

## 5 Allosterische Regulierung der Phosphodiestererspaltung durch Metallkomplexe

### 5.1 Verwendete Liganden und Metallkomplexe

Im Arbeitskreis Krämer wurde ein Ligandensystem entwickelt, an dem die allosterische Regulierung einer „künstlichen Phosphodiesterase“ untersucht werden kann.

Die Liganden enthalten eine vierzählige Bindungsstelle für ein strukturelles Metallion  $M_S$  und zwei zweizählige Chelateinheiten für funktionelle Metallionen  $M_f$ .

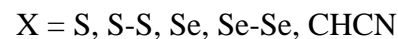
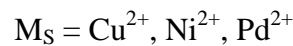
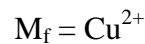
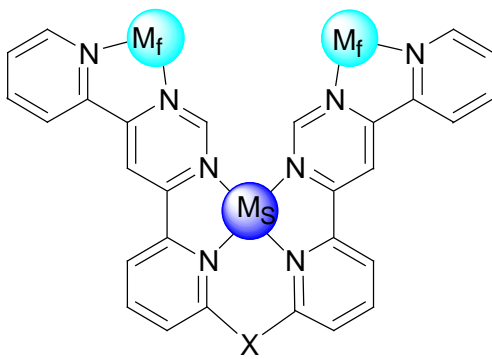


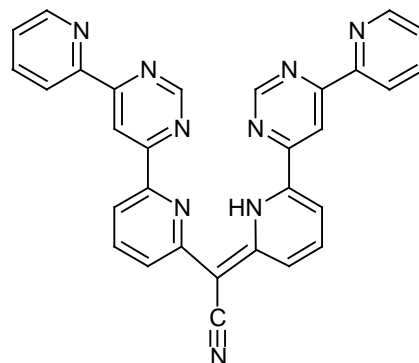
Abb. 5.1: Metallkomplexe für die Untersuchung der allosterischen Regulierung der Phosphodiestererspaltung

Die Aktivität der Komplexe hängt von der Präorganisation der beiden funktionellen Metallionen und dabei vor allem von ihrem Abstand ab. Dieser kann auf zwei Arten beeinflusst werden: einerseits durch die Wahl unterschiedlicher Spacergruppen X, durch die die beiden Untereinheiten des Liganden miteinander verknüpft sind, und andererseits durch die Variation des strukturellen Metallions. Bisher wurden Liganden mit  $X = \text{CHCN}, \text{S}, \text{S-S}, \text{Se}$  und  $\text{Se-Se}$  synthetisiert.<sup>[110,111]</sup> Das strukturelle Metallion nimmt nicht direkt an der Reaktion teil, hat aber Einfluß auf die Konformation des Komplexes und auf die räumliche Lage der beiden funktionellen Metallionen, über deren Abstand die Geschwindigkeit der Reaktion reguliert wird.

Im Rahmen dieser Arbeit wurde die Komplexbildung in Lösung durch Spektrophotometrie und die Kinetik der Phosphodiestererspaltung untersucht. Hauptsächlich wurde dabei der Ligand L mit  $X = \text{CHCN}$  verwendet. Als strukturelle Metallionen wurden  $\text{Cu}^{2+}$ ,  $\text{Ni}^{2+}$  und  $\text{Pd}^{2+}$  eingesetzt, als funktionelle Metallionen dienten zwei  $\text{Cu}^{2+}$ -Ionen.

Der Polypyridyl-Ligand L wurde von Dr. I. Fritsky ausgehend von 4-(2-Pyridyl)pyrimidin in zwei Stufen hergestellt. Durch eine C-C-Kupplung mit 2-Brom-6-lithiopyridin erhält man 4-(6-Brom-2-pyridyl)-6-(2-pyridyl)pyrimidin. Dieses wird mit Cyanacetamid zum Liganden L, einem dunkelroten, kristallinen Feststoff, umgesetzt.<sup>[110]</sup>

Der Kristallstrukturanalyse von L kann man entnehmen, daß der Ligand in einer vollständig konjugierten Form vorliegt. Ein Proton ist dabei an einem Pyridin-N-Atom lokalisiert. In Metallkomplexen bildet sich die deprotonierte Form von L (L-H = „L minus H“).



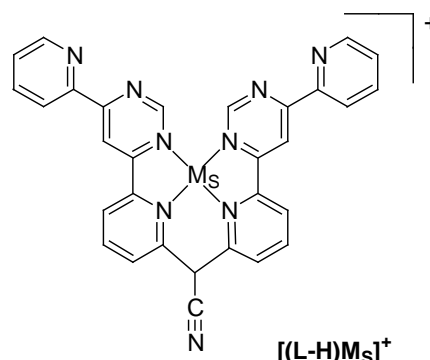
## 5.2 Komplexbildung in Lösung

### 5.2.1 Bildung der einkernigen Komplexe [(L-H)M<sub>S</sub>]<sup>+</sup>

#### 5.2.1.1 Spektrophotometrische Titrations

Die Bildung der einkernigen Komplexe [(L-H)M<sub>S</sub>]<sup>+</sup> kann aufgrund der geringen Löslichkeit des Liganden in DMSO/Wassergemischen nur in reinem DMSO spektrophotometrisch verfolgt werden. Verwendet wurden 0,1 mM Lösungen des Liganden und 2 mM Lösungen der Metallsalze (Cu(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub>, Ni(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub> bzw. Pd(CH<sub>3</sub>CN)<sub>4</sub>(BF<sub>4</sub>)<sub>2</sub>). Es wurden bei jeder Zugabe 0,2 Äquivalente des jeweiligen Metallions hinzugefügt und nach einer geeigneten Wartezeit UV-Spektren aufgenommen. Eine Wiederholung der Messungen mit längeren Wartezeiten führt zu identischen Ergebnissen.

Der einkernige Komplex [(L-H)Cu]NO<sub>3</sub> bildet sich schon bei Raumtemperatur sehr schnell, in diesem Fall wurden die Spektren jeweils 5 Minuten nach der Zugabe des Metallsalzes aufgenommen. Die Komplexbildung kann durch Zunahme der Absorption bei 530 nm bzw. Abnahme der Absorption bei 435 nm beobachtet werden. Man erhält scharfe isosbestische Punkte bei 415 nm und 460 nm, was auf eine einheitliche Komplexbildung hindeutet.



Die maximale Absorption wird bei einer Zugabe von einem Äquivalent  $\text{Cu}^{2+}$  erreicht, es bildet sich zunächst ausschließlich der 1:1 Komplex des Liganden mit  $\text{Cu}^{2+}$ . Die Farbe der Lösung verändert sich während der Titration von Rot zu Rotviolett.

Bei weiterer Zugabe von  $\text{Cu}^{2+}$  nimmt die Extinktion bei 530 nm durch die Bildung des dreikernigen Komplexes  $[(\text{L-H})\text{Cu}_3]^{5+}$  wieder ab (s.u.), da dieser ein Absorptionsmaximum bei 635 nm aufweist.

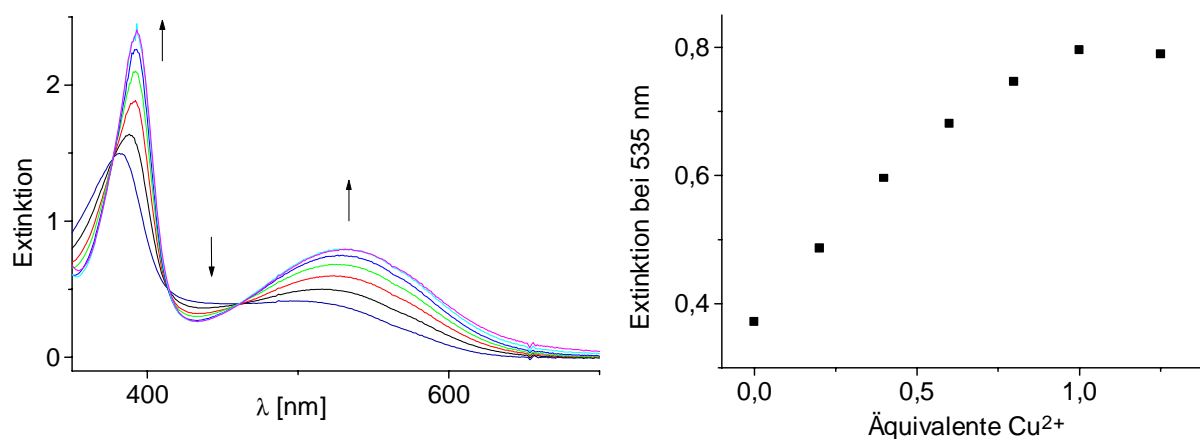


Abb. 5.2: Spektrophotometrische Titration des Liganden L mit  $\text{Cu}^{2+}$

Überlagerung der UV-Spektren (links) und Zunahme der Absorption bei 535 nm während der Titration (rechts), volumenkorierte Werte

Die Titrations des Liganden L mit  $\text{Ni}^{2+}$  und  $\text{Pd}^{2+}$  werden durch die langsame Komplexbildung bei Raumtemperatur erschwert. Daher wurden die Proben nach jeder Zugabe des jeweiligen Metallsalzes für 15 bis 30 Minuten auf 50°C erwärmt. Nach einer Abkühlzeit von 10 Minuten wurden die UV-Spektren aufgenommen.

Die Bildung des Komplexes  $[(\text{L-H})\text{Ni}]\text{NO}_3$  kann durch die Zunahme der Absorption bei 500 nm und die Abnahme der Absorption bei 435 nm verfolgt werden. Es werden scharfe isosbestische Punkte bei 420 und 460 nm erhalten. Die Lösung färbt sich bei Zugabe von  $\text{Ni}^{2+}$  zunehmend rotviolett. Bei der Titration mit  $\text{Pd}^{2+}$  beobachtet man eine Zunahme der Absorption bei 545 nm und eine Abnahme der Absorption bei 440 nm, in diesem Fall findet man isosbestische Punkte bei 415 und 465 nm. Die Farbe der Lösung verändert sich von Rot zu Lila.

