

- [5] a) C. A. Mirkin, R. L. Letsinger, R. C. Mucic, J. J. Storhoff, *Nature* **1996**, 382, 607; b) A. P. Alivisatos, K. P. Johnsson, X. Peng, T. E. Wilson, C. J. Loweth, M. P. Bruchez, Jr., P. G. Schultz, *Nature* **1996**, 382, 609; c) R. Elghanian, J. J. Storhoff, R. C. Mucic, R. L. Letsinger, C. A. Mirkin, *Science* **1997**, 277, 1078; d) R. C. Mucic, J. J. Storhoff, C. A. Mirkin, R. L. Letsinger, *J. Am. Chem. Soc.* **1998**, 120, 12674; e) J. J. Storhoff, R. Elghanian, R. C. Mucic, C. A. Mirkin, R. L. Letsinger, *J. Am. Chem. Soc.* **1998**, 120, 1959; f) C. J. Loweth, W. B. Caldwell, X. Peng, A. P. Alivisatos, P. G. Schultz, *Angew. Chem.* **1999**, 111, 1925; *Angew. Chem. Int. Ed.* **1999**, 38, 1808; g) G. P. Mitchell, C. A. Mirkin, R. L. Letsinger, *J. Am. Chem. Soc.* **1999**, 121, 8122; h) J. J. Storhoff, C. A. Mirkin, *Chem. Rev.* **1999**, 99, 1849.
- [6] C. M. Niemeyer, M. Adler, B. Pignataro, S. Lenhart, S. Gao, L. F. Chi, H. Fuchs, D. Blohm, *Nucleic Acids Res.* **1999**, 27, 4553.
- [7] T. Sano, C. L. Smith, C. R. Cantor, *Science* **1992**, 258, 120.
- [8] Die Zugabe von Einzelstrang-Bindungsprotein (Promega) zum Produktgemisch des Denaturierungsansatzes und die anschließende elektrophoretische Analyse erbrachten den Nachweis, dass freie Einzelstrang-DNA und Konjugate aus STV und einem oder mehreren nichtkomplementären Einzelsträngen als Bestandteile des diffusen Hintergrunds wandern. Die Bildung einzelsträngiger Spezies ist auf die rasche Abkühlgeschwindigkeit zurückzuführen, die eine quantitative intermolekulare Rehybridisierung verhindert.
- [9] N. Yamaguchi, H. W. Gibson, *Angew. Chem.* **1999**, 111, 195; *Angew. Chem. Int. Ed.* **1999**, 38, 143; N. Yamaguchi, D. S. Nagvekar, H. W. Gibson, *Angew. Chem.* **1998**, 110, 2518; *Angew. Chem. Int. Ed.* **1998**, 37, 2361.
- [10] M. Scheffler, A. Dorenbeck, S. Jordan, M. Wüstefeld, G. v. Kiedrowski, *Angew. Chem.* **1999**, 111, 3514; *Angew. Chem. Int. Ed.* **1999**, 38, 3312.
- [11] Circuläre dsDNA ist insbesondere bei Prokaryonten weit verbreitet (J. D. Watson, N. H. Hopkins, J. W. Roberts, J. A. Steitz, A. M. Weiner *Molecular Biology of the Gene*, 4. Aufl., Benjamin/Cummings, Menlo Park, CA, **1987**). Die Größe dieser Plasmide beträgt typischerweise mehr als 1000 bp. Kurze circuläre dsDNA kann durch Ligations-Ringschluss-Reaktion erhalten werden, wobei die untere Ringgröße etwa 100 bp beträgt (L. Ulanovsky, M. Bodner, E. N. Trifonov, M. Choder, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1986**, 83, 862). Über die Synthese eines sehr kleinen Ringes aus nur 42 bp wurde berichtet (M. Wolters, B. Wittig, *Nucleic Acids Res.* **1989**, 17, 5163). Aus Einzelstrang-DNA lassen sich hingegen beliebig kleine Ringe herstellen (Übersicht: E. T. Kool, *Acc. Chem. Res.* **1998**, 31, 502).
- [12] D. Rodbard, A. Chrambach, *Anal. Biochem.* **1971**, 40, 95.
- [13] Kleine, kovalent geschlossene DNA-Ringe weisen eine größere elektrophoretische Mobilität auf als lineare DNA-Fragmente gleichen Molekulargewichts, während die Mobilität großer DNA-Cyclen geringer ist als die der linearen Analoga (S. Mickel, V. Arena, W. Bauer, *Nucleic Acids Res.* **1977**, 4, 1465). Dieses Phänomen bildet die Grundlage dafür, dass beispielsweise durch Proteinbindung induzierte DNA-Ringe durch Gel-Shift-Analyse identifiziert werden können (J. R. Cann, *J. Mol. Biol.* **1990**, 216, 1067).
- [14] M. González, L. A. Bagatolli, I. Echabe, J. L. R. Arrondo, C. E. Argaraña, C. R. Cantor, G. D. Fidelio, *J. Biol. Chem.* **1997**, 272, 11288.
- [15] Temperaturabhängigen Untersuchungen zufolge beginnt die Verdrängung der biotinylierten DNA aus **3b** durch einen 800fachen Überschuss an D-Biotin beim 2 min Erhitzen ab ca. 70 °C und ist bei 80 °C zu etwa 50 % vorangeschritten. Die Denaturierungstemperatur der dsDNA **1b** liegt bei 71 ± 1 °C, und die Nanoringe **4b** werden ab 79 ± 2 °C bevorzugt gebildet.
- [16] J. Shi, D. E. Bergstrom, *Angew. Chem.* **1997**, 109, 111; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1997**, 36, 70.
- [17] H. Kuhn, V. V. Demidov, M. D. Frank-Kamenetskii, *Angew. Chem.* **1999**, 111, 1544; *Angew. Chem. Int. Ed.* **1999**, 38, 1446.
- [18] Elektrophoretische Gel-Shift-Untersuchungen ergaben, dass sowohl niedermolekulare Biotin-Derivate, z. B. ein Biotin-Fluorescein-Konjugat, als auch Biotinyl-derivatisierte Proteine, beispielsweise Antikörper, an **4** binden.
- [19] B. K. Sinha, C. F. Chignell, *Methods Enzymol.* **1979**, 62, 295.
- [20] P. C. Weber, D. H. Ohlendorf, J. J. Wendoloski, F. R. Salemme, *Science* **1989**, 243, 85.

