

Indole zum Vergleich mit *Amanita*-Giften, VI¹ Hydroxylierung von Tryptophan und Tryptophylpeptiden

PETER PFAENDER, GERFRIED FEIGE UND THEODOR WIELAND

Institut für Organische Chemie der Universität Frankfurt am Main

(Z. Naturforsch. 23 b, 926—930 [1968]; eingegangen am 26. August 1967)

Im System Fe^{2+} , Äthylendiamintetraacetat, Ascorbat und Luftsauerstoff gelingt die Hydroxylierung von Tryptophan, Tryptophyl-glycin, Tryptophyl-glycyl-isoleucyl-glycin und Phalloidin, wobei verschiedene Stellen des Indolrings verschieden stark betroffen werden. Produkte einer 2-, 5-, 6- und 2.6-Hydroxylierung konnten spektroskopisch und papierchromatographisch nachgewiesen werden. Bei den Peptiden gewann die Hydroxylierung des Benzolteils des Tryptophans die Überhand. Vom Phalloidin wurde nur die Bildung eines phenolartigen Produkts, vergleichbar mit Amanitin, festgestellt, wobei über die Stellung der neu eingeführten Hydroxylgruppe keine Aussage gemacht werden kann.

α -Amanitin, das langsam wirkende Hauptgift von *Amanita phalloides*, unterscheidet sich vom rasch wirkenden Phalloidin unter anderem dadurch, daß es in 6-Stellung des Tryptophanbausteins eine Hydroxylgruppe trägt, die dem Phalloidin fehlt². Es wurden daher Experimente geplant, den Chromophor des Phalloidins durch Einführung einer Hydroxylgruppe in den des Amanitins zu verwandeln. Zuvor jedoch stellten wir Modellversuche am Tryptophan (2a) und einigen seiner Peptide an, die im folgenden geschildert sind. Als hydroxylierendes Agens wurde das System Fe^{2+} , Ascorbat, Äthylendiamintetraacetat, Luftsauerstoff im Phosphatpuffer vom pH 6,8 bei 37° angewandt, das von UDENFRIEND und Mitarbb. zur Hydroxylierung von Benzolabkömmlingen³ und von DALGLIESH⁴ sowie von ICHIHARA und Mitarbb.⁵ bei Indolderivaten (Bildung von 5- und 7-Hydroxy-indolen) benutzt worden war.

Zur Analyse der Oxydationsansätze bedienten wir uns der Papierchromatographie, die direkt und nach säulenchromatographischer Trennung der Produktgemische an Sephadex G-10 in Wasser ausgeführt wurde, sowie der UV-spektroskopischen Untersuchung der mehr oder weniger deutlich getrennten Substanzen.

Hydroxylierung von Tryptophan (2a)

Nach dreistündigem Durchsaugen von Luft durch eine etwa 1,5-proz. Tryptophanlösung im Hydroxylierungs-System zeigte ein Tropfen auf Filtrierpapier beim Besprühen mit der Natriumcarbonathaltigen Lösung von diazotierter Sulfanilsäure (Paulys Reagenz) deutlich rote Farbreaktion auf Phenole, während Tryptophan selbst eine weniger empfindliche Gelbfärbung verursachte. Die Intensität erhöhte sich nicht, wenn die doppelte Menge an Eisenionen und Ascorbinsäure vorgelegt oder wenn die Oxydation auf vier Std. ausgedehnt wurde. Nach zwei Std. war sie geringer, so daß in allen Versuchen eine Dauer von drei Std. eingehalten wurde.

Nach Klarfiltrieren und Konzentrieren der gelbbraunen Lösung bewies ein Papierchromatogramm neben viel unverändertem Tryptophan das Vorliegen mehrerer Pauly-positiver, mit Ninhydrin anfärbarer Verbindungen, die durch Säulenchromatographie entsalzt, partiell getrennt und im einzelnen charakterisiert wurden. In Abb. 1 ist das Elutionsdiagramm eines Oxydationsansatzes wiedergegeben, wie es bei der Chromatographie an Sephadex G-10 vom Uvicord aufgeschrieben wurde.

