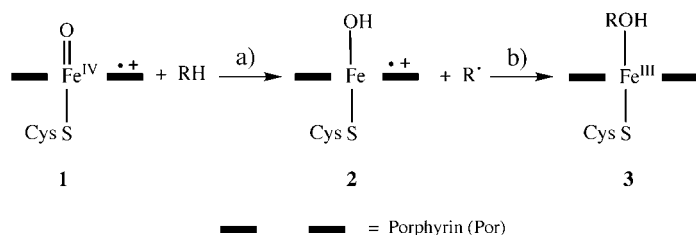


Zwei Reaktionswege beim „Wiederanbindungs“-Mechanismus der Alkanhydroxylierung durch Cytochrom P450: Entstehung freier Radikale mit begrenzter Lebensdauer**

Nathan Harris, Shimrit Cohen, Michael Filatov, François Ogliaro und Sason Shaik*

Der Mechanismus der Alkanhydroxylierung^[1] durch Cytochrom P450 wirft interessante Fragen auf. Nach dem allgemein akzeptierten Mechanismus^[2] (Schema 1) erfolgt im

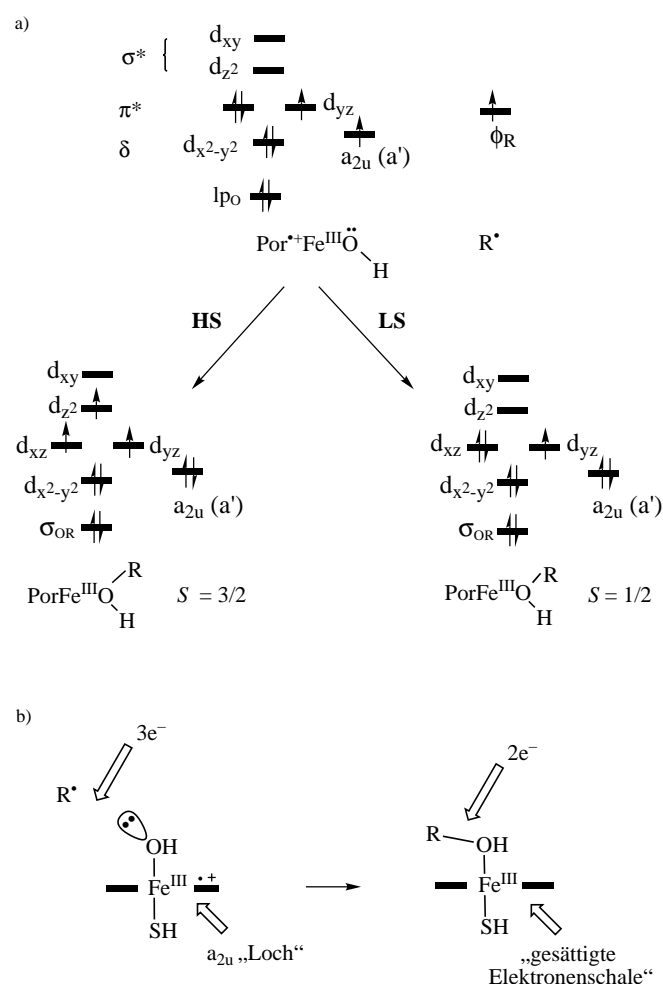


Schema 1. Schematische Darstellung des Wiederanbindungs-Mechanismus.

Schritt a) zunächst die Abspaltung eines Wasserstoffatoms vom Alkan (RH) und anschließend die „Wiederanbindung“ des Alkylradikals an die Hydroxygruppe unter Bildung des Eisen(III)-Alkohol-Komplexes (Schritt b). Die Annahme, dass freie Radikale mit begrenzter Lebensdauer in dieser Reaktion auftreten, wurde durch Untersuchungen bestätigt, bei denen umgelagerte Alkohole als Reaktionsprodukte nachgewiesen wurden.^[3] Zudem wurde festgestellt,^[4a] dass bei den Hydroxylierungen einiger substituierter Alkane durch Cytochrom P450 nahezu die gleichen kinetischen Isotopeneffekte auftreten wie bei der Wasserstoffabstraktion durch das *tert*-Butoxyradikal, was auf ähnliche Übergangszustände in beiden Prozessen hinweist.^[4] Allerdings deuten die Ergebnisse der mechanistischen Studien von Newcomb et al.,^[5] bei denen Alkane verwendet wurden, die ultraschnelle Radikaluhren liefern, darauf hin, dass keine freien Radikale während der Reaktion entstehen; die ermittelten Zeiten sind zu kurz, um sie intermediären freien Radikalen zuordnen zu können (z. B. $\tau \leq 70$ fs),^[5b] und sie stimmen mit den bei der Umlagerung freier Radikale beobachteten Zeiten nicht überein.^[5a] Obwohl viele Anzeichen für die Beteiligung von Radikalen bei diesem Prozess sprechen, ist ihre Existenz dennoch umstritten und muss noch bewiesen werden.

