

ANGEWANDTE CHEMIE Supplement

Jahrgang/Volume 1982

Manuskriptseiten/Manuscript Pages 1-2055

Herausgegeben von
A Journal of

Gesellschaft Deutscher Chemiker

Kuratorium
Advisory Board

J. Thesing, K. H. Büchel, K. Decker, B. Franck, J.-M. Lehn, H. Pommer,
H. Schmidbaur, H. G. von Schnering, G. Tölg, E. Vogel, A. Weiss, K. Weissermel

Redaktion, Editors

P. Göllitz, G. Kruse, I. G. Neil, O. Smrekar, A. Stimson

Pappelallee 3
D-6940 Weinheim
Federal Republic of Germany
Tel. (06201) 602-1
Telex 465 516 vchwh d

Verlag
Publishers



Verlag Chemie GmbH
P.O. Box 1260/1280
D-6940 Weinheim
Federal Republic of Germany
Tel. (06201) 602-1
Telex 465 516 vchwh d

Dieses Manuskript ist
zu zitieren als
Angew. Chem. Suppl.
1982, 1050-1060

This manuscript is
to be cited as
Angew. Chem. Suppl.
1982, 1050-1060

© Verlag Chemie GmbH, D-6940 Weinheim, 1982
0721-4227/82/0606-1050\$02.50/0

Zwei milde, regioselektive Abbaumethoden von Biliprotein-Chromophoren**

Von Werner Kufer, Corinna Krauss und Hugo Scheer*

Biliproteine sind wichtige Rezeptorpigmente der Photosynthese (Phycobiliproteine) und der pflanzlichen Photomorphogenese (Phytochrom, Phycochrome) /1/. Die Gallenfarbstoff-Chromophore sind kovalent über eine Thioether-Bindung an Ring A an das Protein gebunden /3/, eine zweite Bindung ist umstritten /4/. Eine wesentliche chemische Methode zur Strukturaufklärung des Chromophor-teils war bisher der Chromsäureabbau /5/. Eine prinzipielle Limitierung dieses Verfahrens ist jedoch der Verlust von Information über Substituenten an α -pyrrolischen (C-4, 6, 9, 11, 14, 16) und Methin-Positionen (C-5, 10, 15). Wegen des niedrigen pH-Wertes beim Abbau sind auch Aussagen über eine zweite Bindungsstelle schwierig /4/. Es sind deshalb Verfahren wünschenswert, bei denen das Tetrapyrrolgerüst weniger weit und unter milderer Bedingungen abgebaut wird. Es werden hier erstmals zwei solche Abbauprozesse

* Prof. Dr. H. Scheer, Dr. W. Kufer, Dr. C. Krauss
Botanisches Institut der Universität München,
Menzinger Straße 67, D-8000 München 19

** Untersuchungen an pflanzlichen Gallenfarbstoffen. 10. Mitteilung, 9. Mitteilung: C. Krauss und H. Scheer, Photochem. Photobiol. 34, (1981) 385.

- 1048 -

- 1050 -

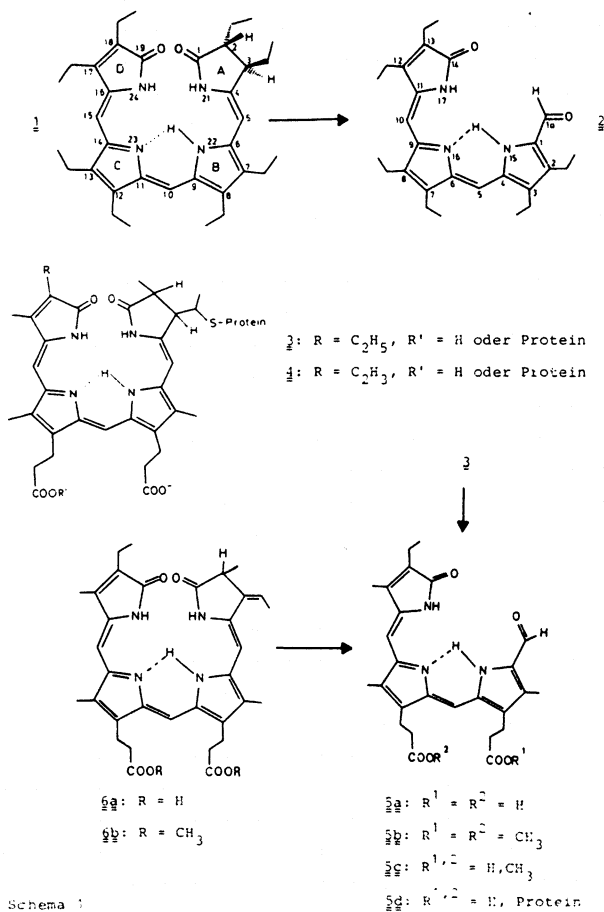
beschrieben, welche die Chromophore selektiv zwischen den Ringen A und B bzw. den Ringen B und C spalten. Sie sind gleichzeitig ein Beispiel dafür, wie die Reaktivität von Gallenfarbstoffen durch kontrollierte Oxidation bzw. Reduktion gezielt beeinflusst werden kann, und sind damit von genereller Bedeutung für regio-selektive Reaktionen und die Analytik von Gallenfarbstoffen.

