

Wechselwirkungen und Reaktionen von Organometallverbindungen mit Enzymen und Proteinen

Von Alexander D. Ryabov *

Die meisten Metallorganiker haben nur wenig aktuelle Kenntnisse in Biochemie. Ebenso glauben die meisten Biochemiker, daß die Organometallchemie weit von den Problemen entfernt ist, die sie bearbeiten. Der tatsächliche Abstand zwischen diesen zwei Grundpfeilern der modernen Chemie wird aber, wenn überhaupt vorhanden, immer kleiner. Die „Auswüchse“ dieser beiden, früher unabhängigen Disziplinen durchdringen sich und bilden ein neues Fachgebiet, die metallorganische Biochemie, deren Grundlagen hier diskutiert werden sollen. So wird die Anwendung von Biokatalysatoren für selektive Umwandlungen von Organometallverbindungen beschrieben. Ferner wird auf Systeme eingegangen, in denen redoxaktive Organometallverbindungen als Substrate in Oxidase- und Peroxidasereaktionen fungieren, und schließlich werden Enzyme behandelt, die die zunehmenden Mengen von Organometallverbindungen, insbesondere Organoquecksilberverbindungen, in der Biosphäre abbauen. Diese Enzyme sind einzigartig, da sie die Metall-Kohlenstoff-Bindung, das Kernstück von Organometallverbindungen, katalytisch spalten können.

1. Einleitung

Dieser Aufsatz wird nicht von Vitamin B₁₂, einem natürlich vorkommenden Molekül mit Cobalt-Kohlenstoff-Bindung^[1], handeln, das lange Zeit die einzige Brücke zwischen der Organometallchemie und der Biochemie war. Ziel dieser Übersicht ist es, den Leser davon zu überzeugen, daß wir gegenwärtig mit den Anfängen eines neuen Wissenschaftszweigs, der metallorganischen Biochemie, konfrontiert werden. Dieses Fachgebiet konzentriert sich nicht länger auf die Chemie des Vitamins B₁₂ und dessen zahlreiche Modellsysteme^[2-7], sondern dehnt sich auf viele Organometallverbindungen aus, die von Enzymen oder Mikroorganismen umgewandelt werden können. Zur Zeit sind Biokatalysatoren noch nicht genügend ausgereift, um Organometallverbindungen direkt aus Metallen, Ionen, Komplexen oder organischen Molekülen herzustellen, sie können aber jetzt schon synthetische Organometallverbindungen modifizieren und in einigen Fällen Kohlenstoff-Metall-Bindungen selektiv spalten.

2. Selektive Umwandlungen von Organometallverbindungen durch Biokatalysatoren

2.1. Allgemeines

Für den Einsatz von Biokatalysatoren auch in der Synthese von Organometallverbindungen sprechen die Erfolge bei der Anwendung von Enzymen^[8-13] und Mikroorganismen^[14] in der organischen Synthese. Biokatalysatoren können sowohl in wässrigen Lösungsmittel-Gemischen, als auch in reinen organischen Lösungsmitteln eingesetzt werden^[15-19]; die spezifische katalytische Aktivität von Enzymen bleibt in inversen Micellen^[20] erhalten oder wird sogar gesteigert. Viele organische Synthesen, die unter Verwendung von Bio-

katalysatoren durchgeführt wurden, haben gezeigt, daß Enzyme eine wesentlich breitere Substratspezifität aufweisen als früher angenommen wurde^[11]. Man hat deshalb vermutet, daß Enzyme auch Organometallverbindungen als Substrat akzeptieren würden. Da Organometallverbindungen aber meist nicht wasserlöslich sind, lag es nahe, sie in nichtwässrigen Medien zu testen. Dieses Forschungsgebiet ist eine Herausforderung für Chemiker und Biochemiker. Die katalytische Aktivität und Spezifität eines Enzyms kann durch Variation seiner Umgebung, zum Beispiel des Innern inverser Micellen^[21], und vermutlich auch durch die Veränderung der Zusammensetzung des organischen Mediums eingestellt werden. Es gibt also die Möglichkeit, die Enzymspezifität an ein spezielles Organometallsubstrat anzupassen.

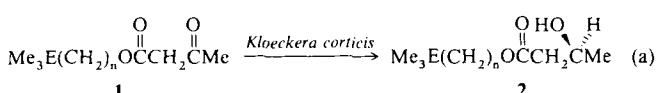
2.2 Umsetzungen von Silicium- und Germaniumverbindungen

Die Biosynthese von Organometallverbindungen hat noch nicht den Stand erreicht, der eine detaillierte kritische Untersuchung ermöglicht; man unterscheidet aber zwei Ansätze: Der erste beschäftigt sich vor allem mit Metallocenen, insbesondere mit Ferrocenverbindungen. Wie wir in Abschnitt 2.3 sehen werden, sind die Ferrocenderivate zweifellos die am ehesten als „biologisch“ zu bezeichnenden Substanzen innerhalb der Vielzahl von Organometallverbindungen. Der zweite, von der Arbeitsgruppe von Tacke entwickelte Ansatz mag auf den ersten Blick trivial erscheinen, ist jedoch ein ausgewogenes, wohl durchdachtes und nützliches Konzept. Die Idee erscheint einfach: da die Synthese vieler organischer Verbindungen, die nicht unbedingt natürlichen Ursprungs sein müssen, mit Enzymen enantioselektiv ablaufen, warum sollten diese Enzyme nicht auch Substanzen umwandeln, in denen Kohlenstoffatome durch Siliciumatome ersetzt sind? Und tatsächlich akzeptieren Enzyme von Mikroorganismen diese Derivate! Wenn die Umwandlung mit Si-haltigen Substanzen funktioniert, warum nicht auch die von Ge-haltigen? Auch diese werden akzeptiert! Es ist hervorzuheben, daß die Vorteile dieses scheinbar einfachen Ansatzes außerordentlich hoch einzuschätzen sind, da optisch aktive Organosili-

[*] Prof. A. D. Ryabov
Abteilung Chemie
G.-V.-Plekhanov-Institut für Nationalökonomie
Stremyann per., 28, 113054 Moskau (UdSSR)

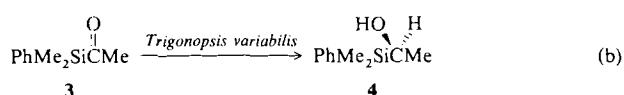
ciumverbindungen als vielversprechende Pharmaka^[22–24] bereits klinisch angewendet werden. Organogermaniumverbindungen sind noch vielversprechender, da sie schon heute als mögliche Alternative zu Platinkomplexen in der Krebstherapie gelten^[22, 25, 26].

Der erste Bericht von Tacke et al.^[27] behandelte die mikrobielle enantioselektive Reduktion von Acetessigsäuretriamethylsilylalkylester **1b,d** sowie deren Kohlenstoffanaloga **1a,c** zu den entsprechenden (+)-(*S*)-3-Hydroxybutansäureestern **2** in Anwesenheit von *Kloeckera corticis* (ATCC 20109) [Gl. (a)]. Die Enantiomerenreinheit beträgt 80% für **2a,b,d** und 65% für **2c**. Es ist bemerkenswert, daß die Substitution von Kohlenstoff- durch Siliciumatome die Enantiomerenreinheit der Reaktionsprodukte erhöht.



a: E = C, n = 1; b: E = Si, n = 1; c: E = C, n = 2; d: E = Si, n = 2

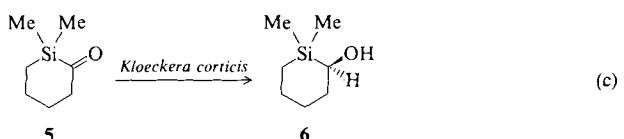
Trigonopsis variabilis (DSM 70714) ist von hunderten getesteten Hefen am besten für die enantioselektive Reduktion von Acetyltrimethylphenylsilan **3** zu (*R*)-(1-Hydroxyethyl)-dimethylphenylsilan **4** geeignet [Gl. (b)]. Mit *Trigonopsis variabilis* wurden die besten Ergebnisse bezüglich Reaktionsgeschwindigkeit, Isolierung und Reinheit des Produkts **4** in bezug auf die Bildung biogener Nebenprodukt erzielt^[28].



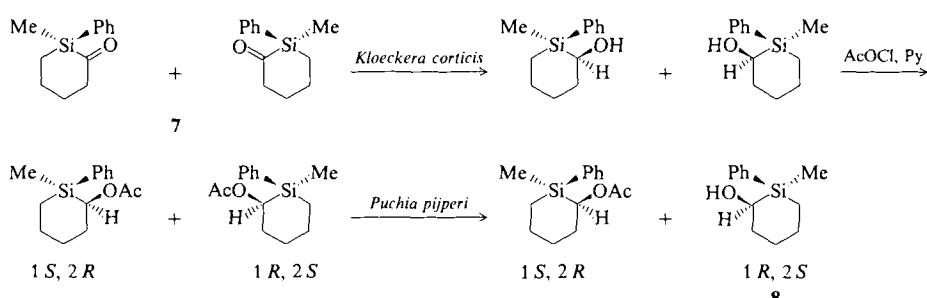
Unter Verwendung ruhender Zellen bei optimalen Bedingungen (37 °C, pH 6–8, 0.25 g L⁻¹ von **3**) wurden 70% **4** mit einer Enantiomerenreinheit von 86% isoliert. Vorversuche

haben gezeigt, daß auch Acetyltrimethylphenylgerman von *Trigonopsis variabilis* als Substrat akzeptiert wird und als Produkt der Reduktion das Enantiomer mit der (*R*)-Konfiguration liefert. Überraschenderweise nimmt die Aktivität der Hefe in der Reihenfolge Silicium- > Germanium- > Kohlenstoffverbindung (21:12:1) ab. Auch die enantioselektive mikrobielle Reduktion von RR'R''SiC(O)Me (R = Me, R' = Ph, R'' = Me₃C, Me₃Si) zu den entsprechenden Alkoholen kann in Gegenwart von *Trigonopsis variabilis* durchgeführt werden^[29].

