

Monothiohydrochinonäther als Vermittler einer oxydativen Synthese von Adenosin-di- und -triphosphat (*ADP* und *ATP*)

Von

Theodor Wieland¹ und Edmund Bäuerlein

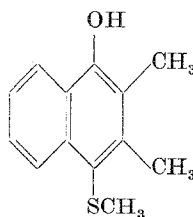
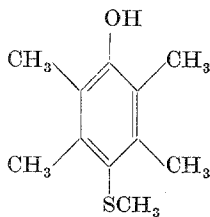
Aus dem Institut für Organische Chemie der Universität Frankfurt am Main

(Eingegangen am 17. April 1967)

Durch Oxydation von S-Methylmonothio-durohydrochinon (**1**) oder S-Methylmonothio-2,3-dimethyl-1,4-naphthohydrochinon (**2**) mit Brom in wasserfr. Pyridin entstehen aus den Tetrabutylammoniumsalzen der Phosphorsäure und des Adenosinmonophosphats: Adenosindiphosphat (*ADP*) und Adenosintriphosphat (*ATP*), aus Phosphat und Adenosindiphosphat: etwa 25% *ATP*.

By oxidation with bromine of S-methylmonothio-durohydroquinone (**1**) or of S-methylmonothio-2,3-dimethyl-1,4-naphthohydroquinone (**2**) in dry pyridine in presence of tetrabutylammonium salts of inorganic phosphate and of adenosine-monophosphate, adenosine-diphosphate (*ADP*) and adenosine-triphosphate (*ATP*) are formed. Inorganic phosphate and *ADP* give 25% *ATP* under the same conditions.

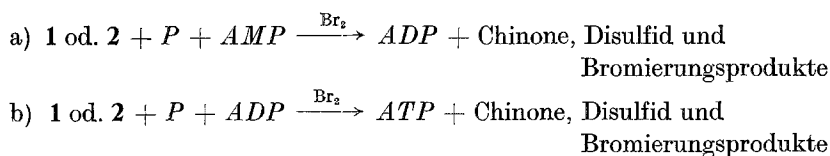
Kürzlich wurden die Synthesen von zwei Monothiohydrochinonmethyläthern, von S-Methylmonothio-durohydrochinon (**1**) und S-Methylmonothio-2,3-dimethyl-1,4-naphthohydrochinon (**2**) beschrieben².



¹ Fritz Wessely mit freundschaftlichem Gruß zum 70. Geburtstag gewidmet.

² Th. Wieland und E. Bäuerlein, Chem. Ber. **97**, 2103 (1964).

Beide sind leicht oxydierbar, z. B. mit Ferrichlorid, und gehen dabei in Anwesenheit von Wasser unter Abspaltung des schwefelhaltigen Rests in die entsprechenden Chinone über. Wir haben jetzt gefunden, daß in beträchtlichen Mengen *ADP* und *ATP* entstehen, wenn man die Oxydation der Thioäther **1** und **2** (mit Brom) in wasserfreiem Medium in Gegenwart von anorganischem Phosphat (*P*) und Adenosin-5'-monophosphat (*AMP*) ausführt [a) und b)]. Setzt man neben *P ADP* ein, so entsteht hauptsächlich *ATP* (b):



Als Lösungsmittel hat sich vor allem wasserfreies Pyridin bewährt. Um die Phosphate in Lösung zu bringen, wurden von allen die Tetrabutylammonium (*TBA*)-salze verwendet, die man durch Neutralisieren der wasserfreien Säuren mit *TBA*-Hydroxid erhält. Da aus diesem immer kleine Mengen Olefin entstehen und da das bei der Oxydation gebildete Dimethyldisulfid ebenfalls Brom verbraucht, setzten sich die Versuchsansätze aus äquimolekularen Mengen von **1** bzw. **2** und den *TBA*-Salzen, aber einer fünffachen Bromeinwaage zusammen. Die in mehreren Versuchen erzielten Ausbeuten an *ADP* und *ATP* gehen aus der Tab. 1 hervor.

