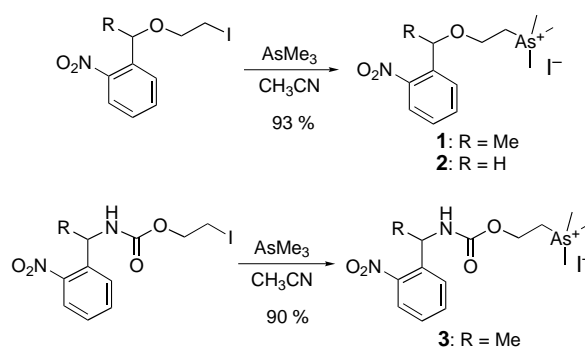


- [5] F. M. Menger, C. A. Littau, *J. Am. Chem. Soc.* **1993**, *115*, 10083–10090; R. Zana, M. Benrraou, R. Rueff, *Langmuir* **1991**, *7*, 1072–1075.
- [6] R. Oda, I. Huc, S. J. Candau, *Chem. Commun.* **1997**, 2105–2106, zit. Lit.
- [7] R. Zana, Y. Talmon, *Nature* **1993**, *362*, 228–230.
- [8] Die Zugabe von Wasser im Überschuß zum Organogel führt zur Entmischung und zur Bildung eines Niederschlags.
- [9] a) N. Yamada, E. Koyama, T. Imai, K. Matsubara, S. Ishida, *Chem. Commun.* **1996**, 2297–2298; b) M. Tata, V. T. John, Y. Y. Waguespack, G. L. McPherson, *J. Am. Chem. Soc.* **1994**, *116*, 9464–9470; c) K. Hanabusa, H. Kobayashi, M. Suzuki, M. Kimura, H. Shirai, *Colloid Polym. Sci.* **1998**, *276*, 252–259.
- [10] M. Sasaki, T. Imae, S. Ikeda, *Langmuir* **1989**, *5*, 211–215.
- [11] a) S. Gravsholt, *J. Colloid Interface Sci.* **1976**, *57*, 575–577; b) K. Bijma, J. B. F. N. Engberts, *Langmuir* **1997**, *13*, 4843–4849.
- [12] J.-M. Lehn, *Makromol. Chem. Macromol. Symp.* **1993**, *69*, 1–17.
- [13] M. Jokić, J. Makarević, Mladen Žinić, *J. Chem. Soc. Chem. Commun.* **1995**, 1723–1724.

2-Nitrobenzylarsoniumverbindungen, die photochemisch schweratomhaltige cholinerge Liganden freisetzen, für zeitaufgelöste kristallographische Untersuchungen an Cholinesterasen**

Ling Peng, Florian Nachon, Jakob Wirz und Maurice Goeldner*

In der makromolekularen Kristallographie werden häufig Schweratomderivate verwendet; sie sind wichtig, um korrekte Beugungsphasen zu erhalten, die für die Lösung der dreidimensionalen Struktur von Proteinen erforderlich sind.^[1] Bei photolabilen, „maskierten“ Vorstufen biologisch interessanter Verbindungen, die durch Lichteinwirkung schnell von einer inaktiven in eine aktive Form umgewandelt werden können („caged compounds“), ist die zeitlich und räumlich gesteuerte Freisetzung von Enzymsubstraten oder Rezeptorliganden durch Photolyse möglich.^[2] Daher sind sie wichtige Hilfsmittel bei zeitaufgelösten kristallographischen Untersuchungen^[3] struktureller Veränderungen auf atomarem Niveau während einer enzymatischen Reaktion. Wir stellen hier die 2-Nitrobenzylarsoniumverbindungen **1–3** (Schema 1) als photolabile Vorstufen cholinерger Liganden vor,



Schema 1. Synthese von **1–3**.

die Arsen als Schweratom enthalten. Sie wurden hergestellt, um die Untersuchung der katalytischen Prozesse von Cholinesterasen durch zeitaufgelöste Kristallographie zu erleichtern.

