

matographie (Ether/Petrolether, 1/24 bis 1/4) erhält man die α,β -Epoxyketone **2** [25]. (*R,R*)-*N*-Methylpseudoephedrin kann mit einem polaren Laufmittel (Methanol/Ether, 1/9, + 1 Vol.-% Isopropylamin) von der gleichen Säule nahezu quantitativ und mit unveränderter Enantiomerenreinheit eluiert werden.

Eingegangen am 18. März 1996 [Z8934]

Stichworte: Asymmetrische Epoxidierungen · Chirale Auxiliare · Enone · Epoxyketone · Zinkverbindungen

- [1] K. Katsuki, K. B. Sharpless, *J. Am. Chem. Soc.* **1980**, *102*, 5974–5976.
- [2] a) R. M. Hanson, K. B. Sharpless, *J. Org. Chem.* **1986**, *51*, 1922–1925; Übersichtsartikel; b) R. A. Johnson, K. B. Sharpless in *Catalytic Asymmetric Synthesis* (Hrsg.: I. Ojima), VCH, New York, **1993**, S. 103; c) A. C. Oehlschlager in *Houben-Weyl, Methods of Organic Chemistry, Bd. E21e* (Hrsg.: G. Helmchen, R. W. Hoffmann, J. Mulzer, E. Schaumann), Thieme, Stuttgart, **1995**, S. 4675.
- [3] a) W. Zhang, J. L. Loebach, S. R. Wilson, E. N. Jacobsen, *J. Am. Chem. Soc.* **1990**, *112*, 2801–2803; b) B. D. Brandes, E. N. Jacobsen, *Tetrahedron Lett.* **1995**, *36*, 5123–5126; c) Übersichtsartikel: E. N. Jacobsen in *Catalytic Asymmetric Synthesis* (Hrsg.: I. Ojima), VCH, New York, **1993**, S. 159.
- [4] a) R. Irie, K. Noda, Y. Ito, N. Matsumoto, T. Katsuki, *Tetrahedron Lett.* **1990**, *31*, 7345–7348; b) T. Fukuda, R. Irie, T. Katsuki, *Synlett* **1995**, 197–198; c) Übersichtsartikel: T. Katsuki, *Coord. Chem. Rev.* **1995**, *140*, 189–214.
- [5] S. Juliá, J. Masana, J. C. Vega, *Angew. Chem.* **1980**, *92*, 968–969; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1980**, *19*, 929–930.
- [6] a) S. Juliá, J. Guijer, J. Masana, J. Rocas, S. Colonna, R. Annunziata, H. Molinari, *J. Chem. Soc. Perkin Trans. 1* **1982**, 1317–1324; b) S. Banfi, S. Colonna, H. Molinari, S. Juliá, J. Guijer, *Tetrahedron* **1984**, *40*, 5207–5211; c) B. C. B. Bezuidenhout, A. Swanepoel, J. A. N. Augustyn, D. Ferreira, *Tetrahedron Lett.* **1987**, *28*, 4857–4860; d) S. Itsuno, M. Sakakura, K. Ito, *J. Org. Chem.* **1990**, *55*, 6047–6049; e) P. W. Baures, D. S. Eggleston, J. R. Flisak, K. Gombatz, I. Lantos, W. Mendelson, J. J. Remich, *Tetrahedron Lett.* **1990**, *31*, 6501–6504; f) C. Bolm, *Angew. Chem.* **1991**, *103*, 414–415; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1991**, *30*, 403–404; g) J. R. Flisak, K. J. Gombatz, M. M. Holmes, A. A. Jarmas, I. Lantos, W. L. Mendelson, V. J. Novack, J. J. Remich, L. Snyder, *J. Org. Chem.* **1993**, *58*, 6247–6254; h) M. E. Lasterra Sanchez, S. M. Roberts, *J. Chem. Soc. Perkin Trans. 1* **1995**, 1467–1468; i) M. E. Lasterra Sanchez, U. Felfer, P. Mayon, S. M. Roberts, S. R. Thornton, C. J. Todd, *ibid.* **1996**, 343–348.
- [7] Benzylchininiumchlorid: a) R. Helder, J. C. Hummelen, R. W. P. M. Laane, J. S. Wiering, H. Wynberg, *Tetrahedron Lett.* **1976**, 1831–1834; b) J. C. Hummelen, H. Wynberg, *ibid.* **1978**, 1089–1092; c) H. Wynberg, B. Marsman, *J. Org. Chem.* **1980**, *45*, 158–161; d) H. Pluim, H. Wynberg, *ibid.* **1980**, *45*, 2498–2502; e) Y. Harigaya, H. Yamaguchi, M. Onda, *Heterocycles* **1981**, *15*, 183–185.
- [8] Rinderserum-Albumin: a) S. Colonna, A. Manfredi, *Tetrahedron Lett.* **1986**, *27*, 387–390; b) S. Colonna, A. Manfredi, A. M. Spadoni, *ibid.* **1987**, *28*, 1577–1580; c) S. Colonna, N. Gaggero, A. Manfredi, A. M. Spadoni, L. Casella, G. Carella, P. Pasta, *Tetrahedron* **1988**, *44*, 5169–5178.
- [9] Cyclodextrine: a) S. Banfi, S. Colonna, S. Julia, *Synth. Commun.* **1983**, *13*, 1049–1052; b) S. Colonna, S. Banfi, A. Pagani, *Gazz. Chim. Ital.* **1985**, *115*, 81–83; c) Y. Hu, A. Harada, S. Takahashi, *Synth. Commun.* **1988**, *18*, 1607–1610; d) S. Colonna, A. Manfredi, R. Annunziata, N. Gaggero, *J. Org. Chem.* **1990**, *55*, 5862–5866.
- [10] Chirale Platinkomplexe: C. Baccin, A. Gusso, F. Pinna, G. Strukul, *Organometallics* **1995**, *14*, 1161–1167.
- [11] Über diastereoselektive Enon-Epoxidierungen mit $O_2/R/Zn$ ist bereits berichtet worden: K. Yamamoto, N. Yamamoto, *Chem. Lett.* **1989**, 1149–1152. Die Autoren postulierten als oxidierende Spezies $ROOZnR$. Unsere asymmetrische Variante spricht dagegen für den in Schema 2 gezeigten Mechanismus über 4-Cyclohexenon wird unter unseren Bedingungen nicht epoxidiert.
- [12] Hergestellt nach a) S. Smith, *J. Chem. Soc.* **1927**, 2056–2059 (65% Ausbeute, Schmp. 29 °C, Sdp. 91–92 °C (8 mbar), $[\alpha]_D^{22} = -48.6$ ($c = 5.1$ in MeOH)), in Übereinstimmung mit Literaturdaten: b) W. N. Nagai, S. Kaneko, *Justus Liebigs Ann. Chem.* **1929**, *470*, 157–182; c) T. Kanzawa, *Bull. Chem. Soc. Jpn.* **1956**, *29*, 398–403; d) K. Yamamoto, K. Tsuruoka, J. Tsuji, *Chem. Lett.* **1977**, 1115–1116; e) H.-J. Schneider, M. Lonsdorfer, *Org. Magn. Reson.* **1981**, *16*(2), 133–137.
