

Ein an ein Guanidinium-Elektrophil (unten) gebundener RNA-Phosphodiester (links), bei dem die 2'-OH-Gruppe des Riboserestes mit einem basischen Imidazolrest (rechts) wechselwirkt — dies ist eines der gegenwärtig untersuchten Modelle, die für den Mechanismus der katalytischen RNA-Spaltung durch Umesterung vorgeschlagen wurden.

# Der Mechanismus der RNA-Spaltung durch Umesterung – eine vereinheitlichende Analyse des aktuellen Diskussionsstandes

Denise M. Perreault und Eric V. Anslyn\*

Die unterschiedlichen Mechanismen der RNA-Hydrolyse werden gegenwärtig intensiv untersucht. Der erste Schritt der Reaktionssequenz ist eine Spaltung und Umesterung, bei der eine 2'-OH-Gruppe eine 3',5'-Phosphodiesterbindung angreift und die 5'-Gruppe verdrängt, der zweite die Öffnung des entstandenen cyclischen 2',3'-Phosphodiesters. Die Komplikationen bei dieser Reaktion rühren von den unterschiedlichen möglichen Wegen her, an denen spezifische und allgemeine Säuren und Basen als Katalysatoren beteiligt sind. Außerdem gibt es unterschiedliche Ansichten über

den Protonierungsgrad der Phosphodiester und aller unter den verschiedenen experimentellen Bedingungen als Zwischenprodukte auftretenden Phosphorane. Hier werden Untersuchungen zum Mechanismus der spezifischen und allgemeinen Säure- und Basenkatalyse bei der Hydrolyse von RNA und RNA-Analoga sowie Interpretationen der experimentellen Befunde präsentiert. Dazu gehören auch theoretische Rechnungen, Untersuchungen zur Kinetik, Bestimmungen der  $pK_a$ -Werte, Isotopeneffekte, Hammett- und Brønsted-Beziehungen sowie Modellbetrach-

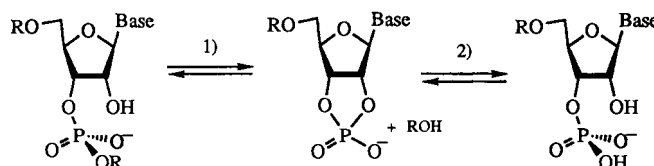
tungen. Neuere Analysen des Reaktionsmechanismus von RNase A werden ebenfalls diskutiert. Einleitend werden zwei Mechanismen für die Spaltung und Umesterung vorgestellt, die die bekannten Daten miteinander in Einklang bringen und die sich nur in der Rolle der Phosphorane und ihres Protonierungsgrades unterscheiden. Danach werden die Literaturdaten analysiert, die diese Mechanismen stützen.

**Stichworte:** Hydrolyse · Kinetik · Reaktionsmechanismen · RNA

## 1. Einleitung

Der Mechanismus der nichtenzymatischen Hydrolyse der RNA-Phosphodiesterbindungen wird schon seit vielen Jahren untersucht. In jüngerer Zeit wurden die Untersuchungen durch den Wunsch vorangetrieben, synthetische Katalysatoren für die RNA-Hydrolyse herzustellen.<sup>[1]</sup> Ein vollständiges Bild des Mechanismus würde den gezielten Entwurf synthetischer sowie semisynthetischer Katalysatoren zur RNA-Hydrolyse erleichtern, die in der Gentherapie eingesetzt werden könnten.<sup>[2]</sup> Außerdem hängt die Interpretation eines Enzymmechanismus oft von der Kenntnis des Mechanismus in Lösung ab, da das Enzym sich entwickelt hat, um den Übergangszustand eines Moleküls in Lösung zu stabilisieren.<sup>[3]</sup> Es gibt also zwei unabhängige Motive für die intensive Beschäftigung mit diesem Thema.

Die Hydrolyse läuft in zwei Schritten ab: Sie beginnt mit einer Spaltung durch Umesterung, auf die eine Hydrolysereaktion folgt (Schema 1). Diese beiden Schritte erscheinen zwar einfach, hängen aber beide in komplizierter Weise vom pH-Wert ab und werden durch allgemeine und spezifische Säuren und Basen katalysiert. Die möglichen Mechanismen für den Spaltungs- und

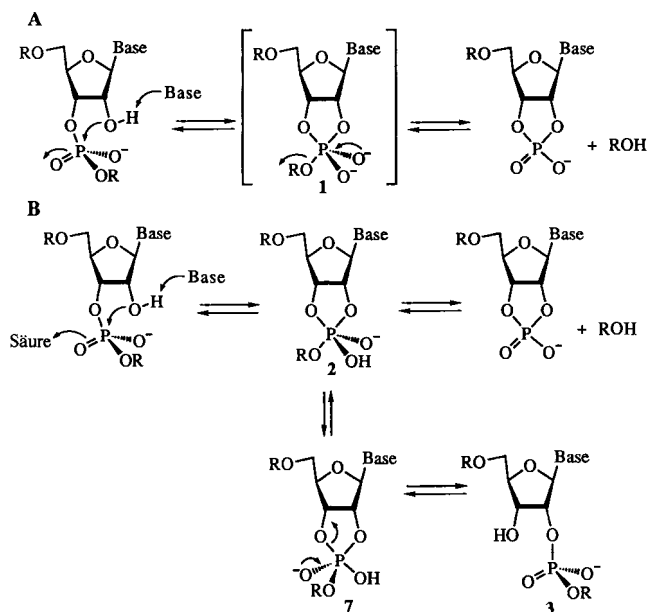


Schema 1. Die beiden Schritte der RNA-Hydrolyse: 1) Spaltung durch Umesterung und 2) Hydrolyse des cyclischen Phosphodiesters.

Umesterungsschritt sind in Schema 2 dargestellt. Der erste Schritt beginnt in jedem Fall mit dem nucleophilen Angriff der 2'-OH-Gruppe der Ribose, wodurch ein trigonal-bipyramidales Phosphoran entsteht. Im zweiten Schritt wird die Abgangsgruppe abgespalten. Durch den Mechanismus müssen Produkte, die durch Pseudorotation entstehen, ebenso erklärt werden können wie die Phosphoran-Zwischenprodukte 1 oder 2. Die Details der spezifischen und allgemeinen Katalyse der beiden Schritte, der Struktur und der Lebensdauer der Phosphorane sind noch nicht vollständig verstanden.

Viele Arbeiten über die RNA-Hydrolyse drehen sich um das Phosphoran-Zwischenprodukt. Dabei sind drei Aspekte von überragender Bedeutung: die Lebensdauer des Phosphorans, sein Protonierungsgrad und die Abhängigkeit dieser beiden Faktoren von der Abgangsgruppe. Daneben wird viel darüber diskutiert, wie diese drei Aspekte von den experimentellen Bedingungen wie dem Typ der Katalyse oder dem pH-Wert abhän-

[\*] Prof. E. V. Anslyn, D. M. Perreault  
Department of Chemistry and Biochemistry  
The University of Texas at Austin  
Austin, TX 78712 (USA)  
Telefax: Int. + 512/471-8696  
E-mail: anslyn@ccwf.cc.utexas.edu



Schema 2. Zwei Mechanismen, die mit der überwiegenden Zahl der Untersuchungen konsistent sind: A) Mechanismus, der über ein kurzlebiges dianionisches Phosphoran oder einen dianionischen phosphoranähnlichen Übergangszustand verläuft. B) Die vorgelagerte oder gleichzeitig mit dem nucleophilen Angriff erfolgende Protonierung des Phosphodiesters ergibt ein monoanionisches, einfach protoniertes Zwischenprodukt, das unter Spaltung oder Umlagerung weiterreagieren kann.

gen. Eine Klärung dieser Fragen ist eine wichtige Voraussetzung für ein umfassendes Verständnis des Mechanismus der RNA-Hydrolyse.

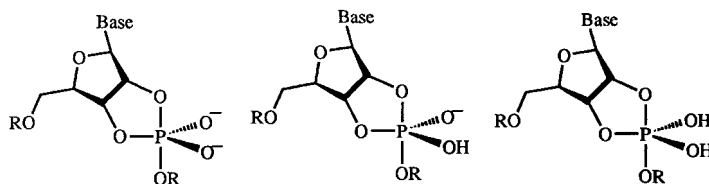
In diesem Beitrag werden acht Hypothesen zur RNA-Hydrolyse sowie zwei Reaktionsmechanismen präsentiert. Die Konzepte, auf denen diese Hypothesen beruhen, sind zwar nicht neu, aber auch nicht notwendigerweise allgemein anerkannt. Im Anschluß an diese Hypothesen und Mechanismen werden alte und neue Untersuchungen zum Mechanismus der RNA-Hydrolyse diskutiert. Jeder Abschnitt dient dazu, die Hypothesen und Mechanismen abzusichern; aber auch bislang nicht beschriebene Experimente werden in einigen Fällen diskutiert. Dabei sind wir

uns durchaus darüber im klaren, daß manche Untersuchungen anders interpretiert werden können als wir es hier tun. Das Motiv für unsere Interpretationen ist, zwei einfache Mechanismen zu untermauern. Diese werden nicht zum erstenmal erläutert, sondern sind bereits in unterschiedlichen Formen besprochen worden. Unser Ziel ist es, die beiden Mechanismen im Licht einer großen Menge solcher experimenteller Befunde zu präsentieren, die als Bestätigung dienen können. Es bleibt künftigen Forschungsarbeiten vorbehalten, die Stichhaltigkeit der Mechanismen weiter zu prüfen.

## 2. Hypothesen und Mechanismen

### 2.1. Die Hypothesen

1. Ein dianionisches Phosphoran ist kinetisch nicht von einem Übergangszustand unterscheidbar.<sup>[4]</sup> Seine Lebensdauer reicht nicht für eine Protonierung aus.
2. Dianionische phosphoranähnliche Übergangszustände (Schema 3) werden während der RNA-Hydrolyse sowohl mit allgemeinen als auch mit speziellen Basen gebildet.



Schema 3. Dianionische, monoanionische (einfach protonierte) und neutrale (zweifach protonierte) Phosphorane.

3. Damit ein Phosphoran ein kinetisch signifikantes Zwischenprodukt im Verlauf der RNA-Hydrolyse sein kann, muß es entweder monoanionisch, also einfach protoniert, oder neutral, also zweifach protoniert, sein.

Eric V. Anslyn, geboren am 9. Juni 1960, promovierte 1987 am California Institute of Technology bei Prof. Robert H. Grubbs. Nach eineinhalb Jahren als Postdoc bei Prof. Ronald Breslow an der Columbia University wechselte er zur University of Texas in Austin, wo er seit 1995 fest angestellt ist. Seine Forschungsinteressen konzentrieren sich auf die Untersuchung von Katalysemechanismen mit den Methoden der physikalisch-organischen und der supramolekularen Chemie. Er ist Presidential Young Investigator, Sloan Foundation Fellow und Camille and Henry Dreyfus Teacher-Scholar.



E. V. Anslyn



D. M. Perreault

Denise M. Perreault, geboren am 19. Februar 1968, erwarb 1990 den Titel eines Bachelor of Arts in Chemie und Französisch am Wellesley College in Wellesley, MA (USA). Sie arbeitete als wissenschaftliche Assistentin in der Forschungsabteilung der Polaroid Corporation in Cambridge, MA, wo sie sich mit Entwurf, Synthese und Charakterisierung photographischer Reagentien und deren Verwendung zur Erzielung molekularer Anordnungen beschäftigte. 1991 ging sie als Robert A. Welch Foundation Fellow (1991–1993) an die University of Texas in Austin, wo sie derzeit unter Anleitung von Prof. Eric V. Anslyn an ihrer Dissertation arbeitet.

4. Monoanionische (einfach protonierte) oder neutrale (zweifach protonierte) Phosphorane werden durch die Protonierung des Phosphodiesters vor oder gleichzeitig mit dem nucleophilen Angriff gebildet.

5. Nur wenn der Phosphodiester vor oder während des nucleophilen Angriffs protoniert wird, können Produkte durch Pseudorotation entstehen, z. B. der 3',5'-Phosphoester in der RNA durch Umlagerung des 2',5'-Phosphoesters.

6. RNA-Analoga mit guten Abgangsgruppen werden über dianionische phosphoranähnliche Übergangszustände hydrolysiert; nur bei niedrigen pH-Werten sind monoanionische (einfach protonierte) oder neutrale (zweifach protonierte) Phosphorane als Übergangszustände möglich.

7. Ein Wechsel des Reaktionsmechanismus von einem über ein Phosphoran-Zwischenprodukt zu einem mit einem phosphoranähnlichen Übergangszustand hängt von den  $pK_a$ -Werten der Abgangsgruppe und des Phosphorans, vom pH-Wert und von der Anwesenheit von Säuren und Basen ab.

8. Mechanismen, die über dianionische phosphoranähnliche Übergangszustände, und solche, die über protonierte Phosphoran-Zwischenprodukte verlaufen, können gleichzeitig nebeneinander auftreten.

## 2.2. Die Mechanismen

In Schema 2 sind zwei Mechanismen dargestellt, die alle acht Hypothesen berücksichtigen. Nach Hypothese 1 verdrängt ein dianionisches Phosphoran **1** die Abgangsgruppe direkt, ohne daß es zu einer Protonierung kommen kann (Schema 2 A). Diese einstufige Eliminierung kann durch allgemeine oder spezifische Basen katalysiert werden (Hypothese 2). Die Abgangsgruppe wird als Anion abgespalten oder als Alkohol, wenn sie durch eine vorher assoziierte Säure protoniert wurde. Dieser Mechanismus A paßt auch am besten zu RNA-Analoga, die gute Abgangsgruppen aufweisen, es sei denn, die Reaktion wird bei niedrigem pH durchgeführt (Hypothese 6). Im Unterschied dazu wird nach Mechanismus B (Schema 2 B) der Phosphodiester durch Protonenübertragung von einer Säure aktiviert. Hier ist das Phosphoran **2** ein Zwischenprodukt (Hypothese 3). Das Proton wird entweder vor oder gleichzeitig mit dem nucleophilen Angriff der 2'-OH-Gruppe übertragen (Hypothese 4). Daher ist sowohl eine spezifische als auch eine allgemeine Säurekatalyse möglich. Nach diesem Mechanismus können durch Pseudorotation auch Umlagerungsprodukte wie **3** entstehen (Hypothese 5). Das 2'-Sauerstoffatom kann nach beiden Mechanismen als neutrale OH-Gruppe, als ein durch eine allgemeine Base (teilweise) freigesetztes Anion oder nach vorgelagerter Deprotonierung zur  $O^-$ -Gruppe angreifen. Bei niedrigem pH-Wert gibt es einen dritten Mechanismus, bei dem die Phosphodiesterbindung zweifach protoniert wird und daher kationisch vorliegt. Dieser Mechanismus ist hier nicht dargestellt, da er für die Spaltung von RNA unter physiologischen Bedingungen nur von untergeordneter Bedeutung ist. Er wird aber weiter unten behandelt. Der Übergang von Mechanismus A zu Mechanismus B sollte vom pH-Wert, der Verfügbarkeit allgemeiner Säuren und Basen, dem  $pK_a$ -Wert des Phosphorans und von der Abgangsgruppe abhängen (Hypothese 7). Daher sollte unter bestimmten experimentellen Bedingungen die

Hydrolyse gleichzeitig nach beiden Mechanismen verlaufen (Hypothese 8).

Die folgenden Abschnitte geben einen Überblick über die bisher erhaltenen theoretischen und experimentellen Befunde, die die Hypothesen und die vorgeschlagenen Mechanismen stützen. Die Daten zur Stabilität der Phosphodiesterbindung, die  $pK_a$ -Werte der Phosphorane,  $\alpha$ - und  $\beta$ -Werte, Isotopeneffekte, Kinetik, Modellsysteme und theoretische Rechnungen werden diesbezüglich untersucht.

## 3. Warum verwendet man RNA-Analoga zur Untersuchung der RNA-Hydrolyse?

Die Geschwindigkeit der Hydrolyse von RNA ist im Neutralen und bei Raumtemperatur recht niedrig, so daß sich die Reaktion nur schwer experimentell verfolgen läßt, und hängt stark von der Gegenwart der 2'-OH-Gruppe ab. Das beste Indiz dafür ist, daß Phosphodiester, denen die 2'-OH-Gruppe fehlt (z. B. in DNA), bei pH 7 ungewöhnlich stabil sind. So beträgt die Hydrolysegeschwindigkeit von Dimethylphosphat  $2 \times 10^{-14} \text{ s}^{-1}$ .<sup>[5]</sup> Mit einer 2'-OH-Gruppe oder einem 2'-OH-Analogon ist die Umesterung mehrere Größenordnungen schneller. Beispielsweise wurde die effektive Molarität der 2'-OH-Gruppe der RNA bei der hydroxidkatalysierten Reaktion eines Phenylesters auf  $3 \times 10^7 \text{ M}$  geschätzt.<sup>[6]</sup> Obwohl die 2'-OH-Gruppe zu einer solchen Beschleunigung führen kann, ist die Halbwertszeit für die hydroxidkatalysierte Spaltung von Cytidylcytidin recht lang (1000–10000 Tage bei 60 °C und pH 7).<sup>[7]</sup>

Wenn die Estergruppen der Phosphoester für einen nucleophilen Angriff auf das Kohlenstoffatom leicht zugänglich sind, kann sich der Hydrolysemechanismus ändern. Bei der Hydrolyse von Dimethylphosphat und Dibenzylphosphat wird die C-O- und nicht die P-O-Einfachbindung gespalten.<sup>[7]</sup> Dagegen wird bei Aryl- und Alkylphosphodiestern, deren C-O-Kohlenstoffatom nicht nucleophil angegriffen werden kann, überwiegend die P-O-Bindung gespalten (Schema 2).

Phosphodiester mit besseren Abgangsgruppen als Alkoxide wurden als RNA- und DNA-Mimetica untersucht. Deren Hydrolyse ist jedoch nur sehr langsam. So ist Diphenylphosphat nach 5 Stunden bei 100 °C und pH 10 noch unverändert, und das Bis-*p*-nitrophenyl-Analogon hat eine Halbwertszeit von vier Monaten bei 100 °C und pH 3–4, während die Halbwertszeit des Bis-2,4-dinitrophenyl-Analogons unter den gleichen Bedingungen nur 75 Minuten beträgt.<sup>[8]</sup> Trotz dieser niedrigen Geschwindigkeiten kann man die hydronium- und hydroxidkatalysierten Hydrolysen der Diphenylphosphodiester verfolgen. Die Katalyse durch spezielle Verbindungen spielt bei fast allen Hydrolysen zwischen pH 0 und 10 eine Rolle. Hängt man einen Ribosering mit einer 2'-OH-Gruppe oder einem Analogon der 2'-OH-Gruppe an, nimmt die Hydrolysegeschwindigkeit weiter zu. Arylphosphoester sind die am meisten benutzten Phosphodiester für mechanistische Untersuchungen, da man mit ihnen hinreichend hohe Umsatzgeschwindigkeiten erreichen kann und außerdem den Reaktionsverlauf UV/Vis-spektrophotometrisch verfolgen kann.

