup>2</sup> Werte können nur abgeschätzt werden.

ist das Ergebnis zusammengefaßt. Ausschließlich 3-Carboxymethyl-histidin konnte nachgewiesen werden, während, wie auch den Verhältnissen bei Chymotrypsin entsprechend<sup>1</sup>, keine Spur von 1-Carboxymethyl-histidin gefunden werden konnte. Der Angriff der Alkylierung hat also am Stickstoff-3 des Histidinrestes-46 von Trypsin stattgefunden. Wegen der Strukturähnlichkeit des Alkylierungsmittels zu den natürlichen Substraten wird man den Schluß ziehen dürfen, daß auch im Falle der Enzymkatalyse Stickstoff-3 des Imidazolringes an den entsprechenden Übergangszuständen direkt beteiligt ist.

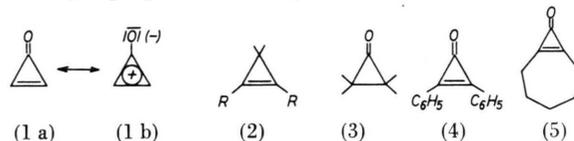
Die Analogie im katalytischen Bezirk der aktiven Zentren von Trypsin und Chymotrypsin ist demzufolge außerordentlich weitgehend.

<sup>4</sup> E. S. SEVERIN u. V. TOMAŠEK, Biochem. biophysic. Res. Commun. **20**, 496 [1965].

<sup>5</sup> V. TOMAŠEK, E. S. SEVERIN u. F. ŠORM, Biochem. biophysic. Res. Commun. **20**, 545 [1965].

<sup>6</sup> D. H. SPACKMAN, W. H. STEIN u. S. MOORE, Analytic. Chem. **30**, 1190 [1958].

Für die IR-Spektren aller bisher untersuchten Cyclopropenone (1a, 1b) sind zwei sehr intensive Banden um 1850 und 1630 cm<sup>-1</sup> charakteristisch. Die Zuordnung dieser Banden war bisher widersprüchlich<sup>1-3</sup>, da sowohl die C=C-Valenzschwingung von an der Doppelbindung disubstituierten Cyclopropenen (2)<sup>4</sup> als auch die C=O-Valenzschwingung von Cyclopropenonen (3)<sup>5</sup> um 1840 cm<sup>-1</sup> auftreten. Die Frage der Zuordnung war wichtig im Zusammenhang mit dem Problem, inwieweit die zwitterionische Form 1b am Grundzustand der Cyclopropenone beteiligt ist<sup>2</sup>.



don] **10**, 65 [1960]; R. BRESLOW u. P. DOWD, J. Amer. chem. Soc. **85**, 2732 [1963].

<sup>5</sup> N. J. TURRO, W. B. HAMMOND u. P. A. LEERMAKERS, J. Amer. chem. Soc. **87**, 2774 [1965]; s. dort auch Hinweise auf frühere Arbeiten.

Zur Klärung dieser Frage wurden folgende Untersuchungen durchgeführt:

1. Aufnahme der Raman-Spektren von (4) und (5).
2. Markierung von (4) mit  $^{18}\text{O}$  und Analyse der entsprechenden IR- und Raman-Spektren.
3. Lösungsmittelabhängigkeit der beiden Banden bei (4) und (5)<sup>6</sup>.

Die Ergebnisse sind in den Tabn. 1 und 2 zusammengefaßt.

	Raman-Spektren (Festkörper)		IR-Spektren, Lösung in $\text{CCl}_4$	
	(4)	(5)	(4)- $^{16}\text{O}$	(4)- $^{18}\text{O}$
$\nu_{\text{as}}$	1845 (0,10)*	1830 (0,17)*	1861	1842
$\nu_{\text{s}}$	1616 (1,00)	1615 (1,00)	1633	1628

Tab. 1. Lage der beiden typischen Cyclopropenon-Banden bei (4) und (5) in  $\text{cm}^{-1}$ . \* Maximumintensität  $\nu_{\text{s}}=1,00$ .

Diese Ergebnisse lassen sich folgendermaßen erklären: Die C=C- und die C=O-Gruppe des Cyclopropenons sind wegen des starren Dreirings stark miteinander gekoppelt. Dies führt zu einer symmetrischen und einer asymmetrischen Schwingung des gesamten Systems, wobei an *beiden* Schwingungen die C=C- und die C=O-Gruppierung beteiligt sind:

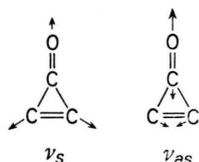


Abb. 1. Symmetrische ( $\nu_{\text{s}}$ ) und asymmetrische ( $\nu_{\text{as}}$ ) Schwingung des Cyclopropenon-Systems.

