

205. Alkalkationen-Spezifität und Träger-Eigenschaften der Antibiotica Nigericin und Monensin

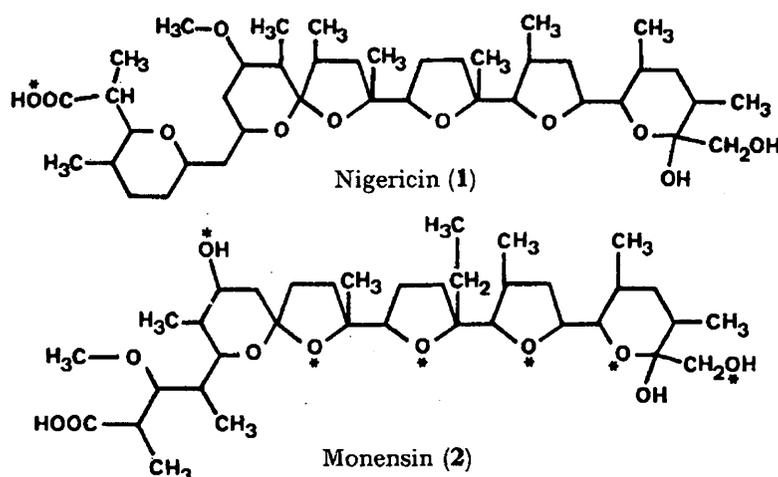
von W. K. Lutz, H.-K. Wipf und W. Simon

Organisch-chemisches Laboratorium, Eidgenössische Technische Hochschule, Zürich

(22. VIII. 70)

Summary. It is shown by means of IR. spectroscopic methods that nigericin and monensin have a cyclic conformation similar to that of their silver salts. Complex formation constants with sodium and potassium ions follow the selectivity order determined by EMF. measurements on liquid membranes: nigericin: $K^+ > Rb^+ > Na^+ > Cs^+ > Li^+$; monensin: $Na^+ > K^+ > Li^+ > Rb^+ > Cs^+$. Transport experiments show that nigericin and monensin facilitate the diffusion of potassium ions across model membranes, although in electrolytic transport experiments the permeability is not affected.

Nigericin (1) [1] und Monensin (2) [2] sind Antibiotica, die den Alkalkationen-transport in Lebermitochondrien beeinflussen [3]. Im Gegensatz zu den Vertretern der sogenannten Valinomycin-Gruppe¹⁾, die elektrisch positiv geladene lipophile Alkalkationenkomplexe bilden, sind die entsprechenden Komplexe der Nigericin-Gruppe²⁾ elektrisch neutral. Dies ist eine Ursache für die unterschiedliche Wirkung der beiden Gruppen in Lebermitochondrien [4] [6]. Die Röntgenstrukturanalyse der Silbersalze von Nigericin [1] und Monensin [2] zeigt, dass die entsprechenden Anionen



das Zentralatom gürtelförmig umschliessen. Dabei wird das Metall-Ion im Falle des Nigericins von 5, im Falle des Monensins von 6 Sauerstoffatomen mit einem Abstand von 2,4 bis 2,7 Å umgeben. In den Strukturformeln (1) und (2) sind die koordinierenden Zentren, soweit sie bekannt sind, besternt.

Von den Carboxylatgruppen koordiniert lediglich im Falle des Nigericins ein Sauerstoff mit dem Zentralatom (vgl. (1), (2)). Die übrigen bilden Wasserstoffbrücken mit den terminalen Hydroxylgruppen, wie dies in Figur 1 schematisch wiedergegeben

¹⁾ Typische Antibiotica dieser Gruppe sind Valinomycin, Enniatine, Gramicidine A, B, C, S und die Makrotetrolide [4].

²⁾ Typische Vertreter sind Nigericin, Monensin, Dianemycin, X-206 und X-537 A [4] [5].

ist. In dieser ringförmig geschlossenen Konformation umgibt die Mehrzahl der Sauerstoffatome das Zentralatom derart, dass die Oberfläche des Komplexsalzes lipophilen Charakter aufweist. Die Komplexe sind dementsprechend in organischen Lösungsmitteln gut, in Wasser jedoch schlecht löslich.

