

7 Experimenteller Teil

7.1 Geräte

¹H-NMR-Spektroskopie:

¹H-NMR-Spektren wurden am Organisch-Chemischen Institut der Universität Münster mit dem Gerät ARX 300 der Firma Bruker aufgenommen. Die chemischen Verschiebungen wurden bei Verwendung von D₂O relativ zum Restwasserstoffsignal des Lösungsmittels ($\delta = 4,65$ ppm) angegeben. Bei Messungen in CDCl₃ oder CD₃OD diente Tetramethylsilan (TMS, $\delta = 0,0$ ppm) als interner Standard.

³¹P-NMR-Spektroskopie:

Die ³¹P-NMR-Spektren wurden mit dem Gerät AM 200 der Firma Bruker am Anorganisch-Chemischen Institut der Universität Münster angefertigt. Als externer Standard wurde 80%ige H₃PO₄ verwendet.

UV-VIS-Messungen:

Die UV-VIS-Untersuchungen wurden am Anorganisch-Chemischen Institut der Universität Münster mit dem Diode-array-Gerät HP 8453 der Firma Hewlett-Packard oder am Anorganisch-Chemischen Institut der Universität Heidelberg mit einem Spektrophotometer Specord S 100 der Firma Carl Zeiss durchgeführt. Es wurden Absorptionsspektren bei 20°C in 1 cm-Quarzküvetten aufgenommen.

HPLC-Untersuchungen:

Die HPLC-Messungen erfolgten am Anorganisch-Chemischen Institut der Universität Münster bzw. am Anorganisch-Chemischen Institut der Universität Heidelberg mit dem Gerät SIL-10A der Firma Shimadzu. Die Substanzen wurden mit Hilfe einer reversed-phase Säule RP-18 (Novogrom GSSB 10511K1204, Länge 120 mm, Durchmesser 4,5 mm, Korngröße 5 μm , Porendurchmesser 110 Å) aufgetrennt. Zur Detektion wurde ein Photometer SPD-10AVi der Firma Shimadzu verwendet.

Massenspektrometrie:

Die Aufnahme der Massenspektren erfolgte am Organisch-Chemischen Institut der Universität Heidelberg.

Die EI-massenspektroskopischen Untersuchungen wurden mit einem VG ZAB-2F durchgeführt. Die Ionisierungsenergie betrug dabei 70 eV. Die MALDI-Massenspektren wurden mit einem Bruker MALDI TOF BIFLEX aufgenommen. Hierbei wurde 9-Nitroanthracen (9-NA) als Matrix verwendet.

Reaktionskinetische Analyse durch High-Throughput-Screening:

Ein Teil der kinetischen Untersuchungen wurde in Mikrotiterplatten mit einem Spektrophotometer „Spectrafluor plus“ der Firma Tecan durchgeführt. Die Reaktionslösungen wurden mit einem Pipettierroboter (Genesis 150 workstation) der Firma Tecan hergestellt. Diese Messungen wurden ebenfalls am Anorganisch-Chemischen Institut der Universität Heidelberg durchgeführt.

7.2 Chemikalien

Die für die Synthesen und die kinetischen Untersuchungen verwendeten Chemikalien wurden von Fluka oder von Aldrich bezogen und hatten einen Reinheitsgrad von mindestens 98%.

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

Die Ammoniumsalze der DNA- bzw. RNA-Dinucleotide Thymidylyl(3'-5')thymidin und Uridinyl(3'-5')uridin, die Vergleichsproben der Spaltungsprodukte Thymidin-3'-Phosphat und Thymidin-5'-Phosphat sowie cyclo-2',3'-Adenosinmonophosphat wurden von Sigma geliefert und ohne weitere Aufarbeitung eingesetzt.

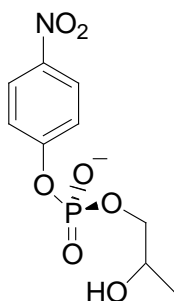
Die für die HPLC-Untersuchungen verwendeten Lösungsmittel (Methanol bzw. Acetonitril) hatten einen Reinheitsgrad > 99,8% (gradient grade).

Deuterierte Lösungsmittel wurden von Eurisotop bzw. von Deutero bezogen.

7.3 Darstellung von 2-Hydroxypropyl-*p*-nitrophenylphosphat (HPNP)^[100]

Eine Lösung von 3,58 g (9,65 mmol) *p*-Nitrophenylphosphat-Dinatriumsalz in 20 ml H₂O wird über eine mit Protonen beladene Austauschersäule (Amberlite IR-120) geschickt. Das saure, hellgelbe Eluat wird mit konzentrierter NH₃-Lösung auf pH 8 eingestellt. Anschließend werden 40 ml (57 mmol) Propylenoxid hinzugefügt und das Gemisch 2 Tage lang unter Rückfluß auf 35°C erwärmt. Danach wird das überschüssige Propylenoxid am Rotationsverdampfer entfernt. Das Reaktionsgemisch wird anschließend auf eine mit Protonen beladene Kationenaustauschersäule gegeben. Das erhaltene saure Eluat wird mit carbonatfreier Ba(OH)₂-Lösung neutralisiert (pH 7) und bei Raumtemperatur im Ölpumpenvakuum auf 20 ml eingengt. Nach der Zugabe von 40 ml Ethanol fällt nicht umgesetztes *p*-Nitrophenylphosphat als Bariumsalz aus. Dieses wird abfiltriert und das Filtrat am Rotationsverdampfer auf 10 ml eingengt. Die konzentrierte Lösung wird unter Rühren zu 300 ml eines Aceton-Ethanol-Gemisches (10:1) getropft. Das Produkt fällt als weißer Feststoff aus. Dieser wird abfiltriert und im Ölpumpenvakuum getrocknet.

