

dem konnte die hohe Affinität von  $^{99m}\text{Tc}$ -PnAO-Biotin für tumorassoziiertes Avidin durch Imaging mit einer externen  $\gamma$ -Kamera nachgewiesen werden. Ein typisches Beispiel für den positiven Nachweis eines Gehirntumors zeigt Abbildung 3<sup>[10]</sup>. In dieser Studie wurde somit erstmals erfolgreich

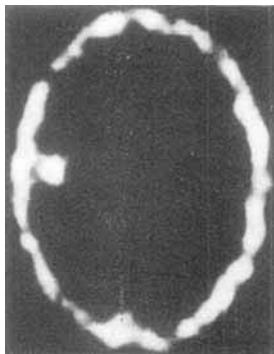


Abb. 3. Einphotonenemissions-Computer tomographie (SPECT) eines Patienten mit einem Gehirntumor. Die Aufnahme erfolgte 30 min nach der Injektion von  $^{99m}\text{Tc}$ -PnAO-Biotin. Ein Gehirntumor-spezifischer, avidinierter monoklonaler Antikörper war drei Tage zuvor injiziert worden. Der Tumor ist am linken Rand in der Mitte deutlich zu erkennen.

ein  $^{99m}\text{Tc}$ -Komplex in Patienten in einer Pretargeting-Methode eingesetzt. Ähnliche Komplexe für therapeutische Anwendungen werden zur Zeit entwickelt.

#### Experimentelles

Die neunstufige Synthese von 1 wird an anderer Stelle publiziert werden. Markierung von 1 mit  $^{99m}\text{Tc}$ : 1.7 mL einer  $\text{N}_2$ -gesättigten Lösung von 900  $\mu\text{g}$  (1.49  $\mu\text{mol}$ ) 1, 4.5  $\mu\text{g}$  (0.02  $\mu\text{mol}$ )  $\text{SnCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  und 8.05 mg (28.5  $\mu\text{mol}$ ) Kaliumnatriumtartrat  $\cdot 4\text{H}_2\text{O}$  werden mit NaOH auf pH 7.5 eingestellt. Zu dieser Lösung werden 740–1100 MBq frisch eluiertes  $^{99m}\text{TcO}_4^-$  gegeben; nach ca. 15 min bei Raumtemperatur ist die Reaktion abgeschlossen, und das Präparat ist nach Sterilfiltration bereit zur Injektion. Soll eine Markierung mit hoher spezifischer Aktivität erreicht werden, kann überschüssiges unmarkiertes 1 mit einer C<sub>18</sub>-Sepak-Kartusche leicht entfernt werden: Hydrophiles 1 wird mit  $\text{H}_2\text{O}$  ausgewaschen, während  $^{99m}\text{Tc}$ -PnAO-Biotin mit Methanol entfernt wird. Das Lösungsmittel wird bei 40 °C unter  $\text{N}_2$  abgedampft und der Rückstand zur Injektion in Phosphatpuffer aufgenommen.

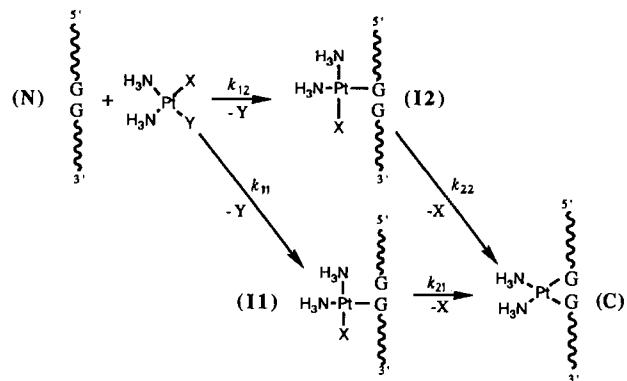
Eingegangen am 8. April,  
veränderte Fassung am 4. Juni 1992 [Z 5292]

