

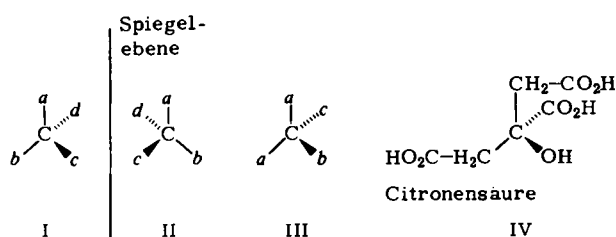
Asymmetrie und Enzymwirkung (Nobel-Vortrag)^[**]

Von John Warcup Cornforth^[*]

Es geschieht, wie ich glaube, nur selten, daß man so hervorragend für eine Arbeit belohnt wird, die in Planung und Durchführung ein reines Vergnügen war. Ich werde nun meinerseits versuchen, Sie an dieser Freude teilhaben zu lassen.

1948 erschien in der wissenschaftlichen Zeitschrift „Nature“ eine kurze, aber historische Notiz von *Alexander Ogston*, der darin die Bedeutung einer neuartigen stereochemischen Betrachtungsweise für biochemische, d. h. durch Enzyme katalysierte Reaktionen hervorhob. Bis dahin hatte ich als Organiker, der sich für die Synthese von Naturstoffen interessiert, zur Stereochemie die gleiche Einstellung wie etwa ein Kraftfahrer zu einem System von Einbahnstraßen – beides sind Vorschriften, die ein zusätzliches Hindernis auf dem Weg zum Ziel bedeuten. 1948 hatte ich allerdings neben meiner Arbeit bei *Robert Robinson* über die Totalsynthese von Sterinen begonnen, mit Biologen am „National Institute for Medical Research“ zusammenzuarbeiten, so daß *Ogstons* Gedanke bei mir auf fruchtbaren Boden fiel.

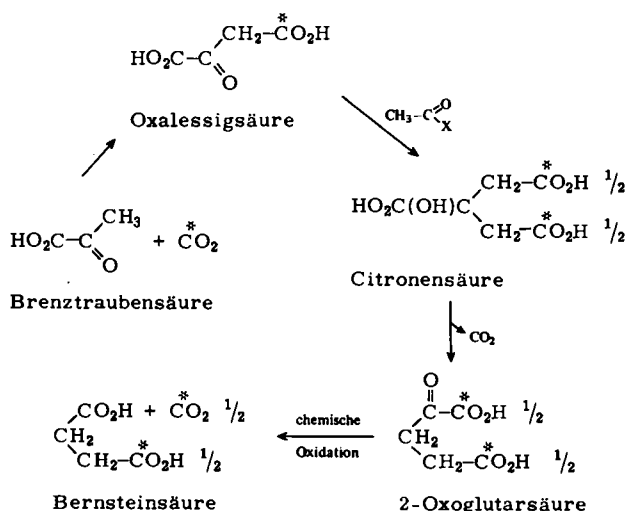
Die wesentlichen Grundlagen der dreidimensionalen Struktur organischer Moleküle waren schon 1874 vom ersten Träger des Nobelpreises für Chemie, *Jacobus van't Hoff*, formuliert worden. Im besonderen schuf er (und unabhängig von ihm *Le Bel*) eine strukturelle Basis für *Louis Pasteurs* Entdeckung, daß manche Moleküle in zwei optisch aktiven Formen existieren können, die sich voneinander im Verhalten gegenüber linear polarisiertem Licht unterscheiden; die Polarisationsebene wird nach rechts gedreht, wenn das Licht durch eine Lösung der einen Form tritt, und nach links, wenn die andere Form



verwendet wird. *van't Hoff* stellte die Theorie auf, daß die vier Atome, mit denen ein Kohlenstoffatom in einem Molekül maximal verbunden sein kann, die vier Ecken eines Tetraeders einnehmen, wobei sich das Kohlenstoffatom in der Mitte befindet. Dies läßt sich auch so ausdrücken, daß sich die vier Atome so weit wie möglich voneinander entfernen, vorausgesetzt, daß sie einen konstanten Abstand vom Zentralatom besitzen. Wenn diese vier Atome alle verschieden sind oder wenn jedes Atom Teil einer von den anderen verschiedenen Atomgruppe ist, können sie zwei räumliche Anordnungen einnehmen, die *chiral* sind: ihr Verhältnis ist wie das der rechten zur linken Hand, sie sind spiegelbildlich zueinander (I und II). Das zentrale Kohlenstoffatom kann als Asymmetriezentrum bezeichnet werden. Sind andererseits zwei der Atome

oder Atomgruppen gleich (III), so ist nur eine Anordnung um das Zentralatom möglich.

Die meisten Moleküle, einschließlich der Enzyme, welche die Reaktionen in der belebten Natur katalysieren, sind optisch aktive Verbindungen und haben Asymmetriezentren; viele für die Lebensvorgänge wichtige Moleküle haben jedoch kein Asymmetriezentrum. Eines dieser Moleküle ist Citronensäure (IV), die der große schwedische Chemiker *Scheele* 1784 zum ersten Mal isolierte. Citronensäure ist eine Verbindung vom Typ *C a a b c* mit zwei gleichen Essigsäureseitenketten am Zentralatom. Als man begann, die Vorgänge in lebenden Zellen durch Markierung mit radioaktiven und stabilen Isotopen zu untersuchen, stieß man bei Citronensäure auf ein bis dahin unerklärliches Phänomen.



Schema 1. Vorauesagte Isotopenverteilung in 2-Oxoglutarat, ausgehend von markiertem Kohlendioxid.

