

62. Über Struktur und Aktivität der den H_2O_2 -Zerfall katalysierenden Cu^{2+} -Komplexe

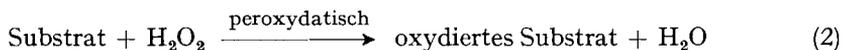
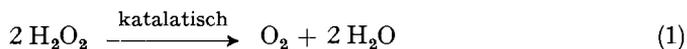
VII¹⁾. Cu^{2+} -Nucleinbasen-Wechselwirkung in den Cu^{2+} -Komplexen von Adenosin-, Inosin-, Guanosin-, Cytidin-, Uridin- und Thymidin-5'-triphosphat²⁾

Metall-Ionen und H_2O_2 , 13. Mitteilung¹⁾

von H. Sigel

(13. I. 67)

1. Einleitung. - In früheren Mitteilungen wurde gezeigt, dass die Metallionen-katalysierten Reaktionen des H_2O_2 in der Koordinationssphäre des Metall-Ions ablaufen [2] [3]. Die H_2O_2 -Abnahme setzt sich dabei zusammen aus dem katalatischen (Gleichung 1) und dem peroxydatischen (Gleichung 2) H_2O_2 -Verbrauch [3]³⁾.



Welche der beiden Reaktionen überwiegt, hängt – ausser von den Reaktionsbedingungen – von den komplexchemischen Eigenschaften und der Oxydierbarkeit des koordinierten Liganden ab [3]. Wesentlich ist, dass nur solche Teile eines Liganden oxydiert werden, die an das Metall-Ion koordiniert sind [1] [3]. Diese Feststellung ermöglicht es umgekehrt, aus einer gefundenen «peroxydatischen Aktivität»³⁾ Rückschlüsse auf die Koordination eines Liganden und damit auf die Struktur des entsprechenden Komplexes zu ziehen. Wir haben demnach in dieser Reaktion – wie von uns bereits gezeigt wurde [1] – eine Art «molekulare Sonde» zur Verfügung.

2. Problemstellung. - Vom Cu^{2+} -Komplex des ATP ist bekannt [4], dass sich neben der Triphosphatkette auch das Adeninsystem unter Ausbildung eines Makrochelates an das Metall-Ion koordiniert. Dementsprechend wird, wie wir gezeigt haben [3], in diesem Cu^{2+} -Komplex das Adeninsystem durch H_2O_2 abgebaut, was sich spektrophotometrisch (bei 260 nm) verfolgen lässt.

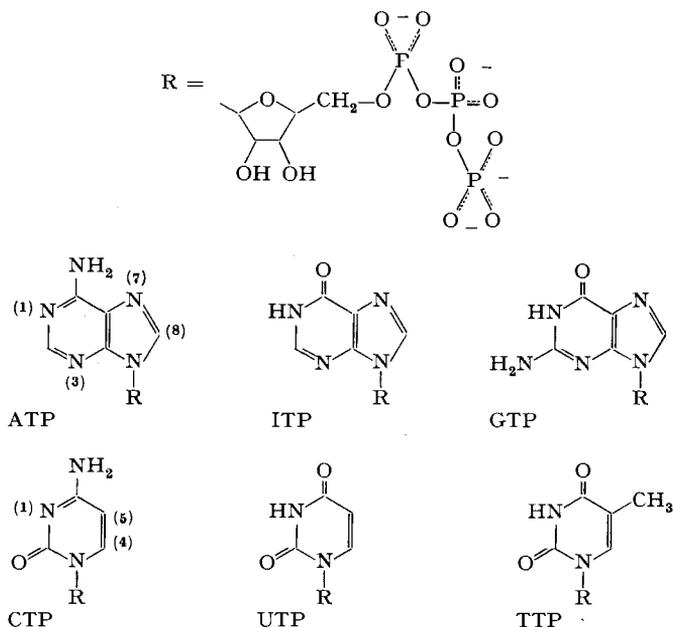
Beim Cu^{2+} -ITP-Komplex wird von SCHNEIDER & BRINTZINGER [5] die Ausbildung eines derartigen Makrochelates ebenfalls angenommen; nachgewiesen wurde eine solche kürzlich im Co^{2+} -ITP-Komplex von STERNLICHT, SHULMAN & ANDERSON [6]. Über die Beteiligung der übrigen Nuclein-Basen an der Komplexbildung in den Cu^{2+} -Nucleosidtriphosphat-Komplexen liegen unseres Wissens keine Angaben vor (vgl. auch [7]).

