

Untersuchung der Wirkungsweise von Enzymen mit Nucleosidphosphorothioaten

Von Fritz Eckstein^[*]

Nucleosidphosphorothioate sind modifizierte Nucleotide, bei denen ein an ein Phosphoratom gebundenes Sauerstoffatom gegen ein Schwefelatom ausgetauscht ist. Zur Untersuchung der Wirkungsweise von Enzymen sind diese Verbindungen deshalb geeignet, weil sie zwar von Enzymen in vielen Fällen ähnlich gut wie das natürliche Substrat gebunden werden, die enzymatischen Reaktionen aber oft wesentlich langsamer ablaufen. Da Nucleosidthiophosphorsäure-Ester als Diastereomere auftreten, kann mit diesen Verbindungen in geeigneten Fällen die Stereochemie enzymatischer Reaktionen überprüft werden.

1. Einleitung

Die rasche Entwicklung der Molekularbiologie hat u. a. zur Isolierung einer immer größer werdenden Zahl von Enzymen geführt. Obwohl die Funktionen dieser Enzyme bekannt sind, ist das Verständnis der zugrunde liegenden Reaktionen oft bestenfalls nur bruchstückhaft. Es nimmt daher nicht Wunder, daß zahlreiche Arbeitsgruppen sich mit Untersuchungen der Wirkungsweise von Enzymen beschäftigen.

Wenn im Rahmen solcher Arbeiten der Einfluß des natürlichen Substrats auf das Enzym untersucht werden soll, so können sich Schwierigkeiten dadurch ergeben, daß das Substrat vom Enzym umgesetzt wird. Obwohl man Bedingungen finden kann, z. B. durch Änderung des pH-Wertes und Erniedrigung der Temperatur, unter denen sich die Umsetzungsgeschwindigkeit stark verringert und für die Zeit der Beobachtung sehr klein wird, ist nicht ganz auszuschließen, daß dabei die Eigenschaften des Proteins, z. B. seine Konformation, drastisch verändert werden und die so gewonnenen Aussagen nur mit Einschränkungen auf das Protein unter optimalen Bedingungen übertragbar sind.

In solchen Fällen haben sich Analoge der Substrate, die zwar vom Enzym erkannt, d. h. an der Substratbindungsstelle ge-

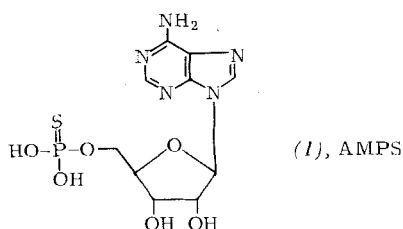
bunden, von ihm aber nicht umgesetzt werden, als kompetitive Inhibitoren als nützlich erwiesen. Mit ihrer Hilfe ist es z. B. möglich, die Zahl der Substratbindungsstellen zu bestimmen und Konformationsänderungen eines Enzyms bei der Bindung des Substrats oder des Analogens festzustellen oder auch die enzymatische Reaktion, falls es sich um eine Mehrsubstratreaktion handelt, an einer bestimmten Stelle zu unterbrechen. Als Beispiel für letzteres sei hier an die Verwendung des β , γ -CH₂-Analogens des Guanosintriphosphats (GTP) in der Proteinbiosynthese erinnert^[1]. Auch zur Bestimmung der Substratbindungsstelle eines Enzyms im Kristall sind kompetitive Inhibitoren als Bestandteile des kristallinen Komplexes von großem Wert^[2].

Arbeiten mit solchen kompetitiven Inhibitoren sind immer der Kritik ausgesetzt, daß die Umwandlung des Substrats in ein nicht reaktives Analoges eine solche Veränderung darstellt, daß die experimentellen Ergebnisse nicht ohne weiteres auf das natürliche Substrat-Enzym-System übertragen werden können. Solche Untersuchungen werden daher um so wertvoller sein, je geringer die Veränderung am Substratmolekül ausfällt, je ähnlicher also der Inhibitor dem Substrat ist.

Die folgende Diskussion soll auf eine Auswahl von Enzymsystemen beschränkt sein, die Nucleotide als Substrate oder Effektoren benutzen und soll zeigen, inwieweit eine Klasse von Nucleotidanalogen, nämlich Nucleosidphosphorothioate (Nucleosidthiophosphate), bei der Untersuchung von Enzy-

[*] Priv.-Doz. Dr. F. Eckstein
Max-Planck-Institut für experimentelle Medizin, Abteilung Chemie
34 Göttingen, Hermann-Rein-Straße 3

men helfen kann. Bei diesen Analogen ist ein an ein Phosphoratom gebundenes Sauerstoffatom durch ein Schwefelatom ersetzt. Hier sollen im wesentlichen Analoge diskutiert werden, bei denen dieses ersetzte Sauerstoffatom nicht Teil einer Esterbindung ist. Die Grundsubstanz für das Adenosin-5'-phosphatanaloge hat dann die Strukturformel (1).



Der Ersatz eines solchen Sauerstoffatoms durch ein Schwefelatom ist eine minimale strukturelle Veränderung der natürlichen Nucleotide. Basen- und Zuckerteil bleiben vollkommen unberührt, ebenso die Zahl der negativen Ladungen. Die erste Dissoziationskonstante ist geringfügig^[3] – um ca. 0.5 pK-Einheiten – von ca. 5.20 auf ca. 4.70 verringert, so daß beim Arbeiten im Neutralen und darüber keine Unterschiede zu den Nucleotiden bestehen. Die geringen strukturellen Unterschiede zwischen Nucleosidphosphaten und den entsprechenden Nucleosidphosphorothioaten werden am besten deutlich beim Vergleich (Tabelle 1) des röntgenstrukturanalytisch untersuchten Cytidin-2',3'-cyclophosphats (2)^[4] und des Uridin-2',3'-O-cyclophosphorothioats (3)^[5] (siehe Abschnitt 3.1). Ähnliche Werte für Abstände und Winkel wurden auch für einen Mg²⁺-Pyridin-Komplex des O,O-Diäthylphosphorothioates gefunden^[6].

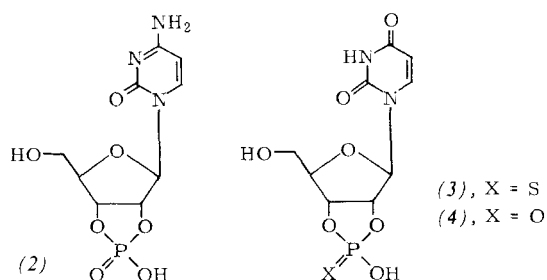


Tabelle 1. Vergleich von Abständen und Winkeln (Mittelwerte) von Cytidin-2',3'-cyclophosphat (2) [4] und Uridin-2',3'-O-cyclophosphorothioat (3) [5].

| | (2) | (3) |
|----------------|------|------|
| P—O [Å] | 1.47 | 1.51 |
| P=S [Å] | — | 1.94 |
| P—O(C) [Å] | 1.61 | 1.57 |
| — | — | 1.61 |
| * O—P—S [°] | — | 117 |
| * O—P—O [°] | 117 | — |
| * S—P—O(C) [°] | — | 111 |
| * O—P—O(C) [°] | 110 | — |

