

## 44. Über Pterinchemie

29. Mitteilung [1]

### Hydroxylierung der Phenylreste in Phenylalanylpeptiden mittels Tetrahydropterin unter physiologischen Bedingungen

von M. Viscontini und G. Mattern<sup>1)</sup>

Organisch-Chemisches Institut der Universität, Rämistrasse 76, CH-8001 Zürich

*Zusammenfassung.* Die Ausbeuten an Tyrosinen bei der Hydroxylierung von Peptiden, in denen das Phenylalanin eingebaut ist, sind gegenüber jenen bei der Hydroxylierung von freiem Phenylalanin bedeutend geringer. Besonders herabgesetzt wird die Bildung von *o*- bzw. *m*-Tyrosin. Wir nehmen an, dass dies auf die sterische Hinderung der Phenylgruppe im Komplex zurückzuführen ist, in dem Eisen als Zentralatom und Tetrahydropterin, Sauerstoff und Peptid als Liganden vorliegen.

Vor drei Jahren hatten wir die Annahme gemacht, dass die Phenylalanylinhydroxylierung mittels Tetrahydropterin und Eisen-Ionen in einem Komplex stattfindet, in welchem das Phenylalanin selbst als Ligand enthalten sein müsste [2]. Stimmt die Theorie, dann sollten die HO-Radikalangriffe am Phenylrest von dessen räumlicher Lage und sterischen Hinderungen im Komplex abhängig sein. Mit *Stuart*-Kalotten-Modellen stellt man fest, dass im freien Phenylalanin praktisch keine Hinderungen vorhanden sind; dementsprechend findet die Hydroxylierung in *o*-, *m*- und *p*-Stellung statt (2:1:1) [1], wie auch auf Grund der elektronischen Betrachtungen zu erwarten ist. Die freie Lage des Phenylrestes verschwindet, wenn das Phenylalanin Bestandteil eines Peptides ist und dieses Peptid als Ligand im Eisenkomplex fest gebunden ist. Je länger die Peptidkette ist, desto grösser wird die Entfernung des Phenylrestes vom Eisen-Ion und desto grösser werden die sterischen Hinderungen; infolgedessen kann man erwarten, dass die Hydroxylierung eines solchen Peptides immer schwieriger werden muss und die Ausbeute an hydroxylierten Produkten demzufolge sinken wird.

Zur Bestätigung dieser Hypothese haben wir zwei radioaktive Dipeptide, Phenylalanyl-glycin (Phe-gly-OH) und Alanyl-phenylalanin (Ala-phe-OH), sowie ein radioaktives Tetrapeptid, Gly-phe-gly-gly-OH, synthetisiert und unter physiologischen Bedingungen mittels Tetrahydropterin und Eisen hydroxyliert.

Betrachten wir die Kalottenmodelle dieser Peptide und nehmen wir an, dass in den Komplexen am Eisen als Zentralatom mindestens zwei Stickstoffatome der Peptide koordiniert sind, so stellen wir fest, dass die Phenylgruppen nicht mehr in der Nähe des Eisens zu liegen kommen, sondern nach aussen zeigen. Die *ortho*- und *meta*-Angriffe werden somit gehindert und entsprechende Stellungen den OH-Radikalen weniger zugänglich. Dieser Zustand ist ausgeprägter bei Ala-phe-OH als bei Phe-gly-OH. Beim Tetrapeptid-Komplex ist die Phenylgruppe soweit vom Eisen entfernt, dass nur minimale Mengen an Tyrosin zu erwarten sind. Die Ergebnisse, die in Tabelle 1 angegeben sind, bestätigen alle diese Voraussichten.

<sup>1)</sup> Derzeitige Adresse: Université de Strasbourg, Institut de Chimie, F-67 Strasbourg.

