

This article was downloaded by:

On: 27 January 2011

Access details: *Access Details: Free Access*

Publisher *Taylor & Francis*

Informa Ltd Registered in England and Wales Registered Number: 1072954 Registered office: Mortimer House, 37-41 Mortimer Street, London W1T 3JH, UK



## Nucleosides, Nucleotides and Nucleic Acids

Publication details, including instructions for authors and subscription information:

<http://www.informaworld.com/smpp/title~content=t713597286>

## Pseudo-ADP: Darstellung und Biomimetische Eigenschaften

Martina Kinzig<sup>a</sup>; Karl-Siegfried Boos<sup>a</sup>

<sup>a</sup> Laboratory for Biological Chemistry University of Paderborn, Paderborn Federal Republic of Germany

**To cite this Article** Kinzig, Martina and Boos, Karl-Siegfried(1990) 'Pseudo-ADP: Darstellung und Biomimetische Eigenschaften', *Nucleosides, Nucleotides and Nucleic Acids*, 9: 4, 489 — 497

**To link to this Article:** DOI: 10.1080/07328319008045182

**URL:** <http://dx.doi.org/10.1080/07328319008045182>

PLEASE SCROLL DOWN FOR ARTICLE

Full terms and conditions of use: <http://www.informaworld.com/terms-and-conditions-of-access.pdf>

This article may be used for research, teaching and private study purposes. Any substantial or systematic reproduction, re-distribution, re-selling, loan or sub-licensing, systematic supply or distribution in any form to anyone is expressly forbidden.

The publisher does not give any warranty express or implied or make any representation that the contents will be complete or accurate or up to date. The accuracy of any instructions, formulae and drug doses should be independently verified with primary sources. The publisher shall not be liable for any loss, actions, claims, proceedings, demand or costs or damages whatsoever or howsoever caused arising directly or indirectly in connection with or arising out of the use of this material.

PSEUDO-ADP: DARSTELLUNG UND BIOMIMETISCHE EIGENSCHAFTEN

Martina Kinzig und Karl-Siegfried Boos\*

Laboratory for Biological Chemistry  
University of Paderborn  
P.O.Box 1621  
D-4790 Paderborn  
Federal Republic of Germany

**Abstract:** By the preparation of (3) via an amide bond like linkage of the diarylmonoazo dye (1a) with adenosine-5'-uronic acid (2) we succeeded, for the first time, in the substitution of the pyrophosphate chain of adenosine-5'-diphosphate with a bioanalogous, synthetic structural element. The biomimetic properties of (3) are demonstrated by its binding and transport properties with respect to the highly ADP-specific mitochondrial adenine-nucleotide carrier using the phenol- $[u-^{14}C]$  labeled compound of (3), which was prepared additionally in a microsynthesis.

Die molekulare Erkennung der Liganden von Nucleotid-Bindungscentren an Enzymen oder Rezeptoren kann erfolgreich mit Hilfe von Substratanaloga<sup>1,2</sup> oder Pseudosubstraten<sup>3-5</sup> untersucht werden. So konnte aus derartigen Struktur-Wirkungsstudien an einem --für Adenosin-5'-diphosphat (ADP) hochspezifischen-- Modellrezeptor, dem in der inneren Mitochondrienmembran integrierten Adennucleotid-Carrier<sup>6-8</sup>, das multilaterale Erkennungsraaster für den Liganden sowie die jeweils komplementären Determinanten am Bindungscentrum abgeleitet<sup>9-11</sup> und mit Hilfe eines minimal-strukturierten ADP-Analogen experimentell bestätigt werden<sup>12</sup>. Analoge Studien mit einer homologen Reihe von metallkomplexierenden Diarylmonoazofarbstoffen ergaben<sup>4</sup>, daß sich die Verbindung 1-(2'-Hydroxyphenylazo)-2-hydroxy-4-naphthalinsulfonsäure (1c) bioisoster zur 5'-Diphosphatkette des natürlichen Liganden verhält. Dieser Farbstoff hemmt das Transportsystem kompetitiv über eine chelatbildende Wechselwirkung der 2,2'-ständigen Hydroxygruppen mit einem am Bindungscentrum

