

- [314] R. F. Troxler, A. S. Brown, S. B. Brown, J. Biol. Chem. 254, 3411 (1979).
 [315] S. B. Brown, R. F. G. J. King, Biochem. J. 170, 297 (1978).
 [316] R. J. Beuhler, R. C. Pierce, L. Friedman, H. W. Siegelman, J. Biol. Chem. 251, 2405 (1976).
 [317] N. Tandeau de Marsac, J. Bacteriol. 130, 82 (1977).
 [318] K. Ohki, Y. Fujita, Plant Cell Physiol. 19, 7 (1978).
 [319] S. Gendel, I. Ohad, L. Bogorad, Plant Physiol. 64, 786 (1979).
 [320] J. F. Haury, L. Bogorad, Plant Physiol. 60, 835 (1977).
 [321] H. Falk, K. Thirring, Tetrahedron, im Druck.
 [322] H.-P. Köst, G. Wanner, H. Scheer, Photochem. Photobiol., im Druck.
 [323] Das Vorkommen von Biliproteinen und ein Energietransfer auf PSI in Heterocysten wurde kürzlich mitgeteilt: R. B. Petterson, E. Dolan, H. E. Calvert, B. Ke, Biochim. Biophys. Acta 634, 237 (1981).

Aminoacyl-tRNA-Synthetasen als Zielenzyme für eine rationale Arzneimittelentwicklung

Von Friedrich von der Haar, Hans-Joachim Gabius und Friedrich Cramer^(*)

Professor Hans Herloff Inhoffen zum 75. Geburtstag gewidmet

Das „maßgeschniederte“ Arzneimittel ist ein alter Traum seit *Paracelsus*: „Dosis sola facit venenum“. Ein ideales Pharmakon sollte den pathologischen Vorgang oder den parasitären Organismus maximal inhibieren und dabei den menschlichen Körper minimal schädigen. Um dieses Ziel zu erreichen, muß man versuchen, metabolische Unterschiede zwischen dem pathologischen bzw. parasitären und dem normalen menschlichen Stoffwechsel gezielt auszunutzen. Dies erscheint heute aufgrund der vertieften Kenntnisse enzymatischer Vorgänge ein möglicher, sogar vielversprechender Weg. Das Pharmakon sollte dabei an einem zentral wichtigen Prozeß eingreifen. Ein solcher Prozeß ist die Proteinbiosynthese, bei der die erforderliche Genauigkeit im Zusammenbau der Makromoleküle durch den Vorgang des „Korrekturlesens“ erreicht wird. Es zeigt sich, daß dieser Mechanismus je nach Spezies verschieden verläuft.

1. Einleitung: Ist eine rational zielorientierte Arzneimittelsynthese möglich?

„...hier handelt es sich um das Problem, einen von bestimmten Parasiten infizierten Organismus dadurch zu heilen, daß man die Parasiten innerhalb des lebenden Organismus zur Abtötung bringt, also den Organismus sterilisiert, mit Hilfe von Substanzen, die in der Retorte des Chemikers entstanden sind“^[1].

„Will man experimentell an das Studium der Frage herantreten, so muß man zunächst Substanzen suchen, die 1. im Reagenzglas stark Entwicklungshemmend oder abtörend auf Bakterien wirken, 2. praktisch ungefährlich für den Organis-

mus sind, die schließlich 3. die Desinfektionswirkung auch im Organismus beibehalten“^[2].

So schrieb *Paul Ehrlich* vor 75 Jahren, im selben Jahre, als der Forscher geboren wurde, dem dieser Beitrag gewidmet ist. Die damals weit vorausschauenden Forderungen sind bis heute nur zum geringsten Teil erfüllt worden. Zwar hat die pharmazeutische Forschung eine große Anzahl hervorragend wirksamer Mittel geschaffen, dies jedoch auf recht wenig rationale Weise. Die meisten Pharmaka wurden durch gewaltige „Screening“-Programme unter Tausenden von Verbindungen herausgefunden oder verdanken ihre Entdeckung dem Zufall^[3]. Auch die Wirkungsweise vieler Pharmaka war zunächst unbekannt und ist es zum Teil heute noch. Ein gutes Beispiel hierfür ist Aspirin (Acetylsalicylsäure), das mit Abstand am meisten verwendete Arzneimittel. Aspirin wurde 1899 registriert; seine Wirkungsweise, die Inhibition der Synthese der Prostaglandine bzw. der Prostaglandin-Cyclooxygenase, wurde aber erst 1971 bzw. 1975 aufgeklärt^[4, 5].

Die biochemische und molekularbiologische Forschung hat in den letzten Jahren wesentliche Reaktionsabläufe in

[*] Priv.-Doz. Dr. F. von der Haar, Dipl.-Biochem. H.-J. Gabius,
 Prof. Dr. F. Cramer
 Max-Planck-Institut für experimentelle Medizin, Abteilung Chemie
 Hermann-Rein-Straße 3, D-3400 Göttingen

Zellen und Organismen aufgeklärt und damit der gezielten Synthese von Pharmazeutika ein weites Feld eröffnet. Dennoch gibt es, wie König^[3] in seiner vor kurzem erschienenen Übersicht schilderte, erst für etwa ein Drittel aller Erkrankungen zufriedenstellende Heilmittel^[6].

