

Thioacylamide und Thioacylharnstoffderivate als Inhibitoren des Photosystem II

Thioacylamides and Thioacylureas as Inhibitors of Photosystem II

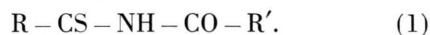
Hainfried E. A. Schenk und Jürgen Hanf
Institut für Chemische Pflanzenphysiologie,
Tübingen

(Z. Naturforsch. **32 c**, 880–883 [1977]; eingegangen
am 2. Mai/1. August 1977)

Pisum sativum, Thioacylamides, Thioacylureas, Inhibitors of
Photosystem II, Hill Reactions

Thioacylureas and thioacylamides were found to inhibit photosynthetic O_2 -evolution (Hill-reactions) of "broken chloroplasts", some derivatives approaching an I_{50} of 10^{-5} M. The inhibition site is near photosystem II. The inhibitory effects of the tested derivatives vary in their pH-dependency between pH 5 and 8.

Unterschiedlichste Vertreter aus den Klassen der Harnstoff- und Carbamat-Verbindungen haben nicht zuletzt wegen ihrer z. T. außerordentlich starken Hemmwirkung auf den photosynthetischen Elektronentransport praktische Anwendung als Herbizide gefunden. Trotzdem ist die Suche nach neuen Verbindungen mit speziellen Eigenschaften (z. B. hinsichtlich Resistenz und Selektivität) selbst in diesen Substanzklassen noch nicht abgeschlossen. Es erschien uns deshalb nicht ganz uninteressant, den Einfluß einer ambifunktionellen Substituentengruppe (hier der Thioacyl-Gruppe) auf die Hemmwirkung von Harnstoff- und Carbamat-Abkömmlingen der allgemeinen Formel (1) ^{1–6} zu untersuchen.



Wir überprüften dabei speziell den Einfluß auf den lichtabhängigen Elektronentransport osmotisch geschockter Chloroplasten („broken chloroplasts“) nach gängigen Verfahren (Hill- und Mehler-Reaktionen).

Material und Methoden

Chemikalien: Soweit käuflich wurden analysenreine Substanzen der Firma Merck (Darmstadt) verwendet. Die zu testenden Verbindungen waren im Labor von Prof. Dr. J. Goerdeler (Universität

Abkürzungen: DMS, Dimethylsulfoxid; MV, Methylviologen; DCPIP, 2,6-Dichlorphenolindophenol; ASC, Ascorbinsäure; HEPES, N-2'-Hydroxyethylpiperazin-2-ethansulfonsäure; TRICINE, N-Tris(hydroxymethyl)methylglyzin; EDTA, Ethylendiaminotetraessigsäure-di-Na-salz; TRIS, Tris(hydroxymethyl)aminomethan.

Sonderdruckanforderungen und Priv.-Doz. Dr. H. Schenk, Institut für Chemische Pflanzenphysiologie, Corrensstraße 41, D-7400 Tübingen.

Bonn) synthetisiert und in analysenreinem Zustand zur Verfügung gestellt worden.

