

Theodor Wieland und Edmund Bäuerlein

Modellversuche zur oxydativen Phosphorylierung, VII<sup>1)</sup>

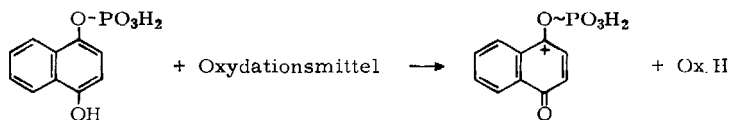
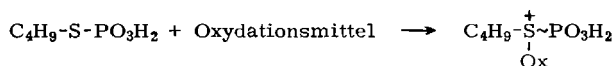
## *N*-Acetyl-homocysteinthiolacton als Vermittler einer oxydativen Synthese von Adenosindiphosphat und Adenosintriphosphat aus Adenosinmonophosphat und Orthophosphat

Aus dem Institut für Organische Chemie der Universität Frankfurt a. M.

(Eingegangen am 23. Juni 1967)

Bei der Oxydation von *N*-Acetyl-homocysteinthiolacton (I) mit Brom in Pyridin entstehen in Gegenwart der Tetrabutylammoniumsalze von Phosphorsäure und Adenosin-5'-monophosphorsäure (AMP) fast 10% Adenosindiphosphat (ADP) und 6% Adenosintriphosphat (ATP), aus Phosphat und ADP über 30% ATP. Die Bildung des ATP läßt sich durch höhere 2,4-Dinitrophenol-Konzentrationen erheblich hemmen, was einer Entkopplung des biologischen Systems der oxydativen Phosphorylierung entspricht.

Der chemische Mechanismus der Umwandlung von freier Oxydationsenergie in die „energiereichen“ Phosphorsäureanhydride der lebenden Zelle, vor allem in ATP, ist bis heute immer noch unbekannt<sup>2)</sup>. Modellversuche, unter diesem Gesichtspunkt im Frankfurter Institut<sup>1)</sup> und an anderen Stellen<sup>3)</sup> ausgeführt, haben zu verschiedenen Derivaten der Phosphorsäure geführt, die durch Oxydation in den Zustand der (durch eine Wellenlinie,  $\sim P$ , gekennzeichneten) energiereichen, d.h. phosphorylierenden Bindungsart übergangen, wie z.B. *n*-Butylthiophosphat (I. bei Lit.<sup>1)</sup>) oder Naphthohydrochinonmonophosphat (II. und III. bei Lit.<sup>1)</sup>).

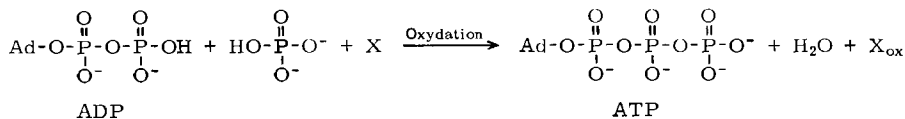


<sup>1)</sup> Als Vorläufer in dieser Serie sollen gelten: I. *Th. Wieland* und *R. Lambert*, Chem. Ber. **89**, 2476 (1956); II. *Th. Wieland* und *F. Pattermann*, Angew. Chem. **70**, 313 (1958); III. *Th. Wieland* und *F. Pattermann*, Chem. Ber. **92**, 2917 (1959); IV. *Th. Wieland* und *E. Bäuerlein*, Chem. Ber. **97**, 2103 (1964); V. *Th. Wieland* und *E. Bäuerlein*, Naturwissenschaften **54**, 80 (1967); VI. *Th. Wieland* und *E. Bäuerlein*, Mh. Chem., im Druck.

<sup>2)</sup> Vgl. z.B. *D. E. Griffiths*, in *P. N. Campbell* und *G. D. Greville*, Essays in Biochemistry, Bd. 1, S. 91, Acad. Press, London und New York 1965.

<sup>3)</sup> Übersicht: *V. M. Clark*, *D. W. Hutchinson*, *A. J. Kirby* und *S. G. Warren*, Angew. Chem. **76**, 704 (1964); Angew. Chem. internat. Edit. **3**, 678 (1964).

