

- [1] *Handbook of Microbial Iron Chelates* (Hrsg.: G. Winkelmann), CRC, Boca Raton, **1991**.
- [2] H. Bickel, G. E. Hall, W. Keller-Schierlein, V. Prelog, E. Vischer, A. Wettstein, *Helv. Chim. Acta* **1960**, *43*, 2129.
- [3] a) R. R. Crichton, *Inorganic Biochemistry of Iron Metabolism*, Ellis Horwood, New York, **1991**, S. 173–190; b) J. P. Day in *Aluminum and other Trace Elements in Renal Disease* (Hrsg.: A. Taylor), Balieres Tindall, Eastbourne, **1986**, S. 184–191.
- [4] a) G. Schwarzenbach, A. Schwarzenbach, *Helv. Chim. Acta* **1963**, *46*, 1390; b) G. Anderegg, F. L'Eplattenier, G. Schwarzenbach, *Helv. Chim. Acta* **1963**, *46*, 1400.
- [5] G. T. Seaborg, W. D. Loveland, *The Elements Beyond Uranium*, Wiley, New York, **1990**, S. 359.
- [6] R. G. Riley, J. M. Zachara, DOE/ER-0547-T U.S. DOE, Office of Energy Research, Subsurface Science Program, Washington, **1992**.
- [7] „Scientific Basis for Waste Management“: J. I. Kim, *Mater. Res. Soc. Symp. Proc.* **1993**, 3–21.
- [8] P. E. Powell, G. R. Cline, C. P. P. Reid, P. J. Szanislo, *Nature* **1980**, *287*, 833–834.
- [9] N. V. Jarvis, R. D. Hancock, *Inorg. Chim. Acta* **1991**, *182*, 229–232.
- [10] Röntgenstrukturanalyse von **1**: Bruker-Diffraktometer, CCD-Detektor, MoK $\alpha$ -Strahlung ( $\lambda = 0.71073 \text{ \AA}$ ), Graphitmonochromator,  $\phi$ - und  $\omega$ -Scan-Methode, SADABS<sup>[14]</sup>-Absorptionskorrektur.  $0.50 \times 0.25 \times 0.10 \text{ mm}$ , Raumgruppe *Pbcm*,  $a = 13.1585(8) \text{ \AA}$ ,  $b = 23.9480(12) \text{ \AA}$ ,  $c = 37.521(2) \text{ \AA}$ ,  $V = 11823.6(12) \text{ \AA}^3$ ,  $Z = 4$ ,  $T = 295 \text{ K}$ . Strukturklärung nach Patterson und Differenz-Fourier-Methode mit dem Programm SHELXS-97<sup>[15]</sup> Kleinste-Fehlerquadrate-Verfeinerung mit SHELXS-97<sup>[16]</sup> mit Ausnahme der F- und O-Atome des Triflat-Ions wurden alle Atome anisotrop verfeinert, der Triflat-C-S-Abstand wurde mit  $1.75 \text{ \AA}$  konstant gehalten. Verfeinerung von  $F^2$  mit  $wR_2 = 0.211$ ,  $R_1 = 0.108$ . Die kristallographischen Daten (ohne Struktur Faktoren) der in dieser Veröffentlichung beschriebenen Struktur wurden als „supplementary publication no. CCDC-136339“ beim Cambridge Crystallographic Data Centre hinterlegt. Kopien der Daten können kostenlos bei folgender Adresse in Großbritannien angefordert werden: CCDC, 12 Union Road, Cambridge CB21EZ (Fax: (+44) 1223-336-033; E-mail: deposit@ccdc.cam.ac.uk).
- [11] a) N. C. Jayadevan, K. D. Singh-Mudher, D. M. Chackrabarty, *Z. Kristallogr.* **1982**, *161*, 7–13; b) M. R. Spirlet, J. Rebizant, C. Apostolidis, B. Kanellakopoulos, E. Dornberger, *Acta Crystallogr. Sect. C* **1992**, *48*, 1161–1164; c) D. L. Clark, S. D. Conradson, D. W. Keogh, P. D. Palmer, B. L. Scott, C. D. Tait, *Inorg. Chem.* **1998**, *37*, 2893–2899.
- [12] a) D. van der Helm, M. Poling, *J. Am. Chem. Soc.* **1976**, *98*, 82–86; b) M. B. Hossain, J. Maf, D. van der Helm, K. Shimizu, *J. Chem. Crystallogr.* **1998**, *28*, 53–56; c) M. B. Hossain, D. van der Helm, M. Poling, *Acta Crystallogr. Sect. B* **1983**, *39*, 258–263; d) M. B. Hossain, M. A. F. Jalal, D. van der Helm, *Acta Crystallogr. Sect. C* **1986**, *42*, 1305–1310.
- [13] W. L. Smith, K. N. Raymond, *J. Am. Chem. Soc.* **1981**, *103*, 3341–3349 zit. Lit.
- [14] G. M. Sheldrick, Empirical Absorption Correction Program, Universität Göttingen, **1996**.
- [15] G. M. Sheldrick, Program for Crystal Structure Solution, Universität Göttingen, **1997**.
- [16] G. M. Sheldrick, Program for Crystal Structure Refinement, Universität Göttingen, **1997**.