¹⁾ Vorhergehende Mitteilung = [1].

²⁾ Abkürzungen für die Nucleosid-5'-triphosphate (in der obigen Reihenfolge): ATP, ITP, GTP, CTP, UTP und TTP.

³⁾ Für das Folgende sei definiert: gemessener H_2O_2 -Verbrauch = katalytische Aktivität = katalatische + peroxydatische Aktivität.

Wir versuchten deshalb durch Messen der «peroxydatischen Aktivität» solcher Komplexe – ähnlich wie beim erwähnten Cu^{2+} -ATP-Komplex [3] – zu einer Aussage über die entsprechenden Komplexstrukturen zu gelangen. Untersucht wurden die Cu^{2+} -Komplexe der im Formelschema aufgeführten Nucleosidtriphosphate



3. Ausbildungsgrad der Cu^{2+} -Nucleotid-Komplexe. WALAAS [8] hat gezeigt, dass die Stabilitätskonstanten $\log K_{\text{MeL}}^{\text{Me}}$ z. B. der Co^{2+} -Komplexe von CTP, UTP, ATP, GTP und ITP alle zwischen 4,48 und 4,74 liegen, d. h. von praktisch derselben Grösse sind⁴⁾. Die globalen Komplexbildungskonstanten werden somit durch die Art der Nucleinbase praktisch nicht beeinflusst, wie auch ein von SCHNEIDER, BRINTZINGER & ERLIENMEYER [9] durchgeführter Vergleich der Konstanten der Cu^{2+} -Komplexe von Methyltriphosphat und ATP bestätigt.

Es darf daher angenommen werden, dass die Konstanten der Cu^{2+} -Nucleotid-Komplexe von derselben Grösßenordnung sind wie die bisher einzig bekannte Konstante des ATP-Komplexes ($\log K_{\text{CuL}}^{\text{Cu}} = 6,30$; Aciditätskonstante des Liganden: $\text{p}K_{\text{HL}}^{\text{H}} = 6,47$ [9]), bzw. dass der Ausbildungsgrad der verschiedenen Komplexe bei einem bestimmten pH derselbe ist. Aus den angegebenen Konstanten für den Cu^{2+} -ATP-Komplex berechnet sich, dass er ab pH 7, also in dem für die Untersuchungen entscheidenden pH-Gebiet, zu mehr als 96% ausgebildet ist. Dasselbe gilt folglich auch für die übrigen Cu^{2+} -Nucleotid-Komplexe.

4. Messungen. – Aus der Abnahme der UV.-Absorptionsbande der jeweiligen Nucleinbase liess sich die Anfangsgeschwindigkeitskonstante k' des Abbaus dieser Base ermitteln und damit ein Mass für die peroxydatische Aktivität³⁾ gewinnen. Die Extinktionen wurden in 1- oder 2-mm-Quarzküvetten bei 249 nm (ITP), 279 nm (GTP), 263 nm (CTP), 247 nm (UTP und TTP) gemessen, d. h. jeweils beim Maximum, oder, bei pH-abhängigen Spektren, am isosbestischen Punkt. Die Anfangsgeschwindigkeitskonstanten k' wurden pseudoerster Ordnung in bezug auf den Abbau der Basen nach $k' = (2,30/t) \cdot \log(E_0/E_t)$ (min^{-1}) berechnet. Die Konstanten k' sind

⁴⁾ Von TTP liegen keine Werte vor, jedoch darf angenommen werden, dass sie denjenigen von UTP sehr ähnlich sind, da die beiden Liganden sich nur durch eine Methylgruppe an der Nucleinbase unterscheiden.