Sowohl Acetylcholinesterase (AChE) als auch Butyrylcholinesterase (BuChE) hydrolysieren den Neurotransmitter Acetylcholin sehr schnell zu Acetat und Cholin.^[4] Obwohl die dreidimensionalen Strukturen von AChE^[5] und von mehreren AChE-Inhibitor-Komplexen^[6] gelöst wurden, bleiben noch Fragen offen zur Bewegung des Substrats zum und des Produkts vom aktiven Zentrum, die im Hinblick auf die hohe Wechselzahl (20000 s⁻¹) gestellt wurden.^[7] Ein idealer Ansatz für die Untersuchung dieser Fragen ist die gerade aufkommende zeitaufgelöste Laue-Kristallographie^[3] unter Verwendung maskierter cholinерger Liganden.^[8–11] Diese Liganden sind in der Lage, photochemisch entweder Cholin (Enzymprodukt) oder Carbamoylcholin (Enzymsubstrat) freizusetzen, was die Einleitung und Steuerung der Katalyse durch AChE in verschiedenen Stadien ermöglicht.^[11] Die nach dem Laue-Verfahren mit einer Datensammelzeit von 1 ms bestimmte dreidimensionale Struktur des AChE-Komplexes^[12] ist der durch herkömmliche monochromatische Kristallographie ermittelten recht ähnlich. Bei zeitaufgelösten kristallographischen Untersuchungen kann es aber schwierig sein, Cholin in den Elektronendichtekarten zu lokalisieren, da das aktive Zentrum des Enzyms Wassermoleküle enthält,^[5, 6] deren Elektronendichte sich sehr wahrscheinlich mit der des Cholins überlagern würde. Die Verwendung von Schwermetallderivaten des Cholins, z.B. Arsenocholin, sollte zur Überwindung dieses Problems beitragen, da dies zu stärkeren Maxima in den Elektronendichtekarten führen sollte. Daher wurde Arsen als Schweratomersatz für Stickstoff in den Cholinint in den photolabilen, inaktivierten cholinерgen Liganden **1–3** eingebaut. **1** und **2** sind potentielle photolabile Vorstufen von Arsenocholin für die zeitaufgelösten kristallographischen Untersuchungen an Cholinesterasen, und **3** ist eine für Arsenocarbamoylcholin, vorausgesetzt, sie behalten die erforderlichen biochemischen und photochemischen Eigenschaften bei. Wir beschreiben hier ihre Synthese, photochemische und biochemische Charakterisierungen sowie die Strukturen von **2** und seinem N-Homologen im Kristall.

Die Synthese von **1–3** (Schema 1) gelang fast quantitativ durch Substitution von Iod in den entsprechenden Vorstufen durch Trimethylarsan. Die Struktur von **2** im Kristall (Abb. 1a)

[*] Prof. Dr. M. Goeldner, Dr. L. Peng, F. Nachon
Laboratoire de Chimie Bio-organique
UMR 7514 CNRS – Faculté de Pharmacie
Université Louis Pasteur de Strasbourg
BP 24, F-67401 Illkirch cedex (Frankreich)
Fax: (+33) 3-88-67-88-91
E-mail: goeldner@bioorga.u-strasbg.fr
Prof. Dr. J. Wirz
Institut für Physikalische Chemie der Universität
Klingelbergstrasse 80, CH-4056 Basel (Schweiz)
E-mail: wirz2@ubaclu.unibas.ch

[**] Diese Arbeit wurde von der Europäischen Union (Biotechnologieprogramm Nr. 960081), der Association Française contre les Myopathies, dem Centre National de la Recherche Scientifique und dem Schweizerischen Nationalfonds zur Förderung der wissenschaftlichen Forschung unterstützt.

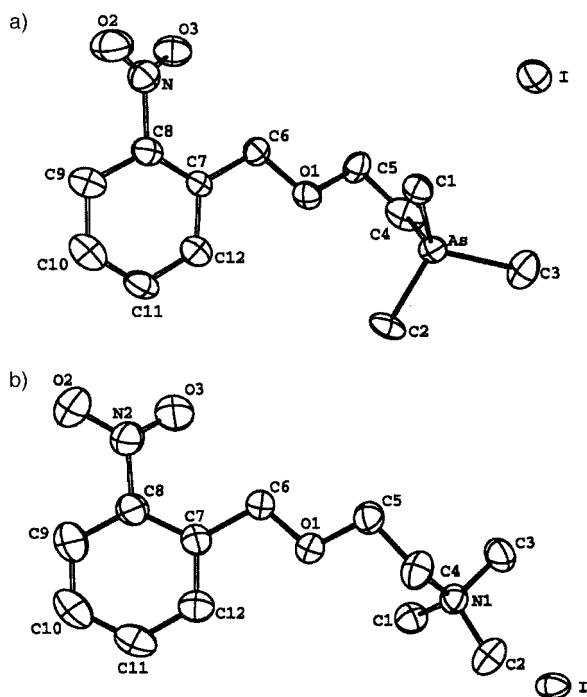


Abb. 1. Struktur von **2** (a) und seinem N-Homologen (b) im Kristall.

