

109. Zur Struktur der ATP¹)-Komplexe zweiwertiger Kationen

IV. Koordinative Besetzung des Adeninrings

von P. W. Schneider, H. Brintzinger und H. Erlenmeyer

(28. III. 64)

Seit einigen Jahren ist verschiedentlich versucht worden, die Frage abzuklären, ob zweiwertige Metallionen bei der Komplexbildung mit ATP auch an den Adeninteil der ATP-Molekel gebunden werden.

Diese Fragestellung geht zurück auf eine These SZENT-GYÖRGYIS [1]²), nach welcher für den Mechanismus biochemischer ATP-Reaktionen die Ausbildung eines Chelates mit gleichzeitiger Koordination des Adenin- wie des Phosphat-Teils der ATP-Molekel an ein Metallion wie z. B. Mg²⁺ eine entscheidende Rolle spielen soll. Inwieweit ein Studium der Struktur und der Reaktivität von binären ATP-Metallionen-Komplexen zum Verständnis der Struktur und der Reaktivität von ternären Enzym-ATP-Metallionen-Komplexen³) – und damit zum Verständnis der Mechanismen enzymatischer ATP-Reaktionen – beitragen kann, ist eine Frage für sich. Die vorliegende Arbeit soll zunächst lediglich einen Beitrag zur Frage liefern, welche der möglichen Strukturen bei binären Komplexen in wässriger Lösung auftreten, und welche experimentellen Methoden zu ihrer Identifizierung geeignet sind.

Die bisher zu diesen Fragen vorliegenden Ergebnisse sind widersprüchlich: Spezifische⁴) katalytische Effekte mit Cu²⁺ bei der nicht-enzymatischen ATP-Hydrolyse, und vor allem Kernspinresonanz-Untersuchungen an ATP-Komplexen von Mn²⁺, Cu²⁺ und Zn²⁺ [4] ergaben deutliche Hinweise auf eine Koordination dieser Metallionen auch an das Adeninringssystem. Andererseits schien aus Untersuchungen über Komplexbildungsgleichgewichte das Gegenteil hervorzugehen⁵): Sowohl die Invarianz der Stabilitätskonstanten der ATP-Komplexe in der Reihe der 3*d*-Metallionen Mn²⁺, Co²⁺, Ni²⁺ und Zn²⁺ [6] und einiger Erdalkali- und 3*d*-Metallionen-Komplexe in der Reihe der Nucleosidtriphosphate (ATP, GTP, UTP) und CTP¹) [7], wie auch die nur geringfügige Störung der Protonenaufnahme des Adeninrings im ATP durch Komplexbildung mit Mg²⁺, Mn²⁺, Cu²⁺ und Zn²⁺ ⁶) schienen eine Koordination dieser Metallionen an das Adeninringssystem auszuschliessen. Die Uneinheitlichkeit dieser Befunde erklärt sich sicherlich dadurch, dass bei diesen ATP-Komplexen Partikeln

¹) Abkürzungen: ATP = Adenosin-5'-triphosphat, GTP = Guanosin-5'-triphosphat, UTP = Uridin-5'-triphosphat, CTP = Cytidin-5'-triphosphat.

²) Die Zahlen in eckigen Klammern verweisen auf das Literaturverzeichnis, S. 1002.

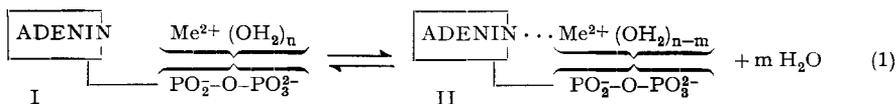
³) Zur Struktur solcher ternärer Enzym-ATP-Metallion-Komplexe s. z. B. [2].

⁴) Die Anwesenheit des Adeninringes scheint eine notwendige Bedingung für das Zustandekommen der Cu²⁺-katalysierten Polyphosphat-Hydrolyse zu sein [3].

⁵) Es seien jedoch Untersuchungen von TAQUAI KHAN & MARTELL erwähnt, in denen Bildungskonstanten monomerer und dimerer Zn-ATP-Hydroxo-Komplexe dahingehend interpretiert werden, dass Zn²⁺ im Zn-ATP sowohl an die drei Phosphatgruppen wie auch an den Adeninring koordiniert sei [5].

⁶) Potentiometrische (Mg-ATP, Mn-ATP, Cu-ATP und Zn-ATP) [8] und fluorospektrophotometrische (Mg-ATP, Zn-ATP) [9] Messungen.

mit ausschliesslicher Bindung des Metallions an die Phosphatkette⁷⁾ mit solchen Partikeln im Gleichgewicht stehen, in welchen das Metallion auch an den Adeninring koordinativ gebunden ist, und dass der Anteil der letzteren hierbei von einer Grössenordnung ist, welche zwar katalytische Effekte noch auftreten lässt, sich in globalen⁸⁾ Gleichgewichtskonstanten jedoch nicht signifikant bemerkbar macht (siehe Gleichgewichtsschema 1). Die eingangs formulierte Frage ist demnach so zu stellen: Wie



gross ist der Anteil der Komplexpartikeln II, bei welchen auch Metallion-Adenin-Bindung vorliegt, unter allen vorkommenden komplex-isomeren Me-ATP-Komplexpartikeln für die einzelnen Metallionen?