¹ V. Mitt.: TH. WIELAND u. D. GRIMM, Chem. Ber. **98**, 1727 [1965].

² TH. WIELAND u. U. GEBERT, Liebigs Ann. Chem. **700**, 157 [1966].

³ S. UDENFRIEND, C. T. CLARK, J. AXELROD u. B. B. BRODIE, J. biol. Chemistry **208**, 731 [1954]; B. B. BRODIE, J. AXELROD, P. A. SHORE u. S. UDENFRIEND **208**, 741 [1954].

⁴ C. E. DALGLIESH, Arch. Biochem. Biophysics **53**, 214 [1955].

⁵ K. ICHIHARA, A. SAKAMOTO, K. INAMORI u. Y. SAKAMOTO, J. Biochemistry [Tokyo] **44**, 649 [1957]; C. A. **52**, 2965 a [1958].

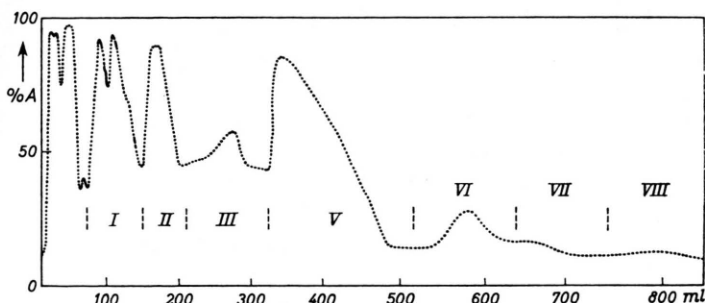


Abb. 1. Elutionsdiagramm des Hydroxylierungsgemischs von 150 mg Tryptophan an 240 · 1,1 cm Sephadex G-10 mit Wasser. Registrierung mit Uvicord.

Man erkennt mehr als 10 Substanzen, die sich — angezeigt durch die mehr oder weniger gut ausgeprägten Erhebungen — teilweise voneinander getrennt haben. Die mit I und II bezeichneten Mischungen wiesen keine charakteristischen UV-Spektren auf und reagierten mit P a u l y - Reagenz mit wenig ausdrucksvoller bräunlicher Farbe. Sie wurden nicht weiter untersucht. Bei den Substanzen der Erhebung III handelte es sich um ein Gemisch, das — wie das Papierchromatogramm von Abb. 2 zeigt — einen großen Anteil einer mit Ninhydrin rotviolett reagierenden Aminosäure enthält, die denselben R_F -Wert wie β -[Oxindolyl-(3)]-alanin (2-Hydroxytryptophan, 1a) aufwies. Das Mischspektrum ließ auch deutlich das bekannte⁶ Maximum der Oxindolkörper bei 250 $m\mu$ und die niedrige Schulter bei 280 $m\mu$ erkennen, so daß wir hier die bisher bei radikalischen Oxydationen nicht aufgefundene Aminosäure 1a vor uns haben dürften. Erhebung IV bestand laut Papierchromatogramm (Abb. 2) aus mindestens 5 in etwa gleichen Mengen vorliegenden Ninhydrin- oder P a u l y - positiven Substanzen, die jedoch, da sie keine UV-spektroskopischen Anhaltspunkte für ihre Identifizierung boten, nicht weiter untersucht wurden. Hingegen konnte der Hauptbestandteil von Erhebung V auf Grund des UV-Spektrums und des Papierchromatogramms leicht als unverändertes Tryptophan (2a) charakterisiert werden. Aus den anderen zahlreichen Komponenten dieser Fraktion sei nur auf die als 3 bezeichnete Aminosäure hingewiesen, die mit P a u l y - Reagenz eine weinrote Färbung ergab. Diese trat eng neben einer zu einem rostroten Farbstoff kuppelnden Ver-