- [1] M. K. Moi, C. F. Meares, S. J. DeNardo, *J. Am. Chem. Soc.* **1988**, *110*, 6266–6267; D. J. Hnatowich, U. U. Layne, R. J. Childs, D. Lateigne, M. A. Davis, T. W. Griffin, P. W. Doherty, *Science* **1983**, *220*, 613–617; M. W. Brechbiel, O. A. Gansow, R. W. Atcher, J. Schlam, J. Esteban, D. E. Simpson, D. Colcher, *Inorg. Chem.* **1986**, *25*, 2772–2781; G. Ruser, W. Ritter, H. R. Maecke, *Bioconjugate Chem.* **1990**, *2*, 345–349.
- [2] J. P. Mach, S. Correl, M. Forni, J. Ritschard, A. Donath, P. Alberto, *Engl. J. Med.* **1980**, *303*, 5–10; T. A. Waldmann, *Science* **1991**, *252*, 1657–1662.
- [3] M. Wilchek, E. A. Bayer, *Immunol. Today* **1984**, *5*, 39–42.
- [4] D. Hoyer, H. Cho, P. G. Schultz, *J. Am. Chem. Soc.* **1990**, *112*, 3249–3250.
- [5] M. Wilchek, E. A. Bayer, *Trends Biochem. Sci.* **1989**, *14*, 408–412.
- [6] H. Sigel, *Experientia* **1981**, *37*, 789–798.
- [7] PnAO ist ein Acronym, das für diese Art Liganden verwendet wird (Propylenamindioxim).
- [8] Das Produkt ist gemäß TLC (Kieselgel,  $\text{CH}_3\text{CN}/25\text{proz. NH}_3$  10/1,  $R_f = 0.18$ ) und HPLC (C18, Bondapak 10  $\mu\text{m}$ , 0.01 M Ammoniumacetat (pH 7)/ $\text{CH}_3\text{CN}$  2/3) rein. Die  $^{13}\text{C}$ - und  $^1\text{H}$ -NMR-Spektren und die FAB-Massenspektren sind in Einklang mit der vorgeschlagenen Struktur.
- [9] S. Jurisson, E. O. Schlepper, D. E. Troutner, L. R. Canning, D. P. Nowotnik, R. D. Neirinckx, *Inorg. Chem.* **1986**, *25*, 543–549.
- [10] Bei einem Teil der Patienten wurde die Avidin/Biotin-Pretargeting-Methode mit der Anwendung eines  $^{99m}\text{Tc}$ -markierten Antikörpers verglichen. Die Pretargeting-Methode zeigte den Tumor sehr deutlich, da die unspezifische Aufnahme des Radiotracers sehr gering war, so daß ein gutes Tumor/Nichttumor-Verhältnis resultierte, während der direkt markierte Antikörper eine hohe unspezifische Lokalisierung aufwies. Eine ausführliche Studie zum Vergleich der beiden Methoden wird an anderer Stelle publiziert werden.

#### Verknüpfung benachbarter Guaninreste in einem Oligonukleotid durch *cis*-[Pt(NH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>(H<sub>2</sub>O)<sub>2</sub>]<sup>2+</sup>: kinetische Analyse der Zwei-Schritt-Reaktion\*\*

