

Tabelle 2. Stereoselektive Addition von Cerorganylen an ausgewählte Carbonylsubstrate.

| Carbonylverbindung | Reagens | de [%] [a] | Ausb. [%] |
|--------------------------|---|------------|-----------|
| 2-Methylcyclohexanon | MeLi | 63 | 74 |
| 2-Methylcyclohexanon | MeCeCl ₂ | 88 | 89 |
| 2-Methylcyclohexanon | MeCe(OCH ₂ Pr ₂) ₂ | 97 | 91 |
| 2-Methylcyclohexanon | Li[CeMe(OCH ₂ Pr ₂) ₃] | — | —[b] |
| 2-Methylcyclohexanon | nBuLi | 78 | 80 |
| 2-Methylcyclohexanon | nBuCeCl ₂ | 94 | 92 |
| 2-Methylcyclohexanon | nBuCe(OCH ₂ Pr ₂) ₂ | 98 | 88 |
| 4-tert-Butylcyclohexanon | MeLi | 24 | 50 |
| 4-tert-Butylcyclohexanon | MeCeCl ₂ | 36 | 93 |
| 4-tert-Butylcyclohexanon | Li[CeMe(OCH ₂ Pr ₂) ₃] | 68 | 88 |
| 2-Phenylpropionaldehyd | MeLi | 82 | 57 |
| 2-Phenylpropionaldehyd | MeCeCl ₂ | 84 | 85 |
| 2-Phenylpropionaldehyd | Li[CeMe(OCH ₂ Pr ₂) ₃] | 90 | 89 |

[a] Durch GC-Analyse bestimmt. [b] Addition fand nicht statt.

reoselektivität von 36 (MeCeCl₂) auf 68 % de (Li[CeMe(OCH₂Pr₂)₃]) festgestellt. Dessen Addition an 2-Phenylpropionaldehyd lieferte mit einer Diastereoselektivität von 90 % de den entsprechenden Alkohol. Demgegenüber führte die Verwendung von MeCeCl₂ (84 % de) oder MeLi (82 % de) zu deutlich geringeren Selektivitäten. Die Anwendung der neuen Organocerreatagentien in der Naturstoffsynthese, z. B. für die enantioselektive Synthese des antifungal wirksamen Chokols,^[10, 13] wird derzeit von uns untersucht.

Experimentelles

Alle Reaktionen wurden mit Schlenktechnik oder in einem Handschuhkasten unter striktem Sauerstoff- und Wasserausschluß durchgeführt.

Herstellung der Certrialkoxide: Nach Zugabe von 20 mL des jeweiligen Alkohols zu einer Lösung von 6.0 mmol Ce(O*i*Pr)₃ in 10 mL Benzol bei Raumtemperatur wurde der Ansatz 15 h unter Rückfluß erhitzt. Anschließend wurde das Reaktionsgemisch auf Raumtemperatur abgekühlt und das Lösungsmittel im Vakuum entfernt (20 °C, 0.005 Torr). Die Certrialkoxide wurden in Ausbeuten von 90–95 % isoliert.

Herstellung der Cerchloriddialkoxide: Zu einer Lösung der entsprechenden Certrialkoxide in 20 mL Benzol wurden bei Raumtemperatur 2.0 mmol Acetylchlorid tropfenweise zugegeben. Nach beendeter Zugabe fiel ein brauner Niederschlag aus. Zur Vervollständigung der Reaktion wurde 2 h unter Rückfluß erhitzt und nach Abkühlen auf Raumtemperatur die überstehende Lösung über eine Kanüle entfernt. Der Rückstand wurde im Vakuum getrocknet (20 °C, 0.005 Torr), und die Cerchloriddialkoxide wurden in Ausbeuten von 80–90 % isoliert.

Carbonyladditionen: Zu einer Lösung von 1.5 mmol der Cerverbindung in 5 mL Tetrahydrofuran wurden bei –78 °C 1.2 mmol Methylolithium (0.75 mL einer 1.6 M Lösung in Diethylether) tropfenweise zugegeben. Nach 1 h wurde 1.0 mmol der entsprechenden Carbonylkomponente langsam hinzugegeben und das Reaktionsgemisch weitere 30 min bei dieser Temperatur gerührt. Nach Zugabe von 10 mL einer gesättigten Ammoniumchloridlösung wurde zur Entfernung ausgefallener Salze über eine kurze Schicht Celite filtriert und mit Diethylether nachgewaschen. Die vereinigten organischen Phasen wurden über Magnesiumsulfat getrocknet, anschließend wurde das Solvens im Vakuum entfernt und der Rückstand an Kieselgel chromatographisch gereinigt.

Eingegangen am 5. Mai 1997 [Z 10422]

Stichwörter: Asymmetrisch-Synthese · Cer · Cycloalkanone · Lanthanoide · Ligandeneffekte

[1] a) G. A. Molander, *Chem. Rev.* **1992**, *92*, 29–68; b) T. Imamoto in *Comprehensive Organic Synthesis*, Vol. 1 (Hrsg.: B. M. Trost, I. Fleming, S. L. Schreiber), Pergamon, Oxford, **1991**, S. 231–250.

[2] F. A. Cotton, G. Wilkinson, *Anorganische Chemie*, 4. Aufl., VCH, Weinheim, **1982**.

[3] a) M. T. Reetz, *Organotitanium Reagents in Organic Synthesis*, Springer, Berlin, **1986**; b) M. T. Reetz, N. Harmat, R. Mahrwald, *Angew. Chem.* **1992**, *104*, 333–334; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1992**, *31*, 342–344; c) M. T. Reetz, H. Haning, S. Stanchev, *Tetrahedron Lett.* **1992**, *33*, 6963–6966; d) K. Chibale, N. Greeves, L. Lyford, J. E. Pease, *Tetrahedron: Asymmetry* **1993**, *4*, 2407–2410; e) N. Greeves, L. Lyford, J. E. Pease, *Tetrahedron Lett.* **1994**, *35*, 385–388; f) N. Greeves, J. E. Pease, M. C. Bowden, S. M. Brown, *ibid.* **1996**, *37*, 2675–2678; g) N. Greeves, J. E. Pease, *ibid.* **1996**, *37*, 5821–5824.