Silacyclohexanone werden ebenfalls enantioselektiv reduziert. Wachsende Zellen der Hefe *Kloeckera corticis* reduzieren 1,1-Dimethyl-1-silacyclohexan-2-on **5** zum Alkohol **6** in 60% Ausbeute (92% ee). Umkristallisieren aus *n*-Hexan steigert die optische Reinheit auf 99% ee^[30]. Ein ähnlicher



Weg zum optisch aktiven (1*R*,2*S*)-1-Methyl-1-phenyl-1-silacyclohexan-2-ol^[31] geht von racemischem 1-Methyl-1-phenyl-1-silacyclohexan-2-on **7** aus und liefert die diastereomerenreine Substanz in zwei Biotransformationsstufen und einem chemischen Reaktionsschritt (Schema 1). Durch diastereoselektive Reduktion von **7** mit *Kloeckera corticis* entsteht eine racemische Mischung von (1*S*,2*R*)- und (1*R*,2*S*)-1-Methyl-1-phenyl-1-silacyclohexan-2-ol in 97% Ausbeute und einem Diastereomerenüberschuß von ca. 90%. Die quantitative Veresterung der Mischung mit Acetylchlorid in Pyridin ergibt das Racemat der entsprechenden Acetate. Die Acetate wurden anschließend in einer hoch enantioselektiven Hydrolyse mit *Puchia piperi* (ATCC 20127) zum optisch aktiven Alkohol **8** mit *R*-Konfiguration am Siliciumatom und *S*-Konfiguration am Kohlenstoffatom umgesetzt. Nach der chromatographischen



Schema 1. Zwei Biotransformations- und ein chemischer Reaktionsschritt liefern diastereomerenrein **8**.



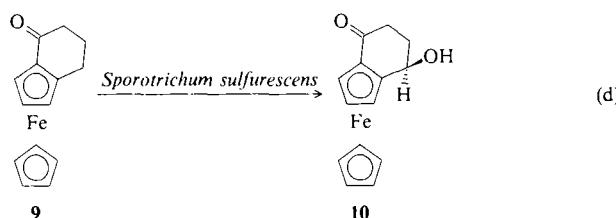
Alexander D. Ryabov wurde 1953 in Moskau geboren. Er studierte an der Moskauer Staatsuniversität und schloß 1976 sein Studium ab. 1979 beendete er seine Promotion, 1987 seine Habilitation. Seit 1989 ist er Professor für Chemie am G.-V.-Plekhanov-Institut für Nationalökonomie. Seine derzeitigen Forschungsinteressen sind Enzyme und Organometallchemie.

Trennung vom nicht umgesetzten (*1S,2R*)-Acetat an Silicagel wurde das gewünschte Produkt in sehr reiner Form (*ee* > 96%) isoliert.

Man darf annehmen, daß auch Organometallverbindungen mit tetraedrisch koordinierten Metallzentren diese Biotransformationen eingehen. Zweifellos werden solche Untersuchungen durch den enormen Bedarf an neuen Wirkstoffen angeregt.

2.3. Ferrocen- und Cymantren-Derivatisierungen

Die Geschichte der Ferrocen-Biotransformationen begann vermutlich 1971, als *Johnson* und *Murray* über die mikrobielle Hydroxylierung von 1,2-(α -Oxotetramethylen)-ferrocen **9** zum Hydroxyketon **10** mit dem Schimmelpilz *Sporotrichum sulfurescens* (ATCC 7169) berichteten^[32]. Die besten Ergebnisse wurden mit niedrigen Substratkonzentrationen erzielt. **10** ist optisch aktiv und *exo*-konfiguriert, ein Hinweis auf eine enzymatische Oxidation [Gl. (d)].



Ratajczak und *Misterkiewicz*^[33] haben die asymmetrische Reduktion von Carbonylferrocenen detailliert untersucht und die Reduktion von Formylferrocen, Ferrocenyltrifluormethylketon **11** und [3]Ferrocenophan-1-on **12** mit Bäckerhefe in Gegenwart von D-Glucose beschrieben (Tabelle 1, Reaktion 1, 2, 5). Formylferrocen wird bei 33°C innerhalb von 20–40 min zu Hydroxymethylferrocen reduziert. Die prochiralen Moleküle **11** und **12** werden in 50% bzw. 10% Ausbeute zu (–)-1-Ferrocenyl-2,2,2-trifluorethanol und (–)-[3]Ferrocenophan-1-ol umgesetzt. Acetyl-, Propionyl-, Isobutyryl-, Benzoyl- und 1,1'-Diacetylferrocen werden dagegen ebensowenig wie **9** von Bäckerhefe reduziert. Das Reduktionsprodukt von **11** hatte zunächst einen spezifischen Drehwert von $[\alpha_D] = -6.4$ ^[33], der dann aber bei einer Ausbeute von 90.5% auf –27.7 optimiert wurde^[34]. Der Einsatz anderer Mikroorganismen erweitert die Substratspezifität der Reduktion. So wird Acetylferrocen (Reaktion 3), das gegenüber Bäckerhefe resistent ist, von anderen Mikroorganismen wie *Candida tropicalis* (IFO 199), *Pichia quercuum* (IFO 949) oder *Saccharomyces cerevisiae* (IFO 305) zum korrespondierenden S-Alkohol reduziert. Die Ausbeute ist zwar gering, dafür verläuft die Reduktion jedoch unter Bildung eines hohen Enantiomerenüberschusses (96% *ee*). Weitere Beispiele mikrobieller oder enzymatischer Redoxreaktionen, die sich auf die Umwandlung der Gruppen $-\text{CO}- \rightleftharpoons -\text{CH}(\text{OH})-$ beziehen, sind in Tabelle 1 zusammengefaßt. Die Reaktionen 6 und 7 bedürfen näherer Erklärung: 1,2-Bis(hydroxymethyl)ferrocen **13** wurde mit Pferdeleber-Alkohol-Dehydrogenase (HLADH) in Gegenwart von NAD⁺ (und Glutamat-Dehydrogenase (30°C, pH 8.3) für die Cofaktor-Regenerierung) oxidiert^[36]. Das Produkt hatte

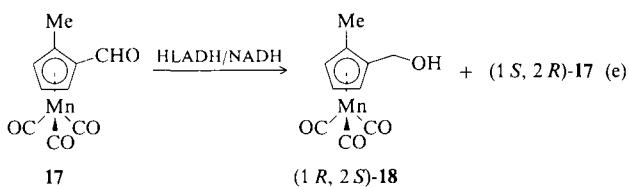
Tabelle 1. Enzymkatalysierte Redoxreaktionen von Ferrocenderivaten Fc-R.

Reaktion	Ausgangsverbindung	Produkt	Mikroorganismus oder Enzym	Ausbeute [%] (<i>ee</i> [%])	Lit.
1	Fc-CHO	Fc-CH ₂ OH	Bäckerhefe	100	[33]
2	Fc-COCF ₃ 11		Bäckerhefe	50 90.5	[33] [34]
3	Fe-COCH ₃		<i>Candida tropicalis</i> <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	7 (96)	[35]
4	Fc-COD		Bäckerhefe	90.8	[38]
5			Bäckerhefe	10	[33]
6			HLADH, NAD ⁺	81 (86)	[36]
7			HLADH, NADH	80(94)	[36]
8			HLADH, NAD ⁺ , FMN	44(100)	[37]

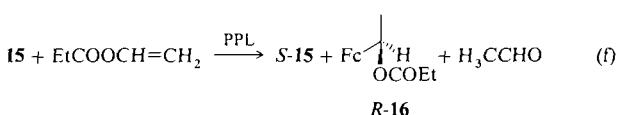
bis auf das Vorzeichen des spezifischen Drehwerts die gleichen Eigenschaften wie das Material, das durch HLADH-katalysierte Reduktion von 1,2-Diformylferrocen **14** in Gegenwart von Ethanol und NADH (5°C, pH 7) entsteht. Die Tatsache, daß HLADH das *meso*-Diol **13** zum (1*R*,2*S*)-Monoaldehyd oxidiert und den *meso*-Dialdehyd **14** zum (1*S*,2*R*)-Enantiomer reduziert, deutet darauf hin, daß HLADH sowohl bei Oxidations- als auch bei Reduktionsreaktionen *meso*-Verbindungen enantiotop unterscheidet. Ein solches Phänomen konnte, trotz der großen Zahl HLADH-katalysierter asymmetrischer Synthesen, die mit *meso*-Diolen und Diketonen durchgeführt wurden, bisher noch nicht beobachtet werden^[36]. Die metallorganischen Substrate **13** und **14** machen einige Merkmale der HLADH-Katalyse sichtbar, die im Fall der reinen Kohlenstoffsubstrate nicht zu erkennen sind. Reaktion 8 ist ein Beispiel für die kinetische Racematspaltung eines Alkohols. Die entsprechenden Ruthenocen- und Osmocenderivate verhalten sich ähnlich^[37].

Alkohol-Dehydrogenase wurde auch für die kinetische Racematspaltung chiraler Cymantrenaldehyde verwendet. (±)-Tricarbonyl(η^5 -1-formyl-2-methylcyclopentadienyl)-mangan **17** wurde mit HLADH und NADH bei 4°C und pH 7 enantioselektiv reduziert. Dabei erhielt man zusammen

mit nicht umgesetztem (*1S,2R*)-**17** (31 %) den (*1R,2S*)-Alkohol **18** in 35 % Ausbeute [Gl. (e)]. Das (*1R,2S*)-Enantiomer der Verbindung **17** ist durch Oxidation von (*1R,2S*)-**18** mit Mangandioxid leicht zugänglich^[37].

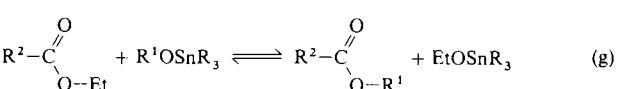


Lipasen sind eine weitere Gruppe von Enzymen, die die Ferrocen-Struktur leicht akzeptieren. So wurde über die Reaktion von racemischem 1-Hydroxyethylferrocen **15** (siehe Tabelle 1) mit Vinylpropionat in Toluol, katalysiert durch die Schweinepankreas-Lipase (PPL), zum *R*-Enantiomer **16** berichtet [Gl. (f)]. Durch die Wahl eines Acylierungsreagens, das ein flüchtiges Beiprodukt (Acetaldehyd) bildet, wurde ein irreversibler Reaktionsverlauf erzwungen^[39]. Die Enantiomerenreinheit für auf diese Weise synthetisiertes *S*-**15** und *R*-**16** beträgt jeweils 84 %. Ähnliche Umwandlungen wurden mit Lipasen von *Pseudomonas fluorescens* in *tert*-Butylalkohol unter Verwendung von $\text{MeCOOCH}=\text{CH}_2$ als Acylierungsreagens durchgeführt^[40].



