

nutzbar. Dieses Beispiel demonstriert einmal mehr, daß der Einsatz von Dominoprozessen effiziente und kurze Synthesewege eröffnen kann.

Experimentelles

2: 68.8 mg (0.2 mmol) **1** wurden in 5 mL Ameisensäure gelöst und 15 min bei Raumtemperatur stehengelassen. Anschließend wurde das Lösungsmittel im Vakuum abdestilliert. Durch präparative Dünnschichtchromatographie ($\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$, 95/5, NH_3 -Atmosphäre) wurden 54 mg (95%) (\pm)-Ulein **2** erhalten.

Eingegangen am 22. Januar 1997 [Z10021]

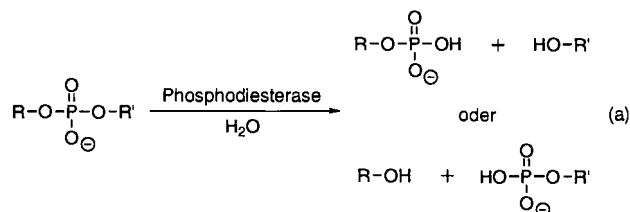
Stichworte: Carbazole • Dominoreaktionen • Kationen • Total-synthesen • Ulein

- [1] a) S. Blechert, R. Knier, H. Schroers, T. Wirth, *Synthesis* **1995**, 591; b) L. F. Tietze, U. Beifuss, *Angew. Chem.* **1993**, 105, 137; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1993**, 32, 131; c) R. A. Bunce, *Tetrahedron* **1995**, 51, 13103; d) *ibid.* **1996**, 52, 11385.
- [2] J. Gracia, N. Casamitjana, J. Bonjoch, J. Bosch, *J. Org. Chem.* **1994**, 59, 3939, zit. Lit.
- [3] Siehe z. B.: P. Magnus, N. L. Sear, C. S. Kim, N. Vicker, *J. Org. Chem.* **1992**, 57, 70.
- [4] Ausgewählte spektroskopische Daten von **2**: $^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, CDCl_3 , $[\text{D}_5]\text{MeOH}$, TMS): δ = 8.30 (s, br., 1 H, NH), 7.55 (dd, J = 8, 1 Hz, 1 H, H-5), 7.35 (dd, J = 8, 1 Hz, 1 H, H-8), 7.18 (ddd, J = 8, 8, 1 Hz, 1 H, H-7), 7.09 (ddd, J = 8, 8, 1 Hz, 1 H, H-6), 5.27 (s, 1 H, H-13), 4.99 (s, 1 H, H-13'), 4.10 (d, J = 2 Hz, 1 H, H-4), 2.69 (dd, br., J = 7.5, 2 Hz, 1 H, H-2), 2.48 (dd, J = 6.5, 2 Hz, 1 H, H-11), 2.29 (s, 3 H, H-12), 2.08 (m, 3 H, H-3, H-10, H-11'), 1.68 (ddm, J = 10, 2 Hz, 1 H, H-10'), 1.12 (dq, J = 7, 7 Hz, 2 H, H-14), 0.84 (t, J = 7 Hz, 3 H, H-15); $^{13}\text{C-NMR}$ (100 MHz, CDCl_3): δ = 138.5 (C, C-8a), 136.6 (C, C-4b), 135.3 (C, C-9a), 129.2 (C, C-4a), 122.7 (CH, C-6), 119.9 (CH, C-5), 119.4 (CH, C-7), 110.8 (CH, C-8), 108.1 (C, C-1), 107.1 (CH₂, C-13), 56.6 (CH, C-4), 46.2 (CH, C-2), 45.8 (CH₂, C-11), 44.2 (CH₃, C-12), 39.3 (CH, C-3), 34.5 (CH₂, C-10), 24.3 (CH₂, C-14), 11.7 (CH₃, C-15); HR-MS: ber. für $\text{C}_{18}\text{H}_{22}\text{N}_2$: 266.1783, gef.: 266.1783.
- [5] Y. Ito, M. Nakatsuka, T. Saegusa, *J. Am. Chem. Soc.* **1982**, 104, 7609.
- [6] E. J. Corey, D. E. Cane, *J. Org. Chem.* **1971**, 36, 3070.
- [7] D. P. Chakraborty, A. Islam, P. Bhattacharyya, *J. Org. Chem.* **1973**, 38, 2728.
- [8] R. Bessellievre, H.-P. Husson, *Tetrahedron* **1981**, 37, 241.
- [9] Ausgewählte spektroskopische Daten von **1**: $^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, CDCl_3 , TMS): δ = 7.44 (dd, J = 8 Hz, J = 1 Hz, 1 H, H-5), 7.29 (dd, J = 8, 1 Hz, 1 H, H-8), 7.13 (ddd, J = 8, 8, 1 Hz, 1 H, H-7), 7.07 (ddd, J = 8, 8, 1 Hz, 1 H, H-6), 3.15 (m, 1 H, H-13), 2.99 (dd, J = 16.5, 5 Hz, 1 H, H-4), 2.85 (m, 1 H, H-13'), 2.77 (s, 3 H, H-14), 2.22 (dd, J = 16.5, 10 Hz, 1 H, H-4'), 2.05 (s, 3 H, H-17), 1.76 (m, 4 H, H-2, H-3, H-12, H-12'), 1.40 (s, 3 H, H-15), 1.28 (m, 2 H, H-10, H-10'), 0.98 (t, J = 7 Hz, 3 H, H-11).