## Synthese des N-terminalen N-myristoylierten und S-palmitoylierten Undetriginta-peptids der endothelialen NO-Synthase\*\*

Rainer Machauer und Herbert Waldmann\*

Die Freisetzung von NO aus Arginin durch die endotheliale NO-Synthase (eNOS) als Antwort auf exogene Signale gehört zu den entscheidenden Schritten bei der Regulierung des Blutdrucks.<sup>[1, 2]</sup> Darüber hinaus ist die eNOS in die Angiogenese<sup>[3]</sup> involviert und trägt zur Pathogenese von Krankheiten bei, an denen die Blutgefäße beteiligt sind, wie z. B. die Arteriosklerose.<sup>[4, 5]</sup> Damit die eNOS ihre biologischen Funktionen korrekt erfüllen kann, muss sie in der Plasmamembran lokalisiert sein und in dieser in Caveolae, Membranmikrodomänen, in denen zahlreiche signaltransduzierende Proteine konzentriert sind, angereichert werden.<sup>[6]</sup>

Im Unterschied zu den anderen bisher identifizierten Isoformen der NO-Synthase ist der N-Terminus der eNOS N-myristoyliert und zweifach S-palmitoyliert (siehe Abbildung 1 und **1** in Schema 1).<sup>[7]</sup> Die Lipidgruppen werden für die

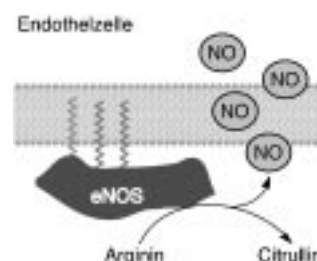


Abbildung 1. Membranverankerung und enzymatische Aktivität der endothelialen NO-Synthase.

Lokalisierung in der Plasmamembran und die biologische Aktivität benötigt.<sup>[6, 8]</sup> Die genauen biologischen Rollen des lipidierten Proteinsegments sind allerdings Gegenstand zahlreicher Hypothesen. Insbesondere wurde vorgeschlagen, dass die Lipidgruppen für die selektive Adressierung der eNOS an die Plasmamembran und hier in die Caveolae verantwortlich sein könnten, z. B. durch Vermittlung von Protein/Protein- oder Protein/Lipid-Wechselwirkungen, und dass Palmitoylierung und Depalmitoylierung in die Signalvermittlung über die eNOS involviert sein könnten.<sup>[5]</sup>

Lipidierte Peptide, die die charakteristischen Partialstrukturen der zugehörigen lipidierten Proteine enthalten, haben

[\*] Prof. Dr. H. Waldmann, Dipl.-Chem. R. Machauer<sup>[+]</sup>  
Max-Planck-Institut für molekulare Physiologie  
Abteilung Chemische Biologie  
Otto-Hahn-Straße 11, 44227 Dortmund (Deutschland)  
Fax: (+49) 231-133-2499  
E-mail: herbert.waldmann@mpi-dortmund.mpg.de

[+] Institut für Organische Chemie der Universität Karlsruhe (TH)  
Richard-Willstätter-Allee 2, 76128 Karlsruhe (Deutschland)

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

Hintergrundinformationen zu diesem Beitrag sind im WWW unter <http://www.vch.de/home/angewandte/> zu finden oder können beim Autor angefordert werden.

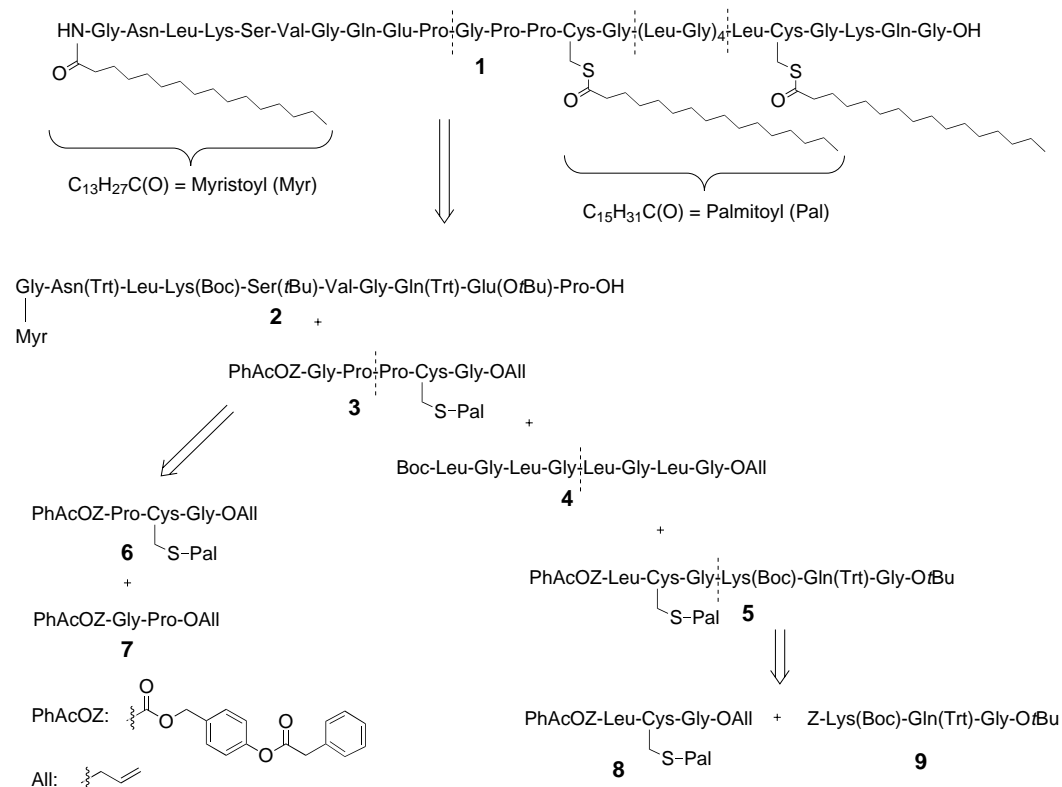
sich als leistungsfähige Werkzeuge für biologische Experimente erwiesen, wie z. B. für die Ras-Proteine gezeigt werden konnte.<sup>[9]</sup> Wir haben jetzt eine Methode entwickelt, mit deren Hilfe das korrekt lipidierte N-terminale 29mer-Peptid **1** der eNOS (siehe Schema 1) synthetisiert werden kann. Damit eröffnen sich neue Möglichkeiten für das Studium der chemischen Biologie der endothelialen NO-Synthase, insbesondere der Faktoren, die ihre Lokalisierung an die Plasmamembran und hier in den Caveolae bestimmen.

