

vom Schmp. 277—278° erhalten, der nach vorsichtiger Sublimation des Krystallisats im Hochvakuum auf 279° anstieg. Der Mischschmelzpunkt mit natürlichem Oestriol (Schmp. 280°) ergab keine Depression. Die optischen Drehungen betrugen für das synthetische Produkt:

$[\alpha]_D$  in Alkohol: + 66,7° (7,8 mg,  $\alpha = 0,26^\circ$ ).  
 $[\alpha]_D$  in Pyridin: + 34,6° (8,4 mg,  $\alpha = 0,364^\circ$ ).

*Darstellung von natürlichem Oestriolmethyläther*<sup>19</sup>. 100 mg aus Schwangerenharn gewonnenes Oestriol wurden in der beim Oestronmethyläther angegebenen Weise mit Dimethylsulfat umgesetzt. Es wurden 56 mg Oestriolmethyläther isoliert, die nach Umkry-

<sup>19</sup> Vergl. A. Butenandt u. F. Hildebrandt, Hoppe-Seylers Z. physiol. Chem. **199**, 263 [1931].

stallisieren aus wässrigem Pyridin einen Schmp. von 168° zeigten. Mischschmelzpunkt mit synthet. Oestriolmethyläther ergab keine Depression.

$[\alpha]_D$  in Pyridin: 32,6° (8 mg,  $\alpha = 0,32^\circ$ ).  
 $[\alpha]_D$  in Eisessig: 65° (8 mg,  $\alpha = 0,65^\circ$ ).

*Diacetat*: 50 mg natürlicher Oestriolmethyläther wurden zu 53,9 mg Diacetat umgesetzt. Schmp. 141,5°. Mischschmelzpunkt des natürlichen mit dem synthet. Präparat zeigte keine Depression.

$[\alpha]_D$  in Alkohol: + 13,5° (5,9 mg,  $\alpha = 0,398^\circ$ ).  
 $[\alpha]_D$  in Pyridin: — 1,5° (8,2 mg,  $\alpha = -0,015^\circ$ ).

Der Schering-A.G., Berlin, danken wir für die Unterstützung der Untersuchung und die Bereitstellung von krystallisiertem Oestron.

## Tyraminderivate als Pigmentvorstufen Ein Beitrag zur biologischen Adrenalinsynthese

Von ROLF DANNEEL

Aus dem Kaiser-Wilhelm-Institut für Biologie, Gastaabteilung Göttingen

(Z. Naturforschg. **1**, 87—92 [1946]; eingegangen am 27. September 1945)

### I. Fragestellung

Die zuerst von Th. Addison im Jahre 1855 beschriebene und nach ihm benannte Nebennierenkrankung äußert sich u. a. in einer braunen Verfärbung der Haut, die auf einer Störung der biologischen Adrenalinsynthese beruht. Offenbar entsteht bei Addison-Kranken an Stelle des Adrenalins ein Chromogen, das in der Haut abgelagert und dort in Pigment umgewandelt wird.

Da es bisher noch nie gelungen ist, ein Aufbauprodukt des Adrenalins aus der Nebenniere zu isolieren, können wir auch über die Vorstufe des Addison-Pigmentes nur Vermutungen hegen. Gewöhnlich wird in diesem Zusammenhange das Dioxyphenylalanin („Dopa“) genannt, eine Verbindung, die in der Natur vorkommt und im Experiment durch Hautfermente in Melanin verwandelt wird<sup>1</sup>. Auch aus Insektenlymphe und aus pflanzlichem Material gewonnene Oxydasen führen Dopa in Pigment über. Dabei treten verschiedene Zwi-

schenprodukte auf, von denen H. St. Raper<sup>2</sup> mehrere abfangen und identifizieren konnte<sup>3</sup>.

Unterbricht man die Oxydation beim Erscheinen des roten Chinons, so lassen sich in der Lösung Spuren einer blutdruckerhöhenden Substanz nachweisen, deren Wirkung durch katalytische Reduktion noch gesteigert werden kann<sup>4</sup>. Etwas besser wird die Ausbeute an vasopressorischen Stoffen, wenn man nicht vom Dopa, sondern vom N-Methyldopa ausgeht. Zur Deutung dieses Befundes entwickelten R. D. H. Heard und H. St. Raper<sup>4</sup> das umseitige<sup>\*\*</sup> Reaktionsschema, wonach u. U. bei der Tyrosinase-Tyrosin-Reaktion Adrenalin und Adrenalon entstehen könnten.