zwar nur «scheinbare», da wir die Extinktion der Abbauprodukte nicht kennen, die jeweils von der gemessenen Extinktion abgezogen werden sollte; die recht gute Übereinstimmung von k' zu verschiedenen Zeiten lässt jedoch auf eine niedrige Extinktion der Abbauprodukte schliessen, so dass unsere «scheinbaren» Geschwindigkeitskonstanten den «wahren» wohl sehr nahe kommen. Als Mass für die katalytische Aktivität³⁾ dienten wiederum [2] [3] die Anfangsgeschwindigkeitskonstanten $k = (2,30/t) \cdot \log ([H_2O_2]_0/[H_2O_2]_t)$ (min^{-1}) des H_2O_2 -Zerfalls pseudo-erster Ordnung in bezug auf H_2O_2 . Gemessen wurde wie in [2] beschrieben.

Wie bei allen bisher untersuchten katalytischen H_2O_2 -Reaktionen treten auch hier ternäre Peroxokomplexe auf, deren Ausbildung am Verlauf der Extinktion bei 360 nm in Abhängigkeit vom pH verfolgt wurde (vgl. [2]).

5. Ergebnisse. - Die Anfangsgeschwindigkeitskonstanten k' des Abbaus der Nucleinbasen in Abhängigkeit vom pH («peroxydatische Aktivitätskurven») in den Cu^{2+} -Komplexen von ITP, GTP, CTP, UTP und TTP (s. Fig. 1, die auch die Daten für den Abbau des Cu^{2+} -ATP-Komplexes [3] enthält) zeigen in allen Fällen eine, wenn auch unterschiedliche, peroxydatische Aktivität an. Es müssen also in allen untersuchten Komplexen die Basen an der Komplexbildung beteiligt sein, was wohl – wie beim Cu^{2+} -ATP-Komplex [4] – zur Ausbildung von Makrochelaten führt.

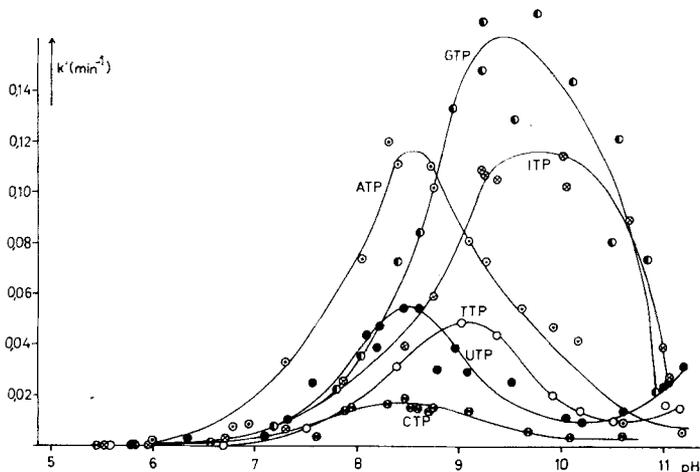


Fig. 1. Peroxydatische Aktivität³⁾ ($H_2O_2: 8 \cdot 10^{-3} M$)

Anfangsgeschwindigkeitskonstante k' (min^{-1}) des Nucleotidbasen-Abbaues, gemessen als Reaktion pseudo-erster Ordnung in bezug auf die Ligandkonzentration, in Abhängigkeit vom pH für die Cu^{2+} -Komplexe ($4 \cdot 10^{-4} M$) von ATP (\odot) (vgl. [3]), ITP (\otimes), GTP (\bullet), CTP (\oplus), UTP (\ominus) und TTP (\circ).

Ein Vergleich der Anfangsgeschwindigkeitskonstanten k des H_2O_2 -Zerfalls³⁾ in Abhängigkeit vom pH («katalytische Aktivitätskurven»; s. Fig. 2) mit den «peroxydatischen Aktivitätskurven» (Fig. 1) zeigt, dass bis pH ca. 8,5 das H_2O_2 im wesentlichen peroxydatisch verbraucht wird, d. h. dass die katalytische Aktivität erst bei $pH > 8,5$ einsetzt.