Dynamische Untersuchungen der durch Phospholipase A₂ katalysierten Hydrolyse einer DPPC-Monoschicht an der Wasser-Luft-Grenzfläche**

Junbai Li,* Zhijian Chen, Xiaoli Wang,
Gerald Brezesinski und Helmuth Möhwald*

Viele chemische Reaktionen, besonders solche im kristallinen Zustand, hängen von der lokalen Umgebung der Reaktanten ab. Um ihre Mechanismen zu verstehen, müssen diese Reaktionen in Abhängigkeit von der lokalen Ordnung untersucht werden; dabei sollten auch Ordnungsänderungen im Verlauf der Reaktion verfolgt werden. Amphiphile Monoschichten sind für diese Zwecke bestens geeignet, da ihre Ordnung gezielt verändert und bestimmt werden kann. Die chemische Reaktion kann dabei mit neuen spektroskopischen und mikroskopischen Techniken verfolgt werden. Darüber hinaus können die Reaktanten mit der jeweils benachbarten Phase auf kontrolliertem Wege ausgetauscht werden.

Ein für die Biologie und technische Bereiche wichtiges System ist die Phospholipase A₂ (PLA₂), die die Hydrolyse einer Phospholipid-Monoschicht an einer Grenzfläche katalysiert. Es ist bekannt, dass diese Reaktion vom Zustand der Monoschicht abhängt. Inzwischen kann die molekulare Ordnung von Monoschichten bereits in einzelnen Domänen mit mikroskopischer Auflösung untersucht werden, wobei hauptsächlich Methoden der Röntgenbeugung an Oberflächen, FT-IR-Spektroskopie und Brewster-Winkel-Mikroskopie (BAM) angewandt werden. Dieses Verfahren wird hier zur detaillierten Beschreibung der Enzymreaktion genutzt. Die Korrelation von Veränderungen der molekularen Ordnung mit der katalytischen Aktivität sollte das Verständnis dieser Reaktionsmechanismen fördern.

PLA₂ ist ein Calcium-abhängiges Enzym, das reichlich in lebenden Organismen vorhanden ist. Die enzymatische Reaktion mit der Membranoberfläche besteht aus einem molekularen Erkennungsprozess und einer Spaltungsreaktion.^[1] PLA₂ hydrolysiert stereoselektiv die *sn*-2-Esterbindung von L-Phospholipiden, wodurch Fettsäuren und Lysophospholipide freigesetzt werden (Abbildung 1a). Die Aktivität von

[*] Prof. Dr. J. Li, Z. Chen, X. Wang
International Joint Lab, Center for Molecular Science
Institute of Chemistry
Chinese Academy of Science
De Wai, Bei Sha Tan, Beijing 100101 (China)
Fax: (+86) 10-6487-9375
E-mail: jbli@ipc.ac.cn

Prof. Dr. H. Möhwald, Dr. G. Brezesinski
Max-Planck-Institut für Kolloid- und Grenzflächenforschung
14476 Golm/Potsdam (Deutschland)
Fax: (+49) 331-567-9202
E-mail: moehwald@mpikg-golm.mpg.de

[**] Diese Arbeit wurde unterstützt durch einen Forschungsvertrag zwischen der Max-Planck-Gesellschaft und der Chinesischen Akademie der Wissenschaften sowie durch die Chinesische Staatstiftung für Naturwissenschaften. J.L. dankt dem Präsidentenfonds der Chinesischen Akademie der Wissenschaften und der Chinesischen Nationalen Abteilung für Personalwesen. DPPC = Dipalmitoylphosphatidylcholin.

