

Flexible Pharmakamoleküle und dynamische Rezeptoren^[**]

Von R. J. P. Williams^[*]

Wenn sich ein kleines flexibles Pharmakamolekül an seinen ebenfalls beweglichen Rezeptor (Protein, Membran etc.) bindet, kann sich dessen Form und Funktion verändern. Das Studium von Art und Ausmaß dieser Änderungen mit vielen unabhängigen Methoden gibt Einblicke in die Wirkungsweise von Arzneimitteln. Das statische Schlüssel-Schloß-Modell muß wahrscheinlich durch das nicht so exakt definierte Konzept der dynamischen Zustände ergänzt oder ersetzt werden.

1. Einleitung

Das Hauptproblem bei der Einwirkung von Pharmaka auf biologische Systeme ist leicht formuliert: Um mit einem biologischen System in Wechselwirkung treten zu können, muß sich ein Pharmakon zuerst daran binden und dann mit ihm umsetzen. Im einfachsten Fall einer Zweistufenreaktion gilt



Darin ist P das Pharmakon, welches sich schnell und reversibel an einen biologischen Rezeptor R, z. B. ein Protein, DNA, RNA oder eine Membran, unter Bildung von PR bindet. Diese Reaktion hat die Gleichgewichtskonstante

$$\frac{k_f}{k_b} = K_{PR} = [PR]/[P][R]$$

Viele solche „erste“ Reaktionsschritte können aufeinanderfolgen, bis schließlich der Zustand vorliegt, der die endgültige Bindung ermöglicht. Der zweite Schritt in Gl. (1), der bereits für die Wirkung notwendig sein kann, ist die irreversible chemische Vereinigung von P in der Form P^1 mit dem Bereich des biologischen Systems R^1 , der P (oder P^1) gebunden hat. R^1 ist z. B. ein Protein, RNA, DNA oder eine Membran und kann mit R identisch sein. Die Reaktionsgeschwindigkeitskonstante k_{PR} ist im einfachsten Fall erster Ordnung, und auch hier können wieder viele solche Schritte beteiligt sein.

In diesem Aufsatz geht die Analyse der Wirkungsweise von Pharmaka von den wesentlichen Eigenschaften der Reaktionswege aus und beginnt mit den Strukturen von P und R selbst. Als Eigenschaften (Strukturmerkmale) werden alle die Konformationen angesehen, die P und R durchlaufen müssen, um einen Endzustand PR oder $P^1 R^1$ zu erreichen. Feeney, Roberts und Burgen^[1], die bei NMR-Studien die Beweglichkeit von Pharmaka- und Hormonmolekülen beobachten, betonten die Bedeutung dieser Reaktionswege. Mein Interesse am Problem der konformativen Beweglichkeit hat sich unabhängig und parallel bei konformationsanalytischen Untersuchungen an kleinen und großen Molekülen in Lösung entwickelt; auch hierfür wurden ausgeklügelte NMR-Methoden herangezogen. Bisher wurden die Strukturen von P und R (die im Hinblick

auf die Pharmakon-Rezeptor-Wirkung diskutiert werden sollen) in Lösung oft schon dann als bekannt angenommen, wenn die Röntgen-Strukturanalyse des Kristalls fertiggestellt war. Dabei blieb jedoch die Population der Konformationen eines Moleküls in Lösung in Abhängigkeit von der Zeit unberücksichtigt. Dies führte zu einer Überbetonung der Notwendigkeit einer strukturellen Anpassung, die z. B. durch die Begriffe „Schlüssel-Schloß“ und „induzierte Anpassung“ zum Ausdruck kam. Das soll an Beispielen näher erläutert werden.

Die Röntgen-Strukturanalyse mehrerer kristalliner Penicilline ergab, daß zwei Ringkonformationen auftreten können (Abb. 1). Die Konformation hängt von der Art der Substituenten am viergliedrigen Ring ab. Wir haben die Konformation einiger dieser Penicilline in wäßriger Lösung NMR-spektroskopisch in Gegenwart lanthanoid(III)-haltiger Verschiebungsreagentien^[2] studiert. Dabei zeigte sich, daß die Struktur der Penicilline in Lösung wenig oder überhaupt nicht von der Substitution an den Ringen abhängt. Die Ergebnisse legen nahe, daß wahrscheinlich beide Konformationen miteinander im Gleichgewicht stehen, wobei eine Konformation überwiegt. Im Prinzip hätten sich auch die Geschwindigkeitskonstanten für das Umlappen der Konfigurationen bestimmen lassen. Wir müssen uns nun fragen, ob eine spezielle Struktur und – wenn ja – welche für die Wirkung eines Pharmakons wichtig ist und ob die Art und die Geschwindigkeit der Konformationsänderungen eine eigene Bedeutung hat.

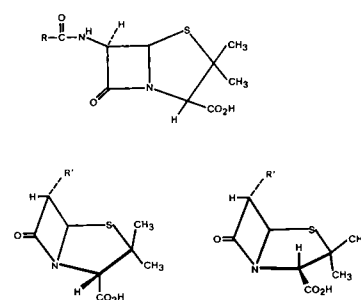


Abb. 1. Allgemeine Formel der Penicilline; räumliche Anordnung der Atome in kristallinem Penicillin G (links; $R' = \text{Ph}-\text{CH}_2-\text{CO}-\text{NH}$) und Ampicillin (rechts; $R' = \text{Ph}-\text{CH}(\text{NH}_2)-\text{CO}-\text{NH}$).

Eine rasche Durchsicht von Pharmakamolekülen zeigt tatsächlich, daß nur eine begrenzte Zahl ein starres Gerüst besitzt und daß die Konformation dieser Moleküle in gebundenem Zustand sich offenbar leicht anhand von Kristall- oder Lösungsuntersuchungen beschreiben läßt (siehe aber weiter unten). In allen anderen Fällen kann das Pharmakonmolekül mehrere Konformationen annehmen, die wie bei den Penicillinen durchaus im Gleichgewicht miteinander stehen können.

[*] Prof. Dr. R. J. P. Williams
Inorganic Chemistry Laboratory, University of Oxford
South Parks Road, Oxford OX1 3QR (England)

[**] Nach der Merck, Sharp and Dohme Scientific Lecture (London 1976) und einem Vortrag beim Symposium „Drug-Receptor and Drug-Enzyme Interactions“ (Namur 1976).

Wir müssen die relativen Energien der möglichen Konformationen des nicht gebundenen Arzneimittels berücksichtigen, denn falls nur ausgewählte Konformationen vom Rezeptor gebunden werden, sollte die Wahrscheinlichkeit der Bindung des Pharmakons in einer dieser Konformationen direkt proportional zu ihrem Vorkommen in freiem Zustand sein. Beim Entwurf neuer Pharmaka könnte man also teils von der Anpassung, teils – wenn es sich um konformativ bewegliche Pharmaka handelt – von der Einschränkung der Konformationsbeweglichkeit der (ungebundenen) Pharmaka ausgehen. Letzteres könnte jedoch auch falsch sein, denn vielleicht ist gerade die Flexibilität des Pharmakons für die Bindung oder die Reaktion unerlässlich. In diesem Fall sind Kenntnisse über die Konformationsbeweglichkeit des Pharmakons wesentlich für das Verstehen seiner Wirkung. Einige der durch k_f erfaßten Schritte in Gl. (1) sind notwendige Bewegungen des Pharmakons auf dem Weg zur endgültigen Bindungsstelle – eine Schlängelbewegung des Pharmakons zur „besten“ Stelle. Bei der Entwicklung eines Pharmakons sollten sowohl die dynamischen Eigenschaften eines Molekülgerüsts berücksichtigt als auch eine Struktur angestrebt werden, die in den angenommenen festen Rezeptor paßt. Schließlich wird in diesem Aufsatz gezeigt werden, daß die großen Rezeptormoleküle nicht notwendigerweise weniger flexibel als die kleinen Pharmakamoleküle sind. Statistische und zeitabhängige Veränderungen, welche die Konstanten in Gl. (1) beeinflussen, müssen daher an den Rezeptoren genauso untersucht werden.

Eine Diskussion über die Wirkungsweise von Pharmaka und Rezeptoren erscheint nur dann sinnvoll, wenn man deren Beweglichkeit sorgfältig analysiert. Es soll daher zunächst auf den neuesten Stand unseres Wissens über Strukturen in Lösung und über das Kräftespiel der Molekülkonformationen eingegangen werden.

2. Allgemeines über die Starrheit kleiner Moleküle in Lösung

Außer der Konformation von Penicillinen in Lösung haben wir auch die Konformationen einer Reihe von Aminosäuren, kleinen Peptiden, Zuckern und Nucleotiden untersucht, denen offensichtlich viel mehr Bewegungsmöglichkeiten gegeben sind^[3,4]. Diese Untersuchungen führten zum Schluß, daß es, obwohl die kleinen Moleküle durchaus beweglich sein müssen (Rotation um sterisch wenig behinderte Einfachbindungen), bestimmte „Konformationsfamilien“ oder eine sehr kleine Gruppe von Konformationsfamilien gibt, die für jeden Molekültyp charakteristisch und weitaus bevorzugt sind, was möglicherweise auf der Solvation durch Wasser beruht. Unter einer Konformationsfamilie soll eine relativ kleine Gruppe verwandter Strukturen verstanden werden, deren Bindungswinkel sich nur geringfügig unterscheiden. Dies läßt sich an einfachen Nucleotiden zeigen. Wir wollen aber nicht direkt auf die Konformation dieser Nucleotide eingehen, wie sie aus NMR-spektroskopischen Daten abgeleitet wurde, sondern stattdessen die NMR-Daten miteinander vergleichen, um Experiment und Interpretation auseinander zu halten.

