

- [9] H. Hashimoto, K. Asano, F. Fuji, J. Yoshimura, *Carbohydr. Res.* **1982**, 104, 87–104.
 [10] K. Tatsuta, Y. Niwata, K. Umezawa, K. Toshima, M. Nakata, *J. Antibiot.* **1991**, 44, 456–458.
 [11] B. Casu, M. Petitou, M. Provassoli, P. Sinaÿ, *Trends Biochem. Sci.* **1988**, 13, 221–225.

Tris(pyrazolyl)methansulfonate: eine neue Klasse wasserlöslicher Liganden

Wolfgang Kläui,* Michael Berghahn, Gerd Rheinwald und Heinrich Lang

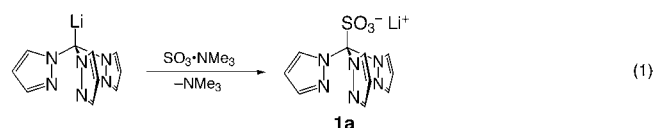
Trofimenko hat 1966 mit Hydrotris(pyrazolyl)borat einen neuartigen tripodalen Stickstoffliganden in die Koordinationschemie eingeführt. Schon bald haben diese Anionen als Stickstoffchelatligenanden weitreichende Anwendungen in der Koordinationschemie gefunden. Heute bilden die substituierten Hydrotris(pyrazolyl)borate (im Folgenden mit Tp abgekürzt) die am häufigsten verwendete Klasse von N_3 -Tripodliganden.^[1] Die Möglichkeit, den sterischen Anspruch der Liganden durch sperrige Substituenten in 3-Position des Pyrazolrings zu vergrößern, ist ein wichtiger Aspekt in der Chemie der Tp-Liganden.^[2] Solche sterisch anspruchsvolle Tp-Liganden spielen eine wichtige Rolle bei der Synthese verschiedener Enzymmodelle.^[3] So erhielt Vahrenkamp mit dem Liganden $Tp^{Cum,Me}$ ^[4] einen Zink-Hydroxid-Komplex, der z.B. aktivierte Ester, Amide und nichtaktivierte Phosphorsäureester hydrolysiert und somit als stöchiometrisches Modell für Esterasen, Peptidasen und Phosphatasen gilt.^[5] Allerdings ist es auf Grund der Unlöslichkeit dieses Komplexes in Wasser weder möglich, einen pK_s -Wert für ein Zinkgebundenes H_2O -Molekül in wässriger Lösung zu bestimmen, noch kann Wasser während einer Hydrolysereaktion zugegeben werden, um den $Tp^{Cum,Me}$ -Zn-OH-Komplex zu regenerieren. Die Hydrolyse läuft daher nur stöchiometrisch und nicht katalytisch ab.^[6] Ein weiteres Problem der Hydrotris(pyrazolyl)borat-Liganden ist ihre hydrolyseempfindliche B-N-Bindung. Die Hydrolyse dieser Bindung kann auch durch Methylsubstituenten in 5-Position der Pyrazolringe nicht vollständig unterbunden werden.^[7]

Besonders im Bereich der Enzymmodelle ist es aber von großem Interesse, Komplexe zu erhalten, die unter physiolo-

gischen Bedingungen löslich und stabil sind. Die Einführung von wasserlöslich machenden funktionellen Gruppen in Hydrotris(pyrazolyl)borate ist bis heute ein ungelöstes Problem. Ausgehend von dieser Aufgabenstellung haben wir nach einem wasserlöslichen und hydrolysestabilen Liganden gesucht, der als eine Alternative zu den Hydrotris(pyrazolyl)boraten eingesetzt werden kann.

Ein geeignetes Ligandensystem sollte neben einer möglichst ähnlichen Anordnung der Donorzentren wie in den Hydrotris(pyrazolyl)borat-Liganden die Möglichkeit bieten, leicht hydrophile Gruppen einzufügen. Wir haben jetzt gefunden, dass die isosteren und isoelektronischen Tris(pyrazolyl)methan-Liganden geeignete Ausgangsverbindungen sind. In dieser Ligandenklasse, die erstmals von Hückel erwähnt und von Juliá vereinfacht zugänglich gemacht wurden, sind die B-N-Bindungen durch C-N-Bindungen ersetzt.^[8,9] Das Methin-Proton des Tris(pyrazolyl)methans ist so acide, dass es sich durch Butyllithium abstrahieren lässt. Man erhält so eine reaktive Zwischenstufe, die sich mit Elektrophilen umsetzen lässt.^[10]

Da unsere Zielsetzung die Einführung einer hydrophilen Gruppe war, setzten wir lithiiertes Tris(pyrazolyl)methan mit Schwefeltrioxid-Trimethylamin-Komplex um und erhielten so nach Gleichung (1) das Lithiumsalz der Tris(pyrazolyl)me-



thansulfonsäure **1a** ($LiTpms$). Durch eine Metathesereaktion mit Kaliumcarbonat erhält man das entsprechende Kaliumsalz **1b** ($KTpms$).

