

# **<sup>31</sup>P- und <sup>1</sup>H-NMR-Untersuchungen über die Wechselwirkung von ATP mit Mg<sup>2+</sup>, Ca<sup>2+</sup> und Monoaminen**

<sup>31</sup>P- and <sup>1</sup>H-NMR-Investigations about the Interaction of ATP with Mg<sup>2+</sup>, Ca<sup>2+</sup>, and Monoamines

Helmut Sapper, Wolfgang Gohl und Wolfgang Lohmann

Institut für Biophysik der Justus-Liebig-Universität Gießen, Leihgesterner Weg 217, D-6300 Gießen

Z. Naturforsch. **35 c**, 569–577 (1980); eingegangen am 27. März 1980

ATP, Phosphate Interaction, Stacking Association, Phosphorus and Proton Magnetic Resonance

The interaction between aromatic amines and ATP is based upon an electrostatic attraction of the protonated amino groups to the negatively charged phosphate groups of ATP combined with a stacking association between the ring systems. The complexes formed are relatively weak (association constants 4–48 M<sup>-1</sup>), shortlived (life time smaller than 0.02 s), and mainly 1:1 in stoichiometry preferring the terminal phosphate of ATP as the site of association. The divalent metal ions Mg<sup>2+</sup> and Ca<sup>2+</sup> bond stronger than the amines (association constants 1500 and 100 M<sup>-1</sup>, resp.) prefer the β-phosphate group changing thereby the geometry of the ATP phosphate chain. Thus, they reduce the amine-ATP association in ternary mixtures.

## **Einleitung**

Im Zusammenhang mit der vielseitigen Wirkung des ATP im Biosystem ist die Wechselwirkung von ATP mit zweiwertigen Metallionen und biogenen Aminen Gegenstand zahlreicher Untersuchungen [1–7]. Diese Wechselwirkung scheint auch für die Funktion und Stabilität gewisser Speichergranula biogener Amine (chromaffine Granula, neuronale Vesikel) wichtig zu sein. Trotz eines umfangreichen Untersuchungsmaterials sind die zugrunde liegenden molekularen Vorgänge aber noch nicht einwandfrei geklärt. Im Gegenteil gelangten verschiedene Autoren sogar zu ziemlich widersprüchlichen Ergebnissen hinsichtlich der beteiligten Bindungsstellen und der möglichen Stöchiometrie der Komplexe. Zur Klärung dieser Widersprüche wurden in Fortsetzung früherer Arbeiten mit Infrarot (IR)- und Protonenspinresonanz (<sup>1</sup>H-NMR)-Spektroskopie [8] weitere Messungen mit <sup>1</sup>H-NMR und <sup>31</sup>P-NMR durchgeführt.

## **Material und Methoden**

Adenosintriphosphat Dinatriumsalz (ATP) wurde von Boehringer, Mannheim, bezogen und vor der Benutzung auf etwa vorhandenes freies Phosphat mittels Merck Phosphattest kontrolliert. Die Natriumionen wurden für die Untersuchungen nicht

entfernt, da ihre Wechselwirkung mit ATP unspezifisch und schwach ist und daher die untersuchten Assoziationen nicht stört [2]. MgCl<sub>2</sub> · 6 H<sub>2</sub>O, CaSO<sub>4</sub> · 2 H<sub>2</sub>O, Phenäethylamin · HCl (PEA), α-Methyl-Phenäethylamin ·  $\frac{1}{2}$  H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (Amphetamin, AA) und 3,4,5-Trimethoxy-Phenäethylamin ·  $\frac{1}{2}$  H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (Mescalin, MES) stammen von Merck, Darmstadt, 3,4-Dihydroxy-Phenäethylamin · HCl (Dopamin, DA), 3,4-Dihydroxy-β-hydroxy-Phenäethylamin · HCl (Noradrenalin, NE), 3,4-Dihydroxy-Benzylamin · HBr (DHB), 4-Methyl-Brenzkatechin (Homobrenzkatechin, HBK) und Propylamin (PA) von EGA-Chemie, Steinheim. Die Substanzen wurden ohne weitere Reinigung verwendet.

Die pH- bzw. pD-Werte wurden mit konzentrierten HCl- bzw. NaOH-Lösungen eingestellt und innerhalb der Probenröhrchen mit einer speziellen Glaselektrode der Firma Ingold, Frankfurt, gemessen. Die NMR-Spektren wurden mit einem Varian-HA-100-Spektrometer bei einer Probentemperatur von 27 °C aufgezeichnet. Die <sup>1</sup>H-Resonanzen wurden bezüglich des internen H<sub>2</sub>O-Signals (6% H<sub>2</sub>O in D<sub>2</sub>O) gemessen und über eine Eichkurve auf ppm bezüglich TMS umgerechnet. Die <sup>31</sup>P-Resonanzen wurden bezüglich 85% H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> (extern) in nicht deuterierter wäßriger Lösung gemessen.

Der <sup>31</sup>P-Frequenzzusatz wurde freundlicherweise von Herrn Dr. Berger, FB Chemie der Universität Marburg, zur Verfügung gestellt.

Der bereits früher beschriebene Formalismus zur Bestimmung der Assoziation von Aminen mit ATP

Sonderdruckanforderungen an Dr. Helmut Sapper.

0341-0382/80/0700-0569 \$ 01.00/0



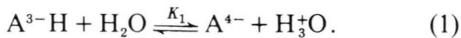
Dieses Werk wurde im Jahr 2013 vom Verlag Zeitschrift für Naturforschung in Zusammenarbeit mit der Max-Planck-Gesellschaft zur Förderung der Wissenschaften e.V. digitalisiert und unter folgender Lizenz veröffentlicht: Creative Commons Namensnennung-Keine Bearbeitung 3.0 Deutschland Lizenz.

