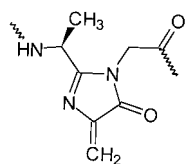


- [14] In wenig solvatisierenden Lösungsmitteln entsteht bei der Reaktion von TlTPms<sup>FBu</sup> mit Zinkbromid neben der Spezies mit der erwarteten C<sub>3v</sub>-Symmetrie eine C<sub>s</sub>-symmetrisch Verbindung, deren Struktur noch ungeklärt ist.
- [15] D. L. Reger, J. E. Collins, D. L. Jameson, 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.<sup>[1]</sup> HAL leitet den Abbau von Histidin sowohl in Bakterien als auch in Tieren ein.<sup>[2, 3]</sup> Ihr Defekt im Menschen ist die Ursache der Krankheit Histidinämie.<sup>[4]</sup> 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.<sup>[5–7]</sup> 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.<sup>[8–10]</sup> Kürzlich haben Schwede et al. die räumliche Struktur von HAL durch Röntgen-Kristallographie gelöst.<sup>[11]</sup> 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-

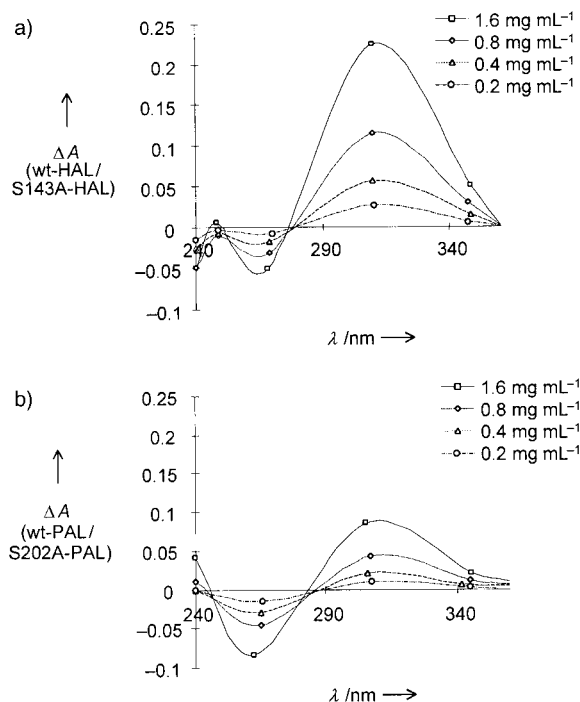


Abbildung 1. a) UV-Differenzspektrum der HAL-Mutante S143A und von Wildtyp(wt)-HAL; b) UV-Differenzspektrum der PAL-Mutante S202A und von Wildtyp-PAL.

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<sup>-1</sup>. 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<sup>-1</sup>. 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.

Molekulargewicht von PAL (312 im Vergleich zu 215 kDa bei HAL) liegen könnte. Dazu kommt, dass PAL viel weniger stabil ist als HAL. Folglich wird PAL während des Konzentrationsprozesses durch Ultrafiltration teilweise inaktiviert. Letztere ist notwendig, um die UV-Differenzspektren messen zu können. Wir haben bemerkt, dass MIO, als starkes Elektrophil, nur in der intakten aktiven Stelle stabil ist. Vor dem Konzentrationsprozess waren sowohl die Wildtyp- als auch die mutierten PAL-Präparate elektrophoretisch homogen und wurden in jeder Hinsicht gleich behandelt.

Von einem Absorptionsmaximum um 315 nm bei Wildtyp-HAL hat Klee schon früher berichtet, gab jedoch keine Erklärung für dieses Phänomen.<sup>[12]</sup> Um auszuschließen, dass die Differenzspektren nicht nur relative Absorptionsdifferenzen zeigen, und um den Chromophor in kleinen Peptiden zu orten, führten wir eine partielle Proteolyse von HAL und PAL durch. Zunächst wurden die beiden Enzyme mit 6 M Harnstoff denaturiert und nach Dialyse mit Pronase inkubiert. Das Verdauungsmisch wurde anschließend auf eine Umkehrphasen-Nucleosil-100-C18-Säule aufgetragen. Die Peptidfragmente wurden mit einem Gradienten von H<sub>2</sub>O/CH<sub>3</sub>CN, das 0.1 % Trifluoressigsäure (TFA) enthielt, getrennt. In diesem Verdauungsmisch von Wildtyp-HAL fanden wir einige Peaks, welche zwischen 300 und 310 nm absorbierten (Abbildung 2). Kein Peptidfragment, welches aus der

