

Die periphere Bindung C1-C2 ist länger als im Spiropentan<sup>[6]</sup>. In Analogie zu Cyclopropanderivaten<sup>[8]</sup> wird diese Bindung, durch die elektronenziehende Wirkung der Estergruppen verlängert (Abb. 1). Die beiden Estergruppen weichen nur 0.3 bzw. 5.3° von der bisektierenden Orientierung ab, die eine optimale Wechselwirkung der Substituenten mit den Walsh-Orbitalen des Dreirings ermöglicht. Die elektronischen Effekte auf die beiden zentralen Bindungen C1-C3 und C2-C3 schwächen sich gegenseitig ab, da diese Bindungen jeweils geminal und distal zu den Substituenten angeordnet sind. Daher findet man im Vergleich zu Spiropentan<sup>[6]</sup> keine signifikante Beeinflussung dieser Bindungen. Die Atomabstände der Tieftemperaturmessung sind länger als bei Raumtemperatur, weil die Librationsverkürzung und die Einflüsse der Bindungselektronen minimal sind (Abb. 1).

Sämtliche Einfachbindungen des Spiropentans **1** sind stark gebogen, deutlich erkennbar an den Verschiebungen der Elektronendichtemaxima relativ zu den Bindungsachsen (Abb. 2). Die Bindungsbiegung in Spiropentan liegt in der gleichen Größenordnung<sup>[6]</sup>. Signifikant stärkere Biegungen im gesättigten Dreiring von **1** relativ zum weniger gespannten Cyclopropan<sup>[9]</sup> und seinen Derivaten<sup>[9, 10]</sup> können innerhalb der Meßgenauigkeit nicht festgestellt werden.

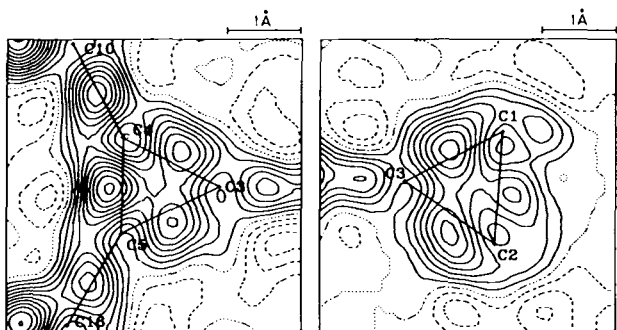


Abb. 2. Differenzelektronendichte in der Cyclopropenebene (C3, C4, C5) und in der Cyclopropanebene (C1, C2, C3) des Spiropentans **1**. Konturintervall 0.05 e/Å<sup>3</sup>. Standardabweichung der Differenzdichte außerhalb der Atomlagen 0.03–0.04 e/Å<sup>3</sup>. Nulllinie gepunktet, negative Elektronendichte gestrichelt.

Die Bindung C4-C5 ist eine der am stärksten gebogenen Doppelbindungen. Das Dichtemaximum ist stark gegenüber der Bindungsachse verschoben (0.18 Å, Winkel zwischen Bindungsachse und Verbindung vom Atom zum Dichtemaximum der Bindung: 15°), und zwar deutlich mehr als bei einer Doppelbindung im Vierringsystem eines Cyclobutadiens (0.08 Å bzw. 8°<sup>[11]</sup>). In benzokondensierten Cyclopropenen liegen die Biegungen wegen der reduzierten Bindungsordnung entsprechend höher<sup>[12]</sup>. Sehr starke Deformationen der Bindungen in Spiropentan und Spiropenten ergeben sich auch aus quantenmechanischen Berechnungen<sup>[12, 13]</sup>.

Eingegangen am 11. Januar 1991 [Z 4380]

CAS-Registry-Nummer:  
1, 132856-03-2.

[1] J. Kao, L. Radom, *J. Am. Chem. Soc.* 100 (1978) 760.

[2] Z. B. Maksic, K. Kovačević, A. Maguš, *J. Mol. Struct.* 85 (1981) 9.

[3] Kristallographische Daten bei Raumtemperatur und 105 K: a) Raumtemperatur: farblose Prismen aus Ethanol/Ether,  $a = 11.637(2)$ ,  $b = 17.548(3)$ ,  $c = 17.692(3)$  Å; orthorhombische Raumgruppe  $Pbca$ ;  $Z = 8$ ,  $\rho_{\text{ber}} = 1.23 \text{ Mg m}^{-3}$ , Kristallgröße  $0.5^3 \text{ mm}^3$ ;  $\text{MoK}_\alpha$ -Strahlung, Enraf-Nonius CAD4-Diffraktometer, Graphit-Monochromator,  $\sin \theta/\lambda < 0.66 \text{ Å}^{-1}$ , 3868 unabhängige, davon 1719 beobachtete ( $I > 2.5\sigma(I)$ ) Reflexe. Verfei-