Der biochemische Reaktionsablauf (Schema 1), der anhand der damals bekannten Befunde im ganzen korrekt aufgestellt war, wurde mit Taubenleberpräparationen überprüft. Brenztraubensäure reagiert mit Kohlendioxid zu Oxalessigsäure, und diese kondensiert mit „aktivem Acetat“ (jetzt als Acetyl-Coenzym A bekannt) zu Citronensäure. Citronensäure wird unter Kohlendioxid-Abspaltung zu 2-Oxoglutarat und weiter zu einem zweiten Molekül Kohlendioxid und Bernsteinsäure oxidiert. Alle diese Reaktionen werden durch Enzyme katalysiert (der letzte Schritt läuft allerdings auch chemisch ab). Die ursprüngliche stereochemische Erörterung über die Reaktionsfolge ging von der Frage aus, was geschähe, wenn die gleichen Reaktionen nichtenzymatisch durchgeführt würden. Die Überlegung war etwa so: „Citronensäure ist ein symmetrisches Molekül des Typs *C a a b c*; die beiden *a*-Gruppen (Essigsäurereste) sind gleich; wenn wir eine davon radioaktiv machen, z. B. durch Einführung radioaktiven Kohlendioxids im ersten Schritt, dann wird beim Abbau der Citronensäure über 2-Oxoglutarat zu Bernsteinsäure und Kohlendioxid die eine Hälfte der Radioaktivität in der Bernsteinsäure, die andere in dem bei der Oxidation zu Bernsteinsäure freigesetzten Kohlendioxid zu finden sein“.

[*] Prof. Dr. J. W. Cornforth
University of Sussex
Falmer, Brighton (England)

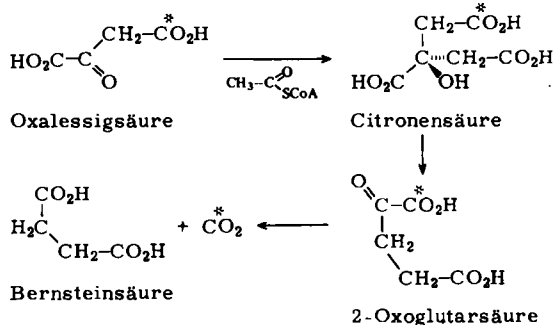
[**] Copyright © The Nobel Foundation 1976. – Wir danken der Nobel-Stiftung, Stockholm, für die Genehmigung zum Druck dieser Übersetzung.

Das Experiment zeigte jedoch, daß die Radioaktivität *vollständig* im Kohlendioxid auftrat und die Bernsteinsäure nichts enthielt. Vor *Ogston*s Notiz konnte dafür keine Erklärung gefunden werden (mit Ausnahme des falschen Schlusses, Citronensäure nähme nicht an der biochemischen Reaktionskette teil). Während *Ogston* das Prinzip exakt herausstellte, gebe ich die Erklärung in etwas allgemeinerer Form.

Enzyme katalysieren chemische Reaktionen durch Bindung der reagierenden Moleküle (Substrate) an einer bestimmten Stelle des Enzymmoleküls. Enzyme sind Proteine, und Proteine bestehen aus einer großen Anzahl asymmetrischer Einheiten, der Aminosäuren. Es gibt kein Symmetrieelement in einem Enzym oder an seiner Bindungsstelle. Darüber hinaus wird jedes Enzym in charakteristischer Weise nur sehr wenige Molekültypen als Substrate annehmen: kleine Veränderungen von Form oder Größe des normalen Substrates können die Reaktionsgeschwindigkeit stark verringern oder auf Null herabsetzen. *Emil Fischer* dachte an diese Befunde, als er schon 1894 sagte, daß Enzym und Substrat wie Schloß und Schlüssel zueinander passen müssen.

Ein Schlüssel und ein Schloß müssen zusammenpassen; wenn das Schloß keine Symmetrie besitzt, muß der Schlüssel vor dem Einstecken in das Schloß räumlich entsprechend orientiert werden. Nach dem Einstecken muß man ihn, um das Schloß zu betätigen, in einem bestimmten Sinn drehen, d. h. nur eine Seite des Schlüssels führt die eigentliche Operation aus und setzt den Mechanismus des Schlosses in Gang.

Betrachtet man das Oxalessigsäuremolekül als Schlüssel, so heißt das, daß nur eine Seite der Ketocarboxylgruppe (oberhalb oder unterhalb der Papierebene) mit dem zweiten Substrat Acetyl-Coenzym A reagieren kann. Die andere Seite *kann nicht* an das Enzym herangebracht werden, ohne die Konformation des Substrates zu ändern, so als ob man versuchte, einen Schlüssel umgekehrt oder umgedreht in ein Schloß zu stecken. Dieses Verhalten unterscheidet sich völlig von den Reaktionen der gleichen Carbonylgruppe in Lösung, wo beide Seiten dem Angriff eines Reagens in gleicher Weise zugänglich sind.

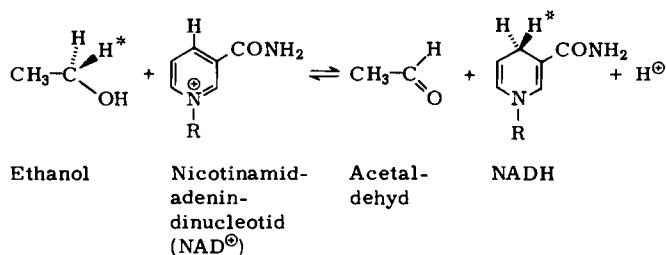


Schema 2. Tatsächlicher stereochemischer Verlauf der enzymatischen Synthese und des enzymatischen Abbaus von Citronensäure.

