

Herstellung von 4'-Azido-2'-nitro-L-phenylalanin zur Markierung von Komponenten des Aminosäuretransports in biologischen Membranen

Falk Fahrenholz und Gilbert Schimmack

(Der Schriftleitung zugegangen am 5. Februar 1975)

Preparation of 4'-Azido-2'-nitro-L-phenylalanine as label for amino acid transport systems in biological membranes

Summary: The synthesis of 4'-azido-2'-nitro-L-phenylalanine is described. It could be activated by irradiation ($\lambda > 345$ nm) within a few minutes and can thus possibly

be used for labeling amino acid transport systems in biological membranes.

Arylazide lassen sich photolytisch zersetzen, wobei reaktionsfähige Nitrene entstehen^[1]. Diese Eigenschaft verwendeten zuerst Fleet, Knowles und Porter^[2] zur Markierung der Bindungsstellen in Antikörpern, später andere Autoren zur Fixierung von Liganden an ihre Rezeptoren in komplexeren biologischen Systemen^[3,4].

p-Azido-L-phenylalanin (I), ein Analogon des Tyrosins, wurde von Schwyzer und Caviezel^[5] sowie von Wieland, Dungen und Birr^[6] hergestellt und in biologisch aktive Peptide eingebaut. Wir interessieren uns für die Möglichkeit, Azidoderivate des L-Phenylalanins zur Markierung von Komponenten zu verwenden, die am Transport von Aminosäuren durch Zellmembranen beteiligt sind^[7]. Unsere Untersuchungen ergaben, daß die Photolyse von (I) entweder lange Bestrahlungszeiten ($\lambda > 345$ nm: 10 - 15% Aktivierung nach 10 min; 40% Aktivierung nach 30 min) oder Wellenlängen erfordert, die von aromatischen Aminosäuren in Proteinen absorbiert werden. Diese Bedingungen sind nur mit Einschränkungen bei Zellen oder Membranvesikeln anwendbar.

Durch die Einführung einer Nitrogruppe in den aromatischen Kern eines Azidoderivats des Phenylalanins sollte die Absorption nach langen Wellen verschoben werden und die Photolyse bei $\lambda > 345$ nm in kürzerer Zeit möglich sein. Außerdem wird durch elektronegative Substituenten die Halblebenszeit aromatischer Nitrene verkürzt

und damit ihre Reaktivität erhöht^[8]. Um intramolekularen Ringschluß durch Reaktion des Nitrens mit der Nitrogruppe zu vermeiden, dürfen sich diese Substituenten nicht in *o*-Stellung zueinander befinden^[9].

Nachstehend wird über Darstellung und Eigenschaften von 4'-Azido-2'-nitro-L-phenylalanin (II) berichtet. Die Nitrierung von aromatischen Aminen in stark schwefelsaurer Lösung führt überwiegend zu *m*-Nitroderivaten, insbesondere wenn sich Alkylgruppen in *o*- oder *p*-Stellung zur Aminofunktion befinden^[10,11]. Deshalb wählen wir als Ausgangssubstanz für die Darstellung von (II) *p*-Amino-L-phenylalanin^[12] (III). Das ¹H-NMR-Spektrum des Nitroderivats von (III) zeigte das nach 1. Ordnung näherungsweise interpretierbare Aufspaltungsmuster eines aromatischen ABC-Systems ($\delta_A = 7.59$ ppm, $\delta_B = 7.32$ ppm, $\delta_C = 7.16$ ppm, $J_{AB} < 1$ Hz, $J_{AC} = 2$ Hz, $J_{BC} = 8.5$ Hz). Die aus den chemischen Verschiebungen von (III) und den Inkrementen der Nitrogruppe^[13] berechneten δ -Werte der beiden theoretisch möglichen Nitroderivate von (III) betragen für 4'-Amino-2'-nitro-L-phenylalanin (IV) $\delta_A = 7.79$ ppm, $\delta_B = 7.29$ ppm, $\delta_C = 7.17$ ppm und für 4'-Amino-3'-nitro-L-phenylalanin $\delta_A = 8.07$, $\delta_B = 7.45$, $\delta_C = 7.01$. Der Vergleich der berechneten mit dem gefundenen δ -Werten bestätigt das Vorliegen von Verbindung (IV). Diese ließ sich analog dem *p*-Amino-L-phenylalanin (III) in die Azido-

