

## 110. Das Diazo-chinon von PQQ als mögliches Reagenz für die Kartierung von Chinoproteinen mittels Photoaffinitätsmarkierung<sup>1)</sup>

von Pierre Martin\* und Tammo Winkler

Zentrale Forschungslaboratorien, Ciba-Geigy AG, CH-4002 Basel

(12.III.93)

---

### The Diazo-quinone of PQQ as a Possible Reagent for Mapping Quinoproteins by Photo-affinity Labeling

PQQ is an organic redox cofactor found in a class of enzymes called quinoproteins. The synthesis and the photochemistry of the diazo-quinones of PQQ and PQQ-triester are described. The photogenerated *Wolff*-rearrangement products have been caught with water and methanol as model nucleophiles. The products show a strong fluorescence. The diazoquinone of PQQ may be considered as a possible reagent for mapping quinoproteins by photo-affinity labeling.

---

**1. Einleitung.** – PQQ (Pyrrolo Quinoline Quinone; **1**) ist das Coenzym von verschiedenen bakteriellen Dehydrogenasen [1]. Im weiteren wurde die Bedeutung von PQQ als Wachstumsfaktor für Bakterien [2] und Säuger [3] erkannt. PQQ scheint eine fundamentale Rolle im 'cross-linking' von Elastin und Collagen sowie in der Regulation des intrazellulären Spiegels von Spermin und Spermidin zu spielen [3].

In Chinoproteinen (PQQ-haltigen Enzymen) liegt PQQ in nicht kovalent gebundener Form vor. Es kann (z. B. durch Dialyse) entfernt werden; bei erneuter Zugabe von PQQ wird das Enzym wieder aktiv. Das Aktivitätszentrum ist unbekannt.

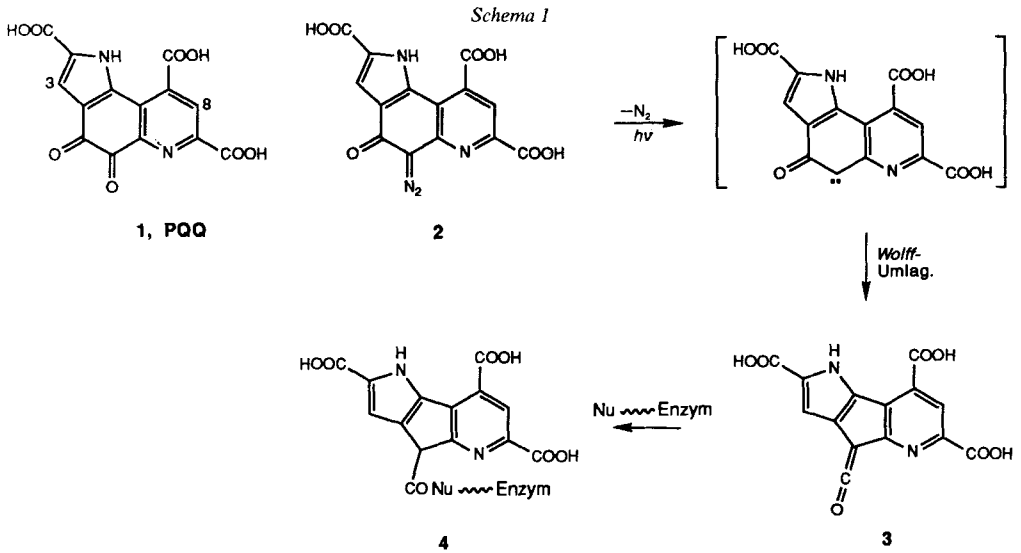
Eine Möglichkeit, das Aktivitätszentrum in Enzymen zu lokalisieren, besteht darin, eine photoreaktive Gruppe (z. B. ein N<sub>3</sub>- oder eine N<sub>2</sub>-Gruppe) an einer Verbindung, welche sich selektiv an der spezifischen Seite des Proteins 'anlagert', einzuführen. Die anschliessende Photolyse generiert eine reaktive Spezies (z. B. ein Nitren oder Carben), welche eine kovalente Bindung mit dem Biopolymer in der Nähe des Aktivitätszentrums eingeht ('Photoaffinitäts-Markierung' [4]).

