

Die fünf Fluoratome sind nahezu in einer Ebene angeordnet, und das Xenonatom befindet sich nur 2.5(1) pm oberhalb der besten Ebene durch die Fluoratome, d. h. die O-Xe-F-Winkel sind mit einer Ausnahme (89.1(1)°) geringfügig größer als 90° (90.6–91.8(1)°). Allerdings weichen die Fluoratome bis zu 2.9(2) pm von dieser besten Ebene ab. Auch diese geringfügigen Abweichungen von der C_{5v} -Symmetrie können durch intermolekulare Wechselwirkungen erklärt werden. Die F-Xe-F-Winkel liegen zwischen 71.2(1) und 74.0(1)° und streuen damit nur geringfügig um den idealen Wert von 72°, der bei einem planaren XeF_5 -Molekülteil vorläge.

Warum nun verhält sich $XeOF_5^-$ so anders als IF_6^- ? Zunächst muß angenommen werden, daß die Sauerstoff-Xenon-Bindung wegen ihres partiellen Doppelbindungscharakters erheblich mehr Platz beansprucht als die Fluoratome; die apikale Position der pentagonalen Pyramide ist für einen solchen besonders großen Liganden sehr gut geeignet; das nichtbindende Elektronenpaar ist in der gegenüberliegenden apikalen Position zu vermuten. $XeOF_5^-$ ist anders als BrF_6^- und XeF_8^{2-} [12, 13] koordinativ nicht vollständig gesättigt, wie die intermolekularen Xe-F-Abstände zu zwei weiteren Fluoratomen von 278.4 und 298.5 pm zeigen, so daß auch das nichtbindende Elektronenpaar Platz hat. Andererseits sind diese intermolekularen Wechselwirkungen schwach, so daß sie keinen starken strukturbestimmenden Einfluß haben. Bislang ist uns ein für die Messung hochaufgelöster Kernresonanzspektren geeignetes Lösungsmittel für $NO^+XeOF_5^-$ nicht bekannt. In Acetonitril löst sich $NO^+XeOF_5^-$; im ^{19}F -NMR-Spektrum wird bei -40° ein breites Signal (600 Hz) bei $\delta = 141$ beobachtet, das mit einem intermolekularen Fluoraustausch erklärt wird.

Experimentelles

$XeOF_4$ und NOF werden im Vakuum (Edelstahlvakuumapparatur) in ein Perfluoräthylen-propen-(TeflonFEP)-Rohr im ungefähren Molverhältnis 1:1 einkondensiert und das Rohr abgeschmolzen. Die flüssige Phase verfestigt sich etwas unterhalb von Raumtemperatur zu großen Kristallen, die zum Teil auch durch Sublimation gebildet werden.

Kristallstrukturanalyse: Ein geeigneter Kristall mit Abmessungen von $0.4 \times 0.4 \times 0.4$ mm wird unter Kühlung auf ein Enraf-Nonius-CAD4-Diffraktometer montiert und bei $-153^\circ C$ vermessen. $a = 669.8(1)$, $b = 551.0(1)$, $c = 1425.1(2)$ pm, $\beta = 101.21(2)^\circ$, $V = 515.9(1) \times 10^6$ pm³, P_2/n (Nr. 14), $Z = 4$, $2\theta_{max} = 90^\circ$, $MoK\alpha$, 71.069 pm, ω -Scan, 4275 gemessene, 4169 unabhängige, 4150 benutzte Reflexe, Lorentz-Polarisations-Korrektur, Diffraktionsabsorptionskorrektur [14], $\mu = 68.3$ mm⁻¹, min./max. Korrektur 0.73/1.10, Strukturösungen mit dem Programm SHELXS 86 [15], Strukturverfeinerung mit SHELXL 93 [16], 83 Parameter, $R_1 = 0.0296$, $wR_2 = 0.0806$, Extinktionskoeffizient 0.0114(9), Restelektrodenichte $2.7 e^- \times 10^6$ pm⁻³ (80 pm vom Xenonatom). Weitere Einzelheiten zur Kristallstrukturanalyse können beim Fachinformationszentrum Karlsruhe, D-76344 Eggenstein-Leopoldshafen, unter Angabe der Hinterlegungsnummer CSD-58969 angefordert werden.

Eingegangen am 15. März 1995 [Z 7798]

Stichworte: Fluorverbindungen · Xenonverbindungen

- [1] J. F. Martins, E. B. Wilson, Jr., *J. Mol. Spectr.* **1968**, *26*, 410–417; *J. Chem. Phys.* **1964**, *41*, 570–571; E. J. Jacob, H. B. Thompson, L. S. Bartlett, *J. Mol. Struct.* **1971**, *8*, 383–394.
- [2] A. G. Robiette, R. H. Bradley, P. N. Brier, *J. Chem. Soc. D* **1971**, 1567–1568.
- [3] A. J. Edwards, P. Taylor, *J. Chem. Soc. Dalton Trans.* **1975**, 2174–2177.
- [4] H. Selig, *Inorg. Chem.* **1966**, *5*, 183–186; D. E. McKee, C. J. Adams, A. Zalkin, N. Bartlett, *J. Chem. Soc. Chem. Commun.* **1973**, 26–28; D. E. McKee, C. J. Adams, N. Bartlett, *Inorg. Chem.* **1973**, *12*, 1722–1725; R. J. Gillespie, G. J. Schrobilgen, *ibid.* **1974**, *13*, 2370–2374.
- [5] K. O. Christe, *Inorg. Chem.* **1972**, *11*, 1215–1219; A. R. Mahjoub, A. Hoser, J. Fuchs, K. Seppelt, *Angew. Chem.* **1989**, *101*, 1528–1529; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1989**, *28*, 1526–1527.
- [6] J. H. Holloway, V. Kaucic, D. Martin-Rovet, D. R. Russell, G. J. Schrobilgen, H. Selig, *Inorg. Chem.* **1985**, *24*, 678–683; G. J. Schrobilgen, D. Martin-Rovet, P. Charpin, M. Lance, *J. Chem. Soc. Chem. Commun.* **1980**, 894–897.