Wir versuchten, das NMR-Spektrum eines Moleküls in Lösung möglichst detailliert auszuwerten und zuzuordnen. Das bedeutet, daß jeder ^1H -, ^{13}C -, ^{31}P - und ^{19}F -Kern im Molekül so genau wie möglich untersucht wird. Hier soll besonders ausführlich auf die ^1H -NMR-Daten eingegangen werden. Aus

der Feinstruktur der Spektren lassen sich die Kopplungskonstanten entnehmen, die von der relativen Stellung der gekoppelten Protonen im Raum abhängen. Beispielsweise kann in einem System wie $\text{C}(\text{H}^1)\text{—}\text{C}(\text{H}^2)$ die geometrische Beziehung von H^1 und H^2 ermittelt werden. Einschränkungen der freien Drehbarkeit um die C—C-Bindungen sind daraus in qualitativer und bisweilen auch halbquantitativer Hinsicht

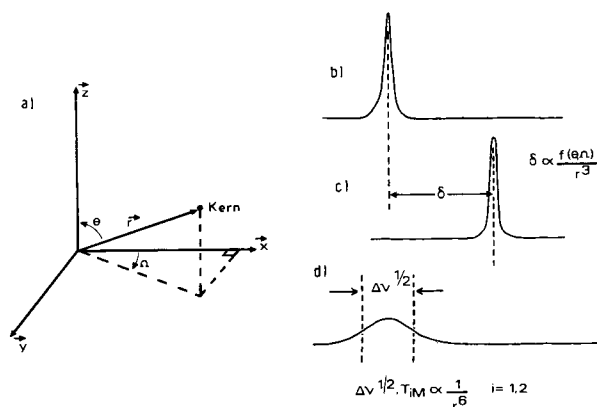


Abb. 2. a) Einfluß einer paramagnetischen Lanthanoid(III)-Verbindung im Koordinatenursprung auf den NMR-spektroskopisch erfaßten Kern. Der Zusatz der paramagnetischen Verbindung („Verschiebungsreagens“) bewirkt eine Verschiebung (b→c) und/oder Verbreiterung (b→d) der Linien im NMR-Spektrum. Die Verbreiterung steht in direkter Beziehung zu T_{2M} ; die Verschiebung δ gilt für den allgemeinen Fall eines rhombischen Feldes. In einem axialen Feld ist $\Omega = 0$ (vgl. [3]).

abzuleiten. Aus den Protonenrelaxationszeiten kann man die Entfernungen zwischen den nicht miteinander verbundenen H-Atomen feststellen. Weitere Daten über kleine, örtlich begrenzte Konformationsbereiche erhält man durch das Studium des Kern-Overhauser-Effektes. Alle diese Methoden sind eine Zeitlang von vielen Forschern angewendet worden. Wir haben darüber hinaus die ^1H -NMR-Spektren kleiner Moleküle in Gegenwart von Verschiebungsreagentien mit gebundenen paramagnetischen Ionen untersucht, die in Wechselwirkung mit dem kleinen Molekül treten (Abb. 2). Die NMR-Spektren werden durch diese Sonden in doppelter Hinsicht gestört: 1. Die Absorptionslinien werden verschoben (δ), wenn das paramagnetische Ion eine kurze Elektronenrelaxationszeit hat, 2. die Relaxationszeit ändert sich, d.h. die Linien werden breiter (B), wenn das paramagnetische Ion eine lange Elektronenrelaxationszeit hat. Die Gleichungen

$$\delta = A(3\cos^2\theta - 1)/r^3 \quad (2)$$

$$B = C(1/r^6) \quad (3)$$

zeigen, daß δ ein Vektor ist, der von der Entfernung r des betrachteten Kerns vom paramagnetischen Ion sowie vom Winkel θ zwischen der Hauptachse des paramagnetischen Verschiebungsreagens und der Richtung dieses Reagens zum Kern (vgl. Abb. 2) abhängt, während B eine skalare Größe ist. In den Gleichungen sind A und C Konstanten, die vom betrachteten Kern unabhängig sind. [Gl. (2) liegt die Annahme zugrunde, daß das gebundene paramagnetische Ion ein axialsymmetrisches magnetisches Feld erzeugt. Einzelheiten über die Methode siehe [3].] Geht man davon aus, daß die Stelle bestimmt werden kann (was der Fall ist), an der das paramagnetische Ion an das zu untersuchende Molekül gebunden wird, dann liefern die Verschiebungs- und Relaxationsmessungen direkt einen Satz Konformationsparameter, δ und B , so

wie auch Kopplungskonstanten Konformationsparameter sind. δ und B können empirisch für den Vergleich der Anordnung sehr vieler, im Molekül weit voneinander entfernter Atome verwendet werden. Natürlich ergeben alle Varianten der NMR-Methode zusammen die größte Zahl von Konformationsparametern und sollten gemeinsam zur Definition der Struktur herangezogen werden^[*].

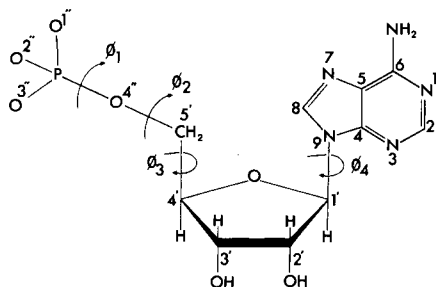


Abb. 3. 5'-Adenosinmonophosphat (5'-AMP). Die Bindungen, die anscheinend frei rotieren können, sind durch Pfeile markiert.

Tabelle 1. Durch Lanthanoid(III)-haltige Verschiebungsreagentien bewirkte Verschiebung δ der NMR-Signale der Protonen des Zuckerteils von Nucleotiden, angegeben als Verhältnis $R = \delta(i\text{-H})/\delta(5'\text{-H})$ [9] [siehe Abb. 2, Abb. 3 und Gl. (2)].

Nucleotid	pH	$R = \delta(i\text{-H})/\delta(5'\text{-H})$			
		$i = 1'$	$i = 2'$	$i = 3'$	$i = 4'$
5'-AMP	2.0	0.09	0.24	0.40	0.32
	7.6	0.09	0.26	0.38	0.34
5'-GMP	8.0	0.11	0.27	0.38	0.33
5'-CMP	2.0	0.10	0.20	0.40	0.32
	7.6	0.08	0.21	0.38	0.31
5'-UMP	2.0	0.07	0.20	0.38	0.32
	7.6	0.08	0.25	0.37	0.32
5'-d-TMP	2.3	0.08	0.30	0.37	0.35

Tabelle 1 enthält Verschiebungsdaten für die Protonen einiger Nucleotide (Abb. 3). Darin ist die beobachtete Verschiebung $\delta(i\text{-H})$ des NMR-Signals eines Protons $i\text{-H}$, die ein gebundenes Lanthanoid(III)-Ion hervorruft, durch die Quotienten R aus dieser Verschiebung und der Verschiebung des Protons $5'\text{-H}$, $\delta(5'\text{-H})$, ausgedrückt (siehe Abb. 2). Die Verschiebungen können nicht nur mit paramagnetischen Lanthanoid-Ionen, sondern auch mit vielen anderen Reagentien erzeugt werden. Auffallend ist, daß fast innerhalb der experimentellen Fehlergrenzen alle Nucleotide denselben Satz von Konformationsparametern geben. Entsprechende relative Relaxationsdaten und Kopplungskonstanten sind ebenfalls beinahe invariant. Das

[*] Alle NMR-Methoden liefern Daten, die sich auf die gemittelte Konformation beziehen. Es ist einerlei, ob man diese als einzelne Konformation mit nicht idealisierten Bindungslängen und Bindungswinkeln [2, 3, 5] oder als Kombination aus zwei oder drei oder vier oder noch mehr idealisierten Konformationen beschreibt. Häufig sind gemittelte Konformationen analysiert worden, die man aus zwei oder mehreren Konformern erhalten hatte, die ihrerseits nach Energieberechnungen für die Gasphase vorgeschlagen worden waren. Wie Feeney et al. [7] gezeigt haben, ist es immer möglich, NMR-Daten auf diese Weise anzupassen. Aber obwohl man experimentelle Parameter durch solche halbtheoretischen Annäherungen gewiß besser anpassen kann (weil mehr Variable eingeführt werden) als wenn man von einer einzigen Konformation ausgeht, muß eine Anpassung immer mit Vorsicht betrachtet werden, da die Theorie nicht für solvatisierte Spezies gilt. Es ist daher wichtig, die Strukturmerkmale von Molekülen in Lösung mit vielen voneinander unabhängigen Methoden zu prüfen, z.B. durch Messung von Kopplungskonstanten, Relaxationsdaten, Verschiebungsdaten und Kern-Overhauser-Effekten, und zwar zunächst unter Verwendung einer Konformation und erst später von Kombinationen zweier Konformationen.

kann nur bedeuten, daß unabhängig von der Base (Pyrimidin oder Purin) und vom Zucker (Ribose oder Desoxyribose) die Konformation des Nucleotids (einschließlich der gemittelten Beweglichkeit) mehr oder weniger festgelegt und überraschenderweise mit der Konformation im Kristall eng verwandt ist. (Nebenbei sei bemerkt, daß – obwohl sich Desoxycytidin- und Cytidinmonophosphat in der Kristallstruktur unterscheiden – ihre Strukturen in Lösung übereinstimmen. Möglicherweise ist der beobachtete Unterschied wie im Fall des Penicillins ein Artefakt bei der Kristallisation.) Die gleichen Resultate wurden unabhängig von Sundaralingam^[6] nur aus Kopplungskonstanten abgeleitet. Sundaralingam ging so weit zu behaupten, daß die Nucleotide in Lösung relativ starr sein müssen.

Da die Beweglichkeit dieser Moleküle zweifellos stark eingeschränkt ist, muß die relative Stabilität der beobachteten Familie (gemittelter) Konformationen in diesen Nucleotiden zum Teil auf den Eigenschaften des Wassers beruhen, das als Lösungsmittel dient. Bei Änderung des Lösungsmittels tritt eine andere Familie stabiler Konformationen auf. So ist in Dimethylsulfoxid die (gemittelte) Konformation der monomeren Nucleotide anders als in Wasser, und in einigen wäßrigen Systemen beeinflussen sogar Salze und Denaturierungsmittel wie Harnstoff die Konformation kleiner Moleküle, wie Messungen mit Verschiebungsreagentien ergaben^[3]. Wir weisen darauf hin, daß Rezeptorstellen vielleicht ganz andere „Solvations“-Eigenschaften als Wasser haben und energetisch vielleicht eine ganz andere Konformationsfamilie bevorzugen als die in wäßriger Lösung beobachtete. Alle diese Daten lehren uns nichts über die Natur der nicht bevorzugten Konformationen oder über die Geschwindigkeit des Umklappens in selten auftretende Konformationen. Es ist allerdings anzunehmen, daß dieses Umklappen schnell verläuft, da keine getrennten Signale für verschiedene Zustände zu sehen sind (wir wissen allerdings nicht, ob solche Zustände geringer Wahrscheinlichkeit überhaupt existieren). In der Tat könnten viele Konformationen auftreten, die sich stark von den NMR-spektroskopisch gefundenen unterscheiden, und während 1 % der Zeit könnte fast jede beliebige Konformation X vorliegen, ohne mit den Methoden für gelöste Moleküle entdeckt zu werden. Wenn jedoch X die für die Wirkung erforderliche Konformation ist und die Wahrscheinlichkeit für die Bildung dieser speziellen Molekülform 1:100 beträgt, dann sollte man ein besseres Molekül oder Pharmakon konstruieren, bei dem dieser Faktor erheblich günstiger liegt.

Aus diesen Befunden ergeben sich für die Untersuchung von Pharmaka folgende einfache Konsequenzen, die bisher nicht ausgesprochen worden sind:

1. Nur bei den Arzneimitteln, die ein starres Gerüst besitzen (Tabelle 2), können wir die Beweglichkeit vernachlässigen, aber auch hier müssen wir die Möglichkeit einer Solvation durch Wasser (oder ein anderes Lösungsmittel) in Betracht ziehen. So fanden wir, daß der Phosphat- und der Zuckerring in gelöstem cyclischem 3',5'-Adenosinmonophosphat (3',5'-cAMP) die gleiche Struktur wie im Kristall haben (Röntgen-Strukturanalyse); man darf annehmen, daß diese Form relativ starr ist^[8]. Der Rezeptor könnte genau dieses Gerüst binden, aber gerade weil die Hydratation unbekannt bleibt, ist es denkbar, daß die hydratisierte Form eines Moleküls die Wirkung hervorruft, wenn die Stereochemie der Rezeptorstelle nicht aus Untersuchungen der Struktur dieses kleinen Moleküls im Kristall oder in Lösung abgeleitet werden kann.