Fluoreszenz-Reporter für Phosphodiesterase-Aktivität**

Albrecht Berkessel* und Rainer Riedl

Phosphodiesterasen katalysieren die Hydrolyse von Phosphorsäurediesterbindungen [Gl. (a)],^[1] ihre bekanntesten Sub-

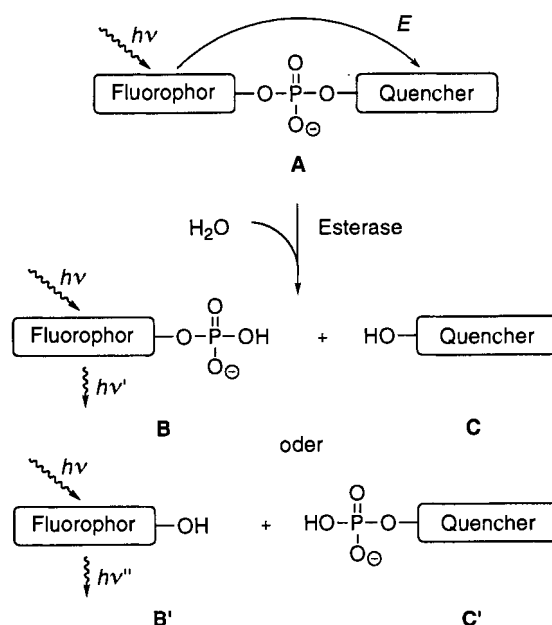


[*] Prof. Dr. A. Berkessel, Dipl.-Chem. R. Riedl
Organisch-chemisches Institut der Universität
Im Neuenheimer Feld 270, D-69120 Heidelberg
Neue Adresse:
Institut für Organische Chemie der Universität
Greinstraße 4, D-50939 Köln
Telefax: Int. + 221/470-5102
E-mail: berkessel@uni-koeln.de

[**] Diese Arbeit wurde vom Fonds der Chemischen Industrie unterstützt.

strate aus dem Bereich der Biochemie sind die Nucleinsäuren. Die gezielte Manipulation von genetischem Material („Gentechnologie“) wird über die sequenzspezifische Spaltung von DNA durch Restriktionsenzyme^[2] erst ermöglicht. Diese stammen aus natürlichen Quellen und sind damit invariabel bezüglich ihrer katalytischen Eigenschaften und insbesondere bezüglich ihrer Basenerkennungsmuster (Zahl und Art der erkannten Basen). Wegen der extremen Bedeutung dieser Enzymklasse für die Biochemie und -technologie fehlt es nicht an Versuchen, „künstliche Phosphodiesterasen“ zu konstruieren.^[3] Unabhängig vom Funktionsprinzip der Katalysatoren sind möglichst empfindliche Nachweismethoden zur Messung der Aktivität nötig. In den meisten Fällen wurden durch Hydrolyse freigesetzte Nitrophenole UV/Vis-spektroskopisch quantifiziert, oder es wurde die $^{31}\text{P-NMR}$ -Spektroskopie eingesetzt. Unser Ziel war es, eine einfache und wesentlich empfindlichere Fluoreszenzsonde für den Nachweis der Phosphodiesterase-Aktivität herzustellen. Wegen der hohen Empfindlichkeit der fluoreszenzanalytischen Methoden sollten Komponenten mit Phosphodiesterase-Aktivität auch in Substanzgemischen biologischen oder synthetischen Ursprungs nachzuweisen sein.

