

## 4 Spaltung von DNA- und RNA-Dinucleotiden durch Zirconium(IV)

### 4.1 Allgemeine Vorgehensweise

Mit den für die Hydrolyse der DNA- und RNA-Modellverbindungen aktivsten Zirconium-Komplexen wurden Untersuchungen zur Spaltung des DNA-Dinucleotids Thymidylyl(3'-5')thymidin (TpT) und des RNA-Dinucleotids Uridinylyl(3'-5')uridin (UpU) durchgeführt.

Als Liganden wurden 1,3,5-Trideoxy-1,3,5-tris-(dimethylamino)-*cis*-inositol (TDCI), 1,3,5-Triamino-1,3,5-trideoxy-*cis*-inositol (TACI), 2,6-Bis(hydroxymethyl)pyridin (BHP), 4-Chlor-2,6-bis(hydroxymethyl)pyridin (Cl-BHP) und 1,3-Bis[tris(hydroxymethyl)-methylamino]-2-propanol (BTMP) eingesetzt. Zum Vergleich wurde  $ZrCl_4$  ohne Zusatz von Liganden verwendet.

Die Konzentrationen in den Reaktionslösungen betragen 5 mM  $ZrCl_4$ , 5 mM Ligand (2,5 mM im Fall von BTMP) und 0,1 mM Substrat (TpT bzw. UpU). Der pH-Wert wurde mit 0,1 N NaOH auf 4,0 bzw. auf 7,0 eingestellt; es wurde kein Puffer zugesetzt, da die Zirconium-Komplex-Lösungen selbst über eine hohe Pufferkapazität verfügen. In geeigneten Zeitabständen wurden Proben entnommen und die Reaktion durch Zugabe eines Überschusses des HPLC-Laufmittels (8 mM  $KH_2PO_4$  in Wasser mit 12 % Methanol) gestoppt. Der dabei entstehende Niederschlag (Zirconiumhydroxid bzw. Zirconiumphosphat) wurde abzentrifugiert, anschließend wurden die Konzentrationen der Hydrolyseprodukte durch HPLC-Messungen bestimmt.

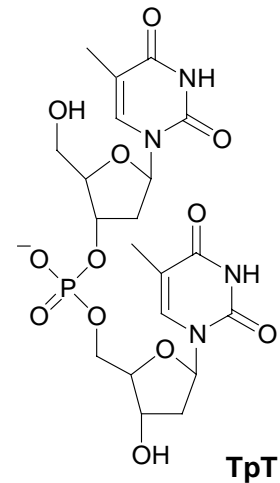
Bei der HPLC (High performance liquid chromatography) macht man sich die unterschiedlichen Affinitäten der zu trennenden Substanzen zum Säulenmaterial bzw. zum Elutionsmittel zunutze. Es wurde eine apolare reversed-phase C18-Säule verwendet, als polares Laufmittel diente eine Lösung von 8 mM  $KH_2PO_4$  in Wasser mit 12 % Methanol. Die Fließgeschwindigkeit betrug zwischen 0,3 und 1 ml/min. Die Bestimmung der Hydrolyseprodukte erfolgte über die Messung der UV-Absorption bei  $\lambda = 260$  nm.

Für die quantitative Auswertung wurde die Zunahme der Konzentration von Thymidin bzw. Uridin herangezogen.

## 4.2 Hydrolytische Spaltung von Thymidylyl(3'-5')thymidin (TpT)

### 4.2.1 TpT als Substrat

Thymidylyl(3'-5')thymidin (TpT) ist ein DNA-Dinucleotid. Es besteht aus zwei Thymidin-Einheiten, die über eine Phosphatgruppe in 3'→5'-Richtung miteinander verbunden sind. Solche Thymidin-Phosphatester-Bindungen sind auch in der DNA enthalten. Thymidin selbst ist aus der Pyrimidinbase Thymin und glykosidisch gebundener 2-Desoxy-D-ribose aufgebaut.



Die Reaktionsprodukte der Hydrolyse von TpT sind zunächst die Monoester Thymidin-3'-Phosphat (3'-TMP) bzw. Thymidin-5'-Phosphat (5'-TMP) und Thymidin (dT) sowie im weiteren Verlauf der Reaktion Thymidin und Phosphat.

Für die möglichen Produkte der Spaltung von TpT erhält man unter den oben beschriebenen Bedingungen bei einer Fließgeschwindigkeit von 1 ml/min folgende Retentionszeiten: für Thymidin 2,7 min und für die beiden Monoester, die nicht weiter aufgetrennt werden, 1,8 min. Die Laufzeit für nicht hydrolysiertes TpT beträgt 7,6 min.

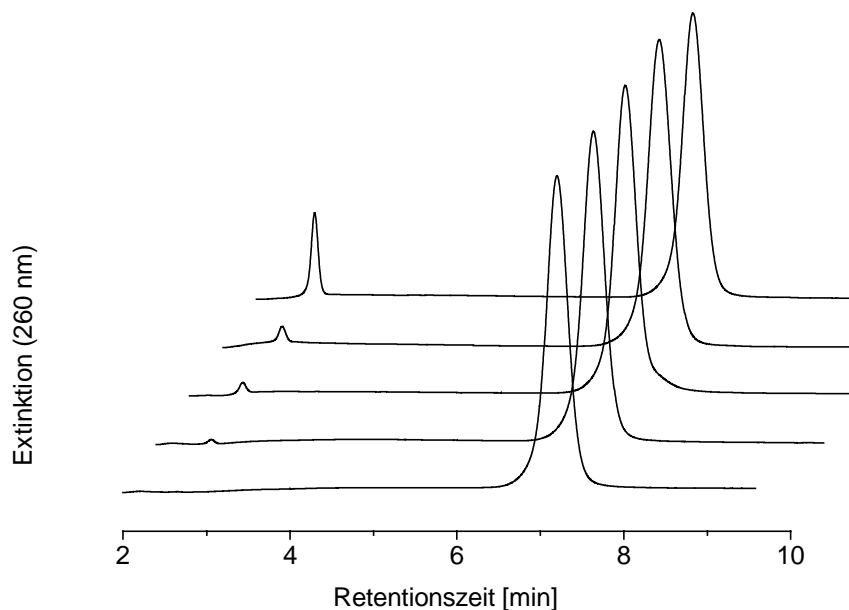


Abb. 4.1: HPLC-Elutionsprofile für die Spaltung von TpT (0,1 mM) durch Zr/TDCI (5 mM) bei pH 4,0 und 55°C nach (von vorne nach hinten) 0, 2, 4, 6 und 22 ½ Stunden Reaktionszeit

Man erkennt an der Abnahme der TpT-Konzentration und der gleichzeitigen Zunahme an Thymidin, daß das Dinucleotid in zwei Äquivalente Thymidin und Phosphat gespalten wird. Eine Anreicherung der Monoester ist nicht zu beobachten, diese reagieren schnell weiter zu Thymidin und Phosphat.

