

Schema 2. E = COOMe.

Zum Beispiel folgt die Regio- und Stereochemie von **6c** aus den berechneten Koeffizienten und Energien von HOMO und LUMO von **5c** und den während der Dimerisierung wirksamen sekundären Orbitalwechselwirkungen. Ähnlich ist die Regiochemie von **7c** durch das LUMO von **6c** vorgegeben, das auf der stärker substituierten Doppelbin-

Tabelle 1. Schmelzpunkte sowie <sup>1</sup>H- und <sup>13</sup>C-NMR-chemische Verschiebungen von **6c–8c**.

Verbindung (Fp)	<sup>1</sup> H-NMR (400 MHz, CDCl <sub>3</sub> ) δ-Werte	<sup>13</sup> C-NMR (100 MHz, CDCl <sub>3</sub> ) δ-Werte
<b>6c</b> (114–115 °C)	6.76 (1 H, d, J <sub>ab</sub> = 0.6 Hz; H <sub>a</sub> ), 3.94 (1 H, d, J <sub>ad</sub> = 3.4 Hz; H <sub>d</sub> ), 3.77 (3 H, s; COOMe), 3.73 (3 H, s; COOMe), 3.71 (3 H, s; COOMe), 3.67 (3 H, s; COOMe), 3.52 (1 H, dd, J <sub>bd</sub> = 8.3 Hz, J <sub>ab</sub> = 0.6 Hz; H <sub>b</sub> ), 3.47 (1 H, dd, J <sub>bd</sub> = 8.3 Hz, J <sub>cd</sub> = 3.4 Hz; H <sub>d</sub> )	170.59, 161.15, 160.68, 160.53, 144.68, 142.44, 141.65, 136.66, 52.50, 52.19, 51.94, 51.62, 49.92, 41.67, 35.75, 35.57
<b>7c</b> (120–121 °C)	6.88 (1 H, d, J <sub>ab</sub> = 0.9 Hz; H <sub>a</sub> ), 3.77 (3 H, s; COOMe), 3.76 (3 H, s; COOMe), 3.74 (3 H, s; COOMe), 3.73 (1 H, dd, J <sub>bd</sub> = 8.2 Hz, J <sub>ab</sub> = 0.9 Hz; H <sub>b</sub> ), 3.72 (1 H, d, J <sub>cd</sub> = 5.6 Hz; H <sub>c</sub> ), 3.70 (3 H, s; COOMe), 3.64 (3 H, s; COOMe), 3.61 (1 H, d; J <sub>ef</sub> = 2.4 Hz; H <sub>e</sub> ), 3.51 (3 H, s; COOMe), 3.48 (1 H, d, J <sub>fe</sub> = 2.4 Hz; H <sub>f</sub> ), 3.14 (1 H, dd, J <sub>bd</sub> = 8.2 Hz, J <sub>cd</sub> = 5.6 Hz; H <sub>d</sub> )	170.66, 169.68, 168.78, 160.60, 160.45, 160.43, 148.93, 143.19, 142.51, 140.14, 60.32, 57.49, 53.28, 52.38, 52.11, 52.08, 51.82, 51.69, 51.58, 46.92, 45.86, 45.07, 41.74, 39.82
<b>8c</b> (132–133 °C)	6.88 (1 H, d, J <sub>ab</sub> = 1 Hz; H <sub>a</sub> ), 3.79 (3 H, s; COOMe), 3.77 (1 H, d, J <sub>cd</sub> = 5.6 Hz; H <sub>c</sub> ), 3.76 (3 H, s; COOMe), 3.72 (3 H, s; COOMe), 3.71 (3 H, s; COOMe), 3.70–3.68 (1 H, ddd, J <sub>bd</sub> = 8.4 Hz, J <sub>ab</sub> = 1 Hz, J <sub>ce</sub> = 0.5 Hz; H <sub>b</sub> ), 3.65 (3 H, s; COOMe), 3.58 (1 H, d, J <sub>gh</sub> = 2.4 Hz; H <sub>g</sub> ), 3.56 (3 H, s; COOMe), 3.55 (3 H, s; COOMe), 3.51 (1 H, d, J <sub>gh</sub> = 2.4 Hz; H <sub>h</sub> ), 3.48 (3 H, s; COOMe), 3.25 (1 H, d, J <sub>ef</sub> = 3.6 Hz; H <sub>e</sub> ), 3.18 (1 H, dd, J <sub>bd</sub> = 8.4 Hz, J <sub>cd</sub> = 5.6 Hz; H <sub>d</sub> ), 3.15 (1 H, d, J <sub>fe</sub> = 3.6 Hz; H <sub>f</sub> )	170.68, 169.09, 168.38, 168.17, 167.90, 160.62, 160.57, 160.24, 147.81, 143.53, 142.35, 139.97, 58.10, 56.58, 55.74, 54.92, 54.21, 52.40, 52.19, 52.13, 51.74, 51.36, 51.26, 51.13, 50.73, 50.28, 47.47, 47.05, 45.91, 43.38, 42.11

dung lokalisiert ist. Die Stereochemie von **7c** wird in Abwesenheit sekundärer Orbitalwechselwirkung durch sterische Wechselwirkungen bestimmt. Die Bildung von **8c** folgt dem gleichen Muster.

