

Edmund Bäuerlein und Theodor Wieland

Modellversuche zur oxydativen Phosphorylierung, XI¹⁾

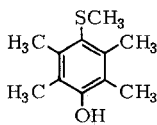
Tocopherol und *S*-Acetyl-*p*-thiokresol als Vermittler einer oxydativen Phosphorylierung von Adenosindiphosphat

Aus dem Institut für Organische Chemie der Universität Frankfurt am Main

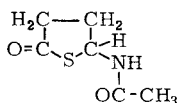
(Eingegangen am 23. September 1968)

Bei der Bromoxydation von Tocopherol (**1**) in Pyridin entstehen aus den Tetrabutylammoniumsalzen von Adenosin-5'-diphosphat (ADP) und Phosphorsäure etwa 8% Adenosintriphosphat (ATP). Die gleichartige Oxydation von *S*-Acetyl-*p*-thiokresol (**2**) gibt über 25% ATP. — Eine analoge Synthese von Adenosin-5'-sulfatophosphat aus Adenosin-5'-monophosphat und Sulfat gelang nicht.

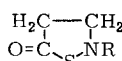
Als Substanzen, die während ihrer Oxydation anorganisches Phosphat binden und in den phosphorylierenden Zustand versetzen können (Mediatoren), wurden im hiesigen Institut Monothiohydrochinon-*S*-methyläther²⁾, *N*-Acetyl-homocysteinethiolacton³⁾ und die ihm ähnlichen Thiazolidone⁴⁾ erkannt. Es hat sich nun gezeigt, daß auch ein Hydrochinonmonoäther, Tocopherol (**1**), und eine offene *S*-Acetylverbindung, *S*-Acetyl-*p*-thiokresol (**2**), zur Umwandlung von Oxydationsenergie in phosphorylierende Potenz geeignet sind, die sich z. B. in der Bildung von ATP aus ADP und Phosphat äußert.



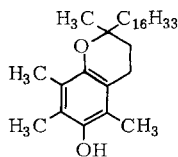
1. c. 2)



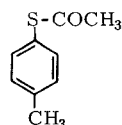
1. c. 3)



1. c. 4)



1



2

Das positive Ergebnis am Tocopherol (**1**) entspricht einer Vorstellung von Dürckheimer und Cohen⁵⁾ über eine mögliche Beteiligung des Vitamins am biologischen Prozeß der oxydativen Phosphorylierung. Diese Autoren formulierten eine bei der Oxydation von **1** in Gegenwart von Phosphat entstehende phosphorylierende Zwischenstufe **3a**, stellten aber durch Oxydation von **1** in Gegenwart von Acetat nur die entsprechende *O*-Acetylverbindung **3b** her, deren Acetylrest allerdings kein erhöhtes Gruppenübertragungspotential aufwies.

¹⁾ X. Mitteil.: Th. Wieland und E. Bäuerlein, Angew. Chem. **80**, 915 (1968).

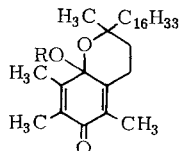
²⁾ Th. Wieland und E. Bäuerlein, Mh. Chem. **98**, 1381 (1967).

³⁾ Th. Wieland und E. Bäuerlein, Chem. Ber. **100**, 3869 (1967).

⁴⁾ Th. Wieland und H. Aquila, Chem. Ber. **101**, 3031 (1968).

⁵⁾ W. Dürckheimer und L. A. Cohen, J. Amer. chem. Soc. **86**, 4388 (1964).

Den Eintritt eines nucleophilen Substituenten in die *p*-Stellung zum oxydierten Hydroxyl hatten schon *Martius* und *Eilingsfeld*⁶⁾ beobachtet, die u. a. die Struktur des „Tocopheroxyds“ von *Boyer*, das bei der Oxydation von **1** in alkoholischer Lösung entsteht, als die eines Chinonmonoacetals **3c** erkannten. Dieses entsteht durch Eintritt eines Alkohol-Moleküls in die durch Oxydation elektrophil gemachte *p*-Stellung.

