

10: $^1\text{H-NMR}$ (600 MHz, CDCl_3): δ = 2.01, 2.03, 2.10 (3 s, 3 H, OAc), 3.09 (ddd, J = 12.0, 6.1, 3.7 Hz, 1 H, 2-H), 3.58 (d, J = 6.1 Hz, 1 H, 7-H), 3.76, 3.78 (2 s, 3 H, CO_2Me), 4.08 (dd, J = 12.6, 2.2 Hz, 1 H, 6-H), 4.17 (ddd, J = 10.3, 4.0, 2.2 Hz, 1 H, 5-H), 4.33 (dd, J = 12.6, 4.0 Hz, 1 H, 6'-H), 5.07 (dd, J = 10.3, 9.3 Hz, 1 H, 4-H), 5.45 (dd, J = 12.0, 9.3 Hz, 1 H, 3-H), 6.70 (d, J = 3.7 Hz, 1 H, 1-H). $^{13}\text{C-NMR}$ (151 MHz, CDCl_3): δ = 20.4, 20.5, 20.6 (3 q, OAc), 42.1, 49.1 (2 d, C-2, C-7), 53.0, 53.2 (2 q, CO_2Me), 61.3 (t, C-6), 68.9, 69.4, 70.3 (3 d, C-3, C-4, C-5), 97.3 (d, C-1), 167.2, 167.4, 169.5, 169.7, 170.5 (5 s, OAc, CO_2Me). Sirup, $[\alpha]_D^{20}$ = +138.7 (c = 0.86, CHCl_3). Anal. ber. für $\text{C}_{17}\text{H}_{23}\text{NO}_{14}$: C 43.88, H 4.98, N 3.01; gef.: C 44.12, H 5.14, N 2.79.

Eingegangen am 1. April 1996 [Z 8989]

Stichworte: Cerverbindungen · Kohlenhydrate · Manganverbindungen · Radikalreaktionen

