

Tabelle 2. Wichtige Diederwinkel [°] zwischen aromatischen Ringen.

	Phenyl A	phen A'	Phenyl A'	phen B	Phenyl B	phen B'	Phenyl B'
phen A	43	64	29	60	19	24	45
Phenyl A		25	37	16	26	52	23
phen A'			43	20	46	60	22
Phenyl A'				50	20	18	22
phen B					42	67	32
Phenyl B						28	38
phen B'							39

Innerhalb der Komplex-Einheiten der Knoten-Verbindung betragen die Diederwinkel zwischen den beiden Phenanthrolinringen 64 bzw. 67°; dies spiegelt die starke Verzerrung des Koordinationspolyeders aus der Tetraedergeometrie wider. Jeder Phenylring bildet darüber hinaus mit der an ihn gebundenen Phenanthrolin-Einheit einen Diederwinkel von annähernd 42°.

Alle Sauerstoffatome der Polyoxyethylenketten weisen nach innen, so daß das Molekül eine rechteckige, hydrophobe äußere Gestalt hat. Die Ketten sind eigentlich etwas zu lang, wie die gefalteten Teilstücke um die zentralen Sauerstoffatome O32A und O32B zeigen.

Die Zentren der kurzen $(CH_2)_4$ -Brücken liegen sehr nahe beieinander mit geringen Abständen zwischen den Wasserstoffatomen der Methylenkohlenstoffatome C22B und C22A'. Viele andere kurze Abstände bestehen insbesondere zwischen den Wasserstoffatomen der Hexaethylenoxyketten und der aromatischen Gruppen. Die wichtigsten Daten sind in Tabelle 3 zusammengefaßt.

Die Röntgenstrukturanalyse ergab des weiteren, daß die chirale Dikupfer(I)-Knotenverbindung als Konglomerat der

Tabelle 3. Kürzeste intramolekulare H-H-Abstände [\AA] ($\sigma \approx 0.1 \text{\AA}$).

Zwischen übereinanderliegenden Phenanthrolinringen	Zwischen Phenylringen
H4A-H4B' 3.5	H16A-H20A' 2.4
H4B-H4A' 3.4	H16B'-H20B 2.5
H4B-H3A' 3.4	Zwischen $(CH_2)_4$ -Brücken
	H _a 22B-H _b 22A' 2.3
Zwischen Phenanthrolinringen und Polyoxyethylenketten[a]	Zwischen den Methylengruppen einer Kette[a]
H5A-H _a 37B 2.8	H _a 24A-H _b 27A 2.4
H4A'-H _a 27A 2.6	H _a 31A-H _b 34A 2.2
H5B-H _a 31A 2.7	H _a 31B-H _b 34B 2.2
H5B'-H _a 27B 2.4	H _a 31B-H _b 36B 2.5

[a] H_a und H_b sind jeweils die beiden H-Atome einer CH₂-Gruppe.

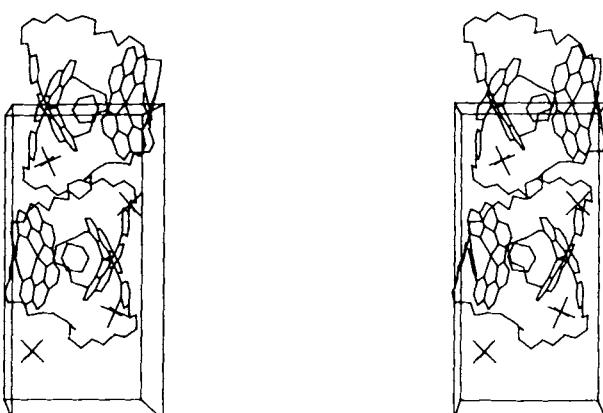


Abb. 3. Stereobild der Elementarzelle. Dargestellt sind zwei Komplexe, vier Anionen (PF_6^-) und zwei Lösungsmittelmoleküle (Benzol).

Enantiomere kristallisiert, d. h. daß ein Kristall nur aus jeweils einem Enantiomer besteht. Abbildung 3 zeigt das Stereobild der Elementarzelle mit zwei linksgeknoteten Enantiomeren.