Trialkylphosphotriester wurden ebenfalls intensiver untersucht als Dialkylphosphodiester, da sie schneller hydrolysiert

werden: Typische Hydrolysegeschwindigkeiten von Trialkylestern sind etwa  $10^5$ – $10^6$  mal höher als die von Diestern (siehe Abschnitte 9 und 16). Solche Triester sind auch etwa ein bis zwei Größenordnungen reaktiver als Phosphodiester mit aromatischen Abgangsgruppen.

Cyclische Phosphodiester mit fünfgliedrigen Ringen sind ebenfalls viel reaktiver.<sup>[9]</sup> Nach wie vor besteht das ursprüngliche Postulat, daß die Ringspannung im Substrat durch die Bildung eines phosphoranähnlichen Übergangszustandes erhöht wird.<sup>[10]</sup> Neuere Untersuchungen ergaben allerdings, daß Unterschiede in der Solvation von Substrat und Phosphoran zur gemessenen Geschwindigkeitssteigerung führen können.<sup>[11]</sup>

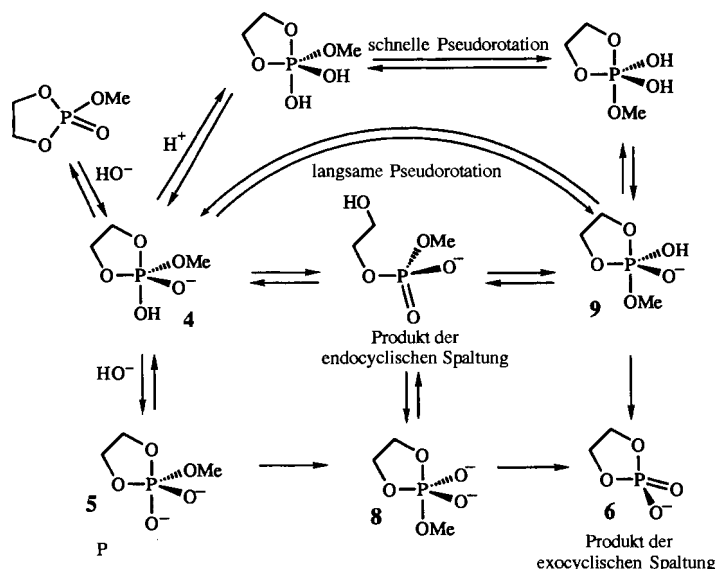
Der Mechanismus der RNA-Hydrolyse kann also trotz der Geschwindigkeitserhöhung durch die 2'-OH-Gruppe nur schwer bestimmt werden, weil die Reaktionsgeschwindigkeit sehr niedrig ist. Daher wurden die Untersuchungen meist mit reaktiveren Analoga, z. B. mit cyclischen Phosphaten, Triestern oder Phosphodiestern mit guten Abgangsgruppen, durchgeführt. Mit Ausnahme der Untersuchungen von Lönnberg et al. sowie von Breslow et al. (Abschnitte 13 bzw. 14) wurde daher der größte Teil der im folgenden zusammengefaßten Ergebnisse mit diesen stärker aktivierten Substraten erhalten.

#### 4. Cyclische Phosphotriester und Pseudorotation

Ein cyclisches Phosphat ist das Umesterungsprodukt, das im ersten Schritt der RNA-Spaltung gebildet und im zweiten hydrolysiert wird. Die gleiche Hydrolyse kann daher als analog zur Umkehr des Umesterungsschrittes in der RNA angesehen werden, wobei statt einer 5'-OH-Gruppe Wasser als Nucleophil fungiert. Folglich wurde die Hydrolyse cyclischer Phosphate untersucht, um mögliche Mechanismen der RNA-Hydrolyse zu testen. Die wahrscheinlich bekanntesten Untersuchungen über den Mechanismus der Hydrolyse von cyclischen Phosphaten sind die von Westheimer mit Methylethylen- (MEP) und Ethylenphosphat.<sup>[12]</sup> Da diese Untersuchungen schon mehrfach zusammengefaßt und diskutiert wurden,<sup>[13]</sup> werden hier nur die Punkte erwähnt, die als Hintergrund für unsere Argumentation notwendig sind.

In Schema 4 sind die Produkte und der vorgeschlagene Reaktionsweg für die Hydrolyse von MEP zusammengefaßt; dazu ist der Anteil exocyclischer Spaltung als Funktion des pH-Wertes in Abbildung 1 dargestellt. Der Anteil exocyclischer Spaltung ist bei niedrigen pH-Werten am größten, geht zwischen pH 10 und 13 gegen Null und nimmt bei höheren pH-Werten wieder zu. Während sich aus den Untersuchungen von Gorenstein et al. keine Anhaltspunkte für eine erhöhte exocyclische Spaltung oberhalb von pH 13 ergaben,<sup>[14]</sup> konnten Kluger und Thatcher sie nachweisen.<sup>[15]</sup> Durch den Kurvenverlauf wird ein Mechanismus unterstützt, nach dem das bei pH 9 bis 13 zunächst gebildete Phosphoran 4 schnell abgebaut wird, bevor es zur Pseudorotation kommen kann. Bei niedrigerem pH-Wert resultiert die exocyclische Spaltung aus einer säurekatalysierten Pseudorotation, bei höheren ist die Pseudorotation basenkatalysiert. Für den basenkatalysierten Reaktionsweg wurde das dianionische Phosphoran 5 als Zwischenprodukt postuliert.

Da die exocyclische Spaltung eine Pseudorotation voraussetzt und im Sauren schneller abläuft und weil die Hydrolyse cycli-



Schema 4. Mechanismus der Hydrolyse von Methylethylenphosphat (MEP), wie er zuerst von Westheimer diskutiert wurde.

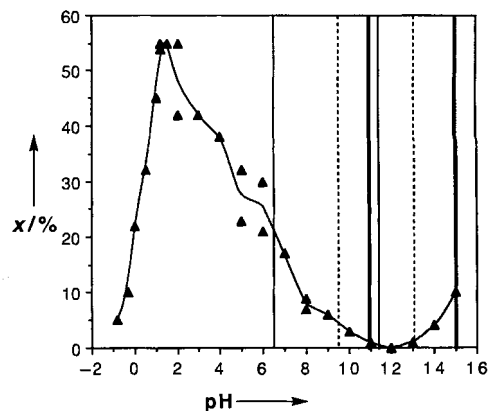


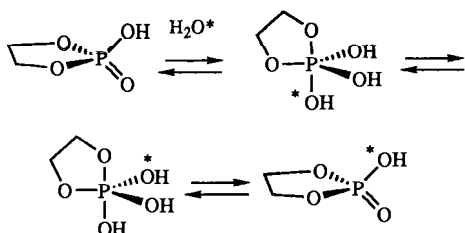
Abb. 1. Anteil x der exocyclischen Spaltung von MEP als Funktion des pH-Wertes (verändert nach Lit. [12]); von Guthrie (—), von Westheimer (---) und von uns (—) bestimmte  $pK_a$ -Werte.

scher Phosphate der Umkehrreaktion der Umesterung von RNA analog ist, sollte die 3' → 2'-Umlagerung des RNA-Phosphodiesters ebenfalls durch Pseudorotation initiiert werden und im Sauren schneller ablaufen; dies wurde tatsächlich experimentell bestätigt (Abschnitte 13 und 14). Außerdem sind für die Bildung von Phosphoran-Zwischenprodukten aus Phosphodiestern unter sauren Bedingungen einige Beispiele bekannt<sup>[16]</sup> (siehe Abschnitt 5). Sogar bei Phosphomonoestern konnten Phosphorane als Zwischenprodukte nachgewiesen werden, die der Pseudorotation unterliegen, allerdings nur, wenn die Hydrolyse unter sauren Bedingungen durchgeführt wurde.<sup>[17]</sup> Ein anderes Beispiel liefert die Synthese von Oligoribonucleotiden: Wenn eine Schutzgruppe für die 2'-O-Funktion unter sauren Bedingungen abgespalten wird, tritt eine teilweise Isomerisierung ein.<sup>[18]</sup> Daraus wird deutlich, daß die Protonierung eines Phosphoesters vor oder gleichzeitig mit der Phosphoranbildung oder die Protonierung eines zunächst dianionischen Phosphorans nach dessen Bildung das Ausmaß der Pseudorotation und als Konsequenz auch das der Umlagerung steigern kann.



## 5. $^{18}\text{O}$ -Austausch

Phosphorane als Zwischenprodukte wurden anhand des  $^{18}\text{O}$ -Austauschs von markiertem Wasser mit dem Phosphoester untersucht. So findet bei der sauren, nicht aber bei der basischen Hydrolyse von Ethylenphosphat ein Sauerstoffaustausch statt (Schema 5).<sup>[12, 19]</sup> Unter sauren Bedingungen beträgt das Verhältnis zwischen  $^{18}\text{O}$ -Austausch und Hydrolyse etwa 0.2:1.



Schema 5. Mechanismus des  $^{18}\text{O}$ -Austauschs zwischen Wasser und Ethylenphosphat.

Ähnliche Ergebnisse ergaben sich für den Einbau von  $^{18}\text{O}$  in Glycerinaldehydphosphat.<sup>[19]</sup> Das 2'-OH-Analogon von Glycerin-2-monophosphat isomerisiert zunächst und wird dann gespalten. Das Substrat wird im Sauren in einem schnellen Schritt unter Einbau von  $^{18}\text{O}$  aus dem Lösungsmittel Wasser zu Glycerin-1-monophosphat umgelagert,<sup>[20]</sup> nicht jedoch unter basischen Bedingungen.<sup>[17, 21]</sup>

Die Produkte, die durch Pseudorotation entstehen, und die Verteilung von  $^{18}\text{O}$  unter sauren bis neutralen, nicht jedoch unter basischen Bedingungen, waren die entscheidenden Befunde, mit deren Hilfe die Mechanismen der Phosphoesterhydrolyse enträtselt wurden. Sie lassen sich am einfachsten erklären, wenn ein dianionisches Phosphoran entweder ein Übergangszustand ist oder in seiner Konformation eingefroren ist. Durch Protonierung wird die Lebensdauer des Phosphorans verlängert und damit die Wahrscheinlichkeit zur  $^{18}\text{O}$ -Wanderung und zur Pseudorotation erhöht. Daher sind die  $^{18}\text{O}$ -Wanderung und die Pseudorotation im Einklang mit den Mechanismen A und B. Unter sauren bis nahezu neutralen Bedingungen ist das Phosphoran protoniert, so daß Pseudorotation und die Umkehrreaktion zum Ausgangsprodukt möglich ist. Unter basischen Bedingungen läuft keine dieser Reaktionen ab.

Eine Frage bleibt allerdings offen: Wann wird das Phosphoran protoniert? Der Phosphoester kann vor oder gleichzeitig mit dem nucleophilen Angriff protoniert werden (Schema 2 B) und/oder das dianionische Phosphoran hat eine hinreichend lange Lebensdauer, um protoniert zu werden.

## 6. Die Theorie

Das erste Indiz für den Zeitpunkt der Phosphoran-Protonierung lieferten theoretische Betrachtungen. Wie Rechnungen ergaben, ist die Potentialmulde dianionischer Phosphorane nur wenige  $\text{kcal mol}^{-1}$  tief, auch wenn sie solvatisiert sind und Alkylgruppen tragen, da ein dianionisches Phosphoran unter neutralen Bedingungen – wie berechnet wurde – zu kurzlebig für eine Protonierung ist.

Die Stabilität von di- und monoanionischen (einfach protonierten) Phosphoranen wurde durch ab-initio-Rechnungen bestimmt. Mit dem STO-3G-Basissatz ergibt sich, daß die Potentialtäler dianionischer Phosphorane sehr tief sind.<sup>[22]</sup> Rechnungen mit Basissätzen höherer Ebenen deuten darauf hin, daß die tiefen Täler von den minimalen Basissätzen herrühren und daß die dianionischen Phosphorane kinetisch bedeutungslos sind oder daß es sich bei ihnen um echte Übergangszustände handelt.<sup>[23]</sup> Ab-initio-Rechnungen von Karplus und Taira unterstützten die Auffassung, daß dianionische Phosphorane sehr instabil sind. Monoanionische (einfach protonierte) Phosphorane sind dagegen ungeachtet ihrer verzerrten trigonal-bipyramidalen Geometrie stabil.<sup>[24]</sup>

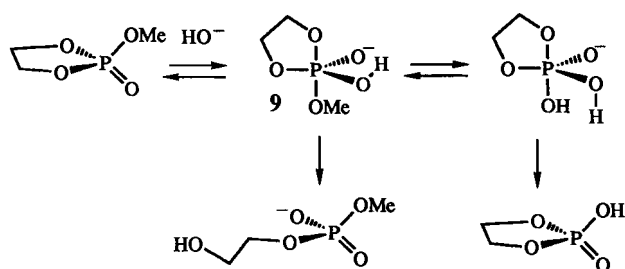
Die Rechnungen sagten auch eine Stabilisierung der Phosphorane durch Solvation voraus. Ein Modell der Ladungsstabilisierung nach Born läßt erwarten, daß dianionische Zwischenprodukte stärker stabilisiert werden als zwei geladene Gruppen, weil die Gibbs-Energie für die Solvation mit dem Quadrat der Ionenladung zunimmt.<sup>[24b, 25]</sup> So errechnete Karplus, daß die Solvation ein dianionisches Phosphoran stabilisieren kann, so daß die Gibbs-Energie zur Aktivierung für den nucleophilen Angriff in Lösung gegenüber dem in der Gasphase um etwa  $60 \text{ kcal mol}^{-1}$  vermindert wird. Unter Berücksichtigung der Solvation liegt die berechnete Aktivierungsenergie für die Bildung eines dianionischen phosphoranähnlichen Übergangszustandes im Bereich der experimentell bestimmten Werte.<sup>[24b, 25]</sup>

Taira et al. schlossen aus Rechnungen, daß dianionische Phosphorane nicht in der Gasphase existieren können, weil sie nicht durch vollständige Delokalisation der beiden negativen Ladungen stabilisiert werden. Dies wurde durch die hohe Instabilität eines vollständig mit Wasserstoff substituierten dianionischen Phosphorans gestützt,<sup>[26]</sup> während Methylgruppen sowie Ethylenbrücken die Stabilität der Phosphorane erhöhen.<sup>[27]</sup> Die Ladungen der dianionischen Phosphorane aus RNA-Phosphodiestern sollten daher besser delokalisiert werden und die Dianionen demzufolge existieren können. Durch Solvation sollte die Stabilität durch zusätzliche Delokalisation der Ladungen weiter gesteigert werden. Tatsächlich existieren sogar die instabilsten Phosphorane als Dianionen, wenn sie mit sechs Wassermolekülen solvatisiert sind,<sup>[28]</sup> und Phosphorane mit Ethylenbrücken werden sogar durch nur ein Wassermolekül hinreichend stabilisiert.<sup>[27b]</sup> Taira et al. sahen die Ergebnisse ihrer Rechnungen in Übereinstimmung mit dem Fehlen von  $^{18}\text{O}$ -Austausch und Phosphorylwanderung unter basischen Bedingungen und folgerten, daß dies von einer hohen Energiebarriere herrührt, die die Pseudorotation verhindert, und nicht daher, daß das Phosphoran ein Übergangszustand sei.<sup>[27]</sup> Weiterhin postulierten sie, daß jedes dianionische Phosphoran in solvatisierter Form ein langlebiges Zwischenprodukt ist.<sup>[29]</sup>

Die Rechnungen ergaben, daß solvatisierte dianionische Phosphorane Zwischenprodukte sind. Allerdings beträgt die berechnete Energiebarriere zum Austreten der Abgangsgruppe nur etwa  $2 \text{ kcal mol}^{-1}$ , was einer Geschwindigkeitskonstanten für die Abspaltung von fast  $10^{11} \text{ s}^{-1}$  bei  $25^\circ\text{C}$  entspricht.<sup>[27–29]</sup> Eine stärkere Solvation schlägt sich in den Rechnungen in einer Erhöhung der Barriere nieder, doch ist bislang unbekannt, in welchem Ausmaß. Geht man von  $2 \text{ kcal mol}^{-1}$  als der gegen-

wärtig besten Abschätzung für die Energiebarriere beim Ausreten der Abgangsgruppe aus, sollte der monomolekulare Zerfall der Verbindung schneller oder ähnlich schnell ablaufen als mögliche diffusionskontrollierte Reaktionen zweiter Ordnung. So sind die Geschwindigkeitskonstanten für die Abspaltung der Abgangsgruppe größer als die vorhergesagten Geschwindigkeitskonstanten für die Protonierung (siehe Abschnitt 7). Dies ist unser erster Hinweis darauf, daß dianionische Phosphorane kaum bei neutralem pH-Wert protoniert werden können.

Durch weitere theoretische Betrachtungen wurde die Stabilität von Phosphoranen und das Verhältnis von exo- zu endocyclischer Spaltung bei MEP untersucht. Lim und Tole haben ab-initio-Rechnungen zum Hydroxid-Angriff auf MEP durchgeführt und sind dabei zu ähnlichen Ergebnissen gekommen wie Taira und Karplus. Sie stellten allerdings fest, daß der Hydroxid-Angriff von Pseudorotation begleitet wird, so daß zunächst Verbindung **9** entsteht (Schema 6),<sup>[24c]</sup> und daß die Ringöffnung schneller abläuft als die exocyclische Spaltung; danach rühren die Unterschiede zwischen endo- und exocyclischer Spaltung von Unterschieden zwischen den P-OH<sub>aq</sub>-Rotameren her. Die Orientierung der freien Elektronenpaare des Sauerstoffatoms bestimmt so das endo-exo-Verhältnis über stereoelektronische Effekte.



Schema 6. Mechanismus der MEP-Spaltung nach Lim und Tole.

Insgesamt lassen die theoretischen Betrachtungen vermuten, daß dianionische Phosphorane wahrscheinlich in Lösung existieren, daß ihre Lebensdauer aber für die meisten diffusionskontrollierten Reaktionen kaum oder nicht ausreicht. Sie sind daher kinetisch nicht von Übergangszuständen zu unterscheiden (Hypothese 1). Die Phosphorane spalten sofort ihre Abgangsgruppen ab, ohne daß es zur Pseudorotation oder zum Austausch von <sup>18</sup>O kommt, wie dies 1956 von Todd postuliert worden war.<sup>[30]</sup> Wir werden diese Rechnungen in den Abschnitten 7, 13 und 16 mit experimentellen Befunden, nach denen dianionische Phosphorane mit Alkoxid-Abgangsgruppen den Übergangszuständen sehr ähneln, weiter untermauern, und in den Abschnitten 10–12 werden wir über Ergebnisse berichten, die verdeutlichen, daß Phosphorane mit guten Abgangsgruppen echte Übergangszustände sind.

Akzeptieren wir zunächst, daß die dianionischen Phosphorane nicht langlebig genug für eine Protonierung sind. Da die protonierte Form aber Ausgangspunkt für Pseudorotation und <sup>18</sup>O-Austausch ist, muß die Protonierung am Phosphodiester vor oder gleichzeitig mit dem nucleophilen Angriff stattfinden (Hypothese 3).