In **7c** und **8c** sind nicht nur fünf bzw. sieben Cyclobutane linear aneinandergereiht, sondern auch entsprechend viele Estergruppen auf einer Seite angeordnet. Diese „polarofaciale“ Anordnung sollte den Verbindungen Eigenschaften verleihen, die sie eventuell als Spacer und neue Materialien interessant machen. Wir versuchen jetzt, noch höhere Ladderane herzustellen.

Eingegangen am 29. Juni 1992 [Z 5437]

CAS-Registry-Nummern:

**5c**, 1120-53-2; **6c**, 143859-21-6; **7c**, 143859-22-7; **8c**, 143859-23-8.

- [1] M. A. Miller, J. M. Schulman, *J. Mol. Struct.* **1988**, *163*, 133.
- [2] Weiterführende Literatur zu Systemen mit Bicyclo[2.2.0]hexan (2-Ladderan) als Spacer: M. N. Paddon-Row, *Acc. Chem. Res.* **1982**, *15*, 245; H. Overing, M. N. Paddon-Row, M. Heppener, A. M. Oliver, E. Cotsaris, J. W. Verhoeven, N. S. Hush, *J. Am. Chem. Soc.* **1987**, *109*, 3258; D. C. Craig, J. M. Lawson, A. M. Oliver, M. N. Paddon-Row, *J. Chem. Soc. Perkin Trans. 1* **1990**, 3305; R. N. Warrener, P. Groundwater, I. G. Pitt, D. N. Butler, R. A. Russell, *Tetrahedron Lett.* **1991**, *32*, 1885.
- [3] E. Osawa, J. M. Rudzinski, D. A. Barbiric, E. D. Jemmis in *Strain and its Implications in Organic Chemistry*, (Hrsg.: A. de Meijere, S. Blechert), NATO-ASI Series, Kluwer, London, **1989**, S. 259.
- [4] G. Dinsburg, *Nouv. J. Chim.* **1982**, *6*, 175.
- [5] A. Nickon, E. F. Silversmith, *Organic Chemistry: The Name Game*, Pergamon Press, New York, **1987**, S. 87. Ein schrittweiser Zugang zu einem [11]-Ladderan und weiter zu **3** und **4**, wie er von A. Eschenmoser formuliert wurde, ist in diesem Buch erwähnt.
- [6] H. D. Martin, M. Hekman, *Angew. Chem.* **1973**, *85*, 615. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1973**, *12*, 572; J. Meinwald, J. Mioduski, *Tetrahedron Lett.* **1974**, 3839; H. D. Martin, M. Hekman, *ibid.* **1978**, 1183; H. D. Martin, B. Mayer, M. Putter, H. Hochstetter, *Angew. Chem.* **1981**, *90*, 695; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1981**, *20*, 677. Für ein anellierte Derivat siehe G. Mehta, M. B. Viswanath, M. Nethaji, K. Venkatesan, *J. Chem. Soc. Chem. Commun.* **1992**, 82.
- [7] T. Bally, S. Masamune, *Tetrahedron* **1980**, *36*, 343; G. Maier, K. Euler, H. Irngartinger, M. Nixdorf, *Chem. Ber.* **1985**, *118*, 409; I. G. Pitt, R. A. Russell, R. N. Warrener, *Syn. Commun.* **1986**, *16*, 1627; G. Maier, *Angew. Chem.* **1988**, *100*, 317; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1988**, *27*, 309.
- [8] M. J. S. Dewar, E. G. Zoebisch, E. F. Healy, J. J. P. Stewart, *J. Am. Chem. Soc.* **1985**, *107*, 3902.
- [9] I. Fleming, *Grenzorbitale und Reaktionen organischer Verbindungen*, Verlag Chemie, Weinheim, **1979** [*Frontier Orbitals and Organic Chemical Reactions*, Wiley, New York, **1976**].
- [10] G. Berens, F. Kaplan, R. Rimerman, B. W. Roberts, A. Wissner, *J. Am. Chem. Soc.* **1975**, *97*, 7076.