Im Falle von PQQ ist es naheliegend, die photoreaktive Gruppe nicht *via* Spacer an das Coenzym anzuhängen, sondern PQQ direkt in sein eigenes Diazid der Formel **2** zu überführen. Bei der Belichtung sollte über die *Wolff*-Umlagerung das ringverengte Keten **3** entstehen, welches durch eine nucleophile Gruppe (proteingebundenes OH, NH, SH) in der Nähe des Aktivitätszentrums zu **4** abgefangen wird (vgl. *Schema 1*).

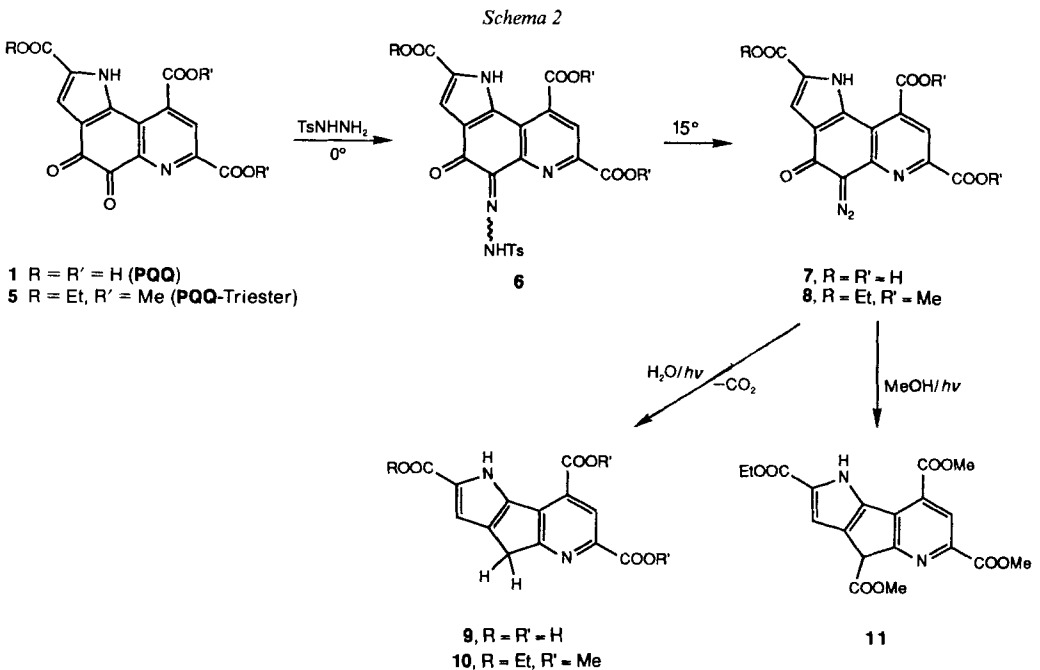
In der vorliegenden Publikation werden die Synthese der Diazo-Derivate von PQQ und PQQ-Triester sowie als Modell-Versuche deren Ringverengung durch Belichtung in H<sub>2</sub>O und MeOH beschrieben. Die entsprechenden Photolysen in Gegenwart von Chinoproteinen sind z. Zt. im Gang.

---

<sup>1)</sup> Der Inhalt der vorliegenden Publikation war Teil einer Präsentation am '2nd International Symposium on PQQ and Quinoproteins', Nov. 19–22, 1991, Yamaguchi, Japan.