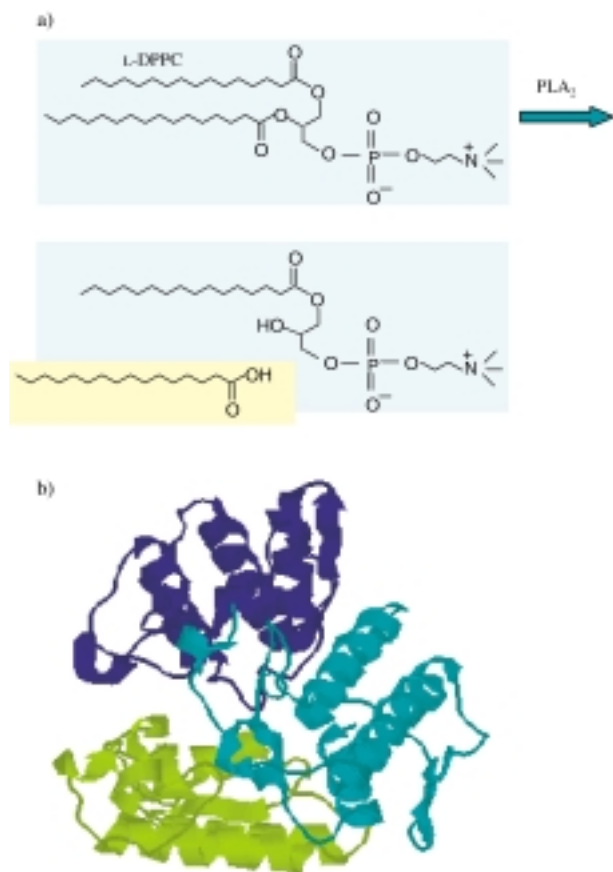


Abbildung 1. a) Schematische Darstellung der Hydrolyse einer L-DPPC-Monoschicht durch Phospholipase A₂ (PLA₂). b) Räumliche Darstellung der Struktur von PLA₂.

PLA₂ ist an Grenzflächen aggregierter Substrate, z.B. Phospholipid-Monoschichten, 10000-mal höher als am entsprechenden monomeren Substrat.^[2] PLA₂ enthält in wässriger Lösung einen hohen Anteil an α-Helix-Struktur (Abbildung 1b). Bei einer enzymatischen Reaktion ist eine Veränderung dieser Konformation möglich, sobald das Molekül die Grenzfläche erreicht.

Die BAM-Methode eröffnet neue Möglichkeiten bei der direkten Visualisierung der Texturen von Langmuir-Monoschichten.^[3] Sie gestattet die Charakterisierung der Fernordnung von Phospholipiden in Monoschichten dank der optischen Anisotropie, die von geeigneten aliphatischen Ketten herrührt.^[4]

Die Resultate der zeitabhängigen Messungen der Oberflächenspannung zeigen, dass PLA₂ zu Beginn einen Anstieg der Oberflächenspannung bewirkt (Abbildung 2a). Dieser Druckanstieg direkt nach der Enzyminjektion korreliert mit der Adsorption von PLA₂ an die L-Dipalmitoylphosphatidylcholin(DPPC)-Monoschicht. Der Zusammenhang zwischen der Geschwindigkeit des Druckanstiegs ($d\pi/dt$) und der Adsorptiongeschwindigkeit, die proportional zur Flächenänderung (dA/dt) ist, wird durch Gleichung (1) beschrieben:

$$\frac{d\pi}{dt} = \frac{d\pi}{dA} \times \frac{dA}{dt} \quad (1)$$

Es wird eine Zunahme der Anfangssteigung ($d\pi/dt$)₀ mit zunehmendem Druck im Verhältnis 1.7:3.4:6.0 beobachtet,

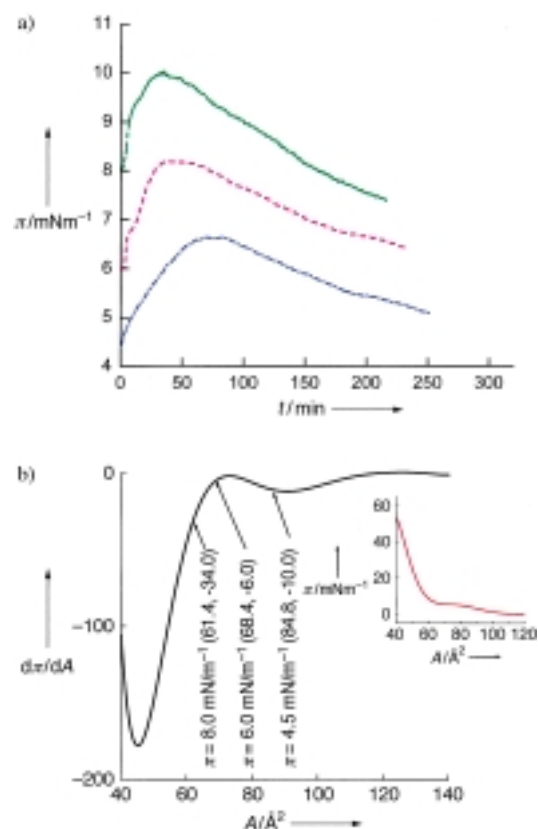


Abbildung 2. a) Änderung des Filmdrucks π mit der Zeit t . PLA₂ wurde bei unterschiedlichen Anfangsdrücken der Monoschicht (4.5 (blau), 6.0 (rot) und 8.0 mN m⁻¹ (grün)) in die Subphase injiziert. b) Der Anstieg $d\pi/dA$ der DPPC-Isotherme (gezeigt als Bildeinset) in Abhängigkeit von der Molekülfläche A .