- [1] a) D. Rouzaud, P. Sinaÿ, *J. Chem. Soc. Chem. Commun.* **1983**, 1353–1354; b) S. Hanessian, M. Martin, R. C. Desai, *ibid.* **1986**, 926–927; c) H. Dietrich, R. R. Schmidt, *Liebigs Ann. Chem.* **1994**, 975–981; d) R. W. Armstrong, D. P. Sutherlin, *Tetrahedron Lett.* **1994**, 35, 7743–7746; e) O. Eyrich, W.-D. Fessner, *Angew. Chem.* **1995**, 107, 1738–1740; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1995**, 34, 1639–1641.
- [2] a) Y. Wang, S. A. Babirad, Y. Kishi, *J. Org. Chem.* **1992**, 57, 468–481; b) Y. Wang, P. G. Goekjian, D. M. Ryckman, W. H. Miller, S. A. Babirad, Y. Kishi, *ibid.* **1992**, 57, 482–489; c) J.-F. Espinosa, H. Dietrich, M. Martin-Lomas, R. R. Schmidt, J. Jiménez-Barbero, *Tetrahedron Lett.* **1996**, 37, 1467–1470.
- [3] a) B. Giese, T. Witzel, *Angew. Chem.* **1986**, 98, 459–460; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1986**, 25, 450–451; b) B. Giese, M. Hoch, C. Lamberth, R. R. Schmidt, *Tetrahedron Lett.* **1988**, 29, 1375–1378; c) A. Chénédé, E. Perrin, E. D. Reikai, P. Sinaÿ, *Synlett* **1994**, 420–422; d) R. Ferritto, P. Vogel, *Tetrahedron Lett.* **1995**, 36, 3517–3518.
- [4] Übersichten: a) S. Hanessian, A. G. Pernet, *Adv. Carbohydr. Chem. Biochem.* **1976**, 33, 111–188; b) M. H. D. Postema, *Tetrahedron* **1992**, 48, 8545–8599.
- [5] a) R. H. Hall, K. Bischofberger, A. J. Brink, O. G. de Villiers, A. Jordaan, *J. Chem. Soc. Perkin Trans. 1* **1979**, 781–786; b) B. Fraser-Reid, L. Magdzinski, B. F. Molino, D. R. Mootoo, *J. Org. Chem.* **1987**, 52, 4495–4504.
- [6] a) B. Giese, J. A. González-Gómez, T. Witzel, *Angew. Chem.* **1984**, 96, 51–52; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1984**, 23, 69–70; b) B. Giese, K. Gröninger, *Tetrahedron Lett.* **1984**, 25, 2743–2764; c) M. E. Jung, S. W. T. Choe, *ibid.* **1993**, 34, 6247–6250.
- [7] Ausgewählte Beispiele für Additionen an Glycale: a) J. Thiem, H. Karl, J. Schwentner, *Synthesis* **1978**, 696–698; b) R. U. Lemieux, R. M. Ratcliffe, *Can. J. Chem.* **1979**, 57, 1244–1251; c) M. Chmielewski, Z. Kaluza, C. Belzecki, P. Salanski, J. Jurczak, *Tetrahedron Lett.* **1984**, 25, 4797–4800; d) R. L. Halcomb, S. J. Danishefsky, *J. Am. Chem. Soc.* **1989**, 111, 6661–6666; e) C. M. Timmers, M. A. Leeuwenburgh, J. C. Verheijen, G. A. van der Marel, J. H. van Boom, *Tetrahedron Asymmetry* **1996**, 7, 49–52.
- [8] a) U. Linker, B. Kersten, T. Linker, *Tetrahedron* **1995**, 51, 9917–9926; b) T. Linker, B. Kersten, U. Linker, K. Peters, E.-M. Peters, H.-G. von Schnering, *Synlett* **1996**, 468–470.
- [9] a) R. J. Ferrier, N. Prasad, *J. Chem. Soc. C* **1969**, 581–586; b) R. D. Dawe, B. Fraser-Reid, *J. Chem. Soc. Chem. Commun.* **1981**, 1180–1181; c) K. Inaba, S. Matsumura, S. Yoshikawa, *Chem. Lett.* **1991**, 485–488.
- [10] a) H. Kessler, H. Oschkinat, C. Griesinger, W. Bermel, *J. Magn. Reson.* **1986**, 70, 106–133; b) H. Günther, *NMR-Spektroskopie*, 3. Aufl., Thieme, Stuttgart, **1993**, S. 375.
- [11] Übersichten zu Übergangsmetall-induzierten Radikalreaktionen: a) J. Iqbal, B. Bhatia, N. K. Nayyar, *Chem. Rev.* **1994**, 94, 519–564; b) P. I. Dalko, *Tetrahedron* **1995**, 51, 7579–7653; c) B. B. Snider, *Chem. Rev.* **1996**, 96, 339–363.
- [12] a) B. Giese, *Angew. Chem.* **1983**, 95, 771–782; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1983**, 22, 753–764; b) *ibid.* **1985**, 97, 555–567 bzw. **1985**, 24, 553–565.
- [13] a) A. Citterio, L. Pesce, R. Sebastiano, R. Santi, *Synthesis* **1990**, 142–144; b) E. Baciocchi, R. Ruzziconi, *J. Org. Chem.* **1991**, 56, 4772–4778; c) V. Nair, J. Mathew, *J. Chem. Soc. Perkin Trans. 1* **1995**, 1881–1882.
- [14] a) B. B. Snider, J. J. Patricia, S. A. Kates, *J. Org. Chem.* **1988**, 53, 2137–2143; b) K. Narasaka, K. Iwakura, T. Okauchi, *Chem. Lett.* **1991**, 423–426; c) R. Warsinsky, E. Steckhan, *J. Chem. Soc. Perkin Trans. 1* **1994**, 2027–2037.

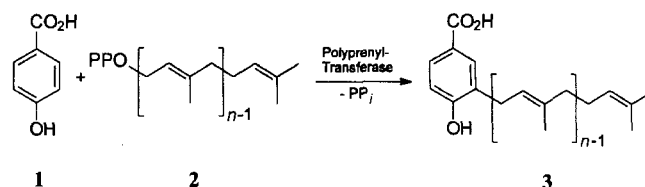
Prenylierung von Benzoessäurederivaten, katalysiert durch eine Transferase aus *Escherichia coli*-Überproduzenten: Verfahrensentwicklung und Substratspezifität**

