

ANGEWANDTE CHEMIE

95. Jahrgang 1983

Heft 6

Seite 431-514

Phosphorothioatanaloga von Nucleotiden – Werkzeuge zur Untersuchung biochemischer Prozesse

Von Fritz Eckstein*

Nucleosidphosphorothioate sind vielseitig verwendbare Analoga von Nucleotiden. So sind sie einerseits in vielen, aber nicht in allen Fällen gegen Hydrolyse stabiler als die nicht-modifizierten Nucleotide, eine Eigenschaft, die sie mit anderen Nucleotidanalogen gemeinsam haben. Andererseits sind sie für viele, aber nicht für alle Reaktionen, bei denen das Nucleotid oder die Phosphorothioatgruppe auf andere Acceptor-moleküle als H₂O übertragen wird, gute Substrate. Dies führt dazu, daß sie nicht so rasch wieder enzymatisch entfernt werden können, wenn sie einmal in ein System wie DNA inkorporiert sind. Was sie gewissermaßen einzigartig macht, ist die Chiralität am Phosphor, wenn zwei ungleiche Reste mit der Phosphorothioatgruppe verbunden sind. Dies ermöglicht ihre Verwendung zur Untersuchung stereochemischer Aspekte enzymatischer Reaktionen. Zu diesen Eigenschaften kommen solche hinzu, die man von einem Austausch eines Sauerstoffatoms in einer Phosphatgruppe gegen ein Schwefelatom erwartet, wie z. B. die erhöhte Affinität zu Quecksilberverbindungen und die starke Verschiebung der Signale im ³¹P-NMR-Spektrum. Bedenkt man, in wie vielen biologisch interessanten Verbindungen Phosphatgruppen enthalten sind, verwundert das starke Interesse an diesen Nucleotidanalogen nicht.

1. Einleitung^[**]

Nucleosidphosphorothioate sind Analoga von Nucleotiden, bei denen ein nichtverbrückendes Sauerstoffatom ei-

ner Phosphatgruppe durch ein Schwefelatom ersetzt ist. Sind wie bei den α- und β-Phosphatgruppen von ATP zwei ungleiche Reste mit der Phosphatgruppe verknüpft, führt dieser Austausch zur Bildung eines Chiralitätszentrums am Phosphoratom und in Verbindung mit dem Nucleosid zur Bildung eines Paares von Diastereomeren. Diese Eigenschaft hat die Phosphorothioatanaloga von Nucleotiden, ganz besonders die von ATP, zu interessanten Substraten für enzymatische Phosphoryl- und Nucleotidyltransferreaktionen gemacht, da sich mit ihnen die Stereochemie dieser Reaktionen untersuchen läßt. Daß diese Entwicklung in den vergangenen fünf Jahren stürmisch verlaufen ist, läßt sich aus der großen Zahl von Übersichtsartikeln, die sich mit diesem Thema befassen, ablesen^[1-9]. Die Verwendung der Nucleosidphosphorothioate blieb nicht auf die Bioorganische Chemie beschränkt; in zunehmendem Maße haben sich für sie auch Biochemiker und Molekularbiologen interessiert, und zwar hauptsächlich weil im allgemeinen die Phosphorothioate gegen hydrolytische Spaltung stabiler sind als die Phosphate. Die Entwicklungen sollen in diesem Fortschrittsbericht zusammenfassend geschildert werden.

[*] Prof. Dr. F. Eckstein

Max-Planck-Institut für Experimentelle Medizin, Abteilung Chemie
Hermann-Rein-Straße 3, D-3400 Göttingen

[**] Abkürzungen: Ade = Adenin; Gua = Guanin; Cyt = Cytosin; Thy = Thymin; Ura = Uracil. A = Adenosin; G = Guanosin; C = Cytidin; U = Urudin; T = Thymidin; N = nicht spezifiziertes Nucleosid; NMPS = Nucleosid-5'-phosphorothioat; NDP_A-A und -B = Diastereomere von Nucleosid-5'-O-(1-thiodiphosphenat); NTP_A-A und -B = Diastereomere von Nucleosid-5'-O-(1-thiotriphosphat); NDPS = Nucleosid-5'-O-(2-thiodiphosphate); NTP_S = Nucleosid-5'-O-(3-thiotriphosphate); cNMPs = Nucleosid-3',5'-cyclophosphorothioat. Das Präfix d bedeutet, daß es sich jeweils um das entsprechende 2'-Desoxynucleosidderivat handelt. ATP = Adenosin-5'-triphosphat; GTP = Guanosin-5'-triphosphat; AMPPNP und GMPPNP = Adenylyl- bzw. Guanylyl-imidodiphosphat; Up(S)A = 5'-O-Adenosyl-3'-O-uridyl-phosphorothioat; d[Tp(S)A]-5'-O-(2'-Desoxyadenosyl)-3'-O-thymidyl-phosphorothioat; Poly[d(A-T)] = alternierendes Copolymer aus dAMP und TMP; Poly[d(A_xT)] = alternierendes Copolymer aus dAMP und TMPS; NAD = Nicotinsäure-amid-adenin-dinucleotid. Für die Dinucleosidphosphorothioate und Polymere, die aus anderen Nucleotiden aufgebaut sind, gelten die Abkürzungen entsprechend. PEP = Phosphoenolpyruvat; DEAE = Diethylaminoethyl; HPLC = High Performance Liquid Chromatography.

2. Synthese und Struktur

2.1. Nucleosiddi- und -triphosphate

Inzwischen sind fast alle Phosphorothioatanaloga der Ribo- und Desoxyribonucleosid-5'-mono-, -di- und -triphosphate synthetisiert worden (Fig. 1). Ihre Herstellung

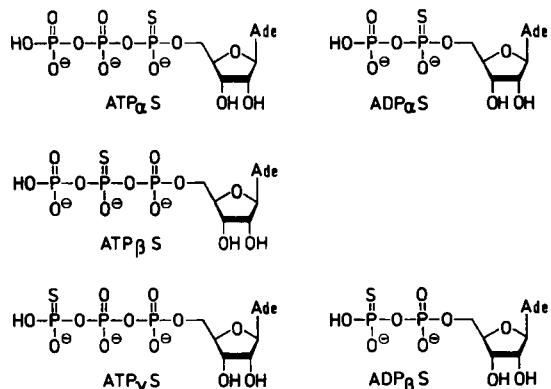


Fig. 1. Strukturformeln für die Phosphorothioate von ATP und ADP.

ist zwar einfach, doch sind die Ausbeuten nicht immer befriedigend. Für die Analoga mit terminaler Phosphorothioatgruppe wie (d)NTP_γS und (d)NDP_βS ist der einfachste Syntheseweg die Aktivierung von *S*-(β-Cyanethyl)phosphorothioat mit Diphenylphosphorsäurechlorid und Umsetzung mit (d)NDP bzw. (d)NMP mit anschließender Alkalibehandlung zur Abspaltung der β-Cyanethylgruppe^[10] (Fig. 2). Für die Synthese der Analoga von (d)NDP oder

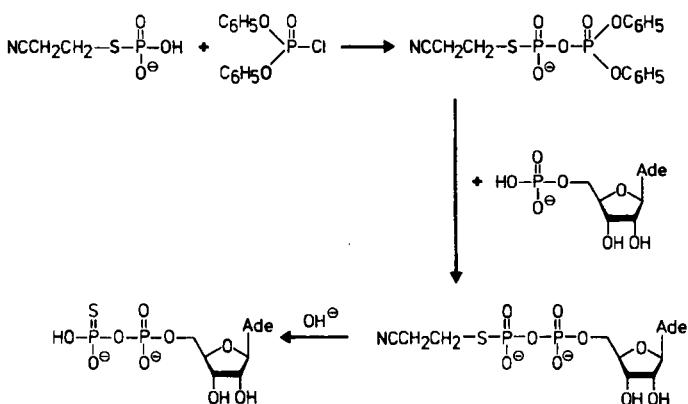


Fig. 2. Synthese von ADP_βS. Die Synthese von ATP_βS verläuft entsprechend unter Verwendung von ADP anstelle von AMP.

(d)NTP mit einer Phosphorothioatgruppe in der α-Position gibt es zwei Möglichkeiten. Bei beiden wird das Nucleosid mit PSCl₃ zu (d)NMPS umgesetzt. Der folgende Phosphorylierungsschritt kann durch Aktivierung mit Diphenylphosphorsäurechlorid und Umsetzung mit Phosphorsäure bzw. Pyrophosphorsäure erfolgen^[11, 12]; diese Methode wurde von Michelson für die Synthese der normalen Nucleosiddi- und -triphosphate entwickelt^[13] (Fig. 3).

Bemerkenswert ist bei dieser Reaktion, daß das Sauerstoffatom des Thiophosphatrestes nucleophiler als das Schwefelatom ist. Bei Aktivierungen mit Carboxyldiimidazol oder Dicyclohexylcarbodiimid ist hingegen das Schwefelatom nucleophiler, und es tritt vollständiger Verlust von Schwefel auf^[11]. Bei dieser Synthese entstehen jeweils die

beiden Diastereomere von (d)NDP_αS oder (d)NTP_αS in einem ungefähren Verhältnis von 1 : 1. Sie können durch ³¹P-NMR-Spektroskopie^[14, 15] oder HPLC^[16, 17] unterschieden werden. Die Trennung des Diastereomerengemisches ist, mindestens in einigen Fällen, durch Chromatographie an DEAE-Sephadex zu erreichen^[16, 18]. Wo das nicht möglich ist, kann die selektive enzymatische Phosphorylierung eines der Diastereomere von (d)NDP_αS mit Kinasen zu dem entsprechenden (d)NTP_αS zur Trennung genutzt werden^[12, 16]. So läßt sich aus dem Diastereomerengemisch von ADP_αS mit Pyruvat-Kinase^[12] oder noch besser mit Phosphoglycerat-Kinase^[19] bevorzugt das A-Isomer zu ATP_αS phosphorylieren, das falls nötig von verunreinigendem ATP_αS-B durch Reaktion mit Acetyl-CoA-Synthetase^[20] getrennt werden kann. Das zurückbleibende B-Isomer von ADP_αS kann mit Creatin-Kinase zu ATP_αS-B phosphoryliert werden^[12], das seinerseits durch Reaktion mit Hexokinase und Glucose von ATP_αS-A befreit werden

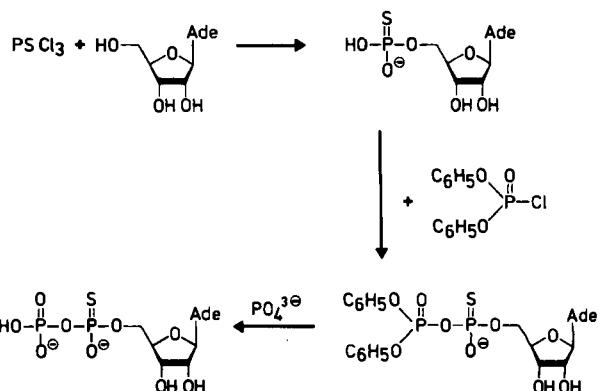


Fig. 3. Synthese von ADP_αS. Die Synthese von ATP_αS gelingt mit Pyrophosphat anstelle von Phosphat.

kann^[21]. Auch für die Synthese der Diastereomere von GTP_αS sind entsprechende Kombinationen von Enzymreaktionen ausgearbeitet worden^[16]. Wesentlich einfacher läßt sich ATP_αS-A durch enzymatische Phosphorylierung von AMPS mit Pyruvat-Kinase und Adenylat-Kinase herstellen; die Reaktion ist sehr stereoselektiv^[14, 15], aber leider auf ATP_αS-A beschränkt (Fig. 4). Trotz intensiver Suche wurde bis jetzt noch kein präparativ anwendbares Enzymsystem gefunden, das ATP_αS-B aus AMPS synthetisieren kann. Aus den Diastereomeren von (d)NTP_αS lassen sich dann durch Hydrolyse mit Myosin die Diastereomere (d)NDP_αS erhalten^[12].

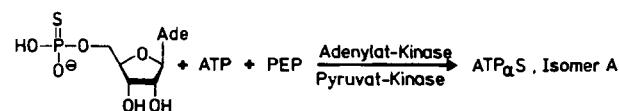


Fig. 4. Enzymatische Synthese von ATP_αS-A.

Eine besonders für den Organiker attraktive Synthese von dNDP_αS ist die Kondensation von dNMPS, wieder nach Aktivierung mit Diphenylphosphorsäurechlorid, mit am Zuckerteil geschützten AMP, wie es für die Synthese von dTTP_αS beschrieben^[22] und auch auf dCTP_αS anwendbar ist^[23] (Fig. 5). Das Gemisch der resultierenden Isomere läßt sich an DEAE-Sephadex gut trennen. Nach Abspal-

tung der Zuckerschutzgruppe durch Oxidation mit NaIO_4 wird der Adenosinrest entfernt, und man erhält die getrennten Diastereomere von dNDP α S, die dann enzymatisch leicht zu den Diastereomeren von dNTP α S phosphoryliert werden können. Diese Methode ist ursprünglich zur stereospezifischen Synthese von $[\alpha\text{-}^{18}\text{O}]ADP\alpha\text{S}$, $[\beta\text{-}^{18}\text{O}]ADP\beta\text{S}$ und $[\gamma\text{-}^{18}\text{O}]ATP\gamma\text{S}$ ^[24,25] entwickelt worden.

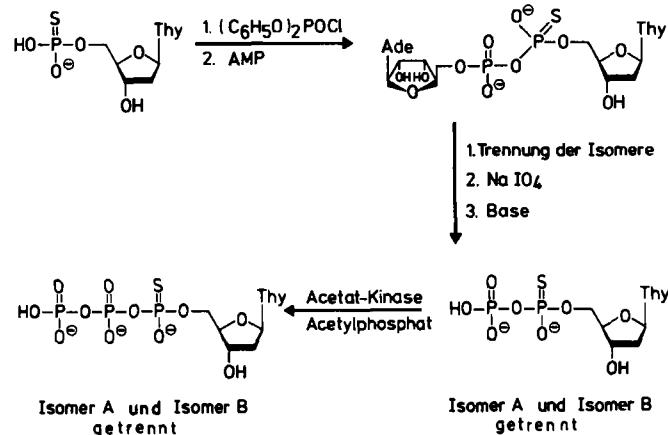


Fig. 5. Synthese der Diastereomere von dTTP α S. Der Einfachheit halber ist die Schutzgruppe am AMP nicht gezeichnet.

Sie wurde jetzt auch verwendet, um die Diastereomere des Phosphorothioatanalogons von NAD, bei dem die Phosphorothioatgruppe in der 5'-Position des Adenosins lokalisiert ist, herzustellen^[26] (Fig. 6).

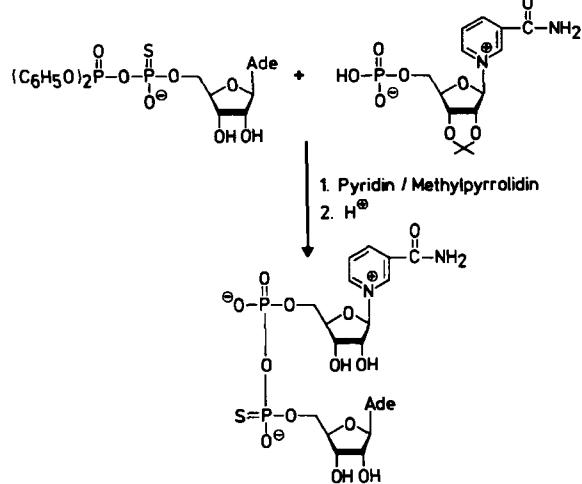


Fig. 6. Synthese eines Phosphorothioatanalogons von NAD.

Die Zuordnung der Konfiguration zu den Diastereomeren A und B von ATP α S wurde durch Vergleich ihrer unterschiedlichen Subrateigenschaften gegenüber Schlangengift-Phosphodiesterase getroffen. Nur das Diastereomer B wird von diesem Enzym gespalten^[27,28]. Auch bei Up(S)A wird nur ein Isomer gespalten; dieses bildet bei der Reaktion mit RNase A das *endo*-Isomer des Uridin-2',3'-cyclophosphorothioats. Da dies das Produkt der Umesterung eines Substrats der (R_p)-Konfiguration ist^[29,30], muß das umgesetzte Isomer von Up(S)A die (R_p)-Konfiguration haben. Daraus folgt, daß auch ATP α S-B die gleiche

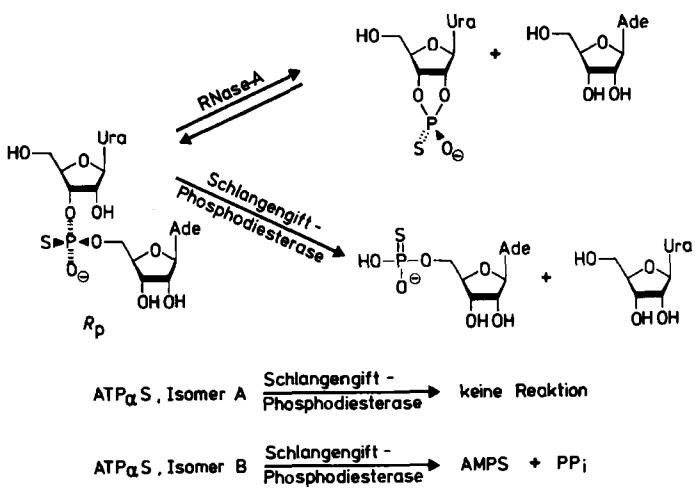


Fig. 7. Enzymatische Reaktionen von Up(S)A und ATP α S zur Bestimmung der absoluten Konfiguration der Diastereomere von ATP α S.