Die Anwendung dieser Überlegung auf die normale und pathologische Adrenalinbildung im Organismus stößt jedoch insofern auf Schwierigkeiten, als weder Dopa noch Methyldopa bei der Behandlung mit Nebennierenextrakten in vitro blutdrucksteigernde Stoffe liefern. Wohl aber entstehen solche „adrenalinähnlichen“ Substanzen, wie W. Schuler und A. Wie-

<sup>1</sup> G. Bloch, Hoppe-Seylers Z. physiol. Chem. **98**, 226, [1917].

<sup>3</sup> W. L. Duliére u. H. St. Raper, Biochemical J. **24**, 239 [1930].

<sup>2</sup> Biochemical J. **21**, 89 [1927].

\* Siehe hierzu den oberen Teil der umseitigen Formelbilder.

<sup>4</sup> Biochemical J. **27**, 36 [1933].

\*\* Unterer Teil der Formeln.

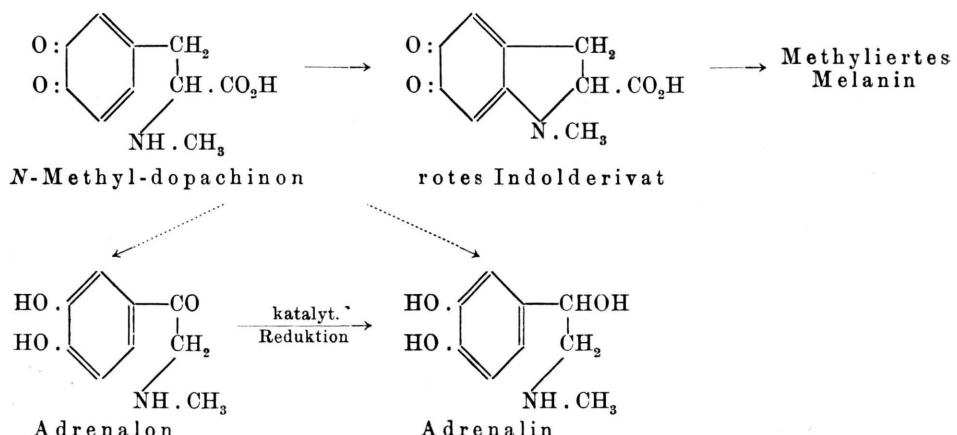
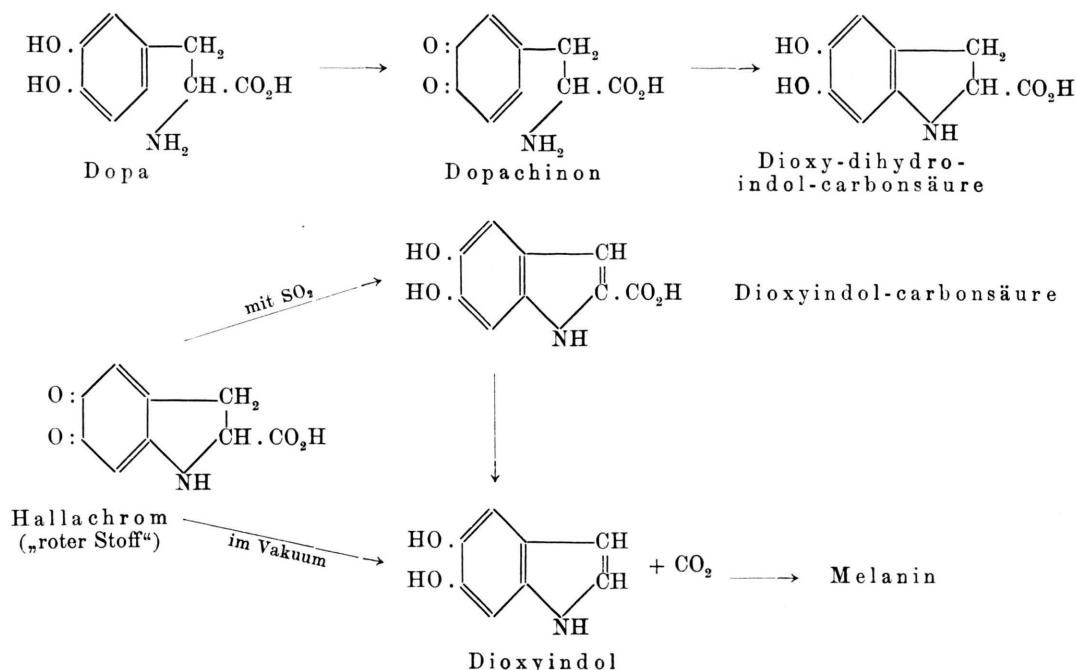