Auch bei der Untersuchung derartiger «interner» Gleichgewichte muss man – wie bei der Untersuchung jedes Gleichgewichtes – nach Messgrössen suchen, welche bei der Ausbildung der in Frage stehenden Me-Adenin-Bindung verändert werden. Eine grundsätzliche Schwierigkeit besteht hier jedoch darin, dass man nicht ohne weiteres durch Veränderung der Konzentration eines «externen» Reaktionspartners das Gleichgewicht in die beiden Extremlagen bringen und dadurch die den voll ausgebildeten Zuständen I bzw. II zugehörigen Grenzwerte der verwendeten Messgrössen ermitteln kann, was ja eine notwendige Voraussetzung für die exakte Bestimmung der intermediären Gleichgewichtslagen durch lineare Interpolation ist. Man muss mithin eine Messmethode wählen, bei der für diese Grenzwerte einigermaßen zuverlässige Abschätzungen getroffen werden können. Eine solche Messgrösse ist, wie im folgenden gezeigt werden soll, die Veränderung der UV.-Absorption des Adeninring-systems durch die Koordination zweiwertiger Kationen.

Die IR-Absorption des Ringsystems im Gebiet von 1300–1700 cm⁻¹ wird durch Komplexbildung des ATP in Lösung nicht geändert (Fig. 1)⁹⁾.

Dass die UV.-Absorption des Adeninring-systems sich bei der Komplexbildung des ATP mit Metallionen verändert, ist bereits mehrfach festgestellt worden [4] [12] [13]. Dieser Effekt wurde jedoch bisher noch nicht quantitativ ausgenutzt und zwar wahrscheinlich weil die Absorptionsveränderungen durch die meisten Metallionen gering sind. Durch die Aufnahme von Differenz-Absorptionsspektren der Komplexe gegen freien Ligand wird der Effekt jedoch gut messbar. Die Differenzspektren der Komplexe

⁷⁾ Die Art der Bindung der einzelnen Metallionen an die Phosphatkette stellt ein Problem für sich dar. Zur Frage, wie hier direkte Koordination und indirekte Bindung über Hydratwasser miteinander im Gleichgewicht stehen und welche der Phosphatgruppen von den einzelnen Metallionen für eine direkte Koordination bevorzugt werden, s. [10] und [4].

⁸⁾ Als «global» sollen solche Gleichgewichtskonstanten – wie z. B. $K_{ML}^M = \frac{[ML]}{[M][L]}$ oder $K_{MLH}^H = \frac{[MLH]}{[H][ML]}$ – bezeichnet werden, in denen einzelne Konzentrationsausdrücke – wie [ML] oder [MLH] – in Wirklichkeit Summen über die Konzentrationen verschiedener komplex-isomerer Partikeln darstellen.

⁹⁾ In Festkörpern von Mg-ATP, Mn-ATP und Co-ATP, die durch Lyophilisieren einer Lösung dieser Komplexe in 10-proz. KBr-Lösung hergestellt wurden, war eine zusätzliche Absorption bei 1685 cm⁻¹ gefunden und als Me-N=C-Bande gedeutet worden [11].

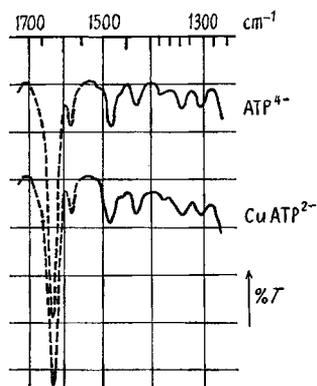


Fig. 1. IR.-Absorptionsspektren von ATP^{4-} (oben) und $CuATP^{2-}$ (unten), je $0,13M$; gemessen von $1700-1550\text{ cm}^{-1}$ in D_2O (unterbrochene Linien), von $1550-1260\text{ cm}^{-1}$ in H_2O (ausgezogene Linien)

Die Spektren sind der besseren Übersicht halber senkrecht gegeneinander verschoben. BECKMAN IR 8, Irtran-Zellen, Schichtdicke $27\ \mu$.

Ca-ATP, Mg-ATP, Mn-ATP, Co-ATP, Ni-ATP, Cu-ATP und Zn-ATP gegen freien Ligand (im Falle des Cu-ATP zusätzlich auch gegen freies Metallion¹⁰), ergeben eine Schar sehr ähnlicher Kurven mit Maxima bei $270\ m\mu$, die sich nur durch einen Faktor in der Ordinate unterscheiden (Fig. 2). Diese Differenzspektren resultieren aus einer langwelligen Verschiebung der $260\text{-}\mu\mu$ -Absorptionsbande des heterocyclischen Ring-systems, wie sie für eine Komplexbildung N-heterocyclischer Liganden typisch ist, und sind somit ein Indiz für das Auftreten der oben diskutierten Partikeln II mit direkter Koordination zwischen Adeninring und Metallion (vgl. auch [4] [13]).

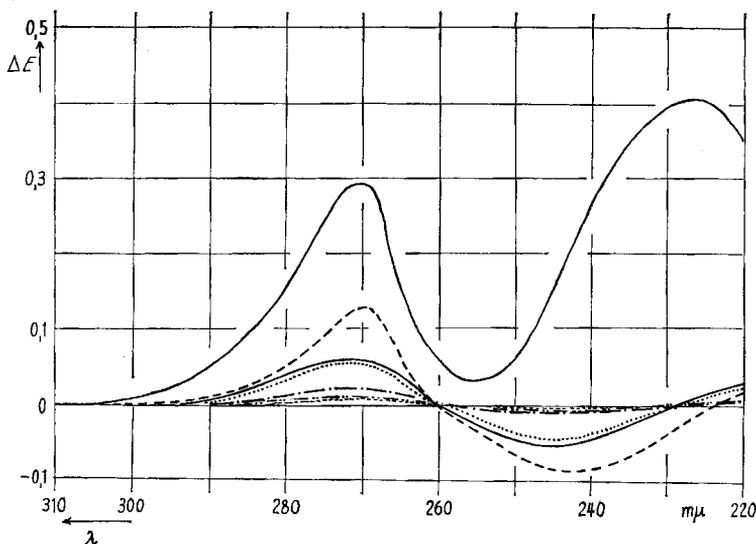


Fig. 2. Differenzspektren von ATP-Metallionen-Komplexen gegen freies ATP^{4-} (je $2 \cdot 10^{-3}M$, Schichtdicke 1 mm)¹¹; von oben nach unten (bei $270\ m\mu$): $Cu-ATP^{2-}$, $Ni-ATP^{2-}$, $Co-ATP^{2-}$, $Zn-ATP^{2-}$, $Mn-ATP^{2-}$, $Ca-ATP^{2-}$, $Mg-ATP^{2-}$

Bei Ca- und Mg-ATP²⁻: $[Me^{2+}] = 2[ATP^{4-}]$, bei den restlichen Komplexen $[Me^{2+}] = [ATP^{4-}]$, so dass die 1:1-Komplexe in allen Fällen zu über 90% ausgebildet waren.

