

# Antibiotica als Hemmstoffe der Nucleinsäure- und Proteinsynthese<sup>[1]</sup>

VON G. HARTMANN, W. BEHR, K.-A. BEISSNER, K. HONIKEL UND A. SIPPEL<sup>(\*)</sup>

Die zur Gruppe der Rifamycine, Actinomycine, Chromomycine und Anthracycline gehörenden Antibiotica haben sich als spezifische Hemmstoffe der DNS-gesteuerten RNS-Synthese<sup>[2]</sup> *in vitro* erwiesen. Im Streptomycin, Chloramphenicol und Puromycin stehen darüber hinaus Antibiotica zur Verfügung, die spezifisch Teilschritte der Eiweißsynthese unterbinden können. Die Untersuchung der Wirkungsweise solcher Substanzen kann uns zu einem tieferen Verständnis der Übertragung der Erbinformation verhelfen.

## 1. Einführung

Vor sieben Jahren fanden Reich, Franklin, Shatkin und Tatum<sup>[3]</sup>, daß kleine Konzentrationen des Antibiotikums Actinomycin in Gewebekulturzellen die RNS-Synthese selektiv unterdrücken. Die DNS- und Proteinsynthese laufen dagegen zunächst noch weitgehend unverändert ab. Bei dem intensiven Bemühen um die Aufklärung der Nucleinsäure- und Proteinsynthese fand diese Entdeckung großes Interesse, hatten doch spezifische Inhibitoren auch zur Aufklärung der einzelnen Reaktionsschritte anderer bedeutsamer Stoffwechselketten entscheidend beigetragen.

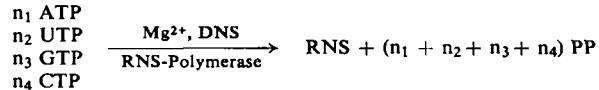
In der Zwischenzeit hat man sehr viele Antibiotica als Hemmstoffe der Vorgänge, die zur Ausprägung der genetischen Information führen, erkannt<sup>[4, 5]</sup>. Diese Prozesse unterscheiden sich von den üblichen Enzymreaktionen durch die Beteiligung informationstragender Matrizen. Dementsprechend findet man unter den Inhibitoren dieser Reaktionen nicht nur Substanzen, die das Enzymprotein angreifen oder substratähnliche Antimetaboliten, sondern auch Inaktivatoren der Matrize. Dies wurde mit vielen Experimenten *in vitro* belegt. Die hier behandelten Beispiele beschränken

sich auf Antibiotica mit bekannter chemischer Struktur, welche direkt die enzymatischen Polykondensationsprozesse hemmen.

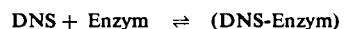
## 2. Hemmung der Nucleinsäuresynthese

### 2.1. Wirkungsweise der RNS-Polymerase

Der erste Schritt der Übertragung der Erbinformation, die in der Basenfolge der DNS enthalten ist, auf die Proteinsynthese besteht in der Bildung einsträngiger RNS. Hierzu werden Ribonucleosidtriphosphate an der DNS als Matrize unter der katalytischen Wirkung des Enzyms RNS-Polymerase (EC 2.7.7.6) zu RNS polykondensiert, die in ihrer Basenfolge der DNS-Matrize entspricht<sup>[6]</sup>.



Versuche vornehmlich mit RNS-Polymerase aus *Escherichia coli* haben ergeben, daß die Reaktion in mehreren Teilschritten abläuft<sup>[7-10]</sup>. Zunächst lagert sich das Polymeraseprotein in einer leicht reversiblen Weise an die Nucleinsäure an. Diese kann ein- oder doppelsträngig sein (Abb. 1a).



An doppelsträngiger DNS beginnt die Synthese nach einer stark temperaturabhängigen Verzögerungsphase. Offenbar muß sich die DNS-Helix lokal auftrennen („schmelzen“) (Abb. 1b). Mit einsträngiger DNS läuft die Reaktion sofort an.

Zum Start der Reaktion ist eine verhältnismäßig hohe Purinnucleosidtriphosphat-Konzentration notwendig. Es bildet sich ein stabiler DNS-Enzym-Nucleotidkomplex (Abb. 1c). Ob hierbei schon die Synthese

[6] Zusammenfassend bei P. Chambon, Bull. Soc. Chim. biol. 50, 349 (1968).

[7] J. Richardson, J. molecular Biol. 21, 83 (1966).

[8] D. Anthony, E. Zeszotek u. D. Goldthwait, Proc. nat. Acad. Sci. USA 56, 1026 (1966).

[9] E. Fuchs, R. Millette, W. Zillig u. G. Walter, European J. Biochem. 3, 183 (1967).

[10] G. Walter, W. Zillig, P. Palm u. E. Fuchs, European J. Biochem. 3, 194 (1967).

[\*] Prof. Dr. G. Hartmann, Dr. W. Behr, Dr. K.-A. Beissner, Dr. K. Honikel und Dipl.-Biol. A. Sippel  
Institut für Biochemie der Universität  
87 Würzburg, Röntgenring 11

[1] Dieser Aufsatz liegt einem Vortrag zugrunde, der auf dem Chemietag bei der Tagung der Gesellschaft Deutscher Naturforscher und Ärzte in Heidelberg am 8. Okt. 1968 gehalten wird.

[2] In dieser Arbeit werden folgende Abkürzungen verwendet: DNS = Desoxyribonucleinsäure; RNS = Ribonucleinsäure; tRNS = Transfer-Ribonucleinsäure; mRNA = messenger-Ribonucleinsäure; GDP, ATP, UTP, GTP, CTP = 5'-Ribonucleosiddi- bzw. -triphosphate des Guanins, Adenins, Uracils, Cytosins; dATP, dTTP, dGTP, dCTP = 5'-Desoxyribonucleosidtriphosphate des Adenins, Thymins, Guanins, Cytosins; PP = Pyrophosphat; Poly-d(A-T), Poly-d(DA-P-T) = doppelsträngige DNS, deren Einzelstränge die Basensequenz -Adenin-Thymin- bzw. -2,6-Diaminopurin-Thymin- haben; Poly-dGdC, Poly-dIdC = doppelsträngige DNS, die aus den Einzelsträngen Poly-desoxyguanylsäure, Polydesoxycytidylsäure bzw. Polydesoxyinosinsäure aufgebaut ist; FM = N-Formyl-methionyl-; CCA = Trinucleotid Cytidyl(3' → 5')cytidyl(3' → 5')adenosin.

[3] E. Reich, R. Franklin, A. Shatkin u. E. Tatum, Science (Washington) 134, 556 (1961).

[4] Vgl. auch B. Newton u. P. Reynolds: Biochemical Studies of Antimicrobial Drugs (16th Symposium, Soc. Gen. Microbiol. Cambridge). Cambridge University Press, Cambridge 1966.

[5] Zusammenfassend in: D. Gottlieb u. P. Shaw: Antibiotics. Springer-Verlag, Berlin 1967, Bd. 1 und 2.

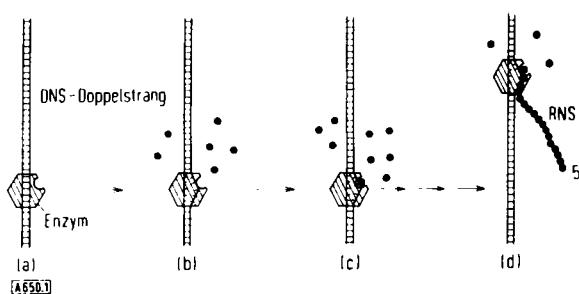
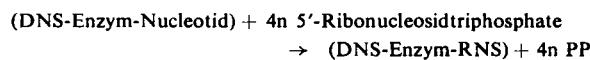


Abb. 1. Start der DNS-gesteuerten RNS-Polymerase am DNS-Doppelstrang. a) Anlagerung des Enzyms an die DNS; b), „Schmelzen“ der DNS; c) DNS-Enzym-Nukleotidkomplex; d) Polykondensation zur RNS; • = Ribonucleotide.

eines kurzen RNS-Abschnitts stattfindet, konnte bisher noch nicht mit Sicherheit festgestellt werden.



