

deutlich sichtbar, die Tc-O-Valenzschwingungen treten im IR-Spektrum bei 909 (symmetrisch) und 880 cm<sup>-1</sup> (antisymmetrisch) auf. Im <sup>1</sup>H-NMR-Spektrum werden die Methylprotonen bei δ = 1.606 beobachtet.

### Arbeitsvorschrift

180 mg (0.57 mmol) **4** wurden in 15 mL C<sub>6</sub>H<sub>6</sub> gelöst und mit 5 mL 30 proz. H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> durch Röhren bei Raumtemperatur zur Reaktion gebracht. Erst nach 24 h begann die Ausgangskonzentration an **4** abzunehmen. Nach 3 d konnte kein **4** mehr nachgewiesen werden. Nach Trennung der Phasen wurde die organische Phase mit Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> getrocknet und durch Chromatographie (Kieselgel 60, 30 × 2 cm, C<sub>6</sub>H<sub>6</sub>) von öligem Reaktionsprodukten befreit. Anschließende Elution mit C<sub>6</sub>H<sub>6</sub>/Diethylether (1/1) ergab eine gelbe Zone. Aus dem Eluat wurde **5** in Form von nadelförmigen gelben Kristallen nach langsamem Verdunsten des Lösungsmittels (ca. 12 h) erhalten. Ausbeute: 25.0 mg (16.0%). <sup>99</sup>Tc 51.6% (berechnet: 51.94%). EI-MS: Fragmentierung (in Klammern relative Intensität [%]): Cp<sup>+</sup> (100); Cp<sup>\*</sup>Tc<sup>0</sup> (36); Cp<sup>\*</sup>TcO<sub>3</sub><sup>0</sup> (0.0); Cp<sup>\*</sup>Tc<sub>2</sub>O<sub>3</sub><sup>0</sup> (18). Die entsprechenden relativen Intensitäten für **2** unter ähnlichen Bedingungen betragen 100, 35, 100 und 0.0%.

Eingegangen am 8. März 1989 [Z 3225]

- [1] W. A. Herrmann, *Angew. Chem.* 100 (1988) 1269; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* 27 (1988) 1297, zit. Lit.; A. H. Klahn-Oliva, D. Sutton, *Organometallics* 3 (1984) 1313.
- [2] I. Okuda, E. Herdtweck, W. A. Herrmann, *Inorg. Chem.* 27 (1988) 1254.
- [3] Gelber säulenförmiger Kristall (0.23 × 0.26 × 0.31 mm<sup>3</sup>);  $a = 594.6(5)$ ,  $b = 869.7(4)$ ,  $c = 1063.0(7)$  pm;  $V = 549.70 \times 10^6$  pm<sup>3</sup>;  $Z = 4$ ; Raumgruppe  $D_{2h}^{12}\cdot Pmnm$  (Nr. 59). Datensammlung mit einem Siemens-Stoe-Diffraktometer (AED II),  $\theta/\omega$ -Scan ( $3^\circ < 2\theta < 60^\circ$ ;  $h(\min/\max) 0/8$ ,  $k 0/12$ ,  $l 0/15$ ), Mo<sub>Kα</sub>-Strahlung ( $\lambda = 0.71069$  Å); 969 im vermessenen Bereich mögliche Reflexe, 381 ( $I > 2.0\sigma(I)$ ), unabhängige 348 ( $I > 2.25\sigma(I)$ ); Absorptionskorrektur empirisch ( $\chi$ -Scans, 4 Reflexe  $13^\circ < 2\theta < 42^\circ$ ), Transmissionsfaktoren ( $\min/\max$ ) 0.74/1.00,  $\mu = 24.41$  cm<sup>-1</sup>,  $\rho_{ber} = 2.3$  g cm<sup>-3</sup>; Strukturlösung durch Patterson-, Fourier-, Differenz-Fourier-Synthesen, Verfeinerung nach der Methode der kleinsten Quadrate (alle Nichtwasserstoffatome anisotrop, H-Atome auf idealen Positionen festgehalten).  $R = 0.059$ ,  $R_e = [\Xi w(|F_0| - |F_c|)^2 / \Xi w F_0^2]^{1/2} = 0.044$ , Goof =  $[\Xi w(|F_0| - |F_c|)^2 / (\text{NO-NV})]^{1/2} = 2.19$ , Restelektronendichte 1.47/−3.13 e/Å<sup>3</sup>, shift/esd (mean/max) 0.18/1.8. Alle Rechnungen basieren auf dem Programmsystem SHELXTL. Weitere Einzelheiten zur Kristallstrukturuntersuchung können beim Fachinformationszentrum Karlsruhe, Gesellschaft für wissenschaftlich-technische Information mbH, D-7514 Eggenstein-Leopoldshafen 2, unter Angabe der Hinterlegungsnummer CSD-53780, der Autoren und des Zeitschriftenzitats angefordert werden.
- [4] F. A. Cotton, L. D. Gage, *Nouv. J. Chim.* 1 (1977) 441; F. A. Cotton, W. K. Bratton, *J. Am. Chem. Soc.* 87 (1965) 921.
- [5] P. O'Brien in G. Wilkinson, R. D. Gillard, J. A. McCleverty (Hrsg.): *Comprehensive Coordination Chemistry*, Vol. 3, Pergamon Press, Oxford 1987, S. 741 ff.
- [6] F. A. Cotton, S. A. Koch, M. Miller, *Inorg. Chem.* 17 (1978) 2084.
- [7] M. H. Chisholm: *Reactivity of Metal-Metal Bonds*, ACS Symp. Ser. 155 (1981) 4.