Von Florence Gonnet, Jiří Kozelka\*  
und Jean-Claude Chottard

Das Antitumormittel *cis*-Diammindichloroplatin(II) („Cisplatin“) bindet an DNA unter Verknüpfung von zwei benachbarten Guaninresten innerhalb des DNA-Stranges<sup>[1]</sup>. Das Makrochelat wird in einer Zwei-Schritt-Reaktion (Schema 1) mit einer der hydrolysierten Cisplatin-Formen – *cis*-[PtCl(NH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>(H<sub>2</sub>O)<sub>2</sub>]<sup>+</sup> oder *cis*-[Pt(NH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>(H<sub>2</sub>O)<sub>2</sub>]<sup>2+</sup> – als reaktiver Platinverbindung gebildet. Dabei sind 60–65 % des Platins an GG-Einheiten der DNA gebunden, wie sowohl in in-vitro- als auch in in-vivo-Experimenten gezeigt werden konnte<sup>[2–7]</sup>. Dieser Prozentsatz überschreitet signifikant die Wahrscheinlichkeit, zwei benachbarte Guaninreste aufzufinden. Da die in Schema 1 gezeigten Reaktionen unter den entsprechenden experimentellen Bedingungen irreversibel sind, bedeutet dies, daß die Reaktivität von Guaninresten in GG-Sequenzen höher ist als in anderen Positionen. Die Ursache für diese unterschiedliche Reaktivität von Guaninresten ist unbekannt. Ein Faktor ist möglicherweise die Verstärkung des negativen Potentials am N7-Atom eines Guaninrestes, der sich in direkter Nachbarschaft zu einem weiteren Guaninrest befindet, wie durch ab-initio-Rechnungen vorausgesagt wurde<sup>[8]</sup>. Wie wir kürzlich durch Molecular Modelling zeigen konnten<sup>[1]</sup>, könnten auch nicht-bindende Wechselwirkungen im Übergangszustand<sup>[9]</sup>, vor allem solche zwischen den Liganden am Platin und den DNA-Resten in Nachbarschaft zum platinierten Guanin, eine Rolle spielen. Ein solcher Mechanismus wäre ligandenabhängig, und die Bindungsselektivität des Platinkomplexes sollte sich durch die Wahl der Liganden beeinflussen lassen.



Schema 1. Bindung eines *cis*-Pt(X)(Y)(NH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>-Komplexes (X, Y = austretende Gruppen) an die GpG-Sequenz eines Oligonukleotids.

Es stellt sich sofort die Frage, ob der 5'-Guaninrest einer d(GpG)-Sequenz die Reaktivität des 3'-Guanins erhöht oder umgekehrt. Bisher konnte auf diese Frage keine Antwort gefunden werden, weil es nicht möglich war, die Geschwindigkeitskonstanten für die Platinierung der beiden Guaninreste ( $k_{11}$  und  $k_{12}$  in Schema 1) getrennt zu bestimmen.

[\*] Dr. J. Kozelka, F. Gonnet, J.-C. Chottard  
URA 400, Laboratoire de Chimie et Biochimie Pharmacologiques et Toxicologiques  
45 rue des Saints Pères, F-75270 Paris Cedex 06 (Frankreich)

[\*\*] Wir danken Dr. J. Igolen für das d(TGG)-Trinukleotid. Diese Arbeit wurde durch die Europäische Gemeinschaft gefördert (Projekt-Nr. ST2J-0462-C), wodurch ein regulärer wissenschaftlicher Austausch mit der Arbeitsgruppe von Prof. J. Reedijk, Leiden, NL, möglich war.

Wir beschreiben hier eine Technik, die nicht nur die Messung der Geschwindigkeitskonstanten der primären Platinierung,  $k_{11}$  und  $k_{12}$ , sondern auch die Bestimmung der Bildungskonstanten der Chelate,  $k_{21}$  und  $k_{22}$ , ermöglicht, und berichten über eine Anwendung auf die Reaktion zwischen dem Einzelstrang-Oligonukleotid d(TpGpG) und der Diaqua-Form des Cisplatsins,  $cis$ -[Pt(NH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>(H<sub>2</sub>O)<sub>2</sub>]<sup>2+</sup>. Hierzu läßt man bekannte, annähernd stöchiometrische Mengen von Oligonukleotid und Platinkomplex miteinander reagieren. In regelmäßigen Abständen entnimmt man aliquote Teile der Lösung, stoppt die Reaktion durch Zugabe gesättigter KCl-Lösung und kühl dann mit flüssigem Stickstoff. Die so konservierten Proben werden anschließend durch HPLC analysiert. Abbildung 1 zeigt ein typisches Chromatogramm mit Banden der in Schema 1 gezeigten vier Spezies N, I1, I2 und C für die Reaktion mit d(TGG). Die hohe Auflösung ermöglicht eine genaue Integration der Peaks und somit eine präzise Bestimmung der Konzentrationen. Wir haben ein Computerprogramm entwickelt, das für jeden Zeitpunkt  $t_i$  die vier Konzentrationen  $[N]_i$ ,  $[I1]_i$ ,  $[I2]_i$  und  $[C]_i$  unter Annahme der Geschwindigkeitskonstanten  $k_{11}$ ,  $k_{12}$ ,  $k_{21}$  und  $k_{22}$  berechnet; dabei werden die Geschwindigkeitskonstanten zur Verbesserung der Anpassung iteriert (siehe Anhang).