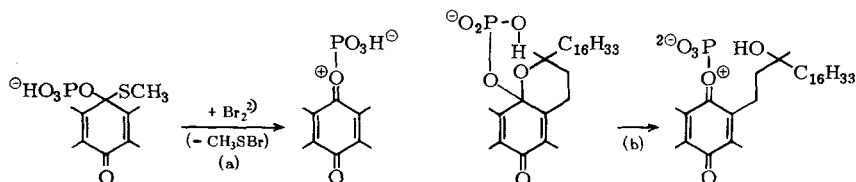


3a: R = PO₃H₂

b: R = COCH₃

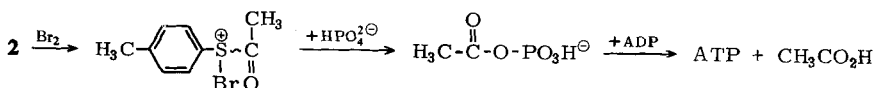
c: R = C₂H₅

Die Bromoxydation von **1** im bewährten System²⁾ Pyridin und Tetrabutylammonium-(TBA)-Salz von ADP und Phosphorsäure gab, wie die enzymatische Bestimmung⁷⁾ nach vorhergehender dünnenschichtchromatographischer Trennung auswies, nach Abzug eines kleinen, aber deutlichen Blindwerts (1–2%), etwa 8% ATP. Dies ist im Vergleich mit den am Thioäther²⁾ erzielten 25% eine kleine Menge, zeigt aber doch, daß die Acetalphosphat-Gruppierung in **3a** phosphorylierende Eigenschaften hat. Daß diese beim Thioäther²⁾ stärker ausgeprägt sind, hängt mit der Oxydierbarkeit des Schwefels zusammen. Dieser wird nach der Oxydation unter Mitnahme von Elektronen aus dem Molekül entfernt, Gl. (a), während beim Tocopherolderivat **3a** nur die Tendenz zur Ausbildung des chinoiden Systems als Triebkraft zum Aufbau des phosphorylierenden Agens dient, Gl. (b).



Daß die Acetylverbindung **3b** keine acetylierenden Eigenschaften hat, hängt möglicherweise mit dem Fehlen des dem Äthersauerstoff benachbarten Protons zusammen, das für das Eintreten der Ringspaltungsreaktion (b) notwendig sein könnte⁵⁾.

Unter den schwefelhaltigen Mediatoren interessierte noch der Effekt von offenen Thioacetylverbindungen im Vergleich mit den cyclischen^{3,4)}. Deshalb wurde *S*-Acetyl-*p*-thiokresol (**2**) in Gegenwart von ADP und Phosphat ebenfalls mit Brom in Pyridin oxydiert, wobei sich in mehreren Versuchen $25 \pm 4\%$ ATP bildeten, während in Abwesenheit des Oxydationsmittels weniger als 0.5% entstanden. Man wird annehmen haben, daß ATP über gemischte Anhydride der Essigsäure vor allem mit Phosphorsäure, daneben mit ADP, entsteht, die sich aus dem oxydativ aktivierten Acetylrest bilden.



⁶⁾ C. Martius und E. Eilingsfeld, Liebigs Ann. Chem. **607**, 159 (1957).

⁷⁾ H. U. Bergmeyer, Methoden der enzymatischen Analyse, S. 539, Verlag Chemie, Weinheim/Bergstraße 1962; W. Gruber, H. Moellering und H. U. Bergmeyer, Enzym. biol. clin. **7**, 115 (1966).