¹⁰) Messanordnungen s. exper. Teil.

Cu-ATP zeigt unterhalb ca. 265 m μ einen etwas anderen Kurvenverlauf als die restlichen Komplexe: die Differenz-Absorption wird nicht wie bei diesen zwischen ca. 260 und 230 m μ negativ. Dieser Effekt ist eindeutig zurückzuführen auf die in diesem Spektralgebiet bereits beginnende und durch die Koordination mit der Phosphatkette etwas langwellig verschobene Ladungstransfer-Absorption des Cu²⁺-Ions. Dies lässt sich direkt zeigen, indem man Cu-ATP gegen Cu-Methyltriphosphat und freien Liganden¹⁰⁾ misst und dadurch den Cu-Phosphat-Effekt eliminiert. Das so erhaltene Differenzspektrum (Fig. 3) zeigt nun den gleichen Verlauf wie das der anderen ATP-Metallion-Komplexe in Fig. 2.

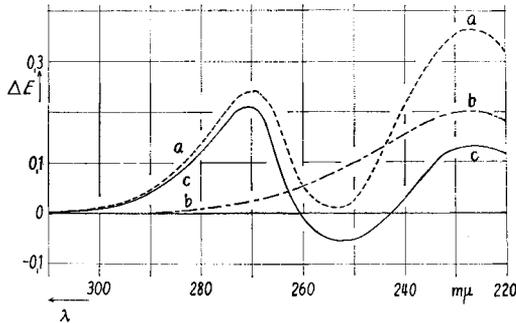


Fig. 3. Differenzspektren von a) Cu-ATP²⁻ gegen ATP⁴⁻ und Cu²⁺¹⁰⁾; b) Cu-MTP²⁻ gegen MTP⁴⁻ und Cu²⁺¹⁰⁾; c) Cu-ATP²⁻ gegen Cu-MTP²⁻ (je 1,7 · 10⁻⁴ M, Schichtdicke 10 mm)

Um die verschiedene Höhe der Differenz-Absorptionsmaxima in Figur 2 im Sinne unserer Fragestellung für eine quantitative Ermittlung der Gleichgewichtsanteile der Partikeln II auswerten zu können, müssen folgende Voraussetzungen gegeben sein:

1. Die verschiedene Höhe der Maxima resultiert nicht etwa daraus, dass bei voller Ausbildung der Partikeln II die 260 m μ -Absorptionsbande des Liganden durch die Komplexbildung mit den verschiedenen Metallionen verschieden stark langwellig verschoben würde. Dies geht daraus hervor, dass die Maxima und vor allem auch die Nulldurchgänge der verschiedenen Differenz-Absorptionskurven in Figur 2 jeweils bei der gleichen Wellenlänge liegen.

2. Die Auswirkung der im Gleichgewicht (1) vorliegenden Partikel I ohne Metallion-Adeninring-Koordination auf das spektrale Verhalten des Adeninrings – z. B. durch eine elektrostatische «Fernwirkung» oder durch eine Störung der Solvatstruktur – wird vernachlässigt. Die Berechtigung dieser Vernachlässigung kann nicht streng bewiesen werden, wir führen sie als Annahme ein.

3. Unter diesen Bedingungen ist für jedes Metallion die gegen den freien Ligand gemessene Differenzextinktion ΔE der ATP-Komplexe bei 270 m μ ein direktes Mass für den Gleichgewichtsanteil α der Partikeln II (Gleichung 2).

$$\alpha_{\text{Me}} = \Delta E_{\text{Me}} / \Delta E_{\text{max, Me}} \quad (2)$$

$\Delta E_{\text{max, Me}}$ sind hierbei die schon eingangs erwähnten, noch zu ermittelnden Grenzwerte der Differenzextinktion, die bei vollständiger Ausbildung der Partikeln II zu beobachten wären.

Diese Grenzwerte haben wir dadurch abschätzen können, dass wir zu wässrigen Lösungen des Nucleosides Adenosin steigende Mengen verschiedener Metallionen zusetzten und wiederum die Differenzabsorption gegen freies Adenosin¹¹⁾ ermittelten. Es ergaben sich hierbei Differenzspektren, wie sie auch in den ATP-Komplexen für

¹¹⁾ Bei Zusatz von Cu²⁺ auch gegen eine entsprechende Lösung dieses Ions (s. exper. Teil).

die Metallion-Adeninring-Koordination typisch sind (Fig. 4). Der Grad der Ausbildung der Differenzspektren nimmt mit steigender Konzentration der zugesetzten Metallionen zunächst etwa linear zu und zeigt dann bei höheren Konzentrationen von