2.4. Weitere Beispiele

Therisod^[41] beschrieb kürzlich die Lipase-katalysierte Umesterung mit *O*-Stannylethern in Benzol oder Cyclohexan [Gl. (g)]. Lipasen aus Schweinepankreas (PPL), *Chromobacterium viscosum* und *Candida cylindracea* wurden getestet. Nur die Lipasen aus *Candida cylindracea* verhielten sich indifferent gegenüber den Organometallsubstraten. Die höchste Geschwindigkeit der PPL-katalysierten Reaktionen wurde bei der Umsetzung von Ethylbutanoat mit $\text{Me}(\text{CH}_2)_5\text{OSnBu}_3$ erzielt. Interessanterweise sind Stannylether dabei wesentlich reaktiver als die entsprechenden Alkohole.

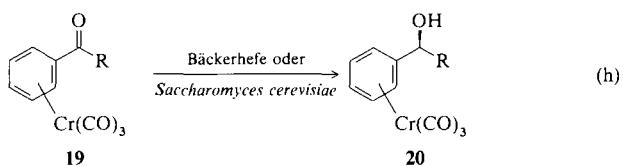


R = Me, nBu; R¹ = n-C₆H₅, Cyclohexyl; R²CO = Acetyl, n-Butyryl, Capryloyl, Lauryl.

Tricarbonylchrom, ein starkes Elektronenlieferndes Fragment, das durch Komplexbildung die Reaktivität von Arenen stark beeinflussen kann, wird von Organikern häufig verwendet^[42]. Es stellt sich nun die Frage, wie die Komplexbildung die Reaktivität von Arenen in Enzymreaktionen beeinflusst. Bei solch einer Komplexbildung mit asymmetrisch 1,2-disubstituierten Arenen sollte ein Enantiomerenpaar ent-

stehen; mit Enzymen oder Mikroorganismen sollte sich dann selektiv ein Enantiomer umsetzen lassen.

(η^6 -Acetophenon)tricarbonylchrom **19a** wird von Bäckerhefe^[43] oder *Saccharomyces cerevisiae*^[35] in Gegenwart von D-Glucose mit 96 % (99 % ee) bzw. 94 % (74 % ee) Ausbeute in (*S*)-(η^6 -1-Phenylethanol)tricarbonylchrom **20a** umgewandelt [Gl. (h)]. Reduziert man nicht komplexiertes Acetophenon unter den gleichen Bedingungen, beträgt die Ausbeute dagegen nur 69 % (92 % ee)^[43]. Mit dem wenig sperrigeren Komplex **19b** verlief die Reduktion sehr langsam, wobei innerhalb von zwei Wochen nur 20 % **20b** gebildet wurden.



a: R = Me; b: R = Et.

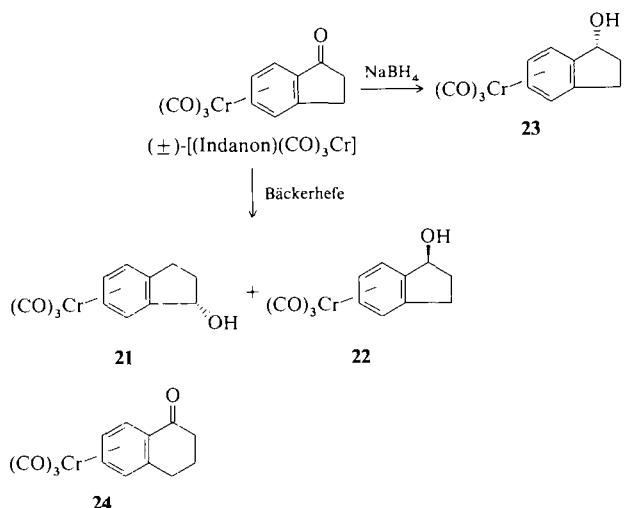
Dagegen wird freies Propiophenon innerhalb von sechs Tagen zu 50 % reduziert. In beiden Fällen beträgt der Enantiomerenüberschuß an (*S*)-Alkohol 87 %. Substituiert man einen CO-Ligand von **19a** durch PPh_3 , erfolgt ebenfalls keine Reduktion. Sperrige Substituenten in diesem Teil des Moleküls beeinflussen den Reaktionsverlauf also erheblich. Zwei Erklärungen für den Einfluß sperriger Gruppen sind möglich: Es könnte die räumliche Struktur des aktiven Zentrums des Enzyms und das Volumen des Organometallsubstrats nicht mehr übereinstimmen. Es ändert sich aber auch die Fähigkeit hydrophober Organometallsubstrate, Zellmembranen zu durchdringen, wenn ihr Volumen und ihre Hydrophobie verändert werden. Es ist schwer zu entscheiden, welcher Effekt überwiegt, solange noch nicht genügend Ergebnisse von Untersuchungen an unterschiedlichen Enzymen vorliegen.

Die Reduktion folgt im allgemeinen der sogenannten Prelog-Regel, die in Gleichung (i) wiedergegeben ist (Ellipse = großer Substituent, Kreis = kleiner Substituent)^[43]. Komplexe Substrate liefern erwartungsgemäß mehrere Produkte. Zum Beispiel entstehen bei der Reduktion von (\pm)-(η^6 -Indanon)tricarbonylchrom mit Bäckerhefe 47 % (55 % ee)



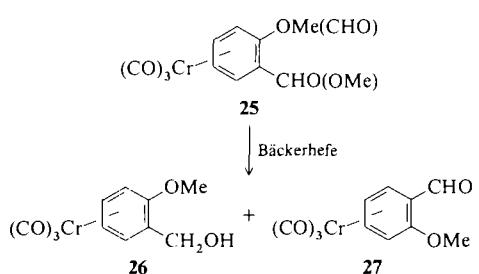
des (*-*)-(*S*)-endo-Alkohols **21** und 5 % (71 % ee) des (*-*)-(*S*)-exo-Alkohols **22**. Nicht umgesetzte Ausgangsverbindung wurde mit NaBH_4 chemisch zum (+)-(*R*)-endo-Alkohol **23** (48 %, 25 % ee) reduziert^[44] (Schema 2). Bei der Reduktion des ähnlichen Tetralonkomplexes **24** entsteht kein exo-Produkt. In Pufferlösung bei pH 7 wurde der (*1S*)-endo-Alkohol in 52 % Ausbeute (92 % ee) erhalten; in ungepuffertem Medium verringerte sich die optische Reinheit des Produkts auf 83 % ee.

Ein weiteres Beispiel für kinetische Racematspaltungen chiraler Organometallverbindungen mit Mikroorganismen ist die enantioselektive Reduktion von (\pm)-(η^6 -1-Formyl-2-methoxybenzol)tricarbonylchrom **25** mit Bäckerhefe (22 °C, H_2O). Sie liefert in Gegenwart von D-Glucose (+)-(*R*)-(η^6 -



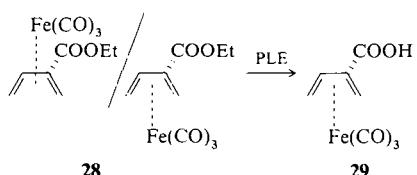
Schema 2. Reduktion von (\pm) - $\{[\eta^6\text{-Indanon}](\text{CO})_3\text{Cr}\}$ mit Bäckerhefe.

1-Hydroxymethyl-2-methoxybenzoltricarbonylchrom **26** (66% ee) neben unverändertem, optisch aktivem (+)-(1S)- $(\eta^6\text{-1-Formyl-2-methoxybenzol})$ tricarbonylchrom **27** (81% ee)^[45] (Schema 3). Eine verbesserte Racematspaltung von **25** wurde mit HLADH und NADH erreicht^[37]. Die optische Reinheit der Produkte beträgt dabei 100%.



Schema 3. Kinetische Racematspaltung durch enantioselektive Reduktion mit Bäckerhefe.

Schweineleber-Esterase^[46] (PLE) ist ein weiteres Enzym, das mit Erfolg für die Racematspaltung von Organometallverbindungen eingesetzt wird (Schema 4). Bei der PLE-kata-



Schema 4. Racematspaltung mit Schweineleber-Esterase (PLE).

lysierten Reaktion von racemischem 2-Ethoxycarbonyl-substituierten Butadieneisenkomplex **28** in wäßrigem Methanol (pH 7, Raumtemperatur, 30 h) wurde die Säure **29** in 40% Ausbeute erhalten. Der nicht hydrolysierte Ester wurde zurückgewonnen und zum Enantiomer von **29** mit LiOH hydrolysiert (38%). Für das enzymatische Hydrolyseprodukt **29** und für die aus dem nicht umgesetzten Ester erhaltenen Säure wurde ein Enantiomerenüberschuss von jeweils 85% gemessen. Die optische Reinheit beider Säuren erhöhte sich nach dem Umkristallisieren auf über 98% ee.

2.5. Organometallverbindungen für die NADH/NAD⁺-Regenerierung

Die Umwandlung von NAD⁺ in NADH erfordert die Übertragung von zwei Elektronen und einem Proton. Es ist offensichtlich nicht leicht, diesen Transfer konzertiert durchzuführen, aber ein schrittweiser Transfer sollte vermieden werden, weil dabei enzymatisch inaktives NAD⁺-Dimer entstehen kann^[47]. Die Regenerierung von NADH in Dehydrogenasereaktionen ist immer noch ein Problem, das einer Kosten senkung für Dehydrogenase-katalysierte asymmetrische Synthesen entgegensteht^[48]. Die Erkenntnis, daß der Transfer von zwei Elektronen und einem Proton einem Hydridtransfer entspricht, kann der Schlüssel zur Lösung dieses Problems sein. Das Hydrid wird in einem Schritt übertragen, und Übergangsmetallkomplexe sind zweifellos die besten Hydridüberträger^[49]. Ein solcher Transfer wurde zuerst von Steckhan et al. realisiert^[50]. Auf der Grundlage der Ergebnisse von Kölle und Grätzel^[51] demonstrierten sie, daß [Cp*(bpy)ClRh]Cl chemisch mit Formiat^[52, 53] oder elektrochemisch^[50] reduziert werden kann; dabei entsteht vermutlich der Hydridokomplex [Cp*(bpy)HRh]⁰, der wiederum NAD⁺ zu NADH reduzieren kann. Dadurch wurde die von D-Lactat-Dehydrogenase katalysierte elektrochemische Reduktion von Pyruvat zu D-Lactat mit einer Geschwindigkeit von 5 Cyclen pro Stunde ermöglicht^[50], wobei D-Lactat in 67% Ausbeute und einem Enantiomerenüberschuß von 93.5% erhalten wurde.