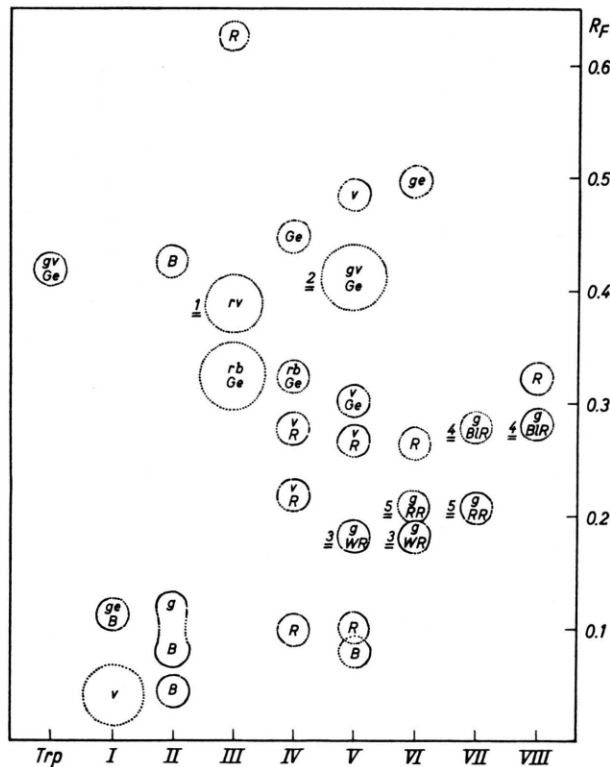


Abb. 2. Absteigendes Papierchromatogramm der Fraktionen I bis VIII aus Abb. 1 mit Fließmittel LM H, 19 Stunden. Großbuchstaben: Farbe mit P a u l y - Reagenz, Kleine Buchstaben: Farbe mit Ninhydrin. Es bedeuten: g grau, ge gelb, v violett, b braun, r rot, rb rotbraun, wr weinrot, blr bläurot, rr rostrot.

bindung (5) in der Fraktion VI als Hauptbestandteil auf. Das UV-Mischspektrum von Fraktion VI deutete auf 6-Hydroxy-tryptophan (3a)² und 5-Hy-

⁶ TH. WIELAND u. G. SCHMIDT, Liebigs Ann. Chem. 577, 215 [1952].

⁷ F. TROXLER, F. SEEMANN u. A. HOFMANN, Helv. chim. Acta 42, 2073 [1959].

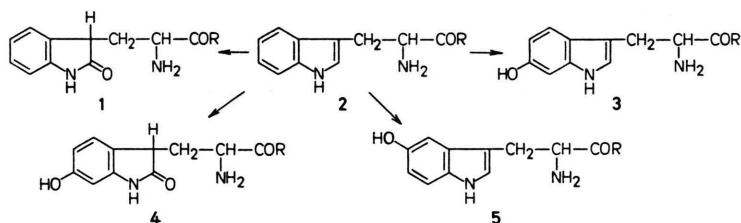
⁸ Wir danken Herrn Prof. Dr. B. WITKOP, National Institutes of Health, Bethesda, Md., USA, auch hier für die Überlassung von 5-Hydroxy-tryptophan und 6-Benzoyloxy-tryptophan, aus dem wir durch katalytische Hydrierung über Pd-Kohle in Methanol/Wasser (4 : 1) und anschließende Chromatographie an einer Sephadex G-10 Säule mit Wasser reines 6-Hydroxy-tryptophan darstellen konnten.

droxy-tryptophan (**5a**)⁷ hin, die beide als Reinstanz zur Verfügung standen⁸.