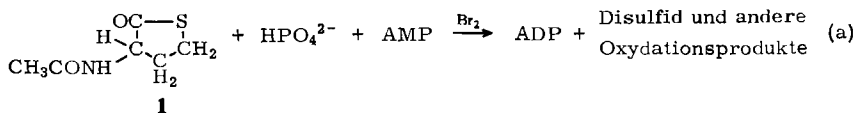
Über diese und mehrere ähnlich gerichtete Versuche anderer Autoren wurde vor kurzem in einer Übersicht berichtet<sup>4)</sup>. Solche Ansätze, wie sie oben formuliert sind, sollen demonstrieren, wie gewisse, auch in der lebenden Zelle denkbare Derivate durch den Oxydationsschritt „aktiviert“ werden können. Diese Versuche bieten jedoch keinen Hinweis dafür, wie die aktivierbaren Verbindungen entstehen könnten, mit anderen Worten, sie sind noch keine Modelle für den Vorgang der Bindung und Aktivierung des anorganischen Phosphats im Zuge der Oxydation eines geeigneten Systems, der eigentlichen „oxydativen Phosphorylierung“:



(X = oxydierbares Substrat, X<sub>ox</sub> = oxydierte Form)

Einen phosphataktivierenden Vorgang konnten wir vor kurzem erstmalig an zwei Monothiohydrochinon-S-methyläthern (IV. in Lit.<sup>1)</sup>) verifizieren<sup>4,5)</sup>: Sie vermittelten bei der Oxydation (mit Brom) eine Kupplung von ADP mit Phosphat zu fast 30% ATP, wenn man in wasserfreiem Pyridin als Lösungsmittel arbeitete. Hier wird nun ein weiteres System vorgestellt, in welchem ebenfalls eine oxydative Phosphorylierung von ADP mit Phosphat gelingt.

Versetzte man *N*-Acetyl-homocysteinethiolacton (**1**) in wäßriger Lösung mit Jod/Jodkaliumlösung, so wurde diese erst im Laufe von mehreren Stunden entfärbt. In Anwesenheit von Phosphat wurde hingegen bei konstantem pH von 7.00–9.00 (pH-Stat) innerhalb von höchstens 30 Min. die dem Thiolacton äquivalente Jodmenge verbraucht. In Anwesenheit der organisch löslichen Tetrabutylammoniumsalze (TBA-Salze) von AMP und Phosphat (P) entstanden bei der Oxydation mit Brom in Pyridin ADP und ATP (Gl. a + b), bei Verwendung von ADP und P hauptsächlich ATP (Gl. b).



Da die Bromoxydation über die Stufe des Disulfids hinausgeht, verwendeten wir in den Versuchsansätzen zur Erreichung optimaler ATP-Ausbeuten eine fünffach äquivalente Bromeinwaage im Vergleich mit den anderen in gleichen Konzentrationen vorliegenden Komponenten. Eine Verringerung der Brommenge verminderte die Ausbeute stark. Die in oft wiederholten Versuchen entstandenen Mengen an ADP und ATP gehen aus der Tabelle hervor.

<sup>4)</sup> Th. Wieland und E. Bäuerlein, *Naturwissenschaften* **54**, 80 (1967).

<sup>5)</sup> Th. Wieland und E. Bäuerlein, *Mh. Chem.*, im Druck.

Ausbeuten an ADP und ATP in Prozent der theoretisch möglichen Menge, die aus den TBA-Salzen von Phosphorsäure, AMP oder ADP bei der Oxydation von *N*-Acetyl-homocysteinethiolacton (I, AcHT) in Pyridin mit verschiedenen Bromeinwaagen und in Abwesenheit oder Gegenwart verschiedener Mengen von 2,4-Dinitrophenol (DNP) entstehen