Die Verbindung **1b** ist im Unterschied zu Tris(pyrazolyl)methan nur in Wasser gut und in Methanol nur noch mäßig löslich. Im Unterschied zu Tris(pyrazolyl)methan^[11] und besonders zum Hydrotris(pyrazolyl)borat-Liganden ist der hier beschriebene Ligand $Tpms$ **1** über einen weiten pH-Bereich in wässriger Lösung stabil. Selbst bei pH 0 findet man erst nach mehreren Wochen geringe Mengen von freiem Pyrazol als Hydrolyseprodukt, bei pH 13 ist auch nach Wochen keine Zersetzung zu beobachten.

Im Hinblick auf die Verwendung der Tris(pyrazolyl)methansulfonate als neue Ligandenklasse für Enzymmodelle synthetisierten wir ausgehend von Tris(3-*tert*-butylpyrazolyl)methan analog zur Synthese von **1** den sterisch anspruchsvollen Liganden Tris(3-*tert*-butylpyrazolyl)methansulfonat **2a** ($LiTpms^{tBu}$ ^[12]).

Durch Metathesereaktion von **2a** mit Thalliumnitrat in Methanol/Wasser erhält man das entsprechende Thalliumsalz **2b** ($TlTpms^{tBu}$). Dieses ist auf Grund der leichten Abtrennbarkeit von Thalliumsalzen eine sehr gute Ausgangsverbindung für Komplexe. Die Molekülstruktur von **2b** wurde durch Röntgenbeugung ermittelt (Abbildung 1).^[13] $TlTpms^{tBu}$ ist in protischen Lösungsmitteln stabil, die Verbindung zersetzt sich erst in Gegenwart von Mineralsäuren unter Bildung von Pyrazol.

[*] Prof. Dr. W. Kläui, M. Berghahn
 Institut für Anorganische Chemie und Strukturchemie der
 Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf
 Universitätsstraße 1, 40225 Düsseldorf (Deutschland)
 Fax: (+49) 211-81-12287
 E-mail: klaeui@uni-duesseldorf.de
 Dr. G. Rheinwald, Prof. Dr. H. Lang
 Institut für Chemie
 Lehrstuhl für Anorganische Chemie
 Straße der Nationen 62, 09107 Chemnitz (Deutschland)

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

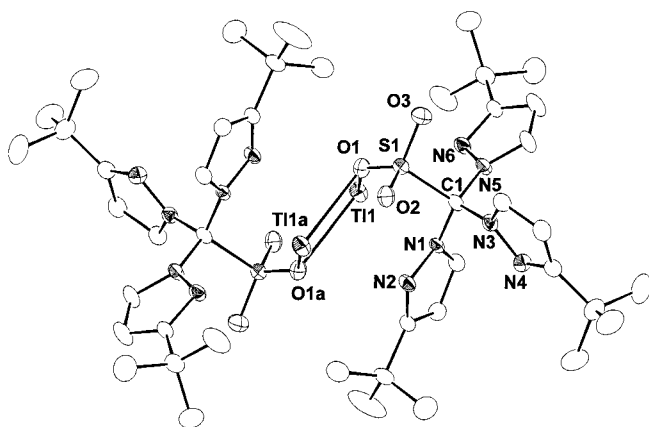


Abbildung 1. Struktur von **2b** im Kristall. Ausgewählte Abstände [Å] und Winkel [°]: Ti1–O1 2.708(3), Ti1–Ti1a 4.1537(3), S1–O3 1.434(3), S1–O2 1.456(3), S1–O1 1.465(3), S1–C1 1.891(4), O1–Ti1a 2.748(3), N1–N2 1.371(4), N1–C1 1.448(5), N3–N4 1.374(5), N3–C1 1.451(5), N5–N6 1.374(5), N5–C1 1.452(5); O1–Ti1–O1a 80.86(10), O1–Ti1–Ti1a 40.79(6), O1a–Ti1–Ti1a 40.07(6), O2–S1–O1 111.72(18), O1–S1–C1 102.71(17), S1–O1–Ti1 100.26(15), S1–O1–Ti1a 135.99(17), Ti1–O1–Ti1a 99.14(10), N1–C1–N3 109.6(3), N1–C1–N5 109.5(3), N3–C1–N5 108.6(3), N1–C1–S1 110.5(2), N3–C1–S1 110.4(3), N5–C1–S1 108.2(3).