Die Funktionsweise der von uns untersuchten Reporter-Moleküle ist in Schema 1 dargestellt. Über eine Phosphorsäure-

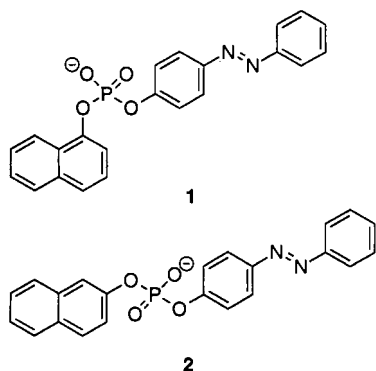


Schema 1. Funktionsweise der Fluoreszenz-Reporter.

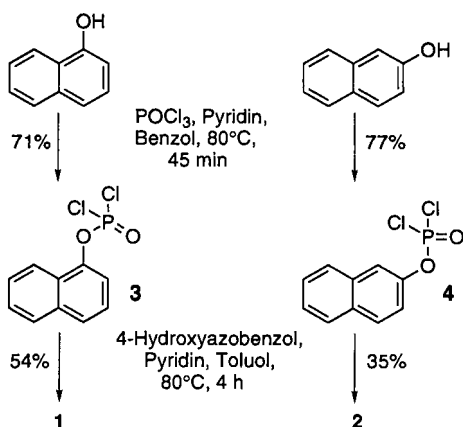
diesterbindung sind in A ein Fluorophor und ein Fluoreszenzlöcher in räumlicher Nähe positioniert. Das Absorptionsspektrum des Fluoreszenzlösers und das Emissionsspektrum des Fluorophors sollten dabei möglichst stark überlappen.^[4]

Intaktes A fluoresziert nicht, da nach Anregung des Fluorophors rascher Energietransfer zum Fluoreszenzlöcher stattfindet.^[4] Nach Spaltung der Phosphorsäurediesterbindung können sich die Spaltstücke B und C (oder B' und C') voneinander entfernen: Die Fluoreszenz wird nun nicht mehr intramolekular gelöscht.^[4] Wir haben zwei derartige Fluoreszenzsonden (**1** und **2**) hergestellt: Als Fluorophor wirkt hier ein Naphthalinrest, als Fluoreszenzlöcher eine Azobenzoleinheit.

Da 4-Hydroxyazobenzol (pK_s = 8.20)^[5] eine bessere Abgangsgruppe ist als 1-Naphthol (pK_s = 9.37)^[6] oder 2-Naphthol (pK_s = 9.49),^[6] sollten **1** und **2** zu 4-Hydroxyazobenzol



und den Naphthylphosphaten hydrolysiert werden. Wir berichten hier über die Synthese von **1** und **2** sowie ihre durch Hydrolyse ausgelöste Fluoreszenz. Gemäß Schema 2 wurden zur Herstellung von **1** und **2** 1- bzw. 2-Naphthol zunächst auf literaturbekannte Weise^[7] mit Phosphorylchlorid umgesetzt. Im zweiten Schritt wurde die Azobenzoleinheit eingeführt.



Schema 2. Synthese der Phosphorsäurediester **1** und **2**.

In den UV/Vis-Spektren von **1** und **2** treten die Absorptionsbanden der Naphthalin- (Maximum bei niedriger Wellenlänge) und der Azobenzoluntereinheit auf (Maximum bei hoher Wellenlänge, Abb. 1). Wird mit Licht der Wellenlänge bestrahlt, die der der Absorptionsbande des Naphthalinteils entspricht, so wird keine Fluoreszenz festgestellt.^[8]

Bei Zusatz einer Phosphodiesterase, z. B. der Phosphodiesterase I aus *Crotalus atrox*,^[9] zu einer Lösung von **1** in AMPSO-Puffer^[10] nimmt die Fluoreszenzintensität rasch zu (Abb. 2).