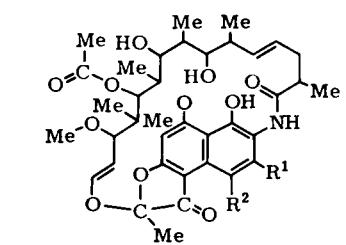
Nach Zugabe der übrigen Nucleosidtriphosphate läuft die Synthese der RNS unter Freisetzung von Pyrophosphat ab, wobei das Enzym an der DNS-Matrize entlanggleitet (Abb. 1d).



Es entsteht ein DNS-Enzym-RNS-Komplex<sup>[11]</sup>, der unter geeigneten Bedingungen dissoziiert; der Zerfall kann für die Gesamtreaktion geschwindigkeitsbestimmend sein. In vivo wird die Freisetzung der gebildeten RNS vielleicht durch die sich anschließende Proteinsynthese beschleunigt<sup>[12]</sup>.

## 2.2. Rifamycine als Enzymgifte

Rifamycin B (*1a*), seine chemisch modifizierten Derivate [13-15] [z.B. (*1b*)] und die ähnlich gebauten Streptovaricine [16] gehören zu den stärksten Hemmstoffen der RNS-Polymerase aus *E. coli*. Schon eine Konzentration von  $3 \cdot 10^{-8}$  M Rifampicin (*1b*) genügt, um die Enzymaktivität in vitro auf die Hälfte herabzusetzen.



$$(Ia), R^1 = H, R^2 = O-\text{CH}_2\text{-COOH}$$

$$(Ib), R^1 = -\text{CH}=\text{N}-\text{N}-\text{CH}_2, R^2 = \text{OH}$$

(Tabelle 1). Die Wirkung des Antibioticums ist unabhängig von der Basenzusammensetzung und der Sekundärstruktur der als Matrize eingesetzten DNS [17-19].

Der Inhibitor wirkt speziespezifisch, denn die RNS-Polymerase aus Rattenleber oder aus Asciteszellen wird nicht gehemmt [19, 20]. Hieraus ergeben sich – etwa für die Virusforschung [18, 20a] – interessante Anwendungsmöglichkeiten.

Tabelle 1. Antibioticum-Konzentrationen für die 50-proz. Hemmung der DNS-gesteuerten RNS- und DNS-Polymerase aus *E. coli*, Thymus-DNS-Konzentration in den RNS-Polymeraseversuchen 3-10<sup>-4</sup> M, in den DNS-Polymeraseversuchen 1.3·10<sup>-4</sup> M [17, 38, 44].

Antibioticum	50 % Hemmung der	
	DNS-Polymerase ( $\text{M} \cdot 10^5$ )	RNS-Polymerase ( $\text{M} \cdot 10^5$ )
Rifampicin	keine Hemmung	0,003
Actinomycin X <sub>2</sub>	2	0,03
Echinomycin	3	0,3
Chromomycin A <sub>3</sub>	2	0,03
Olivomycin	0,6	0,2
Mithramycin	3	0,2
<b>Anthracycline:</b>		
Ruticulomycin A	0,2	0,5
Nogalamycin	0,5	0,5
Cinerubin A und B	3	1
Daunomycin	2	3
Isochinchocyclin	5	4

Die Rifamycine können ihre Hemmwirkung nur am freien Enzymprotein voll entfalten. Durch DNS wird das Enzym bereits in gewissem Umfang vor dem Angriff des Antibioticums geschützt, vorausgesetzt die Polymerase hatte genügend Zeit, mit der DNS zu reagieren (vgl. Abb. 1b). Bedeutend stärker und rascher ist der Schutz durch die Kombination von DNS mit einem oder mehreren Nucleosidtriphosphaten. Auf den hierbei gebildeten Startkomplex (Abb. 1c) kann das Antibioticum offenbar viel weniger einwirken. Setzt man es nach dem Start der Polykondensation mit allen vier Ribonucleosidtriphosphaten zu, so beobachtet man bis zum Ende der Synthese und der Dissoziation der Reaktionspartner keine Hemmung. Die Polykondensation wird also nur durch die Hemmung des Starts der Reaktion verhindert [19, 21].

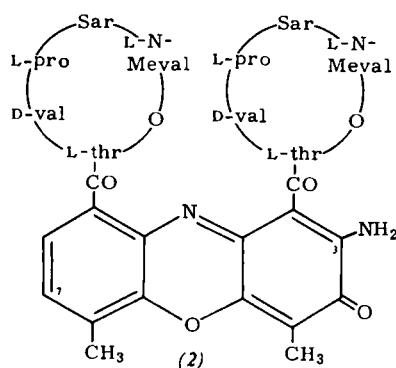
Damit stehen uns in den Rifamycinen sehr selektive Hemmstoffe für den Start der DNS-gesteuerten RNS-Polymerase von Mikroorganismen zur Verfügung<sup>[18, 19, 21]</sup>. In gleicher Weise wirken die Streptovaricine<sup>[22-24]</sup>.

- [17] *G. Hartmann, K. Honikel, F. Knüsel u. J. Nüesch*, Biochim. biophysica Acta 145, 843 (1967).
  - [18] *K. Honikel, A. Sippel u. G. Hartmann*, Hoppe-Seylers Z. physiol. Chem. 349, 957 (1968).
  - [19] *H. Umezawa, S. Mizuno, H. Yamazaki u. K. Nitta*, J. Antibiotics (Tokyo), Ser. A 21, 234 (1968).
  - [20] *W. Wehrli, J. Nüesch, F. Knüsel u. M. Staehelin*, Biochim. biophysica Acta 157, 215 (1968).
  - [20a] *H. Fromageot u. N. Zinder*, Proc. nat. Acad. Sci. USA 61 (1968), im Druck.
  - [21] *A. Sippel u. G. Hartmann*, Biochim. biophysica Acta 157, 218 (1968).
  - [22] *S. Mizuno, H. Yamazaki, K. Nitta u. H. Umezawa*, Biochem. biophys. Res. Commun. 30, 379 (1968).
  - [23] *S. Mizuno, H. Yamazaki, K. Nitta u. H. Umezawa*, Biochim. biophysica Acta 157, 322 (1968).
  - [24] *H. Yamazaki, S. Mizuno, K. Nitta, R. Utahara u. H. Umezawa*, J. Antibiotics (Tokyo), Ser. A 21, 63 (1968).

## 2.3. Inaktivatoren der Matrize

### 2.3.1. Actinomycin

In-vitro-Versuche mit den Actinomycinen (2)<sup>[25]</sup> und dem strukturell verwandten Echinomycin<sup>[26]</sup> haben diese Antibiotica schon vor einigen Jahren als starke



Inhibitoren der DNS-abhängigen RNS-Polymerasereaktion erwiesen<sup>[27, 28]</sup> (Tabelle 1). Damit war die spezifische Unterdrückung der RNS-Synthese in vivo durch Actinomycin einleuchtend erklärt. Seine Hemmwirkung ist von der Herkunft des Polymerasepräparats unabhängig<sup>[29-31]</sup>. Dies ist ein Hinweis darauf, daß ein von der Proteinnatur unabhängiger Schritt der Reaktion blockiert wird.

Actinomycin beeinflußt die Anlagerung des Enzyms an die DNS (Abb. 1a) selbst in einer Konzentration noch nicht, bei der die Gesamtreaktion schon fast vollständig blockiert wird<sup>[7]</sup>. Erst ein Folgeschritt muß Angriffspunkt des Antibioticums sein.

Für eine Reaktion des Antibioticums mit der DNS spricht die Beobachtung, daß bei einem DNS-Überschuß die Reaktion durch eine konstante Menge Actinomycin um so weniger gehemmt wird, je höher die DNS-Konzentration ist, denn in diesem Fall kann das Enzym mehr und mehr mit DNS reagieren, die frei von Antibioticum ist<sup>[32]</sup>.

Auf die DNS als Wirkort des Actinomycins deutet auch die Beobachtung, daß die RNS-Polymerasereaktion an RNS als Matrize durch das Antibioticum nicht gestört wird. Ferner wird die Hemmwirkung stark von der Sekundärstruktur der DNS beeinflußt. An denaturierter, also weitgehend ungeordneter DNS, wird nämlich die RNS-Synthese durch Actinomycin kaum behindert.