- [4] a) A. Lebrun, J. L. Namy, H. B. Kagan, *Tetrahedron Lett.* **1991**, *32*, 2355–2358; b) verbesserte Synthese von Ce(O*i*Pr)₃: P. Eckenberg, U. Groth, T. Köhler, *Liebigs Ann. Chem.* **1994**, 673–677.
- [5] In Analogie zur Synthese von Gd(OR)₃: R. C. Mehrotra, J. M. Batwara, *Inorg. Chem.* **1970**, *9*, 2505–2510.
- [6] In Analogie zur Synthese von ClSm(OR)₂: B. S. Sankhla, R. N. Kapoor, *Can. J. Chem.* **1966**, *44*, 2131–2137.
- [7] In Analogie zur Synthese von Ce[N(SiMe₃)₂]₃: D. C. Bradley, J. S. Ghora, F. A. Hart, *J. Chem. Soc. Dalton Trans.* **1973**, 1021–1023.
- [8] G. Quinkert, W.-D. Weber, U. Schwartz, H. Stark, H. Baier, G. Frank, G. Dürner, *Liebigs Ann. Chem.* **1981**, 2335–2371.
- [9] a) S. E. Denmark, J. P. Edwards, O. Nicaise, *J. Org. Chem.* **1993**, *58*, 569–578; b) W. J. Evans, J. D. Feldman, J. W. Ziller, *J. Am. Chem. Soc.* **1996**, *118*, 4581–4584.
- [10] a) E. A. Mash, *J. Org. Chem.* **1987**, *52*, 4143–4146; b) U. Groth, W. Halfbrodt, T. Köhler, P. Kreye, *Liebigs Ann. Chem.* **1994**, 885–890.
- [11] G. A. Molander, E. R. Burkhardt, P. Weinig, *J. Org. Chem.* **1990**, *55*, 4990–4991.
- [12] 2-Methyl-3-vinylcyclopentanon wurde als untrennbares Gemisch der *cis/trans*-Isomere im Verhältnis 7:93 erhalten. Aus diesem Grunde resultieren 5–7 % der Alkohole aus einem β-Angriff der Organocererverbindung an die Carbonylgruppe des Ketons *cis*-1, siehe Lit. [10].
- [13] E. Urban, G. Knühl, G. Helmchen, *Tetrahedron* **1995**, *52*, 13031–13038.

Molekulare Erkennung eines Minimalmodells der aminoacylierten tRNA durch den Elongationsfaktor Tu der bakteriellen Proteinbiosynthese**

Stefan Limmer,* Martin Vogtherr, Barbara Nawrot, Rainer Hillenbrand und Mathias Sprinzl

Im Verlauf der Proteinbiosynthese muß die mit der jeweiligen Aminosäure korrekt aminoacylierte („beladene“) Transfer-RNA (aa-tRNA) zum Ribosom transportiert werden. Diese Aufgabe übernimmt in der bakteriellen Proteinbiosynthese der Elongationsfaktor Tu (EF-Tu), der einerseits alle aa-tRNAs erkennen, andererseits unbeladene Elongator-tRNAs und auch die Initiator-tRNA zurückweisen muß (in Bakterien ist die Initiator-tRNA stets Formylmethionyl-(fMet)-tRNA, die an der Aminogruppe formyliert ist und mit dem Initiationsfaktor IF-2 wechselwirkt). Somit kann die spezifische Erkennung der aa-tRNAs weder von den Unterschieden in der Sequenz und der Tertiärstruktur der aminosäurespezifischen tRNAs noch von der Art der gebundenen Aminosäure selbst abhängen.

Der allen aa-tRNAs gemeinsame Bereich umfaßt das ubiquitäre CCA-Ende der tRNA und die Esterbindung an der 2'- oder 3'-OH-Gruppe der Ribose des terminalen Adenosins-76.^[11] In Lösung stehen dabei die beiden an der 2'- bzw. 3'-Position veresterten Isomere im Gleichgewicht.^[2] Es wurde bereits gezeigt,^[3] daß Minihelices mit mindestens zehn Basenpaaren und einem aminoacylierten, einzelsträngigen (A)CCA-Ende recht

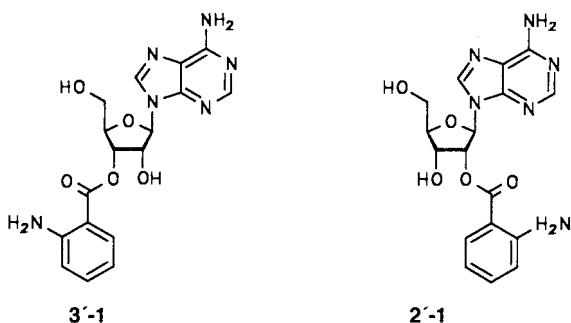
[*] Priv.-Doz. Dr. S. Limmer, Dipl.-Chem. M. Vogtherr, Dipl.-Biol. R. Hillenbrand, Prof. Dr. M. Sprinzl, Laboratorium für Biochemie der Universität D-95440 Bayreuth Telefax: Int. + 921/55-2432 E-mail: btc996@btc9x1.che.uni-bayreuth.de

Dr. B. Nawrot
Centre of Molecular and Macromolecular Studies
Department of Bioorganic Chemistry
Polish Academy of Sciences
PL-90-363 Łódź (Polen)

[**] Diese Arbeit wurde von der Deutschen Forschungsgemeinschaft gefördert. Norbert Grillenbeck danken wir für die Präparation des EF-Tu und Karol Szkaradkiewicz für die Bereitstellung von IF-2.