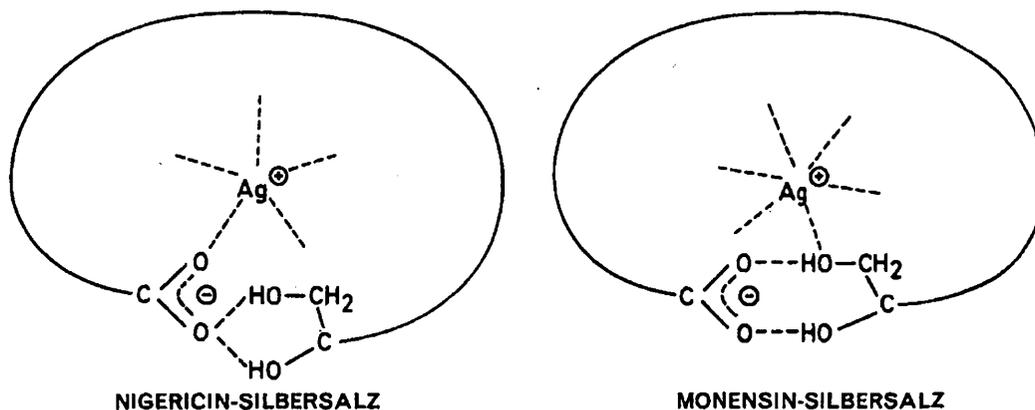


Fig. 1. Schematische Darstellung der Silber-Komplexsalze von Nigericin und Monensin

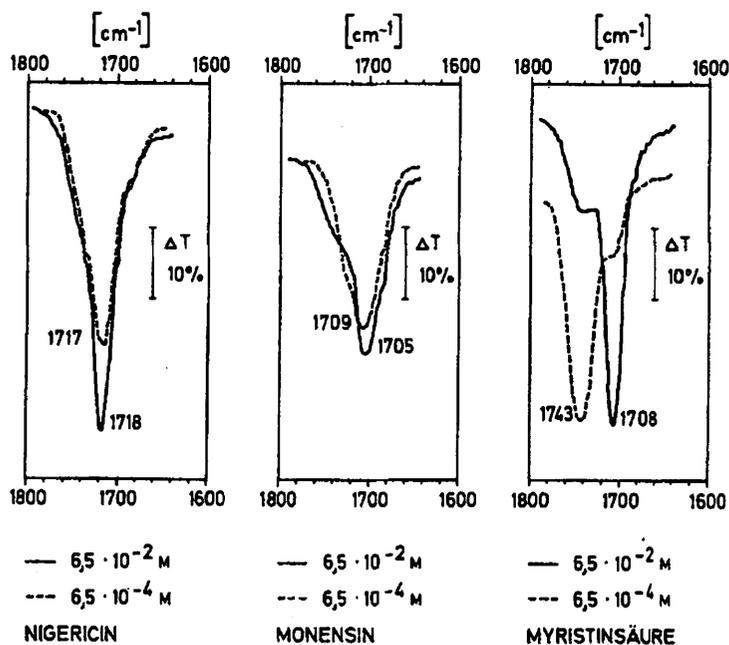
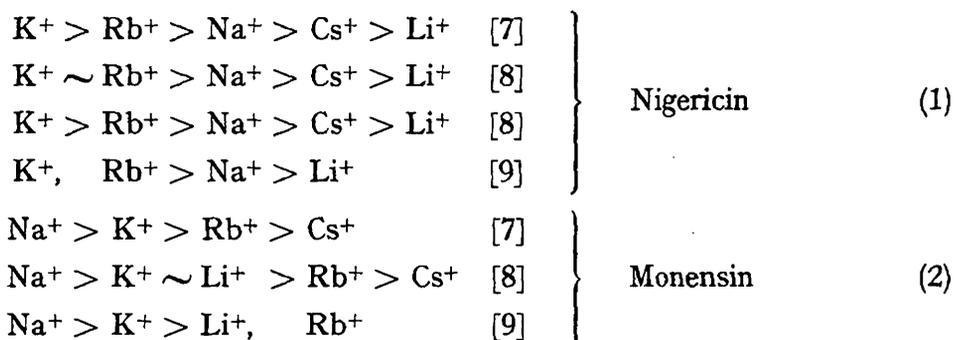