- [13] B. Marsman, H. Wynberg, *J. Org. Chem.* **1979**, *44*, 2312–2315.
- [14] Die Zinkkomplexe sind in den Reaktionsgleichungen vereinfachend als Monomere dargestellt, ohne zu berücksichtigen, daß sie auch als Dimere vorliegen könnten.
- [15] Alkylzinkalkoxide wurden sehr erfolgreich in der enantioselektiven Addition von Dialkylzink an Aldehyde eingesetzt. Übersichtsartikel: a) R. Noyori, M. Kitamura, *Angew. Chem.* **1991**, *103*, 34–55; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1991**, *30*, 49–70; b) K. Soai, S. Niwa, *Chem. Rev.* **1992**, *92*, 833–856.
- [16] G. Sosnovsky, J. H. Brown, *Chem. Rev.* **1966**, *66*, 529–566.
- [17] G. Jander, E. Blasius, *Lehrbuch der analytischen und präparativen anorganischen Chemie*, 14. Aufl., Hirzel, Stuttgart, **1995**, S. 422.
- [18] Ein analoger Mechanismus wurde bei der Epoxidierung von Enonen mit H_2O_2 im alkalischen Medium postuliert: H. O. House, R. S. Ro, *J. Am. Chem. Soc.* **1958**, *80*, 2428–2433.
- [19] Die Kopplungskonstanten der vicinalen, *trans*-ständigen Protonen am Oxiranring der Epoxyketone **2** betragen im 1H -NMR-Spektrum 1.68–2.02 Hz und entsprechen damit den Literaturdaten für *trans*-Epoxide: a) C. A. Reilly, J. D. Swalen, *J. Chem. Phys.* **1960**, *32*, 1378–1384; b) K. L. Williamson, C. A. Lanford, C. R. Nicholson, *J. Am. Chem. Soc.* **1964**, *86*, 762–765.
- [20] Kristallstrukturdaten von **7**: monoklin, Raumgruppe $P2_1(4)$, $a = 13.988(2)$, $b = 18.846(17)$, $c = 14.141(9)$ Å, $\beta = 106.09(2)$ °, 25 Reflexe, $12.23^\circ < \theta < 16.98^\circ$; $Z = 2$, $V = 3581.8$ Å 3 , $M_w = 1202.29$, $\rho_{\text{ber.}} = 1.115$ g cm $^{-3}$. Der Kristall wurde ohne Kapillare direkt im Stickstoffstrom vermessen ($T = 190$ K), $F(000) = 1288$, $Mo_K\text{-Strahlung}$ ($\lambda = 0.71069$ Å), $\sin\theta/\lambda_{\text{max}} = 0.651$, $\mu = 7.32$ cm $^{-1}$ (keine Absorptionskorrektur), $R_{\text{int.}} = 0.102(30)$, 4963 beobachtete Reflexe ($I > 2\sigma(I)$) im Bereich $-18^\circ < h < 17$, $0 < k < 24$, $0 < l < 18$. Lösung der Struktur mit der Schweratommethode (SHELXS86 [26]), Verfeinerung mit XTAL3.2 [27]. 4963 Reflexe in abschließender Kleinst-Quadrat-Methode-Verfeinerung von 410 Parametern. $R = 0.103$, $R_w = 0.077$ ($w = 1/\sigma^2$), $S = 2.717$, Restelektronendichte 1.6 e Å $^{-3}$. Verbindung **7** kristallisiert mit zwei freien Molekülen des Liganden (fehlgeordnet) pro Formeleinheit. Die schlechte Qualität des Kristalls ließ eine anisotrope Verfeinerung nur der Nz-Atome und der Atome in deren unmittelbarer Umgebung (O1A–D, N1A–D, C1A–D, C2A–D) zu. Alle anderen atomaren Parameter wurden isotrop verfeinert. Wasserstoffpositionen berechnet. Alle Versuche, Kristalle besserer Qualität zu präparieren waren erfolglos. Die kristallographischen Daten (ohne Strukturfaktoren) der in dieser Veröffentlichung beschriebenen Struktur wurden als „supplementary publication no. CCDC-179-57“ beim Cambridge Crystallographic Data Centre hinterlegt. Kopien der Daten können kostenlos bei folgender Adresse angefordert werden: The Director, CCDC, 12 Union Road, GB-Cambridge CB21EZ (Telefax: Int. +1223/336-033; E-mail: teched@chemistry.cam.ac.uk).
- [21] Ein verwandtes achirales Zink-bisalkoxid mit C_i -Symmetrie ist bekannt: P. L. Orioli, M. Di Vaira, L. Sacconi, *Inorg. Chem.* **1966**, *5*, 400–405.
- [22] Es ist uns bereits gelungen, mit der gleichen Methode ein Nitroalken diastereo- und enantioselektiv zu epoxidieren: J. Zhu, Dissertation, Technische Hochschule Aachen, **1996**.
- [23] Mit der halben Menge an (1*R,2R*)-*N*-Methylpseudoephedrin gelangen die Epoxidierungen mit ähnlichen Ausbeuten bei längeren Reaktionszeiten und mit zumeist um einige Prozent niedrigeren Enantiomerenüberschüssen, z. B. **2b**: 17 h, 94% Ausbeute, 87% ee.
- [24] Da eine lange Verweilzeit unter O_2 einen negativen Einfluß auf die Reaktion ausüben kann, ist es zu empfehlen, nach 3.5 h den O_2 -gefüllten gegen einen mit Argon gefüllten Ballon auszutauschen.
- [25] **2g** wurde zusätzlich durch präparative HPLC gereinigt. Alle neuen Verbindungen wurden spektroskopisch (IR, NMR, MS) eindeutig charakterisiert und gaben korrekte Elementaranalysen oder passende hochauflöste Massenspektren.
- [26] G. M. Sheldrick in *Crystallographic Computing 3* (Hrsg.: G. M. Sheldrick, C. Krüger, R. Goddard), University Press, **1985**, S. 175.
- [27] S. R. Hall, H. D. Flack, J. M. Stewart, *XTAL3.2 Reference Manual*, Universitäten von West-Australien, Genf und Maryland, Lamb, Perth **1992**.

