

Darstellung und Eigenschaften von 5-Acetyl-4-methyl-1-(β -D-ribofuranosyl)-imidazol-5'-di- und -triphosphat

Synthesis and Properties of 5-Acetyl-4-methyl-1-(β -D-ribofuranosyl)-imidazole-5' di- and -triphosphate

Gerd Johnscher, Jürgen Berghäuser und Christoph Woenckhaus

Klinikum der Johann-Wolfgang Goethe Universität, Gustav Embden Zentrum der Biologischen Chemie, Abteilung für Enzymologie, Frankfurt

(Z. Naturforsch. **30 e**, 25–28 [1975]; eingegangen am 5. November 1974)

Nucleotide Triphosphate Analogue, Kinases, Enzymatic Behaviour

5-Acetyl-4-methyl-1-(β -D-ribofuranosyl)-imidazole-5'-phosphate reacts with diphenylphosphoridate forming the asymmetrical pyrophosphate ester. This in turn reacts with tri-*n*-butylammonium phosphate yielding 5-acetyl-4-methyl-imidazole-riboside-5'-diphosphate and with tri-*n*-butylammonium pyrophosphate to give the nucleotide triphosphate.

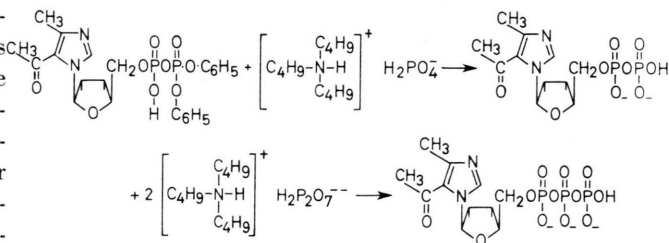
5-Acetyl-4-methyl-imidazole-riboside-5'-pyrophosphate shows in the test with pyruvate kinase a reaction rate three times slower than that of ADP; but the same K_m as that of ADP. The ATP analogue is only about 10% as effective as ATP itself in the test with hexokinase, 3-phosphoglycerate kinase and gluconate kinase. Adenylate kinase and NAD⁺ kinase show no activity when ATP is replaced by the nucleotide-triphosphate-analogue. In presence of ATP the analogue strongly inhibits the reaction of adenylate kinase.

Adenin ist Bestandteil einer großen Zahl biochemisch wichtiger Verbindungen. Röntgenstrukturuntersuchungen an Dehydrogenasen^{1,2} und Kinasen³ zeigen eine ähnliche Verteilung der Elektronendichten der Nucleotidbindungsstellen bei verschiedenen Enzymen. Dieser Befund weist auf einen gleichartigen Bau der Adeninbindungsstellen hin⁴. Wird im NAD⁺ der Adeninteil durch 3-Desazapurin⁵ oder 2-Acetyl-3-methyl-imidazol⁶ ersetzt, so erhält man Coenzymanalogue, die in ihrem biochemischen Verhalten dem des NAD⁺ sehr ähnlich sind. Wir beschreiben in dieser Arbeit Synthese und Eigenschaften von 5-Acetyl-4-methyl-1-(β -D-ribofuranosyl)-imidazol-5'-di- und triphosphat.

Ergebnisse

5-Acetyl-4-methyl-1-(β -D-ribofuranosyl)-5'-phosphat reagiert nach Bildung des Phosphomorpholidats mit *ortho*-Phosphorsäure oder Pyrophosphorsäure in geringer Ausbeute zu den entsprechenden Nucleotid-anhydriden⁷. Durch Umsatz des Nucleotidmonophosphats mit Phosphorsäurechlorid-diphenylester erhielten wir reaktives 5-Acetyl-4-methyl-imidazol-ribosid-5'-(P²)-diphenyl-pyrophosphat⁸. Die Ver-

bindung reagiert mit Tri-*n*-butylammonium-phosphat zum Nucleotiddiphosphat und mit Tri-*n*-butylammonium-pyrophosphat zum Nucleotidtriphosphat in guter Ausbeute. Die Reinigung beider Nucleotid-anhydride gelang durch Säulenchromatographie an Dowex 1 \times 2 Cl⁻-Form mit einem Salzsäure-Lithiumchlorid-Gradienten. Überschüssige Salze ließen sich durch Chromatographie an einer Sephadex G 10-Säule entfernen⁷. Im Absorptionsspektrum der Nucleotid-anhydride treten keine Unterschiede gegenüber dem des 5-Acetyl-4-methyl-1-(β -D-ribofuranosyl)-imidazol-5'-phosphats auf. Die beiden Nucleotid-di- und -triphosphate erwiesen sich als elektrophoretisch und dünnschichtchromatographisch einheitlich und zeigten ähnliche Wandergeschwindigkeiten wie ADP und ATP.