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 digitized 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.

bei Beobachtung der Amin-Signale ( $^1\text{H}$ -NMR) [8] kann in analoger Weise für den Fall umgeschrieben werden, daß die ATP-Signale ( $^{31}\text{P}$ -NMR) beobachtet werden. In Erweiterung dieses Formalismus wird zusätzlich ein Stöchiometriefaktor eingeführt. Die Deprotonierung von  $\text{ATP}^{3-}$  zu  $\text{ATP}^{4-}$  ( $\text{pK}_1^{\text{ATP}}$ ) wird beschrieben durch die Gleichung



Die Assoziation eines Metallions oder eines protonierten Amins  $\text{N}^+$  mit dem deprotonierten  $\text{ATP}^{4-}$  wird durch die Gleichung



mit  $s$  als Stöchiometriefaktor dargestellt. Wird nun die Titrationskurve  $\text{ATP}^{3-}/\text{ATP}^{4-}$  durch die Assoziation zwischen  $\text{ATP}^{4-}$  und  $\text{N}^+$  um  $\Delta\text{pK} := \text{pK}_1 - \text{pK}_2$  verschoben, dann gilt

$$\begin{aligned} \text{pK}_2 = s \cdot \log \left( \frac{\Delta_0 - \Delta_b}{\Delta_b} \right) - s \cdot \text{pH} \\ + (s-1) \left[ \text{pK}_1 \log a_0 - \log \frac{\Delta_0}{\Delta_b} \right], \end{aligned} \quad (3)$$

wobei  $\Delta_0$  die Höhe der Titrationsstufe in ppm angibt und  $\Delta_b$  die beobachtete chemische Verschiebung relativ zur Form  $\text{ATP}^{3-}$ . Zwischen der Steigung der Titrationskurve an ihrem Wendepunkt  $\text{pH} = \text{pK}_2$  und dem Stöchiometriefaktor  $s$  besteht die Beziehung

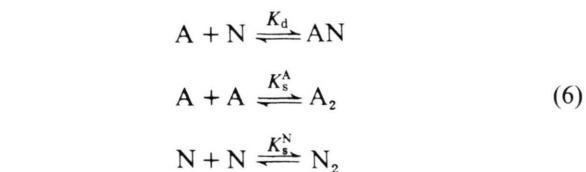
$$\left( \frac{d \text{pH}}{d \Delta_b} \right)_{\text{pH}=\text{pK}_2} = \frac{2}{\Delta_0 \ln 10} \left( \frac{s+1}{s} \right). \quad (4)$$

Für die Assoziationskonstante  $K_c$  gilt mit den Einwaagekonzentrationen  $a_0$  bzw.  $n_0$  für ATP bzw. Wechselwirkungspartner N

$$K_c = \frac{10^{\Delta\text{pK}} - (2/a_0)^{s-1} \cdot 10^{(s-1)\Delta\text{pK}}}{s \cdot n_0 + (10^{-\Delta\text{pK}} - 1)(a_0/2)}. \quad (5)$$

Dieselbe Formel gilt bei der Beobachtung eines Amin-Signals, wenn man  $n_0$  und  $a_0$  vertauscht und den Stöchiometriefaktor  $s$  in Gleichung (2) zu  $\text{N}^+$  statt zu  $\text{A}^{4-}$  schreibt. Für  $s=1$  gehen die Formeln (3) und (5) in die früher angegebenen Formeln über [8]. Die Eigenassoziation der verwendeten Substanzen ist sehr klein (Selbstassoziationskonstanten  $K_s \leq 1,4 \text{ M}^{-1}$ ) und es genügt, sie nur bis zur Dimerisierung zu berücksichtigen. Die Auswertung der Ring-Assoziation, d. h. Berechnung der Assoziationskonstanten  $K_d$ , erfolgte daher iterativ nach

dem von den Gleichungen



ausgehenden erweiterten Dimerenmodell [9]

$$K_d = \frac{a_0}{a_1 \cdot n_1} \cdot \frac{\Delta_b}{\Delta_c} - \frac{2 \cdot K_s^N}{a_0 \cdot n_1} \cdot \frac{\Delta_s^N}{\Delta_c}. \quad (7)$$

$\Delta_b$  bedeutet dabei wieder wie in Gl. (3) die beobachtete chemische Verschiebung, diesmal aber von der Substanz N bezüglich des für  $a_0 = 0, n_0 \rightarrow 0$  extrapolierten Monomerenwertes  $\Delta_m$ .  $\Delta_s^N$  bzw.  $\Delta_c$  stellen die extrapolierten chemischen Verschiebungen des reinen Dimeren  $\text{N}_2$  bzw. des reinen Komplexes AN dar,  $a_1$  und  $n_1$  sind die Monomerenkonzentration von A bzw. N.

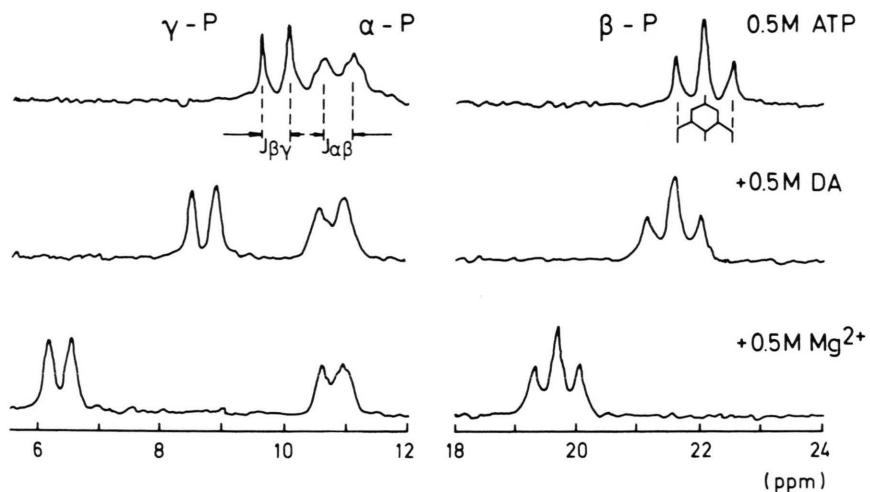
## Ergebnisse

### 1. Die Wechselwirkung von $\text{Mg}^{2+}$ und $\text{Ca}^{2+}$ mit ATP

Es ist bekannt, daß ATP mit zweiwertigen Metallionen relativ stark wechselwirkt. Schon 1962 wurden von Cohn et al. [10]  $^{31}\text{P}$ -Resonanzen für die Bestimmung dieser Wechselwirkung benutzt. Sie konnten zeigen, daß Metallionen, wie z. B.  $\text{Mg}^{2+}$  und  $\text{Ca}^{2+}$ , mit den Phosphatgruppen des ATP komplexieren.

Die  $^{31}\text{P}$ -Resonanzen von ATP (Abb. 1) sind pH-abhängig (Abb. 2) und zeigen übereinstimmend für alle drei Phosphatgruppen einen  $\text{pK}_1^{\text{ATP}}$ -Wert von  $6,4 \pm 0,1$ . Dieser ist der Deprotonierung der terminalen  $\gamma$ -Phosphatgruppe zuzuschreiben, weshalb erwartungsgemäß die Stufenhöhe der Titrationskurven von  $\gamma$ -P (5,5 ppm) über  $\beta$ -P (2,0 ppm) nach  $\alpha$ -P (0,7 ppm) abnimmt (Abb. 2). Eine Zugabe von  $\text{Mg}^{2+}$  verschiebt die Titrationskurven zu niedrigeren pH-Werten (Abb. 3). Das zeigt, daß diese Metallionen die Bildung von Protonen an ATP erschweren. Die Größe der pK-Verschiebung erlaubt daher nach Gl. (5) die Abschätzung einer Assoziationskonstanten. Zur Stöchiometrie der Assoziation ist dabei zu bemerken, daß die Steigung der Titrationskurven, d. h. der Wert  $\left( \frac{d \text{pH}}{d \Delta_b} \right)_{\text{pH}=\text{pK}_2}$ , eine ATP :  $\text{Mg}^{2+} = 1:1$  Stöchiometrie als ausreichende Erklärung zuläßt, sofern sich das Metallion nicht im Überschuß befindet.