Wir haben auch versucht, analog der oxydativen Darstellung von ADP aus AMP und Phosphat mit *N*-Acetyl-homocysteinthiolacton als Mediator⁸⁾ die „aktivierte Schwefelsäure“ der Zelle, Adenosin-5'-sulfatophosphat⁸⁾ aus AMP und Sulfat herzustellen. Auch beim Verhältnis Sulfat : AMP wie 10 : 1 konnte weder papierchromatographisch⁸⁾ noch durch DC das Produkt nachgewiesen werden. Entweder reichte die Positivierung des Carbonyl-C-atoms im Thiolacton nicht aus, ein gemischtes Anhydrid aus Carbonsäure und dem besonders wenig nucleophilen Sulfat zu bilden, oder die konkurrierende Bildung von Di-AMP hatte trotz des großen Überschusses an Sulfat den Vorrang.

Beschreibung der Versuche

DL- α -Tocopherol (**1**) und 0.1 *n* Tetrabutylammonium(TBA)-hydroxidlösung waren Präparate der Fa. Merck, Darmstadt, freies ADP war ein Präparat der Fa. Boehringer Mannheim GmbH. *S*-Acetyl-*p*-thiokresol (**2**) wurde nach l. c.⁹⁾ aus *p*-Thiokresol und Acetanhydrid in Gegenwart von Triäthylamin synthetisiert: Sdp.₁₄ 120--122°.

Zur Herstellung der Phosphat-ADP-Mischung eines Standard-Ansatzes wurden 11.11 ccm 0.1 *n* (TBA)OH-Lösung (10/9 mMol) mit 0.67 ccm einer 1 *n* Lösung von ca. 89proz. Phosphorsäure in Dioxan (2/9 mMol) vermischt, darin 0.107 g freies ADP · 3H₂O (2/9 mMol) aufgelöst. Dann wurde i. Vak. verdampft und noch 30 Min. bei 0.1 Torr getrocknet.

Oxydative Phosphorylierung von ADP

a) *In Gegenwart von Tocopherol (1)*: Die obige TBA-Salzmischung wurde unter Zusatz von 96 mg **1** (2/9 mMol) in 9 ccm absol. Pyridin gelöst. Unter Rühren tropfte man entweder 0.012 ccm (2/9 mMol) oder 0.023 ccm (4/9 mMol) oder 0.057 ccm (10/9 mMol) *Brom*, jeweils in 1 ccm Pyridin, innerhalb von 1 Min. bei 20° zu. Die Farbe der Lösung schlug von Dunkelgelb nach Rot, bei großem Bromüberschuß wieder nach Gelb um. Es wurde noch 1 Stde. weitergerührt und zur Bestimmung von ATP aufgearbeitet.

Analyse von ATP: Die einzelnen Oxydationslösungen wurden bei 30° i. Vak. eingengt, die Rückstände in soviel einer Mischung von 5 Vol. Pyridin und 1 Vol. 0.05 *m* Tris-Puffer von pH 7.55 gelöst, daß ein Endvolumen von 4--5 ccm resultierte. Diese konzentrierten Lösungen wurden in 0.1-ccm-Portionen auf 20 × 20 cm-Platten an 0.5 mm-Schichten aus Kieselgel PF (Merck) in *n*-Propanol/Ammoniak (25proz.)/Wasser (6 : 3 : 1 v/v/v)¹⁰⁾ getrennt. Hierzu wurde von jedem Ansatz je ein Fünftel auf zwei Platten und ein Zehntel auf eine Platte als breite Startbande aufgetragen. Durch 2--3 maliges Aufsteigenlassen nach jeweiliger Fön- oder Lufttrocknung trennten sich AMP, ADP und ATP vollständig (in dieser Reihenfolge langsamer wandernd). Die einzelnen Banden wurden unter der UV-Lampe (254 m μ) identifiziert und von der Platte geschabt. Die Gelportionen wurden dann in eine 1 × 10 cm-Säule auf eine 1 cm dicke Kieselgelschicht gefüllt und mit 0.05 *m* Tris-Puffer von pH 7.55 unter Kontrolle des Eluats mit einem registrierenden UV-Durchflußphotometer (Uvicord, LKB Stockholm) eluiert, bis keine Absorption mehr angezeigt wurde. Dann wurden die Eluate zum Zwecke der Gehaltsbestimmung mit demselben Puffer auf 25 ccm aufgefüllt (Testlösung). Die Auswertung wurde auf enzymatischem Weg mit gekoppelten spezifischen Methoden⁷⁾ im Photometer Eppendorf (3-ccm-Küvetten) vorgenommen; der ATP-Gehalt ist proportional der Nicotinamid-Adenindinucleotid-H(NADH)-Abnahme, die NADH-Konzentrationen wurden bei 366 m μ colorimetrisch gemessen.

