

### 3 Spaltung aktivierter Phosphodiester durch Zr(IV)

#### 3.1 Verwendete Substrate

Nichtaktivierte Phosphodiester wie Dimethylphosphat sind gegenüber der hydrolytischen Spaltung sehr stabil. Deshalb werden zur kinetischen Untersuchung der Hydrolysereaktion aktivierte Phosphodiester eingesetzt, die über eine gute Abgangsgruppe verfügen.

Als Modellverbindung für die DNA wird häufig Bis(*p*-nitrophenyl)phosphat (BNPP) verwendet. Für die RNA dient in vielen Fällen 2-Hydroxypropyl-*p*-nitrophenylphosphat (HPNP) als Modellsubstrat, das wie diese eine 2-Hydroxygruppe enthält (Abb. 3.1).

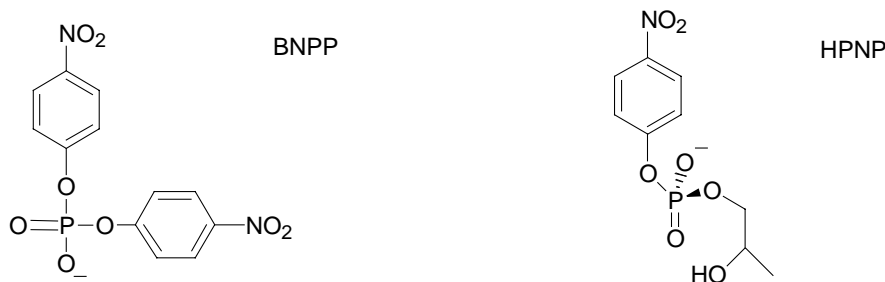


Abb. 3.1: Aktivierte Phosphodiester als Modellsubstrate für DNA und RNA

In beiden Fällen liegt mit *p*-Nitrophenol eine gute Abgangsgruppe vor, die außerdem über eine starke Absorption im UV-VIS-Bereich verfügt. Der Ablauf der Hydrolysereaktion läßt sich daher gut spektrophotometrisch verfolgen.

##### 3.1.1 Hydrolyse von Bis(*p*-nitrophenyl)phosphat (BNPP)

Bei der Hydrolyse von BNPP werden *p*-Nitrophenol (NP) und der Monoester *p*-Nitrophenylphosphat gebildet (Abb. 3.2).

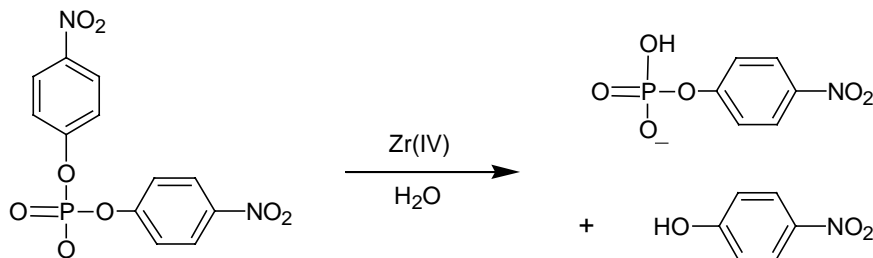


Abb. 3.2: Reaktionsgleichung der Hydrolyse von BNPP

In wässrigen Lösungen liegen das entstehende *p*-Nitrophenol und *p*-Nitrophenolat (NPat) in einem pH-abhängigen Gleichgewicht nebeneinander vor (Abb. 3.3). Mit zunehmendem pH-Wert wird dieses Gleichgewicht immer mehr auf die Seite des *p*-Nitrophenolats verschoben.

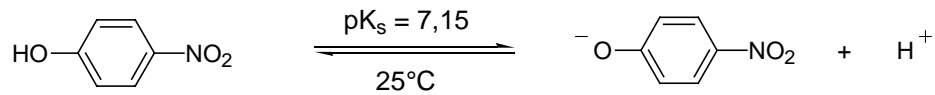


Abb. 3.3: pH-abhängiges Gleichgewicht zwischen NP und NPat

Die Zunahme der Konzentration an *p*-Nitrophenol kann über UV-Messungen bei  $\lambda_{\text{max}} = 320 \text{ nm}$  ermittelt werden. Der Extinktionskoeffizient  $\epsilon_{320\text{nm}}$  beträgt  $10000 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ . In alkalischen Lösungen wird die Hydrolysegeschwindigkeit über die Freisetzung von *p*-Nitrophenolat bestimmt, welches bei  $\lambda_{\text{max}} = 400 \text{ nm}$  absorbiert ( $\epsilon_{400\text{nm}} = 18700 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ ).

### 3.1.2 Spaltung von 2-Hydroxypropyl-*p*-Nitrophenylphosphat (HPNP)

Als Modellsubstrat für die RNA wird häufig HPNP verwendet, das wie diese eine 2-Hydroxygruppe enthält.

HPNP wird nach einer Literaturvorschrift durch die Umsetzung von *p*-Nitrophenylphosphat mit einem Überschuß an Propylenoxid hergestellt. Das Produkt wird anschließend als Bariumsalz gefällt.<sup>[100]</sup>

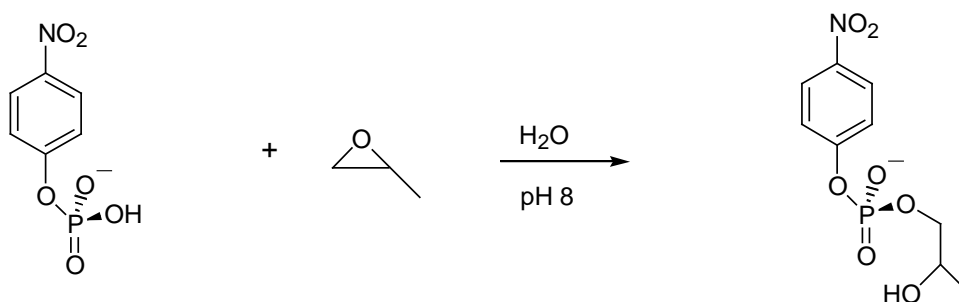


Abb. 3.4: Reaktionsgleichung der Darstellung von HPNP

Die spontane Hydrolyse der RNA verläuft nach einem anderen Mechanismus als die hydrolytische Spaltung der DNA. Im ersten Schritt erfolgt durch einen intramolekularen Angriff der 2'-Hydroxygruppe des Riboserings eine Umesterung zu einem cyclischen Phosphodiester. Dieser kann anschließend zum 2'- oder 3'-Monophosphatester hydrolysiert werden.<sup>[3]</sup>

Nach diesem Umesterungsmechanismus wird auch das Modellsubstrat HPNP gespalten. Hierbei dient die 2-Hydroxygruppe als Nucleophil. Unter Abspaltung von *p*-Nitrophenol bildet sich ein cyclischer Phosphodiester.<sup>[53]</sup>

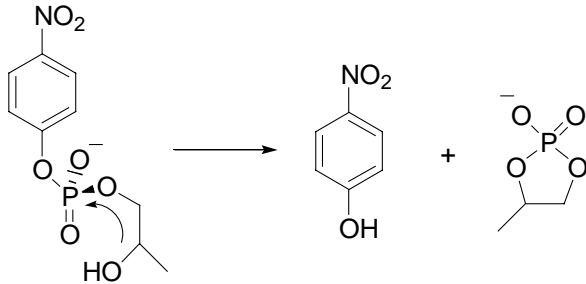


Abb. 3.5: Spaltung von HPNP<sup>[53]</sup>

Der intramolekulare Angriff der 2'-Hydroxygruppe der RNA erfolgt schneller als der intermolekulare Angriff eines Hydroxid-Nucleophils, der bei der Spaltung der DNA abläuft. So lassen sich die großen Unterschiede in der Hydrolysegeschwindigkeit von DNA und RNA erklären. Die RNA wird etwa eine Million mal schneller gespalten als die DNA.<sup>[3]</sup>

Die Geschwindigkeit der unkatalysierten Spaltung von HPNP ist stark pH-abhängig. Bei pH-Werten < 7,5 läuft die Hydrolyse nur sehr langsam ab, mit steigendem pH-Wert nimmt die Reaktionsgeschwindigkeit deutlich zu.<sup>[101]</sup> Ursache hierfür ist die zunehmende Deprotonierung der 2-Hydroxygruppe, da die Alkoholat-Gruppe ein viel stärkeres Nucleophil als die Alkohol-Gruppe ist.

