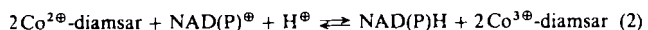
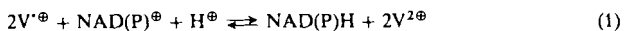


Direkter Elektronentransfer zwischen Kohle-elektroden, daran immobilisierten Mediatoren und einer immobilisierten Viologen-acceptierenden Pyridinnucleotid-Oxidoreduktase **

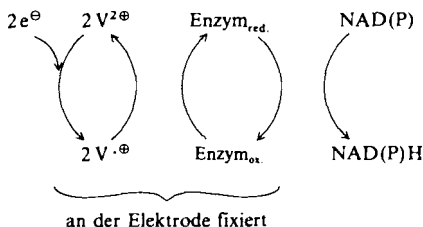
Von Helmut Günther, Antonios S. Paxinos, Michael Schulz, Cees van Dijk und Helmut Simon*

Professor Ivar Ugi zum 60. Geburtstag gewidmet

Für Redoxreaktionen sind Elektronen einer Elektrode ein preiswertes, rückstandsloses Reagens, dessen Redoxpotential in weiten Bereichen der gewünschten Reaktion angepaßt werden kann. Besonders in Kombination mit spezifischen Redoxenzymen könnten sie wertvoll sein. Für präparative Umsetzungen ist jedoch der direkte Elektronenübergang zwischen redoxaktiven prosthetischen Gruppen von Oxidoreduktasen und Elektroden viel zu langsam. Um den Elektronentransfer zu beschleunigen, müssen meist künstliche Redoxmediatoren, zum Beispiel Viologene oder Metalkäfigkomplexe, eingesetzt werden. Präparative elektromikrobielle und elektroenzymatische Systeme mit gelöstem Mediator und gelöstem Enzym^[1] sind bekannt, ebenso solche, bei denen entweder der Mediator oder das Enzym auf der Elektrodenoberfläche immobilisiert wurde^[2, 3]. Für analytische Zwecke wurde ein Ferrocenderivat auf einer Graphitelektrode abgeschieden und anschließend Glucoseoxidase kovalent gebunden^[4]. Wir haben nun sowohl den Mediator als auch das Enzym kovalent auf einer funktionalisierten Kohlenstoffoberfläche gebunden, um zu prüfen, ob Elektronen aus der Kathode über den als „molekularen Draht“ wirkenden Mediator zu den prosthetischen Gruppen des Enzyms fließen. Für die Immobilisierung wurde ein von uns in thermophilen Bacillen entdecktes Enzym gewählt, das Redoxäquivalente zwischen Viologen [Gl. (1); V = Viologen] oder Co-Käfigkomplexen [Gl. (2); Co-diamsar vgl. Abb. 1] und Pyridinnucleotiden überträgt^[5]. Viologen-acceptierende Pyridinnucleotid-Oxidoreduktasen (VAPORs) sind in zahlreichen Zellen vorhanden.



Die VAPOR aus dem thermophilen *Bacillus spec.* DSM 466 wurde zusammen mit Viologen immobilisiert; damit wurden die in Schema 1 gezeigten Reaktionen durchge-



Schema 1. Fluß von Elektronen über immobilisierte Viologene auf ein immobilisiertes Enzym, das lösliches NAD reduziert. Eine NAD(P)H oder NAD(P) verbrauchende Reaktion kann angekoppelt werden.

[*] Prof. Dr. H. Simon, Dr. H. Günther, Dr. A. S. Paxinos, Dipl.-Chem. M. Schulz
Lehrstuhl für Organische Chemie und Biochemie der Technischen Universität München
Lichtenbergstraße 4, D-8046 Garching
Dr. C. van Dijk
Agrotechnical Research Institute
NL-6700 AA Wageningen (Niederlande)

[**] Diese Arbeit wurde von der Europäischen Gemeinschaft (Biotechnology Action Program, Vertrag BAP 250D) gefördert.

führt. Primär war nicht unsere Absicht, auf diese Weise NAD(P)H zu erzeugen, sondern den Elektronenfluß zu demonstrieren. Die verwendeten Mediatoren zeigt Abbildung 1.