Ludger Wessjohann* und Bernd Sontag

Enzymkatalysierte Reaktionen bieten außer den naheliegenden Vorteilen ihrer Chemo-, Regio- und Stereoselektivität vor allem Möglichkeiten, Reaktionen unter besonders milden Bedingungen, in Wasser und auch im Mikromaßstab reproduzierbar durchzuführen^[1–4]. Hierbei sind besonders Reaktionen wertvoll, für die es keine klassischen Verfahren gibt. Wegen ihrer guten Verfügbarkeit gehören vor allem Hydrolasen (Peptidasen, Lipasen, Esterasen) inzwischen zum Standardrepertoire der organischen Synthese^[1b, d], während enzymkatalysierte C-C-Verknüpfungen^[1c, 2] bislang kaum breite Anwendung finden. Lediglich die durch Oxynitrilasen^[3] katalysierte Cyanhydrinreaktion konnte sich etablieren. Bei komplexeren C-C-Verknüpfungen richtete sich das Augenmerk dagegen hauptsächlich auf Aldolasen^[1c, 2, 4].

Der Einsatz von Prenyl-Transferasen in der Chemie ist bisher kaum beschrieben worden^[5]. Das mag daran liegen, daß sie überwiegend membrangebunden sind^[6–8] und damit gewöhnlich schwerer zugänglich, weniger stabil und schlechter charakterisierbar als globuläre Enzyme. Eine bedeutende Gruppe dieser Enzyme katalysiert die Prenylierung in der *ortho*-Stellung von Phenolen wie 4-Hydroxybenzoessäure (PHB) und damit einen Schlüsselschritt in der Synthese von biologisch aktiven Verbindungen wie Ubichinon^[9] und Vitamin E^[10] sowie von vielen Sekundärstoffwechselprodukten, darunter das japanische Arznei- und Färbemittel Shikonin^[8, 11, 12], das anti-HIV-aktive Conocurvon^[13], Bovichinone^[14, 15], Tridentochinon^[15–17] und andere^[18, 19].

Wir beschreiben hier die regioselektive Prenylierung von Benzoessäurederivaten mit einer sehr stabilen und leicht zugänglichen Transferase, die erstmals 1972 von Young et al.^[20] in zellfreien Extrakten von *Escherichia coli* entdeckt worden ist und in vivo sehr wahrscheinlich die in Schema 1 dargestellte Reaktion (mit $n = 8$) katalysiert^[21], einen Teilschritt der Ubichinonbiosynthese^[6, 22]. Dieses Enzym ist demnach eine Polyprenyldi-phosphat:4-Hydroxybenzoat-Polyprenyl-Transferase. Vor kurzem gelang es Heide et al.^[23, 24], das korrespondierende Gen



Schema 1. Prenylierung von 4-Hydroxybenzoessäure (PP = Pyrophosphat, $n = 1–12$).

[*] Dr. L. A. Wessjohann, B. Sontag
Institut für Organische Chemie der Ludwig-Maximilians-Universität
Karlstraße 23, D-80333 München
Telefax: Int. + 89/5902-483
E-mail: law@org.chemie.uni-muenchen.de

[**] Diese Arbeit wurde vom Fonds der Chemischen Industrie gefördert. Den Firmen Bayer AG und BASF AG danken wir für Chemikalien- und Gerätespenden. Prof. Dr. L. Heide danken wir herzlich für die Überlassung der Bakterienstämme, Dr. K. Severin, Dr. M. Melzer und Frau Dr. T. Kuchan für Hilfestellung bei molekularbiologischen und mikrobiologischen Fragestellungen sowie Prof. Dr. W. Steglich, Prof. Dr. M. Zenk und Dr. G. Greull für die Nutzung ihrer Geräte und Räumlichkeiten.

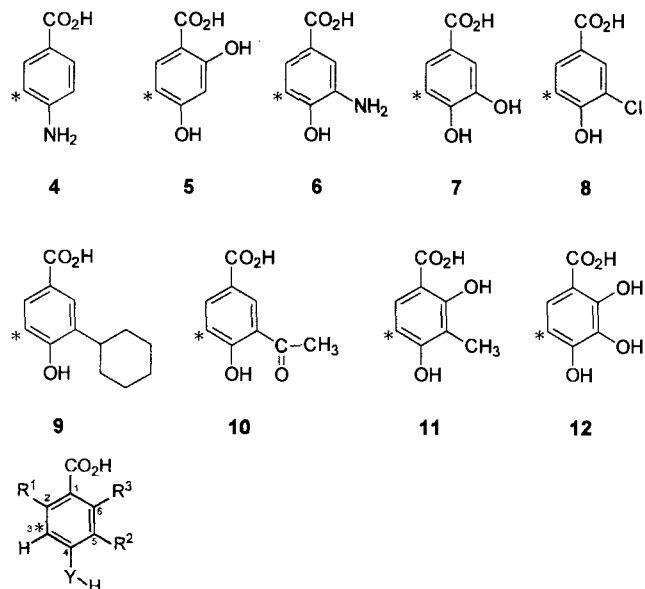
(*ubiA*) zu klonieren und damit rekombinante überproduzierende Stämme zu erhalten, die uns freundlicherweise überlassen wurden^[25].