Experimentelles

Kristalle von $[\text{C}_{104}\text{H}_{104}\text{N}_8\text{O}_{14}\text{Cu}_2](\text{PF}_6)_2 \cdot \text{C}_6\text{H}_6$ wurden aus $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{C}_6\text{H}_6$ durch Dampfdiffusion von Benzol gezüchtet. Die dunkelroten, regelmäßigen Kristalle ($0.8 \times 0.3 \times 0.1 \text{ mm}$) wurden in ein Kapillarröhrchen eingeschmolzen. Die Intensitätsdaten wurden mit einem automatischen Philips-PW1100-Diffraktometer mit 1.1 \AA Auflösung ($\theta_{\max} = 45^\circ$) gesammelt, Wellenlänge $\text{Cu}_{\text{K}\alpha} (\lambda = 1.5418 \text{ \AA})$, Graphitmonochromator. Von 7925 gemessenen Einzelreflexen wurden nur 2967 unabhängige mit $I \geq 2\sigma(I)$ in die Rechnung einbezogen. $M = 2183$, monoklin, Raumgruppe $P2_1$, $a = 13.462(6)$, $b = 27.841(14)$, $c = 13.913(7) \text{ \AA}$, $\beta = 93.66(4)^\circ$, $V = 5204 \text{ \AA}^3$, $Z = 2$, $\rho_{\text{ber.}} = 1.39 \text{ g cm}^{-3}$. Die Struktur wurde durch Direkte Methoden gelöst [1]. Hohe Pseudosymmetrie erschwert die kristallographische Untersuchung. Geringe Auflösung und thermische Bewegung führten zu einer Starren-Block-Verfeinerung der aromatischen Anteile (außer im letzten Verfeinerungszyklus) und Einschränkungen bei den langen Ketten. Der endgültige R-Faktor beträgt 0.128. Weitere Einzelheiten zur Kristallstrukturuntersuchung werden an anderer Stelle veröffentlicht werden und können beim Direktor des Cambridge Crystallographic Data Centre, University Chemical Laboratory, Lensfield Road, CB2 1EW, unter Angabe des vollständigen Literaturzitats angefordert werden.

Eingegangen am 23. Mai 1990 [Z 3974]

- [1] M. A. Krasnow, A. Stasiak, S. J. Spengler, F. Dean, T. Koller, N. R. Cozzarelli, *Nature (London)* 304 (1983) 559.
- [2] J. D. Griffith, H. A. Nash, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 82 (1985) 3124.
- [3] H. F. Frisch, E. Wasserman, *J. Am. Chem. Soc.* 83 (1961) 3789.
- [4] G. Schill, L. Tafelmair, *Synthesis* 1971, 546; J. Boeckmann, G. Schill, *Tetrahedron* 30 (1974) 1945; G. Schill, G. Doerjer, E. Logemann, H. Fritz, *Chem. Ber.* 112 (1979) 3603.
- [5] D. M. Walba, *Tetrahedron* 41 (1985) 3161; D. M. Walba, J. D. Armstrong III, A. E. Perry, R. M. Richards, T. C. Homan, R. C. Haltiwanger, *ibid.* 42 (1986) 1883.
- [6] C. O. Dietrich-Buchecker, J.-P. Sauvage, *Angew. Chem. 101* (1989) 192; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* 28 (1989) 189.
- [7] A. Collet, M.-J. Brienne, J. Jacques, *Chem. Rev.* 80 (1980) 215.
- [8] C. K. Johnson, ORTEP: Report ORNL 3794, Oak Ridge National Laboratory, Oak Ridge, TN, USA 1976.
- [9] C. O. Dietrich-Buchecker, A. K. Khemiss, J.-P. Sauvage, *J. Chem. Soc. Chem. Commun.* 1986, 1376.
- [10] C. O. Dietrich-Buchecker, J. Guillemin, A. K. Khemiss, J.-P. Kintzinger, C. Pascard, J.-P. Sauvage, *Angew. Chem.* 99 (1987) 711; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* 26 (1987) 661.
- [11] G. M. Sheldrick, SHELLX86, Programm zur Kristallstrukturbestimmung, Göttingen 1986.

