

Studien auf dem Gebiete der Nucleotid-Synthese

Nobel-Vortrag am 11. Dezember 1957*)

Von Prof. Sir ALEXANDER TODD, F. R. S.

University Chemical Laboratory, Cambridge/England

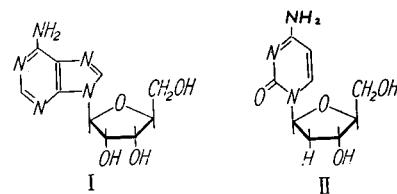
Es wird ein Überblick über eigene Arbeiten auf dem Gebiet der Nucleoside, Nucleotide und Nucleinsäuren, insbesondere über Darstellung und Eigenschaften organischer Phosphate, Pyrophosphate und Polyphosphate gegeben.

Der Ausdruck „Nucleotide“ bedarf zunächst einer Definition, denn die Bezeichnung wird heute in einem viel weiteren Sinne gebraucht als zur Zeit ihrer Einführung. Ursprünglich wurde sie nur für die bei der Hydrolyse von Nucleinsäuren gebildeten Phosphorsäure-ester gewisser N-Glycoside von Purinen oder Pyrimidinen benutzt. Heute verwendet man sie ganz allgemein für Phosphate von N-Glycosiden heterocyclischer Basen, sie umschließt also nicht nur die Nucleotide der alten Definition, sondern auch die Nucleinsäuren (Polynucleotide) und Verbindungen wie Nicotinamid-Nucleotid (5'-Phosphat des quaternären N-Ribofuranosyl-nicotinamids) und Adenosintriphosphat (ATP). Letztere gehören zu den Nucleotid-Coenzymen, die gegenüber anderen Coenzymen dadurch gekennzeichnet sind, daß sie mindestens einen einfachen Nucleotid-Rest in der Molekel enthalten. Eine Ausnahme bildet das Riboflavin-phosphat (Flavin-mono-nucleotid, FMN), das nicht glycosidischer Natur ist, wegen seiner Ähnlichkeit mit echten Nucleotiden aber trotzdem als solches bezeichnet wird.

Als ich 1939 mit Untersuchungen auf diesem Gebiet begann, waren die Grundsubstanzen der Gruppe, d. h. die bei der Hydrolyse von Nucleinsäuren entstehenden Nucleoside seit langem bekannt. Den frühen Arbeiten *Fischers* waren die einiger anderer Forscher gefolgt, unter denen vor allem *Levene* zu erwähnen ist. Als Ergebnis wußte man, daß es sich bei den vier aus Ribonucleinsäure gebildeten Nucleosiden um die D-Riboside von Adenin, Guanin, Uracil und Cytosin handelt. Die Größe des Lacton-Ringes im Zucker-Rest sowie die Konfiguration der Glycosid-Bindung waren dagegen unbekannt und ebenso, an welcher Stelle des Purin-Restes das Kohlenhydrat gebunden ist. Allerdings hatte sich aus den spektroskopischen Untersuchungen von *Gulland* und *Holiday*¹⁾ mit ziemlicher Wahrscheinlichkeit ergeben, daß es ein N-Atom sein mußte. Über die Nucleoside aus Desoxy-ribonucleinsäuren wußte man nur, daß sie die 2'-Desoxy-riboside der Basen Adenin, Guanin, Thymin und Cytosin sind, und nahm an, daß sie strukturell den Ribonucleosiden gleichen würden. Die Chemie der Nucleotide, d. h. der Nucleosid-phosphate befand sich in ähnlich unentwickeltem Zustand. Fragt man, warum dies so war, so ist zunächst zu bedenken, daß die große biologische Bedeutung dieser Verbindungen lange Zeit hindurch unerkannt blieb und nur allmählich mit dem Fortschreiten biochemischer Forschungen offenbar wurde. Aber ich glaube, eine bedeutendere Ursache waren die physikalischen Eigenschaften dieser Substanzen: Als wasserlösliche, polare Verbindungen ohne richtigen Schmelzpunkt ließen sie sich mit den klassischen Methoden der organischen Chemie nur schwer handhaben, und entsprechend war das Arbeiten mit ihnen nicht sehr ermutigend. Es ist sicher kein Zufall, daß größere Fortschritte auf diesem Ge-

biet mit dem Aufkommen neuer experimenteller Techniken zusammenfielen, die wie Papier- und Ionenaustausch-chromatographie, Papier-elektrophorese und Gegenstrom-verteilung für die Untersuchung derartiger Verbindungen besonders geeignet sind. Ich bezweifle, ob ohne diese Techniken und ohne das Vorhandensein bequemer und genauer spektroskopischer Methoden unsere Arbeit überhaupt möglich gewesen wäre.

