

2-Anilino-1,3,4-thiadiazole, Hemmstoffe der oxidativen und photosynthetischen Phosphorylierung

2-Anilino-1,3,4-Thiadiazoles, Inhibitors of Oxidative and Photosynthetic Phosphorylation

G. Schäfer *

Medizinische Hochschule Hannover, Department Biochemie

A. Trebst

Lehrstuhl für Biochemie der Pflanzen, Ruhr-Universität Bochum

K. H. Büchel

Bayer AG, Forschungszentrum, Wuppertal

(Z. Naturforsch. **30 c**, 183–189 [1975]; eingegangen am 19. Dezember 1974)

Oxidative Phosphorylation, Photophosphorylation, Uncouplers, Structure-function Correlation

2-anilino-1,3,4-thiadiazoles carrying various substituents in the 5-position as well as in the benzene-ring were synthesized.

The compounds were tested with rat-liver-mitochondria and with spinach-chloroplasts and revealed to be potent uncouplers of both, oxidative and photosynthetic phosphorylation, with pI_{50} -values ranging from 6.79 to 4.05. At higher concentration all compounds are inhibitors of the Hill-reaction.

In mitochondria a fair correlation exists between pK_a of the acidic NH-group and the uncoupling activity; a maximum is obtained around $pK_a=6.8$, whereas in chloroplasts activity is shifted to more acid pK_a -values.

The compounds meet the requirements for uncouplers according to the chemi-osmotic theory, being lipophilic weak acids. N-methylation causes total loss of activity in mitochondrial oxidative phosphorylation.

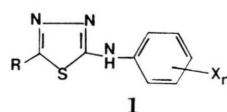
The inhibitory action on photosynthetic electron transport is located within photosystem II. This latter activity is almost independent of substituent effects in contrast to uncoupling of either respiratory- or photo-phosphorylation.

Einleitung

Gemeinsames strukturelles Merkmal zahlreicher Effektoren der biologischen Energiekonservierung in Photosynthese und Zellatmung ist eine azide NH-Gruppe in einem lipophilen Grundmolekül. Dies gilt insbesondere für die Hemmstoffe des photosynthetischen Elektronentransportes im Bereich von Photosystem II bzw. für Entkoppler der oxidativen Phosphorylierung. Wir konnten dies an einer Reihe von π -Überschuß-Heterocyclen feststellen, im ersten Fall bei Benzimidazolen¹⁻³, Imidazolen^{2,4}, Pyrido-imidazolen⁴, Purinen⁴ und Triazolen⁴ sowie im letzteren bei Hydrazonen⁵ und 2-Anilino-thiophenen⁶.

Um zu neuen aciden N-substituierten Anilinen zu gelangen, wurden als N-Substituenten negativ bzw. lipophil substituierte Thiadiazolreste gewählt, so daß

sich Verbindungen der allgemeinen Formel **1** ergeben:



R = CF₃, -C(CH₃)₃
X = Cl, NO₂, CF₃
n = 2,3

Die 2-Anilino-1,3,4-thiadiazole sind zum Teil beträchtlich azid (pK 4,3–8,9) und zeigen die erwarteten Eigenschaften als Entkoppler und als Hemmstoffe des photosynthetischen Elektronentransportes. Ihre Eigenschaften als Entkoppler in der Energiekonservierung in der Atmungskette sollen denen in der Photosynthese gegenübergestellt werden, da neben den aus dem Wirkungsprinzip ableitbaren Analogen auch gegensätzliche Effekte in beiden Systemen auftreten.

Requests for reprints should be sent to Prof. Dr. G. Schäfer, Department Biochemie, Medizinische Hochschule, D-3000 Hannover, Karl-Wiechert-Allee 9.

* G. Schäfer dankt Frl. Claudia Wegener für die ausgezeichnete technische Assistenz.



Dieses Werk wurde im Jahr 2013 vom Verlag Zeitschrift für Naturforschung in Zusammenarbeit mit der Max-Planck-Gesellschaft zur Förderung der Wissenschaften e.V. digitalisiert und unter folgender Lizenz veröffentlicht: Creative Commons Namensnennung-Keine Bearbeitung 3.0 Deutschland Lizenz.

Zum 01.01.2015 ist eine Anpassung der Lizenzbedingungen (Entfall der Creative Commons Lizenzbedingung „Keine Bearbeitung“) beabsichtigt, um eine Nachnutzung auch im Rahmen zukünftiger wissenschaftlicher Nutzungsformen zu ermöglichen.

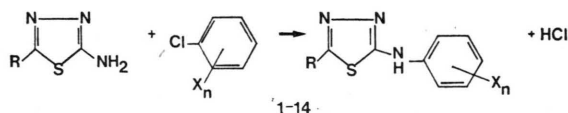
This work has been digitalized and published in 2013 by Verlag Zeitschrift für Naturforschung in cooperation with the Max Planck Society for the Advancement of Science under a Creative Commons Attribution-NoDerivs 3.0 Germany License.