Nachdem der Wirkungsort für ein spezifisches Heilmittel einmal an einem Modellorganismus oder Versuchstier geklärt worden ist, kann man erwarten, daß Wirkungsweise und Wirkungsstärke sich je nach Organismus durchaus unterscheiden mögen. Beispielsweise sind Pyrimethamin, Trimethoprim und Methotrexat Inhibitoren des essentiellen Enzyms Dihydrofolat-Reduktase. Pyrimethamin erwies sich gegen das Enzym von Plasmodien 3600mal wirksamer als gegen das Enzym aus menschlichem Gewebe. Daher kann man Pyrimethamin als Antimalariamittel gegen das Plasmodienstadium verwenden. Trimethoprim ist gegen die Dihydrofolat-Reduktase aus Bakterien 60000mal wirksamer als gegen das menschliche Enzym und eignet sich somit als ein antibakterielles Mittel. Methotrexat hat eine ganz allgemeine starke Aktivität gegen Dihydrofolat-Reduktase auch aus menschlichem Gewebe und kann daher als antineoplastisches Mittel verwendet werden^[7]. Hätte man vorher die genaue Inhibitionsskizze dieser drei Substanzen in bezug auf die verschiedenen Enzyme gewußt, so hätte man im Prinzip die spezifische Wirkungsweise von Pyrimethamin, Trimethoprim und Methotrexat voraussagen können. Auf diese Weise wäre – rein theoretisch – durch eine vollständige Kenntnis der in-vitro-Situation und der Wirkungsweise der beteiligten Enzyme allein durch biochemische Untersuchungen eine „Volltreffer“-Arzneimittelsynthese möglich gewesen. Die Forderung von Ehrlich: „im Reagenzglas stark hemmend für den Parasiten, aber praktisch ungefährlich für den Organismus“ ließe sich bei einer guten Kenntnis der Eigenschaften der betreffenden Enzyme von Parasiten und Wirt in vitro klären. Zweifellos gibt es solche Unterschiede, die sich um so stärker auswirken werden, je mehr die beteiligten Enzyme eine Schlüsselstellung einnehmen. Hier scheint uns eine wichtige Aufgabe für den forschenden Biochemiker in der pharmazeutischen Industrie zu liegen, nämlich die Unterschiede in der Wirkungsweise einiger Schlüsselenzyme so herauszuarbeiten, daß man mit speziell dafür konstruierten Antimetaboliten gezielt eingreifen kann. Dieses Vorgehen hat unlängst Cohen vorgeschlagen und mit Beispielen belegt; er nennt es: „Volltreffer“-Arzneimittelsynthese (target directed drug synthesis)^[8].

2. Aminoacyl-tRNA-Synthetasen als Zielenzyme

Bei Infektionskrankheiten soll nur das eindringende Pathogen, nicht aber der Wirt geschädigt werden. Ein mögliches Zielenzym für ein Heilmittel muß daher eine solch gewichtige Rolle im Lebenszyklus des Pathogens spielen, daß seine Störung zu einer Wachstumshemmung des Pathogens führt. Es ist nicht nötig, den Eindringling total zu vernichten. Er muß nur so weit zurückgedrängt werden, daß die Selbstverteidigungsmechanismen des Wirts die Infektion unter Kontrolle bekommen können. Man kann dies einmal durch Anwendung von Inhibitoren für Schlüsselenzyme des Metabolismus erreichen. Eine andere Möglichkeit, die vielleicht

noch wirksamer sein würde, bestünde darin, Substrat-Analoga anzubieten, die von Enzymen zu falschen Produkten umgesetzt werden, und ihre Wirksamkeit erst in späteren Schritten entwickeln. Im Idealfall würde es so, unabhängig vom primären Enzym, zu einer Störung an vielen wichtigen Stellen des Metabolismus kommen. Unter diesem Gesichtspunkt scheinen uns die Aminoacyl-tRNA-Synthetasen besonders geeignete Kandidaten für eine zielgerichtete rationale Arzneimittelentwicklung zu sein.

Jeder Organismus enthält mindestens 20 Aminoacyl-tRNA-Synthetasen, entsprechend den 20 bei der Proteinbiosynthese verwendeten Aminosäuren. Jedes Enzym ist spezifisch für eine Aminosäure. Diese wird von ihrem Enzym gebunden, unter Verbrauch von einem Äquivalent Adenosintriphosphat (ATP) aktiviert und schließlich mit dem 3'-terminalen Adenosin einer spezifischen Transfer-Ribonucleinsäure (tRNA) verestert. Die aminoacylierte tRNA wird dann unter Mitwirkung weiterer Proteine in das ribosomale System eingeschleust, wo die Peptidbindungen geknüpft werden (Abb. 1, oberer Teil). Im ribosomalen System wird die Position einer Aminosäure in der wachsenden Peptidkette nur durch die Codon-Anticodon-Wechselwirkung bestimmt. Es findet hier keine Kontrolle der Aminosäure mehr statt. Die spezifische Verknüpfung einer Aminosäure mit dem ent-