Wir haben uns mit der Frage der Existenz von Radikalen in diesem Wiederanbindungs-Mechanismus befasst und berichten hier über unsere Untersuchungen. Mit Dichtefunktionaltheorie(DFT)-Rechnungen wollten wir feststellen, ob der angenommene Schritt b in Schema 1 eine Barriere beinhaltet, die einem Radikal eine begrenzte Lebensdauer verleihen würde, und, wenn ja, welche Elektronenstruktur der Eisen-Porphyrin-Komplex hat, der diese Barriere bewirkt. Somit konzentrierte sich unsere Untersuchung auf die Modellierung des eigentlichen Wiederanbindungs-Prozesses und nicht auf den gesamten Mechanismus der Alkanhydroxylierung.

Wir haben bereits mit DFT-Rechnungen gezeigt, dass der intermediäre Hydroxoeisen-Komplex **2** (Schema 1) in einer dielektrischen Umgebung, z. B. in Lösung oder in einem von einem Protein gebildeten Hohlraum, ein Fe^{III} -Zentralion (d^5 -Konfiguration) und ein Porphyrinradikalkation aufweist.^[6] Der Komplex hat einen Triplett-Grundzustand ($S=1$) mit jeweils einem einzelnen Elektron im $d_{yz}(\pi^*)$ -Orbital des Zentralatoms und im a_{2u} -Porphyrinorbital.^[6b] Wie in Schema 2a dargestellt, kann dieser Hydroxoeisen-Komplex mit den beiden ungepaarten Elektronen im Triplettzustand ($S=1$) entweder durch Low-Spin(LS)- oder High-Spin(HS)-



Schema 2. a) Orbitaldiagramme der Low-Spin- und High-Spin-Kopplung des Hydroxoeisen-Komplexes im Triplettzustand mit dem Alkylradikal im Wiederanbindungsschritt. b) Die Elektronenverschiebung beim Auffüllen des „Lochs“ im a_{2u} -Orbital des Porphyrinrestes.

[*] Prof. S. Shaik, Dr. N. Harris, S. Cohen, Dr. M. Filatov, Dr. F. Ogliaro
Department of Organic Chemistry and
The Lise Meitner-Minerva Center for Computational Quantum
Chemistry
Hebrew University, 91904 Jerusalem (Israel)
Fax: (+972) 2-658-5345
E-mail: sason@yfaat.ch.huji.ac.il

[**] Diese Arbeit wurde von der Israeli Science Foundation (ISF) und der German Israeli Foundation (GIF) sowie der Volkswagen-Stiftung gefördert. S.S. dankt der Alexander-von-Humboldt-Stiftung für einen Forschungspreis. F.O. dankt der Europäischen Union für ein Marie-Curie-Stipendium.

Kopplung mit dem einzelnen Elektron des Radikals ($S = 1/2$) in den Dublett- ($S = 1/2$) bzw. Quartettzustand ($S = 3/2$) des Eisen(III)-Alkohol-Komplexes übergehen. Beide Prozesse werden hier erörtert, und wir können nachweisen, dass wegen der auf der HS-Oberfläche auftretenden Barriere das Radikal eine begrenzte Lebensdauer hat, während die LS-Kopplung ohne erkennbare Barriere zum Eisen(III)-Alkohol-Komplex führt. Dieser Sachverhalt und die Verteilung auf die Spinzustände^[7] sind möglicherweise die Gründe für die unterschiedlichen experimentellen Ergebnisse bei den mechanistischen Untersuchungen.

Hartree-Fock/DFT-Hybridrechnungen (B3LYP)^[8] wurden durchgeführt mit den Programmpaketen JAGUAR 3.5^[9] und GAUSSIAN 98^[10] und dienten zur Geometrieoptimierung der Modelle, wobei $\text{CH}_3\cdot$ als Radikal und HS^- als axialer Ligand fungierten (Schema 1). Wie bei unseren früheren Untersuchungen^[6] verwendeten wir das effektive Los-Alamos-Kernpotential gekoppelt mit dem Doppel-Zeta-LACVP-Basissatz^[11] für Eisen und den Allelektronen-6-31G-Basissatz für die übrigen Atome. Die Geometrien aller Modellverbindungen wurden vollständig, ohne Symmetrieeinschränkungen, optimiert.

Der Grundzustand des Eisen(III)-Methanol-Komplexes **3** ($R = \text{Me}$ in Schema 1) ist der Dublettzustand ($S = 1/2$), während der Quartettzustand ($S = 3/2$) um $7.5 \text{ kcal mol}^{-1}$ energiereicher ist.^[12] Zwar wurden intermediäre Alkohol-Komplexe bisher bei Untersuchungen des Mechanismus der Hydroxylierung nicht nachgewiesen, doch sind Eisen(III)-Alkohol-Komplexe von Cytochrom P450 trotzdem bekannt. Unsere Rechnungen stehen in Einklang mit dem experimentell bestimmten Dublettzustand ($S = 1/2$) eines 5-Hydroxycampher-Komplexes von Cytochrom P450_{cam} (ein Eisen(III)-Alkohol-Komplex).^[13] Die kurze und damit starke Fe-O-Bindung im Eisen(III)-Methanol-Komplex (siehe Abbildung 1) deutet

