# Neue Beweise über die Wechselwirkung des Vanadyl(IV)-Kations mit Nucleotiden: $^{31}$P-NMR- und IR-Messungen in Lösung

New Evidence of the Interaction of the Vanadyl(IV) Cation with Nucleotides: $^{31}$P NMR and IR Measurements in Solution

S. B. Etcheverry, E. G. Ferrer und E. J. Baran*

Facultad de Ciencias Exactas, Universidad Nacional de La Plata, 1900 La Plata, Argentinien

Z. Naturforsch. **44b**, 1355–1358 (1989); eingegangen am 3. Juli 1989

Vanadyl(IV), Nucleotide Complexes, $^{31}$P NMR Spectra, IR Spectra

The interaction between the $VO^{2+}$ cation and a number of nucleotides has been investigated by means of $^{31}$P NMR and IR measurements in solutions. The results support and extend previous conclusions obtained from electronic spectra and confirm the central role of the phosphate groups of the nucleotides in this process. Preliminary results obtained from IR spectra of some solid vanadyl/nucleotide compounds suggest a greater complexity of the metal-to ligand interaction in the solid state.

Wir haben vor kurzem die Wechselwirkung des Vanadyl(IV)-Kations mit Nucleotiden# in wässeriger Lösung, mittels Elektronenabsorptionsspektren, untersucht [1]. Dabei wurde festgestellt, daß $VO^{2+}$ bevorzugt mit den Phosphatresten der Nucleotide in Bindung eingeht.

Um weitere Einsicht in dieses Problem zu bekommen, welches große Bedeutung für die Biochemie des Vanadins besitzt [1–4], haben wir jetzt diese früheren Untersuchungen mittels $^{31}$P-NMR- und IR-Messungen in Lösung ergänzt. In einigen Fällen gelang es auch, Vanadyl/Nucleotid-Komplexe als Festkörper auszufällen und ihre IR-Spektren zu untersuchen. Auch über diese Ergebnisse wird kurz berichtet.

## Ergebnisse und Diskussion

### *1. $^{31}$P-NMR-Messungen*

Diese Methode erscheint als besonders geeignet, um weiteren Einblick in die Vanadyl(IV)-Phosphat-Wechselwirkungen zu bekommen. Solche Messungen wurden bereits früher schon öfters bei anderen Metall/Nucleotid-Systemen mit Erfolg angewandt (vgl. z. B. [5–10]).

Es ist gut bekannt, daß bei Triphosphatnucleotiden, wie z. B. ATP, die drei Phosphorsignale in der Reihenfolge $P_\gamma$, $P_\alpha$, $P_\beta$ nach höheren Feldern, bezogen auf dem $H_3PO_4$-Standard, auftreten [5]. Bei genügend hoher Auflösung und bedingt durch die P/P-Kopplungen erscheinen die $P_\alpha$- und $P_\gamma$-Signale als Dubletts, während $P_\beta$ als Triplett auftritt.

Andererseits verbreitern paramagnetische Ionen die NMR-Linien der Kerne von komplexbildenden Gruppen, mit denen sie in Wechselwirkung treten. Diese Verbreiterung wird durch zwei Effekte verursacht, einerseits durch Änderung der Relaxationszeiten des magnetisch-aktiven Kerns durch das magnetische Feld des Ions, und andererseits durch Ligandenaustausch zwischen dem komplexierten Ion und der Lösung.

Da aus den früher analysierten Elektronabsorptionsspektren bereits deutlich war, daß sich alle Triphosphat-, Diphosphat- und Monophosphat-Nucleotide unter sich ganz ähnlich verhalten, haben wir jetzt nur Messungen mit jeweils einem Vertreter einer jeden Reihe unternommen; ATP, ADP und AMP. Dazu haben wir auch noch Messungen mit GMP durchgeführt, da dessen Elektronenabsorptionsspektrum [1] ein etwas abweichendes Verhalten bewiesen hat.