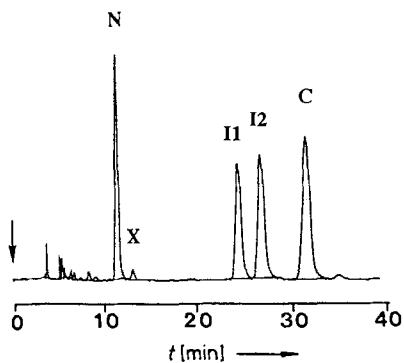


Abb. 1. Ein typisches HPL-Chromatogramm für eine stöchiometrische Umsetzung von d(TGG) ( $10^{-3}$  M) mit  $cis$ -[Pt(NH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>(H<sub>2</sub>O)<sub>2</sub>](NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub> in 0.1 M NaClO<sub>4</sub> nach Zugabe eines Überschusses an KCl.  $T = 293$  K; pH = 4.4;  $t = 12$  min (X = Verunreinigung; weitere Bezeichnungen gemäß Schema 1).

Weil im allgemeinen nur die Konzentration des Platinkomplexes genau bestimmt werden kann – die Konzentration des Oligonukleotids wird anhand seiner UV-Absorption ermittelt –, wird der Über- oder Unterschluß an Oligonukleotid (bezogen auf den Platinkomplex) als fünfte Variable benutzt. Die korrekte Arbeitsweise des Programms wurde in zwei Kontrollexperimenten überprüft, in denen ein definierter großer Überschluß an Oligonukleotid eingesetzt wurde. Mit Hilfe des Programms bestimmten wir einen Überschluß, der um  $\leq 10\%$  von dem durch UV-Spektroskopie ermittelten Wert abwich, was mit dem Fehler der Konzentrationsmessung übereinstimmt. Die vier Geschwindigkeitskonstanten, die in diesen Kontrollexperimenten bestimmt wurden, ähneln denen aus den anderen Versuchen.

Abbildung 2 zeigt den typischen Verlauf der Konzentrationskurven nach Optimierung der fünf Variablen für die Reaktion von d(TGG) mit  $cis$ -[Pt(NH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>(H<sub>2</sub>O)<sub>2</sub>]<sup>2+</sup>. Wir ermittelten die folgenden Geschwindigkeitskonstanten (Mittelwerte aus fünf Messungen) bei 293 K:

$$k_{11} = 0.90 \pm 0.07 \text{ M}^{-1} \text{s}^{-1} \quad k_{12} = 0.89 \pm 0.08 \text{ M}^{-1} \text{s}^{-1}$$

$$k_{21} = (1.76 \pm 0.09) \cdot 10^{-3} \text{ s}^{-1} \quad k_{22} = (1.27 \pm 0.09) \cdot 10^{-3} \text{ s}^{-1}$$

Anscheinend sind beide Guaninreste dieses Trinucleotids gleich reaktiv. Die Chelatbildung erfolgt beim 3'-platinierter Zwischenprodukt I1 etwas schneller als beim 5'-platinierter Zwischenprodukt I2.

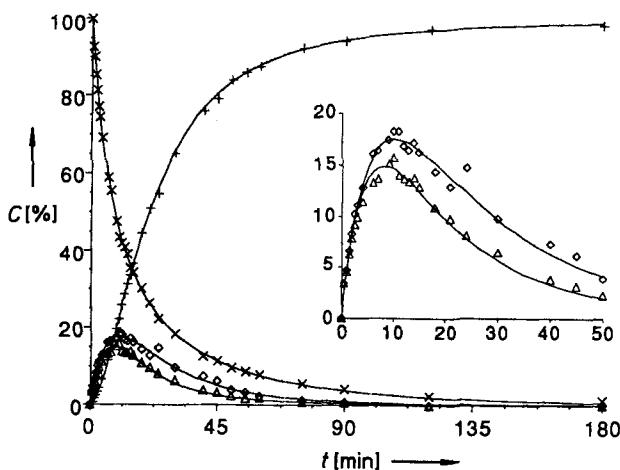
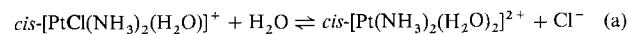


Abb. 2. Errechnete Kurven und ermittelte Werte für die vier relativen Konzentrationen [N] (x), [I1] (Δ), [I2] (○) und [C] (+).

