

# Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	1
1.1	Natürliche und künstliche Nucleasen	1
1.1.1	Aufbau der Nucleinsäuren DNA und RNA	1
1.1.2	Die Rolle von Metallionen in Enzymen	2
1.1.3	Allosterische Effekte	3
1.1.4	Beispiele für natürliche Nucleasen	4
1.2	Spaltung von DNA und DNA-Modellverbindungen durch Metallkomplexe	6
1.2.1	Spaltung von aktivierten Phosphodiestern durch Metallkomplexe	6
1.2.2	Hydrolyse von DNA-Dinucleotiden und von DNA	8
1.2.3	Spaltung von 2-Hydroxypropyl- <i>p</i> -nitrophenylphosphat (HPNP) und Diribonucleotiden durch Metallkomplexe	9
1.3	Anwendung künstlicher Nucleasen	11
1.4	Die wäßrige Chemie des Zr <sup>4+</sup> -Ions	13
2	Zielsetzung	14
3	Spaltung aktivierter Phosphodiester durch Zr(IV)	15
3.1	Verwendete Substrate	15
3.1.1	Hydrolyse von Bis( <i>p</i> -nitrophenyl)phosphat (BNPP)	15
3.1.2	Spaltung von 2-Hydroxypropyl- <i>p</i> -Nitrophenylphosphat (HPNP)	16
3.1.3	Kinetische Analyse der Zr(IV)-vermittelten Hydrolysereaktion	18
3.2	Verwendete Liganden	20
3.3	Ligandensynthese	21
3.3.1	Synthese von 1,3-Bis[tris(hydroxymethyl)-methylamino]-2-propanol (BTMP)	21
3.3.2	Darstellung von 4-Chlor-2,6-bis(hydroxymethyl)pyridin (Cl-BHP)	21
3.4	Komplexbildung	22
3.4.1	<sup>1</sup> H-NMR-Untersuchungen	22
3.5	Kinetische Untersuchungen zur Hydrolyse von BNPP	24
3.5.1	Einfluß von Liganden	24
3.5.2	pH-Abhängigkeit der BNPP-Hydrolyse durch Zr(IV)-Komplexe	26

---

3.6	Hydrolyse von BNPP durch Hafnium(IV)- und Titan(IV)-Komplexe	27
3.7	Spaltung von HPNP durch $ZrCl_4$	28
3.7.1	Abhängigkeit der Spaltungsgeschwindigkeit von der $ZrCl_4$ -Konzentration	28
3.7.2	Produktanalyse durch $^{31}P$ -NMR-Spektroskopie	33
4	Spaltung von DNA- und RNA-Dinucleotiden durch Zr(IV)	36
4.1	Allgemeine Vorgehensweise	36
4.2	Hydrolytische Spaltung von Thymidyl(3'-5')thymidin (TpT)	37
4.2.1	TpT als Substrat	37
4.2.2	Einfluß von Liganden und des pH-Wertes auf die Hydrolysegeschwindigkeit	38
4.2.3	Temperaturabhängigkeit der TpT-Hydrolyse	40
4.2.4	Hydrolyse von TpT durch Cer(IV)-Komplexe	41
4.3	Spaltung größerer DNA-Bruchstücke	42
4.4	Spaltung von RNA-Dinucleotiden	43
4.4.1	Uridinyl(3'-5')Uridin (UpU) als Substrat	43
4.4.2	Spaltung von UpU durch Zirconium(IV)	44
4.4.3	Hydrolyse von Adenosin-2',3'-cyclomonophosphat (2',3'-cAMP)	48
4.5	Vorarbeiten für die Synthese von Oligonucleotid-Konjugaten	50
4.5.1	Erste Vorversuche in Lösung	50
5	Allosterische Regulierung der Phosphodiester-spaltung durch Metallkomplexe	52
5.1	Verwendete Metallkomplexe	52
5.2	Komplexbildung	53
5.2.1	Bildung der einkernigen Komplexe $[(L-H)M_S]^+$	53
5.2.1.1	Spektrophotometrische Titrationsen	53
5.2.1.2	Isolierung der Komplexe $^{[112]}$	55
5.2.2	Bildung der dreikernigen Komplexe $[(L-H)M_S Cu_2]^{5+}$	56
5.2.3	Untersuchungen zum Metallaustausch	58
5.3	Kinetische Untersuchungen	60
5.3.1	HPNP-Spaltung	60
5.3.1.1	Auswertung der kinetischen Messungen	60
5.3.1.2	Abhängigkeit der Spaltungsgeschwindigkeit vom strukturellen Metallion $M_S$	61