Wenn die Oxalessigsäure radioaktiv markiert ist, was z. B. der Fall ist, wenn man sie aus Brenztraubensäure und radioaktivem Kohlendioxid synthetisiert, dann trägt die enzymatisch erhaltene Citronensäure den markierten Essigsäurerest in einer bestimmten räumlichen Anordnung, die sich von derjenigen des anderen Essigsäurerestes unterscheidet – letzterer entsteht aus Acetyl-Coenzym A. Da die nächste Reaktion in der biochemischen Sequenz eine der beiden Essigsäureseitenketten betrifft, ist es offensichtlich, daß *alle* Folgeprodukte der vom Enzym veränderten Citronensäuremoleküle entweder die mar-

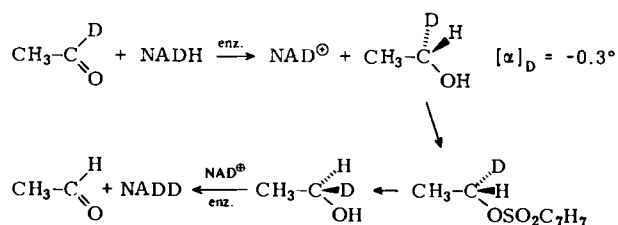
kierte Gruppe oder aber die nicht-markierte Gruppe umgesetzt enthalten: dies ist eine notwendige Folgerung, wenn die Citronensäuremoleküle eine bestimmte räumliche Anordnung relativ zum Enzym einnehmen müssen. Tatsächlich wird die markierte Gruppe vom Enzym angegriffen; die Stereochemie der Reaktion, die viel später von *Kenneth Hanson* und *Irwin Rose* aufgeklärt wurde, geht aus Schema 3 hervor.

Die asymmetrische Synthese ist organischen Chemikern nicht unbekannt: beispielsweise entsteht bei Reaktionen in Lösung, bei denen die Verknüpfung eines symmetrischen und eines unsymmetrischen Moleküls zur Bildung eines neuen Asymmetriezentrums führt, oft ein Überschuß einer der beiden chiralen Formen. Aber hier geschieht etwas prinzipiell anderes: ein asymmetrischer Katalysator läßt zwei Reaktionen unter völliger Spezifität verlaufen. Und in beiden Reaktionen ist die Asymmetrie der Katalyse *versteckt*: wenn es dem Experimentator nicht möglich gewesen wäre, an einem der beiden Essigsäurereste ein Kennzeichen in Form der Isotopenmarkierung anzubringen, so hätte der Ogston-Effekt, wie er genannt worden ist, noch viele Jahre unentdeckt bleiben können. Auf diesem Arbeitsgebiet ist die Anwendung der Isotopenmarkierung fast unerläßlich: der Ersatz eines Atoms in einem Substratmolekül durch ein Isotop führt zu einer sehr geringen Änderung des chemischen Verhaltens; ein Enzym wird immer mit einem markierten Substrat reagieren, wenn auch vielleicht etwas langsamer.



Schema 3. Stereospezifität der Hefe-Alkoholdehydrogenase-Reaktion.

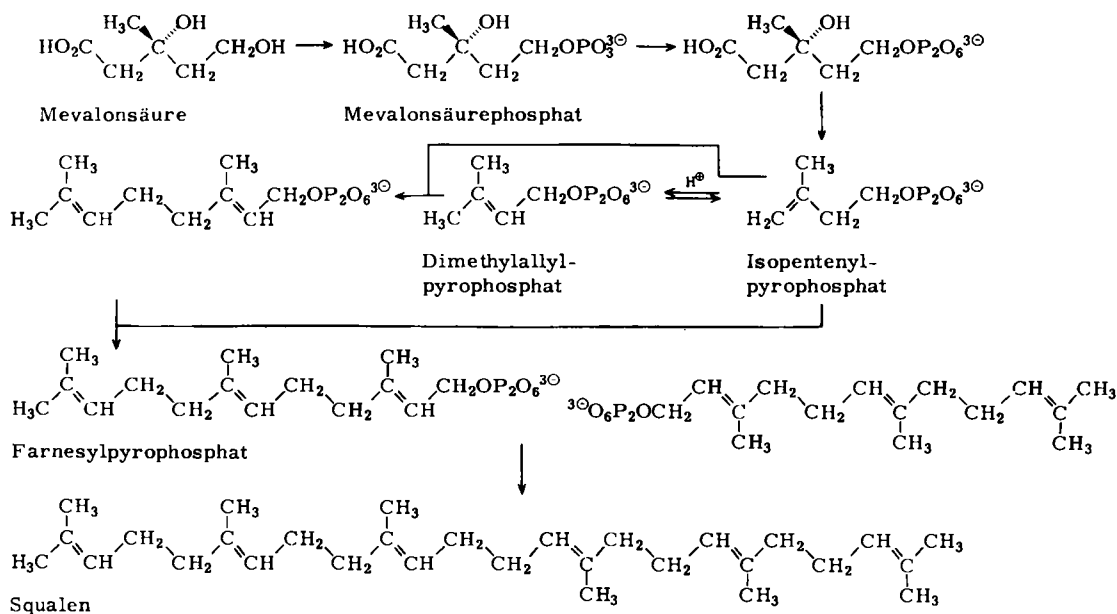
1953 untersuchte *Frank Westheimer* in Zusammenarbeit mit den Biochemikern *Frank Loewus* und *Birgit Vennesland* die Hefe-Alkoholdehydrogenase. Dieses Enzym katalysiert den reversiblen Übergang eines Wasserstoffatoms zwischen einem Molekül Ethanol und einem Molekül des Coenzym Nicotinamidadenin-dinucleotid. Weder schafft der Transfer ein Asymmetriezentrum noch zerstört er ein solches, aber dennoch sind die beiden Wasserstoffatome am Kohlenstoffatom 1 des Ethanols und die beiden Seiten des Pyridinringes im Coenzym stereochemisch verschieden in *Ogston*s Sinn. Zur einfachen Überprüfung sehe man nacheinander von jedem der beiden Wasserstoffatome und von jeder der beiden Seiten des Ringes auf den Rest des Moleküls: wenn die beiden Ansichten verschieden sind (wie es hier der Fall ist), kann ein Enzym – und wahrscheinlich wird es dies auch tun – nur mit einem der beiden Atome oder nur von einer der beiden Seiten her reagieren. Durch Anwendung der Wasserstoffisotope Deuterium oder Tritium als Markierung gelang der Nachweis, daß das übertragene Wasserstoffatom eine eindeutige stereochemische Lage sowohl im Substrat als auch im Coenzym einnimmt. Ein Wasserstoffatom, das nicht in der richtigen Position ist, wird nicht übertragen. Die Stereochemie dieser Reaktion ist seitdem in mehreren Laboratorien, einschließlich meines Laboratoriums, aufgeklärt worden; sie ist in Schema 3 abgebildet.