Die Gewinnung der Enzymfraktion ist mit einfachen Mitteln in zwei Tagen durchführbar. Ein 500-mL-Ansatz liefert Material für ungefähr zweihundert Prenylierungsversuche. Die Bakterien werden aus einer Dauerkultur (Glycerinkultur) zuerst auf Agarplatten angezogen, anschließend auf ein Standard-Flüssigmedium (LB) überimpft, wo sie bis zu einer optischen Dichte von etwa 1 bei 37 °C inkubiert werden. Zur Isolierung des Enzyms werden die Bakterien abzentrifugiert, die Zellwände mit Ultraschall zerstört und durch Zentrifugieren abgetrennt. Um die spezifische Aktivität auf ca. 3 nkat mg⁻¹ zu erhöhen und Vergleichbarkeit unterschiedlicher Ansätze zu erreichen, wurde die Membranfraktion zusätzlich durch Ultrazentrifugieren angereichert^[11, 24]. Für Anwendungen kann auf diesen Schritt, der einen Verlust von bis zu drei Viertel der Gesamtkativität von ca. 12 nkat bedeutet, verzichtet werden. Die erhaltene Membranfraktion wird in Pufferlösung (50 mM Tris(hydroxymethyl)aminomethan-hydrochlorid (TRIS·HCl; pH = 7.5), 2 mM 1,4-Dithiothreitol) ad 10 mL aufgenommen, suspendiert und sofort bei -25 °C eingefroren. Sie ist ohne nennenswerten Aktivitätsverlust mehrere Monate haltbar. Nach über einem Jahr ist die Aktivität der gefrorenen Suspension im Standardassay (siehe *Experimentelles*) nur etwa 20% niedriger als die einer frischen Suspension und damit sogar noch im Rahmen der üblichen Aktivitätsschwankungen bei Enzympräparationen.

Als Referenzsystem hat sich die Reaktion von Geranylpyrophosphat (GPP) mit *p*-Hydroxybenzoesäure (PHB) zu 3-Geranyl-4-hydroxybenzoesäure (GBA) bewährt (Schema 1, *n* = 2). Zur quantitativen Analyse durch Umkehrphasen-HPLC mit 4-Ethylbenzoesäure als internem Standard wurde eine Eichkurve verwendet, die mit klassisch synthetisierter GBA ermittelt wurde. Beim Standardassay (siehe *Experimentelles*) wird die Reaktion nach einer Stunde abgebrochen. Die chemische Ausbeute beträgt bei der PHB/GPP-Reaktion nach dieser Zeit 62%, nach drei Stunden sind synthetisch brauchbare Ausbeuten von etwa 80% erreichbar^[26]. Die Reproduzierbarkeit der Reaktion mit Enzympräparationen aus derselben Anzucht ist selbst bei diesen Mikroreaktionen mit ±5% ausgezeichnet, die Schwankungen innerhalb einer Versuchsreihe liegen sogar bei nur ±1%. Ein dreißigfaches Upscaling gelang problemlos und läßt auch für größere Ansätze keine Komplikationen erwarten.

Die erfolgreiche Variation des Polyprenylrestes – sowohl GPP als auch Geranylgeranylpyrophosphat^[27] wurden umgesetzt – ist angesichts der Varianz der Kettenlänge in Ubichinonen aus *E. coli* und der damit zusammenhängenden erfolgreichen Umsetzungen von langkettigen Prenylpyrophosphaten^[11, 20, 24, 28] nicht verwunderlich. Bemerkenswert ist, daß ausgerechnet das kürzere GPP am schnellsten reagiert, während für eine optimale Übereinstimmung mit der Kettenlängenverteilung der Ubichinone in *E. coli* langkettige Prenyldiphosphate, etwa Octaprenyl^[20, 29], als beste Substrate zu erwarten wären. Geranylmonophosphat wird erwartungsgemäß nicht umgesetzt.