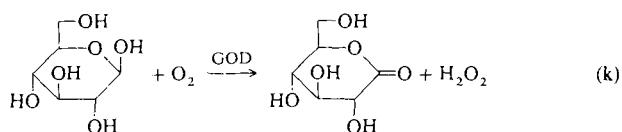
Dieser Ansatz eröffnet neue Perspektiven, betrachtet man das enorme Potential von Übergangsmetallkomplexen als Oxidations- oder Reduktionsmittel der jeweils korrespondierenden Nicotinamid-Cofaktoren. Solche Verbindungen müssen aber nicht notwendigerweise Organometallverbindungen sein. Da eine detaillierte Diskussion dieses Themas den Rahmen dieser Übersicht sprengen würde, können nur einige Beispiele vorgestellt werden. So wurde über die elektrochemische Regenerierung von NADH aus NAD⁺ mit einem Tris(2,2'-bipyridyl)-Komplex von Rhodium(III) berichtet^[54] und auch über die photochemische Reduktion von NAD(P)⁺ zu NAD(P)H^[55, 56]. Die umgekehrte Reaktion, also die Regenerierung von NAD⁺ und NAD(P)⁺, kann in Gegenwart von [Fe(L)₃]²⁺- und [Ru(L)₃]²⁺-Komplexen^[57, 58] durchgeführt werden, wobei L Liganden vom Typ 2,2'-Bipyridin- und 1,10-Phenanthrolin sind.

3. Reaktionen von Oxidasen und Peroxidasen in Gegenwart von Organometallverbindungen

Dieses zweifellos am weitesten entwickelte Gebiet der metallorganischen Biochemie erfuhr 1984 einen lebhaften Aufschwung, als Cass et al.^[59] über die äußerst vorteilhaften Vermittlereigenschaften von Ferrocenderivaten bei der Glucoseoxidase-katalysierten Oxidation von β -D-Glucose berichteten. Selbstverständlich sind noch viele andere Beispiele von Redoxprozessen bekannt^[60–62], an denen Proteine und Koordinations- oder Organometallverbindungen beteiligt sind. Keines dieser Beispiele ist für die vorliegende Diskussion jedoch so gut geeignet, wie die Ergebnisse der Arbeit von Cass et al.^[59], die die Entwicklung neuer amperometrischer Biosensoren initiiert und die intensive Forschung auf diesem Gebiet angeregt hat (siehe Abschnitt 3.1).

3.1. Ferrocene als Substrate von Oxidasen

Flavinadenindinucleotid(FAD)-abhängige Enzyme können die Oxidation unterschiedlicher Moleküle mit molekularem Sauerstoff katalysieren; es entstehen die entsprechenden Oxidationsprodukte und Wasserstoffperoxid [Gl. (j)]. So auch bei der Oxidation von β -D-Glucose mit Glucose-Oxidase (GOD)^[50] [Gl. (k)]. Es ist bemerkenswert, daß Ferrocenium-Ionen Substrate der GOD sind, wobei die ioni- schen Organometallverbindungen den molekularen Sauer-



stoff ersetzen. Die beste Methode zur Kontrolle des Katalyseverlaufs ist die Cyclovoltammetrie. Aus Abbildung 1 ist ersichtlich, daß im System Ferrocen-d-Glucose-GOD praktisch der Grenzstrom erreicht wird, während in Abwesenheit von D-Glucose oder GOD nur die für Ferrocen typische Kurve auftritt. Die Elektrokatalyse in Gegenwart des

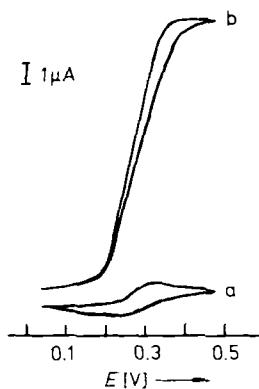
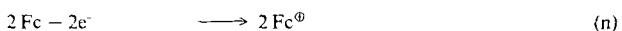
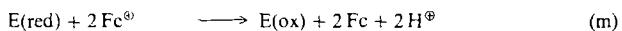
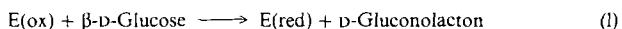


Abb. 1. Gleichstrom-Cyclovoltammogramm von Hydroxycarbonylferrocen (0.05 mM) a) bei pH 7, 25°C, in Gegenwart von D-Glucose (50 mM), Vorschubgeschwindigkeit 1 mVs^{-1} und b) unter den gleichen Bedingungen bei zusätzlicher Zugabe von GOD (10.9 μM) [59].

Organometall-Vermittlers kann mit den Gleichungen (l)–(n) erklärt werden^[59]. E(ox) und E(red) stehen für die



oxidierte bzw. reduzierte Form der GOD, Fc für Ferrocen- derivate. Tabelle 2 faßt Oxidasen mit ähnlicher Funktion wie GOD und Ferrocene R¹-Fc-R² zusammen sowie die aus elektrochemischen Daten berechneten Geschwindigkeitskonstanten für die Oxidation des reduzierten Enzyms. Die beiden ähnlichen Enzyme, Oxalat-Oxidase und Cholin-Oxidase, reagieren nicht mit Ferrocenen^[63]. Die relativ

hohen Werte der in Tabelle 2 aufgeführten Geschwindigkeitskonstanten zweiter Ordnung zeigen, daß Oxidasen bereitwillig Ferrocene akzeptieren und diese sich wie echte Substrate dieser Enzyme verhalten. Octacyanomolybdat(IV) und Octacyanowolframat(IV) werden von Lactat- und Sarcosin-Oxidase auf die gleiche Weise akzeptiert^[64]. Die Geschwin-

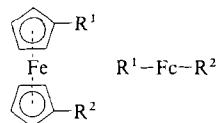


Tabelle 2. Oxidasen, die Ferrocenium-Ionen als Substrate akzeptieren und die zugehörigen Geschwindigkeitskonstanten k für die Oxidation der reduzierten Enzyme.

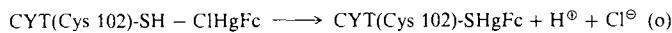
Enzym	Substrat	R ¹ -Fc-R ²	R ¹	R ²	$E_{\text{o}} [\text{mV}]$ vs. SCE	$10^{-5} k$ [$\text{M}^{-1} \text{s}^{-1}$]	Lit.
Glucose-Oxidase	D-Glucose	CH ₃	CH ₃		100	0.77	[59]
Glucose-Oxidase	D-Glucose	H	H		165	0.26	[59]
Glucose-Oxidase	D-Glucose	H ₂ C=CH	H		250	0.30	[59]
Glucose-Oxidase	D-Glucose	COOH	H		275	2.01	[59]
Glucose-Oxidase	D-Glucose	COOH	COOH		285	0.26	[59]
Glucose-Oxidase	D-Glucose	Me ₂ NCH ₂	H		400	5.25	[59]
Pyruvat-Oxidase	Pyruvat	COOH	H		275	0.2	[63]
Xanthin-Oxidase	Xanthin	COOH	H		275	4.0	[63]
Sarcosin-Oxidase	Sarcosin	COOH	H		275	0.1	[63]
Diaphorase	NADH	COOH	H		275	0.2	[63]
Glutathion-Reduktase	NAD(P)H	COOH	H		275	2.0	[63]
CO-Oxidase	CO	COOH	H		275	4.0	[63]
Flavocytochrom-b ₂	L-Lactat	COOH	H		275	67.0	[63]
Alkohol-Dehydrogenase	MeOH	COOH	H		275	2.0	[63]
L-Lysin-Oxidase	L-Lysin	COOH	H		275	[a]	[67]
L-Lysin-Oxidase	L-Lysin	Me ₂ NCH ₂	H		275	[a]	[67]

[a] nicht gemessen.

digkeitskonstanten für die Oxidation der mit $\text{W}(\text{CN})_8^{3\ominus}$ oder $\text{Mo}(\text{CN})_8^{3\ominus}$ reduzierten Enzyme sind beinahe so hoch wie die der Ferrocenium-Ionen [$(3 - 4) \times 10^4 \text{ M}^{-1} \text{s}^{-1}$]. Glucose-Oxidase und D-Aminosäureoxidase reagieren ähnlich mit dem Poly(vinylpyridin)-Komplex $[\text{OsL}_2\text{Cl}]^{\oplus/2\oplus}$ ($\text{L} = 2,2'$ -Bipyridyl)^[65, 66].

Das Prinzip der enzymatischen Verstärkung der elektrochemischen Antwort durch Organometall-Vermittler wurde bereits für viele amperometrische Biosensoren, u.a. auch für die D-Glucose-^[59] und die Kohlenmonoxid-Bestimmung^[68] angewendet. Die günstigen Perspektiven dieses Ansatzes für die Anwendung von Biosensoren^[69 – 71] regen weitere Untersuchungen auf dem Gebiet der metallorganischen Biochemie an. Obwohl Organometall-Vermittler sehr effektiv arbeiten, wird auch der Standpunkt vertreten, daß bioelektrokatalytische Systeme ohne Vermittler vorteilhafter seien^[72 – 77]. Deshalb versuchte man durch kovalente Bindung von Ferrocenen an Enzyme pseudo-vermittlerfreie Oxidase-Ferrocen-Systeme herzustellen^[78 – 80]. Die auf diese Weise mit $\text{Fc}(\text{CH}_2)_n\text{COOH}$ ($n = 0, 1$ und 3) unter Verwendung wasserlöslicher Carbodiimide modifizierte GOD ist anscheinend auch ohne zugesetzte Ferrocene elektrokatalytisch aktiv. Es liegt nahe, auf eine direkte elektrische Wechselwirkung zwischen der chemisch modifizierten GOD und den Elektroden zu schließen. Eine neuere Veröffentlichung^[81] berichtet jedoch über einen von Ferrocen-gebundenem Rinderserum-Albumin vermittelten Elektronentransport zwis-

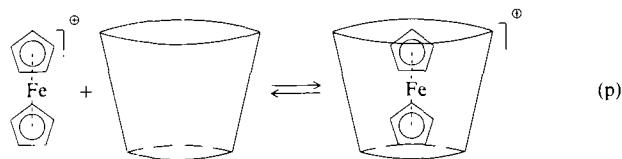
schen dem aktiven Zentrum des Enzyms GOD und einer Elektrode und deutet somit auf einen intermolekularen Mechanismus der Ferrocen-modifizierten GOD hin. Mit Organometallverbindungen modifizierte Oxidoreduktasen sind aber auf jeden Fall ein lohnendes Forschungsthema^[82]. Ein rein metallorganischer Ansatz, der sich auf Ferrocen-modifizierte Enzyme^[83] bezieht, basiert auf der hohen Reaktivität von Organoquecksilberverbindungen gegenüber freien Cysteinresten von Proteinen^[84]. Zum Beispiel führt die Reaktion von Ferrocenylquecksilberchlorid mit Cytochrom c (CYT) aus Bäckerhefe zu einer Bindung der Ferrocenylquecksilbergruppe an den Cys-102-Rest [Gl. (o)]. Das Produkt ist elektrochemisch aktiv, mit einem Maximum bei 450 mV gegenüber der Normalwasserstoffelektrode (NHE). Offenbar kann diese Methode auch auf Oxidoreduktasen angewendet werden, vorausgesetzt, die für die Katalyse wichtigen SH-Gruppen bleiben erhalten.