Postanschrift: Dr. F. Fahrenholz, Max-Planck-Institut für Biophysik, D-6 Frankfurt a.M.-70, Kennedy-Allee 70.

verbindung (II) überführen^[6]. Die Gesamtausbeute an einheitlichem 4'-Azido-2'-nitro-L-phenylalanin (II) bezogen auf (III) betrug 26%.

Die Nitroverbindung (II) besaß im Gegensatz zu *p*-Azido-L-phenylalanin (I) eine zusätzliche langwellige Absorption ($\lambda_{\max} = 335$ nm, wäßrige Lösung, pH 7.2) und ließ sich durch Bestrahlen ($\lambda > 345$ nm) in 3 min zu etwa 75% aktivieren. Die Halbwertszeit für die Zersetzung der Azidofunktion im Tageslicht in 0.1proz. wäßriger Lösung lag bei 12 h.

p-Azido-L-phenylalanin (I) und das beschriebene *o*-Nitroderivat (II) erwiesen sich im „Dunkelexperiment“ als Hemmstoffe der Aufnahme von L-Phenylalanin in Ehrlich-Aszites-Zellen sowie in Membranvesikeln des proximalen Tubulus der Rattenniere^[14]. Die Verbindungen (I) und besonders (II) sollten sich nach Herstellung in radioaktiv markierter Form^[14] zur Charakterisierung von Komponenten eignen, die am Transport von Aminosäuren durch Zellmembranen beteiligt sind^[15].

Material und Methoden

¹H-NMR-Spektren: 90 MHz, Bruker HFX90, Fouriertransform-Technik, Lösungsmittel D₂O, Standard Natriumsalz der Trimethylsilylpropionsäure.

UV-Spektren: Beckman DB-GT Spektralphotometer; Lösungsmittel: Phosphatpuffer, pH 7.2.

IR-Spektren: Perkin Elmer Modell 457.

Spezifische Drehung: Perkin Elmer Polarimeter 141.

UV-Quelle: Quecksilber-Hochdrucklampe 200 Watt, Osram HBO 200, montiert in einem mit Konkavspiegel und Linsensystem ausgestatteten Lampengehäuse der Firma E. Leitz. Zur Absorption des kurzwelligen Anteils wurden Kantenfilter der Firma Schott verwendet ($\lambda > 345$ nm: Filter WG 360, $\lambda > 285$ nm: Filter WG 305).

Photolyse der Azidoverbindungen (I) und (II)

Die wäßrige Lösung der Azidoverbindung ($c = 0.1\%$) wurde in einer doppelwandigen auf 18 °C thermostatisierten Quarzküvette bestrahlt und danach unter Ausschluß von Licht gefriergetrocknet. Wir vermischten jeweils 0.4 mg bestrahlter und unbestrahlter Substanz mit 300 mg Kaliumbromid und bestimmten die Absorption der charakteristischen Bande der Azidogruppe im IR-Spektrum. Die Absorptionsabnahme durch Bestrahlung nahmen wir als Maß für die photolytische Aktivierung von (I) und (II).

4'-Amino-2'-nitro-L-phenylalanin (IV)

5.4 g (30 mmol) *p*-Amino-L-phenylalanin wurden unter Erwärmen in 30 ml 97proz. Schwefelsäure ($d = 1.84$) gelöst und auf -5 °C gekühlt. Hierzu gab man unter Rüh-

ren tropfenweise 1.3 ml 100proz. Salpetersäure ($d = 1.52$), wobei die Temperatur zwischen -5 ° und 0 °C gehalten wurde.