postulierten zweiwertigen Metallion<sup>13</sup> sowie über eine ionische Wechselwirkung der Sulfonsäuregruppe mit einem für die spezifische Bindung essentiellen Arginin- oder Lysinrest. Über die Substitution des 5'-Diphosphatrestes des natürlichen Liganden durch das biomimetische Strukturelement 1-(2'-Hydroxy-phenylazo)-2-hydroxy-4-naphthalinsulfonsäure (1c) sollte daher ein semisynthetisches ADP-Analogon (3) zugänglich sein, das sich bioanalog zu ADP verhält und folglich als pseudo-ADP bezeichnet werden kann.

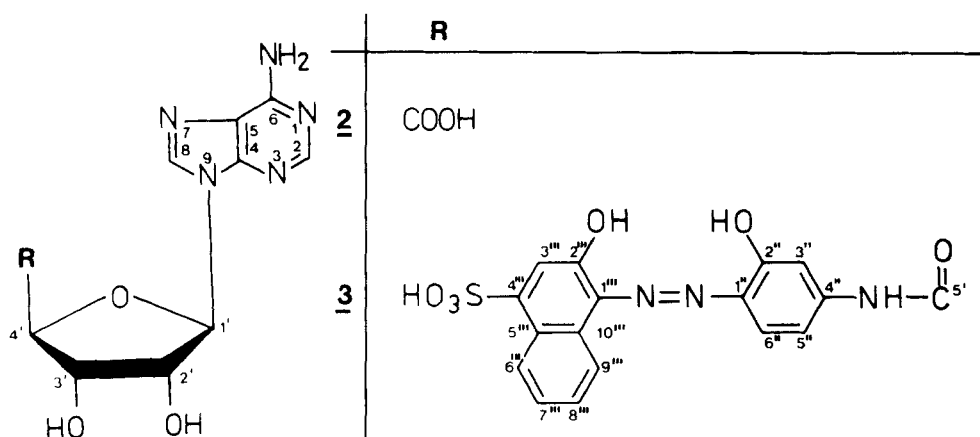
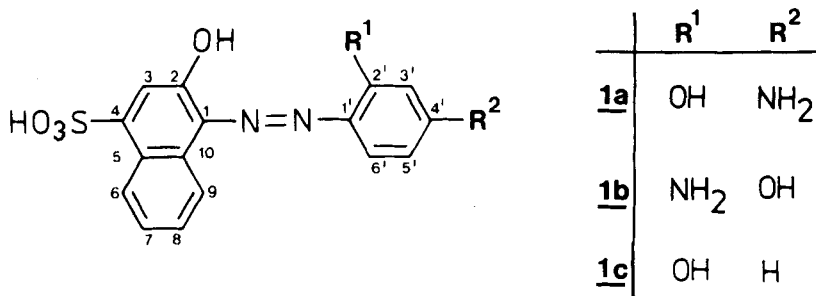
Ausgehend von der nach Lit.<sup>14</sup> hergestellten 5'-Uronsäure des Adenosins (2) gelang es uns (3) über eine säureamidartige Verknüpfung mit dem entsprechenden Diarylmonoazofarbstoff (1a) in guter Ausbeute darzustellen. Die zur Azobrücke para-ständige Aminogruppe in (1a) beeinflusst das kompetitive Inhibitionsverhalten dieses Azofarbstoffes gegenüber dem Modellrezeptor nicht. Darüber hinaus bietet diese Funktionalisierung den Vorteil, daß sich (1a) anschließend leicht mit (2) kondensieren läßt und 3-Aminophenol als benötigte Kopplungskomponente in [u-<sup>14</sup>C]-isotopenmarkierter Form im Handel (Fa. Amersham Buchler, Braunschweig) erhältlich ist.