nerung: C, O anisotrop, H isotrop,  $R = 0.04$ . b) Tieftemperatur (105 K):  $a = 11.427(2)$ ,  $b = 17.476(2)$ ,  $c = 17.617(3)$  Å,  $\rho_{\text{ber}} = 1.27 \text{ Mg m}^{-3}$ , Kristallgröße  $0.45^3 \text{ mm}^3$ , drei ( $2 < \theta \leq 28^\circ$ ) bzw. vier ( $28 < \theta \leq 55^\circ$ ) unabhängige Datensätze mit insgesamt 18 269 Reflexen wurden vermessen. Im hohen Bragg-Winkelbereich ( $\sin \theta/\lambda > 0.66 \text{ Å}^{-1}$ ) wurden nur starke Reflexe ( $|F(hk\ell)| > 3$ ) vermessen. Nach der Mittelung ( $R_{\text{int}} = 0.029$ ) verbleiben 7173 unabhängige Reflexe, davon beobachtet 6074 ( $I > 2.5\sigma(I)$ ) im Bereich bis  $\sin \theta/\lambda = 1.15 \text{ Å}^{-1}$ . Verfeinerung (C, O anisotrop) mit 3003 Reflexen hoher Ordnung ( $\sin \theta/\lambda = 0.66$ – $1.15 \text{ Å}^{-1}$ ),  $R = 0.052$ . Parameter der H-Atome aus der Verfeinerung mit Reflexen niedriger Ordnung ( $\sin \theta/\lambda < 0.66 \text{ Å}^{-1}$ ). Hirshfeldtest [4]: mittlere Differenz der anisotropen Auslenkungsparameter entlang der Bindungen  $0.0008 \text{ Å}^3$ . Weitere Einzelheiten zur Kristallstrukturuntersuchung können beim Fachinformationszentrum Karlsruhe, Gesellschaft für wissenschaftlich-technische Information mbH, W-7514 Eggenstein-Leopoldshafen 2, unter Angabe der Hinterlegungsnummer CSD-55258, der Autoren und des Zeitschriftenzitats angefordert werden.

- [4] F. L. Hirshfeld, *Acta Crystallogr. Sect. A* 32 (1976) 239.  
[5] M. W. Jones, M. E. Stowe, E. E. Wells, Jr., E. W. Lester, *J. Am. Chem. Soc.* 90 (1968) 1849.  
[6] R. Boese, D. Bläser, K. Gomann, U. H. Brinker, *J. Am. Chem. Soc.* 111 (1989) 1501; G. Dalling, R. K. van der Draai, L. H. Toneman, *Recl. Trav. Chim. Pays-Bas* 87 (1968) 897.  
[7] W. M. Stigliani, V. W. Laurie, J. C. Li, *J. Chem. Phys.* 62 (1975) 1890.  
[8] F. H. Allen, *Acta Crystallogr. Sect. B* 36 (1980) 81.  
[9] D. Nyveldt, A. Vos, *Acta Crystallogr. Sect. B* 44 (1988) 289, 296.  
[10] A. Hartmann, F. L. Hirshfeld, *Acta Crystallogr.* 20 (1966) 80.  
[11] H. Irgartinger, M. Nixdorf, *Chem. Ber.* 121 (1988) 679.  
[12] D. Bläser, R. Boese, W. A. Brett, P. Rademacher, H. Schwager, A. Stanger, K. P. C. Vollhardt, *Angew. Chem.* 101 (1989) 209; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* 28 (1989) 206.  
[13] K. B. Wiberg, R. F. W. Bader, C. D. H. Lau, *J. Am. Chem. Soc.* 109 (1987) 985; Z. B. Maksic, K. Kovačević, *J. Org. Chem.* 39 (1974) 539.

## Diastereoselektive, enzymatische Aldoladditionen mit L-Rhamnulose- und L-Fuculose-1-phosphat-Aldolasen aus *E. coli*\*\*

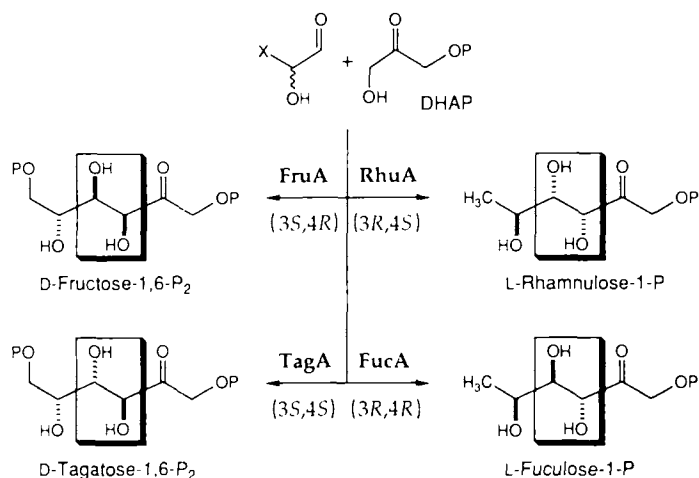
Von Wolf-Dieter Fessner\*, Gudrun Sinerius, Achim Schneider, Matthias Dreyer, Georg E. Schulz, Josefa Badia und Juan Aguilar