Schema 4. Inversion der Konfiguration von 1-Deuterioethanol.

Wurde andererseits Wasserstoff vom unmarkierten Coenzym auf Acetaldehyd übertragen, dessen Aldehyd-Wasserstoff durch Deuterium ersetzt worden war, so drehte der gebildete Alkohol die Ebene des polarisierten Lichtes um meßbare, wenn auch geringe Werte, was die Korrelation seiner Stereochemie mit dieser physikalischen Eigenschaft möglich machte.

durch chemischen Abbau von Cholesterin, das in Rattenleberpräparationen aus Essigsäure synthetisiert wurde, konnten wir zeigen, wie Essigsäure in das Sterinringgerüst eingebaut wird. Später, und besonders nachdem sich Mevalonsäure als chemischer Vorläufer von Steroiden und Terpenoiden herausgestellt hatte, vermochten wir aufschlußreichere Experimente zu planen, wobei wir mit Kohlenstoffisotopen spezifisch markierte Mevalonsäure verwendeten, um Informationen über die Molekülmagerung bei der Bildung des Steroidgerüsts zu erhalten. Zur gleichen Zeit identifizierten *Konrad Bloch* und *Feodor Lynen* die Zwischenstufen der Biosynthese von Sterinen aus Mevalonsäure in Hefe, und *Popják* zeigte, daß in Rattenleber die gleichen Zwischenstufen gebildet wurden. Die Reaktionsfolge für die Synthese von Squalen aus Mevalonsäure, der Vorstufe aller Steroide und Triterpenoide, ist in Schema 5 dargestellt.



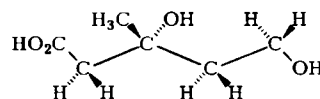
Schema 5. Biosynthese von Squalen aus 3*R*-Mevalonsäure.

Schließlich wurde das deuterierte Ethanol einer rein chemischen Reaktion unterworfen: durch Hydrolyse seines *p*-Toluolsulfonsäureesters entstand eine neue Spezies deuterierten Ethanols, die anders als das ursprüngliche Ethanol in Gegenwart von Alkohol-Dehydrogenase Deuterium und nicht Wasserstoff auf das Coenzym übertrug (Schema 4).

Obleich das letzte Experiment nicht mit dieser Absicht ausgeführt wurde, kann es als Beweis dafür gelten, daß die Hydrolyse eines typischen Sulfonsäureesters eines primären Alkohols unter *Inversion der Konfiguration* am Kohlenstoff abläuft; dieser Reaktionsverlauf war vorher nicht nachgewiesen worden, wenn er auch für Sulfonsäureester sekundärer Alkohole gesichert war, bei denen die Asymmetrie nicht auf der Substitution mit Isotopen beruhte. Die Kenntnis des sterischen Verlaufs einer chemischen Reaktion ist eine der nützlichsten Hilfen, um ihren Mechanismus aufzuklären und Alternativen auszuschließen.

Ich hatte diese Arbeiten mit Interesse verfolgt und ihre potentielle Bedeutung für die Untersuchung der Mechanismen von Enzymreaktionen erkannt; damals befaßte ich mich aber mit meinem Kollegen, dem Biochemiker *George Popják*, und unseren Mitarbeitern mit einem Problem der Biosynthese:

1960 untersuchten wir die Bildung von Squalen aus zwei Molekülen Farnesylpyrophosphat. Diese Reaktion sieht wie eine symmetrische Verknüpfung zweier gleicher Teile aus: wir fanden aber, daß während der Reaktion ein und nur ein Wasserstoffatom an einem der Kohlenstoffatome ausgetauscht wird, die sich bei der Bildung des Squalens miteinander verbinden. Diese nicht-symmetrische Synthese eines symmetrischen Moleküls weckte mein Interesse am Mechanismus des gesamten Prozesses von Mevalonsäure zu Squalen.



Schema 6. Mevalonsäure und ihre sechs Methylenwasserstoffatome.

