

Synthesen in der Aderminreihe, 4. Mitt.**:

Versuche zum Mechanismus der Cystein- und Tryptophan-Biosynthese

Von

Klaus Körte und Ulrich Schmidt*

Aus dem Organisch-Chemischen Institut der Universität Wien

(Eingegangen am 24. September 1970)

Die nichtenzymatische Reaktion von Schwefelwasserstoff (Indol), L-Serin und Pyridoxal führt zu DL-Cystin (DL-Tryptophan). Dieser sterische Ablauf ist am einfachsten mit einem Reaktionsweg über Pyridoxyliden-aminoacrylsäure zu deuten. β -Eliminierungen an Schiff'schen Basen von β -Hydroxy-, β -Dialkylamino- und β -Äthylthio-alaninestern werden untersucht. In Gegenwart stark basischer Ionenaustauscher wird aus Salicyliden-S-äthylcystein-äthylester (**3**) Äthylmercaptan eliminiert. An die gebildete Acrylsäure addiert sich ein weiteres Mol **3** zu **4**.

Syntheses in the Adermine Series, IV: Experiments Concerning the Mechanism of the Cysteine and Tryptophan Biosynthesis

The steric course of the non-enzymatic reaction of hydrogen sulfide (indole), L-serine and pyridoxal to DL-cystine (DL-tryptophan) has been studied. The results point to pyridoxylidene aminoacrylic acid as an intermediate. β -Eliminations with Schiff bases of β -hydroxy-, β -dialkylamino-, and β -ethylthio-alanine esters have been investigated. In the presence of strongly basic ion exchangers ethyl mercaptan is eliminated from ethyl-N-salicylidene-S-ethyl cysteinyl ester (**3**). A second mole of **3** adds to the acrylic acid thus formed to yield **4**.

Pyridoxalphosphat enthaltende Enzyme nehmen eine Schlüsselstellung im Stoffwechsel der Aminosäuren ein. Transaminierung¹, Racemisierung², Decarboxylierung³, α,β -Eliminierung⁴, α,γ -Eliminie-

* Herrn Prof. Dr. E. Broda zum 60. Geburtstag freundschaftlich gewidmet.

** 3. Mitt.: U. Schmidt und G. Giesselmann, Ann. Chem. **657**, 162 (1962).

¹ P. P. Cohen, in: J. B. Sumner, K. Myrback, „The Enzymes“, Vol. 1, Part 2, Academic Press, New York (N. Y.) 1951, p. 1040.

² W. A. Wood und J. C. Gunsalus, J. Biol. Chem. **190**, 403 (1951).

³ E. F. Gale, Adv. in Enzymol. **6**, 1 (1946).

⁴ C. Yanovsky und J. L. Riessig, J. Biol. Chem. **202**, 567 (1953).

rung⁵ und die reversible Spaltung von β -Hydroxyaminosäuren⁶ laufen über die Zwischenstufe von N-Pyridoxyliden-aminosäuren ab. Einige dieser Reaktionen lassen sich auch nichtenzymatisch — jedoch in Gegenwart von Pyridoxal- und Schwermetallionen — verwirklichen⁷.

Wie wir fanden, läßt sich auch die Bildung von Cystein aus Serin und Schwefelwasserstoff an der Serinsulphydrase oder Cysteinsynthetase, die von *Lynen* und *Schlossmann*⁸ nachgewiesen wurde, ohne Enzym, jedoch mit Pyridoxal, nachahmen. Leitet man in eine verdünnte Lösung von Pyridoxal und Serin in Wasser bei pH 6,2 Schwefelwasserstoff ein, so läßt sich nach einiger Zeit Cystin nachweisen. Der Umsatz ist jedoch gering, da das Pyridoxal und Cystein schnell zu Dipyridoxyldisulfid⁹ weiterreagieren¹⁰. Versuche mit Zusatz von Schwermetallionen verliefen ergebnislos, da, wie schon bekannt⁷, Cystein sich in Wasser in Gegenwart von Schwermetallionen und Pyridoxal schnell zersetzt. Für diese und andere Umwandlungen des Serins in substituierte Alanine (z. B. Cystathionin und Tryptophan) nimmt man primäre β -Eliminierung von Wasser aus dem Pyridoxylidenserin (1) zur Pyridoxylidenaminoacrylsäure (2) und folgende Addition von Schwefelwasserstoff (Homocystein bzw. Indol) zum Cystein (Cystathionin bzw. Tryptophan^{7, 11}) an. Der Nachweis von Pyridoxylidenaminoacrylsäure (2) ist jedoch bisher nicht erbracht. Daneben ist ein nucleophiler Austausch der OH-Gruppe denkbar. Diese könnte vielleicht über Schwefelwasserstoffaddition an die C=N-Doppelbindung der *Schiffschen* Base und nachträgliche Thiazolidinbildung erfolgen.