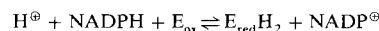
## Das aktive Zentrum der Glutathion-Reduktase, ein Beispiel für Nahezu-Übergangsstrukturen \*\*

Von Reiner Sustmann\*, Willi Sicking und Georg E. Schulz\*

Professor Christoph Rüchardt zum 60. Geburtstag gewidmet

Das ubiquitäre Flavoenzym Glutathion-Reduktase übt eine wichtige Funktion bei intrazellulären Redoxprozessen aus, indem es freie Thiole in Form von reduziertem Glutathion bereitstellt<sup>[1]</sup>. Die Katalyse verläuft in zwei trennbaren

Schritten. Im hier berechneten ersten Schritt werden zwei Elektronen von NADPH auf das Enzym übertragen:



wobei das reduzierte Enzym als stabiles Intermediat entsteht. Im zweiten Schritt wird dann Glutathiondisulfid reduziert:



Das aktive Zentrum besteht aus einem im Proteininneren verborgenen Verbund aus Isoalloxazin (von FAD) und der Disulfidbrücke Cys58:Cys63, an den sich auf der Isoalloxazinseite das reduzierende NADPH und auf der Disulfidseite das zu reduzierende Glutathion anlagern<sup>[2]</sup>. Die Geometrie dieser Anordnung ist nun durch Röntgenstrukturanalysen mit Auflösungen zwischen 2.0 Å und 1.54 Å bestimmt worden<sup>[3]</sup>. Da das aktive Zentrum in einem sehr dicht gepackten inneren Bereich des Proteins weit entfernt von allen intermolekularen Kontakten des Enzymkristallverbandes liegt<sup>[3]</sup> und da das Enzym im Kristall aktiv bleibt, darf man annehmen, daß die etablierte Geometrie der mittleren Orte der Nicht-Wasserstoffatome bis auf 0.1–0.2 Å mit der Geometrie im zellulären Enzym übereinstimmt. Der Ablauf der Reduktion ist bisher nicht im Detail bekannt; unbeantwortet ist auch die wichtige Frage, ob es sich um eine sukzessive Ein-elektronen- oder eine Hydridübertragung handelt.