[25] H. Brockmann, Fortschr. Chem. org. Naturstoffe (Wien) 18, 1 (1960).

[26] W. Keller-Schierlein, M. Mihailović u. V. Prelog, Helv. chim. Acta 42, 305 (1959).

[27] Zusammenfassung über die biologische Wirkungsweise der Actinomycine: E. Reich u. I. Goldberg in J. Davidson u. W. Cohn: Progress in Nucleic Acid Research. Academic Press, New York 1964, Bd. 3, S. 183.

[28] D. Ward, E. Reich u. I. Goldberg, Science (Washington) 149, 1259 (1965).

[29] G. Hartmann u. U. Coy, Angew. Chem. 74, 501 (1962); Angew. Chem. internat. Edit. 1, 514 (1962).

[30] I. Goldberg u. M. Rabinowitz, Science (Washington) 136, 315 (1962).

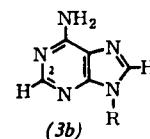
[31] K. von der Helm u. W. Zillig, Hoppe-Seylers Z. physiol. Chem. 348, 902 (1967).

[32] G. Hartmann, U. Coy u. G. Kniese, Hoppe-Seylers Z. physiol. Chem. 330, 227 (1963).

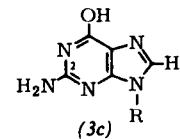
Überdies hängt die biochemische Wirkung des Actinomycins stark von der Basenzusammensetzung der Nucleinsäure ab. Je niedriger der Guaningehalt der DNS ist, desto höhere Antibioticum-Konzentrationen sind zur Hemmung nötig<sup>[27]</sup>. Besonders aufschlußreich waren Versuche mit synthetischen, doppelsträngigen Polydesoxynucleotiden wie Poly-d(A-T), Poly-d(DAP-T) und Poly-dGdC. Auch diese synthetischen Produkte werden sequenzgetreu durch die Polymerase abgelesen. Es zeigt sich, daß die RNS-Synthese an Poly-d(A-T) überhaupt nicht durch Actinomycin beeinflußt wird, während sie an Poly-dGdC und Poly-d(DAP-T) vollkommen unterdrückt wird. Das Fehlen der Hemmung bei Poly-d(A-T) im Gegensatz zu



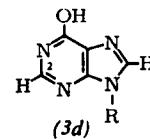
(3a)



(3b)



notwendig



nicht notwendig

für die Wirkung des Antibioticums (R = Desoxyribose)

(3a): 2,6-Diaminopurinnucleosid; (3b): Desoxyadenosin; (3c): Desoxyguanosin; (3d): Desoxyinosin.

Poly-d(DAP-T) und Poly-dGdC beweist, daß allein das Vorhandensein einer 2-Aminogruppierung in der Matrize wie in (3a) und (3c) über die Wirkung des Antibioticums entscheidet<sup>[33]</sup>.

Die Wirkung des Actinomycins über den Angriff an der DNS läßt sich durch die Hypothese veranschaulichen, daß der Inhibitor das Fortschreiten der Synthese längs der Matrize über die Stellen, mit denen er reagiert hat, verhindert. Damit steht in Einklang, daß Actinomycin die Polymerasereaktion augenblicklich, selbst wenn es erst nach Beginn der Reaktion zugesetzt wird, unterbindet<sup>[34]</sup> und zur Verkürzung der synthetisierten RNS-Ketten führt<sup>[35]</sup>.

### 2.3.2. Chromomycin

Chromomycin A<sub>3</sub> (4)<sup>[36]</sup> und die mit ihm eng verwandten Antibiotika Olivomycin und Mithramycin<sup>[5]</sup> erwiesen sich als beinahe ebenso starke Hemmstoffe der RNS-Polymerase wie Actinomycin<sup>[37-39]</sup> (Tabelle 1).

[33] A. Cerami, E. Reich, D. Ward u. I. Goldberg, Proc. nat. Acad. Sci. USA 57, 1036 (1967).

[34] G. Hartmann, Habilitationsschrift, Univers. Würzburg, 1962.

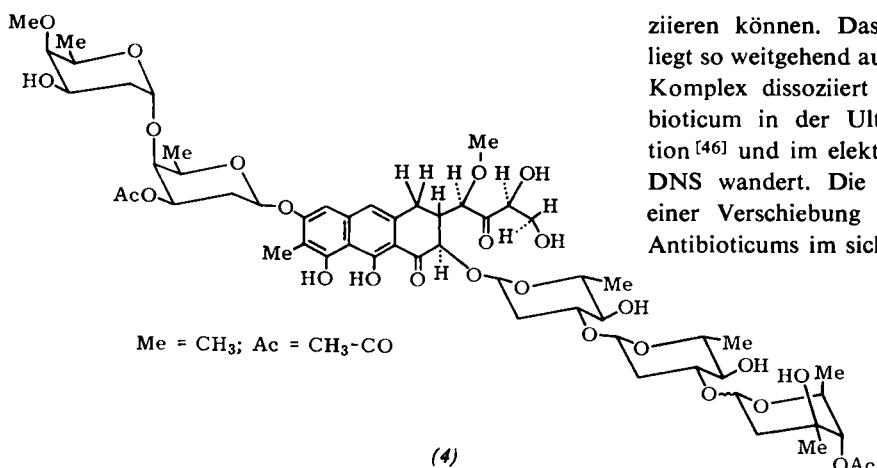
[35] U. Maitra, Y. Nakata u. J. Hurwitz, J. biol. Chemistry 242, 4908 (1967).

[36] Y. Berlin, S. Esipov, M. Kolosov u. M. Shemyakin, Tetrahedron Letters 1966, 1643.

[37] K. Koschel, G. Hartmann, W. Kersten u. H. Kersten, Biochem. Z. 344, 76 (1966).

[38] K. Koschel, K. Honikel u. G. Hartmann in M. Girbardt: Wirkungsmechanismen von Fungiziden und Antibiotica (Internationales Symposium Reinhardtsbrunn, Mai 1966), Akademie-Verlag, Berlin 1967, S. 197.

[39] Y. Kaziro u. M. Kamiyama, J. Biochemistry (Tokyo) 62, 424 (1967).



Auch bei diesen Substanzen ist wohl die doppelsträngige DNS-Matrize der Angriffsort. Die Reaktion mit RNS als Matrize wird nämlich nicht gehemmt<sup>[28]</sup>. Dagegen hängt die Wirkung des Chromomycins wie die des Actinomycins sehr stark von der Doppelsträngigkeit und vom Guaninegehalt der DNS ab<sup>[39]</sup>. Auch hier haben Versuche mit synthetischen Polydesoxynucleotiden (Poly-d(A-T), Poly-d(DAP-T), Poly-dGdC und Poly-dIdC) bewiesen, daß die 2-Aminopurin-Gruppierung in der Matrize für die Wirkung von Antibiotica dieser Gruppe unbedingt notwendig ist<sup>[28, 33]</sup>. In Einklang mit der Hypothese, daß auch diese Antibiotica das Fortschreiten der Enzymreaktion längs der DNS abstoppen, beobachtet man, daß Chromomycin die laufende RNS-Synthese unmittelbar nach Zusatz hemmt<sup>[21]</sup>.

### 2.3.3. Anthracycline

Die DNS-gesteuerte RNS-Polymerasereaktion wird ferner durch die Anthracycline<sup>[40]</sup> (z.B. Daunomycin<sup>[41]</sup>) und verwandte Antibiotika (wie Isochinocyclin<sup>[42]</sup>) gehemmt. Auch hier hängt das Ausmaß der Hemmung in einer hyperbolischen Funktion von der Konzentration des Inhibitors ab<sup>[37, 43]</sup>.

Allerdings sind die Anthracycline deutlich weniger wirksam als die vorher behandelten Antibiotika (Tabelle 1). Im Gegensatz zum Actinomycin und Chromomycin blockieren die Anthracyclin-Antibiotika auch die Polymerasereaktion an RNS als Matrize. Ferner hängt ihre Wirkung meist nur wenig von der Basenzusammensetzung der DNS ab<sup>[28, 44]</sup>.

