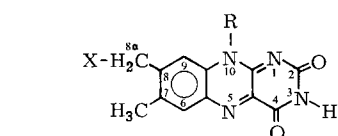


Die Synthese des Succinat-Dehydrogenase-Riboflavs

Von Sandro Ghisla, Ursula Hartmann und Peter Hemmerich^[*]

Fußend auf den Arbeiten von Singer und Kearney^[1], welche das Flavocoenzym der mitochondrialen Succinat-Dehydrogenase („SD-Flavin“)^[**] als ein kovalent an das Protein gebundenes Derivat des Flavin-adenin-dinucleotids („SD-FAD“)^[***] erkannten, haben wir in Zusammenarbeit mit der Singer-Gruppe^[***] die Aufklärung der Struktur dieses Flavocoenzyms in Angriff genommen. In einer vorläufigen Mitteilung^[2] konnten wir durch vergleichende Hyperfeinstruktur-Analyse von Elektronenspinresonanz-Spektren partiell gereinigten SD-Riboflavs (erhalten aus SD-FAD-Peptid-Gemischen durch Totalhydrolyse in 6 N HCl) zeigen, daß

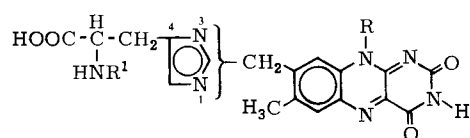
a) SD-Riboflavin reduktiv irreversibel in Riboflavin (1a) übergeführt werden kann, und daß



(1a), X = H, R = Ribityl

(1b), X = Morpholino, R = CH₃

(1c), X = Br, R = Tetraacetyl-ribityl



(2a), R = Tetraacetyl-ribityl,

R¹ = C₆H₅CO

(2b), R = Ribityl; R¹ = H

SD-Riboflavin unterscheidet sich von Riboflavin (1a) im optischen Spektrum des Neutralkörpers ($\lambda_{\max} = 445$ nm) nur geringfügig, drastisch jedoch im UV-Spektrum des oxidierten Kations (Abb. 1, λ_{\max} verschoben von 395^[2] nach 373 nm) sowie in der pH-Abhängigkeit der Fluoreszenz (Abb. 2) und, wie erwähnt, in der ESR-Hyperfeinstruktur des roten Radikalkations (Abb. 3). Auf Grund des strukturell eindeutig interpretierbaren ESR-Befundes haben wir 8 α -substitu-

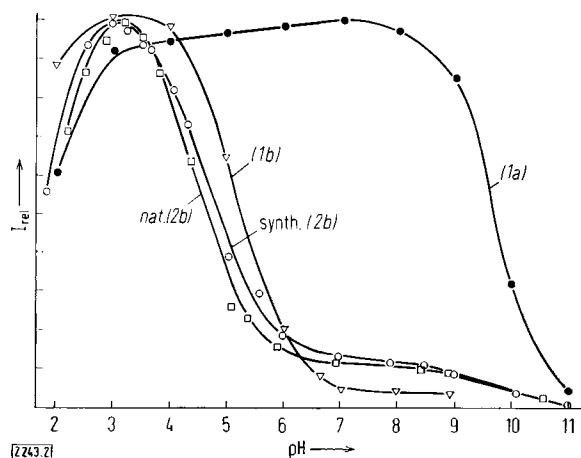


Abb. 2. Relative Fluoreszenzintensität I_{rel} in Abhängigkeit von pH-Wert ungepufferter Lösungen von nativem und synthetischem SD-Riboflavin (2b), Riboflavin (1a) und der Modellverbindung (1b).

ierte Flavinderivate^[3] synthetisiert, z. B. (1b), welche dann auch das optische^[2] und das Fluoreszenz-Verhalten fast getreu wiedergaben. Wir konnten damit voraussagen, daß die für SD-Riboflavin charakteristische Fluoreszenzlösung mit $pK = 4.4$ (Abb. 2) von einer an C-8 α gebundenen sekundären oder tertiären Stickstoff-Funktion herrühren muß. Walker und Singer^[4] ist es daraufhin gelungen, bei der reduktiven Spaltung der Flavin-X-Bindung das X-Bruchstück als *Histidin* zu identifizieren.