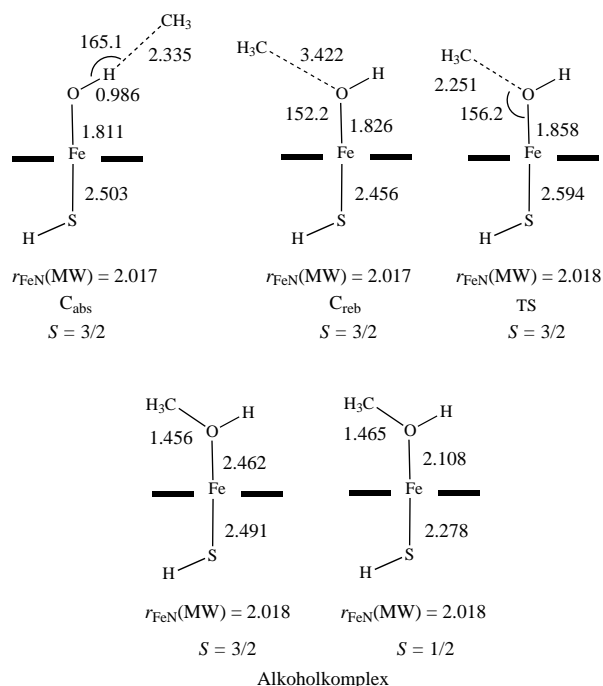


Abbildung 1. Strukturen stationärer Zustände im Wiederanbindungs-Prozess. MW = Mittelwert.

darauf hin, dass ein intermediärer Alkohol-Komplex vorkommt. Die alternative direkte OH-Übertragung zum Alkylradikal unter Bildung eines freien Alkoholmoleküls erfordert vermutlich mehr Energie.^[14]

Im Folgenden bezeichnet der Ausdruck Low-Spin (LS) den Dublettzustand und High-Spin (HS) den Quartettzustand.^[12a] Im HS-Wiederanbindungsschritt tritt als Vorstufe des Übergangszustands (TS für transition state) ein Cluster (C_{abs}) auf, der dem Produkt der H-Abstraktion entspricht (Abbildung 1; nur die wichtigsten Bindungslängen und -winkel sind angegeben). Die Verschiebung der Methylgruppe auf die andere Seite des Sauerstoffatoms ist mit einem kleinen Energieanstieg ($2.1 \text{ kcal mol}^{-1}$) verbunden und führt zu einem weiteren Cluster (C_{reb}), der kein tatsächliches Minimum darstellt, aber doch eine Spezies im Wiederanbindungsschritt ist. Demgegenüber wurde im LS-Wiederanbindungsschritt das LS-Eisen(III)-Methanol-Produkt als einziger stationärer Punkt auf dem Reaktionspfad gefunden.

Die Übergangszustände auf den HS- und LS-Oberflächen wurden in zwei Schritten ermittelt. Zuerst wurden die HS- und LS-Reaktionspfade niedrigster Energie entlang der $r_{\text{C-O}}$ -Koordinate (Annäherung des Methylradikals an das Sauerstoffatom im Hydroxo-eisen-Komplex) mit C_s -Einschränkungen verfolgt. Abbildung 2 zeigt die erhaltenen Energiekur-

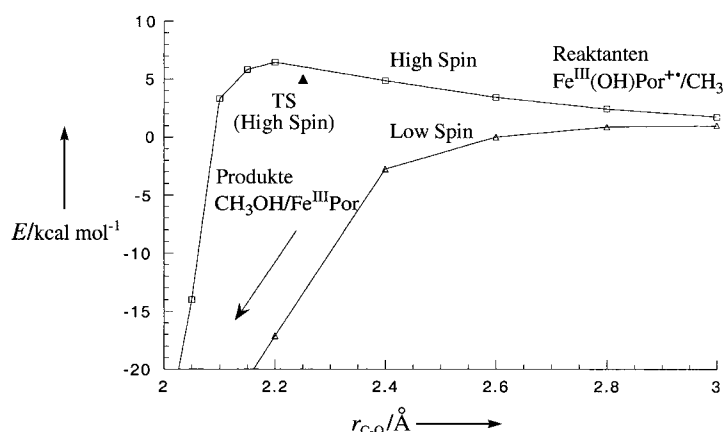
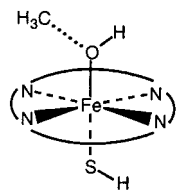


Abbildung 2. Potentialenergiekurven des High-Spin(HS)- und Low-Spin(LS)-Reaktionspfades entlang der $\text{CH}_3\cdots\text{O}$ -Koordinate ($r_{\text{C-O}}$) im Wiederanbindungsschritt.

ven; man erkennt, dass die LS-Energiekurve glatt^[15] zum LS-Eisen(III)-Methanol-Komplex hin abfällt, während die HS-Oberfläche eine Barriere nahe bei $r_{\text{C-O}} = 2.2 \text{ Å}$ aufweist. Der tatsächliche Übergangszustand (TS) auf der HS-Oberfläche (mit \blacktriangle in Abbildung 2 gekennzeichnet) wurde durch Sattelpunkt-Optimierung aller geometrischen Variablen ohne Symmetrieeinschränkungen erhalten. Anschließend wurde eine vollständige Schwingungsanalyse durchgeführt, wobei nur eine Mode mit einer imaginären Frequenz von $i447.6 \text{ cm}^{-1}$ ermittelt wurde, die der erwarteten Mode entlang der $r_{\text{C-O}}$ -Reaktionskoordinate, die Reaktanten und Produkte verbindet, entspricht.