läßt erkennen, daß die Geometrie um das Arsenatom perfekt tetraedrisch ist, wie es auch bei Arsenobetain^[13] und Acetylarsenocholin^[14] der Fall ist. Weiterhin sind die 2-Nitrobenzyl- und die Cholin-Einheit von **2** isostrukturell zu denen des N-Homologen (Abb. 1b). Wie erwartet, lieferte das Arsenatom von **2** ein viel stärkeres Reflexbild als das entsprechende Stickstoffatom im Homologen (Abb. 2).

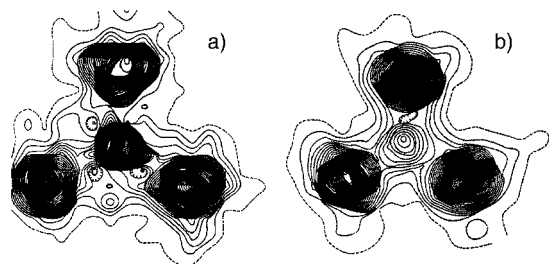


Abb. 2. Elektronendichtekarten für die Trimethylarsonium-Einheit (a) in **2** und die Trimethylammonium-Einheit (b) im N-Homologen. Für die Berechnung wurde die Ebene gewählt, die die drei Methylgruppen enthält. Das zentrale Sphäroid in (a) entspricht dem As-Atom von **2**, während das in (b) dem entsprechenden N-Atom des N-Homologen entspricht.

Die Arsoniumverbindungen **1–3** weisen sowohl gegenüber gereinigter *Torpedo*-AChE als auch gegenüber Humanserum-BuChE Inhibitoreigenschaften auf (Tabelle 1). Die Hemmung von BuChE ist rein kompetitiv, während die von AChE gemischt kompetitiv/nichtkompetitiv ist. Die ermittelten Werte sind den mit den N-Homologen erhaltenen^[8, 11] sehr ähnlich; quartäre Arsoniumsalze können bei diesen Enzymen also Ammoniumsalze ersetzen. Dies stützt frühere Ergebnisse,^[15] daß Acetylarsenocholin als cholinerges Agonist der nicotinischen und muscarinischen Rezeptoren sowie als Substrat für AChE fungiert.

Tabelle 1. Parameter der Photofragmentierung und Inhibierungskonstanten von **1–3**.

Verb.	k [s ⁻¹] ^[a]	Φ ^[b]	$K_{i(A)}$ [μM] ^[c]	$K_{i(B)}$ [μM] ^[d]
1	9.1×10^4	0.26	17	18
2	2.2×10^2	0.17	4	11
3	5.1×10^4	0.33	63	29

[a] Geschwindigkeitskonstante der Photofragmentierung in 0.1M Phosphat-Puffer, pH 6.45. [b] Quantenausbeute, bestimmt für Bestrahlung bei 365 nm. [c] Konstante für die Inhibierung von AChE. [d] Konstante für die Inhibierung von BuChE.

Die Verwendbarkeit von **1–3** für zeitaufgelöste kristallographische Studien hängt entscheidend von der Geschwindigkeit und der Quantenausbeute ihrer Photofragmentierung unter Bildung der gewünschten Produkte ab. Die Kinetik der photochemischen Fragmentierung wurde durch Laser-Blitzlichtphotolyse bei 308 nm untersucht (Abb. 3). Das bei etwa