Enzymatische Synthese eines charakteristischen phosphorylierten und glycosylierten Peptidfragmente der großen Untereinheit der RNA-Polymerase II aus Säugetieren**

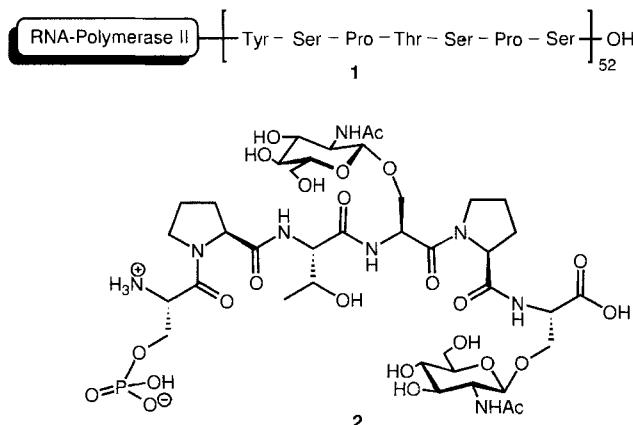
Torsten Pohl und Herbert Waldmann*

Kovalent modifizierte Proteine haben bei der Übertragung von extrazellulären Signalen durch die Plasmamembran in das Zellinnere und weiter zum Zellkern entscheidende Funktionen^[1]. Die intrazelluläre Antwort auf eine Vielzahl externer Stimuli wird dabei besonders durch die dynamische Phosphorylierung und Dephosphorylierung von Hydroxyaminosäuren^[2],

[*] Prof. Dr. H. Waldmann, Dr. T. Pohl
Institut für Organische Chemie der Universität
Richard-Willstätter-Allee 2, D-76128 Karlsruhe
Telefax: +721/608-4825
E-mail: waldmann@ochhades.chemie.uni-karlsruhe.de

[**] Diese Arbeit wurde von der Deutschen Forschungsgemeinschaft und vom Fonds der Chemischen Industrie gefördert.

aber auch durch die β -O-glycosidische Anknüpfung des N-Acetylglucosamin(GlcNAc)-Restes an Serin- und Threonineinheiten von intrazellulären Proteinen^[3] vermittelt. Ein eindrucksvolles Beispiel hierfür ist die RNA-Polymerase II aus Säugetieren^[4] (Schema 1). In ihrer cytosolischen Form liegt der C-ter-



Schema 1. Wiederholungssequenz 1 der großen Untereinheit der RNA-Polymerase II aus Säugetieren sowie Struktur des phosphorylierten und glycosylierten Zielhexapeptids 2.