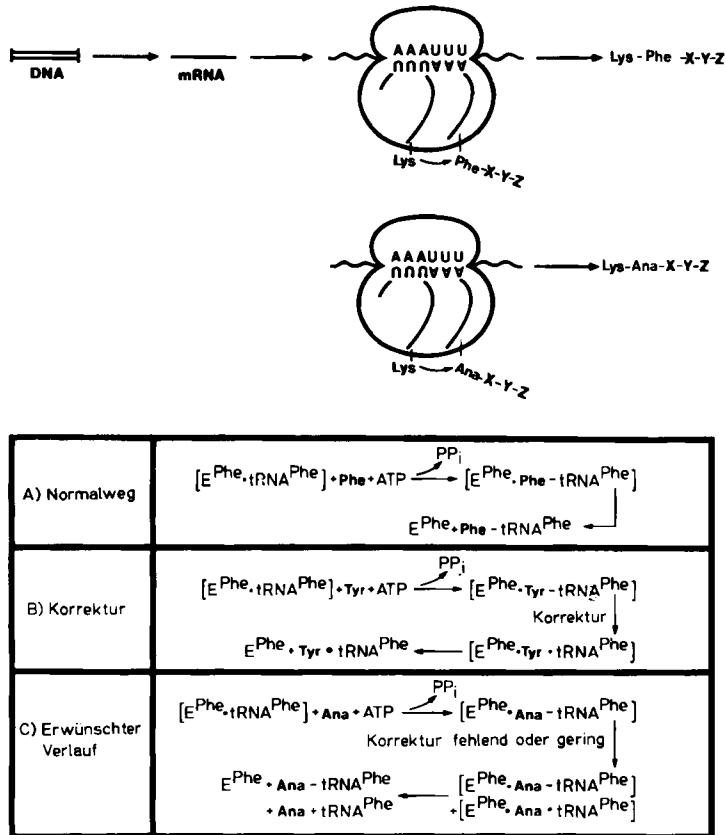


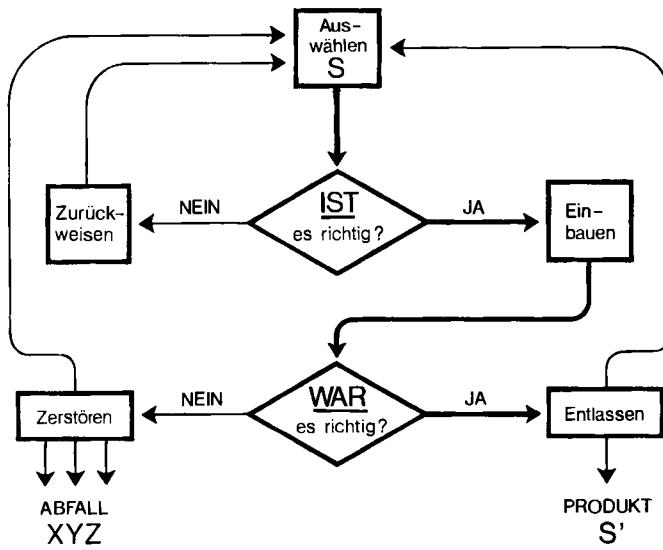
Abb. 1. Schematische Darstellung der Aktivierung von Phenylalanin und seines Einbaus in eine wachsende Peptidkette. A) Normalerweise wird Phenylalanin (Phe) mit (tRNA^{Phe})_n—C—C—A verestert, Phe—tRNA^{Phe}—C—C—A in die ribosomale Synthese eingebracht und Phenylalanin dort eingebaut, wo das Codon UUU mit dem Anticodon AAA (oder AAG) der tRNA^{Phe} Basenpaare bilden kann. B) Der Einbau fehlaktivierter Aminosäuren wie Tyrosin (Tyr) wird durch das Korrekturlesen verhindert. C) Wenn ein Analogon (Ana) des Phenylalanins das Korrekturlesen unterläuft, wird es in die wachsende Peptidkette eingebaut; z.B. würde Lys-Ana—X—Y—Z—NH₂ statt Lys—Phe—X—Y—Z—NH₂ entstehen. (Der Übersichtlichkeit halber wurde —NH₂ nicht gezeichnet. E = Phenylalanyl-tRNA-Synthetase, PP_i = Diphosphat; andere Abkürzungen siehe Text.)

sprechenden Anticodon hängt daher allein von den Aminoacyl-tRNA-Synthetasen ab. Bedenkt man die große Ähnlichkeit von Aminosäuren wie Isoleucin und Valin oder Phenylalanin und Tyrosin, so wird klar, daß an die Genauigkeit der Aminoacyl-tRNA-Synthetasen erhebliche Anforderungen gestellt werden müssen^[9].

Wir haben in den letzten Jahren die Genauigkeit dieser Auswahl von Aminosäuren untersucht und gefunden, daß diese bei einer Reihe von Enzymen aus Bäckerhefe nach einem zweistufigen Mechanismus verläuft^[9, 10]. In Abbildung 1 sind die wesentlichen Elemente dieses Mechanismus für die Phenylalanyl-tRNA-Synthetase aus Bäckerhefe dargestellt. Normalerweise bindet das Enzym Phenylalanin, aktiviert es unter Verbrauch eines Äquivalents ATP und verestert Phenylalanin mit tRNA^{Phe}. Das fertige Produkt wird zur Weiterverwendung in der Proteinbiosynthese von der Phenylalanyl-tRNA-Synthetase entlassen (Abb. 1, Weg A).

Nun ist die Ähnlichkeit zwischen Phenylalanin und Tyrosin so groß, daß das Enzym mit einer gewissen Wahrscheinlichkeit auch Tyrosin bindet. Ein so gebundenes Tyrosin wird genauso wie Phenylalanin aktiviert und auf tRNA^{Phe} übertragen. Es entsteht also Tyr-tRNA^{Phe}, was bei einem Einschleusen dieses falschen Produktes ins ribosomale System dazu führen würde, daß Tyrosin anstelle von Phenylalanin in eine wachsende Peptidkette eingebaut wird. Um dies zu vermeiden, ist ein Prüfschritt eingeschaltet. Tyr-tRNA^{Phe} wird nicht vom Enzym entlassen, sondern die Tyr-tRNA^{Phe}-Bindung wird hydrolytisch gespalten, das falsche Produkt wird zerstört^[11] (Abb. 1, Weg B).

In Schema 1 sind die Elemente dieses Auswahlprozesses noch einmal generalisiert dargestellt. Das Enzym wählt aus der Summe der angebotenen 20 Aminosäuren die richtige aus, indem es zunächst fragt: „Ist die eingehende Aminosäure korrekt?“ Ist die Antwort „nein“, wird die Aminosäure zurückgewiesen; ist die Antwort „ja“, wird die eingehende Aminosäure weiterverarbeitet zum Produkt. Irrtümer in dieser ersten Auswahl werden dadurch eliminiert, daß in einem zweiten Schritt gefragt wird: „War die obige Entscheidung richtig?“. Ist auch hier die Antwort „ja“, wird das Produkt entlassen; ist die Antwort „nein“, wird die Esterbindung hydrolysiert. Der Preis, den die Zelle zahlen muß, ist der Verbrauch eines ATP-Moleküls für jede Fehlaktivierung.



Schema 1. Flußschema bei einem zweistufigen Auswahlprozeß.

Die „Sprache“ dieses Prüfschritts, der genaue chemische Mechanismus, nach dem die Prüfung verläuft, ist uns im Falle der Fehlaktivierung von Tyrosin durch die Phenylalanyl-tRNA-Synthetase noch nicht bekannt. Für ein anderes Beispiel jedoch, die Fehlaktivierung von Valin (Val) durch die Isoleucyl-tRNA-Synthetase, haben wir schon genauere Vorstellungen entwickelt^[12]. Valin unterscheidet sich von Isoleucin (Ile) durch das Fehlen einer Methylgruppe. Wie Abbildung 2 zeigt, wird das falsche Produkt Val-tRNA^{Ile} isoster mit Ile-tRNA^{Ile}, wenn an die Stelle der fehlenden Methylgruppe ein Wassermolekül tritt. Nach all unseren Beobachtungen^[12] wird dieses Wasser durch das Enzym aktiviert und damit zur Spaltung der Val-tRNA^{Ile}-Bindung benutzt. Hier wird also Spezifität dadurch erreicht, daß sich das richtige Produkt gegen eine beim falschen Produkt mögliche Hydrolyse selbst schützt. Da hier danach unterschieden wird, ob eine chemische Reaktion möglich ist oder nicht, haben wir diesen Schritt „Chemisches Korrekturlesen“ (Chemical Proofreading) genannt^[12].