Die Synthese des lipidierten Peptids **1** wird durch mehrere Parameter erschwert: 1) Die Palmitinsäureester sind basenlabil, d. h., sie hydrolysieren spontan bei pH > 7 und unterliegen einer baseninduzierten  $\beta$ -Eliminierung.<sup>[9]</sup> Basenlabile Schutzgruppen können daher bei der Synthese von **1** nicht eingesetzt werden. 2) Für die Synthese S-palmitoylierter Peptide sind keine Festphasenmethoden verfügbar.<sup>[10]</sup> 3) Das Peptid **1** enthält mehrere Aminosäuren mit Seitenkettenfunktionen, die während der Synthese geschützt und am Ende unter Bedingungen deblockiert werden müssen, die so mild sind, dass die empfindlichen Thioesterbindungen nicht angegriffen werden.

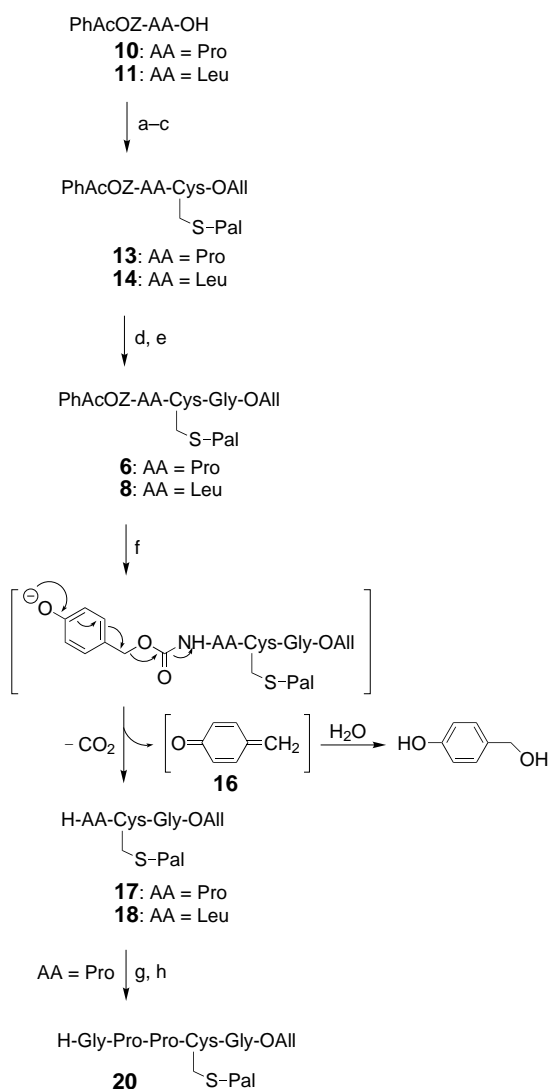
Bei der Entwicklung eines Plans für die Synthese von **1** wählten wir eine Kombination enzymlabiler, säureempfindlicher und durch Edelmetalle abspaltbarer Schutzgruppen und visierten den gemeinsamen Einsatz von Festphasentechniken und Fragmentkondensationen in Lösung an. Im retrosynthetischen Sinn wurde **1** daher in das N-myristoylierte Decapeptid **2**, das S-palmitoylierte Pentapeptid **3**, das Octapeptid **4** und das S-palmitoylierte Hexapeptid **5** zerlegt (Schema 1). Für die Synthese und die selektive Deblo-

ckierung der S-palmitoylierten Bausteine wurden die enzymlabile *p*-Phenylacetoxybenzyloxycarbonyl(PhAcOZ)-Urethangruppe<sup>[11]</sup> und der Pd<sup>0</sup>-labile Allyl(All)-Ester<sup>[12]</sup> als N- und C-terminale Schutzgruppen gewählt. Die Seitenketten von Asn, Lys, Ser, Gln und Glu wurden mit säurelabilen Schutzgruppen maskiert, die gemeinsam im letzten Schritt der Synthese abgespalten werden sollten. Wir beabsichtigten, das N-terminale Decapeptid an der festen Phase aufzubauen und das gesamte 29mer in Lösung mit Hilfe geeigneter Fragmentkondensationen zusammenzufügen. Die retrosynthetischen Schnitte wurden an den C-Terminus von Glycin- und Prolinresten platziert, um Epimerisierungen während der Fragmentkondensationen auszuschließen.