Das Fernziel dieser Untersuchung ist es, die Geschwindigkeitskonstanten für Reaktionen von Oligonukleotiden verschiedener Längen und Sequenzen, einschließlich Doppelstrang-DNA, mit verschiedenen Platinkomplexen zu vergleichen. Das Verständnis der hohen Affinität von Cisplatin gegenüber GG-Sequenzen, und vor allem des Einflusses der Liganden hierauf, wird es hoffentlich ermöglichen, durch gezielte Ligandenvariation diese Affinität zu variieren. Es sollte dann auch möglich sein zu prüfen, ob zwischen der sequenzspezifischen Bindung an die DNA und der Antitumorwirkung der Platinkomplexe ein Zusammenhang besteht.

Eine kinetische Analyse der Reaktion zwischen TGG und  $cis$ -[PtCl(NH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>(H<sub>2</sub>O)]<sup>+</sup> wird derzeit in unserem Laboratorium durchgeführt. Der Versuchsablauf ist genau derselbe wie bei der Umsetzung mit dem Diaquakomplex  $cis$ -[Pt(NH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>(H<sub>2</sub>O)<sub>2</sub>]<sup>2+</sup>, da man dieselben Endprodukte erhält. Allerdings ist die Bestimmung der Geschwindigkeitskonstanten komplizierter, da das Gleichgewicht (a) berücksichtigt werden muß:



Die Bestimmung der Geschwindigkeitskonstanten für das Reaktionssystem mit  $cis$ -[Pt(NH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>(H<sub>2</sub>O)<sub>2</sub>]<sup>2+</sup> ist Voraussetzung für Arbeiten an dem komplexeren System mit  $cis$ -[Pt-Cl(NH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>(H<sub>2</sub>O)]<sup>+</sup>. Auch die Reaktionen anderer Platinkomplexe mit Oligonukleotiden können mit unserer Methode analysiert werden; Voraussetzung ist allerdings, daß die Anfangs-, Zwischen-, und Endprodukte einfach abgefangen und durch HPLC getrennt werden können.

#### Experimenteller Teil

Die Reaktion wurde durch Mischen einer Lösung von ca. 2 μmol d(TGG) (mit UV-Spektrophotometrie gemessen, mit  $\epsilon_{254} = 22\,170 \text{ M}^{-1} \text{cm}^{-1}$ ) [10] in 0.1 M NaClO<sub>4</sub> mit 2 μmol  $cis$ -[Pt(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub>(NH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>] (hergestellt nach Lit. [11]) in 2 mL H<sub>2</sub>O gestartet. Der pH-Wert der Lösung wurde am Anfang der Reaktion mit HClO<sub>4</sub> auf 4.4 eingestellt. Nach einem kurzen Anstieg, den wir mit der Freisetzung des gebundenen Wassers begründen, nahm er auf 4.3 ab. Dies hängt wahrscheinlich mit atmosphärischem Kohlendioxid zusammen, das in Lösung geht. Die Reaktionstemperatur wurde bei  $293 \pm 0.2$  K gehalten. Wir entnah-

men in Intervallen, die von 30 s (Beginn) bis 15 min (Ende) variierten, aliquote Teile von 30  $\mu\text{L}$  und versetzten diese in einer Eppendorf-Pipette mit 30  $\mu\text{L}$  gesättigter Kaliumchloridlösung. Nach einer Inkubationszeit von 1.75 min bei 273 K, in deren Verlauf die Monoaquakomplexe in Monochlorverbindungen überführt werden [12], wurden die Proben in flüssigen Stickstoff getaut und bis zur Analyse bei 77 K gehalten. Die Kühlung auf 77 K ist wichtig, da noch bei 193 K, der Temperatur von Trockeneis, die einfach koordinierten Spezies **I1** und **I2** trotz Überschuss an KCl in das Chelat **C** überführt werden. Da die späteren HPLC-Analysen sehr zeitraubend sind und so einige Proben über mehrere Tage aufbewahrt werden müssen, kann diese langsame Umwandlung die relativen Konzentrationen signifikant verändern.