Mevalonsäure hat die übliche Art Asymmetrie mit *abcd*-Substitution am zentralen Kohlenstoffatom; während der biochemischen Umsetzung geht diese Art Asymmetrie aber bald verloren. Darüber hinaus verfügt Mevalonsäure über drei *Caabc*-Zentren (Schema 6), deren Bindungen während der Squalensynthese angegriffen werden. Jedes der sechs Wasser-

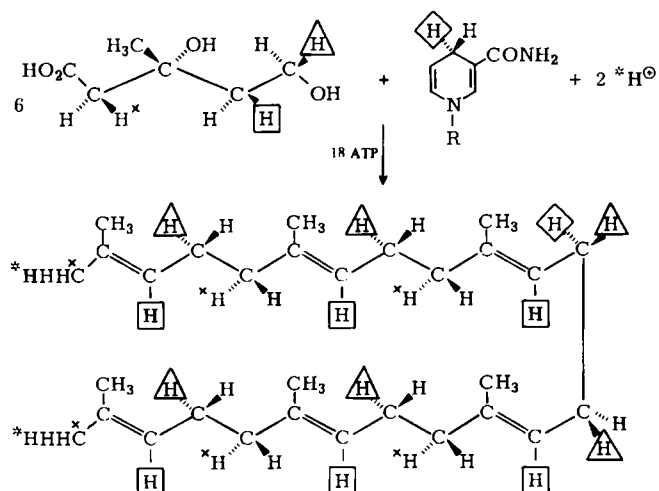
stoffatome in diesen drei Gruppen ist stereochemisch verschieden in *Ogston's* Sinn, und so war es prinzipiell möglich, den Weg eines Wasserstoffatoms aus jeder dieser sechs Positionen zu verfolgen, bis es entweder im wäßrigen Reaktionsmedium verloren ging oder an eine spezifische und stereospezifische Stelle im Squalen gelangte. Das Schicksal der Wasserstoffatome bei der Biosynthese wird ausschließlich durch den sterischen Verlauf der enzymatischen Reaktionen bestimmt, in die man somit weiteren Einblick gewinnt.

Deshalb wurde es nötig, jedes dieser sechs Wasserstoffatome zu kennzeichnen, und dies konnte nur durch Ersatz eines normalen Wasserstoffatoms durch eines seiner Isotope geschehen: stabiles Deuterium oder radioaktives Tritium. Dieses Problem wurde zum großen Teil dadurch gelöst, daß man die enorme Fülle des organisch-chemischen Wissens heranzog, vor allem über den sterischen Verlauf chemischer Reaktionen. Vier der sechs Wasserstoffatome ließen sich durch nicht-enzymatische Reaktionen individuell markieren. Mit einer organischen Reaktion bekannten stereochemischen Verlaufs wurde die Stereospezifität eines Enzyms – der Mevaldat-Reduktase – bestimmt, welches zur Markierung des fünften Wasserstoffatoms diente. Das sechste wurde schließlich ebenfalls durch Enzyme, deren stereochemischer Reaktionsverlauf bekannt war, markiert.

Diese markierten Mevalonsäuren wurden Enzympräparationen aus Ratten- oder Schweineleber zugesetzt. In Abhängigkeit von der Art der Präparation und der Anwesenheit oder Abwesenheit bestimmter Cofaktoren oder Inhibitoren ließ sich die Reaktionsfolge von Mevalonsäure bis Squalen vollständig ausführen oder auf verschiedenen Zwischenstufen abbrechen: Mevalonsäurephosphat, Isopentenylpyrophosphat oder Farnesylpyrophosphat (siehe Schema 5). Besonders bei Experimenten mit deuterium-markierten Substraten mußte ungewöhnlich viel Produkt – im allgemeinen 50 mg – aus diesen Ansätzen isoliert werden, und *Popják* und ich gewöhnten uns an den Dialog „Wieviel können Sie herstellen?“ „Wie wenig brauchen Sie?“.

Nach den enzymatischen Umsetzungen wurden die Produkte geprüft, um das Schicksal des markierenden Isotops zu ergründen. Die Frage, ob das Isotop bei der Reaktion verloren gegangen oder in das Produkt eingebaut worden war, ließ sich relativ einfach beantworten: man untersuchte das Produkt im Massenspektrometer, welches die Anwesenheit oder Abwesenheit von Deuterium anzeigte, oder man maß die von Tritium stammende Radioaktivität. Wenn die absolute Konfiguration an einer markierten Position zu bestimmen war, mußte Deuterium zur Markierung verwendet werden und das Produkt chemisch durch Reaktionen abgebaut werden, die entweder das markierte Zentrum unberührt ließen oder es in einer stereochemisch bekannten Weise so umwandelten, daß eine für polarimetrische oder massenspektroskopische Untersuchungen geeignete Substanz entstand. Glücklicherweise fielen diese Arbeiten zeitlich mit der Entwicklung von Polarimetern zusammen, die empfindlich genug waren, um in günstigen Fällen an wenigen Milligramm Substanz die optische Aktivität zu messen, welche allein durch Austausch von Wasserstoff gegen Deuterium hervorgerufen worden war. Unsere ersten Messungen dieser Art wurden am „National Physical Laboratory“ an einem Instrument des Prototyps gemacht. Da Verunreinigungen durch normales aktives Material die Ergebnisse verfälscht hätten, mußten wir eine Technik zur Umkristallisation in Kapillarröhrchen entwickeln. Diese ermöglichte z. B.

die Umkristallisation von Bernsteinsäure in Milligramm-Mengen aus etwa zwei Teilen Wasser. War die optische Rotation bekannt, so konnte sie mit der Rotation einer Vergleichsprobe bekannter absoluter Konfiguration verglichen werden, die durch enzymatische oder chemische Synthese hergestellt worden war.