Abb. 1.  $^{31}\text{P}$ -Resonanzen von 0,5 M ATP (pH 5,0) mit den P-P-Kopplungen  $J_{\beta\gamma}$  und  $J_{\alpha\beta}$ . Einfluß der Zugabe von 0,5 M Dopamin (DA) bzw.  $\text{Mg}^{2+}$ .



Eine Verschiebung des pK-Wertes von 6,4 auf 3,9 (Abb. 3), d. h. ein  $\Delta\text{pK}$  von 2,5, entspricht bei  $a_0 = n_0 = 0,5 \text{ M}$  einem  $K_c = 1300 \pm 200 \text{ M}^{-1}$ . Für  $a_0 = 0,5 \text{ M}$ ,  $n_0 = 0,25 \text{ M}$  findet man ein  $\Delta\text{pK}$  von 1,3 entsprechend einem  $K_c = 1500 \pm 200 \text{ M}^{-1}$  in guter Übereinstimmung mit dem früher mittels IR-Spektroskopie ermittelten Wert [8].

Zusätzlich zu den Verschiebungen der pK-Werte tritt auch eine Änderung der chemischen Verschiebungen auf, die bei neutralen und basischen pH-Werten um 0,25 ppm bzw. 0,55 ppm zu höherem Feld ( $\alpha$ -P bzw.  $\gamma$ -P) oder um 1,10 ppm zu tieferem Feld ( $\beta$ -P) geht (Abb. 3). Die Zugabe von  $\text{Mg}^{2+}$  ändert die Stufenhöhe der Titration nur beim  $\beta$ -Phosphat. Sie beträgt 3,0 ppm mit  $\text{Mg}^{2+}$  statt 2,0 ppm ohne  $\text{Mg}^{2+}$ . Die Beobachtungen zeigen deutlich die Komplexierung des Metallions an der Phosphatkette des ATP, und zwar bevorzugt am  $\beta$ -Phosphat. Dieses bereits von Son et al. [11] vorgeschlagene Modell (Abb. 4a) erklärt im Gegensatz zu anderen Versionen, z. B. der gleichzeitigen Wechselwirkung mit dem  $\gamma$ - und  $\beta$ -Phosphat (Abb. 4b), die Zunahme der Stufenhöhe der Titration bei  $\beta$ -P, die mit 1,10 ppm relativ starke Tieffeldverschiebung von  $\beta$ -P durch die zweifach entschirmend wirkende  $\text{Mg}^{2+}$ -Assoziation an dieser Phosphatgruppe und die Hochfeldverschiebung für  $\gamma$ -P und  $\alpha$ -P. Daß die beobachtete Hochfeldverschiebung von  $\gamma$ -P mit -0,55 ppm gerade ungefähr doppelt so groß ist wie die von  $\alpha$ -P mit -0,25 ppm bestätigt das angenommene Komplexierungsschema. Für  $\text{pH} > \text{pK}_1^{\text{ATP}}$  besitzt  $\gamma$ -P nämlich zwei, d. h. doppelt so viele frei verschiebbare negative Ladungen wie  $\alpha$ -P.

$\text{Ca}^{2+}$  ist weniger löslich als  $\text{Mg}^{2+}$ . Deshalb wurde seine Wechselwirkung bei den geringeren Konzentrationen  $a_0 = 0,250 \text{ M}$  (ATP) und  $n_0 = 0,125 \text{ M}$  ( $\text{Ca}^{2+}$ ) gemessen, wobei sich aus  $\Delta\text{pK} = 0,6$  eine Assoziationskonstante  $K_c = 100 \pm 20 \text{ M}^{-1}$  errechnen ließ. Der Bindungsort scheint wie im Fall des  $\text{Mg}^{2+}$  auch bei  $\text{Ca}^{2+}$  hauptsächlich das  $\beta$ -Phosphat zu sein, da nur dort eine nennenswerte Änderung in der chemischen Verschiebung auftritt. Da die Assoziationskonstanten für  $\text{Mg}^{2+}$  und  $\text{Ca}^{2+}$  am  $\beta$ -Phosphat indirekt über die pK-Verschiebung des  $\gamma$ -P ermittelt

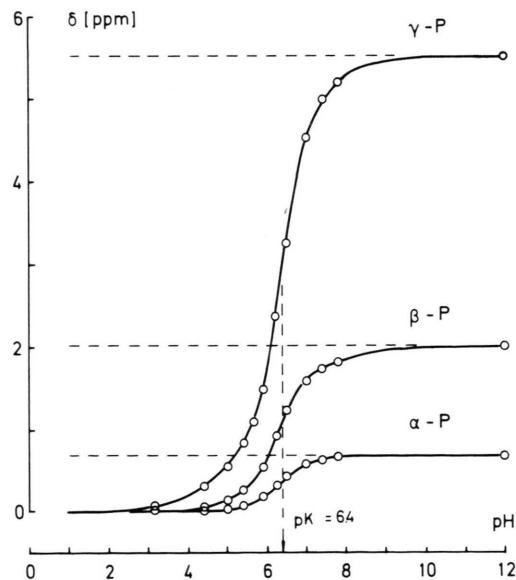


Abb. 2. pH-Titration der Phosphorresonanzen von ATP (0,5 M). Die chemischen Verschiebungen  $\delta$  sind auf ihren Wert in  $\text{ATP}^3^-$  bezogen.