Dieses Werk wurde im Jahr 2013 vom Verlag Zeitschrift für Naturforschung in Zusammenarbeit mit der Max-Planck-Gesellschaft zur Förderung der Wissenschaften e.V. digitalisiert und unter folgender Lizenz veröffentlicht: Creative Commons Namensnennung-Keine Bearbeitung 3.0 Deutschland Lizenz.

Zum 01.01.2015 ist eine Anpassung der Lizenzbedingungen (Entfall der Creative Commons Lizenzbedingung „Keine Bearbeitung“) beabsichtigt, um eine Nachnutzung auch im Rahmen zukünftiger wissenschaftlicher Nutzungsformen zu ermöglichen.

This work has been digitalized and published in 2013 by Verlag Zeitschrift für Naturforschung in cooperation with the Max Planck Society for the Advancement of Science under a Creative Commons Attribution-NoDerivs 3.0 Germany License.

On 01.01.2015 it is planned to change the License Conditions (the removal of the Creative Commons License condition "no derivative works"). This is to allow reuse in the area of future scientific usage.



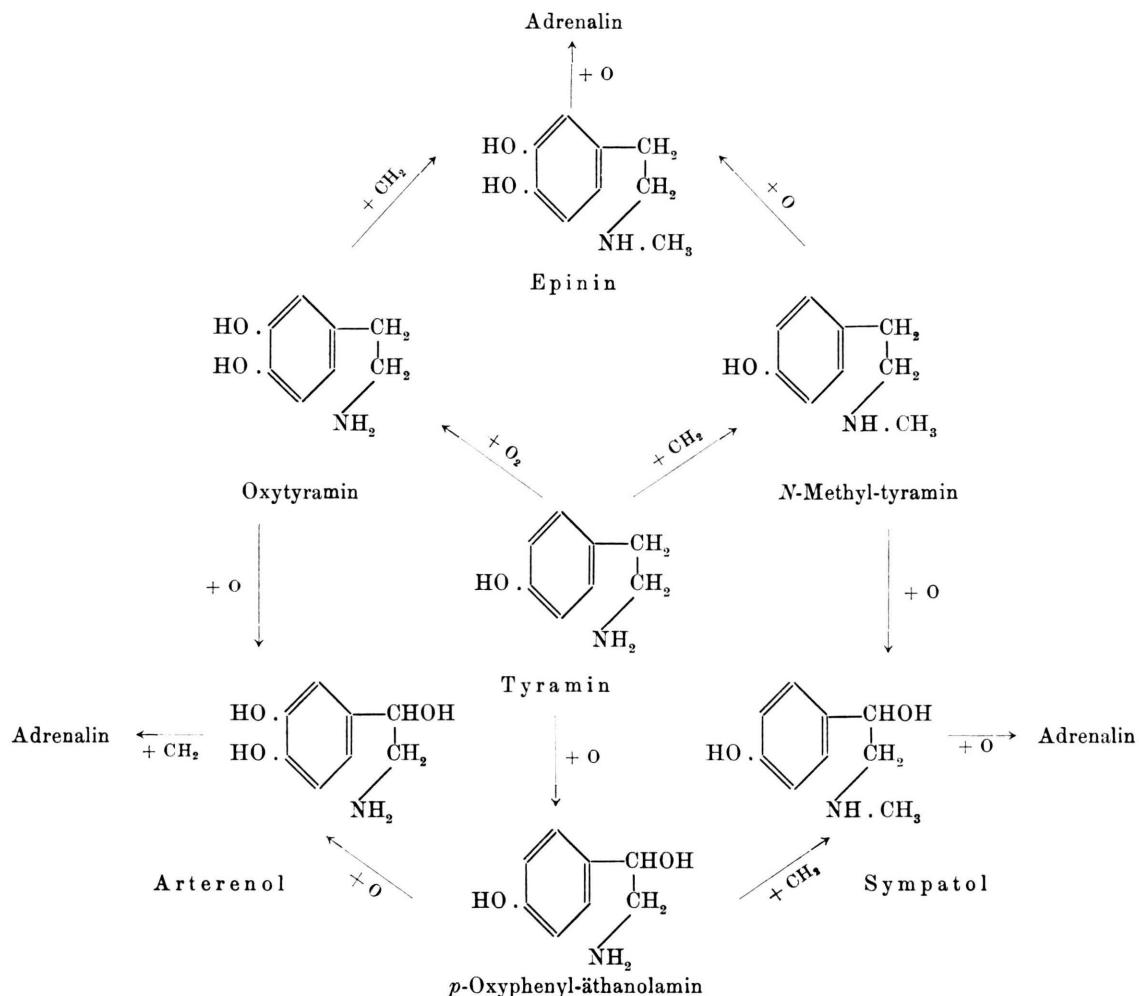
demann<sup>5</sup> zeigen konnten, wenn man *Tyramin* mit zerschnittenem Nebennierenmark bei Zimmertemperatur schüttelt. Die enteiweißte Lösung gab nach dieser Behandlung die Faroreaktion nach Folin und erwies sich im Blutdruckversuch an der Katze als wirksam. Phenylalanin, Tyrosin, Dopa, Hordenin und Phenyl-

