

Edmund Bäuerlein und Theodor Wieland

Modellversuche zur oxydativen Phosphorylierung, XIII¹⁾

Notiz über Hämin als Oxydationsmittel bei der Synthese von Adenosintriphosphat mittels Tocopherol oder Thioglykolsäure

Aus dem Institut für Organische Chemie der Universität Frankfurt a. M. und dem Max-Planck-Institut für medizinische Forschung, Abteilung Chemie, Heidelberg

(Eingegangen am 9. September 1969)

Thioglykolsäure²⁾, DL- α -Tocopherol³⁾, *S*-Acetyl-*p*-thiokresol³⁾, Monothiohydrochinon-*S*-methyläther⁴⁾, Monoacetylurohydrochinon⁵⁾ und Monoacylderivate ähnlicher Hydrochinone¹⁾, *N*-Acetyl-homocysteinethiolacton⁶⁾ und die ihm ähnlichen Thiazolidinone⁷⁾ konnten während ihrer Oxydation, zumeist mit Brom in wasserfreiem Medium, anorganisches Phosphat in den phosphorylierenden Zustand versetzen und so gleichzeitig vorhandenes ADP in ATP überführen.

Es wurden jetzt eisenhaltige Oxydationsmittel ausprobiert, die mit einigen der oben aufgezählten Mediatoren im üblichen System, bestehend aus den Tetrabutylammoniumsalzen von ADP und Phosphorsäure in Pyridin, umgesetzt wurden. Mit wasserfreiem FeCl₃ oder seinem α,α' -Bipyridyl-Komplex konnte nur mit Thioglykolsäure eine über den Blindwert von 0.25% hinausgehende ATP-Menge von 1.7% erhalten werden. Hingegen ergab die Anwendung von Hämin in Gegenwart von Tocopherol nach 18 Stunden eine in vielen Versuchen sichergestellte signifikante Erhöhung des hier überraschend hohen Blindwerts (3%) um durchschnittlich 4% an ATP. Verdoppelung des Oxydationsmittels ergab keine Erhöhung der ATP-Ausbeute, sondern Verminderung (Tab. 1). Aus Adenosinmonophosphat und Phosphat entstanden im analogen Experiment ca. 3% ADP.

Die Bildung von ATP auch in Abwesenheit des Mediators ist nicht auf eine oxydative Phosphorylierung zurückzuführen; sie ist auch zu beobachten, wenn das Phosphat aus dem Ansatz weggelassen wird und kommt durch eine disproportionierende adenylatkinase-artige Wirkung des Hämins auf ADP zustande. Dieser Effekt scheint auf die beiden Carboxylgruppen des Hämins in ihrer speziellen Anordnung zurückzugehen.

Eine beträchtliche oxydative ATP-Bildung bewirkt das Hämin unter der Mitwirkung von Thioglykolsäure. Im optimalen Ansatz ließen sich 15–17% ATP nachweisen (siehe Tab. 2). Aus AMP entstand im analogen Ansatz mindestens ebensoviel ADP.

Die größten ATP-Mengen entstanden bei einem Verhältnis von Thioglykolsäure/Hämin wie 1:2, also bei 2 Einelektronenacceptoren pro SH-Gruppe, jede Konzentrationsänderung an einer Komponente ließ die Ausbeute sinken.

¹⁾ XII. Mitteil.: Th. Wieland und H. Aquila, Chem. Ber. 102, 2285 (1969).

²⁾ Th. Wieland und E. Bäuerlein, Angew. Chem. 80, 915 (1968); Angew. Chem. internat. Edit. 7, 893 (1968).

³⁾ E. Bäuerlein und Th. Wieland, Chem. Ber. 102, 1299 (1969).

⁴⁾ Th. Wieland und E. Bäuerlein, Mh. Chem. 98, 1381 (1967).

⁵⁾ Th. Wieland und H. Aquila, Angew. Chem. 80, 190 (1968); Angew. Chem. internat. Edit. 7, 213 (1968).

⁶⁾ Th. Wieland und E. Bäuerlein, Chem. Ber. 100, 3869 (1967).

⁷⁾ Th. Wieland und H. Aquila, Chem. Ber. 101, 3031 (1968).