In allen untersuchten Fällen zeigten die $^{31}$P-NMR-Messungen deutliche Linienverbreiterungen und geringe Hochfeldverschiebungen aller Resonanzsignale. Als typisches Beispiel für diese Messungen zeigt Abb. 1 die Spektren des freien ADP sowie dasjenige

* Sonderdruckanforderungen an Prof. Dr. E. J. Baran.

# *Abkürzungen:* AMP: Adenosin-5′-monophosphat; ADP: Adenosin-5′-diphosphat; ATP: Adenosin-5′-triphosphat; CDP: Cytidin-5′-diphosphat; CTP: Cytidin-5′-triphosphat; GMP: Guanosin-5′-monophosphat; ITP: Inosin-5′-triphosphat; UMP: Uridin-5′-monophosphat; UDP: Uridin-5′-diphosphat; UTP- Uridin-5′-triphosphat.

Verlag der Zeitschrift für Naturforschung, D-7400 Tübingen
0932–0776/89/1100–1355/$ 01.00/0

des gleichen Nucelotids in Anwesenheit des $VO^{2+}$-Kations.

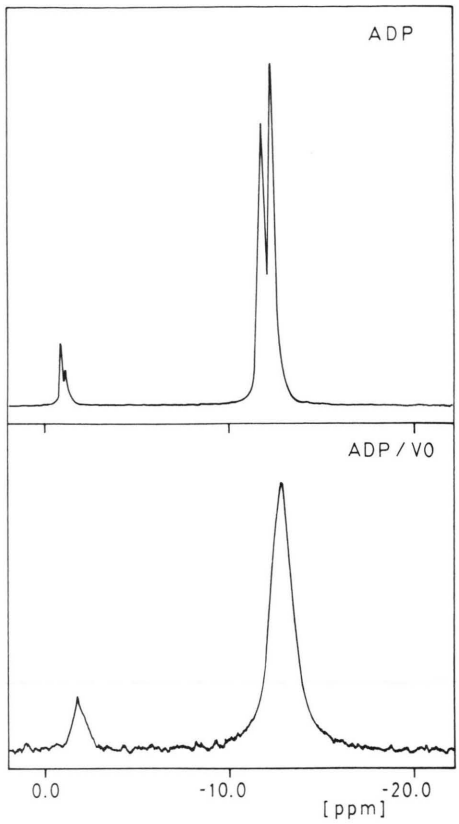


Abb. 1. $^{31}$P-NMR-Spektren von ADP (0,12 M, pH = 4,5) und nach Zugabe von 0,0011 M $VOSO_4$ (pH = 4,0).

Die Ergebnisse der Messungen sind in Tab. I zusammengefaßt. Hieraus kann man sofort erkennen, daß bei allen Nucleotiden alle jeweils vorhandenen Phosphat-Gruppen vom Kation beansprucht werden. Im Falle des ATP stehen vorliegende Ergebnisse im Gegensatz zu einer früheren Untersuchung [11], bei welcher nur Wechselwirkungen mit den $P_\gamma$- und $P_\beta$-Gruppen festgestellt wurden. Auch mit Mg(II), Ca(II), Zn(II) und Cu(II) werden gewöhnlich nur diese zwei ATP-Reste beansprucht [5, 6, 7], während beim Mn(II) und Co(II) alle drei Phosphatgruppen in Wechselwirkung treten [5].

Tab. I. Analyse der $^{31}$P-NMR-Spektren*.

| Nucleotid | $P_\alpha$ | $P_\beta$ | $P_\gamma$ | $[VO^{2+}]$ |
|---|---|---|---|---|
| ATP | −12,67# | −24,24# | −12,09# | |
| ATP/VO | −13,24 | −24,76 | −12,67 | 0,007 M |
| ADP | − 1,28# | −12,28# | – | |
| ADP/VO | − 1,81 | −13,04 | – | 0,011 M |
| AMP | − 0,38 | – | – | |
| AMP/VO | − 1,30 | – | – | 0,007 M |
| GMP | 2,17 | – | – | |
| GMP/VO | 2,07 | – | – | 0,007 M |

* $P_\alpha$ ist das dem organischen Rest näherliegende P-Atom.
\# Mittelwerte der Dubletts bzw. Tripletts.

