

Starke N–H...O-Wasserstoffbrückenbindungen in einer Modellverbindung für die katalytische Triade in Serinproteasen**

Jacob Overgaard, Birgit Schiøtt, Finn K. Larsen,
Arthur J. Schultz, John C. MacDonald und
Bo B. Iversen*

Die Spaltung von Peptidbindungen ist eine bedeutende Reaktion in der Natur, bei der eine katalytische Triade von Aminosäureseitenketten (Ser-His-Asp) im aktiven Zentrum der Enzymfamilie der Serinproteasen beteiligt ist (Abbildung 1).^[1] Viele Untersuchungen haben nahegelegt, daß eine

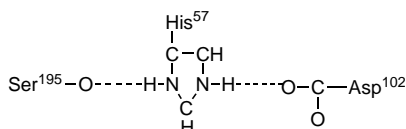


Abbildung 1. Schematische Darstellung der katalytischen Triade in Serinproteasen. Weder formale Ladungen noch Bindungsordnungen sind angegeben.

Wasserstoffbrückenbindung, die sich durch ein Doppelminimumpotential mit niedriger Barriere auszeichnet (low-barrier hydrogen bond, LBHB), am Reaktionsmechanismus auf eine Weise beteiligt ist, die einem teilweisen Protonentransfer zwischen His57 und Asp102 entspricht.^[2] Die Bildung einer LBHB kann eine Erklärung für viele besondere physikochemische Eigenschaften einiger Enzyme sein, aber es ist immer noch umstritten, ob eine LBHB stark zur katalytischen Aktivität der Triade beiträgt.^[3] Viele Untersuchungen sind durchgeführt worden, um die Merkmale von kurzen, starken Wasserstoffbrückenbindungen zu erforschen, und die hierfür hauptsächlich angewandten Methoden sind Ab-initio-Rechnungen an kleinen Modellsystemen,^[4] Kristallstrukturkorrelationen^[5] und spektroskopische Untersuchungen^[6] gewesen. Es wird immer deutlicher, daß außer dem Abstand zwischen den Heteroatomen weitere Faktoren die Bildung einer LBHB beeinflussen. Aufeinander abgestimmte pK_a -Werte, die Beteiligung anderer H-Brücken und die sterische Spannung spielen ebenfalls eine wichtige Rolle. Die Analyse der Ladungsdichten (LDs) in Modellsystemen ist eine alternative

Methode zur Untersuchung von Wasserstoffbrückenbindungen. Ladungsdichten in H-Brücken-Systemen können experimentell durch die Analyse der Daten aus Röntgenbeugungs- und Neutronenstreuungsexperimenten bei tiefen Temperaturen bestimmt werden.^[7] Im Unterschied zur Ab-initio-Theorie unterliegen experimentelle LD-Studien hinsichtlich der Größe des zu untersuchenden Modellsystems weit weniger Einschränkungen, und die Ergebnisse berücksichtigen bereits alle Wechselwirkungen im Kristall. Durch eine topologische Analyse der LD nach Bader^[8] können detaillierte, quantitative Aussagen über die Bindungsverhältnisse erhalten werden.

Um die elektronische Struktur kurzer N–H...O-Bindungen zu untersuchen, haben wir Röntgenbeugungs- und Neutronenstreuungsexperimente an Cokristallen aus Betain, Imidazol und Pikrinsäure bei tiefer Temperatur (28 ± 1 K) durchgeführt (Abbildung 2). Der Komplex dient als Modell

