

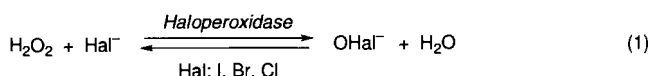
- [1] T. T. Dabrah, H. J. Harwood, L. H. Huang, N. D. Jankovich, T. Kaneko, J.-C. Li, S. Lindsey, P. M. Moshier, T. A. Subashi, M. Therrien, P. C. Watts, *J. Antibiot.* **1997**, *50*, 1.  
 [2] T. T. Dabrah, T. Kaneko, W. Massefski, Jr., E. B. Whipple, *J. Am. Chem. Soc.* **1997**, *119*, 1594. Wir danken Dr. T. Kaneko für einen Vorabdruck dieser Veröffentlichung.  
 [3] G. Popják, W. S. Agnew, *Mol. Cell. Biochem.* **1979**, *27*, 97.  
 [4] S. Clarke, *Annu. Rev. Biochem.* **1992**, *61*, 355.  
 [5] J. L. Goldstein, M. S. Brown, *Nature* **1990**, *343*, 425.  
 [6] J. E. Buss, J. C. Marsters, *Chem. Biol.* **1995**, *2*, 787.  
 [7] Für Übersichtsartikel zur intramolekularen Diels-Alder-Reaktion siehe z. B.: a) E. Ciganek, *Org. Synth.* **1984**, *32*, 1; b) W. R. Roush in *Comprehensive Organic Synthesis*, Vol. 5 (Hrsg.: B. M. Trost, I. Fleming, L. A. Paquette), Pergamon, Oxford, **1991**, S. 513; c) G. Helmchen in *Methoden Org. Chem. (Houben-Weyl)* 4th ed., 1952–, Bd. E21c, **1995**, S. 2872; für die Herstellung von Bicyclo[4.3.1]dec-1(9)-en durch intramolekulare Diels-Alder-Reaktion siehe: d) K. J. Shea, S. Wise, *J. Am. Chem. Soc.* **1978**, *100*, 6519; e) *Tetrahedron Lett.* **1979**, 1011; f) S. L. Gwaltney, S. T. Sakata, K. J. Shea, *ibid.* **1995**, 7177.  
 [8] U. Hertenstein, S. Hünig, M. Öller, *Chem. Ber.* **1980**, *113*, 3783.  
 [9] G. Wittig, H. Reiff, *Angew. Chem.* **1968**, *80*, 8; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1968**, *7*, 7.  
 [10] Alle neuen Verbindungen wiesen zufriedenstellende spektroskopische sowie analytische Daten und/oder hochaufgelöste Massenspektren auf.

## Metallfreie bakterielle Haloperoxidasen als ungewöhnliche Hydrolasen: Aktivierung von H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> durch Bildung von Peressigsäure\*\*

Martin Picard, Jürgen Gross, Ellen Lübbert, Sabine Tölzer, Susanne Krauss, Karl-Heinz van Pée und Albrecht Berkessel\*

Professor Waldemar Adam zum 60. Geburtstag gewidmet

Haloperoxidasen katalysieren die in Gleichung (1) gezeigte Umsetzung von Wasserstoffperoxid mit Chlorid-, Bromid- oder

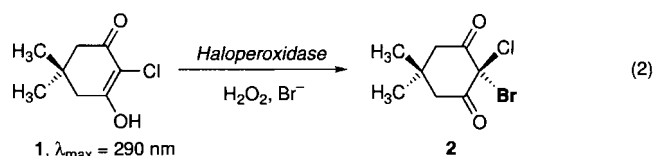


Iodid-Ionen zu den entsprechenden Hypohalogeniten, die organische Substrate elektrophil halogenieren können und somit in der Biosynthese halogener Naturstoffe eine wichtige Rolle spielen.<sup>[1–3]</sup> Haloperoxidasen können aber auch die Sauerstoffübertragung von Wasserstoffperoxid auf organische Substrate wie Olefine und Thioether katalysieren.<sup>[4]</sup> Aus diesem Grund interessiert diese Enzymklasse auch für präparative Anwendungen, z. B. die asymmetrische Epoxidierung prochiraler Olefine.<sup>[4]</sup> Zusätzlich attraktiv ist, daß dabei mit Wasserstoffperoxid

als mildem, billigem und umweltverträglichem Oxidans gearbeitet werden kann.

Bei den meisten Haloperoxidasen ist an der in Gleichung (1) gezeigten Redoxreaktion ein Cofaktor beteiligt, und dessen Art kann zur Klassifizierung herangezogen werden. So unterscheidet man Häm-haltige und Vanadium-haltige Haloperoxidasen sowie solche, die gar kein Metall enthalten. Als präparativ in Oxidationen einsetzbar haben sich von den metallhaltigen bislang nur Häm-Peroxidasen bewährt, z. B. die Chloroperoxidase aus dem Pilz *Caldariomyces fumago*.<sup>[4]</sup> Wenngleich die Ausbeuten und Enantioselektivitäten bei einigen Substraten sehr gut waren, steht einer breiten Anwendbarkeit die relativ geringe Stabilität dieses Enzyms (bezüglich Temperatur, organischen Co-Solventien, pH, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) entgegen.