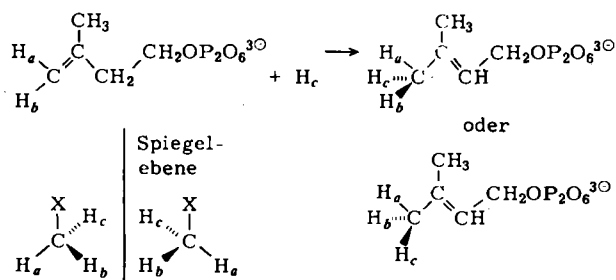


Schema 7. Nicht vollständig geklärter stereochemischer Verlauf der Biosynthese von Squalen aus 3*R*-Mevalonsäure.

Die Arbeiten erforderten somit in einer einzigen Folge von Experimenten ein ungewöhnliches Ineinandergreifen von stereospezifischer Synthese, Isotopenmarkierung, Enzymologie, chemischem Abbau im Centigramm-Bereich und empfindlichen physikalischen Analysemethoden. Schließlich bewiesen wir die Stereospezifität aller damals bekannten enzymatischen Schritte der Squalenbiosynthese mit Ausnahme eines Schrittes. Schema 7 zeigt das Schicksal der Wasserstoffatome. Viel weiter konnten wir mit der Erzeugung der Asymmetrie in CH_2bc -Gruppen durch Isotopensubstitution eines der beiden Wasserstoffatome nicht kommen. Die Zugänglichkeit dieser stereospezifisch markierten Mevalonsäuren war aber für uns und andere Forscher bei der Aufklärung der normalen Terpenoidbiosynthese von großem Nutzen.

Ein Schritt der Terpenoidbiosynthese ist die (reversible) Isomerisierung von Isopentenylpyrophosphat zu Dimethylallylpyrophosphat (siehe Schema 5). Die Addition eines Protons aus dem Wasser an die endständige Methylengruppe geschieht, wenn der Vorgang stereospezifisch verläuft, nur von einer Seite der endständigen Methylengruppe her. Dank der früheren Untersuchungen waren markierte Mevalonsäuren zugänglich, deren enzymatische Reaktion zu Isopentenylpyrophosphat mit Deuterium oder Tritium in geometrisch definierter Position an der Methylengruppe bekannt war; wenn diese Gruppe bei einer normalen Inkubation jedoch in eine Methylgruppe überginge, erhielt man aufgrund der freien Rotation um ihre C—C-Bindung nicht-unterscheidbare Produkte, und zwar unabhängig davon, welches der beiden Wasserstoffatome markiert war und von welcher Seite die Addition des Protons erfolgte. Die einzige Möglichkeit, die Individualität der drei betreffenden Wasserstoffatome zu erhalten, schien darin zu bestehen, alle drei Wasserstoffisotope – Protium, Deuterium und Tritium – in geeigneter Folge einzusetzen. Wenn man Isopentenylpyrophosphat mit zwei Wasserstoffisotopen stereospezifisch markierte und die wäßrige Inkubationslösung das dritte Isotop beisteuerte, müßte bei stereospezifischer Ad-

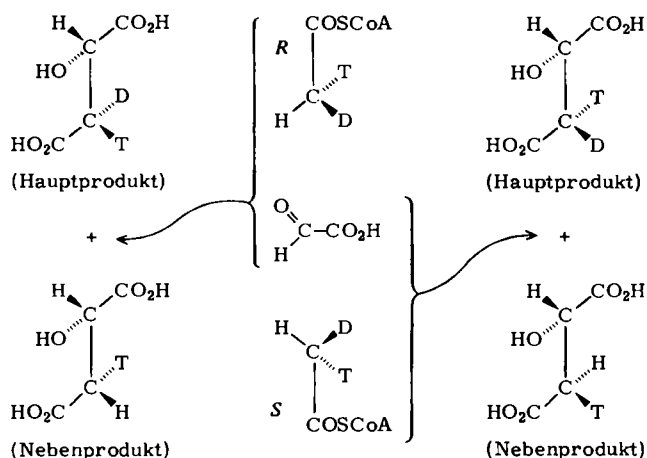
dition des Wasserstoffs aus dem Wasser eine *chirale Methylgruppe* entstehen. Ihre Chiralität hinge von der Additionsrichtung des Protons ab, die sich damit zu erkennen gäbe (Schema 8).



Schema 8. Herstellung einer chiralen Methylgruppe.

Chirale Methylgruppen waren bis dahin unbekannt, und es war unklar, wie man ihre absolute Konfiguration bestimmen könnte: die optische Rotation schien zur Messung ungeeignet, da eine Substanz, die Tritium in normalem Verhältnis zu den anderen Wasserstoffisotopen enthielte (anstatt der für Markierungszwecke üblichen minimalen Konzentrationen), eine spezifische Radioaktivität von schätzungsweise 30000 Curie pro mol hätte und die Rotation wahrscheinlich so klein wäre, daß große Mengen dieser stark radioaktiven Substanz erforderlich wären.