Wie man Abbildung 5.3 entnehmen kann, ist zur quantitativen Bildung der 1:1 Komplexe von  $\text{Ni}^{2+}$  und  $\text{Pd}^{2+}$  mit L ein geringer Überschuss an Metallionen notwendig, die maximale Extinktion wird bei ca. 1,2 Äquivalenten erreicht. Bei weiterer Zugabe von  $\text{Ni}^{2+}$  bzw.  $\text{Pd}^{2+}$  fällt die Absorption durch Bildung der dreikernigen Komplexe wieder, da diese ein Absorptionsmaximum bei höheren Wellenlängen aufweisen ( $\lambda_{\text{max}} = 540 \text{ nm}$  für  $[(\text{L-H})\text{Ni}_3]^{5+}$  und  $\lambda_{\text{max}} = 675 \text{ nm}$  für  $[(\text{L-H})\text{Pd}_3]^{5+}$ ).

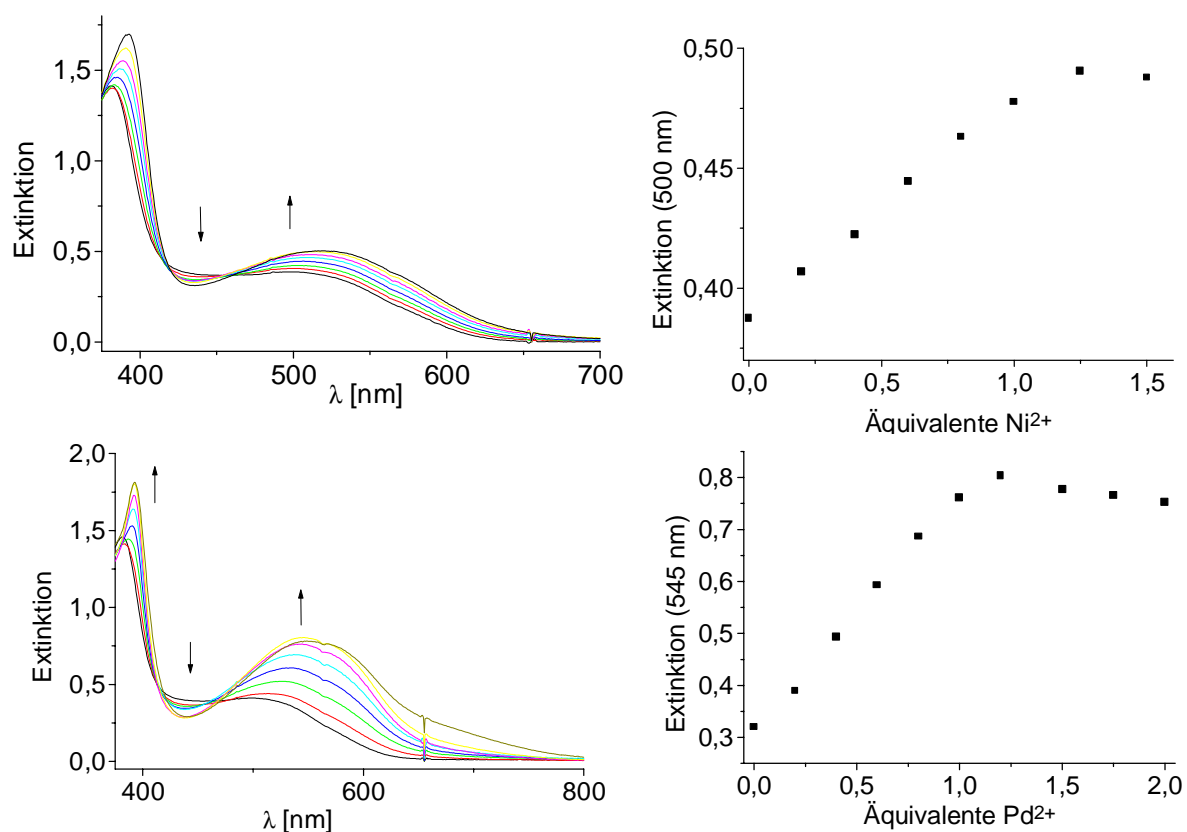


Abb. 5.3: Spektrophotometrische Titration des Liganden L mit  $\text{Ni}^{2+}$  (oben) bzw.  $\text{Pd}^{2+}$  (unten). Links: Überlagerung der UV-Spektren, rechts: Zunahme der Absorption während der Titration, volumenkorierte Werte

### 5.2.1.2 Isolierung der Komplexe<sup>[112]</sup>

Die einkernigen Komplexe  $[(\text{L-H})\text{Cu}]\text{NO}_3 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ,  $[(\text{L-H})\text{Ni}]\text{NO}_3 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  und  $[(\text{L-H})\text{Pd}]\text{ClO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  können durch Reaktion des Liganden L mit den Metallsalzen erhalten werden. Die Isolierung der Komplexe erfolgt durch Zugabe eines Überschusses von  $\text{KNO}_3$  bzw.  $\text{NaClO}_4$ , die erhaltenen Niederschläge werden in Methanol gelöst und durch Zusatz von Diisopropylether in reiner Form ausgefällt. Es handelt sich bei den einkernigen Komplexen um violette, feinkristalline Feststoffe, die durch MALDI-Massenspektren und durch C,H,N-Analysen identifiziert wurden.

Ausgehend von den isolierten Metallkomplexen wurden die photometrischen Untersuchungen zur Bildung der dreikernigen Komplexe der Form  $[(L-H)M_SCu_2]^{5+}$  und die kinetischen Messungen durchgeführt.

Von dem Kupferkomplex  $[(L-H)Cu(MeOH)]ClO_4$  wurde von Dr. I. Fritsky eine Kristallstrukturanalyse angefertigt. Aus dieser geht hervor, daß das strukturelle  $Cu^{2+}$ -Ion durch eine quasi-planare  $N_4$ -Koordination gebunden wird.<sup>[112]</sup>

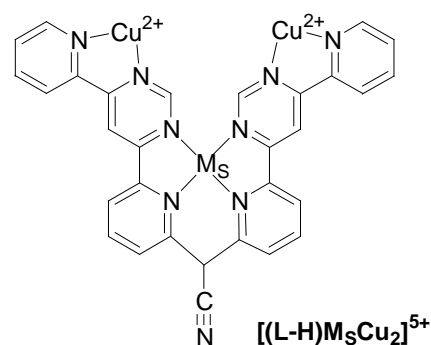
### 5.2.2 Bildung der dreikernigen Komplexe $[(L-H)M_SCu_2]^{5+}$

Die Bildung der dreikernigen Komplexe  $[(L-H)M_SCu_2]^{5+}$  wurde ausgehend von den einkernigen Komplexen durch spektrophotometrische Titrations verfolgt. Die Titrations wurden unter den Bedingungen der kinetischen Untersuchungen durchgeführt, das heißt, in Wasser/DMSO 3/1 bei pH 7 (50 Äquivalente MOPS-Puffer pro Äquivalent Ligand).

Das Substrat HPNP wurde durch 5 Äquivalente des stabileren Phosphodiester Natriumdimethylphosphat ersetzt, das im Zeitfenster der photometrischen Titrations nicht gespalten wird. Es wurden 0,1 mM Lösungen der einkernigen Komplexe  $[(L-H)M_S]^+$  und eine 2 mM Lösung von  $Cu(NO_3)_2$  in DMSO/Wasser 1/3 verwendet. Die Zugabe erfolgte in Schritten von 0,25 Äquivalenten  $Cu^{2+}$ , die UV-Spektren wurden ca. 30 Sekunden nach dem Mischen aufgenommen, eine längere Wartezeit führte zu keiner weiteren Veränderung der Spektren.

Man beobachtet während der Titrations eine Abnahme der Absorption im Bereich von 520 nm und eine Zunahme der Absorption im Bereich von 635 nm mit scharfen isosbestischen Punkten bei 555 nm für  $M_S = Cu^{2+}$ , 565 nm für  $M_S = Ni^{2+}$  und 600 nm für  $M_S = Pd^{2+}$ . Die Farbe der Lösungen verändert sich von Rotviolett zu Blau (für  $M_S = Cu^{2+}$  und  $Ni^{2+}$ ) bzw. Blauviolett (für  $M_S = Pd^{2+}$ ).

Für die quantitative Bildung der dreikernigen Komplexe  $[(L-H)Cu_3]^{5+}$  und  $[(L-H)NiCu_2]^{5+}$  ist ein Überschuß an  $Cu^{2+}$  notwendig, die Absorption bei 635 nm steigt bis zur Zugabe von ca. 3 Äquivalenten  $Cu^{2+}$  weiter an. Dies ist auf eine relativ schwache Komplexierung von  $Cu^{2+}$  durch die zweizähligen Bindungsstellen des Liganden zurückzuführen. Im Gegensatz dazu erfolgt die Bildung von  $[(L-H)PdCu_2]^{5+}$  schon bei einer Zugabe von 2 Äquivalenten  $Cu^{2+}$  nahezu quantitativ.