- [7] A. R. Mahjoub, K. Seppelt, *Angew. Chem.* **1991**, *103*, 309–311; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1991**, *30*, 323–324.
- [8] R. D. Burbank, G. R. Jones, *J. Am. Chem. Soc.* **1974**, *96*, 43–48.
- [9] H. H. Rupp, K. Seppelt, *Angew. Chem.* **1974**, *86*, 669–670; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1974**, *13*, 612–613; K. Seppelt, H. H. Rupp, *Z. Anorg. Allg. Chem.* **1974**, *409*, 331–337; K. Seppelt, N. Bartlett, *ibid.* **1977**, *436*, 122–126; G. J. Schrobilgen, J. H. Holloway, P. Granger, C. Brevard, *Inorg. Chem.* **1978**, *17*, 980–987.
- [10] K. O. Christe, D. A. Dixon, J. C. P. Sanders, G. J. Schrobilgen, S. S. Tsai, W. W. Wilson, *Inorg. Chem.* **1995**, *34*, 1868.
- [11] G. J. Moody, H. Selig, *Inorg. Nucl. Chem. Lett.* **1966**, *2*, 319–320.
- [12] A. R. Mahjoub, A. Hoser, J. Fuchs, K. Seppelt, *Angew. Chem.* **1989**, *101*, 1528–1529; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1989**, *28*, 1526–1527; A. R. Mahjoub, X. Zhang, K. Seppelt, *Chem. Eur. J.* **1995**, *1*, Nr. 4.
- [13] S. W. Peterson, J. H. Holloway, B. A. Coyle, J. M. Williams, *Science* **1971**, *173*, 1238–1239.
- [14] N. Walker, D. Stuart, *Acta Crystallogr. Sect. A* **1983**, *39*, 158–166.
- [15] G. M. Sheldrick, *Program for Crystal Structure Solution*, Universität Göttingen, **1986**.
- [16] G. M. Sheldrick, SHELXL 93, Universität Göttingen, **1993**.

Neuartige Kupferproteine durch Zugabe von Anionen zur Mutante Met121Gly von *Pseudomonas-aeruginosa*-Azurin**

Momcilo Vidakovic und Juris P. Germanas*

Blaue Kupferproteine sind in der Natur weit verbreitet und fungieren als Elektronenüberträger in wichtigen biologischen Prozessen wie der Photosynthese oder dem Stoffwechsel^[1]. Die einzigartigen spektrochemischen Eigenschaften dieser Proteine sind schon lange Gegenstand der Bioanorganischen Chemie^[2]. Proteine im oxidierten Zustand (Kupfer(II)) haben eine intensive Absorptionsbande um etwa 600 nm ($\epsilon = 2000$ bis 6000 m⁻¹cm⁻¹), ein EPR-Spektrum mit ungewöhnlich kleiner Kupfer-Hyperfeinaufspaltung ($I = 3/2$, $A_{||} \leq 70 \times 10^{-1}$ cm⁻¹) und anomal hohe Redoxpotentiale für das Cu^{II}/Cu^I-Paar (180 bis 680 mV gegen die Normalwasserstoffelektrode (NHE)). Eine kristallographische Analyse ergab, daß das Kupfer(II)-Ion in diesen Proteinen mit einem Satz Liganden, der aus zwei Histidinresten und einem Cysteinrest besteht, in etwa trigonal-planar koordiniert ist^[3]. Neben diesen drei starken Wechselwirkungen treten normalerweise noch schwächere axiale Wechselwirkungen mit dem Kupfer-Ion durch andere Liganden auf. In Azurin und Plastocyanin zum Beispiel steht das Thioether-Schwefelatom eines Methioninrests mit dem Kupferzentrum in Wechselwirkung, in Stellacyanin dagegen ist wahrscheinlich ein Carboxamid-Sauerstoffatom eines Glutaminrests am Metall koordiniert^[4]. Die Art der axialen Wechselwirkung soll die spektrochemischen Eigenschaften blauer Kupferzentren deutlich beeinflussen^[5]. Um die Wirkung axialer Liganden auf die spektroskopischen und elektrochemischen Eigenschaften blauer Kupferproteine zu überprüfen, stellten wir mit ortsspezifischer Mutagenese eine Variante von *Pseudomonas-aeruginosa*-Azurin her, Met121Gly-Azurin^[6], in der die schwach koordinierte

[*] Prof. J. P. Germanas, M. Vidakovic
Department of Chemistry, University of Houston
Houston, TX 77204-5641 (USA)
Telefax: 713/743-2709
E-mail: germanas@uh-edu