## 7. Dianionische Phosphorane – die Geschwindigkeit der Protonierung

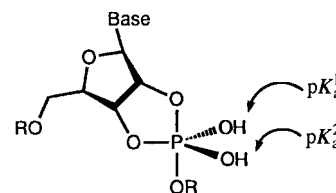
Wir leiten aus den Ergebnissen der ab-initio-Rechnungen ab, daß die Geschwindigkeit des Zerfalls dianionischer Phosphorane größer ist als die der Protonierung durch Wasser oder Pufferkomponenten. 1970 bot Usher hierfür eine überzeugende Begründung an, indem er auf den Mechanismus der MEP-Hydrolyse (Schema 4) verwies.<sup>[31]</sup> Danach muß der Zerfall des monoanionischen Phosphorans **4** schneller sein als dessen Pseudorotation, für die eine Geschwindigkeitskonstante von ungefähr  $10^8 \text{ s}^{-1}$  berechnet worden war.<sup>[32]</sup> Weiterhin sollte der Zerfall des dianionischen Phosphorans **5** sicherlich schneller ablaufen als der von **4**. Daraus leitete Usher für den Zerfall des dianionischen Phosphorans eine Geschwindigkeitskonstante erster Ordnung von  $10^{10}$  bis  $10^{11} \text{ s}^{-1}$  ab; sie ist damit höher als die Geschwindigkeitskonstante pseudo-erster Ordnung, für die er  $10^9 \text{ s}^{-1}$  angab.<sup>[33]</sup> Demnach wäre das dianionische Phosphoran tatsächlich ein Zwischenprodukt, das wegen seiner kurzen Lebensdauer keine diffusionskontrollierten Reaktionen eingehen kann. Diese Schlußfolgerung entspricht der aus den ab-initio-Rechnungen, die in Abschnitt 6 diskutiert wurden.

Da die Abspaltung der Abgangsgruppe von einem dianionischen Phosphoran wahrscheinlich schneller abläuft als die Protonierung, wie dies zuerst von Usher ausgeführt wurde, muß das monoanionische (einfach protonierte) Phosphoran gebildet werden, indem der Phosphodiester vor oder gleichzeitig mit dem nucleophilen Angriff protoniert wird (Hypothese 3). Weitere experimentelle Befunde hierzu werden in den Abschnitten 12–14 und 16 dargelegt; zunächst allerdings wollen wir als Einleitung zu dieser Diskussion die Reaktivität der Phosphorane näher untersuchen.

## 8. Reaktivität und pK<sub>a</sub>-Werte der Phosphorane

Wie die bisher dargestellten Ergebnisse verdeutlichen, hängt die Pseudorotation eines Phosphorans in der RNA-Hydrolyse vom Protonierungsgrad

ab; dieser ist eine Funktion des pH-Wertes und des pK<sub>a</sub>-Wertes des Phosphorans. Westheimer et al.<sup>[12]</sup> berechneten die beiden pK<sub>a</sub>-Werte der Phosphorane (Schema 7) nach der Methode von Branch und Calvin<sup>[34]</sup> zu 9 und 13. Guthrie bestimmte anhand der Bildungswärmen pK<sub>a</sub><sup>1</sup> = 6.5 und pK<sub>a</sub><sup>2</sup> = 11.3,<sup>[35]</sup> und mit Pulsradiolyse wurden in unserem Labor Werte von 11 und 15 erhalten.<sup>[36]</sup> Auch wenn unterschiedliche Phosphorane voneinander abweichende pK<sub>a</sub>-Werte haben sollten, erscheint der Bereich der publizierten Werte unvernünftig weit. Die genaue Bestimmung steht also noch aus.



Schema 7.

Zwar sind die pK<sub>a</sub>-Werte für die Phosphorane noch nicht gut abgesichert, doch werden wir die Abhängigkeit der exocyclischen Spaltung vom pH-Wert (Abb. 1) im Lichte dieser Werte analysieren. Wenn die pK<sub>a</sub>-Werte, die für MEP erhalten wurden, das Verhältnis der endo- zur exocyclischen Spaltung beeinflus-

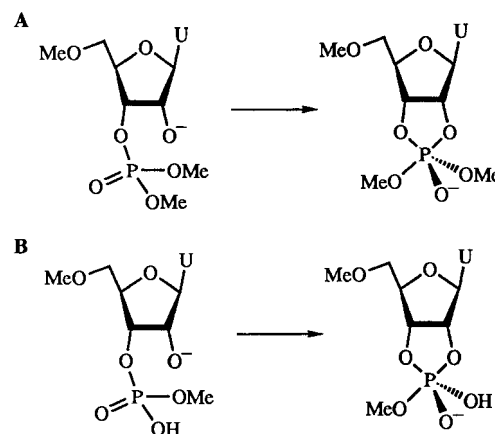
sen, wird man erwarten, daß sich dieses Verhältnis bei pH-Werten in der Nähe des  $pK_a$ -Wertes stark und bei pH-Werten zwischen den  $pK_a$ -Werten wenig ändert. Die senkrechten Linien in Abbildung 1 markieren die  $pK_a$ -Werte für neutrale (zweifach protonierte) Phosphorane, die von Guthrie und Westheimer sowie in unserem Labor bestimmt wurden. Der von Guthrie bestimmte  $pK_a^1$ -Wert von 6.5 liegt in einem pH-Bereich, in dem sich der Anteil der exocyclischen Spaltung deutlich ändert. Bei niedrigeren pH-Werten ist das Phosphoran vollständig protoniert und die Wahrscheinlichkeit einer Pseudorotation am größten, was vermehrt zu exocyclischer Spaltung führt. Bei  $pH > 6.5$  liegt die anionische Form vor, deren Pseudorotation langsamer ist und die daher weniger zur exocyclischen Spaltung neigt. Bei einem pH-Wert nahe dem  $pK_a^2$ -Wert (11.3) läßt sich keine exocyclische Spaltung mehr nachweisen. Schwer erklärbar ist allerdings die Zunahme der exocyclischen Spaltung bei  $pH > pK_a^2$ . Die von Westheimer bestimmten  $pK_a$ -Werte rahmen den Bereich geringer exocyclischer Spaltung ein. Bei pH-Werten unterhalb des ersten  $pK_a$ -Wertes (9) und oberhalb des zweiten (13) nimmt der Anteil der exocyclischen Spaltung zu. Dies stimmt mit der ursprünglichen Interpretation der Daten überein (Abschnitt 3). Unser Wert für  $pK_a^1$  von 11 fällt in einen pH-Bereich, in dem keine exocyclische Spaltung abläuft. Unterhalb dieses Wertes sollte durch die Protonierung die Pseudorotation und damit der Anteil exocyclischer Spaltung zunehmen. Wenn sich der pH-Wert dem  $pK_a^2$ -Wert von etwa 15 nähert ( $pH = 13-14$ ), sollte sich das *exo-endo*-Verhältnis wieder ändern, denn durch partielle Deprotonierung der apikalen OH-Gruppe entsteht das Dianion 5, das infolge schneller Pseudorotation entweder die exocyclische oder die endocyclische Abgangsgruppe abspaltet. Der Befund, daß bei  $pH \approx 15$  die basenkatalysierte exocyclische Spaltung einsetzt, stimmt am ehesten mit dem von uns bestimmten  $pK_a^2$ -Wert überein.

In weiteren Untersuchungen müssen die  $pK_a$ -Werte der Phosphorane noch exakt bestimmt werden, um die Spaltungs- und Isomerisierungsdaten von Phosphodiestern und RNA besser interpretieren zu können.

## 9. Analogien mit Phosphotriestern

Der Mechanismus der Hydrolyse eines Phosphotriesters sollte dem eines protonierten Phosphodiesters weitgehend analog sein, wenn man annimmt, daß eine Alkylgruppe und ein Proton die Reaktivität eines Phosphoesters ähnlich beeinflussen. Phosphotriester werden unter gleichen Bedingungen etwa  $10^5$ - bis  $10^6$ mal schneller hydrolysiert als Phosphodiester (Abschnitt 16). Daher erwartet man, daß die Protonierung eines Phosphodiesters zu einer neutralen Verbindung zu einer ähnlichen Beschleunigung der Hydrolyse führt.<sup>[137]</sup> Angesichts dieser Analogie untersuchte Lönnerberg die saure, neutrale und basische Hydrolyse von Phosphotriestern.<sup>[138]</sup> Phosphatwanderung und Hydrolyse laufen bei pH 2 mit ähnlicher Geschwindigkeit ab, während bei niedrigerem pH-Wert die Hydrolyse und bei pH 3–4 die Phosphatwanderung schneller ist. Lönnerberg vertiefte die Analogie weiter und verglich diese Daten mit denen für Phosphodiester. Die pH-unabhängige Hydrolyse und Isomerisierung eines Phosphodiesters kann nach zwei, kinetisch gleichwertigen Mechanismen ablaufen. Im einen Fall greift eine nichtionische

vorliegende Hydroxygruppe des Zuckers den monoanionischen Phosphodiester an, im anderen reagiert eine zur  $O^-$ -Gruppe deprotonierte Hydroxygruppe mit einem neutralen Diester. Lönnerberg vermutete, daß im Fall der Phosphotriester das angreifende Nucleophil sogar unter sauren Bedingungen (pH 3; Schema 8A) das Anion der 2'-OH-Gruppe ist. Entsprechend postulierte er, daß die pH-unabhängige Hydrolyse der Phosphodiester über den Angriff der zuvor zur  $O^-$ -Gruppe deprotonierten Hydroxygruppe auf den protonierten Phosphodiester abläuft (Schema 8B). Dies entspricht mit vorgelagerter Deprotonierung der 2'-OH-Gruppe im wesentlichen dem Mechanismus B (Schema 2B).



Schema 8. Analogie zwischen Phosphotriestern (A) und -diestern (B) nach Lönnerberg.

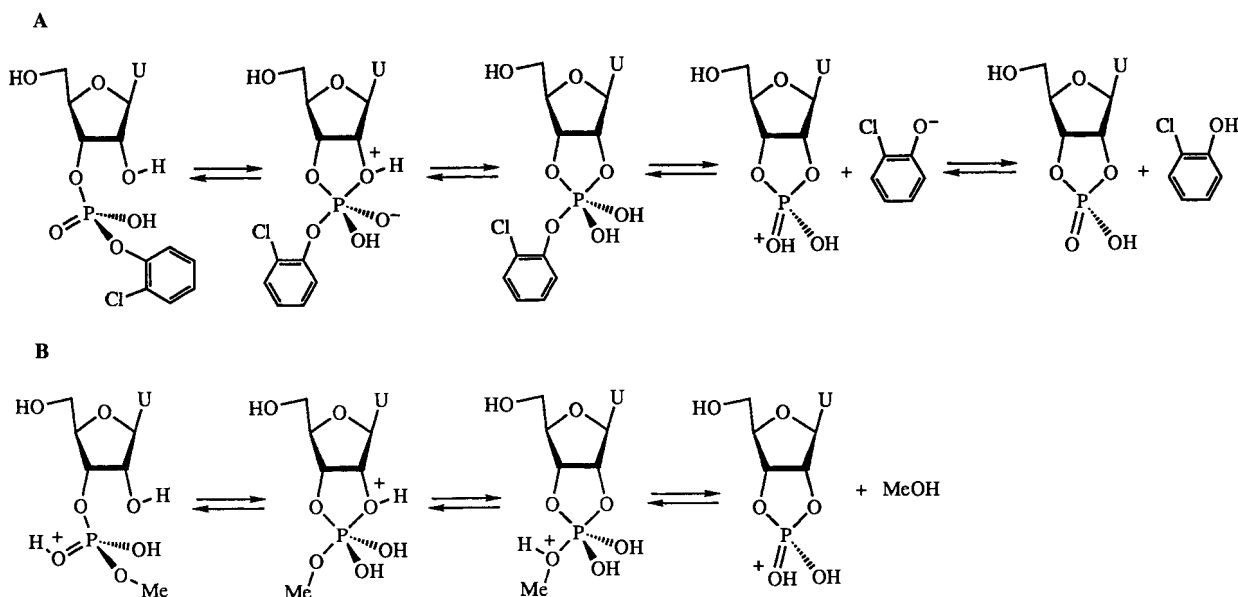
Lönnerberg untersuchte auch die durch allgemeine Säuren oder Basen katalysierte Hydrolyse und Umlagerung von Phosphotriestern.<sup>[138b]</sup> In Ameisensäurepuffern waren Isomerisierung und Hydrolyse von der basischen, nicht aber von der sauren Pufferkomponente abhängig. Dies ist anders als bei Phosphodiestern. Auch wird die Isomerisierung vom Puffer katalysiert, doch hängt deren Geschwindigkeit von der sauren Pufferkomponente ab (siehe für Einzelheiten Abschnitt 14). Die Alkylgruppe eines Triesters nimmt hier also die Position des benötigten Protons im Diester ein.

Die Ähnlichkeiten hinsichtlich der Kinetik der Hydrolyse von Phosphodi- und -triestern führten Lönnerberg zur Hypothese, daß RNA-Diester im Neutralen über Zwischenstufen mit neutralen und protonierten Phosphaten sowie mit 2'-O<sup>-</sup>-Gruppen hydrolysiert werden. Außerdem stützt der Unterschied in der Kinetik der durch allgemeine Säuren und Basen katalysierten Umlagerung von Phosphodi- und -triestern die Vorstellung von einer vorgelagerten Protonierung der Phosphodiester, wodurch diese den Triestern ähnlich werden. Weitere Beispiele werden in den Abschnitten 14–16 vorgestellt.

## 10. RNA-Analoga mit guten Abgangsgruppen

Als ein Weg zur Aufklärung der RNA-Hydrolysemechanismen wurden Phosphodiester mit guten Abgangsgruppen intensiv untersucht. So fand Lönnerberg heraus, daß die Hydrolyse von Uridin-3'-(2-chlorphenyl)phosphat (Schema 9) über den gesam-





Schema 9. Der Protonierungsgrad, der für den nucleophilen Angriff durch die 2'-OH-Gruppe notwendig ist, unterscheidet sich bei aktivierten (A) und nichtaktivierten Phosphodiestern (B).

ten pH-Bereich schneller ist als die Wanderung der Phosphobindung.<sup>[39]</sup> Diese Umlagerung wurde lediglich bei pH < 2 nachgewiesen. Sie ist langsamer als die Hydrolyse, weil während der Pseudorotation eine elektronenziehende Gruppe in eine äquatoriale Position verschoben werden muß.

Die Untersuchungen von Lönnberg verdeutlichten einen interessanten Aspekt über die pH-Abhängigkeit der Reaktionsweise des 2-Chlorphenylesters im Vergleich zu der des Methyl-esters und über die Änderung des Mechanismus beim Übergang von einem aktivierten zu einem nichtaktivierten Phosphoester (Schema 9 A·B).<sup>[39, 40]</sup> Bei pH-Werten unterhalb des  $pK_a$ -Wertes des Phosphats weist die Reaktion des Methyl-esters eine Abhängigkeit zweiter Ordnung von der Hydroniumionenkonzentration auf; dies deutet auf einen Angriff der 2'-OH-Gruppe auf eine kationische, zweifach protonierte Phosphatbrücke hin. Vom Phosphoran kann dann der Alkohol in neutraler Form abgespalten werden. Demgegenüber weist die Reaktion des 2-Chlorphenylesters eine Abhängigkeit erster Ordnung von der Hydroniumionenkonzentration auf, was auf einen Angriff der 2'-OH-Gruppe auf einen neutralen, einfach protonierten Phosphodiester hindeutet. Dieser würde das Phenoxid abspalten. Die elektronenziehende Estergruppe erleichtert den nucleophilen Angriff und verändert so den für den nucleophilen Angriff erforderlichen Grad der Protonierung. Für einen leichten nucleophilen Angriff ist beim Phosphodiester mit der schlechteren Abgangsgruppe eine stärkere Protonierung erforderlich.

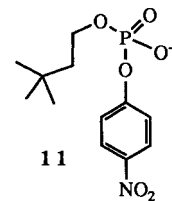
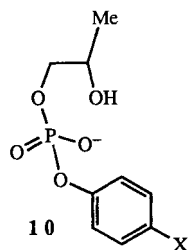
Nicht nur bei der spezifischen Katalyse unterscheiden sich die Reaktionsordnungen mit aktivierten und nichtaktivierten Phosphodiestern, sondern auch bei der (allgemeinen) Pufferkatalyse. So kann an der pufferkatalysierten RNA-Hydrolyse sowohl die saure als auch die basische Komponente des Puffers beteiligt sein (Abschnitt 14). Bei reaktiven Substraten wie **10** ( $X = \text{NO}_2$ ) dagegen hängt die Katalyse nur von der

basischen Komponente des Puffers ab.<sup>[41]</sup> Die unterschiedlichen Erfordernisse an den Protonierungsgrad des Phosphodiesters in Abhängigkeit von der Abgangsgruppe sind der Schlüssel zur Beantwortung der Frage, wie sich der Mechanismus der Hydrolyse von Phosphodiestern mit oder ohne gute Abgangsgruppe ändert (Hypothese 7).

Die Untersuchungen von Phosphodiestern mit guten Abgangsgruppen sind nur unter Vorbehalt auf die Hydrolyse von RNA-Phosphodiestern übertragbar, weil die Qualität der Abgangsgruppe die kinetische Reaktionsordnung der Protonierung eines Phosphodiesters beeinflussen kann. Aber nicht nur die Reaktionsordnung der Protonierung ändert sich; auch die Stabilität des resultierenden Phosphoran-Zwischenproduktes wird erheblich verändert. In den nächsten beiden Abschnitten wird gezeigt, daß dianionische ebenso wie monoanionische Phosphorane mit guten Abgangsgruppen echte Übergangszustände sind.

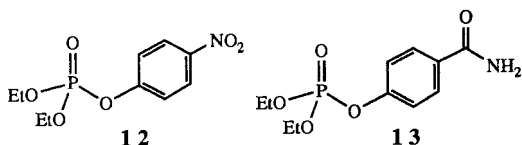
## 11. Isotopeneffekte

Die Messung von Isotopeneffekten ist eine exzellente Methode, um das Ausmaß von Bruch und Bildung von Bindungen in Übergangszuständen zu untersuchen, und ist daher geeignet, die Bildung und den Zerfall der Phosphorane zu analysieren. Anhand von  $^{15}\text{N}$ -Isotopeneffekten bestimmten Hengge und Cleland den Grad des Bindungsbruchs im Übergangszustand des *p*-Nitrophenyl-Phosphodiesters **11**.<sup>[42]</sup> Die Abgangsgruppe ist hier unter alkalischen Bedingungen zu 57 % und unter sauren Bedingungen zu 25–32 % abgespalten; dies stimmt mit der Hypothese überein, daß Phosphodiester mit guten Abgangsgruppen wie *p*-Nitrophenolat durch direkten Austausch ohne Phosphoran-Zwischenprodukt hydrolysiert werden. Der hohe Anteil an Bindungsbruch macht deut-



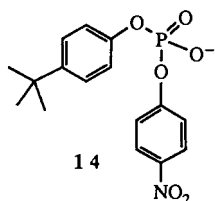
lich, daß die in diesen Reaktionen gebildeten Phosphorane Übergangszustände sind. Der niedrige Grad der Bindungsspaltung unter sauren Bedingungen spricht dafür, daß in den Übergangszustandsartigen protonierten Phosphoranen der Bruch der Bindung zur Abgangsgruppe nicht so weit fortgeschritten ist wie bei dianionischen Spezies (Hypothese 6).