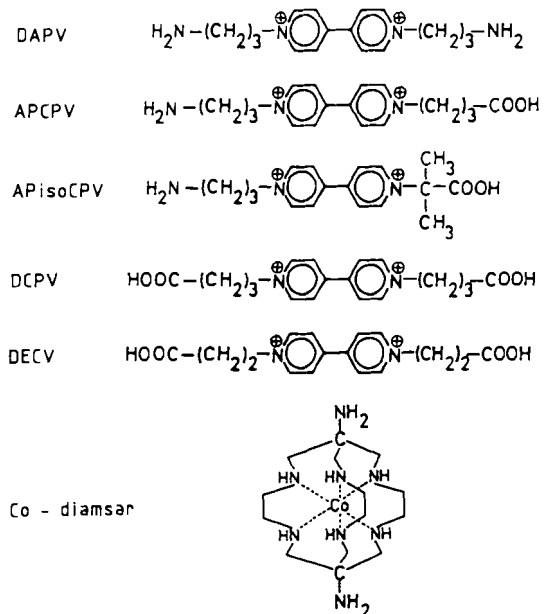


Abb. 1. Verwendete Viologene.

Zur Immobilisierung wurden zwei Wege beschritten: 1) kovalente Bindung des Mediators an das Enzym und nachfolgende kovalente Bindung des modifizierten Enzyms an die funktionalisierte Kohleelektrode, 2) kovalente Bindung des Enzyms an eine mit kovalent gebundenem, bifunktionellem Viologen modifizierte Elektrode.

Mit der Carbodiimidmethode wurde DAPV unter verschiedenen Reaktionsbedingungen an VAPOR aus *Bacillus spec.* DSM 466 kovalent gebunden (Weg 1), und die so modifizierte VAPOR wurde im optischen Test auf ihre Aktivität geprüft (Tabelle 1). Wird DAPV kovalent mit Carbodiimid an das Enzym gebunden, bleibt die Enzymaktivität erhalten, und auch der *K_m*-Wert für die Bindung von NAD ändert sich gegenüber dem des unmodifizierten Enzyms nur unwesentlich von 0.054 mM auf 0.07 mM (80 mol DAPV pro mol VAPOR).

Tabelle 1. Enzymaktivität in Abhängigkeit von der Immobilisierungsmethode. EDC = *N*-Ethyl-*N'*-(3-dimethylaminopropyl)carbodiimid · HCl. Lösungen von DAPV in 10–100 µL 0.1 N NaOH und von EDC in 100–500 µL H₂O wurden zu 5–8 mL VAPOR in TRIS/HCl-Puffer [TRIS = Tris(hydroxymethyl)aminomethan] (0.02 M, pH 7.0) gegeben und mit 0.1 N HCl auf den jeweiligen pH-Wert gebracht, der während der Reaktionszeit von 6 min konstant gehalten wurde. Anschließend wurden durch wiederholte Ultrafiltration nicht gebundenes DAPV und andere niedermolekulare Stoffe abgetrennt.

VAPOR c [µM]	DAPV c [mM]	EDC c [mM]	pH-Wert	spez. Akt. [a] [%]	mol gebun- denes DAPV pro mol VAPOR
0.43	4.7	1.0	4.6	107	10
0.43	4.7	1.0	4.6	71 [b]	6.1
0.43	4.7	1.0	5.5	135	11.1
0.43	4.7	1.0	6.2	108	15.9
3.0	10.0	10.0	4.6	61	80 [c]

[a] Spezifische Aktivität der modifizierten VAPOR im Vergleich zum nativen Enzym. [b] Mit zusätzlich 8.6 µmol *N*-Hydroxysuccinimid. [c] Die Reaktionszeit betrug hier 2.5 h.

Bei der Immobilisierung von VAPOR an einer mit Viologen modifizierten Kohleoberfläche nach der Carbodiimidmethode (Weg 2) sind ähnliche Ergebnisse zu erwarten. Bei entsprechenden Versuchen wurde erst das jeweilige Viologen kovalent auf Kohlefilz gebunden und anschließend daran eine monomolekulare Schicht Enzym. Durch den Kohlefilz wurde eine Lösung von NAD und $MV^{+•}$ ($MV = N,N'$ -Dimethyl-4,4'-bipyridinium) gepumpt und das entstandene NADH in einem optischen Test mit L-Lactat-Dehydrogenase (L-LDH, EC 1.1.1.27) und Pyruvat in Proben gemessen. Die Ergebnisse für verschiedene Viologene sind in Abbildung 2 dargestellt. Die Nichtlinearität der Reaktionsgeschwindigkeit beruht hauptsächlich auf dem fortschreitenden Verbrauch der Edukte und der zunehmenden Konzentration der Produkte. Die Immobilisate sind, nach einem raschen Abfall auf ca. 50% der Anfangsaktivität, sehr stabil. Die Anfangsaktivität beträgt ca. 40% der Aktivität des gelösten Enzyms.