Ausbeute: 1,84 g (5,35 mmol, 55,4 %)



¹H-NMR: (300 MHz, D₂O)

δ [ppm]: 8,06 (d, 2H_{ar},)

7,20 (d, 2H_{ar})

3,85 (m, 2H, CH₃CHOHCH₂R)

3,72 (m, 1H, CH₃CHOHCH₂R)

1,00 (d, 3H, CH₃CHOHCH₂R)

7.4 Ligandensynthese

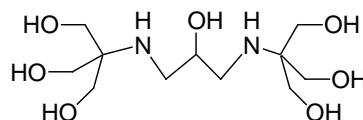
7.4.1 Darstellung von 1,3-Bis[tris(hydroxymethyl)methylamino]-2-propanol · 2 HCl (BTMP)^[102]

Eine Suspension von 12,1 g TRIS (0,1 mol) und 4 ml Epichlorhydrin (4,72 g, 0,05 mol) in 10 ml Ethanol wird 4 Stunden lang unter Rückfluß auf 78°C erhitzt. Die dabei entstehende hellgelbe, viskose Lösung wird anschließend mit 6 ml konz. HCl versetzt. Beim Abkühlen fällt das Produkt als weißer Feststoff aus. Dieser wird abfiltriert und zur Reinigung aus Ethanol/Wasser (2:1) umkristallisiert.

Ausbeute: 8,85 g (0,024 mol, 48,0%)

¹H-NMR: (300 MHz, D₂O)

δ [ppm]: 3,1 (4H, CCH₂N), 3,65 (12H, NCH₂OH), 4,05 (1H, CHOH)



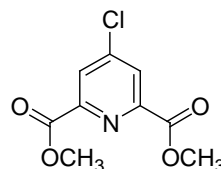
7.4.2 Synthese von 4-Chlor-2,6-dimethylpyridindicarboxylat^[103]

5 g Chelidamsäure (27,5 mmol) und 15,3 ml P,P-Dichlorphenylphosphinoxid (21,3 g, 110 mmol) werden 2 Stunden lang unter Rückfluß auf 130-140°C erhitzt. Dabei bildet sich aus der hellgelben Suspension eine rotviolette Lösung. Nach dem Abkühlen werden innerhalb von 30 Minuten 100 ml Methanol zugegeben. Dabei färbt sich die Reaktionslösung dunkelbraun und das Produkt fällt als hellbrauner Feststoff aus. Man rührt noch 10 Minuten bei Raumtemperatur und verdünnt anschließend mit 200 ml Wasser. Das Reaktionsgemisch wird dreimal mit je 100 ml Ethylacetat ausgeschüttelt und die vereinigten organischen Phasen dreimal mit je 150 ml Wasser gewaschen. Nach dem Trocknen mit Natriumsulfat wird das Lösungsmittel am Rotationsverdampfer entfernt. Der hellbraune Rückstand wird aus Methanol umkristallisiert. Man erhält 4-Chlor-2,6-dimethylpyridindicarboxylat in Form von feinen, hellbraunen Nadeln.

Ausbeute: 4,0 g (17,4 mmol, 63,3%)

¹H-NMR (300 MHz, CDCl₃):

δ [ppm] = 8,3 (s, 2H, Ar-H), 4,05 (s, 6H, COOCH₃)



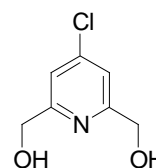
7.4.3 Darstellung von 4-Chlor-2,6-bis(hydroxymethyl)pyridin (Cl-BHP)^[104]

1 g 4-Chlor-2,6-dimethylpyridindicarboxylat (4,35 mmol) wird in 20 ml Methanol suspendiert und bei 0°C 1 g Natriumborhydrid in kleinen Portionen zugegeben. Die dabei entstandene orange Lösung wird eine Stunde bei 0°C und 15 Stunden bei 20°C gerührt. Anschließend wird das Reaktionsgemisch 8 Stunden lang unter Rückfluß auf 65°C erhitzt. Nach dem Abkühlen werden tropfenweise 5 ml 6 M HCl hinzugefügt, um überschüssiges NaBH₄ zu entfernen. Durch Zugabe von 5 ml 40%iger NaOH wird die Lösung stark alkalisch gemacht (pH 13). Das Lösungsmittel wird im Vakuum entfernt und der feste Rückstand zunächst mit 5 ml Ethanol und anschließend dreimal mit je 50 ml Dichlormethan extrahiert. Der unlösliche Feststoff wird abfiltriert und das Filtrat am Rotationsverdampfer bis zur Trockene eingengt. Man erhält das Produkt als hellgelben Feststoff. Dieser wird zur Reinigung aus Aceton umkristallisiert.