Die  $\nu_{\text{s}}$  sollte wegen der größeren Änderung der Polarisierbarkeit im Raman-Effekt stärker sein als die  $\nu_{\text{as}}$ ; beide Schwingungen sollten sich in einer starken Änderung des Dipolmoments äußern, daher stark im IR-Spektrum sein.

Verbindungen	Aceton	Diphenylcyclopropenon (4)		Cycloheptenocyclopropenon (5)	
Lösungsmittel					
Cyclohexan	1725	1864		1639	1851
Tetrachlorkohlenstoff	1721	1861	Schulter	1633	1851
Benzol	1718	1861		1633	1851
Methylenchlorid	1714	1861	1851	1625	1851
Bromoform	1710		1850	1619	1851
$\Delta\nu$ ( $\text{C}_6\text{H}_{12}-\text{CHBr}_3$ )	15	3		20	0
Steigung (Aceton = 1)	1	0,2		1,4	0
					2,2

Tab. 2. Lösungsmittel-Abhängigkeit der Bandenlage bei (4) und (5) im Vergleich zu Aceton.

<sup>6</sup> Die Lösungsmittelabhängigkeit der Bandenlage wurde von L. J. BELLAMY u. R. L. WILLIAMS, Proc. Roy. Soc. **255 A**, 22 [1960]; Trans. Faraday Soc. **55**, 14 [1959] zur Unterscheidung von C=O- und C=C-Valenzschwingungen herangezogen; s. a. z. B. H. GÖTZ, E. HEILBRONNER, A. R. KATRITZKY u. R. A. JONES, Helv. chim. Acta **44**, 387 [1961] u. Y. IKE-

Man kann annehmen, daß die beiden „ungestörten“ Schwingungen der C=C- und der C=O-Gruppe ungefähr in der Mitte zwischen der  $\nu_{\text{s}}$  und der  $\nu_{\text{as}}$ , also etwa um  $1740\text{ cm}^{-1}$ , auftreten würden; diese Verschiebung um etwa  $100\text{ cm}^{-1}$  nach niedrigeren Frequenzen gegenüber der Lage in den Cyclopropenen und Cyclopropenonen weist auf eine starke Beteiligung der Form 1 b am Grundzustand der Cyclopropenone hin.

In Lösung wird beim Übergang vom unpolaren zum polaren Lösungsmittel die Struktur 1 b begünstigt; die „ungestörten“  $\nu(\text{C}=\text{C})$  und  $\nu(\text{C}=\text{O})$  sollten daher im polaren Lösungsmittel bei niedrigeren Frequenzen liegen. Wegen der nun erhöhten Ordnung der koppelnden Bindungen im Dreiring steigt aber die Resonanzabstoßung der  $\nu_{\text{s}}$  und  $\nu_{\text{as}}$ . Dies erklärt den beobachteten starken Lösungsmittelleffekt der Bande bei  $1630\text{ cm}^{-1}$  und den geringen der Bande bei  $1850\text{ cm}^{-1}$ .

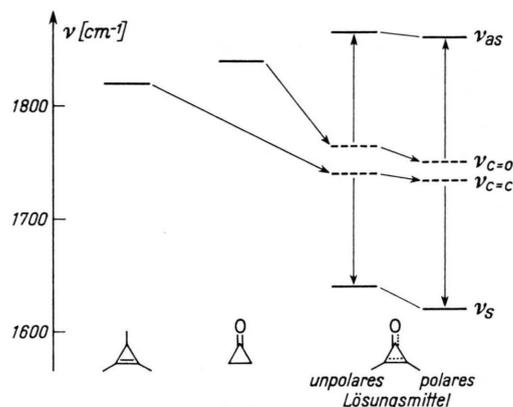


Abb. 2. Zum Lösungsmittelleinfluß auf die Lage der Banden.

Bei der Substitution durch  $^{18}\text{O}$  im Diphenylcyclopropenon (4) verschieben sich beide Banden, die  $\nu_{\text{s}}$  um  $5\text{ cm}^{-1}$ , die  $\nu_{\text{as}}$  um  $19\text{ cm}^{-1}$ . Dies zeigt, daß die C=O-Gruppe an beiden beobachteten Schwingungen beteiligt ist, an der  $\nu_{\text{as}}$  aber stärker als an der  $\nu_{\text{s}}$ .

GAMI, Bull. chem. Soc. Japan **35**, 967, 972 [1962] für die Zuordnung beim Tropon. Im Falle der Cyclopropenone hätten wegen der starken Kopplung der Schwingungen die Ergebnisse der Lösungsmittel-Abhängigkeit allein zu einer inkorrekten Zuordnung geführt<sup>2</sup>.