Wir haben begonnen, die Wechselwirkungen im aktiven Zentrum des Enzyms zu analysieren, und zwar mit Rechnungen auf dem MNDO-Niveau, wobei dessen neueste PM 3-Parametrisierung Anwendung findet<sup>[4]</sup>. Diese Rechnungen werden durch Störungsrechnungen mit dem Programm PERVAL<sup>[5]</sup>, ebenfalls PM 3-parametrisiert, ergänzt. Letzteres ermöglicht die direkte Ermittlung der Wechselwirkung zweier Moleküle und die Interpretation der Ergebnisse auf der Basis kovalenter Stabilisierung, sowie polarer und nicht-kovalenter Anteile („closed shell repulsion“). Der Analyse liegen die Koordinaten der Nicht-Wasserstoffatome aus der Röntgenstrukturanalyse, die unter Heranziehung von Standardbindungslängen und -winkeln mit Wasserstoffatomen versehen wurden, zu Grunde. Da auch semiempirische Rechnungen für vollständiges FAD und NADPH zu aufwendig sind, wurden die Moleküle auf die für den Reaktionsablauf wichtigen Substrukturen, d. h. Isoalloxazin mit und auch ohne Ribit bzw. Dihydronicotinsäureamid mit Ribose, reduziert. Die Verknüpfungsstellen mit dem vernachlässigten Teilen wurden mit Wasserstoffatomen abgesättigt. Gleichartig wurde mit der Disulfidbrücke zwischen Cys58 und Cys63 verfahren, wobei die Bindungen zu den nächstfolgenden Atomen des Proteins gelöst und mit Wasserstoffatomen abgesättigt wurden. Die Rechnungen zeigen in der Tat, daß die für die Reaktion wichtigen Grenzorbitale der Reaktanten ausschließlich im Isoalloxazin bzw. im Dihydronicotinsäureamid lokalisiert sind. Auch das für die Reduktion der Disulfidbrücke wichtige LUMO der SS-Bindung findet sich in dieser wieder. Damit wird unterstrichen, daß das umliegende Protein zunächst nur die Funktion hat, die reagierenden Moleküle in einer bestimmten Lage zu fixieren.

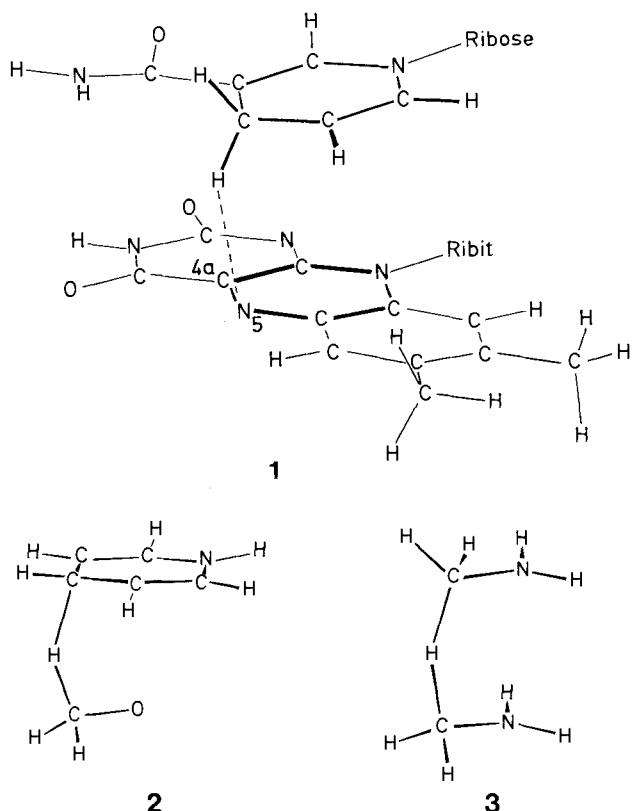
Wir berichten hier über zwei Aspekte: 1) Die Wechselwirkung des Dihydronicotinsäureamids von NADPH mit dem Isoalloxazin von FAD (siehe **1**) und 2) die Wechselwirkung des reduzierten Isoalloxazins mit der Proteindisulfidbrücke Cys58:Cys63 (siehe **5**, unten). Ein Vergleich mit durch ab-initio-Rechnungen bestimmten Übergangsstrukturen der Hydridübertragung von Dihydropyridin auf Formaldehyd (siehe **2**)<sup>[6]</sup> und von Methylamin auf das Methyleniminium-Ion (siehe **3**)<sup>[7]</sup> erweist sich als nützlich.

[\*] Prof. Dr. R. Sustmann, Dipl.-Ing. W. Sicking  
Institut für Organische Chemie der Universität  
Postfach 103 764, D-4300 Essen 1

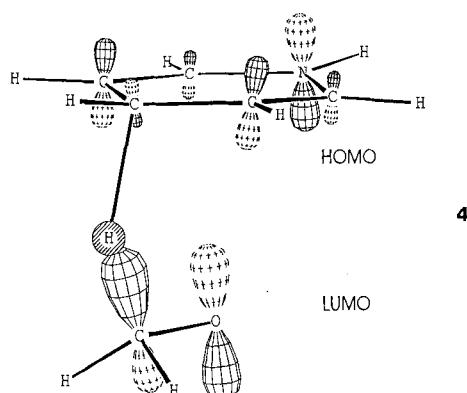
Prof. Dr. G. E. Schulz  
Institut für Organische Chemie und Biochemie der Universität  
Albertstraße 21, D-7800 Freiburg

[\*\*] Diese Arbeit wurde von der Deutschen Forschungsgemeinschaft gefördert.