Vers. Nr.	(TBA) <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	(TBA) <sub>2</sub> AMP	Äquivalente an (TBA) <sub>3</sub> ADP	Brom	AcHT	DNP	Ausbeute (%) ADP	Ausbeute (%) ATP
1	2	1	—	5	2	—	9.3 ± 0.4	6.4 ± 0.5
2	2	1	—	5	2	2	8.05; 9.83	2.80; 3.93
3	2	1	—	5	2	4	3.7; 5.87	0.58; 0.83
4	1	—	1	5	1	—	—	33 ± 5
5	2	—	1	5	2	—	—	31.7
6	1	—	1	2	1	—	—	6.8
7	1	—	1	1	1	—	—	5.5
8	1	—	1	5	1	2	—	11.1; 11.5
9	1	—	1	5	1	3	—	6.3
10	1	—	1	5	1	4	—	6.2

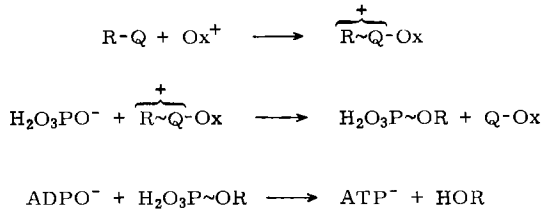
Wie man sieht, wurden bei der oxydativen Phosphorylierung von AMP nahezu 10% ADP und darüber hinaus über 6% ATP gebildet (Nr. 1). Bei Einsatz von ADP — wie es in der lebenden Zelle geschieht — erhielten wir eine durchschnittliche Ausbeute von 33% ATP (Nr. 4) bei diesem Einelektronenübergang; verglichen mit dem biologischen Zweielektronenübergang zum Sauerstoff bedeutet dies eine Ausbeute von durchschnittlich 66% ATP. Eine Steigerung dieser Ausbeute ließ sich durch Verdoppelung der Phosphatmenge und der Thiolactonmenge nicht erreichen (Nr. 5). Herabsetzung der Bromeinwaage führte, wie schon erwähnt, zu einem starken Abfall der ATP-Ausbeute (Nrn. 6 und 7). Die ATP-Ausbeute sank ebenfalls stark ab, wenn sowohl bei der Phosphorylierung von AMP (Nr. 3) als auch bei der von ADP (Nrn. 9 und 10) drei oder vier Mole des notorischen Entkopplers 2,4-Dinitrophenol (DNP) zugegeben wurden. Auch zwei Mole DNP bewirkten schon eine beträchtliche Verminderung der ATP-Ausbeute (Nrn. 2 und 8), während der vorhergehende Phosphorylierungsschritt, der des AMP zu ADP, gegen DNP unempfindlicher zu sein scheint (Nr. 2). Die oxydative Bildung der Pyrophosphatbindung war nicht auf die in der Tabelle angeführten Beispiele beschränkt; ließ man AMP oder ADP aus dem Ansatz weg, so erfolgte zu mindestens 50% Bildung von Diphosphat, aus AMP allein entstand auf oxydativem Weg ebensoviel Di-AMP.

### Zum Mechanismus der beobachteten Reaktionen

Als Gedanke lag der hier geschilderten Untersuchung die einfache Tatsache zugrunde, daß eine Oxydation, d. h. Entzug von Elektronen, eine Positivierung des mit dem oxydierten Atom (Q) verbundenen Restes (R) erwirken sollte. Diese Fortleitung der Elektrophilie sollte benachbarte Stellen jedem nucleophilen Angriff, hier auch dem des wenig nucleophilen Phosphat-Anions, leicht zugänglich machen, d. h. der Bindung zwischen R und Q den Charakter einer „energiereichen“ Bindung verleihen.

