

Trägergebundene SerotoninDerivate und Affinitätschromatographie synaptischer Membranproteine

Resin Linked Derivatives of Serotonin and Affinity Chromatography of Proteins Isolated from Synaptic Membranes

Frank Seela * und Wolfgang Wesemann

Institut für Physiologische Chemie, II, Philipps-Universität, Marburg/Lahn

(Z. Naturforsch. 29 c, 248–256[1974]; eingegangen am 2. Januar/15. Februar 1974)

Affinity Chromatography, Receptor, Resin Linked Serotonin, Synaptic Membrane Proteins

An affinity resin for the isolation of the serotonin receptor from nerve ending membranes was prepared by coupling tryptamine, 5-methoxy-tryptamine or serotonin to CNBr-activated Sepharose 4 B. The tryptamine derivatives, N-6-(aminohexyl)-tryptamines, were obtained by subsequent condensation of the corresponding indole derivatives with oxalyl chloride and ϵ -aminocaproamide and reduction with LiAlH₄. The 6-aminohexyl-group was used as spacer to link covalently the primary amino-group of tryptamine to agarose. — An extract of membrane proteins isolated from rat brain was resolved on this affinity resin into two fractions as compared with only one fraction using unsubstituted Sepharose 4 B.

Einleitung

Zur Aufklärung der Prozesse, die bei der Reizübertragung an den Synapsen ablaufen, spielt die Untersuchung der Funktion von Transmittermolekülen eine wesentliche Rolle. Chemische Transmitter sind Moleküle, die aus den Nervenendigungen durch elektrische Impulse in den synaptischen Spalt ausgeschüttet werden und an der subsynaptischen Membran eine Permeabilitätsänderung für Ionen hervorrufen. Während die physiologische und pharmakologische Wirkung von Transmittern eingehend studiert wurde, ist recht wenig über die molekularen Prozesse, die an der synaptischen Membran ablaufen, bekannt. Zur Kenntnis dieser Vorgänge ist die Isolierung der Aczeptormoleküle, die den Transmitter binden und dabei vermutlich über eine Konformationsänderung die Ionenpermeabilität der Membranen steuern, notwendig.

Für den wichtigsten Transmitter, das Acetylcholin, gelang unlängst die Isolierung seines Aczeptormoleküls^{1–3}. Für andere biogene Amine, wie z.B. das Serotonin (**1**), das im Zentralnervensystem gefunden wird und dessen Beteiligung an der Reizübertragung weitgehend gesichert ist^{4–8}, obwohl seine definitive Einordnung als Neurotransmitter noch aussteht, müssen analog zum Acetylcholin Aczeptormoleküle gefordert werden.

Sonderdruckanforderungen an Professor Dr. W. Wesemann, Institut für Physiologische Chemie, II, Philipps-Universität, D-3550 Marburg/Lahn, Deutschhausstr. 1–2.

Die vorliegende Arbeit soll durch Fixierung von SerotoninDerivaten an polymerem Trägermaterial die experimentellen Voraussetzungen zur Isolierung von Serotonin-RezeptorSubstanzen aus synaptischen Membranen^{8, 9} schaffen.

Fixierung von Serotonin-Derivaten an polymerem Trägermaterial

Trägermaterial und Auswahl der Fixierungsposition am Serotonin

Von den zur Fixierung des Serotonins geeigneten, unlöslichen Polymeren Polyacrylamid¹⁰, Cellulose¹¹, Glas¹² und Agarose¹³ wurde als Trägermaterial Agarose gewählt, da sie sich durch eine gelartige weitporige Struktur, ihren hydrophilen Charakter und das Fehlen von ionischen Gruppen auszeichnet. Nach Axen *et al.*^{14, 15} lässt sie sich unter schonenden Bedingungen mit Bromcyan in eine aktivierte Form umwandeln; diese ist durch Nucleophile substituierbar, wobei kovalente Bindungen geknüpft werden¹⁶.

Zur Darstellung des geeigneten Affinitätsharzes ist es weiterhin wichtig, Kenntnis von der für die Wechselwirkung zwischen Serotonin und Acceptor-Molekül erforderlichen Geometrie und Ladungsverteilung zu haben; denn nur wenn diese Wechselwir-

* Neue Anschrift: Max-Planck-Institut für Experimentelle Medizin, Abteilung Chemie, D-3400 Göttingen, Hermann-Rhein-Str. 8.



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.

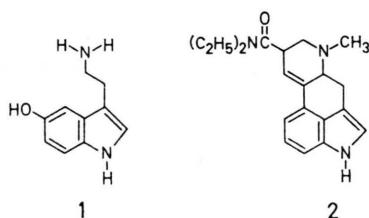
Zum 01.01.2015 ist eine Anpassung der Lizenzbedingungen (Entfall der Creative Commons Lizenzbedingung „Keine Bearbeitung“) beabsichtigt, um eine Nachnutzung auch im Rahmen zukünftiger wissenschaftlicher Nutzungsformen zu ermöglichen.

This work has been digitized 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.

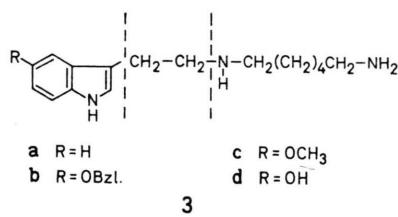
On 01.01.2015 it is planned to change the License Conditions (the removal of the Creative Commons License condition "no derivative works"). This is to allow reuse in the area of future scientific usage.

kung zwischen Serotonin- und Acceptor-molekül bei der Chromatographie erhalten bleibt, kann mit einer erfolgreichen Abtrennung am Affinitätsharz gerechnet werden. Aus Untersuchungen über die Beziehungen zwischen Struktur und Aktivität von Serotonin und Serotonin-Derivaten ist bekannt, daß Monoalkylierung der Aminogruppe in der Seitenkette die biologische Affinität von Serotonin nur unwesentlich beeinflußt^{17, 18}. Darüberhinaus lassen wichtige Serotoninantagonisten, wie das Lysergsäurediäthylamid (2) von ihrer Struktur her vermuten, daß eine Substitution der Aminowasserstoffe dann toleriert wird, wenn der Abstand der Aminogruppe zum Indolring erhalten bleibt und die Einstellung der Seitenkette in eine bevorzugte Konformation möglich ist^{19, 20}. Diese Befunde legen

nahe, Serotonin über die Aminogruppe der Seitenkette am polymeren Träger (Sepharose 4 B) zu fixieren.