---

5.3.1.3	pH-Abhängigkeit der Spaltungsgeschwindigkeit	63
5.3.1.4	Abhängigkeit der Reaktionsgeschwindigkeit von der Komplexkonzentration	64
5.3.1.5	Turnover-Messungen	64
5.3.1.6	Abhängigkeit der Reaktionsgeschwindigkeit von der Substratkonzentration (Michaelis-Menten-Kinetik)	66
5.3.1.7	Spaltung von HPNP durch Kupferkomplexe der Schwefel- und Selen-Analoga von L	69
5.3.2	Reaktivität gegenüber anderen Substraten	71
5.3.3	Spaltung des RNA-Dinucleotids Uridinyl(3'-5')Uridin (UpU)	71
6	Zusammenfassung	75
7	Experimenteller Teil	78
7.1	Geräte	78
7.2	Chemikalien	79
7.3	Darstellung von 2-Hydroxypropyl- <i>p</i> -nitrophenylphosphat (HPNP)	80
7.4	Ligandensynthese	81
7.4.1	Darstellung von 1,3-Bis[tris(hydroxymethyl)methylamino]-2-propanol	81
7.4.2	Synthese von 4-Chlor-2,6-dimethylpyridindicarboxylat	81
7.4.3	Darstellung von 4-Chlor-2,6-bis(hydroxymethyl)pyridin (Cl-BHP)	82
7.5	Komplexbildung	82
7.5.1	Fällung von Zr/BHP	82
7.5.2	<sup>1</sup> H-NMR-Untersuchungen	83
7.5.2.1	Bildung des Zirconium-Komplexes von 2,6-Bis(hydroxymethyl)pyridin (BHP)	83
7.5.2.2	Untersuchungen mit TDCI als Ligand	83
7.6	Hydrolyse der aktivierten Phosphodiester Bis( <i>p</i> -nitrophenyl)phosphat (BNPP) und 2-Hydroxypropyl- <i>p</i> -nitrophenylphosphat (HPNP) durch Zr(IV)	83
7.6.1	Stammlösungen	83
7.6.2	Einfluß von Liganden auf die Hydrolysegeschwindigkeit	84
7.6.3	pH-Abhängigkeit der Spaltungsreaktion	84
7.6.4	BNPP-Hydrolyse durch Hafnium- und Titankomplexe	85
7.6.5	Spaltung von 2-Hydroxypropyl- <i>p</i> -nitrophenylphosphat (HPNP)	85
7.6.5.1	Abhängigkeit der Spaltungsgeschwindigkeit von HPNP von der ZrCl <sub>4</sub> -Konzentration	85
7.6.5.2	Produktanalyse durch <sup>31</sup> P-NMR-Spektroskopie	85