Erste Versuche belegen, dass der Ligand Tpms^{tBu} **2** mit Übergangsmetallen tetraedrische Komplexe bildet, die nach den spektroskopischen Daten C_{3v} -Symmetrie aufweisen.^[14] Der Ligand **1** bildet mit zweiwertigen Metallionen schwerlösliche Niederschläge der Zusammensetzung $\text{M}(\text{Tpms})_2$. Er verhält sich in dieser Hinsicht wie der unsubstituierte Tp-Ligand. Die Löslichkeit von Tpms in protischen Lösungsmitteln erlaubt aber z. B. die Synthese von $[(\text{Tpms})\text{Cu}(\text{CO})]$, einem in Methanol löslichen, thermisch stabilen, aber oxidationsempfindlichen Kupfer(I)-carbonylkomplex. Offensichtlich fungieren Tpms **1** und Tpms^{tBu} **2** als tripodale Stickstoff-Donorliganden.

Vorversuche haben gezeigt, dass es möglich ist, alternativ zur Sulfonatgruppe andere hydrophile Gruppen einzuführen. Die Reaktion von Lithium-tris(pyrazolyl)methanid z. B. mit CO_2 oder Ethylenoxid führt zu der entsprechenden wasserlöslichen Carbonsäure oder zum Alkohol. Auf diese Weise ergeben sich eine Vielzahl von weiteren Derivatisierungsmöglichkeiten, die zu stabilen, wahrscheinlich noch besser wasserlöslichen Enzymmodell-Liganden führen.

Experimentelles

1a, b: Zu einer Lösung von 1.3 g (6.1 mmol) Tris(pyrazolyl)methan^[9] in 25 mL absolutem THF wurden bei -60°C 4.7 mL 1.6 M *n*-Butyllithium-Lösung zugetropft. Die Lösung wurde sofort gelb und trübe. Nach 1 h wurde bei einer Temperatur von -50°C 1.0 g (7.5 mmol) Schwefeltrioxid-Trimethylamin-Komplex zugegeben. Unter ständigem Rühren ließ man die braune Suspension innerhalb von 90 min auf 0°C erwärmen. Nach weiteren 3 h wurde das Lösungsmittel abkondensiert. Zur Entfernung von überschüssigem Tris(pyrazolyl)methan wurde der Feststoff in Chloroform aufgenommen und nach 1 h Rühren durch Membranfilter filtriert. Durch Kristallisation des Rohproduktes aus heißem Methanol erhielt man farblose Kristalle von LiTpms **1a** (0.88 g, 48 %). Elementaranalyse (%): ber. für $\text{C}_{10}\text{H}_9\text{LiN}_6\text{O}_3\text{S}$: C 40.0, H 3.0, N 28.0; gef.: C 40.0, H 3.1, N 28.2.

Alternativ erhielt man KTpms aus dem Rohprodukt durch Metathese mit Kaliumcarbonat in Methanol/Wasser. Entfernen des Lösungsmittelgemisches und Kristallisation des Rückstandes aus heißem Methanol liefert farblose Kristalle von Kaliumtris(pyrazolyl)methansulfonat **1b** (0.72 g,

37 %). $^1\text{H-NMR}$ (200 MHz, D_2O , 300 K): δ = 6.5 (dd, $^3J(\text{H,H})$ = 2.8, 1.8 Hz, 1 H; 4-H), 7.6 (dd, $^3J(\text{H,H})$ = 2.8, $^4J(\text{H,H})$ = 0.6 Hz 1 H; 3 oder 5-H), 7.7 (dd, $^3J(\text{H,H})$ = 1.8, $^4J(\text{H,H})$ = 0.6 Hz, 1 H; 3 oder 5-H); $^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}\text{-NMR}$ (500 MHz, D_2O , 300 K): δ = 96.4, 108.4, 132.9, 142.7; Elementaranalyse (%): ber. für $\text{C}_{10}\text{H}_9\text{KN}_6\text{O}_3\text{S}$: C 36.1, H 2.7, N 25.3; gef.: C 36.1, H 2.3, N 25.0.