Sonderdruckanforderungen an Prof. Dr. Dr. Christoph Woenckhaus, Zentrum der Biologischen Chemie, Abteilung für Enzymologie, Klinikum der Johann-Wolfgang Goethe Universität, D-6000 Frankfurt-70, Theodor-Stern-Kai 7.

Abkürzungen: Adenylatkinase, ATP:AMP Phosphotransferase (EC 2.7.4.3); Glukonatkinase, ATP:D-Glukonat-6-

Phospho-transferase (EC 2.7.1.12); Phosphoglyceratkinase, ATP:3-Phosphoglycerat-1-phospho-transferase (EC 2.7.2.3); Hexokinase, ATP:D-Hexose-6-Phosphotransferase (EC 2.7.1.1); NAD⁺-Kinase, ATP:NAD⁺-2'-Phosphotransferase (EC 2.7.1.23); Pyruvatkinase, ATP:Pyruvat-Phosphotransferase (EC 2.7.1.40); Lactat-Dehydrogenase, L-Lactat:NAD⁺-Oxidoreduktase (EC 1.1.1.27).

5-Acetyl-4-methyl-imidazol-ribosid-5'-diphosphat ist Substrat der Pyruvatkinase. Im gekoppelten Test betrug die Michaeliskonstante 0,6 mM. Die maximale Umsatzzahl war 2000 mol Nucleotid-diphosphat/mol Enzym/min und gegenüber ADP um den Faktor drei vermindert⁹.

5-Acetyl-4-methyl-imidazol-ribosid-5'-triphosphat wurde anstelle von ATP im Test mit Hexokinase¹⁰, Glukonatkinase¹¹, Phosphoglyceratkinase¹², Adenylatkinase¹³ und NAD⁺-kinase¹⁴ eingesetzt. Mit Hexokinase beobachteten wir 9% der ATP-Wirksamkeit. Das gleiche Ergebnis erhielten wir im Glukonatkinasetest. Auch hier zeigte 5-Acetyl-4-methyl-imidazol-ribosid-5'-triphosphat 9% der Wirkung. Im Phosphoglyceratkinasetest wurden noch 3%-ATP-Wirksamkeit festgestellt. Im Test mit Adenylatkinase erwies sich das Triphosphat nicht als Substrat. In Gegenwart von 5-Acetyl-4-methyl-1-(β -D-ribofuranosyl)-imidazol-5'-triphosphat wurde ATP im Test sehr viel langsamer umgesetzt, während 5-Acetyl-4-methyl-1-(β -D-ribofuranosyl)-imidazol-5'-monophosphat keinen Einfluß auf die Phosphorylierung von AMP hat. Das Nucleotidmonophosphat war als Phosphatacceptor nicht wirksam. Das ATP-Analoge kann ATP im Test mit NAD⁺-kinase nicht ersetzen.

Material und Methoden

Enzyme

Adenylatkinase, Glukonatkinase, Phosphoglyceratkinase, Hexokinase, NAD⁺-kinase, Pyruvatkinase, Lactat-, Phosphoglukonat-, Glukose-6-phosphat-, Glycerinaldehyd-3-phosphat- und Isocitrat-Dehydrogenase, ATP, ADP, AMP, NAD⁺, NADH und NADP⁺ bezogen wir von der Firma Boehringer und Soehne, Mannheim. Die Synthese von 5-Acetyl-4-methyl-1-(β -D-ribofuranosyl)-imidazol-5'-phosphat haben wir vor einiger Zeit beschrieben⁶.

5-Acetyl-4-methyl-1-(β -D-ribofuranosyl)-imidazol-5'-di- und -triphosphat

Zu 180 mg Tri-*n*-butylammoniumsalz von 5-Acetyl-4-methyl-imidazol-ribosid-5'-phosphat in 1 ml Dimethylformamid werden 0,26 ml Phosphorsäurechlorid-diphenylester gegeben. Die Lösung wird mit 2,5 ml absolutem Dioxan und 0,12 ml Tri-*n*-butylamin versetzt. Nach 3 Stunden Stehen bei Raumtemperatur wird das Gemisch im Vakuum bei 30 °C eingengt und zum Rückstand 15 ml absoluter Äther gegeben. 5-Acetyl-4-methyl-imidazol-ribosid-5'-(P²)-