Ausbeute: 500 mg (2,88 mmol, 66,2%)

¹H-NMR (300 MHz, CD₃OD):

δ [ppm]= 7,28 (s, 2H, Ar-H), 4,55 (s, 4H, CH₂OH)



7.5 Komplexbildung

7.5.1 Fällung von Zr/BHP

Zwei ml ZrCl₄-Lösung (10 mM) werden mit einem Äquivalent (2,8 mg) BHP in zwei ml Wasser versetzt und ein ml einer NaClO₄-Lösung (400mg NaClO₄/ml) hinzugefügt. Es fällt langsam ein feiner, weißer Niederschlag aus. Dieser wird abzentrifugiert, getrocknet und in Acetonitril/Methanol 4/1 gelöst. Von dieser Lösung wird ein MALDI-Massenspektrum angefertigt.

7.5.2 ^1H -NMR-Untersuchungen

7.5.2.1 Bildung des Zirconium-Komplexes von 2,6-Bis(hydroxymethyl)pyridin (BHP)

Jeweils 5 mg ($3,6 \times 10^{-5}$ mol) BHP werden in 0,8 ml D_2O gelöst und 4,2 mg ($1,8 \times 10^{-5}$ mol), 8,4 mg ($3,6 \times 10^{-5}$ mol) bzw. 16,8 mg ($7,2 \times 10^{-5}$ mol) ZrCl_4 zugegeben. Mit NaOD wird ein pD-Wert von 4,0 eingestellt. Anschließend werden ^1H -NMR-Spektren aufgenommen. Außerdem wird ein Spektrum von 5 mg BHP in D_2O ohne Zusatz von ZrCl_4 bei pD 4 gemessen.

7.5.2.2 Untersuchungen mit TDCI als Ligand

5 mg (0,012 mmol) TDCI und 2,9 mg (0,012 mmol) ZrCl_4 werden in einem ml D_2O gelöst. Der pD-Wert wird mit NaOD auf 7,1 eingestellt und ein ^1H -NMR-Spektrum aufgenommen. Außerdem wird das Spektrum einer Lösung von 5 mg TDCI, 2,9 mg ZrCl_4 und 4,6 mg (0,012 mmol) EDTA in einem ml D_2O bei pD 7,1 gemessen. Zum Vergleich werden die ^1H -NMR-Spektren von 5 mg TDCI bzw. 5 mg EDTA in einem ml D_2O und von dem 1:1-Gemisch aus ZrCl_4 und EDTA bei pD 7,1 aufgenommen.

7.6 Hydrolyse der aktivierten Phosphodiester Bis(*p*-nitrophenyl)-phosphat (BNPP) und 2-Hydroxypropyl-*p*-nitrophenylphosphat (HPNP) durch Zr(IV)

7.6.1 Stammlösungen

Für die kinetischen Untersuchungen werden Stammlösungen von ZrCl_4 , den Liganden und den Substraten (BNPP bzw. HPNP) in Wasser hergestellt. Die Konzentration an ZrCl_4 beträgt dabei 0,01 mol/l, die der Liganden 0,1 mol/l und die der Substrate 1 mmol/l. BNPP wird unter Zugabe von 0,1 N NaOH gelöst und anschließend mit 0,1 N HCl auf einen pH-Wert von 7 bis 8 eingestellt.

7.6.2 Einfluß von Liganden auf die Hydrolysegeschwindigkeit

Jeweils ein ml der $ZrCl_4$ -Stammlösung (10 mM) wird mit 50 bzw. 100 μ l der jeweiligen Ligandlösung (0,1 M) versetzt und mit 0,1 N NaOH auf pH 4,0 bzw. 7,0 eingestellt. Anschließend werden die Komplexlösungen mit Wasser auf ein Volumen von 1,96 ml gebracht. Nach der Zugabe von jeweils 40 μ l BNPP-Lösung (1 mM) wird die Zunahme der Absorption bei $\lambda = 320$ nm und 400 nm verfolgt. Die Konzentration in den Reaktionslösungen beträgt 5 mM $ZrCl_4$, 2,5 bzw. 5 mM Ligand und 2×10^{-5} M BNPP.

Folgende Substanzen werden als Liganden verwendet: 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), 4-Chlor-2,6-bis(hydroxymethyl)pyridin (Cl-BHP), D-Glucamin, N,N-Bis(2-hydroxyethyl)glycin (Bicin), N-[Tris(hydroxymethyl)methyl]glycin (Tricin), Natriumcitrat, Natriumgluconat, Natriumtartrat, Hydroxyessigsäure, Acetylaceton und 2,6-Pyridindialdehyd.

7.6.3 pH-Abhängigkeit der Spaltungsreaktion

Zu jeweils einem ml einer Lösung von $ZrCl_4$ (10 mM) in H_2O werden 50 bzw. 100 μ l einer 0,1 M Ligandlösung in H_2O gegeben und die Komplexlösungen mit 0,1 N NaOH auf pH-Werte zwischen 3 und 7 eingestellt. Anschließend fügt man Wasser hinzu, bis man ein Gesamtvolumen von 1,96 ml erhält. Die Hydrolysereaktion wird durch Zugabe von 40 μ l einer wässrigen BNPP-Lösung (1 mM) gestartet und die Zunahme der Absorption bei 320 und 400 nm gemessen.

