

ger als PC_{Alkyl} -Bindungen; dies ist von Bedeutung, da der Bruch dieser Bindung eine wichtige Voraussetzung für die Bildung von **3a** ist.

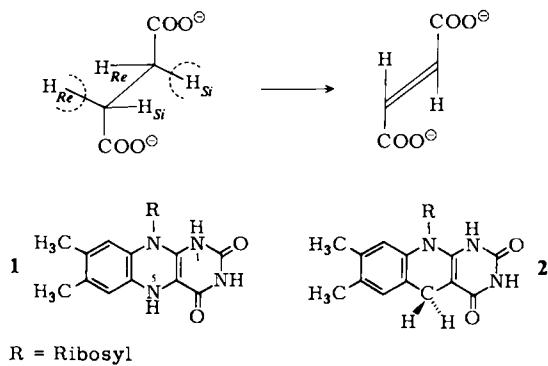
Eingegangen am 28. September 1981 [Z 74]
Das vollständige Manuskript dieser Zuschrift erscheint in:
Angew. Chem. Suppl. 1982, 893–906

- [4] W. T. Brady, *Tetrahedron* 37 (1981) 2949.
[7] E. Lindner, H. Lesiecki, *Z. Naturforsch. B* 33 (1978) 849.
[11] J. Firl, W. Runge, *Z. Naturforsch. B* 29 (1974) 393; *Angew. Chem.* 85 (1973) 671; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* 12 (1973) 668.
[12] Aus Ether kristallisiert **2a** monoklin, Raumgruppe $P2_1/c$, $a = 1113.4(6)$, $b = 1345.6(3)$, $c = 1811.0(5)$ pm, $\beta = 96.76(3)^\circ$, $Z = 8$, $\rho_{nc} = 1.465$ g · cm $^{-3}$. Diffraktometermessung bei -110°C . Die Struktur wurde mit direkten Methoden und Differenz-Fourier-Synthesen für 2157 unabhängige Reflexe ($\Theta = 3\text{--}23^\circ$) mit dem Programmsystem SHEL-76 bis $R = 0.034$ anisotrop verfeinert (außer H).

Spezifische Übertragung des H_{Si} -Atoms von Succinat auf das 5-Desazaflavin-Analogon von Succinat-Dehydrogenase**

Von Hans-Joachim Strobel und János Rétey*

Succinat-Dehydrogenase aus Schweineherz-Mitochondrien katalysiert die Abspaltung je eines H_{Re} - und H_{Si} -Atoms von Succinat^[1]. Dies entspricht bei Annahme anti-periplanarer Konformation einer *anti*-Eliminierung.



Die prosthetischen Gruppen des Enzyms sind kovalent gebundenes Flavin und Eisen-Schwefel-Cluster, welche die Elektronen an Ubichinon und die Cytochrome weitergeben. Weniger klar ist das Schicksal der abgespaltenen Protonen. Sie zeigen zwar verschiedene intramolekulare kinetische Isotopeneffekte^[2a], werden aber beide vom Lösungsmittel aufgenommen. Dies ist dadurch zu erklären, daß in der reduzierten Form **1** des Riboflavins die hinzugekommenen H-Atome an N-5 und N-1 gebunden und daher austauschbar sind. Mit 5-Desazafavin (vgl. **2**) ist ein solcher Austausch vermeidbar^[3a]. Von Succinat-Dehydrogenase läßt sich Flavin nicht ohne Denaturierung des Enzyms entfernen. Deshalb wurde 5-Desazafavin auf biosynthetischem Weg mit der flavinauxotrophen Hefemutante HK 857b^[4] eingebaut. Diese wächst zwar nicht auf 5-Desazafavin, inkorporiert es aber in die Mitochondrien während einer aeroben Inkubation. Dazu ließen wir

die Mangelmutante nach Singer et al.^[3b] unter strikt anaeroben Bedingungen in Gegenwart von Riboflavin wachsen. Nach gründlichem Auswaschen des Nährmediums folgte die aerobe Inkubation in Gegenwart von 5-Desazafavin, wobei die Hefe-Mitochondrien voll ausgebildet wurden. Die anschließend isolierten Mitochondrien enthielten nur 5-Desazafavin, was sich in ihrem Fluoreszenz-Emissionsspektrum und in der Tatsache manifestierte, daß sie die Oxidation von Succinat mit Sauerstoff und unnatürlichen Elektronenacceptoren (*N*-Methylphenaziniumsulfat, $K_3Fe(CN)_6$) nicht katalysierten.