On 01.01.2015 it is planned to change the License Conditions (the removal of the Creative Commons License condition "no derivative works"). This is to allow reuse in the area of future scientific usage.

Darstellung von 2-Anilino-1.3.4-thiadiazolen

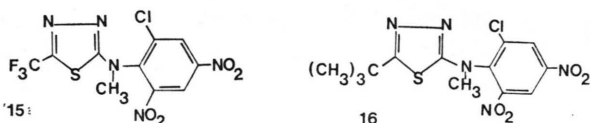
Für Anilino-thiadiazole sind in der Literatur eine Reihe von Verfahren angegeben, z. B. durch oxidative Behandlung von Thiosemicarbazonen bzw. durch intramolekulare Kondensation von 1-Acyl-4-aryl-thiosemicarbaziden⁷.

Wir stellten die hochsubstituierten Anilino-thiadiazole **1–16** (Tab. I) durch N-Alkylierung von 2-Amino-1.3.4-thiadiazolen^{8,9} mit aktivierten Chlorbenzolen in Gegenwart von Basen her.



Man führt die Reaktion in Lösungsmitteln wie Methanol oder Butanol durch. Im IR-Spektrum sind für die 2-Anilino-1.3.4-thiadiazole die starke CH-Bande des substituierten Phenylringes bei ca. 3100/cm sowie NH-Bande bei ca. 3250–3300/cm charakteristisch.

Die Verbindungen sind z. T. gelb bis orangerot oder gelbbraun gefärbte Substanzen, unlöslich in Wasser und wenig löslich in siedenden, niedrigen Alkoholen.



Die 2-Anilino-1.3.4-thiadiazole **1–14** können mit Diazomethan zu den 2-(N-Methylanilino)-1.3.4-thiadiazolen methyliert werden¹⁰. **15** und **16** sind die N-Methylderivate der Verbindungen **1** bzw. **9** und wurden synthetisiert, um auch bei der neuen Substanzklasse den früheren Befund zu prüfen, daß bei NH-aziden Hemmstoffen die N-Substitution zum Wirkungsabfall führt^{1, 4, 10}.

Material und Methoden

Mitochondrien wurden aus Rattenleber nach den bekannten Verfahren der Differentialzentrifugierung in isotonischer Saccharoselösung hergestellt. Die Atmungsgröße mit verschiedenen Substraten wurde polarographisch gemessen, wie früher beschrieben⁶. Der Proteingehalt der Partikelsuspensionen wurde nach einer modifizierten Biuretmethode¹¹ bei 546 nm gemessen; die Modifikation besteht in einer Entfärbung des Kupferkomplexes durch überschüssiges Cyanid in Probe und Blindwert mit nochmaliger

Extinktionsmessung. Dadurch wird ein durch die nicht vollständig entfernbare Trübung hervorgerufener Extinktionsanteil erfaßt, der vom Meßwert abgezogen wird. Das Verfahren wird mit Labtrol® Standardserum geeicht.

Die Entkoppler wurden den atmenden Mitochondrien als alkoholische Lösung zugesetzt. Der Zusatz von entsprechenden Mengen Äthanol allein ist auf die Atmung von Mitochondrien ohne Einfluß.

Die Chloroplasten (gewaschene Thylakoidpräparation) wurde nach Nelson *et al.*¹² hergestellt. Ihre photosynthetische Aktivität wurde durch Belichtung bei 15 °C mit 30 000 lx für 10 min festgestellt. Das Reaktionsmedium enthielt je 3 ml Ansatzvolumen in μ mol: Tricinpuffer (pH 8), 160; MgCl_2 , 10; ADP, 10; anorganisches Phosphat, 10 mit 90 000 cpm ^{32}P und Chloroplasten mit 0,2 mg Chlorophyll. Zur Messung der cyclischen Photophosphorylierung wurden 0,3 μ mol PMS (Phenazin-methosulfat) unter N_2 und in der Hill-Reaktion 0,1 μ mol Anthrachinon-2-sulfonsäure unter Luft zugesetzt. Die gebildete Menge ATP wurde durch den Einbau von ^{32}P nach Conover *et al.*¹³ bestimmt, die Elektronentransportrate in der Hill-Reaktion (pseudocyclischer e-Transport) durch die aufgenommene Menge Sauerstoff.

Beschreibung der chemischen Synthesen

Mitbearbeitet von K. Bungarz

1. Ausgangsprodukte

Die Ausgangsverbindungen 2-Amino-5-trifluormethyl-1.3.4-thiadiazol und 2-Amino-5-*tert*-butyl-1.3.4-thiadiazol werden nach bekannten Verfahren durch Umsetzung von Thiosemicarbazid mit Trifluoressigsäure bzw. Pivalinsäure erhalten^{8,9}.