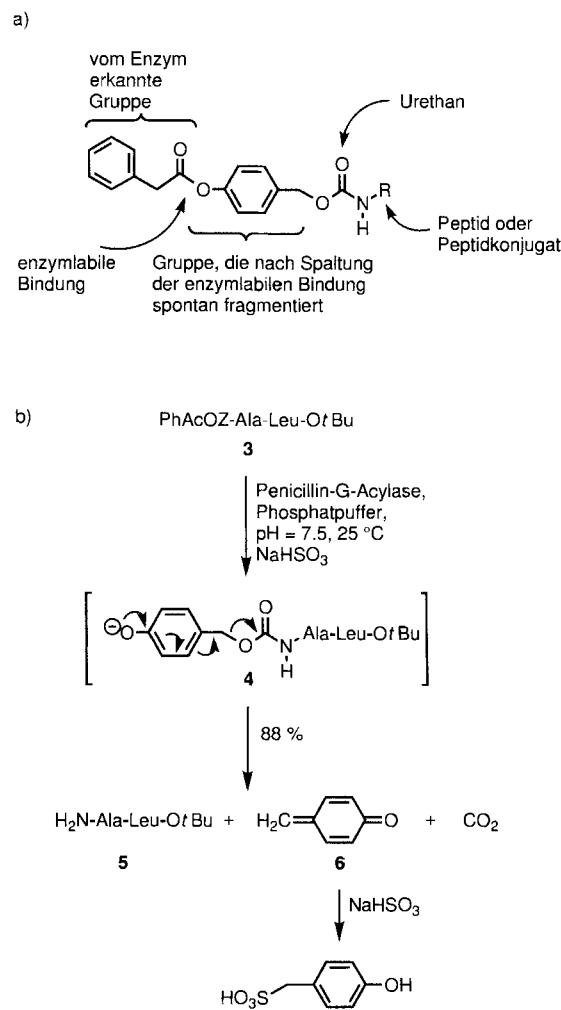
minale Bereich der großen Untereinheit dieses Enzyms hochglycosyliert vor, wodurch möglicherweise der Transport der Polymerase in den Zellkern erleichtert wird. Im Verlauf der im Zellkern stattfindenden Umwandlung der RNA-Polymerase II 1 von einem initierenden in einen verlängernden Transkriptionskomplex werden die GlcNAc-Glycoside abgespalten und das Protein rasch und vielfach phosphoryliert. O-GlcNAc könnte daher als Schutz oder Markierung von Phosphorylierungsstellen dienen, und der kovalenten Modifizierung von Proteinen mit O-GlcNAc und Phosphat kommt damit bei der Expression von Genen, die unter Kontrolle der RNA-Polymerase II transkribiert werden, eine entscheidende Rolle zu.

Für die Untersuchung der von solchen kovalent modifizierten Proteinkonjugaten beeinflußten biologischen Phänomene werden geeignete Hilfsmittel benötigt. Der Einsatz charakteristischer Partialstrukturen der zugrundeliegenden Proteine, die beide Modifikationen sowie nichtderivatisierte Hydroxyaminoäurefunktionen enthalten, kann neue Möglichkeiten für bioorganische Studien eröffnen, z. B. für die Bildung geeigneter monoklonaler Antikörper (O-GlcNAc-modifizierte Peptide sind hochantigen^[5]) sowie für Inhibitions- und Mikroinjektionsstudien. Die Synthese von Phospho-^[5] und Glycopeptiden^[6] wird allerdings bereits durch deren ausgeprägte Säure- und Basenlabilität sowie Multifunktionalität erschwert und erfordert den Einsatz einer Vielzahl von Schutzgruppen, deren selektive Abspaltung unter milden, möglichst neutralen Bedingungen gelingt. Bei der Synthese von Peptiden, die beide Seitenkettenmodifikationen enthalten, vervielfachen sich diese Probleme, weshalb die Herstellung von Phosphoglycopeptiden bisher nicht beschrieben wurde.

Wir berichten nun darüber, daß solche multifunktionellen und empfindlichen Peptidkonjugate vorteilhaft unter sehr milden Bedingungen ($pH = 7.5, 25^\circ\text{C}$) durch enzymatische Schutzgruppentechniken^[7] aufgebaut werden können. Als biologisch relevante Zielverbindung haben wir das Hexapeptid 2 gewählt, das eine phosphorylierte, zwei glycosyierte und eine nicht-modifizierte Hydroxyaminoäurefunktion enthält^[8]. Dieses Peptid repräsentiert eine charakteristische Partialstruktur der

Wiederholungssequenz der großen Untereinheit von RNA-Polymerase II aus Säugetieren, die beim enzymatischen Prozeß glycosyliert oder phosphoryliert wird.