In Tabelle 1 sind die wichtigsten Merkmale der Spezies angegeben, die als stationäre Punkte auf dem Reaktionspfad gefunden wurden. Die Barriere gegenüber den getrennten

Tabelle 1. Ausgewählte Strukturparameter r [Å], Spindichten ρ und relative Energien E_{rel} [kcal mol⁻¹] wichtiger Spezies im Wiederanbindungsschritt.

Parameter	[Por ⁺ Fe ^{III} OH]/CH ₃ · Reaktanten	[Por ⁺ Fe ^{III} OH]/CH ₃ · HS-Cluster ^[a]	TS HS	[PorFe ^{III} (CH ₃ OH)] HS LS	
$r_{\text{C-O}}$	∞	3.298	2.251	1.456	1.465 ^[b]
$r_{\text{Fe-O}}$	1.824 (1.829) ^[d]	1.811	1.858	2.462	2.108 ^[c]
$r_{\text{Fe-S}}$	2.490 (2.458) ^[d]	2.503	2.594	2.491	2.278
$r_{\text{Fe-N}}$ (MW) ^[e]	2.017 (2.017) ^[d]	2.017	2.018	2.018	2.018
$r_{\text{Fe-Ring}}$	+0.09	+0.09	+0.08	-0.14	-0.09
E_{rel}	0	-2.1	+5.0 ^[f] -17.1 ^[g]	-61.2	-68.7
ρ_{CH_3}	0.99	0.96	0.66–0.33 ^[h]	0.003	0.000
ρ_{Ring}	0.67	0.52	0.66–0.13 ^[h]	0.18	0.032
ρ_{Fe}	0.85	0.84	1.05–2.26 ^[h]	2.42	0.86

[a] Der in Abbildung 1 dargestellte Cluster C_{abs}. [b] C-O-Abstand. [c] Fe-O-Abstand. [d] Die Werte in Klammern beschreiben die C_s-Struktur,^[6] die um 0.88 kcal mol⁻¹ energiereicher ist als die C₁-Struktur (Werte ohne Klammer). [e] Mittelwert (MW) aus vier Fe-N-Abständen. [f] Die Barriere gegenüber dem bei C₁-Symmetrie optimierten Reaktanten. [g] Energie der entsprechenden LS-Struktur bei 2.2 Å. [h] Spindichtebereich bei $r_{\text{C-O}} = 2.2$ –2.05 Å.

Einzelfragmenten beträgt 5.0 kcal mol⁻¹ und gegenüber dem Reaktantencluster 7.1 kcal mol⁻¹. Wenn man die bekannte Schwäche der DFT-Rechnungen, Barrieren zu unterschätzen, in Betracht zieht,^[16] ist die hier gefundene Barriere auf der HS-Oberfläche wohl kaum ein Artefakt. Die Energiestabilisierung der LS-Oberfläche im Bereich des HS-Übergangszustands (ungefähr 17 kcal mol⁻¹ gegenüber dem Kurvenanfang bei 3 Å) ist bedeutend größer als der erwartete Fehler bei den B3LYP-Rechnungen^[16d]. Auch wenn die B3LYP-Rechnungen den LS-Zustand etwas überschätzen, ist die Existenz einer signifikanten Barriere auf der LS-Oberfläche dennoch unwahrscheinlich. Allerdings können wir nicht ausschließen, dass eine winzige Barriere an einer viel „früheren“ Stelle auf der $r_{\text{C-O}}$ -Koordinate lokalisiert ist.

Die geometrischen Parameter des HS-Übergangszustands (Tabelle 1) liegen zwischen denen des Ferryl-Hydroxo-Reaktantenkomplexes, [Por⁺Fe^{III}OH], und denen des HS-Eisen(III)-Methanol-Komplexes, [PorFe^{III}(CH₃OH)]. Die Spindichten in Tabelle 1 zeigen, dass die Umgebung des Übergangszustands durch eine beträchtliche elektronische Umorganisation gekennzeichnet ist. Diese Umorganisation werden wir nun analysieren und dadurch nachweisen, dass ein einfacher Grund vorliegt, warum eine Barriere auf der HS-Oberfläche auftritt und keine auf der LS-Oberfläche.

Aus Tabelle 1 geht hervor, dass das angreifende CH₃· und der Porphyrinring sowohl beim HS- als auch beim LS-Wiederanbindungsschritt ihre Spins verlieren. Die Spindichte des Eisens nimmt jedoch beim HS-Reaktionsweg stark zu (von 0.85 auf 2.42), während sie beim LS-Reaktionsweg nahezu konstant bleibt (0.84–0.86). Anhand der Orbitaldia-

