

Theodor Wieland und Heinrich Aquila

Modellversuche zur oxydativen Phosphorylierung, IX¹⁾

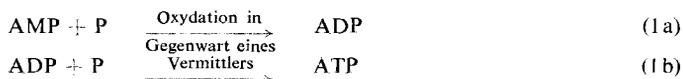
Thiazolidone als Vermittler einer oxydativen Phosphorylierung von Adenosinmonophosphat und -diphosphat

Aus dem Institut für Organische Chemie der Universität Frankfurt am Main

(Eingegangen am 1. April 1968)

Bei der Oxydation von Thiazolidon-(2) (**1a**), seinem *N*-Phenyl- (**1b**) und *N*-Methylderivat (**1c**) sowie der *N*-Acetylverbindung (**1d**) in Anwesenheit der Tetrabutylammoniumsalze von Orthophosphorsäure und AMP bzw. ADP mit Brom entsteht ATP in einer Ausbeute bis zu 33%. Am besten wirkt der unsubstituierte Heterocyclus **1a**, am schlechtesten seine *N*-Methylverbindung **1c**. Pyridin nimmt als Lösungsmittel eine Vorzugsstellung ein, in Acetonitril, Dimethylformamid oder Dimethylacetamid werden geringere Ausbeuten erhalten. Aus einem mMol-Ansatz wurden 40 mg Li-Salz von ATP isoliert.

Die Synthese der „energiereichen“ Phosphorsäureanhydridbindung aus Orthophosphorsäure (P) und Adenosin-monophosphat (AMP) oder -diphosphat (ADP) unter Verwendung der bei der Oxydation verfügbaren freien Energie (Gl. 1a, b) ist kürzlich im hiesigen Laboratorium mit zwei Systemen gelungen^{2,3)}.



Es entstanden ADP und ATP, wenn Mischungen von AMP und P als Tetrabutylammonium(TBA)-Salze in Pyridin in Gegenwart von *S*-Alkyl-monothiohydrochinonen²⁾ oder von *N*-Acetyl-homocysteinethiolacton³⁾ oxydiert wurden. Bei der Auswahl dieser Systeme war auch der Gesichtspunkt einer Ähnlichkeit zum biologischen Vorgang bestimmend. Die Thiolactongruppierung erschien uns als Verbindung der Kondensation einer SH-Gruppe und einem Carboxyl an einem Biomakromolekül in der lebenden Zelle möglich. Ebenso kann man sich das Vorkommen von Carb-

¹⁾ VIII. Mitteil.: *Th. Wieland* und *H. Aquila*, *Angew. Chem.* **80**, 190 (1968); *Angew. Chem. internat. Edit.* **7**, 213 (1968).

²⁾ *Th. Wieland* und *E. Bäuerlein*, *Mh. Chem.* **98**, 1381 (1967).

³⁾ *Th. Wieland* und *E. Bäuerlein*, *Chem. Ber.* **100**, 3869 (1967).

höhung der Temperatur von 20 auf 40° brachte keine wesentliche Erhöhung der Ausbeuten. Nun wurden die Thiazolidone **1a–d** in verschiedenen Lösungsmitteln als Vermittler der oxydativen ADP- und ATP-Bildung aus P + AMP (Gl. 1a + b) mit 2 Mol Brom pro Mol AMP als Oxydationsmittel verglichen. Die Ergebnisse zeigt Tab. 1.

Tab. 1. Ausbeuten an ADP und ATP bei der Brom-Oxydation einiger Thiazolidone-(2) (**1a–d**) (0.4 mMol) in Gegenwart der TBA-Salze von P (0.4 mMol) und AMP (0.2 mMol) in einigen wasserfreien Lösungsmitteln. 30 Min. bei 0°, 2 Stdn. bei 20°

Heterocyclus	Pyridin	% ADP: % ATP in		
		Acetonitril	Dimethylformamid	Dimethylacetamid
1a	8.0 : 3.8	5.0 : 0.2	3.8 : 2.6	3.5 : 1.5
1b *)	5.0 : 2.7			
1c	0.9 : 0	0.3 : 0.2	0.2 : 0	0.5 : 0
1d	4.4 : 3.3	7.0 : 0.7	4.3 : 1.3	4.7 : 1.9
ohne	0.1 : 0			

*) Bei Anwendung von 2.0 mMol Brom. Bei 0.4 mMol wird durch Nebenreaktionen zu gefärbten Produkten dem Ansatz das meiste Oxydationsmittel entzogen.

Man erkennt die Vorzugsstellung des Pyridins als Lösungsmittel und einen sehr starken negativen Einfluß der *N*-Methylgruppe im Thiazolidon **1c**, während die Acetylgruppe (**1d**) den Vorgang nicht deutlich beeinflusst. Besonders gut sichtbar wird der Vorteil des Pyridins gegenüber dem Acetonitril bei der oxydativen Phosphorylierung von ADP zu ATP (Gl. 1 b) unter Thiazolidon-Vermittlung (Tab. 2).