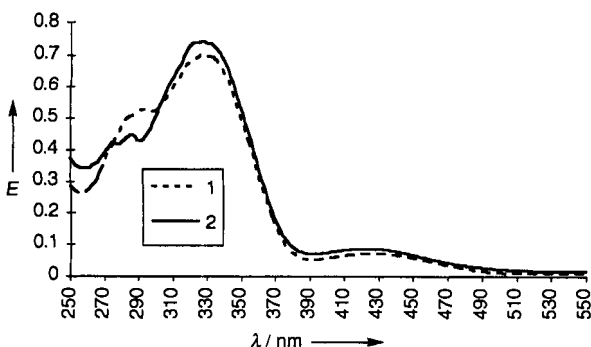


Abb. 1. UV/Vis-Spektren der Fluoreszenz-Reporter **1** und **2** (jeweils $c = 5.0 \times 10^{-5}$ M) in AMPSO-Puffer (0.1 M, pH = 8.8), $T = 25^\circ\text{C}$.

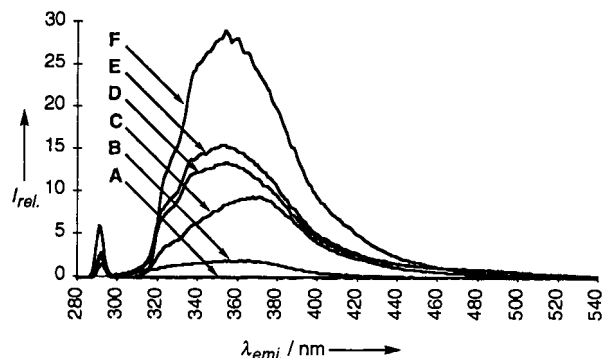


Abb. 2. Fluoreszenzspektren einer 5.0×10^{-5} M Lösung von **1** in AMPSO-Puffer (0.1 M, pH = 8.8), $T = 37^\circ\text{C}$, $V = 1.5$ mL. A: Ohne Zusatz von Enzym; B: Nach Zusatz von 0.05 u Phosphodiesterase I (*Crotalus atrox* venom); C: 30 min nach Enzymzugabe; D: 360 min nach Enzymzugabe; E: 240 min nach Enzymzugabe; F: Vergleich: 5.0×10^{-5} M 1-Naphthylphosphat + 5.0×10^{-5} M 4-Hydroxyazobenzol.

Die Form des Fluoreszenzspektrums entspricht der eines Spektrums, das von einer gleichkonzentrierten äquimolaren Kontrollmischung aus 1-Naphthylphosphat und 4-Hydroxyazobenzol aufgenommen wurde. Gemäß Abbildung 2 wird bei der enzymkatalysierten Hydrolyse von **1** die Intensität der Kontrollmischung nicht erreicht, statt dessen nimmt die Fluoreszenzintensität nach ca. 4 h sogar wieder ab.

Diese zunächst überraschende Feststellung ist auf die geringe Phosphataseaktivität der eingesetzten Enzympräparation zurückzuführen.^[9] Wie wir durch HPLC-Analyse der Reaktionsmischung nachweisen konnten, wird das aus **1** primär gebildete 1-Naphthylphosphat langsam weiter zu 1-Naphthol abgebaut. Anders als 1-Naphthylphosphat fluoresziert 1-Naphthol^[6] nicht in wässriger Lösung bei 357 nm. Bei Einsatz einer weiteren kommerziell erhältlichen^[11] Phosphodiesterase I (aus Rinderdarmmucosa) konnte 1-Naphthylphosphat als primäres Hydrolyseprodukt von **1** nicht nachgewiesen werden: Die HPLC-Analyse der (nichtfluoreszierenden) Reaktionsmischungen zeigte die unmittelbare Weiterreaktion zu 1-Naphthol an.

