

121. Zur Struktur der ATP-Komplexe zweiwertiger Kationen

III. Wechselwirkung zwischen Zentral-Ion und Adeninring

von U. Handschin und H. Brintzinger

(31. III. 62)

1. *Einleitung.* In früheren Mitteilungen¹⁾²⁾ berichteten wir über einige Besonderheiten der Bindungsverhältnisse bei Adenosintriphosphorsäure(ATP)-Metallionen-Komplexen. Wir stellten fest, dass Mn^{2+} , Co^{2+} , Ni^{2+} und Zn^{2+} in ihren ATP-Komplexen höchstwahrscheinlich keine Chelatbindung mit dem Adenteil der ATP-Molekel eingehen. Bei einer inzwischen publizierten Kernresonanz-spektroskopischen Untersuchung von COHN & HUGHES³⁾ ergaben sich jedoch u. a. Anhaltspunkte für gewisse Wechselwirkungen zwischen Zentralionen wie Mn^{2+} , Zn^{2+} und Cu^{2+} und dem Adeninring.

Wir haben nun versucht, näher zu charakterisieren, welche Wechselwirkungen zwischen dem Adenteil des ATP-Liganden L und dem an dessen Phosphatkette gebundenen Metallion M auftreten können. Dazu bot sich folgender Weg: Wie von HOTTA, BRAHMS & MORALES⁴⁾ vor einiger Zeit gezeigt wurde, kann in dem Komplex der Zusammensetzung MHL⁵⁾ der Adeninrest protoniert werden. Die Basizität des Adeninringes muss jedoch unter dem Einfluss des Zentralions – je nach Art und Stärke der Wechselwirkung zwischen diesen beiden – mehr oder weniger erniedrigt sein. Eine genaue Bestimmung der Basizität des Adeninringes in den verschiedenen MHL-Komplexen sollte daher im Sinne unserer Fragestellung wesentliche Information liefern.

2. *Methode.* Titriert man eine saure Lösung von ATP in Gegenwart eines relativ grossen Metallionen-Überschusses, so zeigt die Titrationskurve – wie die von freiem ATP – die Form zweier regulärer Puffergebiete⁶⁾. Beide Puffergebiete sind jedoch gegenüber freiem ATP zu niedrigeren pH-Werten verschoben und überlappen einander nunmehr stark⁶⁾. Die Konstanten K_{MHL}^M , $K_{MH_2L}^M$ und $K_{H_2L}^H$ ⁷⁾ sowie die Metallionen-Konzentration $[M]$ bestimmen hierbei die scheinbare Konstante K'_{H_2L} für das untere der beiden verschobenen Puffergebiete folgendermassen:

$$K'_{H_2L} = K_{H_2L}^H \cdot K_{MH_2L}^M \cdot ([M] + K_{MHL}^M) / K_{MHL}^M \cdot ([M] + K_{MH_2L}^M). \quad (1)$$

Zur Bestimmung der beiden Unbekannten $K_{MH_2L}^M$ und K_{MHL}^M aus Gleichung (1) müssen Titrationen bei mindestens *zwei* Metallionen-Konzentrationen ausgeführt werden.

1) H. BRINTZINGER, *Helv.* 44, 935 (1961).

2) H. BRINTZINGER, *Helv.* 44, 1199 (1961).

3) M. COHN & T. R. HUGHES jr., *J. biol. Chemistry* 237, 176 (1962).

4) K. HOTTA, J. BRAHMS & M. MORALES, *J. Amer. chem. Soc.* 83, 997 (1961). Mit der von den Autoren vorgenommenen weiteren Interpretation der Ergebnisse können wir uns nicht einverstanden erklären.

5) Das Proton des Komplexes MHL ist an der Phosphatkette fixiert.

6) A. E. MARTELL & G. SCHWARZENBACH, *Helv.* 39, 653 (1956).

7) Die Konstanten K_Y^X beziehen sich auf die Dissoziation des Ions X aus der Komplexpartikel Y.

Die Konstanten lassen sich dann graphisch oder arithmetisch leicht ermitteln, und damit auch die gesuchte Konstante $K_{MH_2L}^H$:

$$f K_{MH_2L}^H = pK_{MH_2L}^H + pK_{MH_2L}^M - pK_{MHL}^M. \quad (2)$$

Eine analoge Auswertung der Senkung des oberen Puffergebietes mittels einer zu (1) analogen Gleichung sollte wiederum zur Konstante K_{MHL}^M und ausserdem zu K_{ML}^M führen.