Für die HPLC-Analysen benutzten wir einen Spectra-Physics-SP-8800-Chromatographen mit einer Nucleosil-Cl8-Säule (250  $\times$  4.6 mm ID, 5  $\mu\text{m}$ , 100  $\text{\AA}$ ; Macherey Nagel). Die Standardarbeitsbedingungen waren: Mobile Phase: Ammoniumacetatpuffer (Merck; 0.01 M, pH = 4.70) und Acetonitril (Merck) (95:5 v/v); Flußrate: 0.8  $\text{mL min}^{-1}$ ;  $T = 298$  K. Die Detektion erfolgte bei 255 nm. Bei dieser Wellenlänge nimmt die Absorption des Reaktionsgemisches im Verlauf der Reaktion um 4% ab, wobei die Abnahme in etwa mit der Bildung des Chelats **C** korreliert. Die durch Peak-Integration ermittelte Konzentration von **C** wurde deshalb mit dem Faktor 1.04 korrigiert.

Wir identifizierten die Monoaddukte durch enzymatischen Abbau der entsprechenden Fraktionen mit der Exonuclease Venuum-Phosphodiesterase (VPD, Sigma). VPD spaltet das 5'-Monoaddukt (**I2**) in *cis*-[PtCl(NH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>d(TpG-N7)] und dTpG, während das 3'-Monoaddukt (**I1**) nicht angegriffen wird [13].

## Anhang

Die Integration der Differentialgleichungen, durch die die Kinetik des Reaktionssystems aus Schema 1 beschrieben wird, ergibt zur Zeit  $t$  für die Konzentrationen **[N]**, **[I1]**, **[I2]** und **[C]** die folgenden Ausdrücke ( $W = \text{Überschuß an } cis\text{-[Pt(NH}_3\text{)}_2(\text{H}_2\text{O})_2(\text{NO}_3\text{)}_2 \text{ bezogen auf das Oligonucleotid N)}$ :

$$\begin{aligned} \text{[N]} &= \frac{W}{e^{(k_{11}+k_{12})t} - 1} \\ A &= \frac{\ln(W/[N]_0 + 1)}{W}; k_1 = k_{11} + k_{12}; W = [\text{Pt}] - [\text{N}] \\ \text{[I1]} &= k_{11} e^{-k_{11}t} \int [\text{N}] (\text{[N]} + W) e^{k_{11}t} dt \\ \text{[I2]} &= k_{12} e^{-k_{12}t} \int [\text{N}] (\text{[N]} + W) e^{k_{12}t} dt \\ \text{[C]} &= [\text{N}]_0 - [\text{N}] - \text{[I1]} - \text{[I2]} \end{aligned}$$

Die Integrale in den Gleichungen für **[I1]** und **[I2]** wurden für Zeitabstände von 1 s numerisch gelöst. Zur Optimierung wurde das Lot durch den Meßpunkt auf die Tangente der errechneten Kurve gefällt (**p** in Abb. 3). Wir bevorzugten diese Methode, anstatt den vertikalen Abstand (**v** in Abb. 3) zu verwenden, der die Differenz zwischen berechneten und experimentell bestimmten Konzentrationen wiedergibt. Diese Näherung bezieht sich auf den experimentellen Fehler von Zeit und Konzentration und ist nur dann sinnvoll, wenn die Skaleneinteilung beider Variablen entsprechend der Meßgenauigkeit gewählt wird.