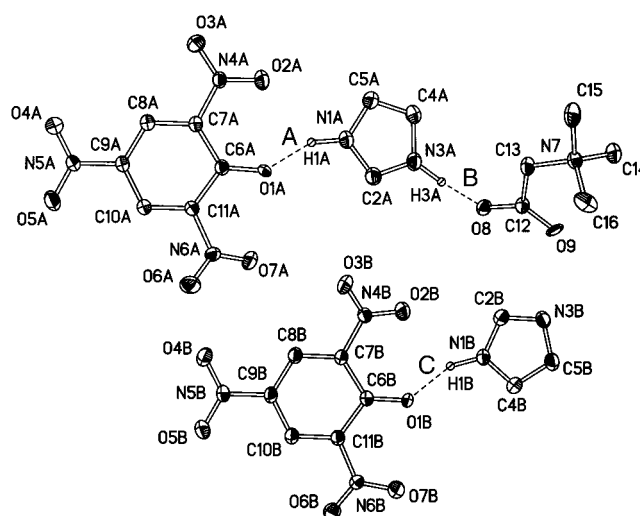


Abbildung 2. ORTEP-Darstellung der Struktur des Cokristalls aus Betain, Imidazol und Pikrinsäure (Schwingungsellipsoide für 95% Aufenthaltswahrscheinlichkeit, basierend auf Neutronenstreuungsdaten bei 28 K, sind eingezeichnet). Die Wasserstoffatome sind aus Gründen der Übersichtlichkeit weggelassen worden. Zwischen (C8B)H8B und O7A gibt es eine C–H...O-Wechselwirkung mit kurzem Abstand (3,070(3) Å), die für die Kristallpackung wesentlich ist.

für eine katalytische Triade, und das System ist a priori attraktiv, da es drei verschiedene kurze N–H...O-Abstände (< 2.7 Å) im selben Kristall enthält. Dies ermöglicht es, Faktoren wie die Angleichung von pK_a -Werten sowie Dreizentren-Wasserstoffbrückenbindungen zu untersuchen, ohne dem Einfluß von unterschiedlichen systematischen Fehlern bei verschiedenen Experimenten zu unterliegen, die gewöhnlich bei Kristallstrukturkorrelationen auftreten.

Um eine hohe Auflösung innerhalb der streng begrenzten Meßzeit zu erreichen, verwendeten wir weiße Neutronenstrahlung mit Flugzeitdetektion an der SCD-Meßstelle der Intense Pulsed Neutron Source.^[9] Die Struktur enthält 75 unabhängige Atome in der asymmetrischen Einheit, womit sie eine der größten Strukturen ist, die durch Neutronenstreuung bei hoher Auflösung ($d_{\min} > 0.38$ Å) untersucht worden sind. Die hohe Auflösung ist entscheidend, um die thermische Bewegung der Atome richtig zu erfassen. Die

[*] Dr. B. B. Iversen, J. Overgaard, B. Schiøtt, F. K. Larsen
Department of Chemistry, University of Aarhus
DK-8000 Aarhus (Dänemark)
Fax: (+45) 86196199
E-mail: bo@kemi.aau.dk

Dr. A. J. Schultz
Intense Pulsed Neutron Source, Argonne National Laboratory
Argonne, IL 60439 (USA)

Dr. J. Macdonald
Department of Chemistry, Northern Arizona University
Flagstaff, AZ 86011 (USA)

[**] Die Arbeit am Argonne National Laboratory wurde vom U.S. Department of Energy, BES-Materials Science, gefördert (contract No. W-31-109-ENG-38), die Forschungsarbeiten am Synchrotron durch ein DANSYNC-Stipendium der Danish Research Councils. Die SUNY-X3-Beamline am NSLS wird von der Division of Basic Energy Sciences des U.S. Department of Energy (DE-FG02-86ER45231) unterstützt.

Tabelle 1. Topologische Eigenschaften der kurzen, starken Wasserstoffbrückenbindungen. ρ ist die Elektronendichte und $\nabla^2\rho$ der Laplace-Operator an den kritischen Bindungspunkten. q_1 und q_2 sind die aus der Ladungsdichte abgeleiteten Atomladungen. V und T sind die Dichten der potentiellen bzw. der kinetischen Energie. E_{HB} ist die Wasserstoffbrückenbindungsenergie.

Bindung	D_{Neutron} [Å]	$\angle \text{N-H}\cdots\text{O}$ [°]	ρ [e Å ⁻³]	$\nabla^2\rho$ [e Å ⁻⁵]	$q_1^{[a]}$	$q_2^{[a]}$	$V^{[b]}$ [kcal mol ⁻¹]	$T^{[b]}$ [kcal mol ⁻¹]	$E_{\text{HB}} = -\frac{1}{2}V^{[c]}$ [kcal mol ⁻¹]
A	N1A–O1A	2.613(2)	154.5(5)						
	N1A–H1A	1.046(4)		2.00	–30.7	–0.04	0.23		
	H1A–O1A	1.631(4)		0.37	3.2	0.23	–0.20	–34.9 (–33.8) ^[d]	28.0 (33.5)
B	N3A–O8	2.685(2)	171.2(4)						
	N3A–H3A	1.056(4)		1.87	–29.9	–0.08	0.28		
	H3A–O8	1.637(4)		0.41	1.8	0.28	–0.38	–37.8 (–33.0)	24.8 (32.9)
C	N1B–O1B	2.676(2)	157.2(4)						
	N1B–H1B	1.049(4)		2.00	–34.6	–0.05	0.28		
	H1B–O1B	1.678(4)		0.30	3.0	0.28	–0.20	–26.2 (–28.4)	23.0 (29.4)