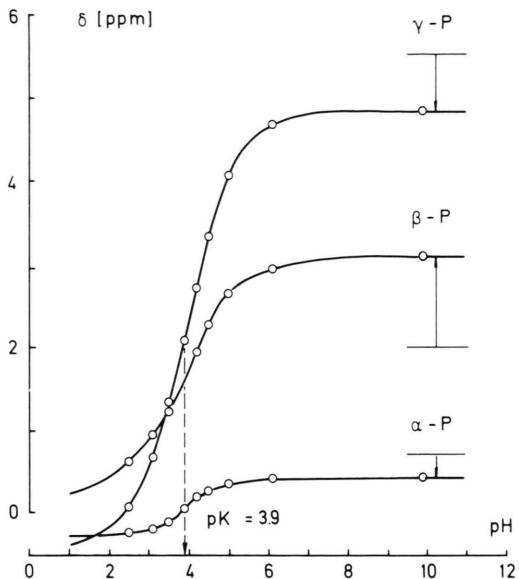


Abb. 3. Einfluß von 0,5 M  $\text{Mg}^{2+}$  auf die pH-Abhängigkeit der Phosphorresonanzen von ATP (0,5 M). Die chemischen Verschiebungen  $\delta$  sind auf ihren Wert in  $\text{ATP}^{3-}$  ohne  $\text{Mg}^{2+}$  bezogen (wie in Abb. 2). Die Markierung bei pH 10 gibt den Unterschied zur Titrationskurve ohne  $\text{Mg}^{2+}$  (Abb. 2) an.

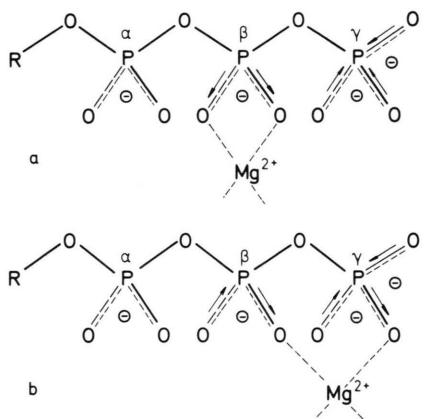


Abb. 4. Mögliche Koordination von  $\text{Mg}^{2+}$  zur Phosphatkette des ATP und die zu erwartenden Ladungsverschiebungen (schematisch). a) Ausschließliche Wechselwirkung mit dem  $\beta$ -Phosphat. b) Kombinierte Wechselwirkung mit dem  $\beta$ - und  $\gamma$ -Phosphat.

wurden und zusätzlich zu der Wechselwirkung mit  $\text{ATP}^{4-}$  auch eine solche mit  $\text{ATP}^{3-}$  möglich sein dürfte, liegen die absoluten Werte in beiden Fällen sicherlich höher. Der relative Vergleich aber bestätigt, daß  $\text{Ca}^{2+}$  wesentlich schwächer als  $\text{Mg}^{2+}$  an ATP bindet [12, 13]. Damit kommt  $\text{Ca}^{2+}$  eher für eine dynamische Modulation der Bindung von Ami-

nen an ATP in Frage, während  $\text{Mg}^{2+}$  die ATP-Phosphatkette als Bindungsstelle mehr oder weniger zu blockieren scheint. Diese blockierende spezifische Bindung der  $\text{Mg}^{2+}$ -Ionen kann als eine mögliche Erklärung der katalytischen Funktion dieser Ionen bei der ATP-Dephosphorylierung gesehen werden [11].

## 2. Die Wechselwirkung von Aminen mit ATP

### a) Protonierung und Coulomb-Wechselwirkung

Wie bei der Zugabe von Metallionen tritt auch bei der Zugabe von Aminen eine Verschiebung des  $pK_{\text{ATP}}$ -Wertes zu niedrigeren Werten auf, die eine Wechselwirkung mit der ATP-Phosphatkette anzeigt und als Maß für deren Stärke dienen kann. Für  $a_0 = 0,5 \text{ M}$  (ATP) und  $n_0 = 0,5 \text{ M}$  bzw.  $1,0 \text{ M}$  (DA) wurde z. B.  $\Delta pK = 1,0$  bzw.  $1,4$  gefunden (Abb. 5). Beide Werte liefern in guter Übereinstimmung einen Wert  $K_c = 33 \pm 5 \text{ M}^{-1}$ , der innerhalb der Fehlergrenzen mit Ausnahme von AA stets niedriger liegen als die aus der Titration der  $^{31}\text{P}$ -Resonanzen ermittelten  $K_c$ -Werte mit Ausnahme von AA stets niedriger liegen als die aus der Titration der  $^1\text{H}$ -Resonanzen bestimmten Werte, kann als Hinweis gesehen werden, daß neben der Wechselwirkung mit  $\text{ATP}^{4-}$  auch eine Wechselwirkung der Amine mit  $\text{ATP}^{3-}$  möglich ist, die sich ja nur über die Titration der  $^1\text{H}$ -Resonanzen der Amine bemerkbar machen kann. Im Falle des Amphetamin scheint sich zu bestätigen, daß dessen Assoziation auf das  $\gamma$ -P des  $\text{ATP}^{4-}$  ausgerichtet ist [8].

Die durch die Wechselwirkung mit ATP zu höheren Werten verschobenen  $pK$ -Werte der Amine können nicht nur über das  $^1\text{H}$ -NMR-Spektrum der Amin-Seitenketten [8] sondern auch über die  $^{31}\text{P}$ -NMR-Spektren des ATP beobachtet werden. Dabei bestehen Unterschiede je nach betrachteter Phosphatgruppe, und zwar derart, daß die betrachtete  $pK$ -Verschiebung am  $\gamma$ -P stets größer ist als am  $\beta$ -P oder  $\alpha$ -P. In der Mischung von  $0,5 \text{ M}$  ATP mit  $1,0 \text{ M}$  DA wird z. B. über das  $\gamma$ -P ein  $pK^{\text{DA}}$ -Wert von  $10,5$ , über das  $\beta$ -P oder  $\alpha$ -P ein  $pK^{\text{DA}}$ -Wert von  $9,7$  abgelesen (Abb. 5). Da die Größe der  $pK$ -Verschiebung der Stärke der Assoziation entspricht, folgt daraus, daß  $\gamma$ -P die bevorzugte Wechselwirkungsstelle ist, mit geringerer Wahrscheinlichkeit aber auch Assoziationen über  $\beta$ -P oder  $\alpha$ -P möglich sind. In Übereinstimmung damit nimmt die Stufenhöhe  $\Delta\delta$  von  $\gamma$ -P über  $\beta$ -P zu  $\alpha$ -P ab (für das Beispiel der Assoziation von  $0,5 \text{ M}$  ATP mit  $1,0 \text{ M}$  DA