Durch Verwendung von eisgekühltem DMF als Reaktionsmedium für die Azokupplung konnte das im wässrigen Milieu beobachtete vielfältige Nebenproduktspektrum erheblich vermindert werden. Die bei der Reaktion anfallenden Konstitutionsisomere (1a) und (1b) konnten mit Hilfe der semipräparativen HPLC aufgetrennt und <sup>13</sup>C-NMR-spektroskopisch zugeordnet werden. Die Zuordnung erfolgt aufgrund der chemischen Verschiebungen der Kohlenstoffatome C-4' ((1a):  $\delta$  = 156.34, (1b):  $\delta$  = 162.98) und C-2' ((1a):  $\delta$  = 154.39, (1b):  $\delta$  = 146.41), die auf den Elektronegativitätsunterschieden der funktionellen Gruppen beruhen.

Versuche, (1a) mit (2) säureamidartig nach Aktivierung der Carboxylgruppe mit Dicyclohexylcarbodiimid (DCC) in Gegenwart von 1-Hydroxybenzotriazolen<sup>15</sup> oder nach Überführung in den entsprechenden N-Hydroxysuccinimidester<sup>16</sup> zu verknüpfen, lieferten nur geringe Ausbeuten an (3). Dagegen verlief die Kondensation zufriedenstellend nach Aktivierung der Adenosin-5'-uronsäure (2) mit N-Ethoxycarbonyl-2-ethoxy-1,2-dihydrochinolin (EEDQ) zum entsprechenden gemischten Carbonsäureanhydrid<sup>17</sup>. Die

in Lit.<sup>17</sup> für Oligopeptid-Synthesen beschriebenen Reaktionsmedien wie Benzol, Ethanol, THF und deren Mischungen führten jedoch zu keinem Umsatz. Schließlich erwiesen sich DMF und eine Reaktionstemperatur von 60°C als erfolgreich. Das Auftreten eines Signals bei  $\delta = 10.80$  das dem Amidproton zuzuordnen ist, und das Fehlen des Signals der Aminogruppe von (1a) bei  $\delta = 6.3$  im  $^1\text{H}$ -NMR-Spektrum von (3) beweist die erfolgreiche Kondensation zum Säureamid.

Aufgrund ihrer hohen Bindungsaffinität zu gängigen stationären Phasen gelang es nicht, die Produkte (1a), (1b) und (3) an Kieselgel, Cellulose oder Polymerträgern zu reinigen und zu isolieren. Als Trennsystem der Wahl stellte sich jedoch die Ionenpaarchromatographie an einer C-18-Umkehrphase heraus. Als Ionenpaarbildner wählten wir Triethylammoniumhydrogencarbonat, dessen Überschuß sich leicht mit Methanol durch mehrmaliges Eindampfen im Vakuum aus der Produktfraktion entfernen läßt.