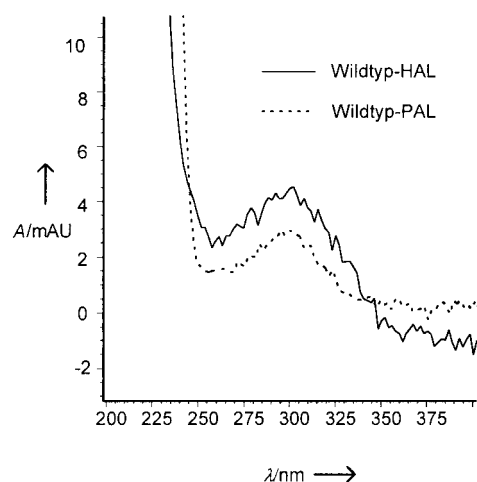


Abbildung 2. UV-Spektren von zwei nach dem Pronase-Verdau separierten Peptidfragmenten. Die durchgezogene Linie repräsentiert das UV-Spektrum eines abgetrennten Fragmentes (Retentionszeit 65 min) aus dem Verdau von Wildtyp-HAL, die unterbrochene dasjenige eines Fragmentes (Retentionszeit 14 min) aus dem Verdau von Wildtyp-PAL.

HAL-Mutante S143A erhalten wurde, zeigte eine ähnliche Absorption während der ganzen Trennungsprozedur. Peptidfragmente aus Wildtyp-PAL wiesen auch Absorptionsmaxima bei Wellenlängen auf, die denjenigen der UV-Differenzspektren ähnelten (Abbildung 2). Ein ähnliches Maximum konnte bei keinem der Fragmente, welche aus der PAL-Mutante S202A erhalten worden waren, nachgewiesen werden. Obwohl wiederholte Versuche zu den selben Resultaten geführt haben, fanden wir auch Peptidfragmente, welche Absorptionsmaxima bei höheren Wellenlängen ( $\lambda_{\text{max}} = 335 \text{ nm}$ ) aufwiesen. Diese Fragmente enthielten eine modifizierte MIO-

Gruppe, die aus der Reaktion mit bestimmten Aminosäuren stammte, z. B. mit Lysin, welches im Pronase-Lysat vorhanden war.<sup>[13a]</sup> Verbindungen, mit einem sehr ähnlichen Chromophor, wie (substituiertes) MIO sind bekannt und weisen  $\lambda_{\text{max}}$ -Werte in demselben Bereich auf.<sup>[13b]</sup>

HAL und PAL sind sehr eng verwandte Enzyme, die beide die MIO-Gruppe im aktiven Zentrum enthalten. Dies weist auf einen analogen Mechanismus der Reaktionen hin, welche durch HAL und PAL katalysiert werden, wie dies bereits postuliert wurde.<sup>[14, 15]</sup>

### Experimentelles

Bakterienstämme und Plasmide: HAL und PAL wurden in *E. coli*-BL21(DE3)-Zellen überexprimiert. Das für HAL aus *Pseudomonas putida* codierende Gen wurde in den Expressionsvektor pT7-7 subkloniert.<sup>[8]</sup> Das Gen für PAL aus *Petroselinum crispum* wurde nach der Codon-Präferenz von *E. coli* umprogrammiert und in den Vektor pT7-7 einkloniert, gefolgt von einer Transformation in *E. coli*-BL21(DE3)-Zellen, welche den Vektor pREP4-GroESL enthielten.<sup>[16]</sup>

Ortspezifische Mutagenese: Die HAL-Mutante S143A ist von Langer et al. hergestellt worden.<sup>[8]</sup> Die PAL-Mutante S202A wurde unter Verwendung des QuickChange Site-Directed mutagenesis Kit (Stratagene) hergestellt.<sup>[17]</sup> Die in der Mutagenesereaktion verwendeten Oligonucleotide waren wie folgt: S202A(+): 5'-CATCACTGCTGCCGGC-GACCTGG-3'; S202A(-): 5'-CCAGGTCGCCGGCAGCAGTGATG-3'. Die erfolgte Mutation wurde durch Sequenzanalyse nach der Didesoxynucleotid-Kettenabbruchmethode kontrolliert.<sup>[18]</sup>

Proteinexpression und Reinigung: Sowohl HAL als auch PAL wurden exprimiert und gereinigt wie in Lit. [8, 10, 16] beschrieben.

Enzymtest und Proteinbestimmung: Die Aktivität sowohl von HAL als auch PAL wurde spektrophotometrisch bestimmt.<sup>[19, 20]</sup> Die Proteinkonzentration wurde nach Warburg und Christian<sup>[21]</sup> nach einer Vorschrift von Layne<sup>[22]</sup> gemessen.

Spektroskopische Messungen: Die UV-Differenzspektren wurden bei Enzymkonzentrationen von 1.6, 0.8, 0.4 und 0.2 mg mL<sup>-1</sup> in 10 mM Tris/HCl-Puffer (pH 7.2; Tris = Tris(hydroxymethyl)methylamin) zwischen 240 und 360 nm in einer Quarzküvette mit 1 cm Lichtweg gemessen. Zuerst wurde der Blindwert mit der Mutante ohne 4-Methylidenimidazol-5-on gemessen, gefolgt von Messungen der Wildtyp-Enzyme.

