

- [3] Gleichzeitiges Vorliegen von Übergangsmetall-Ionen in verschiedenen Oxidationsstufen (z. B. für Typ I im Fall:  $x < 1$ ) sollte ebenfalls Elektronenwanderung (electron hopping) möglich machen.
- [4] Darstellung von **2**: Auf einer Fritte wurden unter  $N_2$ -Atmosphäre ca. 3 g (4.3 mmol) **1** mit 5 mL frisch destilliertem Pyrrol überschichtet. Der ungelöst gebliebene Feststoff wird erst grün, anschließend schwarz. Nach 30 min bei ca. 20 °C wird das überschüssige Pyrrol abfiltriert und das feste Produkt nach Waschen mit  $CH_2Cl_2$  im Vakuum getrocknet (30 °C). Elementaranalyse, berechnet für  $C_{19}H_{32}N_2FeSn_3$ : C 29.62, H 4.19, N 12.73, Fe 7.25, Sn 46.22%; gefunden: C 29.53, H 4.22, N 12.48, Fe 7.29, Sn 44.03%.
- [5]  $\tilde{\nu}(CN)$ -Absorptionen (in  $cm^{-1}$ , IR): 2050(s, br); **1**: 2141(vs), 2080(w).
- [6] Aus den Analysenwerten (siehe [4]) ergeben sich die signifikanten Quotienten:  $H(PPy)/N(PPy)$  6.11,  $C(PPy)/N(PPy)$  4.61,  $Sn/N(PPy)$  3.42; vgl. demgegenüber mit den für „ $PPy(ClO_4)_{0.33}$ “ angegebenen Werten [10b]:  $H/N$  3.37,  $C/N$  3.94.
- [7] Zylindrische Preßlinge von **1** bis **5** (Durchmesser: 1 cm, Höhe: 1–2 mm) wurden unter Drücken von  $5 \times 10^8$  Pa hergestellt. Die Widerstandsmessung erfolgte in einer selbstgebauten Apparatur (evakuierter Korundtopf, vergoldete Elektroden, Widerstandsthermometer Pt-100, Eurotherm Single Loop Communication Controller 820, Hewlett-Packard Multimeter 4329 A).
- [8] Darstellung von **1'**: Orangegelbes **1** wird an der Luft entweder mehrere Monate dem Tageslicht oder knapp eine Woche dem Licht einer UV-Lampe ausgesetzt. Farbwechsel über grün nach blau; allmähliche Abnahme von  $\mu_{eff}$ . IR,  $\tilde{\nu}[cm^{-1}]$ :  $\nu-CN$ , 2142(vs), 2085(vs);  $\delta-Fe^{II}C$ , 600(w),  $\nu-SnC$ , 555(s),  $\nu-Fe^{II}C$ , 412(m).
- [9] Darstellung von **4** und **5** gemäß den Angaben in [2]; korrekte Elementaranalysen (C, H, N, Fe); für **3** siehe [1].
- [10] Vgl. a) K. K. Kanazawa, A. F. Diaz, M. T. Krounbi, G. B. Street, *Synth. Met.* **4** (1981) 119; b) G. B. Street, T. C. Clarke, M. Krounbi, K. Kanazawa, V. Lee, P. Pflüger, J. C. Scott, G. Weiser, *Mol. Cryst. Liq. Cryst.* **83** (1982) 253, sowie in [11] zitierte weitere Literatur.
- [11] M. G. Kanatzidis, L. M. Tonge, T. J. Marks, H. O. Marey, C. R. Kannevurf, *J. Am. Chem. Soc.* **109** (1987) 3797.
- [12] Die Erörterung einer hier denkbaren Leitfähigkeitserhöhung (von **2**) durch einen entsprechenden Perkolationsmechanismus geht auf die Anregung eines Gutachters zurück.
- [13] Neutrale Ppy-Filme sind praktisch Isolatoren: vgl. [10b].
- [14] In mit CdS beladenen Zeolithen bewirken die ladungskompensierenden Protonen beim Evakuieren eine Verschiebung der Reaktion  $[Cd^{2+}Zeol^{2-}] + H_2S \rightleftharpoons [CdS \cdot H_2^+Zeol^{2-}]$  nach links; vgl. N. Herron, Y. Wang, M. M. Eddy, G. D. Stucky, D. E. Cox, K. Moller, T. Bein, *J. Am. Chem. Soc.* **111** (1989) 530.
- [15] Vgl. hierzu: a) F. Vögtle: *Supramolekulare Chemie*, B. G. Teubner, Stuttgart 1989, Kap. 10.5 und 11.1; b) G. A. Ozin, A. Kuperman, A. Stein, *Angew. Chem. Adv. Mater.* **101** (1989) 373; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl. Adv. Mater.* **28** (1989) 359; *Adv. Mater.* 1989, 69.
- [16] T. Bein, P. Enzel, 197. ACS Nat. Meet., Dallas, TX, 9.–14. April 1989, Abstr. INOR 135; *Chem. Eng. News* **67** (1989) Nr. 17, S. 42.
- [17] Anmerkung bei der Korrektur (9. Aug. 1989): a) Zumindest ein Teil des in **2a** eingelagerten Ppy läßt sich – ohne erkennbare Farbveränderung – durch Ionenaustausch (gemäß [2]) überraschend leicht freisetzen. b) Die Leitfähigkeit des gegenüber **2** wesentlich helleren, gleichfalls diamagnetischen Reaktionsprodukts von **1** mit Pyridin, das ebenfalls „ladungskompensierende Protonen“ enthalten sollte, liegt allerdings deutlich unter  $10^{-8} S cm^{-1}$ . c) Eine solche 1:1-Oxidation (Oxidans:Pyrrol) von Pyrrol findet z. B. in wäßriger Lösung nicht statt; siehe S. P. Armes, *Synth. Met.* **20** (1987) 365. d) Erste Dotierungsversuche von **2** mit Iod führten zu keiner nennenswerten Erhöhung von  $\sigma$ .