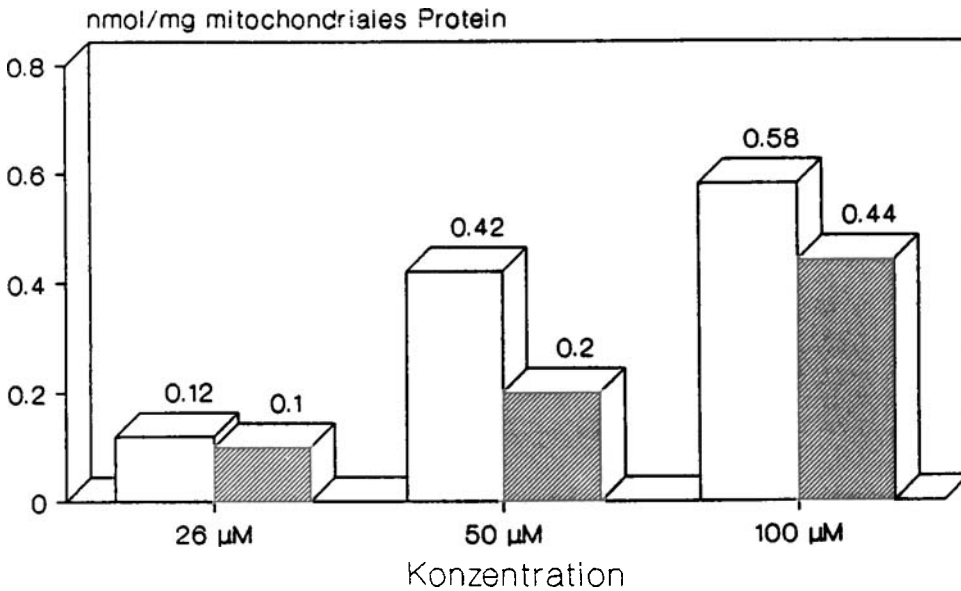




Abb.1 Konzentrationsabhängigkeit der spezifischen, in vitro Bindung von  $[u\text{-}^{14}\text{C}]$ -pseudo-ADP ((3), ) und  $^{14}\text{C}$ -ADP ) an dem mitochondrialen Adeninnucleotid-Carrier. Inkubationszeit: 5 min. Inkubationsbedingungen<sup>9,10</sup>.

Die Untersuchung des Bindungs- und Transportverhaltens von Phenol- $[u\text{-}^{14}\text{C}]$  markiertem (3) gegenüber dem für ADP hochspezifischen mitochondrialen Adeninnucleotid-Carrier aus Rattenleber wurde wie in Lit.<sup>9,10</sup> beschrieben durchgeführt. Wie die Balkendiagramme in Abb.1 zeigen, wird (3) spezifisch an das cytosolseitig orientierte ADP-Bindungszentrum des Transportproteins gebunden und zeitabhängig (Abb.2) über die innere Mitochondrienmembran transportiert. Diese Ergebnisse beweisen, daß es mit der Darstellung von (3) erstmalig gelungen ist, die 5'-Diphosphatkette des ADP durch ein bioanaloges, synthetisches Strukturelement zu ersetzen.

Die gegenüber dem natürlichen Liganden um den Faktor 10 reduzierte Transportrate von (3) läßt sich mit dem -in Lit.<sup>13</sup> für die matrixseitige Freisetzung von ADP postulierten- geschwindigkeitsbestimmenden Protonierungsschritt der nicht koordinativ wirksamen Hydroxyfunktion der terminalen Phosphatgruppe erklären. Diese Protonierung führt beim natürlichen Liganden zu einer Erniedrigung der Metall-ADP-Komplexstabilität um