Die 5-Desazafavin-haltige Succinat-Dehydrogenase wurde aus den Mitochondrien nach der gleichen Prozedur^[5] wie das natürliche Enzym isoliert. Natürliche und modifizierte Dehydrogenase aus Hefe zeigten ähnliche Wanderungsgeschwindigkeiten in der Disc-Elektrophorese, aber verschiedene Fluoreszenz-Emissionsspektren ($\lambda_{max} = 520$ nm bzw. 480 nm). Das Enzym-Analogon war mit unnatürlichen Elektronenacceptoren katalytisch inaktiv.

Die Untersuchung der Stereospezifität der natürlichen Succinat-Dehydrogenase aus Hefe-Mitochondrien ergab eine weitgehende Übereinstimmung mit derjenigen des Enzyms aus Schweineherz-Mitochondrien. So wurde während der anaeroben Inkubation in D_2O das gleiche Anfangsverhältnis (2:1)^[2a] von mono- und dideuteriertem Succinat gefunden. Bei der partiellen Oxidation von (*R*)-, (*RS*)- und (*S*)-[2- 3 H]Succinat fand man ähnliche Tritiumanreicherungen in den umgesetzten Substraten^[2b] entsprechend einem großen Isotopeneffekt ($k(H_{Re})/k(T) \approx 10$) für die Abspaltung von H_{Re} und einem kleineren ($k(H_{Si})/k(T) \approx 1.5$) für die Abspaltung von H_{Si} .

Nach diesen Vorarbeiten wurde die 5-Desazafavin-haltige Succinat-Dehydrogenase mit (*R*)- und mit (*S*)-[2- 3 H, U- 14 C]Succinat inkubiert. Anschließend wurde die Hauptmenge des überschüssigen radioaktiven Substrats und des stöchiometrisch gebildeten Produkts durch Dialyse entfernt. Durch Gelchromatographie des radioaktiven Proteins an Bio-Gel P-2 wurden die Reste niedermolekularer Substanzen abgetrennt. Aus Radioaktivität (3H und ^{14}C) und Proteingehalt der einzelnen Fraktionen (Fig. 1) ergibt

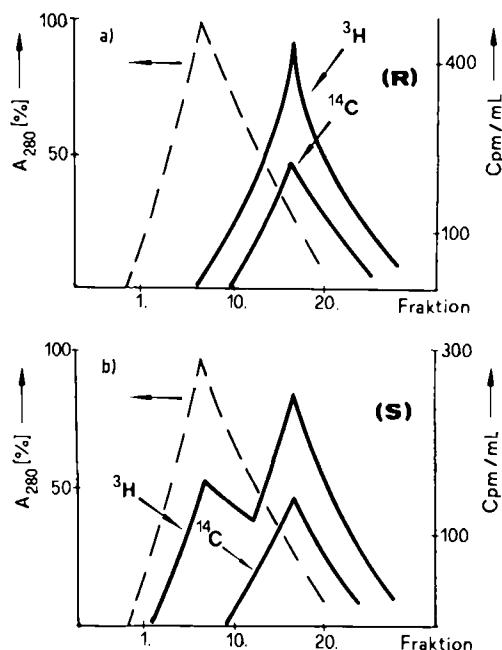


Fig. 1. Radiochromatographie (—) des 5-Desazafavin-Analogons der Succinat-Dehydrogenase an Bio-Gel P-2 nach Inkubation a) mit (*R*)-[2- 3 H, U- 14 C]Succinat und b) mit (*S*)-[2- 3 H, U- 14 C]Succinat. — Der Proteingehalt wurde durch Absorptionsspektroskopie (---) ermittelt.