Selektive Desamidierung von Peptidamiden **

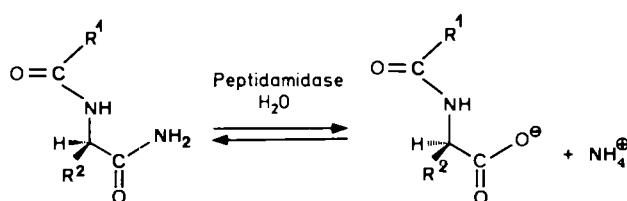
Von Dörte Steinke und Maria-Regina Kula*

Bei der Synthese von Peptiden ist die Wahl der Schutzgruppen von entscheidender Bedeutung^[1, 2]. Die selektive Entfernung bestimmter Schutzgruppen ist oft wünschenswert, aber nur schwer realisierbar. So ist in Peptidamiden die selektive Spaltung der Säureamidbindung aufgrund von deren chemischer Ähnlichkeit mit den Peptidbindungen ohne zumindest partielle Hydrolyse dieser Bindungen bislang

[*] Prof. Dr. M.-R. Kula, Dipl.-Biol. D. Steinke
Institut für Enzymtechnologie der Universität Düsseldorf
Forschungszentrum Jülich
Postfach 2050, D-5170 Jülich

[**] Diese Arbeit wurde vom Bundesministerium für Forschung und Technologie (Projekt-Nr. 031900713) und von der Degussa AG gefördert. Wir danken Dr. Drauz (Degussa AG) und Dr. Berndt (Deutsches Wollforschungsinstitut, Aachen) für die Überlassung von Substraten.

nicht möglich. Aus diesem Grund wurde die Amidfunktion in der Peptidsynthese als C-terminale Schutzgruppe kaum genutzt, obwohl die Amide einige Vorteile bieten wie die Senkung des pK_a gegenüber dem der entsprechenden freien Aminosäure, die Erhöhung der Löslichkeit des Peptids und eine gute chemische Beständigkeit. Mit einem von uns erstmals isolierten und beschriebenen Enzym gelang es nun, Peptidamide anscheinend beliebiger Länge zu Peptiden mit freiem C-Terminus zu hydrolysieren, ohne die Peptidbindung zu spalten. Damit wird eine hochselektive C-terminale Deblockierung möglich (Schema 1).



Schema 1. Amidspaltung durch die Peptidamidase. R^1 = Aminosäurerest, Peptidrest oder N-terminale Schutzgruppe eines Aminosäureamids, R^2 = Seitenkette beliebiger Aminosäure.

Die Peptidamidase wurde aus dem Flavedo von Orangen isoliert und charakterisiert. In Abbildung 1 ist beispielhaft die pH-Abhängigkeit der enzymatischen Desamidierung von Z-Gly-Tyr-NH₂ dargestellt. Das breite pH-Optimum von

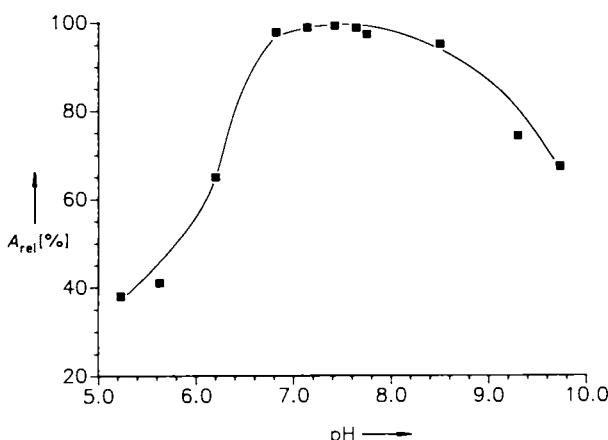


Abb. 1. pH-Abhängigkeit der enzymatischen Desamidierung von Z-Gly-Tyr-NH₂. Reaktionsbedingungen: 10 mM Z-Gly-Tyr-NH₂, 50 mM Na-Citrat-, Na-Phosphat- oder Na-Carbonatpuffer, 40 µg mL⁻¹ Peptidamidase, 30 °C. A_{rel} = relative Aktivität der Peptidamidase.