Tab. 2. Ausbeuten an ATP aus ADP (0.2 mMol) und P (0.2 mMol) bei der Oxydation mit Brom (0.2 mMol) mit Vermittler **1a** und **1d** (je 0.2 mMol) in Pyridin und Acetonitril, z. T. in Gegenwart von 2.4-Dinitro-phenol. 30 Min. bei 0°, 2 Stdn. bei 20°

Vermittler	Mol 2.4-Dinitro-phenol pro Mol ADP	Pyridin	% ATP in	
			Pyridin	Acetonitril
1a	0	33.4		7.7
	0*)	27.6		
	1	27.2		
	3	17.3		
1d	0	22.3		4.8
	1	23.5		

*) Oxydationsdauer 15 Min. bei 0°.

Beachtenswert ist hier die hohe ATP-Ausbeute in Pyridin, die schon nach 15 Minuten erreicht wird. Acetonitril läßt dagegen nur kleine ATP-Mengen entstehen. 3 Mol des Entkopplers 2.4-Dinitro-phenol, die beim *N*-Acetyl-homocysteinethiolacton die oxydativ erzielte ATP-Ausbeute von 33 auf ca. 6% sinken ließen³⁾, wirken sich im vorliegenden System bedeutend weniger hemmend aus.

Zur Erklärung der beobachteten Effekte sei nochmals der vermutete Mechanismus formuliert, dessen erster Schritt in einer oxydativen Phosphatolyse des Thioacylteils bestehen dürfte. In Abwesenheit von Phosphat ist das Thiazolidon gegen Brom

Beschreibung der Versuche

N-Phenyl-thiazolidon-(2) (**1b**): 30 g des *Anils* von **1b**⁹⁾ in 80 g Pyridin wurden unter Kühlung mit ca. 50 ccm konz. *Salzsäure* versetzt. Man dampfte i. Vak. so lange ein, bis bei 80° Badtemp. kein Wasser mehr überdestillierte, und erhitze 18 Stdn. im Ölbad auf 190°. Nach dem Abkühlen wurde mit 400 ccm Wasser verdünnt und mit konz. Ammoniumhydroxid-Lösung auf pH 5 gebracht. Das hierbei abgeschiedene braune Öl wurde in 100 ccm Chloroform aufgenommen, die Lösung zur Entfernung von Ausgangssubstanz 3 mal mit je 20 ccm 2*n* HCl ausgeschüttelt, nach Trocknen mit Na₂SO₄ über 20 g Kieselgel filtriert und nach Waschen mit Chloroform i. Vak. eingedampft. Der Rückstand wurde 3 mal aus Methanol umkristallisiert, das Kristallisat mit den durch Cyclohexan-Extraktion der eingedampften Mutterlaugen erhaltenen Fraktionen vereinigt und gemeinsam aus Äthanol/Wasser umkristallisiert. 7.5 g (35%) schwach hellbraune Nadeln vom Schmp. 15°. Aus Cyclohexan farblose Nadeln vom Schmp. 78° (Lit.⁶⁾: 81°).

N-Acetyl-thiazolidon-(2) (**1d**): 2.3 g Thiazolidon-(2) (**1a**)⁵⁾ wurden mit 5 g wasserfreiem *Natriumacetat* in 20 ccm *Acetanhydrid* 6 Stdn. unter Rückfluß erhitzt. Nach Abdampfen i. Vak. wurde der Rückstand mehrmals mit je 20 ccm Benzol ausgekocht und nach Abdampfen des Benzols bei 0.1 Torr zwischen 70 und 90° destilliert. Durch Umkristallisieren aus Cyclohexan erhielt man 2.4 g (75%) farblose Nadeln vom Schmp. 63°.

C₅H₇NO₂S (145.1) Ber. C 41.38 H 4.86 N 9.65 Gef. C 41.46 H 4.76 N 9.98

Oxydative Phosphorylierungen

Die verwendeten Nucleotide waren Präparate der Firma C. F. Boehringer und Söhne, Werk Tutzing.

a) *Bildung von ADP und ATP aus Phosphat und AMP*: 73.0 mg AMP·H₂O (0.2 mMol) wurden in ein 50-ccm-Rundkölbchen eingewogen. Dazu wurden 10 ccm einer aus *Tetra-n-butylammoniumjodid* und *Silberoxid* nach I. c.⁹⁾ hergestellten 0.1 *m* TBA-Hydroxid-Lösung (1 mMol) und 1.15 ccm 0.35 *m* Phosphorsäure-Lösung in Dioxan (0.4 mMol) pipettiert. Der Ansatz wurde im Rotationsverdampfer bei 30° Badtemp. i. Vak. eingengt, anschließend wurden flüchtige Reste durch 1/2stdg. Evakuieren an einer Ölpumpe entfernt. Man löste in 9 ccm des jeweiligen wasserfreien Lösungsmittels und gab 0.4 mMol des zu untersuchenden Thiazolidons zu. Bei 0° wurde jetzt unter Rühren mit einem Magnetstab 1 ccm einer eiskalten Lösung von 0.11 ccm *Brom* in 5 ccm desselben Lösungsmittels (0.4 mMol) (oder die äquiv. Menge *Jod*) zugegeben und 30 Min. bei 0°, dann 2 Stdn. bei 20° aufbewahrt. Bei Verwendung von *Jod* blieben die Ansätze 15–20 Stdn. stehen.