Das Enzym akzeptiert eine Vielzahl von 4-Hydroxybenzoesäurederivaten und verwandten Verbindungen als Substrat, von denen einige in Schema 2 dargestellt sind. Eine systematische Variation der Reste am aromatischen Ring ergab das folgende, vorläufige Bild für eine Prenylierung in der *meta*-Position (C-3): 1) Die Säuregruppe ist invariant, nur Benzoesäurederivate sind Substrate. 2) Die *para*-Hydroxyfunktion kann z. B. durch eine Aminogruppe ersetzt werden (4). Derivate, in denen das Wasserstoffatom ersetzt wurde, z. B. durch Methylierung zu 4-Methoxy- bzw. 4-*N,N*-Dimethylaminobenzoesäuren, reagieren nicht. 3) Werden beide *meta*-Positionen blockiert, findet



Schema 2. Einige erfolgreich umgesetzte Benzoesäurederivate und vorläufiges Substratmodell. (Die prenylierbare Position ist jeweils mit einem Stern markiert.) R¹ = H (andere Substituenten vermutlich unzulässig); R² = H, OH, NH₂, OCH₃, Cl, COCH₃, CH₃, Cyclohexyl usw., nicht Polyprenyl oder sehr stark elektronenziehende Substituenten wie NO₂; R³ = H, OH und andere; Y = O, NH (möglicherweise auch andere Substituenten zulässig).

erwartungsgemäß keine Reaktion statt. Solche Substanzen sind allerdings auch keine Inhibitoren. 4) Substituenten in 5- und/oder 6-Position (R² bzw. R³) scheinen nahezu beliebig zulässig zu sein (5–12). So gelingt die einstufige Synthese der aus *Saccharomyces cerevisiae* isolierten 4,5-Dihydroxy- und 4-Hydroxy-5-methoxy-3-polyprenylbenzoesäuren^[18]. Lediglich sehr stark elektronenziehende Substituenten wie die Nitrogruppe führen zu einem Aktivitätsverlust, während 5-Chlor- und 5-Acetyl-derivate (8 bzw. 10) noch mit akzeptabler Geschwindigkeit umgesetzt werden. Donorsubstituierte Substrate wie die voluminöse 5-Cyclohexyl-4-hydroxybenzoesäure **9** reagieren sogar ohne Reaktivitätseinbußen. 5) Eine weitere Hydroxygruppe in 2-Position (R¹) wird nicht akzeptiert.

Ausgehend von diesen Ergebnissen konnten wir ein Modell bezüglich der Anforderungen des Enzyms an die aromatische Komponente aufstellen, das sich für alle daraufhin ausgewählten Substanzen bewährt hat. Für ein erfolgreiches Experiment muß zumindest folgendes gegeben sein: Umgesetzt werden Benzoesäuren, die einen Elektronen- und Wasserstoffbrückendonator in *para*-Position aufweisen und die in der zu alkylierenden *meta*- sowie in der benachbarten *ortho*-Position nicht substituiert sind.

Die klassische Friedel-Crafts-Alkylierung von 4-Hydroxybenzoesäure mit Prenylverbindungen gelingt dagegen nicht. Auch der Methylester liefert mit Phytol das 3-Phytylderivat in nur 9% Ausbeute, und die wichtigen, mehrfach ungesättigten all-*trans*-Prenylelektrophile liefern die gewünschten Produkte gar nicht. Neben mangelnder Regioselektivität sind bei diesen Reaktionen vor allem Isomerisierungen, Mehrfach- und O-Alkylierungen festzustellen^[17, 30]. Unter Enzymkatalyse werden Produkte solcher Reaktionen nicht erhalten.

Die vorgestellten Untersuchungen zur Polyprenyldiphosphat:4-Hydroxybenzoat-Polyprenyl-Transferase aus *E. coli*-Überproduzenten demonstrieren damit erstmals das Potential dieser bislang nahezu ungenutzten Klasse C-C-verknüpfender Enzyme für die gerichtete Katalyse einer Alkylierung vom Friedel-Crafts-Typ in Wasser, der *meta*-Prenylierung von Benzoesäurederivaten.