Um die oxydativ gebildeten Phenole **3a** und **5a** zu trennen und zu identifizieren, haben wir versucht, die Fraktion VI der Abb. 1 an Cellulosepulver mit der Lösungsmittelmischung H (s. Versuchsteil) chromatographisch in ihre Komponenten zu zerlegen. Dies ist zwar nicht gelungen, da die schon am Papier wenig unterschiedlichen Stoffe auch auf der Säule nicht differenzierter wanderten, doch konnte immerhin eine chromatographische Fraktion erhalten werden, die nur noch aus den beiden phenolischen Aminosäuren bestand und jetzt deutlich ein UV-Spektrum hatte, wie es von einer Mischung aus **3a** und **5a** gegeben wird. Die Mischung zeigte im Papierchromatogramm exakt das gleiche Bild wie eine Mischung aus 5-Hydroxy-tryptophan (**5a**, $R_f = 0,23$) und 6-Hydroxy-tryptophan (**3a**, $R_f = 0,20$), wobei auch die bei der Kupplung mit P a u l y - Rea-

genz erhaltenen Farbtöne übereinstimmten. Somit ist wohl erwiesen, daß 5- und 6-Hydroxy-tryptophan bei der Hydroxylierung des Tryptophans entstehen.

Als weiteres Oxydationsprodukt trat in den Fraktionen VII und VIII eine im Papierchromatogramm etwas rascher als **3** oder **5** wandernde Aminosäure auf, die nach der P a u l y - Reaktion (blaurot) ebenfalls phenolischer Natur sein mußte (**4** in Abb. 2). Wir konnten sehr wahrscheinlich machen, daß es sich hierbei um β -[6-Hydroxy-oxindolyl-(3)]-alanin (**4a**) handelt, dessen UV-Spektrum aus einem Hydrolyseprodukt des α -Amanitins vor kurzem in Erscheinung getreten war² und das auch, abgewandelt als 6-Methoxyverbindung des 3-Methyl-oxindols, als Syntheseprodukt vorlag⁹ (Maxima bei ca. 260, 285 m μ und Schulter bei ca. 295 m μ). So ist es sehr wahrscheinlich, daß auch die doppelt oxydierte Verbindung **4a** als Produkt der Hydroxylierung des Tryptophans gebildet wird.



	R
a	OH
b	-Gly
c	-Gly-Ile-Gly

Um einen ungefähren Überblick über die mengenmäßigen Anteile an den einzelnen Oxydationsprodukten zu bekommen, wurde ein Hydroxylierungsansatz von 300 mg Tryptophan an einer Sephadex G-10-Säule von 1,9 · 240 cm mit Wasser als Elutions-

mittel aufgetrennt. Die analog Abb. 1 geschnittenen Fraktionen, die salzfrei waren, wurden in trockenem Zustand gewogen und ergaben die in der letzten Spalte von Tab. 1 wiedergegebenen Ausbeuten (in Prozenten des eingesetzten Tryptophans).

Die weiteren im Papierchromatogramm (Abb. 2) sichtbaren Oxydationsprodukte, unter denen vielleicht auch 4- und 7-Hydroxyverbindungen zu finden wären, sind aus Mangel an Referenzsubstanzen nicht weiter untersucht worden.

Nr. in Abb. 2	Verbindung	R_f (Abb. 2)	Farbe mit P a u l y s Reagenz	UV-Maximum [m μ in Wasser]	Ausb. [%]
1	β -[Oxindolyl-(3)]-alanin	0,37	keine	251	13
2	Tryptophan	0,44	rotviolett	280, 289	48
3	6-Hydroxytryptophan	0,20	gelb	272, 292	0,3
4	β -[6-Hydroxy-oxindolyl-(3)]-alanin	0,28	weinrot	264	0,3
5	5-Hydroxytryptophan	0,23	blaurot	275, 295	0,2

Tab. 1. In einem Hydroxylierungsansatz von Tryptophan identifizierte Aminosäuren.

⁹ TH. WIELAND u. O. UNGER, Chem. Ber. **96**, 253 [1963].