[**] Diese Arbeit wurde von der University of Houston und von American Cyanamid (Forschungsspendum der Fakultät an J. P. G.) gefördert. Die Autoren danken Prof. R. S. Czernuszewicz und G. Fraczekiewicz (University of Houston) für die Aufnahme der Resonanz-Raman-Spektren und Mr. V. Kurchev für seine Hilfe bei der Aufnahme der EPR-Spektren.

nierte ($R_{S-Cu} = 3.1 \text{ \AA}$) Thioetherseitenkette von Met121 durch ein Wasserstoffatom ersetzt ist. Dadurch wird ein Hohlraum geschaffen, der von externen Liganden besetzt werden kann^[7]. Wir berichten nun über die Herstellung und Charakterisierung präzedenzloser Kupferproteine, deren spektroskopische Eigenschaften sich von denen aller bekannten natürlich vorkommenden Kupferproteine unterscheiden^[8]. Erhalten wurden diese Proteine durch Zugabe der Anionen N_3^- , SCN^- und CN^- zu Met121Gly-Azurin.

Die UV/Vis-Spektren blauer Kupferproteine zeigen eine charakteristische Absorptionsbande bei etwa 600 nm, die durch einen Ligand-Metall-Charge-Transfer (LMCT) von $S_{Cys}(\pi)$ nach Kupfer(II) hervorgerufen wird, sowie eine weitere Bande bei etwa 450 nm, erzeugt von einem LMCT von S_{Cys} (pseudo- σ) nach Kupfer(II)^[9]. Die relativen Intensitäten der beiden Banden variieren in Abhängigkeit vom jeweils betrachteten Protein. Ein Zusammenhang zwischen der relativen Intensität der Bande bei 450 nm und der axialen Verschiebung des Kupferatoms aus der Ebene, die vom His_2Cys -Ligandensatz gebildet wird, wurde bereits bei einer ganzen Reihe von blauen Kupferproteinen festgestellt^[10]. Bei Titration von Met121Gly-Azurin mit Azid, Thiocyanat oder Cyanid verschwand die intensive Absorptionsbande des nichtkomplexierten Proteins bei 614 nm, und es erschien eine neue, schwächere Bande bei etwa 420 nm sowie ein Signal bei etwa 590 nm (Tabelle 1)^[11]. Die Wellenlängen der Übergänge bei 420 nm waren vom jeweiligen Anion abhängig, was darauf hindeutet, daß sich das Anion direkt an das Kupfer(II)-Ion anlagerte. Die höheren Intensitäten der 420-nm-Banden relativ zu den 590-nm-Banden in den Spektren der Protein-Ligand-Addukte weisen auf einen vergrößerten Abstand zwischen dem Kupfer(II)-Ion und der His_2Cys -Ligandenebene des Proteins relativ zum Abstand in der nichtkomplexierten Form hin^[10]. Die Bildungskonstanten der 1:1-Komplexe aus Anion und Protein, die spektroskopisch bestimmt wurden, zeigten, daß das Cyanidaddukt bedeutend stabiler ist als die Azid- oder Thiocyanataddukte (Tabelle 1).

Resonanz-Raman-Spektren von Met121Gly-Azurin und seinen Anionenaddukten wurden mit Anregungswellenlängen von 568 nm (ohne Liganden) und 413 nm (Komplexe) aufgenommen. Das Ensemble von vier starken Banden im Spektrum des nichtkomplexierten Proteins^[12] wurde bei den Anionenaddukten durch ein Paar von Maxima bei niedrigerer Energie ersetzt (Abb. 1). Da die intensivste Bande in Resonanz-Raman-Spektren blauer Kupferproteine von einer vor allem von der Cu-S-Einheit herrührenden Streckschwingung stammt^[12], deutete die Verschiebung der intensiven Banden in den Spektren der Anionenaddukte zu niedrigeren Wellenzahlen darauf hin, daß in den Anionenkomplexen schwächere und damit längere Cu-S-Bindungen relativ zu dem nichtkomplexierten Protein vorlagen (Tabelle 1). Das Auftauchen von Banden in den Spektren der Addukte, die auf Bindungsdehnungen von Azid und Thiocyanat