Wie bei der Verwendung von BNPP als Substrat, entsteht bei der Reaktion *p*-Nitrophenol bzw. *p*-Nitrophenolat. Die Bildung der Hydrolyseprodukte läßt sich durch UV-Messungen bei  $\lambda = 320$  nm bzw. 400 nm verfolgen.

### 3.1.3 Kinetische Analyse der Zr(IV)-vermittelten Hydrolysereaktion

Die pH-Abhängigkeit des Gleichgewichts zwischen *p*-Nitrophenol und -phenolat kann durch die Henderson-Hasselbach-Gleichung beschrieben werden (1). Mit Hilfe dieser Beziehung läßt sich das Verhältnis von NP und NPat und damit die Gesamtkonzentration des Hydrolyseprodukts berechnen.

$$-\text{pH} = \text{pK}_s + \log \frac{c(\text{NPat})}{c(\text{NP})} \quad (1)$$

Die meisten UV-Messungen wurden in sauren Lösungen (pH 3,0 - 4,5) durchgeführt, in denen ausschließlich *p*-Nitrophenol vorliegt. In diesen Fällen wurde nur die Absorption bei 320 nm für die Auswertung berücksichtigt. Für Untersuchungen in alkalischen Lösungen (pH > 9) würde man die Absorption des *p*-Nitrophenolats,  $\lambda_{\text{max}} = 400 \text{ nm}$ , verwenden. Bei Messungen im Bereich zwischen pH 5,5 und 7 wurden beide Wellenlängen für die Bestimmung der Hydrolysegeschwindigkeit herangezogen.

Die jeweilige Konzentration von *p*-Nitrophenol bzw. von *p*-Nitrophenolat erhält man über die durch UV-Spektroskopie ermittelten Werte für die Extinktion. Den Zusammenhang zwischen der Extinktion *E* und der Konzentration *c* stellt das Lambert-Beer'sche Gesetz (2) her.

$$E = \epsilon_\lambda c d \quad (\text{d: Schichtdicke in cm}) \quad (2)$$

Bei der Hydrolyse von BNPP entstehen zunächst *p*-Nitrophenol und der Monoester *p*-Nitrophenylphosphat als Reaktionsprodukte. Letzteres kann noch in Phosphat und *p*-Nitrophenol gespalten werden, so daß pro Äquivalent BNPP zwei Äquivalente NP entstehen könnten. Die geringe Freisetzung von *p*-Nitrophenol aus dem Monoester wird bei der Bestimmung der Anfangsgeschwindigkeiten für die Hydrolysereaktion vernachlässigt. Auch bei der Spaltung von HPNP wird nur der erste Schritt der Reaktion, die Umesterung zum cyclischen Phosphodiester, betrachtet.

Die Hydrolysereaktionen wurden in Gegenwart eines Zr(IV)-Überschusses durchgeführt. Die Zirconium-Konzentration kann daher als konstant angesehen werden, und die Reaktion wird nach einem Geschwindigkeitsgesetz pseudo-erster Ordnung (3) behandelt.

$$-\frac{dc(\text{BNPP})}{dt} = \frac{dc(\text{NP}_{\text{ges}})}{dt} = k[\text{Zr}][\text{Substrat}] = k_{\text{obs}}[\text{Substrat}] \quad (3)$$

Es werden nur die Anfangsgeschwindigkeiten bei einem Umsatz  $< 10\%$  zur Auswertung herangezogen, daher wird die Konzentration des Substrates als annähernd konstant betrachtet. In diesem Fall gilt:

$$k_{\text{obs}} = \frac{dc(\text{NP}_{\text{ges}})}{[\text{Substrat}]_0 dt} \quad (4)$$

### 3.2 Verwendete Liganden

Aus früheren Untersuchungen ist bekannt, daß mit bestimmten Aminoalkoholen wie Tris(hydroxymethyl)aminomethan (TRIS) oder 2,6-Bis(hydroxymethyl)pyridin (BHP) eine Komplexierung von Zr(IV) möglich ist, ohne die Aktivität des Metallions für die Hydrolyse von Phosphodiestern vollständig zu unterbinden.<sup>[37]</sup> Daher wurden in den kinetischen Messungen überwiegend ähnliche Substanzen als Liganden eingesetzt. Verwendet wurden u. a. 1,3,5-Trideoxy-1,3,5-tris-(dimethylamino)-*cis*-inositol (TDCI), 1,3,5-Triamino-1,3,5-trideoxy-*cis*-inositol (TACI), 1,3-Bis(tris(hydroxymethyl)methylamino)-2-propanol (BTMP), Bis(2-hydroxyethyl)amino-tris(hydroxymethyl)methan (Bis-TRIS) und 4-Chlor-2,6-bis(hydroxymethyl)pyridin (Cl-BHP).