2-Amino-5-trifluormethyl-1.3.4-thiadiazol

Ein Gemisch aus 643 g Polyphosphorsäure und 425 g (3,73 mol) Trifluoressigsäure wird auf 60 °C erwärmt. 272 g (3 mol) Thiosemicarbazid werden portionsweise hinzugegeben. Die Temperatur steigt dabei auf 75 °C an. Nach beendeter Zugabe wird langsam auf 105 °C erhitzt und bei dieser Temperatur 2 Stunden nachgerührt. Das Reaktionsgemisch wird anschließend auf 5 l Eiswasser gegeben. Dabei fällt ein farbloser Feststoff aus. Dieser wird abgesaugt und mit ca. 10 l Wasser säurefrei gewaschen. Das Produkt wird getrocknet. Man erhält 360 g (71% der Theorie) 2-Amino-5-trifluormethyl-1.3.4-thiadiazol⁸ vom Schmelzpunkt 219–221 °C.

2-Amino-5-*tert*-butyl-1.3.4-thiadiazol

Ein Gemisch aus 322 g Polyphosphorsäure und 190 g (1,87 mol) Pivalinsäure wird auf 65 °C er-

hitzt. 136 g (1,5 mol) Thiosemicarbazid werden portionsweise hinzugegeben. Die Temperatur steigt dabei auf 67 °C an. Nach beendeter Zugabe wird langsam auf 105 °C erwärmt und bei dieser Temperatur 2 Stunden nachgerührt. Das Reaktionsgemisch wird anschließend auf 5 l Eiswasser gegeben. Hierbei bildet sich ein zähes Öl. Nach Neutralisation mit wäßriger NH_3 -Lösung erhält man einen Feststoff. Dieser wird abgesaugt, mit 10 l Wasser gewaschen und getrocknet. Nach Auskochen mit 2 l Ligroin bildet sich ein grüner Feststoff. Man erhält 88 g (37,5% der Theorie) 2-Amino-5-*tert*-butyl-1.3.4-thiadiazol⁹ vom Schmelzpunkt 180 – 182 °C.

2. 2-Anilino-1.3.4-thiadiazole

2-(2'-Chlor-4'.6'-dinitro-anilino)-5-trifluormethyl-1.3.4-thiadiazol (Verb. 1 in Tab. I)

23,7 g 1.2-Dichlor-4.6-dinitro-benzol und 2-Amino-5-trifluormethyl-1.3.4-thiadiazol werden in 300 ml Methanol gelöst. Nach Zugabe von 31 ml 24-prozentiger wäßriger Natronlauge wird das Reaktionsgemisch 1 Stunde unter Rückfluß erhitzt. Danach wird auf 20 °C abgekühlt und mit 10-prozentiger Salzsäure versetzt, bis ein pH-Wert von 3 erreicht ist. Dabei fällt das Produkt als gelber Feststoff aus, welcher abgesaugt, mit 2 l Wasser gewaschen und anschließend getrocknet wird. Man erhält 31,8 g (86% der Theorie) 2-(2'-Chlor-4'.6'-dinitro-anilino)-5-trifluormethyl-1.3.4-thiadiazol vom Schmelzpunkt 192 – 193 °C. UV: λ_{max} 306 nm; $\log \epsilon = 4,98$.

Die analytischen Daten sind mit weiteren Beispielen 2 – 14 in Tab. I aufgeführt.

3. 2-(N-Methylanilino)-1.3.4-thiadiazole

2-(2'-Chlor-4'.6'-dinitro-N-methylanilino)-5-trifluormethyl-1.3.4-thiadiazol (Verb. 15 in Tab. I)

Zu 9,5 g (0,0257 mol) 2-(2'-Chlor-4'.6'-dinitro-anilino)-5-trifluormethyl-1.3.4-thiadiazol, gelöst in 200 ml abs. Äther, wird soviel ätherische Diazomethanolösung hinzugegeben, bis die N_2 -Entwicklung beendet ist. Überschüssiges Diazomethan wird durch Zugabe verdünnter Salzsäure zersetzt. Die ätherische Phase wird abgetrennt und über Na_2SO_4 getrocknet. Der Äther wird am Rotationsverdampfer abgezogen und das zurückbleibende Öl mit 100 ml Diisopropyläther ausgerührt.

Es entsteht ein gelber Feststoff. Man erhält 4,0 g (40,6% der Theorie) 2-(2'-Chlor-4'.6'-dinitro-N-methylanilino)-5-trifluormethyl-1.3.4-thiadiazol vom Schmelzpunkt 97 °C. NMR: $\delta\text{CH}_3 = 3,75$ ppm.

Analog wird das 2-(2'-Chlor-4'.6'-dinitro-N-methylanilino)-5-*tert*-butyl-1.3.4-thiadiazol (Verb. 16 in Tab. I) erhalten. Schmelzpunkt 129 – 131 °C.