[a] Basierend auf einer sphärischen Kappa-Verfeinerung. [b] Y. A. Abramov, *Acta Crystallogr. Sect. A* **1997**, 53, 264–272. [c] E. Espinosa, E. Molins, C. Lecomte, *Chem. Phys. Lett.* **1998**, 285, 170–173. [d] Werte in Klammern sind nach Korrelationen berechnet, die in Lit. [c] für gewöhnliche Wasserstoffbrückenbindungen bestimmt wurden.

Verfeinerung anharmonischer, thermischer Parameter liefert eine experimentelles Kriterium, mit dem die Form der Potentialenergiefläche für den Protonenübergang untersucht werden kann.^[7] Daten aus Röntgenbeugungsexperimenten bei entsprechenden Temperaturen wurden für zwei verschiedene Kristalle gesammelt, wobei sowohl Synchrotronstrahlung als auch Strahlung aus einer konventionellen Röntgenröhre verwendet wurde. Die Synchrotrondaten wurden bis zu hoher Auflösung an der Strahlenquelle X3A1 der National Synchrotron Light Source mit Image-plate-Detektoren gesammelt; aus technischen Gründen waren jedoch die niedrig aufgelösten Daten nicht vollständig, weswegen sie an einem Vierkreis-Diffraktometer mit konventioneller Röntgenquelle gemessen wurden. Da die Auslöschung in beiden Kristallen vernachlässigbar war, wurden die beiden Datensätze simultan in der LD-Modellierung verfeinert.

Kein Atom wies signifikante anharmonische thermische Parameter bei der Verfeinerung gegen die Daten aus dem Neutronenstreuungsexperiment auf. Weiterhin sind die mittleren atomaren Auslenkungsparameter Größenmäßig nicht auffällig. Dieses Ergebnis zeigt, daß die Potentialenergiefläche aller Wasserstoffbrückenbindungen im Komplex zwei getrennte Mulden eines harmonischen Potentials enthalten. Die aus den Daten der Neutronenstreuungsexperimenten abgeleiteten Strukturparameter der 25 Wasserstoffatome wurden als feste Werte bei der Verfeinerung gegen die Daten aus den Röntgenbeugungsexperimenten verwendet. Die Ladungsdichte wurde mit dem Multipol-Modell von Hansen und Coppens modelliert,^[10] welches präzise die asphärische Dichteverteilung für Verbindungen beschreibt, die Elemente der zweiten Periode enthalten.

Die Bindungslängen und topologischen Eigenschaften der drei kurzen Wasserstoffbrückenbindungen sind in Tabelle 1 aufgeführt. Die Daten aus den Neutronenstreuungsexperimenten belegen eine deutliche Vergrößerung des N–H–Abstandes im Vergleich zu Systemen mit schwachen Bindungen (1.0 Å), und die Verlängerung stimmt sehr gut mit der von Steiner eingeführten Korrelation der N–H- und H \cdots O–Abstände überein.^[5b] Die Daten verdeutlichen, daß alle Wasserstoffatome an den Stickstoffatomen lokalisiert sind und daß keines in LBHBs einbezogen ist. Das Fehlen der LBHBs wird von der topologischen Analyse unterstützt, die

ergibt, daß die O \cdots H–Wechselwirkungen überwiegend elektrostatische Wechselwirkungen ($\nabla^2\rho > 0$) zwischen Atomen mit abgeschlossener Elektronenschale sind (Abbildung 3). Es ist jedoch ersichtlich, daß insbesondere die Bindung B eine erhebliche Polarisierung des Laplace-Operators der Elektronendichtefunktion in Richtung des Acceptoratoms aufweist. Madsen et al. haben gezeigt, daß in LBHBs der grundlegende Charakter der Wechselwirkungen von dem in längeren Wasserstoffbrückenbindungen verschieden ist und daß das Wasserstoffatom an beide Heteroatome teilweise kovalent gebunden wird.^[7]