Die basenlabilen S-palmitoylierten Bausteine wurden wie in Schema 2 gezeigt synthetisiert. Die PhAcOZ-geschützten Aminosäuren **10** und **11** wurden mit Cystinbis(allylester) **12** kondensiert. Nach Spaltung des Disulfids mit Dithiothreitol (DTT) wurden die freigesetzten Thiolgruppen mit Palmitoylchlorid acyliert, wobei die vollständig geschützten Dipeptide **13** und **14** in hoher Gesamtausbeute entstanden. Zur Verlängerung der Peptidkette in C-terminaler Richtung wurde die Allylesterschutzgruppe selektiv durch Pd<sup>0</sup>-katalysierten Allyltransfer auf *N,N'*-Dimethylbarbitursäure (DMB) als akzeptierendem C-Nucleophil übertragen.<sup>[13]</sup> Unter diesen Bedingungen fand kein Angriff auf den extrem basenlabilen Palmitinsäurethioester und die N-terminale Schutzgruppe statt. Die Kupplung der freigesetzten Carbonsäuren mit Glycinallylester **15** lieferte die maskierten Intermediate **6** und **8**, die nachfolgend am N-Terminus deblockiert werden mussten. Bei Behandlung dieser PhAcOZ-geschützten Sub-



Schema 1. Retrosynthetische Analyse des N-myristoylierten und zweifach S-palmitoylierten N-terminalen 29mer-Peptids der endothelialen NO-Synthase. Boc = *tert*-Butoxycarbonyl; Trt = Trityl = Triphenylmethyl; Z = Benzyloxycarbonyl.



Schema 2. Synthese der empfindlichen S-palmitoylierten Bausteine durch Kombination des enzymlabilen PhAcOZ-Urethans mit dem Pd<sup>0</sup>-empfindlichen Allylester. a) [H-Cys-OAll]<sub>2</sub>·2*p*TosOH **12**, HOBT, EDC, NEt<sub>3</sub>, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, **10**: 88%, **11**: 90%; b) DTT, NEt<sub>3</sub>, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>; c) H<sub>3</sub>C(CH<sub>2</sub>)<sub>14</sub>COCl, NEt<sub>3</sub>, 0 °C, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, **10**: 72% (zwei Schritte), **11**: 85% (zwei Schritte); d) [Pd(PPh<sub>3</sub>)<sub>4</sub>], DMB, THF, **13**: 91%, **14**: 86%; e) H-Gly-OAll·*p*TosOH **15**, HOBT, EDC, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, **6**: 91%, **8**: 94%; f) Penicillin-G-Acylase, pH 6.8, 0.2 M DMB oder KI, Dimethyl-β-cyclodextrin, 20 Vol.-% MeOH, **17**: 53%, **18**: 56%; g) PhAcOZ-Gly-Pro-OH **19**, HOAt, EDC, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, 82%; h) quervernetztes Penicillin-G-Acylase-Kristalle, pH 6.8, 0.1 M KI, Dimethyl-β-cyclodextrin, 20 Vol.-% MeOH, 39%. DMB = *N,N'*-Dimethylbarbitursäure, DTT = 1,4-Dithio-DL-threitol, EDC = *N*-Ethyl-*N'*-(3-dimethylaminopropyl)carbodiimid-hydrochlorid, HOAt = 1-Hydroxy-7-azabenzotriazol, HOBT = 1-Hydroxybenzotriazol, *p*Tos = *p*-Toluolsulfonyl.