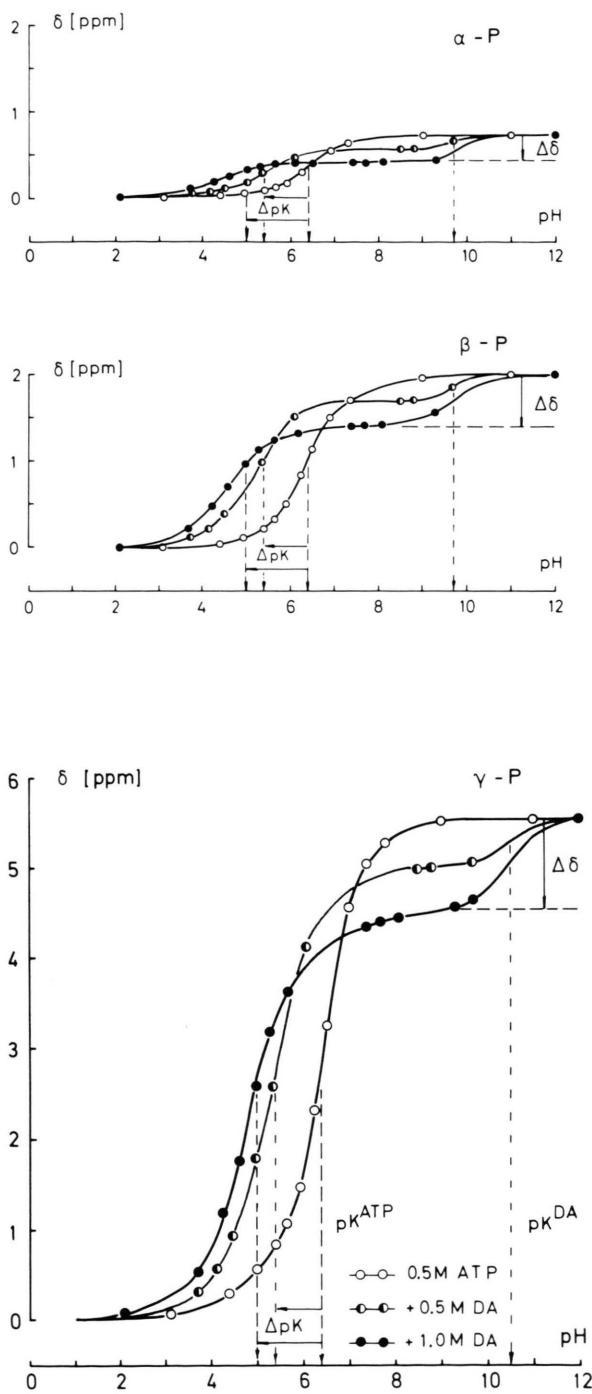


Abb. 5. pH-Titration der  $\alpha$ -,  $\beta$ - und  $\gamma$ -Phosphorresonanzen von ATP (0,5 M) und Einfluß von 0,5 bzw. 1,0 M Dopamin (DA).  $\text{pK}^{\text{ATP}}$ : Deprotonierungsstufe von  $\text{ATP}^{3-}$  zu  $\text{ATP}^{4-}$ ;  $\Delta\text{pK}$ : Verschiebung des  $\text{pK}^{\text{ATP}}$ -Wertes durch die Wechselwirkung mit DA;  $\text{pK}^{\text{DA}}$ : Protonierungsstufe von DA;  $\Delta\delta$ : Verringerung der Stufenhöhe der ATP-Titration durch die Wechselwirkung mit DA.

lauten die Werte 1,0 ppm ( $\gamma$ -P), 0,6 ppm ( $\beta$ -P) bzw. 0,3 ppm ( $\alpha$ -P) (Abb. 5)).

Der Stöchiometriefaktor  $s$  kann einerseits nach Gl. (4) aus der Steigung der Titrationskurven abgeschätzt, andererseits aber auch aus der Anwendung der kontinuierlichen Variation nach Job [14] bestimmt werden. Für das H-2 von DA ist ein solcher sogenannter Job-plot in Abb. 6 dargestellt. Der auf der Abszisse aufgetragene Molenbruch  $a_1/(a_1 + n_1)$  wurde mittels der Selbstassoziationskonstanten von ATP ( $K_s^A = 1,4 \text{ M}^{-1}$ ) und DA ( $K_s^D = 1,2 \text{ M}^{-1}$ ) aus der Gesamteinwaage  $a_0 + n_0$  berechnet. Das bei  $a_1/(a_1 + n_1) = 0,55$  beobachtete Maximum der aus der gemessenen chemischen Verschiebung berechneten Komplexbildung entspricht einem Wert  $s = 0,8$ , wie er für die DA-ATP-Wechselwirkung übereinstimmend auch aus der Steilheit der  $^1\text{H}$ - und  $^{31}\text{P}$ -NMR-Titrationskurven abgelesen wurde. Die entsprechenden Stöchiometriefaktoren der anderen Amine liegen ebenfalls bei  $s = 0,8 \pm 0,1$ . Die Ergebnisse zeigen, daß die ATP-Wechselwirkung mit Monoaminen im wesentlichen einer 1:1-Stöchiometrie genügt, und nur ein ca. 20%-Anteil von ATP : Amin = 1:2 Komplexen zu erwarten ist.

#### b) Wechselwirkung der Ringsysteme (stacking)

Die Stärke der Ring-Wechselwirkung kann über die Ringprotonen der Amine ermittelt werden, da deren chemische Verschiebung von der zugegebenen ATP-Konzentration abhängig ist. Diese Konzentrationsabhängigkeit ist in Abb. 7 für einige Amine gezeigt. Für das Modell der Dimerisierung erhält man nach Gl. (7) die in Tab. I angegebenen  $K_d$ -Werte. Für die Komplexbildungswerte  $\Delta_c$ , in Abb. 7 nur für PEA als Beispiel eingezeichnet, wurden für die gut vergleichbaren H-2 Protonen Werte zwischen 0,6 ppm (PEA und HBK) und 0,4 ppm (NE) extrapoliert (Tab. I). Da bei der beobachteten Assoziation weder die komplexierten noch die nicht komplexierten Moleküle direkt beobachtet werden können, sondern nur eine sich je nach Komplexbildungsgrad einstellende gemittelte chemische Verschiebung  $\Delta_b$ , läßt sich bei einer mittleren Komplexbildung von  $\Delta_c = 0,5 \text{ ppm}$  und einer Meßfrequenz von 100 MHz eine mittlere Lebensdauer  $\tau_c$  der Komplexe  $\tau_c \ll 1/\Delta_c = 0,02 \text{ [s]}$  abschätzen.