Bei der ersten Reaktion (Schema 1) erfolgt eine regioselektive Spaltung an der C-5 Methinbrücke. Der kontrollierte Abbau von Biliverdinen zu Formyltripyrinonen gelang durch Photooxy-generierung /6/, Behandlung mit Thalliumtrifluoracetat /7/ oder elektrochemisch /8/. Bei A-Dihydrobilinen ist eine glatte regio-selektive Spaltung an C-5 möglich /6/. Der Zink-Komplex von 1 verliert unter schwach basischen Bedingungen den hydrierten Ring A unter Bildung von 2. Da das Konjugationssystem von 1 dem von Phycocyanin 3 und Phytochrom P_{fr} 4 entspricht, erschien diese Reaktion als mildes Abbauprozess für Biliproteine geeignet.

3 aus Spirulina platensis (0.05 mM) wurde durch Zugabe von Harnstoff (8 M) entfaltet /9/. Bei Zugabe von Zinkacetat (0.05 mM) und Titration mit NaOH auf pH 9.5 bildet sich das charakteristische Zwischenprodukt /5/ ($\lambda_{max} = 720$ nm, Fig. 1), welches innerhalb von 8 min zum Zink-Komplex von 5_b reagiert (Fig. 1). Bemerkenswert ist bei diesem Produkt das im Vergleich zu Zn-2 /6/ geänderte Intensitätsverhältnis der beiden Banden bei etwa 620 und 580 nm. Es handelt sich dabei um eine Solvatochromie, wobei vermutlich das Gleichgewicht von zwei unterschiedlich komplexierten Tautomeren von 5_b /6/ verschoben wird. So beträgt z.B. beim Zn-Komplex von 5_a das Intensitätsverhältnis der längerwelligen zur kürzerwelligen Bande in Methanol 1.75, in wässriger Lösung (pH 7.5) jedoch nur 0.5. Tryptisch abgebaute: 3 reagiert entsprechend. Die beiden Reaktionen unterscheiden sich jedoch dadurch, daß nur im zweiten Fall das freie Tripyriron 5_a bzw. 5_b aus dem Reaktionsgemisch isoliert werden konnte. Die Identifizierung erfolgte durch HPTLC- und absorptionspektroskopischen Vergleich sowohl der freien Säure 5_a (Toluol/Eisessig

- 1049 -

- 1051 -



Schema 1

- 1052 -

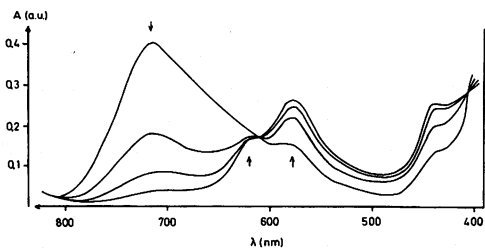


Fig. 1: Absorptionsspektroskopische Verfolgung der Oxygenierung von Harnstoff (8 M)-denaturiertem Phycocyanin $\underline{3}$ in Tris-Puffer (pH 10) in Gegenwart einer äquimolaren Menge Zinkacetat. Die Spektren wurden jeweils im Abstand von 2 min aufgezeichnet.