Wenn der Abstand der Heteroatome allein die Art der Wasserstoffbrückenbindung bestimmt, dann könnte anhand der hier beschriebenen Untersuchungen eine Obergrenze für den Abstand von N–H \cdots O–LBHBs in Enzymen (2.613(2) Å) definiert werden. Bestimmte Eigenschaften der N–H \cdots O–Bindung deuten jedoch darauf hin, daß weitere Faktoren von Bedeutung sind. So ist zum Beispiel der N–H–Abstand in der Bindung B nur geringfügig größer als der in Bindung A, obwohl die N \cdots O- und O \cdots H–Abstände in Bindung B größer sind (Abbildung 1, Tabelle 1). Des weiteren ist Bindung B eine Zweizentren-Bindung, während die Bindungen A und C Dreizentren-Bindungen mit längeren sekundären H–Brücken–Wechselwirkungen sind (O2A \cdots H1A 2.312(5) Å, O2B \cdots H1B 2.242(5) Å). Diese sekundären Wechselwirkungen vergrößern die N–H–Abstände in den Bindungen A und C weiter. Der größere N–H–Abstand in Bindung B könnte auf die bessere pK_a -Wert-Angleichung zwischen Betain (1.8) und dem Imidazolium-Ion (7.0) als zwischen dem Imidazolium-Ion und Pikrinsäure (0.4) ($pK_a(\text{Imidazol}) = 10.5$) zurückzuführen sein. Die topologische Analyse ergibt, daß die stärkste Wasserstoffbrückenbindung in Bindung B gebildet wird, obwohl alle drei Wasserstoffbrückenbindungen starke Bindungsenergien aufweisen, die solche von gewöhnlichen H–Brücken (2–10 kcal mol⁻¹) übersteigen. Tatsächlich sind die Bindungsenergien (E_{HB}) denen der LBHBs von Benzoyl-aceton (16 kcal mol⁻¹) sehr ähnlich.^[4c] Diese Untersuchung beweist, daß kurze, starke Wasserstoffbrückenbindungen nicht vom Low-barrier-Typ sein müssen. Die Abschätzung der Bindungsenergie E_{HB} ist jedoch nur für elektrostatische Wechselwirkungen streng gültig; die hier untersuchten Wasserstoffbrückenbindungen weichen von den Korrelationen ab,

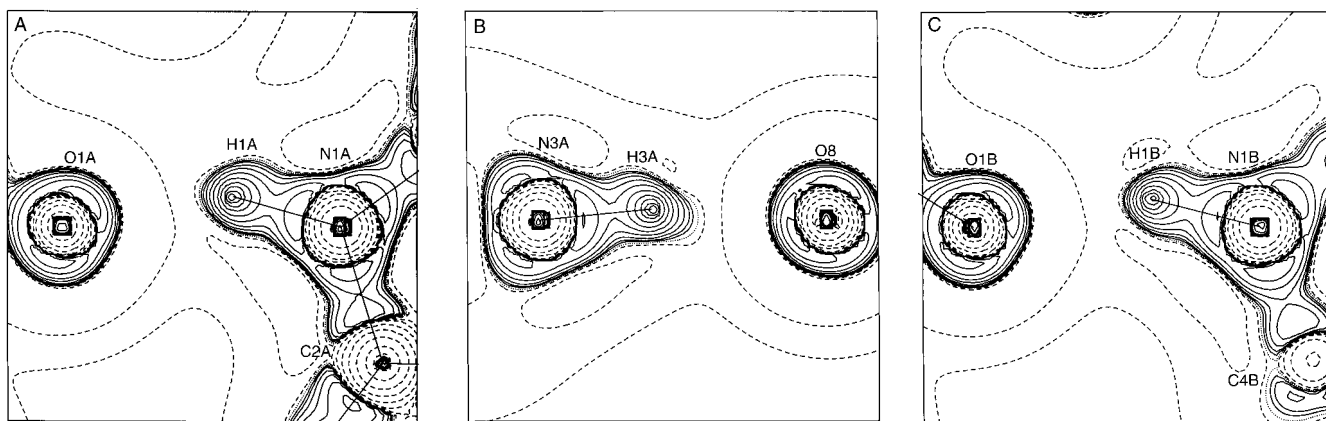


Abbildung 3. Konturdiagramm des negativen Laplace-Operators der Elektronendichtefunktion auf der Ebene der drei starken N-H...O-Wasserstoffbrückenbindungen. A) N1A-H1A...O1A; B) N3A-H3A...O8; C) N1B-H1B...O1B. Die Konturen sind in logarithmischen Intervallen von $1.0 \times 10^2 \text{ e } \text{\AA}^{-3}$ gezeichnet. Die gepunktete Linie ist die Nulllinie. Durchgezogene Linien geben positive, gestrichelte Linien negative Konturen wieder.