Die Näherungsfunktion lautet:

$$F = \left[ \sum_i (p_i^N)^2 + \sum_i (p_i^{I1})^2 + \sum_i (p_i^{I2})^2 + \sum_i (p_i^C)^2 \right]^{1/2} \quad (1)$$

Dabei sind  $p_i^x$  die durch Fällen des Lotes ermittelten Abweichungen der Meßwerte  $i$  von der errechneten Kurve, bestimmt durch  $p_i^x =$

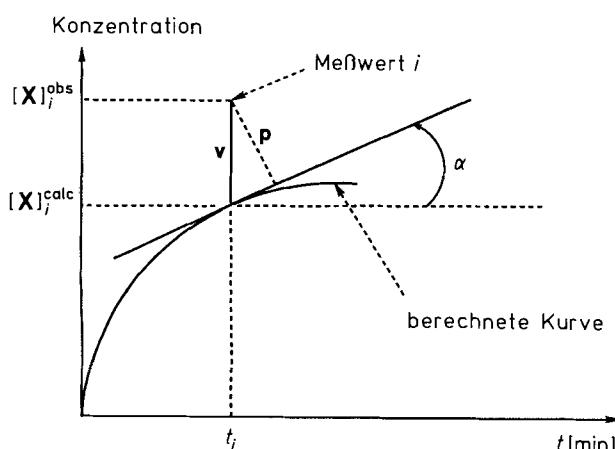


Abb. 3. Zwei Abstände, durch die die Beziehung zwischen Meßwert und berechneter Kurve ausgedrückt werden kann; **p** ist die Normale zur Kurve durch den Meßpunkt. In linearer Näherung ist  $p = v \cos \alpha$ . Die Variablen sind in Einheiten skaliert, die mit deren systematischen Meßfehlern korreliert. Während **v** nur die Ungenauigkeit der Konzentrationsmessung wiedergibt, berücksichtigt **p** den Fehler beider Variablen.

$\{[X]_i^{\text{obs}} - [X]_i^{\text{calc}}\} \cos \alpha = \{[X]_i^{\text{obs}} - [X]_i^{\text{calc}}\} (1 + \tan^2 \alpha)^{-1/2}$  mit  $\tan \alpha = \{d[X]_i^{\text{calc}} / dt\}_i / s(t)/s([X])$ .  $[X]_i^{\text{obs}}$  und  $[X]_i^{\text{calc}}$  sind die beobachteten bzw. errechneten Konzentrationen des Produkts **X** zur Zeit  $t_i$ ;  $s(t)$  und  $s([X])$  wurden entsprechend der Fehler bei der Bestimmung von Zeit und relativen Konzentrationen als 4 s und 2% der Ausgangskonzentration an Oligonucleotid geschätzt. Die Teilsummen in Gleichung (1) wurden in der zweiten Potenz eingebracht, damit nicht eine Kurve durch das Programm wesentlich schlechter angepaßt wird als die anderen. Zur Optimierung benutzten wir einen „grid-search“-Algorithmus [14].

Ein eingegangen am 14. Mai 1992 [Z 5348]

CAS-Registry-Nummern:

**N**, 34727-11-2; **C**, 144017-98-1; **I1**, 144041-54-3; **I2**, 144017-99-2; *cis*-[Pt(NH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>(H<sub>2</sub>O)<sub>2</sub>](NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub>, 52241-26-6; *cis*-[PtCl(NH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>(H<sub>2</sub>O)]<sup>0</sup>, 53861-42-0.