Die Konzentrationen in den Reaktionslösungen betragen 5 mM $ZrCl_4$, 2,5 bzw. 5 mM Ligand und 2×10^{-5} M BNPP.

Als Liganden werden TDCI, Bis-TRIS und Cl-BHP verwendet.

7.6.4 BNPP-Hydrolyse durch Hafnium- und Titankomplexe

Die Untersuchungen zur BNPP-Hydrolyse durch Hafnium- und Titan-Komplexe werden analog zu den Messungen mit Zirconium-Komplexen durchgeführt. Die Konzentrationen in den Reaktionslösungen betragen hierbei 5 mM Metallsalz, 5 mM Ligand und 2×10^{-5} M BNPP bei 20°C und pH 4 bzw. 7. Die Komplex-Lösungen mit Ti(IV) werden zunächst in Methanol hergestellt und anschließend mit Wasser auf die entsprechenden Konzentrationen verdünnt, der Methanolgehalt in den Reaktionslösungen beträgt 15 %. Die Hydrolyse wird durch Zugabe des Substrates gestartet und über die Zunahme der Absorption bei 320 nm und 400 nm verfolgt.

Als Liganden werden TDCI und BHP eingesetzt.

7.6.5 Spaltung von 2-Hydroxypropyl-*p*-nitrophenylphosphat (HPNP)

7.6.5.1 Abhängigkeit der Spaltungsgeschwindigkeit von HPNP von der ZrCl₄-Konzentration

Es werden Reaktionslösungen mit ZrCl₄-Konzentrationen zwischen 0,1 und 5 mmol/l und einer HPNP-Konzentration von 2×10^{-5} mol/l verwendet. Hierfür verdünnt man zwischen 100 µl und 1000 µl der ZrCl₄-Stammlösung mit Wasser auf 1,5 ml. Der pH-Wert wird mit 0,1 N NaOH auf 3,5 eingestellt. Anschließend füllt man mit Wasser auf ein Gesamtvolumen von 1,96 ml auf. Durch Zugabe von 40 µl 1 mM HPNP-Lösung wird die Reaktion gestartet. Es wird die Zunahme der UV-Absorption bei $\lambda = 320$ nm bestimmt.

7.6.5.2 Produktanalyse durch ³¹P-NMR-Spektroskopie

5,2 mg (0,015 mmol) HPNP, 7 mg (0,03 mmol) ZrCl₄ und 12,2 mg (0,03 mmol) TDCI werden in einem ml H₂O gelöst und der pH-Wert mit 0,1 N NaOH auf 3,5 eingestellt. Nach 90 Minuten werden 16,8 mg (0,045 mol) EDTA zugegeben und der pH-Wert mit NaOH auf 7,2 gebracht. Nach Zugabe von 50 µl D₂O wird ein ³¹P-NMR-Spektrum aufgenommen.

Auf die gleiche Weise wird eine Messung mit $ZrCl_4$ ohne Zusatz von TDCI durchgeführt. Außerdem wird eine Lösung von 5,2 mg HPNP in einem ml Wasser auf einen pH-Wert von 10,5 eingestellt und für 48 Stunden auf $60^\circ C$ erwärmt. Anschließend werden 50 μl D_2O zugegeben und der pH-Wert mit 0,1 N HCl auf 7,2 gebracht. Nach der Messung des ^{31}P -NMR-Spektrums werden 3,4 mg $ZrCl_4$ zugegeben. Dabei stellt sich ein pH von 3,5 ein. Nach 90 Minuten werden 8,4 mg EDTA zugefügt, der pH-Wert auf 7,2 eingestellt und erneut ein ^{31}P -NMR-Spektren aufgenommen.

7.7 Spaltung von DNA- und RNA-Dinucleotiden

7.7.1 Probenvorbereitung

7.7.1.1 Hydrolyse von Thymidylyl(3'-5')thymidin (TpT) durch Zirconium- und Cer-Komplexe

Es werden Reaktionslösungen mit folgender Zusammensetzung hergestellt: 5 mM $ZrCl_4$ bzw. $(NH_4)_2Ce(NO_3)_6$, 5 mM bzw. 2,5 mM Ligand und 0,1 mM TpT. Der pH-Wert wird mit 0,1 N NaOH auf 4,0 bzw. auf 7,0 eingestellt. Die Hydrolysereaktion läuft bei $20^\circ C$ ab. Im Abstand von ca. 20 Stunden werden Proben von 100 μl entnommen und die Reaktion durch Zugabe von 200 μl des HPLC-Laufmittels (8 mM KH_2PO_4 in Wasser mit 12 % Methanol) gestoppt. Der dabei entstehende Niederschlag wird abzentrifugiert, anschließend werden die Konzentrationen der Hydrolyseprodukte durch HPLC-Messungen bestimmt.

Auf die gleiche Weise werden Meßreihen bei $37^\circ C$ und bei $60^\circ C$ durchgeführt.

Als Liganden werden TDCI, 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. Außerdem wird $ZrCl_4$ ohne Zusatz von Liganden verwendet.