oxyäthylamin blieben unter denselben Bedingungen unverändert, während Phenyläthylamin eine schwach positive Reaktion lieferte<sup>6</sup>. Als Ausgangspunkt für die Synthese des Adrenalins in der Nebenniere käme danach von den genannten Stoffen nur Tyramin in Frage, das,

halten haben will als aus Tyramin. Dieser Befund widerspricht aber der Erwartung, da Tyramin dem Adrenalin chemisch näher steht als Phenyläthylamin. Auch nahm Devine keine Blutdruckmessungen vor, sondern verwandte als Test lediglich die ziemlich unspezifische Vulpia nsche Farbreaktion.

<sup>5</sup> Hoppe-Seylers Z. physiol. Chem. **233**, 235 [1935].

<sup>6</sup> Diese letztere Angabe Schulers ist später von J. Devine, Biochemical J. **34**, Nr. 1 [1940], bestritten worden, der nach demselben Verfahren aus Phenyläthylamin mehr „adrenalinähnliche“ Substanz er-



wie wir wissen, in der Niere aus Tyrosin entsteht<sup>7,8</sup>.

Tyramin selbst kommt nun allerdings als unmittelbare Vorstufe des Addison-Pigmentes nicht in Betracht, weil es durch Hautextrakte nachgewiesenermaßen nicht in Melanin übergeführt wird. Wenn die Schuler'schen Vorstellungen zutreffen, müssen wir also die in Frage stehenden Chromogene unter den *Derivaten des Tyramins* suchen.

Theoretisch kann man auf mehreren Wegen von Tyramin zum Adrenalin gelangen (s. obenstehende Zusammenstellung).

<sup>7</sup> W. Schuler, H. Bernhardt u. W. Reindel, Hoppe-Seylers Z. physiol. Chem. **243**, 90 [1936].