Konfiguration hat (Fig. 7, 8). Diese Zuordnung wurde durch eine stereospezifische Synthese von $[\alpha\text{-}^{18}\text{O}]ADP\alpha\text{S}$ bestätigt^[31].

Die Diastereomere von (d)NTP β S werden durch enzymatische Phosphorylierung von (d)NDP β S hergestellt^[12]. Bei der Phosphorylierung von ADP β S mit Pyruvat-Kinase entsteht hauptsächlich ATP β S-A. Das B-Isomer kann durch Inkubation mit Hexokinase und Glucose entfernt werden^[21,32a]. Diastereomerenreines A-Isomer kann durch Phosphorylierung mit Phosphoglycerat-Kinase synthetisiert werden^[32b]. Bei Verwendung von Acetat-Kinase ent-

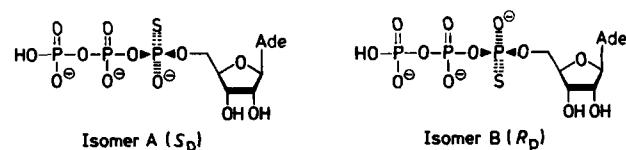


Fig. 8. Absolute Konfigurationen der Diastereomere von ATP α S.

steht hauptsächlich ATP β S-B, das von Spuren des A-Isomers durch Reaktion mit Myosin befreit werden kann^[21] (Fig. 9). Die Diastereomere sind ^{31}P -NMR-spektroskopisch unterscheidbar^[14,15]. Eine ähnliche Sequenz von Enzymreaktionen ist auch für die Diastereomere von GTP β S ausgearbeitet worden^[16].

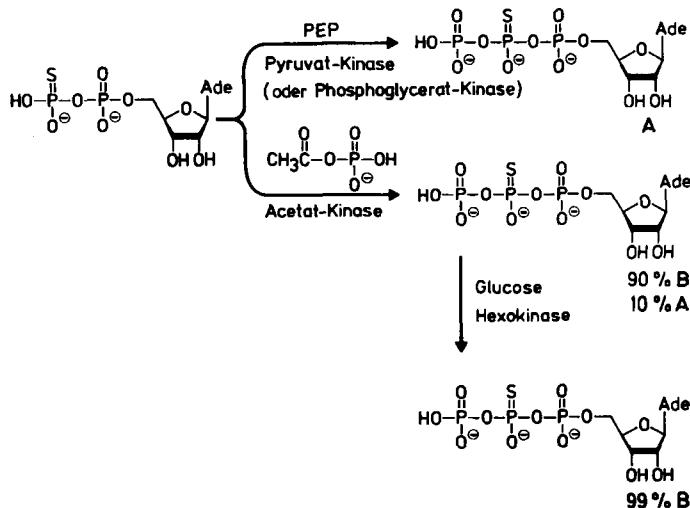


Fig. 9. Enzymatische Synthese der Diastereomere von ATP β S.

Die Konfiguration der Diastereomere von ATP_BS wurde anhand ihrer Substrateigenschaft gegenüber Hexokinase zugeordnet; in Gegenwart von Mg²⁺ ist nur das B-Isomer ein Substrat^[32]. Auch von den Diastereomeren von β,γ-Co(NH₃)₄ATP fungiert nur eines als Substrat^[33]. Es hat β,γ-Α-Konfiguration, wie durch Röntgen-Strukturanalyse des Co(NH₃)₄-Triphosphats, das durch Abspaltung des Adenosinrestes erhalten wurde, ermittelt werden konnte^[34]. Da angenommen wurde, daß für das gleiche Enzym alle Substrate dieselbe Konfiguration haben müssen, wurde dem Komplex MgATP_BS-B ebenfalls Α-Konfiguration ((S_p)-Konfiguration) zugeordnet (Fig. 10). Diese Konfigurationszuordnung wurde auf unabhängigem Weg bestätigt^[24].

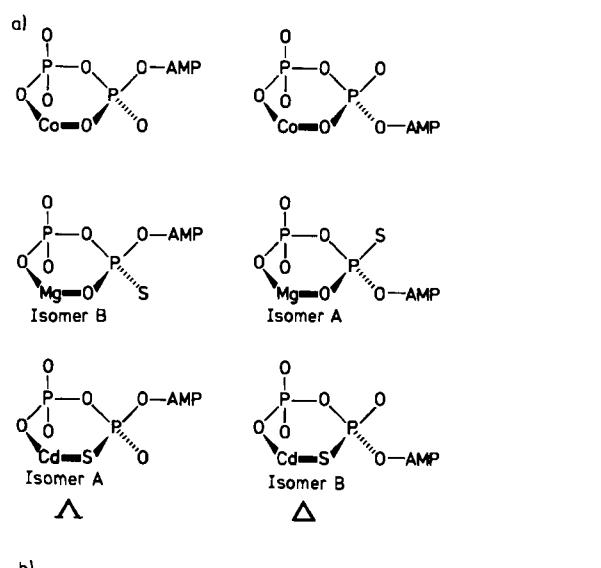


Fig. 10. a) Ermittlung der absoluten Konfiguration der Diastereomere von ATP_BS durch Vergleich der Subrateigenschaften mit denen der Diastereomere von Co(NH₃)₄ATP mit Hexokinase. Die Isomere der linken Hälfte (Λ-Konfiguration) sind die Substrate. b) Absolute Konfiguration.

2.2. Nucleosid-3',5'-cyclophosphorothioate

Für enzymatische Untersuchungen sind auch die Phosphorothioatanaloga der Nucleosid-3',5'-cyclophosphate, besonders von cAMP und cGMP, von Interesse. Die Diastereomere von cAMPS lassen sich folgendermaßen erhalten: Benzoyliertes cAMP wird zum Anilid umgesetzt, und die Diastereomere werden durch präparative Dickschichtchromatographie getrennt; Reaktion mit K/CS₂ führt unter Retention der Konfiguration zu den Isomeren von cAMPS^[35]. Dieser Syntheseweg läßt sich auch auf die Diastereomere von cGMPS^[36], cCMPS und cUMPS^[37] anwenden (Fig. 11). Die Konfiguration wurde anhand der ³¹P-NMR-Spektren der Anilide zugeordnet^[35].

Einfacher lassen sich die Diastereomere von cAMPS durch Cyclisierung des Adenosin-5'-bis(*p*-nitrophenyl)phosphorothioates mit Kalium-*tert*-butylalkoholat synthetisieren^[38]. Nach Aufarbeitung und Chromatographie

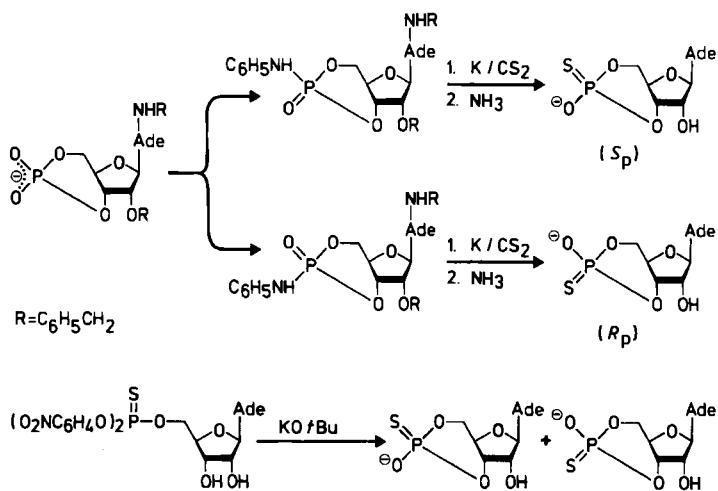


Fig. 11. Synthese der Diastereomere von cAMPS.

an DEAE-Sephadex kristallisiert das S_p-Isomer von cAMPS aus. Die Zuordnung der Konfiguration war aufgrund der Arbeiten von Stec et al.^[35] möglich. In wesentlich geringerer Ausbeute entsteht das nicht-kristalline R_p-Isomer. Auch die Diastereomere von cUMPS und cCMPS können so hergestellt werden, wobei das S_p-Isomer von cUMPS ebenfalls kristallisiert^[23]. Die Synthese von cGMPS durch Aktivierung von GMPS mit Diphenylphosphorsäurechlorid und anschließende Cyclisierung^[39] ist zwar einfacher, verläuft aber mit schlechterer Ausbeute.

2.3. Dinucleosidphosphorothioate

Die chemische Synthese der Diastereomere von Dinucleosidphosphorothioaten hat besonders in jüngster Zeit zur Konfigurationsbestimmung enzymatisch hergestellter Phosphorothioatinternucleotidbindungen in Polydesoxy-nucleotiden reges Interesse geweckt. Die erste Trennung der Diastereomere gelang bei Up(S)A, einem Diribonucleosidphosphorothioat. Es wurde nach der Triestermethode unter Verwendung von β-Cyanethylphosphorothioat zur Thiophosphorylierung der 3'-OH-Gruppe von geschütztem Uridin mit Triisopropylbenzolsulfonsäurechlorid als Kondensationsmittel im ersten Schritt und Kondensation mit der 5'-OH-Gruppe von geschütztem Adenosin im zweiten Schritt hergestellt^[40]. Nach Abspaltung der 5'-OH-Schutzgruppe am Uridin konnten die Diastereomere durch Chromatographie an Silicagel getrennt werden; Abspaltung der β-Cyanethylgruppe durch Umsetzung mit Triethylamin/H₂O (β-Eliminierung) führte schließlich zu den Diastereomeren von Up(S)A. Die Konfigurationszuordnung geschah durch Umsetzung mit RNase zu 2',3'-cUMPS (siehe Abschnitt 2.1)^[27]. Die Diastereomere können sowohl ³¹P-NMR-spektroskopisch als auch durch HPLC unterschieden werden. Auf dem Syntheseweg entsteht durch direkten nucleophilen Angriff am Phosphor auch in ca. 20% das normale Dinucleosidphosphat, in diesem Falle UpA, das aber leicht chromatographisch abgetrennt werden kann. Auch die Diastereomere von Tp(S)T^[22,41], d[Tp(S)A]^[42], d[Cp(S)G] und d[Gp(S)C]^[43] wurden nach der Triestermethode synthetisiert (Fig. 12a), konnten aber erst nach Abspaltung aller Schutzgruppen durch HPLC getrennt werden.

Für die Synthese solcher Verbindungen ist aber nach den bis jetzt vorliegenden Erfahrungen die Phosphitmethode wegen der besseren Ausbeuten geeigneter. Die erste

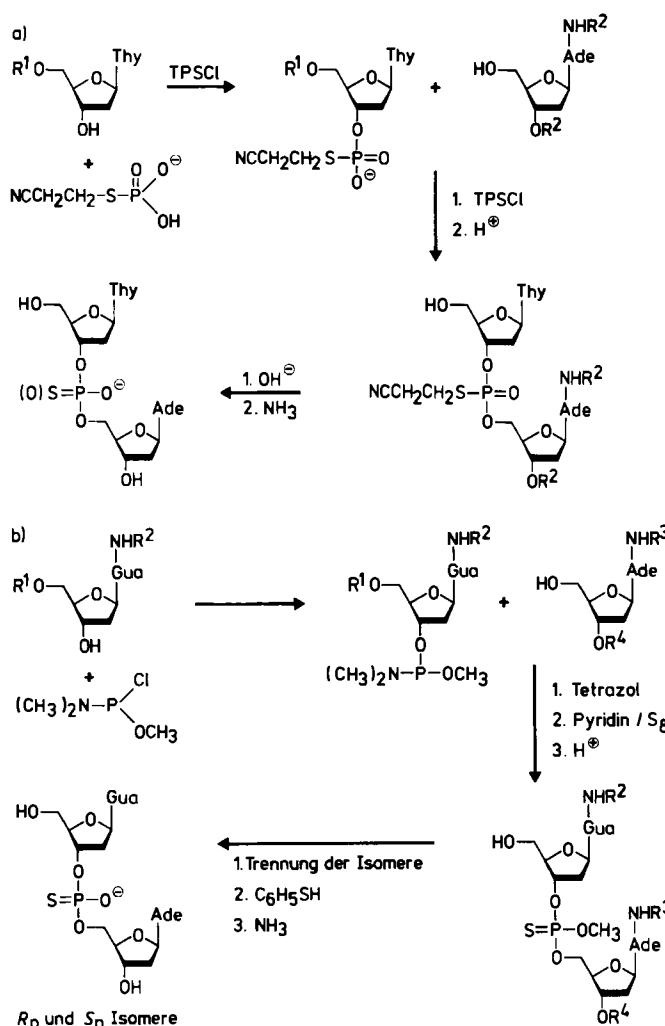


Fig. 12. Synthese von Dinucleosidphosphorothioaten am Beispiel von d[Tp(S)A]. a) Triestermethode. b) Phosphitmethode. – R¹ = Dimethoxytrityl; R² = Isobutyryl; R³ = Benzoyl; R⁴ = Methoxyacetyl; TPSCl = Triisopropylbenzolsulfonsäurechlorid.

Synthese nach dieser Methode unter Verwendung von Phosphorigsäure-phenylester-dichlorid ist für Up(S)A beschrieben^[44], doch konnten die Diastereomere nicht getrennt werden; beim analog hergestellten Ap(S)A^[45] gelang hingegen die Trennung. Inzwischen wurden unter Verwendung von Chloro(dimethylamino)methoxyphosphoran auch die Diastereomere von Tp(S)T^[46], d[Gp(S)A]^[47], d[Cp(S)T] und d[Gp(S)T]^[23] auf diese Weise erhalten (Fig. 12b). Die Zuordnung der Konfiguration geschah in allen Fällen durch Hydrolyse mit Schlangengift-Phosphodiesterase, die nur das R_p-Diastereomer^[26], oder mit Nuclease-P1, die nur das S_p-Diastereomer spaltet^[41]; die zweite Methode ist vorzuziehen, da sie sauberere Hydrolyseprodukte liefert.

Inzwischen sind genügend ³¹P-NMR- und HPLC-Daten vorhanden, um folgende allgemeine Regel zu formulieren: Im ³¹P-NMR-Spektrum hat das (R_p)-Diastereomer das nach tieferem Feld verschobene Signal und bei der HPLC-Trennung an Reversed-Phase-Säulen die kürzere Retentionszeit.

2.4. Austausch von Schwefelatomen gegen Sauerstoffatome

Stereospezifisch mit ¹⁷O oder ¹⁸O markierte Nucleotide können aus den Diastereomeren der Nucleosidphosphorothioate durch Umsetzung mit Bromcyan^[48], N-Bromsuccinimid^[49] oder Brom^[50] in Gegenwart von H₂¹⁷O bzw. H₂¹⁸O erhalten werden (Fig. 13). An Nucleosid-3',5'-cyclo-

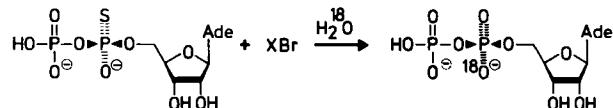


Fig. 13. Austausch von Schwefelatomen in Nucleosidphosphorothioaten gegen Sauerstoffatome. X = CN, Br oder Succinimidyl.

phosphorothioaten wie cAMPS oder cTMPS verlaufen die beiden zuletzt genannten Reaktionen mit ca. 80% Inversion der Konfiguration am Phosphor^[39, 49, 50]; für die Reaktion mit Bromcyan liegen noch keine Daten vor. An dem einzigen Dinucleosidphosphorothioat, Tp(S)T, an dem diese Reaktion bis jetzt – und zwar mit N-Bromsuccinimid – durchgeführt wurde, verlief sie stereospezifisch mit Inversion der Konfiguration am Phosphor^[41]. Die Stereoselektivität des Austausches von Schwefel gegen Sauerstoff an den Diastereomeren von ADP_aS – alle drei Reaktionsvarianten wurden verwendet – ist nicht ohne weiteres mit ausreichender Genauigkeit zu ermitteln. Sie wird entweder an den Co(NH₃)₄α-¹⁸O]ADP-Komplexen ³¹P-NMR-spektroskopisch bestimmt, wobei bis zu 10% des anderen Diastereomers wegen der schlechten Auflösung der Signale nicht entdeckt werden können^[48, 49], oder durch ³¹P-NMR-spektroskopische Untersuchung der diastereomeren Methylester von [^{16, 17, 18}O]cAMP, die durch enzymatische Hydrolyse von [α-¹⁸O]ADP in H₂¹⁷O zu [^{16, 17, 18}O]AMP und anschließende Cyclisierung und Methylierung erhalten werden. Auch hier ist die Bestimmung der Diastereorenreinheit ungenau^[50]. Mit dieser Einschränkung kann für alle drei Reaktionen gesagt werden, daß sie unter Inversion der Konfiguration ablaufen. Eine genauere Bestimmung wurde möglich, da GDP_aS-A mit N-Bromsuccinimid zu [α-¹⁸O]GDP umgesetzt werden konnte; dessen Phosphorylierung ergab [α-¹⁸O]GTP, das als Substrat für Guanylat-Cyclase eingesetzt wurde. Das erhaltene [¹⁸O]cGMP bestand nur aus einem Isotopomeren, was durch ³¹P-NMR-Spektroskopie der Methylester mit hoher Genauigkeit gezeigt werden konnte (siehe Abschnitt 3.1, Fig. 18). Dieses Ergebnis läßt den Schluß zu, daß sowohl die Austauschreaktion an GDP_aS als auch die enzymatische Cyclisierung innerhalb der Fehlergrenzen der Bestimmungs methode stereospezifisch abläuft^[39]. Daraus schließen wir, daß an anderen NDP_aS die N-Bromsuccinimid-Reaktion ebenso stattfindet. Bei allen drei Austauschreaktionen spielt der pH-Wert eine entscheidende Rolle. Bei pH 7–8 wird der Sauerstoff nicht nur in die α-, sondern auch die β-Phosphatgruppe eingebaut, falls die β-Phosphatgruppe nicht durch eine Cyanethylgruppe geschützt wird. Dieses „scrambling“ wird mit der Bildung eines intramolekularen Cyclodiphosphats erklärt^[51]. Übrigens wird bei Verwendung von ATP_aS der Sauerstoff bei allen drei Reaktionen durch intermediäre Bildung eines sechsgliedrigen Rings (nucleophiler Angriff der γ-Phosphatgruppe an der α-Phosphatgruppe) sowohl in α- als auch in γ-Stellung einge baut^[48–50]. Aus diesem Grund wird zur Herstellung von

[α - ^{18}O]NTP das entsprechende NDP_aS mit H₂ ^{18}O zum [α - ^{18}O]NDP umgesetzt, das dann durch eine Kinase zum [α - ^{18}O]NTP phosphoryliert wird.