Ich beschloß, daß wir versuchen sollten, mit den einfachsten Einheiten, den Nucleosiden, beginnend, die Verhältnisse auf dem Nucleotid-Gebiet zu klären, und zwar vor allem mit Hilfe synthetischer Methoden, denn die bis dahin ausgeführten Untersuchungen hatten genügend Hinweise auf die wahrscheinliche Natur der Nucleoside ergeben, um ein solches Verfahren aussichtsreich erscheinen zu lassen. Es würde einen ganzen eigenen Vortrag erfordern, wollte man diese Phase unserer Arbeiten ausführlich beschreiben. Ich werde sie deshalb hier nicht diskutieren, obwohl ich glaube, daß sie ein interessantes Beispiel für die Anwendbarkeit synthetischer Methoden zur Strukturaufklärung darstellt. Es mag genügen zu erwähnen, daß sich aus ihr die Struktur der vier Ribonucleoside als 9-β-D-Ribofuranoside von Adenin und Guanin bzw. 3-β-D-Ribofuranoside von Uracil und Cytosin sowie die Totalsynthese dieser vier Verbindungen ergab²⁾. Ebenso konnte für die Desoxyribonucleoside gezeigt werden, daß es sich um die 9-β-2'-Desoxy-D-ribofuranoside von Purinen und die 3-β-2'-Desoxy-D-ribofuranoside von Pyrimidinen handelt³⁾. Ihre Synthese wurde zunächst durch Schwierigkeiten in der Herstellung und Handhabung von Derivaten der 2-Desoxy-D-ribose verzögert, doch gelang kürzlich die Darstellung von Desoxyuridin⁴⁾, und wahrscheinlich werden die anderen bald folgen. Als Beispiele sind hier die Strukturformeln zweier typischer Nucleoside, des Ribonucleosids Adenin (I) und des Desoxy-ribonucleosids Desoxy-cytidin (II) angegeben.



Die einfachen Nucleotide sind Phosphate der Nucleoside, wobei der Phosphat-Rest an eine Hydroxyl-Gruppe des Zuckers gebunden ist. Die Phosphorylierung der Nucleoside war daher ein zweiter, sehr wesentlicher Abschnitt unserer Arbeit. Obgleich organische Phosphate und Polyphosphate in der belebten Natur weit verbreitet sind, hatte

²⁾ Zusammenfassg. s. G. W. Kenner, *Fortschr. Chem. org. Naturstoffe* [Wien] 8, 96 [1951]; J. Baddiley: *Chemistry of Nucleosides and Nucleotides*, in E. Chargaff u. J. N. Davidson: *Nucleic Acids*, Academic Press, New York 1955, Bd. 1, S. 137–188.

³⁾ W. Andersen, D. H. Hayes, A. M. Michelson u. A. R. Todd, *J. chem. Soc. [London]* 1954, 1882; A. M. Michelson u. A. R. Todd, ebenda 1955, 816.

⁴⁾ D. M. Brown, D. B. Parihar, C. P. Reese u. A. R. Todd, *Proc. chem. Soc. [London]* 1957, 321.

*) Das liebenswürdige Entgegenkommen des Autors und des Nobel-Komitees für Chemie, Stockholm, hat es uns ermöglicht, den Nobel-Vortrag, der erst später in den Veröffentlichungen des Nobel-Komitees herauskommen wird, schon jetzt zu bringen.
1) J. M. Gulland u. E. R. Holiday, *J. chem. Soc. [London]* 1936, 765.

man in der Vergangenheit ihrer Synthese nur wenig, ihrem chemischen Verhalten noch weniger Aufmerksamkeit geschenkt. Eine Anzahl organischer Phosphate war zwar dargestellt worden, aber gewöhnlich mit ziemlich groben, für empfindlichere Substanzen ungeeigneten Methoden, so daß wir zunächst mit einer allgemeinen Untersuchung über die Phosphorylierung beginnen mußten, um Verfahren zu finden, die auch unter Berücksichtigung der vielen strukturellen Feinheiten auf dem Nucleotid- und Nucleotid-Coenzym-Gebiet brauchbar waren.

Als das am weitesten verwendbare Reagens ergab sich Dibenzyl-phosphorsäure-chlorid ($C_6H_5CH_2O_2POCl^5$). Diese recht instabile Verbindung erhält man leicht in Lösung durch Chlorierung von Dibenzyl-phosphit mit Chlor oder N-Chlor-succinimid. Sie reagiert glatt mit Alkoholen in Gegenwart tertärer Basen unter Bildung von Alkyl-dibenzylphosphaten, aus denen die Benzyl-Gruppen auf verschiedene Weise abgespalten werden können. Mono-debenzylierung erreicht man mit starken tertiären Basen⁶), durch anionische Spaltung⁷) oder durch teilweise Hydrierung, vollkommene Debenzylierung z. B. durch Hydrolyse, katalytische Hydrogenolyse oder Ammonolyse. Daneben haben wir einige weitere brauchbare phosphorylierende Reagentien für besondere Fälle entwickelt: Tetra-ester der Pyrophosphorsäure⁸), gemischte Anhydride von Diestern der Phosphorsäure mit stärkeren Säuren (z. B. Sulfinsäuren)⁹), die Reaktion von Dialkylphosphiten mit Polyhalogen-Verbindungen in Gegenwart einer Base und der zu phosphorylierenden Substanz¹⁰) und schließlich das wichtige Phosphit-Verfahren, bei dem ein Alkohol durch Behandlung mit dem gemischten Anhydrid aus Benzyl-phosphoriger Säure und Diphenyl-phosphorsäure zunächst in das Alkyl-benzyl-phosphit überführt wird, woraus man dann über das Phosphorsäure-chlorid oder durch direkte Oxydation das Phosphat erhält¹¹). Als Ergebnis dieser grundlegenden Arbeiten waren wir in der Lage, nicht nur alle theoretisch möglichen einfachen Ribo- und Desoxyribo-nucleotide zu synthetisieren, sondern auch das kompliziertere Problem der Nucleinsäuren und der Nucleotid-Coenzyme in Angriff zu nehmen^{2, 12}). Da es sich hierbei um zwei verschiedene, obwohl miteinander verbundene Aspekte der Nucleotid-Chemie handelt, wird es zweckmäßig sein, sie getrennt zu beschreiben.

