

Es erschien denkbar, daß das durch Proteolyse entstehende Methionin durch *Penicillium Camemberti* nicht nur zu Methioninol reduziert wird, sondern darüber hinaus auch in Form des Adenosyl-Methionins („aktives Methyl“) als Methylgruppen-Donor für Methioninol auftritt. Es war daher naheliegend, das an der Aminogruppe methylierte Methioninol auf seinen Geruch zu überprüfen. Bei der Synthese des *N*-Dimethylmethioninols wurde vom Methioninmethylester ausgegangen, der zunächst mit Formaldehyd und Ameisensäure an der Aminogruppe methyliert wurde. Der entstandene *N*-Dimethylmethioninmethylester wurde schließlich mit Lithiumaluminiumhydrid zum *N*-Dimethylmethioninol reduziert.

Das auf diesem Wege synthetisierte *N*-Dimethylmethioninol (2-Dimethylamino-4-methylthio-butanol-1) zeigte den intensiven, von *Penicillium Camemberti* auf den verschiedensten Nährböden entwickelten Geruch. Es ist sehr wahrscheinlich, daß diese Substanz bzw. die entsprechende Monomethyl-Verbindung der Hauptaromastoff des Camembert-Käses ist.

#### Versuchsteil

##### *N*-Dimethylmethioninmethylester

Zu 82 g Methioninmethylester (0,5 Mol) wurden 182 g Ameisensäure (2 Mole) und 30 g Formaldehyd (1 Mol, gelöst in 100 ml absol. Methanol) gegeben, und die Mischung so lange unter Rückfluß am Sieden gehalten, bis keine CO<sub>2</sub>-Entwicklung mehr zu beobachten war. Das gelb gefärbte Reaktionsgemisch wurde

mit konz. Ammoniak schwach alkalisch (Phenolphthalein) gemacht, das Methanol i. Vak. abgezogen und der Rückstand mit Äther extrahiert. Nach dem Trocknen der ätherischen Lösung wurde der Äther abgezogen und das zurückbleibende Öl i. Vak. destilliert.

Es wurden 70 g (= 65% d. Th.) eines farblosen Öls vom Sdp.<sub>12</sub> = 113–115° erhalten.

C<sub>8</sub>H<sub>17</sub>O<sub>2</sub>NS (191,3) Ber. N 7,32,  
Gef. N 7,33.

##### *N*-Dimethylmethioninol

95,6 g *N*-Dimethylmethioninmethylester (0,5 Mol) wurden in 200 ml absol. Äther gelöst und zu einer Mischung von 19 g Lithiumaluminiumhydrid (0,5 Mol) und 500 ml absol. Äther zugetropft. Es wurde anschließend noch 30 Min. auf dem Wasserbad erhitzt. Nachdem das Reaktionsgemisch unter Eiskühlung vorsichtig mit einem Überschuß von Wasser versetzt worden war, wurde die ätherische Phase abgetrennt, filtriert und getrocknet. Nach dem Abziehen des Äthers wurde der Rückstand i. Vak. fraktioniert.

Es wurden 74 g (= 92% d. Th.) eines schwach gelbliches Öles vom Sdp.<sub>12</sub> = 128° erhalten. Die Verbindung hat ein intensives Camembert-Aroma.

C<sub>7</sub>H<sub>17</sub>ONS (163,3) Ber. N 8,58,  
Gef. N 8,55.

Wir danken dem Fonds der Chemischen Industrie und der Deutschen Forschungsgemeinschaft für die finanzielle Unterstützung der Arbeit.

### Zum Mechanismus der *p*-Fluorphenylalanin-Resistenz bei Bakterien; zellfreie Synthese von Poly-*p*-fluorphenylalanin

VON A. WACKER, R. SELZER, D. PFAHL UND R. SCHMITT  
Institut für Therapeutische Biochemie der Universität  
Frankfurt (Main)

(Z. Naturforsch. 19 b, 1083–1084 [1964]; eingegangen am 31. Juli 1964)

*p*-Fluorphenylalanin, ein Antagonist des Phenylalanins, hemmt sowohl die Vermehrung von Bakterien und Viren als auch die Induktion von Enzymen<sup>1</sup>. Kultiviert man *E. coli* B., dessen Wachstum schon durch 4 µg/ml *p*-Fluorphenylalanin halbmaximal gehemmt wird, mehrere Passagen hindurch in Gegenwart steigender Mengen dieses Antimetaboliten, so beeinflussen nach 24 Passagen auch 320 µg/ml *p*-Fluorphenylalanin nicht mehr das Wachstum.