Aldolasen sind vielversprechende Katalysatoren für die Organische Synthese, da enzymkatalysierte C-C-Verknüpfungen mit einem hohen Grad an Enantio- und Diastereoselektivität verlaufen, der selten mit klassischen Synthesemethoden erreicht wird<sup>[1]</sup>. Speziell aus dem Kohlenhydratstoffwechsel sind vier komplementäre Aldolasen bekannt (Schema 1), die die asymmetrische Addition von Dihydroxyacetonphosphat (DHAP) an L-Lactaldehyd oder D-Glycerinaldehyd-3-phosphat katalysieren, wobei jeweils nur ein einziges Produkt mit einer der vier möglichen diastereomeren Konfigurationen gebildet wird. Die Fructose-1,6-bisphosphat-Aldolase (FruA) akzeptiert eine breite Palette von Aldehyden als Substratanaloga<sup>[2]</sup>. Die Nutzung des vollen Potentials der DHAP-Aldolasen in einer allgemeinen und leistungsfähigen Metho-

[\*] Dr. W.-D. Fessner, Dipl.-Chem. G. Sinerius, Dipl.-Chem. A. Schneider, Dipl.-Chem. M. Dreyer, Prof. Dr. G. E. Schulz  
Institut für Organische Chemie und Biochemie der Universität  
Albertstraße 21, W-7800 Freiburg  
Dr. J. Badia, Prof. Dr. J. Aguilar  
Department of Biochemistry, School of Pharmacy,  
University of Barcelona  
Barcelona 08028 (Spanien)

[\*\*] Enzyme in der Organischen Synthese, 1. Mitteilung. Diese Arbeit wurde durch die Deutsche Forschungsgemeinschaft (Projekt Fe 244/2-1), die Wissenschaftliche Gesellschaft Freiburg und den Fonds der Chemischen Industrie sowie von der Comisión Asesora de Investigación Científica y Técnica (Grant PB 85-0084) unterstützt. Wir danken Prof. Dr. E. C. C. Lin und Dr. Y.-M. Chen, Harvard Medical School, Boston, für die Überlassung von Bakterienstämmen und für die *fuc*-Gene enthaltende Plasmid-DNA sowie Dr. A. Ozaki für einen Vorabdruck von Lit. [8].

de für asymmetrische Synthesen wird weitgehend vom Zugang zur kompletten Tetrade der Enzyme abhängen. Dies würde die gezielte Herstellung aller vier möglichen Diastereomere nach einem Baukastenprinzip ermöglichen, wobei nur der passende Aldehyd und das korrekte Enzym zu wählen wären. Wir berichten hier über die Subklonierung, Überexpression, Isolierung und Anwendung von zwei bakteriellen DHAP-Aldolasen in der Synthese, nämlich der L-Rhamnulose-(RhuA; EC 4.1.2.19) und L-Fuculose-1-phosphat-Aldolasen (FucA; EC 4.1.2.17) aus *E. coli*, die ebenfalls viele Aldehyde akzeptieren, jedoch Produkte bilden, die sich von denen der FruA stereochemisch unterscheiden.



Zellen von *E. coli* K-12 können auf L-Rhamnose oder L-Fucose als einziger Kohlenstoff- und Energiequelle wachsen, wobei Stoffwechselwege induziert werden, die jeweils eine zentrale Aldolspaltung des C<sub>6</sub>-Zuckers durch RhuA bzw. FucA bewirken. Zur Herstellung großer Enzymmengen für eine präparative Nutzung wurden zwei unabhängige Überexpressionssysteme entwickelt. Für die RhuA wurde ein *Bam*HI-*Hind*III-Genomfragment der Größe 3.3 kb, das das gesamte, für die Aldolase codierende *rhaD*-Strukturgen enthält, in den pUC18-Vektor subkloniert<sup>[3]</sup>. Nach Transformation des rekombinanten Plasmids in eine *recA*-Mutante des *E. coli*-Stammes ECL40 wurde das Enzym im Vergleich zum Wildtyp ca. 15fach konstitutiv überexprimiert (0.4 U mg<sup>-1</sup> im Rohextrakt bei insgesamt 400 U L<sup>-1</sup> Kultur<sup>[4]</sup>) bei Fermentation in Ampicillin-haltigem (100 µg mL<sup>-1</sup>) 1 proz. CAA-Medium<sup>[5]</sup>. Das Strukturgen der FucA wurde unter Einführung von *Eco*RI-*Pst*I-Schnittstellen nach PCR-Standardverfahren aus dem pfuc41a-Plasmid<sup>[6]</sup> in einen pUC18-abgeleiteten Expressionsvektor<sup>[7]</sup> umklontiert, wo es unter die Kontrolle des *tac*-Promotors geriet. Die mit diesem rekombinanten Plasmid transformierten Zellen des *E. coli*-Stammes HB101 überexprimierten das FucA-Protein 20fach relativ zum Wildtyp (5 U mg<sup>-1</sup> im Rohextrakt bei insgesamt 900 U L<sup>-1</sup> Kultur<sup>[4]</sup>) nach Induktion mit 0.5 mM Isopropyl-β-D-thiogalactopyranosid (IPTG)<sup>[8]</sup>.