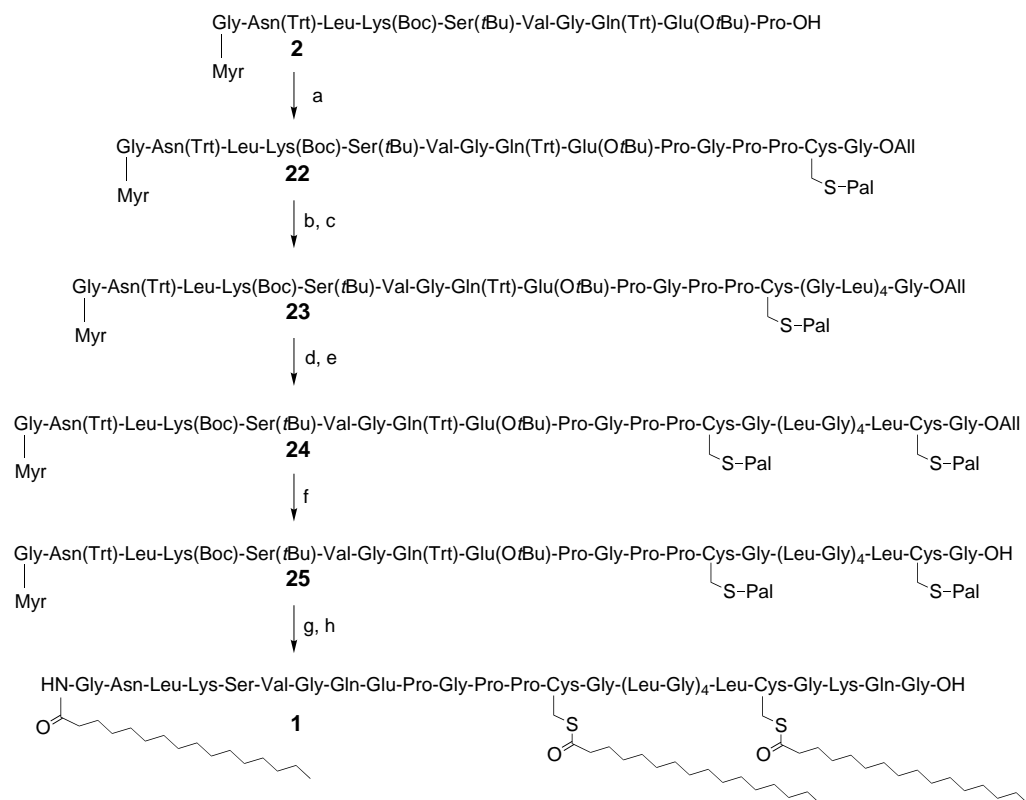
stanzen mit immobilisierter Penicillin-G-Acylase in 0.2 M Na<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>-Puffer bei pH 6.8 wurde die in das Urethan eingebaute Phenyllessigsäureesterseinheit hydrolysiert. Dabei entstand ein Phenolat, das spontan in Chinonmethid **16**, CO<sub>2</sub> und die gewünschten selektiv entschützten lipidierten Tripeptide **17** bzw. **18** zerfiel. Die Bedingungen dieser enzyminitiierten Schutzgruppenfragmentierung sind so mild, dass der basenlabile Palmitinsäurethioester vollständig intakt bleibt. Darüber hinaus garantiert die Substratspezifität des Enzyms, dass der C-terminale Allylester und die Peptidbindungen nicht angegriffen werden.

Um reproduzierbar präparativ wertvolle Resultate in diesen enzymatischen Umsetzungen zu erhalten, mussten die Reaktionen in Gegenwart von 20 Vol.-% Methanol und 38 Äquiv. Dimethyl-β-cyclodextrin durchgeführt werden (für experimentelle Details siehe die Hintergrundinformationen). Die Peptide **6** und **8** sind in wässrigem Puffer kaum löslich, sodass ein Löslichkeitsvermittelndes Cosolvens benötigt wird, um sie für den Biokatalysator zugänglich zu machen. Darüber hinaus schlüpft das Cyclodextrin wahrscheinlich über die hydrophoben Palmitoylgruppen. Dadurch werden die Peptide in Lösung gebracht und der Thioester vor unerwünschter Hydrolyse geschützt. Weiterhin wurde ein Nucleophil zugegeben, um das gebildete Chinonmethid **16** abzufangen, das andernfalls die freigesetzten Aminogruppen angreifen könnte. Im Falle des Prolinderivats **6** war die Verwendung von *N,N'*-Dimethylbarbitursäure am besten, während für das Leucinderivat **8** die Zugabe von KI die besten Resultat lieferte. Das selektiv entschütztes Lipotripeptid **17** wurde dann mit dem PhAcOZ-maskierten Dipeptid **19** kondensiert und das entstandene lipidierte Pentapeptid N-terminal durch enzyminitiierte Fragmentierung wie vorstehend beschrieben deblockiert. In diesem Fall erwies sich die Verwendung quervernetzter Enzymkristalle (CLECs)<sup>[14]</sup> der Penicillin-G-Acylase als vorteilhaft. Diese Präparation der Acylase ist besonders in Gegenwart potentiell denaturierender Cosolventien stabil und lieferte den gewünschten Baustein in ansprechender Ausbeute. Erneut wurde der Palmitinsäurethioester in keinsten Weise im Mitleidenschaft gezogen.

Das Leu-Gly-Octapeptid **4** (Schema 1) wurde ausgehend von Boc-Leu-Gly-OAll durch selektive Abspaltung der N- und der C-terminalen Schutzgruppe und Kondensation der Fragmente zum Tetrapeptid Boc-Leu-Gly-Leu-Gly-OAll (90%) aufgebaut, das dann der gleichen Sequenz unterworfen wurde (82% Kupplungsausbeute). Die Boc-Gruppe wurde mit HCl/Diethylether abgespalten und die Allylesterspaltungen gelangen mit [Pd(PPh<sub>3</sub>)<sub>4</sub>]/Morpholin (98–99% Ausbeute in allen Fällen). Schließlich wurde die Boc-Gruppe von **4** durch Umsetzung mit Trifluoressigsäure in CHCl<sub>3</sub> entfernt, wobei der Baustein CF<sub>3</sub>COOH·H(Leu-Gly)<sub>4</sub>OAll **21** in 99% Ausbeute entstand.