## Multifeld-Sättigungsmagnetisierungsmessungen an oxidiert und reduzierter Ribonucleotid-Reduktase aus *Escherichia coli*

Von Mohammed Atta, Corinne Scheer, Pascal H. Fries, Marc Fontecave und Jean-Marc Latour\*

Ribonucleotid-Reduktasen kommen in allen lebenden Organismen vor und katalysieren die Umwandlung von Ribonucleotiden in Desoxyribonucleotide, einen wesentlichen Teilschritt der DNA-Biosynthese. Das Enzym aus *Escherichia coli* ist aus zwei homodimeren Untereinheiten R1 und R2 aufgebaut<sup>[1]</sup>. Eine Röntgenstrukturanalyse<sup>[2]</sup> der oxidierten Form des Enzyms hat die Lokalisation der Reduktase-

[\*] Dr. J.-M. Latour, C. Scheer, Dr. P. H. Fries

Laboratoire DRFMC/SESAM/CC  
Centre d'Etudes Nucléaires de Grenoble  
F-385X 38041 Grenoble Cedex (Frankreich)

M. Atta, Prof. M. Fontecave  
L.E.D.S.S./Université Joseph Fourier  
F-BP 53X F 38041 Grenoble Cedex (Frankreich)

dierten Form des Proteins R2 zeigte, daß sein aktives Zentrum in der Mitte ähnlich wie Hämerythrin einen zweikernigen Eisenkomplex enthält. Die Auflösung reichte jedoch zur eindeutigen Identifizierung der die beiden Eisentome verbrückenden Gruppe nicht aus; spektroskopische Untersuchungen zeigten die Anwesenheit einer Oxogruppe<sup>[1, 3]</sup>. Übereinstimmend hierzu ergab eine Untersuchung der magnetischen Suszeptibilität<sup>[4]</sup>, daß die beiden High-Spin-Eisen(III)-Ionen stark antiferromagnetisch gekoppelt sind; aufgrund experimentell bedingter Limitierungen war jedoch eine genaue Bestimmung der Austauschwechselwirkung nicht möglich ( $-J = 106 \pm 22 \text{ cm}^{-1}$ ;  $H = -2JS_1 \cdot S_2$ ). Ein für die Enzymfunktion wesentliches Tyrosylradikal befindet sich etwa  $5 \text{ \AA}$  vom nächsten Eisenatom entfernt.

Über das Dieisenzentrum des reduzierten Enzyms weiß man jedoch viel weniger. Die Reduktion des Dieisenzentrums ist ein entscheidender Schritt bei der Bildung des Tyrosylradikals und der anschließenden Enzymaktivierung<sup>[5]</sup>. Aus Mößbauer-Untersuchungen<sup>[6]</sup> kann man schließen, daß beide Eisenzentren im wesentlichen äquivalent sind, und eine eventuell vorhandene Spinkopplung zwischen beiden Eisen-Ionen kleiner ist als die Nullfeld-Aufspaltungen. Dagegen zeigte Ehrenberg anhand NMR-spektroskopischer Befunde, daß die Kopplung  $-J = 5 \pm 5 \text{ cm}^{-1}$  beträgt, und schloß daraus, daß die Wechselwirkung der Eisenzentren, wenn überhaupt vorhanden, nur schwach ist<sup>[7]</sup>. Folglich ist für reduzierte Ribonucleotid-Reduktase eine schwache Austauschwechselwirkung zu erwarten. Bei Hämerythrin wird die Oxobrücke gleichzeitig mit der Reduktion des Dieisen(III)-Zentrums protoniert<sup>[8]</sup>, und ein analoger Vorgang könnte bei der Ribonucleotid-Reduktase stattfinden. Die magnetische Wechselwirkung zwischen den beiden Eisen-Ionen hängt entscheidend von der Art der verbrückenden Liganden ab. Bekanntlich leiten Carboxylatgruppen Austauschwechselwirkungen bei diesen Systemen kaum weiter. Aus Messungen der magnetischen Suszeptibilität sowohl an Proteinen als auch an synthetischen Analoga kennt man die Größenordnung der magnetischen Austauschwechselwirkung für die einzelnen Liganden genau<sup>[9]</sup>. Ausgehend von einem hohen Wert ( $-J = 80\text{--}140 \text{ cm}^{-1}$ ) bei Oxoverbindungen verringert sich diese Wechselwirkung bei Protonierung zur Hydroxyverbindung auf  $-J = 10\text{--}50 \text{ cm}^{-1}$ <sup>[10]</sup>. Vermutlich ist ein kleiner, aber deutlich positiver Wert für  $J$  in mehreren natürlichen Systemen auf weitere Protonierung zurückzuführen<sup>[8, 11]</sup>. Magnetische Untersuchungen sind somit ein wertvolles Werkzeug bei der Untersuchung der Umwandlungen, die mit der Reduktion des Dieisenzentrums einhergehen.