Vor etwa zehn Jahren wurden von der Arbeitsgruppe van Pée erstmals metallfreie Haloperoxidasen bakteriellen Ursprungs beschrieben, nämlich die Chloroperoxidasen aus *Pseudomonas pyrrrocinia* (CPO-P)<sup>[5]</sup> und aus *Streptomyces aureofaciens* Tü24 (CPO-T).<sup>[6]</sup> Ihre Haloperoxidase-Aktivität wurde mit dem Monochlordimedon-Assay nachgewiesen [Gl. (2)]: Bei diesem Test

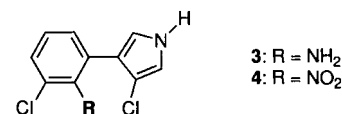


wird photometrisch die Abnahme der Enolon-Absorption des Substrats 2-Chlordimedon **1** bei  $\lambda = 290 \text{ nm}$  als Folge seiner Umwandlung in **2** verfolgt.<sup>[7]</sup> Weitere Arbeiten konnten die halogenierende Aktivität dieser Enzyme auch an natürlichen Substraten, z. B. bei der Biosynthese des Antimykotikums Pyrrolnitrin **4**, zeigen.<sup>[5, 8]</sup> CPO-P/CPO-T führen in diesem Fall nicht nur die beiden Chloratome ein, sondern bewirken in Gegenwart von Wasserstoffperoxid auch die Oxidation der Aminogruppe des Vorläufers **3** zur Nitrogruppe von **4**.<sup>[9]</sup>

CPO-P und CPO-T wurden als sehr stabile Enzyme beschrieben, was sie zu interessanten potentiellen Katalysatoren für präparative Anwendungen macht.<sup>[5, 6]</sup>

Zum Mechanismus der Oxidationskatalyse durch Häm- und Vanadium-haltige Haloperoxidasen existieren relativ klare Vorstellungen,<sup>[1–3]</sup> die Funktionsweise der metallfreien bakteriellen Enzyme war dagegen zu Beginn unserer Arbeiten völlig unklar. Ein Vorschlag, der auf der intermediären Bildung eines Methionin-Sulfoxids im aktiven Zentrum des Enzyms beruhte,<sup>[10]</sup> ist nach dem Ergebnis einer Kristallstrukturanalyse der Bromoperoxidase A2 aus *Streptomyces aureofaciens* CATCC 10762<sup>[11]</sup> wenig realistisch. Vielmehr hat die Kristallstrukturanalyse im aktiven Zentrum des Enzyms eine „katalytische Triade“ Ser-His-Asp nachgewiesen, was zu der Frage führte, wie diese Triade, die üblicherweise die Hydrolyse von Ester- und Amidbindungen katalysiert,<sup>[12]</sup> die Aktivierung/Umsetzung von H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> katalysieren kann. Wir beschreiben hier erstens unsere Versuche zur präparativen Verwendung der Chloroperoxidasen aus *Pseudomonas pyrrrocinia* und *Streptomyces aureofaciens* als Oxidationskatalysatoren und zweitens Experimente zur Klärung des Katalysemechanismus sowie die daraus abgeleitete mechanistische Hypothese, die die experimentellen Befunde zu erklären vermag.

Die Ergebnisse unserer Versuche zur Oxidationskatalyse mit CPO-P und CPO-T sind folgende: a) Halogenhydrinbildung:



[\*] Prof. Dr. A. Berkessel,<sup>[+]</sup> Dipl.-Chem. M. Picard, Dr. J. Gross  
 Organisch-chemisches Institut der Universität  
 Im Neuenheimer Feld 270, D-69120 Heidelberg  
 Telefax: Int. + 6221/54-4205  
 E-mail: gz7@ix.urz.uni-heidelberg.de

Dipl.-Chem. E. Lübbert, Dipl.-Lebensmittelchem. S. Tölzer,  
 Prof. Dr. K.-H. van Pée  
 Institut für Biochemie der Technischen Universität  
 Mommsenstraße 13, D-01069 Dresden

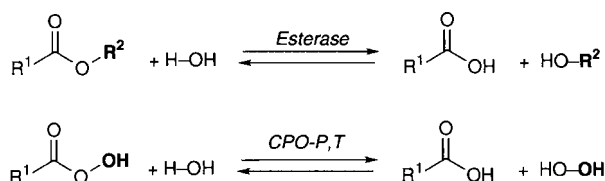
S. Krauss  
 Institut für Mikrobiologie der Universität Hohenheim  
 Garbenstraße 30, D-70593 Stuttgart

[+] Neue Anschrift: Institut für Organische Chemie der Universität, Greinstraße 4, D-50939 Köln  
 Telefax: Int. + 221/470-5102  
 E-mail: berkessel@uni-koeln.de

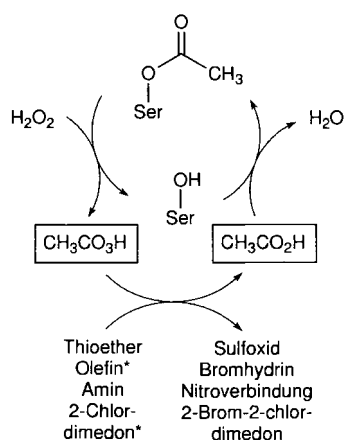
[\*\*] Diese Arbeit wurde vom Fonds der Chemischen Industrie, von der Max-Buchner-Forschungstiftung und von der Deutschen Forschungsgemeinschaft gefördert.