Das *N*-myristoylierte Decapeptid **2** wurde an der festen Phase synthetisiert. Für die N-terminale Entschützung kam die 9-Fluorenylmethoxycarbonyl(Fmoc)-Gruppe zum Einsatz, die Seitenketten der trifunktionellen Aminosäuren wurden mit säurelabilen Trityl- oder *tert*-Butylschutzgruppen maskiert. Die Verankerung am festen Träger wurde über den äußerst säurelabilen 2-Chlortritylanker<sup>[15]</sup> vorgenommen. Nach Aufbau der gesamten Peptidkette wurde der N-terminale Glycinrest durch Entfernen der Fmoc-Gruppe entschützt und dann das Myristinsäureamid durch Umsetzung mit Myristoylchlorid (4 Äquiv.) und Hünigs Base (8 Äquiv.) gebildet. Schließlich gelang die Ablösung des gewünschten lipidierten und seitenkettengeschützten Peptids **2** vom polymeren Träger in 98% Gesamtausbeute durch Behandeln mit Essigsäure/2,2,2-Trifluorethanol/Dichlormethan (1/1/8).

Nachdem alle benötigten selektiv entschützten Bausteine verfügbar waren, wurde aus ihnen das anvisierte 29mer-eNOS-Peptid **1** aufgebaut (Schema 3). Hierfür wurde zunächst das Decapeptid **2** in 91% Ausbeute mit dem S-palmitoylierten



Schema 3. Synthese des lipidierten 29mer-Zielpeptids **1** durch Fragmentkondensation. a) H-Gly-Pro-Pro-Cys(Pal)-Gly-OAll **20**, HOObt, EDC, CHCl<sub>3</sub>/CF<sub>3</sub>CH<sub>2</sub>OH (3/1), 91 %; b) [Pd(PPh<sub>3</sub>)<sub>4</sub>], DMB, DMSO, 92 %; c) H-Leu-(Gly-Leu)<sub>3</sub>-Gly-OAll·CF<sub>3</sub>CO<sub>2</sub>H **21**, HOAt, NEt<sub>3</sub>, EDC, DMSO, 72 %; d) [Pd(PPh<sub>3</sub>)<sub>4</sub>], DMB, DMSO, 87 %; e) H-Leu-Cys(Pal)-Gly-OAll **18**, HOAt, EDC, NMP, 86 %; f) [Pd(PPh<sub>3</sub>)<sub>4</sub>], DMB, DMSO, 69 %; g) H-Lys(Boc)-Gln(Trt)-Gly-OtBu **26**, HOAt, EDC, NMP, 86 %; h) CF<sub>3</sub>CO<sub>2</sub>H/Ethandithiol/H<sub>2</sub>O (95/2.5/2.5), 31 %. HOObt = 3,4-Dihydro-3-hydroxy-4-oxo-1,2,3-benzotriazin, NMP = *N*-Methylpyrrolidon.

Baustein **20** zum Pentadecapeptid **22** verknüpft. Aus **22** konnte der C-terminale Allylester mit vollständiger Selektivität abgelöst werden (92 % Ausbeute), und eine weitere Kettenverlängerung mit dem Octapeptid **21** lieferte das 23mer-Peptid **23** in hoher Gesamtausbeute. Die nachfolgende Pd<sup>0</sup>-katalysierte Spaltung des Allylestere verlief erneut effizient, sodass die Peptidkette selektiv mit dem S-palmitoylierten Baustein **18** verlängert werden konnte. Die selektive Spaltung des Allylestere im 26mer-Intermediat **24** war besonders herausfordernd, da dieses Peptid zwei basenlabile Thioester und mehrere säurelabile Gruppen enthält. Darüber hinaus ist die vollständig geschützte Verbindung sehr hydrophob, sodass Aggregatbildung und geringe Löslichkeit befürchtet werden mussten, aufgrund deren die Substanz für den Pd<sup>0</sup>-Katalysator nur schwer zugänglich sein könnte. Zu unserer großen Freude gelang diese Abspaltung jedoch auch ohne unerwünschte Nebenreaktionen, und das C-terminal deblockierte 26mer-Peptid **25** wurde in hoher Ausbeute erhalten. Schließlich wurde die Peptidkette mit dem Tripeptid **26** verlängert und im letzten Schritt wurden alle säurelabilen Seitenkettenschutzgruppen durch Umsetzung mit Trifluoressigsäure in Gegenwart von Ethandithiol als Kationenfänger abgespalten.

Der erfolgreiche Verlauf der Fragmentkondensationen hängt entscheidend von der Wahl der richtigen Lösungsmittel und den Aufarbeitungsbedingungen ab (für detaillierte Angaben siehe die Hintergrundinformationen). Die geschützten

lipidierten Peptide **2** und **22–25** sind sehr hydrophob und neigen zur Sekundärstruktur Bildung. Daher sind sie in vielen Lösungsmitteln kaum löslich, und eine Trennung der Reaktionsgemische durch Umkehrphasen-HPLC gelang nicht. Diese Probleme konnten durch Verwendung stark polarer Lösungsmittel und Einsatz der kleineren Fragmente in den Kondensationsreaktionen in geringem Überschuss umgangen werden. Peptidkupplungen wurden daher in DMSO, *N*-Methylpyrrolidin oder CHCl<sub>3</sub>/2,2,2-Trifluorethanol als Lösungsmittel ausgeführt, alle Pd<sup>0</sup>-vermittelten Allylesterspaltungen erfolgten in DMSO. Der Einsatz von 1.2–1.5 Äquivalenten der kleineren Bausteine in den Kupplungsreaktionen führte zu hohen Kupplungsausbeuten und ermöglichte es wegen der höheren Löslichkeit der kleineren monolipidierten Verbindungen, das überschüssige Lipopeptid durch einfaches Waschen und Umkristallisieren zu entfernen.