[*] Prof. Dr. J. Rétey, Dr. H.-J. Strobel
Lehrstuhl für Biochemie im Institut für Organische Chemie
der Universität
Richard-Willstätter-Allee, D-7500 Karlsruhe 1

[**] Diese Arbeit wurde von der Deutschen Forschungsgemeinschaft und dem Fonds der Chemischen Industrie unterstützt. Wir danken Prof. I. D. Spenser für Diskussionsbeiträge und Prof. F. Lingens für die Hefemutanten.

sich, daß Tritium nur aus (*S*)-[2-³H]Succinat auf das Protein übertragen wurde. In den späteren Fraktionen entspricht das ³H/¹⁴C-Verhältnis demjenigen des Substrates.

Die Hauptmenge der radioaktiven Säuren wurde aus dem Dialysewasser mit Anionenaustauscher isoliert. Nach chromatographischer Trennung wurden die Bernsteinsäure- und Äpfelsäure-Proben (die primär gebildete Fumarsäure wurde von der kontaminierenden Fumarase weitgehend in L-Äpfelsäure umgewandelt, was aber die Radioaktivität, insbesondere das ³H/¹⁴C-Verhältnis, nicht verändern sollte) auf ihre Radioaktivität geprüft. Wie erwartet^[2b] sank bei der Dehydrierung mit Succinat-Dehydrogenase das ursprüngliche ³H/¹⁴C-Verhältnis auf etwa die Hälfte, und zwar unabhängig vom Chiralitätssinn der verwendeten

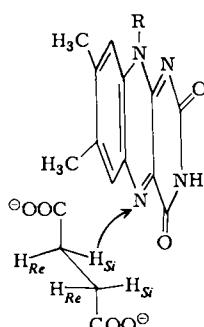


Fig. 2. Relative Lage von Substrat und Coenzym im aktiven Zentrum der Succinat-Dehydrogenase.

[³H]Bernsteinsäure. – Die sterischen Verhältnisse am aktiven Zentrum können demnach durch Fig. 2 dargestellt werden.

Eingegangen am 11. Dezember 1981 [Z 70]

- [1] T. T. Tchen, H. van Milligan, *J. Am. Chem. Soc.* 82 (1960) 4115.
- [2] a) J. Rétey, J. Seibl, D. Arigoni, J. W. Cornforth, G. Ryback, W. P. Zylemaker, C. Veeger, *Eur. J. Biochem.* 14 (1970) 232; b) W. P. Zylemaker, C. Veeger, F. Kunz, J. Rétey, D. Arigoni, *Chimia* 24 (1970) 33.
- [3] a) R. Spencer, J. Fisher, R. Laura, C. Walsh in T. P. Singer: *Flavins and Flavoproteins*, Elsevier, Amsterdam 1976, S. 349; b) S. Grossman, J. Goldenberg, F. B. Kearney, G. Oestreicher, T. P. Singer, *ibid.* S. 302.
- [4] F. Lingens, O. Oltmanns, A. Bacher, *Z. Naturforsch.* 22 (1967) 755.
- [5] T. P. Singer, V. Massey, E. B. Kearney, *Arch. Biochem. Biophys.* 69 (1957) 405.

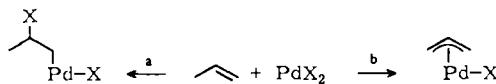
Oxidation mit Palladiumsalzen: Stereo- und regiospezifische Acetoxylierung von 4-Vinylcyclohexen-Derivaten**

Von Andreas Heumann, Marius Reglier und
Bernard Waegell*

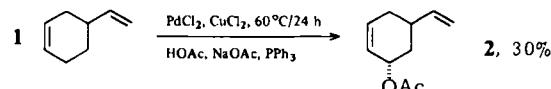
Die Pd-katalysierte Umsetzung von Alkenen kann unter direkter Addition von PdX_2 an die Doppelbindung (Weg a) oder unter Abstraktion eines zur Doppelbindung α -ständigen H-Atoms verlaufen (Weg b)^[1]. Bis jetzt^[2] ist noch unklar, welche Faktoren den Reaktionsweg bestimmen.