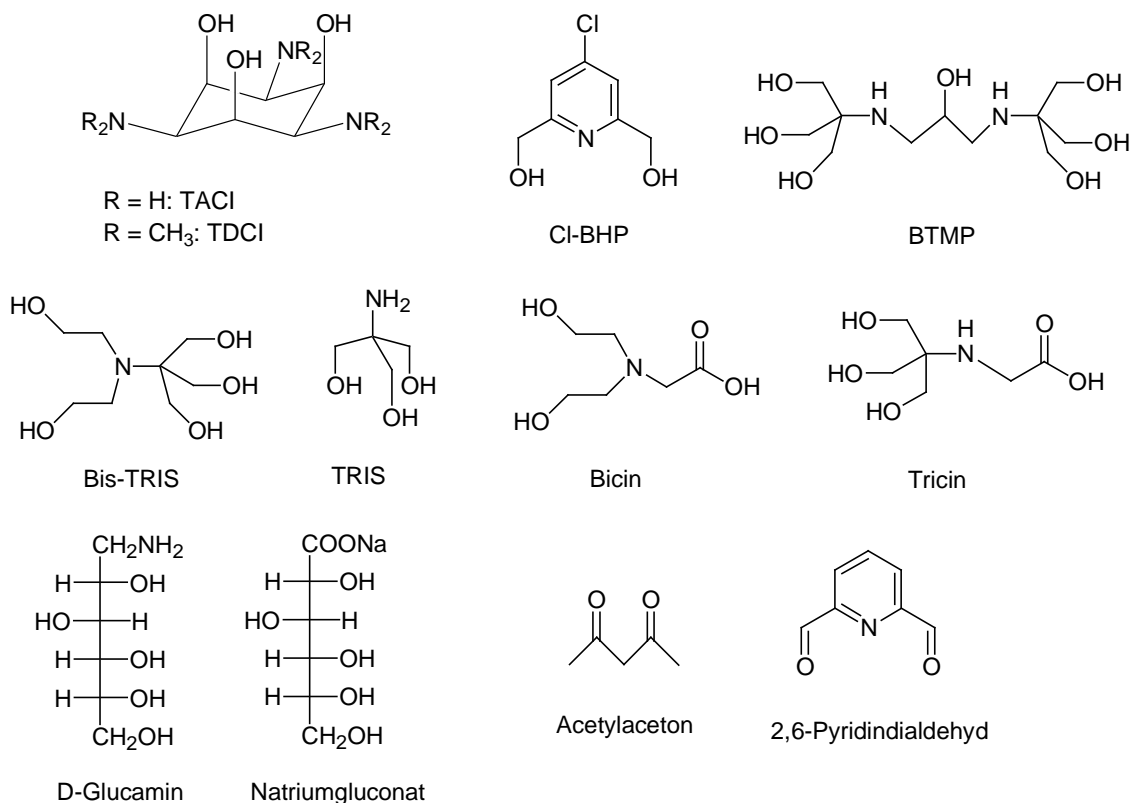


Abb. 3.6: Eingesetzte Liganden

TDCI und TACI wurden von Prof. Dr. K. Hegetschweiler von der Universität Saarbrücken zur Verfügung gestellt.

Ferner wurden Versuche mit Hydroxycarbonsäurederivaten (Natriumcitrat, Natriumgluconat, Natriumtartrat, Hydroxyessigsäure), mit D-Glucamin, N,N-Bis(2-hydroxyethyl)glycin (Bicin), N-[Tris(hydroxymethyl)methyl]glycin (Tricin), Acetylaceton und mit 2,6-Pyridindialdehyd als Liganden durchgeführt.

### 3.3 Ligandensynthese

#### 3.3.1 Synthese von 1,3-Bis[tris(hydroxymethyl)-methylamino]-2-propanol (BTMP)

Der Ligand 1,3-Bis[tris(hydroxymethyl)-methylamino]-2-propanol (BTMP) wurde nach einer Literaturvorschrift dargestellt.<sup>[102]</sup>

Hierbei wird Epichlorhydrin mit 2 Äquivalenten TRIS umgesetzt. Durch Zugabe von konz. HCl wird das Produkt als Hydrochlorid ausgefällt. Der erhaltene weiße Feststoff wird durch Umkristallisieren aus Ethanol/Wasser (2:1) gereinigt.

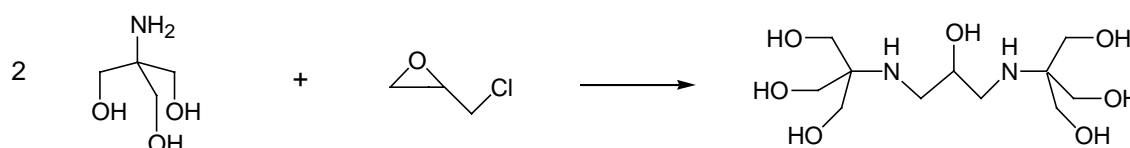


Abb. 3.7: Synthese von BTMP

#### 3.3.2 Darstellung von 4-Chlor-2,6-bis(hydroxymethyl)pyridin (Cl-BHP)

4-Chlor-2,6-bis(hydroxymethyl)pyridin (Cl-BHP) wird in 2 Stufen ausgehend von 4-Hydroxypyridin-2,6-dicarbonsäure (Chelidamsäure) hergestellt. Durch Umsetzung von Chelidamsäure mit Phenylphosphorylchlorid erhält man das Säurechlorid der 4-Chlorpyridin-2,6-dicarbonsäure. Aus diesem bildet sich durch Zugabe von Methanol der entsprechende Ester (4-Chlor-2,6-dimethylpyridindicarboxylat) in Form von hellbraunen Nadeln. Diese werden aus Methanol umkristallisiert.<sup>[103]</sup>

Im zweiten Schritt wird 4-Chlor-2,6-dimethylpyridindicarboxylat mit Natriumborhydrid zu Cl-BHP reduziert.<sup>[104]</sup> Der erhaltene hellgelbe Feststoff wird durch Umkristallisieren aus Aceton gereinigt.

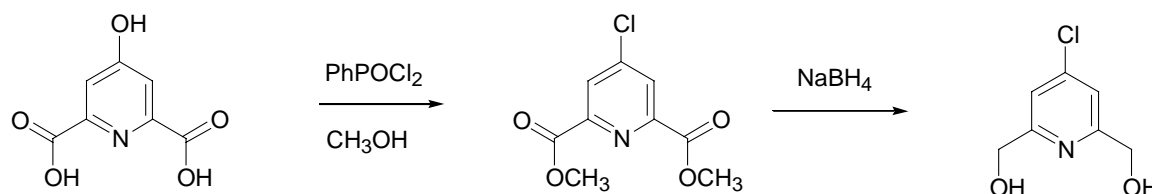


Abb. 3.8: Darstellung von Cl-BHP

### 3.4 Charakterisierung von Zirconium-Komplexen in Lösung

Die Untersuchung der Komplexbildung von Zirconium(IV) mit unterschiedlichen Liganden hat sich als schwierig erwiesen. In den meisten Fällen kann man nur aufgrund der Tatsache auf eine stabile Komplexbildung schließen, daß bei Anwesenheit des Liganden Zirconiumhydroxid-Niederschläge bei pH-Werten > 6 ausbleiben.

Nur mit 2,6-Bis(hydroxymethyl)pyridin (BHP) und TDCI war es möglich, die Komplexbildung von Zr(IV) durch  $^1\text{H-NMR}$ -Untersuchungen nachzuweisen (s. unten).

Der BHP-Zirconium-Komplex konnte außerdem durch Zugabe von Natriumperchlorat als weißes Pulver ausgefällt werden. ESI-Massenspektren von wäßrigen Lösungen dieses Komplexes sind sehr unübersichtlich. Man erhält Signale für  $m/z$  im Bereich von 234 bis über 2000, der Abstand zwischen den Peaks beträgt zwischen 60 und 65, das entspricht etwa einer  $[\text{Zr}(\text{OH})_2]^{2+}$ -Einheit. Offensichtlich bilden sich mehrkernige Komplexe, in denen die Zirconium-Ionen über Hydroxybrücken verknüpft sind.

#### 3.4.1 $^1\text{H-NMR}$ -Untersuchungen

Mit 2,6-Bis(hydroxymethyl)pyridin (BHP) werden im  $^1\text{H-NMR}$ -Spektrum sowohl Signale für den koordinierten als auch für den freien Liganden erhalten, da der Austausch langsam auf der NMR-Zeitskala ist. Aus dem Verhältnis zwischen freiem und koordiniertem BHP bei unterschiedlichen Zusammensetzungen der untersuchten Lösungen kann die Komplexbildungskonstante  $K$  zumindest ungefähr bestimmt werden, da für  $K$  gilt:

$$K = \frac{c(\text{Zr/BHP})}{c(\text{Zr})c(\text{BHP})}$$

Es wurden Lösungen mit folgender Zusammensetzung verwendet : 5 mg BHP ( $3,6 \times 10^{-5}$  mol) und 0,5 bis 2 Äquivalente  $\text{ZrCl}_4$  in 1 ml  $\text{D}_2\text{O}$  bei pD 4,0.

Bei einer Zugabe von einem Äquivalent  $\text{ZrCl}_4$  liegen 85% und bei zwei Äquivalenten Zr(IV) 98% des Liganden in koordinierter Form vor, daraus ergibt sich eine Komplexbildungskonstante  $K$  von ca.  $1000 \text{ M}^{-1}$ .