Nucleinsäuren

Es ist jetzt gut 80 Jahre her, daß Miescher zum erstenmal eine Nucleinsäure aus Eiterzellen isolierte. Heute weiß man, daß sie ein wesentlicher Bestandteil aller lebenden Zellen sind, daß sie gewöhnlich mit Proteinen assoziiert vorkommen, d. h. als Nucleo-proteide, zu denen viele Viren und Enzyme zählen, und daß sie zu den kompliziertesten Substanzen gehören, die man in der belebten Natur kennt. Im Laufe der Jahre konnten anfängliche Fehldeutungen ausgeräumt und die Erkenntnis gewonnen werden, daß die Zahl individueller Nucleinsäuren zwar beträchtlich ist, daß es aber nur zwei große Gruppen gibt: Ribonucleinsäuren und Desoxy-ribonucleinsäuren.

Einen Hinweis auf ihre Zusammensetzung erhält man aus den Hydrolyseprodukten: es entstehen einfache

⁵⁾ F. R. Atherton, H. T. Openshaw u. A. R. Todd, J. chem. Soc. [London] 1945, 382.

⁶⁾ J. Baddiley, V. M. Clark, J. J. Michalski u. A. R. Todd, ebenda 1949, 815.

⁷⁾ V. M. Clark u. A. R. Todd, ebenda 1950, 2031.

⁸⁾ F. R. Atherton u. A. R. Todd, ebenda 1947, 674.

⁹⁾ N. S. Corby, G. W. Kenner u. A. R. Todd, ebenda 1952, 1234.

¹⁰⁾ F. R. Atherton, H. T. Openshaw u. A. R. Todd, ebenda 1945, 660.

¹¹⁾ N. S. Corby, G. W. Kenner u. A. R. Todd, ebenda 1952, 3669;

G. W. Kenner, F. J. Weymouth u. A. R. Todd, ebenda 1952, 3675.

¹²⁾ A. M. Michelson u. A. R. Todd, ebenda 1953, 951, 1954, 34;

D. H. Hayes, A. M. Michelson u. A. R. Todd, ebenda 1955, 808.

Nucleotide, die sich durch weitere Hydrolyse in Nucleosid und Phosphorsäure in äquimolarem Verhältnis zerlegen lassen. Die Nucleinsäuren sind also Polynucleotide, in denen, wie Levene und Simms¹³⁾ gezeigt haben, die einzelnen Nucleotide durch Phosphorsäure-diester-Gruppen miteinander verknüpft sind. Pyrophosphat- und Äther-Bindungen kommen nicht vor. Obwohl die Nucleinsäure-Moleküle sehr groß sind, die Molgewichte können in einigen Fällen mehrere Millionen erreichen, ist die Zahl der verschiedenen sie aufbauenden Nucleoside erstaunlich gering. So findet man in Ribonucleinsäuren im allgemeinen nicht mehr als vier: Adenosin, Guanosin, Uridin, Cytidin, doch wird neuerdings über das spurenweise Vorkommen von ein oder zwei weiteren Nucleosiden berichtet. Desoxyribonucleinsäuren bestehen ebenfalls zur Hauptsache aus vier Nucleosiden: Desoxy-adenosin, Desoxy-guanosin, Desoxy-cytidin und Thymidin, daneben aber aus mindestens zwei weiteren, nämlich 5-Methyl- und 5-Hydroxymethyl-desoxy-cytidin, die beide ziemlich häufig anzutreffen sind. Da wir aus unseren früheren Untersuchungen die vollständige Struktur der Nucleoside bereits kannten, bestand das vordringliche Problem bei den Nucleinsäuren in der Lokalisierung der Internucleotid-Bindungen¹⁴⁾.

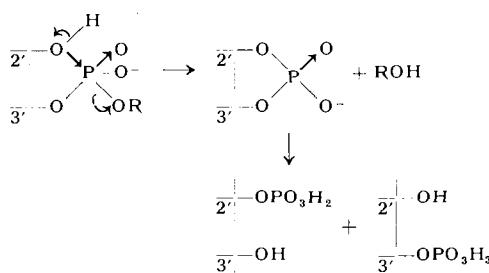
Bis 1949 glaubte man, daß durch alkalische Hydrolyse von Ribonucleinsäure nur vier einfache Nucleotide gebildet würden, die, hauptsächlich auf Grund der Arbeiten von Levene, für die 3'-Phosphate der entsprechenden Nucleoside gehalten wurden. Auf dieser Basis ließ sich für die Polynucleotide nur schwer eine vernünftige Struktur finden. 1949 begann Cohn, die Technik der Ionenaustausch-Chromatographie auf alkalische Hydrolysate von Ribonucleinsäuren anzuwenden, und er konnte zeigen, daß sie nicht vier, sondern acht Nucleotide, bestehend aus vier Isomerenpaaren, enthielten. Jedes Paar leitete sich von einem der vier Nucleoside ab, und er bezeichnete die Isomeren daher als a- und b-Nucleotide, z. B. Adenylsäure a und Adenylsäure b. Durch einen glücklichen Zufall trafen diese Untersuchungen zeitlich mit unserer Synthese der einzelnen Ribonucleotide zusammen, und so wurde alsbald klar, daß es sich bei den a- und b-Nucleotiden um die 2'- und 3'-Phosphate der entsprechenden Nucleoside handeln mußte. Allerdings konnten wir zu der Zeit noch nicht mit Sicherheit sagen, welches das 2'- und welches das 3'-Derivat war. Ich könnte die Geschichte abkürzen und gleich hier sagen, daß wir später Cohns a-Nucleotide als 2'-Phosphate und seine b-Nucleotide als 3'-Phosphate zu identifizieren vermochten, aber die Gründe für unser Unvermögen, dies sofort zu tun, sind von prinzipieller Bedeutung für das Verständnis von Struktur und Verhalten der Nucleinsäuren und hatten auch auf andere Gebiete der Phosphat-Chemie einen weitreichenden Einfluß.