bei $d\pi/dA$ (Abbildung 2b) wurde dagegen das Verhältnis 10:6:34 ermittelt. Beim Vergleich des höchsten und niedrigsten Drucks, bei dem der Film homogen erscheint, bemerkt man, dass der Druckanstieg proportional zur Änderung von $d\pi/dA$ ist, was eine konstante Adsorptiongeschwindigkeit anzeigt. Bei mittleren Drücken, bei denen der Film Inhomogenitäten aufweist, besteht diese Proportionalität nicht, denn die makroskopische und die lokale Kompressibilität weichen voneinander ab. Daraus ist zu schließen, dass die Adsorptiongeschwindigkeit nicht von der Größe der freien Filmoberfläche, sondern vom Transport innerhalb der Volumenphase zur Grenzfläche abhängt. Die der Adsorption folgende Spaltungsreaktion erklärt den beschränkten Druckanstieg und den niedrigeren Maximalwert bei einem geringeren Anfangsdruck. Andererseits konnte gezeigt werden, dass der Oberflächendruck einer D-DPPC-Monoschicht nach der PLA₂-Adsorption, aber ohne enzymatische Spaltung, den gleichen Maximalwert von ca. 10 mN m⁻¹ erreicht.^[5] FT-IR-spektroskopische Untersuchungen ergaben, dass von den Reaktionsprodukten die Fettsäure in der Grenzfläche verbleibt, während das Lysophospholipid teilweise in Lösung geht.^[6] Somit reduziert sich der Flächenbedarf des Lipids von 50 Å² pro Molekül auf die 20 Å² der Fettsäure, was mit einem Druckabfall einhergehen sollte.

Durch polarisationsmodulierte Infrarot-Reflexions-Absorptions-Spektroskopie(PM-IRRAS)-Messungen^[7] an einer

L-DPPC Monoschicht wurde gefunden, dass PLA₂ im Koexistenzbereich von flüssig-expandierter (LE) und kondensierter Phase maximale Aktivität aufweist.^[6] Abbildungen der Morphologie von L-DPPC-Monoschichten, die in diesem Übergangsbereich von PLA₂ angegriffen werden, zeigen, dass die Hydrolysereaktion an der Grenzfläche zwischen der flüssig-expandierten und der kondensierten Phase beginnt und dann in den kondensierten Bereich hinein fortschreitet.^[8] Defekte in der Packung sind bevorzugte Reaktionsstellen. Je nach „Vorgeschichte“ der Probe^[9] beginnt die Reaktion entweder innerhalb der Domäne oder an deren Rand. In ihrem Inneren betroffene Domänen, z. B. der so genannte Pizza-Typ, wurden bereits 2 min nach der Injektion von PLA₂ beobachtet ($c_{\text{PLA}_2} = 0.975 \mu\text{g mL}^{-1}$, $\pi_0 = 8.0 \text{ mN m}^{-1}$; Abbildung 3). Lyso-lipid als eines der Reaktionsprodukte entfernt sich von der Grenzfläche und erweitert dadurch den freien Raum. Als Folge davon verkleinert sich der Anteil der geordneten Bereiche, was sich in der Veränderung der Domänen widerspiegelt (Abbildung 3).

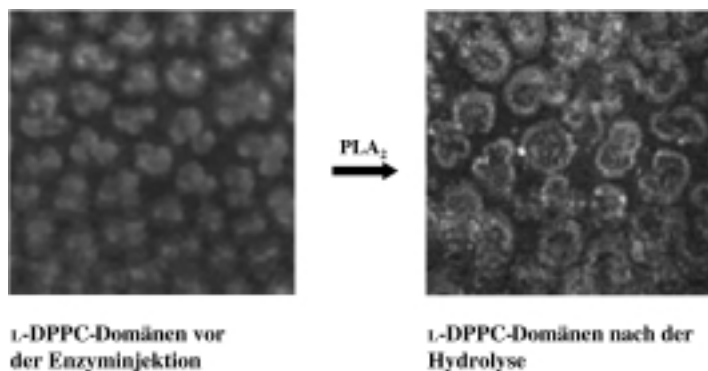


Abbildung 3. BAM-Aufnahmen einer L-DPPC-Monoschicht an der Wasser-Luft-Grenzfläche vor der Injektion von PLA₂ in die Subphase und nach der Hydrolysereaktion.

Durch den Materialschwund in der Monoschicht sinkt der Oberflächendruck, was wiederum das Eindringen des Enzyms erleichtert und eine damit einhergehende Druckerhöhung bewirkt. Das Zusammenwirken dieser Faktoren resultiert in den beobachteten Schwankungen des Oberflächendrucks. Bezüglich der Domänenform bei Abwesenheit von PLA₂ sei angemerkt, dass lediglich die Größe, doch nicht ihre Zahl, druckabhängig ist. Außerdem ändert Enzymzugabe ohne Hydrolysereaktion (D-Enantiomer) die Domänenform nicht, obwohl sich das Enzym bevorzugt an den Domänengrenzen anlagert.^[5]