In Gegenwart von Wasserstoffperoxid und Bromid wurden Styrol, (*E*)- $\beta$ -Methylstyrol und 1,2-Dihydronaphthalin rasch und quantitativ umgesetzt. Als Produkte wurden durch Vergleich mit authentischen Proben die zu erwartenden Bromhydrine identifiziert, z. B. 2-Brom-1-phenylethanol im Fall von Styrol. Bemerkenswert ist, daß sämtliche Bromhydrine als racemische Gemische entstanden. Die analoge Bildung von Chlorhydrinen gelang nicht. b) Epoxidierung von Olefinen: Weder CPO-P noch CPO-T katalysierte die Epoxidierung von Olefinen mit  $H_2O_2$ , unabhängig davon, ob elektronenreiche (Styrol, 1,2-Dihydronaphthalin) oder elektronenarme Substrate ((*E*)-Croton-, (*E*)-Zimtsäure, 2-Cyclohexenon, 2-Isopropylidencyclopentanon) eingesetzt wurden. c) Oxidation von Thioethern: Mit CPO-P und CPO-T konnten Thioether wie Methyl-, Ethyl- und Octylphenylsulfid quantitativ in die entsprechenden Sulfoxide überführt werden. Auch diese Sulfoxidation ergab vollständig racemische Produkte. d) Oxidation von Anilinderivaten: 2-, 3- und 4-Chloranilin wurden in Gegenwart von CPO-P oder CPO-T und Wasserstoffperoxid glatt zum jeweiligen Chlornitrobenzol umgesetzt.

Die Bildung racemischer Produkte spricht nicht für eine Umsetzung der Substrate im aktiven Zentrum des Enzyms, sondern deutet auf eine diffusible, achirale oxidierende Spezies hin. CPO-P und CPO-T sind nur in Acetat- oder Propionatpuffer aktiv, nicht jedoch z. B. in Phosphatpuffer. Die Abhängigkeit der Aktivität von der Pufferkonzentration zeigt eine Sättigungscharakteristik (nicht abgebildet). Die Vermutung lag nahe, daß im aktiven Zentrum von CPO-P und CPO-T in Wirklichkeit nicht die Halogenoxidation katalysiert wird, sondern eine Gleichgewichtseinstellung zwischen Wasserstoffperoxid und Peracetat (Perpropionat). Wie bereits erwähnt, befindet sich im aktiven Zentrum des Enzyms die katalytische Triade der Serin-Esterasen. Wie in Schema 1 gezeigt, ist die Esterhydrolyse (obere Gleichung von links nach rechts) der Reaktion einer



Schema 1. Vergleich der Esterhydrolyse mit der Reaktion einer Carbonsäure mit  $H_2O_2$ .



Schema 2. Postulierter Mechanismus der Katalyse durch metallfreie Haloperoxidasen. Die Umsetzungen der mit Stern gekennzeichneten Substanzen erfordern die Gegenwart von Bromid.

Carbonsäure mit  $H_2O_2$  (untere Gleichung von rechts nach links) sehr ähnlich. Daraus ließe sich folgern, daß Persäure in sehr geringer stationärer Konzentration in Lösung vorliegen sollte und Thioether zu Sulfoxiden sowie Bromid zu Brom oxidieren könnte, das seinerseits die Halogenhydrinbildung bewirken würde. Analog wie bei der Esterhydrolyse sollte die Hydroxygruppe des „katalytischen“ Serinrests intermediär acyliert werden (Schema 2).<sup>[12]</sup> Tatsächlich findet sich in der Kri-

stallstruktur der (aus Acetatpuffer kristallisierten) Haloperoxidase aus *Streptomyces aureofaciens* in der Nähe dieser Hydroxygruppe zusätzliche Elektronendichte, die als Acetatrest interpretiert wurde.<sup>[11]</sup>

Die Annahme, daß enzymkatalysiert Peressigsäure als diffusible oxidierende Spezies entsteht, wird durch folgende Befunde zusätzlich gestützt: a) Inkubation von CPO-T mit  $H_2O_2$  in Acetatpuffer und anschließende Ultrafiltration ergaben ein proteinfreies Filtrat, das in Gegenwart von Bromid eine positive Monochlordimedon-Reaktion zeigt (Abb. 1). b) Oxidationsreaktionen (Halogenhydrinbildung, Sulfoxidation), die mit CPO-P/CPO-T und  $H_2O_2$  bewirkt werden konnten, gelangen genauso mit verdünnter Peressigsäure. Hierzu gehörte auch die in Gleichung (2) gezeigte Nachweisreaktion für Peroxidasen. Es