Bei der Auswahl geeigneter, enzymabiler Schutzgruppen konnten wir auf unsere Erfahrungen bei der biokatalysierten Synthese von multifunktionellen und empfindlichen Peptidkonjugaten zurückgreifen^[9]. Als enzymatisch abspaltbare N-terminale Schutzfunktion wurde die *p*-Phenylacetoxymethoxy carbonyl(PhAcOZ)-Gruppe entwickelt, ein Urethan, das eine funktionelle Gruppe (ein Phenylacetat) enthält, die von dem Biokatalysator (Penicillin-G-Acylase) erkannt wird und über eine enzymabile Bindung (eine Esterbindung) an eine funktionelle Gruppe (ein *p*-Hydroxybenzylurethan) gebunden ist. Diese fragmentiert nach Spaltung der enzymablen Bindung spontan, und es entsteht ein Carbaminsäurederivat, das decarboxyliert und das gewünschte Peptid oder Peptidkonjugat freisetzt (Schema 2).



In einem orientierenden Experiment wurde das PhAcOZ-geschützte Peptid 3^[10] mit Penicillin-G-Acylase, einem Enzym, das spezifisch Phenylessigsäureester und -amide erkennt und unter sehr milden Bedingungen spaltet^[11], schonend zum Phenolat 4 hydrolysiert, das spontan fragmentierte und das Peptid 5 in hoher Ausbeute freisetzt (Schema 2). Bei dieser Umsetzung trat keine Nebenreaktion auf: einerseits, weil das aus dem

Phenolat gebildete Chinonmethid durch Wasser oder – effizienter – durch ein zugesetztes Nucleophil wie NaHSO_3 , abgefangen und so ein Angriff von **6** auf das freigesetzte Amin **5** verhindert wurde, andererseits, da die Substratspezifität der Penicillin-Acylase gewährleistet, daß ausschließlich der Phenylsäureester gespalten wird und nicht die C-terminale Estergruppe oder die Peptidbindungen.

Um mit dieser vorteilhaften enzymatischen Methode das komplexe Phosphoglycohexaspeptid **2** aufzubauen, wurde das PhAcOZ-geschützte Seringlycosid **8** durch Umsetzung des Dihydrooxazols **7**^[12] mit PhAcOZ-Ser hergestellt und dann mit Prolinolylester **9** zum vollständig geschützten Glycodipeptid **10** in hoher Ausbeute gekuppelt (Schema 3). Die C-terminale Esterfunktion in **10** wurde selektiv durch Pd^0 -vermittelten Allyltransfer auf Morphin abgespalten^[13]. Weiterhin wurde **8** als *tert*-Butylester **11** maskiert, dessen N-terminalen Deblockierung unter sehr milden Bedingungen durch Penicillin-G-Acylase-katalysierte Spaltung des PhAcOZ-Urethans gelang. Die so erhaltenen selektiv demaskierten, glycosylierten Fragmente **12** und **13** wurden zum Glycotripeptid **14** in hoher Ausbeute verknüpft, dessen N-Terminus durch Penicillin-G-Acylase-induzierte Spaltung des PhAcOZ-Urethans unter neutralen Bedingungen selektiv entschützt wurde. Die Aminosäurekette des so zugänglichen Diglycotripeptids **15** wurde durch Kondensation mit der PhAcOZ-maskierten Dipeptidcarbonsäure **16**^[14] verlängert. Aus dem dabei gebildeten komplexen und empfindlichen Diglycopentapeptid **17** wurde die PhAcOZ-Gruppe wiederum Penicillin-Acylase-katalysiert abgelöst und so das selektiv entschützte Intermediat **18**, das zwei glycosyierte und eine nicht-funktionalisierte Aminosäurefunktion enthält, in zufriedenstellender Ausbeute erhalten. Die enzymatischen Umsetzungen werden am besten in Gegenwart von 30 Vol.-% Methanol als Cosolvens durchgeführt, um zu garantieren, daß die PhAcOZ-