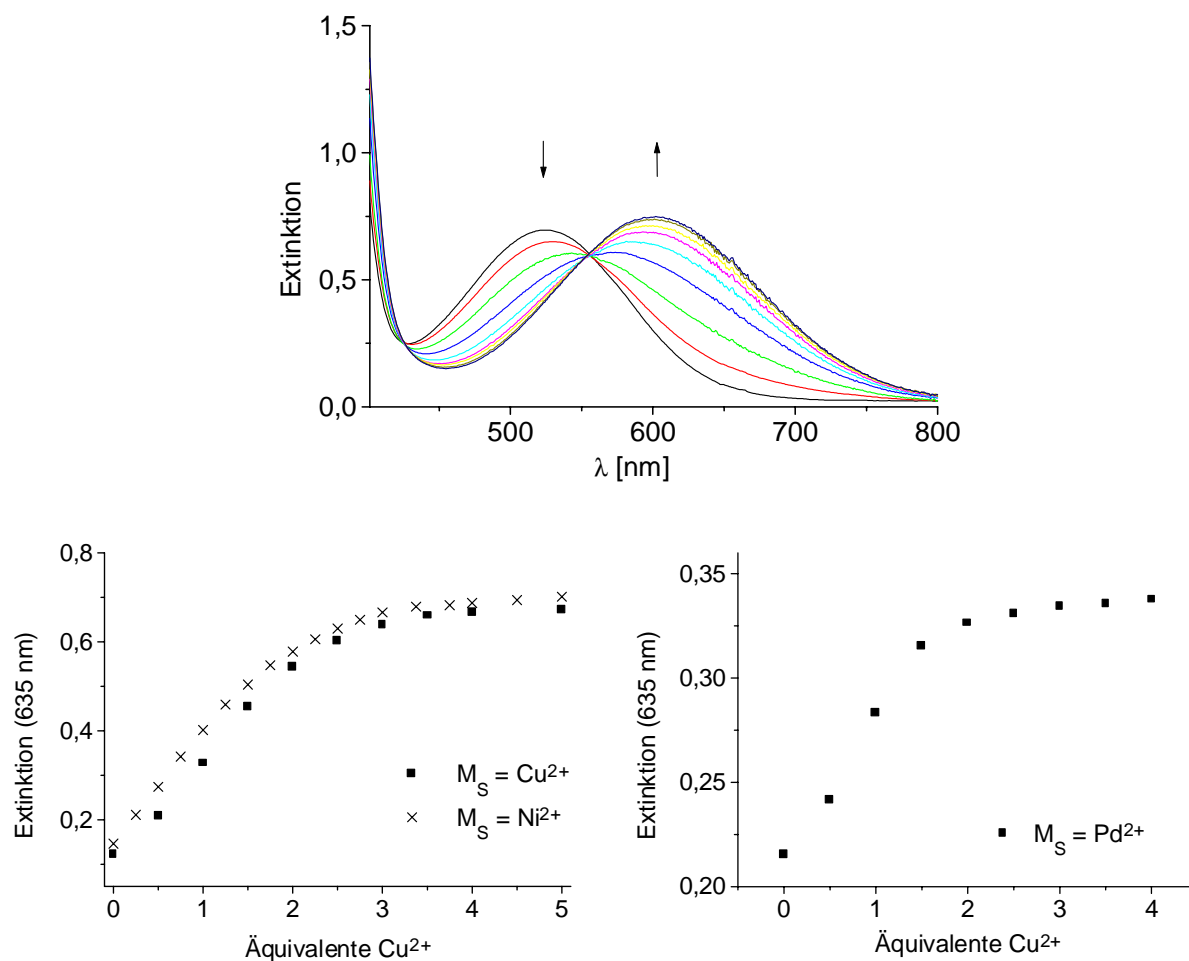


Abb. 5.4: Spektrophotometrische Titrations der Komplexe  $[(L-H)M_S]^+$  mit  $Cu^{2+}$ . Überlagerung der UV-Spektren der Titration von  $[(L-H)Cu]^+$  (oben), Zunahme der Absorption bei 635 nm während der Titration (unten), volumenkorrigierte Werte

Eine Wiederholung der Titrations mit *in situ* hergestellten einkernigen Komplexen bzw. mit dem Substrat HPNP anstelle des Natriumdimethylphosphats führt zu vergleichbaren Ergebnissen (maximale Abweichung 15%).

Ersetzt man Natriumdimethylphosphat bzw. HPNP durch  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , wird die Bildung des dreikernigen Kupferkomplexes  $[(\text{L-H})\text{Cu}_3]^{5+}$  begünstigt. Unter diesen Bedingungen kann schon bei Zugabe von 2 Äquivalenten  $\text{Cu}^{2+}$  eine vollständige Komplexbildung nachgewiesen werden.

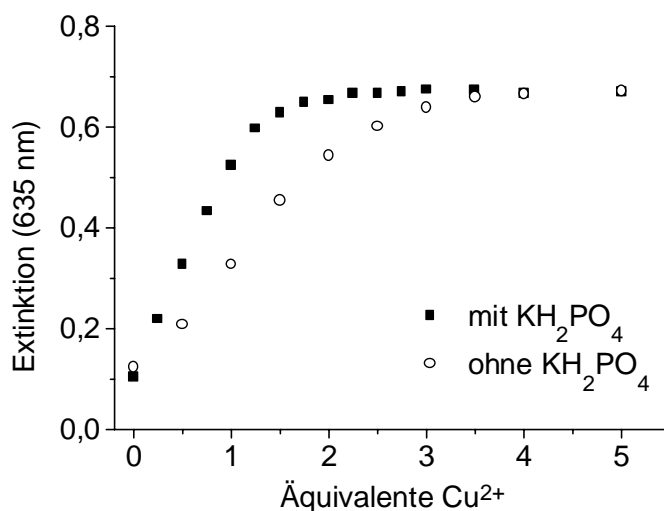


Abb. 5.5: Titration von  $[(\text{L-H})\text{Cu}]^+$  mit  $\text{Cu}^{2+}$  mit und ohne Zugabe von Phosphat, volumenkorigierte Werte

Diese Beobachtung läßt sich durch die Stabilisierung des dreikernigen Komplexes durch Phosphat erklären, wobei die beiden funktionellen  $\text{Cu}^{2+}$ -Ionen durch Phosphat verbrückt werden und die elektrostatische Abstossung zwischen den Metallionen verringert wird.

### 5.2.3 Untersuchungen zum Metallaustausch

Für die kinetischen Untersuchungen zur katalytischen Aktivität der dreikernigen Metallkomplexe ist es wichtig, daß das strukturelle Metallion in  $[(\text{L-H})\text{M}_5\text{Cu}_2]^{5+}$  ( $\text{Ni}^{2+}$  oder  $\text{Pd}^{2+}$ ) unter den Reaktionsbedingungen nicht gegen ein  $\text{Cu}^{2+}$ -Ion ausgetauscht wird, da sich sonst Gemische unterschiedlicher Komplexe bilden. Dieses führt zu einer Verfälschung bzw. Fehlinterpretation der Ergebnisse, da man nicht mehr feststellen kann, welche Spezies die Aktivität hervorruft.

Untersuchungen zum Metallaustausch wurden mit Hilfe der MALDI-Massenspektrometrie durchgeführt. Hierbei macht man sich zunutze, daß unter den Ionisierungsbedingungen die beiden funktionellen  $\text{Cu}^{2+}$ -Ionen dissoziieren und man nur die Signale der einkernigen Komplexe  $[(\text{L-H})\text{M}_5]^+$  erhält.

Die Messungen wurden unter den Bedingungen der kinetischen Untersuchungen durchgeführt, die Lösungen enthielten 0,1 mM des jeweiligen einkernigen Komplexes, 0,4 mM  $\text{Cu}^{2+}$ , 5 mM MOPS-Puffer (pH 7) und 0,5 mM des Substrates 2-Hydroxypropyl-*p*-nitrophenylphosphat (HPNP) in DMSO/Wasser 1/3. Nach 3 Tagen bei 20°C wurden MALDI-Massenspektren aufgenommen, hierbei erhält man überwiegend die Peaks für die einkernigen Komplexe  $[(L-H)Ni]^+$  ( $m/z = 562$ ) bzw.  $[(L-H)Pd]^+$  ( $m/z = 610$ ) und nur Spuren von  $[(L-H)Cu]^+$  ( $m/z = 567$ ). Außerdem wurden Gemische von  $[(L-H)Ni]^+$  und  $[(L-H)Cu]^+$  bzw.  $[(L-H)Pd]^+$  und  $[(L-H)Cu]^+$  mit 4 Äquivalenten  $\text{Cu}^{2+}$  massenspektrometrisch untersucht, hierbei werden die Signale der einkernigen Komplexe im erwarteten Verhältnis gefunden (s. Abb. 5.6).

Aus diesen Ergebnissen kann man ablesen, daß unter den Reaktionsbedingungen der kinetischen Untersuchungen nur ein geringer Metallaustausch stattfindet. Dieser ist vernachlässigbar klein und muß für die Auswertung und Interpretation der Meßergebnisse zur HPNP-Spaltung nicht berücksichtigt werden.

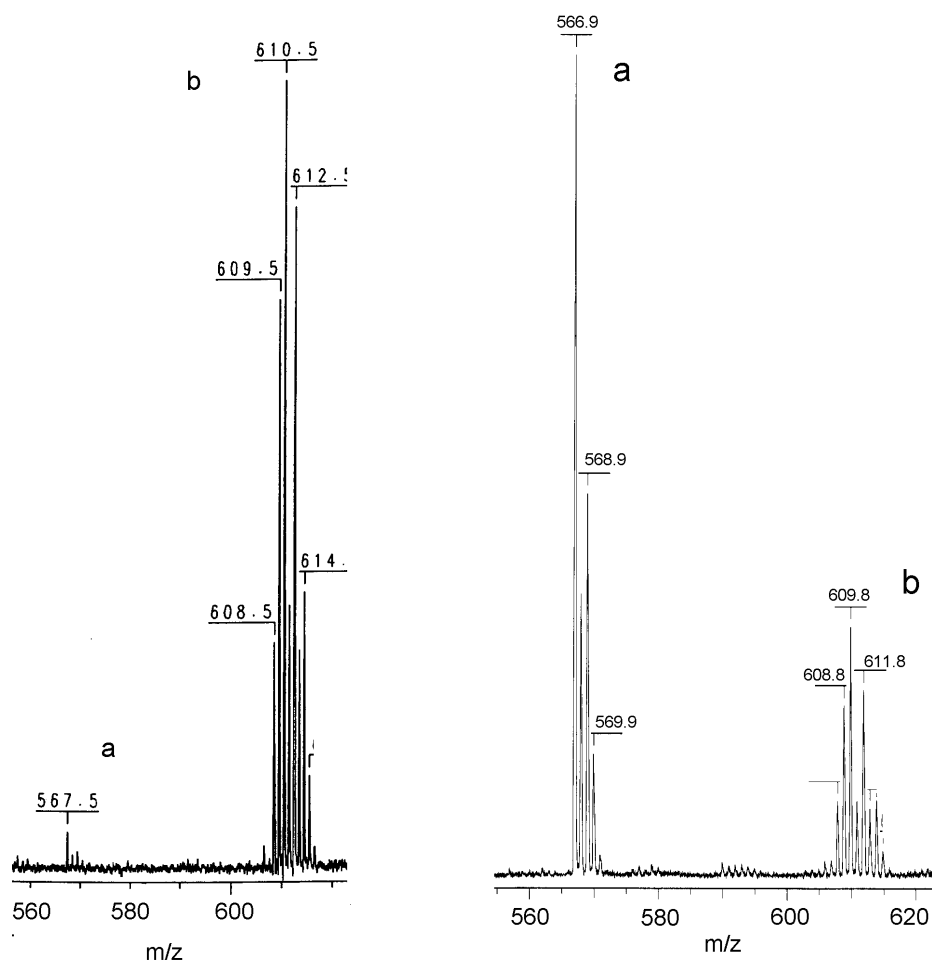


Abb. 5.6: MALDI-Massenspektren von  $[(L-H)Pd]^+$  mit 4 Äquivalenten  $\text{Cu}^{2+}$  (links) bzw. von einem 1:2-Gemisch aus  $[(L-H)Pd]^+$  und  $[(L-H)Cu]^+$  mit 4 Äquivalenten  $\text{Cu}^{2+}$  (rechts), a: Signal für  $[(L-H)Cu]^+$ , b: Signal für  $[(L-H)Pd]^+$