Aus der Röntgen-Strukturanalyse der Phosphorothioate geht hervor, daß die negative Ladung am Sauerstoff und nicht am Schwefel lokalisiert ist. Die Elektronegativitäten von Sauerstoff und Schwefel betragen 3.5 bzw. 2.5, die van-der-Waals-Radien 1.40 bzw. 1.85^[7]. Der Unterschied in der chemischen Reaktivität zeigt sich bei einem Vergleich der beobachteten Reaktionsgeschwindigkeitskonstanten erster Ordnung der

Tabelle 2. Beobachtete Reaktionsgeschwindigkeitskonstanten k [10^{-3} s^{-1}] von Uridin-2',3'-cyclophosphat (4) und Uridin-2',3'-O-cyclophosphorothioat (3).

| | k in 0.15 N HClO ₄ | k in 0.25 N KOH |
|--------------------------|------------------------------------|----------------------|
| Cyclophosphat (4) | 2.3 | 1.2 |
| Cyclophosphorothioat (3) | 0.011 | 0.2 |

Hydrolyse des Uridin-2',3'-cyclophosphats (4) und des Uridin-2',3'-O-cyclophosphorothioats (3)^[8] zu Uridin-2'(3')-phosphat bzw. Uridin-2'(3')-phosphorothioat (Tabelle 2).

Die geringe strukturelle Veränderung, aber die vergleichsweise starke Veränderung der chemischen Reaktivität machen diese Verbindungen für die Untersuchung von nucleotidabhängigen Enzymen interessant. Der anfangs gestellten Forderung nach möglichst geringen Strukturunterschieden zwischen Substratanalogen und Substrat kommen die Nucleosidphosphorothioate sehr entgegen. Auch ein weiterer Gesichtspunkt läßt Nucleosidphosphorothioate attraktiv erscheinen. O-Ester solcher Verbindungen, deren Estergruppe sich vom Nucleosid unterscheidet, sollten als Diastereomere auftreten. Die Untersuchung der Wechselwirkung der getrennten Diastereomeren sollte Einblicke in die Bindung des Nucleotides an das Enzym verschaffen und darüber hinaus, in günstigen Fällen, detaillierte Aussagen über den Mechanismus der Enzymreaktion erlauben.

Von Vorteil ist weiterhin, daß Thiophosphatanalogue nicht nur von Nucleosidmonophosphaten, sondern auch von Nucleosiddi- und -triphosphaten hergestellt werden können, wobei der Schwefel wahlweise am α -, β - oder γ -Phosphoratom lokalisiert sein kann. Solche Analoge sollten sich u. a. für die Untersuchung von ATP-abhängigen Enzymen eignen.

Im folgenden werden Nucleosidphosphorothioate, -thiodiphosphate und -thiotriphosphate getrennt besprochen. Yount hat in einem Übersichtsartikel über ATP-Analogue^[9] die Ergebnisse von Arbeiten auch mit anderen ATP-Analogen eingehend und vorzüglich zusammengefaßt.

2. Nucleosidphosphorothioate

Die erste Synthese dieser Verbindungen durch Umsetzung von Nucleosiden mit Tris(1-imidazolyl)phosphansulfid^[10] ist durch die Reaktion von Nucleosiden mit PSCl₃ zu den Nucleosid-5'-phosphorothioaten^[11] überholt worden. Purinnucleosid-5'-phosphorothioate können durch Fällung ohne Reinigung über Ionenaustauschersäulen als Bariumsalze rein isoliert werden^[12]. Auf diese Weise lassen sich auch die ³⁵S-markierten Verbindungen herstellen.

Die Entdeckung, daß Nucleosid-5'-phosphorothioate von alkalischen Phosphatasen nicht oder nur extrem langsam abgebaut werden, aber für diese Enzyme kompetitive Inhibitoren sind^[3] – also an die Substratbindungsstelle gebunden werden – war entscheidend für die Weiterentwicklung dieser Verbindungskategorie. [³²P]-AMP wird durch alkalische Phosphatase aus Kälberdarm oder *E. coli* ca. 2000mal schneller abgebaut als [³⁵S]-AMPS [s. dazu (1)]^[12]. Bekannt ist, daß die Geschwindigkeit der Hydrolyse eines Phosphorsäureesters durch alkalische Phosphatase nicht von der Estergruppe abhängt; Ester von Alkoholen oder Nucleosiden werden ebenso schnell

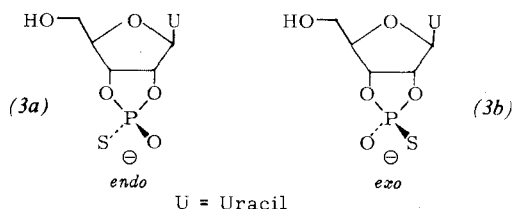
abgebaut wie solche von Phenolen^[13]. Für die Ester der Thio-phosphorsäure scheint das nicht zuzutreffen. So werden Nucleosid-5'-phosphorothioate ca. 2000mal^[12], *p*-Nitrophenyl^[14], 4-Methylumbelliferyl^[15] und *p*-Phenylazophenylphosphorothioat^[16] ca. 100mal, ca. 300mal bzw. ca. 200mal langsamer hydrolysiert als die entsprechenden Phosphate (die ihrerseits alle ähnliche Hydrolysegeschwindigkeiten aufweisen). Dieser große Unterschied bei phenolischen Estern der Thio-phosphorsäure und Nucleosidphosphorothioaten deutet darauf hin, daß der geschwindigkeitsbestimmende Schritt bei der Hydrolyse möglicherweise nicht der gleiche ist. Bei den Phosphorsäureestern tritt als Zwischenprodukt ein phosphoryliertes Enzym auf, dessen Hydrolyse oder Bildung als geschwindigkeitsbestimmend diskutiert werden. Untersuchungen zur Klärung des Verlaufs der Hydrolyse der Phosphorothioate wären sicher aufschlußreich und sollten das Verständnis dieses Enzyms erweitern.

Die Wechselwirkung von Adenosin-5'-phosphorothioat (1) mit anderen Enzymen als Phosphatasen beschrieben Murray und Atkinson^[11]. Auch bei Enzym-Reaktionen, bei denen keine Esterspaltung auftritt, reagiert das Analoge oft langsamer als das Substrat. So ist z. B. Adenosin-5'-phosphorothioat nur ein sehr schlechtes Substrat für Myokinase und Adenylat-Desaminase. Im letzteren System sind die K_m -Werte für das Analoge und für AMP sehr ähnlich, aber die V_{max} -Werte unterscheiden sich um einen Faktor von ca. 10. Als Aktivator für Phosphorylase b ist Adenosin-5'-phosphorothioat ebenso aktiv wie AMP.