Die analytischen Daten dieser beiden Verbindungen sind in Tab. I enthalten.

Ergebnisse

Als Kriterium für das Ausmaß der Entkopplung wurde die Methode des sogenannten „state-3 release“ gewählt. Dabei wird die Atmung durch Abwesenheit eines Phosphatakzeptors (ADP) im kontrollierten Zustand gehalten und kontinuierlich registriert. Zusatz von Entkoppler führt zu einer der Aktivität des Entkopplers entsprechenden Aufhebung dieser Kontrolle und daher zur Beschleunigung der Sauerstoffaufnahme. Dieser Vorgang ist konzentrationsabhängig und erlaubt eine Titration mit Entkoppler, wie früher gezeigt⁶. Die Effektivität wird im pI_{50} -Wert als negativer Logarithmus der halbmaximalen Wirkkonzentration ausgedrückt. Bei über die maximale Aktivierung der Atmung hinausgehenden Konzentrationen führen alle Entkoppler zu einer sukzessiven Atmungshemmung. Diese wird hier nicht näher diskutiert; sie setzt sich aus einer teilweisen, für niedrige Konzentrationen vernachlässigbaren Hemmung des Elektronentransportes in der Atmungskette und aus einer bei erhöhten Konzentrationen auftretenden kompetitiven Hemmung der Aufnahme von Substratanionen zusammen^{5, 21, 22}.

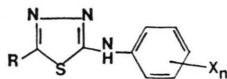
Tab. II gibt eine Zusammenfassung der pI_{50} -Werte für alle Verbindungen aus Tab. I. Die pI_{50} -Werte für die Entkopplung der oxidativen Phosphorylierung sind dabei denen in der Photophosphorylierung und der Hill-Reaktion gegenübergestellt.

1. Photophosphorylierung und Photosynthese

In den photosynthetischen Systemen sind die getesteten Anilino-thiadiazole sowohl Hemmstoffe des Elektronentransportes als auch der Photophosphorylierung (letzteres in einem cyclischen System gemessen, das nur Photosystem I benötigt). Dabei sind im Falle der CF_3 substituierten Anilino-thiadiazole geringere Konzentrationen für die Hemmung der Photophosphorylierung als für die des Elektronentransportes notwendig. Bei den *tert*-Butyl-substituierten Thiadiazol-derivaten ist dagegen meist die Hemmung des Elektronentransportes ausgeprägter. Wie in Mitochondrien sind also die Trifluormethyl-derivate wesentlich bessere Hemmstoffe der Photophosphorylierung als die *tert*-Butyl-derivate.

Die Abhängigkeit der Hemmwirkung von der Substitution zeigt eine Erhöhung der Wirksamkeit

Tab. I. 2-Anilino-1,3,4-thiadiazole.