Experimentelles

Die Polyprenylpyrophosphate wurden aus den entsprechenden Polyprenylalkoholen oder -halogeniden [31] nach der Methode von Poulter et al. [32] erhalten. Geranylphosphat läßt sich analog der Vorschrift für Pyrophosphate synthetisieren.

Enzymassay: 100 nmol eines Benzoesäurederivates (Referenz: PHB), 100 nmol Polyprenylpyrophosphat (Referenz: GPP), 50 µmol $MgCl_2$ (Mg^{2+} als Cofaktor) in 50 µL TRIS-Puffer (50 mM TRIS-HCl; pH = 7.5) und 50 µL Enzym suspension (ca. 25 pkat) werden 60 min bei 37 °C inkubiert. Die Reaktion wird durch Zugabe von 2 µL Ameisensäure gestoppt und die Reaktionsmischung mit 500 µL 4-Ethylbenzoesäure (PEB)-Lösung (100 µM in Ethylacetat; interner Standard) ausgeschüttelt. Nach der Phasentrennung (ggf. zentrifugieren) werden 450 µL der organischen Phase entnommen und das Lösungsmittel im Vakuum entfernt. Der Rückstand wird in 60 µL Methanol aufgenommen und HPL-chromatographisch analysiert (20 µL Lösung, Säule 250 × 4 mm, RP-18 (7 µm), 100 bar, Detektion bei 240 nm (λ_{max} PEB) oder 254 nm). Die geranylierten Substanzen weisen die 2.5- bis 4-fache Retentionszeit des jeweiligen Arens (Elutionsmittel A: Methanol/Wasser/Ameisensäure 750/245/5, isokratisch), geranylgeranierte Verbindungen die 6- bis 7-fache Retentionszeit auf (Elutionsmittel A (2 min), dann Gradientenelution (13 min) → Elutionsmittel B: Methanol/Isopropanol/Ameisensäure 800/195/5). PEB eluiert zwischen dem Edukt und dem Produkt. Die UV-Spektren der prenylierten Benzoesäuren zeigen einen bathochromen Shift von 5–10 nm für die K-Bande ($\pi \rightarrow \pi^*$) des Arens.

Eingegangen am 15. Februar 1996 [Z 8826]