Von TDCI und TACI ist bekannt, daß sie stabile Komplexe mit hoch geladenen Metallionen wie  $\text{Fe}^{3+}$ ,  $\text{Al}^{3+}$ ,  $\text{Ga}^{3+}$ ,  $\text{In}^{3+}$ ,  $\text{Ge}^{4+}$ ,  $\text{Sn}^{4+}$  und  $\text{Ti}^{4+}$  bilden. In TACI ist sowohl eine Bindung über 3 N-Atome als auch über 3 O-Atome oder eine gemischte N,O-Koordination des Metallions möglich.



Wenn die Aminogruppen wie in TDCI methyliert sind, findet aus sterischen Gründen nur noch die Bindung über die drei OH-Gruppen statt.<sup>[105]</sup>

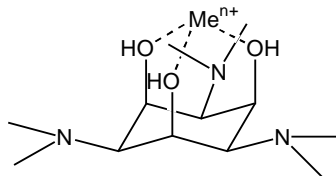


Abb. 3.9: Metallkomplexe mit TDCI<sup>[105]</sup>

Die Komplexbildungskonstanten für Zr/TDCI bzw. Zr/TACI können aus den <sup>1</sup>H-NMR-Spektren nicht ermittelt werden, da man nur die Signale für die Komplexe, aber nicht die der unkoordinierten Liganden erhält.

Aus <sup>1</sup>H-NMR-Messungen bei gleichzeitiger Zugabe von jeweils einem Äquivalent EDTA und TDCI bei pD 7 erkennt man, daß der Zr/TDCI-Komplex ähnlich stabil wie der Zr/EDTA-Komplex ist, da die Signale für freies EDTA ( $\delta = 3,3$  ppm und  $3,65$  ppm), Zr/EDTA ( $\delta = 3,0$  ppm und  $3,4 - 3,9$  ppm), Zr/TDCI ( $\delta = 2,9$  ppm,  $3,1$  ppm und  $4,8$  ppm) und freies TDCI ( $\delta = 2,8$  ppm,  $2,9$  ppm und  $4,8$  ppm) nebeneinander vorliegen

Die Komplexbildungskonstante K für den Zr/EDTA-Komplex beträgt ca.  $10^{28}$ .<sup>[106]</sup>

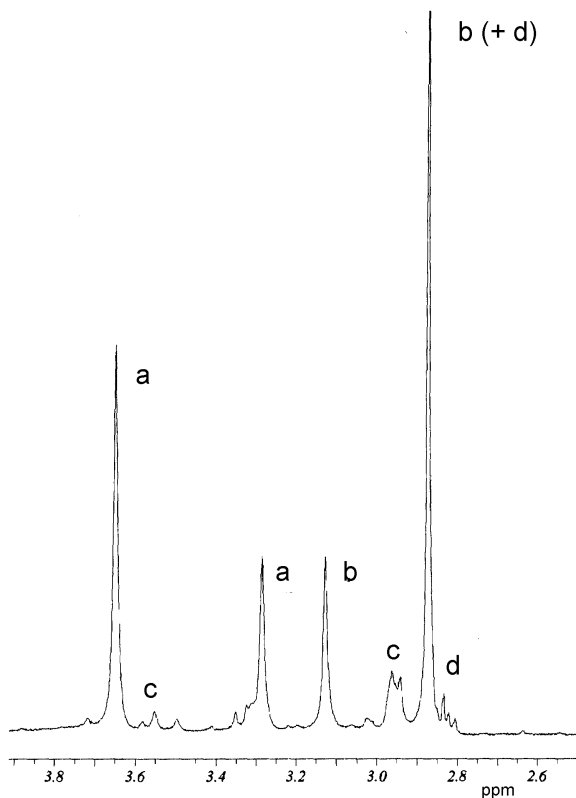


Abb. 3.10: <sup>1</sup>H-NMR für ein Gemisch aus ZrCl<sub>4</sub>, EDTA und TDCI im Verhältnis 1:1:1 bei pD 7; a) EDTA, b) Zr/TDCI, c) Zr/EDTA, d) TDCI

### 3.5 Kinetische Untersuchungen zur Hydrolyse von BNPP

#### 3.5.1 Einfluß von Liganden

Die kinetischen Untersuchungen wurden zunächst bei pH 4, dem Aktivitätsmaximum für die Hydrolyse von BNPP durch  $\text{ZrCl}_4$  <sup>[37]</sup> und bei pH 7 durchgeführt.

Die Konzentrationen in den Reaktionslösungen betragen 5 mM  $\text{ZrCl}_4$ , 2,5 bzw. 5 mM Ligand und  $2 \times 10^{-5}$  M BNPP. Der pH-Wert wurde mit 0,1 N NaOH auf 4,0 bzw. 7,0 eingestellt. Auf Zugabe von Puffersubstanzen wurde verzichtet, da die Komplexlösungen selbst über eine ausreichende Pufferkapazität verfügen. Darüberhinaus haben Kontrollmessungen gezeigt, daß die Spaltungsgeschwindigkeit mit 50 Äquivalenten MOPS-Puffer (pH 7,0) um Faktor 2 bis 3 gegenüber der nicht gepufferten Reaktion abnimmt. Der pH-Wert wurde vor und nach den kinetischen Messungen überprüft, die Abweichung betrug dabei maximal 0,1. Die Geschwindigkeitskonstanten pseudo-erster Ordnung ( $k_{\text{obs}}$ ) wurden aus den konstanten Anfangsgeschwindigkeiten der Hydrolysereaktion bestimmt.

Mit carboxylathaltigen Liganden erhält man stabile Komplexe, die bei pH 7 das Ausfallen von Zirconiumhydroxid-Niederschlägen verhindern. Die Aktivität dieser Komplexe ist jedoch meist sehr gering, eine mäßige Beschleunigung der Reaktionsgeschwindigkeit kann mit N,N-Bis(2-hydroxyethyl)glycin (Bicin), N-[Tris(hydroxymethyl)methyl]glycin (Tricin) und D-Glucamin erzielt werden. Die Hydrolyse mit den Zirconium-Komplexen der verwendeten Hydroxycarbonsäuren ist zu langsam, um exakt bestimmt zu werden, das heißt, mindestens um Faktor 30 kleiner als mit  $\text{ZrCl}_4$ .

Im Gegensatz dazu werden mit den eingesetzten Aminoalkoholen höhere Reaktivitäten beobachtet. In allen Fällen ist die Hydrolysegeschwindigkeit bei pH 4 deutlich höher als bei pH 7 (s. auch Kapitel 3.5.2).

Die Geschwindigkeitskonstanten pseudo-erster Ordnung ( $k_{\text{obs}}$ ) sind in Tabelle 3.1 aufgeführt.