Wir berichten hier über Multifeld-Sättigungs-Magnetisierungs-Untersuchungen sowohl an der oxidierten als auch an der reduzierten Ribonucleotid-Reduktase. Die gefundene starke Austauschwechselwirkung spricht ebenfalls für die Anwesenheit einer Oxobrücke im oxidierten Enzym; darüber hinaus lassen Korrelationen zwischen magnetischem Verhalten und Struktur den Schluß zu, daß die Struktur des Dieisenzentrums den entsprechenden in Methämerythrin-Derivaten ähnelt. Für die reduzierte Ribonucleotid-Reduktase ergibt sich nun, wenn überhaupt, nur eine äußerst schwache Austauschwechselwirkung; dies ist ein deutlicher Hinweis, daß die Oxobrücke während der Reduktion protoniert und dann eliminiert wurde. Hierzu wird ein Strukturvorschlag gemacht.

Multifeld-Sättigungs-Magnetisierungs-Daten wurden an zwei Proteinproben<sup>[12]</sup> (R2 und reduziertes R2) mit einem SHE-900-SQUID-Suszeptometer nach dem von Day skizzierten Verfahren<sup>[13]</sup> erhalten. Die Probe befand sich in einem über Nacht mit 10proz. HF-Lösung geätztem Quarzgefäß. Die Messungen wurden im Temperaturbereich von

5–200 K bei sechs Feldstärken (0.5, 1, 2, 3, 4 und 5 T) durchgeführt. Die Auswertung der Daten erfolgte nach der Methode von Day<sup>[13]</sup>.

Abbildung 1 zeigt die magnetischen Eigenschaften von oxidiertem Ribonucleotid-Reduktase anhand der Temperaturabhängigkeit des Produkts aus magnetischer Suszeptibilität und Temperatur. Die Kurve weist unterhalb von 50 K ein deutliches Plateau bei  $\chi T \approx 0.45 \text{ K cm}^3 \text{ mol}^{-1}$  auf und zeigt bei höheren Temperaturen einen Anstieg von  $\chi T$ . Ein solches Verhalten steht ganz in Einklang mit einem isolierten Spin  $S = 1/2$ , der zu dem Plateau beiträgt ( $\chi T \approx 0.4 \text{ K cm}^3 \text{ mol}^{-1}$ ), und eines antiferromagnetisch gekoppelten Paares von High-Spin-Fe<sup>III</sup>-Ionen, deren Beitrag bei niedrigen Temperaturen verschwindet. Simuliert man die experimentellen Daten mit einer aus dem entsprechenden Heisenberg-Hamilton-Operator abgeleiteten Gleichung unter Berücksichtigung eines geringen Anteils ( $p$ ) von Fremd-Fe<sup>III</sup>-Ionen, erhält man die optimierten Parameter  $g = 2.00$ ,  $J = -84(5) \text{ cm}^{-1}$ ,  $p = 0.022(2)$ . Der Wert von  $J$  ist an der oberen Grenze des von Ehrenberg<sup>[4]</sup> abgeschätzten Bereichs ( $-128 < J < -83 \text{ cm}^{-1}$ ). Zweifelloos deutet eine so starke antiferromagnetische Kopplung darauf hin<sup>[9]</sup>, daß die Eisentome über ein Oxid-Ion verbrückt sind; dies steht in Einklang mit den Schlußfolgerungen aus spektroskopischen Messungen<sup>[3]</sup>.

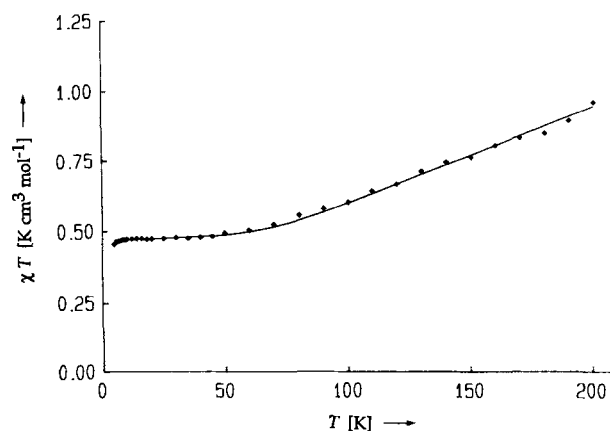


Abb. 1. Oxidiertes R2: Temperaturabhängigkeit des Produkts aus magnetischer Suszeptibilität und Temperatur. Die experimentellen Daten (•) sind Mittelwerte aus bei sechs Feldstärken gewonnenen Daten. Die durchgezogene Linie entspricht den theoretischen Werten (siehe Text).