pH 6.8 bis 8.4 sowie das breite Substratspektrum (siehe Tabelle 1) ermöglichen einen universellen Einsatz des Enzyms. Die Peptidamidase akzeptiert als Substrate sowohl N-terminal geschützte Peptide als auch Peptide mit freiem N-Terminus, und die Seitenkette der C-terminalen Aminosäure ist von untergeordneter Bedeutung. Von den vierzig bisher untersuchten Peptidamiden wurden nur die mit C-terminaler D-Aminosäure von der Peptidamidase nicht umgesetzt. Eine Auswahl der umgesetzten Substrate enthält Tabelle 1.

Das Enzym ist also ausgesprochen unspezifisch bezüglich der Aminosäureseitenketten des Peptids, und seine Stereoselektivität scheint auf die C-terminalen Aminosäure beschränkt zu sein: das Substrat H-Gly-D-Phe-Tyr-NH₂ wird desamidiert, während H-Gly-Phe-D-Phe-NH₂ und H-Arg-Pro-D-Ala-NH₂ nicht umgesetzt werden.

Tabelle 1. Substratspektrum der Peptidamidase.

Substrat [a]	Umsatz [%] nach 6 h	Trennbedingungen TBA [b]/Acetonitril	Retentionszeit Amid	Retentionszeit Säure
Ac-Trp-NH ₂	100	65/35	3.30	4.0
Bz-Arg-NH ₂	100	90/10	3.5	6.8
Bz-Tyr-NH ₂	100	60/40	9.24	21.2
H-Val-Phe-NH ₂	100	80/20	11.54	27.3
H-Asp-Phe-NH ₂	100	80/20	12.12	12.9
H-Ala-Phe-NH ₂	100	80/20	4.8	8.1
H-Arg-Met-NH ₂	100	80/20	6.7	5.4
H-Phe-Leu-NH ₂	100	80/20	17.5	22.1
Z-Gly-Tyr-NH ₂	100	65/35	4.16	5.16
Bz-Tyr-Thr-NH ₂	100	60/40	3.15	3.56
Bz-Tyr-Ser-NH ₂	100	60/40	2.99	3.35
Bz-Tyr-Ala-NH ₂	100	60/40	3.33	4.0
Boc-Leu-Val-NH ₂	20	60/40	7.1	11.4
Trt-Gly-Leu-Val-NH ₂	80	80/20	3.6	10.6
Z-Pro-Leu-Gly-NH ₂	100	60/40	4.9	6.3
Z-Gly-Gly-Leu-NH ₂	100	60/40	3.9	5.0
H-Gly-D-Phe-Tyr-NH ₂	100	80/20	6.9	13.7
H-Gly-Phe-D-Phe-NH ₂	0 [c]	80/20	7.3	11.4
H-Arg-Pro-D-Ala-NH ₂	0 [c]	99/1	2.4	
Z-Arg-Arg-pNa	0 [c]			

[a] Die Substrate wurden von Bachem, Heidelberg, bezogen oder von Dr. Drauz oder Dr. Berndt zur Verfügung gestellt. Ac = Acetyl, Bz = Benzoyl, Boc = tert-Butyloxycarbonyl, Z = Benzyloxycarbonyl, pNa = para-Nitroanilid, Trt = Trityl. Sofern nicht speziell gekennzeichnet, hatten die Aminosäuren L-Konfiguration ((2S)-Aminosäuren). [b] TBA = Bu₄N(HSO₄). [c] Kein Umsatz in 12 h (keine Abnahme der Amid-Peakfläche).