Tabelle 1. Ausbeuten bei der Hydroxylierung von Phenylalanin (frei und gebunden)

Peptide	Gesamte Tyr-Bildung in %	<i>o</i> -Tyr in %	<i>m</i> -Tyr in %	<i>p</i> -Tyr in %	Verhältnis <i>o</i> -/ <i>m</i> -/ <i>p</i> -Tyr
Phe-gly-OH	2,0	0,75	0,075	1,1	0,7:0,07:1
Ala-phe-OH	2,0	0,4	0	1,6	0,25:0:1
Tetrapeptid	1,55	0,4	0	1,15	0,35:0:1
Phenylalanin	6,0	3,0	1,5	1,5	2:1:1

Die Ausbeuten sind auf Grund radioaktiver Messungen berechnet worden, *m*- und *p*-Tyrosin wurden kolorimetrisch bestimmt [1]. Zum Vergleich sind die entsprechenden Ergebnisse der Phenylalaninhydroxylierung beigefügt.

Sollte die enzymatische Hydroxylierung nach einem ähnlichen Mechanismus ablaufen, so würden die Phenylreste der Phenylalaninbausteine in den Proteinmolekeln kaum hydroxyliert werden. Daher kann angenommen werden, dass das Tyrosin aus freiem Phenylalanin oder aus Phenylalaninverbindungen nicht-peptidischer Natur biosynthetisiert wird.

Wir danken Herrn Prof. Dr. W. von Philipsborn für die NMR.-Spektren, Herrn PD Dr. Humbel, Biochemisches Institut der Universität Zürich, und Herrn Dr. H. Leidner, Eidgenössische Anstalt für Wasserversorgung, ETH Zürich, für die Messungen am Aminosäureanalysator Beckman und Herrn H. Frohofer, Leiter unserer mikroanalytischen Abteilung, für alle anderen Messungen und Analysen.

### Experimenteller Teil

Wegen der schlechten Ausbeuten der Synthesen mittels Carbodiimid haben wir die Peptidsynthesen mit radioaktivem 3-<sup>14</sup>C-Phenylalanin nach den Methoden von E. Fischer [3] vorgezogen und wie folgt ausgeführt.

*3-<sup>14</sup>C-Phenylalanin-hydrobromid.* Zu 20 ml einer 48-proz. HBr-Lösung werden 50 ml H<sub>2</sub>O und 16,5 g (0,1 Mol) Phenylalanin, das mit 3-<sup>14</sup>C-Phenylalanin versetzt worden ist, gegeben. Nach Schütteln bis zur vollständigen Auflösung wird eingedampft und der Rückstand mit wenig Aceton aufgenommen und mit Äther ausgefällt: 77% d.Th., Aktivität: 2,5 · 10<sup>6</sup> dpm/mg.

C<sub>9</sub>H<sub>12</sub>BrNO<sub>3</sub> (246,11) Ber. C 43,98 H 4,91 Br 32,50% Gef. C 43,86 H 4,87 Br 32,82%

*Ala-3-<sup>14</sup>C-phe-OH.* 1,5 g (7 mMol) α-Brompropionylbromid werden langsam abwechselnd mit 10 ml 1N NaOH zu einer kalten Lösung (–3°) von 1 g (4 mMol) Phenylalanin-hydrobromid, das mit 3-<sup>14</sup>C-Phenylalanin versetzt ist, in 10 ml 1N NaOH gegeben. Nach beendeter Reaktion werden 0,3 ml 12N HCl zugefügt, wobei sich allmählich Kristalle abscheiden. Nach Stehen über Nacht im Kühlschrank filtriert man die Kristalle ab und wäscht sie mit eiskaltem Wasser. Das α-Bromoderivat wird mit der 10-fachen Gewichtsmenge konz. NH<sub>4</sub>OH bei 100° 3 Std. gekocht. Nach dem Einengen wird das Dipeptid mit absolutem Äthanol ausgefällt und zweimal aus Wasser-Äthanol umkristallisiert: 68%, Aktivität: 6,8 · 10<sup>4</sup> dpm/mg.