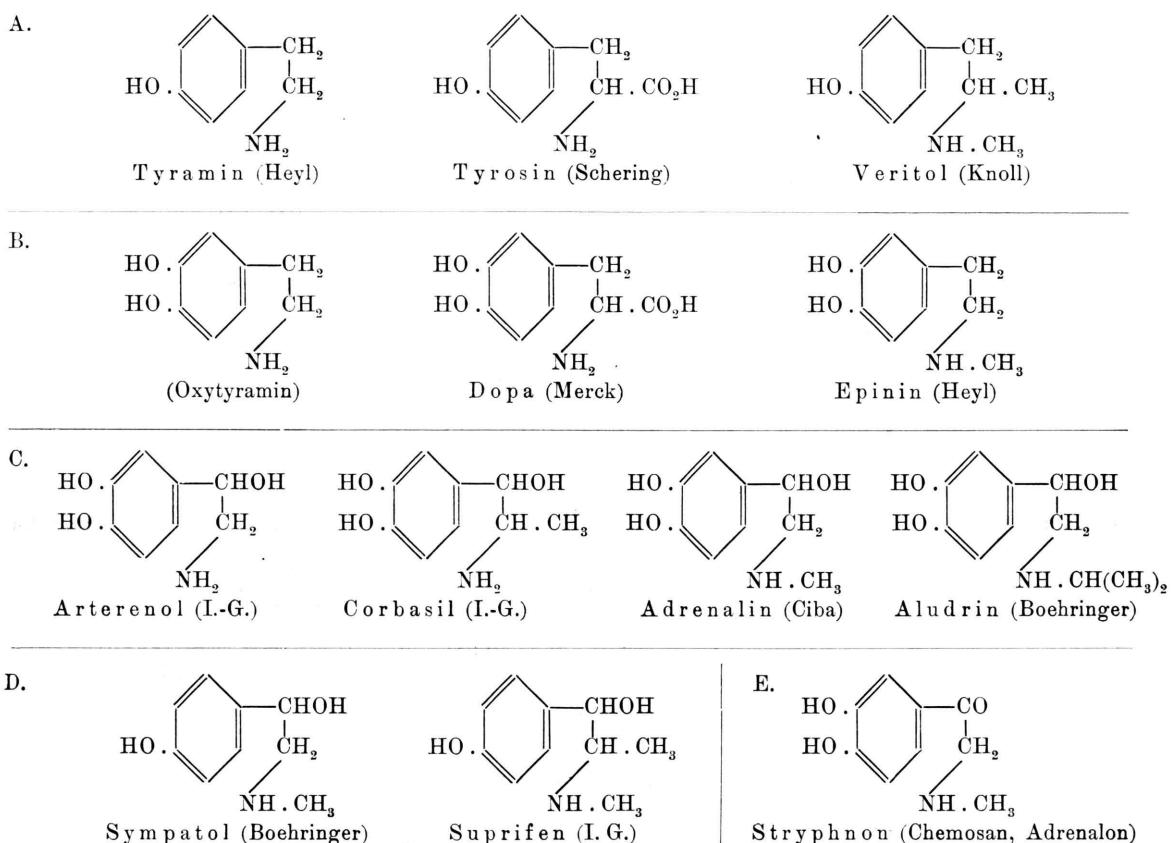
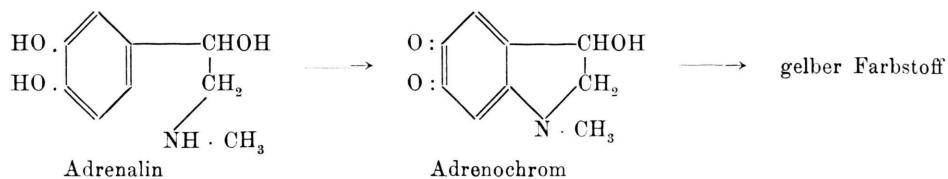
<sup>8</sup> P. Holtz, Hoppe-Seylers Z. physiol. Chem. **251**, 226 [1938].

Von den Zwischenprodukten, die hierbei auftreten können, ist das *Oxytyramin* in anderem Zusammenhang bereits früher auf seine Chromogenität hin untersucht worden<sup>9</sup>. Es geht in der Haut leicht in Pigment über, könnte also die Vorstufe des Addison-Pigmentes sein. *Adrenalin* dagegen liefert bei der Behandlung mit Hautextrakten rotes *Adrenochrom*<sup>10</sup>, das strukturell angeblich dem Hallachrom entspricht, im weiteren Verlauf der Oxydation aber nicht in Melanin, sondern in einen nicht näher bekannten gelben Farbstoff übergeht (s. S. 90, oben).