Die Enzyme wurden bis zur Homogenität gereinigt (≥ 60% (RhuA), ≥ 40% (FucA) Gesamtausbeute; eine Bande in der SDS-Polyacrylamidgel-Elektrophorese oder bei isoelektrischer Fokussierung; keine FruA-Aktivität nachweisbar), und zwar mit vergleichbaren, dreistufigen Reinigungssequenzen aus Ionenaustausch-, hydrophober Wechselwir-

kungs- und Gelpermeations-Chromatographie. Katalytisch aktive Aldolasen sind Homotetramere aus Untereinheiten vom Molekulargewicht 30 kDa (RhuA)<sup>[3]</sup> oder 25 kDa (FucA)<sup>[6]</sup>. In reiner Form bilden beide Enzyme jeweils leicht Kristalle (RhuA: Stäbchen oder rechteckige Tafeln aus ≥ 10 proz. (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>-Lösung; FucA: quadratische Tafeln aus 22 proz. (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>-Lösung bei pH 7.8), die zur Röntgenstrukturanalyse geeignet sind.

Tabelle 1. RhuA- oder FucA-katalysierte enzymatische Synthesen von Ketose-1-phosphaten[a].

Aldehyd	Formel	Produkt-konfiguration trans-cis	Enzym	Diastereo- merenverb. trans-cis	Ausb. [%]	Relative Geschw. [c]
1. Glycolaldehyd		14 15	RhuA FucA	≥ 97 : 3 ≤ 3 : 97	82 85	43 38
2. L-Lactaldehyd		16 17	RhuA FucA	≥ 97 : 3 ≤ 3 : 97	95 83	100 100
3. D-Glycerinaldehyd		18 19	RhuA FucA	> 97 : 3 ≤ 3 : 97	84 82	42 28
4. L-Glycerinaldehyd		20 21	RhuA FucA	≥ 97 : 3 ≤ 3 : 97	91 86	41 17
5. 3-Hydroxypropionaldehyd		22 23	RhuA FucA	≥ 97 : 3 ≤ 3 : 97	73 78	29 11
6. Formaldehyd		24	RhuA FucA	- -	(81) (73)	22 44
7. Acetaldehyd		25 26	RhuA FucA	69 : 31 5 : 95	(84) (54)	32 14
8. Propionaldehyd		27 28	RhuA	90 : 10	(89)	50
9. n-Butyraldehyd		29 30	RhuA	83 : 17	(82)	48
10. i-Butyraldehyd		31 32	RhuA FucA	97 : 3 30 : 70	(88) (58)	22 20
11. 3,3-Diethoxypropionaldehyd		33 34	FucA	≤ 3 : 97	(68)	31
12. Bernsteinsäuresemialdehyd		35 36	FucA	≤ 3 : 97	(80)	19
13. Pyridin-2-carbaldehyd		37 38	FucA	≤ 3 : 97	(43)	39

[a] Bedingungen siehe Experimentelles. P = Orthophosphatester. Bezeichnung der absoluten Konfigurationen an C-4: trans |||, cis —. [b] An den kristallinen Bis(cyclohexylammonium)salzen bestimmt; Werte in Klammern beziehen sich auf nicht-kristallisierende Bis(triethylammonium)salze der Diastereomeren [10]. [c] Bezogen auf L-Lactaldehyd als 100%. Bestimmung der Initialgeschwindigkeiten anhand von Assays auf Rest-DHAP in Proben, welche in Minutenabständen einem Reaktionsansatz entnommen wurden, der 5 mM DHAP, 50 mM Aldehyd und eine entsprechende Menge gereinigte Aldolase enthielt.

Die Stereoselektivität und Substrattoleranz der so gereinigten Enzyme wurde in zwei präparativen Versuchsreihen mit den repräsentativen achiralen und homochiralen Aldehyden **1–13** als Substratanaloga untersucht (Tabelle 1). Alle Umsatzgeschwindigkeiten, die in separaten enzymatischen Assays bestimmt wurden, erwiesen sich als ausreichend schnell, um DHAP effizient und ökonomisch umzusetzen<sup>[9]</sup>. Die Reaktionen wurden im 1–20 mmol-Maßstab durchgeführt mit typischen Ausbeuten von 70–90 % (nicht optimiert). Die Diastereomerenverhältnisse wurden durch Hochfeld-<sup>1</sup>H-NMR-spektroskopische Analyse der Rohprodukte bestimmt. Die Produkte wurden zudem über Ionenaustausch-Chromatographie gereinigt<sup>[10]</sup> und durch Vergleich mit authentischen Proben aus einer anderen Untersuchung<sup>[11]</sup> oder mit enantiomerem Material aus entsprechenden FruA-katalysierten Reaktionen identifiziert.

Alle ausschließlich oder hauptsächlich erhaltenen Diastereomere der RhuA-Reaktionen waren mit Ausnahme ihres gegenläufigen optischen Drehsinns identisch mit denjenigen aus analogen FruA-Reaktionen. Dies beweist, daß RhuA vicinale Diol-Einheiten der absoluten (3*R*,4*S*)-*trans*-Konfiguration („*L-threo*“) erzeugt, im Gegensatz zu der von FruA gebildeten (3*S*,4*R*)-*trans*-Konfiguration („*D-threo*“). Die jeweils einzigen Diastereomere, die bei FucA-katalysierten Reaktionen mit den achiralen oder homochiralen Hydroxyaldehyden **1–5** gebildet wurden, unterscheiden sich jedoch von denjenigen, die bei RhuA- oder FruA-Katalyse erhalten wurden. Dies bestätigt, daß FucA vicinale Dioleinheiten mit *cis*-Konfiguration der Hydroxy-Substituenten an der C3-C4-Bindung erzeugt im Gegensatz zur *trans*-Stellung bei RhuA- und FruA-Produkten. Die Identität der Produkte von FucA und deren absolute (3*R*,4*R*)-Konfiguration („*D-erythro*“) wurde zweifelsfrei durch Vergleich mit authentischen Proben belegt<sup>[11]</sup>.