Fig. 2. IR.-Absorption im Carbonylbereich von Nigericin, Monensin und Myristinsäure bei zwei Konzentrationen

1. *Konformation der freien Säuren.* Bisher wurde angenommen, dass die Verbindungen in der protonierten Form offenkettig vorliegen und erst bei der Deprotonierung und Komplexbildung die Ringkonformation einnehmen [7]. IR.-Untersuchungen an Nigericin und Monensin in Chloroform ergeben jedoch, dass auch die freien Säuren vorwiegend eine Ringkonformation aufweisen. In Figur 2 sind die Absorptionen im Carbonylstreckschwingungsbereich von Nigericin, Monensin und Myristinsäure als Modellverbindung bei zwei Probenkonzentrationen wiedergegeben. Es ist daraus ersichtlich, dass Myristinsäure erwartungsgemäss bei hohen Konzentrationen vorwiegend die Absorption von assoziierten, bei kleinen Konzentrationen jene von nicht-

assozierten Carboxylgruppen zeigt. Im Gegensatz dazu ist die IR.-Absorption der beiden Antibiotica im wesentlichen konzentrationsunabhängig und liegt im Bereich der Carbonylgruppen von Carbonsäuren mit Wasserstoffbrückenbildung. Es müssen also intramolekulare Wasserstoffbrücken vorliegen, was auf eine Ringkonformation der freien Säuren Nigericin und Monensin hinweist. Diese Verbindungen dürften dementsprechend eine für Trägerkomplexe bereits vorgebildete Konformation einnehmen.

2. *Komplexbildungskonstanten.* Durch Messungen an Zweiphasensystemen [7], Untersuchungen an Erythrocytenmembranen und Flüssigkristallen [8] sowie an Modell-Transport-Systemen [9] sind für Nigericin und Monensin Selektivitätssequenzen für die Wechselwirkung mit Alkali-Kationen ermittelt worden. Diese lauten:



Im Hinblick auf die Abklärung der molekularen Grundlagen der Ionenselektivität von Antibiotica und Modellverbindungen sowie zum Vergleich mit bereits vorliegenden Daten [7] [8] [9] ist es notwendig, Stabilitätskonstanten K in Einphasensystemen zu bestimmen. Dazu schien es angezeigt, die Alkaliionenaktivität mittels Natrium- und Kalium-selektiver Glaselektroden [10] [11] in Gegenwart und Abwesenheit der Liganden zu messen [12]. Die in Methanol ermittelten Werte sind in Tab. 1 zusammengestellt. Aus messtechnischen Gründen lag das Optimum der Bestimmungsmethodik in der Gegend von $K = 10^3 \text{ M}^{-1}$. Da die gefundenen Grössen zum Teil weit ausserhalb dieses Optimums liegen, sind zusätzlich pH-metrische Bestimmungen durch Mikrotitration in Methylcellosolve/Wasser (80/20 Gew.-Proz.) [13] durchgeführt worden. Unter der Annahme, dass weder die freie Säure noch das bei der Titration verwendete Tetramethylammonium-Ion an einer Komplexbildung beteiligt ist und alle Aktivitäten gleich den Konzentrationen sind, ergibt sich

$$K = \frac{2}{[M^+]_{tot}} \cdot \frac{[H^+]}{K_{MCS}^*} \cdot \frac{[H^+] - K_{MCS}^*}{[H^+] + K_{MCS}^*} \quad (3)$$

wobei

K_{MCS}^* : scheinbare Aciditätskonstante der freien Säure in Abwesenheit von Alkali-Ionen,

$[M^+]_{tot}$: totale Alkaliionenkonzentration,

$[H^+]$: scheinbare Wasserstoffionenaktivität H_{MCS}^* des Messgutes (vgl. Definition von pH_{MCS}^* in [13]) für den Punkt halber Neutralisation.