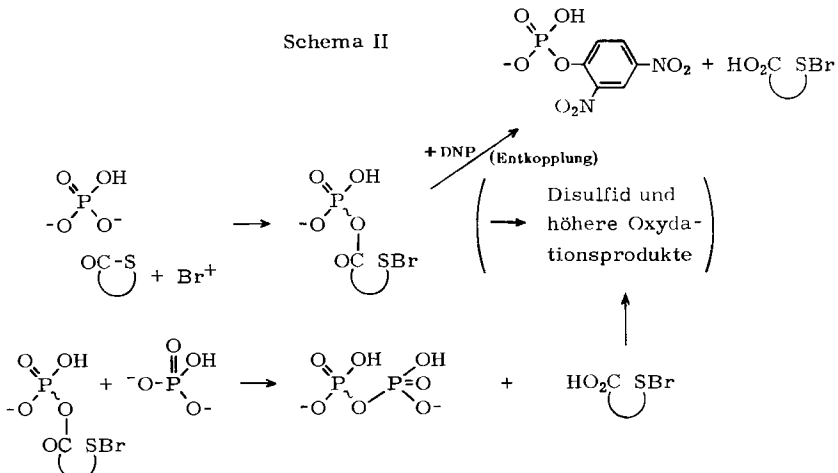
In unserem Fall ist R—Q eine Acylmercaptangruppierung, RCO—SR', der an sich schon ein erhebliches Gruppenübertragungspotential zukommen sollte. Der bei der Hydrolyse, d. h. bei der Übertragung des Acylrestes auf H<sub>2</sub>O, frei werdende Energiebetrag  $\Delta F$  erreicht den Wert von  $-7$  kcal/Mol jedoch nur, wenn die Solvolyseprodukte

Schema I



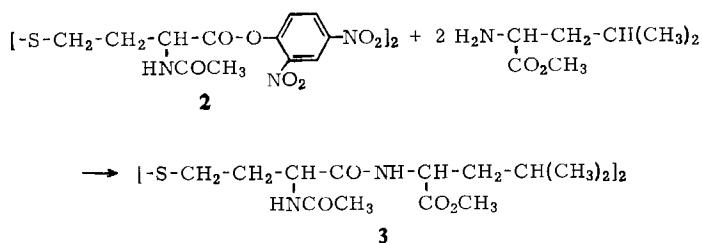
$\text{Ox}^+$  = Oxydationsmittel,  $\text{Q-Ox}$  = Oxydationsprodukt,  $\text{ADPO}^-$  = Anion von ADP

voreinander unabhängig werden, die Entropie des Systems also zunimmt, d.h.  $\Delta S$  einen großen positiven Wert hat. Bei der Hydrolyse unseres  $\gamma$ -Thiolactons (1) bleiben jedoch die Produkte räumlich eng verbunden, so daß die Entropievermehrung wesentlich kleiner sein dürfte; hier handelt es sich nicht um eine energiereiche Verbindung im Sinne der biochemischen Definition. Erst durch die Oxydation, die am Schwefel angreift, wird nach Schema I eine energiereiche Bindung hergestellt, die nun durch Phosphatolyse leicht gespalten werden kann, wobei ein energiereiches Phosphat,  $\text{H}_2\text{O}_3\text{P}\sim\text{OR}$ , gebildet wird. Als nucleophile Ionen können außer Phosphat oder anstelle des Phosphats auch die Anionen von AMP oder ADP angreifen. Deshalb ist im Schema II für alle möglichen Phosphate das Symbol  $-\text{O}-\text{PO}_3\text{H}^-$  benutzt. In jedem Fall entsteht ein Phosphorsäure-Carbonsäureanhydrid, das als energiereiches Phosphat seinen Phosphorylrest auf Phosphat, AMP oder ADP zu übertragen vermag. Der Oxydationsschritt mit Brom ist im Schema II als Anlagerung von  $\text{Br}^+$  formuliert; die S-Bromverbindung wird de facto als Oxydationsmittel mit einem zweiten Thiolacton-Molekül zum Disulfid reagieren (theoret. Bromverbrauch: 1  $\text{Br}_2$  auf 2 Mole Thiolacton 1), das unter Mehrverbrauch weiter oxydiert werden kann.