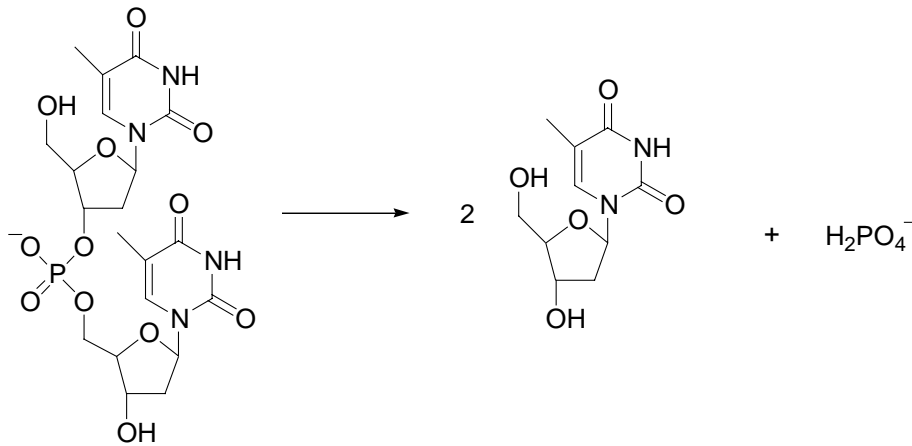


Abb. 4.2: Reaktionsgleichung der Hydrolyse von TpT

#### 4.2.2 Einfluß von Liganden und des pH-Wertes auf die Hydrolysegeschwindigkeit

Trägt man die Konzentration des entstehenden Thymidins gegen die Zeit auf, so kann man aus der Steigung der Ausgleichsgeraden die Reaktionsgeschwindigkeit für die TpT-Spaltung ermitteln. Zur Auswertung wurde jeweils die konstante Anfangsgeschwindigkeit bei einem Substratumsatz  $< 15\%$  herangezogen. Die Daten in Abb. 4.3 sind Mittelwerte einer Doppelbestimmung (maximale Abweichung  $20\%$ ).

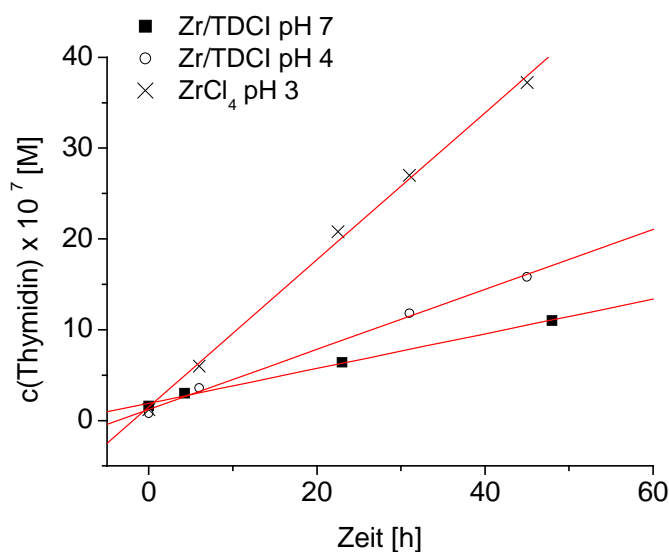


Abb. 4.3: Hydrolyse von TpT durch Zr/TDCI bei pH 4,0 und pH 7,0 sowie durch ZrCl<sub>4</sub> bei pH 3,0; Zunahme der Thymidin-Konzentration mit der Zeit  
Bedingungen: 5 mM ZrCl<sub>4</sub>, 5 mM TDCI, 0,1 mM TpT, 20°C

Die Geschwindigkeitskonstante pseudo-erster Ordnung für die Hydrolyse von TpT durch  $\text{ZrCl}_4$  bei pH 3,0 beträgt  $1,2 (\pm 0,2) \times 10^{-7} \text{ s}^{-1}$ . Das entspricht einer ca.  $10^9$ -fachen Beschleunigung gegenüber der Spontanhydrolyse der DNA-Phosphodiesterbindung, für die  $k_{\text{obs}}$  bei pH 7 und  $25^\circ\text{C}$  auf  $10^{-16} \text{ s}^{-1}$  geschätzt wird.<sup>[21]</sup>

Mit Ausnahme von TRIS wird durch Zugabe von Aminoalkoholen als Liganden die Reaktionsgeschwindigkeit verringert. So wird z.B. mit dem Komplex aus  $\text{ZrCl}_4$  und TDCI nur noch ein Drittel des Wertes von  $\text{ZrCl}_4$  erreicht ( $k_{\text{obs}} = 4,4 (\pm 0,9) \times 10^{-8} \text{ s}^{-1}$ ). Die Abnahme der Hydrolysegeschwindigkeit hat unter anderem elektrostatische Gründe, da die hohe positive Ladung des Zirconiumions durch die Liganden teilweise ausgeglichen und die Lewis-Acidität des Metallions herabgesetzt wird. Außerdem werden die freien Koordinationsstellen am Metallion durch den Liganden besetzt, so daß das Substrat nicht mehr gebunden werden kann.

Die Erhöhung des pH-Wertes bewirkt eine weitere Abnahme der Hydrolysegeschwindigkeit. Mit TDCI als Ligand beträgt  $k_{\text{obs}}$  bei pH 7,0 nur noch  $3,0 (\pm 0,6) \times 10^{-8} \text{ s}^{-1}$ , das entspricht einer Verringerung der Reaktionsgeschwindigkeit um ca. 30 % verglichen mit dem Wert bei pH 4,0.

Die Ursache für die Abnahme der Reaktionsgeschwindigkeit bei steigendem pH-Wert liegt wahrscheinlich in der Bildung hydroxoverbrückter, mehrkerniger Komplexe, die für die Hydrolyse von TpT nicht aktiv sind.

Die Ergebnisse für die Spaltung von TpT durch die Zirconium-Komplexe sind in Tabelle 4.1 aufgeführt.

Mit BHP und Cl-BHP konnten keine Werte für  $k_{\text{obs}}$  bestimmt werden, da die Peaks für diese Liganden sich mit denen für Thymidin bzw. TpT überlagern. Daher konnten die Flächen nicht genau integriert werden und die Konzentration an Thymidin konnte nicht ermittelt werden. Auch durch Variationen in der Zusammensetzung des Laufmittels oder dessen Ersatz durch 0,1 M Triethylammoniumacetat in Wasser mit 10 % Acetonitril konnten die Retentionszeiten nicht so verändert werden, daß man getrennte Signale für die Liganden und die Hydrolyseprodukte erhielt.

### 4.2.3 Temperaturabhängigkeit der TpT-Hydrolyse

Neben den Meßreihen bei Raumtemperatur wurden auch Untersuchungen bei 37°C und bei 55°C durchgeführt, um den Einfluß der Temperatur auf die Reaktionsgeschwindigkeit festzustellen.