## 2.4. Blockierung der DNS

### 2.4.1. Blockierung mit Actinomycin

Eine wichtige Stütze für die Ansicht, daß Actinomycin und ähnliche Antibiotika als Matrizeninhibitoren wirken, ist die Beobachtung, daß sie mit DNS asso-

[40] H. Brockmann, Fortschr. Chem. org. Naturstoffe (Wien) 21, 121 (1963).

[41] F. Arcamone, G. Cassinelli, G. Franceschi, P. Orezzi u. R. Mondelli, Tetrahedron Letters 1968, 3353.

[42] A. Tulinsky, J. Amer. chem. Soc. 86, 5368 (1964).

[43] B. Bhuyan u. C. Smith, Proc. nat. Acad. Sci. USA 54, 56 (1965).

[44] K. Honikel, Dissertation, Universität Würzburg, 1968.

ziieren können. Das Gleichgewicht des Komplexes liegt so weitgehend auf der Seite des Assoziats und der Komplex dissoziiert so langsam<sup>[45]</sup>, daß das Antibioticum in der Ultrazentrifuge, bei der Gelfiltration<sup>[46]</sup> und im elektrischen Feld zusammen mit der DNS wandert. Die Assoziatbildung macht sich in einer Verschiebung des Absorptionsmaximums des Antibioticums im sichtbaren Bereich um etwa 20 nm

nach längeren Wellenlängen hin unter Abnahme der Extinktion bemerkbar. Die Natur der dafür verantwortlichen elektrischen Wechselwirkungen ist noch unbekannt<sup>[27]</sup>. Es ist bemerkenswert, daß Actinomycin nicht nur mit DNS, sondern auch mit deren Abbauprodukten wie Apyrimidinsäure, einfachen Oligonucleotiden und Purinnucleosiden, ja sogar mit β-Naphthalinsulfonat assoziieren kann, wobei ähnliche Veränderungen im Spektrum auftreten<sup>[27, 45, 47, 48]</sup>.

Solche Assoziate unterscheiden sich aber vor allem in der Lage des Komplexgleichgewichts und durch die wesentlich höhere Assoziations- und Dissoziationsgeschwindigkeit deutlich vom Komplex des Actinomycins mit nativer DNS<sup>[45, 49, 50]</sup>.

Wenn man annimmt, daß der Komplex aus DNS und Antibioticum die Ursache für die Hemmung der RNS-Polymerase ist, so sollte die Assoziatbildung die gleichen Besonderheiten wie die Inhibitorwirkung zeigen. Dies ist der Fall. So bildet das Antibioticum in Übereinstimmung mit den Erfahrungen bei der Polymerasereaktion mit ein- und doppelsträngiger RNS keinen Komplex<sup>[27, 45]</sup>.

Die absolute Notwendigkeit der 2-Aminopurin-Gruppierung wie in (3a) und (3c) in der DNS für die biologische Hemmwirkung findet sich auch bei der Komplexbildung des Antibioticums. Die für die Assoziation charakteristischen Veränderungen im Absorptionsspektrum treten nur mit Poly-d(DAP-T) und Poly-dGdC, nicht aber mit Poly-d(A-T) und Poly-dIdC auf<sup>[33, 51]</sup>. Versuche mit einfachen Modellverbindungen des Actinomycins haben bewiesen, daß die Spezifität für die 2-Aminopurin-Gruppierung dem Chromophor des Antibioticums zuzuschreiben ist<sup>[45]</sup>.

Alle Eigenschaften des Actinomycin-DNS-Assoziats lassen sich mit der Vorstellung verstehen, daß der Chromophor sich bei der Komplexbildung flach über oder unter ein Guanin-Cytosin-Basenpaar in die DNS-Helix einschiebt („intercalation“)<sup>[45, 51a]</sup>.

[45] W. Müller u. D. Crothers, J. molecular Biol. 35, 251 (1968).

[46] M. Liersch u. G. Hartmann, Biochem. Z. 343, 16 (1965).

[47] K.-A. Beißner, Dissertation, Universität Würzburg, 1968.

[48] W. Kersten, Biochim. biophysica Acta 47, 610 (1961).

[49] M. Gellert, C. Smith, D. Neville u. G. Felsenfeld, J. molecular Biol. 11, 445 (1965).

[50] W. Müller u. H. Spatz, Z. Naturforsch. 20b, 842 (1965).

[51] E. Reich in M. Locke: Role of Chromosomes in Development. Academic Press, New York 1964, S. 73.

[51a] M. Waring, Hoppe-Seylers Z. physiol. Chem. 349, 954 (1968).

Für die biologische Hemmwirkung ist wohl die Dissoziationsgeschwindigkeit des Komplexes ausschlaggebend. Je rascher das Assoziat in freie DNS und Antibioticum zerfallen kann, desto kürzere Zeit wird die RNS-Polymerase an der Synthese längs der DNS-Matrize gehindert. Man beobachtet, daß DNS-Komplexe mit biologisch inaktiven Actinomycinderivaten sehr rasch dissoziieren, während die Assoziate mit wirksamen Actinomycinen nur langsam zerfallen<sup>[45]</sup>. Die etwa zehnmal höhere Dissoziationsgeschwindigkeit des Actinomycinkomplexes mit denaturierter DNS ist daher wohl auch die Ursache, daß das Antibioticum die RNS-Polymerase an denaturierter DNS viel weniger hemmt als an der nativen, doppelsträngigen Form<sup>[52]</sup>.

#### 2.4.2. Blockierung mit Chromomycin

Auch beim Chromomycin weist die Fähigkeit zur Komplexbildung mit DNS auf seine Funktion als Matrizenaktivator hin<sup>[28, 52–56]</sup>. Allerdings ist hier ein Zusatz von zweiwertigen Metall-Ionen wie  $Mg^{2+}$  notwendig, wenn das DNS-Präparat nicht genügend davon enthält. Die Lage des Komplexgleichgewichts

$$\frac{[\text{Chromomycin-DNS}]}{[\text{Chromomycin}] [\text{DNS}]} = 0,2 \cdot 10^6 \text{ l/mol}$$

und die sehr geringe Dissoziationsgeschwindigkeit des Komplexes (Halbwertszeit ca. 110 min bei 20 °C) machen verständlich, daß das Antibioticum im elektrischen Feld und in der Ultrazentrifuge zusammen mit der DNS wandert. Die Bildung des Assoziats ist an einer Verschiebung des Absorptionsmaximums des Antibiotikums im sichtbaren Bereich um etwa 25 nm nach längeren Wellenlängen hin zu erkennen. Sie darf nicht mit den spektralen Veränderungen, die man bei Zusatz von zweiwertigen Schwermetall-Ionen wie  $Cu^{2+}$  beobachtet, verwechselt werden<sup>[5]</sup>. Die Natur der elektronischen Wechselwirkungen ist unbekannt.

Die Komplexbildung des Chromomycins mit DNS bedingt offenbar seine Inhibitoreigenschaften, denn sie weist die gleichen Besonderheiten auf, die man bei der Hemmung der Polymerasereaktion findet. So bildet das Antibioticum nur mit DNS, nicht mit RNS Assoziate. Der Beobachtung, daß Chromomycin die RNS-Synthese an denaturierter DNS kaum hemmt, entspricht der Befund, daß Chromomycin sich an denaturierte DNS wesentlich weniger bindet als an doppelsträngige. Besonders eindrucksvoll kann man dies mit Poly-dGdC zeigen. Im Gegensatz zum Doppelstrang vermögen die Einzelstränge Poly-dG und Poly-dC nicht mit dem Antibioticum zu reagieren<sup>[44]</sup>.

Wie bei der Inhibitorwirkung ist auch für die Komplexbildung die 2-Aminopurin-Gruppierung wie in

[52] W. Behr u. G. Hartmann, unveröffentlicht.

[53] G. Hartmann, H. Goller, K. Koschel, W. Kersten u. H. Kersten, Biochem. Z. 341, 126 (1964).

[54] W. Kersten u. H. Kersten, Biochem. Z. 341, 174 (1965).

[55] W. Behr, Dissertation, Universität Würzburg, 1967.

[56] W. Behr u. G. Hartmann, Biochem. Z. 343, 519 (1965).

(3a) und (3c) in der DNS Voraussetzung. Versuche mit synthetischen Polydesoxynucleotiden entsprachen ganz denen beim Actinomycin. Auch bei diesem Antibioticum ist dem Chromophor die Spezifität für die 2-Aminogruppierung zuzuschreiben<sup>[44, 55]</sup>.