Aminosäureamide mit freier α -Aminogruppe werden nicht hydrolysiert, während N-geschützte Aminosäureamide als Substrate akzeptiert werden (siehe die ersten drei Einträge in Tabelle 1). Substituierte Amide, wie die häufig zur Analyse von Proteasen eingesetzten Peptidamidine, werden wiederum nicht umgesetzt.

Das Enzym kann sehr gut bei enzymatischen Peptidsynthesen verwendet werden, da es die mit Vorteil als Nucleophile eingesetzten Aminosäureamide^[1, 3, 4] nicht spaltet, so daß diese der Synthesereaktion laufend zur Verfügung stehen, während das gebildete Peptidamid desamidiert wird. Es ist also eine Peptidsynthese mit gleichzeitiger Desamidierung des Produkts möglich^[5].

Mit Aminosäureamiden statt Estern als Nucleophilen genügt bei enzymatischen Peptidsynthesen ein deutlich gerin-

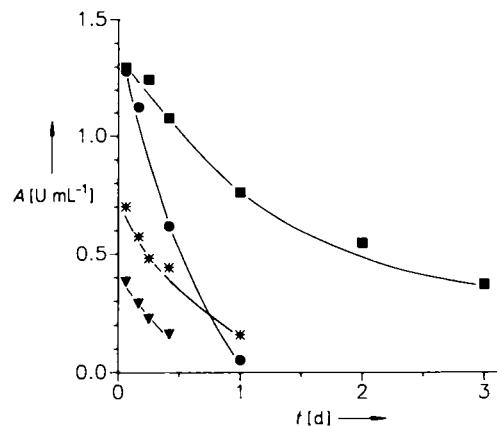


Abb. 2. Einfluß organischer Lösungsmittel auf die Stabilität der Peptidamida. Reaktionsbedingungen: 40 µg mL⁻¹ Enzym wurden bei 30 °C in 50 mM Tris(Tris(hydroxymethyl)aminomethan)-Puffer, pH 7.5 und organischem Lösungsmittel/H₂O 30/70 vorinkubiert. Zur Zeit $t = 0$ wurde die Reaktion durch Zugabe von Substrat (Z-Gly-Tyr-NH₂) gestartet. In der entsprechenden Blindprobe (Enzym in 50 mM Tris/HCl, pH 7.5) ohne organisches Lösungsmittel trat kein Aktivitätsverlust auf. ■ = DMF, ● = Aceton, ▲ = Ethanol, ▽ = Acetonitril.

gerer Überschuß an Nucleophil^[2], was die Aufarbeitung der Peptide erleichtert. Bei einigen Carboxypeptidasen sind Amide als Nucleophile für die Peptidsynthese obligatorische Substrate^[6].

Wegen der Schwerlöslichkeit vieler Peptidsubstrate in Wasser wurde der Einfluß organischer Lösungsmittel, die mit Wasser mischbar sind, auf die Stabilität der Peptidamidase untersucht. Die Ergebnisse zeigt Abbildung 2. Die geringsten Aktivitätsverluste traten mit Dimethylformamid (DMF) auf: nach drei Tagen Inkubation in DMF/H₂O 30/70 bei 30 °C waren noch ca. 30% der ursprünglichen Aktivität vorhanden.