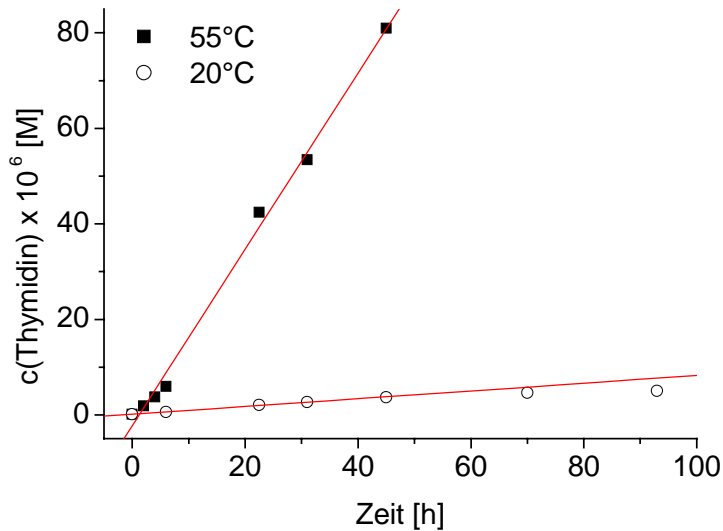


Abb. 4.4: Hydrolyse von TpT (0,1 mM) durch ZrCl<sub>4</sub> (5 mM) bei pH 3,0 und unterschiedlichen Temperaturen, Doppelbestimmung, maximale Abweichung 20%

Erhöht man die Temperatur von 20°C auf 37°C, so nimmt die Hydrolysegeschwindigkeit um den Faktor 2 bis 3 zu. Für den Komplex aus ZrCl<sub>4</sub> und TDCI erhält man unter physiologischen Bedingungen (pH 7, 37°C) einen Wert für  $k_{\text{obs}}$  von  $6,7 (\pm 1,3) \times 10^{-8} \text{ s}^{-1}$ , mit TACI als Ligand beträgt  $k_{\text{obs}}$  dann  $5,9 (\pm 1,2) \times 10^{-8} \text{ s}^{-1}$ . Eine weitere Steigerung der Temperatur auf 55°C bewirkt bei pH 7 erneut eine Zunahme der Aktivität um den Faktor 2 bis 3, die Reaktionsgeschwindigkeit nimmt bei diesem pH-Wert linear mit der Temperatur zu (s. Tabelle 4.1).

Im Gegensatz dazu steigt sowohl für ZrCl<sub>4</sub>-Lösungen als auch für die TDCI- und TACI-Komplexe die Spaltungsgeschwindigkeit bei pH 3 bis 4 bei einer Temperaturerhöhung auf 55°C auf das 20 bis 30-fache des Wertes bei 20°C. Die Geschwindigkeitskonstanten pseudoerster Ordnung für die Zirconium-Komplexe von TDCI und TACI sind gleich groß ( $k_{\text{obs}} = 1,1 (\pm 0,2) \times 10^{-6} \text{ s}^{-1}$ , pH 4).

Eine mögliche Ursache für den höheren Temperatureinfluß bei niedrigerem pH-Wert liegt darin, daß im sauren pH-Bereich die Bildung von Zirconium-Hydroxid-Aggregaten nicht so stark ausgeprägt ist wie im neutralen. Bei einer Temperaturerhöhung brechen diese Aggregate aus Entropiegründen auseinander, was die Konzentration der für die Reaktion aktiven, nicht vollständig hydroxyverbrückten Zirconiumionen erhöht. Dieser Effekt führt zu einem starken Anstieg der Reaktionsgeschwindigkeit bei höheren Temperaturen.

Alle gemessenen Ergebnisse sind in Tabelle 4.1 angegeben:

	pH	$k_{\text{obs}} [\text{s}^{-1}]$		
		T = 20°C	T = 37°C	T = 55°C
5 mM ZrCl <sub>4</sub>	3,0	$1,2 \times 10^{-7}$	$2,2 \times 10^{-7}$	$2,3 \times 10^{-6}$
5 mM ZrCl <sub>4</sub> / 10 mM TRIS	4,0	----	----	$2,7 \times 10^{-6}$
5 mM ZrCl <sub>4</sub> / 5 mM TACI	4,0	$3,7 \times 10^{-8}$	----	$1,1 \times 10^{-6}$
5 mM ZrCl <sub>4</sub> / 5 mM TACI	7,0	----	$5,9 \times 10^{-8}$	----
5 mM ZrCl <sub>4</sub> / 5 mM TDCI	4,0	$4,4 \times 10^{-8}$	----	$1,1 \times 10^{-6}$
5 mM ZrCl <sub>4</sub> / 5 mM TDCI	7,0	$3,0 \times 10^{-8}$	$6,7 \times 10^{-8}$	----
5 mM ZrCl <sub>4</sub> / 5 mM TDCI	5,9	----	----	$2,0 \times 10^{-7}$
5 mM ZrCl <sub>4</sub> / 2,5 mM BTMP	4,0	----	----	$7,4 \times 10^{-7}$
5 mM ZrCl <sub>4</sub> / 2,5 mM BTMP	7,0	$2,6 \times 10^{-8}$	$4,5 \times 10^{-8}$	$8,9 \times 10^{-8}$

$c(\text{TpT}) = 0,1 \text{ mM}$

Alle Ergebnisse sind Mittelwerte einer Doppelbestimmung, maximale Abweichung 20%

Tabelle 4.1:  $k_{\text{obs}}$  für die Hydrolyse von TpT durch Zirconium-Komplexe

#### 4.2.4 Hydrolyse von TpT durch Cer(IV)-Komplexe

Cer(IV)-Komplexe und besonders Cer(IV)-Hydroxid-Gele zeigen hohe Aktivitäten für die Spaltung von DNA-Dinucleotiden.<sup>[46-50]</sup>

Daher wurden Untersuchungen zur TpT-Hydrolyse durch die Cer-Komplexe von TACI, TDCI und BTMP durchgeführt und die ermittelten Aktivitäten mit denen der entsprechenden Zirconium-Verbindungen verglichen. Die eingesetzten Konzentrationen betragen dabei 5 mM (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>[Ce(NO<sub>3</sub>)<sub>6</sub>], 5 mM Ligand (2,5 mM BTMP) und 0,1 mM TpT.

TpT wird durch die Cer-Komplexe bei 20°C ca. dreimal so schnell gespalten wie durch die jeweiligen Zirconium-Komplexe.

Der Temperatureinfluß ist im Fall von Ce(IV) größer als bei Zr(IV), so ist die Reaktionsgeschwindigkeit mit den Cer-Komplexen bei 55°C fünf- bis zehnmal so hoch wie mit den Zirconium-Verbindungen.