In 1–3 wird die Struktur des Komplexes aus Dihydronicotinsäureamid und Isoalloxazin von FAD aus der Röntgenstrukturanalyse mit den Übergangsstrukturen der beiden ab-initio-Rechnungen verglichen. Augenfällig ist die Übereinstimmung von 1–3 im Bereich der an der Reaktion teil-



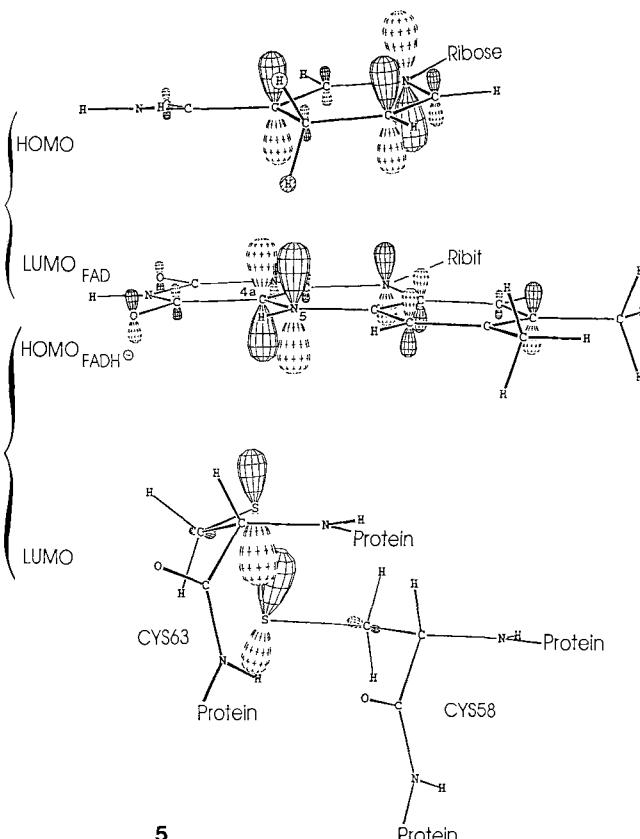
nehmenden Atome, wobei festzuhalten ist, daß 1 noch keine Übergangsstruktur darstellt. Die errechnete Wechselwirkung der Moleküle im Komplex 1 ist mit  $+6.5 \text{ kcal mol}^{-1}$  schwach abstoßend. Der Abstand der Atome, zwischen denen das Wasserstoffatom ausgetauscht wird, ist im Enzym mit  $3.2 \text{ \AA}$  um ca.  $0.5\text{--}0.6 \text{ \AA}$  größer als in den Übergangsstrukturen 2 ( $2.70 \text{ \AA}$ ) und 3 ( $2.55 \text{ \AA}$ ). Die Diskussion, ob die an der Reaktion beteiligten Atome eine lineare Anordnung einnehmen<sup>[8]</sup>, wurde von den ab-initio-Rechnungen zugunsten einer Anordnung mit einem Winkel von ca.  $140\text{--}150^\circ$  entschieden. Die Enzymstruktur bildet einen vergleichbaren Winkel von  $134^\circ$ , was einen ähnlichen Verlauf der Reaktion nahelegt. Eine derartige Anordnung führt zu optimalen Grenzorbitalwechselwirkungen, wie in 4 für die domi-



nierende  $\text{HOMO}_{(\text{Dihydropyridin})}\text{-LUMO}_{(\text{Formaldehyde})}$ -Wechselwirkung gezeigt wird (vgl. 2). Die PERVAL-Rechnung sagt aus, daß sie in 4 63 % der gesamten kovalenten Stabilisierung des

Übergangszustandes der Hydridübertragung ausmacht. Die Ausrichtung der Orbitale in 4 unterstreicht, warum eine nicht-lineare Anordnung günstiger ist: Beim Übergang von den Ausgangsmolekülen zu den Reaktionsprodukten stellt sie eine maximale Überlappung der betroffenen MOs her.