Anhand der Untersuchung der strukturellen und magnetischen Eigenschaften von drei Dutzend ( $\mu$ -Oxo)dieisen(III)-Komplexen schlugen Gorun und Lippard<sup>[14]</sup> kürzlich vor, daß die Austauschwechselwirkung ( $J$ ) mit dem Fe-O-Abstand ( $P$ ), der der kürzeste Austauschweg zwischen den beiden Eisen-Ionen ist, korreliert. Setzt man den obigen Wert für  $J$  in die entsprechende Formel ein, kann man einen Abstand von  $P = 1.82 \text{ \AA}$  zwischen Fe und O und einen Wert von  $130^\circ$  für die Fe-O-Fe-Winkel abschätzen, wenn man den röntgenstrukturanalytisch ermittelten Fe-Fe-Abstand von  $3.3 \text{ \AA}$  heranzieht. Bemerkenswert ist, daß aus Resonanz-Raman-Daten der gleiche Wert für den Fe-O-Fe-Winkel bestimmt wurde<sup>[15]</sup>. Diese Daten passen auf eine ( $\mu$ -Carboxylato)( $\mu$ -oxo)dieisen(III)-Einheit<sup>[9]</sup> und stimmen sehr gut mit den an Methämerythrin-Derivaten gefundenen überein<sup>[16]</sup>.

In Abbildung 2 ist das magnetische Verhalten von reduzierter Ribonucleotid-Reduktase bei sechs Feldstärken im Temperaturbereich von 5–200 K dargestellt. In Abbildung 2a ist die Suszeptibilität bei den sechs Feldstärken jeweils gegen den Kehrwert der Temperatur aufgetragen; Ab-

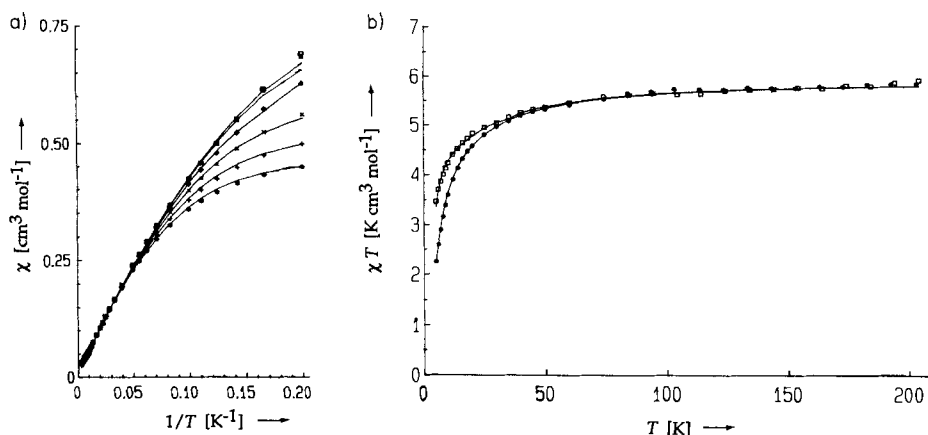


Abb. 2. Reduziertes R2: a) Abhängigkeit der magnetischen Suszeptibilität vom Kehrwert der Temperatur bei sechs Feldstärken: 0.5 T (□), 1 T (Δ), 2 T (○), 3 T (×), 4 T (+) und 5 T (\*). Die durchgezogenen Linien sind die berechneten Werte (siehe Text). b) Temperaturabhängigkeit des Produkts aus magnetischer Suszeptibilität und Temperatur bei den zwei extremen Feldstärken 0.5 T (□) und 5 T (\*). Die durchgezogenen Linien sind die berechneten Werte (siehe Text).

bildung 2b zeigt die Abhängigkeit des Produkts  $\chi T$  von der Temperatur bei den zwei extremen Feldstärken 0.5 und 5 T.

Der Spin-Hamilton-Operator für die beiden über eine Austauschwechselwirkung gekoppelten Eisen-Spins  $S = 2$  folgt aus Gleichung (a), die anisotrope Zeemann-Wechselwirkung aus Gleichung (b).

$$\mathcal{H} = -2J\vec{S}_1 \cdot \vec{S}_2 + \sum_{i=1,2} [D(S_{iz}^2 - 2) + E(S_{ix}^2 - S_{iy}^2) + \mathcal{H}_{iz}] \quad (a)$$

$$\mathcal{H}_{iz} = \mu_B(g_x H_x S_{ix} + g_y H_y S_{iy} + g_z H_z S_{iz}) \quad (b)$$

$J$  ist die isotrope Kopplungskonstante;  $D$  und  $E$  sind der axiale bzw. rhombische Parameter für den Nullfeldaufspaltungs(ZSF)-Tensor (ZSF = Zero Field Splitting), für die bei beiden Ionen derselbe Wert angenommen wird. Wir gehen davon aus, wie allgemein üblich, daß der ZSF-Tensor und der Zeemann- $g$ -Faktor gleichzeitig diagonalisiert werden können<sup>[17a]</sup>. Die Berechnungen wurden so durchgeführt, daß die verschiedenen Parameter jeweils festgelegt oder frei variiert wurden, um so ihre relative Bedeutung zu ermitteln. Daraus folgt, daß die Berücksichtigung der Rhombizität bei der Berechnung (entweder als  $E \neq 0$  oder als  $g_x \neq g_y$ ) zu einer geringfügigen, kaum signifikanten Verbesserung der statistischen Kennzahl führt. Der  $E$ -Wert wurde in keinem Fall größer als  $1 \text{ cm}^{-1}$ , und der Unterschied zwischen  $g_x$  und  $g_y$  war immer kleiner als 0.1. Dagegen ergab sich für  $J$  ein kleiner Wert; setzte man  $J = 0$ , verschlechterte sich die Anpassung deutlich. Daher wurden die endgültigen Berechnungen mit den fünf Parametern  $J$ ,  $D$ ,  $g_x = g_y$  und  $g_z$  durchgeführt.