Tabelle 2. Starre und flexible Pharmakamoleküle [a].

relativ starr	flexibel	mäßig flexibel
Chinin (viele Alkaloide)	geradkettige Alkohole	Penicilline
Sulfonamide	Stickstofflost (N-Methyl- bis(2-chlorethyl)amin)	Chloramphenicol
Steroide	und Derivate	Streptomycin
Tetracycline	lineare Polypeptide	Mepacrin
Morphin		Phenothiazin
Cocain		Nicotin

[a] Es ist sehr nützlich, Molekülmodelle der Pharmaka anzufertigen, um sich die Zahl der möglichen statischen und dynamischen Wirkungsweisen vor Augen zu führen.

2. Es gibt auch viel beweglichere Pharmamoleküle (Tabelle 2). Zum Beispiel war es uns nicht möglich, mit unseren Methoden eine „Struktur“ für 2',3'-cAMP vorzuschlagen; die Annahme liegt nahe, daß die NMR-Daten nicht auf eine einzige Konformationsfamilie zurückgeführt werden können^[9]. Für solch ein Molekül, welches sich zwischen zwei oder mehr recht verschiedenen Konformationsfamilien bewegen kann, sind Kenntnisse über die Konformationen im Kristall oder in Lösung von viel begrenzterem Wert, weil nicht nur die Hydratation unbekannt ist, sondern auch die Art oder die Zahl der durchlaufenen Konformationen [Schritte in Gl. (1)], und wir wissen nicht, welche Konformationen im Endzustand wichtig sind. Das Problem wird umso komplizierter, je größer die betrachteten Moleküle werden; außer der Bindung von Pharmaka betrifft es vielleicht generell die Wirkung von Substanzen im biologischen Geschehen.

3. Nach unseren Untersuchungen ist die Orientierung der Base in 3',5'-cAMP relativ zu den beiden Ringen des cyclischen Systems nicht in demselben Umfang festgelegt, wie in den einfachen Nucleotiden 5'- und 3'-AMP^[8]. So kann es für die Base des 3',5'-cAMP leicht sein, durch allerlei Schlingelbewegungen die richtige Bindungsstelle, den Rezeptor, zu erreichen. Ob sich ein Molekül bindet, kann also davon abhängen, ob es an eine bestimmte Stelle gelangen kann, denn die Rezeptorstelle braucht nicht auf einer offenen Oberfläche zu liegen^[7]. Die Bedeutung von Molekülbewegungen für die Pharmakawirkung ergibt sich besonders aus einer genauen Betrachtung von Hormonen.

2.1. Hormone und Peptidhormone

Auf den ersten Blick ist es überraschend, daß kleine Moleküle wie Adrenalin, 5-Hydroxytryptamin und Acetylcholin als Hormone und Transmitter in Betracht kommen, denn diese Moleküle besitzen – wenn überhaupt – nur einen sehr kleinen

starren Teil und nur wenige Stellen (z. B. OH- und NH₂-Gruppen), mit deren Hilfe sie selektiv erkannt werden können. Die Moleküle enthalten auch einige Bindungen, die relativ leicht frei drehbar sind. Da Hormone sehr spezifisch wirken müssen, sollte man annehmen, daß die Moleküle viel starrer sein müssen. Berücksichtigt man jedoch, daß sich ein Molekül „schlingeln“ muß, um seinen Wirkort zu erreichen, dann könnten schnelle Bindungs- und Lösevorgänge erforderlich sein, an denen mehrere Konformationen mitwirken^[11]. So könnte wie oben ein Kompromiß zwischen einer guten Anpassung von Hormon und bindender Oberfläche im Endzustand und einer Beweglichkeit erzielt werden, die erforderlich ist, um den Wirkort zu erreichen. Dieser Kompromiß schließt einen Verlust an Bindungsvermögen ein, der vom statistischen Gewicht der Konformere in freier oder gebundener Form abhängt. Es ist nicht leicht, ein optimales System für solch ein schnelles und selektives Binden auszuarbeiten. Da aber möglicherweise die Bindungsstelle und die in Lösung vorherrschende Konformation aufeinander zugeschnitten sind, wird es sich immer lohnen, bei der Entwicklung von Pharmaka, die mit Hormonen oder Transmittern in Konkurrenz treten sollen, zunächst nach Stoffen mit ähnlichen Konformationen zu suchen.

Es ist auch bemerkenswert, daß viele größere Hormone sich von 3',5'-cAMP oder Steroiden unterscheiden, deren konformative Beweglichkeit sehr beschränkt sein muß. Stattdessen liegen viele als offenbar ungeordnete lineare Polymere vor, angefangen von Tripeptiden bis zu höheren Peptiden wie Glucagon, die Molekulargewichte von über 10000 haben. Diese Moleküle müssen sehr flexibel sein, was durch NMR-Messungen tatsächlich bestätigt wurde. Geht man davon aus, daß der Rezeptor das ganze Hormon erkennen muß, dann ist die Wahrscheinlichkeit für korrekte Paarung zwischen dem Hormon und dem Rezeptor umso geringer, je länger die Kette dieser Hormone ist. Es will scheinen, daß kleine oder starre Hormonmoleküle schnell wirken, während längere flexible Moleküle langsamer, dafür aber vielleicht hochselektiv wirken. Damit sind alle statischen und dynamischen Möglichkeiten zum Erreichen der Selektivität erfaßt (Tabelle 3).

Tabelle 3. Natürlich vorkommende starre und flexible kleine Moleküle und Hormone [a].

relativ starr	flexibel	mäßig flexibel
Auxine	Spermin	Vasopressin
Thyroxin	Glutathion	Oxytocin
Trypsin-Inhibitor	Corticotropin (ACTH)	Nucleotide
Häm	Freisetzungshormon	Vitamin E und K
Coenzym B ₁₂	viele Lipide	Bacitracin
	Glucagon	Folsäure
	Melanocyten-stimulierendes Hormon	Polysaccharide
		ATP

[a] Es ist anzunehmen, daß durch sterische Hinderung wie in Thyroxin, Ringbildung wie in Vasopressin und Quervernetzung wie im Trypsin-Inhibitor jeweils ein Teil des Moleküls starr wird.

Besonders interessant ist in dieser Hinsicht eine neuere Arbeit über Insulin, aus der sich ergibt, daß mindestens ein Zehntel des Peptids konformativ beweglich ist^[10]. Hier führt der kooperative Effekt von Metall-Ionen und Anionen, die an verschiedenen Stellen gebunden werden, zu einer Umlagerung des Peptids. Wir haben mit NMR-Methoden bestätigt, daß eine entsprechende Konformationsänderung des Insulins in Lösung auftritt, wenn man die gleichen Reagentien zu-

[*] Möglicherweise müssen die Chemiker, die sich mit der Entwicklung von Arzneimitteln beschäftigen, ihre Ansichten jetzt etwas ändern. Die äußere „Gestalt“ eines Moleküls stimmt bei 0 K – wenn sie mit Kurzzeit-Methoden (Zeitkonstante $< 10^{-3}$ s) ermittelt wird – in bezug auf Bindungswinkel und -längen mit den Vorhersagen überein, die auf unserem Wissen über einfache Moleküle wie Methan beruhen. Zum Studium der Wechselwirkung zwischen einem beweglichen Molekül und einem beweglichen Rezeptor könnte ein raumfüllendes Modell besser geeignet sein, in dem Methan ein einfacher Ball wäre und ein Indolring sich durch eine abgeflachte rotierende Scheibe wiedergeben ließe. Die Dynamik schließt in diesen Fällen eine Rotationsbewegung um mehrere Achsen, aber keine Translation ein. Aber auch die Translation könnte wichtig sein, und vielleicht sollten wir in Rezeptoren nach Tunneln und Kanälen suchen, die „Tore“ haben, an denen Schlingelbewegungen eines kleinen Moleküls unter örtlichen Wechselwirkungen ablaufen können. Die Kanäle müssen so gebaut sein, daß das ganze Molekül hindurchpaßt, wenn es Schlingelbewegungen ausführt; die Form der Kanäle läßt sich aber nicht aus der Struktur eines einzigen Moleküls ableiten.

gibt^[11]. Die Änderung hängt vom Anion und vom Kation (d. h. vom Salz) sowie von der Temperatur ab. Dieses Resultat läßt wieder Zweifel am Wert von Kristallstrukturen als Grundlage der Diskussion über die Wirkung solcher Hormone aufkommen – wenn man von den Regionen mit unbeweglicher (starrer) Oberfläche absieht (siehe Trypsin-Inhibitor in Abschnitt 2.2). Die Beobachtungen lassen sich auch verwenden, um den Synergismus zweier kleiner „Pharmaka“, hier X^+ (Zn^{2+}) und Y^- (Cl^- oder I^-), auf einer Rezeptoroberfläche (Insulin) zu beschreiben, indem man berücksichtigt, daß sowohl starke Konformationseffekte in einigen Regionen als auch allgemeine Veränderungen kleineren Ausmaßes in größeren Bereichen des Moleküls auftreten können (siehe Abschnitt 2.2).

2.2. Kleine Moleküle: Zusammenfassung

In Tabelle 3 sind viele Moleküle aufgeführt, die in biologischen Systemen gefunden wurden. Außer Peptiden und Polynucleotiden^[9, 12] haben wir Moleküle wie Adenosintriphosphat (ATP)^[13] und Vitamin B₁₂^[14] mit den gleichen NMR-Methoden unter Verwendung paramagnetischer Verschiebungsreagentien auf die Konformation hin untersucht. In den letzten beiden Fällen sind die Strukturen in Lösung und im festen Zustand wieder relativ ähnlich. Wir stufen daher diese

menten alle möglichen Zwischenzustände auftreten und sich die Teile großer Moleküle verschieden verhalten können.

3. Die Rezeptorstelle: Einführung

Die Diskussion über die Struktur des Rezeptors muß ebenso wie beim Studium kleiner Moleküle geführt werden. Wir müssen zunächst in Kristalle gezwängte Moleküle und freie Moleküle in Lösung untersuchen, um zu Hypothesen über die Geometrie und Dynamik des Rezeptors zu gelangen. Wir wollen davon ausgehen, daß Rezeptorstellen besondere Regionen der Proteine, DNA, RNA, Membranen oder Polysaccharide sind. Was können wir über die Struktur solch großer Moleküle in biologischen Systemen aussagen? Zuerst wenden wir uns der Untersuchung dieser großen Moleküle in Lösung zu.