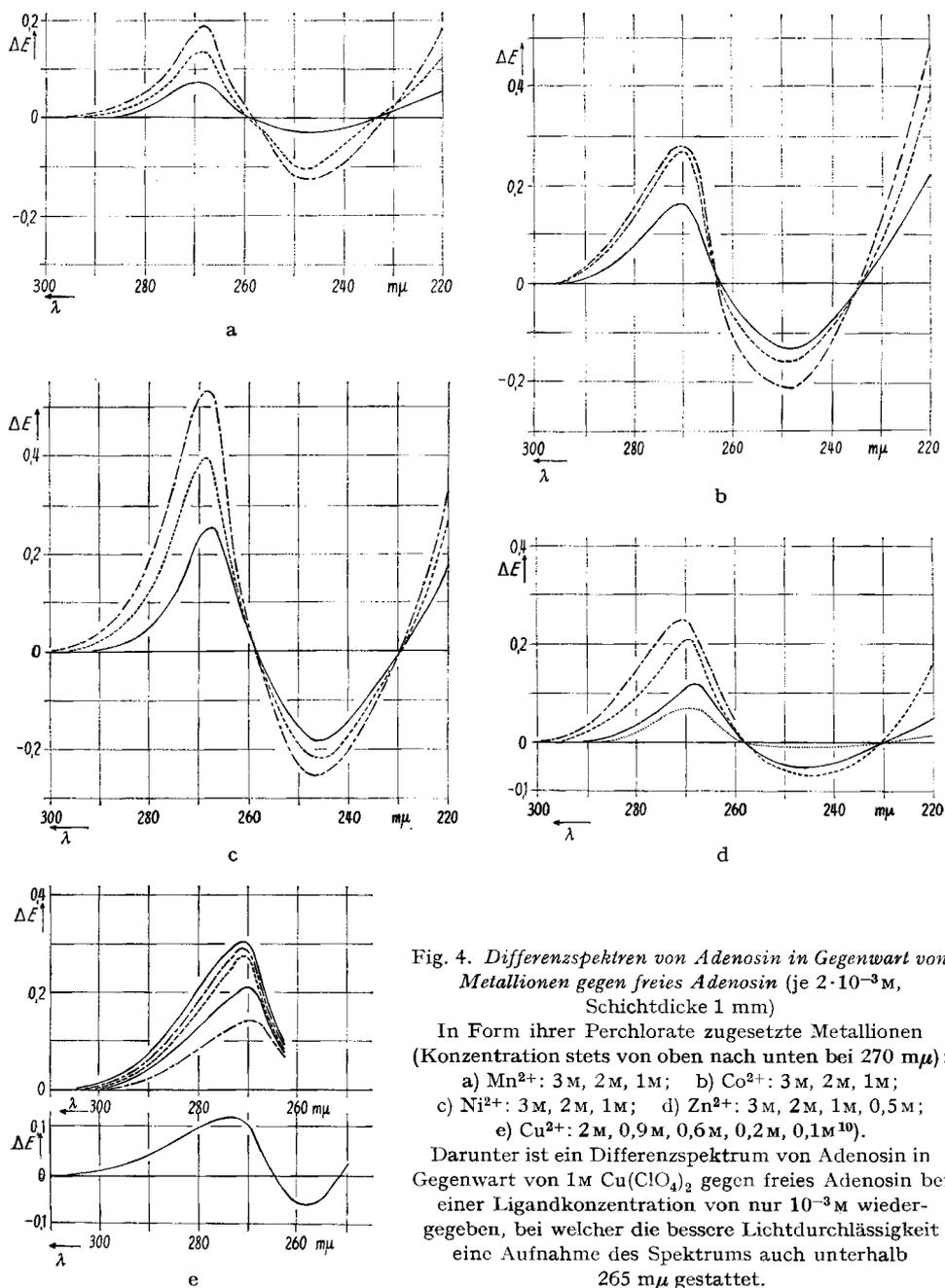


Fig. 4. Differenzspektren von Adenosin in Gegenwart von Metallionen gegen freies Adenosin (je $2 \cdot 10^{-3} M$, Schichtdicke 1 mm)

In Form ihrer Perchlorate zugesetzte Metallionen (Konzentration stets von oben nach unten bei $270 m\mu$):

- a) Mn^{2+} : 3 M, 2 M, 1 M; b) Co^{2+} : 3 M, 2 M, 1 M;
 c) Ni^{2+} : 3 M, 2 M, 1 M; d) Zn^{2+} : 3 M, 2 M, 1 M, 0,5 M;
 e) Cu^{2+} : 2 M, 0,9 M, 0,6 M, 0,2 M, 0,1 M¹⁰).

Darunter ist ein Differenzspektrum von Adenosin in Gegenwart von 1 M $Cu(ClO_4)_2$ gegen freies Adenosin bei einer Ligandkonzentration von nur $10^{-3} M$ wiedergegeben, bei welcher die bessere Lichtdurchlässigkeit eine Aufnahme des Spektrums auch unterhalb $265 m\mu$ gestattet.

Mn²⁺, Co²⁺, Ni²⁺, Cu²⁺ und Zn²⁺ eine zunehmende Absättigung der Komplexbildung an. In diesen Fällen lässt sich der Grenzwert der Differenzextinktion bei 270 mμ für vollständige Komplexbildung graphisch extrapolieren (Fig. 5). Die so erhaltenen Grenzwerte ΔE_{max} (siehe Tabelle) sind für die untersuchten Metallionen von der Grössenordnung 0,33–0,66. Wir können nunmehr mit ihrer Hilfe aus den Werten der Differenzextinktion bei 270 mμ in den ATP-Komplexen der genannten Metallionen nach Gleichung (2) die Gleichgewichtsanteile α der Partikeln II errechnen (Tabelle).