No.	R	X	n	Schmp. [°C]	pK _a	Bruttoformel	(Mol- gewicht)	Analyse C H N		
1	CF ₃	2-Cl, 4,6-NO ₂	3	192—193	5,55	C ₉ H ₃ ClF ₃ N ₅ O ₄ S	(369,7)	Ber. 29,3 Gef. 29,3	0,81 1,1	19,0 19,6
2	CF ₃	2,4-NO ₂	2	129—131	6,8	C ₉ H ₄ F ₃ N ₅ O ₄ S	(335,2)	Ber. 32,3 Gef. 27,3	1,19 1,2	20,9 17,0
3	CF ₃	2,4,6-NO ₂	3	205—207	4,35	C ₉ H ₃ F ₃ N ₆ O ₆ S	(380,2)	Ber. 28,5 Gef. 28,3	0,79 1,3	22,1 22,2
4	CF ₃	3,5-NO ₂ , 4-Cl	3	171—172	6,15	C ₉ H ₃ ClF ₃ N ₅ O ₄ S	(369,7)	Ber. 29,3 Gef. 29,5	0,81 1,5	19,0 18,7
5	CF ₃	2,6-NO ₂ , 4-CF ₃	3	196—198	5,3	C ₁₀ H ₃ F ₆ N ₅ O ₄ S	(403,2)	Ber. 29,8 Gef. 29,4	0,75 1,40	17,35 17,8
6	CF ₃	2-CF ₃ , 4,6-NO ₂	3	193	4,9	C ₁₀ H ₃ F ₆ N ₅ O ₄ S	(403,2)	Ber. 29,8 Gef. 29,7	0,75 1,3	17,35 17,3
7	CF ₃	2,4-NO ₂ , 6-CH(CH ₃) ₂	3	184—185	6,5	C ₁₂ H ₁₀ F ₃ N ₅ O ₄ S	(377,3)	Ber. 38,3 Gef. 38,6	2,66 2,9	18,6 18,8
8	CF ₃	2,4-NO ₂ , 6-CH ₃	3	182—183	6,7	C ₁₀ H ₆ F ₃ N ₅ O ₄ S	(347,2)	Ber. 32,1 Gef. 34,6	1,78 2,0	20,8 20,1
9	—C(CH ₃) ₃	2-Cl, 4,6-NO ₂	3	172—175	7,15	C ₁₂ H ₁₂ ClN ₅ O ₄ S	(357,8)	Ber. 40,3 Gef. 41,8	3,4 3,6	19,7 19,5
10	—C(CH ₃) ₃	4-Cl, 2,6-NO ₂	3	116	8,65	C ₁₂ H ₁₂ ClN ₅ O ₄ S	(357,8)	Ber. 40,3 Gef. 40,9	3,4 3,5	19,7 19,8
11	—C(CH ₃) ₃	2-CH ₃ , 4,6-NO ₂	3	185—186	8,8	C ₁₃ H ₁₅ N ₅ O ₄ S	(337,2)	Ber. 46,3 Gef. 48,3	4,46 4,6	20,8 20,2
12	—C(CH ₃) ₃	2,4-NO ₂	2	124—126	8,9	C ₁₂ H ₁₃ N ₅ O ₄ S	(323,3)	Ber. 44,6 Gef. 45,8	4,06 4,1	21,7 22,0
13	—C(CH ₃) ₃	2-CH(CH ₃) ₂ , 4,6-NO ₂	3	178—180	8,7	C ₁₅ H ₁₉ N ₅ O ₄ S	(365,4)	Ber. 49,4 Gef. 50,3	5,25 5,1	19,2 19,0
14	—C(CH ₃) ₃	2,6-NO ₂ , 4-CF ₃	3	117—120	7,3	C ₁₃ H ₁₂ F ₃ N ₅ O ₄ S	(391,3)	Ber. 40,0 Gef. 39,4	3,1 3,6	17,9 18,0
15	N-Methylderivat von	No. 1	97	—	—	C ₁₀ H ₅ ClF ₃ N ₅ O ₄ S	(383,7)	Ber. 31,4 Gef. 31,5	1,31 1,7	18,3 18,8
16	N-Methylderivat von	No. 9	129—131	—	—	C ₁₃ H ₁₄ ClN ₅ O ₄ S	(371,5)	Ber. 42,1 Gef. 42,3	3,81 3,9	18,85 18,6

Tab. II. pI₅₀-Werte der 2-Anilino-thiadiazole als Entkoppler in Mitochondrien und Chloroplasten und als Hemmstoffe der photosynthetischen Sauerstoffentwicklung.

Substanz No.	pI ₅₀ ox. phos.	pI ₅₀ photophos.	pI ₅₀ Hill Reakt.
1	6,13	6,79	5,87
2	7,43	6,62	5,75
3	4,88	6,68	5,89
4	6,65	5,72	5,87
5	5,06	6,53	5,92
6	5,48	7,30	5,92
7	7,10	6,25	5,98
8	6,92	5,85	5,85
9	6,77	4,78	5,66
10	5,20	4,05	5,04
11	5,30	4,26	5,04
12	5,66	4,99	4,91
13	6,07	4,96	5,45
14	6,52	4,82	5,70

bei Einführung von CF₃ oder Cl in *ortho*-, aber nicht in *para*-Stellung des Anilinteils. Bei Vergleich mit den pK-Werten der Substanz ergibt sich, daß Substanzen mit pK-Werten oberhalb pK 7 schlechte Entkoppler der Photophosphorylierung sind. Auf die Instabilität der Substanzen muß hingewiesen werden. Bei Inkubation der Substanzen im Reaktionsmedium für wenige Minuten tritt bereits ein deutlicher Abfall der Hemmwirkung ein. Dies bringt es aus methodischen Gründen mit sich, daß die Entkopplung der nicht cyclischen Photophosphorylierung praktisch nicht erfaßt werden kann. Die Werte der Tab. II sind durch Messung der Hemmung der cyclischen Photophosphorylierung erhalten worden.

Bei der Hemmung des Elektronentransportes wird fast keine Abhängigkeit der Wirksamkeit von

der Struktur beobachtet. Wie Tab. III zeigt, ist die Hemmung des photosynthetischen Elektronentransportes im Bereich von Photosystem II lokalisiert, weil ein künstliches Donorsystem für Photosystem I (DAD/Ascorbat als Donor) nicht gehemmt wird. Damit verhalten sich die Anilino-thiadiazole, wie erwartet, analog den vielen bekannten Hemmstoffen von Photosystem II. Natürlich bleibt in einer Photo-reduktion mit Photosystem I allein die Hemmung der gekoppelten ATP-Bildung bestehen. Die Versuche sind weiterhin eine Kontrolle dafür, daß bei der Charakterisierung der Hemmpotenz als Entkoppler in der cyclischen Photophosphorylierung sich keine Hemmung des Elektronentransportes überlagert hat.

Tab. III. Lokalisation der Hemmstelle im photosynthetischen Elektronentransport.

