

Metallsulfide sind aktive Katalysatoren für die Reduktion von Nitrilen.<sup>[15]</sup> Wir konnten bestätigen, daß  $[\text{ReS}_4]^-$ -haltige Lösungen für die katalytische Hydrierung von Benzonitril zu  $\text{NH}_3$  und Dibenzylamin sehr aktiv sind (typische Reaktionsbedingungen: reines Nitril, 175 °C, 1000 psi  $\text{H}_2$ , 16 h; 75% Umsatz, Wechselzahl (turnover number, TON) ca. 3400). Dieser Arbeit zufolge sollten Mechanismusmodelle für metallsulfid-katalysierte Hydrierungen von Nitrilen die Möglichkeit der Substratbindung am Schwefelatom berücksichtigen. Eine spekulative, aber logische Erweiterung der hier vorgestellten Ergebnisse ist, daß es ähnliche Reaktionswege bei der biologischen Stickstofffixierung geben könnte, die von Clustern mit gut zugänglichen Sulfidliganden katalysiert wird.<sup>[16, 17]</sup>

### Experimentelles

$\text{NEt}_4[\text{ReS}_4]$  wurde nach der von Exxon modifizierten Vorschrift von Müller et al. hergestellt und durch Metathese in MeCN in das  $\text{PPh}_4^+$ -Salz überführt [18].  $\text{CF}_3\text{CN}$  wurde von PCR (Gainesville, FL, USA) bezogen.

**PPh<sub>4</sub>-1**,  $\text{R} = \text{CO}_2\text{CH}_3$ : Eine Mischung aus 0.36 g (0.55 mmol)  $\text{PPh}_4[\text{ReS}_4]$ , 0.054 g (0.21 mmol) Schwefel und 2.0 g (12.41 mmol) 4-NCC<sub>6</sub>H<sub>4</sub>CO<sub>2</sub>Me wurde 1.5 h auf 85 °C erwärmt. In dieser Zeit änderte sich die Farbe der Reaktionslösung von Violett nach Dunkelbraun. Das Produkt wurde mit 5 mL THF extrahiert und durch Abkühlen ausgefällt. Ausb. 0.36 g (72%). Analytisch reine Proben wurden durch Umkristallisieren aus THF/Hexan erhalten. Elementaranalyse ber. (gef.) für  $\text{C}_{33}\text{H}_{27}\text{NO}_2\text{PReS}_7$ : C 43.50 (43.47), H 2.99 (3.24), N 1.54 (1.24), S 24.63 (24.62), P 3.40 (3.14); <sup>1</sup>H-NMR (500 MHz, CD<sub>3</sub>CN):  $\delta = 3.90$  (Me, 3H), 7.83 (m, 16H), 7.98 (m, 4H), 8.06 (Ar, 2H,  $J = 0.75$  Hz), 8.36 (Ar, 2H,  $J = 0.75$  Hz); <sup>13</sup>C-NMR (125 MHz, [D<sub>6</sub>]Aceton):  $\delta = 52.41$  (OMe), 118.94 (PPh,  $J = 88.8$  Hz), 129.87, 130.40, 131.37 (PPh,  $J = 12.9$  Hz), 131.58, 135.65 (PPh,  $J = 10$  Hz), 136.34 (PPh,  $J = 2.75$  Hz), 139.3, 166.85 (C=O), 181.5 (SCN); IR (KBr):  $\tilde{\nu} = 1714$  (C=O), 1603 (C=N), 1278  $\text{cm}^{-1}$  (C=O); MS (Negativ-Ionen-ESI):  $m/z$ : 571.8 ( $\text{C}_9\text{H}_7\text{NO}_2\text{ReS}_7^-$ ).

Auf dieselbe Weise wurden Synthesen mit 4- $\text{CF}_3\text{C}_6\text{H}_4\text{CN}$  und 4- $\text{O}_2\text{NC}_6\text{H}_4\text{CN}$  durchgeführt: **NEt<sub>4</sub>-1**,  $\text{R} = \text{CF}_3$ : MS (Negativ-Ionen-ESI):  $m/z$ : 581.7 ( $\text{C}_8\text{H}_4\text{F}_3\text{NReS}_7^-$ ); <sup>1</sup>H-NMR (400 MHz, CD<sub>3</sub>CN):  $\delta = 1.17$  (tt, 12H), 3.11 (q, 8H), 7.77 (d, 2H,  $J = 10$  Hz), 8.42 (d, 2H,  $J = 10$  Hz). **NEt<sub>4</sub>-1**,  $\text{R} = \text{NO}_2$ : MS (Negativ-Ionen-ESI):  $m/z$ : 558.9 ( $\text{C}_7\text{H}_4\text{N}_2\text{O}_2\text{ReS}_7^-$ ); <sup>1</sup>H-NMR (500 MHz, CD<sub>3</sub>CN):  $\delta = 1.09$  (tt, 12H), 2.98 (q, 8H), 8.28 (d, 2H,  $J = 9$  Hz), 8.46 (d, 2H,  $J = 9$  Hz).