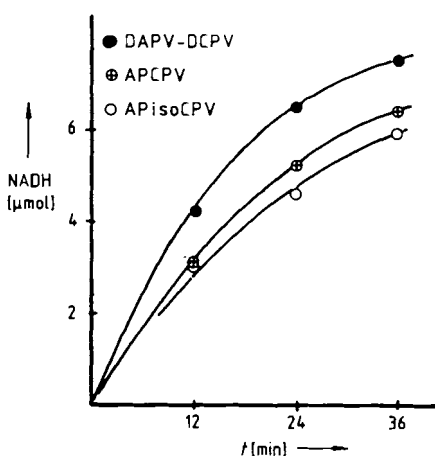


Abb. 2. NADH-Bildung der immobilisierten VAPOR in Abhängigkeit von der Zeit. Auf 50 mg Kohlefilz (ca. 12 cm², Typ RVG 4000, Carbone Lorraine) wurde DAPV-DCPV, APCPV oder APisoCPV kovalent gebunden und darauf eine monomolekulare Schicht VAPOR immobilisiert. Für den Test wurden über den Filz in 5 mL Kaliumphosphatpuffer (0.1 M, pH 7.0) 10 μmol NAD und 25 μmol $MV^{+•}$ im Kreislauf gepumpt (2.7 mL min⁻¹).

Die Funktionalisierung der Glaskohlenstoffelektroden und die kovalente Belegung der Elektrodenoberfläche mit einem bifunktionellen Viologen werden an anderer Stelle beschrieben^[6]. Durch Variation der Reihenfolge der Immobilisierungsschritte für Viologene und VAPOR lassen sich definiert unterschiedlich belegte Elektrodenoberflächen herstellen (Abb. 3). Die Elektroden wurden in potentiostatisch kontrollierten, elektrochemischen Zellen entsprechend Schema 1 als Kathoden getestet. Alle Experimente wurden unter striktem Ausschluß von Sauerstoff durchgeführt; Anolyt und Katholyt waren deshalb durch ein Diaphragma getrennt. Die Initialgeschwindigkeit der NADH-Bildung wurde nach der Biolumineszenzmethode^[7] unter Verwendung einer Eichkurve bestimmt (Abb. 4). Folgendes kann geschlossen werden: 1) Alle Elektroden ohne VAPOR (a, b) oder ohne Mediator (c, d) bewirken keine NADH-Bildung (Meßwerte im Bereich des Blindwerts). 2) Monomolekulare Schichten von VAPOR auf einer Kathode mit Viologenschicht reduzieren NAD zu NADH (e–g). 3) Bei einer mit DAPV modifizierten Elektrode, die darüber eine Multienzymschicht trägt (h), haben die äußeren, vom Substrat erreichbaren Enzymschichten keinen ausreichenden elek-

tronischen Kontakt mit der Kathode. 4) Wird bei einer solchen Elektrode jedoch in die Enzymschicht DAPV kovalent eingebaut, entsteht eine modifizierte Elektrode (i), die NAD zu biologisch aktivem NADH reduziert. 5) Ladungs- und Bindungsverhältnisse beeinflussen die Reaktionsgeschwindigkeit (e–i).