Die Abbildungen 4a–d zeigen die Veränderung der Domänenform von L-DPPC nach der Injektion des Enzyms bei einem Anfangsdruck von 7.5 mN m^{-1} . 300 Sekunden nach der Injektion von PLA₂ beginnt die Veränderung der Domänenform (dunkle Bereiche entsprechen der kondensierten Phase). Die Flächenverkleinerung der kondensierten Domänen wird der Spaltungsreaktion zugeschrieben. Wie in Abbildung 4b zu sehen, gibt es zwei typische Domänenformen: die C- und O-Form. Die Dichte der C-förmigen Domänen nimmt während der Reaktion drastisch ab, während sich ihre Form kaum verändert. Somit nehmen wir an, dass die Hydrolyse an

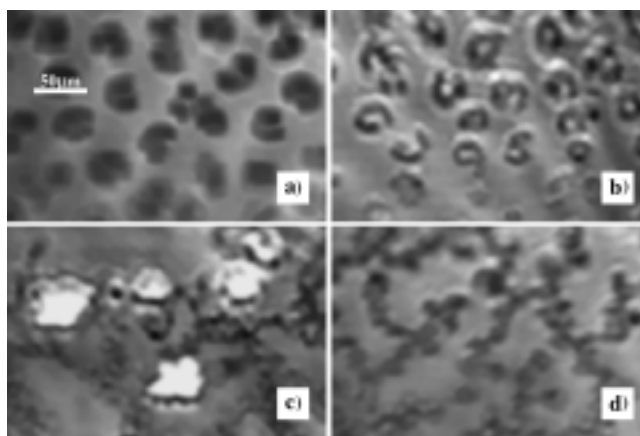


Abbildung 4. BAM-Aufnahmen einer L-DPPC-Monoschicht an der Wasser-Luft-Grenzfläche während der Spaltungsreaktion durch PLA₂ bei einem Anfangsdruck von $\pi_0 = 7.5 \text{ mN m}^{-1}$. Näheres siehe Text.

den C-förmigen Domänen entlang der gekrümmten Domänengrenzlinien verläuft. Die weit reichende Neigungsorientierung in der Phospholipid-Monoschicht wurde bereits früher mit BAM untersucht.^[4] Aus der Morphologie der reinen L-DPPC-Monoschicht kann man entnehmen, dass sich die Orientierung der Moleküle in den lang gestreckten Domänen kontinuierlich entlang der Randlinie ändert und somit der Krümmung jedes Segments folgt.^[10]

Unter Berücksichtigung der Molekülorientierung lässt sich aus dem Experiment schließen, dass das Enzym bevorzugt diejenigen Teile der kondensierten Domänen hydrolysiert, deren Kettenorientierung einheitlich ist. Wenn Moleküle mit gleicher Orientierung (oder Reflektivität) vorzugsweise gespalten werden, so bilden sich Domänen in C- oder S-Form. Die Erklärung dafür ist, dass die Hydrolyse von Molekülen gleicher Orientierung nur eine minimale Konformationsänderung des Enzyms während der Spaltung erfordert. Abbildung 4b zeigt auch O-förmige Domänen. Dies beweist, dass das Enzym den mittleren Teil der Domäne hydrolysiert, in dem die Lipidmoleküle infolge von Defekten weniger geordnet sind. Dadurch werden hohle, O-förmige Domänen gebildet. Die Domänen können sich letztlich zu einer Netzwerkstruktur verknüpfen.

Ein neuer Domärentyp wird etwa 80 min nach der Enzyminjektion (Abbildung 4c) beobachtet. Die Domänenformen unterscheiden sich deutlich von denen der DPPC-Monoschicht. Sie zeigen eine relativ hohe Reflektivität und sind viel heller. Ihre Zahl erhöht sich mit der Zeit. Dies kann durch die Bildung von Enzymdomänen erklärt werden. Solch ein Ergebnis ist in guter Übereinstimmung mit fluoreszenzmikroskopischen Beobachtungen an anderen Proteinen.^[11] Nach 120 min wurde der Mischfilm expandiert und dann erneut komprimiert. Die Domänen sind nun sternförmig (Abbildung 4d). Um die Formumwandlung der Domänen zu verstehen, müssen wir berücksichtigen, dass die Anwesenheit des Enzyms die Linienspannung an der Domänengrenze ändert^[12] und die Monoschicht nun eine Mischung aus Substraten und Reaktionsprodukten ist. Da eines der Produkte als Fettsäuresalz in der Grenzfläche verbleibt, wird es wahrscheinlich phasenseparierte Kristallite bilden.

Um zu zeigen, dass die Hydrolysereaktion zuerst in der kondensierten Phase (LC-Phase) stattfindet, wurde die Monoschicht bei höheren Drücken komprimiert. Abbildung 5 zeigt BAM-Aufnahmen während der Reaktion mit einem Anfangsdruck von 15.0 mNm^{-1} , bei dem die Monoschicht

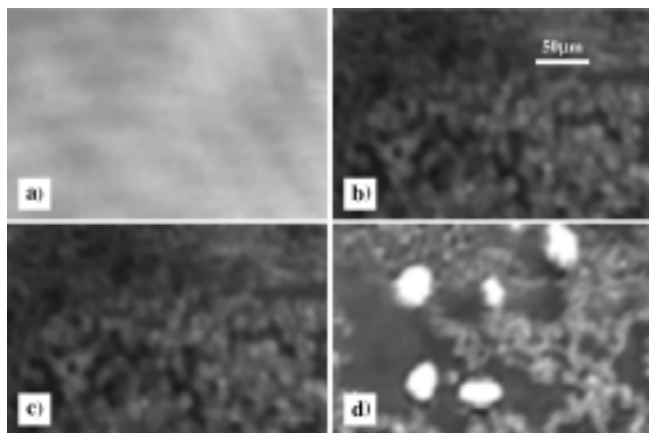


Abbildung 5. BAM-Aufnahmen während der enzymatischen Reaktion bei einem Anfangsdruck von 15 mNm^{-1} . Näheres siehe Text.