**PPh<sub>4</sub>-2**: Eine Lösung aus 0.25 g (0.38 mmol)  $\text{PPh}_4[\text{ReS}_4]$  und 0.051 g (0.43 mmol) NMO in 20 mL MeCN wurde auf  $-47^\circ\text{C}$  gekühlt und mit gasförmigem  $\text{CF}_3\text{CN}$  umgesetzt. Die Lösung nahm sofort eine braune Farbe an. Man ließ die Lösung auf Raumtemperatur kommen. Nach 1 h wurde das Solvens aus der schwachgelben Lösung entfernt, wobei gelbe Mikrokristalle verblieben, die mit 50 mL Hexan gewaschen wurden. Ausb. 0.28 g (86%). Analytisch reine Einkristalle wurden durch langsame Diffusion von Hexan in eine Ethanolösung des Produkts erhalten. Elementaranalyse ber. (gef.) für  $\text{C}_{38}\text{H}_{20}\text{F}_6\text{N}_2\text{OPReS}_4$ : C 39.11 (39.38), H 2.34 (2.28), N 3.26 (3.48), S 14.92 (14.75), F 13.26 (12.84), P 3.60 (3.47); <sup>19</sup>F-NMR (376 MHz,  $\text{CF}_3\text{CO}_2\text{H}$ ):  $\delta = 13.80$ , 13.95; IR (KBr):  $\tilde{\nu} = 1560$  (C=N), 1278 (CF), 1194 (CF), 1182 (CF), 1125 (CF), 960 (Re=O), 630  $\text{cm}^{-1}$  (CS); MS (Negativ-Ionen-ESI):  $m/z$ : 520.8 ( $\text{C}_4\text{F}_6\text{N}_2\text{ORES}_4^-$ ).

Eingegangen am 17. März 1997 [Z 10250]

**Stichworte:** Oxidoreduktasen • Redoxchemie • Rhenium • Schwefel

- [10] H. Gilman, R. G. Jones, *J. Am. Chem. Soc.* **1943**, *65*, 1458.  
 [11] C. M. Bolinger, T. B. Rauchfuss, A. L. Rheingold, *J. Am. Chem. Soc.* **1983**, *105*, 6321.  
 [12] Strukturanalyse von  $\text{C}_{28}\text{H}_{20}\text{F}_6\text{N}_2\text{OPReS}_4$ : monoklin, Raumgruppe  $P2_1/n$ ,  $a = 11.0735(5)$ ,  $b = 12.5437(6)$ ,  $c = 22.2448(10)$  Å,  $\beta = 94.065(2)^\circ$ ,  $V = 3082.1(2)$  Å<sup>3</sup>,  $Z = 4$ ,  $\rho_{\text{ber.}} = 1.922$  g cm<sup>-3</sup>,  $\text{MoK}\alpha$ -Strahlung ( $\lambda = 0.71073$  Å), Kristallabmessungen:  $0.08 \times 0.14 \times 0.36$  mm<sup>3</sup>. Die Struktur wurde mit Direkten Methoden gelöst, Re-, S-, C- sowie N-Atome wurden anisotrop verfeinert (SHELXS-86 und SHELXL-93). Einige Fluoratome sind etwas fehlgeordnet. Für 5415 unabhängige beobachtete Reflexe mit  $I > 2\sigma(I)$ , die bei  $T = 198(2)$  K auf einem Siemens-Dreikreisdiffraktometer im Bereich  $3.68 < 2\theta < 56.60$  gesammelt wurden, betrug der abschließende  $R$ -Wert  $0.063$  ( $wR_2 = 0.1574$ ). Die kristallographischen Daten (ohne Strukturaktoren) der in dieser Veröffentlichung beschriebenen Struktur wurden als „supplementary publication no. CCDC-100280“ beim Cambridge Crystallographic Data Centre hinterlegt. Kopien der Daten können kostenlos bei folgender Adresse in Großbritannien angefordert werden: The Director, CCDC, 12 Union Road, Cambridge CB2 1EZ (Telefax: Int. +1223/336-033; E-mail: deposit@chemcrs.cam.ac.uk).  
 [13] A. Kato, M. Tono, N. Hisamatsu, S. Nozawa, K. Ninomiya, T. Sugiyama, M. Kajitani, T. Akiyama, A. Sugimori, *J. Organomet. Chem.* **1994**, *473*, 313; A. Kato, M. Tono, N. Hisamatsu, S. Nozawa, T. Sugiyama, M. Kajitani, T. Akiyama, A. Sugimori, *Chem. Lett.* **1992**, 243.  
 [14] M. Herberhold, G.-X. Jin, A. L. Rheingold, *Chem. Commun.* **1996**, 2645; M. Herberhold, G.-X. Jin, W. Mihus, *J. Organomet. Chem.* **1996**, *512*, 111, zit. Lit.  
 [15] Kontrollexperimente: In Abwesenheit von  $\text{S}_8$  sind MeCN-Lösungen von  $[\text{ReS}_4]^-$  längere Zeit bei 80 °C stabil. Nitrile an sich beschleunigen die Umwandlung von  $[\text{ReS}_4]^-$  in  $[\text{ReS}_5]^-$  nicht; diese Reaktion läuft auch leicht in Pyridinlösung ab.  
 [16] J. B. Howard, D. C. Rees, *Chem. Rev.* **1996**, *96*, 2965; D. C. Rees, M. K. Chen, J. Kim, *Adv. Inorg. Chem.* **1994**, *40*, 89.  
 [17] Neuere Arbeiten zu katalytisch aktiven Sulfidometallclustern: T. Wakabayashi, Y. Ishii, K. Ishikawa, M. Hidai, *Angew. Chem.* **1996**, *108*, 2268; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1996**, *35*, 2123; K. D. Demadis, S. M. Malinak, D. Coucouvanis, *Inorg. Chem.* **1996**, *35*, 4038; M. D. Curtis, S. H. Drucker, *J. Am. Chem. Soc.* **1997**, *119*, 1027.  
 [18] Jp. Patent 02 08 8428 (Exxon), **1990**; *Chem. Abstr.* **1990**, *113*, 214804; A. Müller, E. Krickemeyer, H. Bögge, *Z. Anorg. Allg. Chem.* **1987**, *554*, 61.