Innerhalb der Nachweisgrenzen von Hochfeld-<sup>1</sup>H- und -<sup>13</sup>C-NMR-Spektroskopie ( $\leq 3\%$ ) bilden die Enzyme RhuA und FucA nur jeweils ein einziges Diastereomer aus den Hydroxyaldehyden **1–5**. Daraus kann man schließen, daß das typisierende Maß an Diastereoselektivität bei der Bildung von *L*-Rhamnose-**16** bzw. *L*-Fucose-1-phosphat **17** in der Regel mit verwandten, polaren Substratanaloga voll erhalten bleibt. Damit wird ein direkter, hochstereokontrollierter Zugang zu Phosphaten ungewöhnlicher oder unnatürlicher Zucker wie **14** (*L*-Xylulose), **18** (*D*-Sorbose), **20** (*L*-Fructose), **15** (*D*-Ribulose), **19** (*D*-Psicose) und **21** (*L*-Tagatose) sowie entsprechender 5-Desoxyderivate **22**, **23** eröffnet. Neben ihrer Eigenschaft als direkte, stabile Vorläufer der freien Zucker<sup>[12]</sup> sind die phosphorylierten Verbindungen wertvoll für Untersuchungen des Stoffwechsels von Kohlenhydraten<sup>[11,12]</sup>.

Bei Experimenten mit RhuA und einer Reihe unpolarer, aliphatischer Aldehyde **7–10** war jedoch neben den erwarteten Deoxyzuckern **25**, **27**, **29** und **31** die Bildung wechselnder Anteile eines zweiten Stereoisomers durch die deutlich abgesetzten 3-/4-H-Signale in den Hochfeld-<sup>1</sup>H-NMR-Spektren (Abb. 1) nachweisbar. Für die falschen Diastereomere, deren Menge invers proportional zur Substituentengröße anstieg, (Maximum von ca. 30 % für Acetaldehyd) wurde die entgegengesetzte Stereochemie an C-4 (z. B. **26**) durch Identität mit dem durch FucA erhaltenen Material bewiesen und ist daher durch ungenaue Steuerung der Aldehydaddition verursacht. Anscheinend ist das aktive Zentrum der Enzyme konsequenter auf die Bindung wasserstoffbrückenbildender als die nicht-wasserstoffbrückenbildender Substituenten im Aldehydteil hin konstruiert. Vergleichsweise arbeitet die FucA sehr selektiv im Falle von Acetaldehyd **7** (Verhältnis 95:5), ist aber sehr viel weniger selektiv beim sterisch anspruchsvolleren Isobutyraldehyd **10** (70:30). Diese Ergebnis-

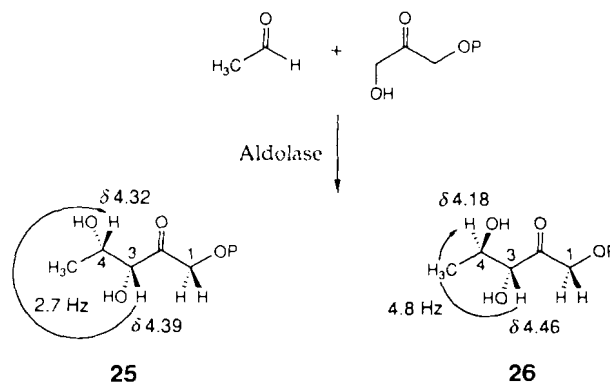


Abb. 1. Exemplarische <sup>1</sup>H-NMR-Daten (400 MHz, D<sub>2</sub>O, pH 7.0) der diastereomeren Aldoladdukte **25** (*trans*) und **26** (*cis*).

se unterstreichen die Problematik, die synthetische Anwendbarkeit von Enzym-Katalysatoren ausschließlich durch Messung eines Substratumsatzes im Assay aufzeigen zu wollen<sup>[8]</sup>, ohne die Produktqualität für jeden Einzelfall genauer zu untersuchen.

Die Bandbreite der Substrattoleranz ist weiterhin exemplarisch belegt durch die FucA-katalysierten Reaktionen von DHAP mit den Aldehyden **11–13** als repräsentative Substratanaloga, die einige typische, für die Synthese nützliche Funktionen enthalten. Generell wurde dabei eine Diastereoselektivität von über 97% beobachtet. Obwohl die absoluten Konfigurationen von **34**, **36** und **38** wegen der beschränkten Verfügbarkeit eindeutiger Vergleichssubstanzen nicht mit letzter Sicherheit bestimmt sind, sollte jedoch die Konfiguration an C-3 mit ziemlicher Sicherheit aus mechanistischen Erwägungen erhalten bleiben<sup>[13]</sup>. Aus ähnlichem Grund muß eine enge Beschränkung für DHAP-Analoga erwartet werden.