Wir verwendeten für die Titrationsen je 100 ml einer $8 \cdot 10^{-4} M$ ATP-Lösung, der die Metallionen Mg^{2+} , Mn^{2+} , Zn^{2+} oder Cu^{2+} in Form ihrer Chloride und in Konzentrationen von $m/30$, $m/100$ resp. $m/300$ zugesetzt waren. Mit KCl wurde die Ionenstärke auf 0,1 konstant gehalten⁸⁾. Die Titrationskurven wurden bei 20° mit Hilfe eines automatischen Combittitrators (kombinierte Glaselektrode UX) der Firma METROHM AG., Herisau, aufgenommen.

Tabelle 1. *Scheinbare Dissoziationskonstanten $pK_{H_2L}^H$ (in Klammern: pK_{HL}^H) für ATP in Gegenwart von Metallionen*

[M]	—	1/300	1/100	1/30
Mg^{2+}	3,95 (6,50)	3,87 (5,32)	3,75 (5,07)	3,64 (4,85)
Mn^{2+}	3,91 (6,50)	3,67 (4,84)	3,56 (4,59)	3,40 (4,37)
Zn^{2+}	3,93 (6,50)	3,59 (4,75)	3,46 (4,50)	3,35 (4,25)
Cu^{2+}	4,00 (6,50)	3,25 (4,01)	2,97 (3,80)	2,78 (3,50)

3. *Ergebnisse.* Die scheinbaren pK-Werte des ATP in Gegenwart der verschiedenen Konzentrationen der untersuchten Metallionen sind in Tabelle 1 zusammengefasst. Die wiederholten Titrationsen von freiem ATP in Gegenwart von KCl⁸⁾ geben ein Bild von der Zuverlässigkeit der erhaltenen Werte: Die Streuungen um den erhaltenen Mittelwert von $pK_{H_2L}^H = 3,95$ sind $\leq 0,05$. Die für $pK_{MH_2L}^M$, pK_{MHL}^M und $pK_{MH_2L}^H$ erhaltenen Werte haben wie in Tabelle 2 aufgeführt. Diese Konstanten sind teilweise mit grösserer Unsicherheit behaftet, insbesondere $pK_{MH_2L}^H$ weist Streuungen bis zu 0,2 pK-Einheiten auf. Die gesuchte Grösse $pK_{MH_2L}^H$ wird jedoch wiederum genauer erhalten und kann bis auf $\pm 0,1$ als gesichert betrachtet werden.

Tabelle 2. *Dissoziationskonstanten verschiedener ATP-Komplexpartikel und ΔpK -Werte*

Zentralion M	$pK_{MH_2L}^M$	pK_{MHL}^M	$pK_{MH_2L}^H$	pK_{ML}^M	pK_{MHL}^H	$pK_{M_2L}^M$	ΔpK_1	ΔpK_2	ΔpK_3 nach ¹⁰⁾ für $a = 5-6 \text{ \AA}$
Mg^{2+}	1,58	2,09	3,44	3,84	4,75	—	0,5	1,7	2,2
Mn^{2+}	2,03	2,61	3,37	4,52	4,59	1,37	0,6	1,9	2,7
Zn^{2+}	2,09	2,78	3,27	4,75	4,53	1,41	0,7	2,0	2,6
Cu^{2+}	1,94	3,25	2,68	5,82	3,93	1,88	1,3	2,6	3,8

Obwohl es als sicher gelten kann, dass die Dissoziationskonstanten $K_{MH_2L}^H$ sich auf die Deprotonierung des Adeninringes beziehen, haben wir dies noch weiter belegt. Nach einer von Hotta, Brahms & Morales⁴⁾ angegebenen Methode lässt sich die

⁸⁾ Aus Untersuchungen von N. C. Melchior (J. biol. Chemistry 208, 615 (1954)) ist bekannt, dass auch K^+ mit ATP schwache Komplexe bildet. Zur Erzielung konstanter Ionenstärken verwendeten wir trotzdem KCl. Die gefundenen pK-Werte gelten somit nur für das angegebene Medium.