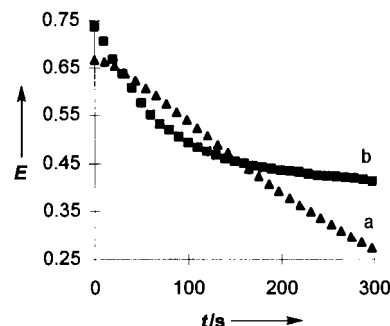


Abb. 1. Monochlordimedon-Assay in Acetatpuffer in Gegenwart von NaBr mit a) CPO-T und  $H_2O_2$  und b) proteinfreiem Ultrafiltrat nach Inkubation von CPO-T mit  $H_2O_2$  in Acetatpuffer.  $E$  = Extinktion.

ist bekannt, daß Persäuren Bromid zu Brom oxidieren<sup>[13]</sup> und daß letzteres die Umsetzung  $1 \rightarrow 2$  und die Halogenhydrinbildung aus Olefinen in wäßrigem Milieu bewirkt. c) Durch verdünnte Peressigsäure wurden unter den angewendeten Reaktionsbedingungen Olefine nicht direkt epoxidiert (siehe oben). d) In Gegenwart von  $H_2O_2$ /Chlorid ließ sich mit den Enzymen CPO-P und CPO-T keine Dichlordimedonbildung erreichen.<sup>[5, 6]</sup> Dies gelang auch mit Peressigsäure in Gegenwart von Chlorid nicht. e) Phenylmethansulfonfluorid (PMSF) ist ein bekannter Inhibitor für Serin-Proteasen und -Esterasen; seine Wirkung beruht auf der Sulfonierung der Serin-Hydroxygruppe im aktiven Zentrum.<sup>[14]</sup> PMSF inhibierte auch durch CPO-P und CPO-T katalysierte Oxidationen. Abbildung 2 zeigt exemplarisch die von der Inkubationszeit abhängige Inhibierung des Enzyms CPO-T bezüglich der Monochlordimedon-Reaktion [Gl. (2)]. Offensichtlich ist die irreversible Inhibierung durch PMSF in Wasser wesentlich schneller als in Acetatpuffer.<sup>[15]</sup> Dies erklärt sich aus der kompetitiven Hemmung der Reaktion

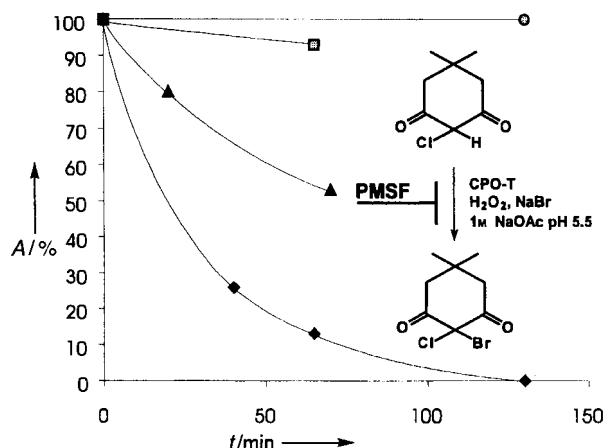


Abb. 2. Zeitabhängigkeit der Inhibierung der Oxidationsaktivität von CPO-T durch PMSF in Wasser und in Natriumacetat-Puffer. o Kontrolle CPO-T/Wasser, □ Kontrolle CPO-T/Puffer, ● Inhibierung CPO-T/Wasser, ▲ Inhibierung CPO-T/Puffer.  $t$  = Inkubationszeit,  $A$  = relative Aktivität.

zwischen PMSF und Serin-Hydroxygruppe im aktiven Zentrum durch Acetat.

Versuche, die gebildete Peressigsäure außer durch ihr Reaktivitätsprofil auch direkt mit spektroskopischen Methoden nachzuweisen, scheiterten bislang an ihrer geringen Gleichgewichtskonzentration neben großen Mengen Wasser und Acetat. Vor diesem Hintergrund hielten wir es für sinnvoll, die enzymkatalysierte Gleichgewichtseinstellung ausgehend von Peressigsäure nachzuweisen (zweite Gleichung in Schema 1 von links nach rechts). Dies ist uns gelungen: Wird eine ca. 30 mM Lösung von Peressigsäure in 1 M Acetatpuffer (pH 5.5) nach Ansäuern auf pH 1 mit Ether extrahiert, so kann im Extrakt durch hochauflösende CI-Massenspektrometrie eindeutig Peressigsäure nachgewiesen werden. Wird die gleiche Lösung mit CPO-T versetzt, so ist bereits nach wenigen Minuten Inkubationszeit im analog erhaltenen Etherextrakt massenspektrometrisch keine Peressigsäure mehr nachweisbar! In einem Kontrollversuch mit einer äquivalenten Menge Trypsin statt CPO-T nimmt über Stunden die Peressigsäurekonzentration nicht meßbar ab.