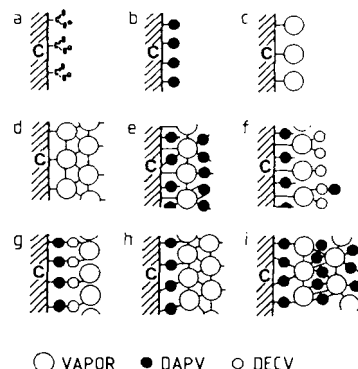


Abb. 3. Schematische Darstellung der definiert präparierten Elektrodenoberflächen. Elektrode: Glaskohlenstoff (SIGRADUR G), Fläche 1 cm². a) Funktionalisierte Oberflächen. b) DAPV-Schicht, über die Carboxygruppen von a) gebunden. c) Monomolekulare VAPOR-Schicht: Auf einer Elektrode des Typs a) wurden die Carboxygruppen durch 2 μmol *N*-Cyclohexyl-*N'*-[2-(*N*-methylmorpholino)ethyl]carbodiimid-*p*-Toluolsulfonat(CMC) in 100 μL 0.1 M Kaliumphosphatpuffer, pH 4.5, 2 h aktiviert, anschließend wurde 1 U VAPOR in 100 μL 0.05 M TRIS/HCl-Puffer, pH 7.0, aufgetragen. d) Multimolekulare Schicht von VAPOR: wie c), jedoch wurde 1 μmol CMC in 50 μL 0.1 M Kaliumphosphatpuffer, pH 5.5, gleichzeitig mit dem Enzym aufgetragen. e) Monomolekulare Schicht VAPOR, mit DAPV dotiert: wie c), anschließend wurden die noch verfügbaren Carboxygruppen der Elektrodenoberfläche und des Enzyms erneut aktiviert und daran DAPV immobilisiert. f) Monomolekulare Schicht VAPOR, mit DECV dotiert: wie c), anschließend wurde DECV mit EDC im Molverhältnis 1:1.2 aktiviert und auf die Enzymschicht aufgebracht. Nach 7 min wurden zu dieser Lösung zusätzlich 2 μmol DAPV gegeben. g) Monomolekulare Schicht von VAPOR, auf einer DAPV-DECV-Schicht immobilisiert: wie b), anschließend wurde DECV mit EDC analog zu f) aufgebracht und nach der erneuten Aktivierung der resultierenden DAPV-DECV-Schicht mit EDC VAPOR aufgetragen. h) Multimolekulare Schicht von VAPOR auf DAPV: wie b), anschließend wurden 1 U VAPOR in 100 μL 0.05 M TRIS/HCl-Puffer, pH 7.0, und 1 μmol CMC in 50 μL 0.1 M Kaliumphosphatpuffer, pH 5.5, gleichzeitig aufgetragen. i) Multimolekulare Schicht von VAPOR auf DAPV, durch DAPV quervernetzt: wie b), anschließend wurden 1 U VAPOR in 100 μL 0.05 M TRIS/HCl-Puffer, pH 7.0, 1 μmol und 1 μmol DAPV in je 50 μL 0.1 M Kaliumphosphatpuffer, pH 5.5, gleichzeitig aufgetragen.

Über einen Zeitraum von 20 h verlangsamt sich die NADH-Zunahme deutlich. Die Ankopplung einer NADH rasch verbrauchenden Reaktion an eine solche NADH regenerierende Elektrodenreaktion (Schema 1) erhöht die Reaktionsgeschwindigkeit und stabilisiert die Reaktion auch über eine größere Zeitspanne. Angekoppelt wurde die Reduktion von Pyruvat zu L-Lactat (katalysiert durch L-LDH). Die Lactatbildung einer Elektrode vom Typ i) betrug 148 nmol cm⁻² in 20 h gegenüber 13.5 nmol cm⁻² NADH in 19.5 h bei einer vergleichbaren Elektrode ohne Ankopplung einer NADH-verbrauchenden Reaktion. In Kontrollversuchen wurde sichergestellt, daß das gesamte Lactat aus der NADH-abhängigen LDH-katalysierten Reaktion stammt. Ein weiteres Experiment sollte den Einfluß des NADH-Zerfalls während der 19.5 h klären. Zuerst wurde die NADH-Bildung nach 90 min nach der Biolumineszenzmethode gemessen, dann wurde nach Zugabe von Pyruvat (20 μmol) und L-LDH (7 U) die Zunahme des Lactats nach weiteren 17 h bestimmt. Die NADH-Bildung verlangsamte sich in den ersten 30 min von 3.6 nmol cm⁻² h⁻¹ auf 1.2 nmol cm⁻² h⁻¹, die Lactatbildung betrug aber über 17 h 9 nmol cm⁻² h⁻¹. In einem weiteren analogen Experiment

mit derselben Elektrode nach 2 Tagen betrug die Lactatbildung $8.4 \text{ nmol cm}^{-2} \text{ h}^{-1}$.