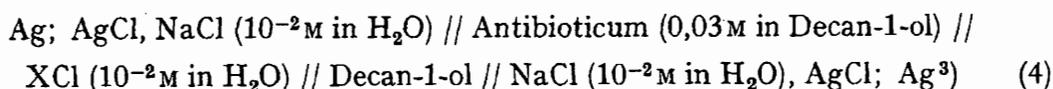
Die Ergebnisse sind in Tabelle 1 wiedergegeben. Sie stehen in qualitativer Übereinstimmung mit den oben erwähnten Daten [7] [8] [9].

3. *Elektromotorisches Verhalten von Modellmembranen.* In Flüssigmembranelektroden, die aus gelöstem Liganden auf inertem Träger bestehen, ist die Ionenselektivität

Tabelle 1. *Komplexbildungskonstanten von Nigericin und Monensin mit Natrium- und Kalium-Ionen [M⁻¹]*

	Na ⁺		K ⁺	
	Methanol	MCS/H ₂ O	Methanol	MCS/H ₂ O
Nigericin	24000	6600	150000	30000
Monensin	700000	85000	95000	6600

unter gewissen Voraussetzungen lediglich von den Bildungskonstanten der Komplexe des Liganden mit den entsprechenden Ionen abhängig [14]. Somit ist bei Flüssigmembransensoren mit Nigericin als Membrankomponente eine Bevorzugung von K⁺ über Na⁺ und mit Monensin eine solche von Na⁺ über K⁺ zu erwarten. EMK.-Ermittlungen an der folgenden aus zwei Membranelektroden bestehenden Messkette



bestätigen diese Annahme, wie aus Fig. 3 hervorgeht. Die gefundenen Selektivitätsreihenfolgen



stimmen mit den früher ermittelten Werten (vgl. (1) und (2)) überein.

4. *Alkaliionentransport durch Modellmembranen.* Elektrolytische Transporte radioaktiv markierter Alkali-Ionen durch synthetische Modellmembranen [15] [16] (bulk membranes) haben gezeigt, dass die Antibiotica der Valinomycin-Gruppe als Träger für Alkali-Kationen auftreten. Diese Antibiotica führen dann zu einer drastischen Erhöhung der elektrischen Leitfähigkeit der Membran, wenn die Lösung im Anodenraum einwertige Kationen, insbesondere Kalium-Ionen, enthält [17]. Für die elektrisch neutralen Komplexe der Nigericin-Gruppe sind keine derartigen Leitfähigkeitserhöhungen zu erwarten. So ergeben denn auch Nigericin und Monensin keine signifikanten Leitfähigkeitsänderungen in Modellmembranen (vgl. Messanordnung in [15]). Dieser Befund steht ebenfalls in Übereinstimmung mit dem Verhalten in biologischen Systemen [8].

Andererseits haben Messungen der Diffusion von Alkali-Ionen durch gleichartige Membranen mit Hilfe von Isotopenmarkierung gezeigt, dass Antibiotica der Nigericin-Gruppe als neutrale Träger-Komplexe die Diffusion von Kationen durch lipophile Phasen erleichtern (vgl. Fig. 4 und [9]). Ohne derartige Antibiotica-Zusätze wie auch in Gegenwart von Valinomycin konnte unter gleichen Bedingungen in keinem Fall eine Diffusion gemessen werden⁴⁾. Auch dieser Effekt kann auf Grund von molekularen Gegebenheiten rationalisiert werden [18]. In biologischen Systemen ist er dann besonders markant, wenn zwei Konzentrationsgradienten (K⁺, H⁺) gleichzeitig im Austausch abgebaut werden können, wie dies nach der Anwendung von Valinomycin auf Mitochondrien der Fall ist (vgl. auch [4] [8]).

³⁾ Diese Messanordnung hat den Vorteil, dass einerseits eine eventuelle Ionenselektivität des Lösungsmittels weitgehend kompensiert wird und andererseits Unsicherheiten bedingt durch Flüssigkeitspotentiale von Referenzelektroden beseitigt werden.