Unsere mechanistische Hypothese impliziert, daß die Haloperoxidasen CPO-P und CPO-T auch Esterase-Aktivität zeigen sollten. Wir haben diese Annahme mit 4-Nitrophenylacetat als Substrat bestätigt: Bei 20 °C und pH 5.5 erfolgte rasche Hydrolyse, während ohne Enzym keine Umsetzung nachweisbar war. Die gefundene Hydrolyse-Aktivität ist in Einklang mit der Kategorisierung der röntgenstrukturanalytisch untersuchten Bromoperoxidase aus *Streptomyces* als  $\alpha/\beta$ -Hydrolase.<sup>[11]</sup> Ähnlich wie die irreversible Inhibierung der Enzymaktivität durch PMSF (siehe oben) verläuft die Umsetzung von 4-Nitrophenylacetat in Acetatpuffern höherer Konzentration langsamer als in solchen niedrigerer Konzentration. Beispielsweise sinkt die Umsatzgeschwindigkeit beim Wechsel von 0.05 M auf 0.5 M auf ca. 1/4. Natürlich wird auch die Hydrolyse-Aktivität von CPO-P und CPO-T durch PMSF inhibiert.

Wenn bei CPO-P und CPO-T die katalytische Triade die Gleichgewichtseinstellung zwischen Acetat/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> und Peressigsäure katalysiert, sollten andere Serin-Esterasen das eventuell auch können.<sup>[16]</sup> Wir haben diese Vermutung anhand von Chymotrypsin, Trypsin, Elastase, der alkalischen Protease aus *Streptomyces griseus* und der Acetylcholin-Esterase aus *Torpedo californica* überprüft. Während die ersten vier Enzyme im Monochlordimedon-Test [Gl. (2)] inaktiv sind (vgl. auch das Massenspektrometrie-Experiment oben), ist die Acetylcholin-Esterase ähnlich aktiv wie CPO-T, wird allerdings durch H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> rasch irreversibel deaktiviert.

Unsere Untersuchungen haben gezeigt, daß die Oxidationsaktivität der metallfreien bakteriellen Haloperoxidasen CPO-P und CPO-T in Wirklichkeit auf eine ungewöhnliche Hydrolase-Reaktion zurückzuführen ist: die Erzeugung von Peressigsäure aus Acetat und Wasserstoffperoxid (Schemata 1 und 2). Für die In-situ-Aktivierung von Wasserstoffperoxid durch Persäurebildung steht damit neben den Lipasen<sup>[17]</sup> ein weiteres enzymatisches System zur Verfügung.

### Experimentelles

Allgemeines: Die Chloroperoxidase aus *Streptomyces aureofaciens* Tü24 (CPO-T) wurde aus pHM621-haltigem *S. lividans*, CPO-P aus *Pseudomonas pyrocinia* aus pHW321-haltigem *E. coli* gewonnen [18, 19]. Chymotrypsin, Trypsin, Elastase und Acetylcholin-Esterase aus *Torpedo californica* wurden von Sigma bezogen, die alkalische Protease von ICN. *n*-Octylphenylsulfid sowie sämtliche Sulfoxide wurden nach Literaturvorschriften hergestellt [20, 21]. Die Produkte wurden anhand authentischer Proben identifiziert.

Enzymkatalysierte Oxidationen (typische Experimente): Standardtest auf Haloperoxidase-Aktivität nach Hewson und Hager [7] mit Monochlordimedon (44  $\mu$ M), H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (7.2 mM), NaBr (82 mM) in 1 M Acetatpuffer (pH 5.5), 25 °C (wurde auch bei den im Text angegebenen Serin-Hydrolasen angewendet): Die Reaktion wurde

durch Zusatz des Enzyms gestartet und photometrisch bei  $\lambda = 290$  nm verfolgt. Zur Analyse der Lösung auf enzymatisch erzeugtes, niedermolekulares Oxidans wurden CPO-T und H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> in Acetatpuffer 30 min inkubiert und anschließend das Enzym durch Ultrafiltration (Centricon-10, Amicon) entfernt. Vom Filtrat wurden 500  $\mu$ L zu 500  $\mu$ L einer Lösung von Monochlordimedon (88  $\mu$ M) und NaBr (164 mM) in 1.0 M Acetatpuffer (pH 5.5) gegeben und die Reaktion photometrisch verfolgt. Bromhydrinbildung: 3.0 mL 1 M Natriumacetatpuffer (pH 4.0), 0.5 mL 1,4-Dioxan, 0.5 mL *tert*-Butylalkohol, 1.0 mL 1 M NaBr, 150  $\mu$ L H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (30%) und 100  $\mu$ M des Olefins wurden durch Ultraschallbehandlung (10 s) homogenisiert. Die Reaktion wurde durch Zusatz von 4 u (bzgl. Monochlordimedon-Reaktion, siehe oben) CPO-P oder CPO-T gestartet und bei 50 °C ausgeführt (3 h). Extraktion mit 5 mL Ether (60 s Ultraschall), GC-, GC/MS-Analyse. Kontrollversuche wurden in gleicher Weise ohne Zusatz von Enzym ausgeführt. Epoxidierung von Olefinen: Ausführung wie bei der Bromhydrinbildung beschrieben, jedoch ohne NaBr; unter diesen Bedingungen kein Olefinsatz. Oxidation von Thioethern: 4.0 mL 1 M Natriumacetatpuffer (pH 5.5), 1.0 mL 1,4-Dioxan, 150  $\mu$ L H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (30%) und 100  $\mu$ M des Thioethers wurden durch Ultraschallbehandlung (10 s) homogenisiert. Die Reaktion wurde durch Zusatz von 8 u (bzgl. Monochlordimedon-Reaktion, siehe oben) CPO-P oder CPO-T gestartet und bei 22 °C ausgeführt (2 h). Extraktion mit 5 mL Ether (60 s Ultraschall), GC-, GC/MS- bzw. HPLC-Analyse (*n*-Octylphenylsulfid). Kontrollversuche in gleicher Weise ohne Zusatz von Enzym. Aminoxidation: 78  $\mu$ M 2-, 3- oder 4-Chloranilin, 44.4  $\mu$ M H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, 1 M Natriumacetat (pH 4.5). Die Reaktion wurde durch Zusatz von 0.5 u (bzgl. Monochlordimedon-Reaktion, siehe oben) CPO-P oder CPO-T zu 1 mL der Mischung gestartet und bei 30 °C ausgeführt (3-Chloranilin: 30 min, 2-, 4-Chloranilin: 50 min). Produktidentifizierung durch HPLC-Coinjektion.