## 5.3 Kinetische Analyse der Phosphodiester-spaltung

### 5.3.1 HPNP-Spaltung

#### 5.3.1.1 Auswertung der kinetischen Messungen

Als Substrat für die kinetischen Untersuchungen wurde die RNA-Modellverbindung 2-Hydroxypropyl-*p*-nitrophenylphosphat (HPNP) verwendet. Bei der Spaltung von HPNP entsteht im ersten Schritt ein cyclischer Monoester und abhängig vom pH-Wert *p*-Nitrophenol bzw. *p*-Nitrophenolat (s. a. Kapitel 3.1.3). Die Messungen wurden bei pH 6 bis 7,5 durchgeführt, in diesem pH-Bereich liegen sowohl *p*-Nitrophenol (NP) als auch *p*-Nitrophenolat (Npat) vor. Aufgrund der starken Absorption des Metallkomplexes bei Wellenlängen < 350 nm kann nur die Konzentration des entstehenden *p*-Nitrophenolats ( $\lambda_{\max} = 400$  nm) erfasst werden. Die Gesamtkonzentration des Hydrolyseprodukts wird mit Hilfe der Hendersson-Hasselbach-Gleichung (1) berechnet.

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

Mit dem  $\text{pK}_s$ -Wert für *p*-Nitrophenol ( $\text{pK}_s = 7,15$ ) erhält man bei pH 7 einen Faktor von 2,4 zur Berechnung der Gesamtkonzentration ( $\text{NP}_{\text{ges}}$ ) aus der *p*-Nitrophenolatkonzentration. Bei Messungen mit  $[(\text{L-H})\text{Cu}_3]^{5+}$  und  $[(\text{L-H})\text{NiCu}_2]^{5+}$  wurde die Reaktion bei 420 nm verfolgt, die Absorption des *p*-Nitrophenolats beträgt bei dieser Wellenlänge noch 90% der Absorption bei 400 nm (der Extinktionskoeffizient  $\epsilon$  beträgt  $18600 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$  bei 400 nm und  $16750 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$  bei 420 nm).

Die Spaltung von HPNP wird nach einem Geschwindigkeitsgesetz pseudo-erster Ordnung behandelt.  $k_{\text{obs}}$  wird aus der konstanten Anfangsgeschwindigkeit der Reaktion bei kleinem Umsatz (<10%) bestimmt. Daher wird neben der Katalysatorkonzentration auch die Substratkonzentration als konstant angesehen und es gilt:

$$k_{\text{obs}} = \frac{dc(\text{NP}_{\text{ges}})}{[\text{HPNP}]_0 dt} \quad (2)$$

Alle Ergebnisse sind Mittelwerte einer Dreifachbestimmung, die maximale Abweichung beträgt 15%.

### 5.3.1.2 Abhängigkeit der Spaltungsgeschwindigkeit vom strukturellen Metallion $M_S$

Zur Untersuchung der Abhängigkeit der Reaktionsgeschwindigkeit vom strukturellen Metallion  $M_S$  wurde  $\text{Cu}^{2+}$  als funktionelles Metallion eingesetzt. Als strukturelle Metallionen dienten  $\text{Cu}^{2+}$ ,  $\text{Ni}^{2+}$  und  $\text{Pd}^{2+}$ . Für die kinetischen Untersuchungen wurden 0,1 mM Lösungen der einkernigen Komplexe  $[(L-H)M_S]^+$  mit 50 Äquivalenten MOPS-Puffer (pH 7,0), 0 bis 3 Äquivalenten Kupfernitrat und 5 Äquivalenten des Substrates HPNP in Wasser/DMSO 3/1 verwendet.

Mit den einkernigen Komplexen erhält man nur sehr geringe Spaltungsgeschwindigkeiten ( $k_{\text{obs}} < 2 \times 10^{-6} \text{ s}^{-1}$ ), die Reaktionsgeschwindigkeit nimmt bei Zugabe von  $\text{Cu}^{2+}$  stark zu. Das Aktivitätsmaximum liegt bei ca. 2,5 Äquivalenten  $\text{Cu}^{2+}$ . Dies stimmt mit den Ergebnissen aus den photometrischen Titrations überein, wonach zur Bildung der dreikernigen Komplexe ein Überschuß an  $\text{Cu}^{2+}$  notwendig ist. Bei weiterer Zugabe von  $\text{Cu}(\text{NO}_3)_2$  bleibt die Spaltungsgeschwindigkeit annähernd konstant. Bei mehr als 4 Äquivalenten  $\text{Cu}^{2+}$  nimmt sie wieder ab, der Wert für  $k_{\text{obs}}$  ist bei insgesamt 7 Äquivalenten  $\text{Cu}^{2+}$  nur noch halb so groß wie bei einer Zugabe von 4 Äquivalenten  $\text{Cu}^{2+}$ . Dies liegt möglicherweise daran, daß überschüssiges  $\text{Cu}^{2+}$  über Hydroxobrücken an den Katalysator gebunden wird und so dessen Aktivität herabsetzt.<sup>[113]</sup>

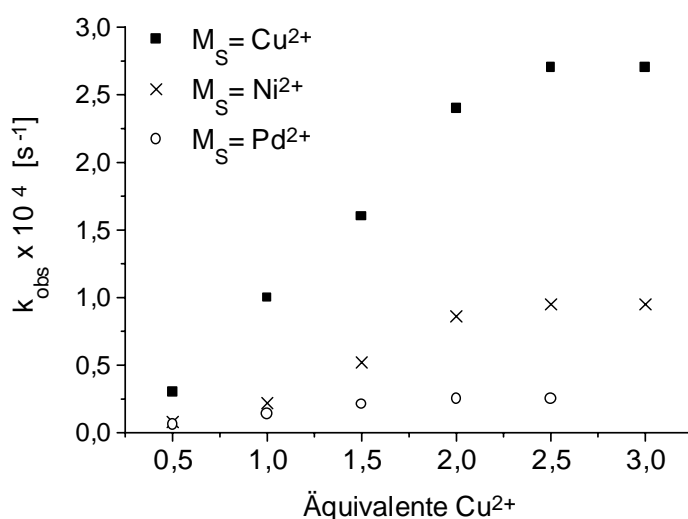
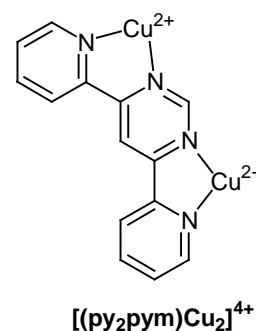


Abb. 5.7:  $k_{\text{obs}}$  für die Spaltung von HPNP in Abhängigkeit von der  $\text{Cu}^{2+}$ -Konzentration und vom strukturellen Metallion  $M_S$  bei pH 7,0 und  $20^\circ\text{C}$ ; Dreifachbestimmung, maximale Abweichung 15%

Die Aktivität der dreikernigen Komplexe hängt stark vom strukturellen Metall  $M_S$  ab. Durch  $[(L-H)\text{Cu}_3]^{5+}$  wird HPNP um den Faktor 3 schneller gespalten als durch  $[(L-H)\text{NiCu}_2]^{5+}$  und sogar um Faktor 10 schneller als durch  $[(L-H)\text{PdCu}_2]^{5+}$  ( $k_{\text{obs}} = 2,7 (\pm 0,4) \times 10^{-4} \text{ s}^{-1}$  für  $M_S = \text{Cu}^{2+}$ ,  $9,5 (\pm 1,4) \times 10^{-5} \text{ s}^{-1}$  für  $M_S = \text{Ni}^{2+}$  und  $2,5 (\pm 0,4) \times 10^{-5} \text{ s}^{-1}$  für  $M_S = \text{Pd}^{2+}$ ).

Dies hängt damit zusammen, daß schon durch geringe Veränderungen im Ionenradius von  $M_S$  und in dessen Neigung, die  $N_4M_S$ -Koordinations Ebene zu verzerren, die Konformation des Katalysator-Komplexes und die Präorganisation der beiden funktionellen Metallionen stark beeinflusst wird.

Eine direkte Beteiligung von  $M_S$  an der Reaktion ist aus sterischen Gründen ausgeschlossen. Auch die Ergebnisse kinetischer Untersuchungen mit 4,6-Di(2-pyridyl)pyrimidin ( $py_2pym$ ), einer Untereinheit des Liganden L, und 2 Äquivalenten  $Cu(NO_3)_2$  deuten darauf hin, daß  $M_S$  nicht als funktionelles Metall an der Reaktion teilnimmt. Durch  $[(py_2pym)Cu_2]^{4+}$  wird das Substrat HPNP unter den üblichen Reaktionsbedingungen nur sehr langsam gespalten ( $k_{obs} = 8,0 (\pm 0,4) \times 10^{-6} s^{-1}$ ; 0,1 mM  $py_2pym$ , 0,2 mM  $Cu(NO_3)_2$ , 0,5 mM HPNP, DMSO/Wasser 1/3, 5 mM MOPS-Puffer pH 7, 20°C). Eine effiziente Kooperation der Pyrimidin-verbrückten  $Cu^{2+}$ -Ionen wird also nicht beobachtet.