Unsere ersten Versuche, 2'- oder 3'-Nucleotide durch Phosphorylierung von Ribonucleosiden darzustellen, schlugen fehl, teilweise infolge ungenügenden Schutzes der anderen OH-Gruppen, hauptsächlich aber durch Phosphorylwanderung, die immer zu einem Gemisch der 2'- und 3'-Isomeren führte. Auch jedes der reinen Isomeren wird in saurer Lösung vermutlich über eine cyclische Zwischenstufe in ein Gleichgewichtsgemisch aus beiden Isomeren umgewandelt. Noch interessanter ist das Verhalten der Monoester der 2'- und 3'-Nucleotide: sie werden im Gegensatz zur normalen Alkalistabilität von Phosphorsäure-diester schon von verdünntem wäßrigem Alkali hydrolysiert, wo-

¹³⁾ P. A. Levene u. H. S. Simms, J. biol. Chemistry 65, 519 [1925]; 70, 327 [1927].

¹⁴⁾ Zusammenfassg. u. Literatur s. D. M. Brown u. A. R. Todd: Evidence on the Nature of Chemical Bonds in Nucleic Acid, in E. Chargaff u. J. N. Davidson: Nucleic Acids, Academic Press, New York 1955, Bd. 1, S. 409–445.

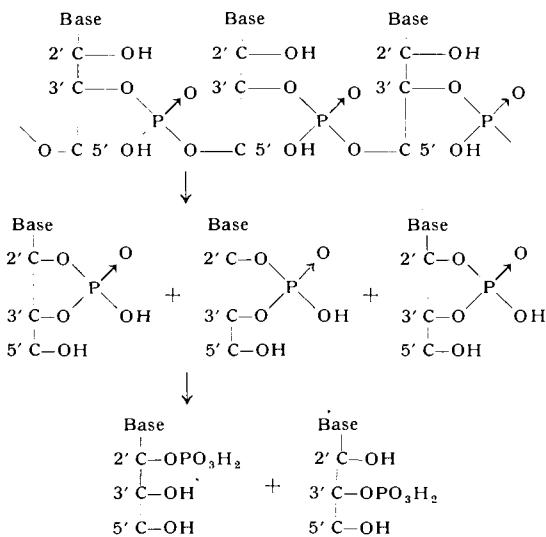
bei wieder ein Gemisch der beiden isomeren Nucleotide entsteht. Wir stellen uns diese Hydrolyse als eine zweistufige Reaktion vor, bei der sich unter Ablösung des Alkohols ROH zunächst ein cyclisches Phosphat bildet, das im zweiten Schritt hydrolytisch zu einem Gemisch beider Nucleotide gespalten wird.



Es mag erwähnt werden, daß das cyclische Zwischenprodukt sowohl aus einer derartigen Hydrolyse als auch synthetisch erhalten werden konnte und die erwarteten Eigenschaften besitzt. Natürlich ist dieses Verhalten nicht auf die Ester der 2'- und 3'-Nucleotide beschränkt, man findet es vielmehr bei allen Phosphorsäure-diester, die am vicinalen C-Atom eine zum Phosphat-Rest cis-ständige Hydroxyl-Gruppe tragen, z. B. bei den Monoestern der Glycerin-phosphorsäuren. Ersetzt man im obigen Formelschema den Rest R durch eine Polynucleotidkette, so wird unmittelbar dreierlei verständlich:

1. daß bei der alkalischen Hydrolyse von Ribonucleinsäuren nie größere Bruchstücke entstehen, sondern immer nur die einfachen Nucleotide,
2. daß sie als Gemisch der 2'- und 3'-Isomeren gebildet werden und
3. daß Desoxy-ribonucleinsäuren gegenüber Alkali stabil sind, weil ihnen die vicinale Hydroxylgruppe am C-Atom 2' fehlt, und sie daher die normale Beständigkeit von Phosphorsäure-diester haben.

Dies ist im folgenden Schema, in dem die Bezeichnung Base-C(2')-C(3')-C(5') einen Ribonucleosid-Rest bedeutet, da nur in den Stellungen 2', 3' und 5' ein Phosphat-Rest gebunden sein kann, veranschaulicht:



Auf Grund dieser und anderer Überlegungen und Anzeichen schlugen Brown und ich¹⁵⁾ für beide Nucleinsäure-Typen die Struktur von 3', 5'-verknüpften Polynucleotiden vor, die durch spätere Arbeiten bestätigt werden konnte und jetzt allgemein anerkannt ist. Die wichtigsten bis

¹⁵⁾ D. M. Brown u. A. R. Todd, J. chem. Soc. [London] 1952, 52.

heute vorhandenen Beweise für die beiden Nucleinsäure-Typen sind im folgenden zusammengefaßt:

Ribonucleinsäuren: unstabil gegenüber Alkali, es entstehen einfache Nucleotide. Die als Zwischenprodukte angenommenen cyclischen Phosphate konnten isoliert werden. Enzymatische Hydrolyse (Schlangengift-Phosphatase) zeigt die Teilnahme von C(5') an der Internucleotid-Bindung. Untersuchungen über die Einwirkung von Ribonuclease und Milz-Nuclease auf cyclische 2', 3'-Nucleosidphosphate und Ester von 2'- und 3'-Nucleotiden ergaben, daß außerdem C(3'), nicht aber C(2') an der Nucleotid-Verknüpfung beteiligt ist. Dies wird unterstützt durch das Verhalten synthetischer Dinucleosid-phosphate (5', 5'; 2', 5'; 3', 5') gegenüber chemischer und enzymatischer Hydrolyse.