eine homogene LC-Phase bildet (Abbildung 5a). Nach der Enzyminjektion werden Morphologieänderungen infolge der Hydrolysereaktion beobachtet (Abbildung 5b). Im Unterschied zur Reaktion im Zweiphasengebiet fand die Reaktion nun willkürlich in der Monoschicht statt. Ein homogener Film wurde in ein Netzwerk umgewandelt. Die Löcher in der Monoschicht wurden allmählich größer und die Form der Kanten irregulär (Abbildung 5c). Bei diesem höheren Druck begann das Enzym bereits eine Stunde nach der Injektion seine eigenen Domänen zu bilden (Abbildung 5d).

Der erste Schritt der Hydrolysereaktion ist der Oberflächenerkennungsprozess, der die Enzymadsorption an die Lipidoberfläche einschließt. Röntgenographische Untersuchungen ergaben, dass sich der Neigungswinkel der Phospholipidmoleküle durch die spezifische Enzymadsorption ändert.^[5] Das bedeutet, dass eine Orientierungsänderung der Lipidmoleküle durch die spezifische Wechselwirkung zwischen Lipiden und Enzym induziert wird. Dadurch ist die innere Struktur der Domänen gegenüber der von reinen Lipiden verändert. Zusätzlich zu den spezifischen Kräften können weit reichende elektrostatische Kräfte die Proteinmoleküle an die Domänengrenze ziehen, da die Normalkomponenten der Dipolmomente der Lipide und Proteine unterschiedlich sind.^[11] Diese elektrostatische Kraft kann auch die Orientierung der Lipidmoleküle beeinflussen. Während der Grenzflächenerkennung zu Beginn der Hydrolysereaktion können sowohl das Enzym als auch die Phospholipidmoleküle ihre Konformation ändern.

Die Enzympenetration, die Hydrolysereaktion und das Lösen der Reaktionsprodukte in die Volumenphase hinein bestimmen also alle die enzymatisch katalysierte Hydrolyse der Phospholipide. Diese drei Prozesse können getrennt werden, indem man gut definierte Monoschichten mittels BAM und Filmwaagentechniken untersucht. Obwohl die Ergebnisse für die PLA_2 , die mit L-DPPC reagiert, erhalten

wurden, erwarten wir, dass sie für eine ganze Klasse von biologischen Grenzflächenreaktionen verallgemeinert werden können. Dies ist auch dann möglich, wenn man bedenkt, dass die Doppelschichtmembran im Allgemeinen als fluide Phase betrachtet wird. Aber starke Änderungen in der Dichte und Ordnung der Membran können zu lokalen Domänengrenzen führen, wie sie hier diskutiert wurden. Monoschichten von Amphiphilen wurden hier als Modelle zum allgemeinen Studium von stereospezifischen Reaktionen eingesetzt, da sie sowohl strukturelle Kontrolle als auch eine mikroskopische Verfolgung von Reaktionen an Grenzflächen zulassen. Obwohl sie in einem geordneten Zustand vorliegen, erlauben sie den Zugang von Reaktanten über den Austausch mit der angrenzenden Volumenphase.

Experimentelles

Ein hochauflösendes Brewster-Winkel-Mikroskop (Optrel, Deutschland) wurde mit einem an einen Computer angeschlossenen Langmuir-Trog (R&K, Deutschland) verbunden. Das reflektierte Licht wurde durch einen Analysator und eine CCD-Kamera detektiert. Das Ausgangssignal wurde mit einem Videorecorder aufgenommen. Zur weiteren Aufarbeitung der Aufnahmen wurde ein Framegrabber verwendet. Eine spezielle Software erlaubte die Kontrasteinstellung und Korrektur der durch die Beobachtung am Brewster-Winkel auftretenden Verzerrung der Bilder. Die Oberflächenspannung wurde mit der Wilhelmy-Methode zu 0.1 mNm^{-1} bestimmt. Die Enzymlösung wurde mit einer feinen Spritze in die Subphase injiziert.

L-DPPC , D-DPPC und PLA_2 aus *Crotalus atrox* Venom wurden von Sigma bezogen und ohne weitere Reinigung eingesetzt. Chloroform (99%) wurde von ACROS bezogen. Die Subphase war in allen Experimenten ein wässriger Puffer (pH 8.9), der 15 mM NaCl , 5 mM CaCl_2 und 10 mM Tris enthielt. Alle Experimente wurden bei $(20.0 \pm 0.1)^\circ\text{C}$ durchgeführt. Die PLA_2 -Konzentration in der Subphase betrug 0.714 mgmL^{-1} . Das in den Experimenten eingesetzte Wasser wurde mit einer Milli-Q-Anlage gereinigt.