die zuvor für eine große Zahl gewöhnlicher Wasserstoffbrückenbindungen bestimmt worden sind.^[11] Unsere Daten deuten daher darauf hin, daß die starken H-Brücken im untersuchten Komplex nicht ausschließlich elektrostatischen Charakter haben. Der kleinere positive Wert für $\nabla^2\rho$ von Bindung B zeigt, daß Bindung B den am stärksten kovalenten Charakter aufweist und somit am ehesten einem LBHB-System entspricht. Darüber hinaus sind die Atomladungen in Bindung B größer als die in den beiden anderen Wasserstoffbrückenbindungen (Tabelle 1), aber immer noch kleiner als die in der LBHB von Benzoylacetone (O $-0.51(5)$, H $+0.40(3)$, O $-0.45(4)$).^[7] Der Übergang zur kovalenten Bindung scheint ohne plötzliche Änderungen im Charakter der H-Brücken-Wechselwirkung einzutreten. Bemerkenswerterweise entspricht die Bindung, die am besten die Wechselwirkung zwischen His 57 und Asp 102 nachahmt (Bindung B), auch am ehesten einer LBHB. Es ist anzunehmen, daß zum Erreichen des LBHB-Charakters in Bindung B Ladung an N3A zugeführt und, in geringerem Ausmaß, von H3A abgezogen werden muß. Wenn H-Brücken vom Low-barrier-Typ tatsächlich in Enzymen vorliegen, dann müssen andere, im hier vorgestellten Modell unwirksame Faktoren für die Ladungsverschiebung verantwortlich sein. Eine mögliche Erklärung könnte die elektronenschiebende CH_2 -Gruppe sein, die im Histidin vorhanden ist, im Imidazol aber fehlt. Gegenwärtig führen wir mit unserem Modellsystem Ab-initio-Rechnungen auf hohem Niveau durch, um weitere Informationen über die Triade zu gewinnen und einen detaillierten Vergleich mit den experimentellen Ergebnissen durchführen zu können.

Experimentelles

Der Cokristall aus $\text{C}_5\text{NO}_2\text{H}_{11}$, $\text{C}_3\text{N}_2\text{H}_5$ und $\text{C}_6\text{N}_3\text{O}_7\text{H}_2$ ($\text{C}_{23}\text{N}_{11}\text{O}_{16}\text{H}_{25}$ in der asymmetrischen Einheit, $M = 711.51 \text{ g mol}^{-1}$) gehört zur monoklinen Raumgruppe $C2/c$. Die kristallographischen Daten (ohne Strukturdaten) der in dieser Veröffentlichung beschriebenen Struktur wurden als „supplementary publication no. CCDC-112286“ beim Cambridge Crystallographic Data Centre hinterlegt. Kopien der Daten können kostenlos bei folgender Adresse in Großbritannien angefordert werden: CCDC, 12 Union Road, Cambridge CB21EZ (Fax: (+44)1223-336-033; E-mail: deposit@ccdc.cam.ac.uk).

Neutronenstreuung: $T = 28(1) \text{ K}$, $a = 33.536(5) \text{ \AA}$, $b = 7.636(1) \text{ \AA}$, $c = 25.066(4) \text{ \AA}$, $\beta = 114.90(1)^\circ$, $V = 5822(2) \text{ \AA}^3$, $V_{\text{Kristall}} = 13.2 \text{ mm}^3$, $0.7 < \lambda < 4.2 \text{ \AA}$, vollständige Daten bis zu $(\sin\theta/\lambda)_{\text{max}} = 0.81 \text{ \AA}^{-1}$, Teildaten bis zu $(\sin\theta/\lambda)_{\text{max}} = 1.3 \text{ \AA}^{-1}$, μ_a (wahre Absorption bei $\lambda = 1.8 \text{ \AA}$) $= 1.22 \text{ cm}^{-1}$, μ_s (Gesamtstreuung) $= 1.15 \text{ cm}^{-1}$ (Absorptionskorrektur durchgeführt), 29014 gemessene Reflexe.