2a, b: Die Synthese von $\text{LiTpms}^{\text{tBu}}$ aus Tris(3-*tert*-butylpyrazolyl)methan^[15] erfolgt in Analogie zur Synthese von LiTpms . Das Thalliumsalz **2b** erhielt man durch Umsetzen von 0.23 g (0.48 mmol) $\text{LiTpms}^{\text{tBu}}$ mit 0.25 g (0.95 mmol) TlNO_3 in 30 mL Methanol/Wasser (1/1). **2b** fällt analysenrein als weißes Pulver aus (0.25 g, 75 %). Verdunstungskristallisation aus Methanol lieferte für die Kristallstrukturanalyse geeignete Einkristalle. $^1\text{H-NMR}$ (200 MHz, CDCl_3 , 300 K): δ = 7.5 (d, $^3J(\text{H,H})$ = 2.7 Hz, 1 H, 5-H), 6.3 (d, $^3J(\text{H,H})$ = 2.7 Hz, 1 H, 4-H), 1.3 (s, 9H, CH_3); $^{13}\text{C-NMR}$ (500 MHz, CDCl_3 , 300 K) δ = 31.1, 32.9, 96.8, 105.0, 134.0, 165.0; Elementaranalyse (%): ber. für $\text{C}_{22}\text{H}_{33}\text{N}_6\text{O}_3\text{STl}$: C 39.7, H 5.0, N 12.6; gef.: C 39.7, H 4.9, N 12.7.

Eingegangen am 2. März 2000 [Z 14794]

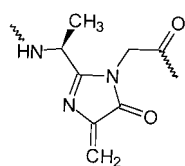
- a) S. Trofimenko, *J. Am. Chem. Soc.* **1966**, *88*, 1842–1844; b) S. Trofimenko, *Chem. Rev.* **1993**, *93*, 943–980; c) S. Trofimenko, *Scorpionates: The Coordination Chemistry of Polypyrazolylborate Ligands*, Imperial College Press, London, **1999**.
- a) S. Trofimenko, J. C. Calabrese, J. S. Thompson, *Inorg. Chem.* **1987**, *26*, 1507–1514; b) N. Kitajima, W. B. Tolman, *Prog. Inorg. Chem.* **1995**, *43*, 419–533.
- a) N. Kitajima, Y. Moro-oka, *Chem. Rev.* **1994**, *94*, 737–757; b) N. Kitajima, M. Osawa, Y. Moro-oka, T. Hirano, M. Hirobe, T. Nagano, *Inorg. Chem.* **1993**, *32*, 1879–1880; c) G. Parkin, *Adv. Inorg. Chem.* **1995**, *42*, 291–393.
- Die hier verwendete Abkürzung entspricht der von Trofimenko eingeführten Nomenklatur.^[1b]
- M. Ruf, K. Weiß, H. Vahrenkamp, *J. Chem. Soc. Chem. Commun.* **1994**, 135–136.
- H. Vahrenkamp, *Acc. Chem. Res.* **1999**, *32*, 589–596.
- A. Kremer-Aach, W. Kläui, unveröffentlichte Ergebnisse; H. Vahrenkamp, persönliche Mitteilung.
- W. Hüchel, H. Bretschneider, *Ber. Dtsch. Chem. Ges.* **1937**, *70*, 2024–2026.
- S. Juliá, J. M. del Mazo, L. Avila, J. Elguero, *J. Org. Prep. Proced. Int.* **1984**, *16*(5), 299–307.
- P. K. Byers, A. J. Canty, R. T. Honeyman, R. M. Claramunt, C. Lopez, J. L. Lavandera, J. Elguero, *Gazz. Chim. Ital.* **1992**, *122*, 341–344.
- C. Tietze, J. Hermann, H. Vahrenkamp, *Chem. Ber.* **1995**, *128*, 1095–1103.
- Die verwendete Abkürzung wird in Analogie zur Nomenklatur von Trofimenko eingeführt.^[1b]
- Kristallstrukturanalyse von **2b**: Kristallabmessung $0.45 \times 0.35 \times 0.25 \text{ mm}^3$, triklin, Raumgruppe $P\bar{1}$, $a = 10.5675(1)$, $b = 10.7703(1)$, $c = 11.7191(2) \text{ Å}$, $\alpha = 87.3920(8)$, $\beta = 74.4663(1)$, $\gamma = 81.2366(7)^\circ$, $V = 1270.07(3) \text{ Å}^3$, $Z = 1$, $\rho_{\text{ber.}} = 1.741 \text{ g cm}^{-3}$, $F(000) = 656$, $T = 173(2) \text{ K}$. Die Daten wurden auf einem Bruker-axs-Diffraktometer mit einem Smart-CCD-Detektor gesammelt (MoK_α -Strahlung, $\lambda = 0.71073 \text{ Å}$, ω -Scans, $3.6 \leq 2\theta \leq 60.74^\circ$). Insgesamt wurden 10263 Reflexe (davon 6663 unabhängige Reflexe) gemessen und 5869 als beobachtet eingestuft. Die Struktur wurde mit Direkten Methoden gelöst und gegen F^2 verfeinert. Die Wasserstoffatome wurden auf ihre berechneten Positionen gesetzt und abhängig von den benachbarten Nichtwasserstoffatomen (Reitermodell) verfeinert. Die Verfeinerung der 331 variierten Parameter konvergierte bei $R = 0.0425$ für 6663 Reflexe mit $I > 2\sigma(I)$ und $wR2 = 0.0900$ für alle Reflexe. Min./max. Restelektronendichte $-3.790/2.057 \text{ e Å}^{-3}$. Die Strukturverfeinerung wurde mit dem Programm SIR-97^[16] und die Strukturverfeinerung mit SHELXL-97^[17] durchgeführt. Die kristallographischen Daten (ohne Strukturaktoren) der in dieser Veröffentlichung beschriebenen Struktur wurden als „supplementary publication no. CCDC-141108“ 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).