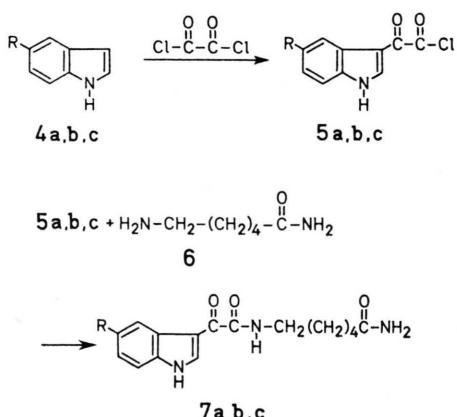
Um die Zugänglichkeit der Serotonin-Acceptor-moleküle zum polymer gebundenen Bindungspartner sicherzustellen, wurde zwischen Serotonin und Sepharose 4 B ein C-6 Alkylrest (Spacer) eingefügt. Die kovalente Fixierung dieses N-alkylierten Serotonin-Derivates vom Typ 3 an die aktivierte Sepharose 4 B erfolgte über eine endständige Aminogruppe. Neben dem Serotonin-derivat 3d wurde die



Methoxyverbindung 3c dargestellt, um die Oxidationsempfindlichkeit, bedingt durch die 5-Hydroxylgruppe, auszuschalten. Um den Einfluß der 5-Hydroxy- bzw. 5-Methoxygruppe auf die Bindungs-konstante zwischen Serotonin und seinem Acceptor-molekül abschätzen zu können, wurde außerdem die 5-Desoxyverbindung 3a dargestellt.

Syntheseweg

Ausgangsprodukte für die Serotonin-Derivate 3a – d waren Indol (4a) bzw. dessen 5-Methoxy- (4c) oder 5-Benzoyloxyderivat (4b). Nach Speeter und Anthony²¹ lassen sich Indol und dessen Derivate durch Oxalylchlorid an C-3 elektrophil substituieren, wobei aus 4a – c Glyoxylsäurechlorid-Derivate vom Typ 5 entstehen. Diese sind reaktiv und reagieren mit Aminoverbindungen glatt zu Amid-derivaten. Setzt man die Säurechloride 5a – c mit Hexamethylendiamin um, so sollte unter Knüpfung einer Amidbindung gleichzeitig ein C-6 Alkylrest und eine ω-ständige freie Aminogruppe in das Molekül eingebaut werden. Da Hexamethylendiamin als bi-funktionelles Amin zweifach substituiert wird, muß eine seiner Aminogruppen geschützt werden.



Verwendet man statt Hexamethylendiamin 6-Amino-capronsäureamid (6), so hat man eine C-6 Verbindung in der Hand, die sich glatt mit den Säurechlorid-Derivaten 5a – c zu 7a – c umsetzt. Die Amidgruppen 7a – c lassen sich mit komplexen Hydriden reduktiv in Aminogruppen umwandeln, wobei gleichzeitig die Carbonylgruppen des Glyoxoyloylrestes in Methylengruppen reduziert werden. – Waren 3a und 3c direkt zur Umsetzung mit CNBr-aktivierter Sepharose bereit, mußte bei 3b erst der Benzylrest abgespalten werden.

Synthese der Serotonin-Derivate 3a – d

$N^6\{[Indolyl-(3')]-glyoxyloyl\}\text{-}6\text{-amino-capron-säureamid}$ (7a), dessen 5-Methoxy- (7c) und 5-Benzoyloxy-Derivat (7b)

Für 7a – c war es notwendig, 6-Amino-capron-säureamid darzustellen. Eine Methode von C. S. Marvel *et al.*²², die die 6-Amino-capronsäure durch

Veresterung in Äthanol/Chlorwasserstoff zuerst zum 6-Amino-capronsäureäthylester und anschließender Ammonolyse in 25-prozentigem Ammoniak zum Amid überführt, verlief unbefriedigend. Entgegen den Angaben der Autoren entstand nicht nur das Amid **6**, sondern auch 6-Amino-capronsäure, die im Dünnschichtchromatogramm LS I, (Cellulose) vom Amid getrennt werden konnte. Von den beiden Ninhydrin-positiven Substanzen entspricht die mit dem größeren R_F -Wert dem Amid **7**, die langsamer wandernde Substanz der 6-Amino-capronsäure.

Da die präparative Abtrennung des Amids von der Säure unbefriedigend verlief, wurde ein anderes Verfahren für die Darstellung von 6-Amino-capronsäureamid notwendig. Schützt man 6-Amino-capronsäure an der Aminogruppe durch den Carbobenzoxyster und behandelt die geschützte Verbindung mit Thionylchlorid, so wird N-CBZ-6-Amino-capronsäurechlorid gebildet, das bei Ammonolyse N-CBZ-6-Amino-capronsäureamid gibt. Durch katalytische Hydrierung wird der Carbobenzoxyster abgespalten und chromatographisch reines 6-Amino-capronsäureamid gebildet. — Da Hartmann und Holler²³, die diesen Syntheseweg bereits benutzt hatten, keine experimentellen Angaben machten, werden in der Versuchsbeschreibung die Reaktionsbedingungen zur Darstellung von 6-Amino-capronsäureamid angegeben. Um die zur Darstellung von **7a–c** erforderlichen Indolverbindungen **5a–c** zu erhalten, wurden die Indol-Derivate **4a–c** durch Behandeln mit Oxalylchlorid an C-3 acyliert²¹ und die Säurechloride **5a–c** mit 6-Amino-capronsäureamid zu den Amiden **7a–c** gekuppelt.

N-(6-Amino-hexyl)-tryptamin (**3a**), dessen 5-Methoxy- (**3c**) und 5-Hydroxy-Derivat (**3d**)

Kocht man **7a–c** in Gegenwart eines Überschusses von Lithiumaluminiumhydrid in Dioxan unter Rückfluß, so erhält man ein Reaktionsgemisch, aus dem sich durch Umsetzen mit 3,5-Dinitrobenzoylchlorid die Bis-3,5-Dinitrobenzamide von **3a–c** isolieren und charakterisieren lassen.