diphenylpyrophosphorsäureester fällt aus. Der Niederschlag wird in 2 ml absolutem Dioxan gelöst. Die Lösung wird im Vakuum bei 30 °C zum Sirup eingengt. Der Rückstand wird mit 1 ml Pyridin, der 0,15 mM an Tri-*n*-butylammonium-orthophosphat war, versetzt. Nach 20 Stunden Stehen bei Raumtemperatur wird das Lösungsmittel bei 30 °C im Vakuum entfernt und der Rückstand mit 10 ml Äther versetzt. Ausgefallenes 5-Acetyl-4-methyl-imidazol-ribosid-5'-diphosphat wird abzentrifugiert und in 3 ml Äthanol-Wasser-Gemisch (1:1) gelöst. Mit 2 N HCl wird pH 4 eingestellt. Nach 2 Stunden Stehen bei Raumtemperatur wird die Lösung mit 400 mg Calciumchlorid-Hexahydrat, in 5 ml Äthanol gelöst, versetzt. Das Calciumsalz des Nucleotid-diphosphats wird abzentrifugiert, in wenig Wasser gelöst und auf eine Dowex-1 \times 2 Säule (Chlorid-Form, 200 – 400 mesh, 1 \times 5 cm) gegeben. Nach Durchfluß von 80 ml Wasser wird mit 150 ml 0,06 N HCl nichtumgesetztes Nucleotid-monophosphat und mit 400 ml 0,01 N HCl, die 0,025 M an LiCl ist, Nucleotid-diphosphat eluiert. Es erscheint nach 30 ml Durchlauf in einem Volumen von 340 ml. Die Lösung wird mit Tri-*n*-butylamin neutralisiert und gefriergetrocknet, der Rückstand in 10 ml absolutem Äthanol gelöst und das Nucleotid-diphosphat mit trockenem Aceton gefällt. Die restlose Abtrennung von Salzen gelingt durch Chromatographie an einer Sephadex G 10 Säule (1 \times 200 cm). Als Elutionsmittel dient Wasser. Die wäßrige Lösung wird gefriergetrocknet. Die Ausbeute beträgt 26,4 mg entsprechend 12,5% der Theorie. Das Ribose- und Phosphat-Verhältnis wurde zu 1:2,2 bestimmt.

$$\lambda_{\max} = 266 \text{ nm}; \epsilon = 10,8 \times 10^{-3}; \text{pH } 9,5.$$

Zur Synthese des *Nucleotid-triphosphats* werden 300 mg 5-Acetyl-4-methyl-imidazol-ribosid-5'-(P²)-diphenylpyrophosphorsäureester in 1 ml absolutem Pyridin mit 550 mg Di-(tri-*n*-butylammonium)-pyrophosphat, in 1 ml absolutem Pyridin gelöst, versetzt. Nach 45 min Stehen bei Raumtemperatur wird das Reaktionsgemisch im Vakuum bei 30 °C eingengt und der Sirup mit 15 ml Äther versetzt. Die weitere Aufarbeitung des Nucleotidgemisches vollzieht sich analog der Nucleotid-diphosphat-Darstellung. Das Calciumsalz wird zur Chromatographie auf eine Dowex-1 \times 2 Säule (Chlorid-Form, 200 – 400 mesh, 1,6 \times 7 cm) gegeben. Nach Durchlauf von 80 ml Wasser wird nichtumgesetztes Nucleotid-monophosphat mit 150 ml 0,06 N HCl eluiert, anschließend das Diphosphat mit 400 ml einer Lösung von 0,01 N HCl und 0,025 M LiCl. Das Nucleotid-triphosphat erscheint nach Aufgabe von 0,01 N HCl, die 0,1 M an LiCl ist, nach Durchlauf von 20 ml in 320 ml. Die weitere Reinigung er-

folgte wieder wie für das Nucleotid-diphosphat beschrieben. Die Ausbeute betrug 58,5 mg, das Verhältnis Ribose : Phosphat wurde zu 1 : 3,1 bestimmt.

$$\lambda_{\max} = 266 \text{ nm}, \quad \varepsilon = 10,8 \times 10^{-3}; \quad \text{pH } 9,5.$$

UV-Spektren wurden im Cary 14 Spektrophotometer aufgenommen. UV-Licht-absorbierende Säuleneluate wurden im Uvicord bestimmt. Als Elektrophoresepuffer verwandten wir 0,1 M Tris-Acetat pH 8,1. Zur *Dünnschichtchromatographie* wurden Polygram CEL 300/PEI-Cellulose-Folien der Firma Macherey & Nagel verwandt. Als *Laufmittel* diente 2 N Ameisensäure und 0,5 M LiCl.