Die gefundenen Werte für  $k_{\text{obs}}$  sind mit denen für andere Ce(IV)-Komplexe vergleichbar.<sup>[50]</sup>

	$k_{\text{obs}} [\text{s}^{-1}]$		
	T	$\text{M}^{4+}: \text{Ce}^{4+}$	$\text{Zr}^{4+}$
5 mM $\text{M}^{4+}$ / 5 mM TDCI	20°C	$1,1 (\pm 0,2) \times 10^{-7}$	$3,0 (\pm 0,6) \times 10^{-8}$
	37°C	$2,8 (\pm 0,6) \times 10^{-7}$	$6,7 (\pm 1,3) \times 10^{-8}$
	55°C	$1,0 (\pm 0,2) \times 10^{-6}$	$2,0 (\pm 0,4) \times 10^{-7}$
5 mM $\text{M}^{4+}$ / 5 mM TACI	20°C	$9,5 (\pm 1,9) \times 10^{-8}$	----
	37°C	$2,6 (\pm 0,5) \times 10^{-7}$	$5,9 (\pm 1,2) \times 10^{-8}$
5 mM $\text{M}^{4+}$ / 2,5 mM BTMP	20°C	$5,7 (\pm 1,1) \times 10^{-8}$	$2,6 (\pm 0,5) \times 10^{-8}$
	37°C	$2,0 (\pm 0,4) \times 10^{-7}$	$4,5 (\pm 0,9) \times 10^{-8}$
	55°C	$1,1 (\pm 0,2) \times 10^{-6}$	$8,9 (\pm 1,8) \times 10^{-8}$

$c(\text{TpT}) = 0,1 \text{ mM}$ , pH 7

Alle Ergebnisse sind Mittelwerte einer Doppelbestimmung, maximale Abweichung 20%

Tabelle 4.2:  $k_{\text{obs}}$  für die Hydrolyse von TpT durch Zirconium- und Cer-Komplexe

Auch wenn es Hinweise darauf gibt, daß die Spaltung von isolierter DNA durch Ce(IV) bei  $\text{pH} > 3$  nicht über einen Oxidations- oder Radikalmechanismus sondern als Hydrolyse verläuft,<sup>[53]</sup> könnte die Verwendung des reduktionsempfindlichen Ce(IV) in DNA-Präparationen aus biologischem Material zu Schwierigkeiten durch Nebenreaktionen führen. Mit nicht redoxaktiven Zr(IV)-Komplexen sind solche Komplikationen auszuschließen.

### 4.3 Spaltung größerer DNA-Bruchstücke

Es wurden Untersuchungen zur Hydrolyse größerer DNA-Oligonucleotide ( $\text{T}_8$  bzw.  $\text{T}_{12}$ ) durch  $\text{ZrCl}_4$  durchgeführt.

Die kinetische Analyse der Reaktion bereitet jedoch Schwierigkeiten, da bei Zirconiumkonzentrationen  $> 1 \text{ mM}$  Niederschläge durch die Bildung von Zr-DNA-Aggregaten entstehen.

Führt man mit den Reaktionsgemischen HPLC-Untersuchungen durch, erhält man außerdem sehr breite Banden im Elutionsprofil, so daß die Konzentrationen der einzelnen Komponenten nicht ermittelt werden können.

Im Gegensatz dazu wurde durch Gelelektrophorese bereits gezeigt, daß Plasmid-DNA durch  $\text{ZrCl}_4$  gespalten werden kann: nach einer Inkubationszeit von 2 Tagen ist das Substrat nicht mehr nachweisbar.<sup>[107]</sup> Dies ist ein Hinweis darauf, daß auch größere DNA-Stränge durch Zr(IV) hydrolysiert werden können.

## 4.4 Spaltung von RNA-Dinucleotiden

### 4.4.1 Uridinyl(3'-5')Uridin (UpU) als Substrat

Bei Uridinyl(3'-5')Uridin (UpU) handelt es sich um ein RNA-Dinucleotid. Es besteht aus zwei Uridin-Einheiten, die durch eine Phosphatester-Brücke miteinander verknüpft sind. Uridin ist aus der Pyrimidinbase Uracil und dem Zucker Ribose aufgebaut. Im Gegensatz zum DNA-Dinucleotid TpT, in dem 2-Desoxy-Ribose vorliegt, enthält UpU zusätzliche 2'-Hydroxygruppen. Die Spaltung von RNA und RNA-Dinucleotiden läuft daher nach einem anderen Mechanismus ab als die Hydrolyse von DNA. Im ersten Schritt erfolgt ein intramolekularer Angriff der 2'-Hydroxygruppe unter Bildung eines cyclischen Phosphodiesters. Dieser wird dann im weiteren Verlauf der Reaktion zu den Monoestern und eventuell auch zu den Nucleotiden und Phosphat hydrolysiert.

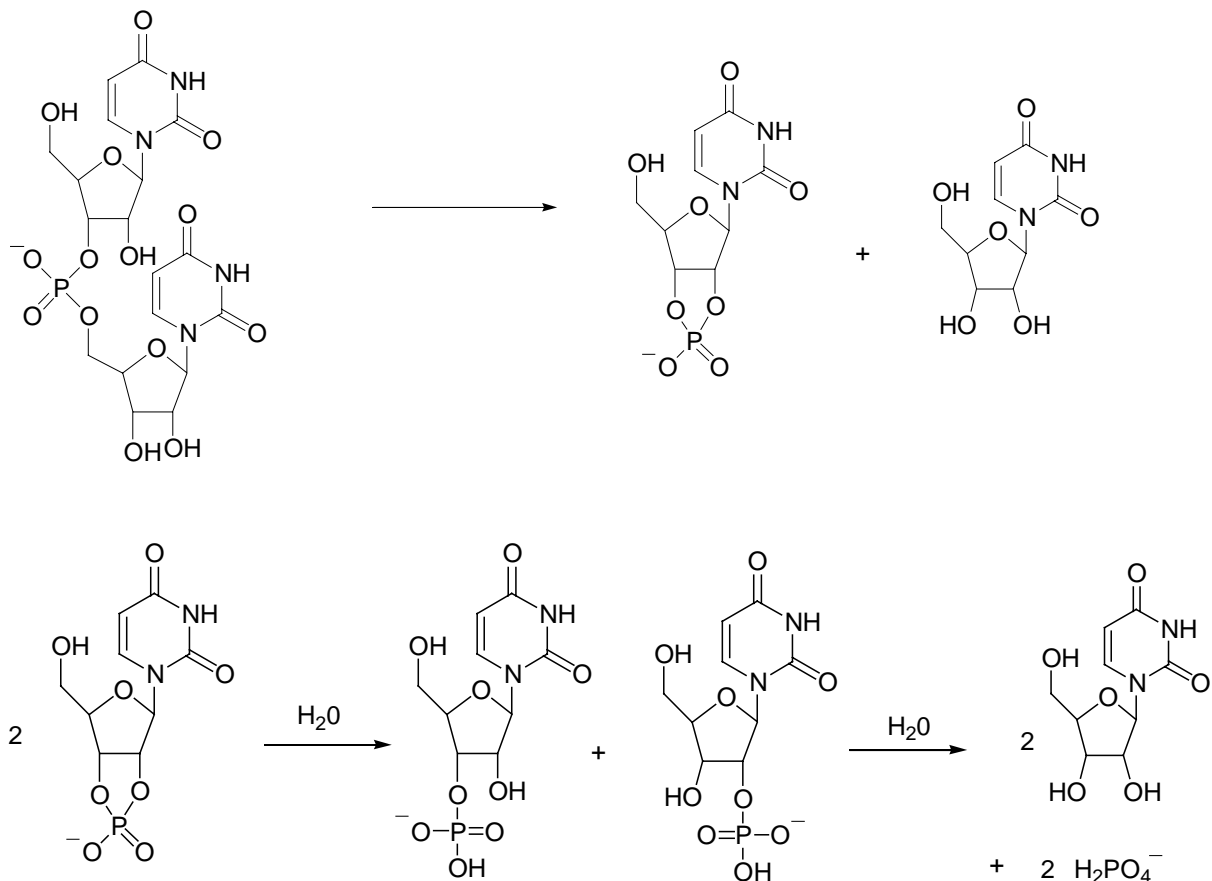


Abb. 4.5: Spaltung von UpU: 1. Schritt: Umesterung zu 2',3'-cUMP, 2. Schritt: Hydrolyse von 2',3'-cUMP

Im Fall von UpU sind die möglichen Hydrolyseprodukte der cyclische Phosphodiester Uridin-2',3'-cyclomonophosphat (2',3'-cUMP), die Monoester 2'- und 3'-Uridinmonophosphat, Uridin und Phosphat.