Beim Ablauf der nichtenzymatischen Reaktion über Pyridoxylidenaminoacrylsäure muß im Unterschied zu den anderen denkbaren Mechanismen Racemisierung eintreten, d. h. aus aktivem Serin muß racemisches Cystein entstehen. Wir prüften die Stereochemie dieser Reaktion durch einen enzymatischen Konfigurationstest¹² des gebildeten Cystins

⁵ R. E. Kallio, J. Biol. Chem. **192**, 371 (1951).

⁶ D. E. Metzler, J. B. Longenecker und E. E. Snell, J. Amer. Chem. Soc. **75**, 2786 (1953); **76**, 639 (1954).

⁷ D. E. Metzler, M. Ikawa und E. E. Snell, J. Amer. Chem. Soc. **76**, 648 (1954).

⁸ F. Lynen und K. Schlossmann, Angew. Chem. **69**, 179 (1957); Biochem. Z. **328**, 591 (1957).

⁹ U. Schmidt und G. Giesselmann, Ann. Chem. **657**, 162 (1962).

¹⁰ F. W. Bernhardt, E. D'Amato und R. M. Romarelli, Arch. Biochem. Biophys. **88**, 267 (1960); G. Wendt und F. W. Bernhardt, l. c. **88**, 270 (1960).

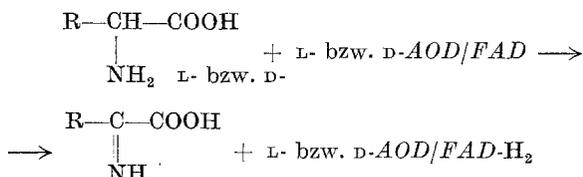
¹¹ W. A. Wood, J. C. Gunsalus und W. W. Umbreit, J. Biol. Chem. **170**, 313 (1947).

¹² J. P. Greenstein und M. Winitz, „Chemistry of the Amino Acids“, p. 1433 und 1782, New York (1961); J. P. Greenstein, S. P. Birnbaum und N. C. Othey, J. Biol. Chem. **204**, 307 (1953); H. U. Bergmeyer, „Methoden der

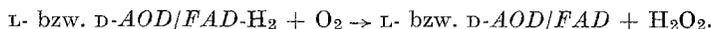
*Mikromethode der enzymatischen Konfigurationsbestimmung*¹²

Die Methode beruht auf einer Koppelung der Aminosäureoxydase- mit der Peroxidase-Reaktion.

Aminosäureoxydase-Reaktion: Eine L- bzw. D-Aminosäure wird spezifisch durch L- bzw. D-Aminosäureoxydase (L- bzw. D-AOD), deren Coenzym Flavinadeninucleotid (*FAD*) ist, zur Iminosäure oxydiert, wobei *FAD* zu *FAD*-H₂ reduziert wird.

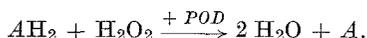


Die entstehende Iminosäure zerfällt in Gegenwart von Wasser in die Ketosäure und NH₃. Das gleichzeitig entstehende *FAD*-H₂ wird durch Sauerstoff zu *FAD* unter Bildung von Wasserstoffperoxid oxydiert.



Das gebildete Wasserstoffperoxid geht in die Peroxidase-Reaktion ein.

Peroxidase-Reaktion: Ein Wasserstoffdonator AH₂ (z. B. o-Dianisidin) wird durch Wasserstoffperoxid in Gegenwart der Peroxidase (*POD*) in seine oxydierte Form *A* (hier ein roter Farbstoff) übergeführt:



Eine Rotfärbung zeigt also an, daß eine L- bzw. D-Aminosäure durch L- bzw. D-Aminosäureoxydase umgesetzt worden ist.

Für unsere Konfigurationsbestimmung zogen wir die L-Aminosäureoxydase der D-Aminosäureoxydase vor, da so, wie Tab. 1 zeigt, günstigere Reaktionsgeschwindigkeiten erreicht werden.

Tabelle 1

Aminosäure	Oxidation* der L-Isomeren mit L-AOD	Oxidation* der D-Isomeren mit D-AOD
Serin	0,0	2,8
Cystin	63,0	1,4
Tryptophan	199,0	3,0

* Gemessen in Mikromol verbrauchten Sauerstoffs pro Stunde und mg Stickstoff.

Auch wird L-Serin durch L-AOD nicht oxydiert, so daß eine Störung durch Serin nicht gegeben ist.