Sicher spielt die sehr geringe Dissoziationsgeschwindigkeit des Assoziats für das Verständnis der Hemmung der RNS-Polymerase eine große Rolle. Die DNS-Komplexe von Chromomycinderivaten zerfallen jedenfalls um so rascher, je kleiner ihre enzymatische Hemmwirkung ist<sup>[52]</sup>. Der Chromomycin-DNS-Komplex zerfällt so langsam, daß er sich mit einem Gemisch aus Desoxyribonuclease (EC 3.1.4.5), Phosphodiesterase (EC 3.1.4.1) und Phosphatase (EC 3.1.3.1) zu kleineren, chromomycinhaltigen Bruchstücken (Sedimentationskoeffizient  $S_0^{20} = 2,8 \pm 0,1 \text{ S}$ ) abbauen läßt. Der Abbau bleibt bei Oligodesoxynucleotiden mit einem Guaningehalt von 33 Mol-% stehen. Nach ihrer Basenzusammensetzung sind die Bruchstücke doppelsträngig; sie enthalten im Durchschnitt auf vier Basenpaare ein gebundenes Chromomycinmolekül. Bei der Größe des Antibioticums ist dies, wie man am Modell erkennen kann, aus sterischen Gründen die obere Grenze der Beladbarkeit. Die vom Antibioticum eingehüllten Strangabschnitte sind offenbar dem Angriff der Hydrolasen entzogen<sup>[55]</sup>.

#### 2.4.3. Blockierung mit Anthracyclinen

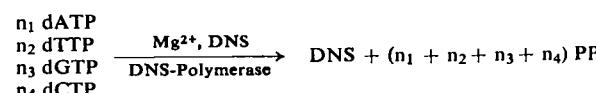
Auch die Anthracycline wirken wohl dank ihrer Assoziationsfähigkeit mit der DNS als Matrizenaktivatoren. Die Komplexbildung ist hier ebenfalls von einer Verschiebung des Absorptionsmaximums der Antibiotika im sichtbaren Bereich nach längeren Wellenlängen hin begleitet<sup>[43, 54, 57]</sup>. Messungen am Daunomycin-DNS-Komplex haben allerdings ergeben, daß das Gleichgewicht deutlich weniger weit auf der Seite des Assoziats liegt als beim Actinomycin und stark von der Ionenstärke abhängt<sup>[47, 57, 58]</sup>. Vielleicht ist dies eine Ursache für die geringere Hemmwirkung dieser Antibiotica (Tabelle 1).

Das Fehlen der DNS-Spezifität bei der enzymatischen Hemmwirkung findet sich entsprechend auch bei der Assoziatbildung wieder. Daunomycin bildet nämlich nicht nur mit DNS, sondern auch mit RNS, Oligonucleotiden und Mononucleotiden Komplexe<sup>[47, 57]</sup>.

Die geringe Abhängigkeit der Inhibitorwirkung von der Basenzusammensetzung der Matrize wird auch in der Assoziatbildung deutlich. Nogalamycin reagiert mit Poly-dGdC fast ebenso gut wie mit Poly-d(A-T)<sup>[44]</sup>.

#### 2.5. Hemmung der DNS-Polymerase

Wenn die Actinomycine, Chromomycine und Anthracycline als Matrizenaktivatoren wirken, so sollten auch andere, von einer DNS-Matrize gesteuerten Reaktionen wie etwa die DNS-Synthese durch sie gehemmt werden. Das Enzym DNS-Polymerase (EC 2.7.7.7) katalysiert entsprechend der Gleichung



[57] E. Calendi, A. Di Marco, M. Reggiani, B. Scarpinato u. L. Valentini, Biochim. biophysica Acta 103, 25 (1965).

[58] K.-A. Beißner, Diplomarbeit, Universität Würzburg, 1966.

die Polykondensation von Desoxynucleosidtriphosphaten zu DNS an einer DNS-Matrize. Die Basenfolge der synthetisierten DNS entspricht der Sequenz in der Matrize. Alle Antibiotika, die auf die RNS-Synthese durch Blockierung der DNS einwirken, hemmen auch diese Reaktion (Tabelle 1) [37, 38, 44]. Nur die Rifamycine, die nicht mit DNS assoziieren können, haben erwartungsgemäß keinen Einfluß [17].

Sehr auffallend ist, daß die basenspezifischen Hemmstoffe in vielen Fällen die DNS-Synthese erst in viel höherer Konzentration genau so stark beeinflussen wie die RNS-Synthese (Tabelle 1). Es liegt nahe, den Unterschied hierfür in der Wirkungsweise der beiden Enzyme zu suchen. Die gereinigte DNS-Polymerase synthetisiert bevorzugt an das 3'-Hydroxyende einer partiell abgebauten DNS-Helix den fehlenden Abschnitt längs des noch vorhandenen Einzelstrangs (Abb. 2). Es wird der biologisch voll aktive intakte Doppelstrang zurückgebildet [59].

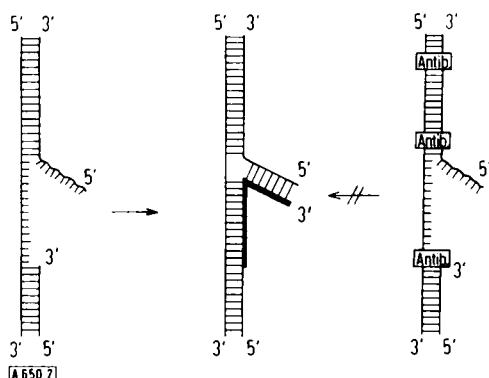


Abb. 2. Wirkungsweise der DNS-Polymerase am partiell abgebauten DNS-Doppelstrang und Blockierung der Reaktion durch Antibiotika (Antib.) wie Actinomycin oder Chromomycin [44, 59]. Verstärkt ausgezogene Linien: neu synthetisierter Strangabschnitt.

Die im Vergleich zur Hemmung der RNS-Polymerase geringe Wirkung von Actinomycin, Chromomycin oder Mithramycin läßt sich mit der Beobachtung verstehen, daß diese nur mit dem Doppelstrang stabile, langsam dissoziierende Komplexe bilden. Da das Enzym am 3'-Hydroxyende des Doppelstrangs zu arbeiten anfängt, können die Antibiotika nur den Start der Reaktion blockieren (Abb. 2). Zur Hemmung genügt nicht mehr die Assoziation mit irgendeiner Stelle des Doppelstrangs, sondern es müssen spezifisch die Enden blockiert sein. Da Antibiotika wie Mithramycin statistisch mit den Guaninresten im Doppelstrang assoziieren, ist jetzt eine wesentlich höhere Inhibitor-Konzentration nötig, um die Reaktion im gleichen Ausmaß wie die RNS-Synthese zu verringern. Die Hemmung muß vom Guaningehalt der DNS abhängen, denn beim Fehlen von Guanin im Endstück kann der Inhibitor dort nicht gebunden werden. Dies wird beobachtet [44] (Abb. 3a). Weiter ist zu erwarten, daß ein Teil der Reaktion selbst bei sehr hoher Konzentration des Antibioticums nicht unterdrückt werden kann, denn selbst in guaninreicher DNS ist ein Teil der 3'-Hydroxyenden guaninfrei.

[59] A. Kornberg in V. Koningsberger u. L. Bosch: Regulation of Nucleic Acid and Protein Biosynthesis. Elsevier, Amsterdam 1967, S. 22.

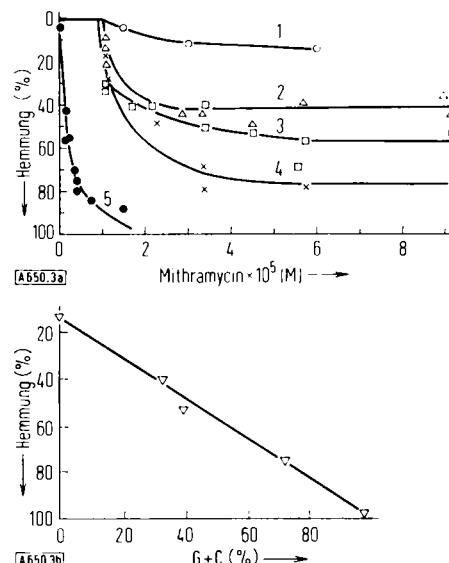


Abb. 3. a) Hemmung der DNS-Polymerasereaktion durch Mithramycin mit verschiedenen Nucleinsäuren als Matrize [44]. 1: Poly-d(A-T), 2: T2-DNS, 3: Kalbsthymus-DNS, 4: *M.-lysodeicticus*-DNS, 5: Poly-dGdC. b) Abhängigkeit der Restaktivität der DNS-Polymerase bei hoher Mithramycin-Konzentration vom Guanin + Cytosin-(G+C)-Gehalt der eingesetzten Nucleinsäure [44].