Desoxy-ribonucleinsäuren: stabil gegenüber Alkali. Hydrolyse mit geeigneten Enzymen liefert 3'- oder 5'-Nucleotide. Bei der sauren Hydrolyse entstehen unter anderem Pyrimidin-nucleosid-3', 5'-diphosphate und Di-thymidin-3', 5'-dinucleotid, das mit einem synthetischen Produkt identifiziert werden konnte¹⁶⁾.

Es ist wahrscheinlich, daß die Nucleinsäuren eher lineare als verzweigte Polyester sind. Dies trifft sicher zu für Desoxy-ribonucleinsäure, die aus biologischem Material isoliert und durch Alkalibehandlung von Ribonucleinsäure getrennt wurde, denn eine Verzweigung wäre nur am Phosphor möglich und Phosphorsäure-triester besitzen nicht die notwendige Alkalistabilität. Im Falle der Ribonucleinsäuren haben wir gezeigt, daß eine Verzweigung am Phosphor mit der Stabilität der Molekel nicht vereinbar ist, aber hier bleibt die Verzweigung am C-Atom 2' eine theoretische Möglichkeit, obwohl bisher noch in keiner Ribonucleinsäure dergleichen nachgewiesen werden konnte.

Da die Unterschiede zwischen den einzelnen Nucleinsäuren in der verschiedenen Aufeinanderfolge der Nucleosid-Reste begründet sein müssen, sind Methoden zur Bestimmung dieser Sequenzen für weitere Untersuchungen von Wichtigkeit. Bis heute ist es allerdings nicht gelungen, eine wirklich homogene Nucleinsäure zu gewinnen. Aber wir haben ein Verfahren zum stufenweisen Abbau von Oligonucleosiden gefunden¹⁷⁾, das möglicherweise auch auf Ribonucleinsäuren anwendbar ist.

Die chemische Synthese von Polynucleotiden befindet sich noch sehr in ihren Anfängen. Dinucleosid-phosphate und wenigstens ein Dinucleotid sind bisher dargestellt worden, und man hat begonnen, im wesentlichen unter Verwendung gemischter Anhydride, Kondensationsmethoden für eine rasche Polynucleotid-Synthese zu entwickeln. Vielfache Bemühungen sowohl in meinem eigenen Laboratorium als auch in denen ehemaliger Studenten und Kollegen lassen baldige Fortschritte auf diesem wichtigen Gebiet erwarten.

Die Zeit erlaubt es mir nicht, hier weiter zu beschreiben, wie aus diesen Ergebnissen chemischer Untersuchungen, zusammen mit der Anwendung von Röntgenstrahlen und anderen Arbeiten schließlich unsere gegenwärtige Vorstellung über die makromolekulare Struktur der Desoxy-ribonucleinsäuren entstanden ist. Es mag genügen zu erwähnen, daß die zuerst von Watson und Crick¹⁸⁾ vorgeschlagene Doppelhelix der Molekel eine neue Ära in der Biologie molekularer Bereiche eröffnet hat, denn es ergeben sich daraus Folgerungen für die Bedeutung der Nucleinsäuren bei der Übertragung von Erbfaktoren, die zusammen mit unserer

¹⁶⁾ A. M. Michelson u. A. R. Todd, ebenda 1955, 2632.

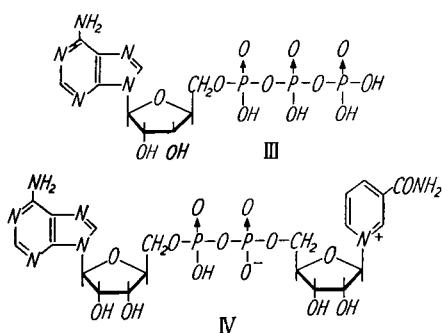
¹⁷⁾ D. M. Brown, M. Fried u. A. R. Todd, Chem. Industries 1953, 352; J. chem. Soc. [London] 1955, 2206; P. R. Whitfield u. R. Markham, Nature [London] 171, 1151 [1953].

¹⁸⁾ J. D. Watson u. F. H. C. Crick, ebenda 171, 737, 964 [1953].

Kenntnis der Eigenschaften und Reaktionen organischer Phosphate zu einem tieferen Verständnis der Rolle führen, welche die Nucleinsäuren im Zellgeschehen spielen.