Ligand	$k_{\text{obs}} \times 10^3 \text{ (s}^{-1}\text{)}$	
	pH 4	pH 7
--- <sup>[37]</sup>	6,0 ( $\pm$ 0,9)	----
TRIS (2 Äq.) <sup>[37]</sup>	7,5 ( $\pm$ 1,1)	0,9 ( $\pm$ 0,2)
BHP <sup>[37]</sup>	4,2 ( $\pm$ 0,6)	0,5 ( $\pm$ 0,1)
Cl-BHP	3,1 ( $\pm$ 0,5)	0,9 ( $\pm$ 0,2)
Bis-TRIS (0,5 Äq.)	2,2 ( $\pm$ 0,3)	0,3 ( $\pm$ 0,1)
(1 Äq.)	1,5 ( $\pm$ 0,2)	0,15 ( $\pm$ 0,05)
TDCI	2,6 ( $\pm$ 0,4)	0,3 ( $\pm$ 0,1)
TACI	2,7 ( $\pm$ 0,4)	0,5 ( $\pm$ 0,1)
BTMP (0,5 Äq.)	2,5 ( $\pm$ 0,4)	0,6 ( $\pm$ 0,1)
(1 Äq.)	2,1 ( $\pm$ 0,3)	0,3 ( $\pm$ 0,1)
Bicin (0,5 Äq.)	1,4 ( $\pm$ 0,2)	< 0,05
D-Glucamin	0,95 ( $\pm$ 0,15)	< 0,05
Tricin (0,5 Äq.)	0,6 ( $\pm$ 0,1)	< 0,05
(1 Äq.)	0,25 ( $\pm$ 0,05)	< 0,05
Acetylaceton	0,75 ( $\pm$ 0,1)	< 0,05
2,6-Pyridindialdehyd	0,5 ( $\pm$ 0,1)	0,2 ( $\pm$ 0,05)

Reaktionsbedingungen: 5 mM  $\text{ZrCl}_4$ ,  $2 \times 10^{-5}$  M BNPP, 20°C

Alle Ergebnisse sind Mittelwerte einer Doppelbestimmung, maximale Abweichung 15%

Tabelle 3.1:  $k_{\text{obs}}$  für die Hydrolyse von BNPP durch  $\text{ZrCl}_4$  und Zirconium-Komplexe

Die bisher höchste Beschleunigung ( $8 \times 10^8$ -fach bei pH 4 und 20°C bzw.  $1 \times 10^8$ -fach bei pH 7 und 20°C) wird durch Zr/TRIS erreicht, aber auch mit den übrigen untersuchten Aminoalkoholen werden hohe Reaktionsgeschwindigkeiten erzielt.

Zr/TRIS ist bisher der einzige Komplex mit dem die Aktivität von  $\text{ZrCl}_4$  übertroffen werden kann, in allen übrigen Fällen nimmt durch Zugabe des Liganden die Reaktionsgeschwindigkeit deutlich ab. Die Verringerung der Hydrolysegeschwindigkeit in Gegenwart von Liganden hat vermutlich elektrostatische Ursachen, die Ladung des Metallatoms wird zumindest teilweise ausgeglichen und die Lewis-Acidität nimmt ab. Außerdem könnten von vielzähligen Liganden wie D-Glucamin freie Koordinationsstellen blockiert werden, so daß das Substrat nicht mehr gebunden werden kann.

Durch Liganden, mit denen hohe Aktivitäten erzielt werden, wird Zirconium(IV) nur relativ schwach komplexiert. So ist bei der Verwendung von TRIS die Zugabe von 2 Äquivalenten des Liganden notwendig, dennoch fallen bei  $\text{pH} > 8$  Zirconiumhydroxid-Niederschläge aus. Bei allen Liganden, die zwei Zirconium-Ionen binden können (BTMP, Bis-TRIS, Bicin, Tricin), führt ein Überschuß an Ligand (Zugabe eines Äquivalentes) zu einer deutlichen Verringerung der Aktivität (s. Tabelle 3.1). Auf die Bildung zweikerniger Komplexe weist jedoch nur ein Ausbleiben von Zirconiumhydroxid-Niederschlägen bei  $\text{pH} > 6$  hin.

### 3.5.2 pH-Abhängigkeit der BNPP-Hydrolyse durch Zr(IV)-Komplexe

Mit den aktivsten Komplexen Zr/TDCI, Zr/Bis-Tris und Zr/Cl-BHP wurde die pH-Abhängigkeit der Hydrolysereaktion genauer untersucht. Wie im Fall von  $\text{ZrCl}_4$  liegt das Reaktivitätsmaximum bei ca.  $\text{pH} 4$  und die Aktivität nimmt bei steigendem pH-Wert stark ab.

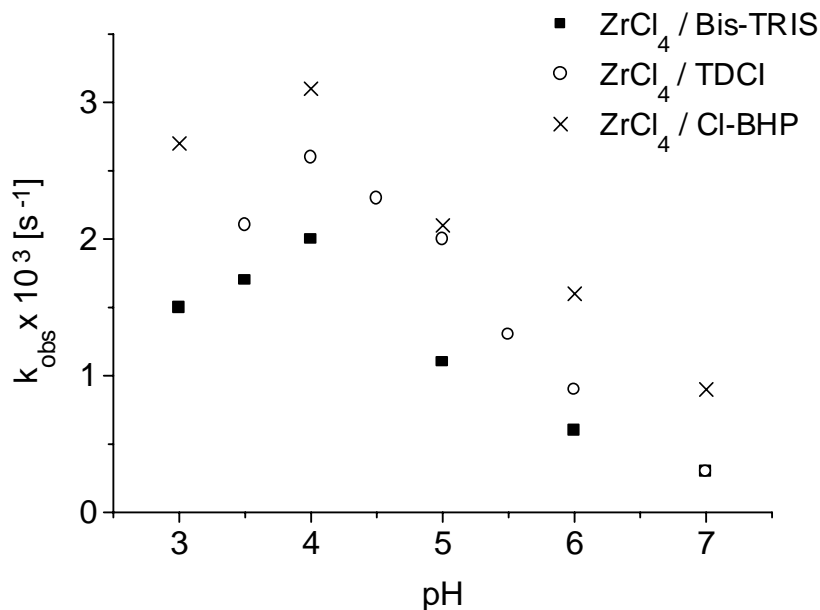


Abb. 3.11: pH-Abhängigkeit der BNPP-Hydrolyse durch Zirconium-Komplexe  
Bedingungen: 5 mM  $\text{ZrCl}_4$ , 2,5 bzw. 5 mM Ligand,  $2 \times 10^5$  M BNPP,  $20^\circ\text{C}$   
Mittelwerte einer Doppelbestimmung, maximale Abweichung 15%

Aus diesen Ergebnissen kann man keine Rückschlüsse auf den genauen Reaktionsmechanismus ziehen. Vermutlich erfolgt ein nucleophiler Angriff eines an Zirconium(IV) gebundenen Hydroxidions, da schon bei  $\text{pH} < 1$   $[\text{Zr}(\text{OH})]^{3+}$ -Spezies vorliegen.<sup>[99]</sup> Dieser Mechanismus wird üblicherweise für die Übergangsmetall-vermittelte BNPP-Hydrolyse vorgeschlagen.

Die Ursache für die Verringerung der Aktivität bei höheren pH-Werten liegt vermutlich in der zunehmenden Bildung von Hydroxid-Brücken, wodurch freie Koordinationsstellen blockiert werden.

### **3.6 Hydrolyse von BNPP durch Hafnium(IV)- und Titan(IV)-Komplexe**

Analog zu den Messungen mit Zirconium-Komplexen wurden Untersuchungen zur BNPP-Hydrolyse durch Hafnium- und Titan-Komplexe durchgeführt. Die verwendeten Konzentrationen betragen hierbei 5 mM Metallsalz, 1 Äquivalent Ligand und  $2 \times 10^{-5}$  M BNPP bei 20°C und pH 4 bzw. 7. Als Liganden wurden TDCI und BHP eingesetzt. Die Komplex-Lösungen mit Ti(IV) wurden zunächst in Methanol hergestellt und anschließend mit Wasser auf die entsprechenden Konzentrationen verdünnt. Der Methanolgehalt in den Reaktionslösungen betrug 15 %.