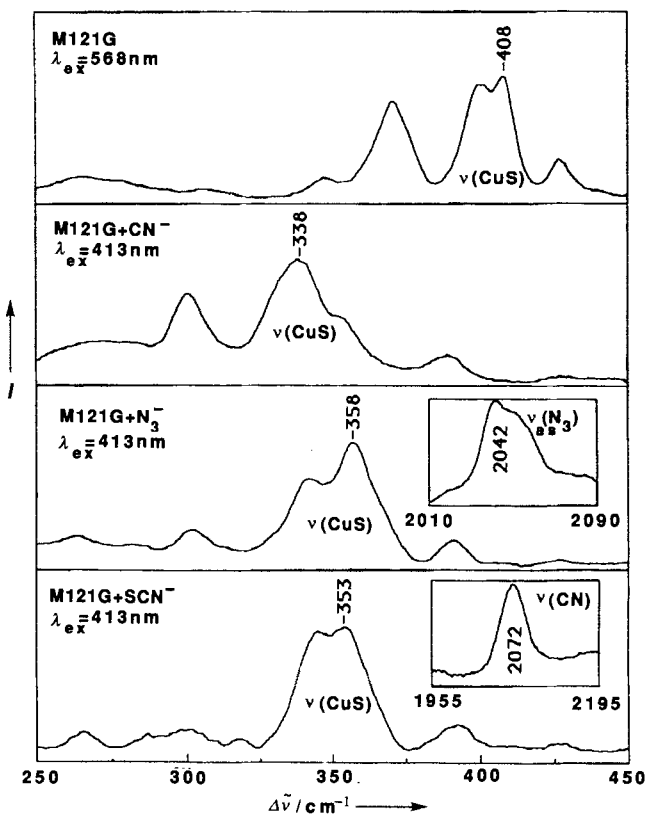


Abb. 1. Resonanz-Raman-Spektren von Met121Gly-Azurin, Met121Gly-Azurin + Cyanid, Met121Gly-Azurin + Azid, Met121Gly-Azurin + Thiocyanat (von oben). Die Anregungswellenlängen λ_{ex} für das jeweilige Protein sind angegeben.

zurückzuführen sind, bestätigte zusätzlich die direkte Koordination dieser Anionen an das Kupfer(II)-Ion von Met121Gly-Azurin (Abb. 1).

Die EPR-Spektren der 1:1-Komplexe spiegelten ebenfalls eine Veränderung der Ligandenumgebung des Kupferzentrums in den Protein-Anion-Addukten wider. Die Kupfer(II)-Zentren der Addukte ergaben axialsymmetrische EPR-Spektren, im Gegensatz zum nichtkomplexierten Protein, das ein EPR-Spektrum mit rhombischer Symmetrie aufwies (Abb. 2). Auffällig war, daß die Werte für die Kupfer-Hyperfeinkopplungskonstante ($A_{||}$) der Komplexe (Tabelle 1) um einiges oberhalb des Wertebereichs typischer blauer Kupferproteine lagen ($\leq \times 10^{-1} \text{ cm}^{-1}$)^[2]. Auftragungen von $g_{||}$ gegen $A_{||}$ von Kupferkomplexen ergeben oft lineare Abhängigkeiten für Verbindungen gleichen strukturellen oder elektronischen Ursprungs^[13]. Nach Auftragen von Werten für $g_{||}$ der Met121Gly-Anionenaddukte gegen die Werte für $A_{||}$ wurde eine lineare Beziehung

Tabelle 1. Spektroskopische und elektrochemische Eigenschaften von *P. aeruginosa*-Met121Gly-Azurin und seinen Anionenaddukten.

Protein/Anion	$\lambda_{max}(\epsilon)$ [a] [nm ($M^{-1} \text{ cm}^{-1}$)]	$\lambda_{max}(\epsilon)$ [a] [nm ($M^{-1} \text{ cm}^{-1}$)]	K_s [b] [M^{-1}]	$g_{ }$ [c]	$A_{ }$ [c] [10^{-4} cm^{-1}]	E° [d] [mV vs. NHE]	$\Delta\nu$ [e] [cm^{-1}]
Wildtyp-Azurin	628 (5300)	—	—	2.259	58 [f]	293	408
M121G Azurin	614 (3500)	456 (560)	—	2.270	53 [f]	261	408
M121G + N_3^-	590 (950)	420 (2000)	30	2.247	101	239	358
M121G + SCN^-	582 (1100)	416 (2020)	30	2.205	89	234	353
M121G + CN^-	580 (950)	432 (1990)	1800	2.216	106	nd [g]	338

[a] Optische Absorptionsmaxima und Extinktionskoeffizienten von S_{Cys} -Cu-CT-Banden lagen bei 600 und 400 nm. [b] Protein-Liganden-Assoziationskonstante bei 23 °C. [c] X-Band-EPR Parameter ($g_x = g_{||}$; $A_x = A_{||}$ für die Aufspaltung aufgrund des Kupfer-Kernspins, $I = 3/2$). [d] Äquivalenzpunkt-Redoxpotential bei 23 °C, 0.1 M NaCl, 0.3 M Ligand, 20 mM Tris-Puffer · HCl, pH 8.0. [e] Häufigkeit des intensivsten Maximums des Resonanz-Raman-Spektrums. [f] Durch Computersimulation des Spektrums bestimmt. [g] Nicht bestimmt.

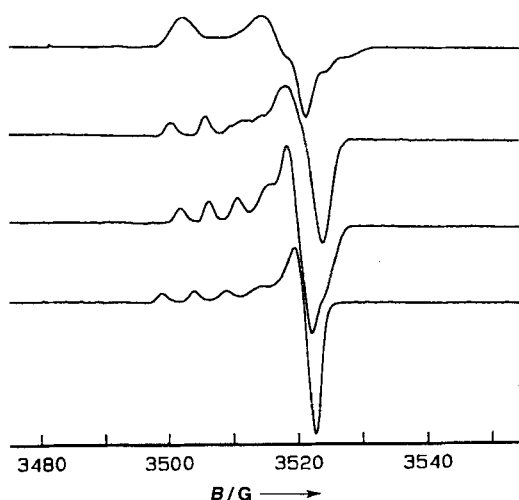


Abb. 2. X-Band-EPR-Spektren bei 77 K von Met121Gly-*P.-aeruginosa*-Azurin und seinen Anionaddukten. Die abgebildeten Spektren stammen von Met121Gly-Azurin, Met121Gly-Azurin + Cyanid, Met121Gly-Azurin + Thiocyanat und Met121Gly-Azurin + Azid (von oben).

erhalten ($R = 0.95$), die sich von den für blaue oder Typ2(tetragonale)-Kupferzentren erhaltenen unterscheiden. Variationen in den exakten Werten der EPR-Parameter für die Addukte spiegeln kleine strukturelle Unterschiede im Ligandenumfeld des Kupferatoms jedes Addukts wider^[13].