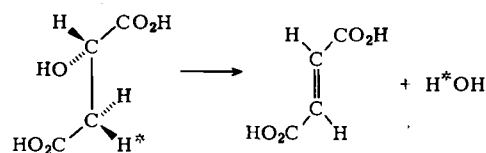
Zur Lösung des Problems trug eine Anregung bei, die *Hermann Eggerer* 1967 gab. Er hatte das Enzym Malat-Synthase untersucht, das aus Glyoxylsäure und Acetyl-Coenzym A Äpfelsäure bildet, eine asymmetrische Verbindung mit *S*-Chiralität nach der Definition von *Cahn, Ingold und Prelog*. *Eggerer* schlug für die Reaktion einen Mechanismus vor, der eine besondere stereochemische Beziehung zwischen dem Wasserstoffatom, das von der Methylgruppe abgespalten wird, und dem Glykolsäurerest, der es ersetzt, voraussagen ließ (Schema 9). Wäre dieser Mechanismus richtig und träte der normale



Schema 9. Vorausgesagte Tritiumverteilung in *S*-Äpfelsäure bei der enzymatischen Synthese (mit Malat-Synthase) aus chiraalem Acetat und Glyoxylsäure. Es wird angenommen, daß die Konfiguration an der chiralen Methylgruppe erhalten bleibt.

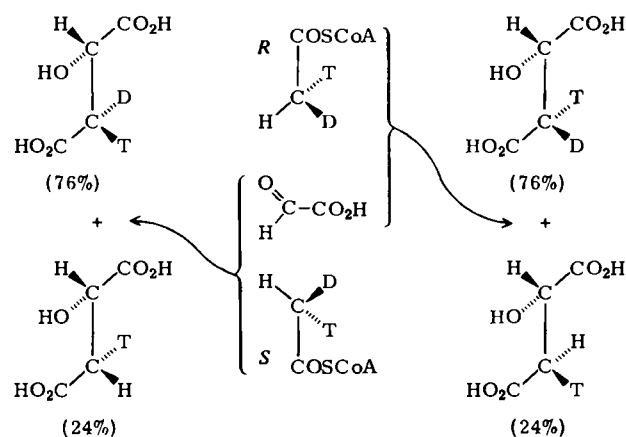
„Isotopeneffekt“ bei der Reaktion auf, dann sollte Protium in der chiralen Methylgruppe häufiger als Deuterium ausgetauscht werden. Demnach sollte es unter den tritiumhaltigen Äpfelsäuremolekülen mehr Moleküle geben, die Tritium und Deuterium enthalten, als Moleküle mit Tritium und Protium,

und in diesen beiden Spezies muß sich die stereochemische Anordnung des Tritiums in *Ogston's* Sinn unterscheiden. Eine analytische Methode zur Bestimmung dieser stereochemischen Anordnung war schon bekannt: das Enzym Fumarase katalysiert die stereospezifische *anti*-Eliminierung von Wasser aus *S*-Äpfelsäure (Schema 10). Wenn man also bei der Reaktionsfolge chirales Acetat → Acetyl-Coenzym A → Äpfelsäure → Fumarsäure den prozentualen Tritium-Verlust in der letzten Stufe bestimmte, dann müßten sich für die beiden Enantiomere des Acetats unterschiedliche Werte ergeben: in dem Maße, in dem Tritium bei der einen Form enthalten bliebe,



Schema 10. Stereochemie der Abspaltung eines an Kohlenstoff gebundenen Wasserstoffatoms von *S*-Äpfelsäure bei der Fumarase-Reaktion.

sollte es bei der anderen Form verlorengehen. Und wenn der Vorschlag für den stereochemischen Verlauf der Malat-Synthase-Reaktion richtig wäre, so könnte man allein aus diesen Radioaktivitätsmessungen die Chiralität des Acetats bestimmen.

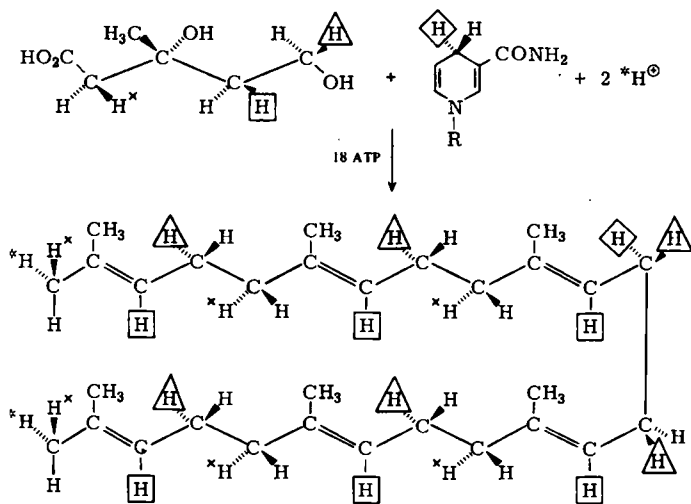


Schema 11. Gemessene Tritiumverteilung in *S*-Äpfelsäure, die aus synthetischem chiraalem Acetat und Glyoxylsäure in Gegenwart von Malat-Synthase erhalten wurde.

Der endgültige Plan (Schema 11) war unabhängig von dieser Annahme (was auch gut war, denn sie erwies sich als falsch). Stattdessen konnten wir in *Milstead* auf rein chemischem Weg Kaliumacetate synthetisieren, deren absolute Konfiguration durch die Synthesemethode eindeutig festgelegt war. Als diese in *Eggers* Laboratorium entsprechend der Reaktionsfolge Acetat → Acetyl-Coenzym A → Äpfelsäure → Fumarsäure umgesetzt wurden, verlor die Äpfelsäure aus *S*-Acetat bei der Inkubation mit Fumarase über Dreiviertel ihres Tritiums. Entsprechend behielt die Äpfelsäure aus *R*-Acetat über Dreiviertel ihrer Radioaktivität.