Während Flavoproteine eine Bindung mit oxidierten Ferrocenen eingehen, katalysiert Peroxidase die Oxidation von Ferrocenen mit Wasserstoffperoxid^[85]. Neben unverändertem Ferrocen waren FcCH_2OH , FcCHMeOH , FcCMe_2OH , FcCH_2COOH , FcB(OH)_2 und $\text{FcCH}_2\text{N}^\oplus\text{Me}_3\text{I}^\ominus$ an der Reaktion beteiligt. Diese Beobachtungen führten zur Konstruktion eines amperometrischen Biosensors für Wasserstoffperoxid, in dem Ferrocene zwischen einer Elektrode und dem aktiven Zentrum der Peroxidase^[86] oder der Cytochrome-c-Peroxidase hin und her transportiert werden^[87].

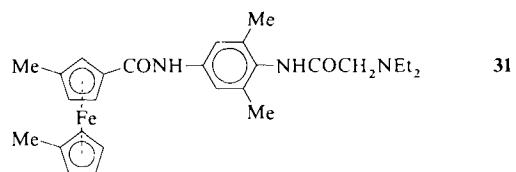
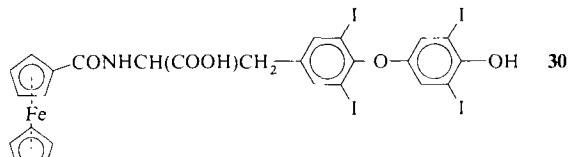
3.2. Ferrocene und Immunoassays

In wäßrigen Medien sind Ferrocene als hydrophobe Moleküle perfekte Gastmoleküle für Cyclodextrine^[88, 89]. Kürzlich wurde berichtet^[90], daß auch Ferrocenium-Ionen Einschlußverbindungen mit Cyclodextrinen bilden [Gl. (p)]. Die komplexierten Verbindungen stehen der Glucose-Oxidase nicht mehr als Substrat zur Verfügung und liefern im System Ferrocen-D-Glucose-GOD auch keinen katalytischen Strom mehr. Die Aufnahme von Ferrocenen in Hohlräume eines



Wirtmoleküls oder ihre Abschirmung durch Fragmente großer Moleküle kann also deren Vermittlereigenschaften stark beeinflussen. Dieser Effekt hat für einfache Sensoren auf Ferrocen-Basis offensichtliche Nachteile, da Wirtmoleküle die Oxidaseantwort stören. Für Immunoassays ist er jedoch sehr vorteilhaft: Angenommen ein Molekül, in dem ein Hapten kovalent an Ferrocen gebunden ist, verliert seine Affinität für die korrespondierenden Antikörper nicht, dann kann die Antigen-Antikörper-Reaktion zu einer Abschirmung des Organometallfragments führen. Das Konjugat könnte daher seine bioelektrokatalytische Aktivität verlieren. Wenn jetzt

freies Antigen dem System hinzugefügt wird, muß es das Konjugat verdrängen, da seine Affinität mindestens so hoch wie diejenige des Konjugats ist. Das freigesetzte Konjugat wird jetzt von Oxidasen als Substrat akzeptiert, und die Stromstärke wird als Funktion der Konzentration des zugegebenen Antigens zunehmen. Diese Methode wurde bereits für die Analyse von Thyroxin^[91, 92] und Lidocain^[93] angewendet, wobei die entsprechenden Konjugate **30** und **31** hergestellt wurden. Auch ein nahe verwandtes Verfahren zur Quantifizierung des humanen Choriongonadotropins ist bekannt^[94, 95]. Die Kopplung von Ferrocen-Konjugaten mit

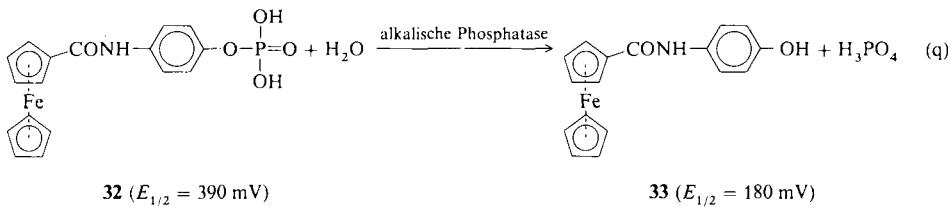


Oxidasen verhalf dem von Cais et al.^[96, 97] Ende der siebziger Jahren vorgeschlagenen Konzept des Metalloimmunoassays zum Durchbruch. Daraufhin wurden viele Ferrocen-, Cobaltocen- und Cymantenderivate von Östriol, Morphin, Barbituraten, Amphetamine und Cocain synthetisiert, jedoch konnte sich die Methode nicht allgemein durchsetzen, da man normalerweise die Atomabsorptionsspektroskopie als analytische Routinemethode verwendet.

Es ist hervorzuheben, daß selbst einfache Bindung von Ferrocen-Konjugaten an entsprechende Antikörper die elektrochemische Ansprechbarkeit einer Ferrocen-markierten Substanz vermindert. Dieser Zusammenhang wurde erstmals am Beispiel der mit Morphin konjugierten Ferrocencarbonsäure^[98] demonstriert. Der Effekt ist allerdings gering und entspricht nicht den Erfordernissen moderner Immunoassays^[99]. Nutzt man jedoch Oxidasen zur Verstärkung, so ist die Methode dann auch für Analysen geeignet.

Da sich das Redoxpotential funktionalisierter Ferrocene durch Variation in der Seitenkette verändert, können auch Proteasen für die Bioelektroanalyse genutzt werden. Verbindung **32** zum Beispiel, wurde für die Bestimmung alkalischer Phosphatase und Östriol hergestellt^[100]. In diesem Fall ist es entscheidend, daß **32**, ein Substrat der alkalischen Phosphatase, einen quasi-reversiblen Peak bei 390 mV hat. Produkt **33** zeigt zwei irreversible Peaks für die Phenol- und die Ferrocen-Oxidation bei 590 mV bzw. 180 mV versus Standardcalomelektrode (SCE). Bemerkenswerterweise wird das Produkt der enzymatischen Reaktion (**q**) bei 210 mV, in einem, verglichen mit der Ausgangsverbindung, kathodischen Bereich oxidiert.

Das Produkt läßt sich daher auch bei einem Substratüberschuß nachweisen und ermöglicht so die Bestimmung der alkalischen Phosphatase (bis zu Konzentrationen von 1.2×10^{-12} M). Das Verfahren eignet sich auch für enzymatische Immunoassays (ELISAs) mit alkalischer Phosphatase als Markerenzym. Es wurden drei Kriterien vorgeschlagen, um eine weitere Enzymverstärkung zu erreichen^[100]:



- Das Produkt muß ein geringeres Oxidationspotential als das Substrat haben.
- Die Differenz zwischen den Oxidationspotentialen muß 100–200 mV betragen.
- Die oxidierte Form des Produkts muß von Glucose-oxidierenden Enzymen als Substrat akzeptiert werden.

4. Rezeptoren für Organometallverbindungen

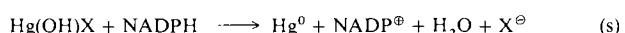
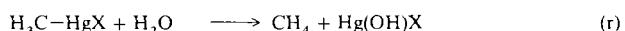
Bisher konnten noch keine spezifischen Rezeptoren für Organometallverbindungen nachgewiesen werden, aber Biomoleküle mit Organometallresten verlieren nicht ihre Fähigkeit, sich an Rezeptoren anzulagern. Dieses Verhalten wurde zur Ausarbeitung eines Verfahrens zur Bestimmung von Hormonrezeptoren mit FT-IR-Spektroskopie genutzt^[101]. Da die allgemeinen Prinzipien der Methode bereits in zwei Übersichten^[102, 103] zusammengefaßt wurden, soll hier nur kurz darauf hingewiesen werden, um die unerwarteten und interessanten Ergebnisse der metallorganischen Biochemie zu demonstrieren.

Die meisten Proteine haben ein „IR-Fenster“ bei etwa 2000 cm^{-1} , Metallcarbonyle dagegen absorbieren stark in diesem Bereich. Darüber hinaus können $[\text{Cr}(\text{CO})_3]$ -, $[\text{Cr}(\text{CO})_2\text{CS}]$ - oder ähnliche Fragmente an biologisch relevante Moleküle^[104–106], unter anderem auch an Östradiol-derivate^[101], gebunden werden. Die mit Organochromverbindungen markierten Steroide **34** sind in wäßrigem Methanol stabil. Ihre relative Affinität zum Östrogenrezeptor variiert im Bereich von 0.4–28 %, wobei der höchste Wert für $\text{R} = \text{HO}(\text{CH}_2)_3$ erzielt wird. Die in Tritium-markierter Form

Weg führt nicht nur zu neuen Pharmaka^[108], sondern auch zu geeigneten Substanzen für die Markierung von Rezeptoren.

5. Organometall-Lyasen

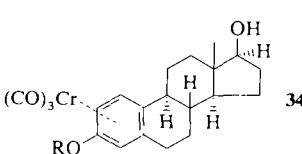
Die Schwermetallbelastung gehört zu den zivilisationsbedingten Umweltrisiken. Eine große Gefahr geht von den Organoquecksilber-Giften aus. Das gesamte Quecksilberreservoir in den Ozeanen wird auf 200 Millionen Tonnen geschätzt, das der flüchtigen Formen (Hg^0 , MeHgX) in der Atmosphäre auf etwa 4 Millionen Tonnen. Zwischen diesen Reservoiren werden jedes Jahr ca. 15 000 Tonnen ausgetauscht^[109]. In biologischen Systemen werden Quecksilbersalze mit Methyl-Coenzym B₁₂ zu Methylquecksilbersalzen methyliert, und diese Organoquecksilberverbindungen wirken beim Menschen stark neurotoxisch. Um zu überleben muß die Natur einen Mechanismus entwickeln, der das Eindringen von Organometallverbindungen in Organismen verhindert^[110]. Bakterien bedienen sich einer Entgiftungsstrategie, die auf einer zweistufigen enzymatischen Umwandlung von Organoquecksilerverbindungen zum nicht toxischen, flüchtigen, elementaren Quecksilber^[111–115] beruht. Das erste Enzym, die Organoquecksilber-Lyase^[116, 117], katalysiert die protolytische Spaltung der Kohlenstoff-Quecksilber-Bindung [Gl. (r)]. Das zweite Enzym, Quecksilber-Ionen-Reduktase^[118–124], reduziert Hg^{II} in einer NADPH-abhängigen Reaktion zu Hg^0 [Gl. (s)].