Die Äquivalenzpunkt-Redoxpotentiale von Met121Gly-Azurin und seinen Anionaddukten wurde durch potentiometrische Titration bestimmt. Bindung von Thiocyanat oder Azid an das Kupfer(II)-Ion des Proteins erzeugte Formen mit niedrigerem Redoxpotential als das freie Protein (Tabelle 1). Das Äquivalenzpunkt-Potential des Cyanidadduktes konnte wegen kompetitiver Oxidation des Cyanids nicht mit dieser Methode bestimmt werden. Die niedrigeren Potentiale der beiden Anionaddukte relativ zum Potential von Met121Gly-Azurin können durch eine elektrostatische Stabilisierung des Kupfers in seinem höheren Oxidationszustand durch die negativ geladenen Liganden erklärt werden.

Die spektroskopischen Eigenschaften von Met12Gly-Azurin-Anionaddukten weisen auf eine neue Form der Bindung von Kupfer an ein Protein hin, was zu spektroskopischen Eigenschaften führt, die sowohl von denen der blauen als auch denen der Typ2-Kupferproteine verschieden sind. Einem computergenerierten Modell für das aktive Zentrum von Met121Gly zufolge^[14] führt die Koordination externer Liganden an das Kupfer(II)-Ion an der Stelle, die vorher von der Met121-Seitenkette eingenommen wurde, zu einem verzerrt tetraedrisch umgebenen Metallzentrum. Die Bindung von Anionen an das Kupfer(II)-Ion sollte außerdem zu einer Verlängerung der anderen Metall-Liganden-Bindungen führen. Absorptions- und Resonanz-Raman-Spektren der Met121Gly-Azurin-Anionkomplexe spiegeln eine deutliche axiale Verschiebung des Kupferatoms aus der Ebene des His₂Cys-Ligandensatzes wider sowie eine Verlängerung der S_{Cys}-Cu-Bindung^[10, 12]. Die Werte für die parallele Hyperfeinaufspaltung in den EPR-Spektren der 1:1-Komplexe sind in Übereinstimmung mit einer Verringerung des kovalenten Charakters der S_{Cys}-Cu-Bindung verglichen mit dem in der nichtkomplexierten Form, was von der Verlängerung der S-Cu-Bindung herrührt^[15]. In natürlichen blauen Kupferproteinen mit verzerrt tetraedrisch umgebenen Metallzentren und kurzen axialen Wechselwirkungen mit neutralen Donorliganden zeigen die Absorptionsspektren intensive Banden bei etwa 450 nm, und ESR-Spektren deuten auf einen rhombischen

g-Tensor hin^[2]. Absorptionsspektren mit einem λ_{\max} bei etwa 420 nm und axialsymmetrische EPR-Spektren der Met121Gly-Azurin-Anionaddukte zeigen eine einzigartige elektronische Struktur der Kupferzentren in diesen Proteinen an, die aus dem anionischen Charakter der axialen Liganden resultiert. Eine weitere Bestätigung des vorgestellten Modells für die Met121Gly-Azurin-Anionaddukt-Kupferzentren ergibt sich aus den Eigenschaften bereits strukturell charakterisierter Komplexe mit pseudotetraedrisch umgebenem Kupfer, deren spektroskopische Eigenschaften denen der hier beschriebenen Addukte bemerkenswert ähneln^[16].

Eine Vielzahl ungewöhnlicher Kupferproteine kann einfach durch Zugabe externer anionischer Liganden zu der Azurin-Mutante Met121Gly erzeugt werden. Mit der Möglichkeit, für Liganden zugängliche Metallzentren in koordinativ gesättigten Metalloproteinen durch ortsspezifische Mutagenese erzeugen zu können, scheint auch die Herstellung von Metalloproteinen, die als selektive Ionensensoren eingesetzt werden können, nähergerückt. Weitere Untersuchungen, die auf eine detaillierte Charakterisierung der elektronischen und geometrischen Verhältnisse sowie der Elektronentransfereigenschaften der aktiven Zentren dieser ungewöhnlichen Proteine abzielen, sind im Gange.