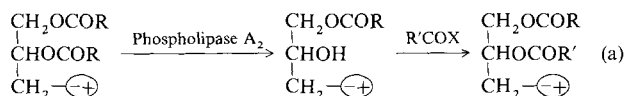
## Ketten-substituierte Lipide als Substrate für Phospholipase $A_2$ \*\*

Von Fredric M. Menger\* und M. G. Wood, Jr.

Für kalorimetrische<sup>[1]</sup>, massenspektrometrische<sup>[2]</sup> und biochemische<sup>[3,4]</sup> Untersuchungen sowie für Monoschichten<sup>[5]</sup>,  $^{13}C$ -NMR<sup>[6]</sup> und Transportstudien<sup>[7]</sup>, die in jüngster Zeit an neuen Lipidsystemen vorgenommen wurden, war die Synthese von „Lysophospholipid“-Zwischenprodukten durch Phospholipase- $A_2$ -katalysierte Hydrolyse [Gl. (a)] erforderlich.

[\*] Prof. Dr. F. M. Menger, M. G. Wood, Jr.  
Department of Chemistry  
Emory University  
Atlanta, GA 30322 (USA)

[\*\*] Diese Arbeit wurde von den National Institutes of Health gefördert.



Bei diesen Arbeiten ist uns aufgefallen, daß Phospholipide mit bestimmten Alkylgruppen an Kohlenstoffatomen der ersten Hälfte der  $C_{18}$ -Kette bei Umsetzung mit der Phospholipase keine isolierbaren Produkte ergaben. Diese Beobachtung veranlaßte uns zu untersuchen, ob Ketten-substituierte Lipide – ähnlich wie kurzkettige Lecithine<sup>[8]</sup> – die Phospholipase- $A_2$ -Aktivität inhibieren. Solche Inhibitoren sind ein wichtiges Ziel der derzeitigen chemopharmakologischen Forschung<sup>[9–13]</sup>, denn Phospholipase  $A_2$  katalysiert die Freisetzung von Arachidonsäure, einer Vorstufe für Prostaglandine, Thromboxane und Leukotriene. Mit Hydrolysebeständigen Phospholipiden wäre es zudem möglich, Wirkstoff-tragende Liposome zu entwickeln, die weniger leicht metabolisch abgebaut würden.

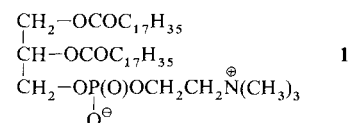


Tabelle 1 faßt Ausbeuten und Reaktionsgeschwindigkeiten der Hydrolysen synthetischer Derivate von Distearoylphosphatidylcholin (DSPC) **1** mit Phospholipase  $A_2$  zusammen. Bei einer typischen Reaktion<sup>[14]</sup> wird ein Gemisch aus 40  $\mu$ mol Lipid in 3.3 mL Methanol/Ether 1/9 und 1 mg Schlangengift von *Crotalus adamanteus*<sup>[15]</sup> in 30  $\mu$ L 5 mM  $CaCl_2$  24 Stunden unter DC-Kontrolle gerührt und anschließend die Reaktion mit 5 mL Wasser gequencht. Die wäßrige Phase wird abgetrennt, mit Ether gewaschen und gefrierge-

Tabelle 1. Ausbeuten und Reaktionsgeschwindigkeiten der Phospholipase- $A_2$ -katalysierten Hydrolyse von **1** und Derivaten von **1**.