Wir haben damit eine hoch effiziente Synthese des *N*-myristoylierten und zweifach S-palmitoylierten N-Terminus der endothelialen NO-Synthase entwickelt. Die Strategie fußt auf dem kombinierten Einsatz enzymlabiler, säureempfindlicher und edelmetallsensitiver Schutzgruppen für die Lösungssynthese S-palmitoylierter Bausteine unter mildesten Bedingungen mit Festphasen- und Fragmentkondensationstechniken. Die Resultate belegen überzeugend die Leistungsfähigkeit der Schutzgruppenmethoden für die Synthese großer und mehrfach lipidierter Peptide. Zusammen mit den kürzlich von uns entwickelten Methoden für die Synthese

vollständiger funktioneller Proteine durch Kombination von organischer Synthese und Molekularbiologie<sup>[16]</sup> sollten sie neue Möglichkeiten für das Studium der chemischen Biologie der endothelialen NO-Synthese im präzisen molekularen Detail eröffnen, insbesondere der Parameter, die ihre Lokalisierung in der Plasmamembran und den Caveolae endothelialer Zellen bedingen.

Eingegangen am 19. November 1999 [Z14295]

## Nachweis eines langlebigen protonierten Metallkations: Bildung von $\text{GeH}^{2+}$ durch Hochenergiestöße\*\*

Phillip Jackson, Martin Diefenbach,  
Ragampeta Srinivas, Detlef Schröder und  
Helmut Schwarz\*

Rolf Huisgen zum 80. Geburtstag gewidmet

Mehrfach geladene Ionen sind sowohl von biochemischem als auch von physikalisch-chemischem Interesse.<sup>[1, 2]</sup> Unlängst wurden mit Hilfe der Charge-stripping-Massenspektrometrie thermochemisch stabile, zweiatomige Triaktionen erzeugt.<sup>[3, 4]</sup> Für thermochemisch stabile binäre Di- oder Triaktionen  $\text{AB}^{n+}$  ist ein Potentialminimum energetisch unterhalb der ladungsseparierten Spezies  $\text{A}^{(n-1)+} + \text{B}^+$  eine notwendige Voraussetzung; andernfalls kann eine elektronische Umlagerung zur Dissoziation auf der Coulomb-Abstoßungs-Asymptote führen. Metastabile Dikationen, für die Letzteres gilt, können für eine Detektion in Experimenten auf der Mikrosekundenzeitskala (oder kürzer) ausreichende Lebenszeiten aufweisen. Die meisten der bis heute synthetisierten binären Triaktionen haben Halogenliganden,<sup>[1-7]</sup> aber auch hochgeladene, elektrostatische Metall-Edelgaskomplexe wurden vorgeschlagen,<sup>[8, 9]</sup> und z. B.  $\text{VHe}^{3+}$  wurde beschrieben.<sup>[10]</sup>

Einigen Anlass zu Kontroversen liefert der vorgeschlagene Nachweis von  $\text{CH}^{2+}$ ,<sup>[11-15]</sup> das allerdings nach neuesten Experimenten nicht zu existieren scheint.<sup>[16]</sup> Rechnungen zufolge sollte jedoch ein langlebiges  $^2\Sigma^+-\text{CH}^{2+}$ -Teilchen detektierbar sein, vorausgesetzt, dass dieses Dikation überhaupt synthetisiert werden kann. Ungünstige Franck-Condon-Faktoren lassen die Erzeugung aus  $\text{CH}^+$  in Charge-stripping-Experimenten so gut wie ausgeschlossen erscheinen. Ein weiteres Problem bei der Detektion von  $\text{CH}^{2+}$  ist der nicht zu vernachlässigende Anteil an  $^{13}\text{C}$ , der in einigen Veröffentlichungen nicht ausreichend berücksichtigt wurde. Ähnliche Probleme traten bei der Charakterisierung von  $^{28}\text{SiH}^{2+}$ <sup>[17]</sup> aufgrund des isobaren  $^{29}\text{Si}$ -Isotops auf.

Wir beschreiben im Folgenden den ersten eindeutigen Nachweis für die Existenz von  $\text{GeH}^{2+}$ , einem metastabilen,