3. Cyclische Nucleosidphosphorothioate

3.1. Uridin-2',3'-O-cyclophosphorothioat (3)

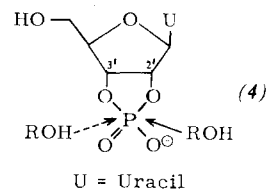
Diese Verbindung existiert aufgrund des chiralen Phosphors in Form der beiden Diastereomeren. (3a) und (3b). Ihre



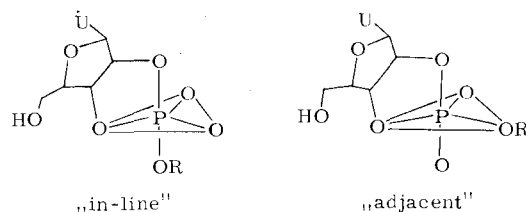
Triäthylammonium-Salze lassen sich durch Kristallisation trennen^[5]. Das – bezogen auf Ribose und Schwefel – *endo*-Isomere (3a) kristallisiert. Durch eine Röntgen-Strukturanalyse konnten seine Struktur und Konfiguration aufgeklärt werden. Beide Isomere werden von RNase A gespalten, haben aber verschiedene Affinitäten zu diesem Enzym ($K_m\text{-endo} = 6.2 \times 10^{-3}$ mol/l; $K_m\text{-exo} = 50 \times 10^{-3}$ mol/l)^[8].

Diese Isomere boten sich zur Klärung eines umstrittenen Schrittes bei der durch RNase A bewirkten Hydrolyse an. RNase A hydrolysiert Pyrimidinnucleosid-3'-phosphorsäure-ester, auch innerhalb eines Polymeren, in einem Zweistufenmechanismus^[2]. Im ersten, leicht reversiblen Schritt wird durch Angriff der 2'-OH-Gruppe am Phosphor ein Pyrimidinnucleosid-2',3'-cyclophosphat gebildet (Umesterung), im zweiten durch Angriff eines Wassermoleküls der cyclische Ester zum Pyrimidinnucleosid-3'-phosphat hydrolysiert (Hydrolyse). Am Beispiel der Alkoholyse oder der Hydrolyse des Uridin-

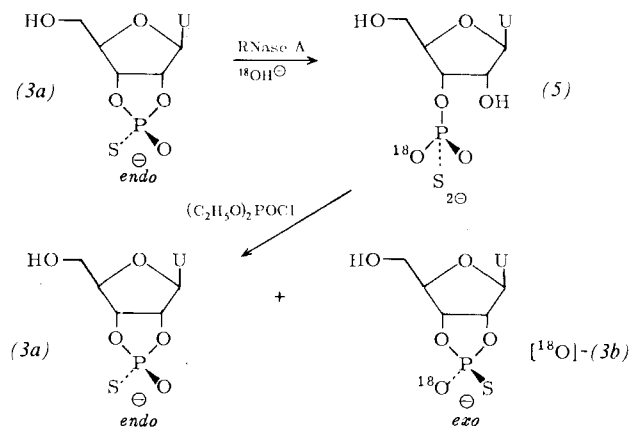
2',3'-cyclophosphats (4) läßt sich sehen, daß der Alkohol oder das Wasser im Prinzip an der austretenden Gruppe (2'-OH) gegenüberliegenden Seite („in-line“, gestrichelter Pfeil) oder von derselben Seite („adjacent“, ausgezogener Pfeil) angreifen können^[17].



Es wird allgemein angenommen, daß bei der Hydrolyse von fünfgliedrigen cyclischen Phosphorsäureestern ein Intermediat mit pentakoordiniertem Phosphor durchlaufen wird, bei dem sowohl das eintretende Nucleophil als auch die austretende Gruppe in einer trigonalen Bipyramide apical angeordnet sind^[18]. Der fünfgliedrige Ring besetzt dabei je eine apicale und eine äquatoriale Position, so daß die austretende Gruppe, unter Umständen erst nach Pseudorotation, immer in eine apicale Position gelangen kann. Der „adjacent“-Mechanismus erfordert eine Pseudorotation der pentakoordinierten Phosphorzwischenverbindung, der „in-line“-Mechanismus dagegen nicht^[19].



Wenn die absolute Konfiguration der Diastereomeren des Uridin-2',3'-O-cyclophosphorothioats (3) bekannt ist, sollte entschieden werden können, welcher der beiden Mechanismen zutrifft. Der Nachweis für den hydrolytischen Schritt gelang durch Umsetzung des *endo*-Isomeren (3a) mit dem Enzym in ¹⁸O-haltigem Wasser. Das Hydrolyseprodukt, [¹⁸O]-Uridin-3'-phosphorothioat (5), wurde chemisch wieder zu Uridin-cyclophosphorothioat cyclisiert („in-line“-Mechanismus), und die durch Kristallisation getrennten Diastereomeren (3a) und (3b) wurden auf ihren ¹⁸O-Gehalt untersucht^[19]. Bei einem „in-line“-Mechanismus sollte das ¹⁸O im *exo*-Isomeren (3b), bei einem „adjacent“-Mechanismus im *endo*-Isomeren (3a) zu finden sein. Tatsächlich war alles ¹⁸O im *exo*-Isomeren (3b)



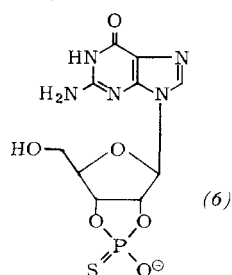
enthalten. Der zweite Schritt bei der enzymatischen Hydrolyse ist daher mit dem „in-line“-Mechanismus erklärbar.

Zur Untersuchung des Umesterungsschrittes wurde das *endo*-Isomere (3a) mit dem Enzym in 20proz. wäßrigem Methanol zum Uridin-3'-thiophosphorsäure-methylester umgesetzt und die absolute Konfiguration des isolierten und kristallisierten Esters durch Röntgen-Strukturanalyse bestimmt^[20, 21]. Bei einem „in-line“-Mechanismus sollte dieser Methylester die *R*-Konfiguration, bei einem „adjacent“-Mechanismus die *S*-Konfiguration haben. Die aus der Enzymreaktion isolierte Substanz hat die *R*-Konfiguration. Usher untersuchte die Umesterungsreaktion des *endo*-Uridin-2',3'-cyclophosphorothioats (3a) mit Cytidin. Das Produkt wurde alkalisch („in-line“) gespalten, das entstandene Uridin-3'-phosphorothioat (5) wieder chemisch zu Uridin-cyclophosphorothioat cyclisiert und die Konfiguration des entstandenen Isomeren durch Kristallisation und NMR-Spektrum bestimmt. Auch diese Ergebnisse sind mit einem „in-line“-Mechanismus vereinbar^[22].

Inwieweit lassen nun die an Phosphorothioaten erhaltenen Ergebnisse Rückschlüsse auf den Mechanismus der Hydrolyse der natürlichen Substrate, der Phosphate, zu? Da der K_m -Wert der Analogen mit dem des Phosphats übereinstimmt und da sich die V_{max} -Werte der Analogen von dem des Phosphats nur um einen Faktor von ca. 5 unterscheiden (den niedrigeren Wert findet man auch bei der alkalischen Hydrolyse des Phosphats; er kann daher auf die geringe chemische Reaktivität zurückgeführt werden), spricht nichts dagegen, daß die Spaltung der beiden Verbindungen nach demselben Mechanismus abläuft.