Oxidationen mit Peressigsäure: Statt H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> und Enzym wurde unter sonst gleichen Versuchsbedingungen Peressigsäure eingesetzt (200  $\mu$ M CH<sub>3</sub>CO<sub>3</sub>H statt 150  $\mu$ M H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>). Im Monochlordimedon-Assay (siehe oben) wurde Peressigsäure 72  $\mu$ M (statt 7200  $\mu$ M H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) verwendet.

Massenspektrometrischer Nachweis des Peressigsäureumsatzes durch CPO-T: Sektorfeld-Massenspektrometer Jeol JMS-700, hochaufgelöstes CI-MS mit Isobutan als Reaktantgas, Positiv-Ionen-Modus, Auflösung  $R = 8000$ , 5–10 Scans der Beschleunigungsspannung akkumuliert ( $m/z$  56–90, 8 s Cycluszeit), Quasimolekülion  $[M + H]^+$  (ber. für C<sub>2</sub>H<sub>5</sub>O<sub>3</sub>: 77.0239, gef.: 77.0261), interne Massenkali-brierung auf Reaktantgas- und Lösungsmittelen. Aliquote (2.5 mL) einer 31 mM Lösung von Peressigsäure in 1 M Natriumacetat (pH 5.5) wurden a) mit 5.5 mg (ca. 50 u) CPO-T versetzt und 10 min bei Raumtemperatur (RT) inkubiert, b) mit 5.5 mg Trypsin versetzt und 1 h bei RT inkubiert, c) ohne Enzymzusatz bei RT aufbewahrt. Anschließend wurde mit H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> auf pH 1 angesäuert, mit 1 mL Ether extrahiert, der Extrakt im N<sub>2</sub>-Strom auf ca. 50  $\mu$ L eingengt und dem Massenspektrometer über das Referenzionensystem zugeführt. Während bei den Ansätzen (b) und (c) die Peressigsäure eindeutig und in etwa gleicher Intensität nachweisbar war, konnte sie im Extrakt aus (a) nicht mehr nachgewiesen werden. Außerdem hatten die Ansätze (b) und (c) den typisch beißenden Geruch der Persäure, während dieser bei (a) schon kurz nach der Enzymzugabe verschwand war.

Hydrolase-Aktivität (typische Experimente): Die Enzyme wurden zu einer Lösung von 0.1  $\mu$ M *p*-Nitrophenylacetat in 2.0 mL 1 M Natriumacetatpuffer (pH 5.5) und 10  $\mu$ L *tert*-Butylalkohol gegeben. Die Reaktion wurde anhand der Extinktionszunahme bei  $\lambda = 317$  nm verfolgt.

Inhibierungsexperimente: In einem typischen Experiment wurden 0.04 u CPO-T (bzgl. Monochlordimedon-Reaktion, siehe oben) in 500  $\mu$ L Wasser oder Natriumacetatpuffer (pH 5.5, unterschiedliche Konzentrationen) mit einer Lösung von 4  $\mu$ M PMSF in 20  $\mu$ L *tert*-Butylalkohol bei 50 °C versetzt. Die verbliebene enzymatische Aktivität wurde nach verschiedenen Inkubationszeiten wie beschrieben ermittelt.