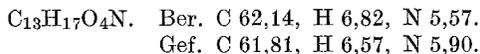
Setzten wir D- und L-Serin jeweils in Gegenwart von Pyridoxal mit Schwefelwasserstoff bzw. Indol um, trennten die Reaktionsgemische durch präparative Schichtchromatographie auf und besprühten das abgetrennte und auf ein Chromatographiepapier (Whatman Nr. 1) aufgebrachte Cystin bzw. Tryptophan mit einem Gemisch aus L-AOD-Lösung, *POD*-Lösung und

o-Dianisidin, so stellten wir in allen vier Fällen eine Rotfärbung fest. Es hatten sich also die Racemate gebildet.

Benötigte Lösung: 1 mg o-Dianisidinhydrochlorid wird in 0,2 ml destill. Wasser gelöst und 2,5 ml Triäthanolamin-Puffer, pH = 7,6, zugegeben. Hierzu fügt man 5 mg (0,5 ml) Peroxydase I (Kristallsuspension in 2,8m-Ammoniumsulfatlösung, pH = 6,8), 0,5 ml L-Aminosäureoxydase (1 mg/ml, Kristallsuspension in 3,2m-Ammoniumsulfatlösung, pH = 6) und etwa 1 mg Flavinadenindinukleotid-Natriumsalz.

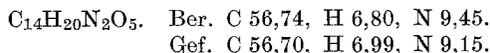
α-Salicyliden-serinisopropylester

2,94 g (0,02 Mol) Serinisopropylester werden mit 2,44 g (0,02 Mol) Salicylaldehyd in 100 ml absol. Benzol am Wasserabscheider gekocht, wobei sich die Lösung gelb färbt. Nach dem Abziehen des Benzols wird der Rückstand rektifiziert. Sdp._{0,005} 134°, Ausb. 5,0 g (83% d. Th.).



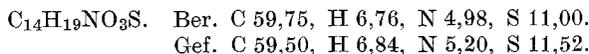
α-Pyridoxyliden-serinisopropylester

2,94 g (0,02 Mol) Serinisopropylester werden in 100 ml CHCl₃ mit 3,34 g (0,02 Mol) Pyridoxal 12 Stdn. gerührt. Nach dem Abziehen des Chloroforms wird der getrocknete Rückstand aus Benzol umkristallisiert, wobei man gelbe Nadeln, Schmp. 115° (u. Zers.), erhält; Ausb. 4,5 g (76% d. Th.).



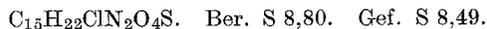
α-Salicyliden-S-äthylcysteinäthylester

3,54 g (0,02 Mol) S-Äthylcysteinäthylester werden mit 2,44 g (0,02 Mol) Salicylaldehyd in Benzol am Wasserabscheider gekocht. Nach Beendigung der Reaktion wird das Benzol abgezogen und der Rückstand rektifiziert. Sdp._{0,05} 143°, Ausb. 3,65 g (65% d. Th.).



α-Pyridoxyliden-S-äthylcysteinäthylester-hydrochlorid

1,0 g (0,005 Mol) Pyridoxalhydrochlorid wird in Methanol mit 0,85 g (0,005 Mol) S-Äthylcysteinäthylester gerührt. Nach 3 Stdn. wird das Lösungsmittel abgezogen, der Rückstand mit CHCl₃ digeriert, vom Unlöslichen (Pyridoxalhydrochlorid) abfiltriert und vom Chloroform befreit. Zurück bleibt ein gelbrotes, einheitliches, kristallines Produkt, Ausb. 1,1 g (62% d. Th.).



Reaktion des α-Salicyliden-S-äthylcysteinäthylesters an einem basischen Ionenaustauscher

2,81 g (0,01 Mol) α-Salicyliden-S-äthylcysteinäthylester werden in 100 ml absol. Tetrahydrofuran gelöst und mit einer äquimolaren Menge des stark basischen Ionenaustauschers Amberlite IRA-400 12 Stdn. gerührt. Nach dem Abfiltrieren des Ionenaustauschers wird das Lösungsmittel abgezogen und

der gelbe, ölige Rückstand mit eisgekühltem, absol. Äther versetzt, wobei ein gelbes Pulver ausfällt, das beim Umkristallisieren aus CCl_4 schöne, gelbe Kristalle, Schmp. 129° , ergibt, Ausb. 2,0 g (40% d. Th.).

$\text{C}_{26}\text{H}_{32}\text{N}_2\text{O}_6\text{S}$. (500,62) Ber. C 62,38, H 6,44, N 5,59, S 6,40.

Gef. C 62,45, H 6,53, N 5,57, S 6,59.

MG (massenspektroskopisch): 500.