stark an EF-Tu·GTP binden. Die kleinste Einheit, die als Minimalmodell der aa-tRNA fungieren kann, besteht aus dem terminalen Adenosinrest und einer an diesen veresterten Aminosäure.^[2] In der Tat können solche Aminoacyladenosine erfolgreich mit einem spezifischen Inhibitor des EF-Tu, dem *N*-Tosyl-L-Phenylalanylchloromethan, um die Bindungsstelle der aa-tRNA konkurrieren.^[4]

Die Esterbindung zwischen Ribose und einer Aminosäure ist unter den für EF-Tu optimalen Bedingungen ($\text{pH} = 7.5$) nur sehr begrenzt stabil. Wir haben daher als hydrolysestabileres Aminosäureanalogen die Anthranilsäure verwendet, deren Eignung zur Bindung an den EF-Tu am Beispiel der mit Anthranilsäure beladenen Hefe-tRNA^{Phe} demonstriert wurde.^[5] Die bei Anthraniloyladenosinen **1**^[6] gegenüber entsprechenden Aminoacyladenosinen^[2] drastisch verringerte Transacylierungsrate der Anthranilsäure zwischen 2'- und 3'-Ribosepositionen korreliert mit der erheblich erhöhten Hydrolysestabilität der Esterbindung. *A priori* kann aufgrund des Fehlens wichtiger, mit



dem EF-Tu in seiner aktiven, GTP-gebundenen Form wechselwirkender Bereiche der aa-tRNA^[7] nur eine drastisch verringerte Affinität von **1** zum EF-Tu erwartet werden. Dies sollte zum auf der NMR-Zeitskala schnellen Austausch von **1** zwischen freier und gebundener Form führen.^[8, 9] Dabei sind die gemessenen Werte von chemischer Verschiebung und Linienbreite das gewichtete Mittel der entsprechenden Größen von **1** im freien und gebundenen Zustand. Die Linienbreite der Signale des kleinen Ligandenmoleküls sollte dabei mit steigender relativer Proteinkonzentration stetig zunehmen. Wegen des viel höheren Molekulargewichts des Proteins (ca. 45 kDa) und der deshalb deutlich schnelleren T_2 -Relaxation liefert das Protein im ^1H -NMR-Spektrum des Komplexes lediglich einen mehr oder weniger stark ausgeprägten, wenig strukturierten Untergrund. In Abbildung 1 sind die ^1H -NMR-Spektren der Komplexe von EF-Tu·GTP aus dem Eubakterium *Thermus thermophilus* mit **1** in unterschiedlichen Verhältnissen dargestellt. Wie für schnellen Austausch (d.h. schwache Bindung) erwartet, steigt die Linienbreite mit Erhöhung des relativen Proteinanteils von 1:20 auf 1:2.5 merklich an. Die Signale des 3'-Isomers werden deutlich stärker verbreitert als die des 2'-Isomers. Dies lässt auf eine bevorzugte Bindung des 3'-Isomers schließen und bestätigt die Ergebnisse von Experimenten,^[10] aus denen eine nahezu ausschließliche Bindung des 3'-Isomers von aa-tRNA an EF-Tu abgeleitet wurde. Dagegen wurde mit aa-tRNA-Varianten, bei denen das terminale Adenosin durch 3'- oder 2'-Desoxyadenosin ersetzt wurde, eine abgeschwächte Wechselwirkung beider Spezies mit EF-Tu·GTP festgestellt.^[11]

Zwar werden in Anwesenheit von EF-Tu alle Linien des ^1H -NMR-Spektrums von **1** verbreitert (siehe Tabelle 1 und Abb. 1), aber nicht in gleichem Maße; so sind die 2'- und 3'-Ribosesignale des 3'-Isomers besonders stark verbreitert. Aus diesen Unter-