Die Wirkung des 2,4-Dinitrophenols (DNP), das die ATP-Ausbeute bedeutend verringerte, kann darauf beruhen, daß es die Acylphosphatbindung des intermediären Anhydrids unter Bildung eines Dinitrophenylphosphats solvolysiert. Dabei wäre zu

fordern, daß 2,4-Dinitrophenylphosphat kein Phosphorylierungsmittel für ADP ist (oder ADP-Dinitrophenylester nicht mit Phosphat zu ATP reagieren kann), während aus AMP wohl ADP entstehen kann, wie Versuch Nr. 2 (Tab.) andeutet. Hierüber und über die entkoppelnde Wirkung anderer Verbindungen sollen weitere Untersuchungen angestellt werden. Den Alternativmechanismus der DNP-Wirkung, Angriff auf den Acylkohlenstoff des gemischten Anhydrids unter Bildung eines 2,4-Dinitrophenylesters der Aminosäure, wie er sinngemäß für die Entkopplung des biochemischen Systems vermutet wird<sup>2)</sup>, glauben wir hier ausschließen zu können, da es uns nicht gelang, die energiereiche Acylverbindung durch Peptidsynthese mit Leucin-methylester abzufangen. Der synthetisch bereitete 2,4-Dinitrophenylester des *N,N'*-Diacetyl-homocystins (2) reagierte hingegen bereitwillig mit dem Ester unter Bildung des *N,N'*-Diacetyl-homocystyl-bis-leucin-methylesters (3).



## Beschreibung der Versuche

*N*-Acetyl-homocysteinethiolacton (1) war ein Präparat der Fa. Calbiochem, Luzern. AMP war ein Präparat der Fa. C. F. Boehringer und Söhne, Mannheim-Waldhof. Freie ADP wurde aus dem Trinatriumsalz derselben Herkunft durch Ionenaustausch an einer Dowex 50X-8-Säule (H<sup>+</sup>-Form) von Herrn *H. Aquila* dargestellt.

*Oxydative Phosphatolyse des N-Acetyl-homocysteinethiolactons (1, AcHT) in wäßriger Lösung*<sup>6)</sup>: Im Thermostat von 26° gab man zur Lösung von 0.06 g (0.31 mMol) AcHT in 50 ccm 0.5 *m* wäßr. Phosphat unter Stickstoff 4.0 ccm 0.1 *n* Jod/Jodkalium-Lösung und ließ unter pH-Stat-Kontrolle 0.2 *n* NaOH bei 3 verschieden eingestellten pH-Werten zutropfen. Nach 30 Min. wurde mit 89proz. Phosphorsäure neutralisiert und das unverbrauchte Jod mit 0.1 *n* Thiosulfat zurücktitriert.

Verbrauch an 0.1 *n* Jodlösung bei pH 7.00: 2.85 ccm, bei pH 8.6: 3.47 ccm, bei pH 9.0: 3.37 ccm. Theoret. Verbrauch: 3.12 ccm. Verbrauch nach 30 Min. Inkubation ohne Phosphat: 0.19 ccm.

*Darstellung der Tetrabutylammoniumsalze*: Nach *Cundiff*<sup>7)</sup> und *Markunas*<sup>7)</sup> wurde aus Tetrabutylammoniumjodid und Ag<sub>2</sub>O in absol. Methanol eine *Tetrabutylammoniumhydroxid*-Lösung hergestellt, die mit wasserfreiem Benzol auf 0.1 *n* verdünnt wurde. Durch Versetzen mit dem berechneten Vol. einer 1 *n* Lösung von ca. 89proz. Phosphorsäure in Dioxan und den ber. festen Einwaagen von AMP oder ADP entstanden die verwendeten Phosphat-

<sup>6)</sup> Herrn Dr. *Klaus Mella* vom Institut für Biochemie, im Hause, danken wir dafür, daß er seine große Erfahrung bei den sehr diffizilen pH-Messungen mit der Glaselektrode zur Verfügung gestellt hat.

<sup>7)</sup> *R. H. Cundiff* und *P. C. Markunas*, *Analytic. Chem.* **28**, 792 (1956).

mischungen, nachdem im Rotationsverdampfer und anschließend 30 Min. bei 25° im olpumpenvakuum (0.1 Torr) getrocknet war. Es hinterblieben glasige bis schaumige Massen, z. B.:

(TBA)<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> aus 20.0 ccm *n*/10 (TBA)OH (2 mMol) + 2.0 ccm *n*/1 H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> (2/3 mMol).