3.2. Guanosin-2',3'-*O*,*O*-cyclophosphorothioat

Analog zu Uridin-2',3'-*O*,*O*-cyclophosphorothioat (3a), (3b) existiert auch das Guanosin-2',3'-*O*,*O*-cyclophosphorothioat (6) als *endo*- und *exo*-Isomere^[23]. Versuche, die Isomeren zu trennen, waren nicht erfolgreich. Der Vergleich ihrer ³¹P-



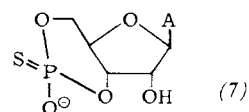
NMR-Spektren mit denen der Uridin-Derivate, (3a) und (3b), bei denen die Zuordnung der Konfiguration zu den Signalen gelang, gestattete es jedoch auch hier, die Isomeren zu identifizieren. Bei der Umsetzung des Gemisches der Diastereomeren von (6) mit RNase T1 in H₂O und Methanol wird nur das *endo*-Isomere angegriffen. Die chemische Verschiebung ($\Delta\delta$) des bei der Umesterung erhaltenen Guanosin-3'-thiophosphorsäure-methylesters ist ebenso groß wie die des Uridin-3'-thiophosphorsäure-methylesters der *R*-Konfiguration, den man bei der Umsetzung von *endo*-Uridin-2',3'-*O*,*O*-cyclophosphorothioat (3a) und RNase in wäßrigem Methanol erhält. Das läßt den Schluß zu, daß auch die RNase T1 nach dem „in-line“-Mechanismus, jedenfalls beim Umesterungsschritt arbeitet. Da sich die chemischen Verschiebungen der

isomeren Methylester sehr wenig unterscheiden, ist dieses Ergebnis nicht ganz so zufriedenstellend wie das bei der RNase A erhaltene.

3.3. Adenosin-3',5'-*O*,*O*-cyclophosphorothioat

Adenosin-3',5'-cyclophosphat (cAMP) ist offenbar eine der vielseitigsten niedermolekularen Verbindungen in der Biologie^[24]. Ganz abgesehen von den vielfältigen regulatorischen Funktionen, die sie ausübt und die für den Biochemiker von Bedeutung sind, stellt diese Verbindung aber auch für den mechanistisch interessierten Chemiker eine Herausforderung dar. Sie ist gegen alkalische und saure Hydrolyse sehr beständig und wird in der Zelle durch eine spezielle Phosphodiesterase abgebaut. Der Mechanismus dieser enzymatischen Hydrolyse ist von besonderem Interesse.

Wie bei der Besprechung des Uridincyclophosphorothioats (3) diskutiert (siehe Abschnitt 3.1), wird bei der Hydrolyse von cyclischen Phosphorsäureestern ein Intermediat mit pentakoordiniertem Phosphor durchlaufen^[17], bei dem sowohl das eintretende Nucleophil als auch die austretende Gruppe apical angeordnet sind. Im Gegensatz zu fünfgliedrigen wird bei sechsgliedrigen cyclischen Phosphorsäureestern aus sterischen Gründen eine äquatorial-äquatoriale Anordnung des Ringes bevorzugt sein^[25]. Auf welche Weise wird nun eine solche Anordnung enzymatisch hydrolysiert? Erzwingt das



A = Adenin

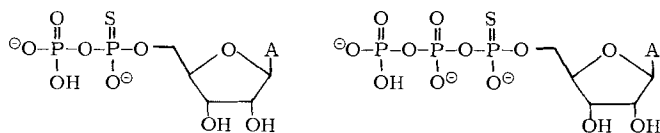
Enzym eine apical-äquatoriale Anordnung, eventuell über einen Pseudorotationsprozeß? Auch hier sollten die Diastereomeren des Adenosin-3',5'-*O*,*O*-cyclophosphorothioats (7) hilfreich sein.

Nach Aussage des ³¹P-NMR-Spektrums liegen die beiden Diastereomeren im Verhältnis von ca. 1 : 1 vor; eine zufriedenstellende Trennung durch Kristallisation ist aber noch nicht gelungen^[26]. Da die Isomeren aber leicht kristallisieren, sollte die Trennung im Prinzip möglich sein. Die Ergebnisse der Hydrolyse des Isomerengemisches mit den Phosphodiesterasen aus Rinderherz und *Dictyostelium discoideum*^[27] deuten, wenn überhaupt, nur auf einen kleinen Unterschied der Hydrolysegeschwindigkeit der beiden Isomeren hin; sie ist um den Faktor von ca. 50–100 kleiner als bei Adenosin-3',5'-cyclophosphat.

Selbstverständlich interessiert auch, welche Funktionen des cAMP die Analogen ausüben können. Mit Hilfe der Analogen hofft man die cAMP-Aktivitäten in biologischen Systemen differenzieren zu können. Analoge, die langsam enzymatisch hydrolysiert werden, aber dennoch zum mindesten einige Reaktionen eingehen, sind besonders gefragt. Adenosin-3',5'-*O*,*O*-cyclophosphorothioat (7) gehört zu dieser Klasse von Analogen, da es langsamer als cAMP abgebaut wird, aber z. B. Protein-Kinase fast ebenso gut wie cAMP stimuliert^[26] und auch chemotaktisch in *Dictyostelium discoideum* fast ebenso aktiv ist wie cAMP^[28].

4. Adenosin-5'-O-(1-thiodiphosphat) (ADP α S) und Adenosin-5'-O-(1-thiotriphosphat) (ATP α S)

ADP α S (8) und ATP α S (9) lassen sich ohne Schwefelverlust entgegen unseren früheren Ergebnissen^[29] aus Adenosin-5'-phosphorothioat durch Aktivierung mit Diphenylphosphorochloridat und Reaktion mit Diphosphorsäure oder Phosphorsäure synthetisieren^[30]. Auch (8) und (9) existieren in Form zweier Diastereomere, die sich z. B. durch ihre Reaktivität gegenüber einigen Kinasen unterscheiden^[30] und die man auch durch Hochdruckflüssigkeitschromatographie analytisch trennen kann^[31, 32].

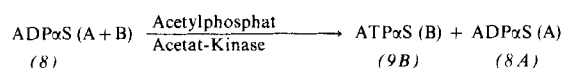
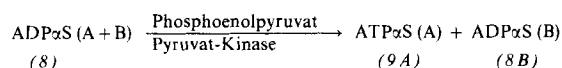


(8), ADP α S

(9), ATP α S

A = Adenin

Die Reaktion des chemisch synthetisierten Gemisches der Diastereomere A + B von ADP α S (8) mit Phosphoenolpyruvat und Pyruvat-Kinase führt unter ca. 50proz. Umsetzung zur Bildung von ATP α S (9A). Dieses so synthetisierte ATP α S wird von Nucleosiddiphosphat-Kinase – in Gegenwart eines Nucleosiddiphosphats – und von Myokinase – in Gegenwart von AMP – sehr rasch zu ADP α S gespalten. Phosphoryliert man ADP α S in Gegenwart von Acetat-Kinase und Acetylphosphat, so erhält man vorzugsweise ATP α S (9B), das von Nucleosiddiphosphat-Kinase und Myokinase nur äußerst langsam gespalten wird. Der Verdacht liegt nahe, daß es sich bei diesen unterscheidbaren ATP α S-Präparationen um die beiden geforderten Diastereomere handelt.



In der Tat wird chemisch synthetisiertes ATP α S (9) auch nur zu 50 % von Myokinase und Nucleosiddiphosphat-Kinase gespalten. Durch Hochdruckflüssigkeitschromatographie lassen sich beim chemisch synthetisierten ATP α S in der Tat zwei Isomere nachweisen, bei den enzymatisch erhaltenen Präparationen aber jeweils nur ein Isomeres^[30–32]. Das mit Pyruvat-Kinase gewonnene wird als Isomeres A, das mit Acetat-Kinase erhaltene als Isomeres B bezeichnet. Mit Hexokinase zeigen beide Isomere des ATP α S recht ähnliche K_m -Werte, doch hat das Isomere A einen ca. 100mal größeren V_{\max} -Wert als das Isomere B^[31].