---

7.7	Spaltung von DNA- und RNA-Dinucleotiden	86
7.7.1	Probenvorbereitung	86
7.7.1.1	Hydrolyse von Thymidyl(3'-5')thymidin (TpT) durch Zirconium- und Cer-Komplexe	86
7.7.1.2	Spaltung von Uridinyl(3'-5')Uridin (UpU) durch Zr(IV)	87
7.7.1.3	Hydrolyse von Adenosin-2',3'-cyclomonophosphat (2',3'-cAMP)	87
7.7.2	HPLC-Untersuchungen	87
7.8	Vorversuche zur Synthese von Oligonucleotid-Konjugaten	88
7.8.1	Reaktion von Octadecylmercaptan mit p-Dichlorxylo	88
7.8.2	Weitere Umsetzung mit TRIS	88
7.9	Allosterische Regulierung der Phosphodiesterhydrolyse	89
7.9.1	Nachweis der Komplexbildung durch spektrophotometrische Titrations	89
7.9.1.1	Bildung der einkernigen Komplexe [(L-H)M <sub>S</sub> ] <sup>+</sup>	89
7.9.1.2	Bildung der dreikernigen Komplexe [(L-H)M <sub>S</sub> Cu <sub>2</sub> ] <sup>5+</sup>	89
7.9.2	Untersuchungen zum Metallaustausch	90
7.9.3	Kinetische Untersuchungen zur Spaltung von HPNP	90
7.9.3.1	Verwendete Stammlösungen	90
7.9.3.2	Abhängigkeit der Reaktionsgeschwindigkeit von M <sub>S</sub> und von der Cu <sup>2+</sup> -Konzentration	90
7.9.3.3	pH-Abhängigkeit	91
7.9.3.4	Abhängigkeit der Spaltungsgeschwindigkeit von der Komplexkonzentration	91
7.9.3.5	Turnover-Messungen	91
7.9.3.6	Abhängigkeit der Reaktionsgeschwindigkeit von der Substratkonzentration (Michaelis-Menten-Kinetik)	92
7.9.3.7	Spaltung von HPNP durch Kupferkomplexe der Schwefel- und Selen-Analoga von L	92
7.9.4	Reaktivität von L gegenüber anderen Substraten	93
7.9.5	Spaltung des RNA-Dinucleotids UpU	93
7.9.5.1	Probenvorbereitung	93
7.9.5.2	Durchführung der HPLC-Messungen	93
8	Literaturverzeichnis	94
9	Aus dieser Arbeit hervorgegangene Publikationen	99

## Abbildungsverzeichnis

Abb. 1.1: Schematische Darstellung eines kurzen Stückes aus der DNA bzw. RNA	1
Abb. 1.2: Aktivierung von Wasser durch Zn	2
Abb. 1.3: Schematische Darstellung der allosterischen Inhibierung	3
Abb. 1.4: Schematische Darstellung der allosterischen Aktivierung	3
Abb. 1.5: Aktives Zentrum der Nuclease P1 <sup>[9,10]</sup> und der alkalischen Phosphatase <sup>[8,9]</sup>	5
Abb. 1.6: Mechanismus der Phosphodiesterhydrolyse an einkernigen Metallkomplexen	7
Abb. 1.7: Vorgeschlagener Mechanismus der Spaltung von DNA-Dinucleotiden durch Ce(IV) <sup>[47]</sup>	8
Abb. 1.8: Erster Schritt der Hydrolyse von ApA	10
Abb. 1.9: Postulierter Mechanismus für die Spaltung von HPNP durch zweikernige Metallkomplexe	11
Abb. 1.10: Aufbau von PNA	11
Abb. 1.11: Verschiedene Bindungsmöglichkeiten zwischen PNA und DNA,	12
Abb. 1.12: Sequenzspezifische Spaltung eines DNA-Oligomers durch durch einen Ce(IV)-Oligonucleotid-Komplex <sup>[54]</sup>	12
Abb. 1.13: Struktur des Kations $[\text{Zr}_4(\text{OH})_8(\text{H}_2\text{O})_{16}]^{8+}$ <sup>[99]</sup>	13
Abb. 3.1: Aktivierte Phosphodiester als Modellsubstrate für DNA und RNA	15
Abb. 3.2: Reaktionsgleichung der Hydrolyse von BNPP	15
Abb. 3.3: pH-abhängiges Gleichgewicht zwischen NP und NPat	16
Abb. 3.4: Reaktionsgleichung der Darstellung von HPNP	16
Abb. 3.5: Spaltung von HPNP <sup>[53]</sup>	17
Abb. 3.6: Eingesetzte Liganden	20
Abb. 3.7: Synthese von BTMP	21
Abb. 3.8: Darstellung von Cl-BHP	21
Abb. 3.9: Metallkomplexe mit TDCI <sup>[105]</sup>	23
Abb. 3.10: <sup>1</sup> H-NMR für ein Gemisch aus ZrCl <sub>4</sub> , EDTA und TDCI im Verhältnis 1:1:1 bei pD 7	23
Abb. 3.11: pH-Abhängigkeit der BNPP-Hydrolyse durch Zirconium-Komplexe	26
Abb. 3.12: Abhängigkeit der HPNP-Spaltungsgeschwindigkeit von der Konzentration an ZrCl <sub>4</sub> (bei pH 3,5 und 20°C)	28
Abb. 3.13: Lineweaver-Burk -Diagramm zur Ermittlung von $k_{\text{cat}}$ und K für die Spaltung von HPNP durch ZrCl <sub>4</sub> bei pH 3,5 und 20°C	30
Abb. 3.14: Reaktionsgeschwindigkeiten für die Hydrolyse von BNPP <sup>[37]</sup> und die Spaltung von HPNP durch ZrCl <sub>4</sub> bei pH 3,5 und 20°C	32