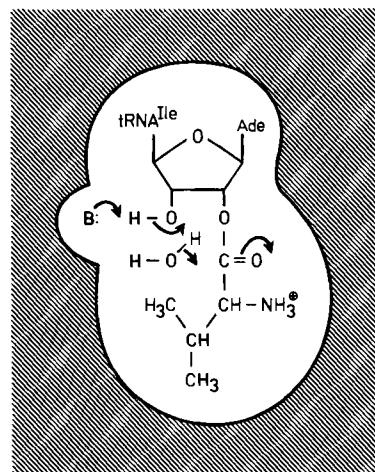


Abb. 2. Mechanismus des Korrekturlesens durch Isoleucyl-tRNA-Synthetase aus Hefe an Val-tRNA^{Ile} (Ade = Adenin).

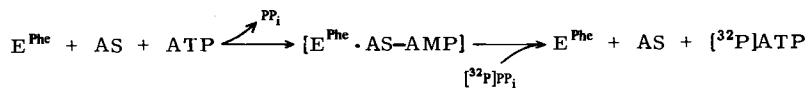
In Abbildung 1, Weg C, ist nun angegeben, wie dieser Prüfschritt zum Objekt einer zielgerichteten Entwicklung von Pharmaka gemacht werden könnte. Man müßte Aminosäure-Analoga entwickeln, die vom Pathogen nicht mehr als falsch erkannt werden, während der Wirt den Unterschied zur natürlichen Aminosäure noch sieht. Voraussetzung dafür ist, daß Unterschiede im Korrekturmechanismus bei den Aminoacyl-tRNA-Synthetasen aus verschiedenen Organismen bestehen. Dann würden die Analoga beim Pathogen in die Proteinbiosynthese eingeschleust. Nach allem, was wir heute über die Genauigkeit der Proteinbiosynthese wissen^[13, 14], sollten schon wenige Fehler ausreichen, um einen Organismus ernsthaft zu stören.

3. Gibt es Unterschiede beim Korrekturlesen durch Phenylalanyl-tRNA-Synthetase aus verschiedenen Organismen?

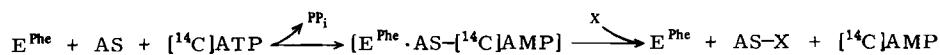
Um eventuelle Unterschiede im Korrekturmechanismus feststellen zu können, wurden Phenylalanyl-tRNA-Synthetase aus *Escherichia coli*, *Saccharomyces cerevisiae* (Bäckerhefe), *Neurospora crassa* und Putenleber gereinigt^[15]. Dann

wurde die Wechselwirkung dieser Enzyme mit Tyrosin, Leucin und Methionin untersucht, da wir wußten, daß diese natürlich vorkommenden Aminosäuren vom Enzym aus Bäckerhefe fehlaktiviert werden^[11]. Weiterhin wurden die Substrateigenschaften von acht Phenylalanin-Analoga untersucht^[15]. Bevor wir jedoch die Ergebnisse zusammenfassend diskutieren können, müssen wir uns kurz mit den methodischen Grundlagen befassen.

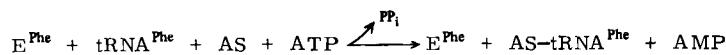
A) ATP/PP_i-Austauschreaktion:



B) AMP-Bildung:



C) Aminoacylierung:



Schema 2. Tests zur Untersuchung der Substrateigenschaften des Phenylalanins und seiner Analoga (AS = Aminosäure; X = tRNA^{Phe} oder andere Nucleophile).

Drei Wege gibt es, um die Aktivität der Phenylalanyl-tRNA-Synthetase zu testen (Schema 2). Da intermediär eine aktivierte Aminosäure unter Abspaltung von PP_i aus ATP gebildet wird, kann man sich die Rückreaktion zunutze machen, um extern vorgegebenes [³²P]PP_i in ATP einzubauen (Schema 2, Weg A). Dieser Test ermöglicht es, eindeutig festzulegen, ob ein Analogon vom Enzym als Substrat verwendet wird oder nicht. Wichtig ist, daß diese Reaktion unabhängig von der tRNA stattfindet.

Das weitere Schicksal des Substrats kann dann verfolgt werden, indem man den Verbrauch von ATP oder die Bildung von Adenosinmonophosphat (AMP) mißt (Schema 2, Weg B). Auch dieser Test beruht darauf, daß ein Substrat zwischenzeitlich unter Verbrauch von einem ATP aktiviert wird. Jede weitere Umsetzung dieses Zwischenprodukts verläuft nun unter Bildung eines AMP-Moleküls. Besonders wichtig an dieser Reaktion ist, daß man den Einfluß der tRNA verfolgen kann, ohne daß sich ein stabiles Endprodukt mit ihr bildet. Aus Weg B in Abbildung 1 ist zu ersehen, daß keine Tyr-tRNA^{Phe} vom Enzym entlassen wird. Jede

zwischenzeitlich auftretende Tyr-tRNA^{Phe} hat aber die Bildung eines AMP zur Folge. Unter Einhaltung geeigneter Kontrollen kann so die Aminoacylierung mit Analoga indirekt bestimmt werden^[12].

Eine weitere Möglichkeit ist schließlich, die Übertragung eines Substrats auf tRNA^{Phe} zu messen, wenn das Enzym ein stabiles Endprodukt entläßt (Schema 2, Weg C). Steht dabei ein radioaktiv markiertes Substrat zur Verfügung, so kann

der Einbau direkt gemessen werden. Andernfalls wird zunächst ein kaltes Substrat in die tRNA eingebaut, und man titriert den nichtumgesetzten tRNA-Anteil mit [¹⁴C]Phenylalanin zurück (siehe auch Tabelle 1).

Um die Aussagefähigkeit dieser Tests zu erweitern, sind wir in Göttingen folgenden Weg gegangen: In natürlicher tRNA^{Phe} befindet sich am 3'-Ende ein Adenosin, an dessen 2'-Hydroxygruppe das Phenylalanin verestert wird. Um Einblicke in die Chemie dieser Reaktion zu bekommen, haben wir das Adenosin von der tRNA entfernt und stattdessen Adenosin-Analoga mit dem Enzym Nucleotidyl-Transferase eingebaut^[16]. Die dafür verwendeten ATP-Analoga sind in Schema 3 wiedergegeben. Für die hier beschriebenen Untersuchungen war Voraussetzung, daß es uns gelang, tRNA^{Phe} so zu modifizieren, daß die Derivate zwar noch mit fehlaktivierter Aminosäure beladen, jedoch nicht mehr korrigiert werden können. Insbesondere die tRNA^{Phe}-C-C-3'-NH₂A war hier von Nutzen. Die 3'-NH₂-Gruppe übernimmt nach der Übertragung auf die 2'-Hydroxygruppe durch nucleophilen Angriff die Aminosäure schneller als die Korrekturfunktion wirksam werden kann. Das sich dabei bildende Amid ist so stabil, daß es von der Phenylalanyl-tRNA-Synthetase nicht mehr hydrolysiert werden kann^[9, 14] (Schema 4).