Die Evolution hat also ein Enzym hervorgebracht, dessen natürliche Substrate Organometallverbindungen sind und das die Kohlenstoff-Metall-Bindung angreift.

5.1. Struktur und Eigenschaften der Organoquecksilber-Lyase

Die Organoquecksilber-Lyase ist ein einfaches monomeres Polypeptid mit einem Molekulargewicht von 22 400 Da^[116]. Die qualitative Neutronenaktivierungsanalyse deutet auf das Fehlen von Metall-Ionen im reinen Enzym hin, wobei aber zu beachten ist, daß Pb, Mg, Ca, Mo, Ir und Sn mit dieser Methode nicht sicher nachgewiesen werden können. Die Aminosäure-Zusammensetzung und die aminoterminale Sequenz des Enzyms ist bekannt; auffallend dabei sind vier Cystein-Reste. Die Lineweaver-Burk-Auftragung für die Aktivität der Organoquecksilber-Lyase gegenüber MeHgCl zeigt eine starke Substrathemmung bei Konzentrationen über 1 mM, die bisher noch nicht befriedigend erklärt werden



hergestellte Substanz hat eine hohe spezifische Aktivität. Sie bindet mit einer Affinität (Dissoziationskonstante $K_D = 0.85 \text{ nM}$) und einer Anzahl von Bindungsstellen, die nahe bei den für Östradiol beobachteten Werten liegen, reversibel an den Östradiol-Rezeptor im Cytosol aus dem Uterus von Lämmern. Der Anteil unspezifischer Bindung ist gering und das Hormon wird nicht signifikant an andere Rezeptoren gebunden. Tricarbonylchrom-markierte Moleküle eignen sich gut zur Markierung von Hormonrezeptoren, die sich im Fall von **34** durch FT-IR-Absorptionsbanden bei 1880 und 1957 cm^{-1} nachweisen lassen. Dieses und andere Beispiele^[107] zeigen, wie vorteilhaft eine Derivatisierung von Biomolekülen mit Organometallverbindungen sein kann. Dieser

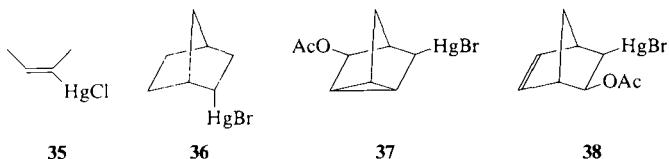
konnte. Der gleiche Effekt wurde auch bei *t*BuHgCl, nicht aber bei anderen Quecksilberverbindungen, beobachtet. Die Geschwindigkeit der enzymatischen Protopolyse ist von der Struktur und von der Konzentration des Thiol-Puffers abhängig. Die Geschwindigkeit für Cystein (5 mM) ist achtmal so schnell wie die für 2-Mercaptoethanol (5 mM), während mit 2-Aminoethanthiol keine Protopolyse auftritt. In Anwesenheit von Cystein-Konzentrationen unter 2 mM wird EtHgCl nicht prototisiert, bei Konzentrationen über 2 mM erhöht sich die Geschwindigkeit mit steigendem Cysteingehalt und erreicht schließlich bei Konzentrationen über 15 mM ihr Maximum.

Das Enzym katalysiert die Protopolyse unterschiedlichster Organoquecksilberverbindungen vom Typ RHgX, Substrate vom Typ RHgR werden dagegen nicht akzeptiert (Tabelle 3).

Tabelle 3. Substratspezifität und kinetische Parameter Lyase-katalysierter Reaktionen von Organoquecksilberverbindungen^[116].

Substrat	v_{\max} [nmol/mg ⁻¹ min ⁻¹]	K_m [mM]	Cyclen [min ⁻¹]
MeHgCl	31	0.5	0.7
<i>n</i> BuHgCl	880	0.9	20
<i>s</i> BuHgCl	110	0.8	2.5
<i>t</i> BuHgCl	40	0.8	2.5
PhHgCl	670	0.9	15.0
(Crotyl)HgCl	2600	1.3	58
H ₂ C=CHHgCl	530	1.0	12
(<i>cis</i> -2-Butenyl)HgCl	10 700	3.3	240
MeHgMe	0		0

Dies ist ein überraschendes Ergebnis, wenn man die wesentlich größere Reaktivität von RHgR bei der sauren Spaltung^[125] berücksichtigt. Eine weitere bemerkenswerte Eigenschaft des Enzyms ist die pH-Abhängigkeit der Werte für die Reaktionsgeschwindigkeit v_{\max} und $v_{\max} K_m^{-1}$, die mit EtHgCl bestimmt wurden. Die Geschwindigkeit steigt bis zu einem pH-Wert von 10.2 an, dann wird das Enzym denaturiert ($pK_s = 9$). Wieder gibt es eine erhebliche Diskrepanz zur protolytischen Spaltung von Organoquecksilberverbindungen^[125], die, bezogen auf die Säure, Reaktionen erster Ordnung sind. Es wurden große Anstrengungen unternommen, um den Mechanismus der enzymatischen Spaltung der C–H-Bindung im Detail aufzuklären^[117]. Die Entscheidung zwischen S_N1-, radikalischem, S_E1- oder S_E2-Mechanismus erfolgte auf der Grundlage einer mechanistischen Studie über die Reaktivität der Organoquecksilberverbindungen 35–38. Dabei ist der S_E2-Mechanismus begünstigt.

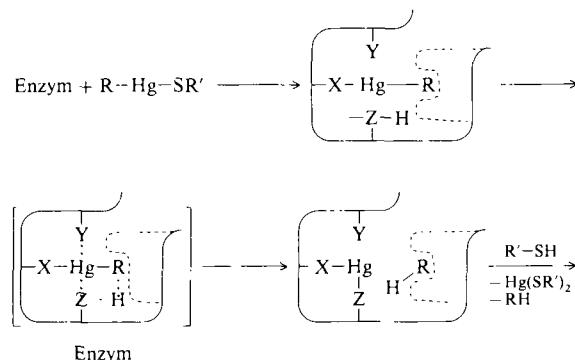


Die Umwandlung von 35 und 36 erfolgt unter Retention der Konfiguration. Verbindung 35 liefert ausschließlich *cis*-2-Buten und 36 wird mit D₂O zum *endo*-deuterierten Produkt umgesetzt. Die enzymatische Protopolyse der Verbindungen 37 und 38, die sich normalerweise gut zur Untersuchung von radikalischen Reaktionsschritten eignen^[126], verläuft

ohne Umlagerungen und radikalische Zwischenstufen, so daß ein radikalischer Mechanismus ausgeschlossen werden kann.

Die Substratspezifität der Lyase wurde ebenfalls untersucht^[117], und zwar durch Umsetzung von Quecksilberverbindungen vom Typ RHgCl, darunter auch Alkyl-, Alkenyl-, Allyl- und Phenyl-Derivate, (siehe Tabelle 3). Bei diesen Substanzen zeigte 35 die größte und MeHgCl die geringste Reaktivität. Der signifikante Deuterium-Isotopeneffekt des Lösungsmittels [$v_{\max}(H_2O)/v_{\max}(D_2O)$] von 2.1 für 35 und 4.9 für EtHgCl (pH 7.4) deutet auf eine für die Kinetik wichtige Übertragung von Protonen hin. Die stöchiometrische Bildung von 2-Buten und Hg^{II} aus 35 sowie Methan und Hg^{II} aus MeHgCl schließt die Möglichkeit einer Solvolyse nach dem S_N1-Mechanismus aus.

Schema 5 zeigt einen Vorschlag für die Wechselwirkung von Organoquecksilberverbindungen mit dem aktiven Zentrum der Lyase^[117]. Die Substrate werden zunächst an die Gruppe X des Enzyms gebunden und bilden einen Enzym-Substrat-Komplex (Sättigungskinetiken werden für alle Substrate beobachtet). Die Koordination einer weiteren nucleophilen Gruppe Y mit der Organometallverbindung aktiviert dann die C-Hg-Bindung für die Protopolyse. Diese Schluß-



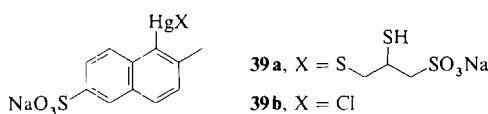
Schema 5. Vorschlag für die Wechselwirkung von Organoquecksilberverbindungen mit dem aktiven Zentrum der Lyase.

folgerung wurde aufgrund der gut dokumentierten nucleophilen Unterstützung der elektrophilen Spaltung von Kohlenstoff-Metall-Bindungen gezogen^[125, 127]. Der Bruch der Kohlenstoff-Quecksilber-Bindung würde dann über einen S_E2-Übergangszustand erfolgen. Der gegenwärtige Wissensstand erlaubt jedoch nicht, zwischen Mechanismen mit Dreipunkt- oder Vierpunkt-Anlagerung zu unterscheiden. Die Vierpunkt-Anlagerung wird allerdings für wahrscheinlicher gehalten. Schließlich führt der Austausch von Hg^{II} mit Thiolen im Lösungsmittel zum freien Enzym, das nun für einen weiteren katalytischen Cyclus bereitsteht. Falls Hg^{II} nicht durch einen Überschuß an Thiolen im Puffer aus dem aktiven Zentrum entfernt wird, reichert sich der inhibierte Enzym-Hg^{II}-Komplex an.

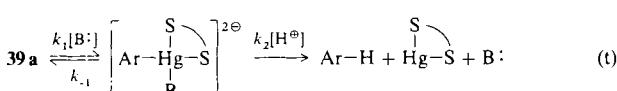
Der katalytische Abbau von Organozinnverbindungen durch Organoquecksilber-Lyase wurde als nächstes untersucht^[128]. Von den getesteten Verbindungen, wird Tetraethylzinn mit der höchsten spezifischen Aktivität umgesetzt. Dabei entsteht Ethen als organisches Produkt. Triethylvinylzinn wird von der Lyase mit 1/60 der Geschwindigkeit von Tetraethylzinn zu Ethen und Ethan (97:3) abgebaut. Die Reaktion mit Me₄Sn und Me₃SnF liefert geringe Mengen

Methan, bevor das Enzym seine Aktivität verliert. Der Aktivitätsverlust stimmt mit der beobachteten Enzymhemmung durch Me_2SnBr_2 überein. Silicium- und Germanium-Analoga der Organozinn-Substrate werden ebenso wenig enzymatisch gespalten wie Et_4Sn , Bu_4Sn , Et_3SnOAc und BuSnCl_3 . Die Enzymaktivität scheint also für das jeweilige Metallzentrum charakteristisch zu sein.