Die im Vergleich zur NADH-Bildung in Abwesenheit einer NADH-verbrauchenden Reaktion hohe Lactatbildung kann dadurch erklärt werden, daß Pyruvat/Lactat im Ver-

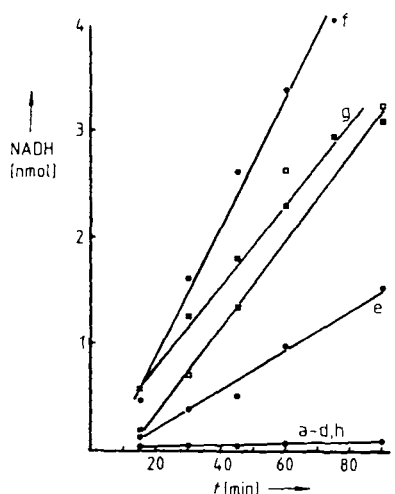


Abb. 4. Verlauf der Geschwindigkeit der NADH-Bildung von Kohlelektroden, die, wie in Abbildung 3 beschrieben, modifiziert waren. Elektrodenfläche: 1 cm^2 (Glaskohlenstoff), Potential: -407 mV vs. NHE , 6 mL sauerstofffreier Katholyt (TRIS/HCl-Puffer, 0.1 M , $\text{pH } 7.0$); $18 \text{ } \mu\text{mol}$ NAD (Indizierung mit a)–i) wie in Abb. 3). Biolumineszenz-NADH Test: $250 \text{ } \mu\text{L}$ Kaliumphosphatpuffer (25 mM , $\text{pH } 7.0$) enthält 25 nmol Dithiothreitol, $1.25 \text{ } \mu\text{g}$ Luciferase EC 1.14.14.3, 9.5 mU Flavinmononucleotid(FMN)-Oxidoreduktase EC 1.6.8.1, 0.6 nmol FMN, $10 \text{ } \mu\text{g}$ TRITON X-100, 5 nmol Myristinaldehyd, 150 nmol NAD und $50 \text{ } \mu\text{L}$ Probe. Meßgerät: BIOLUMAT LB 9500T, Berthold, D-7547 Wildbad.

gleich zu NAD/NADH rascher diffundieren und daß die Elektrode LDH adsorbiert^[8]. Auch wird durch die Dehydrierung des NADH die NAD-Konzentration in der Reaktionsschicht erhöht.

Nach den vorstehenden Ergebnissen können bei der Verwendung von Kohlefilzen mit großer innerer Oberfläche (bezogen auf die makroskopische Oberfläche) Stromdichten erwartet werden, die im unteren Bereich der Stromdichten industrieller Verfahren liegen^[9].

Eingegangen am 17. Mai 1990 [Z. 3963]

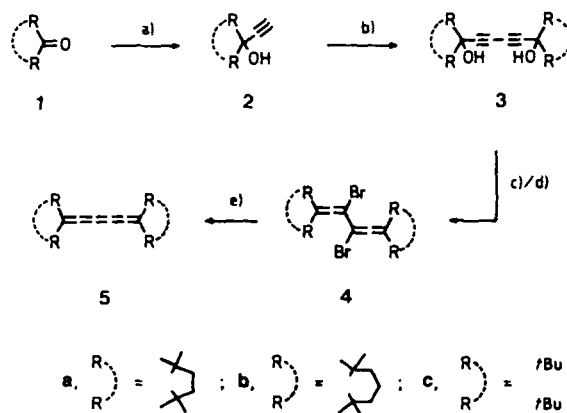
- [1] H. Simon, J. Bader, H. Günther, S. Neumann, J. Thanos, *Angew. Chem.* 97 (1985) 541–555; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* 24 (1985) 539–553.
- [2] C. van Dijk, T. van Eijs, J. W. van Leeuwen, C. Veeger, *FEBS Lett.* 166 (1984) 76–80.
- [3] C. Bourdillon, R. Lortie, J. M. Laval, *Biotechnol. Bioeng.* 31 (1988) 553–589, zit. Lit.
- [4] A. E. G. Cass, G. Davis, G. D. Francis, H. A. O. Hill, W. J. Aston, I. J. Higgins, E. V. Plotkin, L. D. L. Scott, A. P. F. Turner, *Anal. Chem.* 56 (1984) 667–671.
- [5] S. Nagata, R. Feicht, W. Bette, H. Günther, H. Simon, *Eur. J. Appl. Microbiol. Biotechnol.* 26 (1987) 263–267.
- [6] A. S. Paxinos, H. Günther, D. J. M. Schmedding, H. Simon, unveröffentlicht.
- [7] J. W. Hastings, *Methods Enzymol.* 57 (1978) 125–134; P. E. Stanley, *ibid.* 57 (1978) 215–222.
- [8] T. Eguchi, T. Iizuka, T. Kogotani, J. H. Lee, I. Urabe, H. Okada, *Eur. J. Biochem.* 155 (1986) 415–421.
- [9] C. H. Hamann, W. Vielstich: *Elektrochemie II, Elektrodenprozesse, Angewandte Elektrochemie*, Verlag Chemie, Weinheim 1981, S. 265.