Die Synthese des SD-Riboflavs (2b) gelang uns jetzt auf folgendem Wege: Riboflavin (1a) wird in Pyridin/Acetanhydrid peracetyliert und danach in Dioxan mit 1.3-fachem Überschuß an Br₂ und katalytischen Mengen Dibenzoylperoxid durch 40 min. Erhitzen unter Rückfluß mit einer Ausbeute von ca. 80 % in Position 8 α monobromiert, wie aus der Intensitätsabnahme des 8-CH₃-Signals im NMR-Spektrum ($\delta = 2.45$ ppm) abzuschätzen ist.

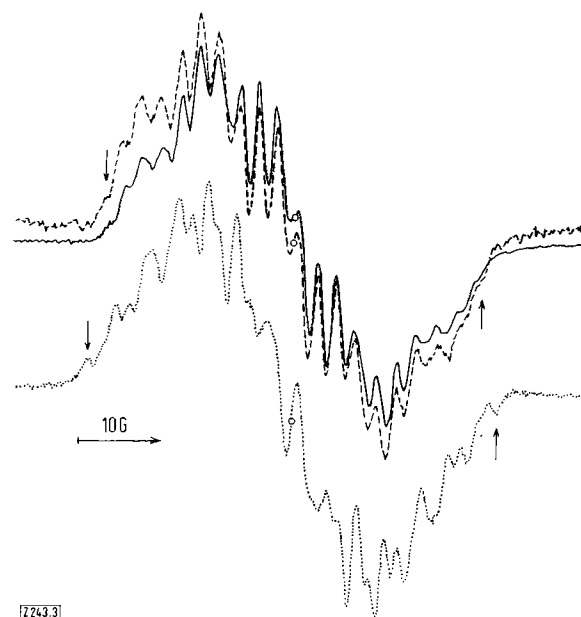


Abb. 3. Hyperfeinstruktur der Elektronenspinresonanz des SD-Riboflavosemichinon-Kations in 6 N HCl, Reduktionsmittel TiCl₃. Die Pfeile verzeichnen die jeweils äußersten Linien. Riboflavin (1a) enthält zwei ESR-aktive 8 α -Protonen mehr als SD-Riboflavin (2b), da die voluminöse Histidyl-CH₂-Gruppe in (2b) rotationsbehindert ist (im Gegensatz zur 8-CH₃-Gruppe im Riboflavin (1a)). (Als Analogie vgl. z. B. 5-Methyl- und 5-Benzyl-flavosemichinone [5].) Alle ESR-Spektren wurden bei einer Modulationsamplitude von 0.5 Gauss und einer Mikrowellenleistung von 25 mW in einer Flachzelle anaerob aufgenommen mit einem Varian-E-3-Gerät. ---: natives SD-Riboflavin, —: synthetisches SD-Riboflavin, ...: Riboflavin.

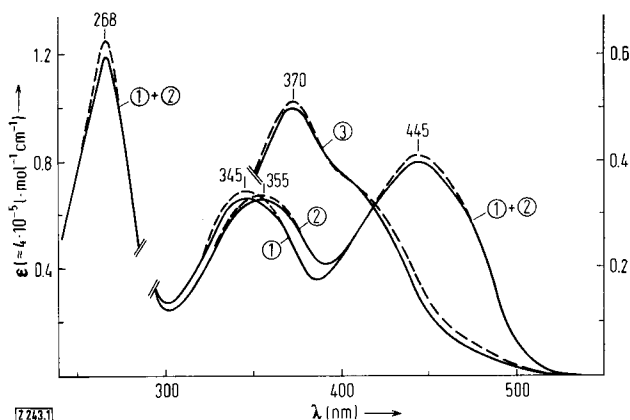


Abb. 1. Elektronenspektren von natürlichem (---) und synthetischem (—) SD-Riboflavin. ① Neutrales SD-Riboflavin, pH = 7, $\lambda_{\max} = 445, 355, 268, 221$ nm. ② Am Imidazolring protoniertes SD-Riboflavin-Monokation, pH = 3, $\lambda_{\max} = 445, 345, 268, 221$ nm. ③ Dikation, 6 N HCl, $\lambda_{\max} = 405$ (S), 373, 265, 221 nm.