3.1. Proteine als flexible Moleküle

Seit 1974 kommt man langsam von der Vorstellung starrer Konformationen der Makromoleküle ab. Wir trieben diese Entwicklung voran, indem wir Proteine durch hochauflösende ¹H-NMR-Spektroskopie untersuchten^[17] (Abb. 4). Parallel zu unseren Studien liefen Arbeiten von Sykes sowie Wüthrich^[16] an Peptiden, während viele andere Autoren ¹³C-NMR-Untersu-

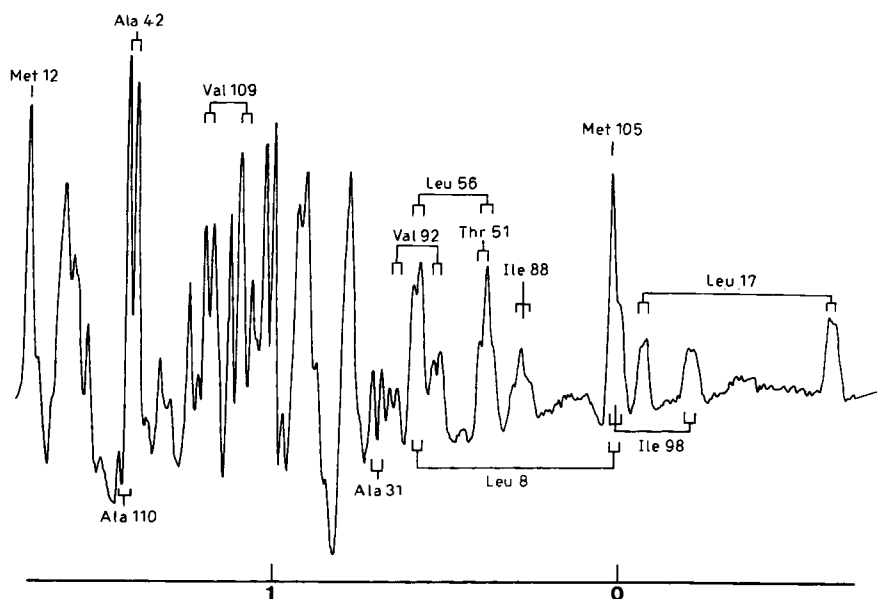


Abb. 4. Teil des ¹H-NMR-Spektrums von Lysozym mit Zuordnungen (Methylgruppen in den angegebenen Aminosäuren).

Moleküle als weitgehend starr ein. Andere Moleküle wie Polymere und langkettige Fettsäuren müssen eine größere Beweglichkeit besitzen. Sie sind in Tabelle 3 einer anderen Gruppe zugeordnet. Nicht alle zum Vergleich herangezogenen höhermolekularen Peptide sind so beweglich wie Glucagon. Die Natur der Trypsin-Inhibitoren, die recht große Peptide, nicht aber einfache lineare Polymere sind und die rasch wirken müssen, läßt den Schluß zu, daß sie recht starr sind, denn die S—S-Brücken und die Faltblattstruktur schränken die konformative Beweglichkeit weitgehend ein^[15, 16]. Daß der Trypsin-Inhibitor starr ist, zeigt sich auch daran, daß nicht alle aromatischen Reste in den Aminosäureseitenketten frei umklappen können^[16]. Es muß betont werden, daß durch die Kombinationen aus starren und beweglichen Strukturele-

chungen durchführten. In weiteren Arbeiten wird eine Vielfalt von Techniken, z. B. Fluoreszenzlöschung mit Sauerstoff sowie Wasserstoffaustausch, zum Nachweis der Beweglichkeit angewendet^[18, 19]. Allerdings werden die Proteinmoleküle dabei als Ganzes diskutiert; es gelang nicht, die Beweglichkeit innerhalb der Aminosäurekette mit diesen Methoden zu lokalisieren. Unsere Arbeit gibt Aufschluß über die Natur dieser Bewegungen und über die beweglichen Stellen des Proteins. Es wurden beobachtet:

1. Rotation und Libation (bisweilen eingeschränkt) um bestimmte Einfachbindungen im Inneren des Proteins,
2. große Beweglichkeit der Seitenketten an der Oberfläche,
3. allgemeine Beweglichkeit der (hydrophoben) Gruppen im Innern des Proteins („Atmen“),

4. gelegentliche Segmentbewegungen in der Hauptkette,
5. bei einigen Proteinen eine generelle Beweglichkeit, d.h. sie liegen beinahe als zufällig geknäuelte Polymere vor. Tabelle 4 enthält zusätzliche Angaben über diese Bewegungen.

Tabelle 4. Bewegungen von Proteinmolekülen.

Art der Bewegung	Beobachtungen
Expansion (Vibration)	Temperaturabhängigkeit der Ringstromverschiebungen Relaxationszeiten
Schnelle Segmentbewegung	Insulin: Umwandlungen Häm: Resonanzen
Oberflächenbewegung	Lysin: Korrelationszeiten
Langsame Bewegung von Seitenketten	Tryptophan: Oszillation Phenylalanin und Tyrosin: Umklappen Temperaturabhängigkeit der Lage von NMR-Signalen
Bewegungen ungeordneter Knäuel	Relaxationszeiten

3.2. Segmentbewegung: Zusammenfassung

Wir müssen annehmen, daß bei einigen Proteinen ein Teil beweglich und ein Teil starr ist und daß diese Teile je nach Protein verschieden groß sein können^[20–22]. Vallee et al.^[23] haben darauf hingewiesen, daß die Region um das aktive Zentrum in gelöster Carboxypeptidase beweglich ist, und es will scheinen, daß dies sogar auch für die Kristallform gilt. Diese Beweglichkeit bewirkt relativ geringe Konformationsänderungen der Hauptkette, vergleichbar mit der Änderung in der FG-Region von Hämoglobin bei der Bindung von Sauerstoff. Inzwischen sind zahlreiche Proteine untersucht worden; sie lassen sich nach ihrem Verhalten in sehr verschiedene Klassen einordnen. Lysozym, Peroxidasen, Peptidasen, Carboanhydrase und Cytochrom c zeigen die geringsten Konformationsänderungen im Hauptgerüst; bei Kinasen, Concanavalin A, Colicin Ia und Hämoglobin treten weit größere Änderungen auf; Histone, Chromogranin A und Phosvitin bestehen aus sehr anpassungsfähigen, flexiblen Ketten (Tabelle 5). Es scheint daher, daß große Moleküle (Rezeptoren) dieselbe abgestufte Flexibilität zeigen wie kleine Moleküle. Es muß einige sehr starre und einige sehr bewegliche Systeme geben, und es werden alle Zwischenstufen auftreten.

Tabelle 5. Starre und flexible große Moleküle [a].

relativ starr	flexibel	mäßig flexibel
Cytochrom c	Phosvitin	Insulin
Neurotoxine [b]	Chromogranin A	DNA-bindende Proteine
Lysozym	Histone	t-RNA
Lipasen	Glucagon	Kinasen (?)
Peptidasen	Myelin-Protein A 1	Antikörper (?)
Nucleasen	Vesiculin	

[a] Normalerweise sind extrazelluläre Proteine starr und oft über S—S-Brücken vernetzt. Intrazelluläre Proteine sind beweglicher, besonders wenn sie für die Gleichgewichtseinstellung zwischen gebundenen und ungebundenen Zuständen unter Beteiligung von DNA, RNA und Membranoberflächen benötigt werden.

[b] G. Petsko, persönliche Mitteilung.

Von großem Interesse ist Cytochrom c^[21]. Obwohl seine beiden Oxidationsstufen unterschiedliche physikalische Eigenschaften wie Löslichkeit und chromatographische Beweglichkeit besitzen, konnten wir in Lösung bei den beiden Oxidationsstufen keine Unterschiede im Innern des Moleküls ent-

decken. Ein ähnlicher Befund ergab sich bei kristallinem Material. Wir beobachteten jedoch Unterschiede bei der Bindung anionischer und kationischer Reagentien an der Oberfläche von Cytochrom c in den beiden Oxidationsstufen. Das beweist, daß sich die Oberflächenenergie von Cytochrom c ändert, wenn die Ladung des Eisens wechselt. Eine Änderung der Oberflächenenergie spiegelt sich in der Regel in einem Wechsel von Ladung, Konformation und Hydratation wider; leider lassen sich aber mit den heutigen Methoden die Zustände an der Oberfläche nur schlecht ermitteln. Dabei sind es diese Oberflächenzustände, die bei Protein-Protein- und zumindest auch zu Beginn von Pharmaka-Protein-Wechselwirkungen erkannt werden.

4. Kombinationen kleines Molekül/Protein (Pharmakon/Rezeptor)

Bislang sind hier die dynamischen Eigenschaften von Pharmaka und Rezeptoren herausgestellt worden. Dabei wurden die Pharmaka mit vielerlei kleinen Molekülen und die Rezeptoren mit vielerlei großen Polymeren verglichen. Bei der Diskussion der Kombination aus Pharmakon und Rezeptor wollen wir die dynamischen Eigenschaften in den Vordergrund stellen, obwohl uns klar ist, daß die statische Anpassung eine sehr wichtige und anerkannte Rolle spielt. Die Diskussion soll anhand von Beispielen erfolgen, aber bevor zu diesen Beispielen übergegangen wird, muß man sich den Zustand des Rezeptors und des kleinen Moleküls vergegenwärtigen, wenn sie sich einander nähern. Wie oben gezeigt wurde, fluktuiert das kleine Molekül sehr schnell zwischen bestenfalls einigen ähnlichen Konformationen und schlimmstenfalls einem kompletten Spektrum sehr verschiedener Zustände. Die Oberfläche des Rezeptors kann genauso beweglich sein – besonders bei Zuckern und Lysinen (Antikörpern) –, während die Beweglichkeit in Taschen und Spalten begrenzt sein kann. Ein Pharmakon könnte diese beweglichen Regionen durchdringen und dabei in manchen Fällen an eine viel tiefer gelegene Stelle gelangen, während Antagonisten den Zugang zu dieser Stelle blockieren. Im folgenden sollen Rezeptorstellen mitsamt dem gebundenen Pharmakon untersucht werden.

4.1. Lysozym-Saccharid-Reaktionen

Die „Rezeptorstelle“ des Lysozyms ist der Spalt, der das Substrat aufnimmt. Er ist mit NMR-spektroskopisch leicht erkennbaren Tryptophanresten ausgekleidet (Abb. 5), deren Signale während der Bindung des Saccharids am leichtesten beobachtet werden können^[24, 25]. Die NMR-Methode ist schnell genug, um Schritte zu verfolgen, die mit Zeitkonstanten von $>10^{-4}$ s ablaufen, und ihre Spezifität erlaubt präzise Angaben darüber, welche Gruppen sich bewegen. Bei genügender Sorgfalt kann die Bewegung selbst mit einiger Genauigkeit definiert werden (Abb. 6).