Abb. 3.15: Spaltung von HPNP, 1. Schritt: Umesterung , 2. Schritt: Hydrolyse des cyclischen Phosphodiesters	33
Abb. 3.16: $^{31}\text{P}$ -NMR-Spektrum des Reaktionsgemisches der HPNP-Spaltung durch Zr/TDCI bei pH 3,5 und 20°C	34
Abb. 3.17: Direkte Hydrolyse von HPNP durch Zirconium(IV)	34
Abb. 4.1: HPLC-Elutionsprofile für die Spaltung von TpT (0,1 mM) durch Zr/ TDCI (5 mM) bei pH 4,0 und 55°C nach 0, 2, 4, 6 und 22 ½ Stunden Reaktionszeit	37
Abb. 4.2: Reaktionsgleichung der Hydrolyse von TpT	38
Abb. 4.3: Hydrolyse von TpT durch Zr/TDCI bei pH 4,0 und pH 7,0 sowie durch $\text{ZrCl}_4$ bei pH 3,0; Zunahme der Thymidin-Konzentration mit der Zeit	38
Abb. 4.4: Hydrolyse von TpT (0,1 mM) durch $\text{ZrCl}_4$ (5 mM) bei pH 3,0 und unterschiedlichen Temperaturen	40
Abb. 4.5: Spaltung von UpU: 1.Schritt: Umesterung zu 2',3'-cUMP, 2. Schritt: Hydrolyse von 2',3'-cUMP	43
Abb. 4.6: HPLC-Elutionsprofile für die Spaltung von UpU durch $\text{ZrCl}_4$	44
Abb. 4.7: Spaltung von UpU (0,1 mM) durch $\text{ZrCl}_4$ bzw. durch Zr/TDCI (5 mM), Zunahme der Uridinkonzentration mit der Zeit	45
Abb. 4.8: Lineweaver-Burk-Diagramm zur Ermittlung von $k_{\text{cat}}$ und K für die Spaltung von UpU (0,1 mM) durch $\text{ZrCl}_4$ bei pH 3,0 und 20°C	46
Abb. 4.9: HPLC-Elutionsprofile für die Hydrolyse von 2',3'-cAMP durch Zr/TDCI	48
Abb. 4.10: Hydrolyse von 2',3'-cAMP durch $\text{ZrCl}_4$ bzw. Zr/TDCI; Abnahme der 2',3'-cAMP-Konzentration mit der Zeit	49
Abb. 4.11: Oligonucleotid-TRIS-Konjugate	51
Abb. 5.1: Metallkomplexe für die Untersuchung der allosterischen Regulierung der Phosphodiesterspaltung	52
Abb. 5.2: Spektrophotometrische Titration des Liganden L mit $\text{Cu}^{2+}$ , Überlagerung der UV-Spektren und Zunahme der Absorption bei 535 nm	54
Abb. 5.3: Spektrophotometrische Titration des Liganden L mit $\text{Ni}^{2+}$ (oben) bzw. $\text{Pd}^{2+}$ , Überlagerung der UV-Spektren und Zunahme der Absorption	55
Abb. 5.4: Spektrophotometrische Titrations der Komplexe $[(\text{L-H})\text{M}_5]^+$ mit $\text{Cu}^{2+}$ , Überlagerung der UV-Spektren der Titration von $[(\text{L-H})\text{Cu}]^+$ und Zunahme der Absorption bei 635 nm während der Titration	57
Abb. 5.5: Titration von $[(\text{L-H})\text{Cu}]^+$ mit $\text{Cu}^{2+}$ mit und ohne Zugabe von Phosphat	58
Abb. 5.6: MALDI-Massenspektren von $[(\text{L-H})\text{Pd}]^+$ mit 4 Äquivalenten $\text{Cu}^{2+}$ bzw. von einem 1:2-Gemisch aus $[(\text{L-H})\text{Pd}]^+$ und $[(\text{L-H})\text{Cu}]^+$ mit 4 Äquivalenten $\text{Cu}^{2+}$	59
Abb. 5.7: $k_{\text{obs}}$ für die Spaltung von HPNP in Abhängigkeit von der $\text{Cu}^{2+}$ -Konzentration und vom strukturellen Metallion $\text{M}_5$ bei pH 7,0 und 20°C	61
Abb. 5.8: Abhängigkeit der Spaltung von HPNP durch $[(\text{L-H})\text{M}_5\text{Cu}_2]^{5+}$ vom pH-Wert	63
Abb. 5.9: Abhängigkeit der Spaltungsgeschwindigkeit von der Komplexkonzentration	64
Abb. 5.10: Zeitlicher Verlauf der Spaltungsreaktion mit $[(\text{L-H})\text{M}_5\text{Cu}_2]^{5+}$ als Katalysator	65