#### 4.4.2 Spaltung von UpU durch Zirconium(IV)

Die kinetischen Untersuchungen zur Spaltung von UpU durch Zr(IV)-Ionen und –Komplexe wurden wie in Kapitel 4.1 beschrieben bei 20°C und pH-Werten von 3,0 bzw. 7,0 durchgeführt.

Als Liganden wurden TDCI und BTMP verwendet, die Konzentrationen betragen zwischen 0,2 und 5 mM ZrCl<sub>4</sub>, 5 mM bzw. 2,5 mM Ligand und 0,1 mM UpU.

Betrachtet man die HPLC-Profile der Reaktionsgemische nach unterschiedlichen Reaktionszeiten, beobachtet man eine Abnahme der UpU-Konzentration und eine Zunahme der Uridin-Konzentration. Die Retentionszeiten für diese beiden Komponenten betragen 4,9 Minuten bzw. 6,9 Minuten. Andere Peaks für die möglichen Zwischenprodukte 2',3'-cUMP oder die Uridinmonophosphate werden nicht erhalten. Anscheinend reagieren diese schnell weiter zu den Endprodukten der Hydrolyse Uridin und Phosphat.

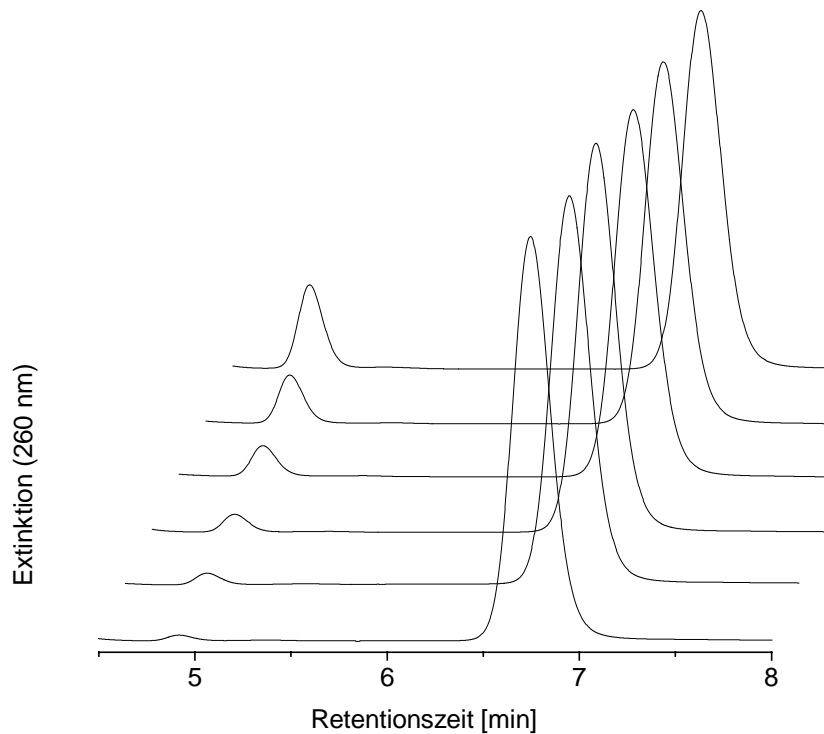


Abb. 4.6: HPLC-Elutionsprofile für die Spaltung von UpU durch ZrCl<sub>4</sub> nach (von vorne nach hinten) 0, 30, 50, 120, 240 und 360 Minuten Reaktionszeit  
Bedingungen: 5 mM ZrCl<sub>4</sub>, 0,1 mM UpU bei pH 3 und 20°C

Für die quantitative Auswertung wurde die Konzentration des entstehenden Uridins herangezogen, trägt man diese gegen die Reaktionszeit auf, kann man aus der Steigung der Ausgleichsgeraden die Geschwindigkeitskonstanten pseudo-erster Ordnung ( $k_{\text{obs}}$ ) bestimmen. Zur Berechnung von  $k_{\text{obs}}$  wurde die konstante Anfangsgeschwindigkeit bei einem Umsatz < 15% verwendet.

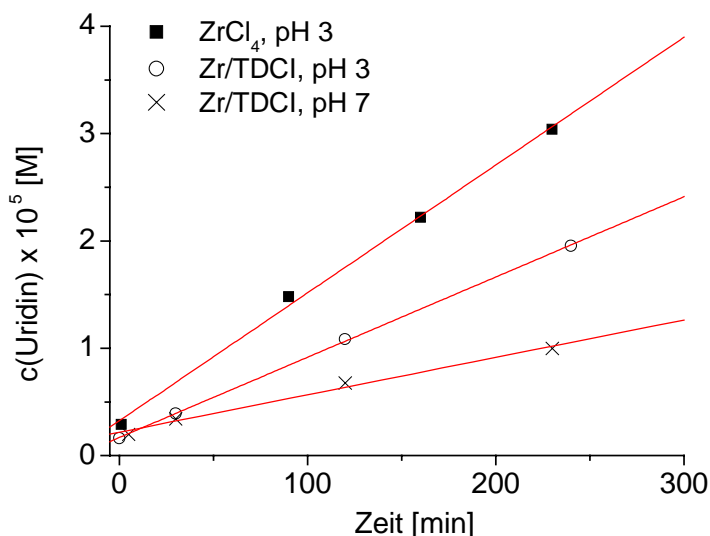


Abb. 4.7: Spaltung von UpU (0,1 mM) durch ZrCl<sub>4</sub> bzw. durch Zr/TDCI (5 mM), Zunahme der Uridinkonzentration mit der Zeit, Doppelbestimmung, maximale Abweichung 20%