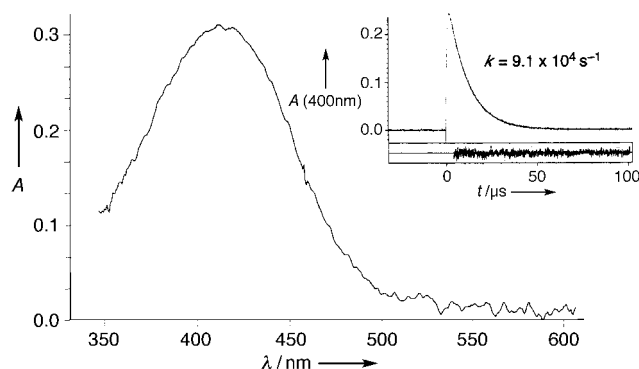


Abb. 3. Transientenabsorptionsspektrum der Zwischenstufe (1 μs Verzögerung) nach einer Laser-Blitzlichtphotolyse von **1** bei 308 nm (0.3 mM **1** in 0.1 mM Phosphat-Puffer, pH 6.45, 20 °C). Einschub: Zerfallsprofil für das Intermediat bei 400 nm.

400 nm nachgewiesene Zwischenprodukt ist charakteristisch für eine *aci*-Nitro-Zwischenstufe;^[16] ähnliches wurde auch beim N-Homologen beschrieben.^[8, 9] Die Kinetik der Photofragmentierung hängt von der Art des freigesetzten Moleküls, dem Substituenten in der α-Benzyl-Position (Tabelle 1) sowie dem pH-Wert ab (Daten nicht gezeigt); alle diese Parameter sind im Einklang mit dem zur Zeit bevorzugt angenommenen Fragmentierungsmechanismus.^[16] Am wichtigsten sind die Halbwertszeiten der *aci*-Nitro-Zwischenstufen von **1** und **3**, die etwa 10 μs betragen; dies ist mit der Wechselzahl des Enzyms vereinbar. Weiterhin sind die Quantenausbeuten (Tabelle 1) von **1–3**, die durch Vergleich der photochemischen Umwandlung bei 365 nm mit der von 1-(2-Nitrophenyl)-ethylcarbamoylcholin ($\Phi = 0.29$)^[9] bestimmt wurden, für die beabsichtigten Anwendungen ausreichend.

Die Arsoniumverbindungen **1–3** sind also Schweratom-analoga inaktiverter, maskierter cholinerges Liganden, und sie haben biochemische und photochemische Eigenschaften, die denen ihrer N-Homologen sehr ähnlich sind. Wegen der strukturellen Ähnlichkeiten zwischen **2** und seinem N-Homologen und des durch Arsen bedingten Schweratomeffekts bei der Röntgenbeugung haben diese As-Sonden die erforderlichen Eigenschaften für kristallographische Untersu-

chungen an Cholinesterasen. Am wichtigsten sind die ausgezeichneten kinetischen Eigenschaften von **1** und **3** sowie ihre Quantenausbeuten bei der photochemischen Freisetzung von Arsenocholin bzw. Arsenocarbamoylcholin. Daher kann man sich von ihnen einen entscheidenden Beitrag zu zukünftigen zeitaufgelösten kristallographischen Untersuchungen des Katalysemechanismus von Cholinesterasen versprechen, und sie könnten ebenso erfolgreich auf andere Systeme angewendet werden.

Experimentelles

Alle Einzelheiten der photochemischen Reaktionen und der Cholinesteraschemmung von **1–3** sind in Lit.[8,10] zu finden. Die kristallographischen Daten (ohne Strukturaktoren) der in dieser Veröffentlichung beschriebenen Strukturen (**2** und sein N-Homologes) wurden als „supplementary publication no. CCDC-102120 bzw. 102121“ beim Cambridge Crystallographic Data Centre hinterlegt. Kopien der Daten können kostenlos bei folgender Adresse in Großbritannien angefordert werden: CCDC, 12 Union Road, Cambridge CB21EZ (Fax: (+44)1223-336-033; E-mail: deposit@ccdc.cam.ac.uk).

1: Farbloses Pulver. $^1\text{H-NMR}$ (200 MHz, CDCl_3): $\delta = 1.56$ (d, 3H, $J = 6.2$ Hz), 2.26 (s, 9H), 3.09–3.17 (m, 2H), 3.70–3.86 (m, 2H), 5.06 (q, 1H, $J = 6.3$ Hz), 7.44–7.52 (m, 1H), 7.60–7.76 (m, 2H), 7.79 (dd, 1H, $J = 1.1$, 8.0 Hz); MS (Positivionen-FAB): m/z (%): 313.8 (100) [$\text{C}_{13}\text{H}_{21}\text{NO}_3\text{As}$]; Elementaranalyse: ber. für $\text{C}_{13}\text{H}_{21}\text{NO}_3\text{AsI}$: C 35.40, H 4.80, N 3.18, As 16.99; gef.: C 35.47, H 4.76, N 3.09, As 17.03.