Die Salpetersäure wurde zuvor zur Zerstörung von Stickoxiden mit Harnstoff versetzt. Man ließ nach Zugabe von Salpetersäure noch 30 min bei 0 °C und 15 min bei Raumtemperatur rühren und gab die dunkelgefärbte Lösung auf 150 ml Eiswasser. Die Reaktionslösung wurde mit Dowex-Ionenaustauschharz Typ 44 (mesh 20 - 50) OH⁻-Form auf pH 5 - 6 gebracht. Hierzu waren 3mal je 120 g Austauscher nötig, wobei man nach jeder Zugabe 30 - 60 min bis zur Einstellung des pH-Wertes wartete. Der Ionenaustauscher wurde abgesaugt und mehrmals mit heißem Wasser gewaschen. Die vereinigten Filtrate wurden mit Aktivkohle kurz gekocht und im Vakuum bei 40 °C eingengt bis zum Ausfallen von gelben Kristallen. Die Hauptmenge kristallisierte beim Stehen bei 4 °C und ließ sich aus heißem Wasser umkristallisieren. Ausbeute: 2.4 g (35% d.Th.) vom Schmp. 237 °C.

$[\alpha]_D^{25} + 1.6^\circ$ ($c = 0.5$, in Wasser).

$R_F = 0.5$ (n-Butanol/Eisessig/Wasser 5:2:3).

¹H-NMR-Spektrum (ABC-System): $\delta_A = 7.59$ ppm, $\delta_B = 7.32$ ppm, $\delta_C = 7.16$ ppm, $J_{AB} < 1$ Hz, $J_{AC} = 2$ Hz, $J_{BC} = 8.5$ Hz;

zum Vergleich *p*-Aminophenylalanin (III) (AA'BB'-System):

$\delta_A = 7.12$ ppm, $\delta_B = 6.84$ ppm, $J_{AB} = 8.5$ Hz.

C₉H₁₁N₃O₄ (225.2)

Ber.	C 48.00	H 4.92	N 18.66
Gef.	C 48.01	H 5.13	N 18.43

4'-Azido-2'-nitro-L-phenylalanin (II)

Bei der Herstellung von (II) wurden die Reaktionsgefäße vor Lichteinwirkung geschützt. Zur Lösung von 2.3 g (10 mmol) 4'-Amino-2'-nitro-L-phenylalanin (IV) in 6 ml 6N Salzsäure ließ man bei < 5 °C 0.83 g (12 mmol) Natriumnitrit in 5.5 ml Wasser langsam hinzutropfen. Nach 10 min gab man tropfenweise 0.78 g (12 mmol) Natriumazid in 7.5 ml Wasser hinzu, wobei die Flüssigkeit stark schäumte. Anschließend wurde 15 min bei 5 °C und 15 min bei Raumtemperatur gerührt. Das ausgefallene Hydrochlorid von (II) wurde abgesaugt, mit wenig kaltem Wasser, dann mit Äther gewaschen. Die so gewonnene Azidoverbindung war meistens bereits in der Dünnschichtchromatographie und Hochspannungselektrophorese einheitlich. Bei einigen Versuchen auftretende Verunreinigung konnten durch Auflösen in wenig Äthanol und Ausfällen mit wasserfreiem Äther entfernt werden.

Ausbeute: 2.16 g (75% d.Th.) vom Schmp. 173 °C (Zers.).

$[\alpha]_D^{25} + 21.2^\circ$ ($c = 0.5$, in Wasser).

$R_F = 0.62$ (n-Butanol/Eisessig/Wasser 5:2:3).

UV-Spektrum in Phosphatpuffer, pH 7.2:

$\lambda_{\max} = 248 \text{ nm}$ ($\epsilon = 19\,700 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$),

$\lambda_{\max} = 335 \text{ nm}$ ($\epsilon = 1\,600 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$).

IR-Spektrum (KBr): Bande der Azidogruppe bei 2130 cm^{-1} , Banden der C-H-"out of plane-Schwingungen" bei 900 cm^{-1} und 825 cm^{-1} .

$\text{C}_9\text{H}_9\text{N}_5\text{O}_4 \cdot \text{HCl}$ (287.7)

Ber.	C 37.57	H 3.50	N 24.35	Cl 12.33
Gef.	C 37.50	H 3.70	N 24.01	Cl 12.35

Wir danken Herrn Prof. H. Kessler und Herrn G. Zimmermann vom Institut für Organische Chemie in Frankfurt für die Aufnahme und Diskussion der Kernresonanzspektren.