Cleland und Raushel haben  $^{18}\text{O}$ -Isotopeneffekte bei der alkalischen Hydrolyse der *p*-Nitrophenyl- und *p*-Carbamoylphenyl-Phosphotriester **12** bzw. **13** untersucht, um das Ausmaß der



Abspaltung der Abgangsgruppe im Übergangszustand zu bestimmen.<sup>[43]</sup> Ein Phosphoran, das aus einem Phosphotriester gebildet wird, ist monoanionisch und voraussichtlich stabiler als das durch alkalische Hydrolyse aus einem Phosphodiester entstehende dianionische Phosphoran. Die Größe des  $^{18}\text{O}$ -Isotopeneffekts auf die Phosphotriester weist auf Änderungen in der Bindungsordnung bei der Abgangsgruppe hin, was auf einen phosphoranähnlichen Übergangszustand und nicht ein Phosphoran als Zwischenprodukt hindeutet. Daher wäre analog zu dem aus einem Phosphotriester mit einer guten Abgangsgruppe entstehenden Phosphoran auch ein einfach protoniertes, monoanionisches Phosphoran aus einem Phosphodiester mit einer guten Abgangsgruppe ein Übergangszustand. Ein dianionisches Phosphoran mit einer guten Abgangsgruppe hat ohnehin Übergangszustandscharakter.

Isotopeneffekte von Nichtwasserstoffatomen wurden auch genutzt, um die durch imidazolsubstituierte  $\beta$ -Cyclodextrine und



durch das Enzym Phosphodiesterase I katalysierte Hydrolyse der *p*-Nitrophenylphosphodiester **11** und **14** zu untersuchen.<sup>[44]</sup> Die Isotopeneffekte bei der Imidazolyl- $\beta$ -cyclodextrin-katalysierten Spaltung deuten auf einen erheblichen Bindungsbruch an der Abgangsgruppe im Übergangszustand hin,

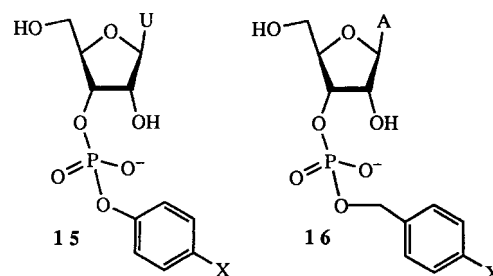
ohne daß ein Phosphoran als Zwischenprodukt gebildet wird. Im Unterschied hierzu wurde ein großer, umgekehrter  $^{18}\text{O}$ -Isotopeneffekt bei der enzymkatalysierten Spaltung gemessen, was eine Protonierung des nichtverbrückenden Sauerstoffatoms im phosphoranähnlichen Übergangszustand vermuten läßt. Phosphoranähnliche Übergangszustände oder Zwischenprodukte können also im aktiven Zentrum von Enzymen durch Protonierung elektrophil aktiviert werden (Abschnitt 17).

Die Isotopeneffekte stützen also die Hypothese, daß ein Phosphoran bei der Hydrolyse eines Phosphodiesters oder eines Phosphotriesters mit einer guten Abgangsgruppe den Charakter eines Übergangszustandes hat (Hypothese 6).

## 12. $\beta_{\text{lg}}$ -Werte

Außer den Isotopeneffekten sind auch die Brønsted- und Hammett-Koeffizienten nützlich, um den Grad des Bindungsbruchs und der Bindungsbildung in Übergangszuständen ab-

zuschätzen. So wurden die  $\beta_{\text{lg}}$ -Werte (lg = leaving group, Abgangsgruppe) für einige Phosphoryl-Transferreaktionen bestimmt.<sup>[45]</sup> Die brauchbarsten Werte für die Hydrolyse von RNA wurden für die Arylester **15** und für die Benzylester **16** von



Williams<sup>[46]</sup> bzw. Inoue<sup>[47]</sup> erhalten. Williams konnte die Ladung der Sauerstoffatome im Übergangszustand bei der Cyclisierung von **15** messen. Er fand eine Reaktion erster Ordnung für diese imidazolkatalysierte Phosphorylwanderung ohne Hinweis auf die Beteiligung eines Imidazoliumions. Die für Imidazol und Hydroxid bestimmten  $\beta_{\text{lg}}$ -Werte von  $-0.59$  und  $-0.54$  liegen sehr nahe bei dem  $\beta_{\text{lg}}$ -Wert von  $-0.56$ , der von Usher für die Hydrolyse des Phosphodiesters **10** erhalten wurde.<sup>[48]</sup>

Die Daten von Williams wurden im Sinne eines phosphoranähnlichen Übergangszustandes ohne Zwischenprodukt gedeutet, in dem eine konzertierte Verdrängung durch das Dianion begünstigt wird (Hypothese 6). Die Ähnlichkeit der  $\beta_{\text{lg}}$ -Werte für die hydroxy- und die imidazolkatalysierte Phosphorylwanderung deutet auf ähnliche Übergangszustände hin, d.h. die imidazolkatalysierte Reaktion verläuft mit den untersuchten Phosphodiestern nicht über protonierte Übergangszustände. Allerdings betrug der größte  $\text{pK}_{\text{a}}$ -Wert der Abgangsgruppe in den Phosphodiestern bei den imidazolkatalysierten Reaktionen 9.38, ein Wert, der etwa 5.4 Einheiten vom  $\text{pK}_{\text{a}}$ -Wert der Abgangsgruppe in RNA abweicht.<sup>[49]</sup> Es war also keiner der Phosphodiester so stark deaktiviert wie RNA. Um seine Daten mit weniger aktivierten Substraten wie RNA vergleichen zu können, extrapolierte Williams sein Hydroxid- $\beta_{\text{lg}}$ -Diagramm auf die Geschwindigkeitskonstanten von Substraten mit Benzylalkohol-Abgangsgruppen. Diese wurden ausgewählt, weil bereits Daten von Inoue vorlagen<sup>[47]</sup> und weil sie wegen ihres höheren  $\text{pK}_{\text{a}}$ -Wertes die schlechteren Abgangsgruppen in der RNA besser nachahmen können. Williams stellte fest, daß die durch Extrapolation bestimmten Geschwindigkeitskonstanten für die Hydrolyse mit den von Inoue publizierten Werten innerhalb einer Größenordnung übereinstimmen. Unter stark alkalischen Bedingungen werden also Phosphodiester mit schlechten Abgangsgruppen ebenso wie solche mit guten Abgangsgruppen durch direkte Verdrängung, d.h. nicht über ein Phosphoran als Zwischenprodukt hydrolysiert. Williams bestimmte auch den Leffler-Index der Reaktion und fand, daß die benzyliche Abgangsgruppe im Übergangszustand stärker geladen ist als eine Aryl-Abgangsgruppe, wie dies bei einem Hammond-Effekt auf eine konzertierte direkte Verdrängung zu erwarten ist.<sup>[46]</sup> Dies gehört zu den wichtigsten Hinweisen darauf, daß dianionische Phosphorane in Wasser Übergangszustandscharakter haben, sogar, wenn sie nur schlechte Abgangsgruppen tragen (Hypothese 1).

Für die imidazolkatalysierte Spaltung der Benzylester **16** wurden keine Geschwindigkeitskonstanten bestimmt, so daß man das Imidazol- $\beta_{lg}$ -Diagramm von Williams nicht extrapolieren kann, um zu prüfen, ob die Werte für benzyliche Abgangsgruppen in der Nähe der Kurve lägen. Im Falle der Imidazolkatalyse gibt es zahlreiche Beispiele dafür, daß aus Phosphodiestern mit schlechten Abgangsgruppen Phosphoran-Zwischenprodukte gebildet werden, wie die festgestellten Umlagerungen andeuten (Abschnitt 14). Da wir davon ausgehen, daß Phosphoran-Zwischenprodukte nur gebildet werden (und dann zu Umlagerungen führen können), wenn sie protoniert vorliegen, erwarten wir nicht, daß die Werte für Benzyl- oder RNA-Ester durch die mit den Phenylestern unter Imidazolkatalyse erhaltenen Brønsted-Beziehung beschrieben werden können. Wenn allerdings die Mechanismen A und B bei der pufferkatalysierten RNA-Hydrolyse nebeneinander ablaufen (Abschnitt 14), kann die Geschwindigkeitskonstante dem Wert aus dem  $\beta_{lg}$ -Diagramm von Williams sehr nahe kommen. Bedauerlicherweise wurden diese Vorhersagen noch nicht geprüft.

Die Brønsted-Beziehungen zwischen der Qualität der Abgangsgruppe und der Hydrolysegeschwindigkeit sind ein Hinweis darauf, daß Phosphodiester mit guten Abgangsgruppen über phosphoranähnliche Übergangszustände ohne Zwischenprodukte hydrolysiert werden. Diese Daten gleichen denen für Phosphodiester mit schlechten Abgangsgruppen bei alkalischer Hydrolyse, was die Vermutung bestätigt, daß bei der basenkatalysierten Hydrolyse von RNA-Phosphodiestern dianionische phosphoranähnliche Übergangszustände durchlaufen werden (Hypothese 2). Da die dianionischen Phosphorane Übergangszustandscharakter haben, werten wir dies als weiteres Indiz dafür, daß die Lebensdauer dianionischer Phosphorane nicht für eine Protonierung ausreicht (Hypothese 1).

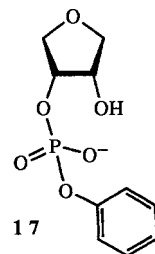
### 13. Katalyse durch spezifische Verbindungen

Die Kinetiken für saure, neutrale sowie alkalische Spaltung und Umlagerung von Dinucleotidmonophosphaten wurde bereits detailliert untersucht;<sup>[30, 50]</sup> die neuesten Arbeiten stammen von Lönnberg,<sup>[40]</sup> der zeigte, daß die Alkylester von 2'- und 3'-AMP im Sauren drei konkurrierende Reaktionen eingehen: Abspaltung der Alkylgruppe unter Bildung von 2'- oder 3'-AMP, Depurinierung und Isomerisierung. Die Hydrolyse zum Adenosin war vernachlässigbar gering. Die Isomerisierung verlief erster Ordnung bezüglich der Hydroniumionen bei pH < 1, zweiter Ordnung zwischen pH 1 und 2 und war pH-unabhängig bei pH 3–8. Die Abhängigkeit der Isomerisierungsgeschwindigkeit vom pH-Wert entsprach bei diesen Phosphodiestern im wesentlichen dem, was bei 2'- und 3'-Ribonucleotiden festgestellt wurde. Der einzige Unterschied besteht darin, daß die Isomerisierung der Monoester oberhalb von pH 7 erster Ordnung bezüglich der Hydroniumionen ist, vermutlich, weil sie durch die Protonierung des Phosphomonoesters katalysiert wird.<sup>[51]</sup> Das Proton am Phosphomonoester übernimmt also die Rolle der Alkylgruppe in einem Phosphodiester.

Lönnberg wies auch eine Ähnlichkeit zwischen den pH-Geschwindigkeits-Profilen für die Phosphatgruppenwanderung und die Phosphodiester-Hydrolyse bei pH < 2 nach und leitete

daraus ein gemeinsames fünffach koordiniertes Zwischenprodukt ab. Unter stark sauren Bedingungen sollte dieser Mechanismus über die Protonierung des Phosphorylsauerstoffatoms eines neutralen Phosphodiesters und den anschließenden nucleophilen Angriff der benachbarten 2'-OH-Gruppe verlaufen. Bei pH  $\approx$  7 wäre die Geschwindigkeit der Isomerisierung dann unabhängig von Hydronium- oder Hydroxidionen. Ein möglicher Mechanismus, den Lönnberg vorschlug, ist der Angriff einer 2'-O<sup>-</sup>-Gruppe auf einen protonierten Phosphodiester, wodurch ein monoanionisches, einfach protoniertes Phosphoran entsteht (Schema 8B); dies entspricht im wesentlichen dem Mechanismus B (Schema 2B). Dieser verläuft über ein einfach protoniertes, monoanionisches Phosphoran; die 2'-OH-Gruppe wird entweder durch allgemeine Basen aktiviert oder vollständig deprotoniert. Bisher wurde angenommen, daß die 2'-OH-Gruppe bereits vor dem nucleophilen Angriff vollständig deprotoniert wird; eine kinetische Analyse der Hydrolyse der Modellverbindung **17** bei pH-Werten nahe dem pK<sub>a</sub>-Wert der 2'-OH-Gruppe ergab einen kinetischen pK<sub>a</sub>-Wert von 13.9.<sup>[7]</sup> Die Tatsache, daß überhaupt ein kinetischer pK<sub>a</sub>-Wert bestimmt werden konnte, spricht für die vorgelagerte Deprotonierung, wie von Lönnberg vorgeschlagen.

Die Kinetik der spezifischen Katalyse bei RNA-Phosphodiestern unter neutralen Bedingungen deutet auf ein monoanionisches, einfach protoniertes Phosphoran hin, das durch den nucleophilen Angriff der durch vorgelagerte Deprotonierung erhaltenen 2'-O<sup>-</sup>-Gruppe auf den protonierten Phosphodiester gebildet wird. Diese Ergebnisse sind eine weitere Bestätigung von Mechanismus B.

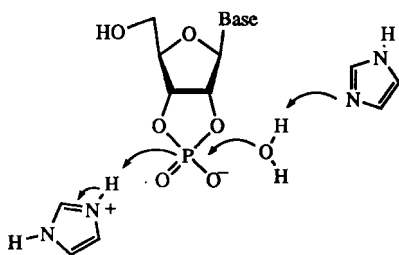


### 14. Allgemeine Säure-Base-Katalyse

Usher war einer der ersten, der die durch eine allgemeine Base (in diesem Falle Morpholin) katalysierte Spaltung eines RNA-Analogons **17** analysierte.<sup>[52]</sup> Man war der Ansicht, daß die Katalyse entweder in der Hinlenkung der 2'-OH-Gruppe auf den Phosphodiester durch die stickstoffhaltige Base oder in der vollständigen Deprotonierung der 2'-OH-Gruppe in einem vorgelagerten Gleichgewicht besteht. Anhand der Daten ließ sich die Bildung eines monoanionischen, einfach protonierten Zwischenprodukts durch die allgemeine Base belegen. Die Reaktion des Zwischenprodukts entweder zurück zur Ausgangsverbindung oder weiter zum Produkt wurde durch die saure und die basische Komponente des Puffers in unterschiedlichem Ausmaß katalysiert. Usher schlug vor, daß nach der Bildung eines Zwischenprodukts unter Beteiligung einer 2'-O<sup>-</sup>-Gruppe die saure Komponente die Bildung und den Zerfall des Phosphorans katalysiert. Dies ist eine Variante des Mechanismus B. Er schloß, daß beim Übergang von kleinen zu großen Morpholin/Morpholiniumion-Verhältnissen der Mechanismus von säure- zu basenkatalysiert wechselt.

In einer anderen Untersuchung über die Spaltung eines RNA-Analogons, die nach einem allgemeinen Säure-Base-Mechanismus katalysiert wird, analysierte Eftink die imidazolkatalysierte

Ringöffnung cyclischer Phosphodiester. Bei pH-Werten, bei denen die saure und die basische Komponente des Imidazolpuffers in nennenswerten Anteilen nebeneinander vorliegen (6.5, 7.0, 7.4), verlief die Ringöffnung von cUMP und cCMP zweiter Ordnung bezüglich der Gesamtpufferkonzentration, wie sich aus der positiven Krümmung der Kurve aus der Auftragung der Geschwindigkeitskonstanten gegen die Pufferkonzentration ableiten läßt.<sup>[53]</sup> Dies deutet auf die Beteiligung von Imidazoliumion und Imidazol an der hydrolytischen Ringöffnung des cyclischen Phosphats (Schema 10). Eftink postulierte, daß bei



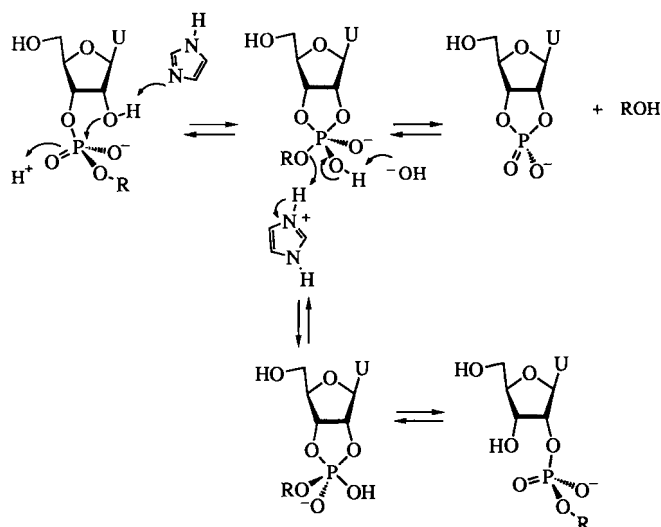
Schema 10. Mechanismus der bifunktionellen Hydrolyse von cyclischen RNA-Phosphodiestern nach Eftink.

hohen Pufferkonzentrationen Imidazol-Imidazolium-Dimere vorliegen und jede Komponente des Puffers einen anderen Schritt der Reaktion katalysiert. In ähnlicher Weise beschrieb Haake die imidazolpufferkatalysierte Ringöffnung des Phosphodiesters **18**.<sup>[54a]</sup> Er erkannte auch, daß das Imidazoliumion ein wirksamer Katalysator ist.

Die ausführlichsten und auch umstrittensten Untersuchungen der pufferkatalysierten RNA-Hydrolyse wurden von Breslow durchgeführt. Er analysierte die imidazolpufferkatalysierte Spaltung von Polyuridylsäure (poly-U),<sup>[55]</sup> von 3',5'- und 2',5'-Uridyluridin (UpU)<sup>[56]</sup> sowie von 3',5'-Adenyladenosin (ApA).<sup>[57]</sup> Außerdem untersuchte er die morpholinpufferkatalysierte Spaltung von 3',5'-UpU.<sup>[58]</sup> Jede Spaltungsreaktion war erster Ordnung bezüglich der Pufferkonzentration, und mit Imidazol ergab sich eine glockenförmige Kurve, wenn man die Geschwindigkeitskonstanten in Abhängigkeit vom pH-Wert auftrug. Breslow interpretierte die Glockenkurve ursprünglich als Hinweis auf die Beteiligung beider Pufferkomponenten an der Katalyse der Spaltung. Da die Reaktion erster Ordnung bezüglich der Gesamtpufferkonzentration verlief, mußten die beiden Komponenten aber nacheinander und nicht gleichzeitig an der Reaktion beteiligt sein. Eine Pufferkomponente katalysiert die Bildung des Phosphorans, die andere dessen Zerfall. Wenn das Verhältnis der beiden Pufferkomponenten zueinander sich ändert, wird die Komponente geschwindigkeitsbestimmend, die in der niedrigsten Konzentration vorliegt. Diese ursprüngliche Deutung wurde im Licht neuer Ergebnisse über Einflüsse des Mediums modifiziert (siehe unten).