Tab. 1. Bildung von ATP (% ber. auf ADP) bei der Hämin-Oxydation von $[(C_4H_9)_4N]_3ADP + [(C_4H_9)_4N]_2HPO_4 +$ Tocopherol in Pyridin nach 18 Stdn. bei 20°. PGK = Analyse mit Phosphoglycerat-Kinase, AK = mit Adenylat-Kinase (Myokinase)⁸⁾

Tocopherol	Hämin	Bruttoausbeute		Nettoausbeute	
		PGK	AK	PGK	AK
+	0.5 Ox.-Äquiv.	1.1	1.1	0.9	1.1
-		0.2	—		
+	1.0 Ox.-Äquiv.	7.0	7.3	4.0	4.0
-		3.0	3.3		
+	2.0 Ox.-Äquivv.	9.8	11.1	1.9	2.5
-		7.9	8.6		
-		0.02	0.02		

Tab. 2. Bildung von ATP (% ber. auf ADP) bei der Hämin-Oxydation von $[(C_4H_9)_4N]_3ADP + [(C_4H_9)_4N]_2HPO_4 + HS-CH_2CO_2H$ nach 18 Stdn. bei 20° (PGK und AK wie in Tab. 1)

Äquivalente		Bruttoausbeute		Nettoausbeute	
HS-CH ₂ CO ₂ H	Hämin	PGK	AK	PGK	AK
1	2	18.7	20.5	15.7	17.2
—	2	3.0	3.3		
2	2	6.7	8.0	3.7	4.7
—	2	3.0	3.3		
4	2	3.8	3.7	0.8	0.4
—	2	3.0	3.3		
1	4	12.8	14.1	4.9	5.5
—	4	7.9	8.6		

Schon *Keilin*⁹⁾ sowie *Drabkin* und *Austin*¹⁰⁾ berichteten vor über 30 Jahren über stabile Reaktionsprodukte von Methämoglobin und Schwefelwasserstoff. Weitere stellten kürzlich *Bayer et al.*¹¹⁾ aus Hämoglobin und Myoglobin mit Mercaptanen her. Alle diese Produkte scheinen 1 : 1-Komplexe zu sein.

⁸⁾ *H. U. Bergmeyer*, Methoden der enzymatischen Analyse, S. 539, Verlag Chemie, Weinheim/Bergstraße 1962; *W. Gruber*, *H. Moellering* und *H. U. Bergmeyer*, Enzym. biol. et chin. **7**, 115 (1966).

⁹⁾ *D. Keilin*, Proc. Royal Soc. Ser. **B 113**, 393 (1933).

¹⁰⁾ *D. L. Drabkin* und *J. H. Austin*, J. biol. Chemistry **112**, 51 (1935).

¹¹⁾ *E. Bayer*, *H. A. O. Hill* und *A. Röder*, Chem. Commun. **1969**, 109.

Eine oxydative Bildung von ATP aus AMP und Phosphat mit Chlorocruoroferrihämochrom in Dimethylacetamid beschrieben früher *Brinigar* und *Wang*¹²⁾, doch führten sie diese auf die im Farbstoff enthaltene Formylgruppe zurück, die im Zuge ihrer internen Oxydation die Kupplung vermitteln soll. Das Formyl-freie Protoferrihämochrom produzierte keine nachweisbaren ATP-Mengen. Eine von *Clark* und *Hutchinson*¹³⁾ für möglich gehaltene direkte Aktivierung durch Oxydation eines Phosphat-Eisen-Porphyrin-Komplexes war in unserem System nicht zu beobachten. Hier wird offensichtlich das Elektronendefizit auf den Hydrochinonteil des Tocopherols bzw. auf den Schwefel der Thioglykolsäure übertragen und in dieser Form zur Aktivierung des Phosphats benutzt.

Beschreibung der Versuche

Thioglykolsäure, mind. 98proz., war ein Produkt der Firma Schuchardt, München, und wurde vor Gebrauch destilliert. DL- α -Tocopherol, Eisen(III)-chlorid wasserfrei, α,α' -Bipyridyl und 0.1*n* Tetrabutylammoniumhydroxid-Lösung in Isopropylalkohol/Methanol waren Präparate der Firma Merck, Darmstadt. Freies ADP und AMP waren Präparate der Firma Boehringer Mannheim GmbH. Häm in wurde nach l. c.¹⁴⁾ aus frischem Rinderblut isoliert und nach l. c.¹⁵⁾ umgefällt; es war papierchromatographisch einheitlich¹⁶⁾.

Oxydative Phosphorylierung von ADP: Zur Herstellung von Phosphat-ADP-Mischung eines Standardansatzes $[(C_4H_9)_4N]_2HPO_4 + [(C_4H_9)_4N]_3ADP$ wurden 5.56 ccm 0.1*n* $(C_4H_9)_4NOH$ -Lösung ($\frac{5}{9}$ mMol) mit 0.36 ccm einer 1*n* Lösung von ca. 89proz. Phosphorsäure in Dioxan ($\frac{1}{9}$ mMol) vermischt, darin 0.054 g freies ADP $\cdot 3H_2O$ ($\frac{1}{9}$ mMol) aufgelöst. Dann wurde i. Vak. verdampft und noch 30 Min. bei 0.1 Torr getrocknet.