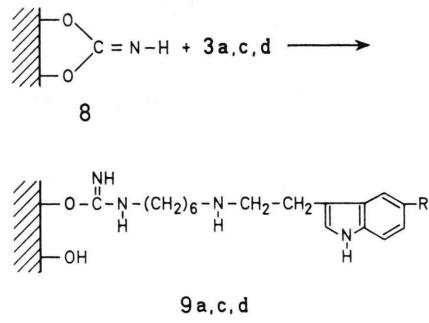
Wie die Dünnschichtchromatogramme (Kieselgel, LS III) zeigen, enthalten die Reaktionsgemische neben einer Hauptkomponente sowohl schneller als auch langsamer wandernde Nebenprodukte. Die Übertragung der analytischen Dünnschichtchromatographie der N-(6-Amino-hexyl)-tryptaminderivate **3a–c** auf präparative Säulenchromatographie gelang weder beim Benutzen von Kieselgel noch von

Cellulose als Sorptionsmittel. In allen Fällen konnten nur unreine Substanzen isoliert werden. Offenbar zersetzen sich **3a–c** während der Chromatographie. Um starke Adsorption und extreme pH-Werte zu vermeiden, werden die Reaktionsprodukte nach der Reduktion mit Lithiumaluminiumhydrid am Kationenaustauscher (Cellex P, 0,1 N Natriumformiatpuffer, pH 3,5) adsorbiert und durch steigende Salzkonzentrationen (Natriumchlorid) aufgetrennt. **3a** entstand in 27,9-prozentiger, **3b** in 16,4-prozentiger und **3c** in 33,3-prozentiger Ausbeute. — Ähnlich niedrige Ausbeuten wurden bereits von anderen Mono-N-Alkyltryptaminen beobachtet, während Di-N-Alkyltryptamine bei gleicher Reaktionsfolge in wesentlich höheren Ausbeuten entstehen^{24, 25}. Offenbar hydrolysieren die Zwischenstufen der Mono-N-Alkylverbindung bei der Lithiumaluminiumhydrid-Reduktion in Gegenwart geringer Mengen Wasser zu den entsprechenden Aldehyden.

Während **3a** und **3c** direkt mit CNBr-Sepharose 4 B umgesetzt werden können, wurde bei **3b** durch katalytische Hydrierung der Benzylrest abgespalten. Aus **3b** entsteht die 5-Hydroxy-Verbindung **3d**, die sich dünnschichtchromatographisch (LS III) durch ihren geringeren R_F -Wert (0,3) deutlich von dem Ausgangsprodukt **3b** (R_F -Wert 0,4) unterscheidet.

Darstellung der Sepharose 4 B-Derivate **9a, c, d**

Setzt man gequollene CNBr-aktivierte Sepharose 4 B mit den Serotoninlderivaten **3a, c, d** in alkalischem DMF/Wassergemisch um, so werden diese kovalent an das Polymer gebunden. Bei dieser Reaktion kann man davon ausgehen, daß sich hauptsäch-



lich die primären Aminogruppen von **3a, c, d** mit der Teilstruktur **8** der Sepharose zu **9a, c, d** umsetzen¹⁶; denn trotz stärkerer Nucleophilie der sekundären Aminogruppe in der Seitenkette sind die primären Aminogruppen sterisch weniger behindert,

ein Faktor, der vor allem bei Reaktionen an Polymeren, von Bedeutung ist. — Daß aliphatische Amine, die gleichzeitig primäre und sekundäre Aminogruppen enthalten, bevorzugt über die primäre Aminogruppe reagieren, zeigt die Verknüpfung von 3,3'-Diamino-dipropylamin mit Sepharose 4 B²⁶. — Bei **3d** ist darüberhinaus in Betracht zu ziehen, daß dessen 5-Hydroxylgruppe mit CNBr-aktivierter Sepharose reagieren kann. Wie jedoch die Umsetzung von Tyrosinderivaten mit CNBr-Sepharose 4 B zeigt, spielt diese Reaktion nur eine untergeordnete Rolle²⁷. Die Sepharosederivate der Struktur **9a, c, d** werden nach der Kupplung noch mit Äthanolamin nachbehandelt, um eventuell nicht umgesetzte aktivierte Sepharosepositionen abzusättigen. Waren **9a** und **9c** farblos, so dunkelte **9d** offenbar durch die leichte Oxidierbarkeit der 5-Hydroxylgruppe nach. Durch Waschen mit alkalischer Natriumdithionitlösung läßt sich **9d** jedoch nahezu vollständig entfärben.

Der qualitative Nachweis, daß **3a, 3c** bzw. **3d** an Sepharose 4 B gebunden sind, gelingt durch Behandlung der Sepharose 4 B-Derivate **9a, c, d** mit van Urks-Reagenz. Die Sepharose 4 B-Derivate färben sich dabei charakteristisch an. Die einzelnen Färbungen von freien und fixierten Serotonin-Derivaten sind in Tab. I zusammengefaßt.

Tab. I. Farbreaktionen von freien und an Sepharose gebundenen Tryptaminderivaten mit van Urks-Reagenz.

Substanz	Farbe
1. Reagenz	grünlich-gelb
2. Tryptamin	rotviolett
3. N-(6-Amino-hexyl)-tryptamin	rotviolett
4. Sepharose gebundenes N-(6-Amino-hexyl)-tryptamin	rotviolett
5. Serotonin	stahlblau
6. 5-Benzylxyloxy-tryptamin	blauviolett
7. 5-Benzylxyloxy-N-(6-amino-hexyl)-tryptamin	blauviolett
8. 5-Hydroxy-N-(6-amino-hexyl)-tryptamin	stahlblau
9. Sepharose gebundenes 5-Hydroxy-N-(6-amino-hexyl)-tryptamin	stahlblau
10. 5-Methoxy-N-(6-amino-hexyl)-tryptamin	blauviolett
11. Sepharose gebundenes 5-Methoxy-N-(6-amino-hexyl)-tryptamin	blauviolett

Aufgrund des großen Überschusses an Serotonin-Derivaten bei der Kupplung (1:20) und ihrer ge-

ringen Molekülgröße muß man annehmen, daß alle aktivierten Positionen der Sepharose mit Serotonin-Derivaten besetzt sind. Das entspricht bei einem Einsatz von käuflicher CNBr-Sepharose 4 B mit einem Aktivierungsgrad von 5 µmol/ml Gel einem Gehalt an gebundenen Serotonin-Derivaten von ebenfalls 5 µmol/ml Sepharose 4 B.