Tabelle 1

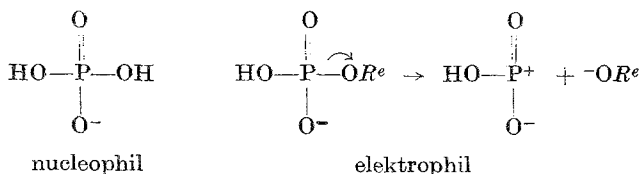
Thioäther	(<i>TBA</i>) ₂ <i>P</i> +	<i>ADP</i> (%)	<i>ATP</i> (%)
1	(<i>TBA</i>) ₂ <i>AMP</i>	12 ± 0,5	8,5 ± 0,3
2	(<i>TBA</i>) ₂ <i>AMP</i>	11 ± 1,0	6,5 ± 0,5
1	(<i>TBA</i>) ₃ <i>ADP</i>	—	25 ± 1,0
2	(<i>TBA</i>) ₃ <i>ADP</i>	—	27 ± 2,0

Oxydierte man die Thioäther **1** oder **2** nur in Anwesenheit von *AMP*, so wurden in einer geschätzten Ausbeute von 50% Di-adenosin-5'-diphosphat, das Dinucleotid (*AMP*)₂, gebildet.

Zum Reaktionsmechanismus

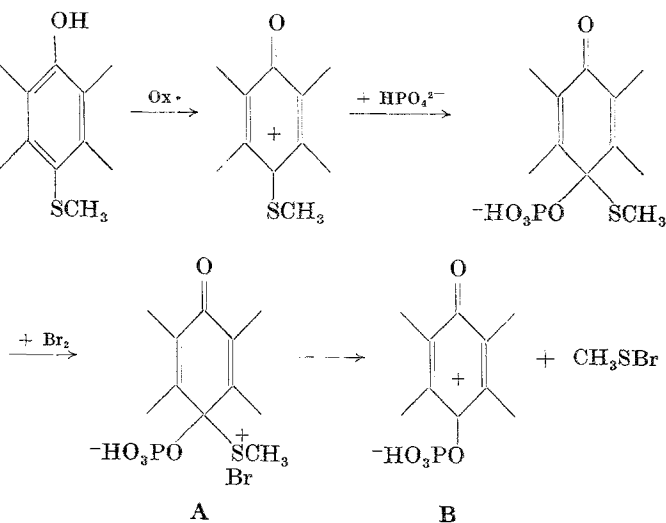
Zur Knüpfung der Pyrophosphatbindungen ist eine Aktivierung des Phosphats oder der Adenosinphosphate nötig, die im Zug der Oxydation der Monothiohydrochinonäther erfolgt. Hierzu muß das Phosphat mit dem Thioäther (oder einem Zwischenprodukt der Oxydation) in kovalente Bindung eintreten, so daß das Addukt durch die Oxydation phosphory-

lierende Eigenschaften erhält. Während das Phosphation gewisse nucleophile Eigenschaften besitzt, kann sein Phosphor elektrophil werden, wenn elektronenanziehende Reste (R^e) mit ihm verbunden werden:



Das nicht frei auftretende Phosphorylierungsmittel HPO_3 reagiert mit AMP zu ADP , mit ADP zu ATP . Ebenso kann man sich eine Aktivierung von AMP oder ADP vorstellen, die dann als Phosphorylierungsmittel mit Orthophosphat unter Bildung von ADP bzw. ATP reagieren können. Daß eine oxydative Aktivierung von AMP möglich ist, zeigt die Bildung des Dinucleotids $(\text{AMP})_2$ aus AMP als alleiniger Phosphatkomponente.

Man kommt zu einer befriedigenden Deutung des Ablaufs, wenn man die oben postulierte Addition des Phosphats an den Thioäther z. B. als eine durch die Oxydation der p-ständigen Hydroxylgruppe verursachte Anlagerung an das SCH_3 -tragende C-Atom annimmt:



Durch weitere Einwirkung des Broms kann dann ein phosphoryliertes Thioätherchinol (A) entstehen, das durch Oxydation am Schwefel den positiven Zustand erreicht hat. Abspaltung von CH_3SBr führte dann zum phosphorylierenden Agens B. Für das Sulfenylbromid, das hier eher als

Symbol für oxydierten Schwefel steht, kann man sich vorstellen, daß es z. B. selbst bromierend weiterwirken kann, dabei in CH_3S^- übergeht, das mit einem zweiten CH_3SBr zum Disulfid reagiert. Die formulierten Hypothesen gelten ebenso für eine primäre Anlagerung von *AMP* oder *ADP* anstelle des Phosphats.