Das berechnete HOMO des Dihydronicotinsäureamids (mit Ribose) im Enzym (siehe 5, oben) hat fast die gleiche Struktur wie das des Dihydropyridins (vgl. 4). Das LUMO des Isoalloxazins (mit Ribit) weist den größten Beitrag am Stickstoffatom N-5 auf, das bei einer Hydridübertragung das H-Atom übernehmen würde. Dieses LUMO stimmt praktisch mit dem in 5 (Mitte) dargestellten HOMO des reduzierten Isoalloxazinrestes  $\text{FADH}^\ominus$  überein.  $\text{HOMO}_{(\text{FADH}^\ominus)}$  und  $\text{LUMO}_{(\text{FAD})}$  unterscheiden sich hauptsächlich durch die Beiträge der Atome N-5 und C-4a, wobei im  $\text{LUMO}_{(\text{FAD})}$  der Beitrag von N-5 etwas größer als der von C-4a ist. Wie in 4 trägt die Wechselwirkung  $\text{HOMO}_{(\text{Dihydronicotinamid})}\text{-LUMO}_{(\text{Isoalloxazin})}$  den größten Anteil zur kovalenten Stabilisierung bei. Damit ist dies auch die dominierende Wechselwirkung. Aus der Vergleichbarkeit der Strukturen 1–3 und der Ähnlichkeit der Wechselwirkungen wird man zu dem Schluß geführt, daß NADPH und FAD im Enzym fast ideal für eine Hydridübertragung auf N-5 des Isoalloxazins angeordnet sind.



Im zweiten Schritt überträgt  $\text{FADH}^\ominus$  Reduktionsäquivalente auf die Disulfidbrücke Cys58:Cys63 (vgl. 5, unten). Hier stellt der direkte nucleophile Angriff des reduzierten Isoalloxazins eine attraktive Möglichkeit dar, die den gängigen Vorstellungen für den Angriff eines Nucleophils auf FAD entspricht<sup>[9]</sup>. Bei einem solchen Angriff geht das Nucleophil eine kovalente Bindung zu C-4a des Isoalloxazins ein. Kristallstrukturanalyse und Rechnung stützen einen solchen Ablauf. Besonders interessant erscheint die nachgewiesene ungewöhnliche Konformation der Disulfidbrücke<sup>[13]</sup>, die bei gegebener Lage relativ zum Isoalloxazin zu einer exakten Ausrichtung des antibindenden LUMOs der Brücke auf C-4a führt, wie die maßstabgetreue Reproduk-

tion der Kristallstruktur in **5** zeigt. C-4a des Isoalloxazins und die S-Atome der Disulfidbrücke liegen linear übereinander, und die energetisch fast entarteten Grenzorbitale ( $\text{HO-MO}_{(\text{FADH}_2)}\text{-LUMO}_{(\text{Cys58:Cys63})}$ ) ergeben eine kräftige kovalente Wechselwirkung zwischen C-4a und dem Schwefelatom von Cys63. **5** unterstreicht zudem die günstige Ausrichtung der Orbitale für einen Rückseitenangriff von C-4a auf die Disulfidbindung. Der Ablauf läßt sich als nucleophile Spaltung der SS-Brücke unter Bildung einer kovalenten Bindung zwischen C-4a des Isoalloxazins und dem S-Atom von Cys63 beschreiben. Es sollten Übertragung des Protons von N-5 auf das S-Atom von Cys58<sup>⊖</sup> und Fragmentierung durch intramolekulare nucleophile Substitution zu Cys63<sup>⊖</sup> und Isoalloxazin folgen. Es ist interessant anzumerken, daß die MNDO-PM 3-Rechnung für die Wechselwirkung von FAD mit Cys63<sup>⊖</sup>, deren relative Lage aus Röntgendiffrakten bekannt ist, eine Stabilisierung von  $-2.6 \text{ kcal mol}^{-1}$  und keine Abstoßung – wie zwischen Molekülen mit abgeschlossener Valenzschale üblich –, ergibt. Die Rechnung bestätigt hier offensichtlich die spektroskopisch nachgewiesene Bildung eines CT-Komplexes<sup>[1, 2]</sup> zwischen FAD und Cys63<sup>⊖</sup>.