Oxydation von Tocopherol mit Häm in: Die obige Salzmischung wurde unter Zusatz von 0.048 g *Tocopherol* ($\frac{1}{9}$ mMol) in 5 ccm absol. Pyridin gelöst. Unter Rühren wurden entweder 0.072 g ($\frac{1}{9}$ mMol) oder 0.144 g ($\frac{2}{9}$ mMol) oder 0.288 g ($\frac{4}{9}$ mMol) *Häm in* zugegeben. Es wurde 18 Stdn. weitergerührt und zur Bestimmung von ATP aufgearbeitet (s. unten).

Oxydation von Thioglykolsäure mit Häm in: Die obige Salzmischung wurde unter Zusatz entweder von 0.008 ccm ($\frac{1}{9}$ mMol) oder 0.016 ccm ($\frac{2}{9}$ mMol) oder 0.032 ccm ($\frac{4}{9}$ mMol) *Thioglykolsäure* in 5 ccm absol. Pyridin gelöst. Unter Rühren wurden entweder 0.144 g ($\frac{2}{9}$ mMol) oder 0.288 g ($\frac{4}{9}$ mMol) *Häm in* zugegeben. Es wurde 18 Stdn. bei 20° weitergerührt und zur Bestimmung auf ATP aufgearbeitet.

Analyse von ATP: Die einzelnen Oxydationslösungen wurden bei Raumtemp. i. Vak. eingengt, die Rückstände in soviel einer Mischung von 4 Vol. Pyridin und 1 Vol. 0.05*m* Tris-Puffer von pH 7.55 gelöst, daß ein Endvolumen von 5 ccm (Meßkolben) resultierte. Diese konzentrierten Lösungen wurden in 0.1-ccm-Portionen auf 20 \times 20-cm-Platten an 0.75-mm-Schichten aus Kieselgel PF (Merck) in *n*-Propanol/Ammoniak(25proz.)/Wasser (6:3:1 v/v/v)¹⁷⁾ getrennt. Hierzu wurden von jedem Ansatz 0.3 oder 0.5 ccm pro Platte aufgetragen; für jeden Ansatz wurden zwei Platten eingesetzt. Durch 2–3 maliges Aufsteigenlassen nach

12) *W. S. Brinigar* und *J. H. Wang*, Proc. natl. Acad. Sci USA **52**, 699 (1964).

13) *V. M. Clark* und *D. W. Hutchinson*, Progress in Org. Chem., Herausgeber *J. Cook* und *W. Carruthers*, Butterworths, London 1968.

14) *Gattermann-Wieland*, Die Praxis des org. Chemikers, S. 355, Walter de Gruyter, Berlin 1956.

15) *M. Nencki* und *J. Zaleski*, Hoppe-Seyler's Z. physiol. Chem. **30**, 39 (1900).

16) *R. Kehl* und *W. Stich*, Hoppe-Seyler's Z. physiol. Chem. **289**, 6 (1951).

17) *C. S. Hanes* und *F. A. Isherwood*, Nature [London] **164**, 1107 (1947).

jeweiliger Fön- oder Lufttrocknung trennen sich AMP, ADP und ATP vollständig. Die einzelnen Banden wurden unter der UV-Lampe (254 m μ) identifiziert und von der Platte geschabt. Die Gelportionen wurden dann in eine 1 \times 10-cm-Säule auf eine 1 cm dicke Kieselschicht gefüllt und mit 0.05 *m* Tris-Puffer 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 Zwecke der Gehaltsbestimmung mit demselben Puffer auf 25 ccm aufgefüllt (Testlösung). Die Auswertung wurde auf enzymatischem Weg mit gekoppelten spezifischen Methoden¹⁷⁾ im Photometer Eppendorf (3-cm-Küvetten) vorgenommen; der ATP-Gehalt ist proportional der Nicotinamid-Adenindinucleotid-H(NADH)-Abnahme, die NADH-Konzentrationen wurden bei 366 m μ colorimetrisch gemessen.

Analyse von ADP: Die Aufarbeitung der Reaktionsansätze erfolgte analog der ATP-Analyse. Die Testlösungen wurden der ADP-Bestimmung nach Adam¹⁸⁾ unterworfen; ADP wurde hier mit Pyruvat-Kinase und Phosphoenolpyruvat umgesetzt, wobei die entstandene Brenztraubensäure durch NADH in Gegenwart von Lactatdehydrogenase spezifisch reduziert wird.

18) *l. c.*⁸⁾, S. 573.