Die Aktivität der Hafnium-Komplexe ist um den Faktor 3 bis 4 kleiner als die der entsprechenden Zirconiumkomplexe. So beträgt  $k_{\text{obs}}$  für Hf/TDCI  $9,0 (\pm 1,3) \times 10^{-4} \text{ s}^{-1}$  bei pH 4 ( $k_{\text{obs}}$  für Zr/TDCI =  $2,6 (\pm 0,4) \times 10^{-3} \text{ s}^{-1}$ ).

Für 1 mM Hf/BHP erhält man  $k_{\text{obs}} = 6,0 (\pm 0,9) \times 10^{-4} \text{ s}^{-1}$  (pH 4, für Zr/BHP:  $k_{\text{obs}} = 2,3 (\pm 0,4) \times 10^{-3} \text{ s}^{-1}$ ).

Mit den Titan-Komplexen kann man weder bei pH 4 noch bei pH 7 eine Erhöhung der Reaktionsgeschwindigkeit beobachten, diese Verbindungen sind inaktiv für die Hydrolyse von BNPP.

### 3.7 Spaltung von HPNP durch $ZrCl_4$

#### 3.7.1 Abhängigkeit der Spaltungsgeschwindigkeit von der $ZrCl_4$ -Konzentration

(Michaelis-Menten-Kinetik)

Zur Untersuchung der Konzentrationsabhängigkeit der Spaltungsgeschwindigkeit wurden Lösungen mit HPNP (0,02 mM) und unterschiedlichen Konzentrationen an  $ZrCl_4$  (0,1 mM bis 5 mM) eingesetzt. Der pH-Wert betrug 3,5, die Reaktionen wurden bei 20°C durchgeführt.

Die Auftragung der Anfangsgeschwindigkeiten gegen die Konzentration von  $ZrCl_4$  ergibt nur bis zu einer Zirconium-Konzentration < 0,8 mM den für eine Reaktion erster Ordnung erwarteten linearen Zusammenhang, bei höheren Konzentrationen steigt die Reaktionsgeschwindigkeit wesentlich langsamer an.

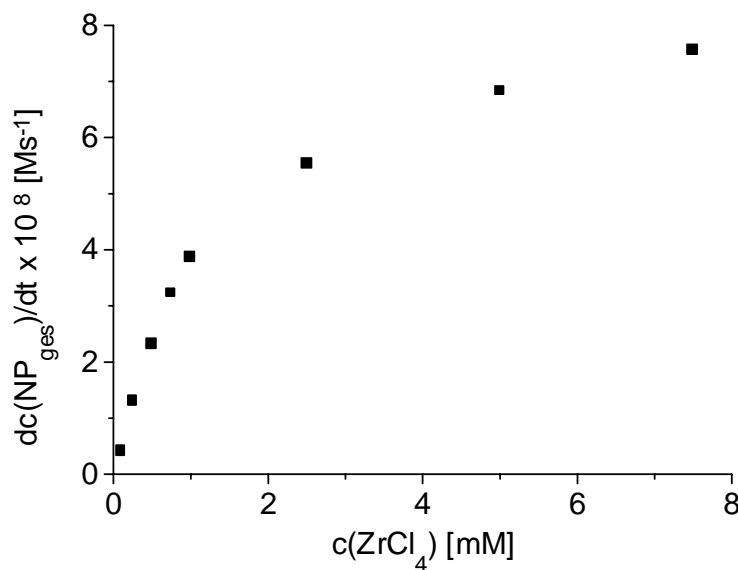


Abb. 3.12: Abhängigkeit der HPNP-Spaltungsgeschwindigkeit von der Konzentration an  $ZrCl_4$  (bei pH 3,5 und 20°C), Doppelbestimmung, maximale Abweichung 15 %

Das deutet darauf hin, daß in diesem Fall eine sogenannte Sättigungskinetik vorliegt. Es bildet sich in einer Gleichgewichtsreaktion ein Substrat-Metall-Addukt, welches irreversibel zu den Produkten weiterreagiert.



Bei einer Konzentrationserhöhung des Metalls (oder des Substrats) nimmt die Geschwindigkeit der Adduktbildung zu und das Gleichgewicht wird immer weiter auf die Seite des komplexierten Substrates verschoben. Im Sättigungsbereich wird das Substrat-Metall-Addukt quantitativ gebildet. Eine weitere Konzentrationserhöhung bewirkt dann keine Beschleunigung der Reaktionsgeschwindigkeit mehr, da der Zerfall des Addukts zu den Produkten zum geschwindigkeitsbestimmenden Schritt wird.

Im Fall eines solchen schnellen vorgelagerten Gleichgewichtes kann ein Zeitgesetz aufgestellt werden, welches dem von Michaelis und Menten für enzymkatalysierte Reaktionen gleicht. Die Adduktkonzentration wird hierbei als konstant angenommen, d.h. es liegt ein Fließgleichgewicht vor, in dem Bildungs- und Zerfallsgeschwindigkeit gleich sind.

$$\frac{dc}{dt} = \left( \frac{dc}{dt} \right)_{\max} \frac{[M]}{[M] + K_M} \quad (6)$$

Die Michaelis-Menten-Konstante  $K_M$  setzt sich aus den Gleichgewichtskonstanten der Gesamtreaktion zusammen.

$$K_M = \frac{k_2 + k_{\text{cat}}}{k_1} \quad (7)$$

Unter der Voraussetzung einer im Vergleich zur Spaltungsreaktion schnellen Adduktbildung ( $k_{\text{cat}} \ll k_2$ ), kann man  $K_M$  in die Gleichgewichtskonstante für das vorgelagerte Gleichgewicht umformen.

$$K_M \approx \frac{k_2}{k_1} = \frac{1}{K} \quad (8)$$

Insgesamt erhält man mit Hilfe der Beziehung

$$\left( \frac{dc}{dt} \right)_{\max} = k_{\text{cat}} [S]_0 \quad (9)$$

für die reziproke Geschwindigkeit

$$\frac{1}{dc/dt} = \frac{1}{k_{\text{cat}} [S]_0} + \frac{1}{K k_{\text{cat}} [S]_0 [M]} \quad (10)$$

Durch Auftragung der reziproken Geschwindigkeit gegen die reziproke Komplexkonzentration in einem Lineweaver-Burk-Diagramm kann man  $k_{cat}$  und  $K$  ermitteln. Als x-Achsenabschnitt erhält man die Komplexbildungskonstante  $K$  für den Metall-Substrat-Komplex und als y-Achsenabschnitt  $(k_{cat} [S]_0)^{-1}$ .