Substituent	in Kette(n)	auf Position [a]	Ausbeute [%] [b]	Relative Anfangsgeschwindigkeit $v_{i,rel}$ [c]
–	–	–	97*	100
Methyl	1,2	4	95*	12
Methyl	2	4	87	20
Methyl	1,2	6	90	23
Methyl	2	6	92	48
Methyl	1,2	8	91*	45
Methyl	2	8	100	100
Methyl	1,2	12	85*	100
Ethyl	1,2	4	5	3
Ethyl	1,2	6	7	3
Ethyl	2	6	15	13
Ethyl	1,2	8	14	5
Ethyl	2	8	15	18
n-Propyl	1,2	6	0	4
n-Propyl	2	6	0	14
n-Propyl	1,2	8	0	11
n-Propyl	2	8	0	29
n-Butyl	1,2	4	0	<0.3
n-Butyl	2	4	0	3
n-Butyl	1,2	6	0	9
n-Butyl	2	6	0	2
n-Butyl	1,2	8	0	9
n-Butyl	2	8	0	9
n-Butyl	1,2	12	34*	42
Phenyl	1,2	8	–	2
Phenyl	1,2	12	–	50

[a] Das Carbonyl-Kohlenstoffatom des Fettsäureanteils wird als C-1 gezählt. Entweder tragen beide Ketten („1,2“) oder nur die abzuspaltende Kette („2“) einen Substituenten in der angegebenen Position. [b] Die mit Sternchen versehenen Prozentangaben wurden durch Säulenchromatographie, die übrigen zweifach durch  $^1H$ -NMR-Spektroskopie ermittelt. [c] Die Reaktionsgeschwindigkeiten wurden unter anderen Reaktionsbedingungen bestimmt wie die Ausbeuten (siehe Text). Es wurde dabei 5.9 mM Lipid eingesetzt. Bezugswert  $v_{max}(1) = 420 \mu mol mg^{-1} min^{-1}$ .

trocknet. Die Ausbeuten wurden durch eine der folgenden Methoden ermittelt: a) Vergleich der  $^1\text{H-NMR}$ -Signalintensitäten der  $\alpha$ -Methylengruppen und der Cholinmethylgruppen; b) Isolierung des Lysophosphatidylcholins durch Säulenchromatographie (Kieselgel; Eluens:  $\text{CH}_3\text{OH}/\text{CHCl}_3$  4/1).

Aus Tabelle 1 geht hervor, daß das unsubstituierte DSPC 1 zu 97% umgesetzt wird, während DSPC-Derivate, die in beiden („1,2“) oder nur in der zweiten („2“) Kette  $n$ -Propyl- oder  $n$ -Butylsubstituenten in Position 4, 6 oder 8 aufweisen, nicht reagieren. Ein Derivat mit  $n$ -Butylsubstituenten in weiter vom Glycerinteil entfernten Positionen (an C-12) kann – allerdings nur in geringer Ausbeute (34%) – hydrolysiert werden. Methylsubstituenten haben nur einen geringen Einfluß auf die Ausbeute (85–100%), selbst dann, wenn sich die Methylgruppe in Nähe des Hydrolysezentrums befindet. Mit Ethylsubstituenten an den Kohlenstoffatomen 4, 6 oder 8 gehen die Ausbeuten auf 5–15% zurück. Zusammenfassend läßt sich feststellen, daß die Phospholipid-Hydrolyse besonders durch große, in der ersten Hälfte der Kohlenstoffkette gebundene Alkylsubstituenten gehindert wird.