Was die Hochfeldverschiebung bedeutet, ist im allgemeinen noch nicht klar. Eine solche Verschiebung wurde z.B. auch bei den ATP-Komplexen von Al(III), Ga(III) und Be(II) gefunden [8], während diejenigen mit Mg(II), Ca(II), Sr(II), Zn(II), Cd(II), Hg(II), Pb(II), Ag(I) und Tl(1) eine Tieffeldverschiebung verursachen [7].

Unsere Ergebnisse zeigen deutlich, daß in allen $VO^{2+}$/Nucleotid-Systemen die Phosphatreste immer vom Kation beansprucht werden und an der Komplexbildung beteiligt sind. Die Ergebnisse sind besonders im Falle der Monophosphatnucleotide von Bedeutung, da bei diesen die Elektronenspektroskopie nicht so eindeutige Beweise wie bei den anderen Nucleotiden erbrachte.

### *2. IR-Spektren in Lösung*

Wir haben versucht, auch mittels dieser Methode Beweise für die Wechselwirkung des Vanadyl(IV)-Kations mit den Phosphatresten der Nucleotide zu bekommen.

Es ist bekannt, daß die Phosphatreste der „freien Liganden" Banden in folgenden charakteristischen Bereichen aufweisen [8, 12–14]:

– Banden bei höchster Frequenz, zwischen 1215 und 1190 $cm^{-1}$, treten nur bei Vorhandensein von $>PO_2$-Gruppen auf; sie entsprechen der $\nu_{as}(PO_2)$-Schwingung. Die entsprechende symmetrische Schwingung dieser Gruppe ist gewöhnlich durch die intensiveren $\nu_{as}(PO_3)$-Banden verdeckt.

– Die $\nu_{as}(PO_3)$-Schwingungen sind im allgemeinen sehr stark und erscheinen um 1100 $cm^{-1}$. Die dazugehörende symmetrische Streckschwingung liegt bei etwa 1015 $cm^{-1}$ und ist gewöhnlich sehr schwach.

– Die zuletzt erwähnte Schwingung ist im allgemeinen mit P–O–C- oder P–O–P-Schwingungen gekoppelt. Die P–O–P-Brückenschwingungen können aber auch etwas tiefer liegen (900–800 $cm^{-1}$).

Bei Bildung von Metall/Nucleotid-Komplexen kann man gewöhnlich im Bereich dieser Phosphat-Schwingungen kleinere Frequenzverschiebungen sowie Änderungen der Form der Banden feststellen.

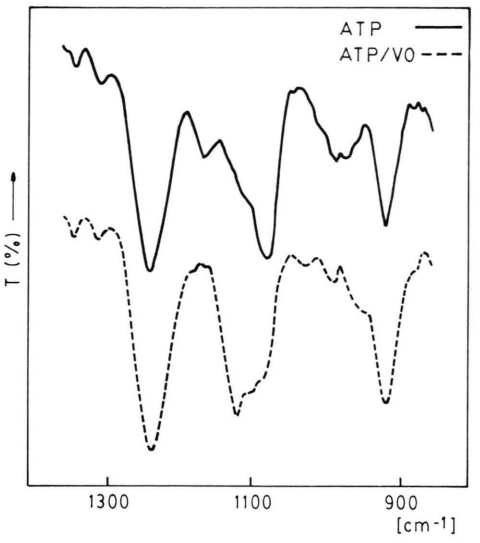


Abb. 2. IR-Spektren von ATP und ATP/VO (2:1); wässerige Lösungen (pH = 6,5).

Als typisches Beispiel für unsere Messungen gibt Abb. 2 die Spektren des freien ATP und dasjenige einer VO/ATP-Lösung wieder. Man kann als erstes ganz deutlich die Aufspaltung der $\nu_{as}(PO_3)$-Bande um 1100 $cm^{-1}$ erkennen. Dieser Effekt wird sicherlich durch eine Symmetrieerniedrigung und Aufhebung der Entartung dieser Bande durch Komplexbildung verursacht (vgl. [8]).