Bei der katalytischen Oxidation nicht-konjugierter mono- und bicyclischer Alkadiene wird ausschließlich Weg a beschritten^[3]. Wir berichten nun über die Oxidation verwandter Alkadiene wie 1 und 8, die unter ähnlichen Bedingungen (PdCl_2 als Katalysator in gepuffertem Eises-

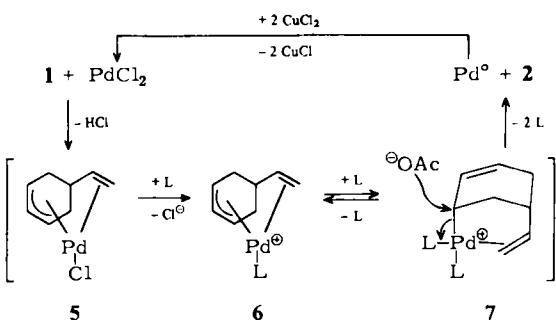
sig, wechselnde Mengen CuCl_2 oder $\text{CuCl}_2\text{-LiCl-O}_2$) nach Weg b reagieren, und zwar regioselektiv und zum Teil stereoselektiv.



4-Vinylcyclohexen 1 bildet unter diesen Bedingungen in Gegenwart von Triphenylphosphan (oder „diphos“) im Überschuß das allylische Acetat 2, dessen Struktur durch ¹H- und ¹³C-NMR-Spektroskopie sowie durch Umwandlung in den ungesättigten und den gesättigten Alkohol gesichert ist [2, ¹H-NMR: δ = 1.4–2.6 (m, 5 H), 2.05 (s, 3 H, OAc), 4.95, 5.04, 5.12 (m, m, m, 2 H), 5.25 (m, 1 H, CHO-Ac), 5.6–6.1 (m, 3 H)].

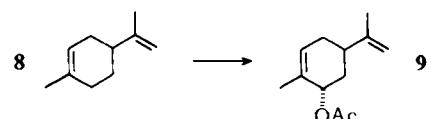


Die Bildung des *trans*-Isomers 2 und die hohe Regioselektivität lassen sich durch einen homogenkatalytischen Mechanismus erklären. Das entstehende Palladium(0) wird von CuCl_2 reoxidiert.



Die Frage, warum die Oxidation von 1 ein allylisches Endprodukt ergibt (Weg b), ist schwierig zu beantworten. Wie Modelle zeigen, scheint der Reaktionsablauf außer von sterischen Effekten (Nähe des zu abstrahierenden H-Atoms zum Metall im intermediären $\text{PdCl}_2\text{-1-Komplex}$) auch von stereoelektronischen Effekten bestimmt zu werden. Daß das *trans*-Isomer 2 entsteht, ist verständlich: Der bessere Ligand Triphenylphosphan, im Überschuß vorhanden, blockiert das Metallzentrum in 7, so daß der schlechtere Ligand Acetat nur von „außen“ angreifen kann^[6].

Wie aus dem mechanistischen Schema ersichtlich, ist die Vinylgruppe in 1 entscheidend für den sterischen Verlauf der Reaktion, obwohl zur Stabilisierung der Zwischenstufen 6 oder 7 zusätzlich Phosphanliganden notwendig zu sein scheinen. Bei Erhöhung der Nucleophilie der Vinylgruppe, beispielsweise durch eine Methylgruppe, sollte die katalytische Acetoxylierung auch in Abwesenheit von Phosphanen gelingen. In der Tat reagiert Limonen 8 ohne Phosphan bei 25 °C in 72 h stereospezifisch zu α -Carvylacetat 9 (Ausb. 63%).



In 1,4-Dimethyl-4-vinylcyclohexen, einem Isomer des Limonens, ist die Acetoxylierung weniger selektiv: Es wer-

[*] Dr. A. Heumann, Dr. M. Reglier, Prof. Dr. B. Waegell
Laboratoire de Stéréochimie, associé au CNRS (LA 109)
Université d'Aix-Marseille
Centre de St-Jérôme, F-13013 Marseille (Frankreich)
[**] Wir danken der Fa. Hüls (Marl) für 4-Vinylcyclohexen und der Fa. Shell-Chemie (Fos) für 1,4-Dimethyl-4-vinylcyclohexen.