⁸⁾ J. Baddiley, J. G. Buchanan und R. Letters, J. chem. Soc. [London] **1957**, 1067.

⁹⁾ P. P. Croitor und R. W. Freedman, Analytic. Chem. **34**, 1536 (1962).

¹⁰⁾ C. S. Hanes und F. A. Isherwood, Nature [London] **164**, 1107 (1947).

Der auf der Bildung von 1.3-Diphosphoglycerat aus 3-Phosphoglycerat und ATP in Gegenwart von Phosphoglyceratkinase (PGK) beruhende Test nach *Bücher*, bei welchem ADP entsteht, ließ sich nach *Gruber et al.*⁷⁾ unter Myokinaseeinwirkung (MK) kontrollierend repetieren, da hierbei aus 2 ADP wieder ATP neben AMP entsteht. In den meisten Fällen waren die mit MK erhaltenen ATP-Werte etwas kleiner als die mit PGK. Während im PGK-Test auch andere etwa durch Oxydation am Purin veränderte Triphosphate mitreagieren können, spricht auf MK nur ADP an, so daß die so erhaltenen und angegebenen Brutto-ATP-Werte als streng spezifisch und zuverlässig gelten können. Die in der Tabelle angegebenen ATP-Ausbeuten sind auf den ADP-Gehalt des eingesetzten Präparats, der 88% betrug, umgerechnet. Die ohne Mediator gebildeten ATP-Mengen (Blindwerte), die 1–2% betragen können, sind ebenfalls in der Tabelle berücksichtigt.

Ausbeuten an ATP (% bez. auf eingesetztes 88proz. ADP) bei der Oxydation von 2/9 mMol Tocopherol (I) in Gegenwart von 2/9 mMol (TBA)₂HPO₄ und 2/9 mMol (TBA)₃ADP mit verschiedenen Mengen Brom

ATP-Bestimmung		mMol Br ₂					
Methode	10/9		4/9		2/9		0
	mit 1	ohne 1	mit 1	ohne 1	mit 1	ohne 1	
Phosphoglyceratkinase	13.5	4.2	10.7	3.4	1.5	1.0	0
	12.0	4.3	11.6	3.6			
	12.2	5.2	11.9				
	13.9						
Mittelwert	12.9	4.5	11.4	3.5			
Myokinase	11.3	1.2	8.2	2.4	1.1	0.9	0
	11.7	1.4	10.1	2.4			
	10.3	1.3	10.7				
Mittelwert	11.1	1.3	9.7	2.4			
ATP (Netto)	9.8		7.3		0.2		0
(nur aus Myokinase-Bestimmung)							

Hauptoxydationsprodukt des Tocopherols mit Brom war bei allen Ansätzen *Tocopherylchinon*. Bei der Dünnschichtchromatographie lief es fast mit der Front. Es wurde durch Herausschaben und Eluieren mit Aceton, Chloroform und Benzol isoliert und in vier Lösungsmittelsystemen¹¹⁾ auf Kieselgel HF (Merck) durch mitlaufende Vergleichssubstanz identifiziert. Die Vergleichssubstanz wurde aus DL- α -Tocopherol durch FeCl₃-Oxydation nach *John et al.*¹²⁾ hergestellt.