	$\mu\text{mol O}_2$ aufgenommen	$\mu\text{mol ATP}$ gebildet
Kontrollansatz	-6,9	-6,4
10^{-5} M Substanz 2	<0,1	<0,1
10^{-5} M Substanz 2 + DAD	-7,3	0,5
$1,5 \times 10^{-5}$ M Substanz 9	-0,3	<0,1
$1,5 \times 10^{-5}$ M Substanz 9 + DAD	-7,4	3,7

Pseudocyclischer Elektronentransport mit $0,1 \mu\text{mol}$ Anthrachinon-2-sulfonsäure als Akzeptor. Das Reaktionsmedium enthielt $10 \mu\text{mol}$ Na-ascorbat. Zugabe von 10^{-4} mol DAD = Diaminoduroil als künstlicher Elektronendonator für Photosystem I.

2. Oxidative Phosphorylierung

Die 2-Anilino-1.3.4-thiadiazole sind nach den heutigen Vorstellungen als schwache lipophile Säuren „klassische“ Entkoppler im Sinne der Mitchell-Theorie¹⁴. Dabei bestimmen die Substituenten neben der Azidität auch die Lipophilität des Moleküls sowie die Stabilität des Anions in der apolaren Membranphase. In einer umfassenden Studie der Dicyano-Carbonyl-phenylhydrazone⁵ konnte gezeigt werden, daß eine Stabilisierung des Anions durch „hydrophobic shielding“ einen wesentlichen Beitrag zur Entkopplerwirksamkeit liefert.

Die Anzahl der hier untersuchten Derivate reicht für eine detaillierte Struktur-Wirkungskorrelation nicht aus; auch ist die Variation der Substituenten, welche sterische Merkmale und Lipophilität stark beeinflussen, nicht breit genug. Daher überwiegt hier der Einfluß des pK_a und es läßt sich eine deutliche Abhängigkeit zwischen pK_a und der Wirkung auf die oxidative Phosphorylierung erkennen, wie in

Abb. 1 dargestellt. Zwischen $\text{pK}_a = 4$ und $\text{pK}_a = 7$ ergibt sich eine praktisch linear ansteigende Korrelation für die vorliegenden Derivate. In diesem Bereich findet ein Anstieg der Aktivität um mehr als zwei Größenordnungen statt. Hingegen bilden die

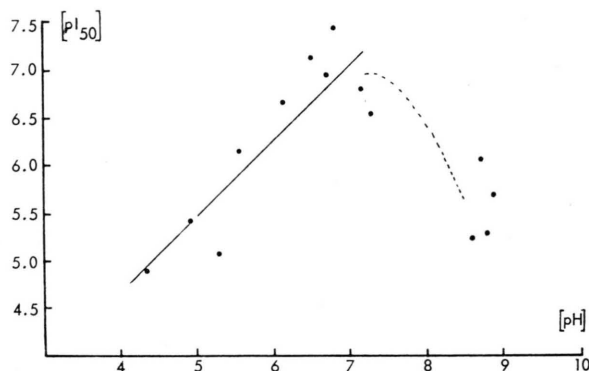


Abb. 1. Korrelation von pK_a und Entkoppleraktivität der 2-Anilino-1.3.4-thiadiazole an Lebermitochondrien der Ratte; für den linearen Teil gilt: $\text{pI}_{50} = 1,64 + 0,76 \text{ pK}_a$ ($r = 0,86$).

Derivate mit pK_a -Werten über 8 eine Gruppe mit signifikant verminderter Aktivität. Für den Zusammenhang von pK_a und Aktivität zeichnet sich daher für die vorliegenden Beispiele ein Wirkungsmaximum im Bereich von pK_a -Werten um 7 ab. Dies unterstreicht die wesentliche Beteiligung des Anions am Mechanismus der Entkopplung der mitochondrialen Atmungskette.

Ein Vergleich der CF_3 -substituierten mit den *tert*-Butyl-substituierten Thiadiazolen zeigt, daß die CF_3 -Verbindungen deutlich aktiver sind. Der mittlere pI_{50} -Wert liegt für diese bei 6,2, für die *tert*-Butyl-derivate bei 5,9. Unter den letzteren befinden sich auch alle Verbindungen mit pK_a -Werten über 8.

Bei einer Gegenüberstellung von pK_a -Werten und biologischer Wirksamkeit von Entkopplern sollte berücksichtigt werden, daß pK_a -Werte in Wasser sicher signifikant von denjenigen membranadsorbierter Moleküle abweichen. Zwar wurden die hier angegebenen pK_a -Werte in einem Medium geringerer Dielektrizitätskonstante, nämlich Alkohol/Wasser, ermittelt; sie können jedoch in der Grenzschicht zwischen Lipidphase und wässriger Lösung, also an der Membranoberfläche beträchtlich verschoben sein. Montal und Mitarbeiter¹⁵ haben gezeigt, daß hierbei die Oberflächenladung der adsorbierenden Membran selbst eine wesentliche Rolle spielt und zu pK_a -Verschiebungen bis zu 2 führt. Mit pK_a -Werten, die in Lipid-adsorbiertem Zustand ermittelt wurden,

sollte sich daher eine bessere Korrelation der molekularen Parameter und der biologischen Aktivität ergeben *.