Mit diesen Methoden konnten wir die im folgenden zusammengefaßten Ergebnisse gewinnen:

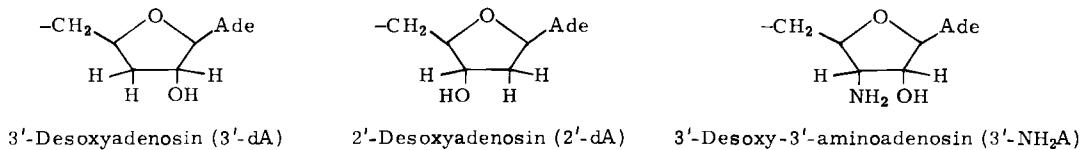
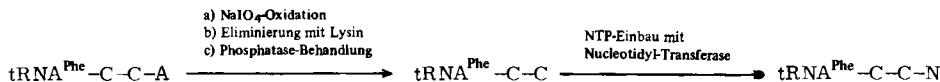
a) Die Phenylalanyl-tRNA-Synthetasen aus *E. coli*, Bäckerhefe und *N. crassa* verhalten sich sehr ähnlich. Sie aktivieren alle untersuchten Phenylalanin-Analoga.

b) In unterschiedlichem Ausmaß, aber in allen Fällen deutlich nachweisbar, werden die Analoga auf tRNA^{Phe}-C-C-3'-NH₂A übertragen.

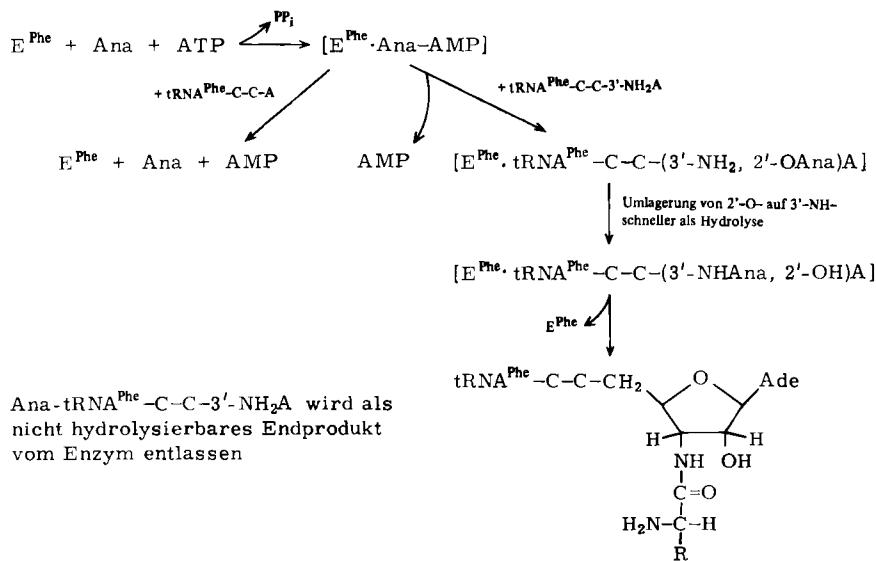
c) Mit tRNA^{Phe}-C-C-A bilden die Analoga – mit einer Ausnahme, die in Abschnitt 4 diskutiert wird – keine stabilen Produkte. Der AMP-Bildungstest ermöglicht aber die Aussage, daß eine zwischenzeitliche Übertragung und Korrektur stattfindet.

Tabelle 1. tRNA^{Phe}-C-C-N-abhängige [¹⁴C]AMP-Bildung durch Phenylalanyl-tRNA-Synthetase aus Bäckerhefe und Putenleber; *k*_{cat} [min⁻¹].

| Enzym | Quelle | Leu | Met | Tyr |
|--|------------|-------|-------|-------|
| <i>E</i> ^{Phe} | Bäckerhefe | <0.05 | <0.05 | <0.05 |
| | Putenleber | 0.75 | 1.35 | <0.1 |
| [<i>E</i> ^{Phe} · tRNA ^{Phe} - C-C] | Bäckerhefe | <0.05 | <0.05 | <0.05 |
| | Putenleber | 0.80 | 1.60 | <0.1 |
| [<i>E</i> ^{Phe} · tRNA ^{Phe} - C-C-3'-dA] | Bäckerhefe | <0.1 | <0.1 | <0.1 |
| | Putenleber | 0.64 | 1.13 | <0.1 |
| [<i>E</i> ^{Phe} · tRNA ^{Phe} - C-C-A] | Bäckerhefe | 0.64 | 2.03 | 6.80 |
| | Putenleber | 2.93 | 3.62 | 0.31 |
| [<i>E</i> ^{Phe} · tRNA ^{Phe} - C-C-2'-dA] | Bäckerhefe | <0.05 | <0.05 | <0.05 |
| | Putenleber | 2.50 | 3.57 | 0.27 |



Schema 3. Modifizierung des 3'-Endes der tRNA^{Phe} ($\text{tRNA}^{\text{Phe}}-\text{C}-\text{C}-3'\text{-dA}$ sowie $\text{tRNA}^{\text{Phe}}-\text{C}-\text{C}-3'\text{-NH}_2\text{A}$ sind Substrate; $\text{tRNA}^{\text{Phe}}-\text{C}-\text{C}-2'\text{-dA}$ sowie $\text{tRNA}^{\text{Phe}}-\text{C}-\text{C}$ sind keine Substrate. N = Beliebiges Nucleosid).



Schema 4. Verhalten von $\text{tRNA}^{\text{Phe}}-\text{C}-\text{C}-3'\text{-NH}_2\text{A}$ bei der Übertragung von Phenylalanin-Analoga.

d) Die Analoga unterscheiden sich deutlich in der Fähigkeit, Phenylalanin in den einzelnen Reaktionen zu ersetzen. Daraus lassen sich Rückschlüsse über die Art der Bindungsstelle ziehen^[15].