Der Anteil an guaninfreien Enden ist um so kleiner, je weniger Adenin und Thymin in der DNS enthalten sind. Daher muß das Ausmaß der nicht hemmbaren DNS-Synthese um so kleiner werden, je größer der Guaningehalt der Matrize ist. Diese Voraussagen werden vom Experiment bestätigt [44] (Abb. 3b).

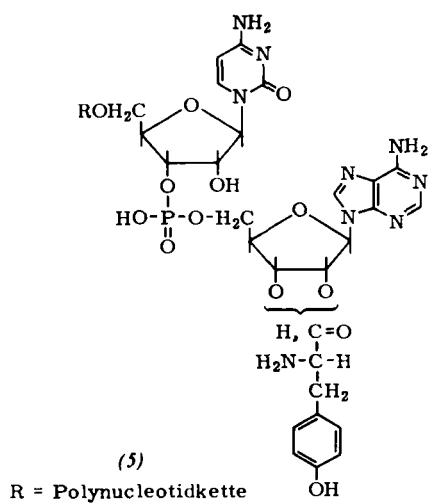
Erwartungsgemäß fehlen diese Besonderheiten bei den Antibiotika ohne ausgeprägte Basenspezifität; diese verbinden sich mit ein- und doppelsträngiger DNS gleich gut. Daher werden beide DNS-gesteuerten Polymerasereaktionen von den Anthracyclinen im gleichen Konzentrationsbereich und bei höheren Konzentrationen auch vollständig gehemmt (Tabelle 1).

### 3. Hemmung der Proteinsynthese

#### 3.1. Ablauf der Proteinsynthese

Unsere Kenntnisse über die Proteinsynthese [60] sind vor allem am zellfreien System aus *E. coli* gewonnen. In den wesentlichen Zügen treffen sie aber auch für andere Zellen zu. Hier nach läuft die Proteinsynthese an RNS-reichen Zellpartikeln, den Ribosomen, ab, die sich aus zwei Teilen aufbauen, welche durch ihren Sedimentationskoeffizienten als 30-S- und 50-S-Untereinheit (im Fall von *E. coli*) charakterisiert werden. Die Übertragung der genetischen Information wird durch die Mitwirkung der mRNS vermittelt. Außerdem sind an der Proteinsynthese noch einige nicht strukturgebundene Enzyme beteiligt. An niedermolekularen Bestandteilen ist neben einigen anorganischen Ionen vor allem GTP notwendig. Die Aminosäuren müssen in aktivierter Form als Aminoacyl-tRNS-Ester, z.B.

[60] H. Matthaei, G. Sander, D. Swan, T. Kreuzer, H. Caffier u. A. Parmeggiani, Naturwissenschaften 55, 281 (1968).



Tyrosyl-tRNA<sub>tyr</sub> (5), vorliegen. Sie lesen an den Ribosomen die im Nucleotidcode der mRNAs gespeicherte Information ab und prägen sie in der Aminosäuresequenz des sich bildenden Proteins aus. Abbildung 4 zeigt eine stark schematische Übersicht über die Teilschritte, deren enzymologische Erforschung noch nicht abgeschlossen ist.

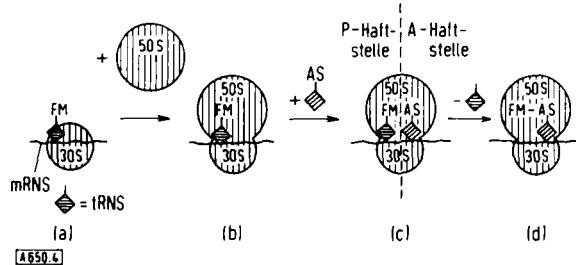


Abb. 4. Start der Proteinbiosynthese.

a) Anlagerung der *N*-Formylmethionyl-(FM)-tRNA an den Komplex aus mRNA und 30-S-Ribosomenuntereinheit; b) Anlagerung der 50-S-Ribosomenuntereinheit; c) Leseschritt durch Anlagerung einer Aminoacyl-(AS)-tRNA an die A-Haftstelle am Ribosom; d) Peptidtransfer von der an der P-Haftstelle gebundenen FM-tRNA auf die in Schritt c) angelagerte Aminoacyl-tRNA. Nach Verschiebung der gebildeten Peptidyl-(FM-AS)-tRNA auf die P-Haftstelle und der mRNA relativ zum Ribosom können sich die Vorgänge c) und d) entsprechend wiederholen.

**Startreaktion:** Zunächst lagert sich die als Starter wirkende *N*-Formylmethionyl-tRNA (FM-tRNA<sub>F</sub>) an den Komplex aus 30-S-Ribosomenuntereinheit und mRNA an. Diese Reaktion ist enzymkatalysiert und wird durch GTP gefördert [61, 62] (Abb. 4a).

**Ablesegeschritt:** An den in der Startreaktion gebildeten Komplex lagert sich die 50-S-Untereinheit an, womit das komplett funktionstüchtige 70-S-Ribosom mit einer weiteren Haftstelle für aktivierte Aminosäuren gebildet ist [63] (Abb. 4b). Die Anlagerung der Aminoacyl-tRNA an diese Haftstelle wird streng spezifisch von den Nucleotidtriplets der mRNA diktiert. Es reagieren nur solche aktivierte Aminosäuren, die mit dem abzulesenden mRNA-Abschnitt in Wechsel-

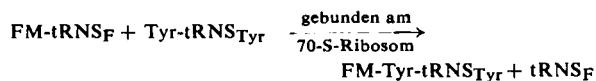
[61] M. Nomura u. C. Lowry, Proc. nat. Acad. Sci. USA 58, 946 (1967).

[62] T. Ohta, S. Sarkar u. R. Thach, Proc. nat. Acad. Sci. USA 58, 1638 (1967).

[63] M. Nomura, C. Lowry u. C. Guthrie, Proc. nat. Acad. Sci. USA 58, 1487 (1967).

wirkung treten können. Durch diesen Schritt wird die Treue der Übersetzung der genetischen Information bei der Proteinsynthese bestimmt. Damit trägt das Ribosom jetzt einen peptidähnlichen, aktivierte Rest (FM-tRNA<sub>F</sub>) und eine Aminoacyl-tRNA. Man unterscheidet am Ribosom die P-Haftstelle (Bindungsstelle der Peptidyl-tRNA) und die A-Haftstelle (Bindungsstelle der Aminoacyl-tRNA) (Abb. 4c).

**Bildung der Peptidbindung:** Jetzt folgt die enzymatische Acylierung der Aminogruppe der an der A-Haftstelle angelagerten aktivierte Aminosäure (z.B. Tyr-tRNA<sub>Tyr</sub>) durch die an der P-Haftstelle gebundene *N*-Formylmethionyl-tRNA.



Diese Reaktion wird durch die an der 50-S-Ribosomenuntereinheit lokalisierte Peptidyl-Transferase enzymatisch katalysiert. Es bildet sich hierbei die erste Peptidbindung unter Freisetzung des tRNA-Rests des Starters.

Nach Verschiebung der entstandenen Dipeptidyl-tRNA auf die Haftstelle für Peptidyl-tRNA und dem Nachrücken der mRNA können sich die Vorgänge (Ablesegeschritt und Bildung der Peptidbindung) entsprechend wiederholen. Die Peptidyl-tRNA übernimmt die Rolle der *N*-Formylmethionyl-tRNA. Es bildet sich ein langer Peptidfaden; pro Peptidbindung wird ein Molekül GTP zu GDP und Phosphat hydrolysiert [64].