gramme in Schema 2a kann diese Elektronenverschiebung erklärt werden. So ist das a_{2u}(a')-Porphyrinorbital^[6b] im Ferryl-Hydroxo-Komplex wie das Orbital der Alkylgruppe einfach besetzt (lp_O ist das Orbital des freien Elektronenpaares am Sauerstoff). Während der Wiederanbindung wird das a_{2u}(a')-Orbital formal mit dem Elektron des Alkylradikals (R·) aufgefüllt, das nun an dem neugebildeten σ_{OR}-Orbital beteiligt ist. Im LS-Reaktionsweg ist dies die wesentlichste Veränderung. Demgegenüber ist im HS-Reaktionsweg das Auffüllen des a_{2u}-Porphyrinorbitals mit einem Elektronenübergang aus dem d_{xz}-Orbital in das energiereichere d_{z²}-Orbital (σ*-Typ) verbunden. Im Hydroxo-eisen-Komplex/CH₃·-Cluster befinden sich alle ungepaarten Elektronen in energetisch relativ niedrig liegenden Orbitalen, während im HS-Übergangszustand und im entsprechenden HS-Eisen(III)-Alkohol-Komplex ein einzelnes Elektron das höher gelegene, energiereichere σ*(d_{z²})-Orbital besetzt, damit der Quartettzustand erhalten bleibt. Aufgrund dieser Elektronenverschiebung nimmt, wie oben erwähnt, die Spindichte am Eisen zu, und die Fe-O- und Fe-S-Bindung sind im Übergangszustand gegenüber denen im Hydroxo-eisen-Komplex deutlich länger. Diese Schwächung der Bindungen erweist sich als Barriere im HS-Reaktionsweg,

die somit ausschließlich das Resultat von Elektronenverschiebungen ist.

Da der LS-Reaktionsweg keine (oder zumindest nur eine sehr niedrige) Barriere aufweist, können, wenn überhaupt, keine radikalischen Zwischenstufen mit signifikanter Lebensdauer auftreten. Daraus folgt, dass die Wiederanbindung über den LS-Reaktionsweg als konzertierter Prozess erfolgt,^[5b, 7, 17] obwohl die Trajektorie der Annäherung der Ferryl-Oxen-Spezies an das Alkan einem Wasserstoffabstraktionsprozess ähnelt. Beim HS-Reaktionsweg entsteht auf der gleichen Trajektorie ein Alkylradikal, und eine Barriere ist zu überwinden. Vorausgesetzt, dass für die Geschwindigkeit des Wiederanbindungsschritts die Arrhenius-Gleichung gilt und für den HS- und LS-Reaktionsweg der gleiche präexponentielle Faktor verwendet wird, verzögert die Potentialbarriere von 5–7 kcal mol⁻¹ im HS-Profil den HS-Wiederanbindungsschritt um vier bis sechs Größenordnungen. Dadurch erlangt das Radikal eine signifikante Lebensdauer, während der es sich umlagern kann. Angesichts des hier aufgezeigten Mechanismus, nach dem ein umgelagerter Alkohol nur auf einem Weg (HS) entstehen kann, während sich ein nicht umgelagerter Alkohol auf beiden Reaktionswegen (LS und HS) bilden kann, können die aus Prozentsätzen einer Umlagerung berechneten Lebensdauern freier Radikale gelegentlich unrealistisch kurz erscheinen und einem Vergleich mit Lebensdauern, die wie von Newcomb et al. mit Hilfe von Radikaluhren bestimmt wurden,^[5] nicht standhalten. Ebenso können die in der Gruppe von Dinnocenzo und Jones durchgeführten Messungen des kinetischen Isotopeneffekts^[4] eine „Wasserstoffabstraktions-Trajektorie“ (auf beiden Reaktionswegen) widerspiegeln. So-

mit bietet der vorgeschlagene Mechanismus mit den beiden Reaktionswegen eine vernünftige Erklärung für die scheinbar widersprüchlichen Untersuchungsergebnisse.

Der Prozentsatz der Umlagerung hängt von der Anfangskonzentration des Radikals, wie durch die Verteilung der Reaktionskomplexe auf den HS- und LS-Prozess bestimmt,^[7] und von der durch die HS-Barriere bestimmten Geschwindigkeit des HS-Wiederanbindungsschritts ab. Zwei Faktoren beeinflussen die Höhe dieser Barriere; sie können anhand von Schema 2 veranschaulicht werden: Der erste Faktor ist verbunden mit dem Elektronenübergang aus dem d_{xz} -Orbital in das höher liegende $d_{z^2}(o^*)$ -Orbital, das antibindend zum axialen O-Fe-S-Vektor ist. Je stärker die Bindungsfähigkeit des Thiolatliganden ist, desto höher liegt das $d_{z^2}(o^*)$ -Orbital, was eine höhere Barriere zur Folge hat. Da im natürlichen Enzym der S-Ligand Bestandteil des Substrat umhüllenden Proteins ist, ist zu erwarten, dass die Koordinationsfähigkeit des S-Atoms sowohl durch die Polarität und Acidität im Bereich der Bindetasche als auch durch sterische Einschränkungen beeinflusst wird.

Der zweite Faktor hängt mit den Eigenschaften des angreifenden Radikals zusammen und kann anhand von Schema 2b erläutert werden. Einfaches Abzählen der Elektronen zeigt, dass an der Knüpfung der R-O-Bindung zunächst drei Elektronen beteiligt sind und der Porphyrinrest ein Loch im a_{2u} -Orbital aufweist.^[6b] Anschließend entsteht die Zweielektronen-R-O-Bindung, und das Loch im Orbital des Porphyrins wird mit einem Elektron aufgefüllt. Dieses Elektron stammt von der Dreielektronen-R-O-Bindungsknüpfung und wird formal vom positiv geladenen Alkylradikal übertragen. Folglich wird im HS-Wiederanbindungsschritt die Bildung der R-O-Bindung von einer Elektronenverschiebung (von R^+ nach Por^{+}) begleitet. Deshalb hängt der Prozentsatz der Radikalumlagerung vom Oxidationspotential des Radikals ab. Mit abnehmendem Oxidationspotential der Alkylgruppe sinkt die tatsächliche Radikallebensdauer auf der HS-Oberfläche und die Menge an umgelagertem Produktalkohol. Diese Behauptung steht mit Untersuchungen von Newcomb et al. in Einklang, die feststellten, dass die Ausbeute an umgelagertem Alkohol von 26 % (ein p -CF₃-Arylderivat) auf weniger als 1 % (1-Isopropyl-2-phenylcyclopropan) sinkt, wenn die Alkylgruppe des Substrats (1-Alkyl-2-arylcyclopropane) bessere Elektronendonoreigenschaften aufweist.^[5c] Dennoch sind die experimentellen Ergebnisse schwierig zu kommentieren, da Umlagerungen kationischer Intermediate stattfinden können und mehr als eine oxidierende Spezies auftritt.^[5]