2: Farblose Kristalle. $^1\text{H-NMR}$ (200 MHz, CDCl_3): $\delta = 2.19$ (s, 9H), 3.22 (t, 2H, $J = 5.8$ Hz), 4.05 (t, 2H, $J = 5.8$ Hz), 4.90 (s, 2H), 7.52–7.69 (m, 3H), 8.00 (dd, 1H, $J = 1.3$, 7.8 Hz); MS (Positivionen-FAB): m/z (%): 299.8 (100) [$\text{C}_{12}\text{H}_{19}\text{NO}_3\text{As}$].

3: Sehr hygroskopisches, farbloses Pulver. $^1\text{H-NMR}$ (200 MHz, CD_3CN): $\delta = 1.56$ (d, 3H, $J = 6.9$ Hz), 1.91 (s, 9H), 2.67 (t, 2H, $J = 5.8$ Hz), 4.33 (t, 2H, $J = 5.8$ Hz), 5.10–5.21 (m, 1H), 6.77 (br. s, 1H), 7.44–7.53 (m, 1H), 7.71–7.76 (m, 2H), 7.85 (d, 1H, $J = 8.8$ Hz); MS (Positivionen-FAB): m/z (%): 356.8 (100) [$\text{C}_{14}\text{H}_{22}\text{N}_2\text{O}_4\text{As}$]; Elementaranalyse: ber. für $\text{C}_{14}\text{H}_{22}\text{N}_2\text{O}_4\text{AsI}$: C 34.73, H 4.58, N 5.79, As 15.48; gef.: C 34.86, H 4.62, N 5.88, As 15.45.

Eingegangen am 27. April 1998 [Z11782]

Stichwörter: Arsen • Bioorganische Chemie • Enzyminhibitoren • Photochemie

- [1] T. L. Blundell, L. N. Johnson, *Protein Crystallography*, Academic Press, London, **1976**.
- [2] S. R. Adams, R. Y. Tsien, *Annu. Rev. Physiol.* **1993**, *55*, 755–784; G. P. Hess, *Biochemistry* **1993**, *32*, 989–1000.
- [3] D. W. J. Cruickshank, J. R. Helliwell, L. N. Johnson, *Time-Resolved Macromolecular Crystallography*, Oxford University Press, Oxford, **1992**, zit. Lit.
- [4] A. Chatonnet, O. Lockridge, *Biochem. J.* **1989**, *260*, 625–634.
- [5] J. L. Sussman, M. Harel, F. Frolow, C. Oefner, A. Goldman, L. Toker, I. Silman, *Science* **1991**, *253*, 872–879.
- [6] M. Harel, I. Schalk, L. Ehret-Sabatier, F. Bouet, M. Goeldner, C. Hirth, P. H. Axelsen, I. Silman, J. L. Sussman, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1993**, *90*, 9031–9035; M. Harel, G. J. Kleywegt, R. B. G. Ravelli, I. Silman, J. L. Sussmann, *Structure* **1995**, *3*, 1355–1366; Y. Bourne, P. Taylor, P. Marchot, *Cell* **1995**, *83*, 503–512; M. Harel, D. M. Quinn, H. K. Nair, I. Silman, J. L. Sussmann, *J. Am. Chem. Soc.* **1996**, *118*, 2340–2346; M. L. Raves, M. Harel, Y.-P. Pang, I. Silman, A. P. Kozikowski, J. L. Sussmann, *Nature Struct. Biol.* **1997**, *4*, 57–63.
- [7] D. R. Ripoll, C. H. Faerman, P. H. Axelsen, I. Silman, J. L. Sussman, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1993**, *90*, 5128–5132; M. K. Gilson, T. P. Straatsma, J. A. McCammon, D. R. Ripoll, C. H. Faerman, P. H. Axelsen, I. Silman, J. L. Sussman, *Science* **1994**, *263*, 1276–1278; A.