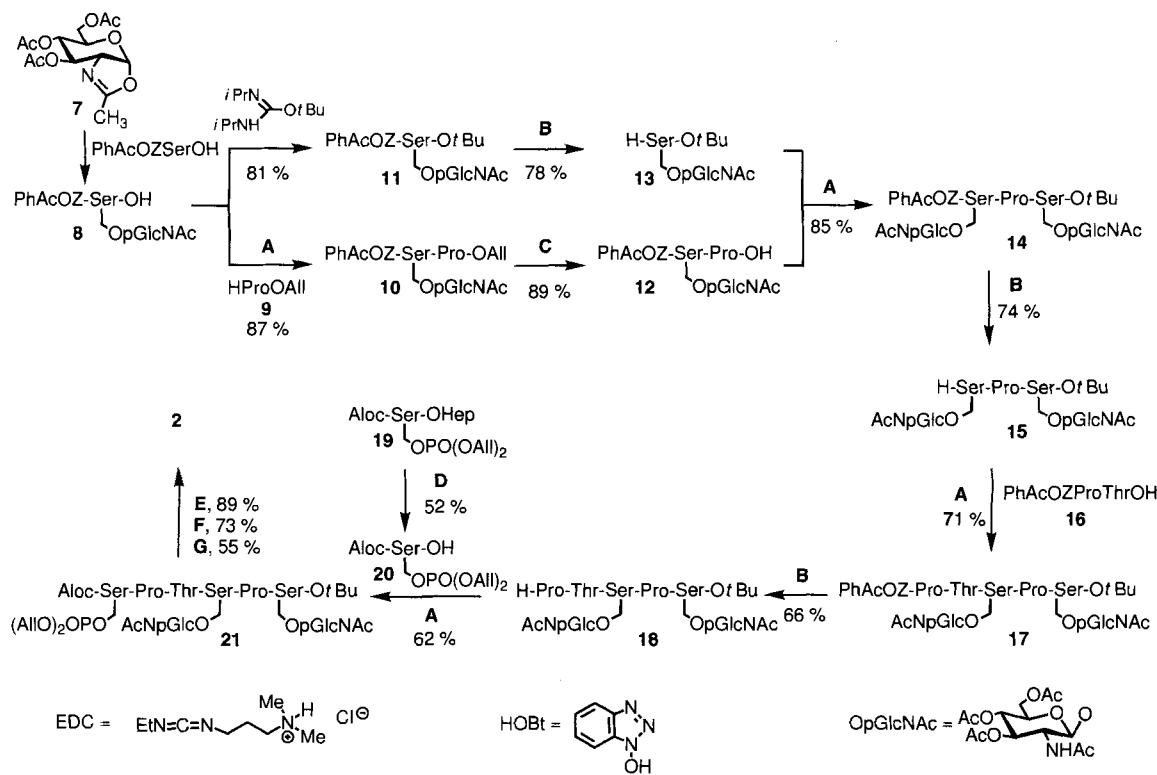
geschützten Substrate unter den Reaktionsbedingungen löslich und damit für den Biokatalysator zugänglich sind.

Für die nachfolgende Einführung eines phosphorylierten, d. h. anders modifizierten Serinbausteins wurde das Phosphoserin **20** benötigt. Dessen Herstellung gelang durch selektive Spaltung des Heptyesters im vollständig geschützten Phosphoserin **19** mit Lipase aus *Aspergillus niger*^[15] unter äußerst milden Bedingungen. Die Verknüpfung von **18** und **20** lieferte das gewünschte komplexe, multifunktionelle Phosphoglycohexaspeptid **21**^[16].

Abschließend wurden zunächst alle Allylschutzgruppen durch Behandlung mit Ameisensäure/*n*-Butylamin in Gegenwart von $[\text{Pd}(\text{Ph}_3\text{P})_4]$ bei Raumtemperatur entfernt^[17]. Dann wurde der *tert*-Butylester mit Trifluoressigsäure gespalten, und die selektive Demaskierung der Hydroxygruppen der Kohlenhydratbausteine gelang mit Hydrazinhydrat in Methanol^[18].

Bei den hier beschriebenen enzymatischen und nichtenzymatischen Umsetzungen traten keine Nebenreaktionen auf. Die Peptidbindungen, die O-Acetatbindungen in den Kohlenhydraten und die Phosphatbindungen blieben unangetastet, und auch eine unter den sauren Bedingungen mögliche Anomerisierung oder Spaltung der glycosidischen Bindungen^[19] sowie eine β -Eliminierung des Phosphatrestes oder der Kohlenhydratbausteine, die im Basischen zu befürchten ist^[18, 20], konnten nicht nachgewiesen werden.

Insgesamt haben wir eine enzymatische Strategie für die Synthese von unterschiedlich funktionalisierten, komplexen Peptidkonjugaten entwickelt und ihre Leistungsfähigkeit am Beispiel der ersten Synthese eines Phosphoglycohexaspeptids, einer charakteristischen Partialstruktur der C-terminalen Wiederholungssequenz der großen Untereinheit der RNA-Polymerase II



Schema 3. Enzymatische Synthese von **2**. A) EDC/HOBt (2 Äquiv./2 Äquiv.); B) Penicillin-G-Acylase, 0.07 M Phosphatpuffer, 30 Vol.-% Methanol, NaHSO_3 (500 Äquiv.), $\text{pH} = 7.5$, 25 °C; C) $[\text{Pd}(\text{Ph}_3\text{P})_4]$, Morphin (1.1 Äquiv.); D) Lipase aus *Aspergillus niger*; 0.2 M Phosphatpuffer ($\text{pH} = 7$, 37 °C); E) $[\text{Pd}(\text{Ph}_3\text{P})_4]$, $\text{HCOOH}/n\text{BuNH}_2$ (10 Äquiv./6 Äquiv.), Raumtemperatur; F) Trifluoressigsäure (TFA), Raumtemperatur; G) Hydrazinhydrat (3000 Äquiv.), Methanol, Raumtemperatur.

aus Säugetieren, demonstriert. Mit dieser Methode sollten weitere O-phosphorylierte und O-glycosyierte Peptidkonjugate zugänglich sein, deren Untersuchung zu neuen Erkenntnissen im Bereich der bioorganischen Chemie und der Biologie führen sollte.