Nickel-katalysierte Cyclodimerisation von Hexapentaenen: [4]Radialene und [5]Radialenone mit cumulierten Doppelbindungen**

Von Masahiko Iyoda*, Yoshiyuki Kuwatani, Masaji Oda, Yasushi Kai*, Nobuko Kanehisa und Nobutami Kasai*

Cumulene^[1] zeichnen sich durch eine Vielzahl reaktiver Zentren aus, die zur Synthese neuer cyclischer Dimere, Trimere und Oligomere genutzt werden können. Einem häufigeren Einsatz dieser Verbindungen in der organischen Synthese steht die nur schwierig zu kontrollierende Reaktivität im Wege. Wir haben kürzlich über die Nickel-katalysierte Cyclooligomerisation von [3]Cumulen (Butatrien)^[2] und die Cyclodimerisation von [5]Cumulen (Hexapentaenen)^[3] berichtet. Diese Methode ist präparativ nutzbar und ermöglicht den Zugang zu den unterschiedlichsten Radialen-Derivaten. Wir möchten nun von der Nickel-initiierten Synthese neuer [4]Radialene und [5]Radialenone^[4] berichten, die derselben Strategie folgt.

Tetramethyl- und Tetra-*tert*-butyl[5]cumulene dimerisieren thermisch zu Octamethylcyclododeca-1,3,7,9-tetraen^[6] bzw. Tetrakis(di-*tert*-butylvinyliden)cyclobutan^[7]. Die Nickel-katalysierte Cyclodimerisation von Tetraarylhexapentaenen liefert 1,2-Bis(diaryl-methylen)-3,4-bis(diarylpropadienyliden)cyclobutan als Kopf-Kopf-Dimer^[3]. Demzufolge verläuft die bekannte thermische Nickel-katalysierte Dimerisation von [5]Cumulen regioselektiv. Um Unterschiede in der Reaktivität der einzelnen Doppelbindungen zu untersuchen, haben wir die [5]Cumulene **5** in Gegenwart von Nickel-Katalysatoren umgesetzt. Die [5]Cumulene **5a–c** wurden gemäß Schema 1 synthetisiert. Ethinylierung der Ketone **1a** und **1b** mit Lithiumacetylid in THF ergab **2a** und **2b** in 91 bzw. 89% Ausbeute. Es folgte die oxidative Kupplung von **2a** und **2b** mit $\text{Cu}(\text{OAc})_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$ in Pyridin-Methanol bei 55°C zu den Diolen **3a** (90% Ausbeute) bzw. **3b**^[8]. Behandelt man **3a** mit konz. HBr in Essigsäure, so erhält man das



Schema 1. a) $\text{LiC}\equiv\text{CH}$, THF, -78°C bis Raumtemperatur. b) $\text{Cu}(\text{OAc})_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$, Pyridin-Methanol (1:1), 55°C . c) HBr, AcOH, Raumtemperatur d) PBr_3 , Benzol, 50°C . e) Zn, THF, Ultraschall.

[*] Prof. Dr. M. Iyoda, Y. Kuwatani, Prof. Dr. M. Oda
Department of Chemistry, Faculty of Science
Osaka University
Toyonaka, Osaka 560 (Japan)
Prof. Dr. Y. Kai, Prof. Dr. N. Kasai, N. Kanehisa
Department of Applied Chemistry, Faculty of Engineering
Osaka University
Yamadaoka, Suita, Osaka 565 (Japan)

[**] Diese Arbeit wurde von der Ciba-Geigy Foundation (Japan) for the Promotion of Science und dem Ministerium für Erziehung, Wissenschaft und Kultur, Japan (Grant-in-Aid for Scientific Research Nr. 63 540 396), gefördert.