Außer durch die Konzentrationsabhängigkeit erhält man einen weiteren Hinweis auf die Ring-Wechselwirkung aus der pH-Abhängigkeit der Ring-

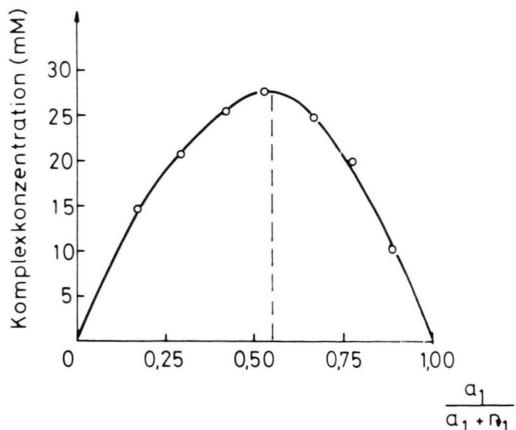


Abb. 6. ATP-DA-Komplexkonzentration (berechnet aus der beobachteten chemischen Verschiebung des H-2 von DA) in Abhängigkeit vom Molenbruch der Monomerenkonzentration bei konstanter Gesamtkonzentration  $a_0 + n_0 = 0,35 \text{ M}$  (pH 7,0).

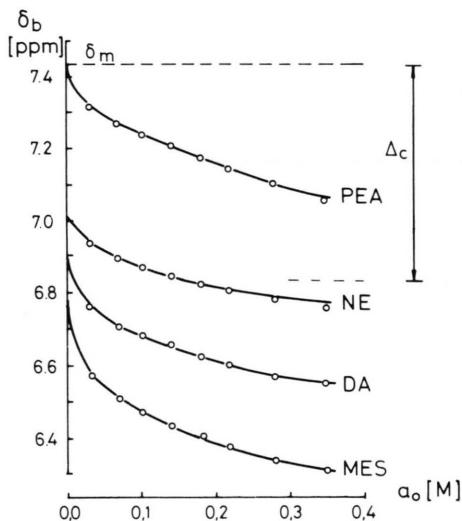


Abb. 7. Beobachtete chemische Verschiebung  $\delta_b$  des H-2-Protons einiger Amine (50 mM, pH 7,0) in Abhängigkeit von der Konzentration  $a_0$  des zugegebenen ATP. Für PEA zusätzlich eingezeichnet: Monomerenverschiebung ( $\delta_m$ ) für  $a_0 = 0, n_0 \rightarrow 0$  und Komplexverschiebung ( $\Delta_c$ ) für  $a_0 \rightarrow \infty$ .

protonenresonanzen von ATP [8] und von den Aminen (z. B. Mescalin in Abb. 8). Die Verschiebung zu höherem Feld ist am größten im pH-Bereich 5–10. Im sauren pH-Bereich bewirkt die Protonierung des Adeninringes von ATP ( $\text{pK}^A = 4,3$ ) eine stacking-Abnahme (vgl. [15]). Im basischen pH-Bereich geht durch den Rückgang der Protonierung der Aminogruppe (z. B.  $\text{pK}^{\text{MES}} = 10,5$ ) die Seitenketten-Wechselwirkung zurück und es bleibt nur ein Rest-stacking beobachtbar.

Die aus der Konzentrationsabhängigkeit der Ringprotonenresonanzen ermittelten Assoziationskonstanten  $K_d$  sind absolut gesehen kleiner als die aus der pH-Abhängigkeit der Seitenkettenprotonenresonanzen oder der Phosphorresonanzen des ATP ermittelten  $K_c$ -Werte, während die relative Reihenfolge erhalten bleibt. Daraus kann man schließen, daß die Wechselwirkung zwischen ATP und den beobachteten Aminen in zwei Schritten abläuft, und zwar so, daß zuerst die Amin-Phosphat-Bindung und erst danach die Bindung der Ringsysteme geschlossen wird. Wie die berechneten Assoziationskonstanten im Bereich 4–48  $\text{M}^{-1}$  (Tab. I) zeigen, sind die beiden Wechselwirkungen einzeln und zusammen relativ schwach. Durch Substituenten an der Seitenkette oder am Ringsystem der Amine sind daher auch keine drastischen Modifikationen zu erwarten. Immerhin können OH- oder  $\text{CH}_3\text{O}$ -Substituenten am Ring die Bindungskräfte in etwa verdoppeln (z. B.  $K_c^{\text{MES}} \approx 2 \cdot K_c^{\text{PEA}}$ ), während ein unsubstituiertes Ringsystem kaum eine zusätzliche Stabilisierung der Assoziation bewirkt ( $K_c^{\text{PEA}} \approx K_c^{\text{PA}}$ ). Dieser Einfluß der Ringsubstituenten dürfte auf ihre elektronenschiebende Wirkung zurückgehen, die bekanntlich die stacking-Assoziation erhöht [15]. Eine  $\beta$ -OH-Gruppe (NE), mehr noch eine  $\alpha$ - $\text{CH}_3$ -Gruppe (AA) oder eine Verkürzung der Seitenkette (DHB) scheinen die Wechselwirkung zu verringern, vermutlich aufgrund sterischer Verhinderung einer geeigneten Wechselwirkungsgeometrie.

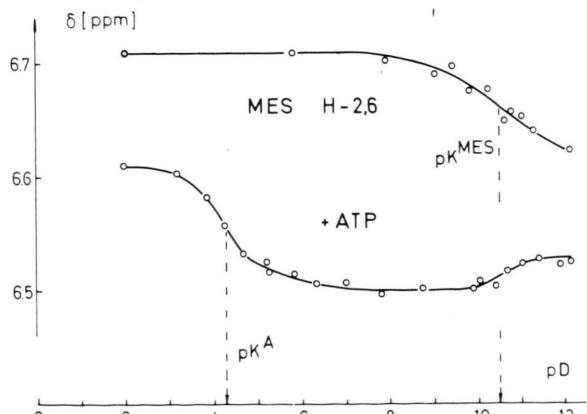


Abb. 8. pD-Abhängigkeit der H-2.6-Ringprotonenresonanzen von Mescalin (MES, 100 mM) und Einfluß der Zugabe von ATP (100 mM).  $\text{pK}^{\text{MES}}$ : Protonierungsstufe der Mescalin-Aminogruppe,  $\text{pK}^A$ : Protonierungsstufe des ATP-Adeninrings.

Tab. I. Assoziationskonstanten der elektrostatischen Amino-Phosphat-Wechselwirkung ( $K_c$ ) bzw. der Ring-Wechselwirkung ( $K_d$ ) verschiedener Monoamine mit ATP. Für die Ring-Wechselwirkung ist außerdem die nach  $a_0 \rightarrow \infty$  extrapolierte Komplexverschiebung des Protons H-2 der Amine angegeben.