Literatur

- ¹ Übersicht bei Reiser, A. & Wagner, H. M. (1971) in *The Chemistry of the Azido Group* (Patai, S., Hrsg.) S. 441 - 502, Intersci. Publ., New York.
- ² Fleet, G. W. J., Knowles, J. R. & Porter, R. R. (1972) *Biochem. J.* **128**, 499 - 508.
- ³ Rucho, A. E., Kiefer, H., Roeder, P. E. & Singer, S. J. (1973) *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A.* **70**, 2567 - 2571.
- ⁴ Hanstein, W. G. & Hafeti, Y. (1973) *J. Biol. Chem.* **249**, 1356 - 1362.
- ⁵ Schwyzer, R. & Caviezel, M. (1971) *Helv. Chim. Acta* **54**, 1395 - 1400.
- ⁶ Wieland, Th., Dungen, A. v. & Birr, C. (1971) *Liebigs Ann. Chem.* **752**, 109 - 114.
- ⁷ Übersicht bei Heinz, E. (1972) *Metabolic Pathways*, S. 455 - 501, Acad. Press, Inc., New York, London.
- ⁸ Reiser, A. & Leyshon, L. (1970) *J. Amer. Chem. Soc.* **92**, 7487.
- ⁹ Smith, P. A. & Brown, B. B. (1951). *J. Amer. Chem. Soc.* **73**, 2435.
- ¹⁰ Seidenfaden, W. & Pawellek, D. (1971) in *Methoden der Organischen Chemie* (Houben-Weyl) Bd. 10/1, S. 659, Thieme-Verlag, Stuttgart.
- ¹¹ Noelting, E. & Collin, B. (1884) *Ber. Deut. Chem. Ges.* **17**, 261.
- ¹² Bergmann, E. D. (1952) *J. Amer. Chem. Soc.* **79**, 4947.
- ¹³ Günther, H. (1973) *NMR-Spektroskopie*, S. 104, Thieme-Verlag, Stuttgart.
- ¹⁴ Die Transportstudien und Markierungen mit radioaktiven Azidoderivaten des L-Phenylalanins sollen Gegenstand nachfolgender Veröffentlichungen sein.
- ¹⁵ Vor kurzem beschrieben Escher, E. & Schwyzer, R. (1974) *FEBS Lett.* **46**, 347 - 350 die „Photoaffinitätsmarkierung“ des Chymotrypsins durch Tripeptide mit C-terminalen Azidoderivaten des L-Phenylalanins, u.a. dem 4'-Azido-2'-nitro-L-phenylalanin. Die Synthese der Peptide u. Aminosäuren ist bisher nicht erschienen.

Über die Spaltung von Eiweißstoffen mit Bromcyan

Gerhard Braunitzer und Heinrich J. Aschauer*

(Der Schriftleitung zugegangen am 18. Februar 1975)

The Lysis of Proteins with Cyanogen Bromide

Summary: Bovine β -lactoglobulin-AB was split with cyanogen bromide, and the reaction mixture was analyzed by countercurrent distribution, gel chromatography and finally, chromatography on phosphocellulose. In addition to the previously described splitting pro-

ducts, we obtained three more minor products, with yields of 8, 15 and 25%. The analytical data indicate that these were formed by lysis C-terminal from the tryptophan-19 and the tryptophan-61 of β -lactoglobulin. The result is discussed.

Vor einiger Zeit erhielten wir die unten beschriebenen Ergebnisse; wir zögerten jedoch mit deren Veröffentlichung. Nun berichten E. Smith^[1] und Mitarbeiter über die Primärstruktur der Glutamat-Dehydrogenase (NADP⁺) (EC 1.4.1.4): die Ergebnisse der amerikanischen Kollegen, die Bromcyspaltung betreffend, stützen unsere Befunde. Wir möchten daher über eine BrCN-Spaltung und zwar an beiden Tryptophan-Resten des β -Lactoglobulins berichten.