Eingegangen am 29. August,  
ergänzte Fassung am 30. Dezember 1996 [Z 9508]

**Stichworte:** Enzymkatalyse · Haloperoxidasen · Hydrolasen · Persäuren

- [1] M. C. R. Franssen, *Biocatalysis* **1994**, *10*, 87–111.
- [2] a) A. Messerschmidt, R. Wever, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1996**, *93*, 392–396; b) D. Rehder, *Angew. Chem.* **1991**, *103*, 152–172; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1991**, *30*, 148–167.
- [3] J. H. Dawson, M. Sono, *Chem. Rev.* **1987**, *87*, 1255–1276.
- [4] a) A. Zaks, D. R. Dodds, *J. Am. Chem. Soc.* **1995**, *117*, 10419–10424; b) E. J. Allain, L. P. Hager, L. Deng, E. N. Jacobsen, *ibid.* **1993**, *115*, 4415–4416; c) H. Fu, H. Kondo, Y. Ichikawa, G. C. Look, C.-H. Wong, *J. Org. Chem.* **1992**, *57*, 7265–7270; d) S. Colonna, N. Gaggero, L. Casella, G. Carrera, P. Pasta, *Tetrahedron: Asymmetry* **1992**, *3*, 95–106.
- [5] W. Wiesner, K.-H. van Pée, F. Lingens, *J. Biol. Chem.* **1988**, *263*, 13725–13732.
- [6] K.-H. van Pée, G. Sury, F. Lingens, *Biol. Chem. Hoppe-Seyler* **1987**, *368*, 1225–1232.
- [7] W. D. Hewson, L. P. Hager, *J. Physiol.* **1980**, *16*, 340–345.
- [8] G. Bongs, K.-H. van Pée, *Enzyme Microb. Technol.* **1994**, *16*, 53–60.
- [9] S. Kirner, K.-H. van Pée, *Angew. Chem.* **1994**, *106*, 346–347; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1994**, *33*, 352.

- [10] T. Haag, F. Lingens, K.-H. van Pée, *Angew. Chem.* **1991**, *103*, 1550–1552; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1991**, *30*, 1487–1488.
- [11] H. J. Hecht, H. Sobek, T. Haag, O. Pfeifer, K.-H. van Pée, *Nat. Struct. Biol.* **1994**, *1*, 532–537. Die katalytische Triade ist in allen bekannten metallfreien Haloperoxidasen konserviert.
- [12] A. Warshel, G. Naray-Szabo, F. Sussman, J.-K. Hwang, *Biochemistry* **1989**, *28*, 3629–3637.
- [13] Y. Sawaki in *Organic Peroxides* (Hrsg.: W. Ando), Wiley, New York, **1992**, S. 443–445.
- [14] a) P. Turini, S. Kurooka, M. Steer, A. N. Corbascio, T. P. Singer, *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **1969**, *167*, 98–104; b) zur Inhibierung der Bromoperoxidase-Aktivität von CPO-P durch PMSF siehe auch I. Pelletier, J. Altenbuchner, R. Mattes, *Biochim. Biophys. Acta* **1995**, *1250*, 149–157.
- [15] Die Inhibierungsgeschwindigkeiten in Acetatpuffern der Konzentrationen 0.5, 0.1 und 0.05 M liegen in der erwarteten Reihenfolge zwischen den in Abbildung 2 gezeigten Kurven (nicht abgebildet).
- [16] I. Pelletier, J. Altenbuchner, *Microbiology* **1995**, *141*, 459–468.
- [17] a) M. Rüsch gen. Klaas, S. Warwel, *Lipid Technol.* **1996**, 77–80; b) S. Warwel, M. Rüsch gen. Klaas, *J. Mol. Catal. B* **1995**, *1*, 29–35; c) M. C. de Zoete, F. van Rantwijk, L. Maat, R. A. Sheldon, *Recl. Trav. Chim. Pays-Bas* **1993**, *112*, 462–463; d) F. Björklund, H. Frykman, S. E. Godtfredsen, O. Kirk, *Tetrahedron* **1992**, *48*, 4587–4592.
- [18] K.-H. van Pée, *J. Bacteriol.* **1988**, *170*, 5890–5894.
- [19] C. Wolframm, F. Lingens, R. Mutzel, K.-H. van Pée, *Gene* **1993**, *130*, 131–135.
- [20] V. N. Ipatieff, H. Pines, B. S. Friedman, *J. Am. Chem. Soc.* **1938**, *60*, 2731–2734.
- [21] G. Kresze, *Methoden Org. Chem. (Houben-Weyl)* 4th ed. 1952–, Vol. E11, S. 719–729.