	$\underline{5a}$	$\underline{5c}$
UV-Vis: Freie Base:	526,497	526,498
λ (nm), Kation:	582,320	578,320
in MeOH, Zink-Komplex:	614,572	616,572
¹ H-NMR Freie Base:	9.82 (CHO), 6.80 (5-H), 5.85 (10-H), 3.67, 3.65 (2 x OCH ₃)	9.85 (CHO), 6.85 (5-H), 5.84 (10-H), 3.66 (1 x OCH ₃)
(δ -Werte) in C ² HCl ₃)		

Tabelle 1: Charakteristische spektroskopische Daten der Formyltripyrinone $\underline{5a}$ und $\underline{5c}$.

- 1053 -

Wasser = 5/5/1; Oberphase) als auch des Dimethylesters $\underline{5b}$ (siehe Arbeitsvorschrift I); erhalten durch Veresterung mit BF₃/MeOH, mit authentischem $\underline{5a}$ (Tabelle 1) bzw. $\underline{5b}$. Letztere wurden aus Phycocyanobilin $\underline{6a}$ bzw. dessen Dimethylester $\underline{6b}$ durch Reaktion mit Zn²⁺ und OH⁻ in Methanol dargestellt.

Die beschriebene Spaltung zwischen den Ringen A und B ist damit zur qualitativen Analytik von Gallenfarbstoffen geeignet. Die relativ milden Reaktionsbedingungen machen sie darüber hinaus auch für die Untersuchung der bisher umstrittenen zweiten Bindungsstelle in Biliproteinen zur Propionsäureseitenkette der Ringe B oder C geeignet. Diese würde auch nach der Spaltung das Tripyriron - Fragment $\underline{2d}$ an das Protein binden. Tatsächlich konnte freies $\underline{2a}$ bzw. $\underline{5b}$ nur nach der Reaktion von tryptisch abgebautem $\underline{3}$ isoliert werden. Da Trypsin neben der Proteolyse auch Ester- oder Amidbindungen zum Chromophor spalten kann, wäre dies ein Hinweis auf die Existenz einer solchen zweiten Bindung. Allerdings ist eine sichere Aussage durch zwei gegenläufige Faktoren erschwert: Einmal ist auch unter den vergleichsweise milden Abbaubedingungen noch eine partielle Hydrolyse möglich, wie die Isolierung des Monomethylesters $\underline{5c}$ (Tabelle 1) aus dem Dimethylester $\underline{6b}$ zeigt. Zum anderen läßt sich bei der Reaktion von denaturiertem $\underline{3}$ das Zn²⁺ nicht mehr vollständig vom Protein trennen. Da Tripyriron gute Komplexbildner sind /10/, könnte dies zu einer Assoziation des Abbauproduktes mit dem Protein führen.

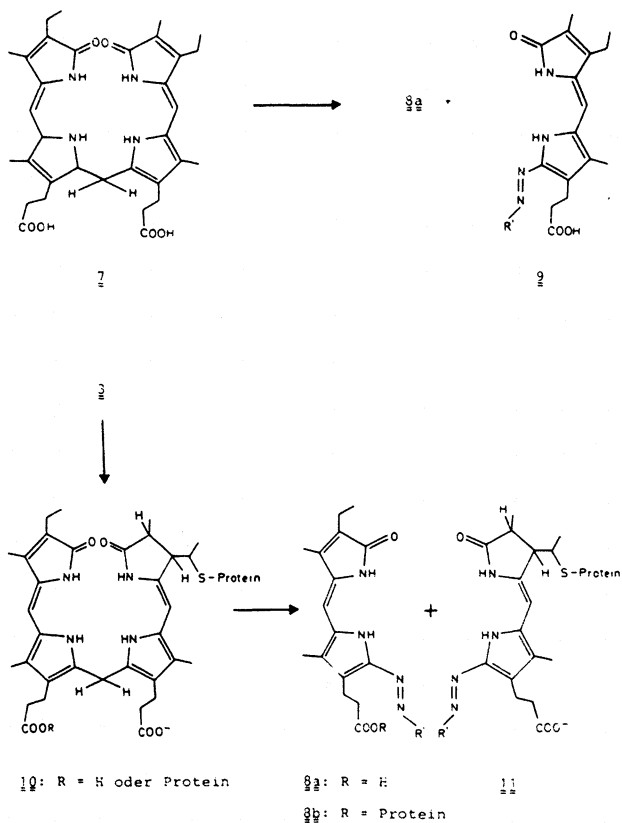
Bei der zweiten Abbaumethode (Schema 2) werden diese Schwierigkeiten weitgehend vermieden. Sie ist zugleich komplementär zur ersten, da sie regioselektiv zwischen den Ringen B und C spaltet. Eine solche regioselektive Spaltung ist insbesondere für Bilirubin bekannt: Die Diazoreaktion ist eine wichtige, auch klinisch genutzte analytische Reaktion dieser Pigmente /11/, bei der z.B. Mesobilirubin /7/ mit aromatischen Diazoniumsalzen zu den Azoverbindungen $\underline{8}$ und $\underline{9}$ reagiert. Die Diazoreaktion ist zwar auf höher oxidierte Gallenfarbstoffe wie die Chromophore von Biliproteinen