Stichworte: Alkylierungen · Enzymkatalyse · Prenylierungen

- [1] a) *Enzyme Catalysis in Organic Synthesis—A Comprehensive Handbook*, Vol. 1 (Hrsg.: K. Drauz, H. Waldmann), VCH, Weinheim, **1995**; b) Lit. [1a], S. 165–504; c) *Enzyme Catalysis in Organic Synthesis—A Comprehensive Handbook*, Vol. 2 (Hrsg.: K. Drauz, H. Waldmann), VCH, Weinheim, **1995**, S. 547–593; d) C.-H. Wong, G. M. Whitesides, *Enzymes in Synthetic Organic Chemistry*, Pergamon, Oxford, **1994**; e) *Enzyme Chemistry—Impact and Applications*, 2. Aufl. (Hrsg.: C. J. Suckling), Chapman and Hall, London, **1990**.
- [2] H. Waldmann, *Nachr. Chem. Tech. Lab.* **1991**, 39, 1408–1414.
- [3] F. Effenberger, *Angew. Chem.* **1994**, 106, 1609–1619; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1994**, 33, 1555–1565.
- [4] W.-D. Fessner, G. Sinerius, *Angew. Chem.* **1994**, 106, 217–220; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1994**, 33, 209–212.
- [5] Ähnlich ist lediglich die enzymatische Synthese von 4-Methyldihomofarnesol: T. Koyama, K. Ogura, F. C. Baker, G. C. Jamieson, D. A. Schooley, *J. Am. Chem. Soc.* **1987**, 109, 2853–2854; Lit. [1c, d].
- [6] K. Momose, H. Rudney, *J. Biol. Chem.* **1972**, 247, 3930–3940.
- [7] G. Wu, H. D. Williams, F. Gibson, R. K. Poole, *J. Gen. Microbiol.* **1993**, 139, 1795–1805.
- [8] Y. Yamaga, K. Nakanishi, H. Fukui, M. Tabata, *Phytochemistry* **1993**, 32, 633–636.
- [9] R. E. Olson, H. Rudney, *Vitam. Horm. (NY)* **1983**, 40, 1–43.
- [10] R. E. Beyer, K. Nordenbrand, L. Ernster, *Chem. Scr.* **1987**, 27, 145–153; G. W. Burton, K. U. Ingold, *Acc. Chem. Res.* **1986**, 19, 194–201; S. Kasperek in *Vitamin E: A Comprehensive Treatise*, Vol. 1 (Hrsg.: L. J. Machlin), Marcel Dekker, New York, **1980**, S. 7–65.
- [11] M. Melzer, Dissertation, Universität Tübingen, **1995**.
- [12] M. Hayashi, *Nippon Yakurigaku Zasshi* **1977**, 73, 193–203 [*Chem. Abstr.* **1978**, 88, 44863e]; L. Heide, M. Tabata, *Phytochemistry* **1987**, 26, 1645–1650, 1651–1655.
- [13] H. Laatsch, *Angew. Chem.* **1994**, 104, 438–440, 1865; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1994**, 33, 422–424, 1668.
- [14] E. Jägers, W. Steglich, *Angew. Chem.* **1981**, 93, 1105; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1981**, 20, 1016; W. Steglich, F. Esser, I. Pils, *Z. Naturforsch. B* **1971**, 26, 336–338; D. Brewer, W. C. Jen, G. A. Jones, A. Tayler, *Can. J. Microbiol.* **1984**, 30, 1068–1072; P. C. Beaumont, R. L. Edwards, *J. Chem. Soc. C* **1971**, 2582–2585; K. Minami, K. Asawa, M. Sawada, *Tetrahedron Lett.* **1968**, 5067–5070.
- [15] J. Miersch, *Biochem. Physiol. Pflanz.* **1986**, 181, 405–410.
- [16] H. Besl, H.-J. Hecht, P. Luger, V. Pasupathy, W. Steglich, *Chem. Ber.* **1975**, 108, 3675–3691; H. Schwarz, V. Pasupathy, W. Steglich, *Org. Mass Spectrom.* **1976**, 11, 472–478; R. F. C. Brown, A. J. Robinson, *Aust. J. Chem.* **1995**, 48, 515–529.
- [17] J. Beyer, Dissertation, Ludwig-Maximilians-Universität München, **1995**; W. Steglich, J. Beyer, unveröffentlichte Ergebnisse.
- [18] R. R. Goewert, J. Sippel, M. F. Grimm, R. E. Olson, *Biochemistry* **1981**, 20, 5611–5616; R. R. Goewert, J. Sippel, R. E. Olson, *ibid.* **1981**, 20, 4217–4223.
- [19] a) G. Cimino, S. De Stefano, L. Minale, *Experientia* **1972**, 28, 1401–1402; b) W. Kramp, F. Bohlmann, *Liebigs Ann. Chem.* **1986**, 226–233.
- [20] I. G. Young, R. A. Leppik, J. A. Hamilton, F. Gibson, *J. Bacteriol.* **1972**, 110, 18–25 [*Chem. Abstr.* **1972**, 76, 138015j].
- [21] I. G. Young, P. Stroobant, C. G. Macdonald, F. Gibson, *J. Bacteriol.* **1973**, 114, 42–52 [*Chem. Abstr.* **1973**, 79, 2615j].
- [22] G. D. Daves, Jr., R. F. Muraca, J. S. Whittick, P. Friis, K. Folkers, *Biochemistry* **1967**, 6, 2861–2866.