Es war nun von Interesse, bei dem empfindlichen und zwei gegen verschiedene Konzentrationen von *p*-Fluorphenylalanin-resistenten Stämmen von *E. coli* B. einmal die Aufnahme von Phenylalanin und *p*-Fluorphenylalanin zu bestimmen und zum anderen mit zell-

freien Extrakten aus diesen Bakterien<sup>2</sup> die Biosynthese des Poly-phenylalanins und Poly-*p*-fluorphenylalanins näher zu untersuchen.

Wie aus Tab. 1 hervorgeht, nehmen 100 mg getrocknete Bakterien, die gegen *p*-Fluorphenylalanin empfindlich sind, 4,3 µMol Phenylalanin auf. Bei dem Stamm, der gegen 32 µg/ml *p*-Fluorphenylalanin resistent ist, verringert sich die Aufnahme des Phenylalanins um 14%, bei dem 320 µg resistenten Stamm um 7% im Vergleich zum Wildtyp. Bei der Aufnahme des *p*-Fluorphenylalanins beobachtet man dagegen bei den resistenten Stämmen eine stetige Abnahme. Ermittelt man den Wert der *p*-Fluorphenylalanin-Aufnahme für den empfindlichen Stamm durch Extrapolation, so zeigt sich, daß im Vergleich hierzu der 32 µg resistente Stamm weit weniger als die Hälfte aufnimmt. Beim 320 µg resistenten Stamm sind es nur noch 0,3 µMol. Danach hat sich beim resistenten Stamm die Affinität zum Metaboliten Phenylalanin nicht wesentlich verändert, dagegen die zum Antimetaboliten *p*-Fluorphenylalanin.

Wie aus Tab. 2 hervorgeht, werden in dem zellfreien System der Proteinbiosynthese nach NIRENBERG und

<sup>1</sup> M. H. RICHMOND, Bacteriol. Rev. 26, 398 [1962].

<sup>2</sup> M. W. NIRENBERG u. J. H. MATTHAEI, Proc. nat. Acad. Sci. USA 47, 1588 [1961].

<i>E. coli</i> B.	<i>p</i> -Fluorphenylalanin		
	empfindlich (halbmax. Hemmung 4 $\mu$ g/ml)	resistent (32 $\mu$ g/ml)	resistent (320 $\mu$ g/ml)
Phenylalanin	4,3	3,7	4,0
Aufnahme von ( $\mu$ Mol/100 mg getrockneter Bakterien)			
<i>p</i> -Fluorphenyl- alanin	1,6	0,6	0,3
% Aufnahme von <i>p</i> -Fluorphenyl- alanin im Ver- gleich zu Phenyl- alanin = 100%	37,2	16,2	7,8

Tab. 1. Aufnahme von radioaktivem Phenylalanin und *p*-Fluorphenylalanin durch wachsende Zellen von *E. coli* B. Zahlenangabe:  $\mu$ Mol/100 mg getrockneter Bakterien. Die Bakterien wurden in Gegenwart von 10  $\mu$ g/ml DL-Phenylalanin-[1- $^{14}$ C] spez. Aktivität 1 mC/mMol oder DL-*p*-Fluorphenylalanin-[3- $^{14}$ C] spez. Aktivität 1 mC/mMol 24 Stdn. kultiviert, danach vom Nährmedium (Zusammensetzung mg/ml:  $K_2HPO_4$  2,5, Na-citrat 20, Glucose 20,  $NH_4H_2PO_4$  2,5, Adenin 0,01, Alanin 0,2, Vitaminmischung, Spurenelemente) abzentrifugiert und 5-mal mit dest. Wasser gewaschen. Zur Bestimmung der Radioaktivität wurden die Bakterien in dest. Wasser suspendiert, 1 ml dieser Suspension mit 9 ml Szintillationsflüssigkeit vermischt und im Tricarb 314 EX ausgemessen. Zum Vergleich der einzelnen Ansätze wurde auf gleiche Zellzahl umgerechnet. Die ausgemessenen Zahlenwerte sind Mittelwerte mehrerer Experimente.

MATTHAEI<sup>2</sup> mit Poly-U als m-RNS im Vergleich zu Phenylalanin nur 33% des *p*-Fluorphenylalanins in ein Polypeptid eingebaut. Isoliert man die Ribosomen, die t-RNS und die Enzyme aus den 32  $\mu$ g resistenten Stamm, so sinkt die Biosynthese des Poly-*p*-fluorphenylalanins von 33 auf 24% und mit den Fraktionen des 320  $\mu$ g resistenten Stammes sogar von 33 auf 17,8 Prozent.