C<sub>12</sub>H<sub>16</sub>N<sub>2</sub>O<sub>3</sub> (236,27) Ber. C 61,00 H 6,83 N 11,86% Gef. C 59,70 H 6,93 N 11,64%

*2-Brom-3-phenyl-3-<sup>14</sup>C-propionsäure.* 12,75 g (50 mMol) Phenylalanin-hydrobromid, das mit 3-<sup>14</sup>C-Phenylalanin versetzt ist, werden in 100 ml 25-proz. HBr gelöst. Zu dieser auf –3° abgekühlten Lösung wird unter stetem Rühren eine eiskalte Lösung von 6 g Na<sub>2</sub>NO<sub>2</sub> in 40 ml H<sub>2</sub>O im Laufe einer Stunde getropft. Das ausgeschiedene braunrote Öl wird ausgeäthert, die ätherische Lösung über Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> getrocknet, anschliessend im Vakuum eingedampft und der hellgelbe ölige Rückstand im Kugelrohr bei 120°/0,01 Torr destilliert: 89%, Aktivität: 1,27 · 10<sup>6</sup> dpm/mg.

C<sub>9</sub>H<sub>9</sub>BrO<sub>2</sub> (229,03) Ber. C 47,20 H 3,96% Gef. C 47,47 H 4,20%

*2-Brom-3-phenyl-3-<sup>14</sup>C-propionylbromid.* 22,9 g (0,1 Mol) obigen Produktes werden in 300 ml CHCl<sub>3</sub> gelöst und mit 30,2 g (1,5 Mol) SOBr<sub>2</sub> versetzt. Das Gemisch wird unter Rückfluss und

Feuchtigkeitsausschluss gekocht bis die Gasentwicklung beendet ist (3 Std.). Das überschüssige Thionylbromid wird abdestilliert, der Rückstand mit trockenem Äther aufgenommen und nochmals eingengt. Zurück bleibt ein zähflüssiges, leicht gelbliches Öl, dessen Reinheit mit Hilfe des NMR.-Spektrum ermittelt wird (Verschwinden des COOH-Signals in  $\text{CCl}_4$ ). Aktivität:  $1,2 \cdot 10^6$  dpm/mg. Das Produkt ist unbeständig und muss sofort weiter verarbeitet werden.

*3-[ $^{14}\text{C}$ ]-Phenylalanyl-glycin.* Zu einer auf  $-3^\circ$  abgekühlten Lösung von 1,5 g (20 mMol) Glycin in 27 ml 1N NaOH gibt man abwechselnd in kleinen Portionen 30 ml 1N NaOH und 5,9 g (20 mMol) des obigen Propionylbromids unter ständigem Rühren hinzu. Man rührt solange, bis das ölige Säurebromid vollständig verschwunden ist. Nach Zusatz von 8 ml 5N HCl fällt ein farbloses Öl aus, das beim Reiben in der Kälte leicht kristallisiert. Das so erhaltene 2-Brom-3-phenyl-3-[ $^{14}\text{C}$ ]-propionylglycin wird aus Aceton-Petroläther umkristallisiert und sofort weiter verarbeitet.

2 g (6,5 mMol) des Produktes werden mit 20 ml 33-proz.  $\text{NH}_3$ , das auf  $-10^\circ$  abgekühlt worden ist, umgerührt und 3 Std. in einer Kältemischung stehengelassen. Anschliessend wird auf Raumtemperatur erwärmt, nach vier Tagen eingedampft und das  $\text{NH}_4\text{Br}$  mit warmem abs. Äthanol herausgelöst. Umkristallisation des Rückstandes aus Wasser-Äthanol: 60%, Aktivität:  $2,14 \cdot 10^4$  dpm/mg.