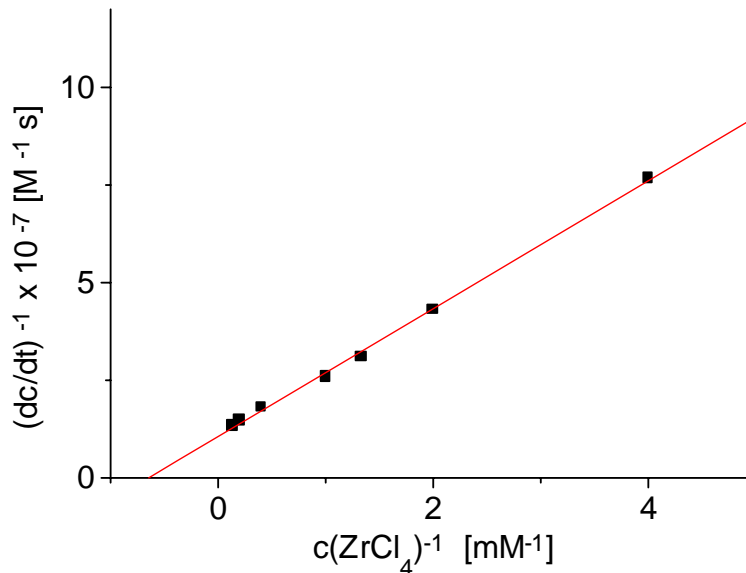


Abb 3.13: Lineweaver-Burk -Diagramm zur Ermittlung von  $k_{cat}$  und  $K$  für die Spaltung von HPNP durch  $\text{ZrCl}_4$  bei pH 3,5 und  $20^\circ\text{C}$ ; Doppelbestimmung, Abweichung  $< 15\%$

Für die Spaltung von HPNP wird ein linearer Zusammenhang zwischen der reziproken Spaltungsgeschwindigkeit und der reziproken  $\text{ZrCl}_4$ -Konzentration gefunden. Es liegt also ein Michaelis-Menten-Verhalten vor. Aus der Auftragung in einem Lineweaver-Burk-Diagramm erhält man für  $k_{cat}$  einen Wert von  $4,7 (\pm 0,7) \times 10^{-3} \text{ s}^{-1}$ . Die Komplexbildungskonstante  $K$  beträgt  $650 (\pm 100) \text{ M}^{-1}$ .



Eine andere Ursache für die nicht-lineare Zunahme der Reaktionsgeschwindigkeit bei Erhöhung der Metallionen-Konzentration (s. Abb. 3.12) könnte die zunehmende Bildung von Zirconium-Hydroxid-Aggregaten bei steigenden  $\text{ZrCl}_4$ -Konzentrationen sein. Eine solche Aggregat-Bildung könnte die Bindung des Substrates erschweren, so daß die Reaktionsgeschwindigkeit nicht mehr linear mit der Zirconium-Konzentration ansteigen würde.

Um diese mögliche Ursache für die beobachteten Meßergebnisse auszuschliessen wurden  $^1\text{H}$ -NMR-Untersuchungen mit verschiedenen Konzentrationen an  $\text{ZrCl}_4$  (2 bis 10 mM in  $\text{D}_2\text{O}$ , pD 3,5) und Natrium-Dimethylphosphat (DMP) durchgeführt. Das gegenüber der hydrolytischen Spaltung stabilere DMP diente dabei als Ersatz für das Substrat HPNP.

Man erhält einen breiten Peak für koordiniertes DMP ( $\delta = 3,7$  ppm) und ein scharfes Dublett für freies DMP ( $\delta = 3,5$  ppm). Aus dem Verhältnis zwischen freiem und gebundenem DMP läßt sich ein ungefährender Wert für die Komplexbildungskonstante für den Metall-Substrat-Komplex bestimmen, da gilt:

$$K = \frac{c(\text{Zr/DMP})}{c(\text{Zr})c(\text{DMP})}$$

Bei gleichen Konzentrationen an  $\text{ZrCl}_4$  und DMP (jeweils 2 mM) liegt ca. 32% des Substrates in gebundener Form vor, bei der doppelten Menge  $\text{ZrCl}_4$  sind ca. 50% DMP koordiniert (4 mM  $\text{ZrCl}_4$ , 2 mM DMP), das entspricht in beiden Fällen einer Komplexbildungskonstante von ca.  $400 \text{ M}^{-1}$ . Bei einem fünffachen Überschuß an  $\text{ZrCl}_4$  (10 mM  $\text{ZrCl}_4$ , 2 mM DMP) erhält man nur noch einen breiten Peak für die beiden sich überlagernden Signale ( $< 20\%$  freies DMP), was sich ebenfalls mit einer Komplexbildungskonstante von ca.  $400 \text{ M}^{-1}$  vereinbaren läßt.

K ist im untersuchten Konzentrationsbereich unabhängig von der  $\text{ZrCl}_4$ -Konzentration, was darauf hindeutet, daß nicht die Bildung von Zirconium-Hydroxid-Aggregaten die Ursache für die langsamere Zunahme der Reaktionsgeschwindigkeit bei steigender Zirconium-Konzentration ist, sondern eine Sättigungskinetik vorliegt, die nach dem Geschwindigkeitsgesetz von Michalis und Menten behandelt werden kann.

Vergleicht man die durch kinetische Analyse erhaltenen Werte von  $k_{\text{cat}}$  und  $K$  für die Spaltung der RNA-Modellverbindung HPNP durch Zr-Ionen mit denen für die Hydrolyse des DNA-Analogons BNPP, so erhält man ähnliche Werte ( $k_{\text{cat}} = 4,9 (\pm 0,7) \times 10^{-3} \text{ s}^{-1}$  und  $K = 770 (\pm 120) \text{ M}^{-1}$  für die Hydrolyse von BNPP<sup>[37]</sup> bzw.  $k_{\text{cat}} = 4,7 (\pm 0,7) \times 10^{-3} \text{ s}^{-1}$  und  $K = 650 (\pm 100) \text{ M}^{-1}$  für die Spaltung von HPNP).

Interessanterweise sind die gemessenen Geschwindigkeiten für die Spaltung von HPNP bis zu einer  $\text{ZrCl}_4$ -Konzentration von 1 mM etwa so groß wie die für die BNPP-Hydrolyse, bei höheren Metallkonzentrationen läuft die Reaktion mit BNPP sogar deutlich schneller ab.

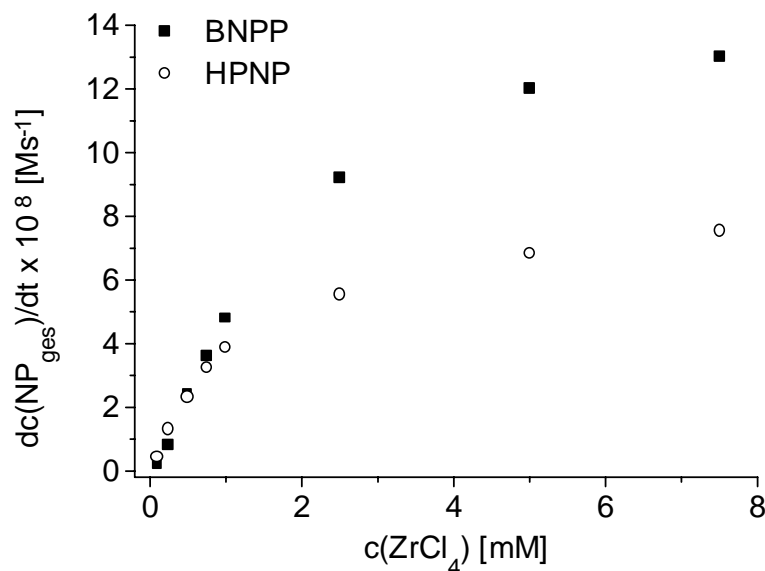


Abb. 3.14: Reaktionsgeschwindigkeiten für die Hydrolyse von BNPP<sup>[37]</sup> und die Spaltung von HPNP durch  $\text{ZrCl}_4$  bei pH 3,5 und 20°C, Doppelbestimmung, Abweichung < 15%

Dies deutet auf einen vergleichbaren Mechanismus hin. Offenbar erfolgt der nucleophile Angriff eines an Zirconium gebundenen Hydroxids auf das Phosphoratom des Phosphodiesters und kein intramolekularer Angriff der Alkoholatgruppe unter Bildung eines cyclischen Esters. Der letztgenannte Reaktionsmechanismus läuft in der Regel bei der Übergangsmetall-vermittelten HPNP-Hydrolyse ab, die um mehrere Zehnerpotenzen schneller verläuft als die Spaltung von BNPP durch Übergangsmetallionen.<sup>[53]</sup>

Weiteren Aufschluß über den Verlauf der Zr-vermittelten Spaltungsreaktion kann man mit Hilfe einer Produktanalyse durch <sup>31</sup>P-NMR-Spektren erhalten.