Eingegangen am 1. September 1999,
veränderte Fassung am 22. November 1999 [Z13948]

- [1] M. Sono, M. P. Roach, E. D. Coulter, J. H. Dawson, *Chem. Rev.* **1996**, 96, 2841.
- [2] a) J. T. Groves, *J. Chem. Educ.* **1985**, 62, 928; b) J. T. Groves, G. A. McClusky, *J. Am. Chem. Soc.* **1976**, 98, 859.
- [3] a) J. T. Groves, Y.-Z. Hang in *Cytochrome P450: Structure, Mechanisms and Biochemistry* (Hrsg.: P. R. Ortiz de Montellano), 2. Aufl., Plenum, New York, **1995**, Kap. 1; b) B. Meunier, *Chem. Rev.* **1992**, 92, 1411; c) W. D. Woggon, *Top. Curr. Chem.* **1996**, 184, 40.
- [4] a) J. I. Manchester, J. P. Dinnocenzo, L. A. Higgins, J. P. Jones, *J. Am. Chem. Soc.* **1997**, 119, 5069; b) es wurde später angenommen, dass die

in Lit. [4a] als Substrate verwendeten Dimethylanilinderivate mit dem Ferryl-Oxen-Komplex der Meerrettich-Peroxidase und einem synthetischen Ferryl-Oxen-Modell über einen Elektronentransfermechanismus reagierten (Y. Goto, Y. Watanabe, S. Fukuzumi, J. P. Jones, J. P. Dinnocenzo, *J. Am. Chem. Soc.* **1998**, 120, 10762). Diese Schlüsse treffen jedoch nicht auf die in Lit. [4a] ebenfalls untersuchten Substanzen Toluol, p -Xylol und Benzylalkohol zu. Zudem sind alle in der Studie verwendeten Ferryl-Oxen-Systeme bessere Elektronen-acceptoren als der Ferryl-Oxen-Komplex von Cytochrom P450, sodass die Ergebnisse für die Oxidation durch Cytochrom P450 nicht relevant sind.