Die Synthese von vorzugsweise einem der Isomere durch verschiedene Kinasen läßt den Schluß zu, daß die Substratbindungsstellen dieser Kinasen unterschiedliche Geometrie haben. Durch Vergleich einer Reihe von Kinasen läßt sich auf diese Weise die Ähnlichkeit ihrer Substratbindungsstellen ermitteln.

Nicht nur Kinasen zeigen diese Stereospezifität. Auch Phenylalanyl-tRNA-Synthetase aus Bäckerhefe^[33] nimmt nur das Isomere A des ATP α S als Substrat. DNA-abhängige RNA-Polymerase aus *E. coli*^[34, 35] und die tRNA-Nucleotidyl-Trans-

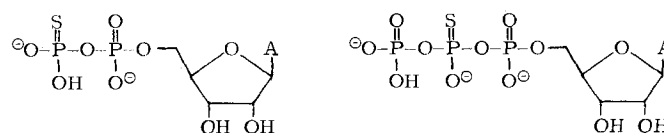
ferase aus Bäckerhefe^[36, 37] hingegen scheinen keine ausgeprägte Stereospezifität gegenüber den Isomeren des ATP α S zu besitzen.

Führt man die Polymerisation von ATP α S und UTP α S mit der DNA-abhängigen RNA-Polymerase aus *E. coli* in Gegenwart von Poly-d(A-T) durch, so kann man ein doppelsträngiges Poly-r(A-U)-Analoges, bei dem jede Phosphatgruppe ein Schwefelatom enthält, [Poly-r(SA \bar{S} U)], isolieren^[35]. Diese Doppelhelix ist thermisch ebenso stabil wie das nicht modifizierte Polymere. Von Nucleasen wird sie aber langsamer abgebaut. Poly-r(SA \bar{S} U) zeigt sich in Zellkulturen von menschlichen Fibroblasten und im Kaninchen bei der Induktion von Interferon dem Poly-r(A-U) deutlich überlegen^[38]. Ähnliches gilt für das Poly-r(I-C)-Analoge^[39]. Es ist denkbar, daß dies auf die wahrscheinlich längere Lebensdauer der modifizierten Polymeren in der Zellkultur bzw. im Tier zurückzuführen ist. Es läßt sich aber nicht ausschließen, daß andere Effekte, z. B. höhere Affinität der Analogen zu einem Receptor, dafür verantwortlich sind. Die Toxizität von Polynucleotiden scheint mit ihrer Fähigkeit zur Induktion von Interferon parallel zu gehen^[40].

Die Analogen dATP α S und dTTP α S können auch für die Replikation von Φ X174-DNA in durch Ätherbehandlung permeabilisierten *E. coli*-Zellen verwendet werden^[41]. Diese DNA wird auch durch Ligase zu RFI-Partikeln (circuläre Doppelstränge) geschlossen. In Sphäroplasten läßt sich zeigen, daß das modifizierte RF-Material offenbar auch infektiös ist. Das Gemisch der Isomere des ATP α S (9) sowie des ATP β S (11) (siehe Abschnitt 5) wird an Mitochondrienmembranen aus Rattenleber sowohl in Ab- als auch Anwesenheit von Atractylosid gebunden^[42]. Die entsprechenden Diphosphatanalogen, ADP α S (8) und ADP β S (10), können in diesem System nicht oxidativ phosphoryliert werden. Sie sind kompetitive Inhibitoren für diesen Prozeß. Die Analogen ADP α S, CDP α S und ADP β S sind Substrate der *E. coli*-Ribonucleotid-Reduktase mit ähnlichen K_m -Werten wie die entsprechenden natürlichen Diphosphate, aber stark verringerten V_{\max} -Werten^[43]. Das heißt: Die modifizierten Substanzen werden zwar ebenso gut wie die natürlichen Substrate gebunden, doch verläuft die Reaktion viel langsamer, obwohl sie sich am unveränderten Teil des Moleküls abspielt. Diese herabgesetzte Reaktionsgeschwindigkeit mag auf eine inkorrekte Bindung, die eine optimale Anordnung der reaktiven Gruppen verhindert, zurückzuführen sein.

5. Adenosin-5'-O-(2-thiotriphosphat) (ATP β S)

Auch ATP β S (11) existiert in Form der Diastereomere A und B, die sich aus Adenosin-5'-O-(2-thiodiphosphat) (ADP β S)



(10), ADP β S

(11), ATP β S

A = Adenin

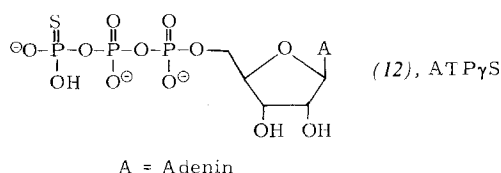
(10) mit Pyruvat-Kinase (Isomeres A) und Kreatin-Kinase (Isomeres B) darstellen lassen^[30]. Diese beiden Isomeren unter-

scheiden sich hauptsächlich durch ihre Reaktion mit Myosin. Das Isomere A wird recht schnell, das Isomere B nur extrem langsam gespalten. Das Verhalten anderer ATPasen ist bis jetzt noch nicht untersucht worden.

6. Adenosin-5'-O-(3-thiotriphosphat) (ATP γ S)

Zu den vielseitigsten Nucleosidphosphorothioaten gehört ATP γ S (12)^[44]. Dieses ATP-Analoge wird durch Phosphatasen nur extrem langsam gespalten. Der Geschwindigkeitsunterschied gegenüber ATP beträgt ca. drei Größenordnungen und ist damit ähnlich groß wie der Unterschied bei der Hydrolyse von AMP und Adenosin-5'-phosphorothioat (1).

Man hatte ursprünglich gehofft, daß ATP γ S auch durch ATPasen generell ähnlich langsam gespalten wird und dieses Analoge daher in biologischen Systemen, bei denen solche ATPasen störend wirken, anstelle von Adenylylimidodiphosphat



(AMPPNP) verwendet werden könnte. Es stellte sich aber heraus, daß das Verhältnis der Abbaugeschwindigkeit von ATP γ S und derjenigen von ATP je nach ATPase verschieden ist. Ein System, in dem ATPasen notorisch stören, ist das ATP-Cyclase-System. Bei dieser Reaktion wird ATP zu cAMP cyclisiert; die ATPasen spalten offensichtlich das Substrat. Auch ATP γ S ist in einem solchen System aus Rattenhirn ein gutes Substrat^[45]. Es wird aber sehr schnell abgebaut, so daß es keine entscheidenden Vorteile gegenüber dem stabilen AMPPNP bringt, obwohl es offenbar in einigen anderen Cyclase-Systemen ein besseres Substrat ist. Auch von der ATPase des Sarcoplasmatischen Reticulums wird ATP γ S schnell gespalten^[46].