Eingegangen am 24. Januar 1995 [Z 7656]

Stichworte: EPR-Spektroskopie · Kupferverbindungen · Metalloproteine · Mutagenese · Raman-Spektroskopie

- [1] a) E. T. Adman, *Adv. Protein Chem.* **1991**, *42*, 145–197; b) E. T. Adman in *Topics in Molecular and Structural Biology. Metalloproteins* (Hrsg.: P. M. Harrison) MacMillan, New York, **1986**, S. 1–42.
- [2] E. I. Solomon, M. J. Baldwin, M. D. Lowery, *Chem. Rev.* **1992**, *92*, 521–542.
- [3] a) *P.-aeruginosa*-Azurin: H. Nar, A. Messerschmidt, R. Huber, M. van de Kamp, G. W. Canters, *J. Mol. Biol.* **1991**, *221*, 765–772; E. T. Adman, L. H. Jensen, *Isr. J. Chem.* **1981**, *21*, 8–12; b) *A.-denitrificans*-Azurin: G. E. Norris, B. F. Anderson, E. N. Baker, *J. Mol. Biol.* **1983**, *165*, 501–521; c) Pappel-Plastocyanin: J. M. Guss, H. C. Freeman, *ibid.* **1983**, *169*, 521–563; d) Basisches blaues Protein aus Gurke: J. M. Guss, E. A. Merritt, R. P. Phizackerley, B. Hedman, M. Murata, K. O. Hodgson, H. C. Freeman, *Science* **1988**, *241*, 806–811; e) Ascorbin-Oxidase: A. Messerschmidt, A. Rossi, R. Ladenstein, R. Huber, M. Bolognesi, G. Gatti, A. Marchesini, R. Petruzzelli, A. Finazzi-Agro, *J. Mol. Biol.* **1989**, *206*, 513–529; f) *A.-cycloclastes*-Nitrit-Reduktase: J. W. Godden, S. Turley, D. C. Teller, E. T. Adman, M. Y. Liu, W. J. Payne, J. LeGall, *Science* **1991**, *253*, 438–442.
- [4] a) Dreidimensionales Modell von Stellacyanin, B. A. Fields, J. M. Guss, H. C. Freeman, *J. Mol. Biol.* **1991**, *222*, 1053–1065; b) ENDOR-Nachweis der Koordination von Gln in Stellacyanin: H. Thomann, M. Bernardo, M. J. Baldwin, M. D. Lowery, E. I. Solomon, *J. Am. Chem. Soc.* **1991**, *113*, 5911–5913; c) *Alcaligenes-denitrificans*-Azurin-Mutante mit spektroskopischen Ähnlichkeiten zu Stellacyanin: A. Romero, C. W. G. Hoitink, H. Nar, R. Huber, A. Messerschmidt, G. W. Canters, *J. Mol. Biol.* **1993**, *229*, 1007–1021.
- [5] a) A. A. Gewirth, S. L. Cohen, H. J. Schugar, E. I. Solomon, *Inorg. Chem.* **1987**, *26*, 1133–1146; b) H. B. Gray, B. G. Malmstrom, *Comments Inorg. Chem.* **1983**, *2*, 203–209.
- [6] a) T. K. Chang, S. A. Iverson, C. N. Kiser, A. N. Lew, C. Rodrigues, J. P. Germanas, J. H. Richards, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1991**, *88*, 1325–1329; b) B. G. Karlsson, M. Nordling, T. Pascher, L.-C. Tsai, L. Sjölin, G. Lundberg, *Protein Eng.* **1991**, *4*, 343–349.
- [7] Regeneration blauer Kupferzentren durch Zugabe externer Liganden zu einer Typ-2-Azurin-Mutante: T. den Blaauwen, G. W. Canters, *J. Am. Chem. Soc.* **1993**, *115*, 1121–1129.
- [8] Diese Arbeit wurde zum ersten Mal auf dem Symposium „Copper Coordination Chemistry: Bioinorganic Perspectives“, 3.–7. August 1992, vorgestellt (Präsentation p56). Während diese Arbeit durchgeführt wurde, publizierten Pascher et al. UV/Vis- und EPR-Daten von zwei Azurin-Mutanten, Met121Glu und Met121Lys, bei hohem pH-Wert (T. Pascher, B. G. Karlsson, M. Nordling, B. G. Malmstrom, T. Vanngard, *Eur. J. Biochem.* **1993**, *212*, 289–296), die denen der hier diskutierten Met121Gly-Anionkomplexe ähneln; die Ähnlichkeiten der spektroskopischen Daten deuten darauf hin, daß die Seitenkette von Position 121 in den erstgenannten Proteinen am Kupfer(II)-Ion koordiniert.
- [9] A. A. Gewirth, E. I. Solomon, *J. Am. Chem. Soc.* **1988**, *110*, 8311–8320.

- [10] a) J. Han, T. M. Loehr, Y. Lu, J. S. Valentine, B. A. Averill, J. Sanders-Loehr, *J. Am. Chem. Soc.* **1993**, *115*, 4256–4263; b) Y. Lu, L. B. LaCroix, M. D. Lowery, E. I. Solomon, C. J. Bender, J. Peisach, J. A. Roe, E. Gralla, J. S. Valentine, *ibid.* **1993**, *115*, 5907–5918.
- [11] Es wurden keine Veränderungen im UV-VIS-Spektrum von Met121Gly-Azurin in Gegenwart der folgenden Anionen ($c > 2$ M bei pH 8.0 festgestellt: Acetat, Bromid, Chlorid, Cyanat, Fluorid, Nitrid oder Phosphat.
- [12] B. C. Dave, J. P. Germanas, R. S. Czernuszewicz, *J. Am. Chem. Soc.* **1993**, *115*, 12175–12176.
- [13] a) A. W. Addison in *Copper Coordination Chemistry: Biochemical and Inorganic Perspectives* (Hrsg.: K. D. Karlin, J. Zubietta) Adenine, New York, **1985**, S. 109–128; b) J. Peisach, W. E. Blumberg, *Arch. Biochem. Biophys.* **1974**, *165*, 691–708.
- [14] Durchgeführt mit Hilfe von „Quanta Package“ anhand der von Nar et al. [3a] beschriebenen Struktur als Grundlage.
- [15] S. E. Shadle, J. E. Penner-Hahn, H. J. Schugar, B. Hedman, K. O. Hodgson, E. I. Solomon, *J. Am. Chem. Soc.* **1993**, *115*, 767–776.
- [16] O. P. Anderson, J. Becher, H. Frydendahl, L. F. Taylor, H. Toftlund, *J. Chem. Soc. Chem. Commun.* **1986**, 699–701.