Für die Hydrolyseexperimente wurde eine 1 mM Chloroformlösung von L-DPPC auf die Puffer-Oberfläche gespreitet. Die Monoschicht wurde auf den gewählten Anfangsdruck komprimiert und die Enzymlösung in die Subphase injiziert. Filmdruck und Domänenmorphologie wurden simultan aufgenommen. Nach 120 min wurde die Isotherme aufgezeichnet.

In den Experimenten mit D-DPPC wurde die Monoschicht nach der gleichen Methode gespreitet und langsam in das Koexistenzgebiet komprimiert. Dann wurde das Enzym in die Subphase injiziert. Nach 60 min wurde die Monoschicht bis zum Verschwinden der LC-Phase expandiert. Die BAM-Bilder wurden bei der anschließenden Rekompensation aufgenommen. Die Kompressionsgeschwindigkeit betrug bei allen Experimenten $2.5 \times 10^{-2} \text{ nm}^2$ pro Molekül und pro Minute.

Eingegangen am 20. Januar 2000,
veränderte Fassung am 19. Juni 2000 [Z14567]

- [1] a) R. D. Schmid, R. Verger, *Angew. Chem.* **1998**, *110*, 1694; *Angew. Chem. Int. Ed.* **1998**, *37*, 1608; b) J. J. Janda, E. J. Bottone, *J. Clin. Microbiol.* **1981**, *14*, 55; c) M. H. Gelb, M. K. Jain, O. Berg, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **1992**, *2*, 1335; d) R. Verger, G. H. de Haas, *Chem. Phys. Lipids* **1973**, *10*, 127.
- [2] a) R. Verger, M. C. E. Mieras, G. H. de Haas, *J. Biol. Chem.* **1973**, *248*, 4023; b) M. Menashe, D. Lichtenberg, C. Gutierrez-Merino, R. L. Biltonen, *J. Biol. Chem.* **1981**, *256*, 4541; c) T. L. Hazlett, E. A. Dennis, *Biochemistry* **1985**, *24*, 6152.
- [3] a) S. Hénion, J. Meunier, *Rev. Sci. Instrum.* **1991**, *62*, 936; b) D. Hönig, D. Möbius, *J. Phys. Chem.* **1991**, *95*, 4590; c) V. Melzer, D. Vollhardt, *Phys. Rev. Lett.* **1996**, *76*, 3770.
- [4] a) T. M. Fischer, R. F. Bruinsma, C. M. Knobler, *Phys. Rev. E* **1994**, *50*, 413; b) G. A. Overbeck, D. Hönig, D. Möbius, *Thin Solid Films* **1994**,

- 224, 213; c) G. Weidemann, G. Brezesinski, D. Vollhardt, D. DeWolf, H. Möhwald, *Langmuir* **1999**, *15*, 2901; d) C. M. Knobler, D. K. Schwartz, *Curr. Opin. Coll. Interf. Sci.* **1999**, *4*, 46.
- [5] U. Dahmen-Levison, G. Brezesinski, H. Möhwald, *Thin Solid Films* **1998**, 327–329, 616.
- [6] U. Dahmen-Levison, G. Brezesinski, H. Möhwald, *Progr. Colloid Polym. Sci.* **1998**, *10*, 269.
- [7] D. Blaudez, T. Buffeteau, J. C. Cornut, B. Desbat, N. Escafre, M. Pezolet, J. M. Turel, *Appl. Spectrosc.* **1993**, *47*, 869.
- [8] a) D. W. Grainger, A. Reichert, H. Ringsdorf, C. Salesse, *FEBS Lett.* **1989**, *73*; b) D. W. Grainger, A. Reichert, H. Ringsdorf, C. Salesse, *Biochim. Biophys. Acta* **1990**, 365.
- [9] Die Probenvorgeschichte bezieht sich auf die Monoschichtpräparation. Die Konzentration der Spreitlösung oder die Kompressionsgeschwindigkeit beeinflussen die Defektverteilung in den kondensierten Domänen.
- [10] a) R. M. Weis, H. M. McConnell, *Nature* **1984**, *310*, 47; b) G. Weidemann, D. Vollhardt, *Colloids Surf. A* **1995**, *100*, 187.
- [11] H. Haas, H. Möhwald, *Thin Solid Films* **1989**, *180*, 101.
- [12] a) M. Seul, D. Andelmann, *Science* **1995**, *267*, 467; b) H. M. McConnell, V. T. Moy, *J. Phys. Chem.* **1988**, *92*, 4520.

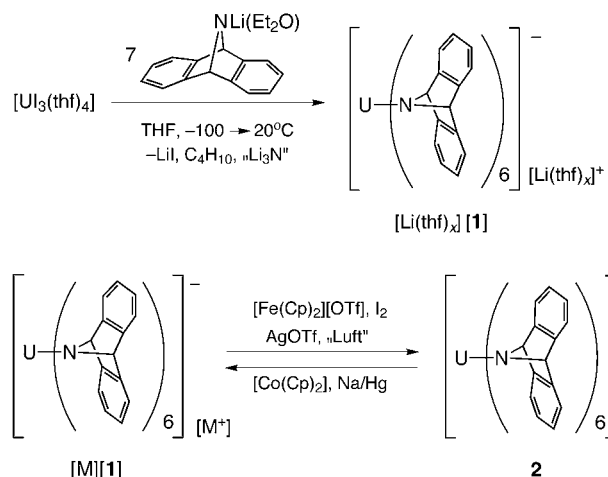
Hexakisamidokomplexe des Urans**

Karsten Meyer, Daniel J. Mindiola, Thomas A. Baker, William M. Davis und Christopher C. Cummins*