Experimenteller Teil

Darstellung der Tetrabutylammoniumsalze

Nach Cundiff und Markunas³ wurde aus Tetrabutylammoniumjodid und Ag_2O in absol. Methanol eine Tetrabutylammoniumhydroxidlösung hergestellt, die mit wasserfr. Benzol auf 0,1*n* verdünnt wurde. Durch Versetzen mit der 1*n*-Lösung von etwa 89proz. Phosphorsäure in Dioxan und festen Einwaagen von *AMP* oder *ADP* entstanden die verwendeten Phosphatmischungen, nachdem im Rotationsverdampfer und anschließend 30 Min. bei 25° im Ölpumpenvak. (0,1 Torr) getrocknet war. Es hinterbleiben glasige bis schaumige Massen.

$(\text{TBA})_2\text{HPO}_4 + (\text{TBA})_2\text{AMP}$: 13,34 ml *n*/10- $(\text{TBA})\text{OH}$ (4/3 mM)
 (Salzmischung I) 1,34 ml *n*/1- H_3PO_4 (4/9 mM)
 0,081 g $\text{AMP} \cdot \text{H}_2\text{O}$ (2/9 mM)

$(\text{TBA})_2\text{HPO}_4 + (\text{TBA})_3\text{ADP}$: 11,11 ml *n*/10- $(\text{TBA})\text{OH}$ (10/9 mM)
 (Salzmischung II) 0,67 ml *n*/1- H_3PO_4 (2/9 mM)
 0,107 g $\text{ADPH}_3 \cdot 3 \text{H}_2\text{O}$ (2/9 mM)

Als Adenosinmonophosphorsäure wurde die Handelsware der Firma C. F. Boehringer und Söhne, Mannheim — Waldhof, verwendet, Adenosin diphosphorsäure wurde aus dem von gleicher Quelle stammenden Trinatriumsalz durch Austausch über eine Dowex 50 \times 8 Säule (H^+ -Form) dargestellt (Diplomarbeit von H. Aquila, Frankfurt a. M., 1967).

Oxydative Phosphorylierungen

Die oben geschilderten Mischungen der *TBA*-phosphate wurden jeweils in 10 ml absol. Pyridin unter Rühren mit einem Magnetstab gelöst. Zu den schwach gelben Lösungen wurde die jeweilige S-Methylverbindung zugegeben, die sofort in Lösung ging. Dann tropfte man das fünffache der berechneten Brommenge unter Magnetührung innerhalb einer Min. zu. Zuerst Dunkel-färbung, dann Aufhellung nach gelb und Abscheidung eines Niederschlags. Danach wurde noch eine Stde. weitergerührt und jeder Ansatz zur Bestimmung der *AMP*- und *ADP*-Ausbeuten aufgearbeitet.

Phosphorylierung von *AMP*

a) Mit S-Methyl-monothiodurohydrochinon (1)

$2 \mathbf{1} + 2 (\text{TBA})_2\text{HPO}_4 + (\text{TBA})_2\text{AMP} + 3 \text{Br}_2 \rightarrow 2 \text{Durochinon} + \text{CH}_3\text{—S—S—CH}_3 + \text{ATP}^{4-} + 4 \text{H}^+ + 6 (\text{TBA})^+\text{Br}^-$

Ansatz: Salzmischung I (s. oben), 0,0871 g Verb. **1** (4/9 mMol) in 10 ml absol. Pyridin + 0,170 ml Br_2 (fünffache ber. Menge).

³ R. H. Cundiff und P. C. Markunas, *Analyt. Chem.* **28**, 792 (1956).

b) Mit *S*-Methyl-2,3-dimethyl-monothionaphthohydrochinon (2)

$2 \mathbf{2} + 2 (TBA)_2HPO_4 + (TBA)_2AMP + 3 Br_2 \rightarrow 2$ Dimethylnaphthochinon + $CH_3-S-S-CH_3 + ATP^{4-} + 4 H^+ + 6 (TBA)^+Br^-$.