Mit Hilfe der «Extinktionskurven» (Verlauf der Extinktion bei 360 nm in Abhängigkeit vom pH) lassen sich die gelben ternären Peroxokomplexe (s. Fig. 3) in allen Fällen – wie zu erwarten [3] – bereits mit dem Auftreten der peroxydatischen Aktivität nachweisen.

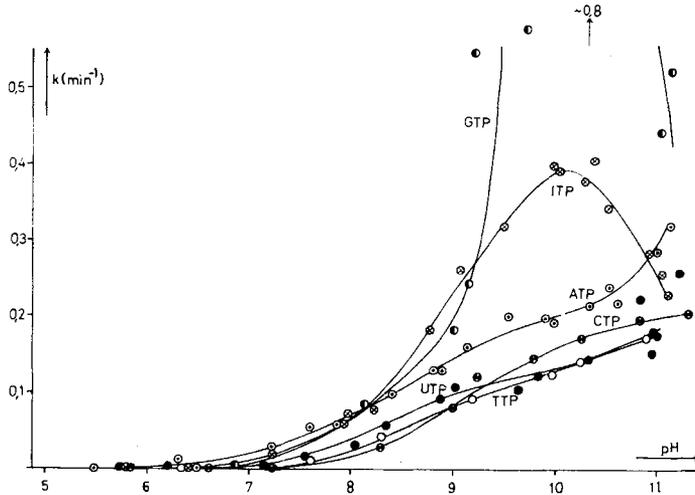


Fig. 2. Katalytische Aktivität³⁾

Anfangsgeschwindigkeitskonstante k (min^{-1}) des H_2O_2 -Zerfalls, gemessen als Reaktion pseudo-erster Ordnung in bezug auf H_2O_2 ($8 \cdot 10^{-3} \text{M}$), in Abhängigkeit vom pH für die Cu^{2+} -Komplexe ($4 \cdot 10^{-4} \text{M}$) von ATP (○) (vgl. [3]), ITP (⊗), GTP (●), CTP (⊙), UTP (●) und TTP (○).

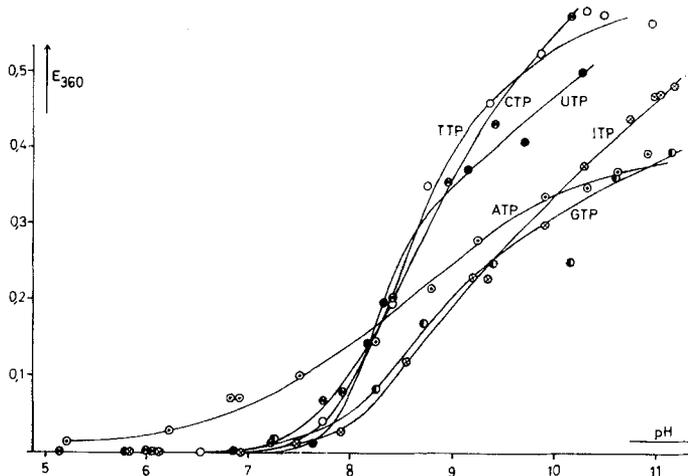


Fig. 3. Ausbildung ternärer Cu^{2+} -Peroxykomplexe in H_2O_2 -haltigem Milieu ($8 \cdot 10^{-3} \text{M}$)

gemessen an der Extinktionszunahme bei 360 nm (1-cm-Quarzküvetten) in Abhängigkeit vom pH für die Cu^{2+} -Komplexe ($4 \cdot 10^{-4} \text{M}$) von ATP (○) (vgl. [3]), ITP (⊗), GTP (●), CTP (⊙), UTP (●) und TTP (○).

6. Diskussion. - Mit der Feststellung, dass sämtliche untersuchten Cu^{2+} -Nucleotid-Komplexe peroxydatische Aktivität zeigen, ist die Frage nach der Koordination der Nuclein-Basen an das Metall-Ion im Prinzip beantwortet. Diese Koordination – deren Ausmass noch abzuklären bleibt (vgl. auch [4]) – ist wohl in Analogie zum ATP [4] mit der Ausbildung von Makrochelaten verbunden. Aus den Versuchsergebnissen lassen sich jedoch noch weitere Aussagen gewinnen.

