

tionsmischung wurden 4-Hydroxyazobenzol und das Sekundärprodukt 2-Naphthol gebildet. Aus der Hydrolyse von **2** resultiert eine mindestens tausendfache Zunahme<sup>[1,2]</sup> 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  $\mu\text{M}$ ) 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.<sup>[7]</sup> 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 zugetropft. 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 eingeeignet. Zum ölichen Rückstand wurden 20.0 mL einer Mischung aus Pyridin/Wasser (1/1) gegeben. Nach einstündigem Röhren bei RT wurden 100 mL 10%  $\text{K}_2\text{CO}_3$ -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):  $\tilde{\nu} = 1222$  [s, v(P=O)], 1204 [s, v(C=O)], 1046, 989 [beide s, v(P-O)], 564  $\text{cm}^{-1}$  [s,  $\delta(\text{P}-\text{O}-\text{Ar})$ ];  $^1\text{H-NMR}$  (300 MHz,  $[\text{D}_6]\text{DMSO}$ ):  $\delta = 7.34$ –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,  $^3J(\text{C},\text{P}) = 2.82$  Hz, Aryl-CH), 121.00 (d,  $^3J(\text{C},\text{P}) = 5.08$  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,  $^4J(\text{C},\text{P}) = 1.70$  Hz, Aryl-CH), 126.32 (s,  $^3J(\text{C},\text{P}) = 6.21$  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,  $^2J(\text{C},\text{P}) = 7.35$  Hz, Aryl-C), 148.64 (s, Aryl-C), 152.06 (s, Aryl-C), 153.96 (s,  $^2J(\text{C},\text{P}) = 6.78$  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) [ $M^- - \text{H}$ ], 298 (5) [ $\text{C}_{16}\text{H}_{11}\text{O}_4\text{P}^-$ ], 197.1 (12) [ $\text{C}_{12}\text{H}_9\text{N}_2\text{O}^-$ ], 142.9 (50) [ $\text{C}_{10}\text{H}_7\text{O}^-$ ]; UV/Vis ( $\text{H}_2\text{O}$ ):  $\lambda_{\text{max}}(\epsilon) = 417$  (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 zugetropft. 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):  $\tilde{\nu} = 1228$  [s, v(P=O)], 1208 [s, v(C=O)], 976, 946 [beide s, v(P-O)], 551  $\text{cm}^{-1}$  [m,  $\delta(\text{P}-\text{O}-\text{Ar})$ ];  $^1\text{H-NMR}$  (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,  $^3J(\text{C},\text{P}) = 4.58$  Hz, Aryl-CH), 120.77 (d,  $^3J(\text{C},\text{P}) = 4.57$  Hz, Aryl-CH), 121.08 (d,  $^3J(\text{C},\text{P}) = 5.34$  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,  $^2J(\text{C},\text{P}) = 6.87$  Hz, Aryl-C), 152.11 (s, Aryl-C), 155.38 (s,  $^2J(\text{C},\text{P}) = 6.87$  Hz, Aryl-C);  $^{31}\text{P-NMR}$  (80 MHz,  $[\text{D}_6]\text{DMSO}$ ):  $\delta = -11.98$ ; LDI-MS:  $m/z$  (%): 403.6 (100) [ $M^- - \text{H}$ ], 298.4 (7) [ $\text{C}_{16}\text{H}_{11}\text{O}_4\text{P}^-$ ], 197.4 (7) [ $\text{C}_{12}\text{H}_9\text{N}_2\text{O}^-$ ]; UV/Vis ( $\text{H}_2\text{O}$ ):  $\lambda_{\text{max}}(\epsilon) = 419$  (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 [Z 9869]