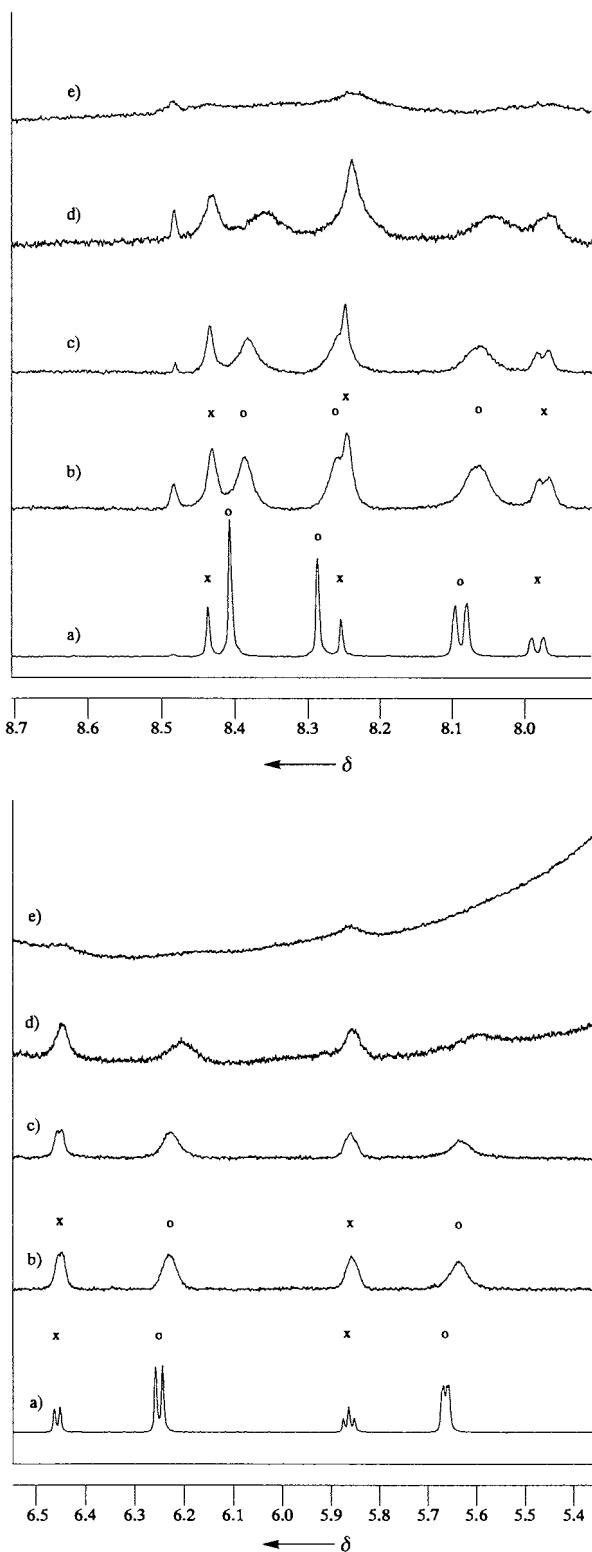


Abb. 1. Teilbereiche der ^1H -NMR-Spektren mit Aren- (oben) und Ribose-1', -2' und -3'-Signalen (unten) von 3'(2')-Anthraniloyladenosin **1** in $\text{D}_2\text{O}/[\text{D}_4]\text{Methanol}$ 7/1 bei 281 K. Konzentration von **1** 1 mM, Konzentration von EF-Tu·GTP a) 0.00, b) 0.05, c) 0.08, d) 0.18, e) 0.40 mM. Die Signale der 3'- und 2'-Isomere sind durch o bzw. x gekennzeichnet (zur Zuordnung siehe Tabelle 1).

schieden kann auf die ligandenseitigen Kontaktstellen zwischen dem Liganden und dem Protein geschlossen werden, da für die Molekülteile des Liganden mit den intensivsten Kontakten zum Protein auch die größte Veränderung im Relaxationsverhalten

Tabelle 1: Linienbreiten [Hz][a] und chemische Verschiebungen [ppm] (in Klammern) der ^1H -NMR-Spektren von freiem und an EF-Tu·GTP[b] gebundenem **1**.

| Proton | 3'-Isomer | | 2'-Isomer | |
|--------|--------------|--------------|--------------|--------------|
| | frei | gebunden | frei | gebunden |
| H8 | 2.6 (8.409) | 28.0 (8.356) | 2.6 (8.437) | 13.0 (8.432) |
| H2 | 2.6 (8.292) | (8.240)[c] | 2.5 (8.258) | (8.240)[c] |
| H1' | 10.8 (6.257) | 33.0 (6.207) | 9.9 (6.442) | 17.3 (6.446) |
| H2' | 14.7 (5.156) | 47.0 (5.121) | 12.9 (5.870) | 19.3 (5.848) |
| H3' | 10.8 (5.598) | 53.0 (5.598) | 11.4 (4.817) | 16.5 (4.812) |

[a] Linienbreiten in halber Höhe, über die Multiplettstruktur gemessen. [b] 1 mM **1**, 0.18 mM EF-Tu·GTP in Boratpuffer pH 7.5, $\text{D}_2\text{O}/[\text{D}_4]\text{Methanol}$ 7/1, 281 K.
[c] Starke Überlappung der Signale beider Isomere.

durch zusätzliche Relaxationswege über Protonen des Proteins resultiert. Eine solche unterschiedliche Linienverbreiterung ist häufig ein Charakteristikum einer spezifischen Ligand-Protein-Wechselwirkung.^[14]

Bemerkenswerterweise verschiebt sich das Integralverhältnis der Signale von 3'-**1** und 2'-**1** von ca. 2:1 bei freiem **1** mit steigender Proteinkonzentration in Richtung 1:1. Mit steigendem Anteil von gebundenem **1**, das ja vorzugsweise als 3'-Isomer bindet, nimmt also der relative Anteil des 2'-Isomers zu. Derselbe Effekt tritt auf, wenn das Bindungsgleichgewicht bei konstanten Konzentrationen von Protein und Ligand durch Variation der Temperatur verschoben wird. Mit 1 mM **1** und 0.18 mM EF-Tu·GTP steigt das Verhältnis z. B. von ca. 1:1 (3':2') bei 281 K auf ca. 1.8:1 bei 307 K an. Allein durch die bevorzugte Bindung des 3'-Isomers kann dieses Verhalten nicht erklärt werden. Eine mögliche Erklärung ist, daß der EF-Tu bei Bindung von **1** die Transacylierung relativ zu der von freiem **1** beschleunigt. Da das Protein die beiden Isomere verschieden stark bindet, stellt sich ein Gleichgewicht ein, das die unterschiedliche Affinität der beiden Isomere zum Protein reflektiert und zu einer relativen Anreicherung des 2'-Isomers führt.

Die Linienverbreiterungen sind, anders als bei der vollständigen aa-tRNA, unabhängig vom gebundenen Nucleotid (GTP, GDP, GPPNHP).^[12] Die mit der GTP-Bindung verknüpfte Umlagerung der EF-Tu-Struktur^[7, 16a, b] ist die Voraussetzung für die Bindung der tRNA in einem bei der Umlagerung gebildeten Spalt zwischen den Domänen I und II, in dem stabilisierende Wechselwirkungen zwischen EF-Tu und tRNA möglich sind. Natürlich sind diese Wechselwirkungen mit dem kleinen Liganden **1** nicht möglich – eine mögliche Erklärung sowohl für die verringerte Affinität als auch für das Fehlen eines Unterschiedes in der Bindung an EF-Tu in GTP/GPPNHP- oder GDP-komplexierter Form. Für die spezifische Interaktion des terminalen A76 ist offenbar die von der Art des gebundenen Nucleotids abhängige relative Orientierung der drei Domänen des EF-Tu nur von untergeordneter Bedeutung.