Diskussion

Ein Vergleich der Aktivität von Entkopplern der oxidativen Phosphorylierung mit ihrer Aktivität in Chloroplasten ist in Tab. IV gegeben. Die Derivate wurden nach abnehmender Entkopplerwirksamkeit an Lebermitochondrien angeordnet und ihre rela-

Tab. IV. Vergleich der relativen Entkoppleraktivitäten von 2-Anilino-thiadiazolen an Mitochondrien und Chloroplasten.

No.	Phosphorylierung oxidat.		Phosphorylierung Photo-		Q ^c ox. phos. / photo-phos.
	pI ₅₀	pI ₅₀ rel.	pI ₅₀	pI ₅₀ rel.	
2	7,43	1,0	6,62	0,91	1,12
7	7,10	0,95	6,25	0,86	1,14
8	6,92	0,93	5,85	0,80	1,18
9	6,77	0,91	4,78	0,65	1,42
4	6,65	0,89	5,72	0,78	1,16
14	6,52	0,87	4,82	0,66	1,35
1	6,13	0,82	6,79	0,93	0,90
13	6,07	0,81	4,96	0,68	1,22
12	5,66	0,76	4,99	0,68	1,13
6	5,48	0,73	7,30	1,00	0,75
11	5,30	0,713	4,26	0,58	1,24
10	5,20	0,698	4,05	0,55	1,28
5	5,06	0,678	6,53	0,89	0,77
3	4,88	0,656	6,68	0,91	0,73

tive Wirkung durch Bezug auf die aktivste Verbindung normiert (relat. Aktivität = 1). Dem ist die aus den entsprechenden pI₅₀-Werten ermittelte relative Aktivität auf das System der Photophosphorylierung gegenübergestellt. Der Quotient „Q“ aus beiden relativen Aktivitäten zeigt an, auf welches der beiden Systeme eine Verbindung die jeweils stärkere Wirkung ausübt. Es zeigt sich, daß 10 von 14 Derivaten in Mitochondrien stärker als in Chloroplasten entkoppeln. Innerhalb der Reihenfolge der relativen Aktivitäten erscheinen für die verglichenen Systeme nur fünf Verbindungen in gleicher Sequenz.

Es fällt jedoch auf, daß die vier in Mitochondrien relativ schwächer entkoppelnden Derivate diejenigen mit den niedrigsten pK_a-Werten sind. Daraus ist ersichtlich, daß das Wirkungsmaximum in Chloroplasten gegenüber Mitochondrien zu sauren pH-Werten verschoben ist; eine Tatsache, die mit dem internen pK des belichteten Chloroplasten zusammenhängen könnte, der mit 6,0–6,5 angegeben

wird¹⁶. Da der energieabhängige Wasserstoffionen-transport in Mitochondrien in umgekehrter Richtung wie in Thylakoiden erfolgt, ist deren internem Kompartiment das cytoplasmatische Kompartiment der aeroben Säugerzelle mit höheren endogenen pK_a-Werten gegenüberzustellen. Dementsprechend wurden die Experimente mit Mitochondrien bei pH 7,2 durchgeführt. Bei diesem pH liegt im Falle der stark sauren Spezies die Konzentration des undissoziierten Entkopplers möglicherweise zu niedrig, um die Funktion eines H⁺-carriers in der Membran ausreichend zu erfüllen. Für diese Derivate ist daher in Mitochondrien eine gegenüber Chloroplasten schwächere Wirksamkeit verständlich. Der Unterschied zwischen den stärker sauren CF₃-Derivaten und den *tert*-Butylderivaten ist an Chloroplasten noch ausgeprägter als an Mitochondrien. Für die Summe der CF₃-Derivate beträgt der mittlere pI₅₀-Wert 6,34 (*n* = 8), während der Wert für die *tert*-Butylderivate mit pI₅₀ = 4,89 (*n* = 6) um mehr als eine Größenordnung darunter liegt.

Die Anilino-thiadiazole zeigen mit ihrem zweifachen Einfluß auf die photosynthetische Elektronentransportkette: Entkoppler und Hemmstoff, die gleiche Wirkung wie die Carbonylcyanidphenylhydrazone¹⁷. Sie sind bei niedrigen Konzentrationen (im Falle CF₃ substituierter Verbindungen) Entkoppler, bei höheren Hemmstoffe des Elektronentransportes. Letztere Hemmstelle kann im Bereich von Photosystem II lokalisiert werden. Die Strukturformel der Substanzen zeigt dann auch das übliche, für solche Hemmstoffe geforderte, aktive Strukturelement^{18–20}, eine NH-Gruppe, gebunden an ein sp²-hybridisiertes C-Atom.