Organoquecksilber-Lyase hat die Aufmerksamkeit vieler Wissenschaftler unterschiedlicher Fachrichtungen auf sich gezogen, so daß Chemiker bald ein Modellsystem zur Verfügung stellen konnten^[129]. Mit diesem Modell kann der Mechanismus der nucleophilen Katalyse und der günstige Einfluß der Thiol-Bindung erklärt werden. Die Protolysegeschwindigkeit der Modellverbindung **39** wurde unter verschiedenen Bedingungen gemessen; die Geschwindigkeits-



konstante (k_{\exp}) beträgt bei pH 6.6 in 0.3 M Phosphatpuffer 10^{-7}s^{-1} , in Gegenwart von 100 Äquivalenten 2,3-Dimercaptopropanulfonat dagegen 10^{-4}s^{-1} . Der größte Teil (90%) dieser Geschwindigkeitssteigerung wird bereits nach Zugabe von nur zwei Äquivalenten Dithiol beobachtet. **39** ist daher vollständig gebunden mit **39a** als Substrat. Die Reaktion wird durch den Puffer (B) katalysiert, da $k_{\exp} = (k + k_{\text{BT}}[B])_0$, wobei $[B]$ für die gesamte Pufferkonzentration steht. Für Formiat-, Acetat- oder Phosphatpuffer erhält man bei der Auftragung von $\log k_{\text{BT}}$ gegen den pH-Wert Glockenkurven mit den maximalen Geschwindigkeiten bei pH-Werten um 4, 5 bzw. 6. Die Glockenkurve weist auf die Bedeutung beider Komponenten des Puffers, der Säure und der Base hin. Dies läßt sich durch einen zweistufigen Mechanismus erklären, dessen geschwindigkeitsbestimmender Schritt sich pH-abhängig verändert [Gl. (t)]. Dies deutet dar-



auf hin, daß eine Bindung von zwei Thiolen nicht nur für die Entfernung von Hg^{II} aus dem aktiven Zentrum des Enzyms, sondern auch für die Entstehung des eigentlichen Substrats notwendig ist.

6. Ausblick

Die metallorganische Biochemie wird sich in nächster Zukunft zweifellos rasch weiterentwickeln. Insbesondere auf den Gebieten der metallorganischen Biosynthese und der Biosensoren gibt es eine Vielzahl von Forschungsthemen. Biochemiker und Chemiker an Universitäten und in der Industrie werden an dieser Entwicklung beteiligt sein. Umwelt- und Gesundheitsprobleme, die mit der verstärkten Anwendung von Organometallverbindungen in Industrie und Medizin zusammenhängen, werden wahrscheinlich Anregungen für weitere Untersuchungen geben.

Ich möchte mich bei Dr. Vadim V. Mozhaev für die kritische Durchsicht des Manuskripts und seine Anregungen bedanken.

Eingegangen am 6. Juni 1990 [A 826]
Übersetzt von Dipl.-Chem. Hermann Kleemeyer, Bremen

- [1] D. Dolphin (Hrsg.): *B₁₂*, Vol. 1, 2, Wiley Interscience, New York 1982.
- [2] D. Lexa, J.-M. Saveant, *Acc. Chem. Res.* 16 (1983) 235–243.
- [3] R. G. Finke, D. A. Shiraldi, B. J. Mayer, *Coord. Chem. Rev.* 54 (1984) 1–22.
- [4] P. Dowd, M. Shapiro, *Tetrahedron* 40 (1984) 3063–3067.
- [5] P. Dowd, M. Shapiro, *Tetrahedron* 40 (1984) 3069–3086.
- [6] P. J. Toscano, L. G. Marzilli, *Prog. Inorg. Chem.* 31 (1984) 105–204.
- [7] L. Randaccio, N. Bresciani Pahor, E. Zangrandi, L. G. Marzilli, *Chem. Soc. Rev.* 18 (1989) 225–250.
- [8] G. M. Whitesides, C. H. Wong, *Angew. Chem.* 97 (1985) 617–638; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* 24 (1985) 617–638.
- [9] J. B. Jones, *Tetrahedron* 42 (1986) 3351–3403.
- [10] A. Akiyama, M. D. Bednarski, M.-J. Kim, E. S. Simon, H. Waldmann, G. M. Whitesides, *CHEMTECH.* 1988, 627.
- [11] E. J. Toone, E. S. Simon, M. D. Bednarski, G. M. Whitesides, *Tetrahedron* 45 (1989) 5365–5422.
- [12] F. S. Sariashlani, *CRC Crit. Rev. Biotechnol.* 9 (1989) 171–257.
- [13] W. Hummel, M.-R. Kula, *Eur. J. Biochem.* 184 (1989) 1–13.
- [14] S. Servi, *Synthesis* 1990, 1–25.
- [15] A. M. Klibanov, *CHEMTECH.* 1986, 354–359.
- [16] A. M. Klibanov, *Acc. Chem. Res.* 23 (1990) 114–120.
- [17] K. Martinek, A. V. Levashov, N. L. Klyachko, K. Martinek, *Enzyme Microb. Technol.* 10 (1988) 710–724.
- [18] D. S. Dordick, *Enzyme Microb. Technol.* 11 (1989) 194–211.
- [19] A. Tanaka, K. Sonomoto, *CHEMTECH.* 1990, 112–117.
- [20] K. Martinek, A. V. Levashov, N. L. Klyachko, Yu. L. Khmelnitsky, I. V. Berezin, *Eur. J. Biochem.* 155 (1986) 453–468.
- [21] Yu. L. Khmelnitsky, A. V. Kabanov, N. L. Klyachko, A. V. Levashov, K. Martinek in M.-P. Pilati (Hrsg.): *Structure and Reactivity in Reverse Micelles*, Elsevier, Amsterdam 1989, S. 230–261.
- [22] A. J. Crowe, *Chem. Ind. (London)* 1983, 304–310.
- [23] R. Tacke, H. Zilch, *Endeavour* 10 (1986) 191–197.
- [24] R. Tacke, H. Zilch, *Actual Chim.* 1986, 75–82.
- [25] J. S. Thayer, *Appl. Organomet. Chem.* 1 (1987) 227–234.
- [26] B. K. Keppler, *New J. Chem.* 14 (1990) 389–403.
- [27] R. Tacke, H. Lynch, B. Stumpf, W. Rainer, A. K. Kieslich, L. Ernst, *Z. Naturforsch.* B38 (1983) 616–620.
- [28] C. Slydatk, H. Andree, A. Stoffregen, F. Wagner, B. Stumpf, L. Ernst, H. Zilch, R. Tacke, *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 27 (1987) 152–158.
- [29] R. Tacke, K. Fritzsche, A. Tafel, F. Wuttke, *J. Organomet. Chem.* 388 (1990) 47–55.
- [30] R. Tacke, H. Hengelsberg, H. Zilch, B. Stumpf, *J. Organomet. Chem.* 379 (1989) 211–216.
- [31] R. Tacke in H. Sakurai (Hrsg.): *Organosilicon and Bioorganosilicon Chemistry. Structure, Bonding, Reactivity and Synthetic Application*, Ellis Horwood, Chichester 1985, S. 251–262.
- [32] R. A. Johnson, H. C. Murray, *J. Chem. Soc. Chem. Commun.* 1971, 989–990.
- [33] A. Ratajczak, B. Misterkiewicz, *Chem. Ind. (London)* 1976, 902–903.
- [34] V. I. Sokolov, L. L. Troitskaya, T. I. Rozhkova, *Gazz. Chim. Ital.* 117 (1987) 525–527.
- [35] Y. Yamazaki, K. Hosono, *Agric. Biol. Chem.* 52 (1988) 3239–3239.
- [36] Y. Yamazaki, K. Hosono, *Tetrahedron Lett.* 29 (1988) 5769–5770.
- [37] Y. Yamazaki, K. Hosono, *Tetrahedron Lett.* 30 (1989) 5313–5314.
- [38] V. I. Sokolov, L. L. Troitskaya, O. A. Reutov, *Dokl. Akad. Nauk. SSSR* 237 (1977) 1376–1379.
- [39] Y.-F. Wang, J. J. Lalonde, M. Momongan, D. E. Bergbreiter, C.-H. Wong, *J. Am. Chem. Soc.* 110 (1988) 7200–7205.
- [40] N. W. Boaz, *Tetrahedron Lett.* 30 (1989) 2061–2064.
- [41] M. Therisod, *J. Organomet. Chem.* 361 (1989) C8–C10.
- [42] V. N. Kalinin, *Usp. Khim.* 56 (1987) 1190–1227.
- [43] J. Gillois, D. Buisson, R. Azerad, G. Jaouen, *J. Chem. Soc. Chem. Commun.* 1988, 1224–1225.
- [44] J. Gillois, G. Jaouen, D. Buisson, R. Azerad, *J. Organomet. Chem.* 367 (1989) 85–93.
- [45] S. Top, G. Jaouen, J. Gillois, C. Baldoli, S. Maiorana, *J. Chem. Soc. Chem. Commun.* 1988, 1284–1285.
- [46] N. W. Alcock, D. H. G. Crout, C. M. Henderson, S. E. Thomas, *J. Chem. Soc. Chem. Commun.* 1988, 746–747.
- [47] R. W. Burnett, A. L. Underwood, *Biochemistry* 7 (1968) 3328–3333.
- [48] C. H. Keith, G. M. Whitesides, *Appl. Biochem. Biotechnol.* 14 (1987) 147–197.
- [49] J. P. Collman, L. S. Hegedus, J. R. Norton, R. G. Finke: *Principles and Applications of Organotransition Metal Chemistry*, University Science Books, Mill Valley, CA, USA 1987, Kapitel 13.