Experimentelles

Das Enzympräparat wurde aus dem Flavedo von Orangen, d. h. aus der äußersten farbigen Schicht der Schalen, über eine zweistufige Reinigung durch fraktionierende Salzfällung und Ionenaustrauschchromatographie gewonnen. Die Peptidamidase hatte je nach Substrat eine Aktivität von 2 bis 100 U mg⁻¹, wobei bei einer Aktivität von 1 U ein μmol Produkt pro Minute bei 30 °C und pH 7.5 umgesetzt wird. Sofern nicht anders angegeben, wurden 10–50 mM Peptidamid in 50 mM Tris/HCl-Puffer, pH 7.5 mit 20–40 μg mL⁻¹ Peptidamidase umgesetzt. Die Bestimmung und Quantifizierung der Peptide erfolgte durch HPLC an einer RP-18-Säule, die isokratisch mit TBA/Acetonitril unterschiedlicher Zusammensetzung als Laufmittel und einer Fließgeschwindigkeit von 1.0 mL min⁻¹ eluiert wurde. Detektiert wurde im Absorptionsmaximum des jeweiligen Substrates. Die Laufmittelzusammensetzung ist in Tabelle 1 angegeben. In allen Experimenten wurde nur ein neuer Peak im Chromatogramm beobachtet, dessen Fläche selbst nach 24–48 h Inkubation unverändert und dessen Retentionszeit mit der einer Referenzprobe (soweit verfügbar) identisch war. Folgende Referenzsubstanzen von Bachem, Heidelberg, wurden zur Produktidentifizierung verwendet: Ac-Trp-OH, Bz-Arg-OH, Z-Gly-Tyr-OH, H-Asp-Phe-OH, H-Ala-Phe-OH, H-Arg-Met-OH, H-Val-Phe-OH, Z-Pro-Leu-Gly-OH, Z-Gly-Gly-Leu-OH und H-Gly-Phe-Phe-OH.

Eingegangen am 17. Juli 1990 [Z 4071]

- [1] V. Kasche, *Enzyme Microb. Technol.* 8 (1986) 4–15.
- [2] A. Schwarz, D. Steinke, M.-R. Kula, C. Wandrey, *Biotechnol. Appl. Biochem.* 12 (1990) 188–195.
- [3] H. D. Jakubke in S. Udenfriend, J. Meienhofer (Hrsg.): *The Peptides. Analysis, Synthesis, Biology*, Academic Press, London 1987, S. 103–165.
- [4] T. Oka, K. Morihara, *J. Biochem.* 82 (1977) 1055–1062.
- [5] D. Steinke, M.-R. Kula, A. Schwarz, C. Wandrey: *Peptidamidase und deren Verwendung*. Patentanmeldung P 4014 564.6-41.
- [6] D. Steinke, M.-R. Kula, *Enzyme Microb. Technol.*, im Druck.

Ein neuartiger Bindungstyp eines Cyanometallat-Liganden: Synthese und Struktur des Mn₄Pd₄-Clusters [(OC)Pd(μ-NC)Mn(η-C₅H₄Me)(CO)₂]₄ mit orthogonal angeordneten helicalen Einheiten **

Von Pierre Braunstein*, Benoît Oswald, Antonio Tiripicchio und Marisa Tiripicchio Camellini

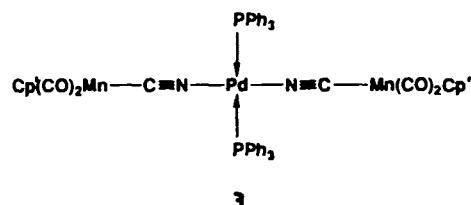
Cyanokomplexe sind für die präparative und Physikalische Chemie von zunehmendem Interesse, da Cyano-Li-

[*] Dr. P. Braunstein, B. Oswald
Laboratoire de Chimie de Coordination URA 416 CNRS
Université Louis Pasteur
4 rue Blaise Pascal, F-67070 Strasbourg Cedex (Frankreich)
Prof. A. Tiripicchio, Prof. M. Tiripicchio Camellini
Istituto di Chimica Generale ed Inorganica
Università di Parma
Centro di Studio per la Strutturistica Diffrattometrica del CNR
Viale delle Scienze, I-43100 Parma (Italien)

[**] Diese Arbeit wurde vom CNRS (Paris) und der Kommission der Europäischen Gemeinschaften (Vertrag Nr. ST2J-0347-C) gefördert.

ganden in der Lage sind, verschiedenartige Organometall-Einheiten zu verknüpfen, ungewöhnliche Oxidationsstufen sowie gemischtvalente Systeme zu stabilisieren, als Charge-Transfer-Vermittler zu wirken^[1] oder katalytisch aktive Übergangsmetallkomplexe zu bilden^[2]. Die Tatsache, daß der Cyano-Ligand isoster mit CO ist, hat ihn außerdem zu einem Modell für die CO-Chemie werden lassen^[3], obwohl er ein schlechterer π-Acceptor und ein besserer σ-Donor als CO ist. Zwar ist die Donorstärke des Cyanid-Ions auch die herausragende Ligandeneigenschaft im komplexen Anion [Cp'Mn(CN)(CO)₂]¹⁻ ¹⁻ (Cp' = η-C₅H₄Me), dennoch ist die Titelverbindung das erste Beispiel für einen mehrkernigen Komplex, der neben direkten Metall-Metall-Bindungen auch noch M-CN-M'-Brücken aufweist, wodurch eine neuartige Molekülstruktur entsteht.