Die Reaktivität der dreikernigen Komplexe gegenüber HPNP ist mit der anderer Kupferkomplexe mit zwei funktionellen  $Cu^{2+}$ -Ionen vergleichbar.<sup>[54,56,71,72]</sup>  $k_{obs}$  für die unkatalysierte Reaktion in Wasser/DMSO 3/1 bei pH 7,0 (5 mM MOPS-Puffer) beträgt  $1,2 (\pm 0,3) \times 10^{-8} s^{-1}$ . Durch  $Cu^{2+}$ -Ionen wird unter diesen Reaktionsbedingungen die Spaltung von HPNP vernachlässigbar langsam katalysiert ( $k_{obs} = 3,0 (\pm 0,5) \times 10^{-6} s^{-1}$ , 0,2 mM  $Cu^{2+}$ ).

Durch die Zugabe von einem Äquivalent  $PO_4^{3-}$  zu  $[(L-H)Cu_3]^{5+}$  wird die Spaltung von HPNP vollständig unterdrückt ( $k_{obs} < 1 \times 10^{-6} s^{-1}$ ). Im Gegensatz dazu wird die Reaktionsgeschwindigkeit durch Zusatz von 5 Äquivalenten  $NaClO_4$  oder  $NaNO_3$  nicht beeinflusst.

Lösungen, die den Liganden L und 3,5 Äquivalente  $Ni(NO_3)_2$  bzw.  $Pd(CH_3CN)_4(BF_4)_2$  enthalten, beschleunigen die HPNP-Spaltung nur sehr wenig ( $k_{obs} = 1,0 (\pm 0,2) \times 10^{-5} s^{-1}$  mit  $Ni^{2+}$  bzw.  $k_{obs} < 1 \times 10^{-6} s^{-1}$  mit  $Pd^{2+}$ ; 0,1 mM L, 3,5 mM  $Ni^{2+}/Pd^{2+}$ , 0,5 mM HPNP, 20°C, DMSO/Wasser 1/3, 5 mM MOPS-Puffer, pH 7,0).

### 5.3.1.3 pH-Abhängigkeit der Spaltungsgeschwindigkeit

Für die Messungen wurden 0,1 mM Lösungen der einkernigen Komplexe mit 2,5 Äquivalenten  $\text{Cu}(\text{NO}_3)_2$ , 5 Äquivalenten HPNP und 50 Äquivalenten Puffer verwendet. Bei pH 5,5 bis 6,5 wurde 2-(N-Morpholino)ethansulfonsäure (MES) und bei pH 7 und 7,5 3-(N-Morpholino)propansulfonsäure (MOPS) als Puffersubstanz eingesetzt.

Die pH-Abhängigkeit der Reaktionsgeschwindigkeit ist für die eingesetzten Komplexe mit  $M_S = \text{Cu}^{2+}$ ,  $\text{Ni}^{2+}$  bzw.  $\text{Pd}^{2+}$  sehr ähnlich. Die maximale Aktivität wird bei pH 6,5 bis 7 erreicht. Bei niedrigeren pH-Werten sinkt die Spaltungsgeschwindigkeit langsam, während sie bei pH 7,5 deutlich abnimmt.

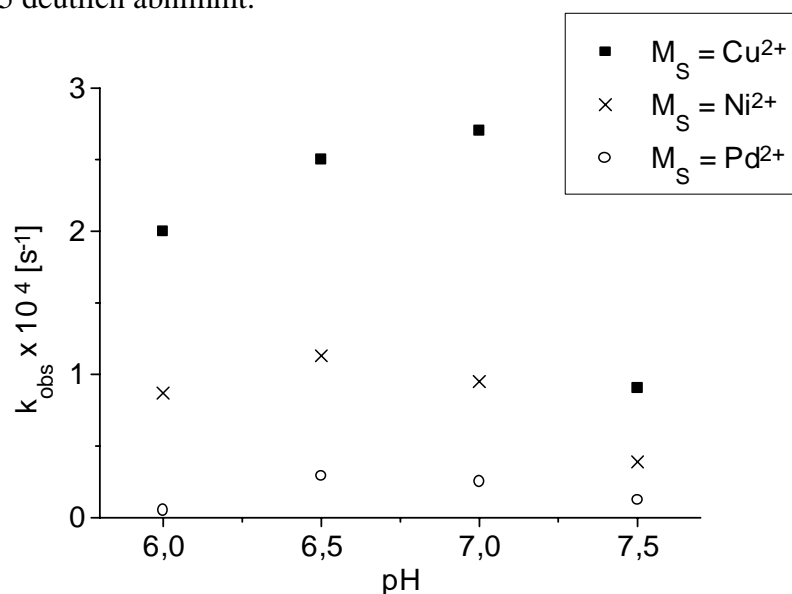


Abb. 5.8: Abhängigkeit der Spaltung von HPNP durch  $[(L-H)M_S \text{Cu}_2]^{5+}$  vom pH-Wert  
Doppelbestimmung, maximale Abweichung 15%

Die Ursache für die Abnahme der Spaltungsgeschwindigkeit bei höheren pH-Werten liegt in der Bildung von hydroxyverbrückten Aggregaten mit überschüssigem  $\text{Cu}^{2+}$ , bei  $\text{pH} > 7,5$  beginnen Kupferhydroxid-Niederschläge auszufallen. Bei pH-Werten  $< 5,5$  dissoziieren die dreikernigen Komplexe zumindest teilweise in  $[(L-H)M_S]^+$  und  $\text{Cu}^{2+}$ .

### 5.3.1.4 Abhängigkeit der Reaktionsgeschwindigkeit von der Komplexkonzentration

Die Messungen zur Abhängigkeit der Spaltungsgeschwindigkeit von der Komplexkonzentration wurden ausgehend von dem einkernigen Kupferkomplex  $[(L-H)Cu]^+$  durchgeführt. Es wurden folgende Reaktionsbedingungen eingehalten: 0,5 bis  $3 \times 10^{-4}$  M  $[(L-H)Cu]^+$ , 2,5 Äquivalente  $Cu^{2+}$ , 5 mM MOPS-Puffer (pH 7,0) und 0,5 mM HPNP in Wasser/DMSO 3/1, 20°C.

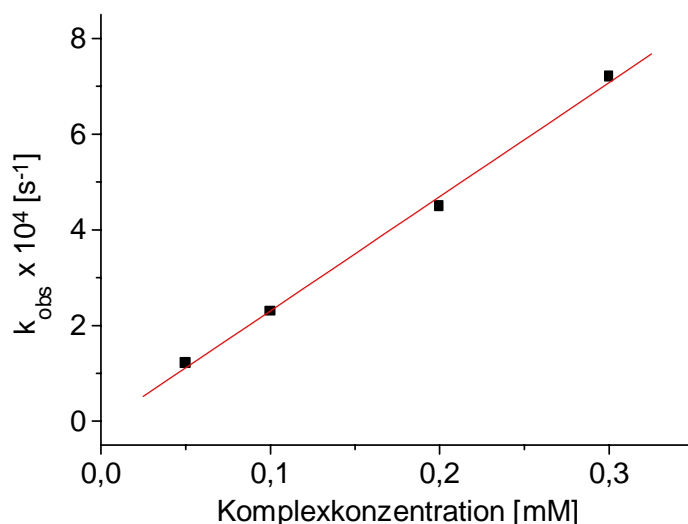


Abb. 5.9: Abhängigkeit der Spaltungsgeschwindigkeit von der Komplexkonzentration  
Doppelbestimmung, maximale Abweichung 15%

In diesem Konzentrationsbereich hängt die Reaktionsgeschwindigkeit linear von der Komplexkonzentration ab, die Reaktion ist erster Ordnung bezogen auf die  $[(L-H)Cu_3]^{5+}$ -Konzentration.

### 5.3.1.5 Turnover-Messungen

Bei längeren Reaktionszeiten und damit verbundenen größeren Umsätzen kann man feststellen, inwieweit die Komplexe katalytisch wirksam sind oder ob lediglich eine stöchiometrische Umsetzung des Substrates erzielt werden kann. Ein Turnover bzw. eine Turnover-Zahl von 1 entspricht hierbei einem Umsatz von einem Molekül Substrat pro Komplexmolekül.

Für diese Untersuchungen wurden zunächst die Messungen unter den üblichen Bedingungen (0,1 mM  $[(L-H)M_3]^+$ , 0,25 mM  $Cu^{2+}$ , 0,5 mM HPNP, 5 mM MOPS-Puffer pH 7,0 in DMSO/Wasser 1/3, 20°C) über mehrere Stunden hinweg verfolgt (Abb. 5.10).