Thylakoidpräparation („broken chloroplasts“): Zunächst wurden weitgehend intakte Chloroplasten nach einer etwas modifizierten Methode von Jensen und Bassham ¹² isoliert und diese dann hypotonisch aufgebrochen: 10 g frisch geerntete und entstielt Blätter von *Pisum sativum* wurden in 30 ml Homogenat-Medium A (0,41 M Saccharose, 20 mM HEPES, 5 mM $CaCl_2$, 3 mM $MgCl_2$, 1 mM $MnCl_2$, 4 mM Ascorbat, mit KOH ad pH 6,9) auf 0 °C gekühlt und bei dieser Temperatur im Omni-Mixer (Sorvall) aufgeschlossen (5 sec Stellung 10), darauf durch Mull filtriert, das Filtrat zentrifugiert (1 min $2500 \times g$) und der Überstand verworfen. Das Sediment wurde in 30 ml Medium B (0,35 M Saccharose, 20 mM HEPES, 7 mM Citrat, 1 mM $CaCl_2$, 3 mM $MgCl_2$, 1 mM $MnCl_2$, 2 mM EDTA mit KOH ad pH 6,9) aufgenommen und zentrifugiert (1 min $250 \times g$), der Überstand vorsichtig vom Sediment dekantiert und dieser noch einmal zentrifugiert (1 min $1000 \times g$). Das so erhaltene Chloroplastensediment besteht zu 70–80% aus intakten Chloroplasten (Beurteilung im Phasenkontrast-Mikroskop). Sie werden nun bei 0 °C während 2 min in 15 ml 0,035 M NaCl-Lösung inkubiert und dadurch ihre Hüllmembranen aufgebrochen. Nach erneuter Zentrifugation (5 min $22\,000 \times g$) enthält das Sediment die geschockten Chloroplasten. Sie werden in 2–4 ml Medium B aufgenommen und bei 0 °C aufbewahrt. Die Bestimmung des Gesamt-Chlorophyll-Gehaltes erfolgt nach Arnon ¹³.

Aktivitäts- und Hemmstoff-Teste

Allgemeinangaben: Die zu testenden Verbindungen wurden in Dimethylsulfoxid (2–6 mg/ml DMS) und in Portionen von 0,5–10 µl den Reaktionsansätzen (ca. 2 ml bei den photometrischen, ca. 3 ml bei den polarographischen Testen) zugefügt. Der experimentelle Fehler liegt für die pJ_{50} -Werte oberhalb 4,0 bei $\pm 0,1$, für kleinere pJ_{50} -Werte ist er größer. Lichtquelle: Prado 500, Leitz, Wetzlar; Lichtbündelung im Eigenbau, Kantenfilter 550 nm und Lichtleiter, Schott & Gen., Mainz; Beleuchtungsstärke an Küvettenwand: 500 Watt/m².

Photometer-Teste: Sie wurden in 1 cm-Küvetten (2 ml Testvolumen) im gekreuzten Strahlengang durchgeführt. Die Ausfilterung des aktinischen Lichtes aus dem Meß-Strahlengang erfolgte für Absorptionsmessungen bei 340 nm mit dem UV-durchlässigen Schwarzglasfilter UG 11 (Schott & Gen., Mainz), für solche bei 522 nm mit einem Interferenz-Bandenfilter (Schott & Gen., Mainz) Typ PAL (R = 518 nm, $T_m = 55\%$, HW = 22 nm). Durch einen



lin-log-Wandler¹⁴ wurden die gemessenen Transmissionsänderungen als Extinktionsänderungen auf einen Schreiber übertragen, dessen Empfindlichkeit durch zusätzliche „Nullpunktsunterdrückung“¹⁴ weitgehend ausgeschöpft werden konnte.

Polarographische Tests: Hier diente uns als Sensor eine Clark-Typ-Elektrode, die seitlich in eine flach-zylindrische 3 ml-Plexiglas-Küvette (19 mm ϕ) eingelassen wurde. Der Boden dieser Küvette bestand aus einem dünnen V2A-Blech, hinter dem die Thermostatenflüssigkeit vorbeiströmte. Durch diese schnelle Wärmeübertragung und infolge der Rotation eines in der Küvette befindlichen Magnetstäbchens wurde eine gute Thermostatisierung erzielt. Die Belichtung erfolgte ebenfalls über den Lichtleiter, der senkrecht zur Sauerstoffelektrode in einer Ausfräsung der Küvettenwandung 2 mm vom Innenraum entfernt endete, und zwar so, daß das Licht nicht direkt auf die Elektrodenspitze strahlte.