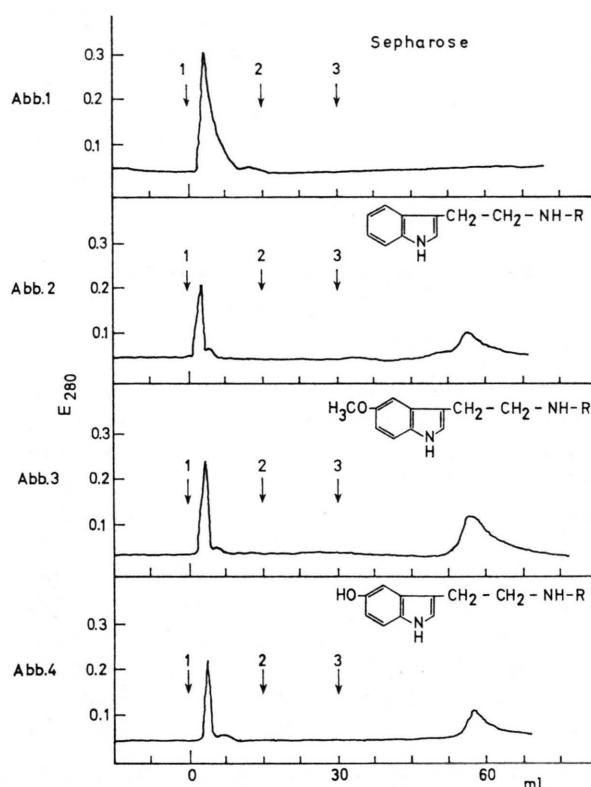
Affinitätschromatographie synaptischer Membranproteine

Extraktion der Proteine

Die Isolierung synaptischer Membranen aus Rattenhirnhomogenaten erfolgte nach der Abtrennung von Zelltrümmern durch Dichtegradientenzentrifugation nach der Methode von De Robertis⁹. Zum Lösen der Membranfragmente in wässrigem Medium wurde ein Lösungsvermittler zugesetzt, wofür Triton X-100 und Natriumdodecylsulfat zur Auswahl standen. Während 0,1- und 1,0-prozentige Lösungen dieser Detergenzen die Membranen nach kräftigem Schütteln bis auf einen geringen Rückstand in Lösung brachten, reichten Konzentrationen von 0,01% nicht aus. Da Triton X-100 aufgrund seiner UV-Eigenabsorption die chromatographische Auftrennung der Membranproteine störte und auch die Proteinbestimmung nach Lowry²⁸ ungünstig beeinflußte, wurde zum Lösen der Membranproteine eine 0,1-prozentige Natriumdodecylsulfatlösung benutzt. Das noch ungelöste Material wurde durch Zentrifugation abgetrennt.

Chromatographie der Proteine an den Sepharose-Derivaten **9a, c, d**

Chromatographiesäulen, die entweder die Sepharose 4 B Derivate **9a, c, d** oder unsubstituierte Sepharose 4 B enthielten, wurden mit dem gleichen Detergenzpuffer, der zum Lösen der synaptischen Membranen benutzt wurde, äquilibriert. Die Säulen wurden mit dem Membranextrakt beladen und mit Detergenzpuffer steigender Salzkonzentration eluiert und die Extinktion des Eluates bei 280 nm registriert. Wie Abb. 1–4 zeigen, werden die Membranproteine von unsubstituierter Sepharose 4 B nicht zurückgehalten und mit dem Ausschlußvolumen der Säule eluiert. Bei den Sepharose 4 B-Derivaten **9a, c, d** wird nur ein Teil der Substanz beim Ausschlußvolumen eluiert, während ein anderer am Säulenmaterial gebunden bleibt. Durch Steigerung der Natriumchlorid-Konzentration auf 2 M läßt sich die gebundene Substanz nicht eluieren. Erst wenn



Abbn. 1—4. Elutionsprofil nach Chromatographie des Detergenzextraktes synaptischer Membranproteine an Sepharose 4 B (Abb. 1) und den Sepharosederivaten **9a** (Abb. 2), **9c** (Abb. 3) und **9d** (Abb. 4). 1. Detergenzpuffer, 2. 0,5 M NaCl in Detergenzpuffer, 3. 0,5 M NaCl in Detergenzpuffer, der 1% Natriumdodecylsulfat enthält.

die Natriumdodecylsulfatkonzentration in der Elutionsflüssigkeit von 0,1% auf 1,0% erhöht wird, eluiert man das gebundene Protein. Wie die Bestimmung der Proteinkräfte in den Eluatfraktionen zeigt, fallen maximale UV280-Absorption und maximale Proteinkonzentrationen zusammen.

Die Ergebnisse der Affinitätschromatographie deuten darauf hin, daß an den Sepharose 4 B-Derivaten **9a, c, d** ein Membranprotein mit hoher Serotonin-Bindungsaffinität (Serotoninrezeptor) abgetrennt wurde.

Obwohl mit der Bindung saurer Membranproteine an die basischen Gruppen des Affinitätsharzes gerechnet werden muß, ist eine unspezifische Bindung der Serotonin-Rezeptorsubstanzen, die ausschließlich auf elektrostatischen Wechselwirkungen beruht, unwahrscheinlich, da der Serotonin-Protein-Komplex wesentlich durch strukturspezifische Merkmale (Indolring) stabilisiert wird. Für diese Annahme spricht, daß eine Erhöhung der Salzkonzentra-

tion keinen Einfluß auf das Elutionsverhalten der Membranfraktion zeigte, während nach Erhöhung der Natriumdodecylsulfatkonzentration der Protein-Serotonin-Komplex dissozierte, so daß das Protein eluiert werden konnte. Daß im Elutionsverhalten der Membranproteine keine signifikanten Unterschiede auftraten, kann durch die spontane Erhöhung der Detergenzkonzentration erklärt werden, so daß mögliche Abstufungen in der Bindungsstärke überdeckt werden. Der Nachweis, daß in der bei höherer Natriumdodecylsulfatkonzentration eluierten Proteinfraction das Serotoninrezeptorprotein angereichert wurde, bleibt weiteren Untersuchungen vorbehalten.