- [50] R. Ruppert, S. Herrmann, E. Steckhan, *Tetrahedron Lett.* 28 (1987) 6583–6586.
- [51] U. Kölle, M. Grätzel, *Angew. Chem.* 99 (1987) 572–575; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* 26 (1987) 567–570.
- [52] R. Ruppert, S. Herrmann, E. Steckhan, *J. Chem. Soc. Chem. Commun.* 1988, 1150–1151.
- [53] E. Steckhan, S. Herrmann, R. Ruppert, J. Thömmes, C. Wandrey, *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* 102 (1990) 445–447; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* 29 (1990) 388–390.
- [54] S. Grammenudi, M. Franke, F. Vögtle, E. Steckhan, *J. Inclusion Phenom.* 5 (1987) 695–707.
- [55] S. Aono, I. Okura, *Inorg. Chim. Acta* 152 (1988) 55–59.
- [56] I. Willner, R. Maidan, M. Shapira, *J. Chem. Soc. Perkin Trans. 2* 1990, 559–564.
- [57] J. Komoschinski, E. Steckhan, *Tetrahedron Lett.* 29 (1988) 3299–3300.
- [58] R. Ruppert, E. Steckhan, *J. Chem. Soc. Perkin Trans. 2* 1989, 811–814.
- [59] A. E. G. Cass, G. Davis, G. D. Francis, H. A. O. Hill, W. J. Aston, I. J. Higgins, E. O. Plotkin, L. D. L. Scott, A. P. F. Turner, *Anal. Chem.* 56 (1984) 667–671.
- [60] R. Szentrimay, P. Yeh, T. Kuwana in D. Sawyer (Hrsg.): *Electrochemical Studies of Biological Systems*, ACS, Washington, DC, USA 1977, S. 143–183.
- [61] M. L. Fultz, R. A. Durst, *Anal. Chim. Acta* 140 (1982) 1–18.
- [62] Y. Kulis, V. Razumas: *Biocatalysis in Electrochemistry of Organic Compounds*, Vilnius, Moksas 1983, S. 52–74.
- [63] M. J. Green, H. A. O. Hill, *J. Chem. Soc. Faraday Trans. 1* 82 (1986) 1237–1243.
- [64] I. Taniguchi, S. Miyamoto, S. Tomimura, F. M. Hawkridge, *J. Electroanal. Chem. Interfacial Electrochem.* 240 (1988) 333–339.
- [65] Y. Degani, A. Heller, *J. Am. Chem. Soc.* 111 (1989) 2357–2358.
- [66] B. A. Gregg, A. Heller, *Anal. Chem.* 62 (1990) 258–263.
- [67] A. D. Ryabov, E. M. Tyapochkin, E. S. Ryabova, M. D. Reshetova, A. A. Karyakin, *Metalloorg. Khim.* 3 (1990) 1384–1390.
- [68] A. P. F. Turner, W. J. Aston, I. J. Higgins, J. M. Bell, G. Davis, H. A. O. Hill, *Anal. Chim. Acta* 163 (1984) 161–174.
- [69] P. N. Bartlett, R. G. Whitaker, *Biosensors* 3 (1987/1988) 359–379.
- [70] J. E. Frew, H. A. O. Hill, *Eur. J. Biochem.* 172 (1988) 261–269.
- [71] D. C. Johnson, M. D. Ryan, G. S. Wilson, *Anal. Chem.* 60 (1988) 147 R–162 R.
- [72] S. D. Varfolomeev, *Methods Enzymol.* 137 (1988) 430–440.
- [73] R. M. Paddock, E. F. Bowden, *Electroanal. Chem. Interfacial Electrochem.* 260 (1989) 487–494.
- [74] L. H. Guo, H. A. O. Hill, G. A. Lowrance, *J. Electroanal. Chem.* 266 (1989) 379–396.
- [75] A. Szues, G. D. Hitchens, J. O. M. Bockris, *Bioelectrochem. Bioenerg.* 21 (1989) 133–148.
- [76] S.-i. Yabuki, H. Shinohara, M. Aizawa, *J. Chem. Soc. Chem. Commun.* 1989, 945–946.
- [77] P. de Taxis Du Poet, S. Miyamoto, T. Murakami, J. Kimura, I. Karube, *Anal. Chim. Acta* 235 (1990) 255–263.
- [78] Y. Degani, A. Heller, *J. Phys. Chem.* 91 (1987) 1285–1289.
- [79] Y. Degani, A. Heller, *J. Am. Chem. Soc.* 110 (1988) 2615–2620.
- [80] P. N. Bartlett, R. G. Whitaker, M. J. Green, J. Frew, *J. Chem. Soc. Chem. Commun.* 1987, 1603–1604.
- [81] F. Mizutani, M. Asai, *Denki Kagakuoyobi Kogyo Butsuri Kagaku* 56 (1988) 1100–1101.
- [82] A. Heller, *Acc. Chem. Res.* 23 (1990) 128–134.
- [83] N. M. Kostić, *Comments Inorg. Chem.* 8 (1989) 137–162.
- [84] Yu. M. Torchinsky: *Sulfur in Proteins*, Nauka, Moskau 1977.
- [85] R. Epton, M. E. Hobson, G. Marr, *J. Organomet. Chem.* 149 (1978) 231–244.
- [86] J. E. Frew, M. A. Harmer, H. A. O. Hill, S. I. Libor, *J. Electroanal. Chem.* 201 (1986) 1–10.
- [87] J. M. Cooper, M. Alvarez-Icaza, C. J. McNeil, P. N. Bartlett, *J. Electroanal. Chem.* 272 (1989) 57–70.
- [88] J. F. Stoddart, R. Zarzycki, *Recl. Trav. Chim. Pays-Bas* 107 (1988) 515–528.
- [89] V. I. Sokolov, *Metalloorg. Khim.* 1 (1988) 25–33.
- [90] A. D. Ryabov, E. M. Tyapochkin, S. D. Varfolomeev, A. A. Karyakin, *Bioelectrochem. Bioenerg.* 24 (1990) 257–262.
- [91] G. A. Robinson, G. Martinazzo, G. C. Forrest, *J. Immunoassay* 7 (1986) 1–15.
- [92] T. Yao, G. A. Rechnitz, *Biosensors* 3 (1987/1988) 307–312.
- [93] K. D. Gleria, H. A. O. Hill, C. J. McNeil, M. J. Green, *Anal. Chem.* 58 (1986) 1203–1205.
- [94] G. A. Robinson, G. Martinazzo, G. C. Forrest, *Biosensors* 2 (1986) 45–57.
- [95] G. A. Robinson, V. M. Cole, G. C. Forrest, *Biosensors* 3 (1987/1988) 147–160.
- [96] M. Cais, S. Dani, Y. Eden, O. Gandolfi, M. Horn, E. E. Isaacs, Y. Josephi, Y. Saar, E. Slovin, L. Snarski, *Nature* 270 (1977) 534–535.
- [97] M. Cais, *Methods Enzymol.* 92 (1982) 445–448.
- [98] S. Weber, W. Purdy, *Anal. Lett.* 12 (1979) 1–9.
- [99] P. Tijssen: *Practice and Theory of Enzyme Immunoassays*, Elsevier, Amsterdam 1985.
- [100] C. J. Neil, I. J. Higgins, J. V. Bannister, *Biosensors* 3 (1987/1988) 199–209.
- [101] A. Vessières, S. Top, A. Ismail, I. S. Butler, M. Louer, G. Jaouen, *Biochemistry* 27 (1988) 6659–6666.
- [102] I. S. Butler, A. Vessières, G. Jaouen, *Comments Inorg. Chem.* 8 (1989) 269–286.
- [103] G. Jaouen, A. Vessières, *Pure Appl. Chem.* 61 (1989) 565–572.
- [104] N. A. Sasaki, P. Potier, M. Savignac, G. Jaouen, *Tetrahedron Lett.* 29 (1988) 5759–5762.
- [105] M. Gruselle, P. Deprez, S. Greenfield, G. Jaouen, J.-P. Larue, D. Thouvenot, *J. Organomet. Chem.* 359 (1989) C53–C56.
- [106] L. L. Troitskaya, V. I. Sokolov, V. J. Bakhtmutov, O. A. Reutov, M. Gruselle, C. Cordier, G. Jaouen, *J. Organomet. Chem.* 364 (1989) 195–206.
- [107] A. Vessières, S. Tondu, G. Jaouen, S. Top, A. A. Ismail, G. Teutsch, M. Moguilewsky, *Inorg. Chem.* 27 (1988) 1850–1852.
- [108] I. Haiduc, C. Silvestru, *Coord. Chem. Rev.* 99 (1990) 253–296.
- [109] C. Walsh, T. Begley, A. Walts, *Pure Appl. Chem.* 59 (1987) 295–298.
- [110] M. J. Moore, M. D. Distefano, L. D. Zydowsky, R. T. Cummings, C. T. Walsh, *Acc. Chem. Res.* 23 (1990) 301–308.
- [111] T. Tesuka, K. Tonomura, *J. Biochem.* 80 (1976) 79–87.
- [112] T. Tesuka, K. Tonomura, *J. Bacteriol.* 135 (1978) 138–143.
- [113] T. Tesuka, Y. Takahashi, *Agric. Biol. Chem.* 52 (1988) 3183–3185.
- [114] J. B. Robinson, O. H. Tuovinen, *Microbiol. Rev.* 48 (1984) 95–124.
- [115] B. H. Belliveau, J. T. Trevors, *Appl. Organomet. Chem.* 3 (1989) 283–294.
- [116] T. P. Begley, A. E. Walts, C. T. Walsh, *Biochemistry* 25 (1986) 7186–7192.
- [117] T. P. Begley, A. E. Walts, C. T. Walsh, *Biochemistry* 25 (1986) 7192–7200.
- [118] B. S. Fox, C. T. Walsh, *J. Biol. Chem.* 257 (1982) 2498–2503.
- [119] B. S. Fox, C. T. Walsh, *Biochemistry* 22 (1983) 4082–4088.
- [120] R. G. Schultz, K. G. Au, C. T. Walsh, *Biochemistry* 24 (1985) 6840–6848.
- [121] M. D. Distefano, K. G. Au, C. T. Walsh, *Biochemistry* 28 (1989) 1168–1183.
- [122] M. J. Moore, C. T. Walsh, *Biochemistry* 28 (1989) 1183–1194.
- [123] M. D. Distefano, M. D. Moore, C. T. Walsh, *Biochemistry* 29 (1990) 2703–2713.
- [124] E. Gopinath, T. W. Kaaret, T. C. Bruice, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 86 (1989) 3041–3044.
- [125] O. A. Reutov, I. P. Beletskaya, V. I. Sokolov: *Mechanisms of Reactions of Organometallic Compounds*, Khimia, Moskau 1972.
- [126] G. M. Whitesides, J. San-Filippo, Jr., *J. Am. Chem. Soc.* 92 (1970) 6611–6624.
- [127] A. D. Ryabov, *Chem. Rev.* 90 (1990) 403–424.
- [128] A. E. Walts, C. T. Walsh, *J. Am. Chem. Soc.* 110 (1988) 1950–1953.
- [129] E. Gopinath, T. C. Bruice, *J. Am. Chem. Soc.* 109 (1987) 7903–7905.