**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  $\lambda_{\text{exc.}} = 326$  nm angeregt, da dabei das Enzym nicht fluoresziert und die Fluoreszenz von 2-Naphthol nur unweentlich geringer ist als mit  $\lambda_{\text{exc.}} = 290$  nm; im Fall von **1** mußte mit  $\lambda_{\text{exc.}} = 290$  nm angeregt werden, da die Fluoreszenz von 1-Naphthylphosphat dabei deutlich höher als mit  $\lambda_{\text{exc.}} = 326$  nm ist.
- [9] Phosphodiesterase I (*Crotalus atrox* venom), Sigma. Aktivitätsdefinition der Anbieter: 1  $\mu\text{l}$  hydrolysiert 1.0  $\mu\text{mol}$  Bis(*p*-nitrophenyl)phosphat pro Minute bei pH = 8.8 und 37 °C. Für die Phosphodiesterase-Aktivität geben die Anbieter 0.16  $\mu\text{mg}^{-1}$  Protein bei pH = 8.8 und 37 °C an, die Phosphatase-Aktivität beträgt <0.001  $\mu\text{mg}^{-1}$  Protein bei pH = 10.4 und 37 °C (Substrat: *p*-Nitrophenylphosphat).
- [10] AMPSO: 3-[*(1,1-Dimethyl-2-hydroxyethyl)amino
- [11] a) Phosphodiesterase I (Rinderdarmmucosa), Sigma. Aktivitätsdefinition der Anbieter: 1  $\mu\text{l}$  hydrolysiert 1.0  $\mu\text{mol}$  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 HPLC-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\*

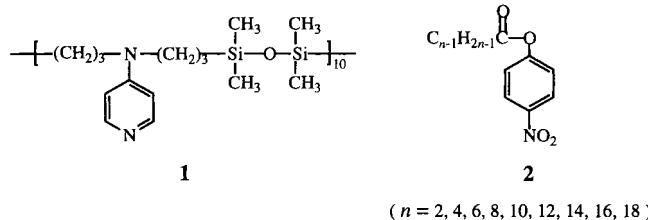
Der Aufbau von Proteinstrukturen und die Spezifität der Enzymkatalyse werden zum größten Teil auf elektrostatische Wechselwirkungen zurückgeführt.<sup>[1]</sup> Doch nur wenige Untersuchungen haben sich mit der Steuerung der Substratspezifität

[\*] 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.

von Enzymen durch Ionen unterschiedlicher Größe und Ladungsdichte befaßt. Die Möglichkeit zur Steuerung der Substratspezifität bei der enzymatischen Katalyse durch Verwendung von organischen Lösungsmitteln ist dagegen bekannt.<sup>[1–3]</sup> Die Aggregation von amphiphilen Polymeren in Wasser und in Mischungen aus Wasser und organischen Lösungsmitteln führt zu komplexen supramolekularen Strukturen mit mannigfältigen Morphologien.<sup>[4, 5]</sup> Die Morphologie der Aggregate aus Polystyrol und Poly(propylenimin)-Dendrimeren ändert sich in wässriger Lösung mit abnehmender Zahl der Dendrimergenerationen von sphärischen Micellen über micellare Stäbchen zu Vesikeln.<sup>[6]</sup> Die gleichen morphologischen Änderungen treten auch bei Polystyrol-b-poly(acrylsäure) (PS-b-PAA) mit abnehmendem Poly(acrylsäure)-Gehalt auf.<sup>[7]</sup> Alle diese Untersuchungen<sup>[4–7]</sup> deuten darauf hin, daß eine Zunahme von hydrophoben Effekten in amphiphilen Makromolekülen bei wachsendem Verhältnis von hydrophoben zu hydrophilen Monomeren zu solchen Änderungen der Aggregatmorphologie führt. Auch ioneninduzierte hydrophobe Effekte beeinflussen die Aggregatmorphologie von Amphiphilen. So kann man die Morphologie der Aggregate von PS-b-PAA, PS-b-Poly(ethylenoxid) und PS-b-Poly(4-vinylpyridiniummethyliodid) in Gemischen aus Wasser und einem organischen Lösungsmittel ebenfalls von Kugeln zu Stäbchen und weiter zu Vesikel ändern, wenn man Aussalzmittel wie NaCl und CaCl<sub>2</sub> zugibt.<sup>[8]</sup>

4-(Dialkylamino)pyridin-funktionalisierte Polymere sind geeignete Modellsysteme für die Untersuchung der Ursachen der Effizienz und der Selektivität von Enzymen.<sup>[9–12]</sup> Wir haben berichtet, daß das Makromolekül **1** mit seiner 4-(Dialkylamino)pyridin-Funktionsgruppe und einem Bis(trimethylen)-disiloxan-Gerüst als nucleophiler Katalysator bei der Solvolyse von **2** in wässrigen und in Methanol/Wasser-Lösungen eine



enzymähnliche Substratselektivität aufweist.<sup>[10, 13, 14]</sup> Unseres Wissens wurden ioneninduzierte Substratspezifitätsänderungen bei der katalytischen Estersolvolyse noch nicht beschrieben.