## Ortsspezifische photochemische Spaltung von Proteinen mit einem Pyren-L-Phenylalanin-Konjugat\*\*

Challa V. Kumar\* und Apinya Buranaprapuk

Professor Nicholas J. Turro gewidmet

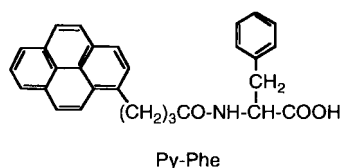
Reagentien, die Proteine thermisch oder photochemisch mit hoher Spezifität spalten, könnten für die Analyse von Struktur-Wirkungs-Beziehungen bei Proteinen, für die Untersuchung struktureller Aspekte von Proteindomänen, für die Entwicklung neuer therapeutischer Wirkstoffe und für die Umwandlung großer Proteine in kleinere und damit leichter sequenzierbare Fragmente von Nutzen sein.<sup>[1]</sup> Der zunehmende Einsatz von chemischen Nucleasen in DNA-Spaltungsstudien demonstriert, wie auf kleinen Molekülen basierende Reagentien als Werkzeuge in der Molekularbiologie angewendet werden.<sup>[2, 3]</sup> In Analogie dazu werden chemische Proteasen zur Manipulation von Proteinen verwendet.<sup>[1, 4, 5]</sup> Bei der Konstruktion von chemischen Proteasen können zwei Herangehensweisen unterschieden werden: 1) Entwicklung von Reagentien, die an das zu

[\*] Prof. C. V. Kumar, A. Buranaprapuk  
 Department of Chemistry  
 University of Connecticut  
 Storrs, CT 06269-3060 (USA)  
 Telefax: Int. + 860/486-2981  
 E-mail: cvkumar@nucleus.chem.uconn.edu

[\*\*] Diese Arbeit wurde von der University of Connecticut Research Foundation gefördert.

- [1] *Transition Metal Sulfur Chemistry* (Hrsg.: E. I. Stiefel, K. Matsumoto), American Chemical Society, Washington, DC, **1996**.  
 [2] H. Kawaguchi, K. Tatsumi, *J. Am. Chem. Soc.* **1995**, *117*, 3885; A. A. Eagle, S. M. Harben, E. R. Tiekink, C. G. Young, *ibid.* **1994**, *116*, 9749; T. Shibahara, G. Sakane, S. Mochida, *ibid.* **1993**, *115*, 10408.  
 [3] M. Rakowski DuBois, B. R. Jagirdar, S. Dietz, B. C. Noll, *Organometallics* **1997**, *16*, 294, zit. Lit.  
 [4] J. T. Goodman, S. Inomata, T. B. Rauchfuss, *J. Am. Chem. Soc.* **1996**, *118*, 11674.  
 [5] O. Weissner, S. Landa, *Sulphide Catalysts, Their Properties and Applications*, Pergamon, New York, **1973**, S. 248.  
 [6] B. K. Burgess, D. J. Lowe, *Chem. Rev.* **1996**, *96*, 2983.  
 [7] P. Bernatis, J. C. V. Laurie, M. Rakowski DuBois, *Organometallics* **1990**, *9*, 1607; D. E. Coons, J. C. V. Laurie, R. C. Haltiwanger, M. Rakowski DuBois, *J. Am. Chem. Soc.* **1987**, *109*, 283.  
 [8] A. Fatidi, *Chemistry of Triple-Bonded Functional Groups, Part 2* (Hrsg.: S. Patai, Z. Rappoport), Wiley, Chichester, **1983**.  
 [9] A. Müller, M. Lemke, E. Krickemeyer, H. Bögge, M. Penk, *Monatsh. Chem.* **1993**, *124*, 857.