Lösungsmittelsysteme ¹¹⁾	R _F -Wert des Chinons
Benzol/Cyclohexan (3 : 1 v/v)	0.09
Cyclohexan/Äther (4 : 1 v/v)	0.19
Cyclohexan/Chloroform (1 : 1 v/v)	0.33
Benzol/Methanol (98 : 2 v/v)	0.62

Oxydationsansätze von 1 Stde. Reaktionsdauer mit einem Äquivalent (2/9 mMol) *N*-Bromsuccinimid oder 2.5 Äquivv. (1 mMol) (TBA)₃Fe(CN)₆ ergaben kein ATP.

¹¹⁾ R. Strohecker und H. Henning, Vitamin Essays-Tested Methods, S. 305, Verlag Chemie, Weinheim 1965.

¹²⁾ W. John, E. Dietzel und W. Ernte, Hoppe-Seyler's Z. physiol. Chem. **257**, 173 (1939).

b) *In Gegenwart von S-Acetyl-p-thiokresol (2)*: Die obige TBA-Salzmischung wurde unter Zusatz von 37 mg **2** (2/9 mMol) in 10 ccm absol. Pyridin mit 0.03 ccm (5/9 mMol) *Brom* in 1 ccm Pyridin wie unter a) oxydiert. Aufarbeitung und ATP-Analyse wie oben. Es wurden in 4 jeweils parallel über 2 DS-Platten aufgearbeiteten Ansätzen nach dem Myokinase-Test 21.0 : 21.5; 24.3 : 21.2; 27.0 : 25.5; 31.4 : 30.8% ATP, d. i. im Mittel 25.3% ATP (bez. auf ADP) gefunden. Die ohne Thioester entstandene ATP-Menge (Blindwert) war 0.3%.

Versuch zur Darstellung des Adenosin-5'-sulfatophosphats: *N*-Acetyl-homocysteinethio-lacton³⁾ war ein Präparat der Fa. Calbiochem., Luzern, AMP der Fa. Boehringer Mannheim GmbH.

Darstellung der Tetrabutylammoniumsalze wie vorne beschrieben; anstelle von 1 *n* H₃PO₄ in Dioxan tritt eine 1 *n* Lösung von konz. Schwefelsäure in Dioxan.

Salzmischung I: (TBA)₂SO₄ + (TBA)₂AMP

8.89 ccm *n*/10 (TBA)OH (8/9 mMol), 0.45 ccm 1 *n* H₂SO₄ (2/9 mMol), 0.081 g AMP · H₂O (2/9 mMol)

Salzmischung II: 10 (TBA)₂SO₄ + (TBA)₂AMP

48.88 ccm *n*/10 TBA(OH) (44/9 mMol), 4.45 ccm 1 *n* H₂SO₄ (20/9 mMol), 0.081 g AMP · H₂O (2/9 mMol)

1) Salzmischung I, 0.036 g *Thiolacton* (2/9 mMol) in 10 ccm absol. Pyridin + 0.028 ccm Br₂ (5fache ber. Menge)

2) Salzmischung II, 0.036 g *Thiolacton* (2/9 mMol) in 10 ccm absol. Pyridin + 0.028 ccm Br₂ (5fache ber. Menge).

Die einzelnen Oxydationslösungen wurden bei 30° i. Vak. eingengt, die Rückstände in soviel 0.05 *m* Tris-Puffer von pH 7.55 aufgenommen, daß ein Endvolumen von 2–4 ccm resultierte. Zum Vergleich wurde *Adenosin-5'-sulfatophosphat* nach *Baddiley*⁸⁾ aus AMP und *Pyridin-Schwefeltrioxid-Komplex*¹³⁾ in *Natriumhydrogencarbonat* dargestellt. Die vergleichende Papierchromatographie⁸⁾ und Dünnschichtchromatographie mit Kieselgel HF₂₅₄ und Cellulose ergaben keinen Hinweis auf das gesuchte Produkt.

¹³⁾ P. Baumgarten, Ber. dtsh. chem. Ges. **59**, 1168 (1926).