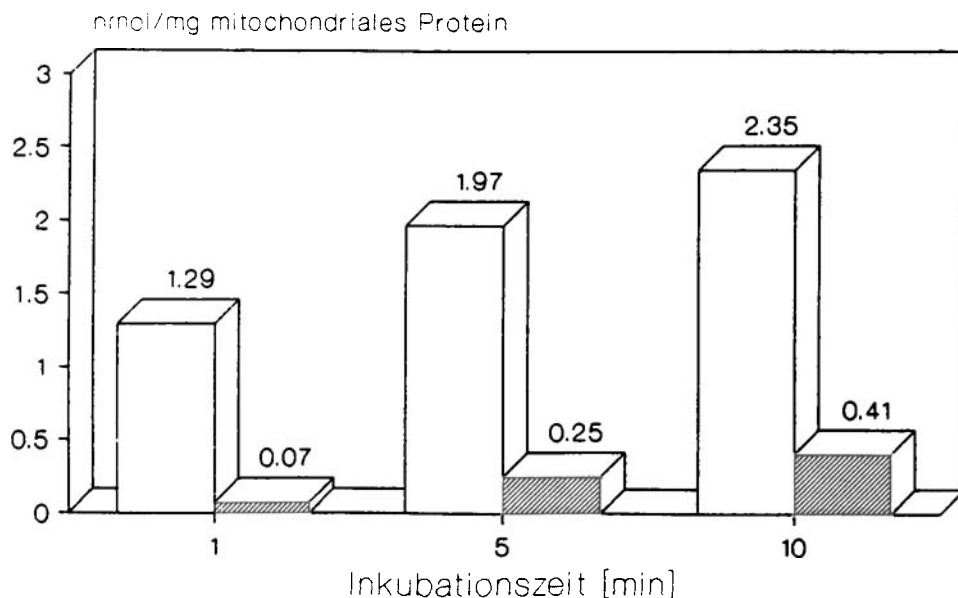


Abb.2 Zeitabhängigkeit des in vitro Transportes von [u-<sup>14</sup>C]-pseudo-ADP ((3), ▨, 100 M) und <sup>14</sup>C-ADP (□, 100 M) durch den mitochondrialen Adeninnucleotid-Carrier. Inkubationsbedingungen 9,10.

den Faktor 30 und somit zur Freisetzung des Transportsubstrates in den mitochondrialen Matrixraum. Im pseudo-ADP (3) hingegen kann die bioisostere Sulfonsäuregruppe unter physiologischen pH-Bedingungen weder protoniert vorliegen, noch besitzt sie einen Einfluß auf die Metallkomplex-Stabilität.

#### EXPERIMENTELLER TEIL

VIS/UV-Spektren: Shimadzu VIS/UV-200-Spektrometer. Extinktionskoeffizienten: Zeiss PMQ 3. <sup>1</sup>H-NMR- und <sup>13</sup>C-NMR-Spektren: Bruker WP 250 F8; in δ-Werten relativ zu Tetramethylsilan (TMS). Die Zahl der Protonen wurde durch "Off-resonance"-Entkopplung ermittelt. Massenspektren: (1a) Varian-MAT 331 A-Spektrometer und (3) Finnigan MAT 90 (FAB-Gun: Firma Ion-Tech, Plasmagas: Xenon). Schmelzpunkte (nicht korrigiert): SMP 20 Schmelzpunktgerät (Büchi, Schweiz). Elementaranalysen: Mikroanalytisches Labor Beller, Göttingen. Flüssigszintillationszähler: Tricarb 544

(Packard Instruments).  $pK_a$ -Wert-Bestimmung: Digital-pH-Meter E 632 (Metrohm, Schweiz). Hochdruckflüssigkeitschromatographie (HPLC): -semi-präparative HPLC: LiChrosorb-RP-18-Säule,  $7\ \mu\text{m}$ ,  $18 \times 1.0\ \text{cm}$  (Fa. Merck, Darmstadt), Fließmittel: 0.1 M Triethylammoniumhydrogencarbonat/Methanol (1:1 v,v) mit 2 ml/min; -analytische HPLC: LiChrosorb-RP-18-Säule,  $7\ \mu\text{m}$ ,  $25 \times 0.4\ \text{cm}$  (Fa. Merck, Darmstadt), Fließmittel: 0.1 M Triethylammoniumhydrogencarbonat/Methanol (1:1 v,v) mit 1 ml/min, Detektion: UV 260nm.