spaltende Protein binden; 2) kovalente Verknüpfung von redox-aktiven Metallkomplexen mit spezifischen Aminosäureresten und anschließende Spaltung des Proteins durch Aktivierung des Metallzentrums. Wir beschreiben hier ein neues Reagens für die photochemische Spaltung von Proteinen, das a) eine hohe Affinität zu hydrophoben Proteinbereichen aufweist, b) starke Absorption im sichtbaren Bereich zeigt, c) einen langlebigen angeregten Singulett-Zustand hat, der für Photoreaktionen geeignet ist, und d) einen Chromophor enthält, mit dessen Hilfe die Mikroumgebungen ausführlich untersucht werden können. Die Spaltung von Proteinen mit Licht ermöglicht eine genaue Kontrolle über Start und Abbruch der Reaktion. Vanadat wurde als Photosonde für Phosphat-Bindungsstellen in Proteinen benutzt.<sup>[6]</sup> Es hat jedoch einen geringen Extinktionskoeffizienten (für  $\lambda > 320$  nm),<sup>[6]</sup> und daher werden hohe Vanadat-Konzentrationen benötigt, um einen signifikanten Anteil des einfallenden Lichts einzufangen. Die Anwesenheit mehrerer Vanadium-Spezies in Vanadatlösungen erschwert die Identifizierung des aktiven Reagens;<sup>[6c]</sup> des weiteren induziert Vanadat die photochemische Spaltung nicht nur an Serin-, sondern auch an vielen anderen Resten.<sup>[6d]</sup> Wir fanden nun, daß Py-Phe (Schema 1) die Vanadat-Photochemie ergänzt und die photochemische Spaltung von Rinderserumalbumin (BSA) und Hühner-Lysozym unter milden Bedingungen induziert.<sup>[7]</sup>



Schema 1. Strukturformel der difunktionellen Sonde Py-Phe, die durch Verknüpfung von 4-(1-Pyrenyl)buttersäure mit L-Phenylalanin erhalten wird.

Die Entwicklung von Py-Phe basiert auf früheren Studien in unserem Labor über difunktionelle Sonden, bei denen eine hydrophobe und eine hydrophile Gruppe über ein Verbindungsstück (einen „Spacer“) verknüpft sind.<sup>[8–10]</sup> Difunktionelle Sonden machen Bindungsstellen in Proteinen ausfindig, die durch einen hydrophoben und einen hydrophilen Bereich in enger Nachbarschaft gekennzeichnet sind. Die kovalente Verknüpfung von 4-(1-Pyrenyl)buttersäure mit L-Phenylalanin ergab die fluoreszierende Sonde Py-Phe (Schema 1).<sup>[11]</sup> Durch die hydrophile Carboxygruppe von Py-Phe und die Amidverknüpfung wird die Löslichkeit des hydrophoben Pyrengerüsts in Wasser verbessert. Die hydrophilen Gruppen können sich an elektrostatischen Wechselwirkungen und Wasserstoffbrücken beteiligen. Die Größe des Abstandes zwischen den hydrophoben und hydrophilen Anteilen (die Spacerlänge) spielt eine wichtige Rolle bei der Bindung einer Sonde an Proteine: Die Affinität der Sonde zu Proteinen nimmt mit der Spacerlänge sowie mit der Größe des hydrophoben Anteils zu.<sup>[8]</sup> Der langlebige angeregte Singulett-Zustand des Pyrenyl-Chromophors (Halbwertszeit  $> 100$  ns) führt in Kombination mit der Redoxaktivität von Cobalt(III)-amin-Komplexen, zu einer ortsspezifischen Proteinspaltung.