Diese Methode des Austausches ist auch zur stereospezifischen Einführung von ^{17}O von Interesse. ^{17}O -markierte Nucleotide können ESR-[⁵²] und ^{17}O -NMR-spektroskopisch untersucht werden[⁵³⁻⁵⁵], die dabei erhaltenen Befunde geben Auskunft über Struktur und Konfiguration von Nucleotid-Metallkomplexen.

3. Anwendung zur Lösung mechanistischer Probleme enzymatischer Reaktionen

3.1. Stereochemischer Verlauf von Enzymreaktionen

Eines der Hauptanwendungsgebiete der Nucleosidphosphorothioate war und ist die Untersuchung des stereochemischen Verlaufs enzymatischer Phosphoryl- und Nucleotidyltransferreaktionen^[1-9]. Inzwischen sind ungefähr 40 Enzyme mit der Phosphorothioatmethode untersucht worden (Tabelle 1). Die Ergebnisse sind besonders in mehreren Übersichtsartikeln^[5-9] dargelegt worden, so daß hier nur einige neue Befunde hauptsächlich mit DNA-Polymerasen als Beispiel geschildert und einige Grundüberlegungen diskutiert werden sollen. Den Untersuchungen lag die Idee zugrunde, die Kenntnis des stereochemischen Verlaufs der enzymatischen Transferreaktionen sollte eine Unterscheidung zwischen einer einfachen und einer doppelten Substitutionsreaktion, bei der ein kovalentes Enzymintermediat auftritt, zulassen. Im ersten Fall sollte Inversion, im zweiten Retention der Konfiguration am übertragenen Phosphoratom zu beobachten sein.

Nachdem zuerst der stereochemische Verlauf der *E.coli*-DNA-abhängigen DNA-Polymerase I (Kornberg-Enzym)^[55-57] und der *E.coli*-DNA-abhängigen RNA-Polymerase^[27] beschrieben worden war, sind in letzter Zeit auch andere Polymerasen wie T4- und T7-Phagen-DNA-Polymerase^[42, 58] untersucht worden. Es hat sich ein einfaches Verfahren zur Bestimmung des stereochemischen Verlaufs der durch diese Enzyme katalysierten Reaktionen herauskristallisiert. Polymerisation von TTP und dATP_aS, wobei bis jetzt immer nur das S_p-Isomer als Substrat gefunden wurde, an Poly[d(A-T)] liefert ein Polymer, das immer abwechselnd eine Phosphatgruppe und eine Phosphorothioatgruppe enthält: Poly[d(T_sA)].

Dieses Polymer kann mit dem Kornberg-Enzym, das eine 5'→3'-Nucleaseaktivität aufweist und im wesentlichen nur Phosphatdiester, nicht aber Phosphorothioatdiester spaltet^[55-57], zu d[pTp(S)A] abgebaut werden. Durch Hydrolyse mit alkalischer Phosphatase erhält man daraus d[Tp(S)A], dessen Konfiguration durch Vergleich mit den chemisch synthetisierten Diastereomeren (³¹P-NMR-Spektroskopie oder HPLC) bestimmt werden kann (Fig. 14). Untersuchungen mit dem Enzym Reverse Transcriptase haben gezeigt, daß diese Analyse sogar am Polymer, also ohne Nucleaseabbau, durch ³¹P-NMR-Spektroskopie durchgeführt werden kann, vorausgesetzt die Polymere sind nicht zu lang und geben ein scharfes Signal^[22]. Alle durch diese Polymerasen katalysierten Reaktionen verlaufen unter Inversion der Konfiguration am Phosphoratom.

Tabelle 1. Stereochemischer Verlauf enzymatischer Phosphoryl- und Nucleotidyltransferreaktionen.

Enzym	Stereochemischer Verlauf	Lit.
A) Untersuchung mit ^{16}O-Phosphorothioaten		
Ribonuclease A Umesterungsschritt	Inversion	[29, 30]
Ribonuclease T ₁	Inversion	[180]
Ribonuclease T ₂	Inversion	[40]
<i>Enterobacter-aerogenes</i> - Phosphohydrolase	Inversion	[181]
<i>E.coli</i> -DNA-abhängige RNA-Polymerase		
Initiation	Inversion	[21]
Elongation	Inversion	[27]
DNA-abhängige DNA-Polymerasen		
<i>E.coli</i> I	Inversion	[56, 57]
T4-Phage	Inversion	[42]
T7-Phage	Inversion	[58]
<i>M.Luteus</i>	Inversion	[43]
Reverse Transcriptase	Inversion	[22]
Polynucleotid-Phosphorylase		
Austausch	Retention	[182]
Elongation	Inversion	[99]
tRNA-Nucleotidyl-Transferase	Inversion	[183]
RNA-Ligase, Ligationsschritt	Inversion	[184]
UDP-Glucose-Pyrophosphorylase	Inversion	[185]
Galactose-1-Phosphat-Uridyl- Transferase	Retention	[185]
Adenylyl-Cyclase		
Bakteriell	Inversion	[186]
Säuger	Inversion	[187]
B) Untersuchungen mit $^{16}\text{O}, ^{18}\text{O}$-Phosphorothioaten		
Ribonuclease A, Hydrolyseschritt	Inversion	[71]
Nucleosiddiphosphat-Kinase	Retention	[185]
Acetyl-CoA-Synthetase	Inversion	[20, 188]
Adenylyl-Kinase	Inversion	[185]
Adenosin-Kinase	Inversion	[189]
Nucleosidphospho-Transferase	Retention	[190]
Nuclease S1	Inversion	[61]
C) Untersuchungen mit $^{16}\text{O}, ^{17}\text{O}, ^{18}\text{O}$-Phosphorothioat		
Myosin-ATPase	Inversion	[191]
Mitochondrielle ATPase	Inversion	[192]
ATPase aus dem Sarcoplasmatischen Reticulum	Retention	[193]
Elongationsfaktor-G-GTPase	Inversion	[194]
Elongationsfaktor-T-GTPase	Inversion	[195]
Phosphoglycerat-Kinase	Inversion	[62, 196]
Schlängengift-5'-Nucleotidase	Inversion	[62]
Thermophilic-Bakterium-PS3-ATPase	Inversion	[197]
D) Untersuchungen sowohl mit der Phosphorothioat- als auch mit der Sauerstoffisotopenmethode		
Hexokinase	Inversion	[198, 199, 201]
Glycerol-Kinase	Inversion	[199, 200]
Pyruvat-Kinase	Inversion	[64, 198, 199]
Polynucleotid-Kinase	Inversion	[202, 203]
cyclische Phosphodiesterase	Inversion	[204-207]
Guanylat-Cyclase	Inversion	[39]
Schlängengift-Phosphodiesterase	Retention	[28, 208-210]
Aminoacyl-tRNA-Synthetasen	Inversion	[211, 212]
E) Untersuchungen mit der Sauerstoffisotopenmethode		
Alkalische Phosphatase	Retention	[213]
Acetat-Kinase	Inversion	[199]
Creatin-Kinase	Inversion	[214]
Nuclease aus <i>Staphylococcus aureus</i>	Inversion	[72]
Milz-Phosphodiesterase	Retention	[66]
Phosphoglycerat-Mutase	Retention	[215]
Nuclease P1	Inversion	[41]

Auch der stereochemische Verlauf einer mit einer DNA-Polymerase assoziierten 3'→5'-Exonuclease ist für das T4-Phagen-Enzym bestimmt worden, indem die Konfiguration des Produkts [¹⁸O]dAMPS mit der des Substrats [α -¹⁸O]dATP_aS verglichen wurde. Dies geschah durch enzy-

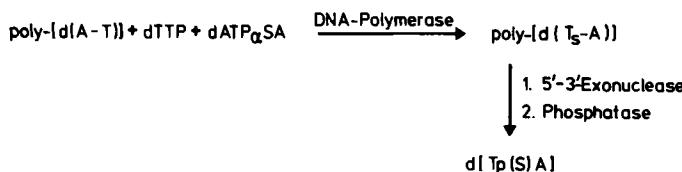


Fig. 14. Bestimmung des stereochemischen Verlaufs der durch eine DNA-Polymerase katalysierten Reaktion. Das Produkt d[Tp(S)A] wird mit den chemisch synthetisierten Diastereomeren durch HPLC oder NMR-Spektroskopie verglichen. Alle Befunde deuten darauf hin, daß die Konfiguration immer R_p ist.

matische Phosphorylierung von $[\alpha\text{-}^{18}\text{O}]$ dAMPS mit Pyruvat-Kinase und Adenylat-Kinase, wobei $[\alpha\text{-}^{18}\text{O}]$ dATP α S der S_p -Konfiguration entsteht^[56]. Durch ^{31}P -NMR-Spektroskopie kann festgestellt werden, ob das ^{18}O nur am P_α lokalisiert ist oder ob es P_α und P_β verbrückt^[59,60] (Fig. 15).

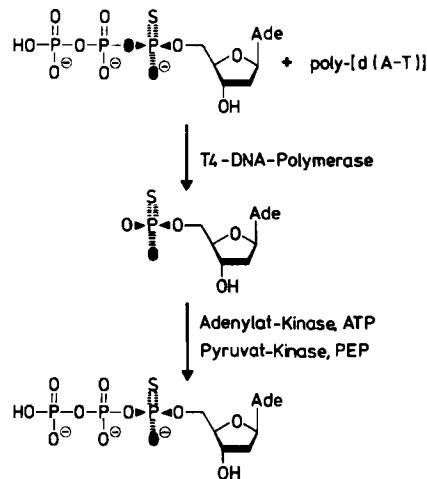


Fig. 15. Bestimmung des stereochemischen Verlaufs der durch die T4-Phagen-DNA-Polymerase-3'→5'-Exonuclease katalysierten Reaktion. Die Konfiguration von $[\alpha\text{-}^{18}\text{O}]$ dATP α S wird ^{31}P -NMR-spektroskopisch bestimmt. ● = ^{18}O .

Im Produkt $[\alpha\text{-}^{18}\text{O}]$ dATP α S wurde ^{18}O nur an P_α gefunden. Das bedeutet Retention der Konfiguration; da die Polymerisation unter Inversion abläuft, muß auch die Exonucleasereaktion unter Inversion ablaufen^[18]. Diese Methode zur Konfigurationsbestimmung hat viele Anwendungsmöglichkeiten, und sie wurde auch für Nuclease-S1-Reaktionen verwendet; dabei benutzte man das S_p -Isomer von d[Tp(S)A]^[61].

Eine elegante Anwendung haben die Phosphorothioate bei der Untersuchung des stereochemischen Verlaufs von ATPase-Reaktionen gefunden; dabei wird $[\gamma\text{-}^{18}\text{O}]$ ATP γ S als Substrat in Gegenwart von H_2^{17}O benutzt^[62]. Die Konfigurationsbestimmung des entstehenden chiralen $^{16,17,18}\text{O}$ -Thiophosphats gelingt durch enzymatischen Einbau in ATP β S, dessen Konfiguration ^{31}P -NMR-spektroskopisch ermittelt wird; dabei ist von Vorteil, daß ^{17}O die Signale von ^{31}P durch Verbreiterung wegen des Quadrupelmoments praktisch verschwinden läßt, so daß sich die Analyse darauf beschränkt festzustellen, ob ^{18}O nur an P_β lokalisiert ist oder ob eine $P_\gamma\text{-}^{18}\text{O}\text{-}P_\beta$ -Brücke enthalten ist^[9,62] (Fig. 16). Eine elegante und beeindruckende Analyse!

Es erhebt sich bei allen diesen stereochemischen Untersuchungen mit Nucleosidphosphorothioaten die Frage, ob eine enzymatische Reaktion mit diesen Analoga stereoche-

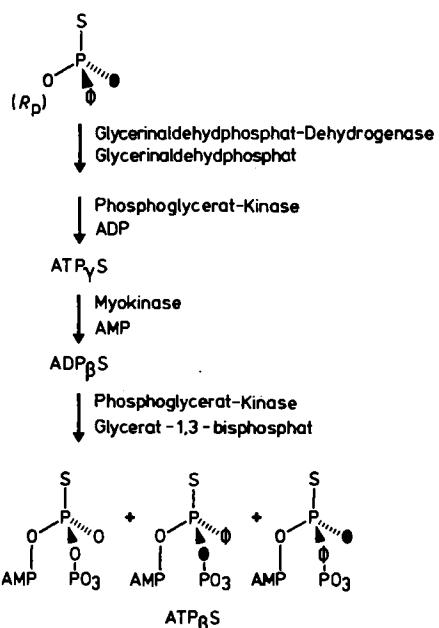


Fig. 16. Bestimmung der Konfiguration des R_p -Enantiomers von $^{16}\text{O}, ^{17}\text{O}, ^{18}\text{O}$ Thiophosphat. Die Analyse des Endproduktes $[\beta\text{-}^{16}\text{O}, ^{17}\text{O}, ^{18}\text{O}]$ ATP β S geschieht ^{31}P -NMR-spektroskopisch. O = ^{16}O ; Ø = ^{17}O ; ● = ^{18}O .

mischi anders verläuft als mit den normalen Substraten. Das Problem läßt sich klären, wenn ein Enzym sowohl mit dem Phosphorothioat als auch mit dem natürlichen Substrat umgesetzt wird. Für Untersuchungen mit natürlichem Substrat muß auch die zu übertragende Phosphatgruppe chiral sein; dies kann durch stereospezifische Einführung von ^{17}O und ^{18}O erreicht werden. Knowles et al.^[4,63], Lowe et al.^[64] und Gerlt et al.^[65] haben Methoden zur Synthese der Substrate und zur Analyse der Produkte entwickelt, auf die hier nicht näher eingegangen wird. Ein Verfahren zur Synthese der markierten Substrate durch stereospezifischen Austausch von S gegen ^{18}O oder ^{17}O wurde in Abschnitt 2.4 besprochen.

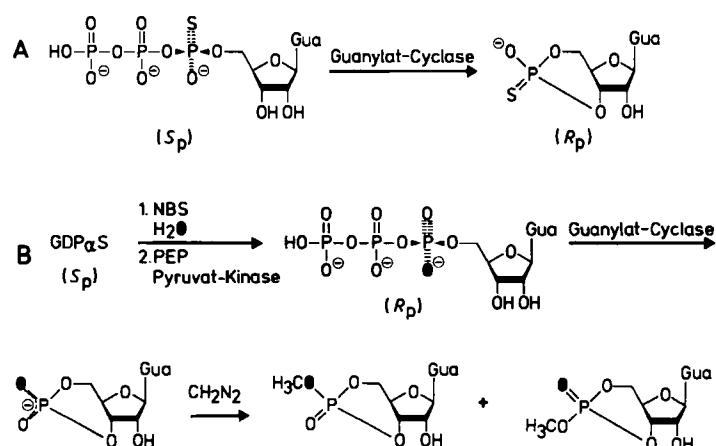


Fig. 17. Bestimmung des stereochemischen Verlaufs der durch Guanylat-Cyclase katalysierten Reaktion. ● = ^{18}O .

Bei den sechs Enzymen, die mit beiden Methoden untersucht wurden (siehe auch Tabelle 1) und für die in Figur 17 Guanylat-Cyclase als Beispiel beschrieben wird, wurde kein Unterschied im stereochemischen Verlauf der Reaktion gefunden. Dies rechtfertigt, die Ergebnisse von Phosphorothioaten für die Reaktion mit normalen Substraten

als übertragbar anzusehen. Die Phosphorothioate sind sowohl wegen der leichteren Zugänglichkeit als auch der einfacheren Analyse der Produkte und der geringeren erforderlichen Mengen leichter zu handhaben als die ^{18}O -Verbindungen. Komplikationen können durch die oft niedrigeren Reaktionsgeschwindigkeiten eintreten, besonders dann, wenn Sekundärreaktionen am Substrat oder am Produkt, wie z. B. Entschwefelung, auftreten; dies ist z. B. bei Umsetzungen mit Schlangengift-Phosphodiesterase oder Nuclease S1 der Fall^[27,61]. Bis jetzt gibt es allerdings nur ein Enzym, die Milz-Phosphodiesterase, bei dem die Phosphorothioatmethode versagt hat, da wegen der geringen Hydrolysegeschwindigkeit eine Transphosphorylierung überhand nahm^[66].