Die MNDO-PM 3-Rechnungen und die störungstheoretische Analyse der Struktur des aktiven Zentrums der Glutathion-Reduktase zeigen, daß im Enzym die Reaktionspartner NADPH und FAD sowie FADH<sup>⊖</sup> und Cys58:Cys63 so positioniert sind, daß sie auf der Reaktionskoordinate der Hydridübertragung bzw. der nucleophilen Spaltung der Disulfidbrücke bereits nahe am Übergangszustand lokalisiert sind. Damit entfällt der Entropiebeitrag für die Reaktionen, was wiederum in Einklang mit Vorstellungen über enzymkatalysierte Reaktionen ist. Darüber hinaus werden andere Reaktionsabläufe wie beispielsweise über Einelektronenschritte unwahrscheinlich. – Weitere Untersuchungen, die auch die Reduktion des Glutathions und einige wichtige Aminosäuren im Bereich des aktiven Zentrums einschließen, werden zur Zeit durchgeführt.

Eingegangen am 3. März,  
ergänzte Fassung am 11. Mai 1989 [Z 3213]

- [1] C. H. Williams, Jr. in P. D. Boyer (Hrsg.): *The Enzymes*, Vol. 13, Academic Press, New York 1976, S. 89.
- [2] E. F. Pai, G. E. Schulz, *J. Biol. Chem.* 258 (1983) 1752; E. F. Pai, P. A. Karplus, G. E. Schulz, *Biochemistry* 27 (1988) 4465; P. A. Karplus, E. F. Pai, G. E. Schulz, *Eur. J. Biochem.* 178 (1989) 693.
- [3] P. A. Karplus, G. E. Schulz, *J. Mol. Biol.* 195 (1987) 701; P. A. Karplus, G. E. Schulz, *ibid.*, im Druck.
- [4] J. J. P. Stewart, *J. Comput. Chem.*, im Druck. Wir danken Herrn Dr. T. Clark, Universität Erlangen-Nürnberg, für die Überlassung eines Programms mit den MNDO-PM 3-Parametern.
- [5] R. Sustmann, W. Sicking, *Chem. Ber.* 120 (1987) 1323; R. Sustmann, P. Daute, R. Sauer, W. Sicking, *Tetrahedron Lett.* 29 (1988) 4699, zit. Lit.
- [6] O. Tapia, R. Cardenas, J. Andres, P. Colonna-Cesari, *J. Am. Chem. Soc.* 110 (1988) 4046.
- [7] Y.-D. Wu, K. N. Houk, *J. Am. Chem. Soc.* 109 (1987) 906.
- [8] J. W. Verhoeven, W. van Gerresheim, F. M. Martens, S. M. van der Kerk, *Tetrahedron* 42 (1986) 975.
- [9] C. Walsh, *Acc. Chem. Res.* 13 (1980) 148.

## Erste heterodinucleare Komplexe mit Bis(cyclopentadienyl)methan-Brücken\*\*

Von Peter Härtter\*, Günther Boguth, Eberhardt Herdtweck und Jürgen Riede

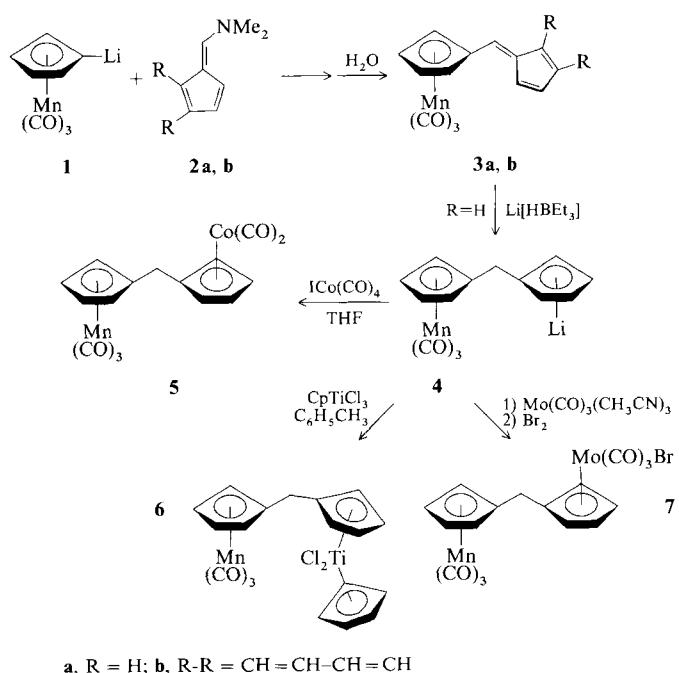
Zweikernige Komplexe haben zunehmendes Interesse gefunden<sup>[1]</sup>, weil die Möglichkeit besteht, daß die Eigenschaften