Beschreibung der Versuche

Reagenzien und Bestimmungsmethoden

Analysen

Die Elementaranalysen wurden vom Mikroanalytischen Laboratorium Beller, Göttingen, ausgeführt. Bei der Proteinbestimmung nach Lowry²⁸ wurde für die Eichkurven eine Lösung von Rinderserumalbumin in 1-prozentigem Natriumdodecylsulfat verwendet.

Spektren

NMR-Spektren (δ -Werte): Varian XL-100 (Tetramethylsilan als innerer Standard); Massenspektren: Varian CH 4.

Chromatographie

Adsorbentien: Ionenaustrauscher Cellex P (Fa. BIO-RAD, Laboratories, Richmond); Kieselgel unter 0,08 mm und Kieselgelfertigplatten (Fa. Merck, Darmstadt); Cellulosefertigplatten (Fa. Riedel deHaen, Hannover); Sepharose 4 B und CNBr-Sepharose 4 B (Fa. Pharmacia, Schweden).

Lösungsmittelsysteme: LS I: Äthanol/25-prozentiges Ammoniak (7:3); LS II: Pyridin/Benzol (7:3); LS III: Äthanol/25-prozentiges Ammoniak/Wasser (8:1:1); LS IV: Chloroform/Äthanol (96:4). **Puffer:** Detergenzpuffer: 10^{-3} M TRIS HCl (pH 7,2) in 0,1-prozentiger wässriger Natriumdodecylsulfatlösung; Na-Formiatpuffer: 0,1 N Natriumformiat/Ameisensäure (pH 3,5) in Wasser.

Van Urk's Reagenz

1 g 4-Dimethylaminobenzaldehyd wird in 50 ml konz. Salzsäure gelöst und mit 50 ml Äthanol versetzt.

Die Schmelzpunkte wurden im Lindström-Apparat bestimmt und sind korrigiert.

*Arbeitsvorschriften***N-(Carbobenzoxy)-6-amino-capron-säure**

54,4 g (414 mmol) 6-Aminocapronsäure werden in 200 ml 2 N Natronlauge gelöst, auf 0 °C gekühlt und unter Turbinieren portionsweise mit insgesamt 74,8 g (438 mmol) Carbobenzoychlorid und 240 ml 2 N Natronlauge versetzt. Nach 1 Stunde wird zweimal mit 80 ml Äther extrahiert und die wässrige Phase mit 6 N Salzsäure angesäuert. Den farblosen, teilweise ölichen Niederschlag löst man in einem Gemisch von 300 ml 2 N Natronlauge/1000 ml Wasser, säuert unter Kühlung mit konz. Salzsäure an und erhält nach Absaugen und Trocknen 97,5 g (88,6%) farblose Nadeln vom Schmelzpunkt 51 – 53 °C (Lit.²⁹: 55 – 57 °C).

N-(Carbobenzoxy)-6-amino-capron-säureamid

50 g (137 mmol) N-(Carbobenzoxy)-6-amino-capronsäure löst man in 500 ml Äther, versetzt bei 5 °C mit 50 ml Thionylchlorid und zieht nach 15 min den Äther und überschüssiges Thionylchlorid im Vakuum ab. Der Rückstand wird in 500 ml 25-prozentigem Ammoniak von 0 °C pipettiert, wobei sich ein farbloser Niederschlag abscheidet, der abgesaugt, mit Wasser gewaschen und aus Äthan/Wasser umkristallisiert wird. 43,0 g (86,4%) farblose Plättchen vom Schmelzpunkt 123 °C (Lit.²³: 124 °C).

6-Amino-capronsäureamid (6)

16,0 g (43 mmol) N-(Carbobenzoxy)-6-amino-capronsäureamid löst man in 300 ml Methanol und hydriert 3 Stunden in Gegenwart von 2,0 g Palladium/Aktivkohle (10% Pd) unter Normalbedingungen, wobei das gebildete Kohlendioxid durch mehrfaches Evakuieren entfernt wird. Nach Abfiltrieren des Katalysators wird eingedampft und getrocknet. 7,8 g (99%) farblose, leicht zerfließliche Nadeln (Lit.²³). Auf der Dünnschichtplatte (Cellulose; LS I) gibt sich die Substanz nach Besprühen mit Ninhydrinlösung und Entwickeln bei 110 °C als einheitliche blaue Zone zu erkennen.

N⁶-{[Indolyl-(3')]-glyoxylol}-6-amino-capronsäureamid (7a)

7,0 g (59 mmol) Indol, gelöst in 200 ml wasserfreiem Äther, werden bei 0 – 5 °C mit 10 ml (117 mmol) Oxalylchlorid versetzt, wobei gelbe Nadeln auskristallisieren. Durch Abpipettieren des Ätherüberstandes und mehrfaches Waschen mit Äther entfernt man überschüssiges Oxalylchlorid. Den noch ätherfeuchten Rückstand, Indol-3-glyoxylsäurechlorid (**5a**), löst man in 50 ml Dimethylformamid und

gibt ihn zu einer Suspension von 8,0 g (61 mmol) **6** (aus 16,0 g N-CBZ-6-amino-capronsäureamid durch Hydrieren gewonnen) und 17 ml Triäthylamin in 200 ml Dimethylformamid. Nach 30 min Schütteln ist die gesamte Substanz in Lösung gegangen. Durch Verdünnen der Reaktionsmischung mit dem vierfachen Volumen Wasser fällt man einen hellgelben Niederschlag aus, der abfiltriert und aus Methanol/Wasser umkristallisiert wird. 10,7 g (59,4%) blaßgelbe Plättchen vom Schmelzpunkt 194 – 196 °C.



Ber.	C 63,77	H 6,35	N 13,94,
Gef.	C 64,08	H 6,27	N 13,89.