Protonierung des Adeninteils spektrophotometrisch bestimmen. Durch Messung der Differenzabsorption bei 282,5 m μ in Abhängigkeit vom pH der Lösung erhielten wir für ATP in 0,1M KCl ein $pK_{H,L}^H = 4,0$, in m/30 ZnCl₂ $pK_{H,L}' = 3,31$. Diese Werte, und folglich ebenso die entsprechenden potentiometrisch erhaltenen von 3,95 resp. 3,35, gelten ohne jeden Zweifel für die Protonierung des Adeninringes.

In Gegenwart von CuCl₂ verhält sich die Differenzabsorption anomal: Sie nimmt – im Gegensatz zum Verhalten in Gegenwart der andern Metallionen – zunächst ab, um dann erst von pH ca. 3 an wieder zuzunehmen⁹⁾. Diese Anomalie rührt möglicherweise davon her, dass die bei ca. 280 m μ schon recht ausgeprägte Charge-Transfer-Absorption des Cu²⁺ durch die Komplexbildung mit dem Polyphosphat beeinflusst wird.

Bei der Auswertung der oberen Puffergebiete ergaben sich sowohl für K_{MHL}^M wie auch für K_{ML}^M Werte, die mit den aus dem unteren Puffergebiet resp. den aus früheren Messungen¹⁾ erhaltenen nicht übereinstimmten. Wertet man jedoch die für die geringste verwendete Metallionen-Konzentration erhaltenen K_{HL}' mittels der aus Gleichung (1) erhaltenen K_{MHL}^M aus, so stimmen die nunmehr resultierenden K_{ML}^M recht gut auf die früher erhaltenen. Bei den höheren Metallionen-Konzentrationen ist die Senkung des Puffergebietes stärker als auf Grund der Ausbildung von MHL und ML zu erwarten ist. Dies bedeutet, dass der Verlauf der Titrations durch das Auftreten einer weiteren Komplexpartikels gestört wird. Tatsächlich lassen sich die Abweichungen durch das Auftreten von Komplexen der Zusammensetzung M₂L erklären. Die für diese Komplex-Spezies ermittelten, ebenfalls in Tabelle 2 angegebenen Konstanten $K_{M,L}^M$ sind von einer für solche Partikeln durchaus zu erwartenden Grössenordnung.

4. *Diskussion.* Die in Tabelle 2 enthaltenen Werte zeigen, dass die Protonierung des Adeninringes die Stabilität der Bindung des Metallions an der Phosphatkette vermindert. Ebenso wird im Komplex mit dem Metallion der Adeninring weniger leicht protoniert, als im freien ATP. Die Differenzen $pK_{H,L}^H - pK_{MHL}^H$ und $pK_{MHL}^M - pK_{MHL}^M$ müssen wegen Gleichung (2) identisch sein. Als ΔpK_1 bezeichnet, stehen sie in Spalte 6 der Tabelle 2. Das geringe Ausmass der gegenseitigen Beeinflussung zeigt, dass die Wechselwirkung von Zentralion und Adeninring bei allen untersuchten Metallionen – wie von uns vermutet¹⁾ – nicht in einer direkten koordinativen Bindung, sondern in einer schwachen elektrostatischen Feldwirkung seine Ursache hat.

An Iminodiessigsäure-Komplexen wurde von SCHWARZENBACH & SCHNEIDER¹⁰⁾ die elektrostatische Wirkung bestimmt, die eine in 5–6 Å Entfernung angebrachte positive Ladung auf verschiedene Metallionen ausübt. Die hierbei für Mg²⁺, Mn²⁺, Zn²⁺ und Cu²⁺ gefundenen ΔpK -Werte, als ΔpK_3 bezeichnet, stehen in der letzten Spalte der Tabelle 2. Der Vergleich mit den für die ATP-Komplexe ermittelten ΔpK_1 -

⁹⁾ Die Extinktionswerte ändern sich hierbei ausserdem mit der Zeit, offenbar infolge der von uns früher erwähnten Instabilität der Cu-ATP-Komplexe¹⁾ ²⁾.

¹⁰⁾ G. SCHWARZENBACH & W. SCHNEIDER, *Helv.* 38, 1931 (1955).

¹¹⁾ Eine Betrachtung der ΔpK_2 -Werte für das zweite, an der Phosphatkette fixierte Proton zeigt (Tab. 2, vorletzte Spalte), dass diese ebenfalls viel kleiner sind, als für eine normale Chelatbindung mit einer direkten Konkurrenz zwischen Metallion und Proton zu erwarten ist. Dies ist ein weiterer Hinweis auf die Berechtigung unserer Vermutung, dass es sich auch bei der Fixierung des Zentralions an der Phosphatkette nicht um eine normale Chelatbindung handelt.