Abb. 5.11: Abhängigkeit der Spaltungsgeschwindigkeit von der Substratkonzentration	66
Abb. 5.12: Lineweaver-Burk-Diagramm zur Bestimmung von $k_{\text{cat}}$ und $K_{\text{HPNP}}$ für die Spaltung von HPNP durch $[(\text{L-H})\text{M}_5\text{Cu}_2]^{5+}$	68
Abb. 5.13: $k_{\text{obs}}$ für die Spaltung von HPNP durch (R-S-R)- Komplexe in Abhängigkeit von der $\text{Cu}^{2+}$ -Konzentration	69
Abb. 5.14: HPLC-Elutionsprofil für die Spaltung von UpU (0,1 mM) durch $[(\text{L-H})\text{Cu}_3]^{5+}$ (1 mM) nach einer Reaktionszeit von 140 h	72
Abb. 5.15: Spaltung von UpU (0,5 mM) durch $[(\text{L-H})\text{M}_5\text{Cu}_2]^{5+}$ (0,1 mM) bei pH 7 und $20^\circ\text{C}$ , Zunahme der Uridinkonzentration mit der Zeit	73
Abb. 6.1: Liganden, deren Zr(IV)-Komplexe Phosphataseaktivität zeigen	75
Abb. 6.2: Spaltung von HPNP durch $[(\text{L-H})\text{M}_5\text{Cu}_2]^{5+}$	76