7.7.1.2 Spaltung von Uridinyl(3'-5')Uridin (UpU) durch Zr(IV)

Für kinetischen Untersuchungen zur Spaltung von UpU werden Lösungen verwendet, die 5 mM ZrCl₄, 2,5 mM BTMP bzw. 5 mM TDCI und 0,1 mM UpU enthalten. Diese werden mit 0,1 N NaOH auf pH 3 bzw. pH 7 eingestellt. Nach 30, 50, 120, 240 und 360 Minuten werden Proben von 100 µl entnommen und zu 200 µl des HPLC-Laufmittels (8 mM KH₂PO₄ in Wasser mit 12 % Methanol) gegeben, um die Reaktion zu stoppen. Der entstehende Niederschlag wird abzentrifugiert und die Zusammensetzung der Reaktionslösungen durch HPLC-Messungen analysiert.

Nach der gleichen Vorgehensweise werden Meßreihen mit verschiedenen Konzentrationen an ZrCl₄ (0,2 bis 5 mM) bei pH 3,0 durchgeführt.

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

Zu jeweils 100 µl ZrCl₄-Lösung (10 mM) werden 10 µl Ligandlösung (0,1 M TDCI bzw. 0,05 M BTMP) und 500 µl Wasser gegeben und der pH-Wert mit 0,1 N NaOH auf 7,0 eingestellt. Anschließend wird Wasser hinzugefügt, um ein Gesamtvolumen von 990 µl zu erhalten. Die Reaktion wird durch Zugabe von 10 µl 2',3'-cAMP-Lösung (5 mM) gestartet. Die Konzentration in den Reaktionslösungen beträgt 1 mM ZrCl₄, 0,5 bzw. 1 mM Ligand und 0,05 mM 2',3'-cAMP. Die Hydrolysereaktion wird bei 20°C durchgeführt, als Liganden werden TDCI und BTMP verwendet. Nach 15, 30, 45, 60, 120 und 300 Sekunden werden Proben von 100 µl entnommen und mit 5 Äquivalenten EDTA versetzt, um die Reaktion zu stoppen. Die Zusammensetzung der Lösungen wird durch HPLC-Messungen analysiert.

Analog wird eine Messung mit ZrCl₄ (1 mM) bei pH 3,0 durchgeführt.

7.7.2 HPLC-Untersuchungen

Jeweils 25 µl der Probenlösung werden auf eine apolare reversed-phase Säule RP-18 injiziert. Als Laufmittel wird eine Lösung von 8 mM KH₂PO₄ in Wasser mit 12 % Methanol verwendet. Die Fließgeschwindigkeit beträgt 1 ml/min bei der Untersuchung der Hydrolyse von TpT und 2',3'-cAMP bzw. 0,3 ml/min bei der Spaltung von UpU. Die einzelnen Substanzen werden durch die Messung der UV-Absorption bei $\lambda = 260$ nm detektiert.

Für die quantitative Auswertung wird die Zunahme der Konzentration von Thymidin bzw. Uridin sowie die Abnahme der Konzentration von 2',3'-cAMP herangezogen.

7.8 Vorversuche zur Synthese von Oligonucleotid-Konjugaten

7.8.1 Reaktion von Octadecylmercaptan mit *p*-Dichlorxylyl

92 mg (0,32 mmol) Octadecylmercaptan und 280 mg (2,6 mmol) *p*-Dichlorxylyl werden in 1,6 ml 1,4-Dioxan gelöst und 48 μ l (0,32 mmol) DBU hinzugefügt. Die Lösung wird innerhalb weniger Minuten trübe. Das Reaktionsgemisch wird 24 Stunden bei Raumtemperatur gerührt, anschließend wird der Niederschlag abzentrifugiert und mit *n*-Hexan gewaschen. Das Filtrat und die Waschlösung werden vereinigt und das Lösungsmittel am Rotationsverdampfer entfernt. Das hellgelbe Rohprodukt wird säulenchromatographisch gereinigt (Kieselgel, *n*-Hexan/Essigester 15:1). Man erhält **1** als weißen Feststoff.

Ausbeute: 59 mg (0,14 mmol, 44%)

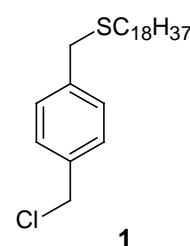
DC: (Kieselgel, Hexan/Essigester 15:1): $R_f = 0,8$

(Kieselgel, CHCl_3 /Methanol 19:1): $R_f = 0,8$

$^1\text{H-NMR}$: (200 MHz, CDCl_3):

δ [ppm]: 0,9(3H), 1,2(30H), 1,6(2H), 2,4(2H) $\text{C}_{18}\text{H}_{37}$,
3,6 (2H, $\text{CH}_2\text{S-R}$), 4,48 (2H, CH_2Cl), 7,3 (4H, Ar-*H*)

MS (EI): m/z : 139 (92%, $\text{M}^+ - \text{C}_{18}\text{H}_{37}\text{S}$), 285 (90%, $\text{C}_{18}\text{H}_{37}\text{S}^+$), 424 (20%, M^+),
571 (4%, $[(\text{C}_{18}\text{H}_{37}\text{S})_2]^+$), 675 (1,3%, $[\text{C}_8\text{H}_8(\text{C}_{18}\text{H}_{37}\text{S})_2]^+$).