Für die Spaltung von UpU (0,1 mM) durch ZrCl<sub>4</sub> (5 mM) bei pH 3,0 beträgt  $k_{\text{obs}}$   $9,5 (\pm 1,9) \times 10^{-6} \text{ s}^{-1}$ . Durch die Zugabe von TDCI als Ligand sinkt die Reaktionsgeschwindigkeit um ca. 30 % ( $k_{\text{obs}} = 6,5 (\pm 1,3) \times 10^{-6} \text{ s}^{-1}$ ). Bei Erhöhung des pH-Wertes auf pH 7,0 wird die Aktivität nochmals halbiert ( $k_{\text{obs}} = 2,9 (\pm 0,6) \times 10^{-6} \text{ s}^{-1}$ ). Alle ermittelten Werte sind in Tabelle 4.3 aufgeführt:

	pH	$k_{\text{obs}} (\text{s}^{-1})$
5 mM ZrCl <sub>4</sub>	3,0	$9,5 (\pm 1,9) \times 10^{-6}$
5 mM ZrCl <sub>4</sub> / 5mM TDCI	3,0	$6,5 (\pm 1,3) \times 10^{-6}$
5 mM ZrCl <sub>4</sub> / 5mM TDCI	7,0	$2,9 (\pm 0,6) \times 10^{-6}$
5 mM ZrCl <sub>4</sub> / 2,5mM BTMP	7,0	$1,5 (\pm 0,3) \times 10^{-6}$
0,2 mM ZrCl <sub>4</sub>	3,0	$1,3 (\pm 0,3) \times 10^{-6}$
0,4 mM ZrCl <sub>4</sub>	3,0	$2,6 (\pm 0,5) \times 10^{-6}$
1 mM ZrCl <sub>4</sub>	3,0	$5,4 (\pm 1,1) \times 10^{-6}$
-----	3,0	$2,8 (\pm 0,6) \times 10^{-8}$
-----	7,0	$5,1 (\pm 1,0) \times 10^{-8}$

0,1 mM UpU, 20°C, Doppelbestimmung, maximale Abweichung 20%

Tabelle 4.3: Geschwindigkeitskonstanten pseudo-erster Ordnung für die Spaltung von UpU durch ZrCl<sub>4</sub> und durch Zirconium-Komplexe

Um die Konzentrationsabhängigkeit der UpU-Spaltung zu untersuchen, wurden Messungen bei verschiedenen  $\text{ZrCl}_4$ -Konzentrationen zwischen 0,2 und 5 mM durchgeführt, die Reaktionsbedingungen betragen dabei pH 3,0 und 20°C. Trägt man die ermittelten Reaktionsgeschwindigkeiten gegen die Zirconium-Konzentration auf, so erhält man nur für Konzentrationen  $< 1$  mM  $\text{ZrCl}_4$  den für eine Reaktion erster Ordnung erwarteten linearen Zusammenhang. Dies deutet auf eine Sättigungskinetik hin, bei der sich in einem schnellen, vorgelagerten Gleichgewicht ein Substrat-Metall-Addukt bildet, welches sich im geschwindigkeitsbestimmenden Schritt der Reaktion zu den Produkten umsetzt.

Eine Auftragung der reziproken Geschwindigkeit gegen die reziproke  $\text{ZrCl}_4$ -Konzentration ergibt einen linearen Zusammenhang, die Reaktion kann nach Michalis-Menten behandelt werden. Aus dem x-Achsenabschnitt kann die Komplexbildungs-konstante für das Substrat-Metall-Addukt ( $K$ ) und aus dem y-Achsenabschnitt die Geschwindigkeitskonstante für die Spaltung des an Zr(IV) koordinierten UpU ( $k_{\text{cat}}$ ) bestimmt werden (s. Kapitel 3.7.1).

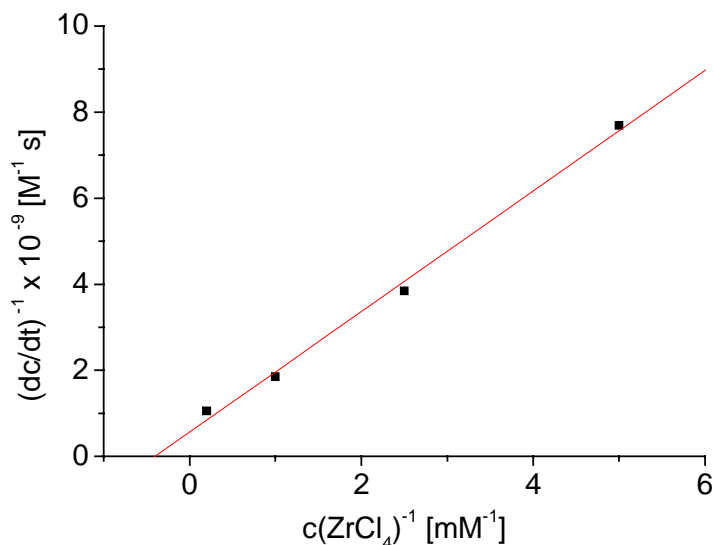


Abb. 4.8: Lineweaver-Burk-Diagramm zur Ermittlung von  $k_{\text{cat}}$  und  $K$  für die Spaltung von UpU (0,1 mM) durch  $\text{ZrCl}_4$  bei pH 3,0 und 20°C; Doppelbestimmung, Abweichung  $< 20\%$

Für die Spaltung von UpU durch  $\text{ZrCl}_4$  ist  $K = 400 (\pm 80) \text{ M}^{-1}$  und  $k_{\text{cat}} = 1,8 (\pm 0,4) \times 10^{-5} \text{ s}^{-1}$ .  $k_{\text{cat}}$  ist damit ca. 300-mal kleiner als die Geschwindigkeitskonstante für die Spaltung des aktivierten RNA-Analogons HPNP ( $k_{\text{cat}} = 4,7 (\pm 0,7) \times 10^{-3} \text{ s}^{-1}$ ).

Vergleicht man die gemessenen  $k_{\text{obs}}$ -Werte für die Spaltung von UpU mit denen der Hydrolyse des DNA-Dinucleotids TpT, stellt man fest, daß die Reaktion mit UpU ca. 100-mal schneller abläuft als mit TpT.

Die Ursache hierfür könnte sein, daß die Spaltung des RNA-Dinucleotids nach dem in Kapitel 4.4.1 beschriebenen Umesterungsmechanismus abläuft. Die 2'-OH-Gruppe der Ribose unterstützt in diesem Fall die Hydrolyse, so daß die Reaktion stark beschleunigt wird. Als Zwischenstufe wird ein cyclischer Phosphodiester gebildet, der schnell weiterhydrolysiert werden kann. Der intramolekulare Mechanismus ist wahrscheinlicher als im Fall von HPNP, da die 2'-OH-Gruppe des Dinucleotids durch Integration von C2 in den Fünfring bezüglich einer Wechselwirkung mit der Phosphatgruppe stärker präorganisiert ist. Andererseits könnte aber auch - wie bei der Spaltung der Modellverbindung HPNP (s. Kap. 3.7) - eine echte Hydrolysereaktion ablaufen, wobei die 2'-OH-Gruppe den Phosphodiester durch intramolekulare Wasserstoffbrückenbindung aktiviert.

#### 4.4.3 Hydrolyse von Adenosin-2',3'-cyclomonophosphat (2',3'-cAMP)

Zur Bestimmung der Hydrolysegeschwindigkeit von cyclischen Phosphodiestern, die als Zwischenprodukte bei der Spaltung von RNA entstehen, wurde Adenosin-2',3'-cyclomonophosphat (2',3'-cAMP) als Substrat verwendet. Die Reaktionslösungen enthielten 1 mM  $ZrCl_4$ , 1 mM Ligand und 0,05 mM 2',3'-cAMP. Die Hydrolysereaktionen wurden bei 20°C und pH 3,0 bzw. pH 7,0 durchgeführt. Innerhalb von 5 Minuten wurden mehrere Proben entnommen und die Reaktion durch Zugabe von 5 Äquivalenten EDTA gestoppt. Die jeweilige Zusammensetzung der Lösungen wurde durch HPLC-Messungen analysiert.