Ansatz: Salzmischung I (S. 1384), 0,0971 g Verb. 2 (4/9 mMol) in 10 ml absol. Pyridin + 0,170 ml Br_2 (fünffache ber. Menge).

Phosphorylierung von ADP

a) Mit *S*-Methyl-monothiodurohydrochinon (1)

$\mathbf{1} + (TBA)_2 HPO_4 + (TBA)_3 ADP + 1,5 Br_2 \rightarrow$ Durochinon + $0,5 CH_3-S-S-CH_3 + ATP^{4-} + 2 H^+ + 3 Br^- + 5 (TBA)^+$.

Ansatz: Salzmischung II (S. 1384), 0,0436 g Verb. 1 (2/9 mMol) in 10 ml absol. Pyridin + 0,0849 ml Br_2 (fünffache ber. Menge).

b) Mit *S*-Methyl-2,3-dimethyl-monothionaphthohydrochinon (2)

Stöchiometrie wie unter a).

Ansatz: Salzmischung II (S. 1384), 0,0485 g Verb. 2 (2/9 mMol) in 10 ml absol. Pyridin + 0,0849 ml Br_2 .

Die einzelnen Oxydationslösungen wurden bei 30° im Vak. eingengt, die Rückstände in soviel einer Mischung von 2 Vol. Pyridin und 1 Vol. 0,05*m*-TRIS-Puffer vom pH 7,55 gelöst, daß ein Endvolumen von 2 bis 4 ml resultierte. Diese konzentrierte Lösung konnte in 0,1 ml-Portionen auf 20 × 20 cm Platten an 0,5 mm Schichten aus Kieselgel HF (Merck) in *n*-Propanol—Ammoniak (25proz.)—Wasser (6 : 3 : 1 Vol.)⁴ chromatographisch getrennt werden. Durch 2—3maliges Aufsteigenlassen nach jeweiliger Luft- oder Föntrocknung trennten sich *AMP*, *ADP* und *ATP* vollständig (in dieser Reihenfolge langsamer wandernd). Die einzelnen Banden wurden unter der UV-Lampe (254 mμ) identifiziert und von der Platte geschabt. Die Gelportionen wurden dann in eine 1 × 10 cm Säule, auf eine 1 cm dicke Kieselgelschicht gefüllt, mit 0,05*m*-TRIS-Puffer von pH 7,55 unter Kontrolle des Eluates mit einem registrierenden UV-Durchflußphotometer (Uvicord, LKB Stockholm) eluiert, bis keine Absorption mehr angezeigt wurde. Dann wurden die Eluate zum Zweck der Gehaltsbestimmung mit demselben Puffer auf 25 ml aufgefüllt (Testlösung).

Die Auswertung wurde auf enzymatischem Weg in gekoppelten Methoden im Photometer Eppendorf (3 ml-Küvetten) vorgenommen, und zwar derartig, daß eine dem Substratgehalt proportionale Abnahme der Konzentration an hydriertem Nicotinamid-Adenindinucleotid (*NADH*) colorimetrisch gemessen wurde. Diese sehr spezifischen Methoden zur Bestimmung von *AMP*, *ADP* und *ATP* sind in: *H. U. Bergmeyer*, Meth. der enzymat. Analyse, Verlag Chemie, 1962, und im Biochimica-Dienst Nr. 6 der Firma C. F. Boehringer⁵, Mannheim, eingehend beschrieben und brauchen deshalb hier nicht wiederholt werden.

Der Nachweis des bei der Oxydation von **1** oder **2** in alleiniger Gegenwart von *AMP* gebildeten Dinucleotids erfolgte durch dünnschichtchromatographische Abtrennung im selben Lösungsmittel und Vergleich mit einem authentischen Präparat, wobei es rascher als *AMP* wanderte.

⁴ C. S. Hanes und F. A. Isherwood, Nature [London] **164**, 1107 (1947).

⁵ W. Gruber, H. Moellering und H. U. Bergmeyer, Enzym. biol. clin. **7**, 115 (1966).