1-(4'-Amino-2'-hydroxy-phenylazo)-2-hydroxy-4-naphthalinsulfonsäure (1a) und 1-(2'-Amino-4'-hydroxy-phenylazo)-2-hydroxy-4-naphthalinsulfonsäure (1b): Zu 4 ml 1 N Natriumhydroxid werden bei  $4^\circ\text{C}$  0.2 g (1.84 mmol) 3-Aminophenol in 20 ml DMF und 0.44 g (1.81 mmol) 4-Sulfo-1-diazonium-2-naphtholnatriumsalz in 20 ml DMF gegeben. Nach Beendigung der Reaktion (15 min) wird das Reaktionsmedium im Rotationsverdampfer unter Hochvakuum entfernt. Unter semipräparativen HPLC-Bedingungen läßt sich das para- und ortho-Produkt (1a bzw. 1b) direkt mit 99proz. Reinheit erhalten. Ausbeute: 0.528 g (80%) (1a) und 0.054 g (8.5%) (1b). Schmp. (1a, 1b)  $250^\circ\text{C}$  (Zers.); VIS/UV ( $\text{H}_2\text{O}$ ): von (1a):  $\lambda_{\text{max}} = 500\ \text{nm}$  ( $\epsilon = 22.609\ \text{cm}^2 \times \mu\text{mol}^{-1}$ ) und  $255\ \text{nm}$  ( $\epsilon = 11.047\ \text{cm}^2 \times \mu\text{mol}^{-1}$ ), von (1b):  $\lambda_{\text{max}} = 493\ \text{nm}$  ( $\epsilon = 12.457\ \text{cm}^2 \times \mu\text{mol}^{-1}$ ) und  $294\ \text{nm}$  ( $\epsilon = 5.3\ \text{cm}^2 \times \mu\text{mol}^{-1}$ );  $^1\text{H-NMR}$  ( $[\text{D}_6]$ -DMSO) von (1a):  $\delta = 15.19$  (s, 1H,  $\text{HSO}_3$ ), 8.73 (d, 1H, 6-H,  $J_{6,7} = 8.3\ \text{Hz}$ ), 8.63 (d, 1H, 9-H,  $J_{a\alpha} = 8.4\ \text{Hz}$ ), 7.76 (d, 1H, 6'-H,  $J_{6',5'} = 8.8\ \text{Hz}$ ), 7.6-7.3 (m, 5H, 3-H, 7-H, 8-H, OH), 6.3-6.2 (m, 3H, 5'-H,  $\text{NH}_2$ ,  $J_{5',6'} = 9.0\ \text{Hz}$ ), 6.22 (s, 1H, 3'-H);  $^{13}\text{C-NMR}$  ( $[\text{D}_6]$ -DMSO) von (1a):  $\delta = 156.34$  (s, C-4'), 154.39 (s, C-2'), 151.18 (s, C-2), 147.00 (s, C-4), 131.80 (s, C-1), 128.87 (s, C-10), 127.92 (m, C-1', C-6'), 126.69 (d, C-9), 123.95 (s, C-5), 123.28 (d, C-6), 120.84 (m, C-7, C-8), 118.88 (d, C-5'), 108.17 (d, C-3), 99.14 (d, C-3');  $^{13}\text{C-NMR}$  ( $[\text{D}_6]$ -DMSO) von (1b):  $\delta = 161.56$  (C-4'), 148.69 (C-4), 146.98 (C-2'), 145.74 (C-2), 131.63 (C-1), 128.97 (C-1'), 128.84 (C-6'), 128.02 (C-10), 126.96 (C-6), 124.17 (C-5), 123.37 (C-9), 121.32 (C-7), 120.67 (C-8), 118.34 (C-3), 107.20 (C-5'), 101.07 (C-3'); MS (ES):  $m/e = 109$  (Aminophenol), 93 ( $\text{C}_6\text{H}_5\text{O}^+$ ,  $\text{C}_6\text{H}_5\text{N}^{+\bullet}$ ), 81 ( $\text{HSO}_3$ ), 79 ( $\text{C}_6\text{H}_7^+$ ), 77 (Phenylradikal), 28 ( $\text{N}_2^+$ ), 17 ( $\text{OH}^+$ ), 16 ( $\text{NH}_2^+$ );  $pK_a$ -Wert von (1a):  $pK_{a1} = 4.95$  (4'- $\text{NH}_2$ ),  $pK_{a2} = 8.95$  (2'-OH),  $pK_{a3} = 10.26$  (2-OH).