Die Anfangsgeschwindigkeiten der Hydrolysen (Tabelle 1) wurden alle unter identischen Reaktionsbedingungen bestimmt: Ein wäßriges Gemisch (6 mL), 5.9 mM an Lipid, 20 mM an Triton X-100 und 10 mM an  $\text{CaCl}_2$ , wird bei 65 °C durch Ultraschall in ein gemischtmicellares System umgewandelt<sup>[12, 16]</sup>. Die nachfolgende Hydrolyse, ausgelöst durch 0.2 Einheiten der gereinigten Phospholipase aus dem Gift der *Crotalus adamanteus*<sup>[17]</sup> (167 Einheiten pro mg), wird durch Titration mit 2 oder 5 mM KOH bei pH = 8 (40 °C,  $\text{N}_2$ -Atmosphäre, Radiometer pH-stat) verfolgt.

Die relativen Reaktionsgeschwindigkeiten  $v_{i, \text{rel}}$  in Tabelle 1 korrelieren in etwa mit den Ausbeuten (eine genaue Übereinstimmung kann nicht erwartet werden, da die beiden Parameter unter vollkommen unterschiedlichen Reaktionsbedingungen ermittelt wurden) und lassen sich wie folgt interpretieren:

a) Je weiter ein Methylsubstituent von der Carbonylgruppe entfernt ist, desto größer ist  $v_{i, \text{rel}}$  (z. B. führt eine Bismethylierung der Kohlenstoffatome 4, 6, 8 oder 12 zu relativen Reaktionsgeschwindigkeiten von 12, 23, 45 bzw. 100).

b) Bei Methylsubstitution an beiden Kohlenstoffketten ist  $v_{i, \text{rel}}$  etwa halb so groß wie bei Methylsubstitution nur an Kette 2. Die Reaktionsgeschwindigkeit wird also nicht nur durch Substituenten am labilen Fettsäurerest beeinflusst.

c) Ethyl- und  $n$ -Propylsubstituenten verringern  $v_{i, \text{rel}}$  um das 3- bis 30fache in Abhängigkeit vom Abstand zum Hydrolysezentrum. Das Derivat mit einer einzelnen  $n$ -Propylgruppe an C-8 der Kette 2 reagierte interessanterweise in Methanol/Ether nicht, bei Inkorporation des Lipids in wäßrige Micellen dagegen war die Hydrolysegeschwindigkeit nur auf etwa ein Drittel reduziert.

d)  $n$ -Butylgruppen bewirken eine drastische Herabsetzung der Reaktionsgeschwindigkeit. So wird das in beiden Kohlenstoffketten an C-4 substituierte DSPC um einen Faktor 390 langsamer hydrolysiert als unsubstituiertes DSPC 1 (da die Reaktion extrem langsam ist, konnte dieser Wert nur geschätzt werden). Befindet sich die Butylgruppe am Kohlenstoffatom 12, ist ihr Einfluß auf die Reaktionsgeschwindigkeit weitaus geringer. Wie man Tabelle 1 entnehmen kann, wirken Phenylsubstituenten ähnlich wie  $n$ -Butylsubstituenten.

Die inhibierende Wirkung von  $n$ -Butylsubstituenten wurde durch konventionelle Enzymkinetik weiter untersucht. Für micellares 1 wurden  $K_m$ - und  $v_{\text{max}}$ -Werte von 3.8 mM bzw. 420  $\mu\text{mol mg}^{-1} \text{min}^{-1}$  bestimmt (diese Daten stimmen zufriedenstellend mit Werten aus vergleichbaren Studien an Phosphatidylcholin aus Hühnerei<sup>[18]</sup> überein). Es konnte ge-

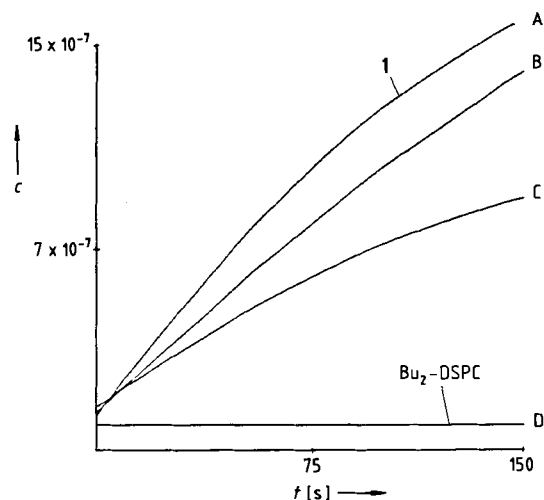


Abb. 1. Untersuchung der kompetitiven Hemmung von 1 durch 4,4'-Di- $n$ -butyl-DSPC bei der Hydrolyse (pH-stat-Ergebnis; pH = 8.0, 40 °C).  $c$  = Äquivalente zugegebener KOH. A: 0.84 mM DSPC 1, kein Inhibitor; B: 1 + 1.0 mM Inhibitor; C: 1 + 3.0 mM Inhibitor; D: 5.9 mM 4,4'-Di- $n$ -butyl-DSPC (Inhibitor).