NMR: (DMSO-d₆) m 1,5, 2,1, 3,25, 7,25, 7,55, 8,25, s 8,75; NH₂ 6,7 (breit), NH t 8,7 ppm.

N⁶-{[Benzyl oxy-indolyl-(3')]-glyoxyloyl}-6-amino-capronsäureamid (7b)

8,0 g (35 mmol) 5-Benzyl oxy-indol in 200 ml Äther werden analog **7a** mit 7 ml (82 mmol) Oxalylchlorid versetzt. Das kristalline 5-Benzyl oxy-indol-3-glyoxylsäurechlorid (**5b**) wird wie **5a** mit 6,5 g **6** (50 mmol) (aus 10,4 g N-CBZ-6-amino-capronsäureamid durch Hydrieren gewonnen) und 13 ml Triäthylamin in 200 ml Dimethylformamid umgesetzt. Aus Pyridin/Wasser erhält man 9,4 g (64,4%) hellgelbe Plättchen vom Schmelzpunkt 230 – 233 °C (Zers.).



Ber.	C 67,80	H 6,18	N 10,31,
Gef.	C 67,84	H 6,23	N 10,48.

NMR: (DMSO-d₆) m 1,5, 2,1, 3,25, s 5,15, dd 7,0, m 7,4, d 7,85, s 8,7, NH₂ 6,7 (breit), NH t 8,7 ppm.

N⁶-{[5-Methoxy-indolyl-(3')]-glyoxyloyl}-6-amino-capronsäureamid (7c)

5,0 g (33 mmol) 5-Methoxy-indol werden in 150 ml wasserfreiem Äther gelöst, mit 7 ml (82 mmol) Oxalylchlorid versetzt und das Säurechlorid wie bei **7a** mit 6,8 g **6** (52 mmol) (aus 11,0 g N-CBZ-6-amino-capronsäureamid durch Hydrieren gewonnen) in 140 ml Dimethylformamid und 11 ml Triäthylamin umgesetzt und wie **7b** aufgearbeitet. 6,5 g (57,7%) gelbe Kristalle (Äthan) vom Schmelzpunkt 201 – 202 °C.



Ber.	C 61,62	H 6,39	N 12,68,
Gef.	C 61,64	H 6,45	N 12,51.

NMR (DMSO-d₆): m 1,5, 2,1, 3,3, s 3,8, dd 6,9, d 7,4, d 7,8, s 8,7; NH 6,7, 7,2, 8,7 ppm.

N-(6-Amino-hexyl)-tryptamin (3a)

3,0 g (10 mmol) **7a** werden in 250 ml trockenem Dioxan in der Siedehitze gelöst und unter Röhren

(KPG-Rührer) bei 100 °C zu einer Suspension von 4,0 g Lithiumaluminiumhydrid in 100 ml Dioxan getropft. Nach 2 Stunden Kochen unter Rückfluß kühlt man ab und versetzt zur amorphen Ausfällung der Hydroxide mit 20 ml Dioxan/Wasser (4:1), 4 ml 15-prozentiger Natronlauge und 12 ml Wasser. Nach Absaugen und Waschen des Hydroxidniederschlasses mit Dioxan wird das Filtrat eingedampft, in 150 ml 0,5 N Salzsäure aufgenommen und mit Äther geschüttelt. Die wässrige Phase wird mit Natronlauge alkalisch gemacht, das Amin mit Äther extrahiert und eingedampft. Der in 8 ml Dimethylformamid gelöste, glasige Abdampfrückstand (1,5 g) wird mit 60 ml 0,1 N Natriumformiatpuffer versetzt und mit 1 N Ameisensäure auf pH 3,5 nachreguliert. Zur Adsorption der Substanz wird die Lösung auf 4 Ionenaustauschersäulen $0,8 \times 16$ cm (je 10 g Cellex P) verteilt. Durch stufenweises Eluieren der Säulen mit 0,1 N Formiatpuffer pH 3,5 und steigenden Natriumchloratkonzentrationen werden zunächst eine Vorzone (0,1 N Formiatpuffer), anschließend Nebenprodukte (0,1 N Natriumchlorid in 0,1 N Formiatpuffer pH 3,5) und schließlich **3a** (0,3 M Natriumchlorid in 0,1 N Formiatpuffer pH 3,5) eluiert. Die Auftrennung wird optisch bei 280 nm verfolgt (LKB UV-cord). Durch Alkalisieren kleiner Proben, Extraktion des Amins mit Äther und Dünnschichtchromatographie auf Kieselgelplatten (LS III) lässt sich nach Anfärben mit Ninhydrin die Trennung analytisch verfolgen. – Aus dem alkalierten 0,3 M Natriumchlorid-Eluat erhält man nach Ätherextraktion und Abdampfen des Lösungsmittels 720 mg (27,9%) farbloses, glasiges **3a**, das chromatographisch einheitlich ist.

Bis-3.5-Dinitrobenzamid von **3a**

330 mg ungereinigtes, glasiges **3a** (Ätherabdampfrückstand) löst man in 25 ml Pyridin und versetzt bei Zimmertemperatur mit 1,0 g 3,5-Dinitrobenzoylchlorid. Nach 20 min wird mit gesättigtem wässrigen Natriumhydrogencarbonat verdünnt, mehrfach geschüttelt, mit Chloroform extrahiert und das Pyridin durch Extraktion der Chloroformphase mit 2 N Salzsäure entfernt. Der Chloroformabdampfrückstand wird an einer Kieselgelsäule 20×5 cm (mit LS IV) chromatographiert. Man trennt den Inhaltsstoff der gelben Hauptzone ab und fällt nach Abdampfen des Lösungsmittels aus Äthylacetat/Äthanol das gelbe, amorphe Bis-3.5-Dinitrobenzamid von **3a**. 360 mg (46,4%), Schmelzpunkt 218–220 °C) (Sintern bei 208 °C).



Ber.	C 55,63	H 4,51	N 15,14,
Gef.	C 55,81	H 4,64	N 14,77.

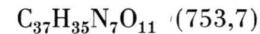
Massenspektrum: m/e 647; Hauptsignal M-1 646.