$\text{C}_{11}\text{H}_{14}\text{N}_2\text{O}_3$  (222,24) Ber. C 59,45 H 6,35 N 12,6% Gef. C 59,54 H 6,44 N 18,80%

*3-[ $^{14}\text{C}$ ]-Phe-gly-gly-OH.* Zu einer Lösung von 2,65 g (0,02 Mol) Gly-gly-OH in 10 ml 2N NaOH werden unter ständigem Rühren und portionsweise abwechselnd eine Lösung von 5,84 g (0,02 Mol) 2-Brom-3-phenyl-3-[ $^{14}\text{C}$ ]-propionylbromid in 20 ml Äther und 10 ml 2N NaOH bei  $-3^\circ$  gegeben. Nach 30 min wird mit 6N HCl auf pH 3 angesäuert und der gebildete Kristallbrei abgenutscht und mit wenig eiskaltem Wasser gewaschen. Die Kristalle werden mit der 10-fachen Gewichtsmenge an 33-proz.  $\text{NH}_3$ , das auf  $-10^\circ$  abgekühlt worden ist, umgerührt und 3 Std. in einer Kältemischung stehengelassen. Anschliessend wird auf Raumtemperatur erwärmt und nach 4 Tagen eingedampft. Der Rückstand wird aus Wasser-Propanol umkristallisiert: 48%.

$\text{C}_{13}\text{H}_{17}\text{N}_3\text{O}_4$  (279,29) Ber. C 55,87 H 6,14% Gef. C 55,50 H 6,21%

*Gly-3-[ $^{14}\text{C}$ ]-phe-gly-gly-OH.* Zu einer Lösung von 1,16 g (4 mMol) des obigen Tripeptids in 10 ml 0,5N NaOH werden abwechselnd unter stetem Rühren 10 ml 0,5N NaOH und 0,63 g (4 mMol) Bromacetylchlorid gegeben; dabei ist darauf zu achten, dass die Temperatur nie über  $-1^\circ$  steigt! Nach 30 min wird mit 2N HCl auf pH 3 angesäuert, der Niederschlag abfiltriert und nach dem Waschen mit wenig eiskaltem Wasser im Exsikkator getrocknet. Mit der 10-fachen Gewichtsmenge an 33-proz.  $\text{NH}_3$  wird die Substanz 1 Std. im Wasserbad gekocht, nach dem Abkühlen im Vakuum eingengt und aus Wasser-Propanol umkristallisiert: 46%, Aktivität:  $3 \cdot 10^4$  dpm/mg.

$\text{C}_{15}\text{H}_{20}\text{N}_4\text{O}_5$  (336,34) Ber. C 53,56 H 5,99 N 17,28% Gef. C 52,98 H 5,97 N 16,84%

*Bestimmung der  $\alpha$ -Aminosäuren:* Wie in der 28. Mitteilung [1] beschrieben.

*Hydroxylierung.* Man löst 5 mg Peptid, die mit [ $^{14}\text{C}$ ]-Peptid versetzt sind, mit 1 mg  $(\text{NH}_4)_2\text{Fe}(\text{SO}_4)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$  und 1 mg Natriumpyrophosphat in 10 ml Phosphatpufferlösung, pH 6,9. Hierzu fügt man noch 5 mg Tetrahydropterinsulfat, dann nach 15 min 5 mg  $\text{NaBH}_4$ , nach weiteren 15 min wieder 3 mg Tetrahydropterinsulfat, dann wiederum 5 mg  $\text{NaBH}_4$ , nach weiteren 15 min wieder 3 mg Tetrahydropterin und nochmals 5 mg  $\text{NaBH}_4$ . Nach 2 stündigem Rühren an der Luft bei  $37^\circ$  engt man die Lösung ein, setzt 20 ml 6N HCl zu und kocht unter  $\text{N}_2$  3 Std. unter Rückfluss. Eine Blindprobe wird jeweils unter gleichen Bedingungen behandelt und aufgearbeitet. Nach dem Einengen der Lösung gibt man 10 ml Wasser zu und dampft wieder ein. Nach zweimaliger Wiederholung dieser Operation wird ein Teil der Probe auf dem Aminosäureanalysator untersucht; der Rest wird mit 2 ml Lösungsmittel A versetzt, auf Cellulosepulverplatten ( $20 \times 20$  cm) aufgetragen und mit folgenden Lösungsmittelgemischen chromatographiert (s. Trennschemata):