Die «katalytischen Aktivitätskurven» (Fig. 2) zeigen, dass die Cu^{2+} -Komplexe in zwei Gruppen zerfallen (vgl. auch Fig. 1): Bei den Komplexen von CTP, UTP, TTP und ATP nimmt die katalytische Aktivität mit steigendem pH zu, bei den Komplexen von ITP und GTP erreicht sie dagegen bei pH ca. 10 ein Maximum und fällt dann bis pH ca. 11 wieder steil ab.

Die Frage, welches Strukturmerkmal für diese Unterschiede verantwortlich ist, lässt sich wohl so beantworten, dass die Nucleinbasen von ITP bzw. GTP *zwei* potentielle Koordinationsstellen besitzen, nämlich N(7) und den Sauerstoff an C(6), gegenüber nur *einer* bei den übrigen vier Nucleotiden.

Die Vermutung von SCHNEIDER *et al.* [5] bzw. die Befunde von STERNLICHT *et al.* [6], dass in ITP-Komplexen die Base zwei Koordinationsstellen betätigt, werden durch unsere Befunde bestätigt: Im Cu^{2+} -ATP-Komplex [4] [10] besetzt die Triphosphatkette zwei Koordinationsstellen des Kupfer-Ions, so dass am Cu^{2+} zwei Koordinationsstellen «frei»⁵⁾ bleiben. Dasselbe darf wohl auch für die übrigen Cu^{2+} -Triphosphatkomplexe angenommen werden. Wird durch die Nucleinbase nur eine weitere Koordinationsstelle besetzt, so verbleibt für die Ausbildung des ternären Peroxokomplexes eine vierte, was noch eine katalytische Aktivität zulässt [2] [3]. Wird jedoch diese letzte «freie» Koordinationsstelle mit zunehmendem pH (Deprotonierung an N(1)) ebenfalls durch die Nucleinbase besetzt, so muss dies zu einem Abfall der Aktivität führen [2] [11], wie wir ihn bei ITP bzw. GTP wirklich beobachten konnten. Gleichzeitig zeigen diese Befunde, dass tatsächlich eine Makrochelatformung eintritt, da nur auf diese Weise ein Ligand gleichzeitig vier Koordinationsstellen des Cu^{2+} besetzen kann.

Nach früheren Befunden [11] sollte diese vierfache Besetzung des Kupfer-Ions, die die Ausbildung ternärer Peroxokomplexe nicht mehr erlaubt, nicht nur zu einem Abfall der katalytischen Aktivität, sondern auch zu einem solchen der «Extinktionskurven» führen, was wir jedoch nicht beobachten konnten (Fig. 3). Ob und wie weit hierfür die durch Oxydation der Liganden [12] bzw. Hydrolyse der Phosphate [5] entstehenden Abbauprodukte verantwortlich sind, ist schwer zu entscheiden; beide Vorgänge würden zu komplexen Partikeln mit «freien» Koordinationsstellen führen. Ferner könnte vielleicht HOO^- eine der koordinierten Ligandgruppen verdrängen. Alle diese Vorgänge hätten keine Abnahme der «Extinktionskurve», hingegen wahrscheinlich eine Verzögerung des Aktivitätsabfalles zur Folge, d. h. die Maxima der Kurven in Fig. 2 liegen möglicherweise bei etwas zu hohem pH.

Interessant ist ferner, dass beim ITP- bzw. GTP-Komplex – nicht aber bei den anderen Komplexen – die peroxydatische Aktivität dem H_2O_2 -Zerfall³⁾ parallel verläuft; dies weist aber nicht etwa auf das Auftreten freier Radikale – wie $\text{HO}\cdot$ oder $\text{HOO}\cdot$ – hin [3] [1], sondern eher auf eine relativ grosse Oxydationsempfindlichkeit der betreffenden Basen, bzw. darauf hin, dass der der peroxydatischen bzw. katalytischen Reaktion gemeinsame «Zwischenkomplex» [3] [2] im gesamten pH-Gebiet gleich leicht in den peroxydatisch bzw. katalytisch aktiven Komplex überzugehen vermag.