Material und Methoden

a) β -Lactoglobulin-AB^[2] des Rindes: erhalten von der Fa. Serva, Heidelberg. Das Präparat zeigte in der Elektrophorese die beiden Banden der Komponenten A und B. Die SH-Gruppen waren nach Crestfield et al.^[3] mit Jodacetamid umgesetzt.

b) Bromcyan^[4]: Präparat der Fa. Merck, Darmstadt. Wir verwendeten das Reagenz ohne weitere Reinigung. Versuche haben gezeigt, daß bei Sublimation und anschließender Resublimation sublimierter Präparate stets wieder derselbe Anteil im Kolben übrigblieb. Zur Spaltung wurden $\approx 18 \mu\text{mol}$ CM- β -Lactoglobulin-AB 4 h mit

70fachem molaren Überschuß BrCN bei Zimmertemperatur in 70proz. Ameisensäure behandelt^[5]. Das Reaktionsgemisch wurde mit Wasser verdünnt und lyophilisiert.

c) Gegenstromverteilung^[6]: Zur Anwendung gelangte das Gerät (1000 Stufen) der Fa. O. Post, New York, N.Y., USA. 3 ml Ober- und 3 ml Unterphase. Als Unterphase diente 1proz. wäßrige Dichloressigsäure; als Oberphase sek. Butanol^[7]. Das Reaktionsgemisch wurde in der Unterphase gelöst und über 150 Stufen verteilt. Die Analyse der Fraktionen erfolgte durch UV-Spektroskopie bei 280 nm und durch alkalische Ninhydrinreaktion.

d) Gel-Chromatographie: Sephadex G-75, 20% Essigsäure, 20% Propionsäure, 60% Wasser (V/V); Säulendimension 2.5×90 cm bei $+4^\circ\text{C}$.

e) Phosphocellulose: Es wurde mit Whatman-P11-Cellulose im Pyridinzyklus gearbeitet^[8]. Äquilibrier-Puffer: 0.2M Pyridin, Gradient 1: 0.5M Pyridin, Gradient 2: 2.5M Pyridin. Die Lösungen wurden mit Ameisensäure auf pH 3 titriert. Säule 10×0.9 cm, Mischgeäß 60 ml.

f) Endgruppenbestimmung: Phenylthiohydantoin-Verfahren, Hand-Methode^[9].

Postanschrift: Prof. Dr. G. Braunitzer, Max-Planck-Institut für Biochemie, Abt. Proteinchemie II, D-8033 Martinsried, Am Klopferspitz 4.

* Auszug: Dissertation Dipl. Ing. H. J. Aschauer, Naturwiss. Fakultät, TH Wien, in Vorbereitung.

Ergebnisse

β -Lactoglobulin enthält 4 Methionin-Reste^[10,11] und ergibt 5 Spaltprodukte mit Bromcyan^[11]. Wir konnten die früher beschriebenen Ergebnisse bestätigen. Zusätzlich erhielten wir die in der Tabelle aufgeführten Peptide P-1, P-2 und P-3.

Tabelle. Peptide aus der Bromcyclyspaltung von β -Lactoglobulin.

Sequenz	P-1	P-2	P-3
	8 - 19	20 - 24	25 - 61
Lys	1.68	—	2.17
Arg	—	—	1.05
Asp	1.03	—	3.23
Thr	0.89	—	1.01
Ser	—	0.90	2.78
Glu	1.44	—	6.35
Pro	—	—	2.82
Gly	1.63	—	0.98
Ala	1.19	1.08	4.10
Val	0.91	—	1.86
Ile	0.86	—	1.77
Leu	1.37	1.13	7.04
Tyr	—	0.90	0.84
Trp	+	—	+
N-Terminus	Lys	Tyr	Ala
Ausbeute [%]	8	15	25

P-1 entspricht der Sequenz 8 - 19, P-2 der Sequenz 20 - 24 und P-3 der Sequenz 25 - 61. Die Analysen unserer Peptide sind im allgemeinen besser; hier handelt es sich jedoch um Nebenbanden, für die keine optimalen Analysenwerte erwartet werden können. Die Werte erlauben jedoch eindeutig die wiedergegebene Interpretation.