Wie durch Bindungsstudien gezeigt werden konnte, bindet Py-Phe an Proteine. Die Absorptionsbanden von Py-Phe (3  $\mu$ M) werden z. B. durch die Bindung an BSA rotverschoben (Abb. 1). Die Intensitäten der Py-Phe-Absorptionsbanden nehmen mit steigender Proteinkonzentration ab, der isosbestische Punkt liegt bei 345 nm. Die Rotverschiebung und der hypochrome Effekt lassen auf eine hydrophobe Umgebung des Pyrenyl-Chromophors schließen.<sup>[8]</sup> Die Auswertung<sup>[12]</sup> der Absorptionstirration (Einschub in Abb. 1) ergab eine Bindungskonstante von

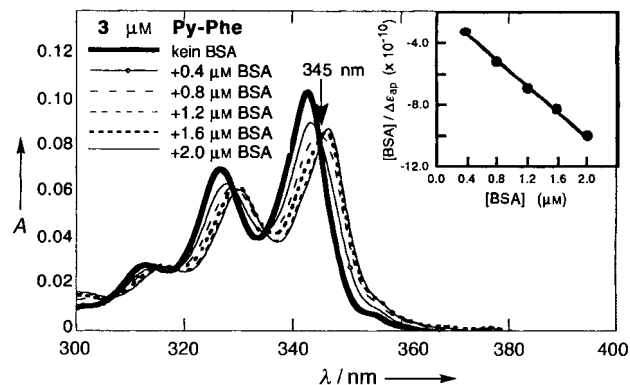


Abb. 1. Absorptionsspektren von Py-Phe (3  $\mu$ M) ohne und mit Rinderserumalbumin. Die Spektren zeigen eine Rotverschiebung mit 4 nm, mit einem isosbestischen Punkt bei 345 nm. Oben rechts im Bild ist der Quotient aus der BSA-Konzentration und  $\Delta\epsilon_{ap}$  [12] gegen die BSA-Konzentration aufgetragen. Die aus der Auftragung bestimmte Bindungskonstante für die Bindung von Py-Phe an BSA beträgt  $2.8 \pm 0.5 \times 10^6$  M<sup>-1</sup>. Die Bindungskonstante für die Bindung von Py-Phe an Lysozym beträgt  $7 \pm 0.5 \times 10^5$  M<sup>-1</sup>. A = Absorbanz.

$(2.8 \pm 0.5) \times 10^6$  M<sup>-1</sup>. Die Bindung von Py-Phe an BSA wurde außerdem durch Messung des Circular Dichroismus (CD) und durch Fluoreszenzspektroskopie bestätigt. Neue positive CD-Banden erschienen bei 330 und 345 nm, wenn BSA (50  $\mu$ M) zu Py-Phe (50  $\mu$ M) gegeben wurde; die freie Sonde wies negative CD-Banden bei 336, 351 und 360 nm auf. Die Bindung von Py-Phe an BSA erhöht die Py-Phe-Fluoreszenzlebensdauer von 106 ns (freie Sonde, luftgesättigter Puffer) auf 125 ns (bei einem 1:1-Verhältnis von Py-Phe zu BSA). Studien zur Fluoreszenzlöschung ergaben, daß an BSA gebundenes Py-Phe gut vor wäßrigem Medium geschützt ist. Die mit CoHA (= [Co(NH<sub>3</sub>)<sub>6</sub>]<sup>3+</sup>) als Löscher ermittelten Stern-Vollmer-Löschkonstanten  $K_{SV}$  nehmen von 1.9 mM<sup>-1</sup> (freie Sonde) auf 0.25 mM<sup>-1</sup> (gebunden an BSA) ab. Insgesamt zeigen die spektroskopischen Untersuchungen, daß die Sonde an das Protein mit ihrem Pyrenylteil bindet, der durch die Proteinmatrix vor dem wäßrigen Medium geschützt wird.

Die photochemische Spaltung von BSA wurde durch Bestrahlung im Bereich der Absorptionsbanden des Pyrenyl-Chromophors bei 344 nm in Gegenwart von CoHA (1, 2 und 10 mM) als Elektronenacceptor erreicht und durch Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE) verfolgt (6% Acrylamid; 0.4% Bisacrylamid; 13% Glycerin; pH 8.4).<sup>[13]</sup> Zwei neue Banden, die von BSA-Fragmenten mit Molekülmassen von 41 und 28 kDa herrühren (Abb. 2), erscheinen im Gel, was den hohen Grad an spezifischer Spaltung veranschaulicht. Wäre die photochemische Spaltung unselektiv erfolgt, hätte man einen Schmier in diesen Spuren beobachtet. In Abwesenheit von entweder einem der beiden Reagentien oder Licht trat keine photochemische Spaltung ein (Abb. 2 unten, Spuren 3 und 8–10): Bestrahlung von BSA und CoHA ohne Py-Phe ergab keine Fragmentierung (Spur 10); Bestrahlung von BSA in Anwesenheit oder Abwesenheit von Py-Phe ohne CoHA hatte keine Fragmentierung zur Folge (Spur 9 bzw. 8). Py-Phe, CoHA und Licht sind also für die photochemische Spaltung essentiell. Auch Lysozym konnte photochemisch mit Py-Phe gespalten werden, wobei zwei Fragmente geringer Molekülmasse (11 kDa, 3.5 kDa) entstanden. Photochemische Spaltung mit Py-Phe wurde auch bei Myoglobin und Carboxypeptidase beobachtet, d. h. das Reagens Py-Phe ist breit anwendbar.