Von den vielen Fragen, die sich aus allen

<sup>9</sup> P. Mulzer u. H. Schmalfuß, Med. Klinik **1931**, Nr. 30, 1.

<sup>10</sup> D. E. Green u. D. Richter, Biochemical J. **31**, 596 [1937].



diesen Beobachtungen ergeben, wollen wir hier nur zwei herausgreifen:

1. Welche Derivate des Tyramins werden durch Hautfermente in Melanin verwandelt?
2. Welche Atomgruppierung verhindert die entsprechende Reaktion beim Adrenalin?

## II. Versuchsergebnisse

Dank dem Entgegenkommen der Herstellerfirmen standen uns fast alle für unsere Untersuchungen erforderlichen Verbindungen und darüber hinaus noch weitere ähnlich gebaute Stoffe in reiner, krystallisierter Form zur Verfügung. Ich habe sie in obenstehender Übersicht gleich so geordnet, wie sie nach unseren Befunden zusammengehören. Oxytyramin fehlt

in dieser Sammlung, doch ist sein Verhalten ja bekannt (s. o.), lässt sich auch aus dem der übrigen Stoffe mit Sicherheit erschließen. Epinin gewannen wir als krystallisiertes Hydrochlorid aus einer im Handel befindlichen Lösung seines schwefligsäuren Salzes.

Von diesen Verbindungen färben sich in Lösung bei pH 6,5 sämtliche Brenzcatechinderivate schon an der Luft durch *Autoxydation* mehr oder weniger schnell an, und zwar Adrenalin, Aludrin, Corbasil und Arterenol orange bis rot (Gruppe C), Epinin und Dopa schwarz (Gruppe B), Adrenalon gelb. Die einwertigen Phenole sind wesentlich stabiler; ihre Lösungen bleiben auch bei langer Versuchsdauer unverändert.

Von den erstgenannten vier Stoffen werden die *N*-methylierten Diphenole Adrenalin und Aludrin bedeutend schneller oxydiert als das am  $\alpha$ -C-Atom substituierte Corbasil, und dieses wieder schneller als das Arterenol, das überhaupt keine zusätzliche  $\text{CH}_3$ -Gruppe enthält. Entsprechendes gilt für die Gruppe B; hier ist Epinin leichter oxydabel als Dopa.

Zum Nachweis der *fermentativen Oxydation* eines Chromogens werden in der Dermatologie verschiedene Verfahren verwendet. Am besten eignet sich die von Bloch<sup>1</sup> ausgearbeitete Gefrierschnittmethode, bei der die Reaktion zwischen der Pigmentvorstufe und dem Hautferment auf den Ort der natürlichen Pigmentbildung beschränkt bleibt. Bringt man nämlich Gefrierschnitte durch frische (oder mit Formol fixierte) Haut von ganz jungen gefärbten Tieren in eine Chromogenlösung, z. B. in 1-proz. Dioxyphenylalanin, so läßt sich nach einigen Stunden in den Haarwurzeln mikroskopisch eine deutliche Vermehrung des dort vorhandenen Pigmentes nachweisen. Besonders exakt und eindrucksvoll wird die Reaktion, wenn man hierzu *Russenkaninchen* verwendet<sup>11</sup>, weil diese Tiere weiß zur Welt kommen, obwohl sie die Fähigkeit zur Pigmentbildung besitzen<sup>12</sup>. Ihre Haarwurzeln färben sich in geeigneten Chromogenlösungen tief schwarz, während Kontrollschnitte in physiologischer Kochsalzlösung völlig pigmentfrei bleiben.

Da die Haut der Säugetiere im Gegensatz zur Hämolymphe der Insekten keine Monophenolase enthält, schieden die Monophenole (Gruppe A und D) für diese Versuche als Chromogene von vorneherein aus. Von den Diphenolen lieferte Epinin eine sehr intensive (Abb. 1), Dopa eine etwas schwächere positive Reaktion. Die mit Adrenalin, Aludrin, Corbasil, Arterenol und Adrenalon behandelten Schnitte blieben dagegen vollkommen farblos.