Im Ausgangszustand liegt z. B. das Disaccharid Bis(*N*-acetylglucosamin) vor, das zwar ein mäßig flexibles Molekül ist, aber durch Wechselwirkung mit Wasser weitgehend starr geworden sein kann, so daß vielleicht 95 % der Moleküle einer kleinen Konformationsfamilie angehören. Das Protein Lysozym enthält einen Spalt, der einer gewissen dynamischen Bewegung unterliegt, wobei sich die Seitenketten z. B. von Valin

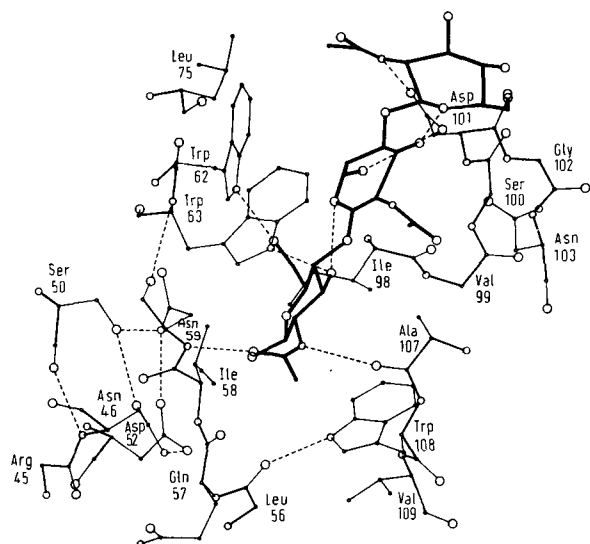


Abb. 5. Ausschnitt aus der Lysozymstruktur. Im Spalt befindet sich ein Trisaccharid als Substrat (nach [25]).

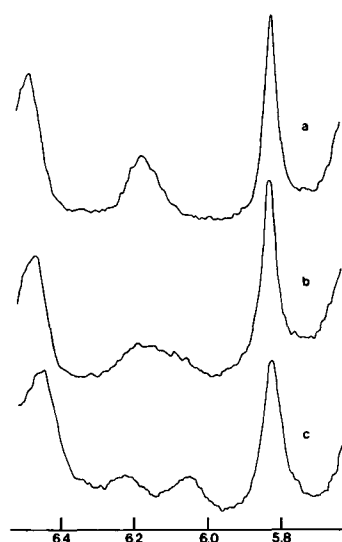
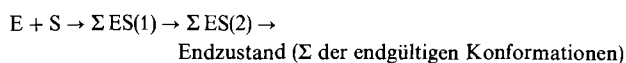


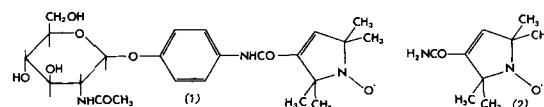
Abb. 6. Aromatischer Bereich des ^1H -NMR-Spektrums von Hühnerlysozym (3 mmol/l) bei pH = 3.5 in Gegenwart von Tris(*N*-acetylglucosamin) (4 mmol/l). Einfluß der Temperatur auf die $>\text{NH}$ -Resonanzen von Tryptophan bei a) 37°C, b) 45°C, c) 55°C.

schnell und von Tryptophan langsam bewegen (vgl. Abb. 10). Anders ausgedrückt können die beiden Moleküle jeweils mehrere geometrische Formen annehmen; einige davon sind kompatibel und einige nicht. Beim Bindevorgang gehen sie in den endgültigen, energetisch günstigsten, gebundenen Zustand über, der – wie wir gezeigt haben – eine verminderte Beweglichkeit besitzt. Die Gesamtreaktion, die zur Bindung führt, läßt sich durch eine Folge von Konformationszuständen wiedergeben:



Darin bedeutet das Summenzeichen Σ alle dynamischen Zustände einer Spezies. Die dynamische Natur des Ausgangszustands und der Zwischenzustände gestattet es, daß alle Schritte zum Endzustand rasch ablaufen^[24]. Die beobachtete größere Starrheit im letzten Schritt (oder in den letzten Schritten)

bedeutet, daß die Rückreaktion, der erste Schritt der Dissoziation, langsam abläuft. Läßt man die Folgerungen außer acht, die sich aus dieser Darstellung für die Enzymwirkung ergeben, so sieht man, daß ein Enzym-Inhibitor ein Molekül sein kann, das zwar die Zustände $\Sigma \text{ES}(1)$ oder $\Sigma \text{ES}(2)$, aber nicht den Endzustand vor der Reaktion erreicht, denn der Inhibitor braucht kein sehr gutes Abbild des Substrates zu sein, er muß sich nur an das Enzym binden. Ein fast triviales Beispiel hierfür ist CN^- , das sehr stark giftig wirkt, weil es in Hämoproteinen an die Stelle des O_2 tritt. Sulfonamide sind CO_2 oder HCO_3^- nicht sehr ähnlich, werden aber in der Tasche der Carboanhydrase anstelle von CO_2 gebunden. Demnach ist zu erwarten, daß es Stoffe gibt, die mit schlechtem, mäßigem oder gutem Erfolg mit dem Substrat um die verschiedenen Stellen im Spalt des Enzyms konkurrieren. Ein sehr interessantes Beispiel wurde rein zufällig entdeckt.



Wir wollten die Lysozymoberfläche mit Hilfe des spinmarkierten Substrates 3-[4-(2-Desoxy-2-acetyl-amino-1-glucosyloxy)phenylcarbamoyl]-2,2,5,5-tetramethyl-3-pyrrolin-1-oxyl (1) untersuchen^[26]. Dabei fanden wir, daß die Bindung nicht über den *N*-Acetylglucosaminrest zustandekommt, der ein Teil des natürlichen Substrates ist, sondern daß der spinmarkierte Teil direkt von der Region C der Lysozymkette gebunden wird. Die Anpassung kann nicht vollkommen sein; dieser Befund gab jedoch Anlaß, die Bindung des spinmarkierten Moleküls (2), das keinen Zuckerrest enthält, zu untersuchen: Verbindung (2) wird besser gebunden als *N*-Acetylglucosamin! So wurde durch Zufall ein starker Inhibitor (Pharmakon) entdeckt, der chemisch dem Substrat nicht ähnlich ist, aber trotzdem besser als das Substrat-Analogon gebunden wird. Keinerlei Prüfung des spinmarkierten Moleküls (2) und des *N*-Acetylglucosamins hätte diese Parallelität nahegelegt. Die genaue Betrachtung von Proteinoberflächen und von Molekülen wie *N*-Acetylglucosamin oder noch besser von Steroiden läßt erkennen, wie schwierig es für ein Enzym ist, sich dem Raumbedarf und dem Bindungsvermögen eines Substrates oder Pharmakons genau anzupassen. Ist die Beweglichkeit der Oberfläche eingeschränkt, so wird eine gute (nicht aber eine vorzügliche) Anpassung sehr erleichtert. Die Anpassung dürfte in der Tat überbetont worden sein, denn alles, was erforderlich ist, ist gutes, relativ spezifisches Binden und dessen

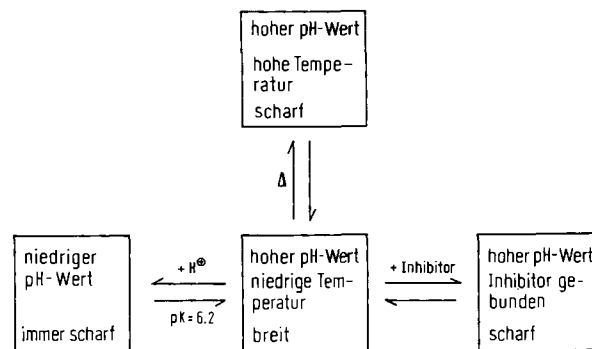
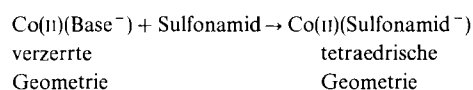


Abb. 7. Aktives Zentrum von Lysozym [25]. Überblick über die Konformationszustände in Lösung und die Linienbreite der ^1H -NMR-Signale. Jedes Kästchen gilt für einen Konformationszustand.

kinetische Kontrolle. Für beides ist Beweglichkeit sehr nützlich (Abb. 7).

Eine etwas weitergehende Umlagerung wurde bei der Bindung von Sacchariden an Concanavalin A beobachtet^[27]. Hier führt die Bindung zu solchen Änderungen in der Proteinstruktur, daß zwei vollständige Kristallstrukturanalysen (Protein mit Zucker und Protein ohne Zucker) erforderlich waren. Für die Dynamik dieses Proteins gibt es keine Beweise. Es sei angemerkt, daß auch hier ein sorgfältig markiertes Reagens, 1-(*o*-Iodphenyl)- β -D-glucopyranosid, mit dem die Bindungsstelle für den Zucker nachgewiesen werden sollte, an einer unerwarteten Stelle gebunden wurde.

Ein weiteres Beispiel für die Beweglichkeit an der Rezeptorstelle fanden *Burgen et al.*^[28]. Sie beobachteten, daß das Absorptionsspektrum von Carboanhydrase (als Cobalt(II)-Enzym) durch Zugabe von Sulfonamiden verändert wird. Die Änderung steht in Einklang mit der Reaktion



der in 3- oder 4-Stellung substituierten Sulfonamide; der Komplex mit dem in 2-Stellung substituierten Sulfonamid hat jedoch ein Absorptionsspektrum, das zwischen diesen Extremen liegt und auf eine ebenfalls „mittlere“ Geometrie am Cobalt hinweist. Es besteht allgemeine Übereinstimmung darin, daß das Metall in der Carboanhydrase rasch zwischen verschiedenen Koordinationszuständen hin- und herwechseln kann. Die Änderung ist zwar nur klein, doch läßt sich dieses Metallenzym mit Enzymen wie Peroxidase und Cytochrom P-450 insoweit vergleichen, als ein Pharmakon in die Koordinationssphäre des Metalls aufgenommen werden kann (siehe auch Tabelle 6).

Tabelle 6. Änderungen bei Metallenzymen infolge Bindung eines Pharmakons.

Enzym	Metall	Pharmakon	Änderung
Cytochrom P-450	Eisen(III)	Steroide	low-spin \leftrightarrow high-spin
Peroxidase	Eisen(III)	3-Indolpropionsäure	Änderungen des g-Wertes
Myoglobin	Eisen(III)	HgI ₂	low-spin \leftrightarrow high-spin
Hämoglobin	Eisen(III)	Xe 1,3-Diphosphoglycerat	low-spin \leftrightarrow high-spin
Carboanhydrase	Cobalt(II) [Zink(II)]	Sulfonamide	Verzerrung der tetraedrischen Koordination

4.2. Peroxidase-Substrat-Komplexe

Die Komplexe von Peroxidase mit Substraten lassen sich gut untersuchen, da einige Substrate – Indole und Phenole – leicht auswertbare NMR-Spektren haben. Der Indolring gehört zu den starren Gebilden, deren einfache Komplexe wir eingehend studiert haben. Wir konnten z. B. zeigen, daß Indolderivate Molekülkomplexe mit Porphyrinen bilden, in denen die Ebenen der Moleküle übereinander gestapelt sind^[29]. Wir haben diese Methoden später auch auf die Peroxidase-Komplexe angewendet^[30].