Die Verwendung anderer Co<sup>III</sup>-Komplexe anstelle von CoHA, wie Chlorpentaamin-Co<sup>III</sup>Chlorid, [Co(bpy)]<sup>3+</sup> oder Co<sup>III</sup>-Sepulchralchlorid, ergab die gleichen Fragmente bei der Spaltung von BSA mit Py-Phe. Die Spaltung findet wahrscheinlich

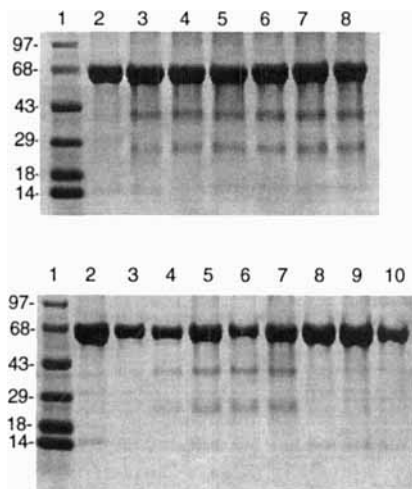


Abb. 2. Oben: Das Gelelektrophoresemuster von Rinderserumalbumin (BSA) unter verschiedenen Bedingungen: Spur 1, Molekülmassenstandard für die links angegebenen Massen; die Spuren 2–8 enthielten BSA (15 µM) und Py-Phe (15 µM), die Spuren 3–5 darüber hinaus 1 mM CoHA und die Spuren 6–8 2 mM CoHA. Die Proben in den Spuren 3, 4 und 5 wurden mit Licht der Wellenlänge 344 nm für 20, 40 bzw. 60 min bestrahlt; die Proben in den Spuren 6–8 wurden 20, 40 bzw. 60 min bestrahlt. Die Proben liefen von oben nach unten. Unten: Das Gelelektrophoresemuster von BSA unter verschiedenen Bedingungen: Spur 1, Molekülmassenstandard für die links angegebenen Massen; die Spur 2 enthielt BSA (15 µM), die Spuren 3–7 BSA (15 µM), CoHA (10 mM) und Py-Phe (15 µM), und die Proben waren 0, 10, 20, 30 bzw. 60 min bestrahlt worden. Spur 8 enthielt nur BSA (15 µM), das 30 min bestrahlt worden war; Spur 9 enthielt BSA (15 µM) und Py-Phe (15 µM), und die Probe war 30 min bestrahlt worden; Spur 10 enthielt BSA (15 µM) und CoHA (10 mM), und die Probe war 30 min bestrahlt worden.

eher an der Pyrenyl- als an der Metall-Bindungsstelle statt. Singulett-Sauerstoff ist nicht an diesen Reaktionen beteiligt, da Entgasung des Reaktionsansatzes die Photoproduktbildung weder veränderte noch reduzierte. Natriumazid, ein bekannter Löscher für Singulett-Sauerstoff, inhibiert die Photoreaktion nicht. Bestrahlungen länger als 20 Minuten erhöhten die Bildung der Photoprodukte nur geringfügig (maximaler Umsatz von 21% für BSA und 44% für Lysozym). Verantwortlich für die photochemische Spaltung könnte das Pyrenyl-Radikalkation sein, das durch Elektronenübertragung aus dem angeregten Py-Phe-Singulett-Zustand auf CoHA entsteht. Gestützt wird diese Hypothese dadurch, daß die Löschung der Py-Phe-Fluoreszenz durch CoHA diffusionskontrolliert erfolgt ( $4.6 \times 10^9 \text{ dm}^3 \text{ mol}^{-1} \text{ s}^{-1}$ ),  $\text{Co}^{\text{III}}$ -Ammin-Komplexe für die Spaltung notwendig sind, Py-Phe allmählich in der Photoreaktion verbraucht wird und  $[\text{Co}^{\text{II}}(\text{H}_2\text{O})_6]^{2+}$  am Ende der photochemischen Reaktion detektiert wurde. Die Fluoreszenz des proteingebundenen Py-Phe wird durch CoHA mit einer niedrigeren Geschwindigkeit gelöscht als die der freien Sonde ( $K_{\text{sv}}$  wird durch die Bindung an BSA um den Faktor 8 reduziert). Ohne Py-Phe führte die Bestrahlung nicht zur Spaltung des Proteins. Der Pyrenyl-Chromophor ist wichtig für die Lichtabsorption und die nachfolgende Photoreaktion. Die N-terminale Sequenzierung der Photoprodukte zur Identifizierung der Spaltstelle war nicht erfolgreich, was auf eine mögliche N-terminale Blockierung hindeutet. Ähnliche N-terminale Blockierungen wurden bereits bei anderen Proteinspaltungen beobachtet.<sup>[1a–c, 6]</sup>