**2. Synthese und Reaktivität der Diazo-chinone von PQQ und PQQ-Triester.** – Die primär gebildeten (*E/Z*)-Hydrazone **6** von PQQ bzw. PQQ-Triester mit TsNHNH<sub>2</sub> sind nur in der Kälte stabil. Sowohl kristallines **6** als auch Lösungen von **6** reagieren oberhalb 15° zu den Diazo-ketonen **7** bzw. **8** (Schema 2). Im UV von **8** wird eine bathochrome



Verschiebung um 31 nm nach 400 nm (gegenüber dem PQQ-Triester **5**) des einen ( $n \rightarrow \pi^*$ )-Übergangs beobachtet. Die 5-Position für die eingetretene  $N_2$ -Gruppe konnte einerseits aus der bekannten Reaktivität von PQQ (die 5-Oxo-Gruppe ist die reaktivere [5]) erwartet, andererseits durch das  $^{13}C$ -NMR-Spektrum von **8** nachgewiesen werden (vgl. *Exper. Teil*), da die ( $C=N_2$ )-Gruppe eine Hochfeldverschiebung [6] der Pyridin-C-Atome in **8** verglichen mit denjenigen in **1** [7] verursacht.

Die Wolff-Umlagerung von **7** bzw. **8** erfolgt bereits mit direktem Sonnenlicht in der offenen Petri-Schale (entsprechend rascher mit einer 300-W-Lampe). Bei der Photolyse in  $H_2O$  wird die entstehende Carboxylatgruppe an C(4) des Fluoren-Systems decarboxyliert, was spontan zu **9** bzw. **10** führt. In MeOH wird beim Belichten von **8** der Ester **11** in guter Ausbeute gebildet. Die ringverengten Produkte fluoreszieren stark, was auf ihre (Hetero-)Fluoren-Struktur zurückzuführen ist (z. B.: **9**,  $Ex_{max.} = 356$ ,  $Em_{max.} = 503$ ,  $\phi = 0,35$ ).

**3. Ausblick.** – Wie wir zeigen konnten, ist das Diazo-Derivat des PQQ's möglicherweise ein interessantes Reagenz für die Kartierung von Chinoproteinen. Neben den photochemischen Eigenschaften von **7** und der starken Fluoreszenz der gebildeten Produkte sind jedoch zwei weitere Voraussetzungen für eine Anwendung nötig. 1) Das Diazo-chinon **7** muss vom Apoenzym als PQQ-Ersatz akzeptiert werden, d. h. es muss am Aktivitätszentrum andocken. 2) Am oder nahe dem Aktivitätszentrum des Proteins muss eine nucleophile Stelle vorhanden sein, welche mit dem photoinduzierten, ringverengten Ketten eine Reaktion eingeht. Das allenfalls gebildete  $H_2O$ -Addukt **9** kann, da nicht am Biopolymer gebunden, ausgewaschen werden.

### Experimenteller Teil

Allgemeines. S. [8].

*5-Diazo-4,5-dihydro-4-oxo-1H-pyrrolo[2,3-f]chinolin-2,7,9-tricarbonsäure (7)*. In einer Suspension von 1,0 g (3 mmol) PQQ (**1**) [9] in 100 ml Phosphat-Puffer (pH 8) werden bei 8° 0,62 g (3,3 mmol)  $TsNHNH_2$  in 10 ml THF getropft. Die Suspension wird 2 h bei 10° und 3 h bei RT. weitergerührt und dann abgenutscht. Der gelbe Rückstand wird mit  $H_2O$  und MeCN gewaschen und i. V. getrocknet: 0,92 g (88%) **7** als gelb-braunes Pulver. Schmp. > 260°. UV (DMSO): 369 (14920) und 382 (15120). IR (KBr): 2140 ( $N_2$ ); 1710, 1615 (CO).  $^1H$ -NMR (300 MHz), ( $D_6$ )DMSO): 7,26 (*d*,  $J = 2$ , H-C(3)); 8,46 (*s*, H-C(8)). FD-MS: 342 ( $M^+$ ).