Die durchgezogenen Linien in Abbildung 2 wurden mit dem folgenden Parametersatz berechnet<sup>[18]</sup>:  $g_x = 1.63(5)$ ,  $g_y = 1.63(5)$ ,  $g_z = 2.56(5)$ ,  $J = 0.3(2) \text{ cm}^{-1}$  und  $D = 9.8(5) \text{ cm}^{-1}$ . Der für die axiale Nullfeldaufspaltung abgeschätzte Wert ist bemerkenswerterweise dem in Desoxyhämererythrin-Derivaten beobachteten<sup>[8,11]</sup> recht ähnlich. Am auffälligsten ist jedoch der außerordentlich geringe Wert für die Austauschwechselwirkung  $J$ . Bei reduziertem Hämererythrin findet man den für eine Hydroxybrücke erwarteten Wert von  $-J = 12-38 \text{ cm}^{-1}$ <sup>[8]</sup>. Vermutlich wird diese weiter zu einer Aquabrücke protoniert, wenn einige exogene Anionen gebunden werden; dies führt zu einer Abnahme der Austauschwechselwirkung. Bei Azid als Gegenion ändert die Kopplung sogar ihr Vorzeichen ( $J = 1.7 \text{ cm}^{-1}$ )<sup>[11]</sup> und wird ferromagnetisch; dadurch entsteht ein EPR-aktiver Grundzustand des DesoxyHrN<sub>3</sub>-Proteins mit  $S = 4$ . Methan-Monooxygenase (MMO), ein weiteres Dieisenprotein, zeigt

in seiner reduzierten Form ein ähnliches, durch einen hohen  $g$ -Wert ( $g \approx 16$ ) charakterisiertes EPR-Signal<sup>[19]</sup>. Erwähnenswert ist, daß reduzierte Ribonucleotid-Reduktase aus *E. coli* unter den Bedingungen, bei denen DesoxyHrN<sub>3</sub> und reduzierte MMO-Spektren mit hohen  $g$ -Werten liefern, EPR-inaktiv ist<sup>[20]</sup>. Daraus könnte man folgern, daß bei reduzierter Ribonucleotid-Reduktase Wasser nicht als Brückenligand zwischen den beiden Eisenatomen fungiert; doch welcher Ligand statt dessen? Es ist durchaus denkbar, daß bei der Reduktion des oxidierten Enzyms zunächst durch Protonierung der Oxobrücke eine schwach bindende Aquabrücke entsteht, die dann durch die Carboxylatgruppe aus Glutamat 238 ersetzt wird. Dieser Rest würde somit von einem terminalen einzähnigen Liganden in oxidiertem R2 zu einem verbrückenden zweizähnigen im reduzierten Protein. Anhand von Strukturuntersuchungen an einer Vielzahl von Carboxylato-Metallkomplexen hat Lippard<sup>[21]</sup> gezeigt, daß eine solche Änderung der Koordination einer Carboxylatgruppe durchaus möglich ist. Weiterhin würde wahrscheinlich auch die Carboxylatgruppe aus Aspartat 84 einzähnig; dies ergäbe die in Abbildung 3 dargestellte hypothetische Situation. Interessanterweise wurde kürzlich mittels Rönt-

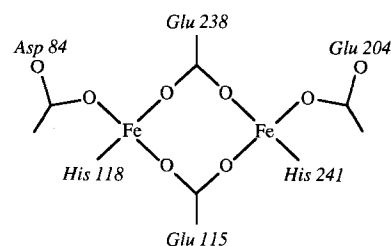


Abb. 3. Hypothetische Struktur des Dieisenzentrums des reduzierten Proteins R2. Höchstwahrscheinlich wird die Koordinationssphäre der Eisen-Ionen wie bei oxidiertem R2 durch Aqualiganden vervollständigt.

genstrukturanalyse an einer neuartigen Form des Proteins R2, bei der die beiden Eisenzentren durch Mangan(II)-Ionen ersetzt wurden, eine ähnliche Struktur gefunden<sup>[22]</sup>. Diese Beobachtung stützt unsere Hypothese.