Von den insgesamt ca. 50 bis jetzt in bezug auf den stereochemischen Verlauf der durch sie katalysierten Reaktionen untersuchten Enzyme zeigen ca. 40 Inversion und ca. 10 Retention der Konfiguration am Phosphoratom (Tabelle 1). In der einfachsten Interpretation heißt das, daß 4/5 der Enzym-Reaktionen nach einem Einschritt-Mechanismus ablaufen. Diese Interpretation berücksichtigt jedoch nicht den Tatbestand, daß nur die Substitutionsreaktionen, bei denen sowohl die eintretenden als auch die austretenden Gruppen apikal bei der im Übergangszustand (oder im Intermediat) auftretenden trigonalen Bipyramide angeordnet sind (in-line-Mechanismus), Inversion zur Folge haben; bei Anordnungen, bei denen die eintretende Gruppe apikal, die austretende aber äquatorial ist (adjacent-Mechanismus), muß eine Pseudorotation stattfinden, die Retention der Konfiguration zur Folge hat^[67,68] (Fig. 18). Demnach muß Retention nicht unbedingt das Ergeb-

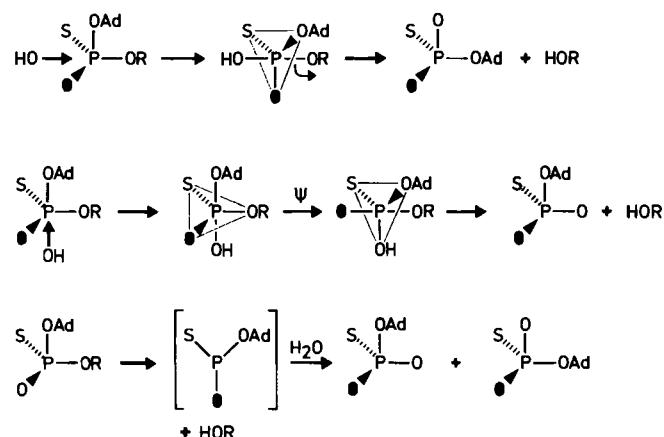


Fig. 18. Stereochemische Konsequenzen von Substitutionsreaktionen am Phosphor in Phosphaten. Ad = Adenosin; ● = ^{18}O . – Oben: in-line-Mechanismus ergibt Inversion der Konfiguration. Mitte: adjacent-Mechanismus erfordert eine Pseudorotation (ψ) und ergibt Retention. Unten: Elimination-Additions-Mechanismus über Metaphosphat sollte Racemisierung ergeben, jedenfalls in nicht-enzymatischen Reaktionen.

nis zweier unter Inversion ablaufender Substitutionsreaktionen sein. Bei der Hälfte der Enzyme, deren Reaktionen Retention zeigen, kann ein kovalentes Enzymintermediat entweder nachgewiesen oder aber als wahrscheinlich angesehen werden, so daß Retention als das Ergebnis zweier unter Inversion ablaufender Substitutionsreaktionen interpretiert werden kann. Bei der anderen Hälfte der Enzyme ist das bis jetzt entweder nicht gelungen oder auch gar nicht versucht worden, so daß hier noch die Möglichkeit besteht, daß Retention das Ergebnis eines Substitutions-

schriftes mit Pseudorotation sein kann. Es wird aber als wahrscheinlich angenommen, daß auch bei diesen Enzymen die Reaktion nach einem Zwei-Schritte-Mechanismus abläuft. Man kann noch kompliziertere Interpretationen heranziehen: So führt jede ungerade Zahl von Substitutionsreaktionen nach dem in-line-Mechanismus zu Inversion, so daß Inversion nicht unbedingt nur das Ergebnis nur einer solchen Reaktion sein muß. Inversion könnte darüber hinaus auch erklärt werden durch einen Zwei-Schritte-Mechanismus, bei dem der erste Schritt unter Inversion, der zweite aber unter Retention abläuft, oder auch umgekehrt. Solange aber die einfachsten Interpretationen ausreichend sind, besteht für eine komplizierte Argumentation kein Anlaß. Für eine Diskussion der Bedeutung des Elimination-Additions-Mechanismus bei Enzymreaktionen sei auf den Artikel von Knowles^[4] verwiesen.

Bis jetzt gibt es nur zwei Röntgen-Strukturanalysen von Nucleotidtransferenzymen, RNase-A und Staphylococcal-Nuclease, die die Struktur des aktiven Zentrums genau genug erkennen lassen, um einen Mechanismus ableiten zu können^[69,70]. Bei den stereochemischen Analysen der Reaktionen dieser beiden Enzyme fand man Inversion der Konfiguration^[29,30,71,72], was in vollem Einklang mit den Strukturanalysen ist (detaillierte Diskussion für die *Staphylococcus-aureus*-Nuclease siehe^[72]).

3.2. Struktur des Mg-ATP-Komplexes in Enzymreaktionen

Phosphorothioatanaloga, besonders die von ATP, eignen sich auch zur Untersuchung der Struktur des Mg-ATP-Komplexes, der bei enzymatischen Phosphoryl- und Nucleotidyltransferreaktionen auftritt^[2,3,5,73]. Sie sind damit eine wertvolle Ergänzung zu den austauschinerten Cr^{III}- und Co^{III}-ATP-Komplexen^[74,75]. Phosphorothioatanaloga sind jedoch oft wesentlich bessere Substrate; die Cr^{III}- und Co^{III}-Komplexe können hingegen eine Koordination des Metalls an die γ -Phosphatgruppe eindeutiger festlegen.

Die Verwendung der Phosphorothioatanaloga von ATP bei derartigen Untersuchungen beruht auf der Beobachtung, daß in Gegenwart von Mg²⁺ das B-Isomer von ATP_BS und in Gegenwart von Cd²⁺ das A-Isomer die bevorzugten Substrate für Hexokinase sind^[32]. Wie schon bei der Konfigurationszuordnung für die Diastereomere von ATP_BS diskutiert (Abschnitt 2.1), ist auch nur das $\beta,\gamma\text{-}\Lambda$ -Diastereomer des Co(NH₃)₄ATP-Komplexes ein Substrat^[33]; dieser Befund diente als Grundlage zur Bestimmung des Mg-ATP_BS-B- und des Cd-ATP_BS-A-Komplexes als $\beta,\gamma\text{-}\Lambda$ ^[32] (Fig. 10a). Das unterschiedliche Substratverhalten des Mg²⁺- und des Cd²⁺-ATP_BS-Komplexes hat seine Ursache in der bevorzugten Koordination von Mg²⁺ an O und von Cd²⁺ an S; dies läßt sich auch NMR-spektroskopisch beobachten^[32]. Andere Kationen wie Co²⁺, Zn²⁺ und Mn²⁺ zeigen solche Präferenzen nicht so stark; folgerichtig können dann beide Diastereomere von ATP_BS Substrate sein. Solche Ergebnisse sprechen dafür, daß das Kation während der Umsetzung durch das Enzym an der Phosphorothioatgruppe koordiniert sein muß. Würde das Metallion abdissoziieren und z. B. durch eine positiv geladene Gruppe im aktiven Zentrum des Enzyms ersetzt, so wäre eine solche Umkehr nicht zu erklären, da nicht einzusehen ist, daß diese Gruppe im einen Fall bevorzugt an O, im anderen an S binden sollte.

Tabelle 2. Struktur des Metall-ATP-Komplexes am aktiven Zentrum von Enzymen nach Analyse mit der Phosphorothioatmethode.

Enzym	P_{α} -Spezifität [a]	P_{β} -Spezifität [a]	Struktur des β,γ -Metall-ATP-Komplexes [b]	Lit.
E.-coli-DNA-Polymerase I	$S_p(Mg-Zn)$	$S_p(Mg)-R_p(Zn)$	Δ	[56]
E.-coli-DNA-abhängige RNA-Polymerase	$S_p(Mg-Cd)$	$S_p(Mg)-R_p(Cd)$	Δ	[78]
Hexokinase, Hefe	$S_p(Mg-Cd)$	$R_p(Mg)-S_p(Cd)$	Δ	[80]
Hexokinase, Säugetier	$S_p(Mg-Cd)$	$R_p(Mg)-S_p(Cd)$	Δ	[216]
Glucokinase	$S_p(Mg-Cd)$	$R_p(Mg)-S_p(Cd)$	Δ	[216]
Creatin-Kinase	$R_p(Mg)-S_p(Cd)$	$R_p(Mg)-S_p(Cd)$	Δ	[76]
Arginin-Kinase	$R_p(Mg)-S_p(Cd)$	$R_p(Mg)-S_p(Cd)$	Δ	[77]
Acetat-Kinase	$S_p, R_p(Mg, Cd)$	$R_p(Mg)-S_p(Cd)$	Δ	[217]
Adenylyl-Kinase, Hefe	$S_p, R_p(Mg, Cd)$	$S_p(Mg)-R_p(Cd)$	Δ	[82]
Myosin	$S_p, R_p(Mg, Cd)$	$S_p(Mg)-R_p(Cd)$	Δ	[79]
Phosphoglycerat-Kinase	$S_p(Mg)-R_p(Zn)$	$S_p(Mg-Zn)$	—	[19]
Phe-tRNA-Synthetase	$S_p(Mg-Co)$	$R_p(Mg)-S_p(Cd)$	Δ	[218]
Met-tRNA-Synthetase	$S_p(Mg)$	$S_p(Mg)-R_p(Zn)$	Δ	[219]
Pyridoxal-Kinase	$S_p, R_p(Mg, Cd)$	$S_p(Mg)-R_p(Cd)$	Δ	[129]
Protein-Kinase	—	$S_p(Mg)-R_p(Cd)$	Δ	[220]
Thermophilic-Bakterium-PS3-ATPase	$S_p(Mg-Cd)$	$S_p(Mg)-R_p(Cd)$	Δ	[197]
Carbamyl-Kinase	$S_p, R_p(Mg)$	$R_p(Mg, Cd)$	—	[221]
Glutamin-Synthetase	$R_p(Mg)-S_p, R_p(Co)$	$R_p(Mg)-S_p, R_p(Co)$	Δ	[221]
Carbamoylphosphat-Synthetase	$R_p(Mg)-S_p(Cd)$	$S_p(Mg)-R_p(Cd)$	—	[221, 222]
Phosphoribosylpyrophosphat-Synthetase	$S_p(Mg)-S_p, R_p(Cd)$	—	—	[223]

[a] $S_p(Mg-Cd)$ bedeutet, daß das Enzym die Präferenz für das S_p -Diastereomer (Isomer A) für $ATP_{\alpha}S$ bzw. $ATP_{\beta}S$ unabhängig davon beibehält, ob Mg^{2+} oder Cd^{2+} als aktivierendes Kation verwendet wird; $R_p(Mg)-S_p(Cd)$ bedeutet, daß das Enzym das R_p -Diastereomer in Gegenwart von Mg^{2+} bevorzugt, aber das S_p -Diastereomer in Gegenwart von Cd^{2+} (oder Zn^{2+}). [b] Δ und Λ bezeichnen den Schraubensinn des β,γ -Metall-ATP-Komplexes [33].

Bei allen nach dieser Methode untersuchten Enzymreaktionen findet man bei Verwendung der Diastereomere von $ATP_{\alpha}S$ und $ATP_{\beta}S$ – mit einer Ausnahme^[19] – Umkehr der Stereoselektivität am β -Phosphat, nicht jedoch – mit zwei Ausnahmen^[76, 77] – am α -Phosphat (Tabelle 2). Für das β -Phosphat ist daher anzunehmen, daß das Metallion in β -Position gebunden ist, für das α -Phosphat, daß kein Metallion in α -Position koordiniert ist. Eindeutig ist diese zweite Aussage nicht, da es auch vorstellbar ist, daß durch die Struktur des aktiven Zentrums die Bildung der Metallkomplexe gewissen Zwängen unterworfen ist, so daß z. B. eine sonst ungünstige $Mg \rightarrow S$ -Koordination möglich wird. Solche und ähnliche Annahmen muß man auch zur Erklärung heranziehen, wenn die Stereoselektivität zwar für ein Metallion, nicht aber für das andere stark ausgeprägt ist, wie z. B. bei der RNA-Polymerase^[78], wo das Verhältnis der Aktivitäten für $ATP_{\beta}S/A/B$ in Gegenwart von Mg^{2+} 1.11 und für Cd^{2+} 0.003 beträgt. Ähnliches gilt auch für Myosin, wo die Werte 3000 bzw. 1.3 betragen^[79].

Eine Beschreibung des Metall-ATP-Komplexes aufgrund dieser Ergebnisse ist nicht einfach. Es ist jedoch anzunehmen, daß das Metallion in einem, wahrscheinlich dem geschwindigkeitsbestimmenden Schritt der Enzymreaktion an der Phosphorothioatgruppe gebunden ist, an der man die Umkehr der Stereoselektivität beobachtet. Ist dies lediglich am β -Phosphat der Fall, wird meist auf die Struktur eines β,γ -Mg-ATP-Bidentatkomplexes geschlossen; aus thermodynamischen Gründen ist ein β -Monodentatkomplex wesentlich instabiler als ein sechsgliedriger cyclischer β,γ -Komplex. Mit den Phosphorothioatanaloga läßt sich aber ein solcher Komplex nicht beweisen. Die Interpretation ist jedoch in Einklang mit den Befunden, die mit den austauschinerten Cr^{III} - und Co^{III} -ATP-Komplexen erhalten wurden – soweit direkte Vergleiche wie bei Hexokinase^[33, 80], Creatin-Kinase^[76, 81], Arginin-Kinase^[77, 81] und Adenylyl-Kinase^[77, 82] möglich sind. Schwierigkeiten ergeben sich bei der Deutung der Ergebnisse bei Creatin- und

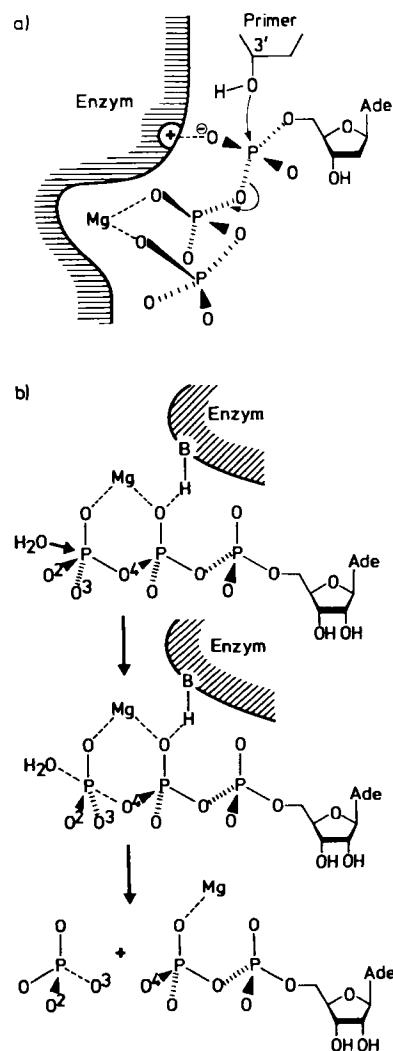


Fig. 19. Struktur des Mg-ATP-Komplexes im aktiven Zentrum von a) E.-coli-DNA-abhängiger DNA-Polymerase I und b) Myosin. – Die Koordination des Metallions an die β -Phosphatgruppe von ADP wurde durch ESR-Messungen an $[\beta-^{17}O]ADP$ bestimmt [84].

Arginin-Kinase, bei denen sowohl Umkehr am α - als auch am β -Phosphat von ATP auftritt. Es könnte entweder ein zweikerniger α,β - oder ein β,γ -Mg-ATP-Komplex vorliegen; das Produkt wäre ein α,β -ADP-Komplex. Des Rätsels Lösung scheint aber ein α,β,γ -Mg-ATP-Tridentatkomplex zu sein, wie sich aus ESR-Messungen an dem Komplex $[\alpha,\beta^{17}\text{O}]$ ADP-Mn-Nitrat-Creatin-Enzym ergibt^[52, 83]. Ein solcher Komplex paßt sehr gut zu einem β,γ -ATP-Komplex des Substrats und einem α,β -ADP-Komplex des Produkts. Wie die Befunde bei der Phosphoglycerat-Kinase (Umkehr am α , aber nicht am β -Phosphat) zu erklären sind, ist noch ungewiß^[19].

Tabelle 2 zeigt, daß keine eindeutige Präferenz für eine bestimmte Konfiguration des Metall-ATP-Komplexes existiert. Es sollte aber betont werden, daß alle bisher untersuchten DNA- und RNA-Polymerasen ausschließlich das S_p -Isomer als Substrat akzeptieren, unabhängig vom anwesenden Kation.