So hatten wir, ohne Annahmen über die Wirkungsweise der Enzyme zu machen, eine geeignete Methode zur Hand, um bei einem gegebenen chiralen Acetat die Zugehörigkeit zur *R*- oder *S*-Reihe zu bestimmen. Unabhängig von uns fanden *Duilio Arigoni* und *Janos Rétey* an der ETH Zürich eine sehr ähnliche Lösung des Problems. Mit dieser analyti-

schen Methode ließ sich nicht nur das Problem der Addition von Wasserstoff an Isopentenylpyrophosphat lösen, sondern es kann ebenso der stereochemische Verlauf einer großen und noch wachsenden Anzahl von Enzymreaktionen bestimmt werden, bei denen eine Methylgruppe entsteht oder umgewandelt wird. Als wir schließlich die stereochemische Herkunft aller fünfzig Wasserstoffatome des aus Mevalonsäure biosynthetisierten Squalens kannten, ließ ich der Anschaulichkeit halber ein dreidimensionales Modell anfertigen. Schema 12 faßt die erhaltenen Informationen zusammen.



Schema 12. Vollständiger stereochemischer Verlauf der Biosynthese von Squalen aus 3R-Mevalonsäure.

Unser Abenteuer mit der chiralen Methylgruppe stärkte die Überzeugung, daß die Stereospezifität nicht ein nur zufälliges, sondern ein wesentliches Merkmal der Enzymkatalyse ist. Das Leben hängt von der genauen Replikation von Molekülen ab, und seine Kompliziertheit erfordert es oft, daß ein Enzym eine einzige Molekülspezies erkennt und sie in ein ebenso spezifisches Produkt umwandelt. Aber die verborgene

Spezifität, die aufzuklären wir mitgeholfen haben, geht noch viel weiter: wie es scheint, muß ein Enzym auch dann Reaktionen streng stereospezifisch katalysieren, wenn diese Spezifität aufgrund der strukturellen Beziehung zwischen Substrat und Produkt nicht erforderlich ist. In der Tat sind bis jetzt viele Beispiele bekannt, in denen ein Enzym mehr als nur eine Molekülspezies als Substrat annimmt; jede von ihnen wird aber unter völliger, wenn auch verborgener stereochemischer Kontrolle umgesetzt.

Durch die beschriebene Kombination von chemischen, biochemischen und physikalischen Methoden konnte die Natur der Enzymkatalyse auf einer neuen Ebene erforscht werden; dadurch wurden andere gleichzeitige Untersuchungen ergänzt. Die Arbeiten erforderten intensive Anstrengungen. Dem Geschick und der Hingabe zahlreicher Mitarbeiter, von denen ich drei erwähnen möchte, verdanke ich viel: *George Popják* sorgte bis 1967 mit ungewöhnlicher Einsicht, Begabung und Findigkeit für die biochemische Seite dieser Untersuchungen. Ich hatte das Glück, mehr als zwanzig Jahre mit ihm als Kollege und Freund verbunden zu sein und mich danach der Zusammenarbeit mit einem anderen großen Biochemiker, *Hermann Eggerer*, zu erfreuen; seine Bereitschaft zur Kooperation erleichterte die Schwierigkeiten beim Vereinbaren und Abstimmen der Experimente in unseren tausend Kilometer entfernten Laboratorien. Schließlich führte meine Frau *Rita Cornforth* mit Geduld und großem experimentellem Geschick viele der chemischen Synthesen aus, auf denen der Erfolg dieser Arbeiten beruht. Ihr schulde ich nicht nur in diesem Sinn mehr als ich ausdrücken kann.

Meinem Lehrer und Freund *Robert Robinson*, dessen Tod am Anfang des Jahres ihn dieses Ereignis nicht mehr miterleben ließ, bleibe ich in besonderer Dankbarkeit verbunden, und ich könnte nichts Besseres erhoffen – so wie er bis zum Ende eines langen und schöpferischen Lebens – als Wissbegier und Bewunderung für die Chemie der Natur zu behalten.

Eingegangen am 5. März 1976 [A 124]
Übersetzt von Dr. Knut Bartl, Karlsruhe

Chemische Methoden zur Untersuchung der Ribosomenstruktur

Von Ernst Küchler[*]

Durch die Anwendung chemischer Methoden, insbesondere der Affinitätsmarkierung, ist unser Wissen über den Aufbau der aktiven Zentren von Ribosomen stark erweitert worden. Die Experimente zeigen, daß ribosomale Proteine und ribosomale Ribonucleinsäuren am Aufbau der Bindungsstellen für messenger-Ribonucleinsäure und transfer-Ribonucleinsäure beteiligt sind.

1. Einleitung

Die genetische Information einer lebenden Zelle ist in einem langen, fadenförmigen Molekül, der Desoxyribonucleinsäure (DNA), niedergelegt. Die DNA selbst greift nicht direkt in

das Zellgeschehen ein, sie speichert nur die Information. Um wirksam zu werden, muß die genetische Information zuerst in eine Ribonucleinsäure (RNA) umgeschrieben werden (Transkription). Aufgrund ihrer Funktion als Informationsüberträger wird diese RNA als Boten- oder messenger-RNA (mRNA) bezeichnet.

Neben der mRNA gibt es in der Zelle transfer-Ribonucleinsäuren (tRNA) und ribosomale Ribonucleinsäuren (rRNA), denen andere Funktionen zukommen. Die Nucleotidsequenz

[*] Dr. E. Küchler
Institut für Biochemie der Universität
Währingerstraße 17, A-1090 Wien (Österreich)