⁴⁾ Es scheint, dass Nigericin und Monensin etwa gleich wirksam sind. Die Fehler in den Messungen sind derart gross, dass eine Berechnung von Diffusionskonstanten nicht angezeigt ist.

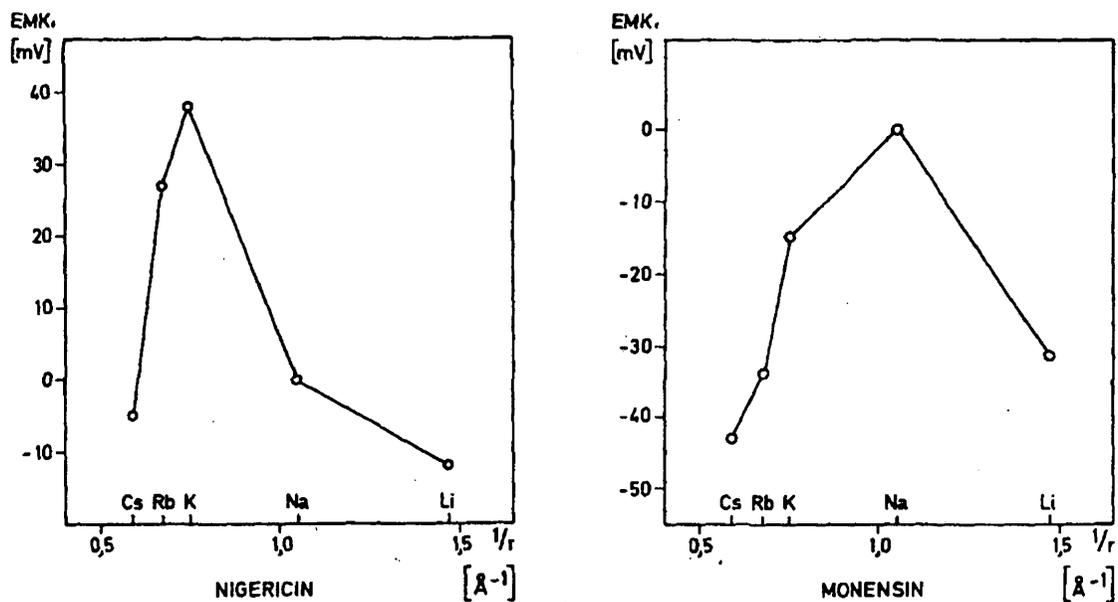


Fig. 3. Elektromotorisches Verhalten von Flüssigmembranelektroden mit Nigericin und Monensin als ionenselektive Membrankomponente