(TBA)<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> aus 13.33 ccm *n*/10 (TBA)OH (4/3 mMol) + 2.0 ccm *n*/1 H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> (2/3 mMol).

(TBA)<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> + (TBA)<sub>2</sub>AMP: 13.34 ccm *n*/10 (TBA)OH (4/3 mMol)

(Salzmischung I) 1.34 ccm *n*/1 H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> (4/9 mMol)

0.081 g AMPH<sub>2</sub>·H<sub>2</sub>O (2/9 mMol)

(TBA)<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> + (TBA)<sub>3</sub>ADP: 11.11 ccm *n*/10 (TBA)OH (10/9 mMol)

(Salzmischung II) 0.67 ccm *n*/1 H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> (2/9 mMol)

0.107 g ADPH<sub>3</sub>·3H<sub>2</sub>O (2/9 mMol)

#### Oxydative Phosphorylierungen

*Bildung von Pyrophosphat aus Phosphat (qualitativer Versuch):* Die oben angegebenen TBA-Phosphate wurden unter Rühren in 30 ccm absol. Dioxan gelöst. Zu den Lösungen gab man jeweils 0.053 g AcHT (1/3 mMol), die sich sofort auflösten. Dann tropfte man 16.67 ccm einer *n*/10 Jod- bzw. Brom-Lösung in absol. Dioxan (5/6 mMol) zu und ließ 18 Stdn. unter Rühren reagieren. Nur die Bromfarbe war nach ca. 10 Stdn. verschwunden, während viel Jod noch unverbraucht war. Das Lösungsmittel wurde im Rotationsverdampfer bei 25° entfernt und der Rückstand in 4 ccm 0.05 *m* Tris-Puffer aufgenommen. Die Analyse erfolgte entweder durch Chromatographie auf der Cellulosepulver-Dünnschicht (a) oder zweidimensional auf Filterpapier (b).

(a) Ein von Usher<sup>8)</sup> angegebenes Lösungsmittelgemisch (25 ccm Isopropylalkohol, 25 ccm Wasser, 5 g Trichloressigsäure, 0.3 ccm 20proz. wäßr. Ammoniak) bewährte sich bei der Dünnschichtchromatographie auf 0.25-mm-Schichten von Cellulosepulver (Macherey-Nagel & Co.). R<sub>F</sub> von Orthophosphat 0.60–0.67, von Pyrophosphat 0.31–0.33. In den Oxydationsansatzen waren beide Ionen deutlich mit dem Sprühreagenz von Hanes-Isherwood<sup>9)</sup> nachzuweisen. Ein Teil eines Ansatzes wurde über eine Säule von Dowex 50 X-2, H<sup>+</sup>-Form, in das Gemisch der freien Säuren verwandelt und diese Lösung 45 Min. auf 100° erhitzt. Danach war dünnschichtchromatographisch nur noch Orthophosphat nachzuweisen, da Pyrophosphat unter diesen Bedingungen hydrolysiert wurde.

(b) Die zweidimensionale Papierchromatographie nach Karl-Kroupa<sup>10)</sup>, ausgeführt auf Schleicher & Schüll-Papier 2043 b, zeigte eindeutig das Vorliegen von Pyrophosphat neben Orthophosphat.

Die oxydative Kupplung zweier Phosphat-Ionen zu Pyrophosphat konnte in mindestens ebenso erfolgreicher Weise auch in wasserfreiem Pyridin als Lösungsmittel erzielt werden. Pyridin erwies sich unter den angeführten ausprobierten Lösungsmitteln bei den anschließend zu schildernden oxydativen Phosphorylierungen als weitaus bestes Lösungsmittel. Die anderen waren: Dioxan, Dimethylformamid und Dimethylacetamid (gerade noch brauchbar) und Dioxan/Dimethylformamid (mäßig brauchbar).