7.8.2 Weitere Umsetzung mit TRIS

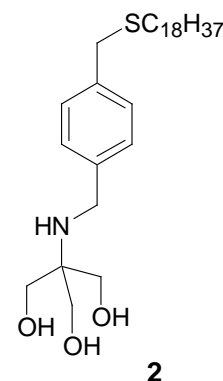
7 mg ($1,65 \times 10^{-5}$ mol) **1** werden mit 10 mg ($8,25 \times 10^{-5}$ mol) TRIS in 0,5 ml DMF für 24 Stunden auf 60°C erwärmt. Dabei löst sich das bei 20°C nur schlecht lösliche TRIS auf. Zur Aufarbeitung des Reaktionsgemisches werden nach dem Abkühlen ein ml Wasser und ein ml Chloroform zugegeben. Die wässrige Phase wird dreimal mit je einem ml CHCl_3 ausgeschüttelt und die vereinigten Chloroformphasen zweimal mit je einem ml Wasser gewaschen. Anschließend wird die CHCl_3 -Phase mit MgSO_4 getrocknet, das Trockenmittel abfiltriert und die Lösungsmittel am Rotationsverdampfer entfernt.

Man erhält **2** als weißen Feststoff.

DC: (Kieselgel, CHCl_3 /Methanol 19:1): R_f -Wert: 0,0

$^1\text{H-NMR}$: (200 MHz, CDCl_3):

δ [ppm]: 0,9(3H), 1,1(30H), 1,6(2H), 2,4(2H) $\text{C}_{18}\text{H}_{37}$,
3,5 (6H, NCH_2OH), 3,55 (2H, $\text{CH}_2\text{S-R}$), 3,75 (2H, $\text{CH}_2\text{N-R}'$),
7,3 (4H, Ar-*H*)



7.9 Allosterische Regulierung der Phosphodiesterhydrolyse

7.9.1 Nachweis der Komplexbildung durch spektrophotometrische Titrationsen

7.9.1.1 Bildung der einkernigen Komplexe $[(L-H)M_S]^+$

Für die spektrophotometrischen Untersuchungen zur Bildung der einkernigen Komplexe werden folgende Stammlösungen verwendet: 0,4 mM Ligand L und 2 mM $Cu(NO_3)_2$, $Ni(NO_3)_2$ bzw. $Pd(CH_3CN)_4(BF_4)_2$ in DMSO. 500 μ l der Ligandlösung werden mit 1,4 ml DMSO verdünnt und die jeweilige Metallsalzlösung in Schritten von 20 μ l (0,2 Äquivalente) hinzugefügt. Nach jeder Zugabe wird ein UV-Spektrum aufgenommen. Dabei wird bei der Titration mit $Cu(NO_3)_2$ 5 Minuten gewartet bis sich der Komplex gebildet hat, bei der Zugabe von $Ni(NO_3)_2$ wird die Lösung 15 Minuten und bei der Zugabe von $Pd(CH_3CN)_4(BF_4)_2$ 30 Minuten lang auf 60°C erwärmt. Nach dem Abkühlen (10 Minuten) wird das UV-Spektrum gemessen. Das Volumen wird auf einen konstanten Wert von 2 ml korrigiert.

7.9.1.2 Bildung der dreikernigen Komplexe $[(L-H)M_S Cu_2]^{5+}$

Zunächst werden folgende Stammlösungen hergestellt: 0,5 mM $[(L-H)Cu]^+$, $[(L-H)Ni]^+$ und $[(L-H)Pd]^+$ in DMSO, 0,05 mM MOPS-Puffer pH 7,0 in Wasser, 2 mM $Cu(NO_3)_2$ in Wasser/DMSO 3/1 und 5 mM Natriumdimethylphosphat in Wasser. 400 μ l der Komplexlösung werden mit 200 μ l Puffer und 200 μ l der Phosphatlösung gemischt und 75 μ l DMSO und 1,025 ml Wasser zugegeben. Die so erhaltenen Konzentrationen betragen 0,1 mM $[(L-H)M_S]^+$, 5 mM MOPS-Puffer und 0,5 mM Natriumdimethylphosphat in Wasser/DMSO 3/1 bezogen auf ein konstantes Volumen von 2 ml. Die $Cu(NO_3)_2$ -Lösung wird in Schritten von 25 μ l (0,25 Äquivalenten) zugegeben. Nach jeder Zugabe wird nach einer Wartezeit von ca. 30 Sekunden ein UV-Spektrum aufgenommen. Das Volumen wird auf 2 ml korrigiert.

Bei einer Wiederholung der Titrationsen wurden die einkernigen Komplexe *in situ* aus einer Ligandlösung und der jeweiligen Metallsalzlösung in DMSO hergestellt.

Bei einigen Titrationsen wurde außerdem Natriumdimethylphosphat durch KH_2PO_4 bzw. durch HPNP ersetzt.

7.9.2 Untersuchungen zum Metallaustausch

Für die massenspektrometrischen Untersuchungen werden 500 μl einer 0,4 mM Lösung der einkernigen Komplexe, 200 μl MOPS-Puffer, 400 μl Kupfernitratlösung und 200 μl HPNP-Lösung zusammengegeben und 700 μl Wasser hinzugefügt. Die Konzentration in den Reaktionslösungen beträgt dann 0,1 mM $[(\text{L-H})\text{M}_\text{S}]^+$, 0,4 mM Cu^{2+} , 5 mM Puffer und 0,5 mM HPNP in Wasser/DMSO 3/1. Nach 3 Tagen Lagerung bei 20°C werden MALDI-Massenspektren aufgenommen.