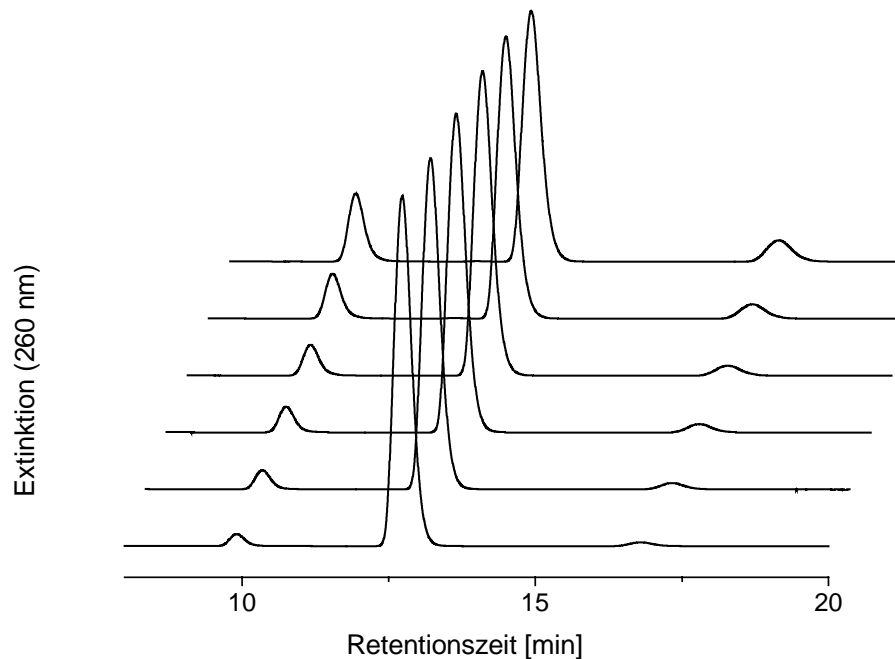


Abb.4.9: HPLC-Elutionsprofile für die Hydrolyse von 2',3'-cAMP durch Zr/TDCI nach (von vorne nach hinten) einer Reaktionszeit von 15, 30, 45, 60, 120 und 300 Sekunden  
Reaktionsbedingungen: 1 mM Zr/TDCI, 0,05 mM 2',3'-cAMP, pH 7, 20°C

Die 2',3'-cAMP-Konzentration nimmt während der Hydrolysereaktion ab, während die Konzentration der beiden Monoester 2'- und 3'-Adenosinmonophosphat steigt. 2'-AMP und 3'-AMP reagieren zu Adenosin und Phosphat weiter. Die Retentionszeiten betragen 10,0 Minuten für die Monophosphate, die unter den verwendeten Bedingungen nicht weiter aufgetrennt werden, 17,3 Minuten für Adenosin und 13,1 Minuten für 2',3'-cAMP.

Die quantitative Auswertung erfolgt über die Abnahme der 2',3'-cAMP-Konzentration.

Für die Hydrolyse von 2',3'-cAMP durch  $ZrCl_4$  bei pH 3,0 und 20°C erhält man einen Wert für  $k_{obs}$  von  $8,0 (\pm 1,6) \times 10^{-3} s^{-1}$ , das entspricht einer Beschleunigung um Faktor  $4 \times 10^6$ . Mit Zr/TDCI beträgt  $k_{obs}$   $2,0 (\pm 0,4) \times 10^{-3} s^{-1}$  bei pH 7,0 und 20°C. Durch den Komplex aus BTMP und  $ZrCl_4$  wird 2',3'-cAMP unter diesen Bedingungen etwas langsamer hydrolysiert ( $k_{obs} = 8,0 (\pm 1,6) \times 10^{-4} s^{-1}$ ).

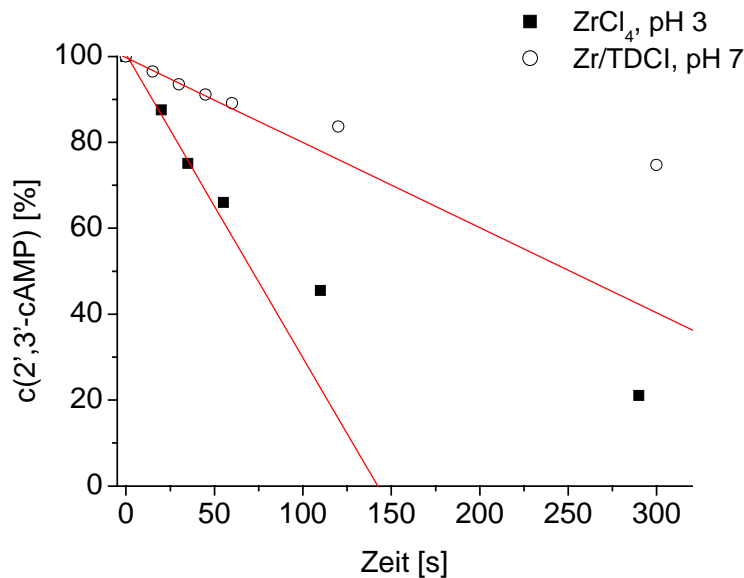


Abb. 4.10: Hydrolyse von 2',3'-cAMP durch  $ZrCl_4$  bzw. Zr/TDCI; Abnahme der 2',3'-cAMP-Konzentration mit der Zeit; 100% 2',3'-cAMP entspricht der Anfangskonzentration (0,1 mM); die Ausgleichsgeraden (rot) beziehen sich auf die ersten 3 Meßpunkte (ca. 25% Umsatz) für  $ZrCl_4$ , bzw. auf die ersten 5 Meßpunkte (ca. 10 % Umsatz) für Zr/TDCI. Bedingungen: 1 mM  $ZrCl_4$  bzw. Zr/TDCI, 0,1 mM 2',3'-cAMP, 20°C

Aus dem annähernd konstanten 2:1-Verhältnis der Reaktionsprodukte Monoester und Adenosin (Abb. 4.9) läßt sich schließen, daß die Spaltung der Monophosphate 2'- und 3'-AMP durch Zr(IV) ähnlich schnell verläuft wie die Hydrolyse des cyclischen Phosphodiester 2',3'-cAMP.

Bei der Spaltung von UpU durch Zirconium-Komplexe entsteht vermutlich ein cyclischer Phosphodiester (2',3'-cUMP) als Zwischenprodukt. Dieser reagiert im weiteren Verlauf der Reaktion zu den 2'- bzw. 3'-Uridinmonophosphat und schließlich zu den Uridin und Phosphat. Nimmt man an, daß die Hydrolyse von 2',3'-cUMP mit vergleichbarer Geschwindigkeit abläuft wie die von 2',3'-cAMP,<sup>[84]</sup> ist die Reaktion etwa um den Faktor 1000 schneller als die Spaltung von UpU, so daß der cyclische Phosphodiester nicht durch HPLC-Messungen nachgewiesen werden kann.