zeigt werden, daß das 4,4'-Dibutyl-Derivat eine kompetitive Hemmung des Enzyms mit einem  $K_i$ -Wert von 2.0 mM bewirkt (Abb. 1). Die  $n$ -Butylierung der Fettsäureketten verhindert demnach nicht die Bindung an das aktive Zentrum des Enzyms, sondern bewirkt eine Hemmung der nachfolgenden Hydrolyse<sup>[19]</sup>.

Die hier vorgestellten Ergebnisse legen nahe, daß die Ketten-Modifikation von Phospholipiden eine vielversprechende Methode sein könnte, um die Reaktivität von Lipiden gegenüber Phospholipase  $A_2$  zu verändern. Wie bereits erwähnt, ergeben sich daraus Möglichkeiten zur Steuerung der Prostaglandin-Konzentration und zur Entwicklung stabilerer Wirkstoff-tragender Systeme<sup>[20]</sup>.

Eingegangen am 20. Februar 1989 [Z 3182]

- [1] F. M. Menger, M. G. Wood, Jr., Q. Z. Zhou, H. P. Hopkins, J. Fumero, *J. Am. Chem. Soc.* 110 (1988) 6804.
- [2] M. J. I. Mattina, S. D. Richardson, M. G. Wood, Jr., Q. Z. Zhou, M. J. Contado, F. M. Menger, L. E. Abbey, *Org. Mass. Spectrom.* 23 (1988) 292.
- [3] Q. Zhou, R. L. Raynor, M. G. Wood, Jr., F. M. Menger, J. F. Kuo, *Biochemistry* 27 (1988) 7361.
- [4] P. A. Chapp, Q. Zhou, M. G. Wood, Jr., R. L. Raynor, F. M. Menger, J. F. Kuo, *Biochemistry* 27 (1988) 4607.
- [5] F. M. Menger, M. G. Wood, Jr., S. D. Richardson, Q. Zhou, A. R. Elrington, M. J. Sherrod, *J. Am. Chem. Soc.* 110 (1988) 6797.
- [6] F. M. Menger, P. Aikens, M. G. Wood, Jr., *J. Chem. Soc. Chem. Commun.* 1988, 180.
- [7] P. Aikens, J. J. Lee, R. Persichetti, unveröffentlichte Ergebnisse.
- [8] W. G. J. Hol, *Angew. Chem.* 98 (1986) 765; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* 25 (1986) 767.
- [9] N. S. Chandrakumar, J. Hajdu, *J. Org. Chem.* 47 (1982) 2144.
- [10] L. J. Reynolds, B. P. Morgan, G. A. Hite, E. D. Mihelich, E. A. Dennis, *J. Am. Chem. Soc.* 110 (1988) 5172.
- [11] M. H. Gelb, *J. Am. Chem. Soc.* 108 (1986) 3146.
- [12] W. Yuan, R. J. Berman, M. H. Gelb, *J. Am. Chem. Soc.* 109 (1987) 8071.
- [13] C. D. DeBose, R. A. Burns, J. M. Donovan, M. F. Roberts, *Biochemistry* 24 (1985) 1298.
- [14] R. L. Misorowski, M. A. Wells, *Biochemistry* 13 (1974) 4921.
- [15] Sigma-Katalog-Nr. V6875.
- [16] R. A. Deems, E. A. Dennis, *Methods Enzymol.* 71 (1981) 703.
- [17] Sigma-Katalog-Nr. P0790 (EC 3.1.1.4).
- [18] C. R. Kensil, E. A. Dennis, *J. Biol. Chem.* 254 (1979) 5843.
- [19] Wir können nicht ausschließen, daß alkylierte Phosphatidylcholine das micellare System verändern. Dies erscheint allerdings unwahrscheinlich, da zur Bestimmung der Reaktionsgeschwindigkeiten die neutrale, Oberflächen-aktive Substanz (Triton X-100) in großem Überschuß eingesetzt wurde.
- [20] Die Aktivierung und Hemmung von Proteinkinase C durch Lipid-Derivate [4, 5] muß hier ebenfalls in Betracht gezogen werden.