⁵⁾ Wir bezeichnen eine Koordinationsstelle als «frei», wenn sie mit H_2O oder mit einem anderen durch HOO^- verdrängbaren Liganden besetzt ist.

Wenn auch eine peroxydatische Aktivität auf eine Koordination der oxydierten Haftstelle zu schliessen erlaubt, so kann jedoch aus der Grösse dieser Aktivität kaum auf die Stärke der Koordination geschlossen werden, denn hierbei wäre noch die Oxydationsempfindlichkeit der einzelnen Liganden zu berücksichtigen. In unserem speziellen Fall kann jedoch mit einem gewissen Vorbehalt umgekehrt wenigstens für ITP, GTP, UTP und TTP – da die Cu^{2+} -Komplexe der entsprechenden Nucleoside eine ungefähr gleiche Stabilität aufweisen [13] [14] – auf die Oxydationsempfindlichkeit dieser Nucleotide in Gegenwart von Cu^{2+} und H_2O_2 geschlossen werden (vgl. Fig. 1); sie nimmt ab in der Reihenfolge $\text{GTP} > \text{ITP} > \text{UTP} \sim \text{TTP}$. Dass UTP und TTP ungefähr gleich oxydationsempfindlich sind, ist verständlich, da sich die beiden Liganden nur durch eine Methylgruppe an C(5) unterscheiden.

Da sich in den untersuchten Nucleotid-Komplexen nach unseren Ergebnissen die Base – zumindest im Gleichgewicht – jeweils in der Koordinationssphäre des Cu^{2+} befindet, sollte sich diese Koordination im Falle von UTP, TTP, ITP und GTP, die an N(1) ein Proton tragen, auch in der Senkung der pK_A -Werte dieses Protons äussern. Dies ist tatsächlich der Fall, wie in einer späteren Mitteilung gezeigt werden wird. Im CTP-Komplex lässt sich die Wechselwirkung zwischen Cu^{2+} und Cytosin, das kein abspaltbares Proton besitzt, mit Hilfe von UV.-Differenzabsorptionsspektren ähnlich bestätigen, wie dies für den Cu^{2+} -ATP-Komplex von SCHNEIDER *et al.* [9] durchgeführt wurde (vgl. auch [15]).

Schliesslich stellt sich noch die Frage, an welchen Stellen der Nucleinbasen das Metall-Ion koordiniert. Die Protonen werden stets an N(1), bei Guanosin bei tieferen pH auch noch an N(7) [13] gebunden; dies bedeutet jedoch nicht, dass auch die Metall-Ionen hier koordiniert sein müssen [7]. Beim Cu^{2+} -ATP-Komplex haben hauptsächlich COHN & HUGHES [10] gezeigt, dass die Koordination an N(7) erfolgt (vgl. auch [4]). Beim Cu^{2+} -ITP-Komplex darf wohl in Analogie zum bereits erwähnten, von STERNLICHT *et al.* [6] untersuchten Co^{2+} -ITP-Komplex angenommen werden, dass sie am O von C(6) und an N(7) stattfindet. Bezüglich der Koordinationsstellen der übrigen Liganden können die NMR.-Untersuchungen von EICHHORN *et al.* [7] an Guanosin, Cytidin und Thymidin bzw. deren Monophosphaten gewisse Hinweise geben. Im Cu^{2+} -GTP-Komplex dürfte die Koordination, analog der des Cu^{2+} -ITP-Komplexes, am O von C(6) und an N(7) erfolgen, was mit den Befunden von EICHHORN *et al.* [7] sowie mit unseren Ergebnissen übereinstimmt (vgl. auch [16]). Im Cytidin bzw. CMP findet sie nach EICHHORN *et al.* [7] am N(1) statt. Bei Thymidin bzw. TMP konnten diese Autoren keine Wechselwirkung zwischen Base und Metall-Ion nachweisen; dies rührt wahrscheinlich daher, dass unter ihren Messbedingungen wohl zu wenig vom am N(1) deprotonierten Komplex ausgebildet ist; dazu kommt noch die relativ grosse Entfernung der möglichen Koordinationsstelle N(1)⁶⁾ vom Proton an C(4), die verhältnismässig schwache «Signale» erwarten lässt. Dass eine Koordination des Cu^{2+} an die Base im TTP bei höheren pH stattfindet, halten wir auf Grund unserer Ergebnisse für gesichert. Das für den Cu^{2+} -TTP-Komplex Angeführte gilt analog auch für den Cu^{2+} -UTP-Komplex.