b) *Bildung von ATP aus Phosphat und ADP*: Die Mischung aus 96 mg ADP (0.2 mMol), 0.57 ccm der obigen Phosphorsäure-Lösung in Dioxan (0.2 mMol) und 10.0 ccm der TBA-Hydroxid-Lösung (1.0 mMol) wurde, wie vorstehend beschrieben, getrocknet, nach Einengen im betreffenden Lösungsmittel (10 ccm) gelöst und nach Zugabe von 0.2 mMol des Thiazolidons bei 0° mit 0.012 ccm *Brom* (0.2 mMol) wie oben oxydiert.

Quantitative Bestimmung von ADP und ATP: Die Oxydationsansätze wurden wie in I. c.^{2,3)} dünn-schichtchromatographisch getrennt und die Nucleotidmengen nach Abschaben der Zonen und Elution mit 0.05 *m* Tris-Puffer vom pH 7.5 enzymatisch ermittelt⁴⁾.

Isolierung von oxydativ gebildetem ATP als Li-Salz: Die Lösung von 365 mg AMP·H₂O (1 mMol) in 20 ccm benzolisch-methanolischer 0.1 *m* TBA-Hydroxid-Lösung wurde i. Vak. eingetrocknet, dann i. Ölpumpenvak. völlig entwässert und der Rückstand in 50 ccm trok-

⁹⁾ R. H. Cundiff und P. C. Markunas, *Analytic. Chem.* **28**, 792 (1956).

kenem Pyridin gelöst. Nun löste man 412 mg (4 mMol) *Thiazolidon-(2)* (1a) darin auf und tropfte dazu bei 20° im Verlauf von 5 Stdn. eine Lösung von 4.0 mMol aus 80 ccm (8.0 mMol) Base (0.1 *m*) und 11.5 ccm (4.0 mMol) Säure (0.348 *m*) hergestelltem und wie oben getrocknetem $(TBA)_2HPO_4$ und 1.01 g *Jod* (4.0 mMol) in 25 ccm trockenem Pyridin. Nach 16 Stdn. wurde das Lösungsmittel i. Vak. abdestilliert, der Rückstand in 2 ccm Äthanol aufgenommen und mit einigen ccm Wasser versetzt, wobei viel unverbrauchtes Jod ausfiel. Dieses wurde abzentrifugiert, einigemal mit wenig Wasser unter Zentrifugieren gewaschen und die Gesamtlösung mit Wasser auf 25 ccm aufgefüllt. Je zwei halbe ccm dienen zur quantitativen Ausbeuteermittlung wie oben, die 16.4% *ADP* und 11.3% *ATP* ergab. Die restlichen 24 ccm wurden auf eine Kieselgelsäule (2.3 × 20 cm) aufgegeben und mit *n*-Propanol/konz. Ammoniak/Wasser (6 : 3 : 1) vorgetrennt. Durch Uvicordanzeige des Durchlaufs ermittelte man die als dritte absorbierende Bande erscheinende gewünschte *ATP*-Fraktion. Sie wurde i. Vak. zur Trockne gebracht und in wenig Wasser auf eine 1 × 15-cm-Säule von Dowex 1X8 (400 mesh, Chlorid-Form) gegeben. Zuerst wurde mit 100 ccm Wasser, dann mit 0.01 *n* HCl eluiert. Als 50 ccm Salzsäure durchgeflossen waren, wurden die restlichen 150 ccm mit einem Vorratsgefäß verbunden, das 1 *m* *LiCl*-Lösung in 0.01 *n* HCl enthielt, so daß ein *LiCl*-Gradient entstand. *ATP* erschien im Eluat nach etwa 150 ccm. Die *ATP*-haltigen Fraktionen wurden zusammen eisgetrocknet und vom *LiCl* durch mehrmaliges Auswaschen mit absol. Äthanol befreit. Das alkoholunlösliche *Li-Salz* wurde nach Lösen in wenig Wasser von einer Trübung abzentrifugiert und durch Eistrocknen rein erhalten. 40 mg farbloses Pulver, das im Dünnschichtchromatogramm auf Kieselgel HF_{254} im obigen Laufmittel mit R_F ca. 0.1 nur eine winzige Spur *ATP* (R_F ca. 0.2) erkennen ließ. Die enzymatische Bestimmung ergab 68% *ATP*.

[142/68]