Zur Überprüfung der Spezifität der Komplexbildung wurden Kontrollexperimente mit strukturell ähnlichen niedermolekularen Verbindungen durchgeführt: Beim Antibioticum Puromycin **2** ist die Esterbindung zur Aminosäure durch eine Amidbindung

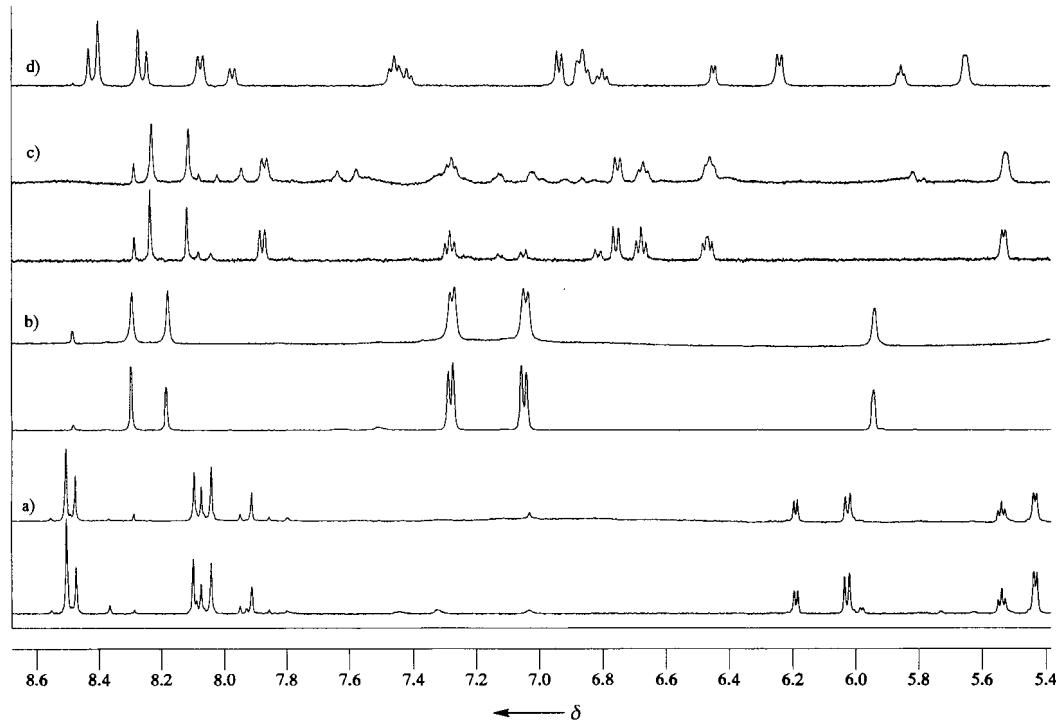
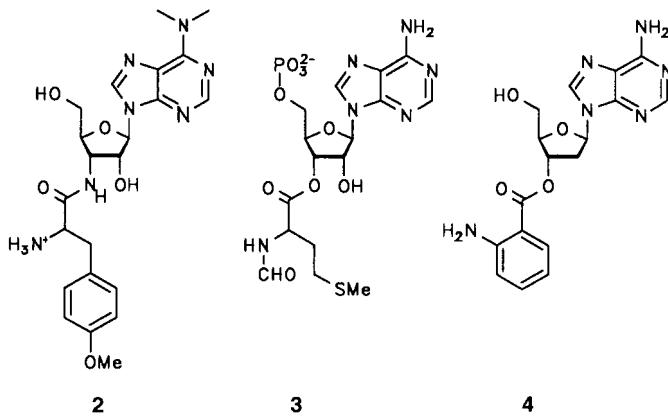


Abb. 2. Teilbereiche der ^1H -NMR-Spektren mit den Aren- und Ribose-1', -2'- und -3'-Signalen bei 281 K. a) fMet-AMP **3** frei (unten) und mit 0.08 mM EF-Tu·GTP (oben), jeweils in D_2O . b) Puromycin **2** frei (unten) und mit 0.08 mM EF-Tu·GTP (oben), jeweils in $\text{D}_2\text{O}/[\text{D}_4]\text{Methanol}$ 7/1. c) 3'-Anthraniloyl-2'-Desoxyadenosin **4** frei (unten) und mit 0.08 mM EF-Tu·GTP (oben), jeweils in $\text{D}_2\text{O}/[\text{D}_6]\text{DMSO}$ 9/1. d) **1** mit 0.08 mM IF-2 in $\text{D}_2\text{O}/[\text{D}_4]\text{Methanol}$ 7/1. Konzentrationen der Liganden jeweils 1 mM.

ersetzt; Formylmethionyl-AMP **3** ist an der Aminogruppe der Aminosäure formyliert. Sowohl bei **2** als auch bei **3** wurde unter sonst gleichen Bedingungen (1 mM Ligand, 0.08 mM EF-Tu·GTP, 281 K) in den ^1H -NMR-Spektren nur eine vernachlässigbare Linienverbreiterung gemessen (Abb. 2a und b). Offenbar binden diese Moleküle nicht an das Protein; bei **3** wird keines der beiden möglichen Isomere (**2'** und **3'**) gebunden. Die höhere Affinität von **3'-1** führt zu der Frage, ob für die Erkennung und Bindung nur die veresterte **3'-OH**-Gruppe vorhanden sein muß, oder ob darüber hinaus die **2'-OH**-Gruppe und evtl. auch die damit verbundene Möglichkeit zur Transacylierung von Bedeutung sind. Hierzu wurde die Bindung des **2'-Desoxy**-Derivats **4** untersucht. Unter wiederum gleichen Bedingungen sind auch hier die Linien in den ^1H -NMR-Spektren nur geringfügig verbreitert (Abb. 2c), was auf eine deutlich schwächere Bindung gegenüber der von **3'-1** hinweist. Daher muß auf eine wichtige Rolle der **2'-OH**-Gruppe sowohl in **1** als auch im terminalen Adenosin der aa-tRNA geschlossen werden. Dies wird durch eine Kristallstrukturanalyse^[7] gestützt, nach der sich eine Wasserstoffbrückenbindung zum konservierten Glutamat 271 ausbilden kann. In der Tat wird für eine EF-Tu-Variante, bei der dieses Glutamat gegen Aspartat ausgetauscht ist (E271D), eine drastisch verringerte aa-tRNA-Bindung festgestellt. Die ^1H -NMR-Signale (Abb. 3) von **1** werden in Anwesenheit der Mutante E271D merklich weniger verbreitert als mit dem Wildtyp-