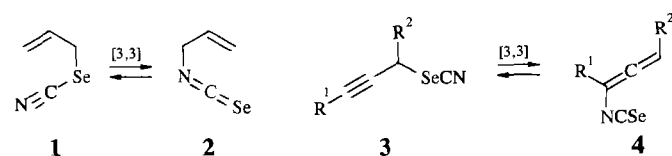
Synthese und Reaktionen von Vinylisosenocyanaten**

Klaus Banert* und Christoph Toth

Professor Harald Günther zum 60. Geburtstag gewidmet

Die Existenz von Isosenocyanaten („Selenosenölen“) war lange Zeit unsicher^[1]; in den letzten Jahren ist jedoch die Synthese diverser Aryl- und Alkylderivate gelungen^[2]. Dagegen waren Vinylisosenocyanate unseres Wissens bisher unbekannt. Wir berichten über Isomerisierungsreaktionen, die sich von der bekannten Äquibrierung^[3] von Allylselenocyanat **1** und Allylselenocyanat **2** ableiten, jedoch erstmals die Isosenocyanato-Funktion in eine Vinyl-Position dirigieren. Über diese [3,3]-sigmatropen Umlagerungen gelingt die Synthese der hochreaktiven Allenylisosenocyanate **4** sowie der Isosenocyanat-substituierten 1,3-Butadiene **11** und **15**.

Über eine Gasphasenthermolyse^[4] der Prop-2-ynylselenocyanate **3**^[5] stellt sich ein Gleichgewicht mit den Allenen **4** ein (Schema 1), die wegen ihrer ausgeprägten Neigung zur Polymerisation nur in Lösung zu handhaben sind, aber dennoch durch Flash-Chromatographie (SiO₂, Hexan/Et₂O 10:1) gereinigt werden können (Charakterisierung siehe Tabelle 1). Erneute



Schema 1. **3a**, **4a**: R¹ = R² = H; **3b**, **4b**: R¹ = H, R² = Me; **3c**, **4c**: R¹ = Me, R² = H. Ausbeuten bezogen auf umgesetztes **3**: **4a** 80%, **4b** 82%, **4c** 76%; Gleichgewichtslagen: **3a**:**4a** = 37:63; **3b**:**4b** = 17:83; **3c**:**4c** = 79:21.

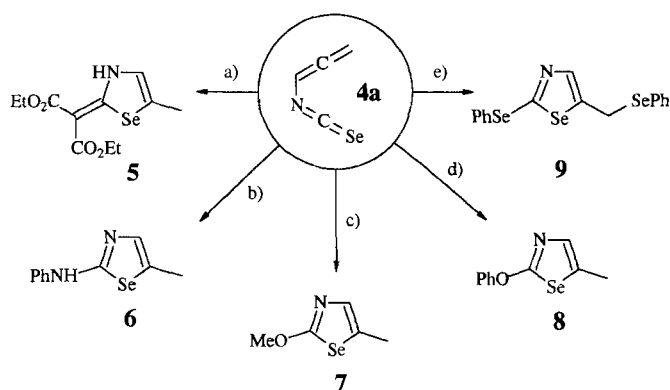
Tabelle 1. Ausgewählte physikalische Daten der Verbindungen **4a–c**, **5** und **9** [a].