In dieser Arbeit vergleichen wir die Reaktivitäten von ¹⁻^[4] und dem isosteren^[5] Anion [CpMo(CO)₃]²⁻ ²⁻ gegenüber Palladiumkomplexen. *trans*-[PdCl₂(PPh₃)₂] reagiert mit zwei Äquivalenten Na · ¹ (THF, 0.5 h, 25 °C) unter Ersatz des Chloro-Liganden zum rotvioletten Komplex *trans*-[Pd{(μ -NC)Mn(CO)₂Cp'}₂(PPh₃)₂] ³ in 89% Ausbeute.



Unter gleichen Bedingungen entsteht bei der Umsetzung mit Na · ² der planare Cluster [Pd₂Mo₂Cp₂(CO)₆(PPh₃)₂] ⁴, in dem zwei kantenverknüpfte Dreiecke aus Metallatomen vorliegen und in dem Pd^{II} zu Pd^I reduziert ist^[6]. Dieser Unterschied ist auf sterische Einflüsse zurückzuführen, da die *trans*-Anordnung der Mo-Pd-Mo-Kette nicht stabil ist, wenn zwei PR₃-Liganden am Palladiumzentrum koordiniert sind^[6].

Der zweikernige Pd^I-Pd^I-Komplex [Pd₂Cl₂(μ-CO)(PPh₃)₃] reagiert mit ¹⁻ (Toluol, 5 h, 0 bis 25 °C) unter Disproportionierung zu ³ (44% Ausbeute) und Palladium-Metall, bei Umsetzung mit ²⁻ jedoch zur Verbindung ⁴^[7]. Die Gründe für die Instabilität des primär gebildeten Reaktionsproduktes, das durch einfachen Austausch eines Chloro-Liganden durch ¹⁻ oder ²⁻ entsteht, sind im ersten Fall auf elektronische Einflüsse zurückzuführen, im zweiten Fall dagegen wiederum sterischen Ursprungs, da eine Pd-Mo-Bindung in Bezug auf die beiden PPh₃-Liganden *cis*-ständig wäre.

Der durch dppm (dppm = Ph₂PCH₂PPh₂) stabilisierte Zweikernkomplex [Pd₂(μ-dppm)₂Cl₂] reagiert mit zwei Äquivalenten ¹⁻ (THF, 1 h, 25 °C) zu der stabilen, eine Kette aus acht Atomen enthaltenden Verbindung ⁵ in 91% Ausbeute (Schema 1). Die spektroskopischen Daten von ⁵ sind im Einklang mit der abgebildeten symmetrischen Struktur: die chemische Verschiebung des im ³¹P(¹H)-NMR-Spektrum beobachteten Singulets von δ = -5.33 entspricht denjenigen anderer [Pd₂(μ-dppm)₂X₂]-Komplexe^[8]. Die IR-Absorptionen ν(CN) und ν(CO) sind vergleichbar mit denen von Verbindungen, in denen, wie auch bei ³, solche oder ähnliche Fragmente über das Stickstoffatom am Metallzentrum gebunden vorliegen^[1, 4]. Formal könnte man ³ und ⁵ auch als „Isocyano“-Palladiumkomplexe^[9] betrachten, die durch das 16-Elektronen-Fragment Cp'Mn(CO)₂ stabilisiert werden. Im Gegensatz dazu bildet sich aus ²⁻ und [Pd₂(μ-dppm)₂Cl₂] der *triangulo*-Cluster ⁶, der durch Wanderung