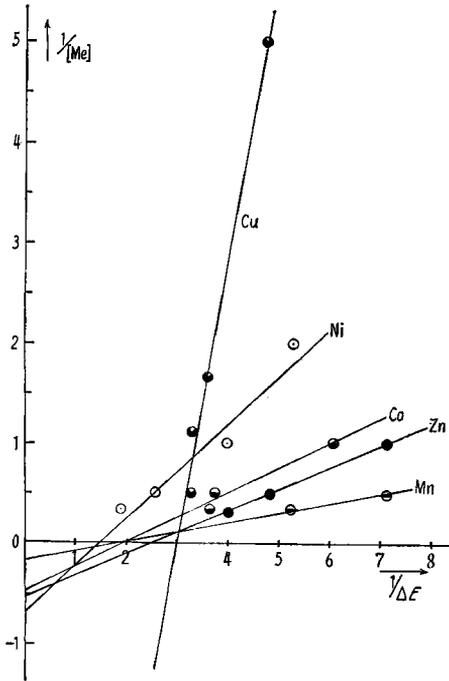


Fig. 5. Graphische Ermittlung von ΔE_{max} und K_{MeAde}^{Me} aus den Differenzextinktionen von Fig. 4

Die Abszissenschnittpunkte der einzelnen Regressionslinien liefern 1/ΔE_{max}, die Ordinatenschnittpunkte –K_{MeAde}^{Me}.

Ausbildungsgrad α der Partikeln II bei ATP-Komplexen verschiedener Metallionen sowie graphisch ermittelte Werte für ΔE_{max} und K_{MeAde}^{Me}.

Me ²⁺	ΔE	ΔE _{max}	log K _{MeAde} ^{Me}	α
Ca ²⁺	0,01	~ 0,3–0,7		~ 0,01–0,03
Mg ²⁺	0,01	~ 0,3–0,7		~ 0,01–0,03
Mn ²⁺	0,02	0,6	– 0,82	0,03
Co ²⁺	0,06	0,5	– 0,30	0,12
Ni ²⁺	0,13	0,66	– 0,17	0,2
Cu ²⁺	0,25	0,33	+ 0,84	0,8
Zn ²⁺	0,05	0,4	– 0,28	0,15

Für Ca²⁺ und Mg²⁺ konnten die Sättigungswerte der Differenzextinktion auf diese Weise nicht direkt ermittelt werden. Nehmen wir jedoch an, dass auch hier ähnliche Grenzwerte gelten wie bei den anderen Metallionen, so lassen sich für die Gleichgewichtsanteile der Partikeln II in den ATP-Komplexen dieser Metallionen die in der Tabelle angegebenen Werte α abschätzen.

Die Stabilitätskonstanten der Adenosinkomplexe (K_{MeAdc}^{Me}) der Metallionen Mn^{2+} , Co^{2+} , Ni^{2+} , Cu^{2+} und Zn^{2+} – ebenfalls aus Fig. 5 graphisch approximativ ermittelt – sind zwar recht gering, folgen im übrigen jedoch durchaus der in dieser Reihe gültigen Stabilitätsabstufung (Tabelle). Auch der Ausbildungsgrad der Partikeln II in den ATP-Komplexen der einzelnen Metallionen folgt der gleichen Stabilitätsabstufung: Er ist durchweg etwa so gross wie der Ausbildungsgrad des Adenosin-Komplexes in einer 0,5–1M Lösung des betreffenden Metallions.

In den Komplexen Ca-ATP, Mg-ATP, Mn-ATP, Co-ATP, Ni-ATP und Zn-ATP sind, wie erwartet, die Gleichgewichtsanteile der Partikeln mit Adenin-Metallion-Koordination so gering, dass sie sich auf globale Gleichgewichtskonstanten wie z. B. K_{MeATP}^{Me} kaum auswirken werden. Im Cu-ATP hingegen – wo die Ausbildung der Cu^{2+} -Adenin-Bindung offenbar nahezu vollständig ist – erwartet man durch den zusätzlichen Eintritt des N-Liganden Adenosin in die Koordinationssphäre des Cu^{2+} eine Erhöhung der globalen Stabilitätskonstanten gegenüber derjenigen des Komplexes I, in welchem Cu^{2+} nur an die Phosphatkette gebunden ist. Die Stabilität dieses Komplexes I lässt sich nicht direkt ermitteln. Wir haben statt dessen die Stabilität des Cu^{2+} -Komplexes von Methyltriphosphat (MTP) gemessen, in welchem nach infrarot-spektroskopischen Untersuchungen die gleichen Bindungsverhältnisse zwischen Cu^{2+} und Polyphosphatkette vorliegen wie im Cu-ATP [10], Wir erhielten¹²⁾:

$$\log K_{CuMTP}^{Cu} = 6,17 \pm 0,05; \quad \log K_{CuATP}^{Cu} = 6,30 \pm 0,05$$

Der Komplex Cu-ATP ist mithin – entgegen der Erwartung – kaum stabiler als der Cu^{2+} -Komplex des Methyltriphosphats. Ob die freie Energie der Cu^{2+} -Adenin-Komplexbildung für eine Verbiegung des Liganden oder für die Aufweitung eines Komplexes zwischen Adenin- und Phosphat-Teil der ATP-Molekel [14] verbraucht wurde, bleibe dahingestellt. Jedenfalls machen diese Ergebnisse deutlich, dass beim Schluss von Gleichgewichtsdaten auf Strukturverhältnisse von Komplexen Vorsicht geboten ist: bei Unkenntnis der spektrophotometrischen Ergebnisse hätte man auch aus obigen Gleichgewichtsdaten sicherlich auf die Abwesenheit der Cu^{2+} -Adenin-Bindung im Cu-ATP geschlossen.

Es bleibt noch abzuklären, auf welche Weise bei der Ausbildung der Partikeln II die Metallionen an das Adeninringsystem koordiniert werden. COHN & HUGHES [4] haben in den Komplexen Mn-ATP, Cu-ATP und Zn-ATP eine spezifische Relaxation bzw. Verschiebung der Kernspin-Resonanz des C-8-Protons festgestellt und konnten dadurch wahrscheinlich machen, dass in diesen Komplexen ein Kontakt des Metallions mit dem N-7 des Adeninrings stattfindet. Bei der Ähnlichkeit der Differenzspektren ist anzunehmen, dass wahrscheinlich auch in allen anderen von uns untersuchten ATP-Komplexen bei der Ausbildung der Partikeln II das Metallion mit dem gleichen N-Atom des Adeninrings in Kontakt tritt¹³⁾.