Nach der ursprünglichen Interpretation ließ sich aus der glockenförmigen Kurve von Spaltungsgeschwindigkeit gegen pH-Wert und der Abhängigkeit erster Ordnung vom Puffer bei der Reaktion von UpU und poly-U nicht entscheiden, welche Pufferkomponente an der Bildung des Zwischenprodukts beteiligt

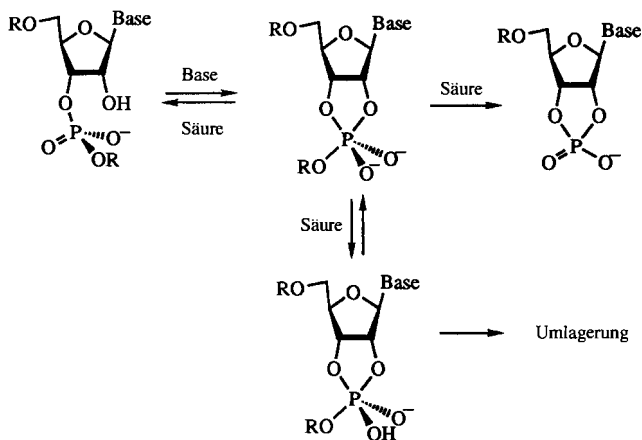
ist und welche dessen Zerfall katalysiert. Breslow gelang diese Zuordnung, als er die 3',5' → 2',5'-Phosphodiester-Isomerisierung bei UpU und ApA verfolgte. Die Isomerisierung in Imidazolpuffer war erster Ordnung bezüglich der 3',5'- und der 2',5'-Verbindung, doch nur das Imidazoliumion war für die Katalyse erforderlich.<sup>[56]</sup> Wenn das Verhältnis von Imidazoliumion zu Imidazol niedrig war, wurde die Isomerisierung von UpU durch steigende Pufferkonzentrationen leicht verzögert, ein Effekt, für den der Begriff „negative Katalyse“ geprägt wurde.<sup>[57]</sup> Bei der imidazoliumkatalysierten Isomerisierung von ApA trat der gleiche Trend auf, wenn bei konstanter Imidazolkonzentration die Imidazoliumkonzentration variiert wurde.<sup>[57]</sup> Bei der Katalyse der UpU-Isomerisierung durch Morpholinpuffer wurde dieser Effekt in noch größerem Umfang deutlich.<sup>[58]</sup> Dies stützte die Hypothese, daß Spaltungs- und Umlagerungsprodukt aus dem gleichen Zwischenprodukt entstehen, wobei das Produktverhältnis von der basischen Pufferkomponente abhängt. Die Daten wurden dahingehend interpretiert, daß die saure Pufferkomponente am ersten Schritt der Spaltung beteiligt ist. Da das Substrat bei pH 7 überwiegend als Anion vorliegt, werden für diesen ersten Schritt ein Proton und die basische Form des Puffers benötigt; daher scheint die Reaktion vom Imidazoliumion als allgemeine Säure katalysiert zu werden (Schema 11). Ergebnisse und Interpretation der imidazol- und morpholinkatalysierten Reaktionen der RNA wurden vor kurzem in einem Übersichtsartikel zusammengefaßt.<sup>[59]</sup>



Schema 11. Mechanismus der pufferkatalysierten RNA-Spaltung nach Breslow.

Die Grundvoraussetzungen von Breslows Arbeiten wurden von mehreren Forschern heftig kritisiert. Der erste Kritikpunkt stammt von Menger,<sup>[60]</sup> der gegen einige experimentelle Details von Breslows Untersuchungen über UpU und ApA Einwände erhob und das Ergebnis der negativen Katalyse auf falsche Datenauswertung zurückführte. Breslow konnte später nachweisen, daß dieser Einwand haltlos war.<sup>[58]</sup> Haim kritisierte,<sup>[61]</sup> daß Breslows kinetisches Modell nicht die publizierten Geschwindigkeitskonstanten reproduzierte,<sup>[62]</sup> und vertrat die Ansicht, daß die Existenz eines gemeinsamen Zwischenproduktes der

Isomerisierung und der Spaltung nicht mit den kinetischen Befunden in Einklang sei. Breslow zeigte später, daß die Daten sehr wohl mit einem gemeinsamen Zwischenprodukt vereinbar sind, und griff dabei auf Haims Analyse zurück.<sup>[58]</sup> Perrin kam zu dem Schluß, daß die Daten für die morpholinkatalysierte Hydrolyse von UpU am ehesten auf eine klassische allgemeine Basenkatalyse hindeuteten,<sup>[63]</sup> da sowohl die Spaltungsgeschwindigkeit als auch das Verhältnis von Spaltung zu Isomerisierung linear von der Pufferkonzentration abhängen, während die Achsenabschnitte der entsprechenden Diagramme mit Zunahme der basischen Pufferkomponente zunehmen, wie es auch bei einer allgemeinen Basenkatalyse der Fall ist. Er schlug einen Mechanismus vor, in dem ein dianionisches Phosphoran-Zwischenprodukt durch eine allgemeine Base gebildet wird; diesem Schritt soll eine durch eine allgemeine Säure katalysierte Protonierung der Abgangsgruppen folgen, die zur Ausgangsverbindung oder zum Produkt führt (Schema 12). Der Weg zur Isome-

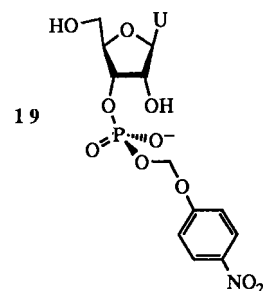


Schema 12. Mechanismus der pufferkatalysierten RNA-Spaltung nach Perrin.

Isomerisierung zweigt beim dianionischen Phosphoran ab, in dem ein verbrückendes Sauerstoffatom protoniert wird und so die Pseudorotation ermöglicht. Das Ausmaß der Phosphoran-Protonierung bestimmt dabei den Anteil der Pseudorotation. Bei pH-Werten, bei denen ein hoher Anteil saurer Pufferkomponente vorliegt, tritt mehr Isomerisierung auf. Der von Perrin vorgeschlagene Mechanismus trägt also dem Abfall der Isomerisierung bei steigendem Anteil an basischer Pufferkomponente Rechnung. Auch wenn Perrin mit Breslow darin übereinstimmt, daß dessen Daten die Existenz eines gemeinsamen Zwischenprodukts von Spaltung und Isomerisierung stützen, läßt sich der vorgeschlagene Mechanismus nicht mit der glockenförmigen Geschwindigkeits-pH-Kurve in Einklang bringen. Perrin vermutete, daß die Glockenform auf den Einfluß des Mediums zurückzuführen sein könnte, und tatsächlich haben sowohl Kirby als auch Breslow einen solchen Einfluß feststellen können.

Kirby wies als erster nach, daß das Medium den RNA-Hydrolysemechanismus entscheidend beeinflussen kann und die Glockenform der Geschwindigkeits-pH-Kurven bei poly-U und UpU möglicherweise darauf zurückzuführen ist.<sup>[64]</sup> Kirby erhielt bei der Untersuchung der imidazolkatalysierten Spaltung

des RNA-Analogons **19** ebenso eine Glockenkurve wie Breslow und dessen Mitarbeiter bei RNA, doch stimmte die Form nicht mit den kinetischen Gleichungen überein, die von Breslows Gruppe aufgestellt worden waren. Stattdessen nahmen die Geschwindigkeitskonstanten bis zum Scheitelpunkt der Glockenkurve linear mit wachsendem Anteil von Imidazol zu und fielen dann wieder ab. Auch für die Hintergrundreaktion (die hydroxidkatalysierte Spaltung) wurden die Daten ermittelt, indem die Kurven für die pufferkatalysierten Reaktionen zweiter Ordnung auf die Pufferkonzentration Null extrapoliert wurden. Wie Kirby feststellte, dominiert die Hintergrundreaktion bei 80–90% freier Imidazolbase im Puffer; durch Zugabe von Imidazol wird die hydroxidkatalysierte Reaktion deutlich zurückgedrängt. Gleichung (a) beschreibt die experimentell erhaltene Reaktionsgeschwindigkeit  $v$ , wobei der dritte Term die Unterdrückung der hydroxidkatalysierten Reaktion durch den Imidazolpuffer widerspiegelt. Kirby korrigierte die gemessene Verringerung der Geschwindigkeit bei hohem pH-Wert und hoher Konzentration an Imidazolpuffer durch den Term  $k_{\text{kor}} k_o [\text{OH}][\text{Im}]$ ; die resultierende Kurve war eine Gerade. Für Kirby war dies ein Argument dafür, daß die glockenförmige Geschwindigkeits-pH-Kurve, die von Breslow und von anderen gemessen worden war, auf den Einfluß des Mediums zurückgeführt werden muß; andernfalls läßt sich die Reaktion am besten durch eine allgemeine Basenkatalyse beschreiben.



$$v = k_{cat}[\text{Im}] + k_o[\text{OH}] - k_{corr}k_o[\text{OH}][\text{Im}] \quad (\text{a})$$

Kirbys Analyse des Einflusses des Mediums ist sehr aufschlußreich.<sup>[64, 54b]</sup> Möglicherweise ist sie für UpU und poly-U aber nicht so relevant, weil die Abgangsgruppe die kinetische Reaktionsordnung für die Protonierung beeinflussen kann (Abschnitt 10) und die reaktiveren Phosphodiester vielleicht weniger stark protoniert sein müssen. So ist die Reaktivität von **19** bei gleichem pH-Wert mehrere hundertmal höher als die von UpU. Kirby bestimmte den  $pK_a$ -Wert der Abgangsgruppe zu etwa 11 und den von UpU zu etwa 14.8.<sup>[49]</sup> Diese  $pK_a$ -Werte unterscheiden sich also um etwa vier Einheiten. Das Phosphoran, das aus **19** entsteht, sollte wegen der besseren Abgangsgruppe einem Übergangszustand viel näher kommen als einem Zwischenprodukt. Wegen der höheren Reaktivität ist bei **19** möglicherweise keine Protonierung notwendig, so daß keine Glockenkurve zu erwarten ist. Da Daten zur Isomerisierung von **19** nicht vorliegen, läßt sich kaum sagen, ob ein Phosphoran-Zwischenprodukt beteiligt ist. Wenn das pH-abhängige Geschwindigkeitsprofil für die Umlagerung von **19** dem für die Umlagerung der RNA ähnelt, ist es wahrscheinlich, daß der von Kirby gefundene Einfluß des Mediums auch bei RNA von Bedeutung ist. Wenn keine Umlagerung stattfindet, ist das Phosphoran aus **19** dem Übergangszustand wahrscheinlich ähnlicher als dem Zwischenprodukt. Daraus folgt, daß der Mechanismus hier dem aus Schema 2 A gleicht, während die RNA eher nach dem Mechanismus B reagiert. Unabhängig vom genauen Vergleich von

19 und RNA konnte Breslow allerdings nachweisen, daß das Medium die Hydrolyse und die Umlagerung der RNA entscheidend beeinflussen kann.

Breslow hat den Einfluß des Mediums auf die pufferkatalysierte Spaltung und Umesterung sowie die Isomerisierung von RNA untersucht. Die glockenförmigen Geschwindigkeitsprofile für die Spaltung sind auf fehlende Kontrolle der Ionenstärke des Mediums zurückzuführen. Die Spaltung wird überwiegend durch die allgemeine Base des Puffers katalysiert, allerdings nur, wenn basische Puffer wie Morpholin verwendet wurden. Im Falle des Imidazolpuffers gibt es zwei Hauptreaktionswege für die Spaltung: einen durch eine allgemeine Base und einen durch eine allgemeine Säure katalysierten, dem ein durch eine allgemeine Base katalysierter Schritt folgt, wie ursprünglich vorgeschlagen. Mit sauren Puffern wie Essigsäure/Acetat überwiegt die säurekatalysierte Spaltung. Die Isomerisierung ist dagegen in allen Puffern säurekatalysiert, wobei die basische Pufferkomponente zu einer negativen Katalyse führt. Die pufferkatalysierte Spaltung kann also gleichzeitig nach zwei Mechanismen ablaufen (Hypothese 8), aber es gibt nur einen Mechanismus für die Isomerisierung. Dieser umfaßt auch die dem nucleophilen Angriff vorgelagerte oder gleichzeitige Protonierung des Phosphodiester (Hypothesen 3–5).

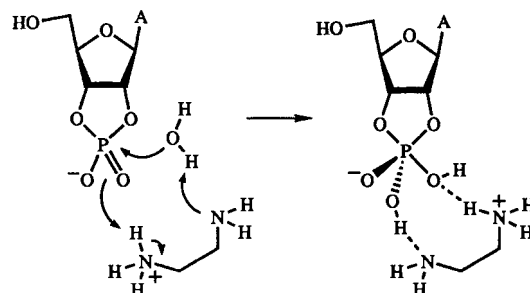
Da die beschriebene Glockenkurve sich bei der RNA-Hydrolyse auf den Einfluß des Mediums zurückführen läßt, erscheint Perrins Interpretation sinnvoll. Eine der eingangs genannten Voraussetzungen ist allerdings die, daß die Lebensdauer des dianionischen Zwischenprodukts zu kurz für eine Protonierung ist. Perrin postulierte, daß das dianionische Phosphoran lange genug existiert, um protoniert zu werden und daß der Protonierungsgrad des Phosphorans den Anteil des gebildeten Isomerisierungsproduktes bestimmt. Nach seinem Mechanismus ist auch die Protonierung einer Abgangsgruppe vonnöten, um das Ausgangs- oder das Endprodukt freizusetzen. Wir sind dagegen davon überzeugt – und die aktuellen Literaturdaten stützen unsere Deutung –, daß ein dianionisches Phosphoran stark einem Übergangszustand ähnelt und sich nicht umlagern kann.

Breslows Folgerung, daß ein Mechanismus analog dem in Schema 2B bei der pufferkatalysierten Spaltung und Umesterung und der Umlagerung von RNA zugrundeliegt, ähnelt den Deutungen vieler anderer. So wies Usher die Imidazolium-Katalyse bei der Spaltung von 17 nach, Eftink stellte fest, daß bei der imidazoliumkatalysierten Hydrolyse cyclischer Phosphate gleichzeitig der Imidazolrest ein Wassermolekül heranzuführt, und Lönnberg kam zu dem Ergebnis, daß RNA-Phosphodiester über protonierte neutrale Phosphate und 2'-O<sup>-</sup>-Gruppen hydrolysiert werden. Daher kann man einen ähnlichen Mechanismus für die Pufferkatalyse erwarten, mit dem Unterschied, daß der Puffer wie eine allgemeine Base die 2'-OH-Gruppe deprotoniert.

Viel Forschungsarbeit wurde bereits geleistet, um die pufferkatalysierte Spaltung und Umesterung sowie die Isomerisierung der RNA zu verstehen. Obwohl es momentan so aussieht, daß der erste Schritt der Spaltung und Umesterung basen- und säurekatalysiert sein kann (Schema 2A bzw. B) und der erste Schritt der Isomerisierung immer säurekatalysiert ist (Schema 2B), sind noch weitere Arbeiten notwendig, um die Details hinsichtlich der relativen Energien dieser beiden Reaktionswege aufzuklären.

## 15. Oligomere Amine als Katalysatoren

Wenn sowohl die Säure- als auch die Basenkomponente eines Puffers eine Rolle bei Hydrolyse und Umlagerung der RNA spielen kann, wird man Kooperativität erwarten, wenn man Säure und Base koppelt. Solche Kooperativität wurde mit oligomeren Aminen festgestellt. Eftink und Biltonen stellten fest, daß Histamin die Geschwindigkeit der Ringöffnung von cyclischen RNA-Phosphodiestern signifikant erhöht, also bifunktionelle (konzertierte) allgemeine Säure-Base-Katalyse unterstützt.<sup>[53]</sup> und Komiyama et al. fanden, daß einfache Diamine RNA hydrolysieren.<sup>[65]</sup> Ethylendiamin, Triethyltetraamin und Pentaethylenhexaamin waren hier alle wirksame Katalysatoren, während Ethylenamin fast keine katalytische Wirkung aufwies. So wird cyclisches Adenosin-2',3'-phosphat von Diaminen bei pH-Werten hydrolysiert, bei denen die Amine als Monokationen vorliegen.<sup>[66]</sup> Für die Hydrolyse dieses Phosphodiester sind solche Katalysatoren die wirksamsten, bei denen genau drei Kohlenstoffatome zwischen den Aminogruppen liegen. Komiyama et al. postulierten, daß die Katalyse das Ergebnis der Hinführung eines Wassermoleküls durch eine allgemeine Base in Richtung auf den Phosphodiester und der gleichzeitigen elektrophilen Aktivierung durch die Ammoniumgruppe ist (Schema 13), was an den Vorschlag von Eftink und Biltonen (Schema 10) erinnert. Barbier und Brack zeigten, daß basische Polypeptide die Hydrolyse von RNA beschleunigen können.<sup>[67]</sup> Definierte Copolymere von Arginin und Lysin mit hydrophoben Aminosäuren führten ebenfalls zu deutlich erhöhten Hydrolysegeschwindigkeiten.

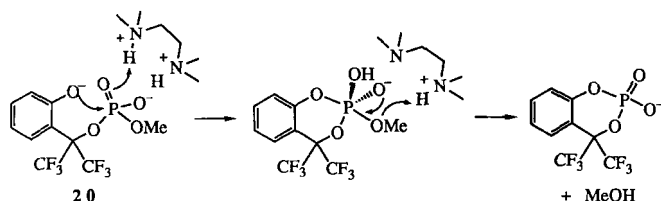


Schema 13. Bifunktionelle allgemeine Säure-Base-Katalyse der Hydrolyse mit Diaminkatalysatoren.

In all diesen Systemen war die zweite Aminofunktion für die katalytische Aktivität notwendig. Dies spricht für einen kooperativen allgemeinen Säure-/Basenmechanismus. Ein Proton wird auf die Phosphorylgruppe übertragen, und gleichzeitig lenkt die allgemeine Base das Nucleophil in Richtung auf diese Gruppe. Komiyama erhielt bei Untersuchungen mit Bis(2,4-dinitrophenyl)phosphat als Substrat Hinweise auf einen solchen Mechanismus.<sup>[68]</sup> Die effektive Spaltung dieses Substrats wird durch die Monokationen von *N,N,N',N'*-Tetramethylalkandyl-diaminen katalysiert. Weil diese als Nucleophile und nicht als allgemeine Basen reagieren,<sup>[69]</sup> ging Komiyama von einem ähnlichen nucleophilen Mechanismus aus und interpretierte einen H/D-Isotopeneffekt von 1.6 dahingehend, daß die Reaktion eine allgemeine Säurekatalyse einschließt. Übereinstimmend damit tritt kein Isotopeneffekt auf, wenn die neutralen Formen der Diamine als Katalysatoren eingesetzt wurden.