Auf die gleiche Weise werden Gemische von $[(\text{L-H})\text{Ni}]^+$ und $[(\text{L-H})\text{Cu}]^+$ bzw. $[(\text{L-H})\text{Pd}]^+$ und $[(\text{L-H})\text{Cu}]^+$ mit 4 Äquivalenten Cu^{2+} hergestellt und massenspektroskopisch untersucht.

7.9.3 Kinetische Untersuchungen zur Spaltung von HPNP

7.9.3.1 Verwendete Stammlösungen

Für die kinetischen Untersuchungen zur Spaltung von HPNP werden folgende Stammlösungen hergestellt: 0,4 mM $[(\text{L-H})\text{M}_\text{S}]^+$ in DMSO, 2 mM $\text{Cu}(\text{NO}_3)_2$ in Wasser, 0,05 M MOPS-Puffer (pH 7,0) in Wasser und 5 mM HPNP in Wasser.

Ein Teil der Messungen wird mit *in situ* aus einer 0,4 mM Lösung des Liganden L in DMSO und 2 mM Lösungen der jeweiligen Metallsalze in Wasser hergestellten $[(\text{L-H})\text{M}_\text{S}]^+$ -Lösungen durchgeführt. Die Ligand- und Komplexlösungen sowie die HPNP-Lösung werden kurz vor der Messung frisch angesetzt

7.9.3.2 Abhängigkeit der Reaktionsgeschwindigkeit von M_S und von der Cu^{2+} -Konzentration

Zu jeweils 500 μl der $[(\text{L-H})\text{M}_\text{S}]^+$ -Lösungen (0,4 mM in DMSO) werden 0 μl , 50 μl , 100 μl , 150 μl , 200 μl , 250 μl bzw. 300 μl $\text{Cu}(\text{NO}_3)_2$ -Lösung (2 mM in Wasser) hinzugefügt und mit Wasser auf ein Gesamtvolumen von 1,6 ml aufgefüllt. Anschließend werden 200 μl MOPS-Puffer (50 mM in Wasser, pH 7,0) zugegeben und die Reaktion durch Zugabe von 200 μl HPNP-Lösung (5 mM in Wasser) gestartet. Die Konzentrationen in den Reaktionslösungen betragen damit 0,1 mM $[(\text{L-H})\text{M}_\text{S}]^+$, zwischen 0 und 0,3 mM Cu^{2+} , 5 mM Puffer und 0,5 mM HPNP in Wasser/DMSO 3/1. Die Reaktion läuft bei 20°C ab.

Die Spaltung von HPNP wird über die Zunahme der UV-Absorption bei 420 nm durch entstehendes *p*-Nitrophenolat verfolgt. Die Gesamtkonzentration des Hydrolyseproduktes wird unter Berücksichtigung des pH-abhängigen Gleichgewichtes zwischen *p*-Nitrophenol und *p*-Nitrophenolat ($pK_s = 7,15$) berechnet.

7.9.3.3 pH-Abhängigkeit

Es werden Reaktionslösungen mit folgenden Konzentrationen verwendet: 0,1 mM $[(L-H)M_S]^+$, 0,25 mM Cu^{2+} , 5 mM Puffer und 0,5 mM HPNP in Wasser/DMSO 3/1. Diese werden wie in Kapitel 7.8.3.2 beschrieben aus den Stammlösungen hergestellt. Als Puffersubstanzen dienen bei pH 6,0 und 6,5 MES und bei pH 7,0 und 7,5 MOPS.

Die Reaktionen bei pH 6,0 und 6,5 werden in 1 mm Quarzküvetten bei 320 nm und 400 nm verfolgt, für die Spaltung von HPNP bei pH 7,0 und 7,5 wird die Absorption bei 420 nm herangezogen. In diesen beiden Fällen werden 1 cm Quarzküvetten benutzt. Die Temperatur beträgt bei allen Messungen 20°C.

7.9.3.4 Abhängigkeit der Spaltungsgeschwindigkeit von der Komplexkonzentration

Die Untersuchungen zur Abhängigkeit der Reaktionsgeschwindigkeit von der Komplexkonzentration werden unter folgenden Reaktionsbedingungen durchgeführt: 0,05 bis 0,3 mM $[(L-H)Cu]^+$, 2,5 Äquivalente Cu^{2+} , 50 Äquivalente MOPS-Puffer (pH 7,0) und 0,5 mM HPNP bei 20°C. Zur Herstellung der Reaktionslösungen werden eine 1,5 mM Lösung von $[(L-H)Cu]^+$ in DMSO, 2 mM $Cu(NO_3)_2$, 5 mM HPNP und 1 M Puffer in Wasser verwendet.

Zur Bestimmung der Reaktionsgeschwindigkeit wird die Absorption bei 420 nm gemessen.