*Bildung von ADP und ATP (quantitative Versuche):* Die oben (S. 3874) geschilderten Mischungen der TBA-Phosphate und Nucleotide wurden jeweils in 10 ccm absol. Pyridin unter Rühren mit einem Magnetstab gelöst. Zu den schwach gelben Lösungen wurde AcHT zugegeben, das sofort in Lösung ging. Dann tropfte man das 5fache der berechneten Brom-Menge unter Magnetruhmung innerhalb 1 Min. zu. Es schied sich ein Niederschlag ab.

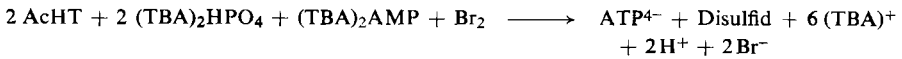
<sup>8)</sup> D. A. Usher, J. Chromatogr. [Amsterdam] **12**, 262 (1963).

<sup>9)</sup> C. S. Hanes und F. A. Isherwood, Nature [London] **164**, 1107 (1947).

<sup>10)</sup> E. Karl-Kroupa, Analytic. Chem. **28**, 1093 (1956).

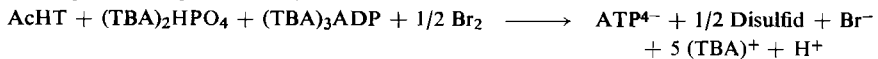
Danach wurde noch 1 Stde. weitergerührt und jeder Ansatz zur Bestimmung der ADP- und ATP-Ausbeuten aufgearbeitet.

*Phosphorylierung von AMP* (Gl. a + b, S. 3870)



Ansatz: Salzmischung I (S. 3874), 0.071 g AcHT (4/9 mMol) in 10 ccm absol. Pyridin + 0.057 ccm Br<sub>2</sub> (5fach ber. Menge).

*Phosphorylierung von ADP* (Gl. b, S. 3870)



Ansatz: Salzmischung II (S. 3874), 0.036 g AcHT (2/9 mMol) in 10 ccm absol. Pyridin + 0.028 ccm Br<sub>2</sub> (5fach ber. Menge).

Die einzelnen Oxydationslösungen wurden bei 30° i. Vak. eingengt, die Rückstände in soviel 0.05 *m* Tris-Puffer vom pH 7.55 gelöst, daß ein Endvolumen von 2–4 ccm resultierte. Diese konzentrierte Lösung konnte in 0.1-ccm-Portionen auf 20 × 20 ccm-Platten an 0.5 mm-Schichten aus Kieselgel HF (Merck) in *n*-Propanol/Ammoniak (25proz./Wasser (6 : 3 : 1 Vol.)<sup>9)</sup> chromatographisch getrennt werden. Hierzu wurde von jedem Ansatz je ein Fünftel auf zwei Platten als breite Startbande aufgetragen. Durch 2–3 maliges Aufsteigenlassen nach jeweiliger Luft- oder Föntrocknung trennten sich AMP, ADP und ATP vollständig (in dieser Reihenfolge langsamer wandernd). Die einzelnen Banden wurden unter der UV-Lampe (254 nm) identifiziert und von der Platte geschabt. Die Gelpartionen wurden dann in eine 1 × 10 cm-Säule, auf eine 1 cm dicke Kieselgelschicht gefüllt, mit 0.05 *m* Tris-Puffer von pH 7.55 unter Kontrolle des Eluats mit einem registrierenden UV-Durchflußphotometer (Uvicord, LKB Stockholm) eluiert, bis keine Absorption mehr angezeigt wurde. Dann wurden die Eluate zum Zweck der Gehaltsbestimmung mit demselben Puffer auf 25 ccm aufgefüllt (Testlösung).

*Quantitative Bestimmung von ADP und ATP:* Die Auswertung wurde auf enzymatischem Weg mit gekoppelten spezifischen Methoden im Photometer Eppendorf (3-ccm-Küvetten) vorgenommen, und zwar derartig, daß eine dem ADP- oder ATP-Gehalt proportionale Abnahme der Konzentration an hydriertem Nicotinamid-Adenindinucleotid (NADH) bei 366 nm colorimetrisch gemessen wurde<sup>11)</sup>.