Daher haben wir das Derivat von 2-Naphthol (**2**) mit der Phosphodiesterase I (aus Rinderdarmmucosa) hydrolysiert: Anders als 1-Naphthylphosphat fluoresziert 2-Naphthol^[6] stark in wässriger Lösung. Das Ergebnis dieser Versuche ist in Abbildung 3 dargestellt: Die Zugabe des Enzyms zu einer Lösung von **2** in AMPSO-Puffer^[10] bewirkt eine rasche Zunahme der Fluoreszenzintensität, die sich asymptotisch der einer gleichkonzentrierten äquimolaren Mischung von 2-Naphthol und 4-Hydroxyazobenzol annähert (Abb. 3). Laut HPLC-Analyse der Reak-

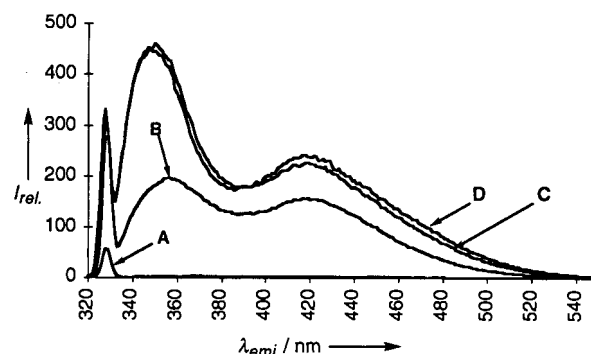


Abb. 3. Fluoreszenzspektren einer 5.0×10^{-5} M Lösung von **2** in AMPSO-Puffer (0.1 M, pH = 8.8), $T = 37^\circ\text{C}$, $V = 1.5$ mL. A: Ohne Zusatz von Enzym; B: 40 min nach Zusatz von 0.05 u Phosphodiesterase I (Rinderdarmmucosa); C: 4 h nach Enzymzusatz (Ende der Reaktion); D: Vergleich: 5.0×10^{-5} M 2-Naphthol + 5.0×10^{-5} M 4-Hydroxyazobenzol.

tionsmischung wurden 4-Hydroxyazobenzol und das Sekundärprodukt 2-Naphthol gebildet. Aus der Hydrolyse von **2** resultiert eine mindestens tausendfache Zunahme^[12] der Fluoreszenzintensität! Das Fortschreiten der Reaktion wird nicht nur durch den enormen Anstieg der Fluoreszenzintensität, sondern auch durch die gelbe Farbe des freigesetzten 4-Hydroxyazobenzols (oder Phenolat-Anions) deutlich ($\lambda_{\text{max}} = 421 \text{ nm}$). Die Auftragung der Anfangsgeschwindigkeiten gegen die Enzymkonzentration (Zugabe von 0.025–0.1 u) zeigt einen linearen Verlauf (nicht abgebildet, drei Experimente, $r = 0.9984$).

Die Phosphodiesterase-Aktivität kann somit mit den Fluoreszenz-Reportern **1** oder **2** festgestellt werden. Mit **1** und **2** als Testsubstrat kann nicht nur die Phosphodiesterase-Aktivität nachgewiesen werden, sondern zusätzlich auf Phosphatase-Aktivität geprüft werden.

Experimentelles

3 und **4** wurden gemäß Lit. [7] hergestellt.

1: In 150 mL wasserfreiem Toluol wurden unter Stickstoff 2.63 g (10.1 mmol) **3** und 2.00 g (10.1 mmol, 1.0 Äquiv.) 4-Hydroxyazobenzol unter Erhitzen gelöst. Zu dieser Lösung wurden innerhalb von 30 min 3.19 g (40.4 mmol, 4.0 Äquiv.) wasserfreies Pyridin zugegeben. Danach wurde 4 h bei 80 °C und anschließend 14 h bei RT gerührt. Das ausgefallene Pyridiniumhydrochlorid wurde abfiltriert und das Filtrat am Rotationsverdampfer auf etwa 20 mL eingengt. Zum öligen Rückstand wurden 20.0 mL einer Mischung aus Pyridin/Wasser (1/1) gegeben. Nach einstündigem Rühren bei RT wurden 100 mL 10% K_2CO_3 -Lösung und 100 mL Chloroform zugegeben. Das Zweiphasensystem wurde stark geschüttelt, so daß das Kaliumsalz von **1** auszufallen begann. Nach 3 h wurde der Niederschlag abfiltriert und der Rückstand mit 150 mL Wasser ausgekocht. Der unlösliche Rückstand wurde abfiltriert und das rote Filtrat mit konz. HCl auf pH = 1 eingestellt. Der hierbei ausgefallene orangefarbene Niederschlag wurde abfiltriert und aus Aceton umkristallisiert. Man erhielt 2.22 g (54%) des Phosphodiesters **1** in Form eines orangefarbenen Kristallpulvers.