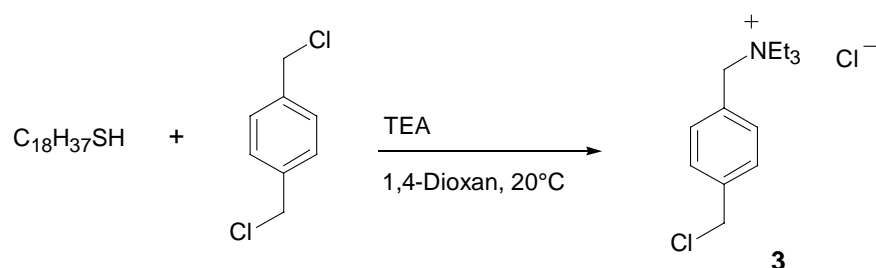
## 4.5 Vorarbeiten für die Synthese von Oligonucleotid-Konjugaten

### 4.5.1 Erste Vorversuche in Lösung

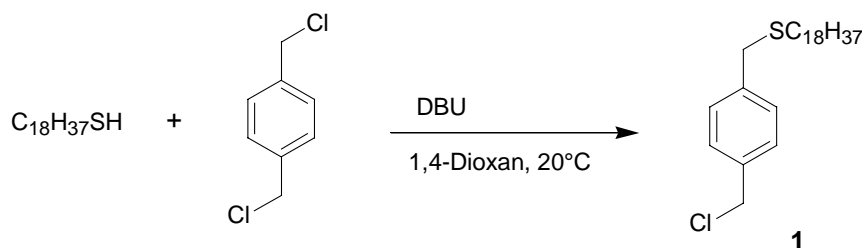
Die Darstellung von Oligonucleotid-Konjugaten aus hydrolytisch aktiven Metallkomplexen und „antisense“-Oligonucleotiden, die sequenzspezifisch an die zu spaltende Ziel-DNA bzw. -RNA anbinden, ist ein erster Schritt für die Entwicklung von künstlichen Nucleasen (siehe Kapitel 1.3).

In Hinblick auf die geplante Synthese solcher Biokonjugate aus DNA- bzw. PNA-Oligonucleotiden und Zirconium-Komplexen wurden erste Versuche in Lösung durchgeführt. Eine Möglichkeit, DNA mit Chelatliganden zu funktionalisieren, ist z. B. der Einsatz eines bifunktionellen Bis(Alkylhalogenid)-Linkers, der zunächst mit einer 5'-Thiol-modifizierten DNA und anschließend mit einer Aminogruppe des Liganden zur Reaktion gebracht wird.

Anstelle eines Oligonucleotids mit Thiolinker wurde Octadecylmercaptan verwendet. Dieses wurde mit einem Überschuß  $\alpha,\alpha'$ -Dichlor-*p*-xylyl umgesetzt. Als Base diente zunächst Triethylamin (TEA), jedoch erhält man unter diesen Bedingungen nicht das gewünschte Produkt sondern überwiegend das Triethylammoniumsalz von  $\alpha,\alpha'$ -Dichlor-*p*-xylyl (**3**):

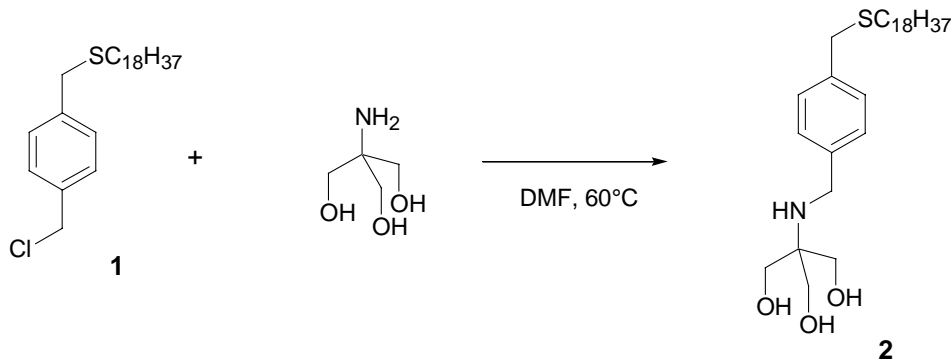


Mit 1,8-Diazabicyclo[5.4.0.]undec-7-en (DBU) als Base kann unter milden Bedingungen die Verbindung **1** hergestellt werden:



Eine Alkylierung der Nucleobasen bei der Synthese der entsprechenden Oligonucleotidverbindungen kann experimentell ausgeschlossen werden:  $\alpha,\alpha'$ -Dichlor-*p*-xylyl reagiert unter den verwendeten Reaktionsbedingungen (20°C, 5 Äquivalente  $\alpha,\alpha'$ -Dichlor-*p*-xylyl, DBU) nicht mit den Nucleobasen der DNA bzw. PNA.

**1** reagiert mit primären Aminen wie TRIS oder TACI, dabei erhält man mit TRIS die Verbindung **2**:



Im ersten Schritt der Reaktion treten jedoch Niederschläge auf, daher ist die Verwendung von DBU als Base für die Festphasensynthese von Oligonucleotid-Konjugaten nicht geeignet.

Ausgehend von diesen Vorarbeiten wurden im AK Krämer von T. Brodowski und F. Zelder Oligonucleotid-Konjugate aus PNA mit freiem Amino-Terminus bzw. aus 5'-Amino-modifizierter DNA hergestellt. Hierbei wurden die Oligonucleotide mit  $\alpha,\alpha'$ -Dichlor-*p*-xylyl bzw. mit  $\alpha,\alpha'$ -Dibrom-*p*-xylyl umgesetzt, als Base wurde N-Ethyl-diisopropylamin ("Hünigs Base") verwendet. Anschließend erfolgte die Reaktion mit TRIS zu den zu **2** analogen Verbindungen. Durch Verwendung von *p*-Chlormethyl-benzoesäure anstelle der Dihalogenid-Verbindung konnten die Ausbeuten erhöht und Nebenreaktionen unterdrückt werden, es bildet sich dann eine Amidbindung anstelle der Aminbindung aus. Die angestrebten Oligonucleotid-Konjugate wurden durch Umsetzung mit TRIS und N-Ethyl-diisopropylamin erhalten.<sup>[108,109]</sup>

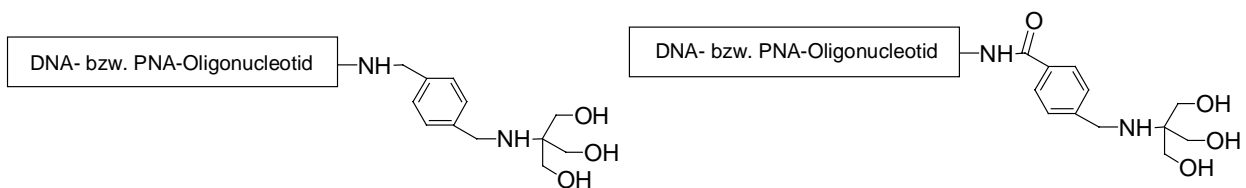


Abb. 4.11: Oligonucleotid-TRIS-Konjugate