Peroxidasen sind sehr große Glykoproteine, die einige offensichtlich bewegliche Teile, z. B. die Saccharidseitenketten, be-

sitzen. Native Peroxidasen sind high-spin-Fe^{III}-Enzyme. Die Reaktion mit Cyanid wandelt sie in den low-spin-Zustand um, während die Reaktion mit Azid zu einem Gleichgewicht der beiden Formen (low-spin \rightleftharpoons high-spin) führt. Nach NMR-Messungen zu urteilen stehen die Zustände

nativ (weitgehend high-spin) \rightleftharpoons „Azid (high-spin)“ \rightleftharpoons „Azid (low-spin)“

miteinander in raschem Gleichgewicht, d. h. sowohl die Bindung und Ablösung des Azids als auch die Spinänderungen verlaufen sehr schnell. Tatsächlich liegen im nativen Enzym wahrscheinlich einige 5 % im low-spin-Zustand vor, wie es bei Myoglobin und Hämoglobin der Fall ist. Abbildung 8 zeigt, daß high-spin- und low-spin-Fe^{III}-Häm-Komplexe recht verschiedene Strukturen besitzen. Wir müssen annehmen, daß Eisen(III) schnell zwischen diesen Zuständen oszilliert und daß der Teil des Proteins, der durch das proximale Histidin direkt mit dem Eisen verbunden ist, ebenfalls raschen Veränderungen unterliegt^[22, 31].

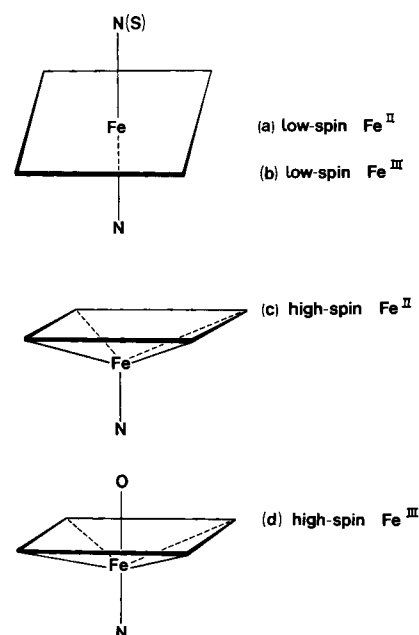


Abb. 8. Stereochemie der Spinzustände des Eisens im Häm.

Wenn sich ein aromatisches Substrat an Peroxidase bindet, entsteht kein Molekülkomplex mit aufeinanderliegenden Ebenen wie in den Modellreaktionen mit Porphyrinen. So liegt z. B. in Peroxidase-Komplexen der 3-Indolpropionsäure das Indolsystem wie in Abbildung 9 gezeigt vor^[30]. Das Indolderivat wird nur durch schwache van-der-Waals-Wechselwirkungen in der Tasche des Enzyms festgehalten. Andere Substrate werden in derselben Tasche gebunden; die Beziehungen zwischen diesen Substraten und ihren Bindungsstellen und zwischen den Indolen und ihren Bindungsstellen unterscheiden sich beträchtlich. Wir schließen daraus, daß die Bindungsstelle eher einem beweglichen Öltröpfchen als einem Schloß ähnelt, in das ein Schlüssel paßt. So läßt sich vorhersehen, daß viele organische Verbindungen als Inhibitoren dieser Enzyme wirken können. Es kann sein, daß sich Entgiftungsenzyme in der Regel so verhalten, denn an den Bindungsstellen von Cytochrom P-450 und Alkohol-Dehydrogenasen gelangen ähnliche Beobachtungen.

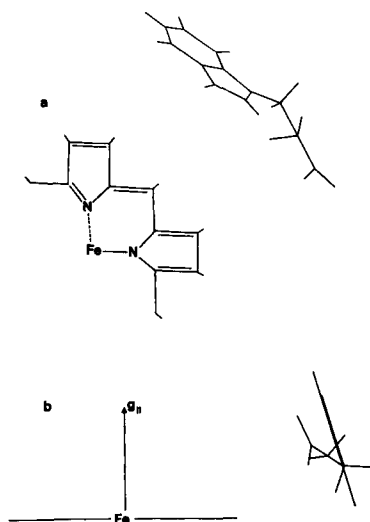


Abb. 9. Anordnung des Häms (Teilstruktur) und des Substrates im Peroxidase-3-Indolpropionsäure-Komplex. a) Blick auf die Ebene des Häms, b) Blick senkrecht dazu auf die Kante des Häms.

Diese Öltröpfchen für die Aufnahme von Substraten in den Proteinen brauchen den kleinen Molekülen nicht unmittelbar zugänglich zu sein; es wäre sehr interessant, den Zeitablauf von der Annäherung bis zur endgültigen Bindung genau zu beobachten. Ein Inhibitor oder ein Pharmakon könnte an jeder Stelle dieses Weges aktiv werden oder indirekt wirken, indem eine Umlagerung des Proteins verhindert wird. Die Beweglichkeit innerhalb des Öltröpfchens scheint durch die Einführung des Substrates wiederum nicht stärker beeinflusst zu werden, obwohl die Substratbindung etwas auf die Umgebung des Eisens(III) einwirkt.

Ein gutes Beispiel für die Schlängelbewegung einer Gruppe, die sich auf der Suche nach solch einem „Ölteich“ befindet, liefert die Aufnahme des hydrophoben Anions HgI_3^- in Myoglobin. Die Bindungsstelle liegt, wie die Röntgen-Strukturuntersuchung zeigt, auf der Rückseite des Häms. In diesem Teil des Proteins sind die Bewegungsmöglichkeiten stark eingeschränkt, und selbst recht kleine Liganden können sich nicht direkt an das Eisen binden, weil dieser Bereich nur zur Aufnahme von Sauerstoff bestimmt ist. Wir haben geprüft, wie die Aufnahme von HgI_3^- die Eigenschaften der Eisen(III)-Form des Myoglobins beeinflusst und gezeigt, daß sich bei der Bindung das Gleichgewicht der Spinzustände ($\text{high-spin} \rightleftharpoons \text{low-spin}$) geringfügig ändert. Demnach muß sich die bindende Gruppe (das Pharmakon), hier HgI_3^- , durch das Protein an seine Bindungsstelle schlängeln, wo es die Konformation des Proteins leicht verändert. Die Aufnahme von Xenon, einem sehr großen Atom, muß in ähnlicher Weise erfolgen. Auch der Einfluß des Sauerstoffs auf die Fluoreszenz von Proteinen läßt sich durch eine ähnliche konformative Beweglichkeit erklären, welche die Sauerstoffaufnahme durch eine Schlängelbewegung ermöglicht.

Wie beeinflussen nun solche Bindungsvorgänge die chemischen Eigenschaften des Rezeptors? Die β -Ketten von Hämoglobin^[32], die das an Eisen gebundene (proximale) Histidin enthalten, tragen in der Helix-Region FG eine SH-Gruppe (β -93). Perutz hat gezeigt, daß es vom Spinzustand des Eisens abhängt, wie stark diese SH-Gruppe hervorsticht, denn eine Änderung im Spinzustand verursacht eine Rotation der Helix. So haben wir die folgenden Abhängigkeiten: a) Pharmakon

gebunden – mehr Fe im low-spin-Zustand – hervorstehende SH-Gruppe; b) kein Pharmakon gebunden – mehr Fe im high-spin-Zustand – verborgene SH-Gruppe.

Die Wirkung eines Pharmakons kann eintreten 1) in seiner unmittelbaren Umgebung, die weit vom Eisen entfernt sein kann, z. B. bei 1,3-Diphosphoglycerat, 2) am Eisen durch Veränderung des Spinzustandes – eine bemerkenswerte Relaischaltung, 3) an der SH-Gruppe, die noch weiter entfernt ist. Antagonisten könnten diese Prozesse blockieren, während Agonisten sie auf ganz andere Weise verstärken könnten. Darüber hinaus kann ein Vorgang wie etwa die O_2 -Aufnahme von Hämoglobin durch mehrere sehr verschiedene Stoffe, z. B. 1,3-Diphosphoglycerat, Xenon, HgI_3^- , CO und SH-Reagentien, beeinflusst werden, obwohl diese an anderen Stellen des Hämoglobins gebunden werden. Das sehr unterschiedliche Verhalten dieser Verbindungen im Vergleich zu O_2 , dem Substrat, mit dem die Pharmaka in Konkurrenz treten, zeigt, daß die Entwicklung neuer Pharmaka unerhört schwierig sein kann. Es ist bemerkenswert, daß die Beweglichkeit des Rezeptors, hier des Hämoglobins, für alle diese „Pharmaka“-Effekte verantwortlich ist.

4.3. Schlängelbewegungen und „Tor“-Kontrolle

Ein weiteres Beispiel für das Prinzip der Schlängelbewegung ergibt sich bei nochmaliger Prüfung der Beweglichkeit, welche der Substrat-aufnehmende Spalt im Lysozym besitzt (Abb. 10). Dieser Spalt enthält zwei Aminodicarbonsäurereste, Glu

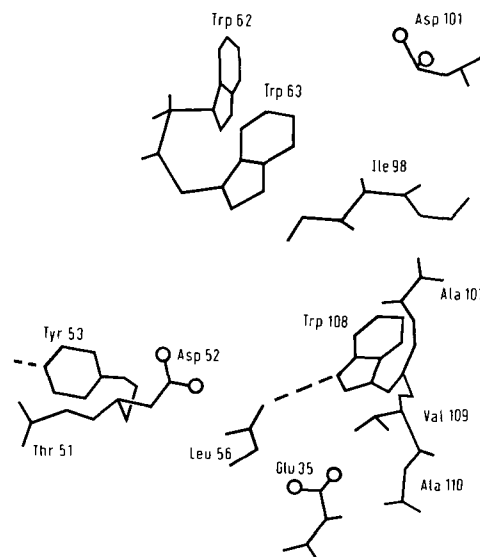
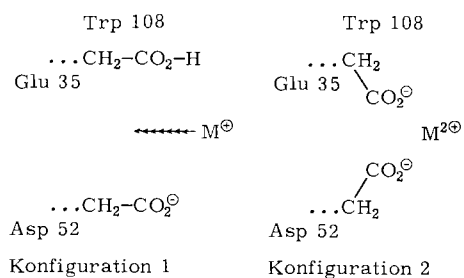


Abb. 10. Das aktive Zentrum des Lysozyms [25]; Ausschnitt aus der Kristallstruktur. Alle Aminosäurereste lassen sich im NMR-Spektrum nachweisen.

35 und Asp 52, von denen Glu 35 protoniert ist und Trp 108 gegenüberliegt. Wenn ein Kation in dieser Region gebunden wird, kann es bei hinreichend starker Wechselwirkung Glu 35 ionisieren; die entstandene Carboxylatgruppe dreht sich von Trp 108 weg (Konfiguration 2 in Schema 1). Bei Kationen mit schwacher Wechselwirkung findet keine derartige Drehung statt (Konfiguration 1). Wir können auf diese Weise Kationen mit starker und mit schwacher Wechselwirkung unterscheiden. Nehmen wir an, daß die beiden Carboxylgruppen unter genau den gleichen Strukturbedingungen ein



zweites Mal auftreten, aber nicht im Lysozym, sondern in einer *dahinter* liegenden Region, in der es eine zweite Bindungsstelle für das Kation gibt. Bei starker Wechselwirkung (Konfiguration 2) würden die Bindungen zu den beiden Carboxylatzentren den Zugang (das Tor) zu dieser Stelle sperren. Bei schwacher Wechselwirkung (Konfiguration 1) könnte das Kation die hinter dem Lysozym liegende Region erreichen, da das Tor offen bleibt. Die Kationen können demnach in sehr verschiedener Weise wirken. Reaktionen, bei denen solche Tore eine Rolle spielen, sind stets mit Schlingelbewegungen verbunden. Genauso kann man sich die Wirkung eines Kations wie Acetylcholin vorstellen.