Es zeigt sich demnach, daß sowohl in vivo (wachsende Zellen) als auch in vitro (zellfreies System) die Resistenz gegen *p*-Fluorphenylalanin einem verminderten Einbau der analogen Aminosäure in das Protein gleichkommt. Der Grad der Resistenz läßt sich quantitativ durch die Menge des eingebauten bzw. polymerisierten *p*-Fluorphenylalanins im Vergleich zum Phenylalanin bestimmen, wobei es anscheinend bei den von uns isolierten resistenten Mutanten einen kontinuier-

<i>E. coli</i> B.	<i>p</i> -Fluorphenylalanin		
	empfindlich (halbmax. Hemmung 4 $\mu$ g/ml)	resistent (32 $\mu$ g/ml)	resistent (320 $\mu$ g/ml)
Phenylalanin	2,60	2,56	2,80
Einbau von (m $\mu$ Mol/mg ribosomales Protein)			
<i>p</i> -Fluorphenyl- alanin	0,86	0,61	0,50
% Einbau von <i>p</i> -Fluorphenyl- alanin im Ver- gleich zu Phenyl- alanin = 100%	33	24	17,8

Tab. 2. Zellfreie Proteinsynthese mit Phenylalanin und *p*-Fluorphenylalanin. *E. coli* B., *E. coli* B. resistent 32  $\mu$ g/ml und 320  $\mu$ g/ml *p*-Fluorphenylalanin wurden unter starker Belüftung kultiviert (Medium mg/ml: Glucose 10,  $K_2HPO_4$  11,  $KH_2PO_4$  8,5, Difco Yeast Extract 6) und in der frühen Wachstumsphase geerntet. t-RNS<sup>3</sup> 1 mg/ml; Poly-U (Miles Chem. Comp.) 80  $\mu$ g/ml; DL-Phenylalanin-[3- $^{14}$ C] spez. Aktivität 3,5 mC/mMol 0,96  $\mu$ Mol/ml; DL-*p*-Fluorphenylalanin-[3- $^{14}$ C] spez. Aktivität 3,5 mC/mMol 0,96  $\mu$ Mol/ml; 37 °C 30 Min.; Ausfällung der Polypeptide nach MANS und NOVELLI<sup>5</sup>. Die angegebenen Zahlenwerte sind Mittelwerte mehrerer Experimente.

lichen Übergang von der Empfindlichkeit bis zur Ausbildung der vollen Resistenz gibt.

Um zu sehen, welches Enzymsystem (Systeme) für die Ausbildung der *p*-Fluorphenylalanin-Resistenz verantwortlich ist, haben wir vorläufige Versuche mit der Aminosäure-Synthetase<sup>3</sup> unternommen. Dabei fanden wir, daß die Akzeptoraktivität der t-RNS vom empfindlichen zum 32  $\mu$ g resistenten Stamm für Phenylalanin um 40% und für *p*-Fluorphenylalanin um 80% abgenommen hat.

In einer späteren, ausführlichen Mitteilung werden wir insbesondere die Ausbildung der verschiedenen *p*-Fluorphenylalanin-Resistenzgrade und ihre molekularbiologisch-genetischen Aspekte behandeln. Wir sehen uns zu dieser kurzen Mitteilung veranlaßt, nachdem soeben einige Arbeitsgruppen<sup>4</sup> teilweise über ähnliche Ergebnisse mit *p*-Fluorphenylalanin berichtet haben.

Wir danken Fräulein G. HERRMANN für ausgezeichnete Mithilfe bei den Versuchen und dem Verband der Chemischen Industrie für die Unterstützung dieser Arbeit.

<sup>5</sup> R. J. MANS u. G. D. NOVELLI, Arch. Biochem. Biophysics **94**, 48 [1961].

<sup>4</sup> T. F. DUNN, JR. u. F. R. LEACH, Federat. Proc. **23**, 381 [1964]; H. R. V. ARNSTEIN u. M. H. RICHMOND, Biochem. J. **91**, 340 [1964]; E. P. PREVIC u. S. B. BINKLEY, Biochim.

biophysica Acta [Amsterdam] **87**, 277 [1964]; W. L. FANGMAN u. F. C. NEIDHARDT, J. biol. Chemistry **239**, 1839 [1964].

<sup>3</sup> G. ZUBAY, J. molecular Biol. **4**, 347 [1962]; G. VON EHRENSTEIN u. D. DAIS, Proc. nat. Acad. Sci. USA **50**, 81 [1963].