Eingegangen am 12. Mai 1992 [Z 5342]

- [1] M. Fontecave, P. Nordlund, H. Eklund, P. Reichard, *Adv. Enzymol. Relat. Areas Mol. Biol.* **1992**, 65, 147.
- [2] P. Nordlund, H. Eklund, B.-M. Sjöberg, *Nature* **1990**, 345, 593.
- [3] a) J. Sanders-Loehr in *Iron Carriers and Iron Proteins* (Hrsg.: T. Loehr), VCH Publishers, New York, **1989**, S. 373; b) L. Que, Jr., A. E. True, *Prog. Inorg. Chem.* **1990**, 38, 97.

- [4] L. Petersson, A. Gräslund, A. Ehrenberg, B.-M. Sjöberg, P. Reichard, *J. Biol. Chem.* **1980**, 255, 6706.
- [5] a) M. Fontecave, R. Eliasson, P. Reichard, *J. Biol. Chem.* **1989**, 264, 9164; b) M. Fontecave, C. Gerez, D. Mansuy, P. Reichard, *ibid.* **1990**, 265, 10919.
- [6] J. B. Lynch, C. Juarez-Garcia, E. Münck, L. Que, Jr., *J. Biol. Chem.* **1989**, 264, 8091.
- [7] M. Sahlin, A. Gräslund, L. Petersson, A. Ehrenberg, B.-M. Sjöberg, *Biochemistry* **1989**, 28, 2618.
- [8] R. C. Reem, E. I. Solomon, *J. Am. Chem. Soc.* **1987**, 109, 1216.
- [9] D. M. Kurtz, *Chem. Rev.* **1990**, 90, 585.
- [10] W. A. Armstrong, S. J. Lippard, *J. Am. Chem. Soc.* **1984**, 106, 4632.
- [11] M. P. Hendrich, L. L. Pearce, L. Que, Jr., N. D. Chasteen, E. P. Day, *J. Am. Chem. Soc.* **1991**, 113, 3039.
- [12] Die Proteine R2 und apoR2 wurden in Tris-Puffer (0.1 M, pH 7.5, 20% Glycerin) dargestellt. Beide Lösungen wurden dann durch aufeinanderfolgende Zentrifugierungen durch eine Centricon-30-Membran und einschließende Verdünnungen mit D<sub>2</sub>O einem H<sub>2</sub>O/D<sub>2</sub>O-Austausch unterworfen, konzentriert ( $1 \times 10^{-3}$  M, 125 mL) und an einer Argon/Vakuum-Leitung entlüftet. Reduziertes R2 wurde in einem sauerstofffreien Handschuhkasten durch Zugabe von vier Äquivalenten Ammoniumeisensulfat zu einer Lösung von apoR2 in D<sub>2</sub>O dargestellt. Der korrekte Einbau von Eisen wurde durch das Auftreten des Tyrosylradikals nach Luftkontakt belegt (Nachweis EPR- und UV/VIS-spektroskopisch). Außerdem konnte in der reoxidierten Probe EPR-spektroskopisch kein freies Eisen-Ion mehr nachgewiesen werden (Signal mit  $g = 4.3$ ).
- [13] E. P. Day, T. A. Kent, P. A. Lindahl, E. Münck, W. H. Orme-Johnson, H. Roder, A. Roy, *Biophys. J.* **1987**, 52, 837.
- [14] S. M. Gorun, S. J. Lippard, *Inorg. Chem.* **1991**, 30, 1625.
- [15] B. M. Sjöberg, T. M. Loehr, J. Sanders-Loehr, *Biochem.* **1982**, 21, 96.
- [16] R. E. Stenkamp, L. C. Sieker, L. H. Jensen, *J. Am. Chem. Soc.* **1984**, 106, 618.
- [17] a) Man beachte auch, daß die Einzel-Ionen-ZSF-Tensoren als colinear angenommen wurden. Diese Vereinfachung bringt bei einer gefrorenen Lösung kaum Einschränkungen mit sich, wenn der  $J$ -Wert so klein ist wie hier. Die mittlere molare Magnetisierung  $m_{av}(H)$  in Richtung des magnetischen Feldes  $H$  wird numerisch aus der partiellen Ableitung der Freien Energie berechnet [17b]. Die sechs Parameter  $J$ ,  $D$ ,  $E$ ,  $g_x$ ,  $g_y$  und  $g_z$  des Hamilton-Operators werden aus einer Anpassung (Methode der kleinsten Fehlerquadrate) an die experimentell erhaltenen Werte des Produkts aus  $m_{av}(H)$  und  $T$  bei allen Feldstärken und Temperaturen erhalten. b) N. W. Ashcroft, N. D. Mermin, *Solid State Physics*, Saunders, Philadelphia, **1976**, S. 643.
- [18] Man beachte, daß der Mittelwert für  $g$  1.992 beträgt; dieser Wert ist für ein Eisen(II)-Derivat zu klein. Wir glauben, daß dies, wie von Day dargelegt [11], auf die Unsicherheit der Proteinbestimmung zurückzuführen ist. Die anderen Parameter ( $J$ ,  $D$ ,  $E$ ) bleiben unbeeinflusst.
- [19] M. P. Hendrich, E. Münck, B. G. Fox, J. D. Lipscomb, *J. Am. Chem. Soc.* **1990**, 112, 5861.
- [20] Que, Jr. [6] hat berichtet, daß reduzierte Ribonucleotid-Reduktase ein breites EPR-Signal bei niedrigem Feld liefert; er schließt jedoch nicht aus, daß dies mit Fremd-Eisen(II)-Ionen zusammenhängt. Wir fanden bei unseren Enzympräparationen nie ein solches Signal.
- [21] R. L. Rardin, W. B. Tolman, S. J. Lippard, *New J. Chem.* **1991**, 15, 417.
- [22] M. Atta, P. Nordlund, A. Åberg, H. Eklund, M. Fontecave, *J. Biol. Chem.*, im Druck.