Kirby testete den Abbau des Phosphorans auf Kooperativität. Der zweite Reaktionsschritt im Mechanismus der Hydrolyse des Phosphodiester **20** ist geschwindigkeitsbestimmend (Schema 14).<sup>[70]</sup> Der nucleophile Angriff ist Teil eines schnellen

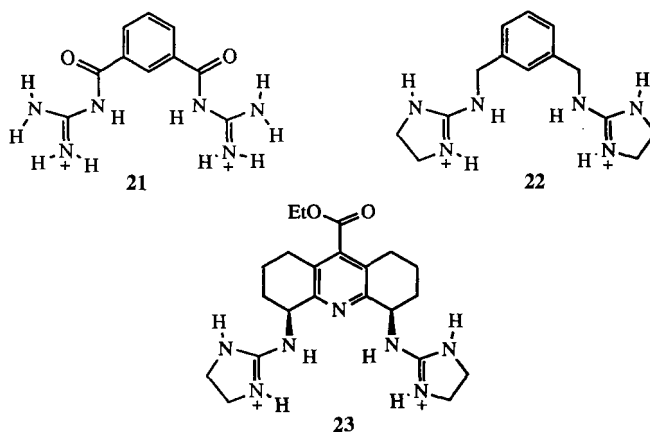


Schema 14. Katalyse der Abspaltung der Abgangsgruppe von Phosphoranen nach Kirby.

vorgelagerten Gleichgewichts. Die effektive Molarität des Nucleophils war den Messungen zufolge größer als  $10^{10}$  M. Diese hohe effektive Molarität ermöglicht einen außergewöhnlich effizienten intramolekularen nucleophilen Angriff, so daß aus allen protonierten und anionischen Formen des Substrates die Alkoxygruppe abgespalten wird. Der Verlust der Abgangsgruppe ist stark durch allgemeine Säure katalysiert ( $\alpha = -0.33$ ). Kationische Disäuren wie  $\text{Me}_2\text{NH}^+(\text{CH}_2)_n\text{NH}^+\text{Me}_2$  ( $n = 2-4, 6$ ) lassen sich nicht durch die Brønsted-Beziehung beschreiben, was auf eine verstärkte Katalyseaktivität hinweist, während die Monokationen dieser Diamine sich ähnlich wie die Monoamine verhalten. Als Mechanismus wurde eine elektrostatische Stabilisierung des anionischen Phosphorans angenommen. Wahrscheinlich sind am Mechanismus aber Wasserstoffbrückenbindungen oder Protonenübertragungen beteiligt, da das Tetramethylethyldiammoniumion kein sehr guter Katalysator war.

Die elektrostatische Stabilisierung durch eine Ammoniumgruppe könnte auch mit einer Protonenübertragung einhergehen. Man erwartet, daß Amine als allgemeine Säuren gegenüber einem Phosphoran wirken, wenn man von einem der  $\text{p}K_a$ -Werte ausgeht, die von Guthrie und Westheimer sowie von uns publiziert wurden. Die  $\text{p}K_a^2$ -Werte der Phosphorane liegen sämtlich höher als die  $\text{p}K_a$ -Werte der Ammoniumgruppen. Wenn also die konjugierten Säuren der phosphoranähnlichen Übergangszustände ebenfalls hohe  $\text{p}K_a$ -Werte haben, übertragen die Amine Protonen auf die Phosphorane (Schema 2 B).

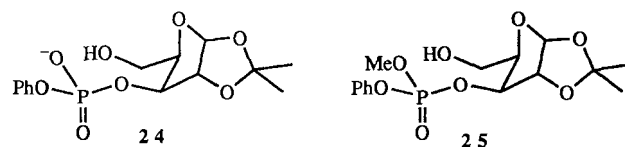
Amino- und Ammoniumgruppen sind nicht die einzigen stickstoffhaltigen funktionellen Gruppen, die Phosphodiester spalten. Hamilton et al.<sup>[72]</sup>, Göbel et al.<sup>[73]</sup> und wir<sup>[71]</sup> zeigten, daß auch Guanidiniumgruppen effektive Katalysatoren für die Übertragung von Phosphorylgruppen in RNA und RNA-Analoga sein können. So beschleunigte **21** mit Lutidin in Acetonitril als allgemeiner Base die Spaltung von **10** ( $\text{X} = \text{NO}_2$ ) um ungefähr das 1000fache, während **22** die Ringöffnung von **18** in DMF um das 2000fache beschleunigte und **23** die Geschwindigkeit der Spaltung von RNA in Wasser in Gegenwart von Imidazol um den Faktor 20 steigerte. Bisher konnte noch nicht geklärt werden, ob die Guanidiniumgruppen lediglich als elektrostatische Katalysatoren oder als allgemeine Säuren wirken. Die von uns bestimmten  $\text{p}K_a$ -Werte der Phosphorane deuten allerdings darauf hin, daß die Guanidiniumgruppen allgemeine Säuren sind. Diese Fragestellung wird gegenwärtig näher untersucht.<sup>[74]</sup>



Eine Kooperativität zwischen allgemeinen Säuren und Basen kann also bei der Spaltung von Phosphodiestern erreicht werden, wie dies auch anhand des Mechanismus B vermutet werden kann. Ausgehend von den publizierten  $\text{p}K_a$ -Werten für Phosphorane schließen wir, daß über eine einfache elektrostatische Stabilisierung hinaus zwischen Phosphoranen und Ammoniumverbindungen Protonen übertragen werden. Für diese Schlußfolgerung sprechen auch Isotopeneffekte, die mit Aminen bestimmt wurden.

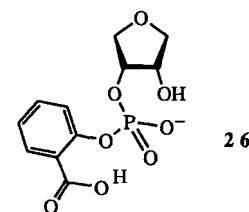
## 16. Modelluntersuchungen

Kirby et al. merkten an: „there is no doubt that protonation of the exceedingly unreactive phosphate diester anion will increase its reactivity toward nucleophilic attack, but it is not a simple matter to quantify the rate factor involved“,<sup>[75]</sup> und versuchten, diese Quantifizierung mit Modellsubstanzen zu erreichen. So führte die Protonierung des Phosphodiesterstauerstoffatoms im Dianion **20** zu einer  $5.5 \times 10^5$ -fachen und Imidazolium als allgemeine Säure zu einer  $8.1 \times 10^4$ -fachen Beschleunigung der Reaktion.<sup>[76]</sup> Cyclisierung und Abspaltung der Arylabgangsgruppe in den Verbindungen **24** und **25** wurde durch eine



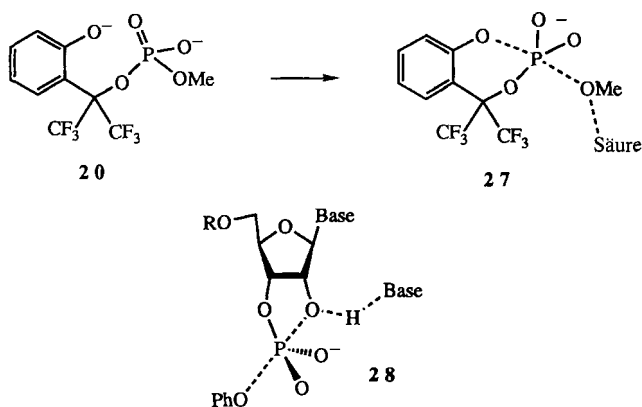
allgemeine Base katalysiert, und mit sehr basischen allgemeinen Basen war die hydroxidkatalysierte Reaktion schneller als die durch die allgemeine Base katalysierte. Die Geschwindigkeit der Methylierung von **25** ist  $4.6 \times 10^5$ mal höher als die von **24**. Eine ähnliche Beschleunigung ( $2.7 \times 10^5$ ) läßt sich für Trimethylphosphate im Vergleich zu Dimethylphosphaten durch Extrapolation der bekannten Daten<sup>[75, 77]</sup> abschätzen.

Kirby untersuchte außerdem die Protonierung von Phosphoranen sowie den nucleophilen Angriff mit dem Phosphodiester **26**. Dieser

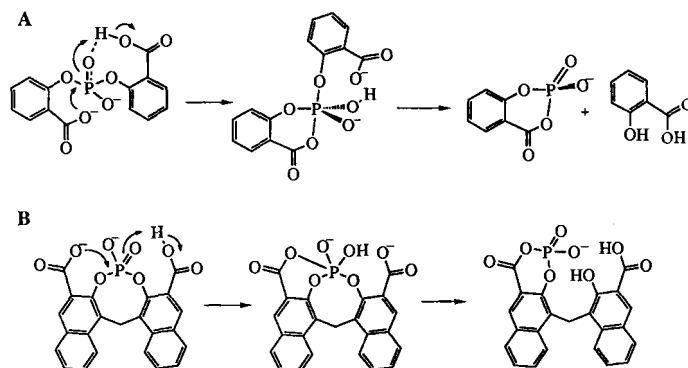


weist eine Abgangsgruppe und eine interne allgemeine Säure auf.<sup>[78]</sup> Die Geschwindigkeits-pH-Kurve für **26** hat nahe pH 4 eine „Stufe“, die andeutet, daß die spontane Hydrolyse von **26** schneller abläuft, wenn die Carboxygruppe in ihrer nicht-dissoziierten Form vorliegt. Mit Formiat- und Acetatpuffern folgt die Reaktion einer allgemeinen Säurekatalyse mit  $\alpha = -0.38$ . Demgegenüber ermöglichen Polyaminpuffer gleichzeitig allgemeine Säure- und Basenkatalyse. Eine Erklärung dafür ist, daß die intramolekulare allgemeine Säure eine Rolle ähnlich der Säure in Schema 2 B spielt.

Kirby analysierte auch die Stabilität dianionischer Phosphorane.<sup>[76]</sup> Er schloß, daß die Lebensdauer eines dianionischen Phosphorans zu kurz für eine diffusionskontrollierte Gleichgewichtseinstellung ist (Hypothese 1). Für die spontane Hydrolyse des Dianions **20** bestimmte er  $\beta_{lg}$  zu  $-1.13$ , was für eine beträchtliche negative Partialladung an der austretenden Alkoxygruppe im Übergangszustand spricht. Diese Ladung kann nicht durch eine Protonenübertragung von Wasser stabilisiert werden, weil Methanol und Wasser ähnliche  $pK_a$ -Werte haben; Die „Libido“-Regel von Jencks<sup>[79]</sup> sagt dafür nur eine geringe treibende Kraft für eine allgemeine Säurekatalyse durch das Lösungsmittel voraus. Neben dem deutlich begonnenen Bruch der Bindung zur Abgangsgruppe war im Übergangszustand auch die Knüpfung der Bindung zum Nucleophil bereits weit fortgeschritten. Der  $\beta_{lg}$ -Wert war größer als der  $\beta$ -Wert der Nucleophils, die Zunahme an negativer Ladungsdichte an der Abgangsgruppe war also größer als die Abnahme an negativer Ladungsdichte am Nucleophil.<sup>[76]</sup> An der  $PO_2$ -Gruppe des Phosphorans konnte sich so nur eine geringe negative Partialladung bilden, ein dianionisches Phosphoran-Zwischenprodukt war demnach nicht beteiligt. Kirby schlug daher einen Übergangskomplex wie **27** vor. Die Umkehrreaktion kann als Spaltung eines RNA-Analogons mit einer guten Abgangsgruppe aufgefaßt werden; dabei würde ein Übergangszustand vom Typ **28** erwartet (Hypothese 6).



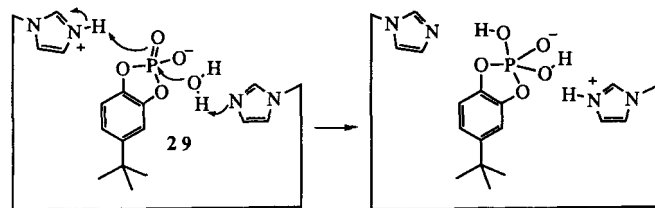
Modellverbindungen wurden auch verwendet, um bifunktionelle Säure-Base- und Säure-Nucleophil-Katalysen zu untersuchen. Glockenförmige Geschwindigkeits-pH-Profile wurden bei intramolekularen Phosphorylübertragungen erhalten.<sup>[80]</sup> In Schema 15 sind zwei Beispiele für die gleichzeitige nucleophile und allgemeine Säurekatalyse eines Phosphoryltransfers dargestellt. Wir sind der Meinung, daß die allgemeine Säure im Verlauf der Reaktion gleichzeitig mit dem nucleophilen Angriff ein



Schema 15. A, B) Zwei Beispiele für bifunktionelle intramolekulare Phosphorylübertragung, katalysiert durch eine allgemeine Säure.

Proton auf das nichtverbrückende Phosphoestersauerstoffatom überträgt. Blaskó et al., die Autoren der Originalarbeiten, diskutierten diese Möglichkeit, wiesen aber darauf hin, daß die Säure das Proton auch auf die Abgangsgruppe übertragen könne. Allerdings ist die Abgangsgruppe in beiden zitierten Beispielen eine Arylgruppe, und das resultierende Phosphoran ähnelt, wie in den Abschnitten 10–12 diskutiert, eher einem Übergangszustand, in dem eine Phenoxidbindung gebrochen wird. Man erwartet also wegen des hohen  $pK_a$ -Wertes des Phosphorans eine Protonenübertragung auf den phosphoranähnlichen Übergangszustand. Wenn diese Modellverbindungen vor dem nucleophilen Angriff eine Wasserstoffbrückenbindung zwischen dem nichtverbrückenden Phosphorylsauerstoffatom und der Carboxygruppe aufweisen, muß man einen erheblichen Protonentransfer auf das Phosphoran erwarten, weil beide  $pK_a$ -Werte des Phosphorans größer sind als der der Carbonsäure. Daher interpretieren wir die Glockenkurven nach einem ähnlichen Mechanismus wie dem in Schema 2 B beschriebenen.

Auch Breslow et al. untersuchten die bifunktionelle Säure-Base-Katalyse. In mehreren Veröffentlichungen<sup>[81]</sup> beschrieben sie die Bisimidazolyl- $\beta$ -cyclodextrin-katalysierte Spaltung von **29** (Schema 16). Aus dem glockenförmigen Reaktionsgeschwin-



Schema 16. Bisimidazolyl- $\beta$ -cyclodextrin-katalysierte Hydrolyse cyclischer Phosphodiester.

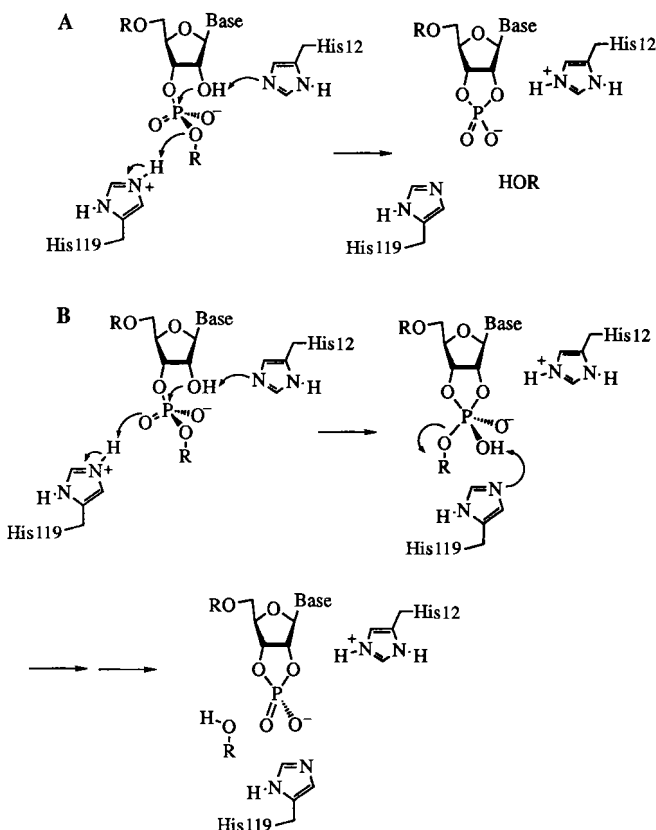
digkeits-pH-Profil ließ sich ableiten, daß die saure und die basische Form des Imidazols für die Katalyse benötigt werden. Nach der ursprünglichen Deutung der Daten sollte ein Wassermolekül durch eine allgemeine Base herangeführt und anschließend die Abgangsgruppe durch die allgemeine Säure protoniert werden. Untersuchungen zur Regiochemie mit Isomeren des Bisimidazolyl- $\beta$ -cyclodextrin-Katalysators deuteten aber auf eine Protonierung der nichtverbrückenden Sauerstoffatome durch eine allgemeine Säure hin. Wenn das Substrat durch eine Wasserstoffbrückenbindung zwischen der negativ geladenen

Phosphodiester- und der Imidazoliumgruppe gebunden wäre, wäre die Protonenübertragung im Einklang mit den relativen  $pK_a$ -Werten der Phosphorane und des Imidazoliums. Tatsächlich wurde die Protonenübertragung auf den phosphoranähnlichen Übergangszustand durch eine Bilanzierung der beteiligten Protonen bestätigt, die ergab, daß zwei Protonen im geschwindigkeitsbestimmenden Schritt wandern: Eines stammt wahrscheinlich aus dem durch eine allgemeine Base herangeführtem Wassermolekül und das andere aus einer allgemeinen Säure, die gleichzeitig ein nichtverbrückendes Phosphorylsauerstoffatom protoniert.

Nach den Modelluntersuchungen mit RNA-Analoga und cyclischen Phosphodiestern sind dianionische Phosphorane mit Übergangszuständen verwandt und werden bei ihrer Entstehung durch Protonierung stabilisiert, was auf einen Mechanismus wie den in Schema 2 B hinweist.

## 17. Analoge Mechanismen für RNase A

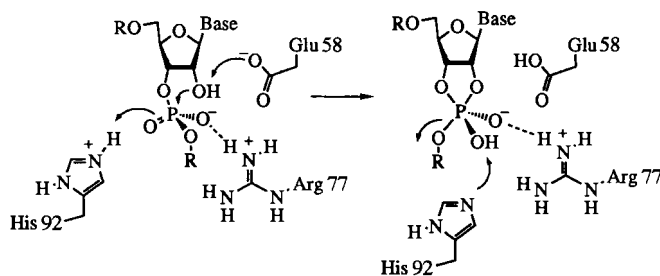
Der Mechanismus der RNA-Hydrolyse durch Ribonuclease A (RNase A) wurde im Licht der beiden beschriebenen Mechanismen (Schema 2) diskutiert. Der klassische Mechanismus (Schema 17 A) ist analog zu dem in Lösung ablaufenden Mechanismus A, der über einen Triester verlaufende Reaktionsweg („Breslow-Mechanismus“, Schema 17 B) entspricht dem Mechanismus B in Schema 2. Nach dem klassischen Mechanismus setzt ein Imidazolrest (His 12) aus der 2'-OH-Gruppe ein Nucleophil frei, und entweder in einem zweiten Schritt oder gleichzeitig mit dem nucleophilen Angriff wird die Abgangsgruppe durch



Schema 17. Mechanismus der RNase-A-katalysierten RNA-Hydrolyse: A) klassischer Mechanismus; B) Triester-Mechanismus.

ein Imidazoliumion protoniert. Beim Triester-Mechanismus protoniert der Imidazoliumrest His 119 das Phosphoran, entfernt es dann wieder und überträgt es schließlich auf die Abgangsgruppe. In diesem „Push-pull“-Mechanismus geht das Imidazolium-Proton auf das Phosphoran über, erniedrigt dessen Barriere gegenüber einem nucleophilen Angriff und wird anschließend wieder vom Phosphoran entfernt, um die Barriere gegenüber dem Austritt der Abgangsgruppe zu erniedrigen.

Usher war einer der ersten, die vermuteten, daß das Phosphat durch das Imidazoliumion im aktiven Zentrum der RNase A für einen nucleophilen Angriff aktiviert werden könnte, indem es in eine triesterähnliche Verbindung überführt wird.<sup>[48]</sup> Er stellte fest, daß ein Triester einen protonierten Diester nachahmen kann. 1975 schlugen Satoh und Inoue einen ähnlichen Mechanismus für RNase T1 vor<sup>[82]</sup> (Schema 18). Zwei Säuren (das Imidazolium- und das Guanidiniumion) komplexieren das Phosphat und stabilisieren so die negative Ladung, die beim Angriff des Nucleophils entsteht. Eine dieser Säuren wird dann innerhalb des aktiven Zentrums verschoben und protoniert die Abgangsgruppe. Diese beiden Vorschläge ähneln dem Mechanismus B.