- [14] In wenig solvatisierenden Lösungsmitteln entsteht bei der Reaktion von TlTPms^{FBu} mit Zinkbromid neben der Spezies mit der erwarteten C_{3v}-Symmetrie eine C_s-symmetrisch Verbindung, deren Struktur noch ungeklärt ist.
- [15] D. L. Reger, J. E. Collins, D. L. Jameson, R. K. Castellano, *Inorg. Synth.* **1998**, 32, 63–65.
- [16] A. Altomare, M. C. Burla, M. Camalli, G. L. Cascarano, C. Giacovazzo, A. Guagliardi, A. G. G. Moliterni, G. Polidori, R. Spagna, *J. Appl. Crystallogr.* **1999**, 32, 115–119.
- [17] G. M. Sheldrick, SHELXL 97, Programs for Crystal Structure Analysis (Release 97-2), Universität Göttingen, **1997**.

Spektroskopischer Nachweis eines 4-Methylidenimidazol-5-ons sowohl in Histidin- als auch in Phenylalanin-Ammoniak-Lyasen**

Dagmar Röther, Dietrich Merkel und János Rétey*

Histidin-Ammoniak-Lyase (HAL, Histidase, EC 4.3.1.3) und Phenylalanin-Ammoniak-Lyase (PAL, EC 4.3.1.5) katalysieren die nichtoxidative Desaminierung ihrer jeweiligen Aminosäuresubstrate zu *trans*-Urocaninsäure bzw. zu *trans*-Zimtsäure.^[1] HAL leitet den Abbau von Histidin sowohl in Bakterien als auch in Tieren ein.^[2, 3] Ihr Defekt im Menschen ist die Ursache der Krankheit Histidinämie.^[4] PAL ist ein wichtiges Pflanzenenzym, welches an der Abzweigung des Primär- und Sekundärmetabolismus agiert. Ihr Produkt, die *trans*-Zimtsäure, ist Vorstufe von Ligninen, Flavonoiden und Cumarinen. Die beiden Enzyme weisen eine hochgradige Homologie in ihrer Aminosäuresequenz auf und es wurde postuliert, dass sie ein prosthetisches Dehydroalanin in ihrer aktiven Stelle enthalten.^[5–7] Überexpression der Enzyme in *E. coli* verbunden mit Mutageneseexperimenten ergaben, dass die prosthetische Gruppe autokatalytisch aus Serin 143



1

im Falle von HAL und Serin 202 im Falle von PAL gebildet wird.^[8–10] Kürzlich haben Schwede et al. die räumliche Struktur von HAL durch Röntgen-Kristallographie gelöst.^[11] Die Struktur zeigte, dass die prosthetische Gruppe nicht Dehydroalanin, sondern 4-Methylidenimidazol-5-on (MIO) **1** ist. Diese neu-

artige elektrophile Gruppe wird durch autokatalytische Cyclisierung eines internen Tripeptids (Ala-Ser-Gly) des Vorstufenproteins gebildet, ein Prozess, der zwei aufeinander folgende Wassereliminierungen einschließt. Um einen spektroskopischen Nachweis des MIO-Chromophors zu erhalten, untersuchten wir die UV-Spektren von Wildtyp-HAL und diejenigen der Mutante S143A, die keine MIO-Gruppe bildet. Abbildung 1a zeigt das UV-Differenzspektrum der HAL-