Hill-Reaktion ($H_2O \rightarrow DCPIP$): Die Testansätze enthielten a) für die Photometerteste: 2 ml Medium B (pH 6,9), 20 μ l „broken chloroplasts“ (Chlorophyllgehalt: 8–14 γ Chl a + b), 20 μ l DCPIP (200 μ mol), sowie 0,5–10 μ l Hemmstoff-Lösung (d. h. ca. 5–500 μ mol pro Ansatz), b) für die polarographischen Tests: 3 ml Medium B (pH 6,9), 30 μ l „broken chloroplasts“, 30 μ l DCPIP, Hemmstoffe wie oben. Eine Minute nach Pipettierung der Ansätze wurden die Reaktionsraten bestimmt, für jede Hemmstoffkonzentration in einem neuen Ansatz. Jede vierte Messung war eine Kontrollmessung (ohne Hemmstoffzugabe), Reaktionsrate: etwa 60–80 μ mol O_2 /mg Chl \cdot h.

Hill-System ($DCPIP/asc \rightarrow NADP$): Diese Reaktion wurde unter Berücksichtigung der Angaben von¹⁵ als Photometertest (340 nm) durchgeführt. Die Testansätze enthielten 2 ml 50 mM TRIS/HCl-Puffer (pH 7,8), 100 μ l DCPIP/asc (20 nmol DCPIP und 20 μ mol asc), 50 μ l „broken chloroplasts“ (20–50 γ Chl a + b), 10 μ l 50 mM NADP (0,5 μ mol), 10 μ l Fd-Lösung (ca. 2 μ mol), Hemmstoffzugabe wie oben. Kontrollrate: ca. 50 μ mol NADPH/mg Chl \cdot h.

Mehler Reaktion ($H_2O \rightarrow MV$)¹⁶: Bei dieser polarographischen Testmethode enthielten die Reaktionsansätze 3 ml Medium B (pH 6,9), 50 μ l „broken chloroplasts“ (60–75 γ Chl a + b), 10 μ l MV (1 μ mol), 10 μ l NaN_3 (1 μ mol), Hemmstoffzugabe wie oben. Kontrollrate (O_2 -Verbrauch): etwa 50–60 μ mol O_2 /mg Chl \cdot h.

Messung der pH-Abhängigkeit: Für die verschiedenen Reaktionen wurden die angegebenen Puffer ausgetauscht und durch folgende ersetzt. Modifiziertes Medium B (mit annähernd konstanter Pufferkapazität im pH-Bereich von 5–8,5; in Klammer

mM Endkonzentration): Saccharose oder Sorbit (350), HEPES (50), Citronensäure (13,5), Tricine (30), $MgCl_2$ (1), $MnCl_2$ (0,5), $CaCl_2$ (0,5), EDTA (1), mit KOH vor Endverdünnung gewünschten pH-Wert einstellen.


Da das VIS-Spektrum des DCPIP eine stärkere Abhängigkeit vom pH-Wert zeigt, haben wir im Hill-System ($H_2O \rightarrow DCPIP$) die Extinktionsabnahme nicht im Absorptionsmaximum (604 nm), sondern im isosbestischen Punkt bei 522 nm vermessen: $E_M = 8,6$ ¹⁷.