Das Putenleber-Enzym verhält sich deutlich anders als die Enzyme aus den niederen Organismen:

a) Auch mit dem Putenleber-Enzym werden alle getesteten Analoga aktiviert, wie sich durch den ATP/PP_i-Austausch zeigen ließ. Die Reaktivität war aber deutlich anders. So wird z. B. Tyrosin nur außerordentlich schlecht aktiviert, während es bei den anderen Enzymen eines der besten Analoga war^[15].

b) Im Gegensatz zu den Enzymen aus *E. coli*, Bäckerhefe und *N. crassa* war das Putenleber-Enzym nicht imstande, irgendeines der fehlaktivierten Analoga auf $\text{tRNA}^{\text{Phe}}-\text{C}-\text{C}-3'\text{-NH}_2\text{A}$ zu übertragen. Da jedoch der AMP-Bildungstest positiv verlief, mußten die aktivierte Analoga in Abhängigkeit von tRNA weiter umgesetzt worden sein.

Dieses Ergebnis legt den Gedanken nahe, daß für das Putenleber-Enzym ein Korrekturmekanismus entwickelt wurde, bei dem die fehlaktivierten Aminosäuren nicht mehr auf die tRNA^{Phe} übertragen werden. Dieser Schluß wird durch die Daten in Tabelle 1 stark gestützt. Wir haben hier die [¹⁴C]AMP-Bildung in Abhängigkeit von den modifizierten $\text{tRNA}^{\text{Phe}}-\text{C}-\text{C}-\text{N}$ sowie den aktivierte Aminosäuren gemessen. Die Werte für das Bäckerhefe- und Putenleber-Enzym wurden dabei verglichen. Sowohl mit freiem Enzym als

auch mit dem $\text{E}^{\text{Phe}} \cdot \text{tRNA}^{\text{Phe}}-\text{C}-\text{C}-\text{Komplex}$ sind die aktivierte Zwischenstufen sehr stabil, wenn wir das Hefe-Enzym verwenden. Mit dem Putenleber-Enzym sind die aktivierte Zwischenstufen instabil, wie die deutliche AMP-Bildung zu erkennen gibt.

Der Komplex $\text{E}^{\text{Phe}} \cdot \text{tRNA}^{\text{Phe}}-\text{C}-\text{C}-3'\text{-dA}$ zeigt eine gleich große AMP-Bildungsgeschwindigkeit wie das freie Enzym. Der fehlende Einfluß der tRNA-C-C-3'-dA auf die AMP-Bildung hat für das Hefe- und das Putenleber-Enzym aber unterschiedliche Ursachen. Beim Hefe-Enzym wird die $\text{tRNA}^{\text{Phe}}-\text{C}-\text{C}-3'\text{-dA}$ mit dem Analogon verestert, kann aber nicht korrigiert werden, weil die fehlende 3'-Hydroxygruppe für die Korrektur essentiell ist^[14]. Beim Putenleber-Enzym findet keine Übertragung statt.

Der Komplex mit der natürlichen $\text{tRNA}^{\text{Phe}}-\text{C}-\text{C}-\text{A}$ führt bei beiden Enzymen zur Korrektur und damit zur erhöhten AMP-Bildung, wie zu erwarten ist. Ein unerwartetes Ergebnis fanden wir für den Komplex $\text{E}^{\text{Phe}} \cdot \text{tRNA}^{\text{Phe}}-\text{C}-\text{C}-2'\text{-dA}$ beim Putenleber-Enzym. Dieser tRNA^{Phe}-C-C-2'-dA fehlt die akzeptierende Hydroxygruppe, und infolgedessen kann beim Hefe-Enzym auch keine AMP-Bildung stattfinden, da dazu ja die Übertragung auf die tRNA^{Phe} Voraussetzung ist. Auch mit dem Putenleber-Enzym konnte weder mit Phenylalanin noch mit Phenylalanin-Analoga eine Übertragung auf die tRNA^{Phe}-C-C-2'-dA beobachtet werden. Trotzdem findet mit dem Putenleber-Enzym in Anwesenheit von tRNA-C-C-2'-dA eine stark

erhöhte AMP-Bildung statt. Da diese parallel zur Fähigkeit, die verschiedenen Aminosäure-Analoga fehlzuaktivieren, verläuft, möchten wir auch in diesem Fall die beobachtete AMP-Bildung dem Korrekturmekanismus zuschreiben. Das bedeutet dann aber, daß mit dem Putenleber-Enzym ein tRNA^{Phe}-abhängiger Korrekturschritt stattfindet, bei dem es nicht zur zwischenzeitlichen Übertragung der falschen Aminosäure auf tRNA^{Phe} kommt. Trotzdem spielen alle Elemente, die für diese Reaktion beim Hefe-Enzym^[14] wichtig sind, eine Rolle. Im wesentlichen sind dies das 3'-terminale Adenosin und dessen nicht akzeptierende 3'-Hydroxygruppe. Diese Befunde stimmen außerordentlich gut mit unseren Vorstellungen über die Steuerung der Enzymaktivität durch die reaktive Stelle (reactive site triggering) über ein^[17].

Ein Korrekturmekanismus, der ohne Übertragung der falschen Aminosäure verläuft, ist offensichtlich sicherer als einer, der erst nach der Übertragung stattfindet. Ohne Übertragung auf tRNA kann eine fehlaktivierte Aminosäure niemals in das ribosomale System und damit in eine wachsende Peptidkette gelangen. Der einzige Nachteil einer Fehlaktivierung ist bei diesem Vorgang, daß ein Enzymmolekül solange blockiert ist, wie das Analogon eine Bindungsstelle besetzt. Ein Schaden für die Zelle könnte hier aber erst bei sehr starker Inhibition erwartet werden. Unabhängig von den Konsequenzen für die Zellbiologie interessiert jedoch in diesem Zusammenhang nur, daß Unterschiede im Mechanismus der Korrektur bestehen, da sie ja eine Voraussetzung für die Entwicklung von Pharmaka sind, die gegen die Phenylalanyl-tRNA-Synthetase gerichtet sein sollen. Die weiterführende Frage ist dann, ob sich diese Unterschiede ausnutzen lassen.