Im Gegensatz dazu wird ATP γ S durch die mikrosomale Na⁺/K⁺-ATPase extrem langsam, wenn überhaupt, hydrolysiert^[47]. Von dieser ATPase ist bekannt, daß sie im ersten Schritt das Enzym phosphoryliert und im zweiten das phosphorylierte Enzym dephosphoryliert. Mit [³⁵S]-ATP γ S sollte es möglich sein zu zeigen, ob das Enzym auch thiophosphoryliert wird. Das würde unter Umständen die Möglichkeit eröffnen, das Enzym im Zwischenzustand der (Thio)-Phosphorylierung „einzufrieren“ und zu untersuchen, in welcher Weise es sich vom nicht-phosphorylierten Enzym unterscheidet.

In einem anderen System konnte dieses Einfrieren eines phosphorylierten Zwischenzustandes mit Hilfe von ATP γ S demonstriert werden^[46]. Kaninchenmuskel-Phosphorylase wird durch ATP unter Beteiligung einer Phosphorylase-Kinase zu Phosphorylase a phosphoryliert und ist dann imstande, Glykogen zu spalten. Durch eine Phosphorylase-a-Phosphatase wird das Enzym wieder zu Phosphorylase b dephosphoryliert und damit inaktiviert, d. h. seine Aktivität in der Zelle reguliert. Mit ATP γ S gelingt die enzymatische Übertragung des Thiophosphatrestes auf Phosphorylase, so daß man ein Thioanaloges der Phosphorylase a erhält^[46]. Dieses Analoge ist so aktiv wie Phosphatase a bei der Spaltung von Glykogen, wird aber von der Phosphatase, wenn überhaupt, nur extrem langsam

abgebaut. Auch die Phosphorylase-Kinase kann durch eine cAMP-abhängige Protein-Kinase durch Phosphorylierung mit ATP aktiviert werden. Bei dieser Reaktion läßt sich ATP ebenfalls durch ATP γ S ersetzen. Man erhält eine aktivierte, vermutlich nicht durch die entsprechende Phosphatase hydrolysierbare Phosphorylase-Kinase.

Hier hat man Fälle, in denen die thiophosphorylierten, aktiven Enzyme getrennt untersucht werden können, was besonders in biologischen Systemen, z. B. den Glykogenpartikeln, von Interesse ist. Da eine Reihe von Enzymen durch den Zyklus Phosphorylierung-Dephosphorylierung reguliert werden, läßt sich hier eine interessante Anwendungsmöglichkeit für ATP γ S voraussehen.

Wichtig für Untersuchungen, in denen der Thiophosphatrest übertragen wird, ist die Zugänglichkeit von [³⁵S]-ATP γ S. Die für den γ -Phosphataustausch von ATP ausgearbeitete enzymatische Methode mit Phosphoglycerat-Kinase^[48] läßt sich auch auf ATP γ S übertragen. Durch Änderung der Versuchsbedingungen gelingt es, [³⁵S]-Thiophosphat auf diese Weise in ATP γ S einzuführen^[12]. [¹⁴C]- oder [³H]-ATP γ S läßt sich aus entsprechend markiertem ADP durch Thiophosphattransfer mit Myokinase oder Nucleosiddiphosphat-Kinase darstellen^[49]. Es sollte hier erwähnt werden, daß Thiophosphat nicht wie Phosphat einen blauen Ammoniummolybdat-Komplex bildet und daß es im Gegensatz zu Phosphat von Aktivkohle adsorbiert wird. Diese Methoden entfallen daher zur Bestimmung von Hydrolysedaten für ATP γ S.

Ein anderes System, in dem das Verhalten von ATP γ S eingehend untersucht wurde, sind isolierte Muskelfasern und die an der Kontraktion beteiligten Proteine Actin und Myosin. Das Interesse an diesem System konzentriert sich in vielen Arbeitskreisen zur Zeit darauf, die Beziehung zwischen chemischer Reaktion (Hydrolyse von ATP durch Myosin) und mechanischer Arbeit (Kontraktion des Muskels) herzustellen. *Lynn* und *Taylor* entwickelten ein Modell (Abb. 1)^[50], bei dem durch Anlagerung von ATP an die Myosinköpfe Actin vom Myosin abdissoziiert, ohne daß der Winkel der Köpfe zum Myosin (45°) verändert wird. Durch die Hydrolyse des ATP zu ADP und Phosphat richten sich die Köpfe auf, und Myosin und Actin können sich wieder verbinden. Bei diesem Schritt dissoziieren die Hydrolyseprodukte ab, und die eigentliche mechanische Arbeit, die Bewegung des Actinfilaments relativ zum Myosinfilament mit Hilfe der Myosinköpfe, d. h. die Kontraktion, findet statt. In Abwesenheit von ATP geht der Muskel in den Rigor-mortis-Zustand über. Bei Abwesenheit von ATP kann der Zyklus wieder von vorne beginnen, d. h. der Muskel befindet sich im Zustand aktiver Kontraktion. Entscheidend in diesem Zyklus ist, daß die Anlagerung von ATP an die Myosinköpfe lediglich eine Abdissoziation vom Actinfilament, aber keine Aufrichtung der Köpfe bewirkt. Mit ATP-Analogen, die von Myosin nicht oder nur langsam gespalten werden, sollte man diesen Vorschlag testen können, vorausgesetzt, daß diese dem ATP vergleichbar gebunden werden und die Kinetik der einzelnen Schritte während der Hydrolyse der Analogen bekannt ist. Darüber hinaus muß eine Methode zur Verfügung stehen, um solche Veränderungen an der Muskelfaser zu beobachten. Letzteres ist mit Hilfe der Röntgendiffraktionsmethode möglich.

Von den ATP-Analogen AMPPNP, AMPCH₂PP und ATP γ S, die im Prinzip für solche Untersuchungen herangezogen werden können, sei hier nur ATP γ S eingehender diskutiert. In

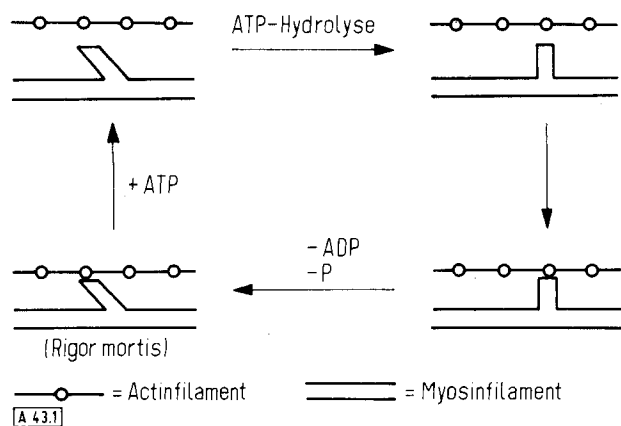


Abb. 1. Lymn-Taylor-Modell für das Actin-Myosin-System. Einzelheiten siehe Text (nach [50]).