Elementaranalyse:  $C_{16}H_{12}N_3O_5S \times 0.2 (C_2H_5)_3NH^+$  (378.76)

Ber.: C 54.54 H 4.04 N 11.83 S 8.47

Gef.: C 54.62 H 4.10 N 11.08 S 8.50

4''-N-[(2''-Hydroxy-phenylazo)-2'''-hydroxy-naphthalin-4'''-sulfon-säure]-adenosin-5'-uronsäureamid (3): 0.1 g (0.356 mmol) Adenosin-5'-uronsäure (2), 0.06 g (0.167 mmol) Diarylmonoazofarbstoff (1a) und 0.1 g (0.4 mmol) EEDQ werden in 50 ml DMF bei 60°C über einen Zeitraum von 3 Tagen gerührt. Der Reaktionsansatz wird am Hochvakuum eingedampft. Die sich anschließende direkte Isolierung von (3) erfolgt unter semipräparativen HPLC-Bedingungen. Ausbeute: 0.071 g (69%). Schmp.

214°C (Zers); VIS/UV ( $H_2O$ ):  $\lambda_{max} = 550 \text{ nm}$  ( $\epsilon = 13.892 \text{ cm}^2 \times \mu\text{mol}^{-1}$ ) und  $260 \text{ nm}$  ( $\epsilon = 18.482 \text{ cm}^2 \times \mu\text{mol}^{-1}$ );  $^1H$ -NMR ( $[D_6]$ -DMSO):  $\delta = 16.03$  (s, 1H,  $HSO_3$ ), 10.80 (s, 1H, Amid-NH), 8.7-8.6 (m, 3H, 6'''-H, 8-H, 9'''-H,  $J_{6''',7'''} = 8.8 \text{ Hz}$ ,  $J_{9''',8'''} = 8.3 \text{ Hz}$ ), 8.2-8.1 (m, 2H, 6''-H, 5''-H,  $J_{6'',5''} = 9.0 \text{ Hz}$ ,  $J_{5'',6''} = 9.0 \text{ Hz}$ ), 7.96 (s, 1H, 2-H), 7.7-7.34 (m, 6H, 7'''-H, 8'''-H, 3'''-H, 3''-H, OH,  $J_{7''',6'''} = 8.3 \text{ Hz}$ ,  $J_{8''',9'''} = 8.3 \text{ Hz}$ ), 7.30 (s, 2H,  $NH_2$ ), 6.06 (d, 1H, 1'-H,  $J_{1',2'} = 7.0 \text{ Hz}$ ), 5.9-5.6 (m, 2-H, Ribose-OH), 4.7-4.3 (m, 3H, 4'-H, 3'-H, 2'-H,  $J_{4',3'} = 4.7 \text{ Hz}$ ,  $J_{3',4'} = 4.7 \text{ Hz}$ ,  $J_{2',1'} = 7.1 \text{ Hz}$ ); MS (ES):  $m/e = 621$ ;  $pK_a$ -Wert:  $pK_{a1} = 6.8$  ( $NH_2$ ),  $pK_{a2} = 9.35$  (2'''-OH),  $pK_{a3} = 10.36$  (2''-OH).