Initiationsfaktor IF-2 untersucht (wiederum 1 mM Ligand, 0.08 mM Protein; Abb. 2d). Auch hier gibt es keine Veränderung des Spektrums gegenüber dem von freiem **1** (Abb. 1a), was auf eine vernachlässigungswerte Wechselwirkung zwischen **1** und IF-2 schließen läßt.

Die Struktur von freiem **1** wurde bereits früher analysiert,^[6] die des an EF-Tu gebundenen **1** kann durch Transfer-NOE(TrNOE)-Messungen bestimmt werden.^[13, 14] Dabei wird die Tatsache genutzt, daß sich Vorzeichen und Größe des NOE bei einem kleinen Molekül wie **1** (schwach positiv) und einem Protein-Ligand-Komplex (stark negativ) drastisch unterscheiden.^[14, 15] Tauscht der in großem Überschuß vorhandene Ligand schnell zwischen enzymgebundener und freier Form aus, so wird der NOE des gebundenen Liganden auf den freien übertragen und überwiegt dessen NOE bei weitem. Die Messung des TrNOE ermöglicht somit eine selektive Strukturbestimmung des gebundenen Liganden. Für die Konformationsanalyse wurde EF-Tu mit dem nur extrem langsam hydrolysbaren GTP-Analogen GPPNHP komplexiert, um mögliche Auswirkungen der GTP-Hydrolyse und der damit verbundenen konformativen Änderungen^[7, 16] während der Messung auszuschließen. Aus technischen Gründen wurde bei 298 K gemessen. Im NOESY-Spektrum (1 mM Ligand, 0.05 mM EF-Tu) treten stark positive Kreuzpeaks auf,^[8, 14] die aufgrund der bevorzugten Bindung des **3'-Isomers** bei diesem noch intensiver sind als beim **2'-Isomer**. Die Struktur im Komplex (Abb. 4) wurde mit der vollen

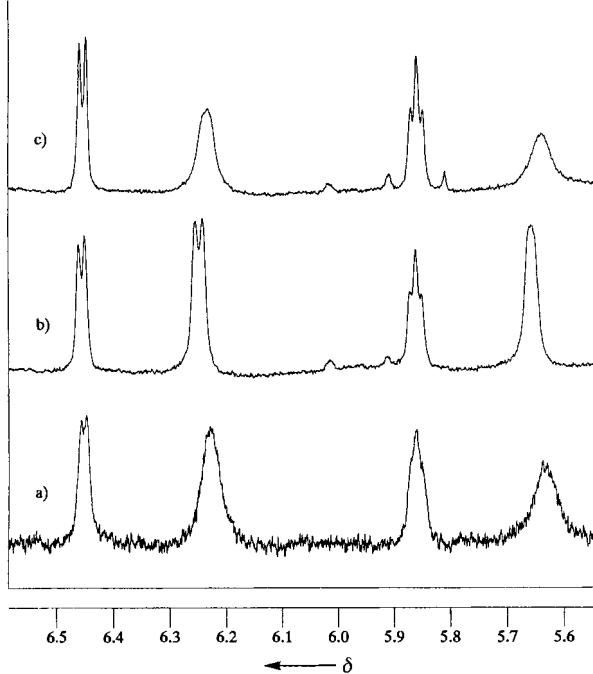


Abb. 3. Teil der Ribosesignale des ^1H -NMR-Spektrums von 1 mM **1** bei 281 K mit 0.8 mM a) Wildtyp-EF-Tu·GTP, b) EF-Tu(E271D)·GTP, c) EF-Tu(C82A/T394C)·GTP.

Protein (Abb. 3 b), in Einklang mit einer deutlich verringerten Bindungsstärke. Dies belegt die Spezifität der Wechselwirkung auch seitens des Proteins, da andere Mutanten wie die Doppelmutante C82A/T394C zur selben Linienverbreiterung wie der Wildtyp führen (Abb. 3c). Da die komplette tRNA noch weitere Kontakte zum EF-Tu hat,^[7] werden deren Varianten mit terminalem **2'-** und **3'-Desoxyadenosin**, wenn auch mit geringerer Affinität, gebunden.^[11] Um eine unspezifische Bindung von **1** an Proteine, besonders solche aus der Proteinbiosynthese, auszuschließen zu können, wurde die Wechselwirkung von **1** mit dem

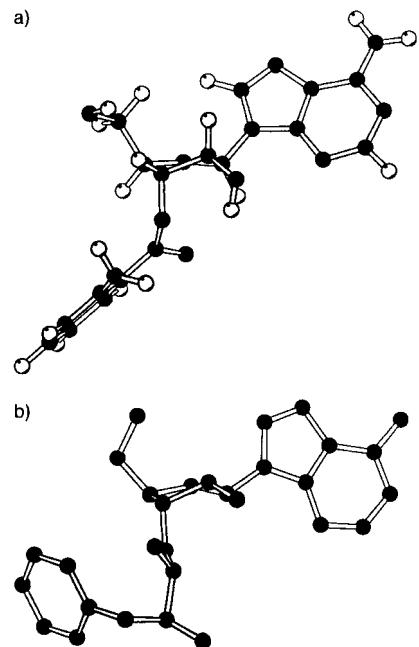


Abb. 4. a) Auf der Basis von NMR-Daten berechnete Struktur von **3'-1** im EF-Tu·GTP-gebundenen Zustand (Darstellung mit dem Programm MOLSCRIPT[22]). b) Konformation des terminalen Adenosins der beladenen tRNA^{Phe} aus der Struktur^[7] des ternären Komplexes EF-Tu·GTP-Phe-tRNA^{Phe} im Kristall.