4. N-Benzyl-L-phenylalanin

N-Benzyl-D,L-amphetamin ist ein ausgezeichneter Inhibitor für die ATP/PP_i-Austauschreaktion der Phenylalanyl-tRNA-Synthetase von *E. coli*. Demgegenüber wird das Enzym aus Rattenleber kaum gehemmt^[18]. Trotz der nahen strukturellen Verwandtschaft hemmt keines der N-Benzyl-phenylalanin-Enantiomere den ATP/PP_i-Austausch mit dem Enzym von *E. coli*^[19]. Dies scheint zunächst ein Widerspruch zu sein, der sich aber leicht lösen läßt, wenn man annimmt, daß N-Benzyl-L-phenylalanin ein Substrat für das Enzym aus *E. coli* ist. Diese Erklärung, die von den Autoren^[18, 19] seinerzeit offensichtlich nicht in Erwägung gezogen wurde, konnten wir als richtig erkennen^[15].

Während N-Benzyl-D,L-amphetamin eine um Größenordnungen unterschiedliche Inhibition beim *E. coli*- und Rattenleber-Enzym hervorruft^[18], ist die Michaelis-Konstante (K_m) für N-Benzyl-L-phenylalanin bei den Enzymen aus *E. coli*, Bäckerhefe und Rattenleber sehr ähnlich (Tabelle 2). In Übereinstimmung mit dem in Abschnitt 3 für andere Analoga beschriebenen Verhalten wird N-Benzyl-L-phenylalanin nur durch die Enzyme von *E. coli* und Hefe auf tRNA^{Phe}-C-C-3'-NH₂A übertragen, nicht jedoch vom Putenleber-Enzym (Tabelle 2). Vergleicht man K_m der ATP/PP_i-Austauschreaktion und der Übertragung auf die tRNA^{Phe}-C-C-3'-NH₂A, so zeigt sich, daß diese in der tRNA^{Phe}-abhängigen Übertragung beim *E. coli*-Enzym um den Faktor 17 und beim Hefe-Enzym um den Faktor 38 höher

ist als beim Austausch mit freiem Enzym. Wir haben bei allen verwendeten Analoga gefunden, daß K_m bei tRNA^{Phe}-abhängigen Reaktionen wesentlich höher als bei Reaktionen mit freiem Enzym ist^[15]. Diese Beobachtung stimmt wieder mit unseren früher entwickelten Vorstellungen über den Einfluß der tRNA^{Phe} auf die Konformation der Phenylalanyl-tRNA-Synthetase überein^[14, 17]. Sie stellt jene Interpretationen in Frage, die versuchen, Ergebnisse des ATP/PP_i-Austausches mit freiem Enzym zur Erklärung tRNA-abhängiger Reaktionen heranzuziehen^[19].

Tabelle 2. N-Benzyl-L-phenylalanin als Substrat für mehrere Phenylalanyl-tRNA-Synthetasen.

| | Enzym isoliert aus <i>E. coli</i> | Bäcker- hefe | Puten- leber |
|--|--------------------------------------|-----------------|-----------------|
| K_m im ATP/PP _i -Austausch [μM] | 85 | 157 | 205 |
| Veresterung mit tRNA ^{Phe} -C-C-3'-NH ₂ A [%] [a] | 64 | 50 | 0 |
| K_m bei der Veresterung mit tRNA ^{Phe} -C-C-3'-NH ₂ A [μM] | 1500 | 6000 | — |
| Veresterung mit tRNA ^{Phe} -C-C-A [%] [b] | 6 | 0 | 0 |

[a] Mit Rücktitration bestimmt: Enzym, tRNA^{Phe}-C-C-3'-NH₂A, ATP und unmarkiertes Analogon werden zunächst 30 min inkubiert. Dann werden überschüssiges ATP, [¹⁴C]Phenylalanin und Enzym zugegeben, um den Rest nicht aminoacylierter tRNA^{Phe} zu aminoacylieren. Der Anteil fehlbeladener tRNA ist die Differenz zwischen gesamter tRNA und der bei der zweiten Aminoacylierung erfaßten tRNA. [b] Mit Rücktitration und durch Einfüllung von [¹⁴C]-N-Benzyl-L-phenylalanin und anschließende Analyse bestimmt.

Im Zusammenhang dieser Diskussion ist es jedoch von außerordentlicher Bedeutung, daß N-Benzyl-L-phenylalanin zu einem geringen, aber eindeutig meßbaren Ausmaß nur vom *E. coli*-Enzym auf die unmodifizierte tRNA^{Phe}-C-C-A übertragen werden kann (Tabelle 2), daß es also, anders ausgedrückt, dem Korrekturschritt entgehen kann und als stabiles Produkt vom Enzym entlassen wird.

Das mit nicht-markiertem Analogon erhaltenen Ergebnis in Tabelle 2 wurde wie folgt eindeutig bestätigt. [¹⁴C]N-Benzyl-L-phenylalanin wurde synthetisiert und in tRNA^{Phe} eingebaut. Die [¹⁴C]N-Benzyl-L-Phe-tRNA^{Phe}-C-C-A wurde säulenchromatographisch vom Substrat abgetrennt und mit Alkali gespalten. Die anschließende dünnenschichtchromatographische Analyse ergab, daß bei der alkalischen Spaltung der beladenen tRNA^{Phe} als einziges radioaktiv markiertes Produkt [¹⁴C]N-Benzyl-L-phenylalanin entstanden war^[15].

5. Schluß und Ausblick

Wir haben in diesem Beitrag kein neues Arzneimittel beschrieben oder vorgeschlagen, wir haben vielmehr versucht, ein Prinzip an einem Beispiel zu erläutern: Das Prinzip der „Volltreffer“-Arzneimittelsynthese; als Zielsystem wurde das Beispiel des Korrekturlesens in der Proteinbiosynthese diskutiert.

Im Laufe der Evolution haben sich in ihren Verzweigungen die biochemischen Synthesewege angepaßt, verbessert und verfeinert. Auch ein so zentraler und universeller Vor-

gang wie die Proteinbiosynthese, der von dem universellen genetischen Code dirigiert wird und bei allen Organismen die gleichen 20 Aminosäuren benutzt, weist wichtige Spezies-Unterschiede auf, die sich in der Genauigkeit der Aminosäureerkennung bemerkbar machen. Diese Unterschiede sollten sich pharmakologisch ausnutzen lassen. Organismen sollten sich, abhängig von der Evolutionshöhe, im Einbau „falscher“ Aminosäuren differenziert verhalten. Hierfür haben wir experimentelle Beweise am System der Phenylalanyl-tRNA-Synthetase gefunden. Es gibt zahlreiche aminosäureanaloge Antimetaboliten, deren Wirkungsweise noch größtenteils unbekannt ist. Und es gibt außer Phenylalanyl-tRNA-Synthetase noch Aminoacyl-tRNA-Synthetasen für die 19 anderen Aminosäuren – ein weit offenes Feld für künftige Untersuchungen.