Schmp. 167 °C (Aceton); IR (KBr): $\tilde{\nu} = 1222 \text{ [s, } \nu(\text{P=O})]$, 1204 [s, $\nu(\text{C-O})$], 1046, 989 [beide s, $\nu(\text{P-O})$], 564 cm^{-1} [s, $\delta(\text{P-O-Ar})$]; $^1\text{H-NMR}$ (300 MHz, $[\text{D}_6]\text{DMSO}$): $\delta = 7.34\text{--}7.51$ (m, 4H, Aryl-H), 7.51–7.64 (m, 5H, Aryl-H), 7.70–7.78 (m, 1H, Aryl-H), 7.81–8.00 (m, 5H, Aryl-H), 8.03–8.13 (m, 1H, Aryl-H), 11.20 (br. s, 1H, OH); $^{13}\text{C-NMR}$ (75 MHz, $[\text{D}_6]\text{DMSO}$): $\delta = 115.10$ (d, $^3J(\text{C,P}) = 2.82 \text{ Hz}$, Aryl-CH), 121.00 (d, $^3J(\text{C,P}) = 5.08 \text{ Hz}$, Aryl-CH), 121.70 (d, Aryl-CH), 122.64 (d, Aryl-CH), 124.32 (d, Aryl-CH), 124.38 (d, Aryl-CH), 125.97 (d, $^4J(\text{C,P}) = 1.70 \text{ Hz}$, Aryl-CH), 126.32 (s, $^3J(\text{C,P}) = 6.21 \text{ Hz}$, Aryl-C), 126.44 (d, Aryl-CH), 126.81 (d, Aryl-CH), 127.87 (d, Aryl-CH), 129.60 (d, Aryl-CH), 131.55 (d, Aryl-CH), 134.47 (s, Aryl-C), 147.16 (s, $^2J(\text{C,P}) = 7.35 \text{ Hz}$, Aryl-C), 148.64 (s, Aryl-C), 152.06 (s, Aryl-C), 153.96 (s, $^2J(\text{C,P}) = 6.78 \text{ Hz}$, Aryl-C); $^{31}\text{P-NMR}$ (80 MHz, $[\text{D}_6]\text{DMSO}$): $\delta = -11.68$; Laser-desorption-ionisation(LDI)-MS: m/z (%): 403.4 (100) [$\text{M}^+ - \text{H}$], 298 (5) [$\text{C}_{16}\text{H}_{11}\text{O}_4\text{P}^+$], 197.1 (12) [$\text{C}_{15}\text{H}_9\text{N}_2\text{O}^+$], 142.9 (50) [$\text{C}_{10}\text{H}_7\text{O}^+$]; UV/Vis (H_2O): $\lambda_{\text{max}}(\epsilon) = 417$ (1322), 330 (14910), 290 (9385), 220 nm (54300); Elementaranalyse für $\text{C}_{22}\text{H}_{17}\text{N}_2\text{O}_4\text{P}$ (404.36): ber. C 65.35, H 4.24, N 6.93, P 7.66; gef. C 65.23, H 4.37, N 6.88, P 7.61.

2: Analog zu **1** wurden 5.90 g (22.6 mmol) **4** und 4.49 g (22.6 mmol, 1.0 Äquiv.) 4-Hydroxyazobenzol in 300 mL wasserfreiem Toluol zusammengegeben und 7.14 g (90.4 mmol, 4.0 Äquiv.) wasserfreies Pyridin zugegeben. Danach wurde 4 h auf 80 °C erhitzt und über Nacht bei RT gerührt, anschließend das ausgefallene Pyridiniumhydrochlorid abfiltriert und Toluol am Rotationsverdampfer entfernt. Der ölige Rückstand wurde mit 20.0 mL Pyridin/Wasser 1/1 versetzt und bei RT eine Stunde gerührt. Die Reaktionsmischung wurde dann mit konz. HCl auf pH = 1 eingestellt. Nach 14 h fiel ein dunkelroter Niederschlag aus, der abfiltriert und aus Aceton umkristallisiert wurde. Man erhielt 3.22 g (35%) des Phosphodiesters **2** in Form orangefarbener Plättchen.