Röntgenbeugungsexperimente am Synchrotron: $T = 28(1) \text{ K}$, $a = 33.54(2) \text{ \AA}$, $b = 7.64(2) \text{ \AA}$, $c = 24.98(4) \text{ \AA}$, $\beta = 114.76(5)^\circ$, $V = 5813(30) \text{ \AA}^3$, $V_{\text{Kristall}} = 0.001 \text{ mm}^3$, $\lambda = 0.643(1) \text{ \AA}$, $(\sin\theta/\lambda)_{\text{max}} = 1.08 \text{ \AA}^{-1}$, $\mu_1 = 0.08 \text{ cm}^{-1}$ (keine Absorptionskorrektur), 98 132 gemessene Reflexe, davon 15 657 unabhängige, $R_{\text{int}} = 0.030$.

Röntgenbeugungsexperimente mit herkömmlicher Röntgenröhre: $T = 10(1) \text{ K}$, $a = 33.57(1) \text{ \AA}$, $b = 7.640(2) \text{ \AA}$, $c = 25.031(8) \text{ \AA}$, $\beta = 114.84(2)^\circ$, $V = 5826(6) \text{ \AA}^3$, $V_{\text{Kristall}} = 0.058 \text{ mm}^3$, $\lambda = 0.5616 \text{ \AA}$, $(\sin\theta/\lambda)_{\text{max}} = 0.51 \text{ \AA}^{-1}$, $\mu_1 = 0.06 \text{ cm}^{-1}$ (keine Absorptionskorrektur), 16 382 gemessene Reflexe, davon 3187 unabhängige, $R_{\text{int}} = 0.016$.

Verfeinerung bei der Neutronenstreuung: $N_{\text{obs}} = 8867$ ($I > 3\sigma(I)$), $N_{\text{par}} = 708$, $\text{GOF} = 1.79$, $R_F = 0.082$, $R_{\text{wF}} = 0.063$.

Multipol-Verfeinerung: Die O-, N- und C-Atome wurden mit Multipol-Erweiterungen bis zum Octopol-Niveau und zwei radialen Kappa-Parametern für jedes chemisch einzigartige Atom (12 verschiedene Kappa-Sätze) modelliert. Die Wasserstoffatome hatten Multipol-Erweiterungen bis zum Quadrupol-Niveau mit Positionen und anisotropen thermischen Parametern, die von der Neutronenverfeinerung her festgelegt waren. Die Genauigkeit des Modells kann durch einen Vergleich der thermischen Parameter für die Schweratome überprüft werden, die unabhängig voneinander aus den Röntgenbeugungs- und Neutronenstreuungsexperimenten erhalten wurden.^[12] Hier erhalten wir Werte von $\langle \Delta U_{\text{X-N}} \rangle = 0.0009 \text{ \AA}^2$ und $\langle U_{\text{X}}/U_{\text{N}} \rangle = 1.05$. Das zeigt, daß die systematischen Fehler minimal sind und wir daher den statischen Modell-Ladungsdichten vertrauen können. $N_{\text{obs}} = 11 182$ (nur mehrfach gemessene Reflexe), $N_{\text{par}} = 1128$, $\text{GOF} = 1.13$, $R_{F2} = 0.035$, $R_{\text{wF2}} = 0.046$.

Eingegangen am 14. Dezember 1998 [Z12778]

International Edition: *Angew. Chem. Int. Ed.* **1999**, 38, 1239–1242

Stichwörter: Enzymkatalyse • Ladungsdichte • Neutronenbeugung • Serinproteasen • Wasserstoffbrücken

- [1] D. M. Blow, J. J. Birks, B. S. Hartley, *Nature* **1969**, 211, 337–340.
- [2] a) W. W. Cleland, M. M. Krevoy, *Science* **1994**, 264, 1887–1890; b) P. A. Frey, S. A. Whitt, J. B. Tobin, *Science* **1994**, 264, 1927–1935.
- [3] A. Warshal, A. Papazyan, P. A. Kollman, *Science* **1995**, 269, 102–104.
- [4] a) M. Garcia-Viloca, A. Gonzalez-Lafont, J. M. Lluch, *J. Am. Chem. Soc.* **1997**, 119, 1081–1086; b) G. A. Kumar, M. A. McAllister, *J. Am. Chem. Soc.* **1998**, 120, 3159–3165; c) B. Schjøtt, B. B. Iversen, G. H. K. Madsen, T. C. Bruice, *J. Am. Chem. Soc.* **1998**, 120, 12117.