5-Benzyl oxy-N-(6-amino-hexyl)-tryptamin (**3b**)

2,0 g (4,9 mmol) **7b** werden unter Erwärmten in 600 ml getrocknetem Dioxan gelöst und analog **7a** mit 3,0 g Lithiumaluminiumhydrid in 75 ml Dioxan umgesetzt. Der Dioxanabdampfrückstand wird in 300 ml 0,5 N Salzsäure aufgenommen, mit 50 mg Aktivkohle geschüttelt und filtriert. Die Weiterverarbeitung erfolgt wie bei **3a**, wobei man 900 mg des Ätherabdampfrückstandes erhält, der an 2 Ionenaustauschersäulen chromatographiert wird. 295 mg (16,4%) glasige Substanz, einheitlich im Dünnschichtchromatogramm auf Kieselgel (LS III). Massenspektrum: m/e 365, berechnet 365.

Bis-3.5-Dinitrobenzamid von **3b**

420 mg ungereinigtes **3b** (Ätherabdampfrückstand) werden wie **3a** in 25 ml Pyridin gelöst und mit 1,0 g 3,5-Dinitro-benzoylchlorid versetzt. Die Aufarbeitung erfolgt analog dem Bis-3,5-Dinitrobenzamid von **3a**. 240 mg (27,7%) amorphes gelbes Pulver, das bei 95 °C sintert und oberhalb von 190 °C schmilzt.



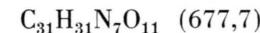
Ber.	C 58,96	H 4,68	N 13,03,
Gef.	C 58,95	H 4,79	N 12,98.

5-Methoxy-N-(6-amino-hexyl)-tryptamin (**3c**)

2,0 g (6 mmol) **7c** löst man in der Siedehitze in 300 ml getrocknetem Dioxan und reduziert mit 3,0 g Lithiumaluminiumhydrid in 75 ml Dioxan. Die Aufarbeitung erfolgt analog **3a**, wobei die chromatographische Reinigung des Ätherabdampfrückstandes (930 mg) an 3 Ionenaustauschersäulen vorgenommen wird. Die Elution von **3c** beginnt bereits bei 0,1 M Natriumchlorid. 600 mg (33,3%) farbloses glasiges **3c**.

Bis-3.5-Dinitrobenzamid von **3c**

310 mg **3c** werden in 25 ml Pyridin gelöst und mit 1,0 g 3,5-Dinitro-benzoylchlorid versetzt und wie das Bis-3,5-Dinitrobenzamid von **3a** aufgearbeitet. 380 mg (52,3%) amorphes gelbes Pulver, das oberhalb von 185 °C schmilzt.



Ber.	C 54,94	H 4,61	N 14,47,
Gef.	C 55,00	H 4,63	N 14,42.

5-Hydroxy-N-(6-amino-hexyl)-tryptamin (**3d**)

160 mg (0,58 mmol) **3b** werden in 75 ml Äthanol gelöst und unter Normaldruck in Gegenwart von 50 mg Palladium/Aktivkohle (10% Pd) aushydriert.

Nach Absaugen des Katalysators dampft man ab, wobei 90 mg (74,7%) schwach grünliches **3d** zurückbleibt. Die Substanz reagiert Ninhydrin positiv und wandert auf der Kieselgel-Dünnsschichtplatte, LS III, einheitlich und deutlich langsamer als **3b**. R_f -Wert von **3b** 0,4; R_f -Wert von **3d** 0,3.

N-(6-Amino-hexyl)-tryptamin-Derivat von Sepharose 4B (9a)

3,0 g CNBr-Sepharose 4 B lässt man 10 min in 100 ml 10⁻³ N Salzsäure quellen und wäscht auf der Glasfritte 5 min mit 150 ml Salzsäure der gleichen Konzentration. Währenddessen löst man 120 mg (0,46 mmol) **3a** in 50 ml Dimethylformamid und 25 ml Wasser, das 2,0 g Natriumchlorid enthält und stellt mit Salzsäure den pH-Wert auf 10,5 ein. Die auf einer Glasfritte abgesaugte CNBr-Sepharose 4 B wird in die Lösung von **3a** eingetragen und 3 Stunden bei 10 °C geschüttelt. Nach Zugabe von 20 ml 1 M Äthanolamin, das mit konz. Salzsäure auf einen pH-Wert von 10 eingestellt ist, schüttelt man noch eine weitere Stunde. Das Sepharose 4 B-Derivat **9a** wird abgesaugt (Glasfritte) und alternierend mit 0,1 M Na-Formiatpuffer pH 3,5 und 0,1 M Na-Carbonatpuffer pH 10, die beide 1 M Natriumchlorid und 30% Dimethylformamid enthalten, dann mit Dimethylformamid freien Puffern gewaschen; zuletzt wäscht man mit saurem Puffer und dest. Wasser. Man erhält 10 ml farbloses Sepharose 4 B-Derivat **9a**, das sich mit van Urks-Reagenz rotviolett färbt.

5-Hydroxy-N-(6-amino-hexyl)-tryptamin-Derivat von Sepharose 4 B (9d)

90 mg (0,33 mmol) **3d** werden analog **9a** mit 3,0 g CNBr-Sepharose 4 B umgesetzt und aufgearbeitet. Man erhält 10 ml bräunliches Sepharose 4 B-Derivat **9d**, das sich mit van Urks-Reagenz stahlblau anfärbt.

5-Methoxy-N-(6-amino-hexyl)-tryptamin-Derivat von Sepharose 4 B (9c)

200 mg **3c** werden in einer Mischung von 30 ml Dimethylformamid/30 ml Waser, die 3,0 g Natriumchlorid enthält, gelöst, mit 5,0 g CNBr-Sepharose 4 B versetzt und wie bei **9a** aufgearbeitet. Man gewinnt 15 ml farbloses Sepharose 4 B-Derivat **9c**, das sich mit van Urks-Reagenz rotviolett anfärbt.