Ergebnisse und Diskussion

Hemmwirkung auf das Photosystem II

Tab. I faßt das Ergebnis unserer vorläufigen Untersuchungen zusammen. Alle Verbindungen wurden in den Hill-Systemen ($H_2O \xrightarrow{7} DCPIP$) und ($DCPIP/asc \rightarrow NADP$) photometrisch sowie im Mehler-System ($H_2O \rightarrow MV \rightarrow O_2$) polarographisch getestet. Keineswegs zeigten alle getesteten Verbindungen eine Hemmwirkung auf die Photosynthese, wie wir zuerst vermuteten. Doch wurden mehrere Substanzen gefunden, die den photosynthetischen Elektronentransport mittelstark inhibieren, darunter wenige, deren Hemmstärke an die kommerzieller Herbizide heranreicht. Es fiel dabei auf, daß vor allem die Verbindungen mit einem größeren lipophilen Substituenten und einem Proton am Stickstoff in Position 1 die höchste Hemmwirkung aufwiesen. Vorerst deuten wir das Ergebnis noch rein deduktiv in Anlehnung an die quantitativen Aussagen von Hansch und Deutsch⁸ sowie von Büchel *et al.*⁹, wonach bei Harnstoff-Derivaten Elektronenverarmung des Stickstoffs in Position 3 und Hydrophobierung des Stickstoffs in Position 1 durch entsprechende Alkylsubstitution (Erhöhung der Lipidlöslichkeit) die Inhibitorwirkung verstärkt. Den Wirkort unserer Hemmstoffe lokalisieren wir im Bereiche der Lichtreaktion II, da bei den eingesetzten Hemmstoffkonzentrationen (bis zu 0,1 mM) keine Hemmung des Hill-Systems ($DCPIP/asc \rightarrow NADP$) beobachtet werden konnte. Der Rezeptor dieser Verbindungen dürfte dem für substituierte Harnstoffe und Triazine entsprechen, denn einerseits enthalten unsere Verbindungen die für die Hemmeigenschaften verantwortlich gemachte Grundstruktur $[-NH-(C=X)-Y]$ und zum anderen konnte gezeigt werden¹⁰, daß Verbindungen mit dieser Grundstruktur (Harnstoffe: z. B. DCMU, Triazine: z. B. Simazin, Biscarbamate: z. B. Phenmedipham, u. a.), sich gegenseitig bei der Bindung an die Thylakoidmembran kompetitiv hemmen. Das heißt solche Verbindungen konkurrieren ganz offensichtlich um dieselbe Bindungsstelle¹⁰. Wir nehmen nun an, daß

Tab. I. Hemmung des photosynthetischen Elektronentransportes bei pH 6,9 durch Thioacylamid-Derivate.

Nr.	$\begin{array}{c} \text{S} \quad \quad \text{O} \\ \parallel \quad \parallel \\ \text{R}'-\text{C}-\text{NH}-\text{C}-\text{R}'' \end{array}$		Hemmung von Hill- und Mehler-Reaktion ^a		Hemmung der Reaktion DCPIP/asc → NADP	Ref. für Synthese
	R'	R''	50% bei γ /ml	pJ ₅₀		
1	C ₆ H ₅	NH ₂	274	2,8	(0)	(4)
2	C ₆ H ₅	NH-C ₆ H ₄ -p-CN	90	3,5	—	(4)
3	C ₆ H ₅	N(CH ₂) ₅	156	3,2	—	(4)
4	C ₆ H ₅	NH-C ₄ H ₉	19,8	4,1	(0)	(4)
5	C ₆ H ₅	NH-c-C ₆ H ₁₁	3,1	4,9	(0)	(4)
6	C ₂ H ₅ O	NH-C ₆ H ₅	22,8	4,0	(0)	(6)
7	C ₂ H ₅ O		1,3	5,2	(0)	(6)

^a Hemmwirkung für die Reaktionen H₂O ⁷ → DCPIP und H₂O → MV.

^b Mit (0) wird angedeutet, daß bei den maximal verwendeten Konzentrationen (0,1 mM) keine signifikante Hemmung beobachtet worden war.

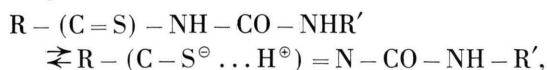
sich Thioacylharnstoffe und Thioacylamide gleich verhalten; der Beweis steht allerdings noch aus.

Die pH-Abhängigkeit der Hemmwirkung

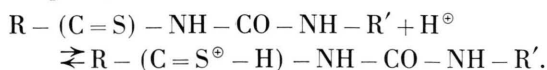
Für einige der oben beschriebenen Inhibitoren untersuchten wir, ob ihre Hemmstärke eine Abhängigkeit vom pH-Wert des Testmediums aufweist (Tab. II). Im System (H₂O → DCPIP) sowie (H₂O → MV) wurde eine nicht-lineare, schwach glockenförmige Kurve im I/v-Diagramm erhalten, mit einem gering ausgeprägten Maximum bei pH 6 bis pH 7. Die mit steigendem pH-Wert des Mediums zunächst zunehmende Hemmwirkung nimmt im alkalischen Bereich wieder ab, d. h. die Neutralform dürfte die aktivste Strukturform dieser Hemmstoffe sein. Wir vermuten, daß die gefundene pH-Abhängigkeit auf

Schema 1:

a) für pH > 7:



b) für pH < 7:

Tab. II. pH-Abhängigkeit der Hemmstärke einiger Thioacylamid-Derivate auf die Hill-Reaktion (H₂O → DCPIP) bzw. Mehler-Reaktion (H₂O → MV → O₂).