Diskussion

Zur chemischen Spaltung von Proteinen wird heute die Methode mit Bromcyan^[4] bevorzugt. Die von uns gewählten Versuchsbedingungen (70% Ameisensäure) werden allgemein verwendet. Die Ausbeuten der Spaltung sind gut; nur bei Serin^[12] und Threonin^[13] sind Komplikationen zu erwarten: Es wurde noch berichtet, daß die Met-Ile-Bindung schlecht gelöst wird^[14]. Die Spaltung wird bisher in verschiedenen Medien, aber auch in wasserfreier Ameisensäure^[15] durchgeführt. In unserer Arbeit versuchten wir durch eine Folge von drei Methoden, nämlich der Gegenstromverteilung, Gelchromatographie und Trennung über Ionenaustauscher möglichst reine Produkte zu erhalten. Hierbei konnten wir infolge der großen Leistung des Arbeitsganges Nebenbanden

erhalten, die interpretierbare Analysen lieferten. β -Lactoglobulin enthält in Position 19 und 61 je einen Tryptophanrest und unsere Daten ergeben, daß an beiden Resten eine zusätzliche Spaltung eingetreten ist. Da bei P-2 Tyrosin N-terminal vorliegt, muß die Spaltung C-terminal vom Tryptophan-19 erfolgen. Dieses Ergebnis steht in Übereinstimmung mit dem Bericht von E. Smith et al.^[1].

Es erhebt sich die Frage, ob eine unspezifische oder — was wir vermuten — eine spezifische Nebenreaktion vorliegt. Die Frage nach Abhängigkeit der „Nebenreaktion“ von Temperatur, Milieu, Lichteinfluß usw. muß zunächst offen gelassen werden.

Wir danken der Deutschen Forschungsgemeinschaft für die Unterstützung unserer Arbeit. Die Max-Planck-Gesellschaft gewährte einem von uns (H. J. A.) ein Stipendium. Die Analysen wurden von Herrn A. Stangl durchgeführt.

Literatur

- Wootton, J. C., Chambers, G. K., Holder, A. A., Baron, A. J., Taylor, J. G., Fincham, J. R. S., Blumenthal, K. M., Moon, K. & Smith, E. L. (1974) *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A.* 71, 4361 - 4365.
- Palmer, A. H. (1934) *J. Biol. Chem.* 104, 359 - 372.
- Crestfield, A. M., Moore, S. & Stein, W. H. (1963) *J. Biol. Chem.* 238, 622 - 627.
- Gross, E. & Witkop, B. (1961) *J. Amer. Chem. Soc.* 83, 1510 - 1511.
- Steers, E., Craven, G. R., Anfinsen, C. B. & Bethune, J. L. (1965) *J. Biol. Chem.* 240, 2478 - 2484.
- Hecker, E. (1955) Verteilungsverfahren im Laboratorium, S. 45 - 72, Verlag Chemie, Weinheim.
- Hill, R. J. & Craig, L. C. (1959) *J. Amer. Chem. Soc.* 81, 2272 - 2273.
- Braunitzer, G. & Köhler, H. (1966) *diese Z.* 343, 290 - 293.
- Edman, P. (1970) in Protein Sequence Determination (Needleman, S. B., Hrsg.) S. 229 - 240, Springer Verlag, Berlin.
- Brand, E., Saidel, L. J., Goldwater, W. H., Kassell, B. & Ryan, F. J. (1945) *J. Amer. Chem. Soc.* 67, 1524 - 1532.
- Braunitzer, G. & Chen, R. (1972) *diese Z.* 353, 674 - 676.
- Narita, K. & Titani, K. (1968) *J. Biochem.* 63, 226 - 241.
- Schroeder, W. A., Shelton, J. B. & Shelton, J. R. (1969) *Arch. Biochem. Biophys.* 130, 551 - 556.
- Kolb, E., Harris, J. I. & Bridgen, J. (1974) *Biochem. J.* 137, 185 - 197.
- Inglis, A. S. & Edman, P. (1970) *Anal. Biochem.* 37, 73 - 80.