Zur Messung der Eigenschaften in *enzymatischen Tests* verwandten wir ein Photometer Eppendorf mit registrierendem Schreiber. Die Reaktionsgeschwindigkeiten wurden in gekoppelten Tests als $\Delta E_{366 \text{ nm}}/\text{min}$ bei 25 °C bestimmt. Zur Bestimmung der Michaeliskonstanten und maximalen Umsatzzahl mit Pyruvatkinase befanden sich in einer Küvette $D = 1 \text{ cm}$ in 3 ml Gemisch bestehend aus: 0,1 M Triäthanolamin-Puffer pH 7,6, 0,5 mM Phosphoenolpyruvat, 2,5 mM MgCl_2 , 5 mM NADH, 0,1 M KCl und 0,2 mg Lactat-Dehydrogenase und 5-Acetyl-4-methyl-imidazol-ribosid-5'-diphosphat in Konzentrationen von 0,1 – 1 mM. Die Reaktion wurde durch Zugabe von 0,01 ml Pyruvatkinaselösung – 2 mg Enzym/ml – ausgelöst. K_m und maximale Umsatzzahl wurden nach Lineweaver und Burk¹⁵ bestimmt. Die Wirkung des Triphosphats im Test mit Adenylatkinase¹³, Glukonatkinase¹¹, Hexokinase¹⁰, NAD^+ -Kinase¹⁴, Phosphoglyceratkinase¹² wurde nach beschriebenen Testvorschriften bestimmt. Als Kontrollen dienten Ansätze, die gleiche Konzentrationen an ATP enthielten. Die im Kontrollansatz gemessene Geschwindigkeit wurde als 100% festgesetzt.

Proteinbestimmungen erfolgten nach der Biuret-methode²¹ mit einem Faktor von 16,5. Die molaren Extinktionskoeffizienten des 5-Acetyl-4-methyl-imidazol-ribosid-5'-di- und -triphosphats wurden unter Zugrundelegung der Phosphat-²² und Ribose-analyse²³ bestimmt.

Diskussion

Im ATP wurde der Adeninring durch 5-Acetyl-4-methyl-imidazol ersetzt, um Aussagen über die Bindung der Nucleotid-Base zu machen. So zeigte das NAD^+ -Analoge: Nicotinamid-5-acetyl-4-methyl-imidazol-dinucleotid im Test mit Dehydrogenasen hohe Michaeliskonstanten und hohe Umsatzzahlen verglichen mit NAD^+ . Die Dissoziationskonstanten binärer Dehydrogenase-Dihydronicotinamid-(5-acetyl-

4-methyl-imidazol)-dinucleotid-Komplexe sind etwa 10-mal größer als die der NADH -Enzym-Komplexe¹⁶. 5-Acetyl-4-methyl-imidazol-ribosid-5'-diphosphat anstelle von ADP wurde von Pyruvatkinase etwas langsamer bei gleicher K_m wie ADP umgesetzt. Diese Beobachtung steht im Einklang mit anderen Untersuchungen¹⁷.

Die geringe Aktivität des ATP-analogen 5-Acetyl-4-methyl-imidazol-ribosid-5'-triphosphat im Test mit Glukonatkinase, Hexokinase und Phosphoglyceratkinase wird offensichtlich durch die unterschiedliche Affinität des heterocyclischen Ringes zur Adeninbindungsstelle bewirkt. Der Acetyl-methyl-imidazolrest wird nur unzureichend im Adeninbindungszentrum fixiert. Ein zusätzlicher Bindungsanteil wird durch die Wechselbeziehung der Ribose mit Seitenresten des Enzyms aufgebracht. Diese Bindung ist vom NAD^+ -Komplex der Alkohol-² und Lactat-Dehydrogenase¹ bekannt. Hier bildet sich eine Wasserstoffbrücke zwischen der Zuckerhydroxylgruppe des Ribose C-2 und einem Aspartatrest des Enzyms aus. Im Falle des NAD^+ -Analoge: Nicotinamid-(5-acetyl-4-methyl-imidazol)-dinucleotid ist die schwache Fixierung für die Coenzymfunktion noch ausreichend. Die hohe Umsatzzahl kann durch den erleichterten Austausch der Coenzymanalogen im aktiven Zentrum bewirkt werden. Bei 5-Acetyl-4-methyl-imidazol-ribosid-5'-triphosphat reicht diese Fixierung offenbar nicht aus, um eine entsprechend stabile Bindung an das Enzym zu bewirken, was sich in einer Abnahme der ATP-Wirksamkeit ausdrückt.