Entsprechende Ergebnisse bekommt man, wenn man die Amine mit *Extrakten aus der Haut junger, gefärbter Tiere* (z. B. Mäuse) versetzt. Bei solchen Versuchen färben sich nur die Lösungen von Epinin und Dopa schwarz; alle übrigen werden bloß bis zur Rotstufe oxy-

<sup>11</sup> R. Dannen u. H. Paul, Biol. Zbl. **60**, 79 [1940].

<sup>12</sup> Die Ursachen dieses merkwürdigen Verhaltens sind an anderer Stelle ausführlich besprochen worden (Danneel, Ergeb. Biol. **18**, 55 [1941]).

dert, und zwar in derselben Reihenfolge wie bei der Autoxydation, aber im ganzen natürlich schneller<sup>13</sup>.

Wie man sieht, unterscheiden sich die Stoffe der Gruppe B, zu denen auch das von Mülzer und Schmalfuß<sup>9</sup> als Chromogen gekennzeichnete Oxytyramin gehört, von denjenigen der Gruppe C im Prinzip nur durch das Fehlen der *OH-Gruppe am  $\beta$ -C-Atom*. Diese Atomgruppierung muß also für das Ausbleiben der Pigmentbildung verantwortlich gemacht werden. Die partielle Methylierung des N-Atoms im Adrenalinmolekül behindert dagegen, wie das Beispiel des Epinins zeigt, die Melaninbildung

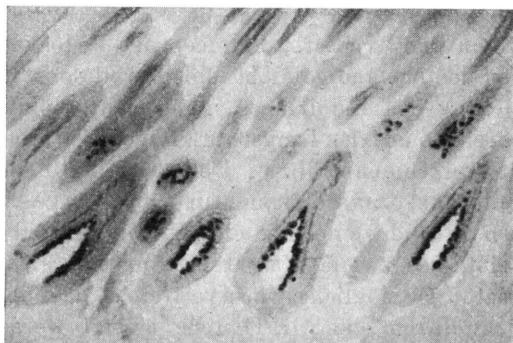


Abb. 1. Gefrierschnitt durch die Rückenhaut eines neugeborenen Russenkaninchen nach mehrstündiger Einwirkung einer 0,1-proz. Epininlösung (Vergr. 70-fach). Die Haarwurzeln unbehandelter Kontrollschnitte bleiben unter sonst gleichen Bedingungen völlig pigmentfrei.

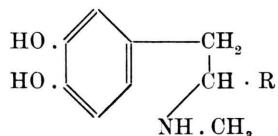
in keiner Weise. Die Verknüpfung der nach Raper<sup>2</sup> als Zwischenprodukte der Tyrosinase-Tyrosin-Reaktion entstehenden Dioxyindolmoleküle zu dem viel höhermolekularen Melanin erfolgt also nicht am Indolstickstoff.

Dieselben Regeln wie für die Diphenole gelten mutatis mutandis auch für die Monophenole. Mit Extrakten aus Fliegenpuppen lassen sich im Reagensglas zwar *Tyramin*, *Tyrosin* und *Veritol* (Gruppe A) in Pigment überführen, nicht dagegen die Alkohole Sympatol und Suprifen (Gruppe D), deren Lösungen unter gleichen Versuchsbedingungen farblos bleiben.

Damit dürften die beiden eingangs aufgeworfenen Fragen beantwortet sein: *Von allen Zwi-*

<sup>13</sup> Da die roten Reaktionsprodukte im Gegensatz zum Melanin wasserlöslich sind, lassen sie sich nach der Gefrierschnittmethode nicht nachweisen.

schenprodukten, deren Auftreten bei der Umwandlung von Tyramin in Adrenalin erwartet werden kann, gehen in der Haut der Säugetiere nur die *o*-Diphenole *Oxytyramin* und *Epinin* in Pigment über, nicht aber die Monophenole und auch nicht diejenigen Diphenole, die am  $\beta$ -C-Atom eine Hydroxylgruppe oder eine Ketogruppe tragen. Als Chromogene kommen dann bei Warmblütern überhaupt nur Verbindungen des folgenden Typus in Frage:



Von den Wasserstoffatomen der Seitenkette darf das *N*-ständige nicht fehlen, weil sonst die Bildung des Indolringes nicht mehr möglich wäre. Die auf den Ringschluß folgende Wasserstoffverschiebung bzw. Dehydrierung<sup>14</sup> setzt weiterhin voraus, daß auch an den beiden C-Atomen ( $\alpha$  und  $\beta$ ) noch je ein H-Atom verfügbar bleibt. Das zweite Wasserstoffatom am  $\beta$ -Kohlenstoff ist möglicherweise vertretbar, darf aber nicht durch eine OH-Gruppe ersetzt werden (Adrenalin).

Wie unsere Versuche erneut zeigen, gibt es außer dem Dioxyphenylalanin eine ganze Reihe von Stoffen, aus denen Hautpigment entstehen kann. Das an dieser Reaktion beteiligte Ferment darf also nicht, wie Bloch<sup>1</sup> vorgeschlagen hat, als „Dopaoxydase“ bezeichnet werden; es handelt sich vielmehr um eine Diphenolase, die einen viel weiteren Wirkungsbereich besitzt und wahrscheinlich zu den von Kubowitz<sup>15</sup> beschriebenen Kupferproteiden gehört<sup>16</sup>.

<sup>14</sup> Welche von diesen beiden Reaktionen in Wirklichkeit stattfindet, wissen wir noch nicht. Raper (2) selbst hat sich im Gegensatz zu uns für die Wasserstoffverschiebung entschieden (Danneel, Melaninbildende Fermente bei *Drosophila melanogaster II*. Neuformulierung der Tyrosinase-Tyrosin-Reaktion. Biol. Zbl. (i. Druck) [1945]).

<sup>15</sup> F. Kubowitz, Biochem. Z. 292, 221 [1937]; 296, 443 [1938].

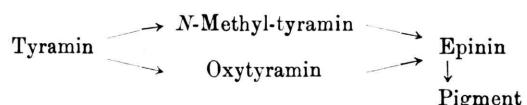
<sup>16</sup> R. Danneel, Biol. Zbl. 63, 377 [1943].

### III. Zusammenfassung und Besprechung der Ergebnisse

Ausgehend von den Befunden Schulers und seiner Mitarbeiter<sup>7</sup>, wonach das Adrenalin der Nebenniere aus Tyramin entsteht, haben wir zunächst überlegt, welche Reaktionswege hierfür in Frage kommen, haben dann die dabei zu erwartenden Zwischenprodukte auf ihre Chromogennatur hin untersucht und gefunden, daß nur *Oxytyramin* und *Epinin* durch Hautfermente in Melanin verwandelt werden.

Diese Überlegungen und Beobachtungen erweitern unsere Kenntnis der biologischen Adrenalsynthese zunächst insofern, als sie uns vom Dioxyphenylalanin unabhängig machen, das bisher als bestbekanntes Chromogen der Säugetiere immer wieder dazu verführt hat, das Addison-Pigment und damit auch das Adrenalin vom Tyrosin herzuleiten, obwohl hierfür sonst keine Anhaltspunkte vorlagen. Demgegenüber stellen wir fest, daß sich unter den Derivaten des Tyramins ebenfalls zwei Pigmentvorstufen befinden, die dem Adrenalin sogar näher stehen als das Dioxyphenylalanin. Schulers Theorie wird also auch in dieser Hinsicht durch die experimentellen Befunde durchaus gedeckt.

Wenn aber das Adrenalin der Nebennieren tatsächlich aus Tyramin entsteht, dann kommen als Vorstufen für das Addison-Pigment nur die beiden genannten Chromogene in Betracht, für deren Bildung folgende Wege zur Verfügung stehen (s. o.):



Ob diese Formulierung, die nach unserer Meinung den bisher vorliegenden experimentellen Ergebnissen in der einfachsten Form Rechnung trägt, die wahren, vielleicht viel komplizierteren Vorgänge richtig wiedergibt, ob und inwieweit sie insbesondere Rückschlüsse auf die Adrenalinbildung im gesunden Organismus zuläßt, bleibt indessen abzuwarten.