Gegenwärtig werden Experimente zur Identifizierung der Spaltstelle und des für die photochemische Spaltung verantwortlichen Mechanismus durchgeführt. Das Auftreten zweier scharfer Banden in den Gelen verweist auf einen einzigen Schnitt im Peptidrückgrat mit einem hohen Grad an Spezifität. Die geringe Diffusionsbeweglichkeit des Pyrenyl-Radikalkations (im Vergleich zu der des Hydroxyl-Radikals<sup>[14]</sup>) und die

hohe Affinität von Py-Phe für hydrophobe/hydrophile Bereiche in Proteinen könnten für die hohe Spezifität verantwortlich sein.

Eingegangen am 30. Dezember 1996,  
veränderte Fassung am 14. April 1997 [Z 9946]

**Stichworte:** Gelelektrophorese • Photochemie • Proteine • Pyrene • Spaltungsreaktionen

- [1] a) A. Schepartz, B. Cuenoud, *J. Am. Chem. Soc.* **1990**, *112*, 3247; b) B. Cuenoud, T. M. Tarasow, A. Schepartz, *Tetrahedron Lett.* **1992**, *33*, 895; c) D. Hoyer, H. Cho, P. G. Schultz, *J. Am. Chem. Soc.* **1990**, *112*, 3249; d) M. R. Ermacora, J. M. Delfino, B. Cuenoud, A. Schepartz, R. O. Fox, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1992**, *89*, 6383; e) T. M. Rana, C. F. Meares, *J. Am. Chem. Soc.* **1991**, *113*, 1859; f) *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* **1991**, *88*, 10578; g) *J. Am. Chem. Soc.* **1990**, *112*, 2457.
- [2] A. H. Krotz, L. Y. Kuo, T. P. Shields, J. K. Barton, *J. Am. Chem. Soc.* **1993**, *115*, 3877; C. C. Cheng, S. E. Rokita, C. Burrows, *Angew. Chem.* **1993**, *105*, 290; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1993**, *32*, 277; N. Gupta, N. Grover, G. A. Neyhart, P. Singh, H. H. Thorpe, *Inorg. Chem.* **1993**, *32*, 310; A. Sitlani, E. C. Long, A. M. Pyle, J. K. Barton, *J. Am. Chem. Soc.* **1992**, *114*, 2303.
- [3] S. A. Strobel, P. B. Dervan, *Methods Enzymol.* **1992**, *216*, 309; D. P. Mack, P. B. Dervan, *Biochemistry* **1992**, *31*, 9399; S. F. Singleton, P. B. Dervan, *J. Am. Chem. Soc.* **1992**, *114*, 6957; P. B. Dervan, *Nature* **1992**, *359*, 87.
- [4] N. Ettner, G. A. Ellestad, W. Hillen, *J. Am. Chem. Soc.* **1993**, *115*, 2546; N. Ettner, J. W. Metzger, T. Lederer, J. D. Hlmes, C. Kisker, W. Hinrichs, G. Ellestad, W. Hillen, *Biochemistry* **1995**, *34*, 22.
- [5] S. A. Strobel, P. B. Dervan, *Science* **1991**, *254*, 1639; K. S. Graham, P. B. Dervan, *J. Biol. Chem.* **1990**, *265*, 6534; K. Nagai, S. M. Hecht, *ibid.* **1991**, *266*, 3994.
- [6] a) J. J. Correia, L. D. Lipscomb, J. C. Dabrowiak, N. Isern, J. Zubieta, *Arch. Biochem. Biophys.* **1994**, *309*, 94; b) D. C. Crans, K. Sudhakar, T. Zamborelli, *Biochemistry* **1992**, *31*, 6812; c) D. Rehder, *Angew. Chem.* **1991**, *103*, 152; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1991**, *30*, 148; d) C. R. Cremo, J. A. Loo, C. G. Edmonds, K. M. Hatlelid, *Biochemistry* **1992**, *31*, 491.
- [7] C. V. Kumar, A. Buranaprapuk, Vortrag beim 213. ACS National Meeting, August 1996, Orlando, FL, USA.
- [8] a) C. V. Kumar, L. M. Tolosa, *J. Phys. Chem.* **1993**, *97*, 13913; b) *FASEB J.* **1993**, *7*, A1131.
- [9] C. V. Kumar, E. H. Asuncion, *J. Chem. Soc. Chem. Commun.* **1992**, 470; *J. Am. Chem. Soc.* **1993**, *115*, 8547.
- [10] C. V. Kumar, W. B. Tan, *J. Inorg. Biochem.* **1997**, im Druck.
- [11] Zu 0.5 g 4-(1-Pyrenyl)buttersäure in Acetonitril (50 mL) wurden L-Phenylalaninethylester (0.4 g) und Dicyclohexylcarbodiimid (DCC) (0.4 g) gegeben. Das Gemisch wurde bei Raumtemperatur gerührt (4 h), und überschüssiges DCC wurde zersetzt. Das Lösungsmittel wurde im Vakuum entfernt und das Reaktionsgemisch einer sauren Hydrolyse unterworfen (1 N HCl, 12 h, Raumtemperatur). Das Produkt wurde nach Chromatographie an Kieselgel in reiner Form isoliert.  $^1\text{H-NMR}$  (270 MHz, DMSO):  $\delta$  = 8.06–8.34 (m, 9H), 7.2 (m, 5H), 4.5 (austauschbares NH); 2.0 (m, 1H), 2.1–2.5 (m, aliphatische H); IR (KBr):  $\nu$  = 3300  $\text{cm}^{-1}$  (OH), 1703  $\text{cm}^{-1}$  (Säure-C=O), 1640  $\text{cm}^{-1}$  (Amid, C=O); die Absorptionsmaxima bei  $\lambda$  = 313, 326 und 343 nm sowie die Fluoreszenzmaxima bei  $\lambda$  = 376, 396 und 417 nm (Anregung bei 340 nm) sind für den Pyrenyl-Chromophor charakteristisch. Die Maxima im CD-Spektrum wurden bei  $\lambda$  = 336, 351 und 360 nm beobachtet.
- [12] A. Wolfe, G. H. Shimer, Jr., T. Mechan, *Biochemistry* **1987**, *26*, 6392; A. M. Pyle, R. M. Rehm, C. V. Kumar, N. J. Turro, J. K. Barton, *J. Am. Chem. Soc.* **1989**, *111*, 3051. Die verwendete Gleichung lautet:  