Wir stellen hier ioneninduzierte Änderungen der Substratspezifität bei der durch **1** katalysierten Solvolyse von **2** ( $n = 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18$ ) in wässrigen und in Methanol/Wasser-Lösungen vor. Unsere Ergebnisse sind eine Ermutigung, weitergehende Modelluntersuchungen zu den Ursprüngen der katalytischen Wirkung und Spezifität auf molekularer Ebene bei biologischen und chemischen Katalysen durchzuführen. Das Makromolekül **1** ist ein amphiphiles Polymer, das getrennte hydrophile und hydrophobe Bereiche enthält. In wässriger oder in Methanol/Wasser-Lösungen bildet es in einem dynamischen Prozeß durch Selbstorganisation makromolekulare Aggregate.<sup>[9–11]</sup> Die Erhöhung der Reaktionsgeschwindigkeit der durch **1** katalysierten Solvolyse von **2** wurde mit der hydrophoben Assoziation zwischen Katalysator und Substrat im Reaktionsmedium erklärt.<sup>[9–13]</sup> Wir haben die durch **1** katalysierte Solvolyse von **2** ( $n = 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18$ ) in mehreren Reaktionsmedien aus Lösungsmittel und zugesetzten Salzen bei pH 8.0 und 30 °C untersucht. Erste Versuche ergaben, daß die

Löslichkeit von **1** in 0.05 M wässrigen Tris(hydroxymethyl)-ammonium(Tris)-Pufferlösungen gegenüber der in reinem Wasser auf mehr als das Zehnfache ansteigt. Der Grund hierfür besteht in der Einsalzwirkung des Tris(hydroxymethyl)methylammonium-Ions aus dem Tris-Puffer.<sup>[15–18]</sup> Die Löslichkeit von **1** in 0.05 M wässrigen Phosphat- oder Borat-Pufferlösungen ähnelt der in reinem Wasser. Wässrige Lösungen von **1** weisen eine deutliche Trübung auf, wenn die Konzentration von **1** auf mehr als  $2.5 \times 10^{-5}$  mol L<sup>-1</sup> (hier wie im folgenden ist die Konzentration einer Monomereinheit von **1** angegeben) erhöht wird. Eine Lösung von **1** ( $2.5 \times 10^{-4}$  mol L<sup>-1</sup>) in 0.05 M wässriger Tris-Pufferlösung bleibt dagegen auch beim Stehen über längere Zeit klar. Diese Ergebnisse deuten darauf hin, daß Änderungen der Aggregatmorphologie von **1** von Vesikeln zu Stäbchen oder Kugeln bei einer Konzentration von  $2.5 \times 10^{-5}$  mol L<sup>-1</sup> offenbar auch bei Änderungen des Reaktionsmediums von wässriger Phosphat- oder Borat- zu Tris-Pufferlösung auftreten.<sup>[17, 19]</sup>

Wir haben die Geschwindigkeitskonstanten pseudo-erster Ordnung der durch **1** katalysierten Hydrolyse von **2** in 0.05 M wässriger Tris-, Phosphat- oder Borat-Pufferlösungen gemessen (Abb. 1). Ohne **1** läuft die Hydrolyse von **2** ( $n = 2, 4, 6, 8, 10, 12,$