Relaxationsmatrix berechnet und weicht nur wenig von der für freies **1** postulierten^[6] ab; so steht die Base in *anti*-Stellung bezüglich des Riboserings, und der Zuckerring weist eine *2'-endo*-Wellung auf. Die berechnete Struktur ist der des terminalen Adenosins aus dem ternären Komplex^[7] EF-Tu·GTP·Phe-tRNA^{Phe} sehr ähnlich (Abb. 4 b), vor allem in der Stellung der Base und der Ribosewellung. Auch die Aminogruppen der Aminosäure und von **1** liegen in einer ähnlichen Position, in der

sie mit Histidin 273 und Asparagin 285 des EF-Tu wechselwirken können.

Die hier vorgestellten Untersuchungen belegen, daß EF-Tu durch aminoacylierte Elongator-tRNA sehr wahrscheinlich über die Wechselwirkung der mit der Aminosäure veresterten Ribose des terminalen Nucleotids der tRNA spezifisch erkannt wird. Dabei wird offenbar das Isomer, bei dem die Aminosäure an die 3'-OH-Position gebunden ist, deutlich stärker gebunden. Der engste Kontakt des aminoacylierten terminalen Adenosinrests wird über die 2'-Ribose-Hydroxyposition sowie die 3'-Esterbindung hergestellt. Möglicherweise könnten diese Resultate als Ausgangspunkt für den Entwurf von Verbindungen auf der Basis von **1** dienen, die noch stärker mit EF-Tu wechselwirken und damit als spezifische Inhibitoren der aa-tRNA-EF-Tu-Interaktion und der gesamten Proteinbiosynthese wirken.

Experimentelles

Die Synthese von **1** wurde nach Lit.[6] durchgeführt. Präparation und Reinigung des in *E. coli* überproduzierten EF-Tu[18] und IF-2[20] aus *Th. thermophilus* wurde bereits beschrieben. **3** wurde nach Lit.[19] synthetisiert. NMR-Proben von **1** und **2** wurden aus Löslichkeitsgründen in einer 7:1-Mischung aus D₂O-Puffer (50 mM Natriumborat, pH 7.5; 50 mM KCl) und [D₄]Methanol aufgenommen. Bei **3** konnte auf Methanol verzichtet werden, bei **4** wurde statt Methanol [D₆]DMSO (Verhältnis 9:1) verwendet. Für Probenvolumina von 500 µL wurde das Protein in 437.5 µL Puffer gelöst, lyophilisiert und in das gleiche Volumen an D₂O überführt. 62.5 µL einer 8 mM Lösung von **1** oder **2** in [D₄]Methanol wurden dann zugegeben. Bei **3** und **4** wurde entsprechend verfahren.

Alle NMR-Spektren wurden bei 500 MHz mit einem Bruker-DRX-500-Spektrometer gemessen und mit dem Programm NDEE (Software: Symbiose, Bayreuth) ausgewertet. NOESY-Spektren wurden mit 4 k Datenpunkten in *t*₂- und 512 *t*₁- Inkrementen mit Mischzeiten von 70 ms und 150 ms aufgenommen. Das HDO-Signal wurde durch Vorsättigung unterdrückt.

Zur Strukturberechnung von proteingegebundem **1** wurde das X-Plor-Programmpaket[17] verwendet. Unter dem Einfluß der kovalenten Energieterme sowie einer Relaxationsmatrix-Strafenergie (angenommene Korrelationszeit für den Komplex von 20 ns)[21] wurde innerhalb von 1 ps von 1200 K auf 50 K abgekühlt, anschließend wurden die Strukturen mit dem kleinsten *R*-Faktor ausgewählt.

Eingegangen am 23. April,
veränderte Fassung am 14. Juli 1997 [Z10376]

Stichwörter: Molekulare Erkennung · NMR-Spektroskopie · Nucleotide · Proteine · RNA

- [1] M. Sprinzl, C. Steegborn, F. Hübel, S. Steinberg, *Compilation of tRNA Sequences and Sequences of tRNA Genes, Nucleic Acids Res.* **1996**, *24*, 68–72.
- [2] M. Taiji, S. Yokoyama, S. Higuchi, T. Miyazawa, *J. Biochem.* **1981**, *90*, 885–888.
- [3] J. Rudinger, B. Blechschmidt, S. Ribeiro, M. Sprinzl, *Biochem.* **1994**, *33*, 5682–5688.
- [4] a) J. Jonák, I. Rychlík, J. Smrt, A. Holý, *FEBS Lett.* **1979**, *98*, 329–332; b) J. Jonák, J. Smrt, A. Holý, I. Rychlík, *Eur. J. Biochem.* **1980**, *105*, 315–320.
- [5] L. Servillo, C. Balestrieri, L. Quagliuolo, L. Iorio, A. Giovane, *Eur. J. Biochem.* **1993**, *213*, 583–589.
- [6] B. Nawrot, W. Milius, A. Ejchart, St. Limmer, M. Sprinzl, *Nucleic Acids Res.* **1997**, *25*, 948–954.
- [7] P. Nissen, M. Kjeldgaard, S. Thirup, G. Polekhina, L. Reshetnikova, B. F. C. Clark, J. Nyborg, *Science* **1995**, *270*, 1464–1472.
- [8] O. Jarrettzky, G. C. K. Roberts, *NMR in Molecular Biology*, Academic Press, Orlando, FL, USA, **1981**, S. 115–142.
- [9] L.-Y. Lian, G. C. Roberts in *NMR of Macromolecules* (Hrsg.: G. C. K. Roberts), IRL, Oxford, **1993**, S. 153–182.
- [10] M. Taiji, S. Yokoyama, T. Miyazawa, *J. Biochem.* **1985**, *98*, 1447–1453.
- [11] M. Sprinzl, M. Kucharzewski, J. B. Hobbs, F. Cramer, *Eur. J. Biochem.* **1977**, *78*, 55–61.
- [12] F. Janiak, V. A. Dell, J. K. Abrahamson, B. S. Watson, D. L. Miller, A. E. Johnson, *Biochem.* **1990**, *29*, 4268–4277.
- [13] A. P. Campbell, B. D. Sykes, *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.* **1990**, *29*, 99–122.
- [14] a) F. Ni, H. A. Scheraga, *Acc. Chem. Res.* **1994**, *27*, 257–264; b) F. Ni, *Prog. NMR Spectrosc.* **1994**, *26*, 517–606.