Detergenz-Extraktion synaptischer Rattenhirnmembranen

Synaptische Membranen aus 9 Rattenhirnen werden durch Dichtegradientenzentrifugation nach einer

Methode von De Robertis⁹ modifiziert nach Wesemann⁸ gewonnen. Die vereinigten Inhaltsstoffe der Gradientenzentrifugation, die Membranen in den 1,0/1,1 M und 1,1/1,2 M Saccharoseschichten, werden in 6,0 ml Detergenzlösung (10⁻³ M Tris/HCl-Puffer pH 7,2, 0,1-prozentiges Natriumdodecylsulfat) durch 5 min Schütteln in Lösung gebracht und von wenig ungelöstem Material abzentrifugiert. In 0,2 ml des Überstandes wird der Proteingehalt bestimmt²⁸: 1,6 mg Protein/ml.

Affinitätschromatographie des Detergenzextraktes an Sepharose 4 B und den Sepharose 4 B-Derivaten **9a, **9c** und **9d****

Chromatographiesäulen (0,9 × 10,0 cm) werden entweder mit 10 ml Sepharose 4 B oder 10 ml der Sepharose 4 B-Derivate **9a**, **9c** bzw. **9d** gefüllt (Füllhöhe 8 cm) und mit Detergenzpuffer äquilibriert. Nach Auftragen von 0,8 ml Detergenzextrakt wird mit Detergenzpuffer steigender Ionenkonzentration eluiert: 1. 15 ml Detergenzpuffer, 2. 15 ml 0,5 M Natriumchlorid in Detergenzpuffer, 3. 40 ml 0,5 M Natriumchlorid in Detergenzpuffer, der 1% Natriumdodecylsulfat enthält. Die Chromatographie wird bei 280 nm optisch verfolgt und in den Eluaten der Proteingehalt bestimmt. Das Elutionsprofil (Extinktion bei 280 nm/Elutionsvolumen) der Chromatographie an Sepharose 4 B zeigt nach Elution mit Detergenzpuffer nur ein Adsorptionsmaximum mit Schulter (Zone I), während nach Chromatographie an den Sepharose 4 B-Derivaten **9a**, **9c** und **9d** zusätzlich ein zweites Maximum (Zone II) nach Elution mit 0,5 M Natriumchlorid in 1,0% Natriumdodecylsulfatpuffer auftritt (vgl. Abb. 1 – 4!).

Aufgetragene Proteinmenge: 1,4 mg.

Eluierte Proteinmengen:

	Zone I [mg]	Zone II [mg]
Sepharose 4 B	1,30	–
9a	0,30	0,70
9c	0,30	0,75
9d	0,25	0,75

Diese Arbeit wurde mit Unterstützung der Deutschen Forschungsgemeinschaft durchgeführt.

Fräulein Ruthild Hetché möchten wir für wertvolle Mitarbeit bei der Synthese danken.

- ¹ R. W. Olson, J. C. Meunier u. J. P. Changeux, FEBS Letters **28**, 96 [1972].
- ² J. Schmid u. M. A. Raftery, Biochem. Biophys. Res. Commun. **49**, 572 [1972].
- ³ R. P. Klett, B. W. Fulpius, D. Copper, M. Smith, E. Reich u. L. Posani, persönliche Mitteilung.
- ⁴ I. A. Michaelson u. V. P. Whittaker, Biochem. Pharmacol. **12**, 203 [1963].
- ⁵ E. De Robertis, Proceedings of the International Union of Physiological Sciences, Vol. IV, p. 411, Excerpta Medica Foundation, Amsterdam 1965.
- ⁶ M. H. T. Roberts u. D. W. Straughn, J. Physiol. (London) **193**, 269 [1967].
- ⁷ T. N. Chase, R. J. Katz u. I. J. Kopin, J. Neurochem. **16**, 607 [1969].
- ⁸ W. Wesemann, FEBS Letters **3**, 80 [1969].
- ⁹ E. De Robertis, Science **156**, 907 [1967].
- ¹⁰ J. K. Inman u. H. M. Dinzis, Biochemistry **8**, 4075 [1969].
- ¹¹ G. Kay u. D. M. Lilly, Biochim. Biophys. Acta **198**, 276 [1970].
- ¹² H. H. Weetall, Biochim. Biophys. Acta **212**, 1 [1970].
- ¹³ P. Cuatrecasas, M. Wilchek u. C. B. Anfinsen, Proc. Nat. Acad. Sci. USA **61**, 636 [1968].
- ¹⁴ R. Axen, J. Porath u. S. Ernback, Nature **214**, 1302 [1967].
- ¹⁵ R. Axen u. S. Ernback, Europ. J. Biochem. **18**, 351 [1971].
- ¹⁶ L. Ahrgren, L. Kagedal u. S. Akerström, Acta Chem. Scand. **26**, 285 [1972].
- ¹⁷ J. R. Vane, Brit. J. Pharmacol. **14**, 87 [1959].
- ¹⁸ J. Offermeier u. E. J. Ariëns, Arch. Int. Pharmacodyn. **164**, 192 [1966].
- ¹⁹ R. J. Boakes, P. B. Bradley, I. Briggs u. A. Dray, Brain Res. **15**, 529 [1969].
- ²⁰ L. Kier, J. Pharm. Sci. **57**, 1188 [1968].
- ²¹ M. E. Speeter u. E. C. Anthony, J. Am. Chem. Soc. **76**, 6208 [1954].
- ²² C. S. Marvel, J. R. Elliott, F. E. Boettner u. H. Yuska, J. Am. Chem. Soc. **68**, 1681 [1946].
- ²³ H. Hartmann u. E. Holler, Eur. J. Biochem. **16**, 80 [1970].
- ²⁴ A. Kalir u. S. Szara, J. Med. Chem. **9**, 341 [1966].
- ²⁵ W. J. Welstead, J. P. Da Vanzo, G. C. Helsley, C. D. Lunsford u. R. Taylor, J. Med. Chem. **10**, 1015 [1967].
- ²⁶ P. Cuatrecasas u. I. Parikh, Biochemistry **11**, 2291 [1972].
- ²⁷ W. C. Chan u. M. Takahashi, Biochem. Biophys. Res. Commun. **37**, 272 [1969].
- ²⁸ O. H. Lowry, N. J. Rosenbrough, A. L. Farr u. R. J. Randall, J. Biol. Chem. **193**, 265 [1961].
- ²⁹ J. A. Davies, C. H. Hassal u. I. H. Rogers, J. Chem. Soc. (C) **1969**, 1358.