Nr.	pJ ₅₀				
	bei pH 5	6	7	8	
4	4,1	4,3	3,9	3,5	
5	4,6	4,9	4,9	4,8	
7	5,0	5,3	5,2	5,1	

der unterschiedlichen Protonisierung bzw. im Alkalischen auf der Dissoziation der zum Thioacylharnstoff tautomeren Thiolgruppe ¹¹ beruht (Schema 1).

Ob nun die Enthiol-Form als solche inaktiv ist, oder ob das gebildete Enthiolat-Anion auf Grund seiner negativen Ladung schwieriger zur Hemmstelle diffundieren kann, entzieht sich unserer Kenntnis. Die Bearbeitung dieser Frage wie auch jener nach möglichen Entkoppler-Eigenschaften bei den verschiedenen Elektronentransport-Phosphorylierungen (wir haben experimentelle Hinweise) ist vorgesehen.

Wir danken Herrn Prof. Goerdeler ganz besonders für die großzügige Bereitstellung der Chemikalien, Herrn Prof. Metzner für die Unterstützung dieser Arbeit, dem Fonds der Chemischen Industrie für eine kleine Sachbeihilfe.

¹ J. Goerdeler u. H. Schenk, Angew. Chem. **75**, 675 [1963].

² J. Goerdeler u. H. Schenk, Chem. Ber. **98**, 2954 [1965].

³ J. Goerdeler u. K. Nandi, Chem. Ber. **108**, 3066 [1975].

⁴ J. Goerdeler u. H. Schenk, Chem. Ber. **99**, 782 [1966].

⁵ J. Goerdeler u. H. Schenk, Chem. Ber. **98**, 3831 [1965].

⁶ A. Schulze, Dissertation Bonn 1974.

⁷ Wir verwenden hier noch die herkömmliche Schreibweise. H. Metzner schlägt jedoch auf Grund einer Reihe von Literaturdaten und eigener experimenteller Ergebnisse vor, statt H₂O das Kürzel H₂O/CO₂ zu verwenden. Siehe dazu: H. Metzner, J. Theor. Biol. **51**, 201–231 [1975]. R. Scheerer u. M. Grätzel, Ber. Bunsenges. Physikal. Chem. **80**, 979–982 [1976].

- ⁸ C. Hansch u. E. W. Deutsch, *Biochem. Biophys. Acta* **112**, 381 [1966].
- ⁹ K. H. Büchel, W. Draber, A. Trebst u. E. Pistorius, *Z. Naturforsch.* **21b**, 243 [1966].
- ¹⁰ H. Strotmann, W. Tischer u. K. Edelmann, *Ber. Deutsch. Bot. Ges.* **87**, 457 [1974].
- ¹¹ J. Goerdeler u. H. Schenk, *Chem. Ber.* **99**, 785 [1966].
- ¹² R. G. Jensen u. J. A. Bassham, *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.* **56**, 1095 [1966].
- ¹³ D. I. Arnon, *Plant Physiol.* **24**, 1 [1949].
- ¹⁴ Ich möchte an dieser Stelle Herrn Dipl.-Biol. W. Klemke für den Entwurf und Zusammenbau dieses Gerätes, wie auch des Zusatzgerätes zur Nullpunktsunterdrückung meinen besonderen Dank aussprechen.
- ¹⁵ A. Trebst, *Meth. Enzymol.* **Vol. XXIV**, 146 [1972].
- ¹⁶ B. B. Buchanan u. D. I. Arnon, *Meth. Enzymol.* **Vol. XXIII**, 417 [1971].
- ¹⁷ J. Mc D. Armstrong, *Biochem. Biophys. Acta* **86**, 194 [1964].