- A: *n*-Propanol/33-proz.  $\text{NH}_4\text{OH}$  (7:3)
- B: Collidin, mit Wasser gesättigt
- C: *n*-Butanol/Eisessig/Wasser (4:1:1)
- D: Phenol, mit Wasser gesättigt
- E: Aceton/Pyridin/Wasser/Eisessig (70:15:15:2)

*Ergebnisse der Ala-phe-OH-Hydroxylierung.* Eine erste Analyse mit dem Beckman-Analysator (Fig. 1 a und b) zeigt, dass *o*- und *p*-Tyrosin gebildet werden. Mittels Papierchromatographie (Lö-



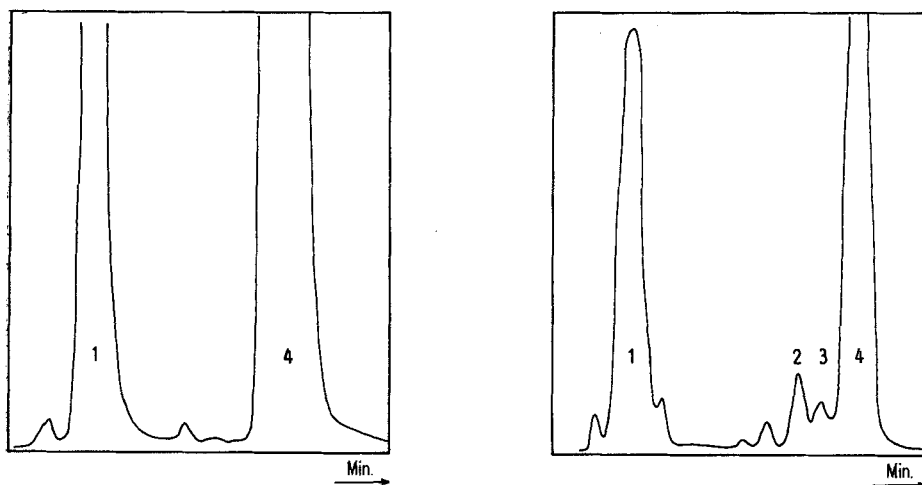


Fig. 1. Chromatographie mittels Aminosäureanalysator

- a) Ala-phe-OH nach Hydroxylierung und anschließender Hydrolyse, b) Blindprobe  
 1 = Alanin; 2 = *p*-Tyrosin; 3 = *o*-Tyrosin; 4 = Phenylalanin

*Ergebnisse der Phe-gly-OH-Hydroxylierung.* Die Analyse mit dem Beckman-Analysator (Fig. 2) zeigt, dass *o*- und *p*-Tyrosin gebildet werden. Die Papierchromatographie (Lösungsmittel B) lässt die Bildung von Spuren *m*-Tyrosin erkennen. Die präparative Trennung erfolgte nach Trennschema 2.