Die gereinigten, mikrobiellen Aldolasen weisen eine ausgezeichnete Stabilität in Gegenwart niedriger Zn<sup>2+</sup>-Konzentration ( $\leq 1$  mM) auf mit geschätzten Halbwertszeiten bei Raumtemperatur von mehreren Wochen und einer vernachlässigbaren Inaktivierung während der Lagerung bei 4 °C über Monate. Zudem tolerieren die Enzyme bemerkenswert hohe Anteile organischer Cosolventien (z. B. 30–50 % Ethanol, DMF oder DMSO, Abb. 2).

Zusammenfassend ist hiermit belegt, daß sowohl RhuA als auch FucA eine bemerkenswerte Vielfalt von Aldehyden als Substratanaloga für die effiziente, hoch enantio- und diastereokontrollierte *de-novo*-Synthese von Kohlenhydraten,

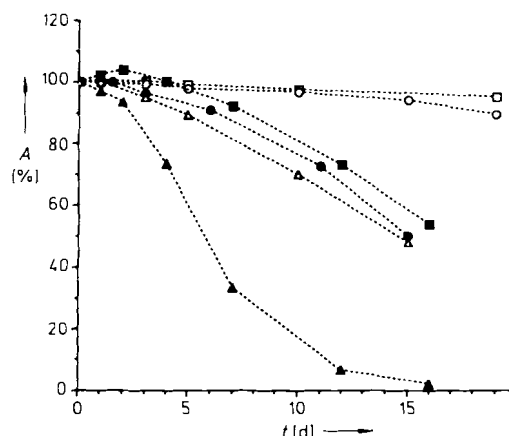


Abb. 2. Stabilität der Aldolasen in Phosphatpuffer (50 mM; 0.5 mM ZnCl<sub>2</sub>; pH 7.2; ca. 1 U mL<sup>-1</sup>) bei 25 °C, bestimmt anhand von Assays nach [4]. Die Beispiele zeigen a) □ RhuA; b) ○ RhuA, 30 % EtOH; c) △ RhuA, 50 % DMSO; d) ■ FucA; e) ● FucA, 30 % DMSO; f) ▲ FucA, 30 % DMF.

verwandten Polyhydroxyverbindungen und phosphorylierten Derivaten akzeptiert. Obwohl die Diastereoselektivität für bestimmte Substratklassen eingeschränkt sein kann und eine sorgfältige Auswahl von Substitutionsmustern erforderlich mag, bieten sich diese Aldolasen aufgrund ihrer leichten Zugänglichkeit und Anwendungsbreite als leistungsfähige enzymatische Katalysatoren für die Organische Synthese an.

Allgemein profitiert die Methode der enzymatischen Aldoladdition vom hohen Grad an gleichzeitiger asymmetrischer Induktion an zwei Stereozentren, den milden Reaktionsbedingungen und der fehlenden Notwendigkeit, funktionelle Gruppen zu schützen. Die praktischen Beschränkungen liegen immer noch in der Kontrolle über die vierte, bis jetzt noch unzugängliche (3*S*,4*S*)-Aldol-Diastereochemie und der inhärenten Begrenzung auf Produkte vom Ketose-Typ<sup>[14]</sup>. Unsere Anstrengungen richten sich deshalb darauf, sowohl die TagA als auch Ketose→Aldose-Isomerasen mit DNA-Rekombinationsmethoden verfügbar zu machen.

### Experimentelles

Eine wäßrige Lösung von D-Glycerinaldehyd **3** (25 mmol in 300 mL) wurde mit einer frisch auf pH 6.8 eingestellten DHAP-Lösung **9** (20 mmol in 200 mL) vereinigt. Die Mischung wurde mit RhuA (100 U) bei Raumtemperatur unter Verfolgung des Umsatzes durch Dünnschichtchromatographie (2-Propanol/ges. Ammoniak Wasser 6:4:2) und enzymatischem Assay auf DHAP für 24 h inkubiert. Das Produkt wurde an einen Ionenaustauscher (Dowex AG1-X8, HCO<sub>3</sub><sup>-</sup>; 100 mL) gebunden und mit 200 mM Triethylammoniumbicarbonat-Puffer eluiert. Nach Ionenaustausch mit Dowex AG50W-X8 (H<sup>+</sup>) und Neutralisieren mit Cyclohexylamin wurde das Produkt aus Ethanol (90%) als Bis(cyclohexylammonium)-α-D-sorbose-1-phosphat **18** farblos kristallisiert; Ausbeute 7.71 g (84%); Fp = 158 °C; [α]<sub>D</sub><sup>20</sup> = + 8.0 (H<sub>2</sub>O, c = 1); <sup>1</sup>H-NMR (400.1 MHz, D<sub>2</sub>O, TSPNa, pH 7.0) δ = 3.56 (d, 3-H), 3.62–3.76 (m, 4-, 5-, 6-H), 3.78 (dd, 1-H<sub>A</sub>), 3.87 (dd, 1-H<sub>B</sub>); <sup>13</sup>C-NMR (100.6 MHz, D<sub>2</sub>O, CH<sub>3</sub>CN, pH 7.0) δ = 62.2 (C-6), 66.5 (C-1, J<sub>C-P</sub> = 3.7 Hz), 70.0 (C-5), 71.2 (C-4), 74.0 (C-3), 98.1 (C-2, J<sub>C-P</sub> = 7.3 Hz).