4a : ¹ H-NMR: δ = 5.44 (d, ⁴ J = 6.4, 2H; H-3), 6.16 (t, ⁴ J = 6.4, 1H; H-1); ¹³ C-NMR: δ = 86.30 (t; C-3), 89.51 (br. d; C-1), 128.40 (v. br. s; NCSe), 210.88 (s; C-2); GC-MS: m/z (%): 145 (82) [M ⁺], 118 (38) [M ⁺ – HCN], 39 (100) [C ₃ H ₃ ⁺]; IR (CCl ₄): ν̄ = 2080 (NCSe)
4b : ¹ H-NMR: δ = 1.79 (dd, ³ J = 7.4, ⁵ J = 2.7, 3H; H-4), 5.80 (dq, ³ J = 7.4, ⁴ J = 5.9, 1H; H-3), 6.03 (dq, ⁴ J = 5.9, ⁵ J = 2.7, 1H; H-1); ¹³ C-NMR: δ = 13.62 (q; C-4), 87.94 (br. d; C-1), 97.63 (d; C-3), 126.90 (br. s; NCSe), 206.26 (s; C-2)
4c : ¹ H-NMR: δ = 1.96 (t, ⁵ J = 3.2, 3H; CH ₃), 5.24 (q, ⁵ J = 3.2, 2H; CH ₂); ¹³ C-NMR: δ = 18.97 (q; CH ₃), 83.73 (t; CH ₂), 98.75 (br. s; CNCSe), 128.18 (br. s; NCSe), 208.03 (s; C-2)
5 : gelbe Kristalle; Schmp. 128 °C; ¹ H-NMR: δ = 1.35 (t, ³ J = 7.1, 6H; CH ₂ CH ₃), 2.37 (d, ⁴ J = 1.5, 3H; 5-CH ₃), 4.27 (q, ³ J = 7.1, 4H; CH ₂), 6.92 (q, ⁴ J = 1.5, 1H; H-4), 12.70 (s, 1H; NH); ¹³ C-NMR: δ = 13.68 (q, 2C; CH ₂ CH ₃), 14.36 (q; 5-CH ₃), 60.10 (t, 2C; CH ₂ CH ₃), 87.62 (s; C(CO ₂ Et) ₂), 122.48 (d; C-4), 128.40 (s; C-5), 168.00 (s), 175.00 (s); IR (CCl ₄): ν̄ = 1650 (C=O), 1620 (C=O), 1250 (C–O); korrekte Elementaranalyse für C ₁₁ H ₁₅ NO ₄ Se
9 : hellrote, zähe Flüssigkeit; ¹ H-NMR: δ = 4.21 (d, ⁴ J = 0.9, 2H; CH ₂), 7.20–7.80 (m, 11H; 2 × Ph und H-4); ¹³ C-NMR: δ = 25.35 (t; CH ₂), 127.85 (d; Ph), 128.56 (s; C-5), 129.34 (d; Ph), 129.50 (d; Ph), 129.80 (d; Ph), 133.80 (d; Ph), 135.98 (d; Ph), 142.37 (d; C-4), 143.59 (s; i-Ph), 146.15 (s; i-Ph), 164.85 (s; C-2); korrekte Elementaranalyse des Pikrats für C ₂₂ H ₁₆ N ₄ O ₇ Se ₃

[a] ¹H-NMR (CDCl₃, 300 oder 200 MHz, J in Hz), ¹³C-NMR (CDCl₃, 75 oder 50 MHz, J in Hz), MS (EI, 70 eV, korrekte Isotopenverteilung), IR (ν̄ in cm^{–1}), Elementaranalyse (C,H,N).

Gasphasenthermolyse von **4a** belegt die Äquibrierung **3a** ⇌ **4a**^[6].

Im Gegensatz zu Allenylisocyanaten^[7], aber analog Allenylisothiocyanaten^[8] liefern die Verbindungen **4** mit Kohlenstoff-, Stickstoff-, Sauerstoff- oder Selen-Nucleophilen heterocyclische Produkte (Schema 2). Die Umsetzungen zu den Selenazolen **5–9**^[9] (Tabelle 1) zeigen, daß **4a** deutlich langsamer mit Nucleophilen reagiert als das ungewöhnlich reaktive Allenylisocyanat^[8].



Schema 2. Umsetzungen von **4a** mit Nucleophilen zu den Selenazolen **5–9**: a) NaH, THF, CH₂(CO₂Et)₂, dann **4a**, 20 °C, 2 h, dann NH₄Cl, H₂O (65%); b) PhNH₂, Et₂O, Hexan, 60 °C, 17 h (60%); c) MeOH, 60 °C, 24 h (50%); d) PhOH, NEt₃, Et₂O, Hexan, 60 °C, 48 h (88%); e) NaH, THF, Ph₂Se₂ (Überschuß), 75 °C, 1.5 h, dann **4a**, 40 °C, 5 h und 20 °C, 16 h, dann NH₄Cl, H₂O (50%).

Nicht nur die Prop-2-ynylselenocyanate **3**, sondern auch die Buta-2,3-dienylselenocyanate **10b** und **10d**, die aus den Vorläufern **10a**^[10] bzw. **10c**^[11] und Kaliumselenocyanat leicht zugänglich sind, eignen sich für Umlagerungen, die eine Isosenocyanato-Funktion in eine Vinyl-Position dirigieren. Durch Gasphasenthermolyse^[4] (bei **10d** auch durch Thermolyse in Lösung) entstehen aus **10b** und **10d** praktisch irreversibel die 1,3-Diene **11a** bzw. **11b** (Schema 3, Tabelle 2). Mit den reaktiven Dienophilen **12** geht **11b** [4 + 2]-Cycloadditionen unter Bildung von **13** ein.

[*] Prof. Dr. K. Banert, Dipl.-Chem. C. Toth
Lehrstuhl für Organische Chemie der Technischen Universität Chemnitz-Zwickau
Straße der Nationen 62, D-09111 Chemnitz
Telefax: Int. + 371/531-1839
E-mail: email@chemie.tu-chemnitz.de

[**] Umlagerungsreaktionen. 5. Mitteilung. Diese Arbeit wurde von der Deutschen Forschungsgemeinschaft und dem Fonds der Chemischen Industrie gefördert.
– 4. Mitteilung: K. Banert, S. Groth, H. Hückstädt, K. Vrobel, *Phosphorus Sulfur Silicon Relat. Elem.* **1994**, *95–96*, 323–324.