Hydroxylierung von Tryptophyl-peptiden

Tryptophyl-glycin (2b)

Der auf dem Syntheseweg zum Dipeptid **2b** gelegene Benzyloxycarbonyl-tryptophyl-glycinmethylester, der in Wasser/Methanol (2 : 1) dem Oxydationsversuch unterzogen werden mußte, lieferte überhaupt keine papierchromatographisch nachweisbaren Hydroxylierungsprodukte. Das Dipeptid reagierte hingegen in ähnlicher Weise wie Tryptophan, so daß die Benzyloxycarbonylgruppe, die wohl als Radikalfänger wirkt, für den Mißerfolg verantwortlich sein dürfte. Am Methanol als Lösungsmittel konnte das Ausbleiben der Hydroxylierung nicht liegen, da — wie wir uns beim Tryptophan überzeugt hatten — dieser Alkohol keine hemmende Wirkung auf den Hydroxylierungsvorgang ausübte. Vom Dipeptid **2b** entstanden bei gleichartiger Sauerstoffbehandlung wie an Tryptophan prinzipiell analoge Hydroxylierungsprodukte. Diese konnten in der gleichen Reihenfolge, wenn auch in weniger scharf unterschiedenen Fraktionen, durch Chromatographie an Sephadex G-10 in Wasser getrennt werden. Die der Abb. 1 analogen Anteile wurden papierchromatographisch analysiert. Dabei ergab sich ein Bild, das dem der Oxydationsprodukte des Tryptophans entsprach, mit dem kleinen Unterschied, daß jetzt die mit Paulys-Reagenz gleichfarbig kuppelnden Peptide **3b**, **4b** und **5b** etwas deutlicher waren. R_f -Werte und Ausbeuten der Oxydationsprodukte sind in Tab. 2 zusammengestellt.

Wie im Vergleich zum Tryptophanansatz (Tab. 1) zu sehen ist, wuchs die Ausbeute der am Benzolkern hydroxylierten Produkte stark an, während die 2-Hydroxylierung abfiel. Die in der letzten Spalte angegebenen Ausbeuten sind allerdings nur annäherungsweise ermittelt.

Tryptophyl-glycyl-isoleucyl-glycin (2c)

Auch das Tetrapeptid **2c** ließ nach Hydroxylierung im wäßrigen System bei der anschließenden Chromatographie an Sephadex G-10 mit Wasser zahlreiche Uvicord-registrierte Komponenten erkennen, die in einer der Abb. 1 analogen Reihenfolge, spektrophotometrisch unterscheidbar, auftraten. Im Papierchromatogramm ergaben sich diesmal weniger mit Paulys-Reagenz oder Ninhydrin anfärbbare Flecken, doch konnten auch hier die 5-, -6 und 2.6-Hydroxylierungsprodukte (**5c**, **3c**, **4c**) eindeutig nachgewiesen werden. Die Konzentration am Oxindolyl-(3)-alanylpeptid (**1c**), das durch sein UV-Spektrum in der Lösung noch nachzuweisen war, trat im Papierchromatogramm nicht mehr in Erscheinung, da seine Konzentration gegenüber den anderen Hydroxylierungsprodukten noch weiter als beim Dipeptid **2b** abgefallen war.

Zum Abschluß wurde ein analoger Hydroxylierungsversuch mit 20 mg des Knollenblätterpilzgiftes Phalloidin in Wasser ausgeführt. Trotz der geringen Menge gelang es nach Chromatographie an Sephadex G-10, in den nach dem unveränderten Toxin erscheinenden, UV-absorbierenden Fraktionen durch Papierchromatographie deutlich eine Substanz aufzufinden, die sich durch ihre violette Farbreaktion mit Zimtaldehyd (Phalloidin wird blau) und rote Farbreaktion mit Paulys Reagenz (Phalloidin wird schwach gelb) sowie durch ihren etwas kleineren R_f -Wert als Hydroxylierungsprodukt erwies. Ob hier die 5-Hydroxyverbindung oder, wie in α -Amanitin die 6-Hydroxyverbindung vorlag, kann erst durch eingehendere Versuche entschieden werden.