Wechselwirkung von ATP mit	$^{31}\text{P}$ -NMR	$^1\text{H}$ -NMR		
	$K_c$ [M $^{-1}$ ]	$K_c$ [M $^{-1}$ ]	$K_d$ [M $^{-1}$ ]	$\Delta_c^{H-2}$ [ppm]
PA	18 ± 3	21 ± 1	—	—
PEA	18 ± 3	22 ± 5	7 ± 2	0,60 ± 0,13
AA	13 ± 3	8 ± 2	6 ± 2	0,57 ± 0,13
DA	33 ± 5	46 ± 12	12 ± 1	0,48 ± 0,07
MES	35 ± 5	48 ± 8	18 ± 1	0,56 ± 0,07
NE	21 ± 3	—	8 ± 1	0,40 ± 0,05
DHB	5 ± 1	—	—	—
HBK	—	—	4 ± 1	0,60 ± 0,13

Verwendete Konzentrationen:

$K_c$  ( $^{31}\text{P}$ -NMR):  $a_0 = n_0 = 500 \text{ mM}$  (außer MES:  $n_0 = 250 \text{ mM}$ );

$K_c$  ( $^1\text{H}$ -NMR):  $a_0 = n_0 = 100 \text{ mM}$ ;

$K_d$  ( $^1\text{H}$ -NMR):  $a_0 = 30-350 \text{ mM}$ ,  $n_0 = 50 \text{ mM}$ ;

$\Delta_c^{H-2}$  ( $^1\text{H}$ -NMR): extrapoliert für  $a_0 \rightarrow \infty$ .

### 3. ATP-DA-Metallionen-Komplexe

Für biologische Prozesse sind jene Assoziationen von Interesse, die bei physiologischen pH-Werten auftreten. Im pH-Bereich  $\text{pH} < 8$  sind die betrachteten Amine protoniert, und es tritt praktisch keine Wechselwirkung mit  $\text{Mg}^{2+}$  oder  $\text{Ca}^{2+}$  auf [2]. Die Anwesenheit dieser Metallionen verringert aber stark die Wechselwirkung der Amine mit ATP. So beträgt die aus der pH-Abhängigkeit der Phosphorresonanzen ermittelte Restwechselwirkung von DA mit ATP nur noch  $K_c = 2 \pm 0,5 \text{ M}^{-1}$  bei Zusatz von  $\text{Mg}^{2+}$  (0,5 M auf je 0,5 M DA und ATP) (übereinstimmend mit den IR-Ergebnissen [8]) und  $K_c = 3 \pm 0,5 \text{ M}^{-1}$  bei Zusatz von  $\text{Ca}^{2+}$  (0,125 M auf je 0,25 M DA und ATP).

Die Kopplungskonstanten der Bimethylenseitenkette der Amine und die Kopplungskonstanten  $J_{\alpha\beta}$  und  $J_{\beta\gamma}$  zwischen den Phosphorkernen der ATP-Phosphatkette (Abb. 1) ändern sich bei Assoziation der Amine mit ATP kaum (z. B.  $J_{\beta\gamma}$  von 19,0 auf 18,5 Hz bei Zugabe von 1,0 M DA auf 0,5 M ATP). Bei Zugabe von  $\text{Mg}^{2+}$  gehen die P-P-Kopplungen aber stärker zurück (z. B.  $J_{\beta\gamma}$  auf 15 Hz bei Zugabe von 0,5 M  $\text{Mg}^{2+}$  auf 0,5 M ATP) und auch die P-H-Kopplungen des  $\alpha$ -P scheinen sich zu verändern. Da die Kopplungskonstanten als ein Maß für die Geometrie der ATP-Phosphatkette interpretiert werden können, ergibt sich daraus, daß die Amine diese

Geometrie offenbar nur wenig beeinflussen.  $\text{Mg}^{2+}$  scheint dagegen durch seine Assoziation sowohl auf die räumliche Anordnung der Phosphatkette als auch auf den Winkel des  $\alpha$ -Phosphates zur Ribose einzuwirken. Der Einfluß der  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionen scheint in der Tendenz ähnlich, aber schwächer zu sein. Er konnte aber wegen der kleineren Bindungskonstanten und der aus Löslichkeitsgründen verwendeten geringeren Konzentrationen nicht weiter verfolgt werden.

### Diskussion

Die mittels NMR-Spektroskopie durchgeföhrten Messungen zeigen, daß Monoamine mit ATP wechselwirken und zwar über eine aus Ring-Wechselwirkung und Amino-Phosphat-Wechselwirkung kombinierten Assoziation. Aufgrund der beobachteten Unterschiede der  $K_d$ - und  $K_c$ -Werte und der verschiedenen Abstandsabhängigkeit der auftretenden Kräfte kann man sich einen Wechselwirkungsmechanismus dabei so vorstellen, daß die relativ weitreichende elektrostatische Anziehung zwischen negativ geladenen Phosphatgruppen (besonders das zweifach deprotonierte  $\gamma$ -P) und positiv geladenen Aminogruppen zu einer Annäherung und Ausrichtung der Wechselwirkungspartner führt (Abb. 9a). Bei genügender Annäherung tragen die weniger weitreichenden Van-der-Waals-Kräfte der Ringsysteme zunehmend zur Wechselwirkung bei und führen zu einer zusätzlichen stabilisierenden Assoziation der Ringsysteme (Abb. 9b und c). Diese wird durch elektronenschiebende Substituenten am Amin-Ringsystem verstärkt, da dadurch dessen Polarisierbarkeit erhöht wird.

Eine Kombination beider Wechselwirkungen der beschriebenen Art ist natürlich nur möglich, wenn Phosphat- und Amino-Gruppen in geeigneter Geometrie zu den Ringsystemen angeordnet sind, d. h. eine optimale stacking-Anordnung zulassen. Wie die Messungen zeigen, ist  $\gamma$ -P die bevorzugte Wechselwirkungsstelle. Diese Bevorzugung beruht möglicherweise darauf, daß diese terminale Phosphatgruppe den größten Freiheitsgrad zur Erreichung der stacking-Anordnung besitzt. Außerdem ist die Coulomb-Anziehung zum  $\gamma$ -P größer als zu den anderen Phosphatgruppen, da es im ATP $^{4-}$  zweifach deprotoniert vorliegt. Ein ATP-Moleköl ist mit einem Amin aber noch nicht abgesättigt, und es kann über  $\alpha$ -P oder  $\beta$ -P zur Anlagerung eines zweiten Amins, d. h. zu einem 1 : 2-Komplex kommen (Abb. 9d).