Gegenwart von ATP γ S erschaffen Muskelfasern, können aber nach Zugabe von Ca^{2+} nicht mehr kontrahieren^[51]. Aufgrund der Geschwindigkeit, mit der es an Myosin oder das Myosin-Subfragment 1 angelagert wird, scheint ATP γ S dem ATP ähnlicher zu sein als die beiden anderen Analogen^[52]. Eingehende kinetische Untersuchungen in *Trenthams* Laboratorium in Bristol haben gezeigt, daß der wesentliche Unterschied zwischen ATP und ATP γ S darin besteht, daß der eigentliche Hydrolyseschritt beim ATP γ S ca. 1000mal langsamer ist. Somit ist nicht mehr die Produktdissoziation wie beim ATP, sondern der Hydrolyseschritt geschwindigkeitsbestimmend^[53]. Im stationären Zustand sollte daher der Komplex ATP γ S·Myosin (und nicht ADP·Myosin wie beim ATP) vorherrschend sein. Das sollte dann wie oben geschildert erlauben, die Orientierung der Myosinköpfe im Zustand der ATP-Anlagerung zu bestimmen. Solche röntgenstrukturanalytischen Untersuchungen sind in *Holmes* Laboratorium in Heidelberg im Gang^[54]. Die dort erhaltenen Ergebnisse^[55] lassen sich aber eher mit einer 90°-Stellung der Myosinköpfe vereinbaren und passen somit nur in ein modifiziertes Lymn-Taylor-Schema.

Das erwähnte kinetische Schema ist von *Trentham* erweitert worden und soll hier nur insoweit besprochen werden, als ATP γ S dabei verwendet wurde. Bei der Bindung von ATP an das Myosin-Subfragment 1 erhöht sich die Fluoreszenz des Proteins. Zur Entscheidung der Frage, ob diese Änderung der Fluoreszenz auf der Bindung des Nucleotids an das Protein beruht, auf einer Konformationsänderung des binären Komplexes Protein-Nucleotid oder auf der Hydrolyse von ATP, war die geringe Geschwindigkeit des Hydrolyseschritts von ATP γ S ($k = 0.2 \text{ s}^{-1}$) im Gegensatz zu dem des ATP (ca. 160 s^{-1}) hilfreich. Da die Geschwindigkeit der Fluoreszenzänderung (400 s^{-1}) für beide Substanzen gleich, die Hydrolysegeschwindigkeit aber stark unterschiedlich ist, ließ sich die Fluoreszenzänderung einer Konformationsänderung des binären Komplexes zuordnen^[52]. Dies kann auch für die oben geschilderte Stellung der Myosinköpfe und damit für den Zusammenhang zwischen chemischer Reaktion und mechanischer Arbeit von Bedeutung sein.

7. Schlußbetrachtung

Diese Betrachtungen zeigen, daß Nucleosidphosphorothioate recht unterschiedliche Eigenschaften bei der Wechselwirkung

mit Enzymen zeigen. Sie können kompetitive Inhibitoren oder aber auch Substrate – in vielen Fällen mit stark verringerten Reaktionsgeschwindigkeiten gegenüber den normalen Substraten – sein. Das trifft auch oft dann zu, wenn sich die eigentliche chemische Reaktion nicht am Thiophosphatrest abspielt. Gemeinsam scheint allen bis jetzt untersuchten Systemen zu sein, daß die Affinitäten der Nucleosidphosphorothioate und der natürlichen Substrate zu einem bestimmten Enzym wenn nicht gleich, so doch sehr ähnlich sind. Weiterhin scheint in fast allen Systemen die Reaktionsgeschwindigkeitskonstante des chemischen Schrittes (wenn das auch nirgends so eindeutig gezeigt ist wie beim Myosin, sondern meist nur die V_{max} -Werte erfaßt wurden) mehr oder weniger herabgesetzt zu sein, wobei die Unterschiede von Enzym zu Enzym variieren. Eine Voraussetzung über das Verhalten eines noch nicht untersuchten Enzymsystems gegenüber Nucleosidphosphorothioaten scheint zur Zeit noch sehr gewagt. Das spiegelt sicher unsere begrenzte Einsicht in die meisten Enzymsysteme wider.

Der Vorteil der Nucleosidphosphorothioate gegenüber anderen phosphatmodifizierten Nucleotidanalogen liegt wohl gerade darin, daß sie in vielen Fällen keine kompetitiven Inhibitoren, sondern Substrate mit allerdings oft verringerten Reaktionsgeschwindigkeiten sind. Diese Eigenschaften, die Existenz von Diastereomeren, die Fähigkeit, den Thiophosphatrest des ATP-Analogen zu übertragen und die Möglichkeit, Nucleosidmono-, -di- und -triphosphate zu modifizieren, eröffnen dieser Gruppe von Analogen ein weites Anwendungsfeld, wie in diesem Fortschrittsbericht zu zeigen versucht wurde. Es bleibt abzuwarten, ob sie sich auch bei der Untersuchung komplizierterer Systeme, z. B. Membranen oder Zellkulturen, weiterhin bewähren werden.

Vielen Freunden und Kollegen in diesem Institut und in vielen anderen im In- und Ausland bin ich zu Dank verpflichtet für Anregungen, Kritik, methodische Hilfen und die Bereitschaft zur Zusammenarbeit, ohne die die Nucleosidphosphorothioate niemals diese Verbreitung und Bedeutung hätten gewinnen können. Allen Mitarbeitern bin ich darüber hinaus für ihren tatkräftigen Einsatz dankbar, der das Zustandekommen dieser Arbeiten erst ermöglicht hat. Der Deutschen Forschungsgemeinschaft danke ich für die finanzielle Unterstützung.

Eingegangen am 26. August 1974 [A 43]

- [1] P. Lengyel u. D. Söll, *Biol. Rev.* 33, 264 (1969).
- [2] F. M. Richards u. H. W. Wyckhoff in P. D. Boyer: *The Enzymes*. 3. Aufl., Bd. 4. Academic Press, New York 1971, S. 647ff.
- [3] F. Eckstein u. H. Sternbach, *Biochim. Biophys. Acta* 146, 618 (1967).
- [4] C. L. Coulter, *J. Amer. Chem. Soc.* 95, 570 (1973).
- [5] W. Saenger u. F. Eckstein, *J. Amer. Chem. Soc.* 92, 4712 (1970).
- [6] C. H. Schwalbe, R. Goody u. W. Saenger, *Acta Crystallogr. B* 29, 2264 (1973).
- [7] L. Pauling: *Die Natur der chemischen Bindung*. Verlag Chemie, Weinheim 1962.
- [8] F. Eckstein, *FEBS-Lett.* 2, 85 (1968).
- [9] R. Yount, *Methods Enzymol.*, im Druck.
- [10] F. Eckstein, *J. Amer. Chem. Soc.* 92, 4718 (1970).
- [11] A. W. Murray u. M. R. Atkinson, *Biochemistry* 7, 4023 (1968).
- [12] F. Eckstein, unveröffentlichte Versuche.
- [13] T. W. Reid u. J. B. Wilson in P. D. Boyer: *The Enzymes*. 3. Aufl., Bd. 4. Academic Press, New York 1971, S. 373ff.
- [14] R. Breslow u. J. Katz, *J. Amer. Chem. Soc.* 90, 7376 (1968).
- [15] H. N. Fernley, *Nature New Biol.* 241, 100 (1973).
- [16] P. Mushak u. J. E. Coleman, *Biochemistry* 11, 201 (1972).
- [17] D. A. Usher, *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* 62, 661 (1969).