Eingegangen am 21. März 1996 [Z 8954]

Stichworte: Enzyme · Glycopeptide · Peptide · Schutzgruppen

- [1] a) T. Hunter, M. Karin, *Cell* **1992**, *70*, 375; b) A. Levitzki, *Eur. J. Biochem.* **1994**, *226*, 1; c) P. J. Casey, *Science* **1995**, *268*, 221; d) S. E. Egan, R. A. Weinberg, *Nature* **1993**, *365*, 781; e) M. S. Boguski, F. McCormick, *Nature* **1993**, *366*, 643.
- [2] Übersichtsartikel: A. J. Bridges, *Chemtracts Org. Chem.* **1995**, *8*, 73.
- [3] G. W. Hart, W. G. Kelly, M. A. Blomberg, E. P. Roquemore, L.-Y. D. Dong, L. Kreppel, T.-Y. Chou, D. Snow, K. Greis, *Glyco- and Cellbiology*, Springer, Heidelberg, **1994**, zit. Lit.
- [4] W. G. Kelly, M. E. Dahmus, G. W. Hart, *J. Biol. Chem.* **1993**, *268*, 10416.
- [5] J. W. Perich in *Peptides and Protein Phosphorylation* (Hrsg.: B. E. Kemp), CRC Press, **1990**, S. 289.
- [6] Übersichtsartikel: H. Kunz, *Angew. Chem.* **1987**, *99*, 297; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1987**, *26*, 294.
- [7] Übersichtsartikel: H. Waldmann, D. Sebastian, *Chem. Rev.* **1994**, *94*, 911.
- [8] Synthese eines glycosylierten Analogons von **2**: E. Meinjhanss, A. Vargas-Berenguel, M. Meldal, H. Paulsen, K. Bock, *J. Chem. Soc. Perkin Trans. 1* **1995**, 2165.
- [9] a) H. Waldmann, E. Nägele, *Angew. Chem.* **1995**, *107*, 2425; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1995**, *34*, 2259; b) H. Waldmann, M. Schelhaas, *ibid.* **1996**, *108*, 82 bzw. **1996**, *35*, 106; c) H. Waldmann, E. Nägele, M. Schelhaas, *Bioorg. Med. Chem.* **1996**, im Druck.
- [10] **3** wurde aus PhAcOZ-Ala-OH und H-Leu-OrBu durch Kupplung mit N-Ethoxycarbonyl-2-ethoxy-1,2-dihydrochinolin ohne nachweisbare Racemisierung (HPLC, NMR) in 94% Ausbeute erhalten. PhAcOZ-geschützte Aminosäuren können einfach aus p-Phenylacetoxymethylchlorformiat und N,O-Bis(trimethylsilyl)aminosäuren aufgebaut werden. D. R. Bolin, I. I. Sytu, F. Humiec, J. Meienhofer, *Int. J. Peptide Protein Res.* **1989**, *33*, 353, zit. Lit.
- [11] T. Pohl, H. Waldmann, *Tetrahedron Lett.* **1995**, *36*, 2963, zit. Lit.
- [12] G. Arsequell, L. Krippner, R. A. Dwek, S. Y. C. Wong, *J. Chem. Soc. Chem. Commun.* **1994**, 2383.
- [13] S. Friedrich-Bohnitschek, H. Waldmann, H. Kunz, *J. Org. Chem.* **1989**, *54*, 751.
- [14] **16** wurde in 93% Ausbeute aus PhAcOZ-Pro-Thr-OAll durch selektive Allylesterspaltung mit [Pd(Ph₃P)₄]/Morpholin erhalten.
- [15] D. Sebastian, H. Waldmann, unveröffentlichte Ergebnisse. Für die Spaltung von Heptylestern in Glycopeptiden mit einer anderen Lipase siehe: P. Braun, H. Waldmann, H. Kunz, *Bioorg. Med. Chem.* **1993**, *1*, 197.
- [16] **21**: Farbloser, amorpher Feststoff; R_f : 0.37 (Chloroform/Methanol, 6/1 (v/v)); $[\alpha]_D^{25} = -65.4$ ($c = 1$ in MeOH); ¹H-NMR (400 MHz, CD₃OD, 25 °C, TMS): $\delta = 6.06 - 5.88$ (m, 3H, CH=CH₂), 5.43–5.08 (m, 8H, 3-H, 3'-H, CH=CH₂), 5.01 (dd, $J(3,4) = J(4,5) = J(3',4') = J(4',5') = 9$ Hz, 2H, 4-H, 4'-H), 4.78 (d, $J(1,2) = 8.5$ Hz, 1H, 1-H), 4.73 (d, $J(1',2') = 8.5$ Hz, 1H, 1'-H), 4.71 (t, $J = 6$ Hz, 1H, γ -CH Ser), 2.40–2.19 (m, 2H, β -CH₂ Pro, β' -CH₂ Pro), 2.16–1.85 (m, 30H, β -CH₂ Pro, β' -CH₂ Pro, γ -CH₂ Pro, γ' -CH₂ Pro, COCH₃), 1.46 (s, 9H, C(CH₃)₃), 1.19, 1.14 (d, $J = 6$ Hz, 3H, γ -CH₃ Thr, zwei Rotamere); FAB-MS (Glycerin): m/z : 1533.602 [$M^+ + H$].
- [17] Y. Hayakawa, H. Kato, M. Uchiyama, H. Kajino, R. Noyori, *J. Org. Chem.* **1986**, *51*, 2402.
- [18] P. Schultheiss-Reimann, H. Kunz, *Angew. Chem.* **1983**, *95*, 64; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1983**, *22*, 62.
- [19] H. Kunz, *Pure Appl. Chem.* **1993**, *65*, 1223.
- [20] a) G. Shapiro, D. Büchler, C. Dalvit, M. Fernandez, B. Gomez-Lor, E. Pombo-Villar, U. Strauss, R. Swoboda, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **1996**, *4*, 409; b) J. R. Vercellotti, R. Fernandez, C. J. Chang, *Carbohydr. Res.* **1974**, *5*, 97.