Das Bromierungsprodukt (1c) zeigt neben dem 8-CH₂Br-Signal ($\delta = 4.7$ ppm) nur die schwache Andeutung eines 8-CHBr₂-Signals ($\delta = 7.0$ ppm^[6]), welches auf Anwesenheit von doppelt bromiertem Riboflavin^[6] hindeutet, wie es bei längerem Erhitzen mit höherem Br₂-Überschuß in Gegenwart von Pyridin quantitativ erhalten wird. Das Monobromid (1c) wurde dann 15 Std. in wasserfreiem Dimethylformamid ohne Basenzusatz mit 2,5-fachem Überschuß an N α -Benzoylhistidin auf 90 °C erwärmt, und das resultierende Flavingemisch wurde zwischen Chloroform und Wasser bei pH = 7 verteilt. Die wäßrige Phase enthält das geschützte 8 α -Histidylflavin (2a), welches vom Histidin-Überschuß bei pH = 3 durch Extraktion mit Chloroform abgetrennt wird (nach Sättigung der wäßrigen Phase mit Ammoniumsulfat). (2a) wird schließlich während 2 Std. unter Rückfluß in 6 N HCl zu (2b) hydrolysiert (Gesamtausbeute 35%).

Das so erhaltene 8 α -(N-Histidyl)-riboflavin (2b) ist hinsichtlich der ESR- (Abb. 3) und der optischen Spektren (Abb. 1) mit natürlichem SD-Riboflavin^[4] völlig identisch. Der pH-Wert der Fluoreszenz-Löschung (Abb. 2) liegt ein wenig anders als beim Naturprodukt, was darauf schließen läßt, daß das Syntheseprodukt ein Isomerengemisch ist, welches aus der chemischen Nichtäquivalenz der beiden Imidazolistickstoffatome herrührt. Dünnschichtchromatographisch sind Natur- und Syntheseprodukt einheitlich und identisch

auf Kieselgel. Die chromatographische Trennung der anzunehmenden Isomeren und deren Struktur-Zuordnung wird derzeit bearbeitet.

Eingegangen am 14. Juli 1970 [Z 243]

[*] Dr. S. Ghisla, U. Hartmann und
Prof. Dr. P. Hemmerich
Fachbereich Biologie der Universität
775 Konstanz, Postfach 733

[**] „Flavin“ ist ein Oberbegriff. Er umfaßt alle Spezies der Formel (1) mit beliebigen Resten R und X, jedoch R \neq H.

[***] Diese Arbeit wurde von der Deutschen Forschungsgemeinschaft unterstützt. – Voraussetzung für unsere Arbeit war die enge Kooperation mit Drs. E. B. Kearney, T. P. Singer und W. H. Walker, San Francisco, denen wir auch das authentische Vergleichsmaterial verdanken

[1] T. P. Singer, J. Hauber u. E. B. Kearney, Biochem. biophysic. Res. Commun. 9, 146 (1962); E. B. Kearney, J. biol. Chemistry 253, 865 (1960).

[2] P. Hemmerich, A. Ehrenberg, W. H. Walker, L. E. G. Eriksson, J. Salach, P. Bader u. T. Singer, FEBS-Letters 3, 37 (1969).

[3] S. Ghisla u. P. Hemmerich, noch unveröffentlicht.

[4] W. H. Walker u. T. P. Singer, J. biol. Chemistry, im Druck.

[5] F. Müller, P. Hemmerich, A. Ehrenberg, G. Palmer u. V. Massey, Europ. J. Biochem. 14, 185 (1970).

[6] D. B. McCormick, J. heterocyclic Chem. 7, 447 (1970).