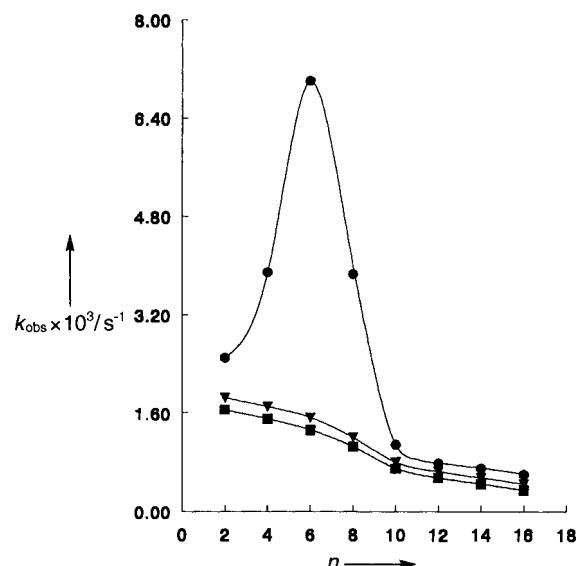


Abb. 1. Geschwindigkeitskonstanten pseudo-erster Ordnung ( $k_{\text{obs}}$ ) der Hydrolyse von **2** ( $n = 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16; 5.0 \times 10^{-5}$  M), katalysiert durch  $2.5 \times 10^{-5}$  mol L<sup>-1</sup> **1** als Funktion der Alkansäurekettenlänge  $n$  in 0.05 M wässriger Pufferlösung bei pH 8.0 und 30 °C: ●: Tris-Puffer, ▼: Phosphat-Puffer, ■: Borat-Puffer.

14, 16) sehr langsam ab, und in wässriger Tris-, Phosphat- oder Borat-Pufferlösungen liegt keine Substratselektivität vor. In Gegenwart von **1** ist die Hydrolyse von **2** ( $n = 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16$ ) ebenfalls sehr langsam, und die Reaktionsgeschwindigkeiten in wässriger Phosphat- oder Borat-Pufferlösungen unterscheiden sich nur geringfügig. Es findet hierbei also keine merkliche Katalyse statt. Eine Verlängerung der Alkansäureketten von **2** verringert die Hydrolysegeschwindigkeit geringfügig. Die Reaktionen in diesen Systemen sind ebenso wie die in wässriger Pufferlösungen ohne Katalysator nicht substratspezifisch (Tabelle 1). In wässriger Tris-Pufferlösung läuft die durch **1** katalysierte Hydrolyse von **2** ( $n = 2, 4, 6, 8$ ) dagegen viel schneller ab als in wässriger Phosphat- oder Borat-Pufferlösung. Außerdem weist **1** die gleiche Substratbevorzugung für **2** ( $n = 6$ ) auf wie Cholesterin-Esterase.<sup>[20]</sup> Bei zehnfachem Substratüberschüß

Tabelle 1. Einfluß der Konzentration von zugesetzten Salzen auf die Substratspezifität der durch **1** katalysierten Solvolyse von **2** ( $n = 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18$ ) in wäßrigen und in Methanol/Wasser-Lösungen bei 30 °C.

Reaktionsmedium	Salz	c[M]	Substratspezifität
wäßrige Lösung [a]	Tris-Puffer	0.05	<b>2</b> ( $n = 6$ )
	Phosphat-Puffer	0.05	keine
	Borat-Puffer	0.05	keine
Methanol/Wasser [b]	NaCl	0.00	<b>2</b> ( $n = 14$ )
	NaCl	0.01	<b>2</b> ( $n = 14$ )
	NaCl	0.10	<b>2</b> ( $n = 14$ )
	NaCl	0.25	<b>2</b> ( $n = 12$ )
	NaCl	0.50	<b>2</b> ( $n = 12$ )
	NaCl	1.00	<b>2</b> ( $n = 12$ )

[a] **1** ( $2.5 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ ), pH 8.0. [b] **1** ( $5.0 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$ ), Methanol/wäßriger Puffer (1/1, v/v; 0.05 M  $\text{H}_2\text{PO}_4^-/\text{HPO}_4^{2-}$ ), pH 8.0.

bleibt die katalytische Wirkung von **1** bis zum vollständigen Umsatz erhalten.

Wir haben außerdem den Einfluß des Aussalzmittels NaCl auf die Substratspezifität der durch **1** katalysierten Solvolyse von **2** in Methanol/Wasser (1/1, v/v) gemessen (Abb. 2). Ohne