Die Lage der $\nu_{as}(PO_2)$-Schwingung ist hier, genauso wie bei anderen ähnlichen Systemen [8, 12, 13], weniger beeinflußt, und man beobachtet nur eine ganz geringe (*ca.* 3 $cm^{-1}$) Verschiebung derselben zu höheren Frequenzen.

Das Verhalten anderer vermessener Triphosphatnucleotiden (CTP und ITP) ist dem Besprochenen ganz ähnlich.

Weiterhin haben wir auch noch Messungen mit den Monophosphatnucleotiden AMP und UMP und dem Diphosphat CDP durchgeführt. In den ersten beiden Fällen beobachtet man eine starke Änderung der Form der 1100-$cm^{-1}$-Bande sowie eine bedeutende Intensitätserhöhung der 980-$cm^{-1}$-Bande. Beim CDP spaltet die 1100-$cm^{-1}$-Bande deutlich in zwei Komponenten auf, während sich die $\nu_{as}(PO_2)$-Schwingung kaum verändert.

Leider konnte man in keinem der gemessenen Spektren mit Sicherheit die Streckschwingung des $VO^{2+}$-Kations feststellen. Diese Bande liegt gewöhnlich zwischen 970–1020 $cm^{-1}$ [15], also gerade in dem Bereich, wo auch die Phosphatgruppen starke Absorptionen aufweisen. Andererseits konnte man in Lösung auch nicht den Bereich um 1600–1700 $cm^{-1}$ überprüfen, in dem typische Banden der organischen Basen liegen, da er durch die starken $H_2O$-Absorptionen völlig verdeckt wird.

Diese Messungen haben aber dennoch ganz deutlich die Bildung von Phosphat-Vanadyl-Bindungen bestätigt.

### *3. IR-Messungen an Festkörpern*

Die IR-Spektren mikrokristalliner Vanadyl(IV)-Komplexe mit ATP und verschiedenen Monophosphatnucleotiden wurden vor einiger Zeit von Katsaros [16] aufgenommen und besprochen. Seine Ergebnisse deuten vor allem auf Wechselwirkungen des Kations mit den Stickstoffatomen der verschiedenen Basen.

Unsere Messungen mit den Pyrimidin-Nucleotiden CDP, UMP, UDP und UTP sowie mit den Purin-Nucleotiden AMP, ADP, ATP und GMP zeigen deutlich, daß sowohl Phosphatreste wie auch Gruppen der Basen mit dem Kation in Wechselwirkung treten. Man beobachtet gewöhnlich spektroskopische Änderungen im Bereich der P–O-Schwingungen, welche der in Lösung festgestellten ähneln, aber auch im Bereich um 1600–1700 $cm^{-1}$, wo einige der charakteristischen Schwingungen der Basen liegen. Eine ausführliche Analyse dieser ziemlich komplizierten Festkörperspektren ist zur Zeit im Gange [17].

## Schlußfolgerungen

Die vorliegenden Ergebnisse beweisen erneut die zentrale Rolle der Phosphat-Gruppen bei der Wechselwirkung von Nucleotiden mit dem Vanadyl(IV)-Kation. Die Ergebnisse der $^{31}P$-NMR-Messungen und der IR-Spektren in Lösung bestätigen weitgehend die Befunde, welche aus den Elektronenspektren erhalten wurden [1]. Die vorläufigen Daten aus den IR-Festkörperspektren, welche hier nur ganz kurz mitgeteilt wurden, lassen im festen Zustand ein kompliziertes Verhalten vermuten.

## Experimentelles

Die Natrium-Salze der Nucleotide waren kommerzielle Produkte der Fa. Sigma, $VOSO_4 \cdot 5\,H_2O$ von Merck und 50%-$VOCl_2$-Lösung von Carlo Erba.

Die $^{31}$P-NMR-Spektren wurden mit einem Bruker-AM-300-Spektrometer, mit Fourier-Transform und Protonenentkopplung bei 121,442 MHz erhalten. Es wurde bei R.T. gearbeitet. Die chemischen Verschiebungen sind auf 85-proz. $H_3PO_4$ als äußeren Standard bezogen. Vermessen wurden *ca.* 0,12-M-Lösungen der Nucleotide in $H_2O$ sowie VO/Nucleotid-Lösungen mit Vanadyl(IV)-Konzentrationen zwischen 0,007 und 0,012 M.