Schema 18. Ein möglicher Mechanismus der RNase-T1-katalysierten Hydrolyse.

Ob ein Imidazoliumion einen phosphoranähnlichen Übergangszustand protonieren und ihn in eine triesterähnliche Form überführen kann, läßt sich anhand der relativen  $pK_a$ -Werte feststellen. Alle abgeschätzten und gemessenen  $pK_a$ -Werte für Phosphorane liegen höher als der  $pK_a$ -Wert des Imidazoliums. Wenn also RNA als Substrat im aktiven Zentrum von RNase A vor dem nucleophilen Angriff durch eine Wasserstoffbrückenbindung zwischen dem Phosphat und dem Imidazolium gebunden ist, wird man eine Protonenübertragung auf den Übergangszustand erwarten. Durch Titrationsexperimente mit Enzym-Substrat-Komplexen wurde diese vorgelagerte Wechselwirkung zwischen der Imidazoliumgruppe und dem unverbrückten Sauerstoffatom bestätigt.<sup>[83]</sup> Oft schreibt man einer Ammoniumgruppe am Lysin eine Rolle bei der Ionenpaarbildung oder Protonenübertragung auf den Übergangszustand zu.<sup>[84]</sup> Geht man von den relativen  $pK_a$ -Werten aus, kann man von einer Ammoniumgruppe die Übertragung eines Protons auf ein Phosphoran erwarten (Abschnitt 13). Es ist aber noch nicht klar, ob Histidin oder Lysin die allgemeine Säure ist, die den Übergangszustand für die Phosphorylübertragung stabilisiert.

Auch wenn der von Breslow vorgeschlagene Mechanismus für die Pufferkatalyse in die Kritik geraten ist, ist er immer noch eine Alternative für das Enzym RNase A. Durch Moleküldynamik-Simulationen des aktiven Zentrums der RNase A fand Karplus heraus, daß His 119 so positioniert ist, daß es die Phosphat-

nicht aber notwendigerweise die Abgangsgruppe protoniert.<sup>[85]</sup> In Kristallstrukturanalysen der RNase A taucht die Imidazolgruppe des Histidins an vielen Positionen auf,<sup>[86]</sup> so daß man zwischen den beiden alternativen Mechanismen nicht unterscheiden kann.

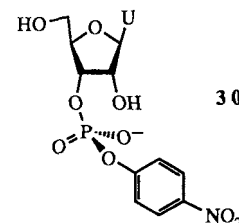
Herschlag versuchte, zwischen den beiden Reaktionswegen der RNase A zu unterscheiden.<sup>[87]</sup> Mit Schwefelanaloga der Phosphodiester erhaltene Befunde sind nicht mit dem Triester-Mechanismus konsistent. So reichten die „Thio-Effekte“ (Verhältnis zwischen der Geschwindigkeitskonstante mit einem Phosphodiester zu der mit dem entsprechenden Phosphodiesterthioat) für die hydroxidkatalysierte Spaltung von RNA-Dimeren von 1.3 bis 6. Die Thio-Effekte bei Triestern sind dagegen mit 10 bis 160 erheblich größer. Herschlag sagte daher für den klassischen Mechanismus keinen großen Thio-Effekt voraus, wohl aber für den Triester-Mechanismus bei RNase A. Die Thio-Effekte auf die RNase-katalysierte Ringöffnung der (*R<sub>p</sub>*)- und (*S<sub>p</sub>*)-Thioisomere von cUMP sind gering und betragen etwa 5. Auch für RNase T2 sind die Thio-Effekte auf  $k_{\text{cat}}$  und  $k_{\text{cat}}/K_M$  sehr niedrig. Herschlag bezieht sich bei seiner Argumentation gegen eine durch die RNasen A und T2 katalysierte Phosphodiester-Ringöffnung nach dem Triester-Mechanismus auf diese Werte. Dazu ist anzumerken, daß bei gleichzeitiger Protonenübertragung und nucleophilem Angriff sicherlich jeder Thio-Effekt unterdrückt würde. In welchem Ausmaß dies geschehen würde, ist unbekannt, doch Herschlag erwartete nur einen geringen Effekt.

Im Unterschied zum geringen Thio-Effekt bei cUMP liegt der Thio-Effekt beim (*S<sub>p</sub>*)-Thioisomer von UpA bei der Spaltung mit RNase A zwischen 70 und 100. Dies spricht eindeutig für einen Triester-Mechanismus. Dennoch glaubt Herschlag nicht an diese mechanistische Alternative, da der Thio-Effekt beim (*R<sub>p</sub>*)-Isomer (2–4) mit dem klassischen Mechanismus übereinstimmt. Beim Triester-Mechanismus sollten aber sowohl das (*R<sub>p</sub>*)- als auch das (*S<sub>p</sub>*)-Isomer große Thio-Effekte aufweisen, weil die Substitution eines nichtverbrückenden Sauerstoffatoms durch ein Schwefelatom die  $pK_a$ -Werte sowohl des S- als auch des O-Atoms erniedrigt. Obwohl die Voraussage, daß bei beiden Isomeren in Lösung ein Thio-Effekt auftreten sollte, schlüssig klingt, ist es sicherlich schwierig, eine solche Aussage auf ein asymmetrisches aktives Enzymzentrum auszudehnen. So können die Mikroumgebungen im aktiven Zentrum eines Enzyms  $pK_a$ -Werte erheblich beeinflussen. Durch die Asymmetrie des aktiven Zentrums können also auch die  $pK_a$ -Werte der nichtverbrückenden P-O- und P-S-Gruppen unterschiedlich stark verändert werden, so daß sich der Thio-Effekt nur in einem Isomer merklich auswirkt.

Herschlags Analyse klingt sehr interessant, und zwar nicht nur in bezug auf den Enzymmechanismus, sondern auch auf den Mechanismus der pufferkatalysierten RNA-Hydrolyse in Lösung. Die Thio-Effekte für UpU und UpA unter stark basischen Bedingungen liegen beide bei 1.3. Stimmt die Hypothese, daß die RNA-Hydrolyse unter basischen Bedingungen über einen phosphoranähnlichen Übergangszustand, im Neutralen aber über ein protoniertes Phosphoran abläuft, sollte ein Thio-Effekt wie beim Triester-Mechanismus auch bei imidazolkatalysierter Reaktion auftreten. Wenn außerdem die Mechanismen A und B gleichzeitig ablaufen und die Umlagerung nach Mechanismus B und die Hydrolyse nach Mechanismus A verlaufen, sollte der

Thio-Effekt bei der Umlagerung groß sein, nicht aber bei der Hydrolyse. Wir prüfen diese Voraussage gegenwärtig.

Raines untersuchte den Triester-Mechanismus, indem er das aktive Zentrum der RNase A ortsspezifisch mutagenisierte.<sup>[88]</sup> Die Umwandlung des als allgemeine Base fungierenden Histidinrestes zu Alanin führte zu einer Verlangsamung der katalytischen Spaltung von RNA ebenso wie der des Analogons **30**, das eine gute Abgangsgruppe aufweist. Die analoge Umwandlung der allgemeinen Säure Histidin verlangsamte auch die Katalyse der RNA-Substrate, nicht jedoch die von **30**. Daraus schloß Raines, daß die allgemeine Säure die Abgangsgruppe und nicht das nichtverbrückende Sauerstoffatom protoniert. Diese Interpretation beruht darauf, daß die *p*-Nitrophenolatgruppe für die Abspaltung nicht protoniert sein muß; daher sollte die Entfernung der allgemeinen Säure die Katalyse nicht beeinträchtigen. Dieses Experiment ist sehr gut geeignet, um die mögliche Protonierung eines nichtverbrückenden Sauerstoffatoms zu testen. Es ist jedoch auch möglich, daß Phosphodiester mit guten Abgangsgruppen andere kinetische Anforderungen an den Protonierungsgrad haben (Abschnitt 10). Möglicherweise müssen RNA-Substrate – im Unterschied zu hochaktivierten Substraten wie **30** – erst protoniert werden, um einem Triester zu ähneln. Weitere Experimente werden dazu beitragen, die unterschiedlichen kinetischen Erfordernisse von Substraten wie **30** und RNA an die Säure zu verdeutlichen.



Raines untersuchte auch die Rolle von Lysin im aktiven Zentrum von RNase A als mögliche allgemeine Säure zur Ionenpaarbildung oder zur Protonenübertragung auf den Phosphoran-Übergangszustand.<sup>[89]</sup> Er kombinierte ortsspezifische Mutagenese mit Semisynthese und erhielt so eine Reihe von Mutanten mit unterschiedlichen Amin-Wasserstoffbrückenbindungsmustern und  $pK_a$ -Werten an der Position des Lysinrestes im aktiven Zentrum. Je acider die Seitenkette war, desto größer war die katalytische Aktivität der Mutante. Dies unterstützt das Konzept, nach dem der Lysinrest hier als allgemeine Säure und elektrostatischer Katalysator fungiert.

In neuerer Zeit werden auch mathematische Verfahren eingesetzt, um den Hydrolysemechanismus mit den RNasen A<sup>[90]</sup> und T2<sup>[91]</sup> zu untersuchen. Obwohl sich die Methoden stark unterscheiden, wurden bemerkenswert gut übereinstimmende Resultate erzielt. So fanden Lim und Tole, daß im aktiven Zentrum von RNase A die Protonenübertragung auf die Phosphoran-Zwischenprodukte ein kritischer Faktor für die Erniedrigung der Barriere gegenüber einem nucleophilen Angriff ist.<sup>[24a]</sup> Anders aber als von Breslow vorgeschlagen, übernimmt die Imidazolgruppe von His 12 sowohl die Deprotonierung der 2'-OH-Gruppe als auch die Protonierung des Phosphorans, während His 119 ein Ionenpaar mit dem Phosphodiester bildet und die Abgangsgruppe protoniert. Ein monoanionisches, einfach protoniertes Phosphoran ist das zentrale Zwischenprodukt. Auch Wladkowski konnte Protonenübertragungen von Aminosäureresten des aktiven Zentrums auf das Phosphoran-Zwischenprodukt nachweisen. Nach seiner Untersuchung übertragen die Histidin-Imidazolium- und die Lysin-Ammonium-Gruppe je ein Proton, so daß ein neutrales, zweifach protoniertes Phospho-

ran-Zwischenprodukt entsteht.<sup>[90]</sup> Saenger schlug vor, daß sich die allgemeine Säure His 92 der RNase T2 in einer Position befindet, von der aus das Phosphoran und nicht die Abgangsgruppe protoniert wird. All diese theoretischen Arbeiten ergaben übereinstimmend, daß die Aminosäurereste im aktiven Zentrum Protonenübertragungen auf und von nichtverbrückenden Sauerstoffatomen des Phosphorans vermitteln und so die Ladungsanhäufung am Phosphoran minimieren.

Es gibt also viele Argumente dafür, daß die Protonierung eines Phosphodiesters vor oder gleichzeitig mit einem nucleophilen Angriff ein tragfähiger Mechanismus für enzymkatalysierte Reaktionen ist. Es gibt aber auch Hinweise auf eine direkte Substitution. Durch kinetische Untersuchungen und Kristallstrukturanalysen wurde versucht, einen der beiden Mechanismen zu belegen. Während die theoretischen Rechnungen eher für den ersten Mechanismus sprechen, sind Thio-Effekte und die Ergebnisse ortsspezifischer Mutagenesen eher mit dem zweiten in Übereinstimmung zu bringen.

## 18. Zusammenfassung und Ausblick

Vier Interpretationen der theoretischen und experimentellen Daten stützen Hypothese 1: „Dianionische Phosphorane existieren nicht lange genug, um protoniert zu werden.“ Die Daten dazu stammen aus Untersuchungen zur spezifischen und allgemeinen Katalyse (Hypothese 2) und aus theoretischen Rechnungen: 1. Anhand der Ergebnisse der Hydrolyse von Methyl-ethylenphosphat stellte Usher fest, daß dianionische Phosphorane nicht lange genug für eine Protonierung existieren. 2. Nach ab-initio-Rechnungen sind die Potentialmulden dianionischer Phosphorane, sogar wenn diese solvatisiert sind, sehr flach, während monoanionische, einfach protonierte Phosphorane eine viel längere Lebenszeit haben. 3. Aus  $\beta_{lg}$ -Diagrammen für Phosphodiester mit schlechten Abgangsgruppen ließ sich ableiten, daß sogar diese Phosphodiester über dianionische phosphoranähnliche Übergangszustände hydrolysiert werden, ohne daß dianionische Phosphorane als Zwischenprodukte auftreten. 4. Untersuchungen mit Modells substraten, die ein Nucleophil mit hoher effektiver Molarität enthalten, ergaben, daß die Lebenszeit dianionischer Phosphorane nicht ausreicht, um ein diffusionsabhängiges Gleichgewicht einzustellen. Da dianionische Phosphorane für eine Protonierung nicht lange genug existieren, muß bereits das Phosphoran-Zwischenprodukt protoniert sein (Hypothese 3). Ein protoniertes Phosphoran kann daher nur entstehen, wenn der Phosphodiester vor oder gleichzeitig mit dem nucleophilen Angriff protoniert wird (Hypothese 4). Nur ein solcher Mechanismus kann auch zur Umlagerung führen (Hypothese 5).

Mehrere experimentelle Befunde stützen die Protonierung des Phosphodiesters als sinnvollen Mechanismus für Spaltung und Umesterung von RNA. Einer ist die Analogie mit dem Phosphotriester, die für eine  $10^5$ - bis  $10^6$ -fache Beschleunigung des nucleophilen Angriffs durch die Protonierung spricht. Ein anderer ist die Kinetik der spezifischen Katalyse der RNA, die den nucleophilen Angriff einer durch vorgelagerte Deprotonierung freigesetzten 2'-O<sup>-</sup>-Gruppe auf einen neutralen Phosphodiester unter neutralen pH-Bedingungen bestätigt; Ergebnis der Reaktion ist ein einfach protoniertes monoanionisches Phosphoran.

Ein weiterer Befund ist, daß Imidazol- und Imidazoliumgruppen gleichzeitig an der katalytischen Hydrolyse cyclischer Phosphodiester beteiligt sind und daß das Imidazoliumion ein Proton auf den Phosphoester überträgt. Obwohl viele Daten über die imidazolpufferkatalysierte Spaltung und Umesterung der RNA noch experimentell überprüft werden, weist die kinetische Abhängigkeit der Umlagerung von der Imidazoliumkonzentration auf eine Protonierung des Phosphodiesters hin. Die dem nucleophilen Angriff vorgelagerte oder gleichzeitige Protonierung des Phosphodiesters wird auch durch die festgestellte Kooperativität zwischen den Aminogruppen bei polyaminkatalysierter Hydrolyse nahegelegt. Die Isotopeneffekte auf solche Reaktionen stimmen mit der Protonierung des entstehenden Phosphoran-Zwischenprodukts überein. Auch die berechneten und die gemessenen  $pK_a$ -Werte für Phosphorane deuten auf eine Protonenübertragung von den Aminogruppen auf die Phosphorane hin. Ein derartiger gleichzeitiger Protonentransfer wurde auch bei Substraten mit einer intramolekularen allgemeinen Säure festgestellt und bei cyclischen Phosphodiestern, die an Bisimidazolyl- $\beta$ -cyclodextrin-Komplexe gebunden waren. Schließlich wurde gezeigt, daß RNA-Phosphodiester mit guten Abgangsgruppen nicht protoniert werden müssen, während Phosphodiester mit schlechteren Abgangsgruppen bisweilen einen hohen Protonierungsgrad aufweisen müssen, damit sie leicht nucleophil angegriffen werden können. Klar ist, daß Mechanismus A bei Umesterung und anschließender Spaltung abläuft, doch die hier zusammengetragenen Befunde belegen eindrucksvoll, daß daneben auch Mechanismus B eine Rolle spielt.

Mit zwei Mechanismen, die sich im Protonierungsgrad des Phosphoran-Zwischenprodukts unterscheiden, können die bekannten mechanistischen Daten über die Spaltung und Umesterung von RNA vollständig erklärt werden. Die Katalyse ist nach jedem der beiden Mechanismen möglich, doch sollten geringfügige Unterschiede im Aufbau der Katalysatoren beachtet werden. Der erste Mechanismus verläuft über ein dianionisches Phosphoran, das einem Übergangszustand ähnlich ist und die Abgangsgruppe ohne die Möglichkeit zur Protonierung abspaltet. Dieser Mechanismus kommt bei allgemeiner und spezifischer Basenkatalyse der RNA-Hydrolyse und der Hydrolyse von RNA-Analoga mit guten Abgangsgruppen zum Tragen (Hypothese 6). Er kann durch die Koordination von Lewis-aciden Metallverbindungen an den Phosphodiester sowie durch Protonierung oder Metallierung der Abgangsgruppe katalysiert werden. Für den zweiten Mechanismus ist vor oder gleichzeitig mit dem nucleophilen Angriff die Protonierung des Phosphodiesters notwendig, so daß ein einfach protoniertes, monoanionisches Phosphoran entsteht. Nur nach diesem Mechanismus und nicht nach dem erstgenannten kann die Umlagerung eingeleitet werden. Er kann durch Koordination des Phosphodiesters an eine Brønsted-Säure wie eine Ammonium-, Imidazolium-, Carbonsäure- oder Guanidiniumgruppe katalysiert werden. Der Wechsel zwischen den beiden Mechanismen hängt von der Qualität der Abgangsgruppe, dem pH-Wert und der Verfügbarkeit von allgemeinen Säuren und Basen ab (Hypothese 7). Unter bestimmten experimentellen Bedingungen spielen sehr wahrscheinlich beide Mechanismen gleichzeitig eine Rolle, wodurch unterschiedliche kinetische Reaktionsordnungen für Säure und Base bei Spaltung und Umlagerung resultieren (Hypothese 8).

Diese beiden Mechanismen und die beschriebenen acht Hypothesen geben insgesamt ein umfassendes Bild von dieser wichtigen biologischen Transformation und eröffnen zwei unterschiedliche Strategien, um synthetische RNA-Hydrolyse-Katalysatoren zu entwerfen.