VERSAMMLUNGSBERICHTE

Pulsradiolyse zur Aufklärung des Mechanismus komplexer Reaktionen der organischen und anorganischen Chemie

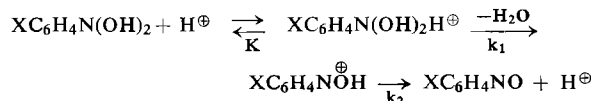
Von Arnim Henglein[*]

Durch einen Mikrosekundenpuls energiereicher Strahlung lassen sich in einer wäßrigen Lösung freie OH-Radikale und hydratisierte Elektronen in bekannter Konzentration erzeugen. Die Reaktionen dieser Teilchen mit gelösten organischen und anorganischen Substanzen werden anschließend verfolgt, indem man die optische Absorption und elektrische Leitfähigkeit als Funktion der Zeit durch elektronische Methoden registriert. Einige typische Beispiele werden nachstehend beschrieben.

Hydrate aromatischer Nitroverbindungen: Diese Verbindungen waren noch nicht bekannt. Sie werden gebildet, wenn eine Nitroverbindung durch das hydratisierte Elektron reduziert wird; das hierbei entstehende Anion nimmt in saurer Lösung ein Proton auf und disproportioniert:



Die Spektren der Hydrate wurden in einigen Fällen gemessen. Die Hydrate spalten Wasser ab, wozu sie je nach der Natur des Substituenten X und des pH-Wertes der Lösung zwischen 10⁻² und 10⁻⁴ s benötigen. Die Dehydratation ist eine Zweistufenreaktion:

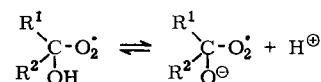


($k_2 \gg k_1$). Zwischen der Dissoziationskonstanten und der Hammett-Konstanten des Substituenten X besteht die Beziehung

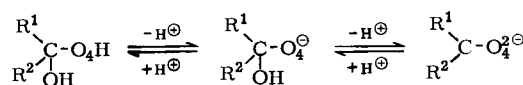
$$\log K/K_0 = 2.3 \cdot \sigma \quad (K_0 \text{ gilt für } X = \text{H})$$

Geladene Zwischenprodukte der Autoxidation: Bei der Oxidation zahlreicher organischer Substanzen in wäßriger Lösung

(Alkohole, Äther, Olefine) in Gegenwart von Sauerstoff werden intermediär Säuren gebildet, die sich durch ihre Leitfähigkeit nachweisen lassen. α -Hydroxy-peroxy-Radikale dissoziieren gemäß



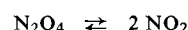
Die Spektren der sauren und basischen Form wurden aufgenommen. Der pK-Wert beträgt 7.1 für das Radikal aus Methanol, 8.3 für das aus Äthanol und 8.5 für das aus Isopropanol. Aus zwei Hydroxy-peroxy-Radikalen entsteht eine zweibasige Säure, die nach erster Ordnung verschwindet. Die Ergebnisse lassen sich quantitativ verstehen, wenn man dieser Säure die Struktur eines Hydroxy-hydrotetroxids zuschreibt:



Der erste pK-Wert beträgt 4.5, der zweite 8 (für R¹ = R² = CH₃). Der Zerfall wird auf die Abspaltung von O₂ zurückgeführt.

Instabile Stickstoffoxide und -säuren: Kurzlebige Verbindungen des Stickstoffs in abnormalen Valenzzuständen erhält man durch Einwirkung des OH-Radikals und des hydratisierten Elektrons auf gelöste Nitrat- und Nitriten sowie Stickstoffmonoxid. Die Absorptionsspektren dieser instabilen Verbindungen und die Geschwindigkeitskonstanten ihrer Reaktionen wurden bestimmt.

H₂NO₃, HNO₃[⊖] und NO₃^{2⊖} bzw. H₂NO₂, HNO₂[⊖] und NO₂^{2⊖} stehen jeweils im protolytischen Gleichgewicht. Alle pK-Werte wurden bestimmt und der Zerfall dieser Teilchen unter Erzeugung von NO₂ bzw. NO untersucht. Ferner ließen sich die Konstanten der Gleichgewichte



und