$$([\text{BSA}]/\Delta\epsilon_{\text{ap}}) = ([\text{BSA}]/\Delta\epsilon) + (1/\Delta\epsilon K)$$

$$\Delta\epsilon_{\text{ap}} = [\epsilon_a - \epsilon_f], \Delta\epsilon = [\epsilon_b - \epsilon_f], K$$
 ist die Bindungskonstante,  $\epsilon_a$  = (Absorbanz bei 343 nm)/[Py-Phe],  $\epsilon_b$  = Extinktionskoeffizient für die gebundene Form ( $2.211 \times 10^4 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ ), und  $\epsilon_f$  ist der Extinktionskoeffizient von freiem Py-Phe.
- [13] Das Reaktionsgemisch (0.1 mL) wurde bei 344 nm verschieden lang mit einer Xenon-Lichtquelle durch einen Monochromator ( $3.0 \times 10^{-8} \text{ Einstein min}^{-1}$  bei 340 nm) bestrahlt. Es wurden UV-Filter benutzt, um streuendes UV-Licht fernzuhalten, und der Bandpaß am Monochromator wurde auf 10 nm eingestellt. Die bestrahlten Protein-Sonden-Lösungen wurden im Vakuum getrocknet und die Rückstände in 0.024 mL Probenpuffer aufgenommen. Der Puffer enthielt Glycerin (1 mL), Natriumdodecylsulfat (3 mL, 10proz. wäßrige Lösung), Tris-Hydrochlorid (1.25 mL, 0.5 M), Bromphenolblau (0.6 mL, 0.1proz. Lösung) und entionisiertes destilliertes Wasser (4.5 mL). An die Gele wurde eine Spannung von 60 V gelegt, bis der Farbstoff (Coomassie-Blau) das Sammelgel passiert hatte. Danach wurde die Spannung für die Laufzeit von 2 h erhöht (110 V); siehe H. Schaeffer, G. von Jagow, *Anal. Biochem.* **1987**, *166*, 368.
- [14] P. A. King, E. Jamison, D. Strahs, V. E. Anderson, M. Brenowitz, *Biophys. J.* **1993**, *64*, A179; *Nucleic Acids Res.* **1993**, *21*, 2473; P. A. King, V. E. Anderson, J. O. Edwards, G. Gustafson, R. C. Plumb, J. W. Suggs, *J. Am. Chem. Soc.* **1992**, *114*, 5430.