- 1054 -

nicht direkt anwendbar, wohl aber nach deren vorheriger Reduktion /12/. Die kürzlich beschriebene selektive Reduktion der Chromophore von Phycocyanin $\underline{3}$ und Phytochrom P_r ($\underline{4}$) zu Rubinen wie $\underline{10}$ /13/ machte einen zweistufigen Abbau praktikabel.

Dazu wurde Phycocyanin $\underline{3}$ im ersten Schritt mit Natriumborhydrid reduziert. Nach Entfernen des überschüssigen Reagens durch Gel-filtration wurde mit 5- bis 10-fachem Überschuß von Diazoniumsalz, z.B. diazotiertem Ethylanthranilat, umgesetzt (siehe Arbeitsvorschrift II). Bei der Reaktion von $\underline{3}$ erhielt man ein Produktgemisch mit einem langwelligeren Absorptionsmaximum bei 486 nm (Fig. 2). Es konnte durch Gelfiltration oder Extraktion mit organischen Lösungsmitteln in zwei Fraktionen aufgetrennt werden, von denen die niedermolekulare bzw. weniger polare bei 522 nm absorbiert. Dieses Absorptionsmaximum ist typisch für die Pyromethenon-Azo -Verbindungen $\underline{8}$ und $\underline{9}$. Die freien Säuren $\underline{8a}$ und $\underline{9}$ sind in dem verwendeten Laufmittel (Chloroform/Ethylacetat = 1:1) /14/ auf Kieselgel nicht trennbar. Nach Veresterung mit Diazomethan erwies sich die 522 nm-Fraktion bei der DC (Benzol/Ethylacetat = 9:1) /15/ als identisch mit authentischem $\underline{8b}$. Es stammt offensichtlich aus den Ringen C und D von $\underline{3}$. Die Identifizierung bedeutet einen unabhängigen Beweis dieser Partialstruktur und zeigt, daß sich die beschriebene Reaktionsfolge zur schonenden qualitativen Analyse von Biliprotein-Chromophoren eignet. Die zweite, hochmolekulare und polare Fraktion hat ein kürzerwelliges Absorptionsmaximum bei 480 nm. Aufgrund dieser Eigenschaften enthält sie wohl proteingebunden das diazotierte Ring-A,B-Fragment des Chromophors $\underline{3}$, welches formal einem 2-Vinylpyrrol entspricht ($\underline{11}$). Eine vorläufige quantitative Analyse des Reaktionsgemisches ergab, daß etwa 14 % der im Rohgemisch bei 520 nm vorhandenen Extinktion ($\underline{8a}$) mit organischen Lösungsmitteln extrahierbar bzw. durch Gelfiltration abtrennbar ist. Damit enthält offensichtlich zumindest ein Teil der Chromophore keine Bindungsstelle an den Ringen C oder D des Tetrapyrrolgerüsts. Phycocyanin $\underline{3}$ enthält drei Chromophore mit unterschiedlicher Proteinumgebung. Das formale