Die IR-Spektren wurden mit einem Perkin-Elmer-580-B-Spektrophotometer aufgenommen. Spektren in Lösung wurden mit Flüssigkeitsküvetten mit AgCl-Fenster und 0,05 mm Schichtdichte erhalten. Es wurden wässerige Lösungen mit einem Nucleotid/$VO^{2+}$-Verhältnis von etwa 2:1 vermessen; der pH-Wert wurde vor den Messungen auf etwa 6,5–7,0 eingestellt.

Im Falle der Festkörper wurden die Spektren an KBr-Preßlingen vermessen. Die untersuchten mikrokristallinen Komplexe wurden im allgemeinen durch Zusammengießen äquimolarer $VOSO_4$- und Nucleotid-Lösungen ausgefällt, mit Ethanol gewaschen und im Vakuum getrocknet (vgl. [16, 17]). Auf diese Weise wurden Festkörper mit AMP, GMP und CDP erhalten. Durch diese Methode konnte man aber die entsprechenden Komplexe mit UMP, UDP, UTP, ADP und ATP nur schlecht kristallisiert oder als ölige Niederschläge bekommen. In diesen Fällen wurde $VOCl_2$ anstatt von $VOSO_4$ eingesetzt und nach dem Zusammengießen der Lösungen der pH-Wert mittels einer 1-proz. NaOH-Lösung auf *ca.* 7 eingestellt. Aus diesen Lösungen wurden anschließend die Festkörper durch Tieftemperatursprühtrocknung erhalten [17].

Diese Arbeit wurde mit Unterstützung des CONICET durchgeführt. Diese Untersuchungen sind auch Teil eines Forschungsprogramms über die Chemie und Biochemie des Vanadins, welches mit Unterstützung der Stiftung „Volkswagenwerk" entwickelt wird. E. G. F. ist Forschungsstipendiatin der CIC-Provincia de Buenos Aires.

[1] G. Urretavizcaya und E. J. Baran, Z. Naturforsch. **42b,** 1537 (1987).
[2] L. Josephson und L. Cantley (Jr.), Biochemistry **16,** 4572 (1977).
[3] K. Kustin und G. Macara, Comments Inorg. Chem. **2,** 1 (1982).
[4] N. D. Chasteen, Struct. Bonding **53,** 105 (1983).
[5] M. Cohn und Th. R. Hughes (Jr.), J. Biol. Chem. **237,** 176 (1962).
[6] M. Gabriel, D. Larcher, J. C. Boubel, A. A. Peguy und J. Torreilles, Inorg. Chim. Acta **26,** 77 (1978).
[7] J. L. Bock, J. Inorg. Biochem. **12,** 119 (1980).
[8] J. L. Bock und D. E. Ash, J. Inorg. Biochem. **13,** 105 (1980).
[9] J. L. Leroy und M. Guéron, J. Am. Chem. Soc. **108,** 5753 (1986).
[10] R. B. Martin und Y. H. Mariam, in H. Sigel (Herausg.): Metal Ions in Biological Systems, Bd. 8, S. 58ff., M. Dekker, New York (1979).
[11] H. Sakurai, T. Goda und S. Shimonura, Biochem. Biophys. Res. Commun. **108,** 474 (1982).
[12] H. Brintzinger, Biochem. Biophys. Acta **77,** 343 (1963).
[13] H. Brintzinger, Helv. Chim. Acta **48,** 47 (1965).
[14] N. Katsaros, E. Vrachnou-Astra und J. Konstantatos, J. Inorg. Biochem. **16,** 227 (1982).
[15] J. Selbin, Chem. Rev. **65,** 153 (1965).
[16] N. Katsaros, Trans. Met. Chem. **7,** 72 (1982).
[17] S. B. Etcheverry, E. G. Ferrer und E. J. Baran, in Vorbereitung.