## BUCHBESPRECHUNGEN

Buchbesprechungen werden auf Einladung der Redaktion geschrieben. Vorschläge für zu besprechende Bücher und für Rezensenten sind willkommen. Verlage sollten Buchankündigungen oder (besser) Bücher an folgende Adresse senden: Redaktion Angewandte Chemie, Postfach 101161, W-6940 Weinheim, Bundesrepublik Deutschland. Die Redaktion behält sich bei der Besprechung von Büchern, die unverlangt zur Rezension eingehen, eine Auswahl vor. Nicht rezensierte Bücher werden nicht zurückgesandt.

**Biotechnology. A Multi-Volume Comprehensive Treatise. Vol. 4. Measuring, Modelling and Control.** 2. Auflage. Herausgegeben von K. Schügerl. VCH Verlagsgesellschaft, Weinheim/VCH Publishers, New York, 1991. XIII, 658 S., geb. DM 490.00. – ISBN 3-527-28314-5/1-56081-154-4

Dieser Band, Bestandteil der Buchreihe über Biotechnologie schlechthin, ist der zuerst erschienene Band der neuen zweiten Auflage. Das Buch wendet sich gleichermaßen an Universitätsangehörige, Mitglieder von Forschungsinstituten und Anwender in der Praxis. Es bietet demjenigen, der sich in Teilgebiete der Meß- und Regeltechnik innerhalb der Biotechnologie einlesen will, eine wertvolle Hilfe.

Der Band gliedert sich in vier Hauptgebiete: Meßinstrumente, Meßmethoden, Modellierung und Regelung/Auto-

mation mit insgesamt 19 Kapiteln. Sehr ansprechend für den Leser sind die klare Einteilung des Buches mit Inhalts- und Symbolverzeichnis für jedes Kapitel, was die Lesbarkeit sehr erhöht, die Einheitlichkeit des Drucks und die graphische Darstellung. Trotz der etwas kurzen Einführung am Anfang des Buches wird dem Leser keineswegs nur eine enge Sicht auf jeweils kleine Spezialgebiete geboten. So beginnt etwa Kapitel 13 über Modelle in der aeroben Abwasserreinigung mit einer kurzen Diskussion über den Sinn und die Zweckmäßigkeit von Modellen, die über das Generieren und Manipulieren großer Mengen von Zahlen hinausgeht. Das komplementäre Kapitel 14 über anaerobe Abwasserreinigung enthält eine gute Einführung über Thermodynamik und Kinetik der relevanten Prozesse. Insgesamt erhält man einen guten zusammenhängenden Überblick. Ausnahmen, wie das recht kurz geratene und etwas isoliert stehende Kapitel 8 über Probenziehung, bestätigen die Regel.

Das Buch ist nicht nur eine Sammlung des State-of-the-art; einige Kapitel behandeln Gebiete, die, obwohl heute noch nicht jedem geläufig, in der Zukunft sicherlich wesentlich größere Bedeutung erlangen können, wie die Abschätzung von Zuständen von Bioreaktoren (Kapitel 7). Ob sich allerdings die Anwendung von Expertensystemen (Kapitel 19) in der Praxis durchsetzen können wird, muß sich in der Zukunft erweisen.

Auch wenn einige Kapitel theoretisch sehr anspruchsvoll sind, werden häufig Anwendungen aus der Praxis zitiert; ein ganzes Kapitel (Kapitel 12) ist etwa der Fallstudie über die Optimierung der Hefeproduktion gewidmet. Kapitel 2 verknüpft in sehr anschaulicher Weise Theorie und Praxis der Gasanalyse bei Fermentationen. Ich stimme der Meinung des Bandherausgebers im Vorwort zu, daß in dieser Auflage die Behandlung der Regelung von Aufarbeitungsprozessen