Dass Differenzspektren auf Unterschiede der Koordinationsstruktur empfindlich ansprechen, zeigen folgende Daten: Hg^{2+} ruft bei gleichartiger Koordination an N-heterocyclische Liganden –

¹²⁾ S. exper. Teil.

¹³⁾ Das N-Atom 7 ist – wie Kalottenmodelle zeigen – durch ein an der Phosphatkette fixiertes Metallion am leichtesten erreichbar. Aber auch im Adenosin wird – nach der Ähnlichkeit der Differenzspektren – das gleiche, offenbar sterisch am wenigsten behinderte N-Atom bevorzugt koordiniert.

z. B. 2,2'-Bipyridyl – sehr ähnliche Differenzspektren hervor wie andere zweiwertige Metallionen (Fig. 6). Im Komplex Hg-ATP hingegen, in welchem sowohl nach Protonenspinresonanz-Befunden (Fig. 8) wie auch nach Befunden von EICHHORN [15] an Adenosin-Hg²⁺-Komplexen eine andersartige Koordination an das Adeninringssystem vorliegen muss als bei anderen Metallionen, macht sich diese Veränderung der Koordinationsstruktur auch durch eine auffallende Veränderung des Differenzspektrums bemerkbar (Fig. 7).

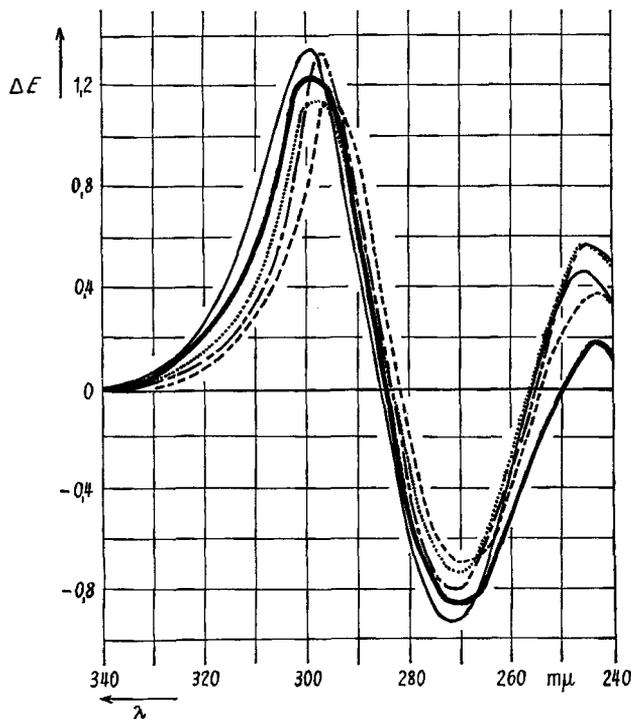


Fig. 6. Differenzspektren des Hg²⁺- und einiger andere Me²⁺-2,2'-Bipyridyl-1:1-Komplexe gegen freies 2,2'-Bipyridyl
Hg-Bipy: —, Cu-Bipy: —, Co-Bipy: ·····,
Ni-Bipy: y ·····, Zn-Bipy: - - - -;
(Konzentrationen je 10⁻⁴M, Schichtdicke 10 mm).

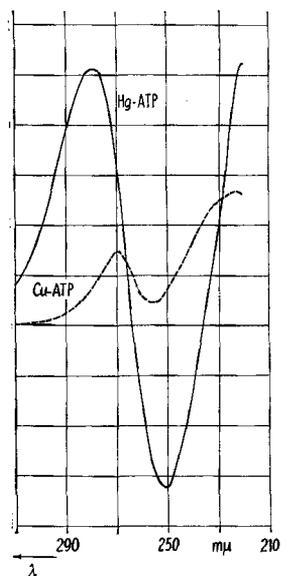


Fig. 7. Differenzspektren von Hg-ATP²⁻ und Cu-ATP²⁻ gegen freies ATP⁴⁻ (10)
(Konzentration 2 · 10⁻⁴, Schichtdicke 10 mm)

Die Bindung der Metallionen Zn²⁺, Cu²⁺, Ni²⁺, Co²⁺, Mn²⁺, Mg²⁺ und Ca²⁺ am N-7 des Adeninrings im ATP bedingt nicht die gleichzeitige Ausbildung einer weiteren Chelatbindung zur 6-Aminogruppe des Adeninringssystems. Zur Ausbildung eines solchen 5-gliedrigen Chelatringes wäre eine Drehung der mit dem Ring koplanaren -NH₂-Gruppe um 90° notwendig, d. h. das freie Elektronenpaar müsste aus seiner Einbeziehung in das π-System gelöst werden. In Anbetracht des grossen Beitrages dieses freien Elektronenpaares zur Stabilität des elektronenarmen Purinringssystems besitzt eine solche Entkopplung keine grosse Wahrscheinlichkeit. Die 6-Aminogruppe ragt mithin also wohl störend in den Bereich der Hydratationshülle des Metallions. Diese sterische Hinderung und die durch die teilweise Abgabe des freien Elektronenpaares auf der Aminogruppe befindliche positive Ladung [16] sind wohl auch der