[\*] Dr. P. Härtter, G. Boguth, Dr. E. Herdtweck, J. Riede  
Anorganisch-chemisches Institut der Technischen Universität München  
Lichtenbergstraße 4, D-8046 Garching

[\*\*] Diese Arbeit wurde durch die Stiftung Volkswagenwerk und die Leonhardt-Lorenz-Stiftung gefördert.

der beiden Fragmente sich ergänzen und zu neuartigen Reaktionen führen. In neuerer Zeit werden Komplexe mit  $(\text{C}_5\text{H}_4)_2\text{X}$ -Brücken ( $\text{X} = \text{SiMe}_2$  und  $(\text{CH}_2)_n$ ,  $n = 0, 1, 2$ ) unter anderem wegen ihrer Robustheit bevorzugt. Über die besonders interessante heterodinucleare Variante dieser Verbindungsklasse ist in Ermangelung geeigneter Syntheserouten bisher jedoch nur wenig bekannt. So wurde lediglich die mehrstufige Synthese von heterodinuclearen Fulvalen-Komplexen<sup>[2]</sup> und 1,2-Bis(cyclopentadienyl)ethan-verbrückten Komplexen<sup>[3]</sup> beschrieben. Dagegen gibt es bisher keine Beispiele von heterodinuclearen Komplexen der Bis(cyclopentadienyl)methan-Reihe. Wir berichten nun über einen einfachen Zugang zu dieser Substanzklasse.

Wir haben gefunden, daß die von *Mueller-Westhoff* et al.<sup>[4]</sup> beschriebene Reaktion von Dilithioferrocen mit 6-Dimethylaminofulven zu Bis(6-fulvenyl)ferrocen auf andere Komplexe mit lithiierten Cyclopentadienylring übertragbar ist. Läßt man Tricarbonyl(lithiocyclopentadienyl)mangan **1**<sup>[5]</sup> mit 6-Dimethylaminofulven **2a** oder 1-(Dimethylamino-methylen)-1*H*-inden **2b**<sup>[6]</sup> in THF-Lösung reagieren, so erhält man nach Hydrolyse und chromatographischer Aufarbeitung die neuen Fulvenyl-Komplexe **3a** bzw. **3b**.



Die spektroskopischen Daten dieser Verbindungen sind mit dem dargestellten Strukturvorschlag im Einklang. Eine röntgenographische Strukturbestimmung von **3a** bestätigt diese Formulierung; die Bindungslängen und -winkel sind typisch für  $\text{C}_5\text{H}_5\text{Mn}(\text{CO})_3$ -Derivate<sup>[7]</sup> (Abb. 1). Der Fulvenylrest hat die für Fulvene charakteristische, ausgeprägte Alternanz der Doppelbindungen. Der Abstand C6-C7 (146.6 pm) sowie der Diederwinkel von  $16.4^\circ$  zwischen den beiden Ringen deuten auf keine bemerkenswerte  $\pi$ -Wechselwirkung zwischen dem Manganteil und dem Fulvenylrest hin.

Durch Reaktion von Verbindung **3a** mit „Superhydrid“ ( $\text{Li}[\text{HB}(\text{C}_2\text{H}_5)_3]$ ) in THF-Lösung erhält man nahezu quantitativ den anionischen Komplex **4**, der mit Hexan als schwach gelbes Pulver fällbar ist. Zur weiteren Umsetzung wird **4** zunächst mit frisch bereitetem Tetracarbonyl(iodo)cobalt<sup>[8]</sup> bei  $-78^\circ\text{C}$  gerührt. Nach Erwärmen auf Raumtemperatur und Extraktion mit Hexan wird der Komplex **5** in 63% Ausbeute als rotbraunes Öl erhalten.