*5-Diazo-4,5-dihydro-4-oxo-1H-pyrrolo[2,3-f]chinolin-2,7,9-tricarbonsäure-(2-ethyl)(7,9-dimethyl)ester (8)*. Zu einer Lsg. von 10,0 g (26 mmol) PQQ-Triester (**5**) [9] in 220 ml  $CH_2Cl_2$  werden bei -20° 5,33 g (28,6 mmol)  $TsNHNH_2$  in 130 ml  $CH_2Cl_2$  getropft. Die Suspension wird noch 2 h gerührt und dann abgenutscht. Der gelbe Rückstand wird mit  $CH_2Cl_2$  gewaschen und übers Wochenende in einer braunen Flasche stehengelassen. Die jetzt braune Substanz wird mit  $Et_2O$  digeriert: 8,59 g (87%) **8** als gelbes Pulver. Schmp. 198/199°. UV ( $CHCl_3$ ): 267 (36240), 359 (9920), 400 (14440). IR ( $CHCl_3$ ): 2140 ( $N_2$ ); 1720, 1630 (CO).  $^1H$ -NMR (250 MHz,  $CDCl_3$ ): 1,45 (*t*,  $J = 8$ ,  $CH_3$ ); 4,05, 4,16 (2*s*, je  $CH_3$ ); 4,43 (*q*,  $J = 8$ ,  $CH_2$ ); 7,52 (*d*,  $J = 2,5$ , H-C(3)); 8,56 (*s*, H-C(8)); 12,75 (br. *s*, NH).  $^{13}C$ -NMR ( $CDCl_3$ ): 173,0 (*t*, C(4)); 167,6 (C(9')); 164,3 (C(7)); 160,2 (C(2)); 148,8 (*s*, C(5a)); 145,0 (*s*, C(7)); 131,8 (*s*, C(9)); 131,0 (*dd*,  $J = 7,5$ , 2, C(1a)); 127,4 (*dd*,  $J = 6$ , 3, C(2)); 124,7 (*dd*,  $J = 6$ , 3, C(3a)); 122,1 (*d*, C(8)); 115,6 (*d*,  $J = 6$ , C(9a)); 110,6 (*dd*, C(3)); 81,2 (*s*, C(5)); 61,5 ( $CH_2O$ ); 54,3, 53,1 (je  $CH_3O$ ); 14,3 ( $CH_3$ ). MS: 398 ( $M^+$ ), 370 ( $[M - N_2]^+$ ).

*1,4-Dihydropyrrolo[2',3':3,4]cyclopenta[1,2-b]pyridin-2,6,8-tricarbonsäure (9)*. Eine Suspension von 0,68 g (2 mmol) **7** in 700 ml Dioxan, 350 ml  $H_2O$  und 18 ml Phosphat-Puffer (pH 8) wird bei RT. während drei sonnigen Tagen am Fenster gerührt. Das Gemisch wird filtriert und das Filtrat mit konz. HCl auf pH 2 gestellt und eingeeignet. Gegen Ende des Einengens fallen 0,36 g (63%) **9** als braun-gelbe Kristalle aus. Schmp. > 260°. UV ( $0,5 \cdot 10^{-4}$ , DMF);  $\lambda_{max.}$ : 362 (26800), 604 (400), 660 (360), 690 (200). Fluoreszenz (DMF):  $Ex_{max.} = 356$ ,  $Em_{max.} = 503$ ,  $\phi = 0,35$ .  $^1H$ -NMR (300 MHz, ( $D_7$ )DMF): 3,78 (*s*, 2 H-C(4)); 7,07 (*d*,  $J = 2$ , H-C(3)); 8,60 (*s*, H-C(7)); 11,0 (br. *s*, NH). FD-MS: 288 ( $M^+$ ).

*1,4-Dihydropyrrolo[2',3':3,4]cyclopenta[1,2-b]pyridin-2,6,8-tricarbonsäure-(2-ethyl)(6,8-dimethyl)ester (10).*