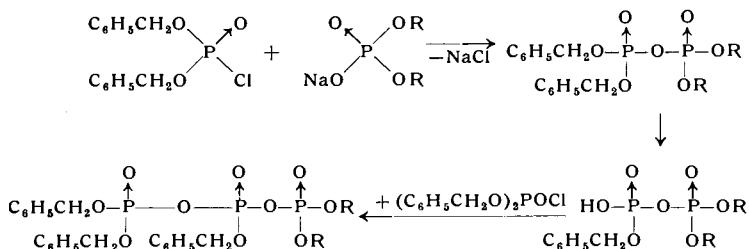
Nucleotid-Coenzyme¹⁹⁾

Dieser Ausdruck bezeichnet eine Gruppe von Nucleotiden, die Bestandteile vieler lebenswichtiger Enzymsysteme sind. 1906 wurde erstmals durch *Harden* und *Young* die Existenz eines Nucleotid-Coenzymes, des Diphospho-pyridin-nucleotids (DPN) nachgewiesen, seine Reindarstellung gelang 30 Jahre später *v. Euler* und *Schlenk*. Es dient als Coenzym einer Anzahl von Redox-Enzymen. Andere Beispiele sind Flavin-Adenin-dinucleotid (FAD), das in vielen an der biologischen Wasserstoff-Übertragung beteiligten Flavoproteinen vorkommt, oder Adenosin-triphosphat (ATP), das als Cophosphorylase wirkt und die Energie für Muskelkontraktionen und andere Vorgänge liefert. Alle bekannten Nucleotid-Coenzyme sind entweder (a) Monoester von Polyphosphorsäuren, in denen der Alkohol ein Nucleosid ist, oder (b) unsymmetrische P(1)-P(2)-Pyrophosphorsäure-di-ester, in denen mindestens ein Alkohol ein Nucleosid ist. ATP (III) ist ein Beispiel für Typ (a), DPN (IV) für Typ (b).



Aus den Formeln (III) und (IV) sieht man nun sofort drei Aufgaben, die bei der Synthese von Nucleotid-Coenzymen zu lösen sind: 1. die Darstellung der Nucleoside, 2. deren Phosphorylierung und Polyphosphorylierung und 3. die ester-artige Verknüpfung zweier verschiedener Molekülen durch einen Pyrophosphat-Rest. Für 1. und teilweise auch für 2. besaßen wir die Lösung bereits aus den eben beschriebenen Untersuchungen, und ich werde deshalb hier nur die Polyphosphorylierung und die Synthese unsymmetrischer Diester der Pyrophosphorsäure diskutieren.

Ausgehend vom Dibenzyl-phosphorsäure-chlorid besteht der einfachste und direkteste Weg zu Pyrophosphaten in einer Reaktion zwischen jenem und dem Salz eines Phosphorsäure-diesters. Mit Hilfe der verschiedenen Verfahren zur teilweisen oder vollständigen Entfernung der Benzyl-Gruppen kommt man so zu Estern der Pyrophosphorsäure und durch einfache Fortsetzung der Synthese auch zu Mono- oder Diestern von Polyphosphorsäure:



Auf diese einfache Weise gelang uns erstmalig die Total-synthese von Adenosin-5'-pyrophosphat (ADP) und Adenosin-5'-triphosphat (ATP)²⁰⁾. Die Ausbeuten der ersten Synthesen waren zwar gering, doch wurden die Gründe da-

für klar, als sich durch die Bemühung, andere und bessere Methoden zu finden, unsere Kenntnis der Eigenschaften und Reaktionsweisen von Pyrophosphorsäure-estern erweiterte. Vollkommen veresterte Pyrophosphate sind sehr labile Verbindungen. Sie phosphorylieren Amine und Alkohole und neigen zu Austauschreaktionen mit anderen Anionen. Z. B. reagiert Tetra-phenyl-pyrophosphat in Gegenwart einer Base schon bei 0 °C mit Dibenzyl-phosphorsäure sehr rasch unter Bildung von Tetra-benzyl-pyrophosphat und Diphenyl-phosphorsäure²¹⁾. Dabei handelt es sich wahrscheinlich um eine zweistufige nucleophile Substitution, deren erster Schritt in der Bildung des unsymmetrischen Esters P(1)-Diphenyl-P(2)-dibenzyl-pyrophosphat besteht. Dieses Verhalten scheint für Pyrophosphate sowie gemischte Anhydride aus Phosphorsäure und einer anderen Säure allgemeingültig zu sein. In seiner einfachsten Form kann man es folgendermaßen beschreiben: bilden zwei Säuren A und B ein Anhydrid AB, und wird dieses mit dem Anion einer Säure C zusammengebracht, so tritt die Reaktion $AB + C \rightarrow BC + A$ ein, wenn A stärker ist (d. h. ein stabileres Anion bildet) als B und C. Hauptsächlich dadurch ist die geringe Ausbeute bei der eben erwähnten Synthese von ADP und ATP zu erklären, denn die hier zunächst entstehenden vollständig veresterten Polyphosphate unterliegen derartigen Austauschreaktionen, und es entstehen komplexe, schwer zu trennende Stoffgemische. Die Tendenz, so zu reagieren, ist bei nur teilweise veresterten Polyphosphaten sehr viel weniger ausgeprägt (entsprechend sind sie auch weniger wirksame Phosphorylierungsmittel), und man kann daher die Phosphatchlorid-Methode zur Synthese von Polyphosphaten durch die Verwendung des Salzes eines Phosphorsäure-monoesters als Kondensationspartner beträchtlich verbessern. Auf diese Weise gelang uns die Totalsynthese der Nucleotid-Coenzyme Flavin-Adenin-Dinucleotid (FAD)²²⁾, Uridin-diphosphoglucose (UDPG)²³⁾ und Uridin-diphosphogalactose (UDPGal)²³⁾ ebenso wie eine verbesserte Synthese von ADP und ATP.