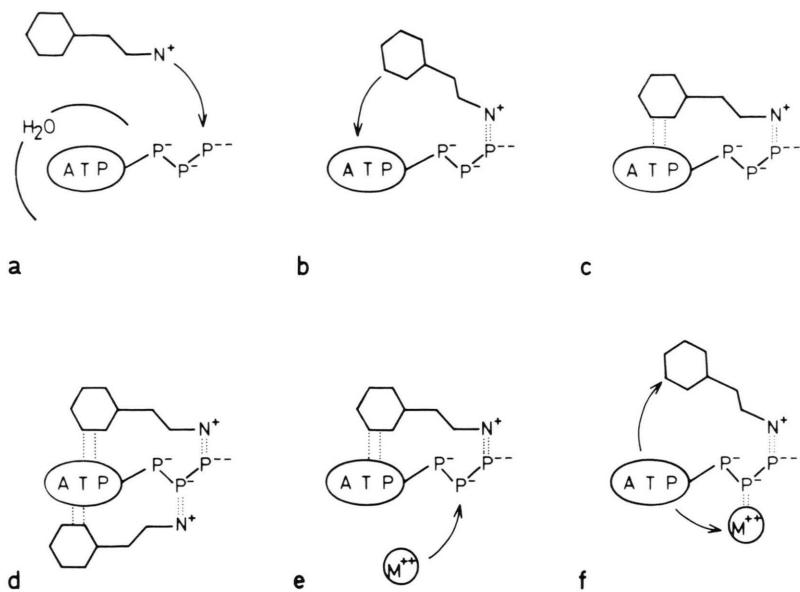


Abb. 9. Assoziationsmechanismus zwischen Monoaminen und ATP, und ein möglicher Einfluß von zweiwertigen Metallionen  $\text{M}^{2+}$  ( $\text{Mg}^{2+}$ ,  $\text{Ca}^{2+}$ ) (schematisch).

Dessen Lebensdauer dürfte jedoch noch kürzer sein als die des ohnehin schon relativ kurzlebigen 1:1-Komplexes.

Die Anlagerung von  $\text{Mg}^{2+}$  oder  $\text{Ca}^{2+}$  an ATP geschieht im wesentlichen über das  $\beta$ -P (Abb. 9e). Vermutlich tritt (über ein Wassermolekül) eine weitere Bindung zum N-7 des Adeninrings ein [16], wodurch es zu einer veränderten Geometrie und wahrscheinlich zu einer Einschränkung der Flexibilität von  $\gamma$ -P kommt. Diese restriktiven Einwirkungen auf die Phosphatkette bewirken eine Abnahme der Amin-ATP-Wechselwirkung vermutlich durch Auflösung der Ring-Assoziation, für die ja am ATP eine geeignete Geometrie des  $\gamma$ -P zum Adeninring vorausgesetzt war (Abb. 9f). Zusätzlich tritt eine Abschwächung der Coulomb-Wechselwirkung wegen der teilweisen Kompensation der negativen Ladungen der Phosphatkette ein. Da die Bindung der  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionen und erst recht die der  $\text{Mg}^{2+}$ -Ionen wesentlich stärker ist als die der Amine, verbleibt nur eine geringe Amin-ATP-Restwechselwirkung bei Vorliegen einer ausreichend großen Metallionen-Konzentration.

Aus dem geschilderten Wechselwirkungsablauf wird deutlich, daß den ATP-Amin-Assoziaten im wesentlichen eine 1:1-Stöchiometrie mit nur geringen 1:2-Anteilen zugrunde liegt, und  $\text{Mg}^{2+}$  und  $\text{Ca}^{2+}$  die ohnehin schon schwache Koordination verringern. So kann die gegenseitige Bindung von ATP mit biogenen Aminen und Metallionen in den Speichergranula nicht als Grundlage zur Erreichung einer geeigneten Isotonie dienen [17] oder als Ursache für die Aufnahme der Amine in die Speichergranula entgegen ihrem Konzentrationsgefälle [18, 19] in Frage kommen. Vielmehr müssen diese Vesikel osmotisch wesentlich stabiler sein als bisher vermutet wurde [20] und für den Transport der Amine müssen pH- oder ATP-abhängige Mechanismen angenommen werden [21, 22]. Der aus den beschriebenen Messungen abgeleitete Wechselwirkungsmechanismus macht verständlich, daß die ATP-Amin-Wechselwirkung äußerst dynamisch ist und gibt einen Eindruck davon, wie Metallionen (speziell  $\text{Ca}^{2+}$ ) diese zu modulieren imstande sind.

- [1] J. Granot, *J. Am. Chem. Soc.* **100**, 2886 (1978).
- [2] J. Granot und D. Fiat, *J. Am. Chem. Soc.* **99**, 4963 (1977).
- [3] K. S. Rajan, Metal ions in biological systems, p. 291, (H. Sigel, ed.) Marcel Dekker Inc., New York 1976.
- [4] A. Pletscher, M. DaPrada, K. H. Berneis, H. Steffen, B. Lütold und H. G. Weder, *Adv. Cytopharm.* **Vol. 2**, Raven Press, New York 1974.
- [5] L. D. Tuck und J. K. Baker, *Chem. Biol. Interactions* **7**, 355 (1973).
- [6] I. Muro, J. Morishima und T. Yonezawa, *Chem. Biol. Interactions* **3**, 213 (1971).
- [7] N. Weiner und O. Jardetzky, *Naunyn-Schmiedebergs Arch. exp. Path. Pharm.* **248**, 300 (1964).
- [8] H. Sapper, W. Gohl, M. Matthies, I. Haas-Ackermann und W. Lohmann, *Cell. Mol. Biol.* **25**, 263 (1979).
- [9] H. Sapper, Dissertation, TU München 1975.
- [10] M. Cohn und T. R. Hughes, *J. Biol. Chem.* **237**, 176 (1962).
- [11] T. D. Son, M. Roux und M. Ellenberger, *Nucl. Acid. Res.* **2**, 1101 (1975).
- [12] F. L. Khalil und T. L. Brown, *J. Am. Chem. Soc.* **86**, 5113 (1964).
- [13] S. Watanabe, L. Evenson und J. Gulz, *J. Biol. Chem.* **238**, 324 (1963).
- [14] P. Job, *Annales de Chimie* **10**, 113 (1927).
- [15] W. Schimmack, H. Sapper und W. Lohmann, *Bioophys. Struct. Mechanism.* **1**, 311 (1975).
- [16] R. Basosi, N. E. Tiezzi und G. Valencin, *J. Am. Chem. Soc.* **100**, 8047 (1978).
- [17] J. Granot und K. Rosenheck, *FEBS Lett.* **95**, 45 (1978).
- [18] K. S. Rajan, J. M. Davis, R. W. Colburn und F. H. Jarke, *J. Neurochem.* **19**, 1099 (1972).
- [19] K. H. Berneis, M. DaPrada und A. Pletscher, *Experientia* **27**, 917 (1971).
- [20] H. Lagercrantz und L. Stajärne, *Nature* **249**, 843 (1974).
- [21] R. G. Johnson, N. J. Carlson und A. Scarpa, *J. Biol. Chem.* **253**, 1512 (1978).
- [22] J. W. Nichols und D. W. Deamer, *Biochim. Biophys. Acta* **455**, 269 (1976).