- [5] a) G. Gilli, F. Bellucci, V. Ferretti, V. Bertolasi, *J. Am. Chem. Soc.* **1989**, *111*, 1023–1028; b) T. Steiner, *J. Phys. Chem. A* **1998**, *102*, 7041–7052.
- [6] F. Hibbert, J. Emsley, *J. Adv. Phys. Org. Chem.* **1990**, *26*, 255–379.
- [7] a) E. D. Stevens, M. S. Lehmann, P. Coppens, *J. Am. Chem. Soc.* **1977**, *99*, 2829–2831; b) G. K. H. Madsen, B. B. Iversen, F. K. Larsen, M. Kapon, G. M. Reisner, F. H. Herbst, *J. Am. Chem. Soc.* **1998**, *120*, 10040–10045.
- [8] R. F. W. Bader, *Atoms in molecules. A quantum theory*, Oxford University Press, Oxford, **1990**.
- [9] A. J. Schultz, K. Srinivasan, R. G. Teller, J. M. Williams, C. M. Lukehart, *J. Am. Chem. Soc.* **1984**, *106*, 999–1003.
- [10] a) N. K. Hansen, P. Coppens, *Acta Crystallogr. Sect. A* **1978**, *34*, 909–921; b) T. Koritsanszky, S. T. Howard, P. R. Mallinson, Z. Su, T. Richter, N. K. Hansen, *Program X D, ein Computerprogramm zur Multipol-Verfeinerung und Analyse von Ladungsdichten aus Diffraktionsdaten*, Institut für Kristallographie der Freien Universität, Berlin, **1995**.
- [11] E. Espinosa, E. Molins, C. Lecomte, *Chem. Phys. Lett.* **1998**, *285*, 170–173.
- [12] B. B. Iversen, F. K. Larsen, B. N. Figgis, P. A. Reynolds, A. J. Schultz, *Acta Crystallogr. Sect. B* **1996**, *52*, 923–931.

Tripodale, „supergeladene“ Analoga von Adenosinnucleotiden: Inhibitoren des Fhit-Proteins, einer Ap₃A-Hydrolase**

Xiaohai Liu, Charles Brenner, Andrzej Guranowski, Elzbieta Starzynska und G. Michael Blackburn*

Die vor mehr als dreißig Jahren entdeckten Diadenosinpolyphosphate^[1] sind ubiquitäre Bestandteile aller Zellen. Vor kurzem wurde erkannt, daß Diadenosintriphosphat und -tetraphosphat – Ap₃A bzw. Ap₄A – als Liganden des Tumorsuppressorproteins Fhit große Bedeutung haben.^[2a] Fhit ist eine Ap₃A-Hydrolase,^[2b] deren Signalfunktion über das Binden von Ap_nA gesteuert wird.^[3] Wir interessieren uns für spezifische Enzyme des Dinucleosidpolyphosphat-Katabolismus,^[2a, 4, 5] für die Chemie^[6] dieser Verbindungen und für Disubstratanaloga von Phosphoglycerat^[7] und anderen Kinasen und stellen hier die Synthese neuartiger Disubstratanaloga vor, die mit dem Übergangszustand der Ap₄A-Hydrolyse isopolar^[8] sind.