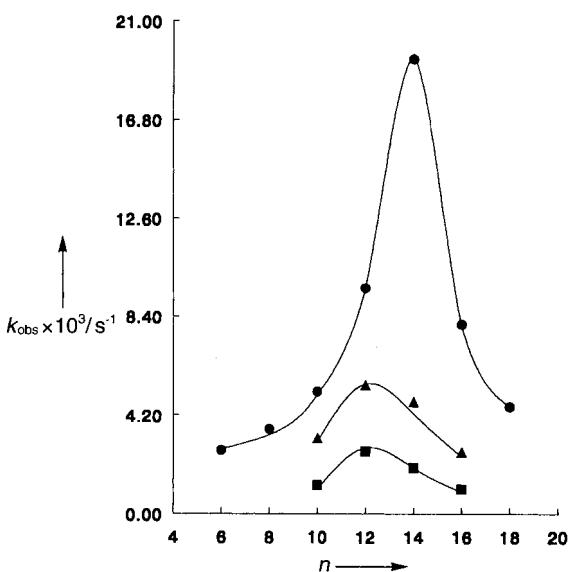


Abb. 2. Einfluß der NaCl-Konzentration auf die Geschwindigkeitskonstanten pseudo-erster Ordnung ( $k_{\text{obs}}$ ) der Solvolyse von **2** ( $n = 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18; 5.0 \times 10^{-6} \text{ M}$ ), katalysiert durch  $5.0 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$  **1** als Funktion der Alkansäurekettenlänge  $n$  in Methanol/wäßrigem Puffer (1/1, v/v; 0.05 M  $\text{H}_2\text{PO}_4^-/\text{HPO}_4^{2-}$ , pH 8.0) bei 30 °C: ●: kein NaCl, ▲: 0.25 M NaCl, ■: 1.00 M NaCl.

NaCl weist **1** eine Substratspezifität für **2** ( $n = 14$ ) auf. Die Solvolysegeschwindigkeiten für **2** ( $n = 10, 12, 14, 16$ ) nehmen ab, wenn die NaCl-Konzentration von 0 auf 1.00 M erhöht wird. Überraschenderweise wird bei einer NaCl-Konzentration von > 0.25 M statt **2** ( $n = 14$ ) bevorzugt **2** ( $n = 12$ ) umgesetzt (Tabelle 1). Außerdem opaleszieren die Lösungen von **1** bei  $5.0 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$  in Methanol/Wasser, wenn die NaCl-Konzentration mehr als 1.00 M beträgt. Offenbar ändert sich die Aggregatmorphologie von **1** in Methanol/Wasser von Kugeln oder Stäbchen zu Vesikeln, wenn die NaCl-Konzentration von 0 auf 1.00 M steigt.<sup>[8, 19]</sup> Wir nehmen an, daß Aussalzeffekte von NaCl diese Änderungen hervorrufen,<sup>[15–18]</sup> während Einsalzeffekte des Tris(hydroxymethyl)methylammonium-Ions in wäßriger Lösung bei **1** Änderungen der Aggregatmorphologie von Vesikeln zu Stäbchen oder Kugeln induzieren.<sup>[15–18]</sup> Diese Annahme basiert auf dem Befund, daß Salzzusätze die Aggregat-

morphologie von Amphiphilen aus kleinen Molekülen und Makromolekülen verändern.<sup>[8, 21, 22]</sup>

Zhang und Eisenberg berichteten, daß die Streckung der hydrophoben Ketten in makromolekularen Amphiphilen in kugelförmigen micellaren Aggregaten am größten ist und abnimmt, wenn die Aggregatmorphologie sich von Kugeln zu Stäbchen und weiter zu Vesikeln ändert.<sup>[17, 19]</sup> Die stärksten hydrophoben Bindungen zu lipophilen Substraten im Reaktionsmedium können mit den kugelförmigen Aggregaten gebildet werden. Vermutlich werden die durch NaCl hervorgerufenen Änderungen der Substratspezifität durch Änderungen der Aggregatmorphologie von **1** in Methanol/Wasser verursacht. Diese Änderungen der Aggregatmorphologie von **1** von Kugeln zu Stäbchen oder Vesikeln sollten mit einer schwächeren werdenden hydrophoben Bindung der Substrate und einer Abnahme der Abhängigkeit der Komplexbildung zwischen **1** und **2** von der Hydrophobie des Substrats einhergehen. Die Änderung der Substratspezifität von **2** ( $n = 14$ ) zu **2** ( $n = 12$ ) kann durch NaCl verursacht sein, das in der Aggregatmorphologie von **1** einen Übergang von Kugeln zu Stäbchen bewirkt. Dadurch entsteht eine hydrophobe Bindung, die zu **2** ( $n = 12$ ) in Methanol/Wasser am stärksten ist. Dies kann die Ursache der Moleküldiskriminierung sein, die bei biologischen und chemischen Reaktionen auf hydrophobe Wechselwirkungen an aktiven Stellen der Enzyme bzw. Katalysatoren zurückgeführt wird. Das Verhalten von **1** in wäßriger Tris-Pufferlösung kann kugelförmigen Aggregaten von **1** zugeschrieben werden, die infolge der Einsalzeffekte des Tris(hydroxymethyl)methylammonium-Ions entstehen und in wäßriger Lösung zu einer effizienten Reaktion im **1**·**2**-Komplex ( $n = 6$ ) beitragen.