### 3.7.2 Produktanalyse durch $^{31}\text{P}$ -NMR-Spektroskopie

Um zu untersuchen, welche Zwischen- und Endprodukte bei der Spaltung von HPNP durch Zirconium-Verbindungen entstehen, wurden Lösungen von  $\text{ZrCl}_4$  und  $\text{Zr/TDCI}$  bei pH 3,5 mit HPNP umgesetzt.

Es wurden dabei folgende Konzentrationen verwendet: 15 mM HPNP, 30 mM  $\text{ZrCl}_4$  und 30 mM TDCI. Nach einer Reaktionszeit von 90 Minuten wurden 1,5 Äquivalenten EDTA zur Maskierung des Zirconiums zugegeben, anschließend wurde der pH-Wert mit NaOH auf pH 7,2 eingestellt und  $^{31}\text{P}$ -NMR-Spektren aufgenommen.

Zum Vergleich wurden bei pH 7,2 Spektren von HPNP ( $\delta = -2,9$  ppm), von  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  (in Gegenwart von  $\text{Zr/EDTA}$ ) und vom cyclischen Phosphodiester 1,2-Propylenphosphat (erzeugt in situ durch Cyclisierung von HPNP bei pH 10,5) gemessen.

Aus den  $^{31}\text{P}$ -NMR-Spektren kann man ablesen, daß bei der alkalischen Spaltung von HPNP fast ausschließlich der cyclische Phosphodiester entsteht ( $\delta = 19,9$  ppm). Setzt man diesen bei pH 3,5 mit  $\text{ZrCl}_4$  um, erhält man die Signale für beide Monoester ( $\delta = 5,1$  ppm für 2-Hydroxypropylphosphat bzw. 2,7 ppm für 1-Hydroxyisopropylphosphat) im Verhältnis von ca. 2:1. Auch die Monoester werden durch  $\text{ZrCl}_4$  gespalten, wie man an dem Signal für freies Phosphat ( $\delta = 4,2$  ppm) erkennen kann.

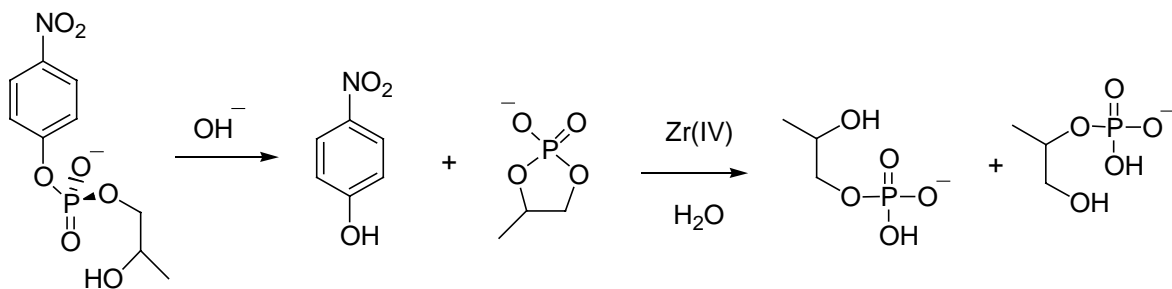


Abb. 3.15: Spaltung von HPNP, 1. Schritt: Umesterung, 2. Schritt: Hydrolyse des cyclischen Phosphodiesters.

Im Gegensatz dazu werden bei der Spaltung von HPNP durch  $ZrCl_4$  und durch den Zr/TDCI-Komplex die Signale von 2-Hydroxypropylphosphat ( $\delta = 5,1$  ppm) und von freiem Phosphat ( $\delta = 4,2$  ppm) erhalten (Abb. 3.16), 1-Hydroxyisopropylphosphat tritt nur in Spuren auf.

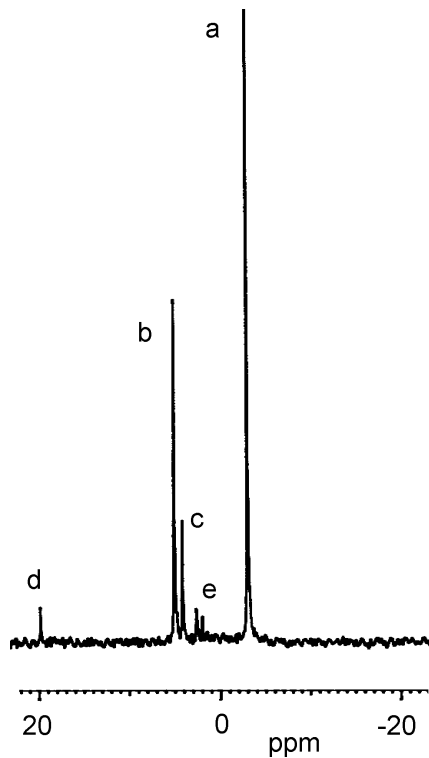


Abb. 3.16:  $^{31}P$ -NMR-Spektrum des Reaktionsgemisches der HPNP-Spaltung durch Zr/TDCI bei pH 3,5 und  $20^\circ C$ ; a) HPNP, b) 2-Hydroxypropylphosphat, c) Phosphat d) cyclischer Phosphodiester, e) 1-Hydroxyisopropylphosphat. Vor der Aufnahme des Spektrums wurden 1,5 Äquivalente EDTA zugegeben und der pH-Wert auf 7,2 eingestellt.

Sowohl die Ergebnisse der kinetischen Untersuchungen als auch die Produktanalyse durch die  $^{31}P$ -NMR-Spektroskopie deuten darauf hin, daß es sich bei der Zirconium-vermittelten Spaltung von HPNP um eine echte Hydrolysereaktion handelt.

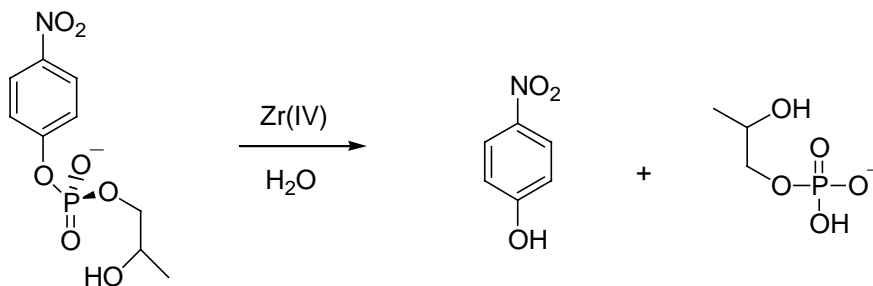


Abb. 3.17: Direkte Hydrolyse von HPNP durch Zirconium(IV)

Die üblicherweise beobachtete intramolekulare Umesterung des Substrates mit Bildung eines cyclischen Phosphodiesters als Zwischenprodukt läuft in diesem Fall als untergeordnete Nebenreaktion ab, wie man an den im  $^{31}\text{P}$ -NMR-Spektrum enthaltenen Signalen (Abb. 3.16) erkennen kann.