Modelle für Reaktionen am aktiven Zentrum der Galactose-Oxidase **

Jason A. Halfen, Victor G. Young, Jr. und William B. Tolman*

Vor kurzem wurden Verbände aus organischen, freien Radikalen und benachbarten Metallzentren als wichtiger Bestandteil der aktiven Zentren von Enzymen, die Multielektronen-Redoxreaktionen katalysieren^[1], identifiziert. Ein faszinierendes Beispiel eines funktionell bedeutsamen derartigen „Metall-Radikal-Paars“ liegt bei der Galactose-Oxidase (GAO)^[2] vor, einem Pilz-Enzym, dessen aktives Zentrum ein Kupferatom enthält, welches die Zwei-Elektronen-Oxidation von Alkoholen zu Aldehyden ermöglicht. Durch biophysikalische Untersuchungen^[2a, 3], einschließlich Kristallstrukturanalysen^[4], konnte die Struktur des aktiven Zentrums aufgeklärt (Abb. 1, Einschub),

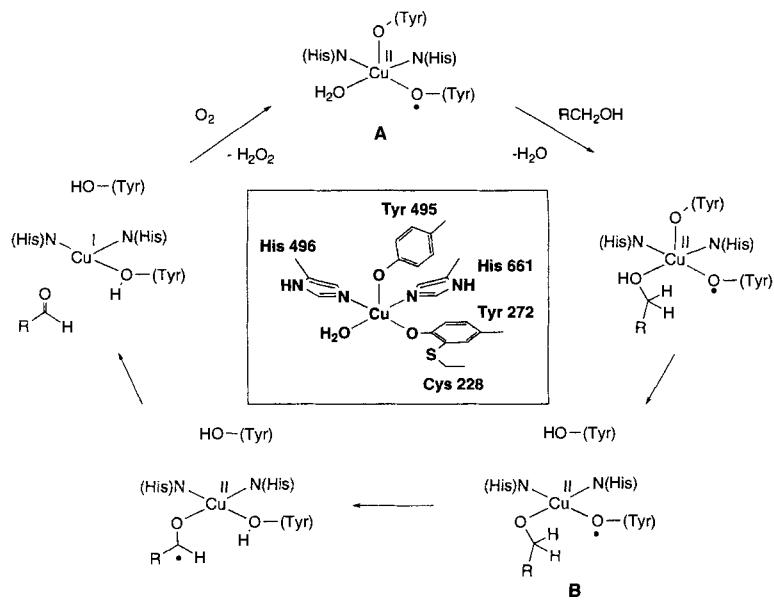


Abb. 1. Schematische Darstellung des kristallographisch charakterisierten aktiven Zentrums der Galactose-Oxidase bei pH 7.0 (Einschub) [4], sowie postulierter Mechanismus der enzymvermittelten Alkoholoxidation [2].

und die elektronischen und strukturellen Eigenschaften der aktiven Form beschrieben werden. Es wird angenommen, daß diese Form (Struktur **A**, Abb. 1) ein Cu^{II}-Ion enthält, welches stark an ein Radikal koordiniert ist, das sich an einem äquatorial gebundenen, kovalent S-Cys-modifizierten Tyrosinatoliganden befindet und durch π -Stapelwechselwirkungen zu einem benachbarten Tryptophanrest (nicht abgebildet) stabilisiert wird. Das Cu^{II}-Ion ist zu Zwei-Elektronen-Redoxreaktionen befähigt, und der Komplex **A** mit Kopplung von freiem Radikal und Kupferzentrum soll sich unter Deprotonierung des Alkoholsubstrates

[*] Prof. W. B. Tolman, J. A. Halfen, Dr. V. G. Young, Jr.
Department of Chemistry
University of Minnesota
207 Pleasant Street S.E., Minneapolis, MN 55455 (USA)
Telefax: Int. +612/624-7029
E-mail: tolman@chemsun.chem.umn.edu

[**] Diese Arbeit wurde von den National Institutes of Health (GM 47365), der National Science Foundation (National Young Investigator Award für W. B. T.) sowie der Alfred P. Sloan und der Camille and Henry Dreyfus Foundation (Stipendium für W. B. T.) gefördert. J. A. H. dankt der University of Minnesota für ein Doktorandenstipendium. Eines der Diffraktometer wurde teilweise von der National Science Foundation finanziert (CHE-9413114).