- [1] A. Laoui, J. Kozelka, J. C. Chottard, *Inorg. Chem.* **1988**, *27*, 2751–2753.
- [2] A. Eastman, *Biochemistry* **1983**, *22*, 3927–3933.
- [3] A. Eastman, *Biochemistry* **1985**, *24*, 5027–5032.
- [4] A. Eastman, M. A. Barry, *Biochemistry* **1987**, *26*, 3303–3307.
- [5] A. Eastman, N. Schulte, *Biochemistry* **1988**, *27*, 4730–4734.
- [6] A. M. J. Fichtinger-Schepman, P. H. M. Lohman, J. Reedijk, *Nucleic Acids Res.* **1982**, *10*, 5345–5356.
- [7] A. M. J. Fichtinger-Schepman, J. L. van der Veer, J. H. J. Den Hartog, P. H. M. Lohman, J. Reedijk, *Biochemistry* **1985**, *24*, 707–713.
- [8] A. Pullman, C. Zakrzewska, D. Perahia, *Int. J. Quantum Chem.* **1979**, *16*, 395–403.
- [9] Als Vergleichsverbindung wurde das fünffach koordinierte Zwischenprodukt unter der Annahme verwendet, daß sich die Struktur des Übergangszustands hier von nicht wesentlich unterscheidet.
- [10] Es wurde folgende Näherung durchgeführt:  $\varepsilon_{254}\{d(\text{TGG})\} \approx \varepsilon_{254}\{d(\text{dT})\} + 2\varepsilon_{254}\{d(\text{pG})\}$ ;  $\varepsilon_{254}\{d(\text{dT})\}$  und  $\varepsilon_{254}\{d(\text{pG})\}$  wurden an Sigma-Produkten unter Berücksichtigung des analytisch bestimmten Wassergehaltes als  $5850 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$  bzw.  $8160 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$  gemessen.
- [11] Y. N. Kukushkin, S. C. Dhara, *Indian J. Chem.* **1970**, *8*, 184–185.
- [12] Es ist notwendig, die Monoqua-Produkte (**I**,  $X = \text{H}_2\text{O}$ ) in Monochlorverbindungen (**I**,  $X = \text{Cl}$ ) umzuwandeln, da die Chelatbildung sonst während der HPLC-Analyse weitergeht, wodurch die Trennung unvollständig wird. Dazu sollte die Temperatur mindestens 1.75 min bei 293 K gehalten werden. Längere Inkubationen vermeidet man besser, da die Chelatbildung bei dieser Temperatur nicht ausreichend unterdrückt werden.
- [13] K. Inagaki, Y. Kidani, *Inorg. Chim. Acta* **1985**, *106*, 187–191.
- [14] J. A. McCammon, S. C. Harvey, *Dynamics of Proteins and Nucleic Acids*, Cambridge University Press, Cambridge, 1987, S. 48.

## Formiat-getriebene, nicht-enzymatische NAD(P)H-Regeneration bei der durch Alkohol-Dehydrogenasen katalysierten stereoselektiven Reduktion von 4-Phenyl-2-butanon\*\*

Von Dorothee Westerhausen, Sabine Herrmann, Werner Hummel und Eberhard Steckhan\*

Biotransformationen organischer Verbindungen durch Enzyme oder Mikroorganismen sind aufgrund ihrer Stereospezifität inzwischen weit verbreitet. Die Anwendung von Redoxenzymen in Synthesen ist wegen der Notwendigkeit zur Cofaktorregeneration bisher jedoch relativ eingeschränkt geblieben. Für Reduktionen mit NAD(P)H-abhängigen Enzymen wurden enzymgekoppelte Regenerationssysteme entwickelt. Dabei wird entweder ein Regenerationsenzym wie Formiat-Dehydrogenase (FDH)<sup>[1]</sup> für NADH-abhängige Produktionsenzyme oder das Produktionsenzym

[\*] Prof. Dr. E. Steckhan, Dipl.-Chem. D. Westerhausen, Dr. S. Herrmann  
Institut für Organische Chemie und Biochemie der Universität  
Gerhard-Domagk-Straße 1, W-5300 Bonn 1

Priv.-Doz. Dr. W. Hummel  
Institut für Enzymtechnologie der Universität Düsseldorf  
in der KFA Jülich GmbH  
Postfach 2050, Wilhelm-Johnen-Straße, W-5170 Jülich

[\*\*] Diese Arbeit wurde vom Bundesministerium für Forschung und Technologie (0319410A) sowie von der BASF Aktiengesellschaft und dem Fonds der Chemischen Industrie gefördert. Wir danken der BASF AG und der DEGUSSA AG für Chemikalienspenden sowie Frau Professor M.-R. Kula, Düsseldorf, und Herrn Professor Dr. C. Wandrey, Jülich, für Unterstützung.