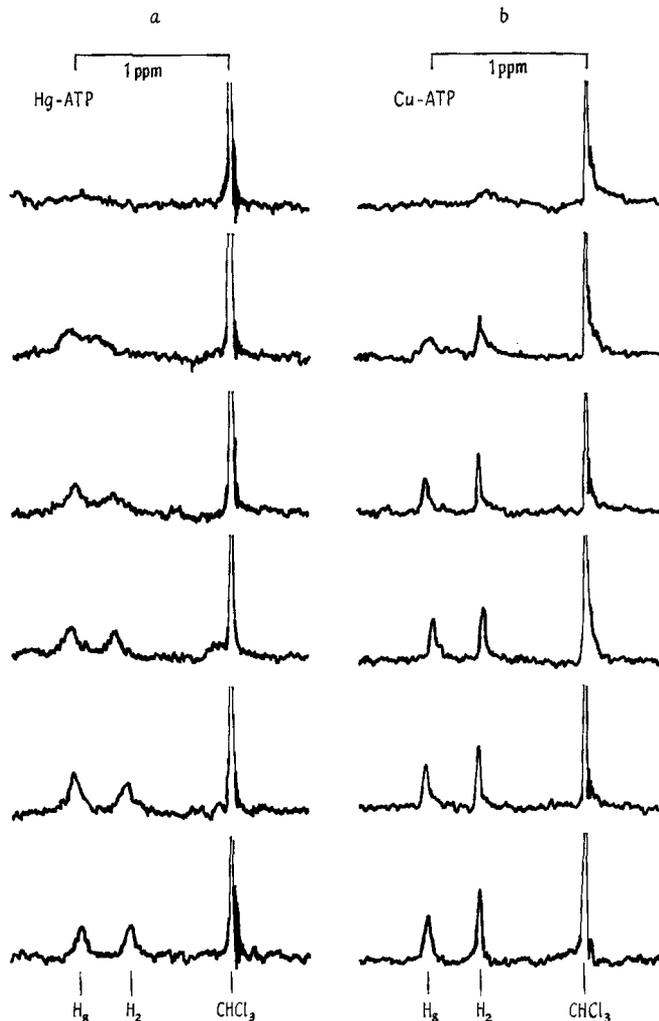


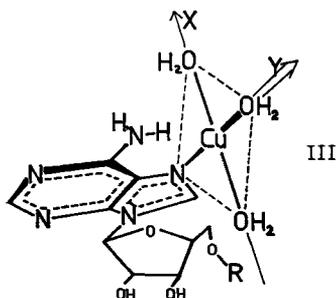
Fig. 8. Protonenspinresonanzspektren von $0,2M$ ATP^{4-} in D_2O :

- a) Vorwiegende Beeinflussung des H-2-Signals bei Zusatz von $Hg(NO_3)_2$ (links), im Verhältnis $ATP^{4-}:Hg^{2+}$ 1:1; 1: 0,58; 1: 0,37; 1: 0,24; 1: 0,16; 1: 0,11 (von oben nach unten)
- b) Vorwiegende Beeinflussung des H-8-Signals bei Zusatz von $Cu(ClO_4)_2$ (rechts; vgl. auch [4]), in Konzentrationen von $4 \cdot 10^{-4}$; $4 \cdot 10^{-5}$; $4 \cdot 10^{-6}$; $4 \cdot 10^{-7}$; $4 \cdot 10^{-8}$ 0 (von oben nach unten).

Grund dafür, dass das Adeninringssystem ein soviel schwächerer Komplexbildner ist, als z.B. Pyridin. Bei der Koordination des Cu^{2+} wird die sterische und elektrostatische Störung durch die Aminogruppe am kleinsten sein, wenn sich die tetragonale Koordinationsfläche quer zur Adeninringebene stellt (III).

Ob und wie im Cu-ATP Phosphatgruppen eine oder mehrere der drei Hydratwasser-Molekeln der Struktur III unter Ausbildung makrocyclischer Chelatringe ersetzen, sowie über die Bedeutung der so entstehenden Komplexkonfigurationen bei

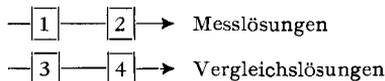
nicht-enzymatischen Reaktionen der ATP-Metallionen-Komplexe, soll in weiteren Mitteilungen berichtet werden.



Wir danken dem SCHWEIZERISCHEN NATIONALFONDS ZUR FÖRDERUNG DER WISSENSCHAFTLICHEN FORSCHUNG für die Unterstützung dieser Arbeit. Den Herren Dr. P. DIEHL und T. LEIPERT sind wir für die Durchführung von Protonenspinresonanz-Messungen, den Herren Drs. G. EICHORN, P. HEMMERICH und B. PRIJS für Ratschläge bei der Abfassung des Manuskriptes zu Dank verpflichtet. Einen wesentlichen Teil der experimentellen Untersuchungen hat Frl. M. DÜRSTELER durchgeführt.

Experimentelles. - *Reagentien:* ATP-Dinatriumsalz von SIGMA CHEMICAL Co., St. Louis, Mo., USA; Bipyridyl *p. a.* von E. MERCK AG, Darmstadt; Metall-perchlorate von FLUKA AG, Buchs. Methyltriphosphat (MTP) wurde hergestellt durch Methylierung von Pentanatrium-triphosphat mit Dimethylsulfat, gereinigt durch zweimalige Chromatographie über eine Anionenaustauschersäule (Amberlite IRA 400, 100–325 mesh; $(\text{NH}_4)_2\text{CO}_3$ -Gradient-Elution), in die H^+ -Form und dann mit NaOH in die Form des Tri- bzw. Tetra-natriumsalzes übergeführt.

UV.-Differenzspektren: Gemessen wurden bei 20° in 1-mm-Küvetten mit einem BECKMAN-DB-Spektrophotometer (Spaltöffnung 2,2 mm), jeweils eine $2 \cdot 10^{-3} \text{ M}$ Lösung des Liganden (Na_4ATP bzw. Adenosin), welche Metallperchlorate in den angegebenen Konzentrationen enthielt, gegen eine gleich konzentrierte Lösung des Liganden allein. Entsprechende Messungen bei Ligandkonzentrationen $2 \cdot 10^{-4} \text{ M}$ in 10-mm-Küvetten ergaben die gleichen Resultate. Bei Zusatz von $\text{Cu}(\text{ClO}_4)_2$ musste dessen UV.-Absorption dadurch eliminiert werden, dass die Differenzspektren entsprechend folgendem Schema in vier Küvetten gemessen wurden:



Küvette 1: Ligand + $\text{Cu}(\text{ClO}_4)_2$

Küvette 2: H_2O (Fig. 2 und 4) bzw. Na_4MTP (Fig. 3)

Küvette 3: Ligand

Küvette 4: $\text{Cu}(\text{ClO}_4)_2$ (Fig. 2 und 4) bzw. $\text{Cu}(\text{ClO}_4)_2 + \text{Na}_4\text{MTP}$ (Fig. 3)

Die Versuchsbedingungen für die restlichen Differenz-Absorptionsmessungen sind in den Legenden der entsprechenden Figuren angegeben.