*Unsere Untersuchungen zum Mechanismus der RNA-Hydrolyse und zur Entwicklung von Katalysatoren für die RNA-Hydrolyse wurden von der Searle Foundation (Chicago Community Trust), den National Institutes of Health, der National Science Foundation, der Dreyfus Foundation, der Sloan Foundation und der Welch Foundation unterstützt. Wir danken Ronald Breslow für die Mitteilung noch unveröffentlichter Ergebnisse über Einflüsse des Mediums auf die pufferkatalysierte Spaltung/Umlagerung und Umlagerung von RNA<sup>[92]</sup> und Daniel Herschlag, Anthony J. Kirby, Harri Lönnberg, Ronald T. Raines sowie Kazunari Taira für hilfreiche Diskussionen.*

Eingegangen am 29. Februar,  
veränderte Fassung am 11. Juli 1996 [A 150]  
Übersetzt von Dr. Burkhard Neuß, Jülich

- [1] Einige typische Beispiele: a) M. J. Young, J. Chin, *J. Am. Chem. Soc.* **1995**, *117*, 10577–10578; b) J. Chin, *Acc. Chem. Res.* **1991**, *24*, 145–152; c) T. Koike, E. Kimura, *J. Am. Chem. Soc.* **1991**, *113*, 8935–8941; d) J. R. Morrow, L. A. Buttrely, V. M. Shelton, K. A. Berback, *ibid.* **1992**, *114*, 1903–1905; e) J. K. Bashkin, E. I. Frolova, U. Sampath, *ibid.* **1994**, *116*, 5981–5987; f) D. Magda, R. A. Miller, J. L. Sessler, B. L. Iverson, *ibid.* **1994**, *116*, 7439–7440; g) K. Matsumura, M. Endo, M. Komiyama, *J. Chem. Soc. Chem. Commun.* **1994**, 2019; h) J. Hall, D. Huesken, U. Piesles, H. E. Moser, R. Haener, *Chem. Biol.* **1994**, *1*, 185–190; i) J. Hovinen, A. Guzaev, E. Ashayeva, A. Azhayev, H. Lönnberg, *J. Org. Chem.* **1995**, *60*, 2205–2209.
- [2] a) N. T. Thuong, C. Hélène, *Angew. Chem.* **1993**, *105*, 697–723; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1993**, *32*, 666–690; b) C. Hélène, J.-J. Toulmé, *Biochim. Biophys. Acta* **1990**, *1049*, 99–125; c) J. F. Milligan, M. D. Matteucci, J. C. Martin, *J. Med. Chem.* **1993**, *36*, 1923–1937; d) C. A. Stein, J. S. Cohen, *Cancer Res.* **1988**, *48*, 2659–2668.
- [3] H. Dugas, C. Penney, *Bioorganic Chemistry*, Springer, New York, **1981**.
- [4] In diesem Manuskript wird statt des an sich passenderen Begriffs „aktivierter Komplex“ der in der Biochemie gebräuchlichere Begriff „Übergangszustand“ verwendet. Zur verwirrenden Benutzung beider Begriffe siehe: S. H. Bauer, C. F. Wilcox, Jr., *J. Chem. Educ.* **1995**, 13–16.
- [5] a) C. A. Bunton, M. M. Mhala, K. G. Oldham, C. A. Vernon, *J. Chem. Soc.* **1960**, 3293–3301; b) J. Kumamoto, J. R. Cox, Jr., F. H. Westheimer, *J. Am. Chem. Soc.* **1956**, *78*, 4858–4860; c) J. Kumamoto, F. H. Westheimer, *ibid.* **1955**, *77*, 2515–2518.
- [6] a) A. J. Kirby, *Adv. Phys. Org. Chem.* **1980**, *17*, 183–278; b) D. G. Oakenfull, D. I. Richardson, Jr., D. A. Usher, *J. Am. Chem. Soc.* **1967**, *89*, 5491–5492.
- [7] D. A. Usher, D. I. Richardson, Jr., D. G. Oakenfull, *J. Am. Chem. Soc.* **1970**, *92*, 4699–4712.
- [8] A. J. Kirby, M. Younas, *J. Chem. Soc. B* **1970**, 510–513.
- [9] P. C. Haake, F. H. Westheimer, *J. Am. Chem. Soc.* **1961**, *83*, 1102–1109.
- [10] a) F. H. Westheimer, *Acc. Chem. Res.* **1968**, *1*, 70–78; b) R. Kluger, S. D. Taylor, *J. Am. Chem. Soc.* **1990**, *112*, 6669–6671.
- [11] A. Dejaegere, M. Karplus, *J. Am. Chem. Soc.* **1993**, *115*, 5316–5317.
- [12] R. Kluger, F. Covitz, E. Dennis, D. Williams, F. H. Westheimer, *J. Am. Chem. Soc.* **1969**, *91*, 6066–6072.
- [13] G. R. J. Thatcher, R. Kluger, *Adv. Phys. Org. Chem.* **1989**, *25*, 99–265, zit. Lit.
- [14] a) K. Taira, T. Fanni, D. G. Gorenstein, *J. Am. Chem. Soc.* **1984**, *106*, 1521–1523; b) K. Taira, T. Fanni, D. G. Gorenstein, *J. Org. Chem.* **1984**, *49*, 4531–4536.
- [15] R. Kluger, G. R. J. Thatcher, *J. Am. Chem. Soc.* **1985**, *107*, 6006–6011.
- [16] a) D. M. Brown, A. R. Todd, *J. Chem. Soc.* **1952**, 52–58; b) W. E. Cohn, *J. Am. Chem. Soc.* **1950**, *72*, 2811–2812.
- [17] S. L. Buchwald, D. H. Pliura, J. R. Knowles, *J. Am. Chem. Soc.* **1984**, *106*, 4916–4922.
- [18] a) B. E. Griffin, M. Jarman, C. B. Reese, *Tetrahedron* **1968**, *24*, 639–662; b) D. G. Norman, C. B. Reese, H. T. Serafinowska, *Tetrahedron Lett.* **1984**, *25*, 3015–3018; c) C. B. Reese, P. A. Skone, *Nucleic Acids Res.* **1985**, *13*, 5215–5230; d) T. Pathak, J. Chattopadhyaya, *Acta Chem. Scand.* **1985**, *B39*, 799–806.
- [19] W. D. Fordham, J. H. Wang, *J. Am. Chem. Soc.* **1967**, *89*, 4197–4203.
- [20] M. C. Bailly, *Bull. Soc. Chim. Fr.* **1942**, *9*, 314–350.
- [21] W. H. Harrison, P. D. Boyer, A. Falcone, *J. Biol. Chem.* **1955**, *215*, 303–317.
- [22] D. G. Gorenstein, B. A. Luxon, J. B. Findlay, *J. Am. Chem. Soc.* **1979**, *101*, 5869–5875.
- [23] A. Dejaegere, C. Lim, M. Karplus, *J. Am. Chem. Soc.* **1991**, *113*, 4353–4355.
- [24] a) C. Lim, P. Tole, *J. Am. Chem. Soc.* **1992**, *114*, 7245–7252; b) A. Dejaegere, X. Liang, M. Karplus, *J. Chem. Soc. Faraday Trans.* **1994**, *90*, 1763–1770; c) C. Lim, P. Tole, *J. Phys. Chem.* **1992**, *96*, 5217–5219; d) M. Uebayasi, T. Uchimar, K. Taira, *Chem. Express* **1992**, *7*, 617.
- [25] H.-A. Yu, B. Roux, M. Karplus, *J. Chem. Phys.* **1990**, *92*, 5020–5033.
- [26] K. Taira, T. Uchimar, K. Tanabe, M. Uebayasi, S. Nishikawa, *Nucleic Acids Res.* **1991**, *19*, 2747–2753.
- [27] a) T. Uchimar, K. Tanabe, S. Nishikawa, K. Taira, *J. Am. Chem. Soc.* **1991**, *113*, 4351–4353; b) J. W. Storer, T. Uchimar, K. Tanabe, M. Uebayasi, S. Nishikawa, K. Taira, *ibid.* **1991**, *113*, 5216–5219.
- [28] A. Yliniemela, T. Uchimar, K. Tanabe, K. Taira, *J. Am. Chem. Soc.* **1993**, *115*, 3032–3033.
- [29] K. Taira, T. Uchimar, J. W. Storer, A. Yliniemela, M. Uebayasi, K. Tanabe, *J. Org. Chem.* **1993**, *58*, 3009–3017.
- [30] D. M. Brown, D. I. Magrath, A. H. Neilson, A. R. Todd, *Nature* **1956**, *177*, 1124–1125.
- [31] Siehe Zitat 67 in Lit. [7].
- [32] D. A. Usher, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1969**, *62*, 661–667.
- [33] M. Eigen, *Angew. Chem.* **1964**, *76*, 489–508; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1964**, *3*, 1–28.
- [34] G. E. K. Branch, M. Calvin, *The Theory of Organic Chemistry*, Prentice-Hall, New York, **1941**, S. 183–270.
- [35] J. P. Guthrie, *J. Am. Chem. Soc.* **1977**, *99*, 3991–4001.
- [36] D. M. Kneeland, T. Kottke, D. O'Connor, E. V. Anslyn, noch unveröffentlichte Ergebnisse.
- [37] Man muß sich allerdings darüber im klaren sein, daß der Mechanismus zwischen Diestern und Triestern wechseln kann. S. A. Khan, A. J. Kirby, *J. Chem. Soc. B* **1970**, 1172–1182.
- [38] a) M. Kosonen, M. Oivanen, H. Lönnberg, *J. Org. Chem.* **1994**, *59*, 3704–3708; b) M. Kosonen, H. Lönnberg, *J. Chem. Soc. Perkin Trans. 2* **1995**, 1203–1209.
- [39] M. Oivanen, H. Lönnberg, *Acta Chem. Scand.* **1991**, *45*, 968–971.
- [40] M. Oivanen, R. Schnell, W. Pfeleiderer, H. Lönnberg, *J. Org. Chem.* **1991**, *56*, 3623–3628; P. Järvinen, M. Oivanen, H. Lönnberg, *ibid.* **1991**, *56*, 5396–5401.
- [41] R. Breslow, D.-L. Huang, E. V. Anslyn, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1989**, *86*, 1746–1750; A. M. Davis, A. D. Hall, A. Williams, *J. Am. Chem. Soc.* **1988**, *110*, 5105–5108; A. M. Davis, A. C. Regan, A. Williams, *Biochemistry* **1988**, *27*, 9042–9047.
- [42] A. C. Hengge, W. W. Cleland, *J. Am. Chem. Soc.* **1990**, *112*, 7421–7422.
- [43] S. R. Caldwell, F. M. Raushel, P. M. Weiss, W. W. Cleland, *J. Am. Chem. Soc.* **1991**, *113*, 730–732.
- [44] A. C. Hengge, A. E. Tobin, W. W. Cleland, *J. Am. Chem. Soc.* **1995**, *117*, 5919–5926. Überblick über die Isotopeneffekte der Nichtwasserstoffatome: W. W. Cleland, A. C. Hengge, *FASEB J.* **1995**, *9*, 1585–1594.
- [45] a) M. T. Skoog, W. P. Jencks, *J. Am. Chem. Soc.* **1984**, *106*, 7597–7606; b) D. Herschlag, W. P. Jencks, *ibid.* **1989**, *111*, 7587–7596; c) W. P. Jencks, M. T. Haber, D. Herschlag, K. L. Nazareian, *ibid.* **1986**, *108*, 479–483.
- [46] A. M. Davis, A. D. Hall, A. Williams, *J. Am. Chem. Soc.* **1988**, *110*, 5105–5108.
- [47] K. Satoh, Y. Inoue, *Chem. Lett.* **1972**, 1097–1100; K. Satoh, Y. Inoue, *ibid.* **1975**, 551–556.
- [48] D. M. Brown, D. A. Usher, *J. Chem. Soc.* **1965**, 6558–6564.
- [49] Der  $pK_s$ -Wert von  $H_3COCH_2CH_2OH$  beträgt nach Thompson und Raines [88] 14.8; P. Ballinger, F. A. Long, *J. Am. Chem. Soc.* **1960**, *82*, 795–798.
- [50] a) T. Koike, Y. Inoue, *Chem. Lett.* **1972**, 569–572; b) D. M. Brown, D. A. Usher, *J. Chem. Soc.* **1965**, 6547–6558.
- [51] a) M. Oivanen, H. Lönnberg, *J. Org. Chem.* **1989**, *54*, 2556–2560; b) *Acta Chem. Scand.* **1990**, *44*, 239–242.
- [52] D. G. Oakenfull, D. I. Richardson, Jr., D. A. Usher, *J. Am. Chem. Soc.* **1967**, *89*, 5491–5492.
- [53] M. R. Eftink, R. L. Biltonen, *Biochemistry* **1983**, *22*, 5134–5140.
- [54] a) L. Atwood, P. Haake, *Bioorg. Chem.* **1976**, *5*, 373–382. b) Zu Salzeffekten bei der Hydrolyse cyclischer Phosphate siehe Lit. [54a].
- [55] R. Breslow, M. Labelle, *J. Am. Chem. Soc.* **1986**, *108*, 2655–2659.
- [56] E. V. Anslyn, R. Breslow, *J. Am. Chem. Soc.* **1989**, *111*, 4473–4482.
- [57] R. Breslow, D.-L. Huang, *J. Am. Chem. Soc.* **1990**, *112*, 9621–9623.
- [58] R. Breslow, R. Xu, *J. Am. Chem. Soc.* **1993**, *115*, 10705–10713.
- [59] a) R. Breslow, *Acc. Chem. Res.* **1991**, *24*, 319–324; b) R. Breslow, R. Xu, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1993**, *90*, 1201–1207.
- [60] F. M. Menger, *J. Org. Chem.* **1991**, *56*, 6251–6252.
- [61] A. Haim, *J. Am. Chem. Soc.* **1992**, *114*, 8384–8388.
- [62] Die Anpassung der in Lit. [56] beschriebenen Kinetik konnte von anderen Forschern nicht reproduziert werden, weil die in Tabelle 1 von Lit. [56] angegebenen Geschwindigkeitskonstanten versehentlich verwechselt wurden [58]. E. V. A. übernimmt die volle Verantwortung für diesen Fehler und daraus abgeleitete, falsche Schlußfolgerungen.
- [63] C. L. Perrin, *J. Org. Chem.* **1995**, *60*, 1239–1243.
- [64] A. J. Kirby, R. E. Marriott, *J. Am. Chem. Soc.* **1995**, *117*, 833–834.



- [65] K. Yoshinari, K. Yamazaki, M. Komiyama, *J. Am. Chem. Soc.* **1991**, *113*, 5899–5901.
- [66] K. Yoshinari, M. Komiyama, *Chem. Lett.* **1990**, 519–522.
- [67] B. Barbier, A. Brack, *J. Am. Chem. Soc.* **1988**, *110*, 6880–6882; *ibid.* **1992**, *114*, 3511–3515.
- [68] M. Komiyama, K. Yoshinari, *J. Chem. Soc. Chem. Commun.* **1989**, 1880.
- [69] A. J. Kirby, W. P. Jencks, *J. Am. Chem. Soc.* **1965**, *87*, 3209–3216.
- [70] K. N. Dalby, F. Hollfelder, A. J. Kirby, *J. Chem. Soc. Chem. Commun.* **1992**, 1770–1771.
- [71] a) D. M. Kneeland, K. Ariga, V. M. Lynch, C.-Y. Huang, E. V. Anslyn, *J. Am. Chem. Soc.* **1993**, *115*, 10042–10055; b) J. Smith, K. Ariga, E. V. Anslyn, *ibid.* **1993**, *115*, 362–364.
- [72] V. Jubian, R. P. Dixon, A. D. Hamilton, *J. Am. Chem. Soc.* **1992**, *114*, 1120–1121; V. Jubian, A. Veronese, R. P. Dixon, A. D. Hamilton, *Angew. Chem.* **1995**, *107*, 1343–1345; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1995**, *34*, 1237–1239.
- [73] M. W. Göbel, J. W. Bats, G. Dürner, *Angew. Chem.* **1992**, *104*, 217–218; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1992**, *31*, 207–209; R. Gross, G. Dürner, M. W. Göbel, *Liebigs Ann. Chem.* **1994**, 49–58.
- [74] Die Möglichkeit der Protonenübertragung von einer Guanidiniumgruppe auf ein Phosphoran wird gegenwärtig in unserem Labor untersucht.
- [75] A. J. Chandler, F. Hollfelder, A. J. Kirby, F. O'Carroll, R. Stromberg, *J. Chem. Soc. Perkin Trans. 2* **1994**, 327–333.
- [76] K. N. Dalby, A. J. Kirby, F. Hollfelder, *J. Chem. Soc. Perkin Trans. 2* **1993**, 1269–1281.
- [77] J. R. Cox, O. B. Ramsay, *Chem. Rev.* **1964**, *64*, 317–352.
- [78] A. J. Chandler, A. J. Kirby, *J. Chem. Soc. Chem. Commun.* **1992**, 1769–1770.
- [79] W. P. Jencks, *J. Am. Chem. Soc.* **1972**, *94*, 4731–4732.
- [80] T. C. Bruice, A. Blaskó, M. E. Petyak, *J. Am. Chem. Soc.* **1995**, *117*, 12064–12069; T. C. Bruice, A. Blaskó, R. D. Arasasingham, J.-S. Kim, *ibid.* **1995**, *117*, 12070–12077; T. C. Bruice, A. Blaskó, R. D. Arasasingham, J.-S. Kim, M. E. Petyak, *ibid.* **1995**, *117*, 3639–3640; K. W. Y. Abell, A. J. Kirby, *J. Chem. Soc. Perkin Trans. 2* **1983**, 1171–1183.
- [81] a) R. Breslow, J. D. Doherty, G. Guillot, C. Lipsey, *J. Am. Chem. Soc.* **1978**, *100*, 3227–3229; b) R. Breslow, P. Bovy, C. Lipsey Hersh, *ibid.* **1980**, *102*, 2115–2117; c) E. V. Anslyn, R. Breslow, *ibid.* **1989**, *111*, 5972–5973; d) *ibid.* **1989**, *11*, 8931–8932.
- [82] K. Satoh, Y. Inoue, *Chem. Lett.* **1975**, 551–556.
- [83] J. E. Jentoft, T. A. Gerken, N. Jentoft, D. G. Dearborn, *J. Biol. Chem.* **1981**, *256*, 231.
- [84] a) G. C. K. Roberts, E. A. Dennis, D. H. Meadows, J. S. Cohen, O. Jardetzky, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1969**, *62*, 1151–1158; b) C. H. W. Hirs, M. Halman, J. H. Kycia, *Arch. Biochem. Biophys.* **1965**, *111*, 209–222; c) L. R. Brown, J. H. Bradbury, *Eur. J. Biochem.* **1975**, *54*, 219–227.
- [85] K. Haydock, C. Lim, A. T. Brünger, M. Karplus, *J. Am. Chem. Soc.* **1990**, *112*, 3826–3831.
- [86] a) C. A. Deakyne, L. C. Allen, *J. Am. Chem. Soc.* **1979**, *101*, 3951–3959; b) R. L. Campbell, G. A. Petsko, *Biochemistry* **1987**, *26*, 8579–8584; c) T. Alber, W. A. Gilbert, D. Ringe Ponz, G. A. Petsko in *Mobility and Function in Proteins and Nucleic Acids* (Hrsg.: R. Porter, M. O. Connor, J. Whelan), Pitman, London, **1983**, S. 4–24; d) A. Wlodawer, M. Müller, L. Sjölin, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1983**, *80*, 3628–3631.
- [87] D. Herschlag, *J. Am. Chem. Soc.* **1994**, *116*, 11631–11635.
- [88] J. E. Thompson, R. T. Raines, *J. Am. Chem. Soc.* **1994**, *116*, 5467–5468.
- [89] J. M. Messmore, D. N. Fuchs, R. T. Raines, *J. Am. Chem. Soc.* **1995**, *117*, 8057–8060.
- [90] B. D. Wladkowski, M. Krauss, W. J. Stevens, *J. Am. Chem. Soc.* **1995**, *117*, 10537–10545.
- [91] F. Cordes, E. B. Starikov, W. Saenger, *J. Am. Chem. Soc.* **1995**, *117*, 10365–10372.
- [92] R. Breslow, S. D. Dong, Y. Webb, R. Xu, *J. Am. Chem. Soc.* **1996**, *118*, 6588–6600.