## Tabellenverzeichnis

Tabelle 3.1: $k_{\text{obs}}$ für die Hydrolyse von BNPP durch $\text{ZrCl}_4$ und Zirconium-Komplexe	25
Tabelle 4.1: $k_{\text{obs}}$ für die Hydrolyse von TpT durch Zirconium-Komplexe	41
Tabelle 4.2: $k_{\text{obs}}$ für die Hydrolyse von TpT durch Zirconium- und Cer-Komplexe	42
Tabelle 4.3: Geschwindigkeitskonstanten pseudo-erster Ordnung für die Spaltung von UpU durch $\text{ZrCl}_4$ und durch Zirconium-Komplexe	45
Tabelle 5.1: $k_{\text{cat}}$ und $K_{\text{HPNP}}$ für die Spaltung von HPNP durch $[(\text{L-H})\text{M}_5\text{Cu}_2]^{5+}$	68
Tabelle 5.2: $k_{\text{obs}}$ für die Spaltung von UpU durch $[(\text{L-H})\text{M}_5\text{Cu}_2]^{5+}$	73

## Abkürzungsverzeichnis

ApA	Adenylyl(3' → 5')Adenosin
ApUp	Adenylyl(3' → 5')Uridin-3'-monophosphat
ATP	Adenosintriphosphat
2'-AMP	Adenosin-2'-monophosphat
3'-AMP	Adenosin-3'-monophosphat
BHP	2,6-Bis(hydroxymethyl)pyridin
Bicin	N,N-Bis(2-hydroxyethyl)glycin
Bis-TRIS	Bis(2-hydroxyethyl)amino-tris(hydroxymethyl)methan
BNPP	Bis( <i>p</i> -nitrophenyl)phosphat
BTMP	1,3-Bis(tris(hydroxymethyl)methylamino)-2-propanol
2',3'-cAMP	Adenosin-2',3'-cyclomonophosphat
2',3'-cUMP	Uridin-2',3'-cyclomonophosphat
Cl-BHP	4-Chlor-2,6-bis(hydroxymethyl)pyridin
dApdA	2'-Desoxyadenyl(3'-5')-2'-desoxyadenosin
DBU	1,8-Diazabicyclo[5.4.0.]undec-7-en
DC	Dünnschichtchromatographie
DMF	N,N-Dimethylformamid
DMP	Natriumdimethylphosphat
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonucleinsäure
dT	Thymidin
EDTA	Ethylendiamin-N,N,N',N'-tetraacetat-dinatriumsalz
EI	<i>electron ionisation</i>
HPLC	<i>high performance liquid chromatography</i>
HPNP	2-Hydroxypropyl- <i>p</i> -nitrophenylphosphat
MALDI	<i>matrix-assisted laser desorption ionisation</i>
MES	2-(N-Morpholino)ethansulfonsäure
M <sub>f</sub>	funktionelles Metallion
MOPS	3-(N-Morpholino)propansulfonsäure
M <sub>s</sub>	strukturelles Metallion
NMR	<i>nuclear magnetic resonance</i>
NP	<i>p</i> -Nitrophenol



---

NPA	<i>p</i> -Nitrophenylacetat
NPat	<i>p</i> -Nitrophenolat
NPP	<i>p</i> -Nitrophenylphosphat
PNA	Peptidnucleinsäuren
R <sub>f</sub>	<i>ratios of fronts</i>
RNA	Ribonucleinsäure
TACI	1,3,5-Triamino-1,3,5-trideoxy- <i>cis</i> -inositol
TDCI	1,3,5-Trideoxy-1,3,5-tris-(dimethylamino)- <i>cis</i> -inositol
TEA	Triethanolamin
3'-TMP	Thymin-3'-monophosphat
5'-TMP	Thymin-5'-monophosphat
TpT	Thymidyl-3'-5'-thymidin
Tricin	N-[Tris(hydroxymethyl)methyl]glycin
TRIS	Tris(hydroxymethyl)aminoethan
UV/VIS	<i>ultraviolett/ visible</i> (Wellenlängenbereich)