Protonenspinresonanz-Messungen (VARIAN-NMR.-Gerät, 56,4 Mc/s) von CuATP^{2-} und HgATP^{2-} wurden freundlicherweise von Herrn T. LEIPERT im Physikalischen Institut der Universität Basel vorgenommen.

Stabilitätskonstanten von Cu-ATP und Cu-MTP: 200 ml folgender Lösungen wurden bei 20°C mit 0,1N NaOH titriert (METROHM-Potentiograph, kombinierte Glaselektrodenmesskette):

1. $\text{Na}_2\text{H}_2\text{ATP}$ $1,75 \cdot 10^{-4} \text{ M}$, HClO_4 10^{-4} M , NaClO_4 $0,1 \text{ M}$;
2. wie 1., + $\text{Cu}(\text{ClO}_4)_2$ $2,13 \cdot 10^{-4} \text{ M}$;
3. wie 1., aber mit Na_3HMTP statt $\text{Na}_2\text{H}_2\text{ATP}$;
4. wie 3., + $\text{Cu}(\text{ClO}_4)_2$ $2,13 \cdot 10^{-4} \text{ M}$;
5. HClO_4 10^{-4} M , NaClO_4 $0,1 \text{ M}$.

Aus den Titrationskurven der Liganden allein erhielten wir:

$$pK_{\text{MTPH}}^{\text{H}} = 6,45 \pm 0,02 \quad pK_{\text{ATPH}}^{\text{H}} = 6,47 \pm 0,02 \quad pK_{\text{ATPH}_2}^{\text{H}} = 4,10 \pm 0,03$$

Aus der Protonenfreisetzung in Gegenwart von Cu^{2+} lässt sich $K_{\text{CuATP}}^{\text{Cu}}$ bzw. $K_{\text{CuMTP}}^{\text{Cu}}$ nur bei Kenntnis von $K_{\text{CuATPH}}^{\text{H}}$ bzw. $K_{\text{CuMTPH}}^{\text{H}}$ berechnen. Wir beabsichtigten ursprünglich, diese Deprotonierungskonstanten zu variieren, bis die Stabilitätskonstanten im ausgewerteten pH-Gebiet (pH 4,2–5,2) keinen Gang mehr zeigen. Der zuerst gewählte, in früheren Untersuchungen [8] erhaltene Wert von $\log K_{\text{CuATPH}}^{\text{H}} = 3,93$ ergab jedoch bereits befriedigende Werte für $K_{\text{CuATP}}^{\text{Cu}}$ und bei Verwendung von $\log K_{\text{CuMTPH}}^{\text{H}} = 3,93$ auch für $K_{\text{CuMTP}}^{\text{Cu}}$.

SUMMARY

In aqueous solutions of ATP-complexes of some bivalent alkaline earth and 3d transition metal ions the degree of co-ordination between metal ion and adenine ring has been estimated from UV. difference spectra. In Ca-ATP, Mg-ATP, Mn-ATP, Co-ATP, Ni-ATP and Zn-ATP only a low percentage of the complex molecules show co-ordination between metal ion and adenine ring, whereas in Cu-ATP complex particles with metal-adenine co-ordination predominate.

Institut für anorganische Chemie der Universität Basel

LITERATURVERZEICHNIS

- [1] A. SZENT-GYÖRGYI, in *Enzymes: Units of Biological Structure and Function*, New York 1956, p. 393.
- [2] M. COHN, *Biochemistry* 2, 623 (1963).
- [3] Vorläufige Mitteilung: P. SCHNEIDER, H. BRINTZINGER & H. ERLIENMEYER, *Experientia* 19, 623 (1963).
- [4] M. COHN & T. R. HUGHES JR., *J. biol. Chemistry* 237, 176 (1962).
- [5] M. M. TAQUI KHAN & A. E. MARTELL, *J. physic. Chemistry* 66, 10 (1962); *J. Amer. chem. Soc.* 84, 3037 (1962).
- [6] H. BRINTZINGER, *Helv.* 44, 935 (1961).
- [7] E. WALAAS, *Acta chem. scand.* 72, 528 (1958).
- [8] U. HANDSCHIN & H. BRINTZINGER, *Helv.* 45, 1037 (1962).
- [9] S. WATANABE, L. EVENSON & I. GULZ, *J. biol. Chemistry* 238, 324 (1963).
- [10] Vorläufige Mitteilung: H. BRINTZINGER, *Biochim. biophys. Acta* 77, 343 (1963).
- [11] A. EPP, T. RAMASARMA & L. R. WETTER, *J. Amer. chem. Soc.* 80, 724 (1958).
- [12] R. M. BOCK & N. S. LING, *Arch. Biochem. Biophysics* 62, 253 (1956).
- [13] G. L. EICHHORN & P. CLARK, *Proc. 7. ICC. 126* (1962).
- [14] B. H. LEVEDAHL & T. W. JAMES, *Biochim. biophys. Acta* 21, 298 (1956).
- [15] G. L. EICHHORN & P. CLARK, *J. Amer. chem. Soc.* 85, 4020 (1963).
- [16] A. PULLMAN & B. PULLMAN, *J. chim. phys.* 58, 904 (1961).