Schmp. 146 °C (Aceton); FT-IR (KBr): $\tilde{\nu} = 1228 \text{ [s, } \nu(\text{P=O})]$, 1208 [s, $\nu(\text{C-O})$], 976, 946 [beide s, $\nu(\text{P-O})$], 551 cm^{-1} [m, $\delta(\text{P-O-Ar})$]; $^1\text{H-NMR}$ (300 MHz, $[\text{D}_6]\text{DMSO}$): $\delta = 5.05$ (br. s, 1H, OH), 7.32–7.51 (m, 5H, Aryl-H), 7.52–7.63 (m, 3H, Aryl-H), 7.68–7.73 (br. s, 1H, Aryl-H), 7.78–7.94 (m, 7H, Aryl-H); $^{13}\text{C-NMR}$ (50 MHz, $[\text{D}_6]\text{DMSO}$): $\delta = 115.79$ (d, $^3J(\text{C,P}) = 4.58 \text{ Hz}$, Aryl-CH), 120.77 (d, $^3J(\text{C,P}) = 4.57 \text{ Hz}$, Aryl-CH), 121.08 (d, $^3J(\text{C,P}) = 5.34 \text{ Hz}$, Aryl-CH), 122.56 (d, Aryl-CH), 124.20 (d, Aryl-CH), 124.90 (d, Aryl-CH), 126.59 (d, Aryl-CH), 127.28 (d, Aryl-CH), 127.69 (d, Aryl-CH), 129.34 (d, Aryl-CH), 129.58 (d, Aryl-CH), 129.93 (s, Aryl-C), 131.32 (d, Aryl-C), 133.81 (s, Aryl-C), 147.91 (s, Aryl-C), 150.21 (s, $^2J(\text{C,P}) = 6.87 \text{ Hz}$, Aryl-C), 152.11 (s, Aryl-C), 155.38 (s, $^2J(\text{C,P}) = 6.87 \text{ Hz}$, Aryl-C); $^{31}\text{P-NMR}$ (80 MHz, $[\text{D}_6]\text{DMSO}$): $\delta = -11.98$; LDI-MS: m/z (%): 403.6 (100) [$\text{M}^+ - \text{H}$], 298.4 (7) [$\text{C}_{16}\text{H}_{11}\text{O}_4\text{P}^+$], 197.4 (7) [$\text{C}_{15}\text{H}_9\text{N}_2\text{O}^+$]; UV/Vis (H_2O): $\lambda_{\text{max}}(\epsilon) = 419$ (1195), 329 (15280), 286 (7480), 276 (6735), 220 nm (63090); Elementaranalyse für $\text{C}_{22}\text{H}_{17}\text{N}_2\text{O}_4\text{P}$ (404.36): ber. C 65.35, H 4.24, N 6.93,

P 7.66; gef. C 65.24, H 4.23, N 6.91, P 7.68. Hydrolyseexperimente wurden mit einem temperierbaren Shimadzu-RF-5000-Recording-Spektrofluorophotometer (150-W-Xenon-Lampe) durchgeführt.

Eingegangen am 11. Dezember 1996 [Z9869]