- 1055 -



Schema 1. R' = 1-Ethoxy-carbonyl-phenyl

- 1056 -

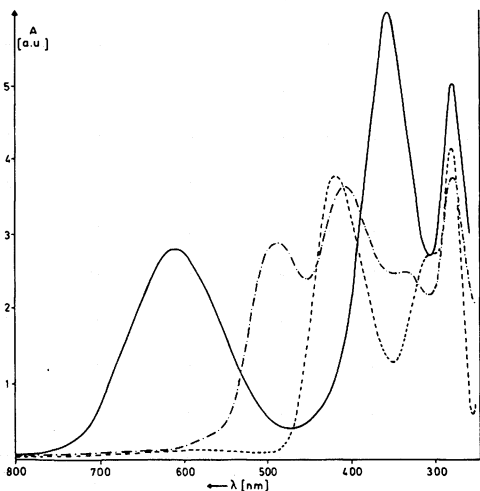


Fig. 2: Reduktion von Phycocyanin 7 mit $NaBH_4$ und anschließende Diazoreaktion. Elektronenangeregungsspektren von: 7 ; denaturiert mit Harnstoff (8 M) in Kaliumphosphatpuffer (10 mM, pH 7.5) (—); nach Umsetzung mit $NaBH_4$ und Entfernen des Reduktionsmittels durch Gelfiltration (-----); nach weiterer Umsetzung mit diazotiertem Ethylanthranilat (-.-.-.-.-).

Defizit an 8 wäre prinzipiell dadurch zu erklären, daß zwei der Chromophore über eine zweite Proteinbindungsstelle verfügen und damit kein freies $8a$ liefern. Eine eindeutige Klärung bedarf jedoch weiterführender Untersuchungen, da (a) die Extinktionskoeffizienten von 11 bisher nicht bekannt sind, (b) Asymmetrie von 10 auch eine unterschiedliche Ausbeute an 8 und 11 möglich macht, und (c) bei der Reaktion ein weiteres Hauptprodukt auf-

- 1057 -

tritt ($\lambda_{max} = 400 \text{ nm}$, Fig. 2). Bei letzterem dürfte es sich um das bereits früher postulierte /16/, die Ringe C,D enthaltende Zwischenprodukte der Diazoreaktion handeln, welches unter den Reaktionsbedingungen gegen einen weiteren Angriff des Diazoniumsalzes stabilisiert ist. Diese auch für den Mechanismus der Diazoreaktion interessanten Punkte werden derzeit untersucht.

Arbeitsvorschriften:

I: 7 mg $6b$ (11.4 μmol) werden in 100 mL Methanol gelöst, mit einer äquimolaren Menge Zinkacetat in Methanol versetzt und mit methanolischer Kalilauge (0.1 M) bis zum Farbumschlag nach hellgrün titriert. Die Mischung wird 15 min im offenen Gefäß gerührt und anschließend zwischen Methylchlorid und Salzsäure (1 mM) verteilt. Die neutral gewaschene organische Phase wird über NaCl getrocknet, im Vakuum eingengt und an Kieselgel H (Merck) chromatographiert (20 x 20 cm Platten, 0.5 mm Schichtdicke, Benzol/Ethanol = 9:1). Als Hauptprodukt wurde $8b$ in 25 % Ausbeute erhalten, daneben entstand $8c$ in 8 % Ausbeute. Als weiteres Nebenprodukt wurde in 5 % Ausbeute ein drittes Pigment mit dem gleichen Absorptionsspektrum wie 7 erhalten, bei dem es sich aufgrund von Modelluntersuchungen mit 1 um ein 1-Carboxytrypyrinon handeln dürfte. In gleicher Weise wurde tryptisch abgebautes (1 h, pH 6.5) bzw. denaturiertes (8 M Harnstoff) Phycocyanin 7 aus *Spirulina platensis* /9/ mit Zn^{2+} bis zum Farbumschlag titriert (Fig. 1), 15 min an der Luft gerührt und durch Extraktion der auf pH 2 gebrachten Reaktionslösung mit 1-Butanol bzw. durch Filtration über Biogel P2 aufgearbeitet.

II: Phycocyanin 7 (50 μM Chromophore) wird in Phosphatpuffer (10 mL, 50 mM, pH 7.5, 8 M Harnstoff) denaturiert und in Eisbad mit 500 μL einer Lösung von $NaBH_4$ (0.48 M) im gleichen Puffer versetzt. Nach 30 min wurde nochmals mit der gleichen Menge $NaBH_4$ versetzt und nach weiteren 30 min bei 4°C über eine Biogel-P2-Säule (2.5 x 18 cm, äquilibriert mit dem gleichen Puffer) filtriert. 2.0 mL dieses Filtrats wurden im Eisbad mit 40 μL Diazoreagens (20 mM) versetzt und 15 min stehengelassen. Zur