In Figur 19 sind die mit den Phosphorothioatmethoden erhaltenen Ergebnisse über den stereochemischen Verlauf der Reaktion sowie über die Struktur des Mg-ATP-Substrat-Komplexes für Myosin^[79] und DNA-Polymerase^[56] zusammengefaßt; dies zeigt, welch detailliertes Bild von der Anordnung des Substrats im aktiven Zentrum durch solche Untersuchungen erhalten werden kann. Selbstverständlich lassen sie keine Aussage über Teilnahme und Funktion funktioneller Gruppen der Proteine zu; das zu klären bleibt der Röntgen-Strukturanalyse vorbehalten.

4. Anwendung zur Lösung anderer biochemischer Probleme

4.1. Einbau von Phosphorothioatgruppen in DNA

Phosphorothioatgruppen lassen sich leicht durch enzymatische Polymerisation von dNTP α S in DNA einbauen^[85]. Alle untersuchten DNA-Polymerasen, z. B. *E. coli*-DNA-Polymerase I^[56, 57], T4- und T7-Phagen-DNA-Polymerase^[42, 58], *M. luteus*-DNA-Polymerase^[43, 87] und Reverse Transcriptase^[22], benutzen nur das S_p -Isomer von dNTP α S als Substrat, wobei immer Inversion der Konfiguration am Phosphor beobachtet wird. Auch die DNA-Polymerase β von Säugern polymerisiert dNTP α S; die Stereospezifität wurde allerdings noch nicht untersucht^[86]. Das gilt auch für die mit Ether behandelten *E. coli*-Zellen^[85]. Allen Systemen ist gemeinsam, daß die Phosphorothioate ähnlich schnell polymerisieren werden wie die natürlichen Triphosphate.

Die durch Phosphorothioatgruppen veränderte DNA unterscheidet sich in mancher Hinsicht von natürlicher DNA. So wurde schon sehr früh gefunden^[85], daß doppelsträngige, zirkuläre Φ X174- oder fd-DNA, in der nur der Minus-Strang durch Einbau von dAMPS anstelle von dAMP verändert war, zwar denselben Sedimentationskoeffizienten wie die natürliche DNA zeigte, daß aber die Schwebedichte in neutraler CsCl-Lösung ca. 0.4% größer ist, was durch das im Vergleich zu Sauerstoff höhere Atomgewicht von Schwefel erklärt werden könnte. Die veränderte DNA ist infektiös; ihr T_m -Wert liegt 1–2 °C unter dem der nicht-modifizierten DNA. Niedrigere T_m -Werte wurden in jüngster Zeit auch für die Phosphorothio-

atanaloga anderer Polymere wie Poly[d(G $_s$ C)] (ΔT_m – 8 °C), Poly[d(C $_s$ G)] (ΔT_m – 2 °C)^[43], aber auch Poly[d(A $_s$ T)] (ΔT_m – 15 °C) und Poly[d(T $_s$ A)] (ΔT_m – 5 °C)^[87, 88] gefunden. Worauf dies zurückzuführen ist, bedarf noch der Klärung. Die CD-Spektren der Analoga von Poly[d(G-C)] unterscheiden sich nicht von denen des natürlichen Polymers^[43]. Es wurde noch nicht untersucht, wie gut solche modifizierte DNA als Matrize für DNA-abhängige RNA- und DNA-Polymerasen dienen kann. Die Phosphorothioatgruppe beeinflußt den Übergang von der B- in die Z-Konformation. So läßt sich der Übergang bei Poly[d(G $_s$ C)] wesentlich leichter erreichen als bei Poly[d(G-C)]; bei Poly[d(C $_s$ G)] ist er praktisch unmöglich.

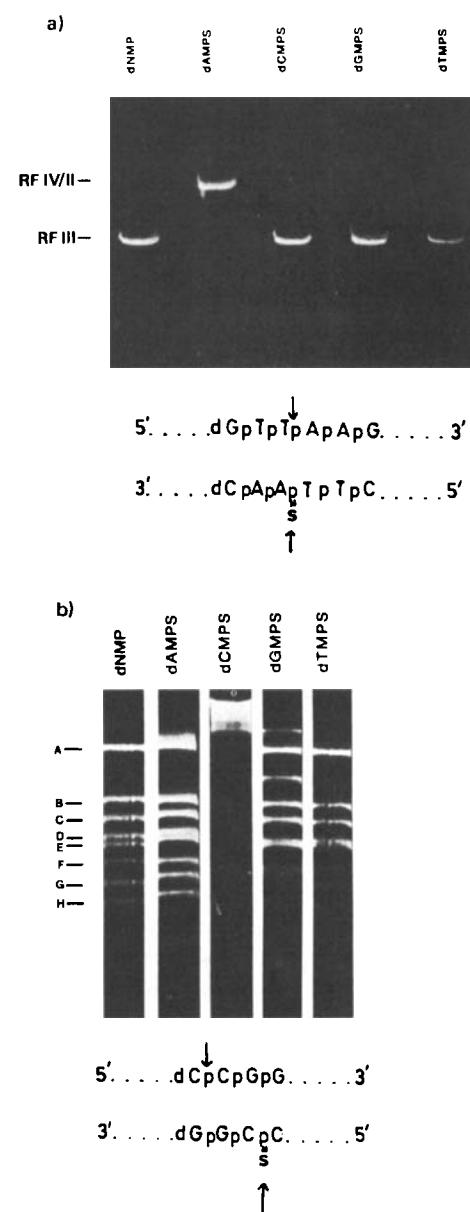


Fig. 20. Inhibition der durch Restriktionsendonukleasen katalysierten Reaktionen durch Einbau einer Phosphorothioatgruppe an der Schnittstelle. a) Reaktion mit HindII. b) Reaktion mit HpaII. – Das Enzym HindII schneidet fd-DNA einmal, so daß die ringförmige DNA linearisiert wird. Das Enzym HpaII schneidet achtmal, so daß acht Fragmente unterschiedlicher Länge erhalten werden. Die Buchstaben A bis H kennzeichnen diese Fragmente. RF IV ist zirkuläre, kovalent geschlossene doppelsträngige DNA; RF III ist doppelsträngige, lineare DNA; RF II ist zirkuläre, doppelsträngige DNA mit mindestens einem Bruch in einem der Strände. Die Fragmente wurden gel-elektrophoretisch getrennt und mit Ethidiumbromid angefärbt [90].

Dies läßt sich durch UV-, CD-, Laser-Raman- und ^{31}P -NMR-Spektroskopie zeigen. Auch ist Poly[d(G₃C)] im Gegensatz zu Poly[d(C₃G)] stark antigen, und die produzierten Antikörper sind spezifisch für Z-DNA. Wie der unterschiedliche Einfluß der Phosphorothioatgruppen entsteht, ist noch unklar^[43]. Die Befunde deuten auf eine bis jetzt noch nicht beachtete Rolle der Phosphatgruppen bei dieser Konformationsänderung hin, und es ist zu hoffen, daß die DNA-Analoga einen genaueren Einblick in diese Prozesse ermöglichen. Anhand der ^{31}P -NMR-Spektren der partiell thiophosphorylierten Polymere Poly[d(T₃A)], Poly[d(A₃T)], Poly[d(C₃G)] und Poly[d(G₃C)] konnten die ^{31}P -NMR-Signale der nicht-modifizierten Polymere zugeordnet werden, da die Signale der Phosphorothioatgruppen stark tieffeldverschoben sind^[43, 87].

Neben diesen Unterschieden zwischen natürlicher DNA und Phosphorothioat-DNA zeigen sich auch solche bei der Wechselwirkung mit Enzymen. Phosphorothioatinternucleotidbindungen sind gegen die 5'→3'-Nuclease der Polymerase I stabil (siehe Abschnitt 3.1). Diese Stabilität gegen Nucleasen scheint eine allgemeine Erscheinung zu sein. So können diese modifizierten Internucleotidbindungen auch nicht von der Exonuclease III hydrolysiert werden. Dieser Befund ist zur Stabilisierung des 5'-Endes eines Stranges doppelsträngiger DNA gegen Abbau benutzt worden^[89].

Auch alle untersuchten Restriktionsenzyme hydrolysierten Phosphorothioatinternucleotidbindungen langsamer als entsprechende Phosphatbindungen. Dies konnte an fd-DNA-Molekülen gezeigt werden, bei denen nur der (-)-Strang, nicht aber der als Matrize für die Polymerisation benutzte (+)-Strang modifiziert war^[90]. Durch Ersatz jeweils eines Desoxynucleosidtriphosphats durch das entsprechende Phosphorothioatanalogon bei der Polymerisation wurden vier Präparationen hergestellt, bei denen jeweils die 5'-Phosphatgruppe eines anderen Nucleotids modifiziert war. Beim Vergleich des Abbaus dieser vier DNA-Moleküle durch sechs Restriktionsenzyme stellte sich heraus, daß im allgemeinen nur die Modifizierung exakt an der Schnittstelle, nicht aber in anderen Positionen innerhalb der Erkennungsregion, die Hydrolyse z.T. erheblich verlangsamte (Fig. 20). Dieser noch nicht quantitativ erfaßte Befund regt die Verwendung der Phosphorothioate zur Stabilisierung von DNA gegen den Abbau durch Restriktionsenzyme an.

Die 3'→5'-Nuclease-Aktivität viraler und bakterieller DNA-Polymerasen ist für das Ausschneiden nicht-komplementärer Basenpaare während der Polymerisation und da-

mit für die Genauigkeit der Replikation bei diesen System ganz oder teilweise verantwortlich^[91] (Fig. 21). Sollten die Phosphorothioate von dieser Nuclease nicht oder nur langsam hydrolysiert werden, sollte man eine Erhöhung der Fehlerhäufigkeit bei der Replikation erwarten; auf diese Weise könnte man den Anteil abschätzen, den diese 3'→5'-Nuclease zur Genauigkeit beiträgt. Zur Bestimmung der Genauigkeit der Replikation eignen sich besonders amber-Mutanten von zirkulärer Einzelstrang-Virus-DNA, die durch Einbau nicht-komplementärer Basen bei der Replikation, also fehlerhaften Einbau, zum Wildtyp revertieren (Fig. 22). Selbst wenige Revertanten können sehr ge-



Fig. 22. Φ X174-Mutante am3. Die Positionen 586–588 sind angegeben. In der Mutante ist G durch A ersetzt. Dieses Triplet codiert im Wildtyp für die Aminosäure Tryptophan (try), in der Mutante ist es ein „non-sense“-Codon (siehe auch Text).

nau in einer großen Population ermittelt werden, da sich jedes lebensfähige Virus nach Infektion einer Bakterienkultur und Ausbreiten auf einem Agarnährboden durch Hofbildung verrät. Die Zahl der nicht-revertierten Mutanten kann durch Zugabe von Suppressor-tRNA zur Aufhebung der Mutation in einem separaten Experiment bestimmt werden.

In einem solchen System wurde die Genauigkeit der Replikation des (+)-Stranges von Φ X174-am3 in Gegenwart von dCTP_aS anstelle von dCTP untersucht^[86]. Bei Verwendung von *E.coli*-DNA-Polymerase I stieg die Fehlerhäufigkeit um den Faktor 20, bei Verwendung von T4-DNA-Polymerase um den Faktor 500. Wurde mit einer DNA-Polymerase ohne 3'→5'-Nucleaseaktivität polymerisiert, so änderte sich die Fehlerhäufigkeit nicht. Die Ergebnisse zeigen, daß diese Nuclease die Genauigkeit der Replikation mitbestimmt. Sie eröffnen auch den Weg zu gezielten Mutationen durch Einbau von Nucleosidphosphorothioaten an bestimmten Stellen, z.B. an Restriktionsschnittstellen der DNA^[92].

Wegen der Undurchlässigkeit von Zellmembranen ist der Einbau von Phosphorothioatgruppen in DNA über die

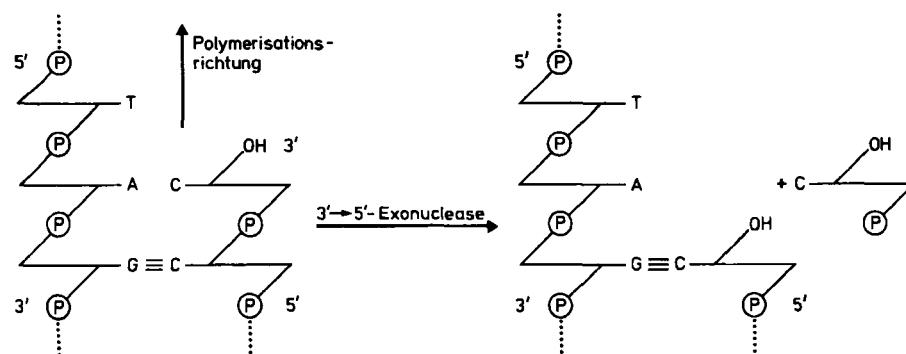


Fig. 21. Schematische Darstellung der Funktion der 3'→5'-Exonucleaseaktivität von DNA-Polymerasen zur Vermeidung des Einbaus von nicht-komplementären Nucleotiden.

Desoxynucleosidthiotriphosphate bei intakten Zellen nicht möglich. Die Zellen werden aber durch Behandlung mit Ether oder Toluol durchlässig^[85]. Die Barriere kann aber auch durch die Verwendung von Thiophosphat umgangen werden. In HeLa-Zellen werden Thiophosphatgruppen in Nucleotide wie ATP_γS und GTP_γS eingebaut und dann auf andere Acceptor-moleküle wie z. B. Histone übertragen^[93]. In Kulturen von African-green-monkey-Zellen, die mit SV40 infiziert waren, thiophosphorylierte ATP_γS auch Thymidin; nach weiterer Phosphorylierung in den Zellen entstand TTP_αS, d. h. auch Phosphorothioat kann in DNA eingebaut werden^[94]. Obwohl bei diesen Experimenten nur 3–12 Phosphorothioatgruppen in die virale DNA (5226 Basenpaare) eingebaut wurden, war dies doch ausreichend, um sie über Hg-Sepharose zu isolieren!

4.2. RNA- und DNA-Moleküle mit Phosphorothioatendgruppen

Phosphorothioat kann durch Verwertung von NTP_αS und Polymerasen auch in RNA eingebaut werden. Das scheint aber bis jetzt nur für Poly[r(A-U)]^[78, 95, 96], das 3'-Ende von tRNA^[97, 98] und Poly- α A^[99] durchgeführt worden zu sein. Hingegen gibt es eine Reihe von Untersuchungen, in denen durch Verwendung von ATP_γS oder GTP_γS die Phosphorothioatgruppe in das 5'-Ende von RNA-Molekülen in *Physarum Polyccephalum* und in isolierten Kernen von Hefe, Maus-Myelom und Xenopus-Oocyten eingebaut und diese neu synthetisierte RNA von endogener RNA durch Chromatographie an Hg-Sepharose getrennt wurde^[100–106]. Diese Technik ermöglicht mit verschiedenen NTP_γS zu bestimmen, welches Nucleotid am 5'-Ende der RNA steht und so eventuell auch zu entscheiden, von welchem Promoter die RNA-Synthese ausgegangen ist.

Es können aber dadurch Probleme auftreten, daß die terminale Phosphorothioatgruppe enzymatisch auf andere RNA-Moleküle übertragen wird; dies täuscht dann neu synthetisierte RNA vor^[107, 108]. Stallcup et al. hatten die Idee, zur Vermeidung dieser Übertragung NTP_βS anstelle

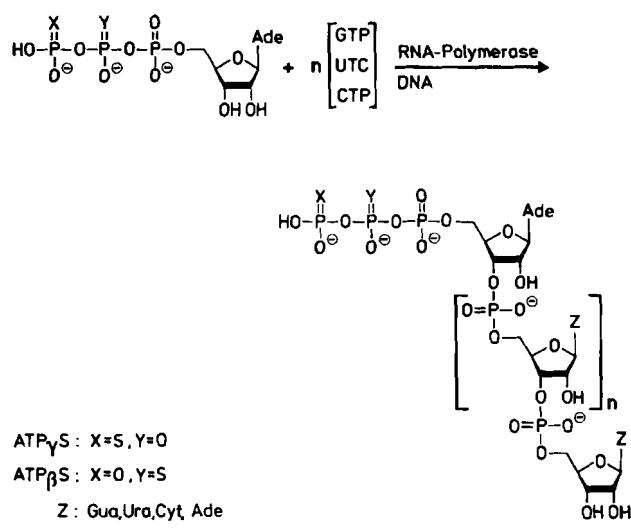


Fig. 23. Einbau von Phosphorothioatgruppen in das 5'-Ende von RNA unter Verwendung von ATP_γS oder ATP_βS.

von NTP_γS zur Polymerisation zu verwenden (Fig. 23)^[109, 110], da diese ebenfalls gute Substrate für RNA-Polymerasen sind^[78]. Die so erhaltenen RNA-Moleküle sind auch an Hg-Sepharose trennbar, und die Übertragung von Phosphat auf andere RNA-Moleküle stört nicht, da sie von Hg-Sepharose nicht zurückgehalten werden.

Für den Einbau terminaler Phosphorothioatgruppen in DNA ist dieser Weg nicht gangbar, da DNA-Polymerasen immer nur an das 3'-Ende vorhandener Polynucleotide anpolymerisieren, aber keine neuen Ketten beginnen. Es gibt jedoch die Möglichkeit, die Phosphorothioatgruppe von ATP_γS auf das 5'-Ende von DNA durch Polynucleotid-Kinase zu übertragen^[111] (Fig. 24). Diese Reaktion ist aber bedeutend langsamer als die mit ATP.