Wie auf Grund früherer Untersuchungen zu erwarten, sind die N-Methylderivate als Entkoppler der oxidativen Phosphorylierung inaktiv (vgl. Tab. V). Dies gilt auch für die Entkopplung der Photophosphorylierung und wird durch N-Methylierung der sehr aktiven Verbindung **1** besonders deutlich

Tab. V. Einfluß der N-Methylierung auf die Hemmaktivität von 2-Anilino-thiadiazolen.

Substanz No.	pI ₅₀ ox. phos.	pI ₅₀ photo-phos.	pI ₅₀ Hill-Reakt.
1	6,13	6,79	5,87
N-Methylderivate von 1 (=15)	inaktiv	4,48	4,48
9	6,77	4,78	5,66
N-Methylderivat von 9 (=16)	inaktiv	4,28	4,30

* G. Schäfer, unveröffentlicht.

(Tab. V). Auch die Potenz als Hemmstoff des photosynthetischen Elektronentransportes wird durch N-Methylierung erniedrigt. Dies steht im Einklang mit

dem Befund an anderen Substanzklassen und Hemmstoffen des Elektronentransportes in Chloroplasten im Bereich von Photosystem II¹⁸⁻²⁰.

- ¹ K. H. Büchel, F. Korte, A. Trebst u. E. Pistorius, *Angew. Chem.* **77**, 911 [1965].
- ² K. H. Büchel, F. Korte u. R. B. Beechey, *Angew. Chem.* **77**, 814 [1965]; *Angew. Chem. Intern. Edit.* **4**, 788 [1965].
- ³ K. H. Büchel, W. Draber, A. Trebst u. E. Pistorius, *Z. Naturforsch.* **21b**, 243 [1966].
- ⁴ K. H. Büchel u. W. Draber, *Progress in Photosynthesis Res.* **Vol. III**, p. 1777 (Ed. H. Metzner), Internat. Union of Biolog. Sciences, Tübingen 1969.
- ⁵ W. Draber, K. H. Büchel u. G. Schäfer, *Z. Naturforsch.* **27b**, 159 [1972].
- ⁶ K. H. Büchel u. G. Schäfer, *Z. Naturforsch.* **25b**, 1465 [1970].
- ⁷ G. Ramachander u. V. R. Srinivasan, *J. Sci. Ind. Res., ZIC*, Nr. 3, 70 [1962].
- ⁸ W. A. Remers, G. J. Gibbs u. M. J. Weiss, *J. Heterocycl. Chem.* **6**, 835 [1969].
- ⁹ H. Kubo, R. Sato, I. Hamura u. T. Ohi, *J. Agr. Food Chem.* **18**, 60 [1970].
- ¹⁰ G. Renger, B. Bouges-Bocquet u. K. H. Büchel, *Bioenergetics* **4**, 491 [1973].
- ¹¹ G. Schäfer u. L. Nägel, *Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem.* **349**, 1365 [1968].
- ¹² N. Nelson, Z. Drechsler u. J. Neumann, *J. Biol. Chem.* **245**, 143—151 [1970].
- ¹³ T. E. Conover, R. L. Prairie u. E. Racker, *J. Biol. Chem.* **238**, 2831—2837 [1963].
- ¹⁴ P. Mitchell, *Chemiosmotic Coupling in Oxidative Phosphorylation and Photosynthetic Phosphorylation*, Glynn Res. Bodmin, Cornwall 1966.
- ¹⁵ M. Montal u. C. Gitler, *Bioenergetics* **4**, 363—382 [1973].
- ¹⁶ M. Avron, *Proc. 2nd International Congress on Photosynthesis Research, Stresa Vol. II*, p. 1697, Dr. N. V. Junk, The Hague 1971.
- ¹⁷ N. E. Good u. Izawa, *Metabolic Inhibitors* (eds. R. M. Hochster u. J. H. Quastel), **Vol. 4**, p. 179, Academic Press, New York 1973.
- ¹⁸ C. Hansch, *Progress in Photosynthesis Research* (ed. H. Metzner), **Vol. III**, p. 1685—1692, 1969.
- ¹⁹ D. E. Moreland, *Progress in Photosynthesis Research* (ed. H. Metzner), **Vol. III**, p. 1693—1711, 1969.
- ²⁰ K. H. Büchel, *Pestic. Sc.* **3**, 89—110 [1972].
- ²¹ R. Kraayenhof u. K. Van Dam, *Biochim. Biophys. Acta* **172**, 189 [1969].
- ²² R. Portenhauser, G. Schäfer u. R. Trolp, *Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem.* **350**, 1159 [1969]; sowie: G. Schäfer, R. Portenhauser u. R. Trolp, *Biochem. Pharmacol.* **20**, 2623 [1971].