*Wir danken Prof. Dr. E. Holler, Regensburg, für eine Probe teilweise gereinigter Phenylalanyl-tRNA-Synthetase aus *E. coli* sowie Fritz Benseler, Erika Graeser und Jörg Schischkoff für ihre engagierte Mitarbeit bei der Reinigung des Enzyms aus *Neurospora crassa* und bei der Synthese von N-Benzyl-L-phenylalanin.*

Eingegangen am 30. Januar 1981 [A 356]

- [1] P. Ehrlich, Ansprache bei der Einweihung des Georg-Speyer-Hauses am 6. September 1906. Zitiert nach F. Himmelweit: *The Collected Papers of Paul Ehrlich*. Vol. 3: *Chemotherapy*. Pergamon Press, New York 1960.
- [2] H. Bechhold, P. Ehrlich, Beziehung zwischen chemischer Konstitution und Desinfektionswirkung. Zitatquelle vgl. [1].
- [3] Vgl. H. König, *Angew. Chem.* 92, 802 (1980); *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* 19, 749 (1980).
- [4] J. R. Vane, *Nature New Biol.* 231, 232 (1971).
- [5] G. Roth, N. Stanford, P. Majerus, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 72, 3073 (1975).
- [6] E. Wiekert: *Pharma-Dialog* 54, *Arzneimittelforschung* 1978, herausgeg. vom Bundesverband der Pharmazeutischen Industrie, Frankfurt/M. 1978.
- [7] A. Albert: *Selective Toxicity*. Chapman and Hall, London 1973.
- [8] S. S. Cohen, *Science* 205, 964 (1979).
- [9] F. von der Haar, *Naturwissenschaften* 63, 519 (1976).
- [10] F. von der Haar, *FEBS Lett.* 79, 225 (1977).
- [11] G. L. Igloi, F. von der Haar, F. Cramer, *Biochemistry* 17, 3459 (1978).
- [12] F. von der Haar, F. Cramer, *Biochemistry* 15, 4131 (1976).
- [13] M. Yarus, *Progr. Nucleic Acid Res. Mol. Biol.* 23, 195 (1979).
- [14] F. Cramer, F. von der Haar, G. L. Igloi in P. R. Schimmel, D. Söll, J. Abelson: *Transfer RNA: Structure, Properties and Recognition*. Cold Spring Harbor Laboratory 1979, S. 267.
- [15] F. Cramer, F. von der Haar, H.-J. Gabius, noch unveröffentlicht; Arbeiten mit *E. coli*- und Hefe-Enzym: H.-J. Gabius, Diplomarbeit, Medizinische Hochschule Hannover 1980; Arbeiten mit Putenleber-Enzym: H.-J. Gabius, Teil der Dissertation, unveröffentlicht; Arbeiten mit *Neurospora-crassa*-Enzym: F. von der Haar, unveröffentlicht.
- [16] M. Sprinzl, H. Sternbach, F. von der Haar, F. Cramer, *Eur. J. Biochem.* 81, 579 (1977).
- [17] F. von der Haar in J. Augustyniak: *Biological Implications of Protein-Nucleic Acid Interactions*. Elsevier/North-Holland, Amsterdam 1980, S. 325.
- [18] D. V. Santi, R. W. Webster, Jr., *J. Med. Chem.* 19, 1276 (1976).
- [19] D. V. Santi, P. V. Danenberg, *Biochemistry* 10, 4813 (1971).

Fortschritte der Organophosphorchemie ausgehend von Dichlor(methyl)phosphan

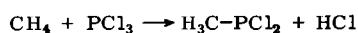
Von Klaus Weissermel, Hanß-Jerg Kleiner, Manfred Finke und Utz-Hellmuth Felcht^[*]

Professor Hans Herloff Inhoffen zum 75. Geburtstag gewidmet

Neben Phosphortrichlorid und Phosphan gewinnt Dichlor(methyl)phosphan als Ausgangsstoff für die Synthese von Organophosphorverbindungen zunehmend an Bedeutung. Es eröffnet einen leichten Zugang zu Phosphonsäure-, Phosphinsäure- und Phosphonigsäure-Derivaten sowie ihren Folgeprodukten. Das Synthese- und Anwendungspotential von Phosphororganika, die aus dem technisch hergestellten Dichlor(methyl)phosphan erhältlich sind, wird an zahlreichen Beispielen gezeigt.

1. Einleitung

Der Einstieg in die Phosphor-Kohlenstoff-Chemie setzt die Knüpfung mindestens einer Phosphor-Kohlenstoff-Bindung voraus. Hierfür bieten sich mehrere Möglichkeiten an. Im technischen Maßstab realisiert wurde die Umsetzung von Methan mit Phosphortrichlorid. Sie führt bei etwa 600 °C in der Gasphase und kurzen Verweilzeiten in glatter Reaktion zu Dichlor(methyl)phosphan (1)^[1].



(1)

(1) ist eine farblose, unzersetzt destillierbare, aber extrem feuchtigkeitsempfindliche Flüssigkeit, die durch hohe Reaktivität gekennzeichnet ist. Es wurden zahlreiche Reaktionen dieses einfachen „Bausteins“ untersucht, die an ausgewählten Beispielen beschrieben werden.

2. Umsetzungen des Dichlor(methyl)phosphans (1) und seiner wichtigsten Folgeprodukte

Bei optimierter Reaktionsführung ergeben die einfachen Umsetzungen hohe Ausbeuten.

Die wichtigsten Reaktionen von (1)^[2,3] sind schematisch in Abbildung 1 zusammengestellt. Die Oxidation von (1) führt direkt zu Methylphosphonsäuredichlorid (2)^[4]. Als Oxidationsmittel können Luftsauerstoff, Distickstofftetra-

[*] Prof. K. Weissermel, Dr. H.-J. Kleiner, Dr. M. Finke, Dr. U.-H. Felcht
Hoechst Aktiengesellschaft
Postfach 800320, D-6230 Frankfurt am Main 80