Die fehlende Reaktion des ATP-Analogen im Adenylatkinase-Test kann nicht durch eine schwächere Bindung erklärt werden. Dieses Enzym kann alle natürlichen Nucleotidtriphosphate zur Reaktion verwenden¹⁸. Im Gegensatz dazu ist eine hohe Spezifität der Adenylatkinase gegenüber Nucleotidmonophosphat bekannt¹⁹. Für das Enzym werden zwei unterschiedliche Nucleotidbindungsstellen gefordert²⁰. So wird das ATP-Analoge von Adenylatkinase gebunden und hemmt die Disproportionierungsreaktion von gleichzeitig vorhandenem ATP, während 5-Acetyl-4-methyl-imidazol-ribosid-5'-monophosphat keinen Einfluß auf die Reaktion hat. Es besteht die Möglichkeit, daß 5-Acetyl-4-methyl-imidazol-ribosid-5'-triphosphat in einer Anordnung fixiert wird, die keine Weiterreaktion zuläßt. Ähnliche Beobachtungen machte Holler²¹ an L-Isoleucin: t-RNS Ligase und L-Phenylalanin:

t-RNS Ligase mit diesem Analogon, das ATP als Substrat nicht ersetzen kann, aber die durch L-Phe-

nylalanin: t-RNS Ligase katalysierte Reaktion stark hemmt.

- ¹ M. J. Adams, M. Buehner, K. Chandrasekhar, G. C. Ford, M. L. Hackert, A. Liliás, M. G. Rossmann, I. E. Smiley, W. S. Allison, J. Everse, N. O. Kaplan u. S. Taylor, *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.* **70**, 1968 [1973].
- ² H. Eklund, B. Nordström, E. Zeppezauer, G. Söderlund, I. Ohlsson, T. Boiwe u. C.-I. Brändén, *FEBS-Letters* **44**, 200 [1974].
- ³ C. C. F. Blake, *Nature* **250**, 284 [1974].
- ⁴ M. G. Rossmann, D. Moras u. K. W. Olsen, *Nature* **250**, 194 [1974].
- ⁵ C. Woenckhaus u. P. Zumpe, *Z. Naturforsch.* **23b**, 484 [1968].
- ⁶ C. Woenckhaus, R. Kaleja u. P. Heik, *Z. Naturforsch.* **25b**, 1252 [1970].
- ⁷ J. G. Moffatt u. H. G. Khorana, *J. Amer. Chem. Soc.* **83**, 649 [1961].
- ⁸ A. M. Michelson, *Biochim. Biophys. Acta* **91**, 1 [1964].
- ⁹ Th. Bücher u. G. Pfeleiderer, *Methods in Enzymology*, **vol. 1**, p. 435, Acad. Press, New York 1955.
- ¹⁰ M. D. Joshi u. V. Jogannathan, *Methods in Enzymology* (ed. W. A. Wood), **vol. 9**, p. 371, Acad. Press, New York 1966.
- ¹¹ H. U. Bergmeyer, *Methoden der enzymatischen Analyse*, **Bd. 1**, p. 415, Verlag Chemie, Weinheim 1970.
- ¹² Th. Bücher, *Methods in Enzymology*, **vol. 1**, p. 415, Academic Press, New York 1955.
- ¹³ H. U. Bergmeyer, *Methoden der enzymatischen Analyse*, **Bd. 1**, p. 447, Verlag Chemie, Weinheim 1970.
- ¹⁴ A. Kornberg, *J. Biol. Chem.* **182**, 805 [1950].
- ¹⁵ H. Lineweaver u. D. Burk, *J. Amer. Chem. Soc.* **56**, 658 [1934].
- ¹⁶ C. Woenckhaus u. D. Scherr, *Z. Naturforsch.* **26b**, 106 [1971].
- ¹⁷ K. M. Plowman u. A. R. Krall, *Biochemistry* **4**, 2809 [1965].
- ¹⁸ W. J. O'Sullivan u. L. Noda, *J. Biol. Chem.* **243**, 1424 [1968].
- ¹⁹ S. Su u. P. J. Russell, *J. Biol. Chem.* **132**, 370 [1967].
- ²⁰ J. A. Secrist, J. R. Barrio, N. J. Leonard u. G. Weber, *Biochemistry* **11**, 3499 [1972].
- ²¹ E. Holler, pers. Mitteilung.
- ²² G. Beisenherz, H. J. Boltze, T. Bücher, R. Czok, K. H. Garbade, E. Meyer-Arendt u. G. Pfeleiderer, *Z. Naturforsch.* **8b**, 555 [1953].
- ²³ M. Martland u. R. Robison, *Biochem. J.* **20**, 848 [1926].
- ²⁴ E. Volkin u. W. E. Cohn, *Methods of Biochem. Analysis*, **Bd. 1**, p. 298, Interscience Publishers, New York 1957.