Dies ist das erste Beispiel, in dem die Substratspezifität der katalytischen Estersolvolyse auf Struktureigenschaften von Katalysatoraggregaten im Reaktionsmedium beruht. Es eröffnet eine neue Möglichkeit zur Steuerung der chemischen Reaktivität und Aggregatmorphologie amphiphiler Makromoleküle und kann zum Verständnis der Grundlagen für die Steuerung der Substratspezifität auf molekularem Niveau bei der biologischen und chemischen Katalyse beitragen. Das kinetische Verhalten unseres Modellsystems gleicht dem von natürlichen Acyl-Transfer-Enzymen wie Chymotrypsin und Cholesterin-Esterase bei der Übertragung von Strukturelementen in Zellprozessen.

### Experimentelles

Kinetische Messungen: Die Küvette wurde mit 2.5 mL einer frisch hergestellten Lösung des Katalysators in 0.05 M wäßriger Pufferlösungen bei pH 8.0 gefüllt. Die Lösung wurde 10 min bei 30 °C in der thermostatisierten Meßzelle eines Hewlett-Packard-Modell-8450-Spektrophotometers äquilibriert. Die Katalysatorlösungen mit Natrimumchlorid wurden in Methanol/wäßrigem Puffer (1/1, v/v; 0.05 M  $\text{H}_2\text{PO}_4^-/\text{HPO}_4^{2-}$ , pH 8.0) hergestellt. 5 μL einer Lösung des Alkansäure-*p*-nitrophenylesters in Dioxan ( $2.5 \times 10^{-2} \text{ M}$ ) wurden mit einer Mikrospritze zugegeben. Das Reaktionsgemisch wurde schnell durch Schütteln gemischt und der zeitliche Verlauf der Absorption bei 400 nm aufgezeichnet. Die Reaktionen wurden für die Dauer von vier bis fünf Halbwertszeiten verfolgt. Die Geschwindigkeitskonstante pseudo-erster Ordnung ( $k_{\text{obs}}$ ) wurde als Steigung der Auftragung von  $\ln[A_x]/(A_x - A_i)$  gegen die Zeit erhalten ( $A_x, A_i$ : Absorption bei  $t = \infty$  bzw. zur Zeit  $t$ ). Die Geschwindigkeitskonstanten erster Ordnung,  $k_{\text{obs}}$ , sind Mittelwerte aus drei Versuchen; der experimentelle Fehler beträgt weniger als 5 %.

Eingegangen am 28. Januar 1997 [Z 10046]

**Stichworte:** Aggregate · Homogene Katalyse · Polymere · Solvolysen

- [1] W. P. Jencks, *Catalysis in Chemistry and Enzymology*, McGraw-Hill, New York, 1969, Kap. 7.
- [2] A. M. Klibanov, *Acc. Chem. Res.* **1990**, 23, 114.
- [3] T. Ke, C. R. Wescott, A. M. Klibanov, *J. Am. Chem. Soc.* **1996**, 118, 3366.
- [4] Z. Zhou, B. Chu, *Macromolecules* **1988**, 21, 2548.
- [5] K. Schillen, W. Brown, R. M. Johnsen, *Macromolecules* **1994**, 27, 4825.
- [6] J. C. M. van Hest, D. A. P. Delnoye, M. W. P. L. Baars, M. H. P. van Genderen, E. W. Meijer, *Science* **1995**, 268, 1592.