- [5] a) M. Newcomb, M.-H. Le Tadic, D. A. Putt, P. F. Hollenberg, *J. Am. Chem. Soc.* **1995**, 117, 3312; b) M. Newcomb, M.-H. Le Tadic-Beadatti, D. L. Chestney, E. S. Roberts, P. F. Hollenberg, *J. Am. Chem. Soc.* **1995**, 117, 12085; c) P. H. Toy, M. Newcomb, P. F. Hollenberg, *J. Am. Chem. Soc.* **1998**, 120, 7719.
- [6] a) M. Filatov, N. Harris, S. Shaik, *Angew. Chem.* **1999**, 111, 3730; *Angew. Chem. Int. Ed.* **1999**, 38, 3512. In der Gasphase sind die Elektromere $[PorFe^{IV}OH]$ ($S = 1$) und $[Por^{+}Fe^{III}OH]$ ($S = 1$) nahezu entartet, aber in einer dielektrischen Umgebung ist $[Por^{+}Fe^{III}OH]$ ($S = 1$) der Grundzustand. Dies stimmt mit elektrochemischen Untersuchungen überein (J. T. Groves, Z. Gross, M. K. Stern, *Inorg. Chem.* **1994**, 33, 5065). b) Die Spindichte beträgt 67 % im Porphyrinrest und 30 % am hier verwendeten S-Ligandenmodell. Dieses Modell entspricht mehr dem Cysteinato-Liganden als beispielsweise das Modell CH_3S^+ .
- [7] S. Shaik, M. Filatov, D. Schroder, H. Schwarz, *Chem. Eur. J.* **1998**, 4, 193.
- [8] P. J. Stevens, F. J. Devlin, C. F. Chabrowski, M. J. Frisch, *J. Phys. Chem.* **1994**, 98, 11 623.
- [9] JAGUAR 3.5, Schrodinger, Inc., Portland, OR, **1998**. Das Programm arbeitet nach der „Restricted-open-Shell“-B3LYP-Methode.
- [10] GAUSSIAN 98, Gaussian, Inc., Pittsburgh, PA, **1998**.
- [11] J. P. Hay, W. R. Wadt, *J. Chem. Phys.* **1985**, 82, 299.
- [12] a) Den maximalen Spinzustand ($S = \frac{1}{2}$) konnten wir nicht in unseren Rechnungen berücksichtigen. Allerdings ist die Frage, ob der Grundzustand des Eisen(III)-Alkohol-Komplexes der $S = \frac{1}{2}$ - oder $S = \frac{3}{2}$ -Zustand ist, für die Untersuchungsergebnisse nicht relevant, wie aus Abbildung 2 hervorgeht. Wichtig ist nur das Verhalten der Zustände, die durch die beiden in Schema 2a angegebenen Spinkopplungen erhalten werden. b) DFT-Berechnungen des entsprechenden Eisen(III)-Wasser-Komplexes ergaben einen $S = \frac{1}{2}$ -Grundzustand und einen energiereicheren $S = \frac{3}{2}$ -Zustand: M. Filatov, N. Harris, S. Shaik, *J. Chem. Soc. Perkin Trans. 2* **1999**, 399; M. T. Green, *J. Am. Chem. Soc.* **1998**, 120, 10772. Dieses Ergebnis wird durch Experimente bestätigt: H. Thomann, M. Bernardo, D. Goldfrab, P. M. H. Kroneck, V. Ulrich, *J. Am. Chem. Soc.* **1995**, 117, 8243. Allerdings führte eine experimentelle Studie einer Modellverbindung mit einem räumlich fixierten Thiophenoxy-Liganden zu einem $S = \frac{3}{2}$ -Grundzustand. Diese unterschiedlichen Resultate demonstrieren die von Harris und Loew vorhergesagte Bedeutung des Proteins bei der Stabilisierung des $S = \frac{1}{2}$ -Grundzustands: H. Aissaoui, R. Bachmann, A. Schweiger, W.-D. Woggon, *Angew. Chem.* **1998**, 110, 3191; *Angew. Chem. Int. Ed.* **1998**, 37, 2998; D. Harris, G. H. Loew, *J. Am. Chem. Soc.* **1993**, 115, 8775.
- [13] H. Li, S. Narashmhulu, L. M. Havran, J. D. Winkler, T. L. Poulos, *J. Am. Chem. Soc.* **1995**, 117, 6297.
- [14] Ein direkter OH-Transfermechanismus würde eine Spinzustandsänderung des fünffach koordinierten Eisen(III)-Komplexes nach $S = \frac{3}{2}$ erfordern (siehe z.B. Lit. [1]).
- [15] Alle HS-Daten wurden durch B3LYP-Rechnungen unter Verwendung des Programmpakets JAGUAR 3.5 erhalten (Lit. [9]). Das LS-Profil wurde nach der „Unrestricted“-B3LYP-Methode mit GAUSSIAN 98 berechnet (Lit. [10]). Der Nullpunkt der Energieskala in Abbildung 2 gilt für beide Kurven (LS und HS).
- [16] a) M. Filatov, W. Thiel, *Chem. Phys. Lett.* **1998**, 295, 467; b) H. Basch, S. Hoz, *J. Phys. Chem. A*, **1997**, 101, 4416; c) S. Skokov, R. A. Wheeler, *Chem. Phys. Lett.* **1997**, 271, 251; d) der Fehler bezüglich der Unterschätzung von Barrieren in B3LYP-Rechnungen (Lit. [16a–c]) beträgt bei verwandten Radikalreaktionen durchschnittlich $\leq 6 \text{ kcal mol}^{-1}$ und bei entsprechenden Reaktionen mit OH- und CH_3 -Gruppen $0.5 \text{ kcal mol}^{-1}$.^[16c] In B3LYP-Berechnungen von Reak-

tionen mit Beteiligung von Fe-, O- und H-Atomen wird die Barrierrhöhe um ungefähr 1 kcal mol^{-1} gegenüber den experimentellen Daten und um $5.4 \text{ kcal mol}^{-1}$ gegenüber dem CASPT2-Ergebnis unterbewertet, wobei allerdings in der CASPT2-Rechnung die Barriere überschätzt wird.^[17]

[17] M. Filatov, S. Shaik, *J. Phys. Chem. A* **1998**, *102*, 3835.

Eine durch Rinder- β 1,4-Galactosyl-Transferase katalysierte Reaktion zu β -D-Galactopyranosyl-(1-3)-verknüpften Disacchariden von L-Zuckern**

Yoshihiro Nishida,* Hideaki Tamakoshi,
Yuki Kitagawa, Kazukiyo Kobayashi* und
Joachim Thiem

Die β 1,4-Galactosyl-Transferase (β 1,4-GalTase) aus Rindern gehört hinsichtlich der Substratspezifität zu den am besten untersuchten Glycosyl-Transferasen von Säugetieren.^[1] Das Enzym katalysiert den Galactosyltransfer von UDP-Galactose auf die 4-OH-Position von *N*-Acetyl-D-glucosamin (p-GlcNAc) sowie in Gegenwart von α -Lactalbumin (α -LA) auf D-Glucose. Auch andere Reaktionen des Enzyms sind bekannt, z. B. die Übertragung von *N*-Acetyl-D-galactosamin auf p-GlcNAc bei hohen α -LA-Konzentrationen.^[2] Die β 1,4-GalTase-katalysierte Reaktion wurde lange als regiospezifisch für die 4-OH-Stellung der Acceptorzucker angesehen; wir entdeckten jedoch auch einen anderen Reaktionstyp, bei dem ein Galactosyltransfer auf die β -anomere Position von *N*-Acetylkannosamin (3-Acetamido-3-desoxy-D-glucose),^[3] *N*-Acetylgentosamin (3-Acetamido-3-desoxy-D-xylose)^[4] und D-Xylose^[5] katalysiert wird. Hier berichten wir über die erste β 1,4-GalTase-Reaktion mit L-Zuckern als Acceptorsubstraten. Bei dieser neuen Reaktion wird zudem die ungewöhnliche Galactosylübertragung auf die 3-OH-Position der L-Zucker katalysiert, es handelt sich demnach um einen β 1,3-Galactosyltransfer.