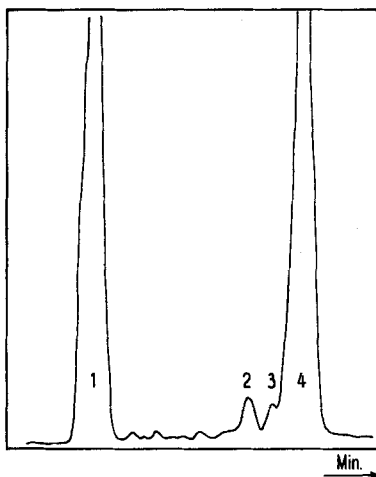
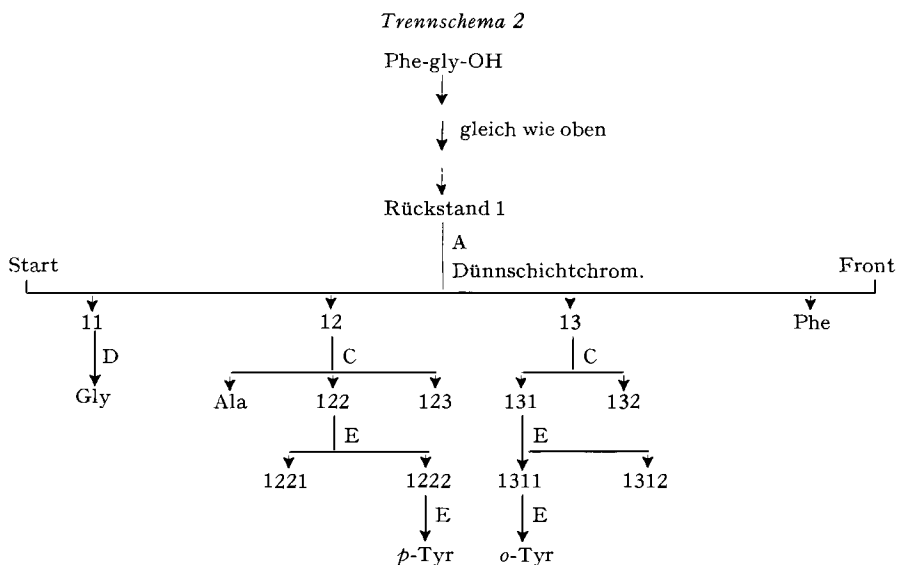


Fig. 2. Chromatographie mittels Aminosäureanalysator des Peptides Phe-gly-OH, nach Hydroxylierung und Hydrolyse

- 1 = Glycin; 2 = *p*-Tyrosin; 3 = *o*-Tyrosin; 4 = Phenylalanin



In diesem Schema stellen die Zonen 1221 Spuren von Alanin und 123, 132 sowie 1312 Spuren von Phenylalanin dar. Den Zonen 122 und 131 wird jeweils etwas inaktives Material als Träger zugegeben.

Die gefundenen Aktivitäten der isolierten Aminosäuren sind in Tab. 3 aufgeführt.

Tabelle 3. *Aktivitäten der Aminosäuren aus der Phe-gly-OH-Hydroxylierung*  
(Eingesetzte Aktivität  $1,1 \cdot 10^5$  dpm/5 mg Dipeptid)

	Phe	<i>o</i> -Tyr	<i>p</i> -Tyr
Einzelresultate	81 591	517	704
	95 204	424	720
	104 696	476	825
	113 008	680	930
	91 940	672	1002
	119 706	855	852
	77 941	624	1108
	119 318	516	629
	100 271		
Durchschnitt	110 271	593	844
%	93	0,75	1,1

*Ergebnisse der Tetrapeptid-Hydroxylierung.* Die Analyse mit dem Beckman-Analysator (Fig. 3a und b) zeigt, dass *o*- und *p*-Tyrosin gebildet werden. Mittels Papierchromatographie lässt sich kein *m*-Tyrosin nachweisen. Die präparative Trennung wird wie beim Phe-gly-OH ausgeführt. Die gefundenen Aktivitäten der isolierten Aminosäuren sind in Tabelle 4 zusammengefasst:

Tabelle 4. *Aktivitäten der Aminosäuren aus der Tetrapeptid-Hydroxylierung*  
(Eingesetzte Aktivität  $7 \cdot 10^8$  dpm/5 mg Tetrapeptid)

	Einzelresultate					Durchschnitt	%
<i>o</i> -Tyr	14,6	46	15	31	34	28	0,42
<i>p</i> -Tyr	83	68	87	84	77	80	1,15