Wir berichten im Folgenden über die Synthese und die Charakterisierung des bislang unbekannten Hexakisamido-uran(v)-Anions $[U(dbabh)_6]^-$ **1** (Hdbabh = 2,3:5,6-Dibenzo-7-azabicyclo[2.2.1]hepta-2,5-dien^[1]) sowie seines Einelektronenoxidaionsproduktes, des neutralen, homoleptischen Uran(vi)-Komplexes $[U(dbabh)_6]$ **2**. Wir konnten zeigen, dass Chrom(vi)-Derivate mit einem terminalen Nitridoliganden ausgehend von dem redoxaktiven Azanorbornadienliganden dbabh synthetisiert werden können. Bei dieser Reaktion wird Anthracen eliminiert und das Metallzentrum gleichzeitig um zwei Einheiten oxidiert.^[2] Letzteres ist bei der hier vorgestellten Synthese von **1** von entscheidender Bedeutung, da hierbei die Anthraceneliminierung zur Oxidation des eingesetzten formal dreiwertigen Urans zu Uran(v) dient.

Setzt man eine tauende Lösung von $[UI_3(thf)_4]^{[3]}$ in THF mit einer kalten Suspension von $[Li(dbabh)(OEt_2)]$ (7 Äquiv.) in Diethylether um, so erhält man einen orangefarbenen kristallinen Niederschlag des Lithiumsalzes

$[Li(thf)_x][1]$ in 85 % Ausbeute. ¹H-NMR-Spektroskopisch konnte Anthracen (ca. 1 Äquivalent pro Mol Uran) als Nebenprodukt nachgewiesen werden. Die Ausbeute an **1** kann optimiert werden, wenn sieben Äquivalente $[Li(dbabh)(OEt_2)]$ eingesetzt werden. Dieser Befund stützt die in Schema 1 vorgeschlagene Stöchiometrie. Umkristallisation von $[Li(thf)_x][1]$ aus einer mit $[PPh_4][Br]$ gesättigten Lösung in Dichlormethan/Hexan bei –40 °C liefert extrem luftempfindliche, aber thermisch stabile, würfelförmige Kristalle des Salzes $[PPh_4][1]$.



Schema 1. Synthese der homoleptischen Hexakisamido-uran(v)- und -(vi)-Komplexe. Cp = C₅H₅, Tf = SO₂CF₃.

Der Hexakisamido-uran(v)-Komplex $[Li(thf)_x][1]$ ist in Lösung bei Raumtemperatur nicht EPR-aktiv. Das X-Band-EPR-Spektrum einer verdünnten, gefrorenen Lösung bei 100 oder 20 K in Acetonitril/Toluol zeigt jedoch ein breites, isotropes Signal bei $|g| = 1.12$ (Abbildung 1).^[4] Der für **1** beobachtete isotrope g -Wert ist nicht ungewöhnlich: Andere

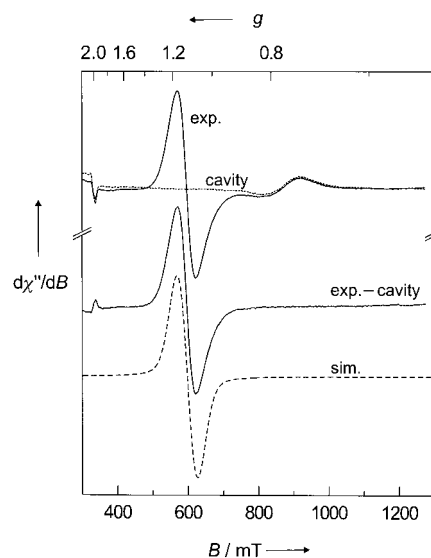


Abbildung 1. X-Band-EPR-Spektrum von $[Li(thf)_x][1]$ in CH₃CN/Toluol bei 20 K. Gezeigt sind das gemessene Spektrum (exp.), das der Probenkammer (cavity), die Differenz beider Spektren (exp. – cavity) und das simulierte Spektrum (sim.).

[*] Prof. Dr. C. C. Cummins, Dr. K. Meyer, D. J. Mindiola, T. A. Baker, Dr. W. M. Davis
Department of Chemistry, Room 2-227
Massachusetts Institute of Technology
77 Massachusetts Avenue, Cambridge, MA 02139-4307 (USA)
Fax: (+1) 617-258-6989
E-mail: ccummins@mit.edu

[**] Diese Arbeit wurde von der National Science Foundation (CAREER Award CHE-9501992), der Alfred P. Sloan Foundation, dem National Science Board (Alan T. Waterman Award (1998) an C.C.C.) und der Packard Foundation unterstützt. K.M. dankt der Deutschen Forschungsgemeinschaft für ein Postdoktorandenstipendium.

Hintergrundinformationen zu diesem Beitrag sind im WWW unter <http://www.wiley-vch.de/home/angewandte/> zu finden oder können beim Autor angefordert werden.