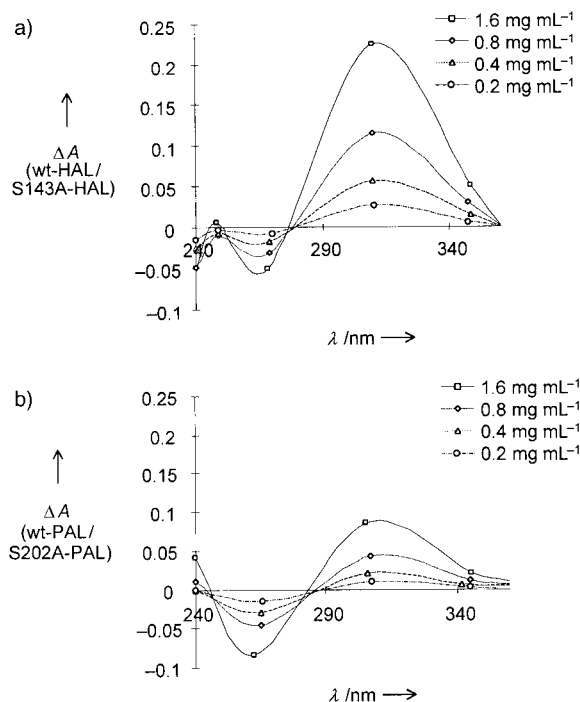


Abbildung 1. a) UV-Differenzspektrum der HAL-Mutante S143A und von Wildtyp(wt)-HAL; b) UV-Differenzspektrum der PAL-Mutante S202A und von Wildtyp-PAL.

Mutante S143A und von Wildtyp-HAL zwischen 240 und 360 nm, gemessen bei Enzymkonzentrationen von 0,2, 0,4, 0,8 und 1,6 mg mL⁻¹. Das UV-Spektrum von Wildtyp-HAL zeigt ein diskretes Maximum zwischen 305 und 310 nm, dessen Intensität mit zunehmender Enzymkonzentration wächst. Wir schlagen vor, dass dieses Maximum von der MIO-Gruppe stammt, die ein kreuzkonjugiertes Doppelbindungssystem aufweist. Die Mutante weist kein konjugiertes System auf und folglich zeigt sie kein Absorptionsmaximum um 308 nm.

Die Kristallstruktur von PAL ist noch nicht gelöst. Um zu entscheiden, ob PAL ebenfalls eine MIO-Gruppe an der aktiven Stelle enthält, untersuchten wir das Wildtyp-Enzym und die Mutante S202A UV-spektroskopisch. Abbildung 1b zeigt das UV-Differenzspektrum der Mutante S202A und von Wildtyp-PAL bei Enzymkonzentrationen von 0,2, 0,4, 0,8 und 1,6 mg mL⁻¹. Wie schon in dem mit HAL durchgeführten Experiment, ist auch hier ein Maximum zu beobachten, dessen Intensität mit zunehmender Enzymkonzentration wächst. Dieses Maximum tritt zwischen 305 und 310 nm auf. Ein Vergleich der Abbildungen 1a und 1b zeigt, dass die UV-Differenzspektren von HAL und PAL sehr ähnlich sind, jedoch PAL bei gleicher Proteinkonzentration eine etwas niedrigere Absorption zeigt, was zum Teil an dem höheren

[*] Prof. Dr. J. Rétey, D. Röther, Dr. D. Merkel
Institut für Organische Chemie und Biochemie der Universität
Richard-Willstätter-Allee, 76128 Karlsruhe (Deutschland)
Fax: (+49) 721-608-4823
E-mail: biochem@ochhades.chemie.uni-karlsruhe.de

[**] Diese Arbeit wurde von der Deutschen Forschungsgemeinschaft und vom Fonds der Chemischen Industrie gefördert. Wir danken Prof. G. E. Schulz und Dipl.-Chem. M. Baedeker (Universität Freiburg) für das neue PAL-Expressionssystem und Dr. M. Stieger (Hoffmann-La Roche, Basel, Schweiz) für den Vektor pREP4-GroESL. D.R. und D.M. danken dem Land Baden-Württemberg für ein Landesgraduiertenstipendium.