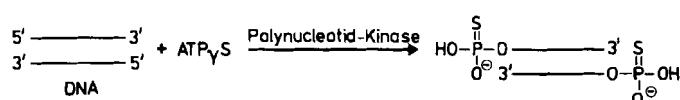


Fig. 24. Einbau von 5'-Phosphorothioatgruppen in DNA.

4.3. Thiophosphorylierung von Proteinen

Thiophosphorylierung und Dephosphylierung von Proteinen ist einer der von der Natur am häufigsten verwendeten Mechanismen zur Regulation der Enzymaktivität^[112, 113]. Diese Reaktionen werden durch Protein-Kinasen und -Phosphatasen katalysiert. Besonders in komplexen Systemen ist es oft schwer, Proteine im voll phosphorylierten Zustand zu isolieren und zu untersuchen. Da Thiophosphorsäureester wie z. B. AMPS von Phosphatasen extrem langsam hydrolysiert werden, lag es nahe zu prüfen, ob thiophosphorylierte Proteine nicht auch gegen Phosphatasen stabil sind. Das setzt voraus, daß die Protein-Kinasen ATP_γS als Substrat akzeptieren. Das erste System, an dem dies untersucht wurde, war die Glykogen-Phosphorylase, die durch Phosphorylierung aktiviert wird. Es stellte sich in der Tat heraus, daß der Phosphorothioatrest durch die Kinase übertragen und damit die Glykogen-Phosphorylase aktiviert wird. Die Phosphatase kann aber diesen Rest nicht mehr entfernen, so daß die Phosphorylase im aktivierte Zustand eingefroren ist^[114]. Damit war die grundsätzliche Anwendbarkeit der Phosphorothioatgruppe für solche Probleme gezeigt.

Die Rolle der Phosphorylierung der leichten Ketten des Myosins der glatten Muskulatur bei der Aktivierung dieses Enzyms und somit bei der Kontraktion des Muskels wurde ebenfalls auf diesem Weg geklärt. In diesem Muskel wird die Kontraktion durch Ca²⁺-Ionen ausgelöst, und es war nicht klar, ob dies auf eine direkte Wechselwirkung von Ca²⁺ mit Myosin zurückgeht wie etwa bei den Mollusken^[115], oder ob durch Ca²⁺ eine Protein-Kinase aktiviert wird, die die Phosphorylierung der leichten Ketten dieses Myosins katalysiert, und erst die Phosphorylierung der direkten Auslöser für die Kontraktion ist. Daß letzteres trifft, ließ sich durch Thiophosphorylierung (auch an Muskelfasern) zeigen, da die konkurrierende Dephosphylierung, die normalerweise solche Untersuchungen erschwert, ausgeschaltet war^[116–119]. Auch die Rolle der Phosphorylierung des Myosins in Skelettmuskelfasern wurde so studiert^[120]. In Weiterverfolgung dieser Arbeiten wurde die Thiophosphorylierung der leichten Ketten des Myosins

zur affinitätschromatographischen Reinigung der Phosphatase benutzt^[121].

Führt die Phosphorylierung eines Proteins zur Inaktivierung, wie z. B. bei der Pyruvat-Dehydrogenase, kann Thiophosphorylierung zur Aufklärung der Bedeutung dieses Schrittes genutzt werden^[122]. Um die Rolle der Phosphorylierung des Rezeptors und anderer Membranproteine durch den epidermalen Wachstumsfaktor zu klären, scheint die Thiophosphorylierung geeignet zu sein^[123]. Vielleicht kann diese Methode auch bei der Untersuchung der Phosphorylierung des Insulinrezeptors^[124, 125] oder des Ca^{2+} -Transportsystems in cholinergen synaptischen Vesikeln^[126] eine Hilfe sein.

Auch Histone werden durch Protein-Kinase mit ATP_S thiophosphoryliert, wobei diese Reaktion nicht nur *in vitro*^[127], sondern auch *in vivo* abläuft (siehe Abschnitt 4.1); HeLa-Zellen bauen ^{35}S -Thiophosphat in ATP_S und GTP_S ein, die dann auf Proteine übertragen werden^[101]. Die thiophosphorylierten Proteine können an Hg-Sepharose getrennt werden. Dieses Verfahren sollte zur Isolierung anderer in der Zelle phosphorylierter Proteine von Nutzen sein. Auch Microtubuli-assoziierte Proteine werden von ATP_S thiophosphoryliert^[128].

Für die enzymatische Thiophosphorylierung von Nucleosiden – sieht man von dem nicht effizienten System von SV40-infizierten Zellen ab – und Zuckern ist bisher kein Beispiel bekannt. Ganz sicher nehmen aber noch andere als die bis jetzt beschriebenen Kinasen ATP_S als Substrat an, wie das kürzlich veröffentlichte Beispiel der Pyridoxal-Kinase zeigt^[129] (Fig. 25).

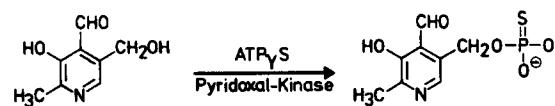


Fig. 25. Enzymatische Synthese von Pyridoxalphosphorothioat.

4.4. Stabilisierung von Nucleotid-Protein-Komplexen mit ATP_S und GTP_S

Bei gekoppelten Reaktionen, in denen ATP oder GTP gespalten wird, erhebt sich oft die Frage, wie weit diese Reaktion ohne Spaltung von ATP nur durch Anlagerung von ATP an das Enzym ablaufen würde, oder in anderen Worten, für welchen Teilschritt der Reaktion die Spaltung von ATP notwendig ist. Darüber sollte die Verwendung hydrolysestabiler Analoga von ATP oder GTP Aufschluß geben. Die Imidoanaloga AMPPNP und GMPPNP sind für diese Zwecke weit verbreitet^[130]. In jüngster Zeit haben sich auch die Phosphorothioatanaloga ATP_S und GTP_S für die Untersuchung einiger Systeme durchgesetzt.

Die erste ATPase, die mit ATP_S genauer untersucht wurde, war Myosin^[12]. Dieses ATP-Analogon hat geholfen, die mit der Bindung des Substrats einhergehenden Konformationsänderungen des Proteins eindeutig zu bestimmen. Dies war möglich, da für das Analogon der Hydrolyseschritt wesentlich langsamer ist als für ATP, so daß Änderungen durch Substratbindung von der durch Hydrolyse fluoreszenzspektroskopisch eindeutig unterschieden werden können^[131, 132].

ATP_S hat sich auch für die Untersuchungen der durch recA-Protein katalysierten Reaktionen als nützlich erwie-

sen. Dieses Protein ist essentiell für die genetische Rekombination in *E. coli*. In vitro katalysiert es in Gegenwart von ATP die Hybridisierung von Einzelstrang-DNA mit homologen Regionen in doppelsträngiger DNA zu sogenannten D-Loops, die auf der DNA „entlanglaufen“, bis ein vollständiger Strangtausch stattgefunden hat (branch migration) (Fig. 26). Darüber hinaus spaltet dieses Protein in

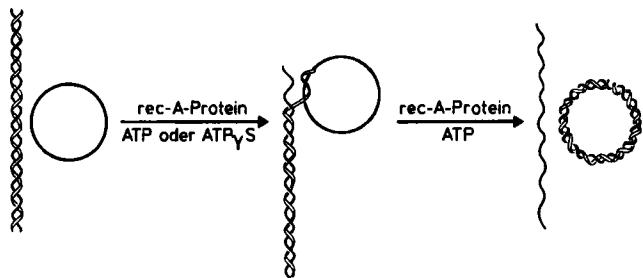


Fig. 26. Funktion des recA-Proteins in Abhängigkeit von ATP und ATP_S (siehe auch Text).

Gegenwart von Einzelstrang-DNA und ATP Repressoren, z. B. λ , lexA und P22^[133, 134]. Für beide Reaktionen ist es von Interesse zu erfahren, ob, und wenn ja, für welchen Schritt ATP-Hydrolyse erforderlich ist. Dies wurde durch Verwendung von ATP_S , das von recA-Protein praktisch nicht hydrolysiert wird, untersucht. Danach ist für die D-Loop-Bildung keine ATP-Hydrolyse erforderlich, wohl aber für die „branch migration“^[135-138]. Der D-Loop ist in Gegenwart von ATP_S und recA-Protein so stabil, daß seine Struktur elektronenmikroskopisch aufgeklärt werden konnte; die DNA ist in ihm aufgeweitet oder aufgedreht^[139-141], was schon früher angenommen worden war^[142]. Die Proteaseaktivität des recA-Proteins gegenüber Repressoren wird durch ATP_S nicht behindert, woraus geschlossen wird, daß Hydrolyse von ATP nicht notwendig ist^[143-147].

Auch *E. coli*-DNA-Polymerase III kann ATP_S nicht spalten. Für dieses Enzym ist Spaltung von ATP zur Bildung des DNA-Enzym-Komplexes erforderlich. In Gegenwart von ATP_S , das nicht durch dieses Enzym spaltbar ist, dissoziert der Komplex, was zur Inhibition der Polymerisation führt^[148, 149]. Dies könnte darauf hindeuten, daß für die Translocation des Enzyms an der Replikationsgabel von einem Primer zum nächsten Hydrolyse von ATP nicht erforderlich ist.

Auch bei der Bindung von aminoacylierter tRNA an mRNA-programmierte Ribosomen durch den Tu-Faktor wird ein Nucleosidtriphosphat, in diesem Fall GTP, hydrolysiert. Die Genauigkeit der Anticodon-Codon-Erkennung ist für die Genauigkeit der Proteinbiosynthese entscheidend. Vergleicht man bei dieser Reaktion die Geschwindigkeit der Hydrolyse von GTP mit der von GTP_S , so findet man, daß letzteres ungefähr 2500 mal langsamer gespalten wird^[150]. Das hat zur Folge, daß der Komplex von GTP_S , Tu-Faktor, Ribosom und tRNA eine wesentlich längere Lebensdauer hat als der entsprechende Komplex mit GTP. Die Fehlerhäufigkeit bei der Translation wird dadurch erniedrigt. Offenbar legt die Natur bei der Proteinbiosynthese, jedenfalls bei diesem Schritt, mehr Wert auf Geschwindigkeit als auf Genauigkeit.

Der Unterschied der Hydrolysegeschwindigkeit von GTP und GTP_S von ca. 2500 in diesem System kommt

dem für Myosin und ATP bzw. ATP,_S (ca. 1000) recht nahe^[151]. Natürlich sind zwei Beispiele nicht ausreichend, um eine Regel abzuleiten, doch kann man spekulieren, ob diese Differenz nicht vielleicht den Unterschied in der Reaktivität der γ -Phosphat- und der γ -Phosphorothioatgruppe gegenüber einem nucleophilen Angriff entspricht. Detaillierte kinetische Untersuchungen an anderen ATP-Asen und GTPasen werden das klären müssen. Bei der nicht-enzymatischen alkalischen Hydrolyse von Trialkylphosphorothioat und Trialkylphosphat wurde ein Unterschied von 100 gefunden^[151].

An der Aktivierung der durch Hormone regulierten Adenylyl-Cyclase ist ebenfalls ein GTP-bindendes Protein beteiligt; es besteht aus zwei Untereinheiten und hat GTPase-Aktivität^[152]. Da GMPPNP und ganz besonders GTP,_S eine praktisch irreversible und wesentlich höhere Aktivierung der Cyclase als GTP zeigen, lag es nahe, dies ihrer Resistenz gegen diese GTPase zuzuschreiben^[153, 154]. Dieser Auffassung widerspricht eine neuere Deutung, wonach dieses Protein keine GTPase-Aktivität aufweist und die Aktivierung durch Dissoziation der Untereinheiten in Gegenwart von GTP,_S und GMPPNP erfolgt^[155]. Da die Adenylyl-Cyclase ein membrangebundenes Enzym ist, wird sie oft in wenig gereinigten, komplexen biologischen Systemen untersucht. Auch hier sind die Analoga GMPPNP und GTP,_S wegen ihrer Stabilität nützlich, da die Gefahr besteht, daß das normale Nucleotid GTP in solchen Systemen sehr rasch abgebaut wird und sein Effekt nicht genau bestimmt werden kann.

Das gilt auch für GDP, von dem angenommen wird, daß es die Cyclase nicht aktiviert, sondern durch Kompetition mit GTP inhibiert. GDP kann sehr leicht sowohl zu GMP abgebaut als auch zu GTP phosphoryliert werden, so daß die Schwierigkeit besteht, eindeutige Aussagen über die Wirkung von GDP zu machen. Ein sehr stabiles Analogon ist GDP,_BS, das durch Phosphatasen nicht abgebaut und von Kinasen nur schwer phosphoryliert wird. In der Tat kann gezeigt werden, daß es die Cyclase inhibiert^[156-160].

Die Aktivierung der Adenylyl-Cyclase durch Hormone ähnelt der Aktivierung der cyclischen Phosphodiesterase durch Licht beim Sehprozeß. In beiden Systemen leitet ein GTP-bindendes Protein das Signal vom angeregten Rezeptor weiter zu einem Enzym, das die zelluläre Konzentration eines cyclischen Nucleotids, cAMP in einem, cGMP im anderen Fall, verändert. Das im Sehvorgang involvierte GTP-bindende Protein zeigt auch GTPase-Aktivität, die wie beim Protein G/F bei der Cyclase das Enzym in den nicht-stimulierten Zustand versetzt. Bei beiden Proteinen wird die GTPase-Aktivität irreversibel durch ADP-Ribosylierung durch Choleratoxin aktiviert^[161]. Neben GMPPNP ist auch GTP,_S als nicht-hydrolysierbares GTP-Analogon GDP,_BS als Analogon von GDP verwendet worden^[161-165]. Es ist zu erwarten, daß diese Analoga und cGMPS (Abschnitt 2.2)^[36, 39] bei weiteren Untersuchungen dieses interessanten Systems von Nutzen sein werden.

4.5. Wechselwirkung von cAMPS mit Proteinen

Auch cAMPS zeichnet sich dadurch aus, daß es metabolisch stabiler ist als cAMP^[38]. Seit dem letzten zusammenfassenden Bericht über die Eigenschaften von cAMPS^[2] ist

es gelungen, die beiden Diastereomere zu trennen (Abschnitt 2.2). Dies hat es ermöglicht, die Produkte der früher ausgearbeiteten Synthese von cAMPS^[38] zu analysieren. Es stellte sich heraus, daß das kristalline Produkt das S_P-Isomer ist. Das in nur geringem Anteil entstehende R_P-Isomer wird bei der Chromatographie an DEAE-Sephadex teilweise abgetrennt. Alle früher^[2] beschriebenen Ergebnisse beziehen sich auf das S_P-Isomer.

Die Untersuchungen sind auf andere Systeme ausgedehnt worden; in einigen Fällen, besonders bei Protein-Kinase, studierte man die unterschiedlichen Effekte der S_P- und R_P-Isomere. Bei der Protein-Kinase I bindet das S_P-Isomer besser als das R_P-Isomer, bei der Protein-Kinase II ist es gerade umgekehrt^[166-168]. Das S_P-Isomer bindet auch an das Catabolit-Activator-Protein (CAP)^[169], das dadurch, wenn auch etwas schlechter als durch cAMP, aktiviert wird^[170]. Wie schon beschrieben^[2], wurde cAMPS zur Untersuchung der Chemotaxe in *Dictyostelium Discoideum* genutzt^[171]. Wegen seiner im Vergleich zu cAMP erhöhten metabolischen Stabilität, wegen seiner Fähigkeit, in Zellen eindringen zu können^[2, 172], und wegen des geringen strukturellen Unterschiedes zu cAMP sollte sich cAMPS besonders gut für Untersuchungen der Wirkung von cAMP eignen und Vorteile gegenüber anderen gebräuchlichen Analoga haben. Die kommerzielle Verfügbarkeit des S_P-Isomers wird wohl eine solche Entwicklung fördern.

4.6. Phosphorothioatanaloga von Phospholipiden

Ein neues Anwendungsgebiet für Phosphorothioatanaloga wird gegenwärtig durch den Einbau von Phosphorothioatgruppen in Phospholipide erschlossen. So wurden die beiden Diastereomere des 1,2-Dipalmitoyl-sn-glycero-3-thiophosphorylcholins (Fig. 27) synthetisiert^[173-177]. Sie

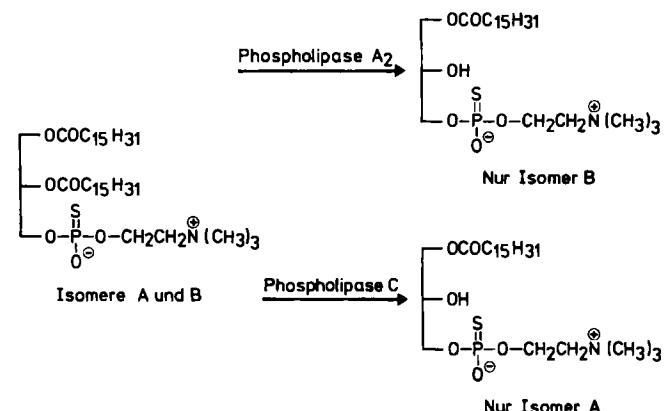


Fig. 27. Trennung der Diastereomere des 1,2-Dipalmitoyl-sn-glycero-3-thiophosphorylcholins.

können ³¹P-NMR-spektroskopisch unterschieden werden; allerdings ist ihre absolute Konfiguration noch nicht bestimmt. Phospholipase A₂ hydrolysiert bevorzugt das Diastereomer, dessen ³¹P-NMR-Signal stärker tieffeldverschoben ist^[175-177]. Bezeichnet man dieses Diastereomer mit B, so ist das Produkt der Hydrolyse das B-Isomer des *lys*-Palmitoyl-thiophosphorylcholins. Dies kann vom A-Isomer des nicht umgesetzten Dipalmitoyl-thiophosphorylcholins chromatographisch getrennt und dann mit Palmi-

tinsäureanhydrid zum B-Isomer des Dipalmitoyl-thiophosphorylcholins umgesetzt werden. Diese Trennung von Diastereomeren erinnert an die der Diastereomere von ATP_aS (siehe Abschnitt 2.1)^[12]. Auch Phospholipase C zeigt Stereoselektivität, wobei das gegen Phospholipase A₂ resiente Isomer das bevorzugte Substrat ist^[175-177]. Auch an diesen beiden Beispielen zeigt sich, daß Enzyme stereoselektiv reagieren, selbst wenn sie nicht direkt am chiralen Phosphorzentrum angreifen.