Die eben erwähnte Austauschreaktion von Polyphosphaten ist von besonderer Bedeutung: Ich bezweifle nicht, daß hauptsächlich auf diesem Wege die in der Natur vorkommenden Polyphosphate entstehen. Dafür ließen sich zahlreiche Beispiele anführen, doch mag es genügen, an die von *Kornberg*²⁴⁾ beschriebene enzymatische Synthese von FAD aus Riboflavin-phosphat und ATP zu erinnern. Interessant ist, daß die Natur in solchen Fällen Monoester der Polyphosphorsäure verwendet, wogegen die entsprechende Reaktion im Laboratorium nur bei vollkommener Veresterung leicht verläuft. Vermutlich hat also das Enzym der lebenden Zelle eine ähnliche Wirkung auf das Polyphosphat wie sie durch vollständige Veresterung hervorgerufen werden kann. Der labilisierende Einfluß des Enzyms könnte durchaus der Labilisierung des endständigen Phosphat-Restes von ATP gleichen, die wir bei der Bildung einer Einschlußverbindung aus β-Cyclodextrin und ATP beobachteten²⁵⁾. Wenn dies so ist, ergibt sich hier eine neue Möglichkeit, Probleme der Enzymwirkung und -spezifität zu studieren. Im Laboratorium haben sich Austauschreaktionen vollkommen veresterter Pyrophosphate zur Synthese von Coenzymen allerdings nicht als besonders braubar erwiesen, denn sie lassen sich durch die extreme Labilität der anfänglich entstehenden Zwischenprodukte nicht in eine gewünschte Richtung lenken.

²¹⁾ H. S. Mason u. A. R. Todd, ebenda 1951, 2267.

²²⁾ S. M. H. Christie, G. W. Kerner u. A. R. Todd, Nature [London] 170, 3669 [1952]; J. chem. Soc. [London] 1954, 46.

²³⁾ A. M. Michelson u. A. R. Todd, ebenda 1956, 3459.

²⁴⁾ H. Schrecker u. A. Kornberg, J. biol. Chemistry 182, 795 [1950].

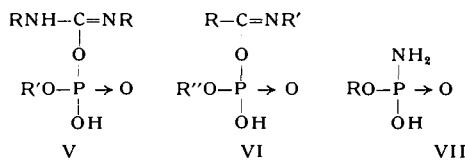
²⁵⁾ F. Cramer u. A. R. Todd, unveröffentl.

Außer den durch Austausch bedingten Schwierigkeiten hat das Phosphatchlorid-Verfahren auch noch den Nachteil, daß bei Nucleosid-phosphat-chloriden ein Schutz der freien Zucker-hydroxy-Gruppen durch Acylierung oder Alkylierung erforderlich ist. Weiterhin kann man nicht in hydroxyl-haltigen Lösungsmitteln arbeiten, da Phosphatchloride durch Alkohole und Wasser leicht zersetzt werden. Wir haben infolgedessen viel Mühe darauf verwandt, für die Synthese von Pyrophosphaten aus Phosphaten Reagenzien zu finden, bei denen der Schutz von Hydroxy-Gruppen nicht notwendig ist, und mit denen man auch in Gegenwart von Wasser arbeiten kann, denn Nucleotide lassen sich am leichtesten in polaren, insbesondere wäßrigen Lösungsmitteln handhaben. Das hieß also, Verbindungen suchen, die leichter mit Säuren unter Anhydridbildung reagieren als mit Wasser. Die erste Gruppe von Substanzen, die wir erfolgreich verwenden konnten, waren Dialkyl- und Diaryl-carbodiimide ($RN=C=NR'$)²⁶⁾, unter ihnen vor allem Dicyclohexyl-carbodiimid. Sie reagieren glatt mit Phosphorsäure-mono- und -diestern unter Bildung von Di- und Tetraestern der Pyrophosphorsäure, und sie tun dies – im Überschuß angewendet – sogar in Gegenwart mäßiger Mengen Wassers. Die Reaktion verläuft in polaren und unpolaren Medien gleich gut, und obwohl ihr Mechanismus nicht im einzelnen untersucht worden ist, besteht der erste Schritt doch ziemlich sicher in einer Anlagerung des Phosphates an das Carbodiimid, wobei sich ein Addukt (V) bildet, das durch den Angriff eines zweiten Phosphat-Ions in Pyrophosphat und Dialkyl-harnstoff zerfällt. Die Gesamtreaktion verläuft sehr schnell, und es ist nicht möglich, sie auf der Stufe des Adduktes anzuhalten. Deshalb ist sie zwar für die Darstellung symmetrischer Pyrophosphate nahezu ideal, läßt sich aber nur mit geringem Erfolg zur Gewinnung unsymmetrischer Pyrophosphate verwenden, denn man erhält bei der Umsetzung zweier verschiedener Phosphate ein Gemisch aller möglichen symmetrischen und unsymmetrischen Pyrophosphate, das oft nur mit größten Schwierigkeiten in seine Komponenten zu zerlegen ist. Trotz dieses Nachteiles gelang uns mit Hilfe der Carbodiimid-Reaktion die Darstellung von UDPG²⁷⁾ und einiger Nucleosid-polyphosphaten sowie kürzlich die Totalsynthese von DPN und Triphospho-pyridin-nucleotid (TPN)²⁸⁾. Es ist bemerkenswert, daß bei der DPN-Synthese aus Nicotinamid-nucleotid und Adenosin-5'-phosphat mit Dicyclohexyl-carbodiimid nur sehr wenig Di-(nicotinamid-nucleosid-5')-pyrophosphat entsteht und dafür das erwünschte unsymmetrische DPN in entsprechend größerer Ausbeute. Dieses unerwartet günstige Ergebnis könnte, obwohl man seine Ursache noch nicht genau kennt, für Carbodiimid-Reaktionen charakteristisch sein, an denen dipolar-ionische Moleküle beteiligt sind, denn ähnliches wurde von Kennedy²⁹⁾ bei der Darstellung von Cytidin-diphosphat-cholin beobachtet.