Ein weiteres Beispiel betrifft den Durchgang eines Ions, z. B. Li^+ , durch eine Membran mit Hilfe eines Ionenträgers (Carriers). Das Ion wird an den Ionenträger gebunden, von ihm abgelöst und schließlich freigesetzt. Es gibt auch eine nach außen gerichtete Ionenpumpe; man könnte ein Wirkungszentrum annehmen, um welches Li^+ z. B. mit Ca^{2+} oder Mg^{2+} konkurriert. Die vom Ionenträger gesteuerten Schritte sind für die Gesamtwirkung des Lithiums sehr wichtig.

Wie wir oben festgestellt haben, ist die Oberfläche von Proteinen viel beweglicher als die inneren Regionen. Unsere Messungen zeigen, daß sich Lysin- und Zuckerseitenketten (in Glykoproteinen) an der Oberfläche mit Korrelationszeiten von 10^{-9} s bewegen, was den Stoßdiffusionsgeschwindigkeiten entspricht. In einer Anhäufung von Proteinen muß es einen Weg zwischen den Proteinmolekülen geben, auf dem jedoch die Diffusion aufgrund der Packung der beweglichen Seitenketten eingeschränkt ist. Aufschluß hierüber erhält man durch Betrachtung der Anordnung der Proteine in der Kristallstruktur. Dabei zeigt sich, daß es zwischen den Proteinmolekülen lange Kanäle gibt, die von „fehlgeordnetem“ Lösungsmittel und Proteinseitenketten ausgefüllt sind. Inhibitoren und andere größere Gruppen, z. B. Schwermetallmarkierungen, können durch die Kanäle recht gut zu den Bindungsstellen diffundieren. Selbstverständlich unterliegt die Diffusion, die fast beliebig selektiv sein kann, auch Beschränkungen. So werden nur gewisse Moleküle imstande sein, bestimmte Proteinregionen in einer Proteinansammlung zu erreichen. Man kann das als eine Art „Torlauf“ an die richtige Stelle ansehen, wobei eine Torkontrolle für die Wirkung (des Pharmakons) verantwortlich ist. Die Beweglichkeit von Proteinen ist auch wichtig für die Antigen-Antikörper-Reaktion. Nach Huber et al.^[15] ist der Teil des Antikörpers, der das Eisen enthält, relativ beweglich und ändert bei der Aufnahme des Antigens die Konformation.

4.4. Kompliziertere Rezeptoren

Der Rezeptor eines Pharmakons muß nicht unbedingt ein Protein oder eine Gruppe von Proteinen sein. Ein Pharmakon

kann auch auf andere große Moleküle einwirken, wie RNA oder DNA, oder es kann sich an einer Membran oder einer ähnlichen kondensierten Phase betätigen. Die Wirkung kleiner Moleküle auf kondensierte Phasen soll nun in derselben Weise wie ihre Wirkung auf große Moleküle untersucht werden. Parallelen zwischen diesen Problemen sind in einem Überblick über Phasen in biologischen Systemen beschrieben worden^[33]. Wir wählen Lipidphasen (Membranen) als Beispiel.

4.5. Membranen

Schnelle Bewegungen von Gruppen, wie wir sie bei Proteinen beschrieben haben, werden in den meisten künstlichen Membranen beobachtet, die aus Lipidvesikeln bestehen. Beispielsweise zeigt ein hochaufgelöstes NMR-Spektrum von Lecithinvesikeln, daß sich die $-\text{N}(\text{CH}_3)_3^+$ -Gruppe am Kopf und die Methylgruppe am Schwanz der Fettsäureketten schnell, die Glycerringruppierung jedoch etwas langsamer bewegt. Diese Beweglichkeiten können sich stark verändern, wenn die Vesikeln größer oder kleiner werden, andere Moleküle aufnehmen, die Temperatur sich ändert oder Ionen an der Oberfläche gebunden werden. Bei biologischen Membranen beobachteten wir ebenso wie andere, daß fast alle Zellmembranen, auch solche, die einen hohen Anteil an Lecithin enthalten, stark verbreiterte ^1H -NMR-Signale ergeben, so daß man im NMR-Spektrum weder die Cholingruppe am Kopf noch die Methylgruppe am Schwanz der Fettsäureketten nachweisen kann. Es läßt sich einfach zeigen, daß der Einbau von Molekülen wie Cholesterin in die Lipiddoppelschicht allgemein zu verringerter Bewegung der Lipidteile des Moleküls führt, während die Kopfgruppe frei bleibt. Wir stehen daher vor dem Problem, daß es in biologischen Membranen starke Beschränkungen der Beweglichkeit gibt, die an Vesikeln nicht auftreten. Diese Beschränkungen können mit der Größe oder der Krümmung der Membranoberfläche oder mit der Bindung der Kopfgruppen zusammenhängen.

Darüber hinaus bewegen sich die Membranlipide schnell in der Ebene der Membran (lateral). Die Inversion der Lipide ist jedoch relativ langsam; daher behält die Membran ihre Asymmetrie bei. Die Zeitskala der lateralen Bewegung und der Diffusion unterscheidet sich nicht sehr stark. Es ist oft vermutet worden, daß Pharmaka diese Bewegungen beeinflussen können. Die Inversion hat eine Zeitkonstante in der Größenordnung von Minuten. Obwohl die Inversion bei einem Fließgleichgewicht, welches sich innerhalb von Sekunden einstellt, keine Rolle spielt, kann sich der Gleichgewichtszustand selbst je nach den Bedingungen in der Umgebung verändern. Vor einigen Jahren schlugen wir vor, diese Asymmetrie mit paramagnetischen Verschiebungsreagentien zu studieren; die erste Untersuchung wurde unabhängig von uns in der UdSSR durchgeführt^[34, 35]. Ein Hauptproblem – wie bei der Untersuchung von Proteinen – war (und ist) die Frage nach der Struktur und der strukturellen Dynamik der Membran und nach den chemischen Faktoren, welche die Dynamik kontrollieren. Zu diesem Zweck prüften wir die Bindung von paramagnetischen Verschiebungsreagentien an eine Reihe von Phosphatestern einschließlich Phosphatidylcholinen.

Als erstes fällt auf, daß die Metall-Ionen sich an die Phosphatgruppe des Phosphatidylcholins der Membran nicht in der gleichen Art wie an Phosphatester, z. B. Phosphoglycerincholin, in Wasser binden. Wenn wir unsere Standardverfahren

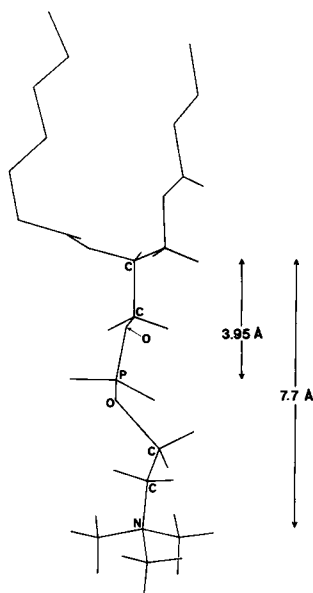


Abb. 11. Struktur von Phosphatidylcholin. Das Molekül ist auffallend beweglich.

für das Studium biologischer Moleküle heranziehen, erhalten wir die in Abbildung 11 gezeigte Struktur, in der sich die Cholin-Kopfgruppe von der Lipiddoppelschicht weit wegstreckt. Das Ergebnis muß nicht in allen Einzelheiten analysiert werden, weil die Bewegung sicherlich recht stark ist; wichtig ist erstens die Beobachtung, daß die Kopfgruppe eines Lipids sich in einer Membran nicht wie eine dissoziierte Kopfgruppe, z. B. Phosphoglycerincholin, in wäßriger Lösung verhält. Zweitens ist die Bindungsstärke von Kationen an den beiden Membranoberflächen (innen und außen) nicht gleich. Drittens binden sich die Kationen selektiv an verschiedene Phospholipide und erzeugen in der Membran eine Asymmetrie, wenn sich ihre Konzentrationen an beiden Seiten der Membran unterscheiden^[36]. Der Einfluß der gebundenen Metall-Ionen auf die Beweglichkeit der Membran ist noch nicht bestimmt worden. Man sieht jedoch sofort, daß die Wirkung einer chemischen Verbindung (eines Pharmakons) auf ein solches System wahrscheinlich nicht von irgendeinem einfachen Faktor abhängt. Es läßt sich demnach absehen, daß die Wirkung eines Pharmakons auf eine Membran wie die Wirkung auf ein Protein äußerst kompliziert ist. Man kann zwar die Arzneimittel-Protein-Bindung Atom für Atom verfolgen, doch existiert diese Möglichkeit bei einer Membranphase eigentlich nicht; vielmehr müssen wir uns wahrscheinlich mit einer überwiegend phänomenologischen Untersuchung der funktionellen und thermodynamischen Eigenschaften zufrieden geben. Das würde bedeuten, daß die Entwicklung neuer Pharmaka weiterhin auf Empirie beruhen muß. Beispielsweise hängen die Fließeigenschaften einer Flüssigkeit, die an einer Reaktion teilnimmt, vom Phasenwechsel $\text{Sol} \rightleftharpoons \text{Gel}$ ab, und es könnte sein, daß geringfügige Verunreinigungen das $\text{Sol} \rightleftharpoons \text{Gel}$ -Gleichgewicht verschieben und so die Dynamik der Phase drastisch ändern.