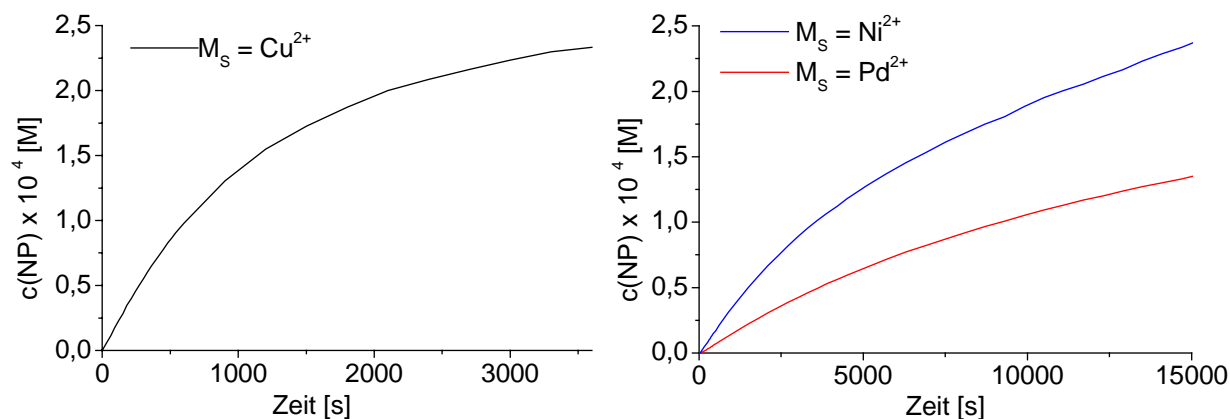


Abb. 5.10: Zeitlicher Verlauf der Spaltungsreaktion mit  $[(L-H)M_SCu_2]^{5+}$  als Katalysator, Doppelbestimmung, maximale Abweichung 15%

Für den Komplex  $[(L-H)Cu_3]^{5+}$  findet man eine konstante Reaktionsgeschwindigkeit ( $k_{\text{obs}} = 2,8 \times 10^{-4} \text{s}^{-1}$ ) bis zu einem Zeitpunkt von ca. 500 Sekunden. In diesem Zeitraum wird 15% der eingesetzten Substratmenge umgesetzt. Die Reaktionsgeschwindigkeit verlangsamt sich unter anderem aufgrund der abnehmenden Substratkonzentration immer weiter. Außerdem konkurriert das Reaktionsprodukt, der cyclische Phosphodiester, mit dem Substrat um die Bindung an den Katalysator. Dadurch wird die Reaktion zusätzlich verlangsamt. Trägt man die logarithmierten Werte der Substratkonzentration gegen die Reaktionszeit auf, so würde man für eine Reaktion 1. Ordnung einen linearen Zusammenhang erwarten. Dies ist jedoch nur zu Beginn der Reaktion ( $< 500 \text{ s}$ ) der Fall. Über einen längeren Zeitraum hinweg betrachtet, entspricht die Spaltung von HPNP eher einer Reaktion 2. Ordnung, wie man an dem linearen Zusammenhang zwischen der reziproken Substratkonzentration und der Reaktionszeit erkennt. Mit zunehmender Reaktionsdauer wird die HPNP-Spaltung also stärker verlangsamt, als man es für eine Reaktion 1. Ordnung erwarten würde, was mit der oben erläuterten Produkthemmung kompatibel ist.

Nach 35 Minuten haben 40% (0,2 mmol) des HPNP reagiert, das entspricht einer Turnover-Zahl von 2. Für den Komplex  $[(L-H)NiCu_2]^{5+}$  erhält man nach 185 Minuten zwei Turnover und für  $[(L-H)PdCu_2]^{5+}$  nach 155 Minuten ein Turnover. Bei der Bestimmung der Turnover-Zahlen muß jedoch berücksichtigt werden, daß eine Produkt-Konzentration von 0,2 mmol/l einer Extinktion von ca. 2 entspricht. Die ermittelten Werte sind daher mit einem relativ großen Fehler (ca. 20%) behaftet.

Setzt man einen größeren Überschuss an HPNP ein, kann man mehrere Turnover ohne Abnahme der Reaktionsgeschwindigkeit beobachten. Für den dreikernigen Komplex  $[(L-H)Cu_3]^{5+}$  (0,1mM) erhält man bei einer HPNP-Konzentration von 2,5 mmol/l innerhalb von 10 Minuten 2 Turnover ohne Verlust der Aktivität, die aus diesem Wert berechnete Turnover-Frequenz beträgt  $12 h^{-1}$ .

### 5.3.1.6 Abhängigkeit der Reaktionsgeschwindigkeit von der Substratkonzentration (Michaelis-Menten-Kinetik)

Erste Untersuchungen zur Abhängigkeit der Reaktionsgeschwindigkeit von der Substratkonzentration wurden mit dem dreikernigen Kupferkomplex durchgeführt. Es wurden 0,1 mM Lösungen von  $[(L-H)Cu]^+$  in Wasser/DMSO 3/1 mit 2,5 Äquivalenten  $Cu^{2+}$  und 50 Äquivalenten MOPS-Puffer (pH 7,0) verwendet, die HPNP-Konzentration lag zwischen 0,1 und 2,5 mmol/l.

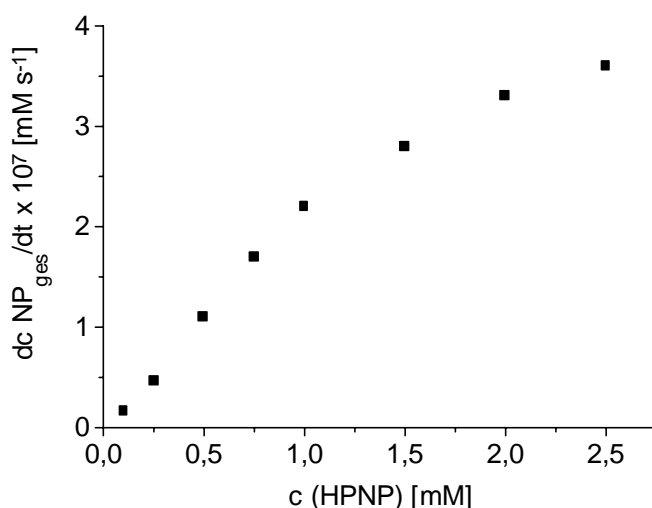
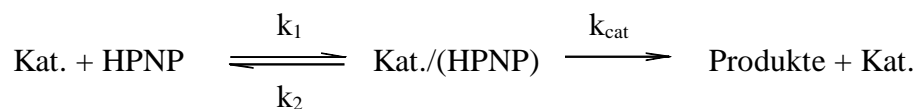


Abb. 5.11: Abhängigkeit der Spaltungsgeschwindigkeit von der Substratkonzentration, Doppelbestimmung, maximale Abweichung 15%

Man erhält einen linearen Zusammenhang zwischen der Substrat-Konzentration und der Spaltungsgeschwindigkeit bei HPNP-Konzentrationen  $\leq 1$  mmol/l. Bei höheren Substratkonzentrationen wird die Reaktion nicht mehr so stark beschleunigt. Es liegt eine Sättigungskinetik vor, die nach dem Zeitgesetz von Michaelis und Menten für enzymkatalysierte Reaktionen behandelt werden kann.

Dabei bildet sich zunächst in einer schnellen Gleichgewichtsreaktion ein Katalysator-Substrat-Addukt, welches irreversibel zu den Produkten weiterreagiert. Im Sättigungsbereich wird der Katalysator-Substrat-Komplex quantitativ gebildet und der Zerfall des Addukts zu den Produkten wird der geschwindigkeitsbestimmende Schritt der Reaktion.



In diesem Fall gilt: 
$$\frac{1}{dc/dt} = \frac{1}{k_{\text{cat}} [\text{Kat.}]} + \frac{1}{K_{\text{HPNP}} k_{\text{cat}} [\text{Kat.}][\text{HPNP}]_0} .$$

Durch Auftragung der reziproken Geschwindigkeit gegen die reziproke Substratkonzentration in einem Lineweaver-Burk-Diagramm kann man  $K_{\text{HPNP}}$  und  $k_{\text{cat}}$  ermitteln.  $K_{\text{HPNP}}$  entspricht hierbei der Gleichgewichtskonstanten für die Bindung des Substrates an den Metallkomplex,  $k_{\text{cat}}$  ist die Geschwindigkeitskonstante erster Ordnung für die Spaltung des an den Katalysator gebundenen HPNP.

Als x-Achsenabschnitt erhält man die Komplexbildungskonstante  $K_{\text{HPNP}}$  und als y-Achsenabschnitt  $(k_{\text{cat}} [\text{Kat.}])^{-1}$ . Zur Ableitung dieser Beziehung siehe auch Kapitel 3.7.1.

Die weiteren kinetischen Untersuchungen zur Abhängigkeit der Spaltungsgeschwindigkeit von der Substratkonzentration wurden mit Hilfe eines Pipettierroboters durchgeführt, was eine große Anzahl von Messungen innerhalb von kurzer Zeit ermöglichte. Es wurden die üblichen Reaktionsbedingungen verwendet, abweichend von den anderen Meßreihen wurde  $\text{Cu}^{2+}$  als letzte Substanz hinzugefügt, um die Reaktion zu starten.

Im Lineweaver-Burk-Diagramm erkennt man einen linearen Zusammenhang zwischen der reziproken Reaktionsgeschwindigkeit und der reziproken Substratkonzentration, die Reaktion kann im untersuchten Konzentrationsbereich durch das Geschwindigkeitsgesetz von Michaelis und Menten beschrieben werden.



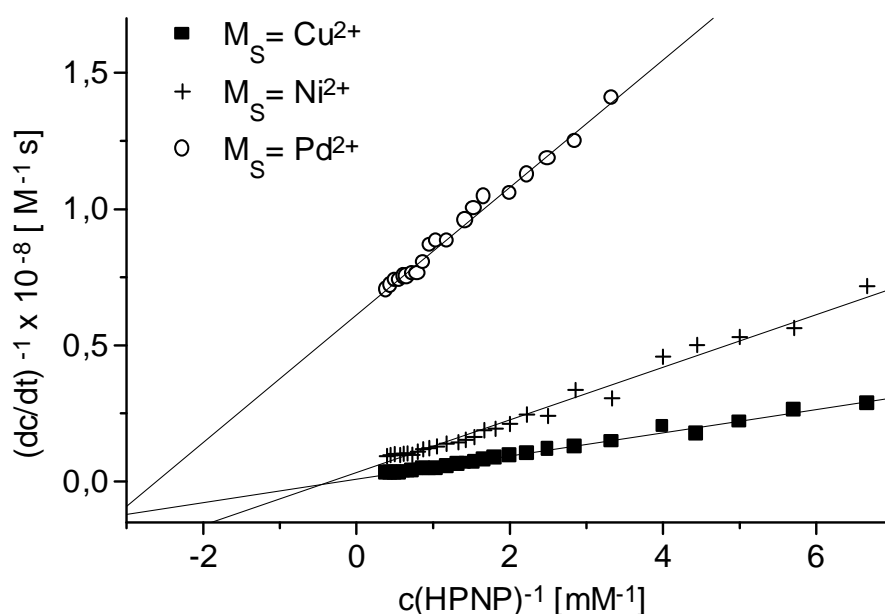


Abb. 5.12: Lineweaver-Burk-Diagramm zur Bestimmung von  $k_{cat}$  und  $K_{HPNP}$  für die Spaltung von HPNP durch  $[(L-H)M_SCu_2]^{5+}$   
 Dreifachbestimmung, maximale Abweichung 15%  
 Bedingungen: 0,1 mM  $[(L-H)M_SCu_2]^{5+}$ , DMSO/Wasser 1/3, pH 7,0  
 (50 Äquivalente MOPS-Puffer), 20°C

Aus der Auftragung der reziproken Werte können  $k_{cat}$  und  $K_{HPNP}$  ermittelt werden. Die Geschwindigkeitskonstanten  $k_{cat}$  unterscheiden sich für die drei Komplexe deutlich voneinander,  $[(L-H)Cu_3]^{5+}$  spaltet HPNP sechsmal schneller als  $[(L-H)NiCu_2]^{5+}$  und sogar 77-mal schneller als  $[(L-H)PdCu_2]^{5+}$ . Für die Gleichgewichtskonstante  $K_{HPNP}$  erhält man eine entgegengesetzte Tendenz, das Substrat wird 8-mal stärker an  $[(L-H)PdCu_2]^{5+}$  gebunden als an  $[(L-H)NiCu_2]^{5+}$  und 16-mal stärker als an  $[(L-H)Cu_3]^{5+}$  (s. Tabelle 5.1).