Werten zeigt, dass alle untersuchten Metallionen im Komplex MHL die Protonierung des Adeninringes 3–4mal weniger zu «spüren» bekommen, als für die Einführung einer positiven Ladung in 5–6 Å Entfernung zu erwarten ist. Ob dies teilweise auf eine bessere dielektrische Abschirmung, oder wirklich auf einen 3–4mal grösseren Abstand zurückzuführen ist, sei dahingestellt. Auf jeden Fall ist als Ergebnis festzuhalten, dass der durchschnittliche Abstand zwischen Metallion und Adeninrest ein bis zwei Wassermolekeln keinesfalls unterschreitet, denn dies müsste an vielfach höheren ΔpK_1 -Werten sofort zu erkennen sein. Dieses Ergebnis lässt sich mit aller Wahrscheinlichkeit auch auf die Komplexe ML ausdehnen, in denen die Phosphatkette deprotoniert ist und infolgedessen das Zentralion um einige Zehnerpotenzen stärker bindet als in MHL¹¹⁾.

Andererseits ist jedoch zu bedenken, dass unsere Messungen ausgesprochen globaler Natur sind. Sie können deshalb natürlich keine Auskunft darüber geben, ob nicht doch ein geringer, statistisch nicht ins Gewicht fallender Anteil der Molekeln MHL und ML in anderen Konfigurationen vorliegt – z. B. mit einer Bindung zwischen Metallion und Adeninrest. Dies wird durch die Existenz der Partikel M_2L sogar wahrscheinlich gemacht, welche ja bedeutet, dass die ATP-Molekel den Metallionen Mn^{2+} , Zn^{2+} und Cu^{2+} zweierlei Haftstellen anbietet. Es lässt sich abschätzen, dass ein solches Metallion sich mit einer statistischen Häufigkeit von der Grössenordnung 10^{-2} bei der schwächeren, «irregulären» Haftstelle aufhalten wird.

Wenn diese – statistisch irrelevante – Haftstelle eine koordinative Bindung am Adeninring impliziert, so wäre dies eine ausreichende Erklärung für die Kernresonanz-Befunde von COHN & HUGHES³⁾. Eine weitere mögliche Erklärung hierfür liesse sich aber auch aus folgender Überlegung ableiten: Die für unsere ΔpK_1 -Werte verantwortliche Wechselwirkung zwischen Metallion und Adeninring beträgt grössenordnungsmässig 1–2 kcal/Mol. Dies lässt es denkbar erscheinen, dass unter der elektrostatischen Wirkung des Zentralions dem Dipol des Adeninring-Systems im Komplex eine andere Orientierung zum Rest der Molekel aufgezwungen wird, als im freien ATP. Ausserdem könnte auch die sowohl von COHN & HUGHES³⁾ wie von uns²⁾ festgestellte Einwirkung des Zentralions auf den Riboseteil der ATP-Molekel sich indirekt am C-8 des Adeninringes bemerkbar machen.

Herrn Professor ERLNMEYER gilt unser besonderer Dank für wertvolle Hinweise und Kritiken zu dieser Arbeit. Die Herren stud. phil. G. VASCI und B. GISIN, die ebenfalls an diesen Untersuchungen beteiligt waren, seien für ihre Mithilfe bedankt. Herrn Dr. B. PRIJS danken wir für seine Unterstützung bei der Abfassung des Manuskriptes; und schliesslich ist es uns ein Anliegen, der KOMMISSION FÜR ATOMWISSENSCHAFT DES SCHWEIZERISCHEN NATIONALFONDS ZUR FÖRDERUNG DER WISSENSCHAFTLICHEN FORSCHUNG zu danken, deren Unterstützung uns die Durchführung dieser Arbeit ermöglichte.

SUMMARY

The basicity of the adenin nucleus in the ATP complexes of Mg^{2+} , Mn^{2+} , Zn^{2+} and Cu^{2+} has been determined. Some possible interactions between metal ions and adenin nucleus are discussed. Coordinative binding between these two to any statistically important extent can be excluded: the average distance between metal ion and adenin nucleus in these complexes is definitely greater than 5–6 Å.

Institut für anorganische Chemie
der Universität Basel