Eingegangen am 12. Dezember 1990,  
veränderte Fassung am 13. Februar 1991 [Z 4322/4323]

CAS-Registry-Nummern:

1, 141-46-8; 2, 3913-64-2; 3, 453-17-8; 4, 497-09-6; 5, 2134-29-4; 6, 50-00-0; 7, 75-07-0; 8, 123-38-6; 9, 123-72-8; 10, 78-84-2; 11, 6367-37-9; 12, 692-29-5; 13, 1121-60-4; 14, 2547-08-2; 15, 7721-50-8; 16, 444-09-7; 17, 92418-41-2; 18, 2650-47-7; 19, 92418-40-1; 20, 19456-80-5; 21, 133007-25-7; 22, 132959-24-1; 23, 132959-25-2; 24, 2547-10-6; 25, 89195-02-8; 26, 133007-26-8; 27, 132959-26-3; 28, 132959-27-4; 29, 132959-28-5; 30, 132959-29-6; 31, 132959-30-9; 32, 132959-31-0; 33, 132959-32-1; 34, 132959-33-2; 35, 132959-34-3; 36, 132959-35-4; 37, 132959-36-5; 38, 132959-37-6; DHAP, 57-04-5; L-Rhamulose-1-phosphat-Aldolase, 9054-58-4; L-Fucose-1-phosphat-Aldolase, 9024-54-8.

- [1] a) G. M. Whitesides, C.-H. Wong, *Angew. Chem.* 97 (1985) 617–720; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* 25 (1985) 617–638; b) E. J. Toone, E. S. Simon, M. D. Bednarski, G. M. Whitesides, *Tetrahedron* 45 (1989) 5365–5422.
- [2] a) M. D. Bednarski, E. S. Simon, N. Bischofberger, W.-D. Fessner, M.-J. Kim, W. Lees, T. Saito, H. Waldmann, G. M. Whitesides, *J. Am. Chem. Soc.* 111 (1989) 627–635; b) J. R. Durrwachter, D. G. Drueckhammer, K. Nozaki, H. M. Sweers, C.-H. Wong, *ibid.* 108 (1986) 7812–7818; c) C. H. von der Osten, A. J. Sinskey, C. F. Barbas, R. L. Pederson, Y.-F. Wang, C.-H. Wong, *ibid.* 11 (1989) 3924–3927; d) A. Straub, F. Effenberger, P. Fischer, *J. Org. Chem.* 55 (1990) 3926–3932; e) M. Schultz, H. Waldmann, H. Kunz, W. Vogt, *Liebigs Ann. Chem.* 1990, 1019–1024; f) H. P. Brokamp, M. R. Kula, *Tetrahedron Lett.* 31 (1990) 7123–7126.
- [3] J. Badia, L. Baldomá, J. Aguilar, A. Boronat, *FEMS Microbiol. Lett.* 65 (1989) 253–258.
- [4] 1 Unit katalysiert die Spaltung von 1 μmol L-Ketose-1-phosphat pro Minute bei 25 °C; photometrisch anhand der NADH-Oxidation in einem gekoppelten Assay mit der Glycerophosphatdehydrogenase bestimmt.
- [5] Ausgehend von der N-terminalen Aminosäuresequenz (E. Schiltz, W.-D. Fessner, unveröffentlichte Ergebnisse) konnte der zugehörige Leserahmen und die DNA-Anfangssequenz für das RhuA-Enzym identifiziert werden (J. Aguilar et al., unveröffentlichte Ergebnisse). Mit dieser Information gelang die Konstruktion eines *tac*-Promotor-kontrollierten Überexpressionssystems ähnlich dem für die FucA beschriebenen (G. Sinerius, W.-D. Fessner, unveröffentlichte Ergebnisse).
- [6] Y.-M. Chen, Z. Lu, E. C. C. Lin, *J. Bacteriol.* 171 (1989) 6097–6105.
- [7] K. Proba, *Dissertation*, Universität Freiburg, in Vorbereitung. Die Richtigkeit der Sequenz des *fucA*-Inserts wurde durch vollständige Dideoxy-Sequenzierung gesichert; M. Dreyer, *Diplomarbeit*, Universität Freiburg 1991.