## Rotaxansynthese durch kurzes Zusammenschmelzen von Rad und Achse

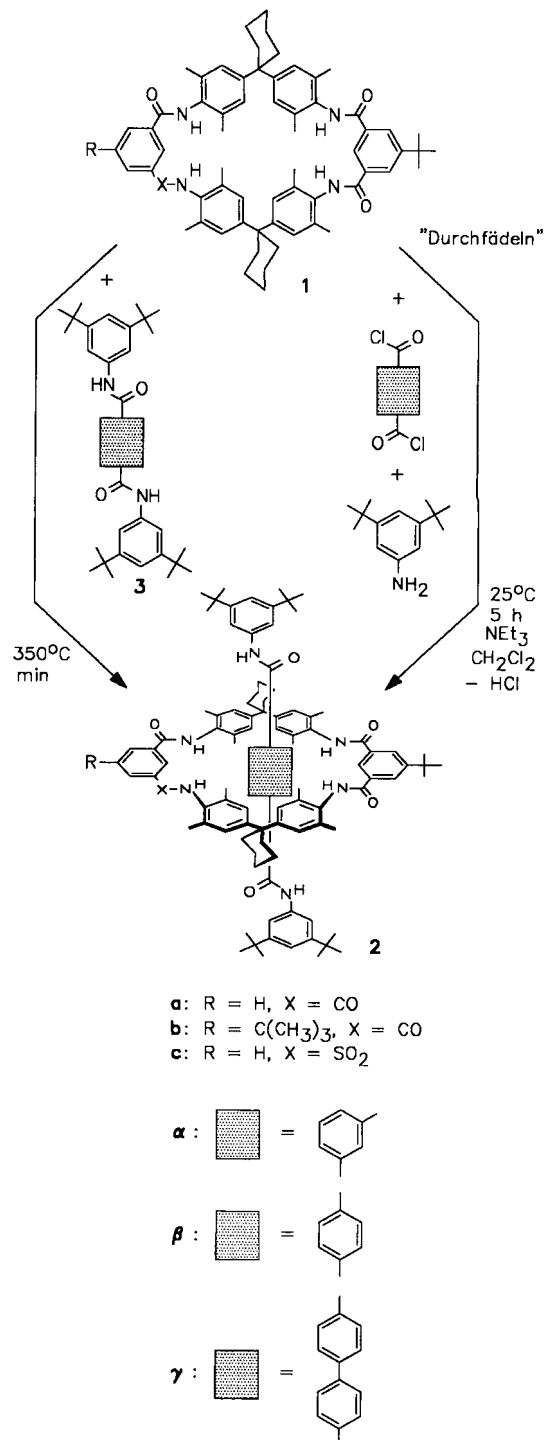
Mirko Händel, Marcus Plevoets, Sven Gestermann und Fritz Vögtle\*

Professor Sigrid D. Peyerimhoff zum 60. Geburtstag gewidmet

Vor zwei Jahren haben wir die ersten Rotaxane des Amidtyps durch Knüpfung von Amidbindungen in der Achse in Gegenwart des Rads hergestellt.<sup>[1]</sup> Die verwendeten (Triphenylmethyl-)Sperrgruppen waren so voluminös, daß Räder vom Typ **1**<sup>[2]</sup> nicht von der Achse herabgleiten konnten. Wir suchten nun nach Möglichkeiten, einen derartigen Makromonocyclus auf die vollständig gebildete Achse aufzufädeln, wie es bei anderen Rotaxantypen über einen „Slipping“-Prozeß stattfindet.<sup>[3]</sup> So gelang uns die erste Synthese von Amidrotaxanen **2** aus den vorgefertigten Rad- und Achsenkomponenten durch einfaches, etwa einminütiges Zusammenschmelzen.

Um Amidrotaxane auf diese Weise synthetisieren zu können (Schema 1), müssen die Verhältnisse von Raumbedarf des Stoppers und Innendurchmesser des Rads so aufeinander abgestimmt werden, daß das Rad bei höherer Temperatur über die Sperrgruppen hinweg auf die Achse auffädeln kann; bei niedriger Temperatur sollte die Barriere für das „Abfädeln“ aber so hoch sein, daß eine stabile mechanische Bindung vorliegt. Eine Synthese via Slipping über die Triphenylmethyl-Sperrgruppen hinweg schien uns allerdings nicht erfolgversprechend, da selbst bei mehrtägigem Erhitzen von entsprechenden Rotaxanen bei 100 °C in Tetrachlorethan kein Abgleiten des Rads von der Achse und damit eine Zerlegung in die Bestandteile festzustellen

[\*] Dr. M. Händel, Dipl.-Chem. M. Plevoets, Dipl.-Chem. S. Gestermann, Prof. Dr. F. Vögtle  
Institut für Organische Chemie und Biochemie der Universität  
Gerhard-Domagk-Straße 1, D-53121 Bonn  
Telefax: Int. + 228/735662  
E-mail: voegtle@snchemie1.chemie.uni-bonn.de



Schema 1. Synthese von Amidrotaxanen **2** aus den vorgefertigten Rad- und Achsenkomponenten.

war.<sup>[4]</sup> Um ein Auffädeln zu ermöglichen, synthetisierten wir daher die Achsen **3** mit etwas kleineren Di-*tert*-butylbenzol-Stoppfern, die in Kalottenmodellen leichter durch den Hohlraum von Rädern wie **1** hindurchpassen.<sup>[5]</sup> Versuche, Tetralactame wie **1** durch Erhitzen in hochsiedenden Lösungsmitteln (Tetrachlorethan) auf die Achse **3a** aufzufädeln, waren allerdings nicht erfolgreich: Die Ausgangssubstanzen **1a** und **3a** wurden größtenteils zurückerhalten, das Rotaxan **2aa** konnte nicht nachgewiesen werden.

Es schien uns daher sinnvoll, in der Schmelze statt in Lösung zu arbeiten, da hier höhere Konzentrationen vorliegen und hö-