Die Phosphorothioatanaloga bilden Liposomen, deren Übergang vom Gel zur flüssigkristallinen Phase bei 44 °C nur etwas höher liegt als der für die natürlichen Phospholipide (41 °C). ³¹P-NMR-spektroskopisch zeigt sich, daß in wäßrigen Dispersionen der Phosphorothioatanaloga die für Phospholipide typischen Doppelschichten entstehen^[174]. Da die ³¹P-NMR-Signale der Phosphorothioate gegenüber den Phosphaten stark tieffeldverschoben sind, wird erwartet, daß sich mit ihnen die Bewegungs- und Struktureigenschaften einzelner Lipide in einem gemischten System untersuchen lassen. Darüber hinaus könnten sie wegen ihrer erhöhten metabolischen Stabilität in Situationen, wo die Turnoverzahl der Phospholipide für zelluläre Funktionen wichtig ist, von Interesse sein. Methoden zur Inkorporation der Phosphorothioatanaloga in biologische Membranen werden gegenwärtig entwickelt. So wurde gefunden, daß *sn*-Glycerol-3-phosphorothioat von *Escherichia coli* Stamm 8 über das spezifische aktive Transportsystem für Glycerolphosphat aufgenommen und in Phospholipide eingebaut wird. Bei höheren Konzentrationen ist diese Verbindung baktericid für Stämme, die ein aktives Transportsystem für Glycerolphosphat haben^[178].

5. Schluß

Dieser Fortschrittsbericht demonstriert, daß Nucleosidphosphorothioate in der Biochemie vielfältig angewendet werden. Dies ist darauf zurückzuführen, daß der Ersatz eines Sauerstoffatoms durch ein Schwefelatom in den Phosphatgruppen der Nucleotide weitreichendere Konsequenzen hat, als man erwartet. Das Auftreten von Diastereomeren und auch die erhöhte Affinität der Phosphorothioatgruppen für Hg⁺ überrascht nicht, doch verwundert die große Zahl der Anwendungsmöglichkeiten dieser Eigenschaften zur Lösung biochemischer Probleme. Das eigentlich Erstaunliche ist, daß der Unterschied in den Affinitäten der Nucleotide und Nucleosidphosphorothioate zu Proteinen, wenn überhaupt vorhanden, dann nur sehr gering ist. Dies ist ein weiterer Beleg dafür, daß aktive Zentren von Proteinen nicht starre, sondern in gewissen Grenzen flexible, anpassungsfähige Strukturen haben. Auf den ersten Blick ist schwer zu verstehen, daß nicht alle Enzymreaktionen um einen ähnlichen Betrag verlangsamt werden, und zwar so, wie man es aufgrund der geringeren chemischen Reaktivität der Phosphorothioate erwartet. Trotzdem laufen viele enzymatische Transferreaktionen fast ebenso gut ab wie die Reaktionen mit den natürlichen Substraten, z. B. die Umsetzungen mit DNA- und RNA-Polymerasen; anders ist es bei Polynucleotid-Kinasen und der Pyridoxal-Kinase, aber vor allem bei Phosphatasen und Nucleasen. Die durch sie katalysierten Hydrolysereaktionen sind in Gegenwart von Phosphorothioaten sehr viel

langsamer. Wahrscheinlich ist im allgemeinen bei enzymatischen Reaktionen nicht der eigentliche chemische Schritt, sondern vielmehr die Konformationsänderung des Proteins geschwindigkeitsbestimmend^[179]. Leider gibt es bis jetzt nur zwei Untersuchungen zur Kinetik von Enzymreaktionen mit Nucleosidphosphorothioaten (Myosin und Tu-Faktor)^[131, 150]. Bei beiden zeigt sich, daß der chemische Schritt bei Verwendung des Analogons deutlich verlangsamt und, jedenfalls beim Myosin, geschwindigkeitsmitbestimmend wird. Als Erklärung dafür, daß die Reaktionsgeschwindigkeit bei den aufgeführten Enzymen kaum verringert wird, bietet sich folgende Annahme an: Bei den Phosphorothioaten wird der chemische Schritt ähnlich schnell wie die gewöhnlich geschwindigkeitsbestimmenden Konformationsänderungen; dies beeinflußt aber kaum die „steady state rate“. Zur Prüfung dieser Hypothese sind eingehendere Untersuchungen notwendig.

Es ist nicht ganz klar vorauszusehen, welche Richtung die Untersuchungen mit Phosphorothioatanaloga einschlagen werden. Nach der Klärung des stereochemischen Verlaufs von ca. 50 enzymkatalysierten Phosphoryl- und Nucleotidyltransferreaktionen hat dieses Gebiet den Reiz des Neuen verloren. Verstärkte Bedeutung werden sie wohl beim Studium der Phosphorylierung von Proteinen, insbesondere bei deren Regulation, erlangen. Dem Zug der Zeit folgend dürfte auch die Nutzung der speziellen Eigenschaften der Phosphorothioatgruppen, besonders ihre Stabilität gegen enzymatischen Abbau, in DNA und RNA verstärktes Interesse erlangen. Diese Tendenz wird durch die immer größer werdende Zahl kommerziell erhältlicher Nucleosidphosphorothioate, auch radioaktiv markierter, gefördert werden.

Ganz sicher ist man auch bei den Phosphorothioatanaloga der Phospholipide erst am Anfang der Entwicklung, und die Synthese von Analoga mit anderen Zuckern, als sie in den Nucleosiden auftreten, hat noch gar nicht begonnen.

Nucleosidphosphorothioate scheinen geradezu ideal geeignet zu sein, eine Kooperation zwischen Chemikern, Biochemikern, Biologen und Molekularbiologen zu stimulieren. Der Umgang mit ihnen erleichtert den Chemikern den Zugang zu den Biowissenschaften und fördert bei Biowissenschaftlern das Verständnis für Probleme, die durch Strukturänderungen der sie interessierenden Moleküle einer Lösung nähergebracht werden können. Es ist zu hoffen, daß Nucleosidphosphorothioate in Zukunft die Rolle eines fruchtbaren Bindeglieds noch stärker spielen werden.

Alle beschriebenen eigenen Arbeiten sind nur zustande gekommen durch die enthusiastische, stimulierende und kritische Mitarbeit meiner Mitarbeiter Drs. V. W. Armstrong, P. A. Bartlett, P. M. J. Burgers, B. A. Connolly, H. Gindl, R. S. Goody, B. V. L. Potter, P. J. Romaniuk, P. D. Senter und D. Yee, denen ich auch hier für ihre Beiträge danken möchte. Diese Arbeiten wurden zum Teil von der Deutschen Forschungsgemeinschaft sowie durch Stipendien der Alexander-von-Humboldt-Stiftung und der Royal Society unterstützt. P. Große sei für die Geduld beim Schreiben dieses Manuskriptes gedankt.

Eingegangen am 9. März 1983 [A 457]

- [1] F. Eckstein, *Angew. Chem.* 87 (1975) 179; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* 14 (1975) 160.
- [2] F. Eckstein, *Acc. Chem. Res.* 12 (1979) 204.
- [3] F. Eckstein, *Trends Biochem. Sci.* 5 (1980) 157.
- [4] J. R. Knowles, *Annu. Rev. Biochem.* 49 (1980) 877.
- [5] P. A. Frey in A. Neuberger, L. L. M. Van Deenen: *New Comprehensive Biochemistry*, Vol. 3, Elsevier Biomedical Press, Amsterdam 1982, S. 201.
- [6] P. A. Frey, *Tetrahedron* 38 (1982) 1541.
- [7] F. Eckstein, P. J. Romaniuk, B. A. Connolly, *Methods Enzymol.* 87 (1982) 197.
- [8] P. A. Frey, J. P. Richard, H.-T. Ho, R. S. Brody, R. D. Sammons, K.-F. Sheu, *Methods Enzymol.* 87 (1982) 213.
- [9] M. R. Webb, *Methods Enzymol.* 87 (1982) 301.
- [10] R. S. Goody, F. Eckstein, *J. Am. Chem. Soc.* 93 (1971) 6252.
- [11] F. Eckstein, H. Gindl, *Biochim. Biophys. Acta* 149 (1967) 35.
- [12] F. Eckstein, R. S. Goody, *Biochemistry* 15 (1976) 1685.
- [13] A. M. Michelson, *Biochim. Biophys. Acta* 91 (1964) 1.
- [14] K.-F. R. Shiu, P. A. Frey, *J. Biol. Chem.* 252 (1977) 4445.
- [15] E. K. Jaffe, M. Cohn, *Biochemistry* 17 (1978) 652.
- [16] B. A. Connolly, P. J. Romaniuk, F. Eckstein, *Biochemistry* 21 (1982) 1983.
- [17] F. R. Bryant, S. J. Benkovic, D. Sammons, P. A. Frey, *J. Biol. Chem.* 256 (1981) 5965.
- [18] A. Gupta, C. De Brosse, S. J. Benkovic, *J. Biol. Chem.* 257 (1982) 7689.
- [19] E. K. Jaffe, J. Nick, M. Cohn, *J. Biol. Chem.* 257 (1982) 7650.
- [20] C. F. Midelfort, I. Sarton-Miller, *J. Biol. Chem.* 253 (1978) 7127.
- [21] D. Yee, V. W. Armstrong, F. Eckstein, *Biochemistry* 18 (1979) 4116.
- [22] P. A. Bartlett, F. Eckstein, *J. Biol. Chem.* 257 (1982) 8879.
- [23] F. Eckstein, unveröffentlicht.
- [24] J. P. Richard, H.-T. Ho, P. A. Frey, *J. Am. Chem. Soc.* 100 (1978) 7756.
- [25] J. P. Richard, P. A. Frey, *J. Am. Chem. Soc.* 104 (1982) 3476.
- [26] Th. Meyer, K. Wilckens, J. Thiem, H. Hilz, unveröffentlicht.
- [27] P. M. J. Burgers, F. Eckstein, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 75 (1978) 4798.
- [28] F. R. Bryant, S. J. Benkovic, *Biochemistry* 18 (1979) 2825.
- [29] W. Saenger, D. Suck, F. Eckstein, *Eur. J. Biochem.* 46 (1974) 559.
- [30] D. A. Usher, E. S. Erenrich, F. Eckstein, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 69 (1972) 115.
- [31] R. L. Jarvest, G. Lowe, *J. Chem. Soc. Chem. Commun.* 1979, 364.
- [32] a) E. K. Jaffe, M. Cohn, *J. Biol. Chem.* 253 (1978) 4823; b) J. Stingelin, D. W. Boyle, E. T. Kaiser, *ibid.* 255 (1980) 2022.
- [33] R. D. Cornelius, W. W. Cleland, *Biochemistry* 17 (1978) 3279.
- [34] E. A. Merritt, M. Sundaralingam, R. D. Cornelius, W. W. Cleland, *Biochemistry* 17 (1978) 3274.
- [35] J. Baraniak, R. W. Kinias, K. Lesiak, W. J. Stec, *J. Chem. Soc. Chem. Commun.* 1979, 940.
- [36] J. Baraniak, B. Jastorff, W. J. Stec, persönliche Mitteilung.
- [37] J. Baraniak, P. Mejbaum, W. J. Stec, *Pol. J. Chem.*, im Druck.
- [38] F. Eckstein, L. P. Simonson, H. P. Baer, *Biochemistry* 13 (1974) 3806.
- [39] P. D. Senter, F. Eckstein, A. Mülsch, E. Böhme, *J. Biol. Chem.*, im Druck.
- [40] P. M. J. Burgers, F. Eckstein, *Biochemistry* 18 (1978) 592.
- [41] B. V. L. Potter, B. A. Connolly, F. Eckstein, *Biochemistry* 22 (1983) 1369.
- [42] P. J. Romaniuk, F. Eckstein, *J. Biol. Chem.* 257 (1982) 7684.
- [43] T. Jovin, H. Füldner, F. Eckstein, unveröffentlicht.
- [44] P. M. J. Burgers, F. Eckstein, *Tetrahedron Lett.* 1978, 3835.
- [45] J. F. Marlier, S. J. Benkovic, *Tetrahedron Lett.* 21 (1980) 1121.
- [46] B. Uznanski, W. Niewiarowski, W. J. Stec, *Tetrahedron Lett.* 23 (1982) 4289.
- [47] B. A. Connolly, B. Uznanski, F. Eckstein, unveröffentlicht.
- [48] R. D. Sammons, P. A. Frey, *J. Biol. Chem.* 257 (1982) 1138.
- [49] B. A. Connolly, H. H. Füldner, F. Eckstein, *J. Biol. Chem.* 257 (1982) 3382.
- [50] G. Lowe, G. Tansley, P. M. Cullis, *J. Chem. Soc. Chem. Commun.* 1982, 595.
- [51] R. D. Sammons, H.-T. Ho, P. A. Frey, *J. Am. Chem. Soc.* 104 (1982) 5841.
- [52] T. S. Leyh, R. D. Sammons, P. A. Frey, G. H. Reed, *J. Biol. Chem.* 257 (1982) 15047.
- [53] M. D. Tsai, K. Bruzik in L. J. Berliner, J. Reuben: *Biological Magnetic Resonance*, Vol. 5, Plenum, New York 1983.
- [54] M. D. Tsai, *Methods Enzymol.* 87 (1982) 235.
- [55] J. A. Gerlt, P. C. Demon, S. Mehdi, *J. Am. Chem. Soc.* 104 (1982) 2848.
- [56] P. M. J. Burgers, F. Eckstein, *J. Biol. Chem.* 254 (1979) 6889.
- [57] R. S. Brody, P. A. Frey, *Biochemistry* 20 (1981) 1245.
- [58] R. S. Brody, S. Adler, P. Modrich, W. J. Stec, Z. J. Leznikowski, P. A. Frey, *Biochemistry* 21 (1982) 2570.
- [59] G. Lowe, B. V. L. Potter, B. S. Sproat, W. E. Hull, *J. Chem. Soc. Chem. Commun.* 1979, 733.
- [60] M. Cohn, A. Hu, *J. Am. Chem. Soc.* 102 (1980) 913.
- [61] B. V. L. Potter, P. J. Romaniuk, F. Eckstein, *J. Biol. Chem.* 258 (1983) 1758.
- [62] M. D. Tsai, T. T. Chang, *J. Am. Chem. Soc.* 102 (1980) 5416.
- [63] S. L. Buchwald, P. E. Hansen, A. Hassett, J. R. Knowles, *Methods Enzymol.* 87 (1982) 279.
- [64] G. Lowe, P. M. Cullis, R. L. Jarvest, B. V. L. Potter, B. S. Sproat, *Philos. Trans. R. Soc. London B* 293 (1981) 75.
- [65] J. A. Gerlt, J. A. Coderre, *J. Am. Chem. Soc.* 102 (1980) 4531.
- [66] S. Mehdi, J. A. Gerlt, *J. Am. Chem. Soc.* 103 (1981) 7018.
- [67] F. H. Westheimer, *Acc. Chem. Res.* 1 (1968) 70.
- [68] F. H. Westheimer in A. De Mayo: *Rearrangements in Ground and Excited States*, Vol. 2, Academic Press, New York 1980, S. 229.
- [69] A. Włodawer, R. Bott, L. Sjölin, *J. Biol. Chem.* 257 (1982) 1325.
- [70] F. A. Cotton, E. E. Hazen, M. J. Legg, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 76 (1979) 2551.
- [71] D. A. Usher, D. J. Richardson, F. Eckstein, *Nature* 228 (1970) 663.
- [72] S. Mehdi, J. A. Gerlt, *J. Am. Chem. Soc.* 104 (1982) 3223.
- [73] M. Cohn, *Acc. Chem. Res.* 15 (1982) 326.
- [74] W. W. Cleland, *Methods Enzymol.* 87 (1982) 159.
- [75] J. J. Villafranca, *Methods Enzymol.* 87 (1982) 180.
- [76] P. M. J. Burgers, F. Eckstein, *J. Biol. Chem.* 255 (1980) 8229.
- [77] M. Cohn, N. Shih, J. Nick, *J. Biol. Chem.* 257 (1982) 7646.
- [78] V. W. Armstrong, D. Yee, F. Eckstein, *Biochemistry* 18 (1979) 4120.
- [79] B. A. Connolly, F. Eckstein, *J. Biol. Chem.* 256 (1981) 9450.
- [80] E. K. Jaffe, M. Cohn, *J. Biol. Chem.* 254 (1979) 10839.
- [81] D. Dunaway-Mariano, W. W. Cleland, *Biochemistry* 19 (1980) 1506.
- [82] A. G. Tomasselli, S. H. Noda, *Fed. Proc. Fed. Am. Soc. Exp. Biol.* 40 (1981) 1864.
- [83] G. H. Reed, T. S. Leyh, *Biochemistry* 19 (1980) 5472.
- [84] M. R. Webb, D. E. Ash, T. S. Leyh, D. R. Trentham, G. H. Reed, *J. Biol. Chem.* 257 (1982) 3068.
- [85] H. P. Vosberg, F. Eckstein, *Biochemistry* 16 (1977) 3633.
- [86] T. A. Kunkel, F. Eckstein, A. S. Mildvan, R. M. Koplitz, L. Loeb, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 78 (1981) 6734.
- [87] F. Eckstein, T. Jovin, unveröffentlicht.
- [88] S. Adler, R. S. Brody, P. A. Frey, P. Modrich, unveröffentlicht.
- [89] S. Putney, S. Benkovic, P. Schimmel, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 78 (1981) 7350.
- [90] H. P. Vosberg, F. Eckstein, *J. Biol. Chem.* 257 (1982) 6595.
- [91] A. Kornberg: *DNA-Replication*, W. H. Freeman, San Francisco 1980.
- [92] D. Shortle, P. Grisafi, S. J. Benkovic, D. Botstein, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 79 (1982) 1588.
- [93] I. Y.-C. Sun, V. G. Allfrey, *J. Biol. Chem.* 257 (1982) 1347.
- [94] I. Y.-C. Sun, V. G. Allfrey, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 79 (1982) 4589.
- [95] F. Eckstein, H. Gindl, *Eur. J. Biochem.* 13 (1970) 558.
- [96] F. Eckstein, K. H. Scheit in G. L. Cantoni, D. R. Davies: *Procedures in Nucleic Acid Research*, Vol. 2, Harper & Row, New York 1971, S. 665.
- [97] F. Eckstein, H. Sternbach, F. von der Haar, *Biochemistry* 16 (1977) 3429.
- [98] D. J. Szalda, F. Eckstein, H. Sternbach, S. J. Lippard, *J. Inorg. Biochem.* 11 (1979) 279.
- [99] P. M. J. Burgers, F. Eckstein, *Biochemistry* 18 (1979) 450.
- [100] M. M. Smith, A. E. Reeve, R. C. C. Huang, *Cell* 15 (1978) 615.
- [101] I. Y.-C. Sun, V. G. Allfrey, *J. Biol. Chem.* 255 (1980) 742.
- [102] R. A. Hipskind, R. H. Reeder, *J. Biol. Chem.* 255 (1980) 7896.
- [103] G. J. Ide, *Biochemistry* 20 (1981) 2633.
- [104] E. W. Benz, R. M. Wydro, B. Nadel-Ginard, D. Dina, *Nature* 288 (1980) 665.
- [105] D. Bunick, R. Weinmann, *Biochim. Biophys. Acta* 610 (1980) 331.
- [106] S. I. Oskuski, *FEBS Lett.* 143 (1982) 119.
- [107] M. R. Stallcup, J. C. Ring, D. S. Ucker, K. Yamamoto, *Cold Spring Harbor Conf. Cell Proliferation* 7 (1979) 1.
- [108] S. Silverman, O. Schmidt, D. Söll, B. Hovemann, *J. Biol. Chem.* 254 (1979) 10290.
- [109] M. R. Stallcup, L. D. Washington, *J. Biol. Chem.* 258 (1983) 2802.
- [110] L. D. Washington, M. R. Stallcup, *Nucleic Acids Res.* 10 (1982) 8311.
- [111] W. R. Beltz, K. J. O'Brien, *Fed. Proc. Fed. Am. Soc. Exp. Biol.* 40 (1981) 1849.
- [112] P. Greengard, *Science* 199 (1978) 146.
- [113] P. Cohen, *Nature* 296 (1982) 613.
- [114] D. Gratecos, E. J. Fischer, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 58 (1974) 960.
- [115] J. Kendrick-Jones, W. Lehman, A. G. Szent-Györgyi, *J. Mol. Biol.* 54 (1970) 313.
- [116] P. E. Hoar, W. G. L. Kerrick, P. S. Cassidy, *Science* 204 (1979) 503.
- [117] W. G. L. Kerrick, P. E. Hoar, *Nature* 292 (1981) 253.
- [118] P. S. Cassidy, P. E. Hoar, W. G. L. Kerrick, *J. Biol. Chem.* 254 (1979) 11148.
- [119] J. M. F. Sherry, A. Gorecka, M. O. Aksoy, R. Dabrowska, D. J. Hartshorne, *Biochemistry* 17 (1978) 4411.
- [120] R. Cooke, K. Franks, J. T. Stull, *FEBS Lett.* 144 (1982) 33.
- [121] M. D. Pato, R. S. Adelstein, *J. Biol. Chem.* 255 (1980) 6535.