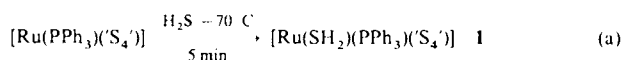
- [8] Überexpression der FucA und Substratassays für eine begrenzte Anzahl an Aldehyden mit ungereinigtem Enzym wurden kürzlich berichtet: A. Ozaki, E. J. Toone, C. H. von der Osten, A. J. Sinskey, G. M. Whitesides, *J. Am. Chem. Soc.* 112 (1990) 4970–4971.
- [9] DHAP wurde auf chemischem Weg in Abwandlung des Literaturverfahrens (F. Effenberger, A. Straub, *Tetrahedron Lett.* 28 (1987) 1641–1644) über die entsprechenden Methylacetale hergestellt. Dadurch wird ein Produkt von ≥ 95% Reinheitsgrad erreicht bei ≤ 5% anorganischem Phosphat (anstatt 80% Reinheit, 20% P<sub>i</sub>). G. Sinerius, A. Schneider, *Diplomarbeit*, Universität Freiburg 1990.
- [10] Alle Produkte sind durch ihre Spektren charakterisiert (<sup>1</sup>H-, <sup>13</sup>C-NMR, IR). Für die kristallinen Verbindungen wurden befriedigende Analysenwerte erhalten (C, H, P).
- [11] Erhalten durch enzymatische Phosphorylierung entsprechender Ketozucker. A. Schneider, J. Badia, W.-D. Fessner, unveröffentlichte Ergebnisse.
- [12] J. Badia, R. Gimenez, L. Baldomá, E. Barnes, W.-D. Fessner, J. Aguilar, *J. Bacteriol.*, im Druck.
- [13] D. J. Hupe in M. I. Page, A. Williams (Hrsg.): *Enzyme Mechanisms*, The Royal Society of Chemistry, London 1987, S. 324–332.
- [14] Eine Synthese von Aldosen aus Dialdehydderivaten, unter Strukturveränderung und formaler „Inversion“ stereochemischer Symbole, wurde ebenfalls vorgeschlagen: C. W. Borysenko, A. Spaltenstein, J. A. Straub, G. M. Whitesides, *J. Am. Chem. Soc.* 111 (1989) 9275–9276.

## Nachweis starker S–H···S-Brücken in [Ru(SH<sub>2</sub>)(PPh<sub>3</sub>)('S<sub>4</sub>')] · THF, dem ersten röntgenographisch charakterisierten H<sub>2</sub>S-Komplex\*\*

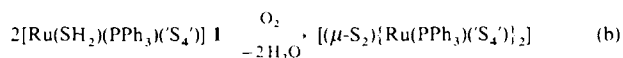
Von Dieter Sellmann\*, Peter Lechner, Falk Knoch und Matthias Moll

Die Wechselwirkung von H<sub>2</sub>S, HS<sup>−</sup> sowie S<sup>2−</sup> mit Übergangsmetallen ist der Primärschritt bei der Bildung von Enzymen wie Ferredoxinen oder Nitrogenasen. Hier wie auch bei der Metallenzym-katalysierten SO<sub>4</sub><sup>2−</sup>/H<sub>2</sub>S-Umwandlung im biologischen Schwefelkreislauf werden H<sub>2</sub>S-Komplexe als Intermediate angenommen. Solche Komplexe konnten jedoch wegen ihrer großen Reaktivität<sup>[1, 2a]</sup> bisher nur in Ausnahmefällen nachgewiesen<sup>[2b, f, g]</sup> oder isoliert<sup>[2a–e]</sup>, aber noch nie röntgenstrukturanalytisch charakterisiert werden. Dadurch unterscheiden sie sich von den zahlreichen, gut charakterisierten H<sub>2</sub>O-Komplexen.

Es ist uns nun gelungen, den einkernigen H<sub>2</sub>S-Komplex [Ru(SH<sub>2</sub>)(PPh<sub>3</sub>)('S<sub>4</sub>')] **1** aus [Ru(PPh<sub>3</sub>)('S<sub>4</sub>')]<sup>[3]</sup> zu erhalten



[Gl. (a)], der auch röntgenstrukturanalytisch charakterisiert werden konnte (Abb. 1a)<sup>[4]</sup>. **1** fällt beim Umkristallisieren aus H<sub>2</sub>S-gesättigtem THF als 1 · THF in gelborangen Kristallen an und ist im Massenspektrometer unzersetzt ionisierbar. Im Gegensatz zum außerordentlich labilen, solvatfreien **1** ist 1 · THF bei 25 °C stabil und spaltet erst im Vakuum langsam H<sub>2</sub>S ab. Beide Verbindungen werden durch O<sub>2</sub> rasch zum türkisfarbenen [(μ-S<sub>2</sub>)<sub>2</sub>{Ru(PPh<sub>3</sub>)('S<sub>4</sub>')<sub>2</sub>}]<sub>2</sub> oxidiert<sup>[5]</sup> [Gl. (b)].



[\*] Prof. Dr. D. Sellmann, Dipl.-Chem. P. Lechner, Dr. F. Knoch, Dr. M. Moll  
Institut für Anorganische Chemie II der Universität Erlangen-Nürnberg  
Egerlandstraße 1, W-8520 Erlangen

[\*\*] ('S<sub>4</sub>')<sup>2+</sup> = 2,2'-(Ethylendithio)bis(thiophenolat). Übergangsmetallkomplexe mit Schwefelliganden, 64. Mitteilung. Diese Arbeit wurde von der Deutschen Forschungsgemeinschaft, dem Fonds der Chemischen Industrie und der Degussa AG, Hanau, durch eine Spende RuCl<sub>3</sub> · x H<sub>2</sub>O gefördert. 63. Mitteilung: D. Sellmann, M. Geck, F. Knoch, M. Moll, *Inorg. Chim. Acta*, im Druck.