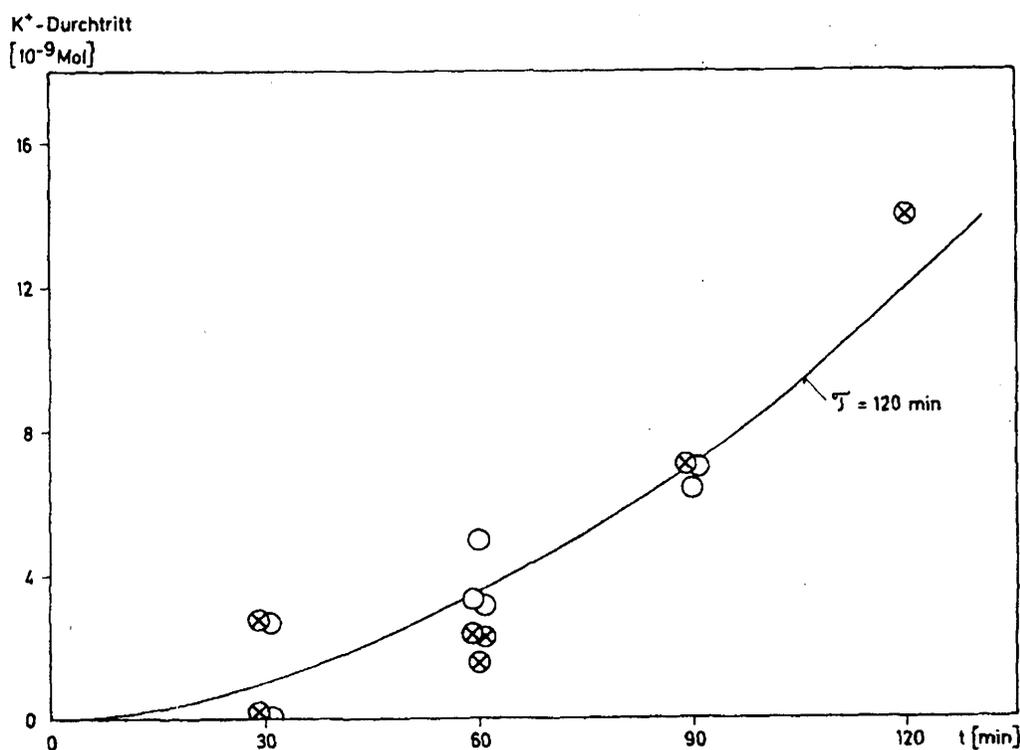


Fig. 4. Erleichterte Diffusion von Kalium-Ionen durch eine Modellmembran (0,75 mm dick, 80 mm² Oberfläche) bestehend aus einer Lösung von Nigericin bzw. Monensin in Octan-2-ol. Die Kurve entspricht einem möglichen theoretischen Verlauf für eine mittlere Durchtrittszeit $\tau = 120 \text{ min}$; Nigericin: ○; Monensin: ⊗

Experimentelles. - IR.-Absorptionsspektren: Diese wurden mit einem Perkin-Elmer-Spektrophotometer Modell 125 und Chloroform als Lösungsmittel aufgenommen. Für die konzentrierten Lösungen fanden NaCl-Zellen mit Schichtdicke 0,1 mm, für die verdünnten Lösungen Irtran-Zellen mit Schichtdicke 10 mm Verwendung. Die Eichung erfolgte mit der Wasserbande bei 1700 cm⁻¹.

Komplexbildungskonstanten: Für deren Bestimmung wurden Glaselektroden *Philips*, Typ G15-Na (Natrium) [10] sowie Typ G15-K (Kalium) [11] und Kalomel-Referenzelektroden *Philips* Typ R44 mit 0,1 M NH_4Cl als Brückenelektrolyt verwendet. Die Eichung der Elektroden erfolgte mit methanolischen Lösungen von Natrium- bzw. Kaliumrhodanid. Eine vorgegebene Menge Antibioticum wurde schliesslich zu diesen Eichlösungen gegeben und der Abfall der freien Alkaliionenaktivität gemessen. Um eine praktisch vollständige Deprotonierung der Antibiotica zu gewährleisten, waren sämtliche Lösungen $2 \cdot 10^{-2}$ M an Triäthylamin.

Die Mikrotitrationen wurden im mikroanalytischen Laboratorium der ETH Zürich (Leitung: *W. Manser*) nach ausführlich beschriebener Methodik [13] durchgeführt.

Die Potentialmessungen erfolgten mit der früher beschriebenen Messanordnung [19], bestehend aus Diodenverstärker (Eingangsimpedanz $>10^{12} \Omega$), Digitalvoltmeter und Digitaldrucker. Als Membranmaterial für die Elektroden fand Millipore-Filter Typ RAHP Verwendung. Die 10^{-2} M Alkalichloridlösungen waren mit einer Totalkonzentration von 10^{-4} M Imidazol-HCl auf pH 6,5 gepuffert.

Die Transport- und Diffusionsexperimente wurden an makroskopischen Modellmembranen (bulk membranes) durchgeführt. Diese bestanden aus porösem Polyvinylchlorid (*Porvic S*, *Porous Plastics Ltd.*, Dagenham Dock, Essex, England) als inertem Trägermaterial, imprägniert mit den entsprechenden Lösungen der Antibiotica (6 mg/ml) in Octan-2-ol. Die Montage der Membranen und die Versuchsanordnung wurden bereits früher eingehend beschrieben [15].