Stichworte: Analytische Methoden • Enzyme • Fluoreszenzsensoren

- [1] N. Sträter, W. N. Lipscomb, T. Klabunde, B. Krebs, *Angew. Chem.* **1996**, *108*, 2158–2190; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1996**, *35*, 2024–2055.
- [2] a) D. M. Skinner, C. A. Holland in *Essentials of Molecular Biology*, Vol. 2 (Hrsg.: D. Freifelder, G. M. Malacinski), Jones and Bartlett, Boston, London, **1993**, S. 262–297; b) D. Kostrewa, F. K. Winkler, *Biochemistry* **1995**, *34*, 683–696; c) M. Newman, T. Strzelecka, L. F. Dorner, I. Schildkraut, A. K. Aggarwal, *Science* **1995**, *269*, 656–663; d) I. B. Vipond, S. E. Halford, *Mol. Microbiol.* **1993**, *9*, 225–231; e) S. E. Halford, J. D. Taylor, C. L. M. Vermote, I. B. Vipond in *Nucleic Acids and Molecular Biology*, Vol. 7 (Hrsg.: F. Eckstein, D. M. J. Lilley), Springer, Berlin, Heidelberg, **1993**, S. 47–69.
- [3] a) D. S. Sigman, A. Mazumder, D. M. Perrin, *Chem. Rev.* **1993**, *93*, 2295–2316; b) P. B. Dervan, *Science* **1986**, *232*, 464–471; c) B. Linkletter, J. Chin, *Angew. Chem.* **1995**, *107*, 529–531; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1995**, *34*, 472–474; d) W. H. Chapman, Jr., R. Breslow, *J. Am. Chem. Soc.* **1995**, *117*, 5462–5469; e) J. Rammo, R. Hettich, A. Roigk, H.-J. Schneider, *Chem. Commun.* **1996**, 105–107; f) M.-S. Muche, M. W. Göbel, *Angew. Chem.* **1996**, *108*, 2263–2265; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1996**, *35*, 2126–2129.
- [4] J. R. Lakowicz, *Principles of Fluorescence Spectroscopy*, Plenum, New York, London, **1983**.
- [5] I. M. Klotz, H. A. Fiess, J. Y. Chen Ho, M. Mellody, *J. Am. Chem. Soc.* **1954**, *76*, 5136–5140.
- [6] A. Weller, *Z. Elektrochem.* **1952**, *56*, 662–668.
- [7] O. M. Friedman, A. M. Seligman, *J. Am. Chem. Soc.* **1950**, *72*, 624–625.
- [8] Bei den Hydrolyseexperimenten mit **2** wurde mit $\lambda_{\text{exc.}} = 326 \text{ nm}$ angeregt, da dabei das Enzym nicht fluoresziert und die Fluoreszenz von 2-Naphthol nur unwesentlich geringer ist als mit $\lambda_{\text{exc.}} = 290 \text{ nm}$; im Fall von **1** mußte mit $\lambda_{\text{exc.}} = 290 \text{ nm}$ angeregt werden, da die Fluoreszenz von 1-Naphthylphosphat dabei deutlich höher als mit $\lambda_{\text{exc.}} = 326 \text{ nm}$ ist.
- [9] Phosphodiesterase I (Crotalus atrox venom), Sigma. Aktivitätsdefinition der Anbieter: 1 u hydrolysiert 1.0 μmol Bis(*p*-nitrophenyl)phosphat pro Minute bei pH = 8.8 und 37 °C. Für die Phosphodiesterase-Aktivität geben die Anbieter 0.16 mg^{-1} Protein bei pH = 8.8 und 37 °C an, die Phosphatase-Aktivität beträgt $<0.001 \mu\text{g}^{-1}$ Protein bei pH = 10.4 und 37 °C (Substrat: *p*-Nitrophenylphosphat).
- [10] AMPSO: 3-[(1,1-Dimethyl-2-hydroxyethyl)amino]-2-hydroxypropansulfonsäure.
- [11] a) Phosphodiesterase I (Rinderdarmmucosa), Sigma. Aktivitätsdefinition der Anbieter: 1 u hydrolysiert 1.0 μmol Bis(*p*-nitrophenyl)phosphat pro Minute bei pH = 8.8 und 37 °C. Die Anbieter geben für das Präparat „non-specific phosphatase activity“ an. b) Im Kontrollexperiment wurde durch HPL-Chromatographie die schnelle Dephosphorylierung von 1- und 2-Naphthylphosphat festgestellt.
- [12] Fluoreszenzintensität bei 357 nm nach Abschluß der Reaktion/Fluoreszenzintensität bei 357 nm vor Enzymzugabe. Bei höherer Anregungsintensität sollte eine noch größere Zunahme der Fluoreszenzintensität auftreten.

Ioneninduzierte Spezifitätsänderung bei der polymerkatalysierten Solvolyse von Alkansäure-*p*-nitrophenylestern**

Guang-Jia Wang und Wilmer K. Fife*

Der Aufbau von Proteinstrukturen und die Spezifität der Enzymkatalyse werden zum größten Teil auf elektrostatische Wechselwirkungen zurückgeführt.^[1] Doch nur wenige Untersuchungen haben sich mit der Steuerung der Substratspezifität

[*] Prof. W. K. Fife, Dr. G.-J. Wang
Department of Chemistry
Indiana University-Purdue University at Indianapolis
402 North Blackford Street, Indianapolis, IN 46202 (USA)
Telefax: Int. + 317/274-4701
E-mail: fife@chem.iupui.edu

[**] Diese Arbeit wurde vom Office of Naval Research gefördert.