$M_S$	$K_{HPNP} (M^{-1})$	$k_{cat} (x 10^{-3} s^{-1})$
$Cu^{2+}$	170 ( $\pm 35$ )	17 ( $\pm 3$ )
$Ni^{2+}$	340 ( $\pm 70$ )	3,1 ( $\pm 0,6$ )
$Pd^{2+}$	2600 ( $\pm 500$ )	0,22 ( $\pm 0,05$ )

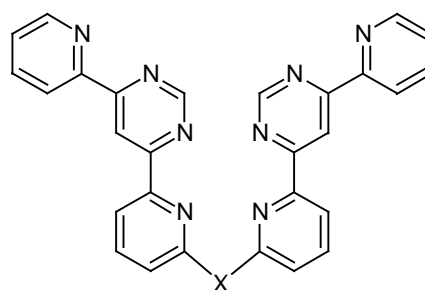
Tabelle 5.1:  $k_{cat}$  und  $K_{HPNP}$  für die Spaltung von HPNP durch  $[(L-H)M_SCu_2]^{5+}$

Der katalytisch aktivste Komplex  $[(L-H)Cu_3]^{5+}$  hat die geringste Affinität zum Substrat HPNP, darüberhinaus sind die beiden funktionellen  $Cu^{2+}$ -Ionen schwächer an den Komplex gebunden als in  $[(L-H)PdCu_2]^{5+}$ , wie man anhand der spektrophotometrischen Titrations erkennen kann. Durch  $Cu^{2+}$  als strukturelles Metallion wird die Konformation des Komplexes wahrscheinlich so beeinflusst, daß ein vergleichsweise energiereicher Katalysator-Substrat-Komplex gebildet wird. Möglicherweise wird dadurch die Energiedifferenz zum Übergangszustand der Reaktion verringert und der Zerfall in die Reaktionsprodukte beschleunigt.

### 5.3.1.7 Spaltung von HPNP durch Kupferkomplexe der Schwefel- und Selen-Analoga von L

Um den Einfluß der Spacergruppe auf die Spaltungsgeschwindigkeit von HPNP zu untersuchen, wurden Kupferkomplexe von R-S-R bzw. R-Se-R verwendet und die erhaltenen Ergebnisse mit denen von  $[(L-H)Cu_3]^{5+}$  verglichen.

Die kinetischen Messungen wurden unter den gleichen Bedingungen wie die mit L als Ligand durchgeführt. Zunächst wurden Lösungen von R-S-R mit 1 bis 10 Äquivalenten  $Cu(NO_3)_2$  in DMSO hergestellt. Nach einer Wartezeit von 2 Stunden wurden Wasser und MOPS-Puffer hinzugefügt und die Reaktion nach weiteren 30 Minuten durch Zusatz des Substrates HPNP gestartet. Die Konzentrationen in den Reaktionslösungen betragen 0,1 mM Ligand, 0,1 bis 1 mM  $Cu^{2+}$ , 5 mM MOPS-Puffer (pH 7,0) und 0,5 mM HPNP in DMSO/Wasser 1/3.



X = S: R-S-R  
X = Se: R-Se-R

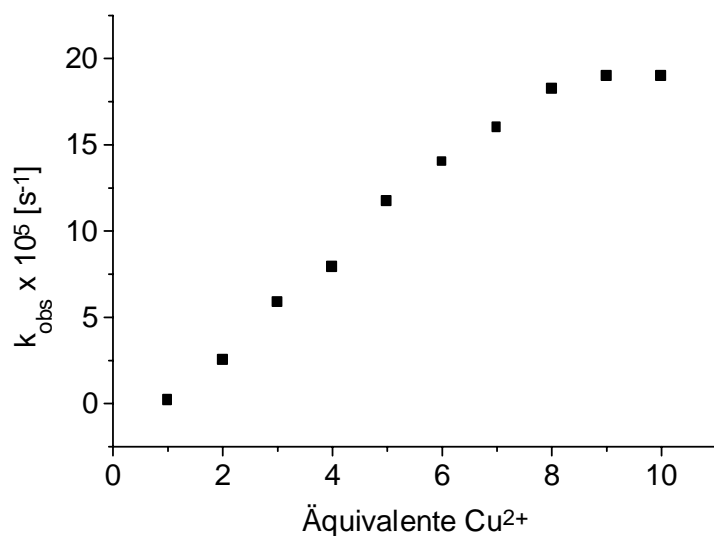


Abb. 5.13:  $k_{obs}$  für die Spaltung von HPNP durch (R-S-R)- Komplexe in Abhängigkeit von der  $Cu^{2+}$ -Konzentration; Doppelbestimmung, maximale Abweichung 15%

Die Spaltungsaktivität des 1:1-Komplexes  $[(R-S-R)Cu]^{2+}$  ist sehr gering ( $k_{obs} = 2,0 (\pm 0,3) \times 10^{-6} s^{-1}$ ). Die Reaktionsgeschwindigkeit nimmt mit steigender  $Cu^{2+}$ -Konzentration linear zu, das Aktivitätsmaximum wird bei 9 Äquivalenten  $Cu^{2+}$  erreicht ( $k_{obs} = 1,9 (\pm 0,3) \times 10^{-4} s^{-1}$ ). Bei noch größeren  $Cu^{2+}$ -Konzentrationen bleibt die Spaltungsgeschwindigkeit nahezu konstant. Einen sehr ähnlichen Verlauf der Aktivität in Abhängigkeit von der  $Cu^{2+}$ -Konzentration erhält man mit R-Se-R als Ligand. Auch hier liegt die maximale Reaktionsgeschwindigkeit bei 9 Äquivalenten  $Cu^{2+}$  ( $k_{obs} = 1,0 (\pm 0,2) \times 10^{-4} s^{-1}$ ).<sup>[111]</sup>

Die Bildung der einkernigen Komplexe  $[(R-S-R)Cu]^{2+}$  bzw.  $[(R-Se-R)Cu]^{2+}$  und der dreikernigen Komplexe  $[(R-S-R)Cu_3]^{6+}$  bzw.  $[(R-Se-R)Cu_3]^{6+}$  kann in  $CH_3CN/CH_2Cl_2$ -Gemischen ( $CH_3CN/CH_2Cl_2$  1/1) durch spektrophotometrische Titrations nachgewiesen werden. Dabei hat sich gezeigt, daß bei Zugabe von DMSO die Bildung der mehrkernigen Komplexe erschwert wird.<sup>[111]</sup> Unter den Bedingungen der kinetischen Untersuchungen (Wasser/DMSO 3/1) liegt daher nur eine geringe Konzentration der dreikernigen Komplexe vor, die vermutlich die katalytisch wirksame Spezies sind. Bei Zugabe von  $Cu^{2+}$  steigt die Komplexkonzentration und damit die Reaktionsgeschwindigkeit an.

Die Kupferkomplexe von R-S-R zeigen eine etwa doppelt so hohe Aktivität gegenüber HPNP wie die von R-Se-R. Dieser Unterschied läßt sich durch den Einfluß der Spacergruppe (S oder Se) auf die Konformation des Komplexes und vor allem auf den Abstand der beiden funktionellen  $Cu^{2+}$ -Ionen erklären. Dadurch wird die katalytische Aktivität der Komplexe entscheidend beeinflusst.

Ein direkter Vergleich der Kupferkomplexe von L, R-S-R und R-Se-R gestaltet sich schwierig, da sich  $[(L-H)Cu_3]^{5+}$  unter den Bedingungen der kinetischen Messungen bei einem geringen  $Cu^{2+}$ -Überschuß quantitativ bildet. Darüberhinaus ist es in  $[(L-H)M_5Cu_2]^{5+}$  möglich das strukturelle Metallion zu variieren, da sich hierbei stabile Komplexe bilden, während mit R-S-R und R-Se-R als Liganden ein schneller Metallaustausch zwischen  $M_5$  und den funktionellen Kupferionen stattfindet.<sup>[111]</sup>

### 5.3.2 Reaktivität von $[(L-H)M_5Cu_2]^{5+}$ gegenüber anderen Substraten

Analog zu den kinetischen Messungen mit der RNA-Modellverbindung HPNP wurden Untersuchungen zur Hydrolyse anderer Substrate durch  $[(L-H)M_5Cu_2]^{5+}$  durchgeführt. Hierbei wurden der Phosphomonoester *p*-Nitrophenylphosphat (NPP), der aktivierte Ester *p*-Nitrophenylacetat (NPA), das DNA-Modell Bis(*p*-nitrophenyl)phosphat (BNPP) und das RNA-Dinucleotid UpU (s. unten) als Substrate eingesetzt.

Die Versuche mit NPP, BNPP und NPA wurden unter den gleichen Bedingungen durchgeführt wie diejenigen mit HPNP. Es wurden 0,1 mM Lösungen der einkernigen Komplexe  $[(L-H)M_5]^+$  mit 2,5 Äquivalenten  $Cu^{2+}$ , 50 Äquivalenten MOPS-Puffer (pH 7,0) und 5 Äquivalenten Substrat in DMSO/Wasser 1/3 verwendet.