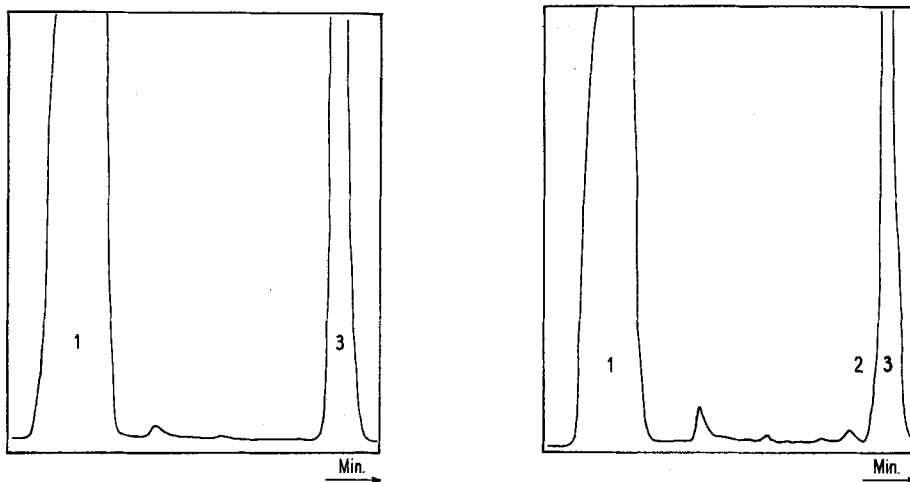


Fig. 3. Chromatographie mittels Aminosäureanalysator

- a) Gly-phe-gly-gly-OH nach Hydroxylierung und Hydrolyse, b) Blindprobe  
 1 = Glycin; 2 = *p*-Tyrosin; 3 = Phenylalanin

#### LITERATURVERZEICHNIS

- [1] 28. Mitteilung: *M. Viscontini & G. Mattern*, *Helv.* 53, 399 (1970).  
 [2] *M. Viscontini*, *Angew. Chem.* 80, 492 (1968); *ibid.* International Edition 7, 477 (1968); *Fortschr. chem. Forsch.* 9, 605 (1968).  
 [3] *E. Fischer*, *Ber. deutsch. Chem. Ges.* 37, 3062 (1904); *E. Fischer & W. Schoeller*, *Liebigs Ann. Chem.* 357, 1 (1908).

## 45. Die Wohl-Ziegler-Bromierung von Tiglin- und Angelika-säureestern<sup>1)</sup>

**A. Löffler<sup>2)</sup>, R. J. Pratt<sup>2)</sup>, H. P. Rüesch<sup>2)</sup> und André S. Dreiding**

Organisch-chemisches Institut der Universität Zürich;  
*Rollin H. Stevens* Memorial Laboratory of the Detroit Institute of Cancer Research,  
 Wayne State University, Detroit;  
 Department of Chemistry, Colorado School of Mines, Golden, Colorado

(7. I. 70)

*Summary.* The Wohl-Ziegler bromination (with N-bromo-succinimide = NBS) of methyl tiglate (**1b**) gave a 2:1 mixture of methyl  $\gamma$ -bromotiglate (**3b**) and methyl  $\beta'$ -bromotiglate (**5b**). This ratio of  $\gamma$ - to  $\beta'$ -bromination was unaffected by changes of solvent, catalyst or size of the ester alkoxy group. The same products were obtained from the NBS treatment of methyl angelate (**2b**). This NBS-bromination appears to be thermodynamically controlled, since both angelic and tiglic acid as well as their methyl esters were brought into equilibrium (**1**  $\rightleftharpoons$  **2** = >9:1) with catalytic amounts of NBS.

<sup>1)</sup> Zum Teil aus der Dissertation von *Richard J. Pratt* [1].

<sup>2)</sup> Gegenwärtige Adressen: *A. Löffler*, Weizmann Institute of Science, Rehovot; *H. P. Rüesch*, *Knoll & Cie AG*, Liestal; *R. J. Pratt*, *Charles Bruning Co.*, Mount Prospect, Illinois.