- [122] N. K. Tonks, A. Kearns, P. J. Randle, *Eur. J. Biochem.* 122 (1982) 549.
- [123] D. Cassel, L. Glaser, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 79 (1982) 2231.
- [124] F. Madriaco, T. Urumow, O. H. Wieland, *FEBS Lett.* 149 (1982) 96.
- [125] J. Avruch, R. A. Nemenuoff, P. J. Blackshear, M. W. Pierce, R. Osathanondh, *J. Biol. Chem.* 257 (1982) 15162.
- [126] A. Rephaeli, S. M. Parsons, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 79 (1982) 5783.
- [127] I. Y.-C. Sun, E. M. Johnson, V. G. Allfrey, *J. Biol. Chem.* 255 (1980) 742.
- [128] D. L. Purich, B. J. Terry, H. D. White, B. A. Coughlin, T. L. Karr, D. Kristofferson, *Cold Spring Harbor Conf. Cell Proliferation* 8 (1981) 1143.
- [129] J. E. Churdrich, C. Wu, *J. Biol. Chem.* 257 (1982) 12136.
- [130] R. G. Yount, *Adv. Enzymol. Rel. Areas Mol. Biol.* 43 (1975) 1.
- [131] C. R. Bagshaw, J. F. Eccleston, D. R. Trentham, D. R. Yates, R. S. Goody, *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.* 37 (1972) 127.
- [132] M. A. Greeves, D. R. Trentham, *Biochemistry* 21 (1982) 2782.
- [133] C. M. Radding, *Cell* 25 (1981) 3.
- [134] S. Gottesman, *Cell* 23 (1981) 1.
- [135] K. McEntee, G. M. Weinstock, I. R. Lehman, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 76 (1979) 2615.
- [136] G. M. Weinstock, K. McEntee, I. R. Lehman, *J. Biol. Chem.* 256 (1981) 8850.
- [137] K. McEntee, G. M. Weinstock, I. R. Lehman, *J. Biol. Chem.* 256 (1981) 8835.
- [138] M. M. Cox, I. R. Lehman, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 78 (1981) 3433.
- [139] A. Starak, E. Di Capura, *Nature* 299 (1982) 185.
- [140] K. Dunn, S. Chrysogelos, J. Griffith, *Cell* 28 (1982) 757.
- [141] J. Flory, C. M. Radding, *Cell* 28 (1982) 747.
- [142] R. P. Cunningham, T. Shibata, C. DasGupta, C. M. Radding, *Nature* 281 (1979) 191.
- [143] N. Craig, J. W. Roberts, *J. Biol. Chem.* 256 (1981) 8039.
- [144] G. M. Weinstock, K. McEntee, *J. Biol. Chem.* 256 (1981) 10883.
- [145] J. W. Little, D. W. Mount, C. R. Yanish-Pesson, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 78 (1981) 4199.
- [146] E. Phizicky, J. W. Roberts, *J. Mol. Biol.* 139 (1980) 319.
- [147] R. T. Sauer, M. J. Ross, M. Ptashne, *J. Biol. Chem.* 257 (1982) 4458.
- [148] P. M. J. Burgers, A. Kornberg, *J. Biol. Chem.* 257 (1982) 11474.
- [149] P. M. J. Burgers, A. Kornberg, *J. Biol. Chem.*, unveröffentlicht.
- [150] R. C. Thompson, A. M. Karim, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 79 (1982) 4922.
- [151] J. Ketelaar, H. Gersmann, K. Koopmanns, *Recl. Trav. Chim. Pays-Bas* 71 (1952) 1253.
- [152] E. M. Ross, A. G. Gilman, *Annu. Rev. Biochem.* 49 (1980) 533.
- [153] Th. Pfeuffer, E. J. M. Helmreich, *J. Biol. Chem.* 250 (1975) 867.
- [154] D. Cassel, Z. Selinger, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 77 (1977) 868.
- [155] J. K. Northrup, M. D. Smigel, A. Gilman, *J. Biol. Chem.* 257 (1982) 11416.
- [156] F. Eckstein, D. Cassel, H. Lefkowitz, M. Lowe, Z. Selinger, *J. Biol. Chem.* 254 (1979) 9829.
- [157] D. Cassel, F. Eckstein, M. Lowe, Z. Selinger, *J. Biol. Chem.* 254 (1979) 9835.
- [158] M. Svoboda, J. Furnelle, F. Eckstein, J. Christophe, *FEBS Lett.* 109 (1980) 275.
- [159] E. Ezra, Y. Salomon, *J. Biol. Chem.* 256 (1981) 5377.
- [160] T. H. Hudson, J. F. Roeker, G. L. Johnson, *J. Biol. Chem.* 256 (1981) 1459.
- [161] M. E. Abood, J. B. Hurley, M.-C. Pappone, H. R. Bourne, L. Stryer, *J. Biol. Chem.* 257 (1982) 10540.
- [162] A. Fein, D. W. Corson, *Science* 212 (1981) 555.
- [163] H. Kühn, N. Bennet, M. Michel-Villaz, M. Chabre, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 78 (1981) 6873.
- [164] N. Bennet, *Eur. J. Biochem.* 123 (1982) 133.
- [165] D. Emeis, H. Kühn, J. Reichert, K. P. Hofmann, *FEBS Lett.* 143 (1982) 29.
- [166] T. S. Yagura, J. P. Miller, *Biochemistry* 20 (1981) 879.
- [167] C. A. O'Brian, S. O. Rocznak, H. N. Bramson, J. Baraniak, W. J. Stec, E. T. Kaiser, *Biochemistry* 21 (1982) 4371.
- [168] R. J. W. de Witt, J. Hoppe, W. J. Stec, J. Baraniak, B. Jastorff, *Eur. J. Biochem.* 122 (1982) 95.
- [169] A. M. Gronenburg, G. M. Clore, *Biochemistry* 21 (1982) 4040.
- [170] J. Krakow, persönliche Mitteilung.
- [171] P. J. M. Van Haastert, B. Jastorff, J. E. Pinas, T. M. Konijn, *J. Bacteriol.* 149 (1982) 99.
- [172] F. Eckstein, S. Eimerl, M. Schramm, *FEBS Lett.* 64 (1976) 92.
- [173] E. E. Nifant'ev, D. A. Predvoditelev, H. H. Arlakon, *Zh. Org. Khim.* 14 (1978) 63.
- [174] I. Varilenko, B. De Kruijff, A. J. Verkleij, *Biochim. Biophys. Acta* 685 (1982) 144.
- [175] K. Bruzik, S. M. Gupta, M.-D. Tsai, *J. Am. Chem. Soc.* 104 (1982) 4682.
- [176] G. A. Orr, C. F. Brewer, G. Heney, *Biochemistry* 21 (1982) 3202.
- [177] K. Bruzik, R.-T. Jiang, M.-D. Tsai, *Biochemistry*, im Druck.
- [178] G. A. Orr, J. W. Hammelburger, G. Heney, persönliche Mitteilung.
- [179] W. W. Cleland, *Acc. Chem. Res.* 8 (1975) 145.
- [180] F. Eckstein, H. H. Schulz, H. Rüterjans, W. Haar, W. Maurer, *Biochemistry* 11 (1972) 3507.
- [181] J. A. Gerlt, W. H. Y. Wan, *Biochemistry* 18 (1979) 4630.
- [182] J. F. Marlier, F. R. Bryant, S. J. Benkovic, *Biochemistry* 20 (1981) 2212.
- [183] F. Eckstein, H. Sternbach, F. von der Haar, *Biochemistry* 16 (1977) 3429.
- [184] F. R. Bryant, S. J. Benkovic, *Biochemistry* 21 (1982) 5877.
- [185] K.-F. R. Sheu, J. P. Richard, P. A. Frey, *Biochemistry* 18 (1979) 5548.
- [186] J. A. Gerlt, J. A. Coderre, M. S. Wolin, *J. Biol. Chem.* 255 (1980) 331.
- [187] F. Eckstein, P. J. Romaniuk, W. Heideman, D. R. Storm, *J. Biol. Chem.* 256 (1981) 9118.
- [188] M.-D. Tsai, *Biochemistry* 18 (1979) 1468.
- [189] J. P. Richard, M. C. Carr, D. H. Ives, P. A. Frey, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 94 (1980) 1052.
- [190] J. P. Richard, D. C. Prasher, D. H. Ives, P. A. Frey, *J. Biol. Chem.* 254 (1979) 4339.
- [191] M. R. Webb, D. R. Trentham, *J. Biol. Chem.* 255 (1980) 8629.
- [192] M. R. Webb, C. Grubmeyer, H. S. Penefsky, D. R. Trentham, *J. Biol. Chem.* 255 (1980) 11637.
- [193] M. R. Webb, D. R. Trentham, *J. Biol. Chem.* 256 (1981) 4884.
- [194] M. R. Webb, J. F. Eccleston, *J. Biol. Chem.* 256 (1981) 7734.
- [195] J. F. Eccleston, M. R. Webb, *J. Biol. Chem.* 257 (1982) 5046.
- [196] M. R. Webb, D. R. Trentham, *J. Biol. Chem.* 255 (1980) 1775.
- [197] P. D. Senter, F. Eckstein, Y. Kagawa, unveröffentlicht.
- [198] G. A. Orr, J. Simon, S. R. Jones, G. J. Chin, J. R. Knowles, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 75 (1978) 2230.
- [199] W. A. Blättler, J. R. Knowles, *Biochemistry* 18 (1979) 3927.
- [200] D. H. Pliura, D. Schomburg, J. P. Richard, P. A. Frey, J. R. Knowles, *Biochemistry* 19 (1980) 325.
- [201] G. Lowe, B. V. L. Potter, *Biochem. J.* 199 (1981) 227.
- [202] R. L. Jarvest, G. Lowe, *Biochem. J.* 199 (1981) 273.
- [203] F. R. Bryant, S. J. Benkovic, D. Sammons, P. A. Frey, *J. Biol. Chem.* 256 (1981) 5965.
- [204] P. M. J. Burgers, F. Eckstein, D. H. Hunneman, J. Baraniak, R. W. Kinas, K. Lesiak, W. J. Stec, *J. Biol. Chem.* 254 (1979) 9959.
- [205] R. L. Jarvest, G. Lowe, J. Baraniak, W. J. Stec, *Biochem. J.* 203 (1982) 461.
- [206] P. M. Cullis, R. L. Jarvest, G. Lowe, B. V. L. Potter, *J. Chem. Soc. Chem. Commun.* 1981, 245.
- [207] J. A. Coderre, S. Mehdi, J. A. Gerlt, *J. Am. Chem. Soc.* 103 (1981) 1872.
- [208] P. M. J. Burgers, F. Eckstein, D. H. Hunneman, *J. Biol. Chem.* 254 (1979) 7476.
- [209] R. L. Jarvest, G. Lowe, *Biochem. J.* 199 (1981) 447.
- [210] S. Mehdi, J. A. Gerlt, *J. Biol. Chem.* 256 (1981) 12164.
- [211] S. P. Langdon, G. Lowe, *Nature* 281 (1979) 320.
- [212] G. Lowe, B. S. Sprout, G. Tansley, *Eur. J. Biochem.* 130 (1983) 341.
- [213] S. J. Jones, L. A. Kindman, J. R. Knowles, *Nature* 275 (1978) 564.
- [214] D. E. Hansen, J. R. Knowles, *J. Biol. Chem.* 256 (1981) 5967.
- [215] W. A. Blättler, J. R. Knowles, *Biochemistry* 19 (1980) 738.
- [216] M. K. Darby, I. P. Trayer, *Eur. J. Biochem.* 129 (1982) 555.
- [217] P. J. Romaniuk, F. Eckstein, *J. Biol. Chem.* 256 (1981) 7322.
- [218] B. A. Connolly, F. von der Haar, F. Eckstein, *J. Biol. Chem.* 255 (1980) 11301.
- [219] L. T. Smith, M. Cohn, *Biochemistry* 21 (1982) 1530.
- [220] D. W. Bolen, J. Stigelin, H. N. Bramson, E. T. Kaiser, *Biochemistry* 19 (1980) 1176.
- [221] R. P. Pillai, F. M. Rauschel, J. J. Villafranca, *Arch. Biochem. Biophys.* 199 (1980) 7.
- [222] F. M. Rauschel, P. M. Anderson, J. J. Villafranca, *J. Biol. Chem.* 253 (1978) 6627.
- [223] K. J. Gibson, R. L. Switzer, *J. Biol. Chem.* 255 (1980) 694.