Es kann jedoch in keinem Fall eine Beschleunigung der Hydrolysereaktion nachgewiesen werden, die dreikernigen Komplexe  $[(L-H)M_5Cu_2]^{5+}$  sind inaktiv gegenüber den Substraten NPP, BNPP und NPA.

### 5.3.3 Spaltung des RNA-Dinucleotids Uridinyl(3'-5')Uridin (UpU)

Zur Untersuchung der Spaltung von RNA-Dinucleotiden durch  $[(L-H)M_5Cu_2]^{5+}$  wurde Uridinyl(3'-5')Uridin (UpU) als Substrat verwendet. Im ersten Schritt der Reaktion entsteht ein cyclischer Ester (2',3'-cUMP) durch einen intramolekularen Angriff der 2'-Hydroxygruppe, dieser kann dann zu den Monoestern und schließlich zu Uridin und Phosphat hydrolysiert werden (zum Reaktionsablauf siehe auch Kapitel 4.4.1).

Die Reaktionsprodukte werden durch HPLC-Messungen nachgewiesen und quantifiziert. Es wird dafür eine reversed phase C18-Säule eingesetzt, als Laufmittel dient ein Gemisch von 8 mM  $KH_2PO_4$  in Wasser mit 12% Methanol bei einer Fließgeschwindigkeit von 0,3 ml/min. Die Detektion erfolgt durch Messung der UV-Absorption bei  $\lambda = 260$  nm. Die Retentionszeiten betragen unter diesen Bedingungen 6,8 Minuten für UpU und 5,2 Minuten für Uridin. Außerdem erhält man Peaks für die dreikernigen Komplexe  $[(L-H)M_5Cu_2]^{5+}$  bei 3,1 Minuten und für DMSO, das in den Reaktionslösungen als Solvens verwendet wird, bei 4,3 Minuten.

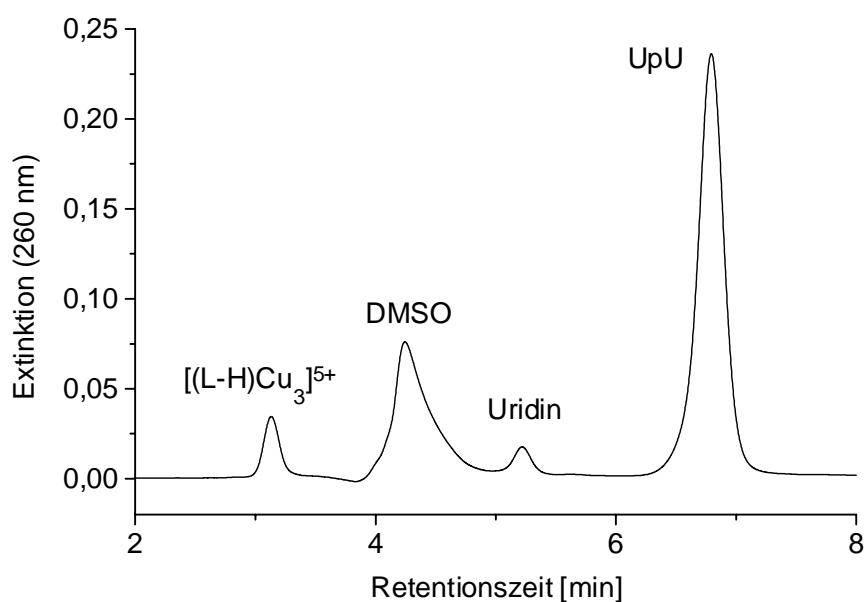


Abb. 5.14: HPLC-Elutionsprofil für die Spaltung von UpU (0,1 mM) durch  $[(L-H)Cu_3]^{5+}$  (1 mM) nach einer Reaktionszeit von 140 h

Es wurden Untersuchungen mit verschiedenen Komplexkonzentrationen (0,1 mM bzw. 1 mM  $[(L-H)M_5Cu_2]^{5+}$ ) und mit verschiedenen Substratkonzentrationen (0,1 mM bzw. 0,5 mM UpU) durchgeführt. Die Messungen erfolgten analog zu den UV-Messungen mit HPNP als Substrat in Wasser/DMSO 3/1 bei pH 7,0 (20 bzw. 50 Äquivalente MOPS-Puffer) und 20°C. In geeigneten Zeitabständen wurden Proben entnommen und mit Laufmittel verdünnt, um die Reaktion zu stoppen. Der dabei entstehende Niederschlag (wahrscheinlich  $[(L-H)M_5Cu_2]^{5+}$  mit koordiniertem Phosphat in feinverteilter Form) wurde abzentrifugiert und die Lösungen anschließend durch HPLC-Messungen analysiert.

2',3'-cUMP und die Monoester konnten dabei nicht nachgewiesen werden, sie werden im Reaktionsgemisch nicht angereichert sondern reagieren schnell weiter zu Uridin und Phosphat.

Trägt man die Konzentration des entstehenden Uridins gegen die Zeit auf, so erhält man aus der Anfangssteigung die Reaktionsgeschwindigkeit für die Spaltung von UpU. Für den dreikernigen Kupferkomplex  $[(L-H)Cu_3]^{5+}$  beträgt  $k_{obs}$   $3,5 (\pm 0,7) \times 10^{-8} s^{-1}$  (0,1 mM  $[(L-H)Cu_3]^{5+}$ , 0,5 mM UpU). Unter den gleichen Bedingungen wird das aktivierte Substrat HPNP ca.  $10^4$ -mal schneller gespalten ( $k_{obs} = 2,7 (\pm 0,4) \times 10^{-4} s^{-1}$ ).

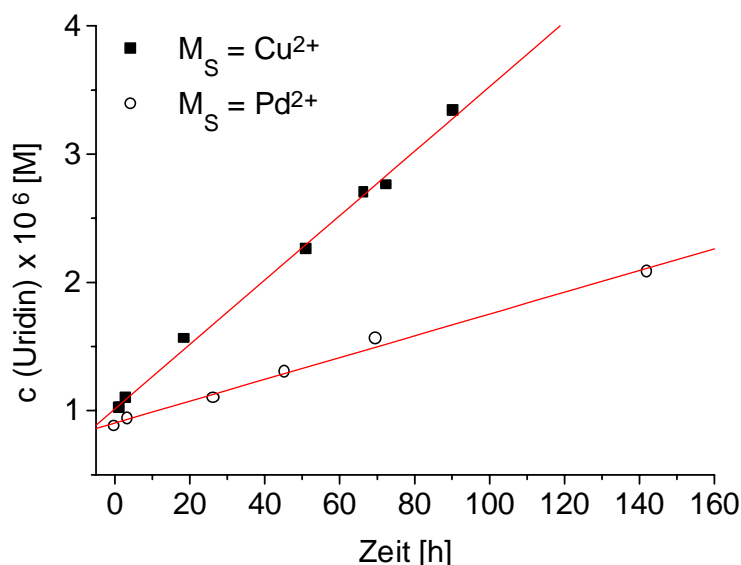


Abb. 5.15: Spaltung von UpU (0,5 mM) durch  $[(L-H)M_S Cu_2]^{5+}$  (0,1 mM) bei pH 7 und 20°C, Zunahme der Uridinkonzentration mit der Zeit, Doppelbestimmung; maximale Abweichung 20%

Die übrigen Ergebnisse sind in Tabelle 5.2 aufgelistet. Mit  $M_S = Ni^{2+}$  konnten keine genauen Werte ermittelt werden, da in den Proben schon nach einigen Stunden Niederschläge ausgefallen sind.

Zusammensetzung der Proben	$k_{obs}$ ( $s^{-1}$ )	
	$M_S = Cu^{2+}$	$M_S = Pd^{2+}$
0,5 mM UpU / 5mM MOPS	$< 5 \times 10^{-9}$	
0,1 mM UpU / 20 mM MOPS	$< 5 \times 10^{-9}$	
0,1 mM $[(L-H)M_S Cu_2]^{5+}$ / 0,5 mM UpU	$3,5 (\pm 0,7) \times 10^{-8}$	$1,2 (\pm 0,2) \times 10^{-8}$
1 mM $[(L-H)M_S Cu_2]^{5+}$ / 0,5 mM UpU	$1,0 (\pm 0,2) \times 10^{-7}$	$6,0 (\pm 1,2) \times 10^{-8}$
1 mM $[(L-H)M_S Cu_2]^{5+}$ / 0,1 mM UpU	$1,6 (\pm 0,3) \times 10^{-7}$	$1,0 (\pm 0,3) \times 10^{-7}$

Reaktionsbedingungen: DMSO/Wasser 1/3, 5 mM MOPS-Puffer (0,1 mM Komplex) bzw. 20 mM MOPS-Puffer (1 mM Komplex), pH 7,0, 20°C

Alle Werte sind Mittelwerte einer Doppelbestimmung, maximale Abweichung 20%.

Tabelle 5.2:  $k_{obs}$  für die Spaltung von UpU durch  $[(L-H)M_S Cu_2]^{5+}$

Insgesamt sind die für die Spaltung von UpU gefundenen Beschleunigungen durch  $[(L-H)M_5Cu_2]^{5+}$  kleiner als die kürzlich in der Literatur beschriebenen Werte für einen zweikernigen Kupferkomplex ( $k_{obs} = 8,7 \times 10^{-6} s^{-1}$ ; 2 mM Komplex, 0,1 mM UpU, 25°C, pH 7,5).<sup>[74]</sup>

Die Aktivität der Komplexe  $[(L-H)M_5Cu_2]^{5+}$  hängt auch bei der Spaltung von UpU vom strukturellen Metallion ab. Der Effekt ist jedoch bei einem Unterschied von  $k_{obs}$  um den Faktor 1,5 bis 3 beim Vergleich von  $[(L-H)Cu_3]^{5+}$  und  $[(L-H)PdCu_2]^{5+}$  nicht mehr so groß wie bei der Spaltung von HPNP, wo die Aktivitäten der beiden Metallkomplexe sich um den Faktor 10 unterscheiden. Eine mögliche Ursache dafür ist der größere sterische Anspruch des Übergangszustandes der Dinucleotid-Spaltung.