- 1058 -

Extraktion von $8a$ wird die Lösung nacheinander mit 2 mL und 1 mL 2-Butanol extrahiert. Die vereinigten Extrakte wurden mit 3 mL Chloroform und 3 mL Wasser versetzt und die organische Phase mit Wasser gewaschen, mit NaCl getrocknet und im Stickstoffstrom eingengt. Zur Veresterung wurde das Pigment in Chloroform gelöst, mit einer etherischen Lösung von Diazomethan versetzt und nach 15 min im Vakuum eingengt zur Chromatographie. Als Vergleichspigmente für die Dünnschichtchromatographie wurde ein Gemisch von $8a$ und 9 durch Umsetzung von Mesobilirubin 7 mit diazotiertem Ethylanthranilat in absolutem Ethanol dargestellt. Die entsprechenden Methylester wurden daraus durch nachfolgende Veresterung mit Diazomethan in Chloroform erhalten.

Danksagung:

Wir danken der Deutschen Forschungsgemeinschaft, Bonn-Bad Godesberg, für die Unterstützung dieser Arbeit, Herrn Prof. C.J. Soeder, Jülich, für eine großzügige Gabe von *Spirulina platensis* und Herrn Prof. W. Rüdiger, München, für fortdauernde Förderung.

- /1/ E. Gantt, *Int. Rev. Cytol.* **66** (1980) 45; A.N. Glazer, *Mol. Cell. Biochem.* **18** (1977) 125; W. Rüdiger, *Ber. Dtsch. Bot. Ges.* **92** (1979) 413; W. Rüdiger, *Struct. Bond.* **40** (1980) 101.
- /2/ H. Scheer, *Angew. Chem.* **93** (1981) 230; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **20** (1981) 241.
- /3/ G. Klein, S. Grombein, W. Rüdiger, *Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem.* **358** (1977) 1077; S. Schoch, G. Klein, U. Linsenmeier, W. Rüdiger, *Liebigs Ann. Chem.* **1976**, 549.
- /4/ E. Köst-Reyes, H.-P. Köst, *Eur. J. Biochem.* **102** (1979) 83; E. Köst-Reyes, H.-P. Köst, W. Rüdiger, *Liebigs Ann. Chem.* **1975**, 1594; G. Muckle, J. Otto, W. Rüdiger, *Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem.* **359** (1978) 345; W. Rüdiger, *Fortschr. Chem. Org. Naturst.* **29** (1971) 60; W. Rüdiger, P.O. Carra, *Eur. J. Biochem.* **7** (1969) 509; R.F. Troxler, A.S. Brown, H.-P. Köst, *ibid.* **87** (1978) 181.

- 1059 -

- /5/ W. Rüdiger, Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem. **350** (1969) 1291
- /6/ H. Scheer, U. Linsenmeier, C. Krauss, Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem. **358** (1977) 185.
- /7/ F. Eivazi, K.M. Smith, J. Chem. Soc. Perkin I. **1979**, 544.
- /8/ F. Eivazi, W.M. Lewis, K.M. Smith, Tetrahedron Lett. **1977**, 3083.
- /9/ W. Kufer, H. Scheer, Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem. **360**, (1979) 955; W. Kufer, H. Scheer, Z. Naturforsch. C **34** (1979) 776.
- /10/ H. Plieninger, K. Stumpf, Chem. Ber. **103** (1970) 2562.
- /11/ P.Ehrlich, Zbl. Klin. Med. **45** (1883) 721; K.P. M. Heirwegh J. Fevery, J.A.T.P. Meuwissen, F. Compennolle, V. Desment, F.P. van Roy, Meth. Biochem. Anal. **22** (1974) 205.
- /12/ Für eine frühere elegante Anwendung von vor- bzw. nachgeschalteten Redoxreaktionen in der Gallenfarbstoffchemie, a. M. S. Stoll, C.H. Gray, Biochem. J. **163** (1977) 59.
- /13/ W. Kufer, H. Scheer, Z. Naturforsch. C. **37** (1982) 179.
- /14/ F. Compennolle, F.H. Jansen, K.P.M. Heirwegh, Biochem. J. **120** (1970) 891.
- /15/ N. Blanckaert, K.P. M. Heirwegh, F. Compennolle, Biochem. J. **155** (1976) 405.
- /16/ D.W. Hutchinson, B. Johnson and A.J. Knell, Biochem. J. **127** (1972) 907.

Eingegangen am 27. Februar 1981, in veränderter Fassung am 21. April 1982 /Z 107 S/