- Shafferman, A. Ordentlich, D. Barak, C. Kronman, R. Ber, T. Bino, N. Ariel, R. Osman, B. Velan, *EMBO J.* **1994**, *13*, 3448–3455.
- [8] L. Peng, M. Goeldner, *J. Org. Chem.* **1996**, *61*, 185–191.
- [9] a) T. Milburn, N. Matsubara, A. P. Billington, J. B. Udgaonkar, J. W. Walker, B. K. Carpenter, W. W. Webb, J. Marque, W. Denk, J. A. McCray, G. P. Hess, *Biochemistry* **1989**, *28*, 49–55; b) J. W. Walker, J. A. McCray, G. P. Hess, *Biochemistry* **1986**, *25*, 1799–1805.
- [10] L. Peng, J. Wirz, M. Goeldner, *Angew. Chem.* **1997**, *109*, 420–422; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1997**, *36*, 398–400; L. Peng, J. Wirz, M. Goeldner, *Tetrahedron Lett.* **1997**, *38*, 2961–2964.
- [11] L. Peng, M. Goeldner, *Methods Enzymol.* **1998**, *291*, 265–278; L. Peng, I. Silman, J. L. Sussman, M. Goeldner, *Biochemistry* **1996**, *35*, 10854–10861.
- [12] R. B. G. Ravelli, M. L. Raves, Z. Ren, D. Bourgeois, M. Roth, J. Kroon, I. Silman, J. L. Sussman, *Acta Crystallogr. Sect. D* **1998**, im Druck.
- [13] J. R. Cannon, J. S. Edmonds, K. A. Francesconi, C. L. Raston, J. B. Saunders, B. W. Skelton, A. H. White, *Aust. J. Chem.* **1981**, *34*, 787–798, zit. Lit.
- [14] A. Kostick, A. S. Secco, M. Billingham, D. Abrams, S. Cantor, *Acta Crystallogr. Sect. C* **1989**, *45*, 1306–1309.
- [15] B. Hedlund, H. Norin, A. Christakopoulos, P. Alberts, T. Bartfai, *J. Neurochem.* **1982**, *39*, 871–873.
- [16] J. W. Walker, G. P. Reid, J. A. McCray, D. R. Trentham, *J. Am. Chem. Soc.* **1988**, *110*, 7170–7177; A. Barth, K. Hauser, W. Mantele, J. E. T. Corrie, D. R. Trentham, *J. Am. Chem. Soc.* **1995**, *117*, 10311–10316.

Die Erkennung von Sulfationen durch Guanidinium-Rezeptoren ist entropiebestimmt**

Michael Berger und Franz P. Schmidtchen*

Es gibt viele Gründe, die Bindung von Gastmolekülen durch Wirtmoleküle auf die funktionelle und geometrische Komplementarität und auf die Präorganisation von Bindungsstellen im künstlichen Rezeptor zurückzuführen.^[1] Dieser Ansatz betont die Bedeutung der gegenseitigen enthalpischen Wechselwirkungen, läßt aber entropische Beiträge außer acht, die in vielen Fällen die Wirt-Gast-Bindung in Lösung bestimmen.^[2–4] Das rationale Design von abiotischen Wirtverbindungen muß daher die grundlegenden Beiträge zur Gibbs-Bindungsenthalpie getrennt ansprechen. Dies erfordert in erster Linie deren experimentelle Trennung in die zugrundeliegenden Beiträge von Enthalpie und Entropie, um die Möglichkeiten auszuloten, Enthalpie-Entropie-Kompensation zu vermeiden.^[5] Häufig wird durch dieses Phänomen ein spürbarer Fortschritt im Wirt-Design verschleiert oder letztlich gar verhindert.

Die Sulfatbindung an abiotische Guanidinium-Rezeptoren könnte ein guter Ausgangspunkt für Untersuchungen in dieser Richtung sein: Der ditope Wirt **1** bindet Sulfat auch in DMSO,^[6] und der verwandte Rezeptor **2** ist in der Lage, diesen Gast aus sehr verdünnter (10^{-4} M) wäßriger Lösung mit

[*] Prof. Dr. F. P. Schmidtchen, Dipl.-Chem. M. Berger
Institut für Organische Chemie und Biochemie der Technischen Universität München
Lichtenbergstraße 4, D-85747 Garching
Fax: (+49)89-289-13345
E-mail: FPSchmid@nucleus.org.chemie.tu-muenchen.de

[**] Diese Arbeit wurde von der Deutschen Forschungsgemeinschaft und vom Fonds der Chemischen Industrie unterstützt.