Ein Kernproblem bei derartigen Bemühungen ist, daß die negative Ladung eines linearen Disubstrat-Nucleotidanalogs unvermeidlich geringer ist als die im Übergangszustand der entsprechenden Phosphoryltransferreaktion. So wandelt Adenylat-Kinase (AK) zwei ADP-Moleküle (Nettoladung –6) über einen trigonal-bipyramidalen Übergangszustand der Ladung –6 in AMP und ATP um. Das Disubstratanalogon für diese Reaktion, Ap₄A, hat eine Ladung von lediglich –4. Daher ist es nicht überraschend, daß Ap₅A ($K_i = 30 \text{ nM}$) ein viel besserer Inhibitor von AK ist als Ap₄A ($K_i = 10 \text{ } \mu\text{M}$),^[9] wobei allerdings zu bedenken ist, daß die Konformation der Phosphatkette ebenfalls zu diesem Unterschied beitragen könnte. Analog spaltet Lupinen-Ap₄A-Hydrolase Ap₄A in AMP und ATP über einen trigonal-bipyramidalen In-line-Übergangszustand^[10] der Ladung –5. Daher sollte ein erfolgversprechender Zugang zu besseren auf Disubstratanaloga basierenden Inhibitoren für viele Phosphoryltransferenzyme die Nutzung von Pyrophosphatmimetika sein, die zusätzliche negative Ladungen durch Verzweigungen statt durch eine Verlängerung der Phosph(on)atkette integrieren. Vor kurzem beschrieben wir die Synthese einiger derartiger supergeladener Analoga von Pyrophosphorsäure (**1**, **5**) und ihren Einbau in ATP-Analoga^[11] und berichten nun über ihren Einbau in ADP- und Diadenosinpolyphosphat-Analoga und insbesondere über die neuartige Verwendung der C₃-symmetrischen Verzweigungsstelle von Methantrisphosphorsäuren zur Erzeugung tripodaler Adenosinnucleotid-Analoga.

Diese Produkte unterscheiden sich bei der kompetitiven Inhibierung von zwei Diadenosintriphosphat-Hydrolasen. Ap_nA-Hydrolasen scheinen zumindest zwei evolutionäre Gruppen zu umfassen. Das Produkt des menschlichen Fhit-Gens gehört zur Histidinriaden-Überfamilie^[12a] der nucleotidbindenden Proteine, zu der Homologe in Tieren und Pilzen existieren. Andere Ap_nA-Hydrolasen sind mit mutT^[12b] verwandt und werden in allen Lebensformen gefunden. Da das Fhit-Protein ein Tumorsuppressorprotein ist, das in der Frühphase der Entwicklung von Epithelkarzinomen deaktiviert wird,^[12c] es aber nicht das einzige Enzym ist, das Ap₃A spalten kann, besitzen neue chemische Bausteine, die zwischen dem Fhit-Protein und anderen Ap_nA-Hydrolasen differenzieren, ein großes Potential in der Krebsdiagnostik.

Methantrisphosphorsäure **1** wurde von Gross et al. 1993 beschrieben.^[13] Wesentliche Verbesserungen der damaligen Synthesemethode ermöglichten uns inzwischen, auch Chlor- und Fluormethantrisphosphorsäuren in brauchbaren Mengen herzustellen.^[14] Verbindung **1** wurde nach Poulter et al.^[15] leicht in das ADP-Analogon **2** und mit der Phosphormorpholidatprozedur von Khorana und Moffatt^[16] in das ATP-Analogon **3** überführt (Schema 1). Bei der Synthese von **3** wurde AMP-Morpholidat im Unterschuß eingesetzt, bei der des Diadenosintetraphosphatanalogons **4** – aus Chlormethantrisphosphonat **5** – dagegen im Überschuß. Die beiden primären Phosphonsäurefunktionen in **2** und **3** waren die Angriffspunkte für eine doppelte Adenylierung mit einer modifizierten Khorana-Moffatt-Prozedur in der Synthese von zwei neuartigen tripodalen Nucleotidanaloga (**7** bzw. **6** in Schema 1). Die Reaktion des Tris-tri-*n*-butylammoniumsalzes

[*] Prof. G. M. Blackburn, X. Liu
Krebs Institute, Department of Chemistry
Sheffield University
Sheffield, S3 7HF (Großbritannien)
Fax: (+44) 114-273-8673
E-mail: g.m.blackburn@sheffield.ac.uk

Prof. C. Brenner
Kimmel Cancer Institute, Thomas Jefferson University
Philadelphia (USA)

Prof. A. Guranowski, E. Starzynska
Akademia Rolnicza, Poznan (Polen)

[**] Diese Arbeit wurde durch das BBSRC (ROPA/MOLO4558 und B08013), das KBN (Projekt 6P04A06215) und das US National Cancer Institute (CA75954) gefördert. Wir danken Dr. K. R. Gayler (Melbourne University, Australien) und Dr. A. G. McLennan (Liverpool University, Großbritannien) für die überexprimierten (asymmetrischen) Ap_nA-Hydrolasen aus Lupinen bzw. dem Menschen sowie Peter Ashton (Birmingham University) für seine Hilfe bei den hochauflösenden massenspektrometrischen Analysen.