⁶⁾ Eine Koordination an die Sauerstoffatome von C(2) bzw. C(6) ist nicht auszuschliessen, jedoch weniger wahrscheinlich, da Cu^{2+} N als Ligandatome dem O vorzieht.

Für Anregungen und hilfreiche Diskussionen bin ich den Herren Prof. Dr. H. ERLLENMEYER und Dr. B. PRIJS dankbar. Herrn W. VAN DE VOORT danke ich für seine sorgfältige Hilfe bei der experimentellen Durchführung dieser Arbeit und dem SCHWEIZERISCHEN NATIONALFONDS ZUR FÖRDERUNG DER WISSENSCHAFTLICHEN FORSCHUNG für seine Unterstützung.

SUMMARY

It has been stated in a preceding paper [3] that only parts of a ligand coordinated to a metal ion can be oxidized by H_2O_2 (= peroxidative activity). Considering the reversal of this statement to be true, it is shown by means of the peroxidative activity of the Cu^{2+} -complexes of ATP, ITP, CTP, UTP, and TTP that in these complexes the heteroaromatic groups contribute to the coordination of Cu^{2+} ion. By analogy with the Cu^{2+} -ATP-complex, where a macrocyclic phosphate-metal-adenine chelate is formed [4], and based on his experimental results, the author considers the existence of such a macrocyclic chelate in the copper complexes of ITP, GTP, CTP, UTP, and TTP as established. The coordination sites of the heteroaromatic groups in these complexes are discussed.

Institut für anorganische Chemie,
Universität Basel

LITERATURVERZEICHNIS

- [1] H. SIGEL, B. PRIJS & H. ERLLENMEYER, *Experientia* 23, 170 (1967).
- [2] H. SIGEL & U. MÜLLER, *Helv.* 49, 671 (1966).
- [3] H. SIGEL & H. ERLLENMEYER, *Helv.* 49, 1266 (1966).
- [4] R. PHILLIPS, *Chem. Reviews* 66, 501 (1966).
- [5] P. W. SCHNEIDER & H. BRINTZINGER, *Helv.* 47, 1717 (1964).
- [6] H. STERNLICHT, R. G. SHULMAN & E. W. ANDERSON, *J. chem. Physics* 43, 3133 (1965).
- [7] G. L. EICHORN, P. CLARK & E. D. BECKER, *Biochemistry* 5, 245 (1966).
- [8] E. WALAAS, *Acta chem. scand.* 72, 528 (1958).
- [9] P. W. SCHNEIDER, H. BRINTZINGER & H. ERLLENMEYER, *Helv.* 47, 992 (1964).
- [10] M. COHN & T. R. HUGHES, *J. biol. Chemistry* 235, 3250 (1960); 237, 176 (1962).
- [11] H. ERLLENMEYER, U. MÜLLER & H. SIGEL, *Helv.* 49, 681 (1966).
- [12] H. PRIESS & W. ZILLIG, *Z. physiol. Chem.* 342, 73 (1965); vgl. auch Y. UCHIDA, H. SHIGEMATU & K. YAMAFUJI, *Enzymologia* 29, 369 (1965); K. YAMAFUJI & Y. UCHIDA, *Nature* 209, 301 (1966).
- [13] A. M. FISKIN & M. BEER, *Biochemistry* 4, 1289 (1965).
- [14] A. ALBERT, *Biochem. J.* 54, 646 (1953).
- [15] H. SIGEL, *Experientia* 22, 497 (1966).
- [16] A. T. TU & J. A. REINOSA, *Biochemistry* 5, 3375 (1966).