Die von uns beschriebenen β 1,1-Transferreaktionen der 3-Acetamido-3-desoxyzucker sind ein überzeugender Hinweis darauf, dass die 3-NAc-Gruppe eine Schlüsselrolle bei der Enzym-Substrat-Bindung spielt und die ungewöhnliche

Übertragung steuert.^[4] Sollte dies zutreffen, könnte das Enzym mit Acceptorsubstraten, die eine NAc-Gruppe an verschiedenen Positionen tragen, unterschiedliche Glycosylbindungen knüpfen. Wir führten daher in die β -anomere Position von L-Glucose, L-Xylose und ihren D-Isomeren eine NAc-Gruppe ein und untersuchten dann den Einfluss auf die enzymatische Reaktion.

Die Einführung der NAc-Gruppe gelang durch Umsetzen des jeweiligen reduzierenden Zuckers mit Ammoniumhydrogencarbonat in Wasser und nachfolgende Acetylierung mit Acetanhydrid in Methanol.^[6] Die 1-NAc-Derivate wurden in einem Enzym-Assay^[7] sowohl mit als auch ohne α -LA untersucht. Ihre Reaktivität wurde anhand der relativen Anfangsreaktionsgeschwindigkeit (r) bei Substratkonzentrationen von 1 und 10 mM mit der der reduzierenden Zucker verglichen (Abbildung 1).

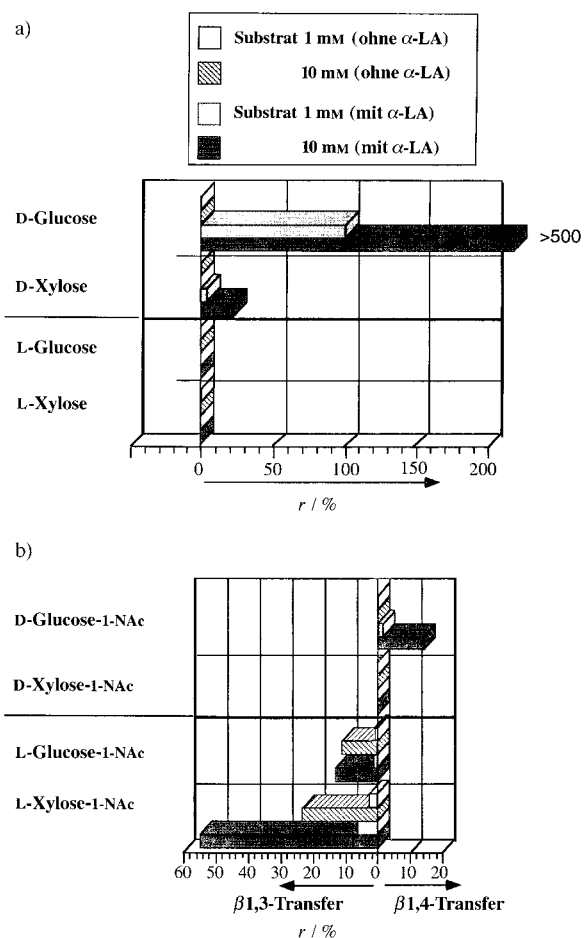


Abbildung 1. Relative Geschwindigkeiten (r) für die Reaktion von Rinder- β 1,4-Galactosyl-Transferase mit enantiomeren Glucosen und Xylosen (a) sowie ihren 1-NAc-Derivaten (b). Die Assays wurden mit jedem Acceptorsubstrat bei Konzentrationen von 1 und 10 mM sowie mit und ohne Rinder- α -Lactalbumin (0.1 mg mL^{-1}) durchgeführt. Die Art des Galactosyltransfers in (b) wurde $^1\text{H-NMR}$ -spektroskopisch bestimmt (siehe Text).

Der Enzym-Assay bestätigte den signifikanten Einfluss der 1-NAc-Gruppe von D- und L-Zuckern auf die enzymatische Reaktion. Dieser Effekt äußert sich bei D- und L-Enantiomeren in entgegengesetzter Weise: Die NAc-Gruppe macht

[*] Prof. Dr. Y. Nishida, Prof. Dr. K. Kobayashi, H. Tamakoshi, Y. Kitagawa
Department of Molecular Design and Engineering
Graduate School of Engineering, Nagoya University
Chikusa-ku, Nagoya 464-8603 (Japan)
Fax: (81) 52-789-2528
E-mail: nishida@mol.nagoya-u.ac.jp, kobayash@mol.nagoya-u.ac.jp
Prof. Dr. J. Thiem
Institut für Organische Chemie der Universität
Martin-Luther-King-Platz 6, D-20146 Hamburg

[**] Diese Arbeit wurde vom japanischen Ministerium für Wissenschaft und Technologie und von der Deutschen Forschungsgemeinschaft unterstützt.