- [23] L. Heide, M. Melzer, M. Siebert, A. Bechthold, J. Schröder, K. Severin, *J. Bacteriol.* **1993**, 175, 5728–5729; M. Melzer, M. Siebert, A. Bechthold, L. Heide, *Planta Med.* **1992**, 58, A596.
- [24] M. Melzer, L. Heide, *Biochim. Biophys. Acta* **1994**, 1212, 93–102.
- [25] Durch Insertion in ein Multicopy-Plasmid, welches zur Selektion über ein Ampicillinresistenzgen verfügt, und Übertragung auf den Wildtyp K-12 oder den *ubiA*-defizienten *E. coli*-Stamm AN385 wurden überproduzierende Mutanten erhalten. Für die Untersuchungen wurde *E. coli* K-12:pALMU3 eingesetzt, dessen Membranfraktion eine etwa 600fache Aktivität aufweist. Für spätere Klonierungen siehe: P. E. Lilley, N. P. J. Stamford, S. G. Vasudevan, N. E. Dixon, *Gene* **1993**, 129, 9–16; K. Suzuki, U. Minoru, M. Yuasa, T. Nakagawa, M. Kawamukai, H. Matsuda, *Biosci. Biotech. Biochem.* **1994**, 58, 1814–1819; G. Wu, H. D. Williams, F. Gibson, R. K. Poole, *J. Gen. Microbiol.* **1993**, 139, 1795–1805.
- [26] Die Halbwertszeit des Enzyms im Reaktionsmedium bei 37 °C beträgt an der Luft ca. 1.5 h.
- [27] Das mit PHB erhaltene Produkt 3-Geranylgeranyl-4-hydroxybenzoesäure wurde unter anderem aus dem Meeresschwamm *Ircinia muscarum* isoliert [19a].
- [28] Z. El Hachimi, O. Samuel, R. Azerad, *Biochimie* **1974**, 56, 1239–1247 [*Chem. Abstr.* **1975**, 82, 121392f].
- [29] M. Siebert, A. Bechthold, M. Melzer, U. May, U. Berger, G. Schröder, J. Schröder, K. Severin, L. Heide, *FEBS Lett.* **1992**, 307, 347–350.
- [30] S. Lang-Fugmann, Dissertation, Universität Bonn, **1987**.
- [31] S. Klinge, M. Demuth, *Synlett* **1993**, 783–784; E. J. Corey, W.-C. Shieh, *Tetrahedron Lett.* **1992**, 33, 6435–6438; A. Yanagisawa, H. Hibino, S. Habaue, Y. Hisada, H. Yamamoto, *J. Org. Chem.* **1992**, 57, 6386–6387; J. D. Faulkner, *Synthesis* **1971**, 175–189.
- [32] V. J. Davison, A. B. Woodside, C. D. Poulter in *Steroids and Isoprenoids, Part A*, Vol. 110 (Hrsg.: J. H. Law, H. C. Rilling), Academic Press, Orlando, **1985**, S. 130–144.

Auswahl unterschiedlicher Reaktionsmechanismen durch Enantiomere bei Elektronentransferreaktionen mit Metalloproteinen**

Klaus Bernauer* und Luca Verardo

Die Charakterisierung des Reaktionszentrums bei Elektronentransferreaktionen mit Metalloproteinen war Gegenstand vielfältiger Untersuchungen^[1–3]. Beim Plastocyanin (PcCu^{II}) wurden zwei Stellen zur Bindung der Reaktionspartner identifiziert: eine nahe beim Cu²⁺-Zentrum gelegene, hydrophobe und eine etwa 16 Å vom Metallion entfernte, negativ geladene. Anionische und neutrale Metallkomplexe reagieren ausschließlich an der nahegelegenen Bindungsstelle, kationische sowohl an der nahen als auch an der entfernteren^[3]. Bei der negativ geladenen, entfernteren Bindungsstelle ist vermutlich Tyr83 am Elektronentransfer beteiligt. Um genauere Informationen über den Ort des Angriffs eines redoxaktiven Reagens zu erhalten, haben wir die Reaktion mit optisch aktiven Metallkomplexen untersucht. Das Ziel dabei war es, die chirale Erkennung zwischen Reagens und Proteinoberfläche anhand der kinetischen Stereoselektivität der Wechselwirkung nachzuweisen^[4–7].

Eine zur Identifizierung von Bindungsstellen bei Inner-sphere-Elektronentransferreaktionen häufig verwendete Methode besteht darin, Cr²⁺-Komplexe durch Oxidation zu inerten Cr^{III}-Komplexen kovalent an das verbrückende Atom zu binden^[8]. Diese Technik wurde auch zur Untersuchung von

[*] Prof. K. Bernauer, Dipl.-Chem. L. Verardo
Institut de chimie, Université de Neuchâtel
51, Av. de Bellevaux, CH-2000 Neuchâtel (Schweiz)
Telefax: Int. + 38/232511

[**] Diese Arbeit wurde vom Schweizerischen Nationalfonds zur Förderung der wissenschaftlichen Forschung unterstützt (Nr. 20-37'224.93 und 20-41'206.94). Die Autoren danken Professor P. Schürmann für die Bereitstellung des Plastocyanins und für viele anregende Diskussionen.