- [7] L. Zhang, A. Eisenberg, *Science* **1995**, *268*, 1728.  
[8] L. Zhang, K. Yu, A. Eisenberg, *Science* **1996**, *272*, 1777.  
[9] R. Vaidya, L. J. Mathias, *J. Am. Chem. Soc.* **1986**, *108*, 5514.  
[10] W. K. Fife, S. Rubinsztajn, M. Zeldin, *J. Am. Chem. Soc.* **1991**, *113*, 8535.  
[11] S. Rubinsztajn, M. Zeldin, W. K. Fife, *Macromolecules* **1991**, *24*, 2682.  
[12] W. K. Fife, *Trends Polym. Sci.* **1995**, *3*, 214.  
[13] G. J. Wang, D. Ye, W. K. Fife, *J. Am. Chem. Soc.* **1996**, *118*, 12536.  
[14] G. J. Wang, W. K. Fife, *Macromolecules* **1996**, *29*, 8587.  
[15] F. A. Long, W. F. McDevit, *Chem. Rev.* **1952**, *51*, 119.  
[16] D. B. Wetlauffer, S. K. Malik, S. Stoller, R. L. Coffin, *J. Am. Chem. Soc.* **1964**, *86*, 508.  
[17] R. Breslow, *Acc. Chem. Res.* **1991**, *24*, 159.  
[18] R. Breslow, C. J. Rizzo, *J. Am. Chem. Soc.* **1991**, *113*, 4340.  
[19] L. Zhang, A. Eisenberg, *J. Am. Chem. Soc.* **1996**, *118*, 3168.  
[20] L. D. Sutton, J. S. Stout, D. M. Quinn, *J. Am. Chem. Soc.* **1990**, *112*, 8398.  
[21] A. Sein, J. B. F. N. Engberts, *Langmuir* **1995**, *11*, 455.  
[22] L. L. Brasher, K. L. Herrington, E. W. Kaler, *Langmuir* **1995**, *11*, 4267.

## Über die Aktivität 2',5'-verknüpfter RNA in der templatgesteuerten Oligomerisierung von Mononucleotiden\*\*

Thazha P. Prakash, Christopher Roberts und Christopher Switzer\*

Die Fähigkeit 2',5'-verknüpfter Nucleinsäuren zur Kodierung von genetischer Information war und ist Gegenstand experimentellen und theoretischen Interesses. Bis in die achtziger Jahre wurde diskutiert, ob 2',5'-verknüpfte Nucleinsäuren Helices bilden;<sup>[1]</sup> dann entdeckte man, daß 2',5'-verknüpfte Oligonucleotide assoziieren.<sup>[2]</sup> Ein verwandtes Thema ist die Möglichkeit, chimäre Helices aufzubauen. Seit langem etwa ist bekannt, daß 2',5'-verknüpftes Polyadenylat einen Triplex mit natürlichem Oligouridylat bildet.<sup>[3]</sup> Dieses Phänomen wurde seitdem auch an anderen Strukturen und Sequenzen beobachtet.<sup>[4]</sup> Die erwähnten Befunde weisen auf die Möglichkeit hin, mit 2',5'-verknüpfter RNA oder mit natürlicher, 2',5'-Verknüpfungsdefekte enthaltender RNA genetische Informationen zu übertragen. Für enzymatische Reaktionen zeigten Lorsch et al., daß reverse Transkriptase ein RNA-Templat mit einer 2'-Fehlverknüpfung verarbeiten kann.<sup>[5]</sup> Für nichtenzymatische Reaktionen wurde die Fähigkeit isomerer RNA, als Templat zu dienen, vor kurzem bestätigt, und zwar durch die Verwendung eines komplexen Gemisches linearer und cyclischer 2',5'-verknüppter Oligocytidylate, das bei der Ton-katalysierten Kondensation von aktiviertem 5'-CMP erhalten wurde.<sup>[6]</sup> Wir berichten hier über die ersten Mononucleotid-Oligomerisierungen, die einen direkten Vergleich der Eigenschaften von natürlichen und 2',5'-verknüpften RNA-Templaten ermöglichen.

Die Oligonucleotide, die als Template eingesetzt wurden, sind in Abbildung 1 aufgeführt. Eine schematische Beschreibung der

Abbildung 1. In dieser Studie eingesetzte Oligonucleotidtemplate. Doppelt unterstrichene Buchstaben bedeuten 2',5'-verknüpfte, einfach unterstrichene 3',5'-verknüpfte RNA und kursiv gesetzte 3',5'-verknüpfte DNA.

[\*] Prof. C. Switzer, Dr. T. P. Prakash, C. Roberts  
Department of Chemistry, University of California  
Riverside, CA 92521 (USA)  
Telefax: Int. + 909/787-4713  
E-mail: switzer@citrus.ucr.edu

[\*\*] Diese Arbeit wurde durch die National Aeronautics and Space Administration gefördert [NAGW-4184].