4.6. Beweglichkeit gebundener Zustände: Zusammenfassung

Folgende Annahmen scheinen unumgänglich zu sein: Da Pharmaka (kleine Moleküle) und Rezeptoren (Proteine, RNA, DNA, Membranen) Molekülbewegungen jeden Grades vollführen können, sollte man in deren Kombinationen ebenfalls

abgestufte Beweglichkeiten finden (Abb. 12). Für ein an der Bindungsstelle gebundenes Pharmakon kann das beste Modell im einen Extremfall ein Molekül sein, das auf einem starren kristallinen Material festgehalten wird, und im anderen ein Pharmakon, das sich zwischen Wasser und einem organischen Medium verteilt hat. Es kann keine allgemeingültige Theorie der Arzneimittelwirkung geben, denn die obigen Befunde umfassen die gesamte Chemie der festen und flüssigen Phasen

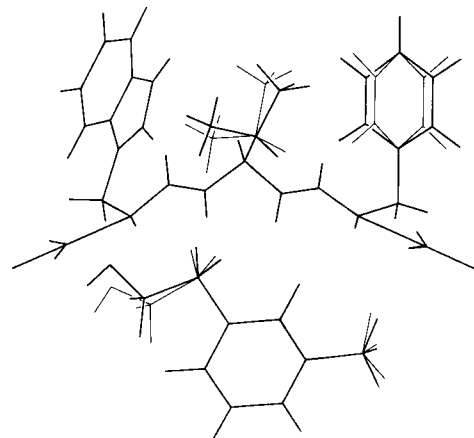


Abb. 12. Schematische Darstellung einer Wechselwirkung zwischen einem beweglichen Protein und einem beweglichen Pharmakon. Die Proteinkette ist durch Pfeile gekennzeichnet.

mit der großen Vielfalt der Wechselwirkungen, die quantitativ nur als Änderung der freien Energie ausgedrückt werden können. Kürzlich haben wir mit NMR-Methoden Organproben untersucht und dabei bemerkenswert viele Bindungsarten in verschiedenen Phasen festgestellt^[37]. Diese Eigenschaften der Zellen können hier nicht diskutiert werden; es sei abschließend noch einmal darauf hingewiesen, daß wir mit vielen neuen Problemen kämpfen müssen, wenn wir uns mit Chemikalien im Körper beschäftigen, die die Beweglichkeit von Molekülen beeinflussen können. Das statische Modell, das auf der Anpassung von Geometrie und Chemie zweier Festkörperoberflächen beruht, muß wahrscheinlich durch das nicht so exakt definierte Konzept der dynamischen (Lösungs-)Zustände ersetzt werden.

Die hier beschriebenen eigenen Arbeiten wurden durch Stipendien des Science Research Councils und des Medical Research Councils ermöglicht. Der Autor möchte auch an dieser Stelle den Mitarbeitern der Oxford Enzyme Group und seinen Studenten für die großartige Unterstützung danken.

Eingegangen am 8. November 1976 [A 187]
Übersetzt von Dr. Wolfgang Karau, Neustadt

- [1] A. S. V. Burgen, G. C. K. Roberts, J. Feeney, *Nature* 253, 753 (1975); zit. Lit.
- [2] C. M. Dobson, L. O. Ford, S. E. Summers, R. J. P. Williams, *J. Chem. Soc. Faraday Trans. II* 71, 1145 (1975).
- [3] B. A. Levine, R. J. P. Williams, *Proc. Roy. Soc. (London)* 345, 5 (1975); B. A. Levine, R. J. P. Williams in B. Pullman: *Environmental Effects on Molecular Structure and Properties*. Reidel, Dordrecht 1976, S. 95ff.
- [4] Siehe z. B. E. Bergmann, B. Pullman: *Molecular and Quantum Pharmacology*. Reidel, Dordrecht 1974.
- [5] C. D. Barry, J. A. Glasel, R. J. P. Williams, A. V. Xavier, *J. Mol. Biol.* 84, 471 (1974).
- [6] C. Altona, M. Sundaralingam, *J. Am. Chem. Soc.* 95, 2333 (1973).
- [7] B. Birdsall, N. J. M. Birdsall, J. Feeney, J. Thornton, *J. Am. Chem. Soc.* 97, 2845 (1975).

- [8] C. D. Barry, D. R. Martin, R. J. P. Williams, A. V. Xavier, J. Mol. Biol. 84, 491 (1974).
 [9] C. Galdes, D. Phil. Thesis, Oxford 1976.
 [10] G. Bentley, E. Dodson, G. Dodson, D. Hodgkin, D. Mercola, Nature 261, 166 (1976).
 [11] G. Bentley, R. J. P. Williams, K. Williamson, noch unveröffentlicht.
 [12] C. D. Barry, J. A. Glasel, A. C. T. North, R. J. P. Williams, A. V. Xavier, Biochim. Biophys. Acta 262, 101 (1972).
 [13] P. Tanswell, J. M. Thornton, A. V. Korda, R. J. P. Williams, Eur. J. Biochem. 57, 135 (1975).
 [14] O. D. Hensens, H. A. O. Hill, J. Thornton, R. J. P. Williams, Phil. Trans. Roy. Soc. (London) B 273, 353 (1976).
 [15] R. Huber, D. Kukla, W. Stiegemann, J. Deisenhofer, A. Jones: Bayer Symposium V, Proteinase Inhibitors, Springer, Berlin 1973.
 [16] K. Wüthrich, G. Wagner, FEBS Lett. 50, 265 (1975).
 [17] I. D. Campbell, C. M. Dobson, R. J. P. Williams, Proc. Roy. Soc. (London) 345, 23, 41 (1975).
 [18] K. Linderstrom-Lang, J. A. Schellmann in P. D. Boyer, H. Lardy, K. Myrbäck: The Enzymes. Vol. 1. Academic Press, New York 1959, S. 443ff.
 [19] J. R. Lakowicz, G. Weber, Biochemistry 12, 4161 (1973).
 [20] A. Cave, C. M. Dobson, J. Parelo, R. J. P. Williams, FEBS Lett. 65, 190 (1976).
 [21] G. R. Moore, R. J. P. Williams, Coord. Chem. Rev. 18, 125 (1956).
 [22] R. J. P. Williams, Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol. 36, 53 (1971).
 [23] J. T. Jahansen, B. L. Vallee, Biochemistry 14, 649 (1975).
 [24] C. M. Dobson, R. J. P. Williams, FEBS Lett. 56, 362 (1975).
 [25] T. Imoto, L. N. Johnson, A. C. T. North, D. C. Phillips, J. A. Rupley in P. D. Boyer: The Enzymes. Vol. 7. Academic Press, New York 1972, S. 665.
 [26] J. Poulsen, C. M. Dobson, R. J. P. Williams, noch unveröffentlicht.
 [27] J. W. Becker, G. N. Reeke, B. A. Cunningham, G. M. Edelman, Nature 259, 407 (1976).
 [28] R. W. King, A. S. V. Burgen, Proc. Roy. Soc. (London) B 193, 107 (1976).
 [29] C. D. Barry, H. A. O. Hill, P. J. Sadler, R. J. P. Williams, Proc. Roy. Soc. (London) A 334, 493 (1973).
 [30] P. S. Burns, R. J. P. Williams, P. E. Wright, J. Chem. Soc. Chem. Commun. 1975, 795.
 [31] Dieses Problem wurde kürzlich sehr eingehend von Prof. H. Frauenfelder (Hamburg Int. Biochemistry Meeting 1976) untersucht.
 [32] M. F. Perutz, L. T. Teneyck, Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol. 36, 295 (1971).
 [33] R. J. P. Williams, Biochim. Biophys. Acta 416, 237 (1975).
 [34] Siehe H. Hauser, M. C. Phillips, B. A. Levine, R. J. P. Williams, Nature 261, 390 (1976).
 [35] L. I. Barsukov, Y. E. Shapiro, A. V. Viktorov, A. F. Bystrov, A. D. Bergelson, Akad. Nauk USSR 208, 717 (1973).
 [36] R. J. P. Williams, Physiol. Chem. Phys. 4, 427 (1972).
 [37] A. Daniels, R. J. P. Williams, P. E. Wright, Nature 261, 321 (1976).

ZUSCHRIFTEN

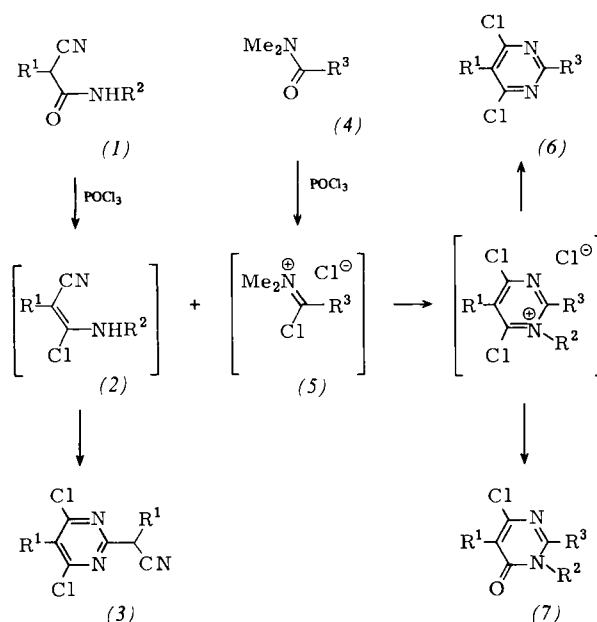
Zuschriften sind kurze vorläufige Berichte über Forschungsergebnisse aus allen Gebieten der Chemie. Vom Inhalt der Arbeiten muß zu erwarten sein, daß er aufgrund seiner Bedeutung, Neuartigkeit oder weiten Anwendbarkeit bei sehr vielen Chemikern allgemeine Beachtung finden wird. Autoren von Zuschriften werden gebeten, bei Einreichung ihrer Manuskripte der Redaktion mitzuteilen, welche Gründe in diesem Sinne für eine vorzügliche Veröffentlichung sprechen. Die gleichen Gründe sollen im Manuskript deutlich zum Ausdruck kommen. Manuskripte, von denen sich bei eingehender Beratung in der Redaktion und mit auswärtigen Gutachtern herausstellt, daß sie diesen Voraussetzungen nicht entsprechen, werden den Autoren mit der Bitte zurückgesandt, sie in einer Spezialzeitschrift erscheinen zu lassen, die sich direkt an den Fachmann des behandelten Gebietes wendet.

Neue Synthese von Pyrimidinen und Pyrimidinonen^[**]

Von R. L. N. Harris und J. L. Huppatz^[*]

N-Alkyl-2-cyanamide (1) setzen sich bei längerem Erhitzen in POCl₃ unter Selbstkondensation zu Pyrimidinen (3) um^[1]. Als Zwischenstufe wurde das α-Chlorenamin (2) vorgeschlagen^[1]. Wir fanden jetzt, daß diese Zwischenstufen geeignete

Substrate für eine alternative Pyrimidinsynthese sind. Als zweite Komponente fungiert dabei das Addukt (5), das aus einem N,N-Dialkylamid (4) und POCl₃ entsteht. So erhielten wir durch Reaktion einer Mischung der Amide (1) und (4) mit POCl₃ bei 100°C die Pyrimidine (6). Je nach der Natur der Gruppe R² können auch Pyrimidinone (7) isoliert werden. Wenn R² eine primäre Alkylgruppe ist, geht sie während der Kondensation nur zum Teil verloren, und es entsteht eine Mischung von Pyrimidinen und Pyrimidinonen. Wenn R² eine sekundäre Alkylgruppe ist, wird sie im allgemeinen vollständig abgespalten, und die Pyrimidine bilden sich in guten Ausbeuten (Tabelle 1).



[*] Dr. R. L. N. Harris, Dr. J. L. Huppatz
 CSIRO, Division of Plant Industry
 P. O. Box 1600, Canberra City, A. C. T. (Australien)

[**] Amid-Säurechlorid-Addukte in der organischen Synthese, 8. Mitteilung.
 – 7. Mitteilung: R. L. N. Harris, J. L. Huppatz, J. N. Phillips, Angew. Chem. 88, 539 (1976); Angew. Chem. Int. Ed. Engl. 15, 498 (1976).