**Syntheseende:** Erst ein mRNA-Abschnitt, der ein Haltsignal zum Inhalt hat, macht dem Ableseprozeß und damit auch der Peptidsynthese ein Ende. Das gebildete Protein wird von der endständigen tRNA enzymatisch abgelöst [65], und das Ribosom zerfällt wieder in seine Untereinheiten.

Es sind in den letzten Jahren zahlreiche Antibiotika gefunden worden, welche diese Prozesse an den Ribosomen unterbinden können. Viele Antibiotika lassen sich nach ihrer Wirkung auf die 30-S- oder 50-S-Ribosomenuntereinheit, auf die P- oder A-Haftstelle, oder auf die Peptidyl-Transferasereaktion unterscheiden [66–69]. Vergleichende Untersuchungen deuten darauf hin, daß sich die Ribosomen von Pflanzen und Bakterien vor allem in der P-Haftstelle deutlich unterscheiden [69].

In dieser kurzen Übersicht soll am Beispiel der Antibiotika Streptomycin, Chloramphenicol und Puromycin der Einfluß auf die Ribosomenfunktionen behandelt werden.

[64] Y. Nishizuka u. F. Lipmann, Proc. nat. Acad. Sci. USA 55, 212 (1966).

[65] M. Capecchi, Proc. nat. Acad. Sci. USA 58, 1144 (1967); M. Ganoza, Cold Spring Harbor Sympos. quantitat. Biol. 31, 273 (1966).

[66] D. Vazquez u. R. Monroe, Biochim. biophysica Acta 142, 155 (1967).

[67] I. Rychlik, Biochim. biophysica Acta 114, 425 (1966).

[68] J. Černá u. I. Rychlik, Collect. czechoslov. chem. Commun., im Druck.

[69] D. Vazquez u. R. Monroe, VII. Symposium on Biosynthesis of Proteins, Salamanca (Spanien) 1968.

### 3.2. Inhibitoren der Proteinsynthese

#### 3.2.1. Streptomycin

Zusatz von Streptomycin in einer Konzentration von  $10^{-5}$  M zur Proteinsynthese in vitro setzt nicht nur die Reaktion herab, sondern vergrößert deutlich die Fehler bei der Ablesung der genetischen Information. Mit einer synthetischen mRNS, die alternierend aus den Nucleotiden UMP und GMP aufgebaut ist, werden in das sich bildende Polypeptid, das normalerweise nur aus Cysteinyl-valin-Einheiten besteht, in Anwesenheit von Streptomycin auch Arginin und Serin eingebaut. Diese und weitere Beobachtungen sprechen dafür, daß das Antibioticum die richtige Ablesung der Pyrimidinreste der mRNS stört<sup>[70]</sup>. Um einen näheren Hinweis auf den Angriffsort des Streptomycins am Ribosom zu erhalten, hat man die Proteinsynthese in vitro mit genetisch verschiedenen Ribosomenuntereinheiten untersucht. Diese waren aus streptomycinresistenten oder empfindlichen Bakterien gewonnen worden. Dabei hat sich gezeigt, daß für die Ablesefehler mit Streptomycin ein Protein des 23-S-Ribonucleoproteids aus der 30-S-Ribosomenuntereinheit verantwortlich ist<sup>[71]</sup>.

In Übereinstimmung hiermit haben andere Versuche ergeben, daß Streptomycin sich auch tatsächlich an die 30-S-Ribosomenuntereinheit bindet<sup>[72]</sup>. Es liegt daher nahe, dort den primären Angriffspunkt zu vermuten. Die Ablesefehler und die ebenfalls sehr oft beobachtete Verringerung der Proteinsynthese lassen sich mit der Hypothese verstehen, daß die Konfiguration der Ribosomen durch Streptomycin verändert wird. Die Proteinsynthese kann noch ablaufen, doch ist die hohe Spezifität der Wechselwirkung zwischen der Aminoacyl-tRNS und der mRNS am Ribosom verändert<sup>[73]</sup>. Streptomycin modifiziert somit die biologische Wirkung der Matrize. Seine Wirkung deutet auf die aktive Rolle der Ribosomen beim Ableseprozeß.

Die mit Streptomycin ausgelösten Veränderungen in der Aminosäuresequenz des gebildeten Proteins brauchen sich nicht nur negativ, etwa in der Abnahme der Synthese eines aktiven Enzyms, auswirken. Dies ließ sich sehr schön mit *E.-coli*-Mutanten zeigen, die keine aktive Ornithin-Transcarbamylase (EC 2.1.3.3) mehr synthetisieren können. Zusatz von Streptomycin zum Nährmedium löst wieder die Synthese von kleinen Mengen des aktiven Enzyms aus<sup>[74]</sup>. Streptomycin wirkt hier phänotypisch wie eine Suppressormutation.

#### 3.2.2. Chloramphenicol

Viele Antibiotica greifen in Teilschritte der Proteinsynthese an der 50-S-Ribosomenuntereinheit an. Hierzu gehört Chloramphenicol (6)<sup>[75]</sup>.

[70] J. Davies, D. Jones u. H. Khorana, J. molecular Biol. 18, 48 (1966).

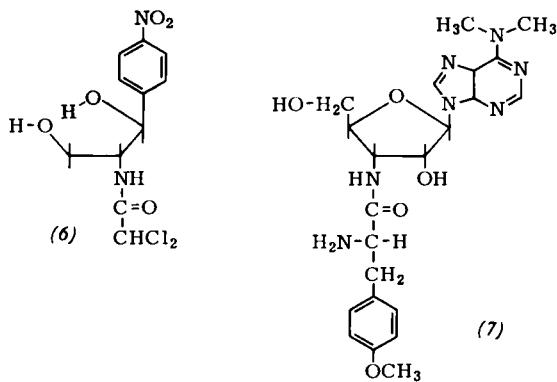
[71] T. Staehelin u. M. Meselson, J. molecular Biol. 19, 207 (1966); P. Traub u. M. Nomura, Science (Washington) 106, 198 (1968).

[72] H. Kaji u. Y. Tanaka, J. molecular Biol. 32, 221 (1968).

[73] S. Pestka, R. Marshall u. M. Nirenberg, Proc. nat. Acad. Sci. USA 53, 639 (1965).

[74] L. Gorini u. E. Kataja, Proc. nat. Acad. Sci. USA 51, 487 (1964).

[75] O. Jardetzky, J. biol. Chemistry 238, 2498 (1963).



Versuche mit dem radioaktiv markierten Antibioticum haben gezeigt, daß es bevorzugt von der 50-S-Untereinheit der 70-S-Ribosomen gebunden wird. Dies beobachtet man nur mit dem biologisch wirksamen  $D(-)$ -*threo*-Isomeren des Antibioticums. Die Bindungsreaktion zeigt also die gleiche Stereospezifität wie die Hemmwirkung auf die Proteinsynthese<sup>[76, 77]</sup>.

Oft wird die Chloramphenicol-Anlagerung an die 50-S-Untereinheit durch andere Antibiotica, welche auch die Proteinsynthese hemmen, gestört. Wir erhalten damit einen Hinweis auf deren Angriffspunkt<sup>[66]</sup>.

Bemerkenswert ist, daß Chloramphenicol wie auch einige andere Proteinsynthese-Inhibitoren speciesspezifisch wirken. Einige Arten von Zellen, die (wie Hefe oder Reticulocyten) 80-S- statt 70-S-Ribosomen enthalten, können kein Chloramphenicol binden<sup>[76]</sup>. Dementsprechend ist auch das Proteinsynthese-System mit 80-S-Ribosomen gegen dieses Antibioticum unempfindlich<sup>[78]</sup>. Ribosomen verschiedener Species können somit bei grundsätzlich ähnlicher Wirkungsweise anders aufgebaut sein. Diese Verhältnisse erinnern an die unterschiedliche Wirkung der Rifamycine (und Streptovaricine) auf die RNS-Polymerase aus verschiedenen Organismen<sup>[19, 20]</sup>.

Einen deutlichen Hinweis auf die wechselseitigen Einflüsse der Komponenten im Ribosomenkomplex gibt die Beobachtung, daß das Ausmaß der Chloramphenicol-Hemmung von der Zusammensetzung der mRNS abhängt<sup>[79]</sup>.