- [18] F. H. Westheimer, *Accounts Chem. Res.* 1, 70 (1968).
- [19] D. A. Usher, D. J. Richardson u. F. Eckstein, *Nature* 228, 663 (1970).
- [20] F. Eckstein, W. Saenger u. D. Suck, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 46, 964 (1972).
- [21] W. Saenger, D. Suck u. F. Eckstein, *Eur. J. Biochem.* 46, 559 (1974).
- [22] D. A. Usher, E. S. Erenrich u. F. Eckstein, *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* 69, 115 (1972).
- [23] F. Eckstein, K.-H. Schulz, H. Rüterjans, W. Haar u. W. Maurer, *Biochemistry* 11, 3507 (1972).
- [24] P. Greengard u. G. A. Robison: *Advances in Cyclic Nucleotide Research*. Bd. 1. Raven Press, New York 1972.
- [25] D. Marquarding, F. Ramirez, I. Ugi u. P. Gillespie, *Angew. Chem.* 85, 99 (1973); *Angew. Chem. internat. Edit.* 12, 91 (1973).
- [26] F. Eckstein, L. P. Simonson u. H. P. Baer, *Biochemistry* 13, 3806 (1974).
- [27] D. Malchow u. F. Eckstein, unveröffentlicht.
- [28] T. Konijn, persönliche Mitteilung.
- [29] F. Eckstein u. H. Gindl, *Biochim. Biophys. Acta* 149, 35 (1967).
- [30] F. Eckstein u. R. S. Goody, noch unveröffentlicht.
- [31] K. W. Stahl, E. Schlimme u. F. Eckstein, *FEBS-Lett.* 40, 241 (1974).
- [32] K. W. Stahl, *Habilitationsschrift*, Technische Universität Hannover 1974.
- [33] F. v. d. Haar, persönliche Mitteilung.
- [34] V. Armstrong u. H. Sternbach, persönliche Mitteilung.
- [35] F. Eckstein u. H. Gindl, *Eur. J. Biochem.* 13, 558 (1970).
- [36] E. Schlimme, F. v. d. Haar, F. Eckstein u. F. Cramer, *Eur. J. Biochem.* 14, 351 (1970).
- [37] H. Sternbach, persönliche Mitteilung.
- [38] E. DeClercq, F. Eckstein u. T. C. Merigan, *Science* 165, 1137 (1969).
- [39] E. DeClercq, F. Eckstein, H. Sternbach u. T. C. Merigan, *Virology* 42, 421 (1970).
- [40] D. R. Black, F. Eckstein, E. DeClercq u. T. C. Merigan, *Antimicrob. Ag. Chemother.* 1973, 198.
- [41] H. P. Vosberg u. F. Eckstein, unveröffentlicht.
- [42] E. Schlimme, W. Lamprecht, F. Eckstein u. R. S. Goody, *Eur. J. Biochem.* 40, 485 (1973).
- [43] U. v. Döbeln u. F. Eckstein, *Eur. J. Biochem.* 43, 315 (1973).
- [44] R. S. Goody u. F. Eckstein, *J. Amer. Chem. Soc.* 93, 6252 (1971).
- [45] H. P. Baer, L. P. Simonson u. F. Eckstein, *FEBS-Lett.* 41, 199 (1974).
- [46] D. Gratecos u. E. J. Fischer, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 58, 960 (1974).
- [47] H. Schoner u. F. Eckstein, unveröffentlicht.
- [48] J. M. Glynn u. J. B. Chappell, *Biochem. J.* 90, 147 (1964).
- [49] R. S. Goody, F. Eckstein u. R. H. Schirmer, *Biochim. Biophys. Acta* 226, 155 (1972).
- [50] R. W. Lymn u. E. W. Taylor, *Biochemistry* 10, 4617 (1971).
- [51] H. J. Mannherz, R. S. Goody u. F. Eckstein, unveröffentlicht.
- [52] C. R. Bagshaw, J. F. Eccleston, F. Eckstein, R. S. Goody, H. Gutfreund u. R. Trentham, *Biochem. J.* 141, 351 (1974).
- [53] C. R. Bagshaw, J. F. Eccleston, D. R. Trentham, D. W. Yates u. R. S. Goody, *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.* 37, 127 (1972).
- [54] J. Barrington Leigh, K. C. Holmes, H. G. Mannherz, G. Rosenbaum, F. Eckstein u. R. S. Goody, *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.* 37, 443 (1972).
- [55] R. S. Goody, K. C. Holmes, H. G. Mannherz, J. Barrington Leigh u. G. Rosenbaum, *Biophys. J.*, im Druck.

Hochdruck-kinetische Untersuchungen in der Organischen und Makromolekularen Chemie^[**]

Von Gérard Jenner^[*]

Kinetische Untersuchungen bei hohen Drücken sind ein sehr nützliches Verfahren zur Aufklärung des Mechanismus einer Vielfalt organischer Reaktionen. Sie geben beispielsweise bei pericyclischen, Mentshutkin-, Käfig- sowie Polymerisationsreaktionen Auskunft über die Beschaffenheit und die Position des Übergangszustands entlang der Reaktionskoordinate. Die Deutung der Ergebnisse setzt jedoch voraus, daß verschiedene, die Struktur des Übergangszustands bestimmende Effekte (elektrostatische, sterische, Orbitalbeiträge etc.) anteilmäßig getrennt werden können.

1. Einleitung

Druck beeinflusst die Geschwindigkeit chemischer Reaktionen in der Gasphase und in kondensierter Phase:

1. Kompression des Reaktionsmediums bewirkt eine Konzentrationserhöhung der reagierenden Moleküle.
2. Die intermolekularen Diffusionsvorgänge werden unter Druck verändert.
3. Druck komprimiert die Moleküle selbst, verformt die „Elektronenwolken“ und beeinflusst die Stoßhäufigkeit.

In der dichten flüssigen Phase, in der der zur Bildung des Übergangszustandes verfügbare Raum ohnehin beschränkt

ist, übertrifft der Druckeinfluß auf die Reaktionsgeschwindigkeit alle übrigen Effekte.

Die Hochdruck-Thermodynamik von Lösungen ist wohl bekannt und braucht hier nicht im einzelnen dargestellt zu werden. Die grundlegenden Beziehungen zur Beschreibung von Gleichgewichten in der kondensierten Phase können durch das Aktivierungsvolumen ΔV^\ddagger ausgedrückt werden:

$$\left[\frac{\partial \ln k}{\partial p} \right]_T = - \left[\frac{\partial \Delta G^\ddagger}{RT \partial p} \right]_T = - \frac{\Delta V^\ddagger}{RT} \quad (1)$$

$$\left[\frac{\partial \Delta S^\ddagger}{\partial p} \right]_T = \left[\frac{\partial \Delta V^\ddagger}{\partial T} \right]_p \quad (2)$$

$$\left[\frac{\partial \Delta H^\ddagger}{\partial p} \right]_T = \Delta V^\ddagger - T \left[\frac{\partial \Delta V^\ddagger}{\partial T} \right]_p \quad (3)$$

Hierin sind ΔG^\ddagger (Freie Enthalpie), ΔH^\ddagger (Enthalpie) und ΔS^\ddagger (Entropie) die den Übergangszustand charakterisierenden Ak-

[*] Dr. G. Jenner
Laboratoire de Chimie Organique Appliquée,
Institut de Chimie de l'Université
F-67008 Strasbourg-Cedex, BP 296/R8 (Frankreich)

[**] Nach einem Vortrag beim 12. Jahrestreffen der European High Pressure Research Group in Marburg/Lahn, März 1974.