- [1] a) R. M. J. Palmer, D. S. Ashton, S. Moncada, *Nature* **1988**, 333, 664–666; b) P. W. Shaul, E. J. Smart, L. J. Robinson, Z. German, I. S. Yuhanna, Y. Ying, R. G. W. Anderson, T. Michel, *J. Biol. Chem.* **1996**, 271, 6518–6522.
- [2] a) E. G. Shesely, N. Maeda, H. S. Kim, K. M. Desai, J. H. Krege, V. E. Laubach, P. A. Sherman, W. C. Sessa, O. Smithies, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1996**, 93, 13176–13181; b) P. L. Huang, Z. H. Huang, H. Mashimo, K. D. Bloch, M. A. Moskowitz, J. A. Bevan, M. C. Fishman, *Nature* **1995**, 377, 239–242.
- [3] a) R. D. Rudic, E. G. Shesely, N. Maeda, O. Smithies, S. S. Segal, W. C. Sessa, *J. Clin. Invest.* **1998**, 101, 731–736; b) T. Murohara, T. Asahara, M. Silver, C. Bauters, H. Masuda, C. Kalka, M. Kearney, D. Chen, D. Chen, J. F. Symes, M. C. Fishman, P. L. Huang, J. M. Isner, *J. Clin. Invest.* **1998**, 101, 2567–2578.
- [4] a) D. S. Brecht, S. H. Snyder, *Annu. Rev. Biochem.* **1994**, 63, 175–195; b) C. Nathan, Q. Xie, *J. Biol. Chem.* **1994**, 269, 13725–13728; c) S. Moncada, A. Higgs, *New Engl. J. Med.* **1993**, 329, 2002–2012; d) P. W. Shaul in *Advances in Pediatrics* (Hrsg.: L. Barnes), Mosby Year Book, Chicago, IL, **1995**, S. 367–414.
- [5] a) J. T. Dunphy, M. E. Linder, *Biochim. Biophys. Acta* **1998**, 1436, 245–261; b) M. D. Resh, *Biochim. Biophys. Acta* **1999**, 1451, 1–16.
- [6] a) G. García-Cardena, P. Oh, J. Liu, J. E. Schnitzler, W. C. Sessa, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1996**, 93, 6448–6453; b) P. W. Shaul, E. J. Smart, L. J. Robinson, Z. German, I. S. Yuhanna, Y. Ying, R. G. W. Anderson, T. Michel, *J. Biol. Chem.* **1996**, 271, 6518–6522; c) R. G. W. Anderson, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1993**, 90, 10909–10913; d) M. P. Lisanti, P. E. Scherer, Z. Tang, M. Sargiacomo, *Trends Cell Biol.* **1994**, 4, 231–235; e) E. J. Smart, Y. S. Ying, R. G. W. Anderson, *J. Cell Biol.* **1995**, 131, 929–938.
- [7] a) J. Liu, W. C. Sessa, *J. Biol. Chem.* **1994**, 269, 11691–11694; b) J. Liu, G. García-Cardena, W. C. Sessa, *Biochemistry* **1995**, 34, 12333–12340.
- [8] L. J. Robinson, T. Michel, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1995**, 92, 11776–11780.
- [9] Übersicht: D. Kadereit, J. Kuhlmann, H. Waldmann, *Angew. Chem.*, eingereicht; *Angew. Chem. Int. Ed.*, eingereicht.
- [10] Für eine einzelne Arbeit siehe: M. Joseph, R. Nagaraj, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **1993**, 3, 1025–1028.
- [11] H. Waldmann, T. Pohl, *Angew. Chem.* **1996**, 108, 1829–1832; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1996**, 35, 1720–1723.
- [12] a) H. Kunz, H. Waldmann, *Angew. Chem.* **1984**, 96, 49–50; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1984**, 23, 71–72; b) A. Cotté, B. Bader, J. Kuhlmann, H. Waldmann, *Chem. Eur. J.* **1999**, 5, 922–953.
- [13] H. Kunz, J. März, *Angew. Chem.* **1988**, 100, 1424; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1988**, 27, 1375–1377.
- [14] a) J. Lalonde, *CHEMTECH* **1997**, 27, 38–45; b) D. Haring, P. Schreier, *Curr. Opin. Chem. Biol.* **1999**, 3, 35–38; c) T. Zelinski, H. Waldmann, *Angew. Chem.* **1997**, 109, 746–748; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1997**, 36, 722–724.
- [15] K. Barlos, D. Gatos, J. Kallitsis, G. Papaphotiu, P. Sotiriou, Y. Wenquing, W. Schäfer, *Tetrahedron Lett.* **1989**, 30, 3943–3950.
- [16] B. Bader, K. Kuhn, D. Owen, H. Waldmann, A. Wittinghofer, J. Kuhlmann, *Nature* **2000**, 403, 223–226.

[\*] Prof. Dr. H. Schwarz, Dipl.-Chem. M. Diefenbach, Dr. D. Schröder  
Institut für Organische Chemie der Technischen Universität  
Straße des 17. Juni 135, 10623 Berlin (Deutschland)  
Fax: (+49) 30-31421102  
E-mail: schw0531@www.chem.tu-berlin.de

Dr. P. Jackson  
Research School of Chemistry  
Australian National University  
Canberra, ACT0200 (Australien)

Dr. R. Srinivas  
Mass Spectrometry Centre  
Indian Institute of Chemical Technology  
Hyderabad-500007 (Indien)

[\*\*] Diese Arbeit wurde von der Deutschen Forschungsgemeinschaft, von der Volkswagenstiftung und vom Fonds der Chemischen Industrie gefördert. Wir danken dem Konrad-Zuse-Zentrum, Berlin, für die Bereitstellung von Rechenzeit. R.S. dankt dem Deutschen Akademischen Austauschdienst für ein Stipendium sowie Dr. K. V. Raghavan, Direktor des Indian Institute of Chemical Technology, für Anregungen und Unterstützung.