Wir danken der Firma *Eli Lilly & Co.*, Indianapolis, USA, für die freundliche Überlassung je einer Probe Nigericin-Natriumsalz (189-380B-171-A) und Monensin-Natriumsalz (370-559-AD-291).

Die vorliegende Arbeit wurde durch den *Schweizerischen Nationalfonds zur Förderung der wissenschaftlichen Forschung* unterstützt.

LITERATURVERZEICHNIS

- [1] *L. K. Steinrauf, M. Pinkerton & J. W. Chamberlin*, *Biochem. biophys. Res. Commun.* **33**, 29 (1968).
- [2] *A. Agtarap, J. W. Chamberlin, M. Pinkerton & L. K. Steinrauf*, *J. Amer. chem. Soc.* **89**, 5737 (1969); *M. Pinkerton & L. K. Steinrauf*, *J. mol. Biol.* **49**, 533 (1970).
- [3] *S. N. Graven, S. Estrada-O. & H. A. Lardy*, *Proc. natl. Acad. Sci. USA* **56**, 654 (1966); *S. Estrada-O., B. Rightmire & H. A. Lardy*, *Antimicrobial Agents Chemotherapy 1967*, 279.
- [4] *H. A. Lardy, S. N. Graven & S. Estrada-O.*, *Fed. Proc.* **26**, 1355 (1967); *B. C. Pressman, E. J. Harris, W. S. Jagger & J. H. Johnson*, *Proc. natl. Acad. Sci. USA* **58**, 1949 (1967).
- [5] *J. W. Westley, R. H. Evans, Jr., T. Williams & A. Stempel*, *Chem. Commun.* **1970**, 71.
- [6] *W. Simon, L. A. R. Pioda & H.-K. Wipf*, *Cation Specificity of Inhibitors*, 20. Colloquium der Gesellschaft für Biologische Chemie, Mosbach/Baden (Deutschland) 1969.
- [7] *B. C. Pressman*, *Fed. Proc.* **27**, 1283 (1968).
- [8] *P. J. F. Henderson, J. D. McGivan & J. B. Chappell*, *Biochem. J.* **111**, 521 (1969).
- [9] *R. Ashton & L. K. Steinrauf*, *J. mol. Biol.* **49**, 547 (1970).
- [10] *Z. Štefanac & W. Simon*, *Analyt. Letters* **1**, 1 (1967).
- [11] *Z. Štefanac & W. Simon*, *Helv.* **51**, 74 (1968).
- [12] *G. A. Rechnitz & S. B. Zamochnik*, *Talanta* **11**, 1061 (1964); *H.-K. Wipf, L. A. R. Pioda, Z. Štefanac & W. Simon*, *Helv.* **51**, 377 (1968).
- [13] *W. Simon*, *Helv.* **41**, 1835 (1958).
- [14] *J. Sandblom, G. Eisenman & J. L. Walker, Jr.*, *J. physic. Chemistry* **71**, 3862 (1967); *W. Simon, H.-R. Wuhrmann, M. Vašák, L. A. R. Pioda, R. Dohner & Z. Štefanac*, *Angew. Chem.* **82**, 433 (1970).
- [15] *H.-K. Wipf & W. Simon*, *Biochem. biophys. Res. Commun.* **34**, 707 (1969); *H.-K. Wipf, W. Pache, P. Jordan, H. Zähler, W. Keller-Schierlein & W. Simon*, *Biochem. biophys. Res. Commun.* **36**, 387 (1969).
- [16] *H.-K. Wipf, A. Olivier & W. Simon*, *Helv.* **53**, 1605 (1970).
- [17] *P. Mueller & D. O. Rudin*, *Biochem. biophys. Res. Commun.* **26**, 398 (1967); *D. C. Tosteson*, *Fed. Proc.* **27**, 1269 (1968).
- [18] *H.-K. Wipf & W. Simon*, *Helv.* **53**, 1732 (1970).
- [19] *L. A. R. Pioda, V. Stankova & W. Simon*, *Analyt. Letters* **2**, 665 (1969).