Die Wirkungsweise des Chloramphenicols an der 50-S-Ribosomenuntereinheit ist noch nicht aufgeklärt. Auf Grund von Ergebnissen mit dem Antibioticum Puromycin darf man schließen, daß es die Peptidyl-Transferase blockiert<sup>[80]</sup>.

#### 3.2.3. Puromycin

Der Zusatz von Puromycin (7) zur Proteinsynthese bewirkt außer einer starken Hemmung der Reaktion die Freisetzung kleinerer Peptidbruchstücke<sup>[81]</sup>. Dabei wird das Antibioticum über die Aminogruppe sei-

[76] D. Vazquez, Nature (London) 203, 257 (1964).

[77] A. Wolfe u. F. Hahn, Biochim. biophysica Acta 95, 146 (1965).

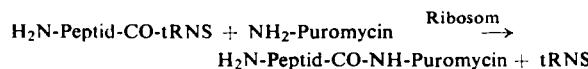
[78] G. v. Ehrenstein u. F. Lipmann, Proc. nat. Acad. Sci. USA 47, 941 (1961).

[79] Z. Kućan u. F. Lipmann, J. biol. Chemistry 239, 516 (1964).

[80] R. Monro u. D. Vazquez, J. molecular Biol. 28, 161 (1967).

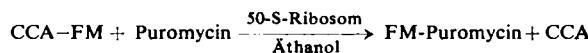
[81] D. Allen u. P. Zamecnik, Biochim. biophysica Acta 55, 865 (1962).

nes *O*-Methyltyrosinrests säureamidartig an das Carboxyende der Peptide gebunden<sup>[82,83]</sup>. Dies läßt sich auf Grund der Strukturähnlichkeit des Puromycins mit dem Endstück einer Aminoacyl-tRNS [z.B. Tyrosyl-tRNS (5)] verstehen<sup>[84]</sup>. Es wirkt an der A-Haftstelle am Ribosom offenbar als inaktives Analogon (Antimetabolit) einer aktivierten Aminosäure. In dieser Rolle übernimmt das Antibioticum als kompetitives Substrat für die Peptidyl-Transferase den aktivierten Peptidrest, der sich dann vom Ribosom ablöst<sup>[85]</sup>.



Die Richtigkeit dieser Vorstellung hat sich mit einfachen chemischsynthetisierten Modellverbindungen des Puromycins wie des 2'(3')-*O*-Phenylalanyladenosins nachweisen lassen. Auch solche Verbindungen wirken als Acceptor für das in der Peptidyl-Transferasereaktion übertragene Peptid<sup>[86]</sup>. Da in diesem Fall zur Bildung einer Peptidbindung keine Wechselwirkungen einer weiteren tRNS mit dem Ribosom oder der mRNS nötig sind, haben wir es bei der Puromycinreaktion mit dem isolierten Teilschritt der natürlichen Peptidbildung zu tun. Setzt man als einfaches peptidähnliches Substrat der P-Haftstelle den Starter *N*-Formylmethionyl-tRNS ein, so erhält man das einfache Dipeptid *N*-Formylmethionyl-puromycin<sup>[62]</sup>.

Sehr einfache Modellverbindungen aktiver Peptide wie etwa das Trinucleotid Cytidylyl(3' → 5')cytidylyl-(3' → 5')-2'(3')-*O*-(*N*-Formyl)methionyladenosin (abgekürzt CCA-FM) sind biochemisch aktive Substrate der P-Haftstelle. Die Verbindungen entsprechen dem Adenosinendstück der *N*-Formylmethionyl-tRNS. Mit ihnen ist es möglich, die natürliche Peptidbildung mit Puromycin als Acceptor nach der Gleichung



an der 50-S-Ribosomenuntereinheit ablaufen zu lassen. Es entsteht *N*-Formylmethionyl-puromycin. Zu dieser isolierten Peptidyl-Transferasereaktion (Fragmentreaktion) sind weder GTP, tRNA, mRNS, die 30-S-Ribosomenuntereinheit noch lösliche Enzyme notwendig. Allerdings muß Äthanol zugesetzt werden<sup>[87-89]</sup>.

- [82] D. Nathans, Proc. nat. Acad. Sci. USA 51, 585 (1964).
- [83] J. Smith, R. Traut, G. Blackburn u. R. Monro, J. molecular Biol. 13, 617 (1965).
- [84] M. Yarmolinsky u. G. de La Haba, Proc. nat. Acad. Sci. USA 45, 1721 (1959).
- [85] R. Traut u. R. Monro, J. molecular Biol. 10, 63 (1964).
- [86] I. Rychlik, Z. Haladová, S. Chládek u. J. Žemlička, Abstract Nr. 1166 of papers presented at the 5. Meeting of the FEBS, Praha 15.-20. Juli 1968; Czechoslovak Biochemical Society, Praha 1968, S. 292.
- [87] R. Monro u. K. Marcker, J. molecular Biol. 25, 347 (1967).
- [88] R. Monro, J. molecular Biol. 26, 147 (1967).
- [89] R. Monro, J. Černá u. K. Marcker, J. molecular Biol., im Druck.

Aus der Tatsache, daß Chloramphenicol und einige andere Antibiotika diese Fragmentreaktion verhindern, kann man schließen, daß der Angriffspunkt solcher Inhibitoren die Peptidyl-Transferase ist<sup>[80,90]</sup>.

#### 4. Ausblick

Nur mit Vorbehalt darf man aus den Ergebnissen bei den in-vitro-Experimenten auf die Wirkung der Antibiotica, die in vivo zur Schädigung und zum Tod der Zelle führen, schließen. Nucleinsäure- und Proteinsynthese sind nämlich miteinander, aber auch mit anderen Stoffwechselreaktionen in der Zelle, in vielfacher Weise eng verbunden. Dabei unterscheiden sich die Zellen verschiedener Typen sicher stark im Ausmaß und in der Art der Kopplung. So läßt sich noch nicht voraussagen, an welchen Stellen des Zellstoffwechsels vielleicht schon kleine Störungen bei der Ausprägung der Erbinformation schwerwiegende Folgen haben können. Schließlich ist nicht *a priori* auszuschließen, daß die behandelten Antibiotica noch weitere Enzymreaktionen hemmen. Dies wird von der Konzentration des Inhibitors in der Zelle abhängen.

Die Bedeutung der hier besprochenen und zahlreicher weiterer Antibiotica für die Biochemie liegt darin, daß sie sich dank ihrer sehr unterschiedlichen Wirkungsweise vorzüglich zur Untersuchung des Reaktionsablaufs der wichtigen matrizensteuerten Prozesse bei der Ausprägung der Erbinformation eignen.

Von besonderem Interesse ist, daß einige Hemmstoffe (Actinomycin, Chromomycin, Streptomycin) in ihrer Wirkung in gewissem Umfang matrizenabhängig, also informationsspezifisch sind. Es liegt nahe, Vergleiche zu den Repressorproteinen zu ziehen, die in der Zelle die RNS-Synthese regulieren<sup>[91]</sup>. Derartige Analoga rufen die Hoffnung wach, niedermolekulare, permeationsfähige Substanzen zu finden, mit denen sich informationsgesteuerte Synthesen (wie die Vermehrung von Viren in Wirtszellen) gezielt und selektiv unterdrücken lassen. Solche Hemmstoffe könnten für die Medizin von großem Interesse werden.

Den Herren Dr. W. Müller, Göttingen, Dr. I. Rychlik, Prag, Dr. D. Vazquez, Madrid, und Dr. M. Waring, Cambridge, danken wir, daß sie uns wesentliche Informationen vor der Veröffentlichung zur Verfügung gestellt haben. – Die in diesem Bericht behandelten eigenen Untersuchungen wurden in großzügiger Weise vom Fonds der Chemischen Industrie und der Deutschen Forschungsgemeinschaft unterstützt.

Eingegangen am 10. Mai 1968 [A 650]

- [90] D. Vazquez u. R. Monro, Hoppe-Seylers Z. physiol. Chem. 349, 959 (1968); I. Rychlik u. I. Černá, ibid. 349, 958 (1968).
- [91] W. Gilbert u. B. Müller-Hill, Proc. nat. Acad. Sci. USA 58, 2415 (1967).