- [15] D. Neuhau, M. Williamson, *The Nuclear Overhauser Effect in Structural and Conformational Analysis*, VCH, New York, **1989**.
- [16] a) H. Berchtold, L. Reshetnikova, C. O. A. Reiser, N. K. Schirmer, M. Sprinzl, R. Hilgenfeld, *Nature* **1993**, *365*, 126–132; b) M. Kjeldgaard, P. Nissen, S. Thirup, J. Nyborg, *Structure* **1993**, *1*, 35–50.
- [17] A. T. Brünger, X-Plor, Version 3.843, **1996**.
- [18] S. Limmer, C. O. A. Reiser, N. K. Schirmer, N. W. Grillenbeck, M. Sprinzl, *Biochem.* **1992**, *32*, 2970–2977.
- [19] A. V. Azhayev, S. V. Popovkina, N. B. Tarussova, M. P. Kirpichnikov, V. L. Florentiev, A. A. Krayevsky, M. K. Kukhanova, B. P. Gottikh, *Nucleic Acids Res.* **1997**, *7*, 2223–2234.
- [20] H.-P. Vornlocher, W.-R. Scheible, H. G. Faulhammer, M. Sprinzl, *Eur. J. Biochem.* **1997**, *243*, 66–71.
- [21] C. R. Cantor, P. R. Schimmel, *Biophysical Chemistry, Part II*, W. H. Freeman, San Francisco, **1980**, S. 461.
- [22] P. J. Kraulis, *J. Appl. Crystallogr.* **1991**, *24*, 946–950.

Templatgesteuerter Selbstaufbau sechs- und achtgliedriger Eisencoronate**

Rolf W. Saalfrank,* Ingo Bernt, Evelin Uller und Frank Hampel

Professor Gottfried Huttner zum 60. Geburtstag gewidmet

Die „Synthese von Eigenschaften“^[1] ist erklärt Ziel der supramolekularen Chemie. Modellsubstanzen hierfür sind die in großer Zahl natürlich vorkommenden komplex strukturierten oxidischen Eisenminerale.^[2] Über den biologischen Prototyp dieser anorganischen Systeme, das Eisenspeicherprotein Ferritin, liegen bereits umfangreiche Arbeiten vor.^[3, 4] Ferner konnten diskrete Cluster mit bis zu 19 sauerstoffverbrückten Eisenatomen synthetisiert und eindeutig charakterisiert werden.^[5] Zum besseren Verständnis von Elektronentransferprozessen so wie den magnetischen Eigenschaften vielkerniger Eisen-,^[3, 5] Mangan-^[6] und Nickelkomplexe^[7] sind allerdings noch weitere Studien an Verbindungen dieses Typs erforderlich. Gleicher gilt sowohl für das erst kürzlich beschriebene cyclische Ferrocenheptamer^[8] als auch für Metallakronenether mit eingeschlossenem Kation^[9, 10] oder Anion.^[11] Bezuglich ihrer Anwendungsmöglichkeiten sind Eisen(III)-Verbindungen sicherlich von zentraler Bedeutung.

Unsere Untersuchungen haben ergeben, daß neben den klassischen Kronenthern, Cryptanden und deren Komplexen eine topomer analoge Verbindungsklasse von Metallakronenethern,^[10] Metallacryptanden^[12, 13] und deren Einschlußverbindungen existiert. Als ditope Brücken fungieren dabei in allen Fällen bisbidentate Liganden. Außerdem studierten wir den Aufbau von 1D-, 2D- und 3D-Koordinationspolymeren mit koordinativ ungesättigten, formal linearen bidentaten Dinitril-Monomeren.^[14] Durch die Kombination beider Methoden haben wir versucht, neuartige adamantanoide, vierkernige Chelatkomplexe **1** zu konstruieren. In Anlehnung an die Syn-

[*] Prof. Dr. R. W. Saalfrank, Dipl.-Chem. I. Bernt, E. Uller, Dr. F. Hampel
Institut für Organische Chemie der Universität Erlangen-Nürnberg
Henkestraße 42, D-91054 Erlangen
Telefax: Int. + 9131/85-6864
E-mail: saalfrnk@organik.uni-erlangen.de

[**] Chelatkomplexe (Metallacoronate), 9. Mitteilung. Diese Arbeit wurde von der Deutschen Forschungsgemeinschaft, von der Volkswagen-Stiftung und vom Fonds der Chemischen Industrie gefördert. Wir danken Prof. Dr. A. X. Trautwein und Dr. V. Schünemann, Universität Lübeck, für die Aufnahme von Mößbauer-Spektren. Prof. Dr. K.-P. Zeller, Universität Tübingen, und Prof. Dr. F. Vögtle, Universität Bonn, danken wir für die Aufnahme zahlreicher FAB-MS-Spektren. – 8. Mitteilung: Lit. [9].