Die Lsg. aus 0,5 g (1,25 mmol) **8**, 600 ml Dioxan, 300 ml H<sub>2</sub>O und 15 ml Eisessig wird bei 10° 28 h mit einer 300-W-Glühhbirne bestrahlt. Die gelbe Lsg. wird mit AcOEt extrahiert und der Extrakt mit H<sub>2</sub>O gewaschen, getrocknet (MgSO<sub>4</sub>) und eingedampft. Der Rückstand wird mit Et<sub>2</sub>O digeriert: 0,37 g (80%) **10**. Schmp. 210°. IR (CHCl<sub>3</sub>): 3440 (N<sub>2</sub>H); 1715 (CO). <sup>1</sup>H-NMR (250 MHz, CDCl<sub>3</sub>): 1,43 (*t*, *J* = 7, CH<sub>3</sub>); 4,05, 4,10 (2*s*, je CH<sub>3</sub>); 4,42 (*q*, *J* = 7, CH<sub>2</sub>); 3,84 (*s*, 2 H–C(4)); 7,06 (*d*, *J* = 2, HC(3)); 8,60 (*s*, H–C(7)); 10,55 (*br. s*, NH). <sup>13</sup>C-NMR (CDCl<sub>3</sub>): 170,5 (C(4a)); 166,2 (C(8')); 165,5 (C(6')); 160,8 (C(2')); 142,5 (C(6)); 137,3 (C(1a)); 133,7 (C(3a)); 131,7 (C(8a)); 128,7 (C(2)); 125,2 (C(8)); 123,3 (C(7)); 110,6 (C(3)); 60,9 (OCH<sub>2</sub>); 53,0 (OCH<sub>3</sub>); 33,5 (C(4)); 14,5 (CH<sub>3</sub>). MS: 344 (*M*<sup>+</sup>).

*1,4-Dihydropyrrolo[2',3':3,4]cyclopenta[1,2-b]pyridin-2,4,6,8-tricarbonsäure-(2-ethyl)(4,6,8-trimethyl)ester (11).*

Die Lsg. aus 0,5 g (1,25 mmol) **8**, 600 ml Dioxan, 300 ml MeOH und 15 ml Eisessig wird wie im vorangehenden Versuch bestrahlt und analog aufgearbeitet: 0,39 g (76%) **11**. Schmp. 221°. <sup>1</sup>H-NMR (250 MHz, CDCl<sub>3</sub>): 1,43 (*t*, *J* = 7, CH<sub>3</sub>); 3,77, 4,04, 4,08 (3*s*, je CH<sub>3</sub>); 4,42 (*q*, *J* = 7, CH<sub>2</sub>); 4,84 (*s*, H–C(4)); 7,08 (*d*, *J* = 2, H–C(3)); 8,61 (*s*, H–C(7)); 10,55 (*br. s*, NH). FD-MS: 402 (*M*<sup>+</sup>).

## LITERATURVERZEICHNIS

- [1] J. A. Duine, J. A. Jongejan, *Vitam. Horm.* **1989**, *45*, 223.
- [2] M. Ameyama, E. Shinagawa, K. Matsushita, O. Adachi, *Agric. Biol. Chem.* **1985**, *49*, 699.
- [3] a) J. Killgore, C. Schmidt, L. Duick, N. R. Chapman, D. Trinker, K. Reiser, M. Melko, D. Hyde, R. B. Rucker, *Science* **1989**, *245*, 850; b) C. Schmidt, F. Steinberg, R. B. Rucker, *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* **1991**, *197*, 19.
- [4] G. Jori, J. D. Spikes, *Photochem. Photobiol. Rev.* **1978**, *3*, 193.
- [5] a) S. A. Salisbury, H. S. Forrest, W. B. T. Cruse, O. Kennard, *Nature (London)* **1979**, *289*, 844; b) M. Mure, S. Itho, Y. Ohshiro, *Tetrahedron Lett.* **1989**, *30*, 6875.
- [6] T. A. Albright, W. J. Freeman, *Org. Magn. Reson.* **1977**, *9*, 75.
- [7] D. R. Houck, C. J. Unkefer, 'Proceedings of the First International Symposium on PQQ and Quinoproteins', Delft, 1988, Ed. J. A. Jongejan, J. A. Duine, Kluwer Academic Publ. Dordrecht, The Netherlands, 1989, S. 256.
- [8] P. Martin, *Helv. Chim. Acta* **1989**, *72*, 1554.
- [9] P. Martin, E. Steiner, K. Auer, T. Winkler, *Helv. Chim. Acta* **1993**, *76*, 1667.