Elementaranalyse:  $C_{26}H_{21}N_8O_9S \times (C_2H_5)_3NH^+ \times 1.5 H_2O$  (759.77)

Ber.: C 51.19 H 5.37 N 16.79 S 4.27

Gef.: C 51.14 H 5.33 N 16.37 S 4.14

Mikrosynthese von (1a), (1b) und (3): Die mikrosynthetische Darstellung von Phenol- $[u-^{14}C]$  markiertem (3) gelang in analoger Weise, wobei zunächst für die Azokupplung 18.40  $\mu\text{mol}$  3-Amino- $[u-^{14}C]$ -phenol (spezifische Aktivität:  $16 \times 10^9 \text{ cpm/mmol}$ ) sowie 18.1  $\mu\text{mol}$  4-Sulfo-1-diazonium-2-naphtholatnatriumsalz eingesetzt wurden. Die Reaktionslösung (0.4 ml DMF und 0.03 ml 1 N Natriumhydroxyd) wurde im Hochvakuum zur Trockne ein-



geengt, mit 0.4 ml 0.1 M Triethylammoniumhydrogencarbonat/Methanol (1:1) aufgenommen und nach 0.08 ml Injektionen unter analytischen HPLC-Bedingungen mit Ausbeuten von 62% an (1a) ( $R_t = 11.60$  min) und 22% an (1b) ( $R_t = 6.81$  min) aufgereinigt. Die Kondensationsreaktion von 11  $\mu\text{mol}$  Phenol- $[\text{u-}^{14}\text{C}]$  markiertem (1a) mit 28  $\mu\text{mol}$  (2) in Gegenwart von 32  $\mu\text{mol}$  EEDQ lieferte nach Aufreinigung mit Hilfe der analytischen HPLC Phenol- $[\text{u-}^{14}\text{C}]$  markiertes (3) ( $R_t = 19.64$  min) in 34% Ausbeute.

Frau R. Wissmann (Universität-GH-Paderborn) danken wir für die Aufnahme der NMR-, Frau W. Lenhart (Institut für Spektrochemie und angewandte Spektroskopie, Dortmund) und Herrn E. Jonk (Universität-GH-Paderborn) für die der Massenspektren sowie dem Minister für Wissenschaft und Forschung, Nordrhein-Westfalen, für finanzielle Unterstützung.

#### LITERATUR

1. R. G. Yount, Adv.Enzymol.Relat.Areas.Mol.Biol., (1975), 43, 1.
2. K. H. Scheit, Nucleotide Analogs, John Wiley & Sons, New York 1980.
3. K.-S. Boos, E. Schlimme, FEBS Lett., (1981), 127, 40.
4. K.-S. Boos, Biochim.Biophys.Acta, (1982), 693, 68.
5. K.-S. Boos, B. Wilmers, U. Juhl, E. Schlimme, Lebensmittelchem.Ge-richtl.Chem., (1986), 40, 54.
6. M. Klingenberg in The Enzymes of Biological Membranes (A. N. Martonosi, Ed.), vol. 3, p. 383, Plenum, New York 1980.
7. P. V. Vignais, Biochim.Biophys.Acta, (1976), 456, 1.
8. P. V. Vignais, M. R. Block, F. Boulay, G. Brandolin, G. J. M. Lauquin in Structur and Properties of Cell Membranes (G. Benga, Ed.), vol. 2, p. 139, CRC Press Inc., Boca Raton (1985).
9. E. Schlimme, K.-S. Boos, E. J. de Groot, Biochemistry, (1980), 19, 5569.
10. K.-S. Boos, E. Schlimme, Biochemistry, (1979), 18, 5304.
11. P. V. Vignais, J. Lunardi, Ann.Rev.Biochem., (1985), 54, 977.
12. E. Schlimme, K.-S. Boos, H. Renz, Biol.Chem.Hoppe-Seyler, (1988), 369, 1105.

13. K.-S. Boos, E. Schlimme, FEBS Lett., (1983), 160, 68.
14. R. Schmidt, U. Scholz & D. Schwille, Chem.Ber., (1968), 101, 590.
15. G. W. Anderson, J. E. Zimmermann & F. M. Callahan, J.Am.Chem.Soc., (1964), 86, 1839.
16. W. König & R. Geiger, Chem.Ber., (1970), 103, 788.
17. B. Belleau, G. Malek, J.Am.Chem.Soc., (1968), 90, 1651.

**Received June 19, 1989.**