Neben den Carbodiimid sind einige weitere Verbindungen, vor allem Ketenimide, Cyanamide und Dialkyl-cyanamide, untersucht worden, die zwar normalerweise etwas weniger glatt reagieren, jedoch in derselben Weise wirken und in gewissen Fällen auch eine praktische Bedeutung haben. Sie alle besitzen wie Carbodiimid den Nachteil, ein Gemisch von Reaktionsprodukten zu liefern, wenn man sie zur Synthese unsymmetrischer Pyrophosphate verwendet. Dialkyl-cyanamide sind vor allem für Umsetzungen in wäßriger Lösung geeignet, weil sie gegen Hydrolyse bedeutend beständiger sind als Carbodiimide³⁰⁾.

²⁶⁾ H. G. Khorana u. A. R. Todd, J. chem. Soc. [London] 1953, 2257.
²⁷⁾ G. W. Kenner, A. R. Todd u. R. F. Webb, ebenda 1954, 2843.
²⁸⁾ N. A. Hughes, G. W. Kenner u. A. R. Todd, ebenda 1957, 3733.
²⁹⁾ E. P. Kennedy u. S. B. Weiss, J. Amer. chem. Soc. 77, 250 [1955].
³⁰⁾ G. W. Kenner, C. B. Reese u. A. R. Todd, J. chem. Soc. [London], 1958, 546.

Wir haben viel Mühe darauf verwandt, zur Darstellung unsymmetrischer Ester von Pyrophosphaten andere Reagenzien zu finden, mit denen sich die Verschwendungs kostbaren Materials und die unbedeute Aufbereitung von Substanzgemischen am Ende der Reaktion vermeiden läßt. Ich



möchte kurz zwei Methoden erwähnen, die sich ergeben haben. Die erste arbeitet mit Imidoyl-phosphaten (VI)³¹⁾, die auf mehreren Wegen präparativ zugänglich sind. Sie haben eine gewisse Ähnlichkeit mit den in der Natur vorkommenden Enolphosphaten, reagieren rasch mit Phosphat-Anionen unter Bildung von Pyrophosphaten; leider aber tritt in polaren Lösungsmitteln ein Austausch zwischen Phosphat und Imidoyl-phosphat ein, und man erhält dann wieder ein Gemisch von Reaktionsprodukten. Das zweite Verfahren verwendet Monoester der Phosphoramidsäure (VII), die leicht mit Phosphorsäure zu Pyrophosphaten reagieren³²⁾. Es ist hervorragend zur Synthese von Polyphosphorsäure-monoestern (z. B. ADP, ATP) brauchbar, benutzt man es aber zur Darstellung von Pyrophosphäurediestern, so entstehen wieder Gemische aus symmetrischen und unsymmetrischen Verbindungen.

Wir suchen also immer noch nach einer idealen Methode zur Synthese unsymmetrischer Pyrophosphate, obwohl wir mit den fünf genannten Verfahren einen Punkt erreicht haben, von dem aus die Darstellung beliebiger Nucleotid-Coenzyme mit der sicheren Aussicht auf Erfolg möglich ist. Wir haben an den Methoden der Pyrophosphat-Bildung, an ihrem Verhalten und dem gemischter Anhydride deshalb ein so großes Interesse, weil in den Eigenschaften derartiger Verbindungen das Geheimnis vieler biologischer Vorgänge verborgen liegt. Es ist vielleicht bemerkenswert, daß wir auf der Suche nach neuen Verfahren und Reagentien uns in mancher Weise immer mehr den Methoden der Natur nähern, nicht nur durch das Arbeiten im wäßrigen Medium, sondern auch indem Zwischenprodukte unserer Synthesen Ähnlichkeit mit reaktionsfähigen Phosphorsäure-Derivaten haben, die, wie z. B. Enol-phosphate, in lebenden Organismen weit verbreitet sind.

Nucleotide stehen heute mit an erster Stelle unter den Objekten chemischer, biochemischer und biologischer Forschung und neue Ausblicke eröffnen sich, die bald zu einem tieferen Verständnis der lebenden Zelle führen werden als es vor nur wenigen Jahren möglich schien. Wir haben noch einen weiten Weg zu gehen, aber wenn unsere Untersuchungen ein Weniges zu solch tieferem Verständnis beitragen, so sind meine Mitarbeiter und ich mehr als befriedigt. Ich schließe meine Arbeitskollegen hierin ausdrücklich ein, denn die Arbeiten, von denen ich zusammenfassend berichtet habe, wären ohne die unermüdlichen Anstrengungen einer großen Zahl hervorragender und begeisterter Studenten und Mitarbeiter, unter denen ich vor allem Lythgoe, Baddiley, Atherton, Kenner, Michelson, Brown, Clark und Webb nennen möchte, nicht möglich gewesen. Die Zusammenarbeit mit ihnen war eine Freude, und ihnen allen schulde ich große Dankbarkeit.

(Übersetzt von Dipl.-Chem. H. Grünwald, Freiburg/Brsg.)

Eingegangen am 9. Januar 1958 [A 862]

³¹⁾ F. R. Atherton, A. L. Morrison, R. J. Creely, G. W. Kenner, A. R. Todd u. R. F. Webb, Chem. Industries 1955, 1183.

³²⁾ V. M. Clark, G. W. Kirby u. A. R. Todd, J. chem. Soc. [London] 1957, 1497.