Der auf der Bildung von 1,3-Diphosphoglycerat aus 3-Phosphoglycerat und ATP beruhende Test nach *Bücher*<sup>11)</sup>, bei welchem ADP entsteht, ließ sich nach *Gruber* u. a.<sup>12)</sup> nach Myokinaseeinwirkung kontrollierend repetieren, da hierbei aus 2 ADP wieder ATP (neben AMP) entsteht. Die ADP-Bestimmung erfolgte mit Pyruvatkinase und Phosphoenolpyruvat nach *Adam*<sup>11)</sup>, wobei die entstandene Brenztraubensäure durch NADH in Gegenwart von Lactatdehydrogenase spezifisch reduziert wird.

Die durch enzymatische Analysen ermittelten Ausbeuten an ADP und ATP sind in der Tabelle (S. 3871) zusammengestellt.

*Hemmungsversuche mit 2,4-Dinitrophenol:* Die Hemmungsversuche wurden so angestellt, daß die jeweilige Menge DNP vor dem AcHT-Zusatz in der Reaktionslösung der AMP- oder ADP-Phosphorylierung (S. 3874) aufgelöst wurde und dann, wie oben, oxydiert wurde.

<sup>11)</sup> s. in *H. U. Bergmeyer*, Methoden der enzymatischen Analyse, Verlag Chemie, Weinheim Bergstraße 1962.

<sup>12)</sup> *W. Gruber, H. Moellering und H. U. Bergmeyer*, *Enzym. biol. clin.* **7**, 115 (1966).

Vor der dünn-schichtchromatographischen Nucleotidtrennung wurde auf derselben Platte das DNP durch Aufsteigenlassen einer Mischung von Chloroform/Äthanol (4 : 1) abgetrennt<sup>13)</sup>. Die Ergebnisse der Hemmversuche sind in der Tabelle (S. 3871) enthalten.

*N.N'*-Diacetyl-homocystyl-bis-leucin-methylester (3): 1.06 g *N.N'*-Diacetyl-homocystin<sup>14)</sup> (3.0 mMol) wurden in 30 ccm absol. Pyridin bei 0—3° durch portionsweise Zugabe von 2.25 g *Bis-dinitrophenyl-carbonat*<sup>15)</sup> (5.7 mMol) und  $\frac{1}{2}$ stdg. Weiterrühren nach Wegnahme der Kühlung in den *N.N'*-Diacetyl-homocystin-bis-dinitrophenylester (2) verwandelt. Dann wurden 1.09 g *L-Leucin-methylester-hydrochlorid* (6.0 mMol) zugesetzt, die sofort in Lösung gingen. Nach 2stdg. Rühren wurde das Lösungsmittel i. Vak. verdampft, der Rückstand in 50 ccm Chloroform gelöst und die Lösung mit je 3 × 30 ccm *n* HCl, 30ccm Wasser und 6 × 30ccm 2proz. Phosphatpuffer vom pH 8.5 so lange ausgeschüttelt, bis die alkalische Lösung farblos blieb. Die Chloroformphase wurde mit MgSO<sub>4</sub> getrocknet und i. Vak. zur Trockne gebracht. Es hinterblieb ein schwach gelber amorpher Rückstand von 0.7 g (38%), der in der Dünn-schichtchromatographie auf Kieselgel mit Methanol oder Chloroform/Methanol (10 : 1) als ein Flecken lief (*R<sub>F</sub>* 0.90 bzw. 0.65). Die chromatographische Aminosäureanalyse (Unichrom, Beckman, München) des Hydrolysats mit 6*n* HCl (12 Std.), in dem ein Teil der schwefelhaltigen Aminosäure zerstört war, zeigte ein Verhältnis von Homocystin : Leucin wie 1 : 1.17.

<sup>13)</sup> Dipl.-Arbeit *H. Aquila*, Frankfurt a. M. 1967.

<sup>14)</sup> *V. du Vigneaud*, J. biol. Chemistry **119**, 49 (1937).

<sup>15)</sup> *R. Glatthard* und *M. Mattern*, Helv. chim. Acta **46**, 804 (1963).