7.9.3.5 Turnover-Messungen

Die Reaktionslösungen werden wie in Kapitel 7.8.3.2 beschrieben hergestellt: 0,1 mM $[(L-H)M_S]^+$, 0,25 mM Cu^{2+} , 5 mM MOPS-Puffer (pH 7,0) und 0,5 mM HPNP in Wasser/DMSO 3/1. Die Spaltung von HPNP wird bei 20°C durchgeführt, die UV-Absorption bei 420 nm wird über mehrere Stunden hinweg verfolgt.

7.9.3.6 Abhängigkeit der Reaktionsgeschwindigkeit von der Substratkonzentration (Michaelis-Menten-Kinetik)

Die Untersuchungen zur Bestimmung von k_{cat} und K_{HPNP} werden in Mikrotiterplatten durchgeführt, die Reaktionslösungen werden dabei mit Hilfe eines Pipettierroboters hergestellt. Es werden folgende Stammlösungen verwendet: 0,4 mM [(L-H) M_S]⁺ in DMSO, 1,2 mM Cu(NO₃)₂, 5 mM MOPS-Puffer (pH 7,0) und 10 mM HPNP in Wasser. Zunächst wird eine Verdünnungsreihe von HPNP mit Konzentrationen zwischen 0,1 und 10 mM angesetzt. Anschließend werden jeweils 25 μ l Komplexlösung, 10 μ l Puffer, 25 μ l der entsprechenden HPNP-Lösung und 15 μ l Wasser zusammenpipettiert und die Reaktion durch Zugabe von 25 μ l Cu(NO₃)₂-Lösung gestartet. Die Konzentrationen in den Reaktionslösungen betragen damit 0,1 mM [(L-H) M_S]⁺, 0,3 mM Cu²⁺, 5 mM Puffer und zwischen 0,025 und 2,5 mM HPNP in Wasser/DMSO 3/1. Die Reaktion läuft bei 20°C ab. Die Umesterung von HPNP wird spektrophotometrisch bei einer Wellenlänge von 430 nm ($\epsilon = 13000 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ für *p*-Nitrophenolat) verfolgt. Die Gesamtkonzentration des Spaltungsproduktes wird unter Berücksichtigung des pH-abhängigen Gleichgewichtes zwischen *p*-Nitrophenol und *p*-Nitrophenolat ($pK_s = 7,15$) berechnet.

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

Die kinetischen Messungen zur Spaltung von HPNP werden unter den gleichen Bedingungen durchgeführt wie die mit L als Ligand.

200 μ l einer 1 mM Lösung von R-S-R in DMSO werden mit 10 bis 100 μ l einer 20 mM Cu(NO₃)₂-Lösung versetzt und mit DMSO auf 500 μ l verdünnt. Nach einer Wartezeit von 2 Stunden werden 1,1 ml Wasser und 200 μ l MOPS-Puffer hinzugefügt. Nach weiteren 30 Minuten werden 200 μ l des Substrates hinzugeben, die Reaktionslösungen enthalten somit 0,1 mM Ligand, zwischen 0,1 und 1 mM Cu²⁺, 5 mM MOPS-Puffer (pH 7,0) und 0,5 mM HPNP in Wasser/DMSO 3/1.

Man verfolgt die Reaktion bei 20°C über die Zunahme der UV-Absorption bei 420 nm.

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

Die Reaktionslösungen werden mit folgenden Konzentrationen hergestellt wie in Kapitel 7.8.3.2 beschrieben: 0,1 mM $[(L-H)M_5]^+$, 0,25 mM Cu^{2+} , 5 mM MOPS-Puffer (pH 7,0) und 0,5 mM Substrat in Wasser/DMSO 3/1. Als Substrate werden *p*-Nitrophenylphosphat, Bis(*p*-nitrophenyl)phosphat und *p*-Nitrophenylacetat verwendet. Die Hydrolysereaktion wird bei 20°C durchgeführt und die Veränderung der Absorption bei 420 nm ermittelt.

7.9.4 Spaltung des RNA-Dinucleotids UpU

7.9.4.1 Probenvorbereitung

Es werden Lösungen mit folgender Zusammensetzung hergestellt: 0,1 mM $[(L-H)M_5]^+$, 0,25 mM Cu^{2+} , 5 mM MOPS-Puffer (pH 7,0) und 0,5 mM UpU in Wasser/DMSO 3/1. Die Hydrolysereaktion läuft bei 20°C ab. In geeigneten Zeitabständen werden Proben von 100 µl entnommen und die Reaktion durch Zugabe von 200 µl des HPLC-Laufmittels (8 mM KH_2PO_4 in Wasser mit 12 % Methanol) gestoppt. Der dabei entstehende Niederschlag wird abzentrifugiert, anschließend werden die Konzentrationen der Hydrolyseprodukte durch HPLC-Messungen bestimmt.

Auf die gleiche Weise werden Meßreihen mit 1 mM $[(L-H)M_5]^+$, 2,5 mM Cu^{2+} , 20 mM MOPS-Puffer (pH 7,0) und 0,1 bzw. 0,5 mM UpU in Wasser/DMSO 3/1 durchgeführt.

7.9.4.2 Durchführung der HPLC-Messungen

Die Reaktionsprodukte der Spaltung von UpU 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. Es werden jeweils 25 µl der Probenlösung injiziert. Die Detektion erfolgt durch Messung der UV-Absorption bei $\lambda = 260$ nm.