Beschreibung der Versuche

Hydroxylierung der Tryptophankomponente aus Tryptophan (2a), Tryptophyl-glycin (2b), Tryptophyl-glycyl-isoleucyl-glycin (2c) und Phalloidin nach BRODIE³

Die im Hydroxylierungsgemisch (s. w. u.) gelöste Substanz wurde im 50- oder 100-cm³-Kölbchen am

Nr. entsprechend Abb. 2	Peptid	R_f (analog Abb. 2)	Farbe mit		Ausbeute [%]
			Paulys Reagenz	Ninhydrin	
1'	β -[Oxindolyl-(3)]-alanyl-glycin	0,34	—	rotviolett	3
2'	Tryptophylglycin	0,37	gelb	grauviolett	35
3'	6-Hydroxytryptophyl-glycin	0,11	weinrot	grau	11
4'	β -[6-Hydroxyoxindolyl-(3)]-alanyl-glycin	0,22	blaurot	grau	17
5'	5-Hydroxytryptophyl-glycin	0,18	rostrot	grau	12

Tab. 2. In einem Hydroxylierungsansatz von Tryptophyl-glycin identifizierte Peptide. Die UV-Maxima entsprechen den analogen Tryptophanderivaten (Tab. 1).

Vibrator unter Durchsaugen von mit Glaswolle, konz. Schwefelsäure und Wasser gereinigter Luft 3 Stdn. bei 37° (thermostatisiertes Wasserbad) hydroxyliert. Der Ansatz wurde filtriert, auf 1 bis 2 cm³ eingengt und direkt zur Säulen- und Papierchromatographie verwendet. Hydroxylierungsgemisch: 6,5 mMol Versene (Äthylendiamintetraessigsäure-Dinatriumsalz) 1,3 mMol Eisen-(II)-sulfat · 7 H₂O, 10 mMol Ascorbinsäure, 250 ml 0,1-*m*. Phosphatpuffer pH 6,8; 6 mMol der Verbindungen **2a–c**.

Säulenchromatographie

Die Hydroxylierungsgemische wurden an 240 · 1,1 cm Sephadex G-10-Säulen unter Verwendung des „Uvicord“ Firma LKB Produkter AB, Stockholm, und eines Fraktionssammlers in 5-cm³-Fraktionen mit Wasser

Ver- bindung	[mg]	Versene	FeSO ₄ · 7H ₂ O [mg]	Ascorbin- säure	Phosphat- Puffer [ccm]
2a	305	550	90	615	62,5
2b	96	135	50	300	31
2c	50	42	7	48	31
Phalloidin	20	9	3	21	15

Tab. 3. Hydroxylierungsansätze.

als Elutionsmittel chromatographiert. Die nach dem UV-Spektrum kontrollierten, zusammengehörigen Fraktionen (s. Abb. 1, S. 927) wurden vereinigt, am Rotationsverdampfer auf wenige cm³ eingengt, eisgetrocknet und der Papierchromatographie unterworfen. Fraktion VI (s. Abb. 1) des Ansatzes **2a** aus Tab. 3 wurde außerdem an 130 · 2,25 cm „Ederol“-Cellulosepulver Nr. 221 chromatographiert. Im Elutionsmittel LMH (s. w. u.) war die Fraktion III von 1100 bis 1300 cm³ Gesamt-Elutionsvolumen ein Gemisch aus 5- und 6-Hydroxy-tryptophan (**5a** und **3a**).

Papierchromatographie

Absteigend an 60 · 60 cm Schleicher & Schüll 2043 b. Fließmittel: Lösungsmittel H (LMH) = sek.-Butylalkohol/Ameisensäure/Wasser (75 : 15 : 10).

Sprühreagenzien

Pauly: Frisch bereitet aus ca. 20 mg diazotierter Sulfanilsäure in 10 cm³ 10-proz. Natriumcarbonatlösung.

Ninhydrin: 1 g Ninhydrin auf 1 l Methanol/n-Butanol/2 n-Essigsäure (60 : 35 : 3).

Zimtaldehyd/HCl 2,5-proz. methanolische Lösung. Nach dem Sprühen 10 Min. Einhängen in einen Trog mit HCl-Gas-Atmosphäre.