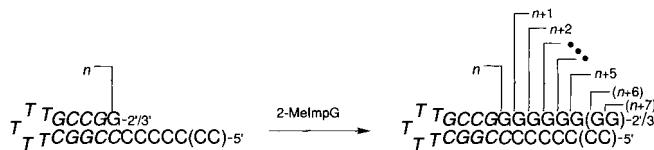


Abb. 2. Allgemeines Schema für den Ablauf der Reaktion zwischen den Templayten **1–4** (Abb. 1) und 2-MeImpG. Die GMP-Einheiten addieren sich sequentiell an das 2'/3'-Ende des Templayts (mit  $n^*$  gekennzeichnet). Das maximal lange Produkt bei den Templayten **1** und **2** ist  $G^{n+5}$  und bei den Templayten **3** und **4**  $G^{n+7}$ .

untersuchten Reaktionen findet sich in Abbildung 2. Die Templayte von Abbildung 1 sind den Haarnadeltemplayten, über die Wu und Orgel berichteten,<sup>[7]</sup> nachgebildet. Wie hier genutzt werden wird und auch schon in früheren Arbeiten<sup>[7]</sup> angemerkt ist, ermöglicht der Einbau von DNA in die Strang- und Schleifenregionen der Templayte, die Art der Phosphodiesterverknüpfungen (3',5' oder 2',5') durch Verdauung mit RNase zu bestimmen. Um eine eventuelle Störung der Konformation des 2',5'-verknüpften RNA-Teils im Templat **1** durch den DNA-Strangteil abzuschätzen, wurden die CD-Spektren von **1** und einem Standard, der dem RNA-Teil entspricht, 2',5'-C<sub>12</sub>, verglichen. Das Spektrum des Standards wies auf eine *A*-Helix hin, während das von **1** als Überlagerung der Spektren einer *B*-Helix und einer *A*-Helix interpretiert werden kann. Dies spricht dafür, daß der RNA-Teil in **1** seine Konformation beibehalten hat.

Zunächst untersuchten wir den Einfluß von divalenten Metall-Ionen auf die Oligomerisierung des 2-Methylimidazolids von Guanosin-5'-phosphat (2-MeImpG) an den Templayten **1** und **2**. Die Ergebnisse dieser Versuche sind in Tabelle 1 zusam-

Tabelle 1. Acht Tage dauernde Oligomerisierungen mit den Templayten **1** und **2** unter Verwendung verschiedener Metall-Ionen (jeweils 100 mM). Für weitere Details siehe Abb. 3.

Metallsalz	Templat 1 [%]	Templat 2 [%]
MgCl <sub>2</sub>	27.4	1.44
HgCl <sub>2</sub>	84.5	18.4
ZnCl <sub>2</sub>	73.8	36.7
CoCl <sub>2</sub>	76.6	61.4
MnCl <sub>2</sub>	80.1	92.4
UO <sub>2</sub> (NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub>	76.6	58.2
Pb(NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub>	71.3	43.7
Ni(NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub>	80.7	75.4

mengefaßt. Die Zahlen geben an, wieviel Templat jeweils nach acht Tagen Inkubationsdauer noch nicht verbraucht war. Magnesium war das bei weitem effektivste zweiwertige Metall-Ion für die Beschleunigung der Oligomerisierung am 2',5'-verknüpften RNA-Templat **1**. Dasselbe gilt für die Oligomerisierung am 3',5'-verknüpften RNA-Templat **2**; hier erwiesen sich allerdings auch andere Metall-Ionen als effektiv, besonders Quecksilber-, Zink- und Blei-Ionen. Gegenwärtig ist noch nicht klar, warum 2',5'-verknüpfte RNA durch Mg<sup>2+</sup> am stärksten aktiviert wird; man kann jedoch spekulieren, daß das Metall-Ion für eine kinetisch günstige Anordnung der aktivierten Nucleotide am Templat sorgt. Ein repräsentatives Autoradiogramm der Oligomerisierungsprodukte, die nach acht Tagen mit Templat **1** erhalten wurden, zeigt Abbildung 3. Auf der Grundlage von zeitabhängigen Daten und dem Vergleich mit dem Produkt an Templat **2** (nicht gezeigt) scheint das vorherrschende Produkt in Spur 2 das Resultat eines Einbaus von vier Ribonucleotiden zu sein. Um sicherzugehen, daß tatsächlich templatgesteuerte Reaktionen stattgefunden hatten, wurden die Templayten **1** und **2** mit