Denaturierung und Pronase-Verdau der Enzyme: 30 mg Enzym wurden 15 h gegen 100 mM Tris/HCl-Puffer (pH 7.5) dialysiert und danach mit 6 M Harnstoff und 0.5 % Natriumdodecylsulfat (SDS) in 10 min bei 100 °C denaturiert. Das denaturierte Enzym wurde anschließend zur Entfernung des Harnstoffes gegen 100 mM Tris-HCl-Puffer (pH 7.5) dem 10 mM CaCl<sub>2</sub> zugesetzt wurde, dialysiert, gefolgt durch Konzentrierung zu 1.5 mL via Ultrafiltration in einer 10 kDa Konzentrationsereinheit (Millipore). Nach Zugabe von 4 mg Pronase (Roche Diagnostics) wurde die Mischung 48 h bei 37 °C inkubiert. Anschließend wurde die Pronase durch Ultrafiltration entfernt.

Trennung des Pronase-Verdau durch HPLC: Der Pronase-Verdau wurde durch HPLC unter Verwendung eines Hewlett-Packard-Ti-Series-Liquid-Chromatography-Systems aufgetrennt. Die Mischung wurde auf eine mit Lösung A (bidestilliertes H<sub>2</sub>O mit 0.1 % TFA) äquilibrierte präparative Umkehrphasen-Nucleosil-100-C18-Säule (Macherey-Nagel) aufgetragen. Nach 10 min Waschen mit Lösung A wurde die Elution bei einem Fluss von 5 mL min<sup>-1</sup> mit einem Gradienten zunehmender Konzentration an Lösung B (CH<sub>3</sub>CN mit 0.1 % TFA) in einem Zeitraum von 90 min durchgeführt (0–30 % B). Die Absorption des Eluates wurde gleichzeitig bei 215, 315 und 340 nm bestimmt. Mit einem Dioden-Array-Detektor wurde von jedem Peak das UV-Spektrum aufgenommen.

Eingegangen am 17. Dezember 1999 [Z14414]

[1] Übersicht: J. Rétey, *Naturwissenschaften* **1996**, 83, 439–447.

[2] H. Tabor, A. H. Mehler, O. Hayaishi, J. White, *J. Biol. Chem.* **1952**, 196, 121–127.

[3] V. H. Auerbach, H. A. Waisman, *J. Biol. Chem.* **1959**, 234, 304–306.

- [4] R. G. Taylor, H. L. Levy, R. R. McInnes, *Mol. Biol. Med.* **1991**, 8, 101–116.  
 [5] R. B. Wickner, *J. Biol. Chem.* **1969**, 244, 6550–6552.  
 [6] J. L. Givot, T. A. Smith, R. H. Abeles, *J. Biol. Chem.* **1969**, 244, 6341–6353.  
 [7] K. R. Hanson, E. A. Havir, *Arch. Biochem. Biophys.* **1970**, 141, 1–17.  
 [8] M. Langer, G. Reck, J. Reed, J. Rétey, *Biochemistry* **1994**, 33, 6462–6467.  
 [9] M. Langer, A. Lieber, J. Rétey, *Biochemistry* **1994**, 33, 14034–14038.  
 [10] B. Schuster, J. Rétey, *FEBS Lett.* **1994**, 349, 252–254.  
 [11] T. F. Schwede, J. Rétey, G. E. Schulz, *Biochemistry* **1999**, 38, 5355–5361.  
 [12] C. B. Klee, *J. Biol. Chem.* **1970**, 245, 3143–3152.  
 [13] a) D. Merkel, J. Rétey, *Helv. Chim. Acta* **2000**, 83, 1151–1160; b) F. Campagna, A. Carotti, G. J. Casini, *Heterocycl. Chem.* **1990**, 27, 1973–1977.  
 [14] M. Langer, A. Pauling, J. Rétey, *Angew. Chem.* **1995**, 107, 1585–1587; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1995**, 34, 1464–1465.  
 [15] B. Schuster, J. Rétey, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1995**, 92, 8433–8437.  
 [16] M. Baedeker, G. E. Schulz, *FEBS Lett.* **1999**, 457, 57–60.  
 [17] C. Papworth, J. Braman, D. A. Wright, *Strategies* **1996**, 9, 3–4.  
 [18] F. Sanger, S. Nicklen, A. Coulson, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1977**, 78, 177–181.  
 [19] A. H. Mehler, H. Tabor, *J. Biol. Chem.* **1953**, 201, 775–784.  
 [20] A. Zimmermann, K. Hahlbrock, *Arch. Biochem. Biophys.* **1975**, 166, 54–62.  
 [21] O. Warburg, W. Christian, *Biochem. Z.* **1942**, 310, 384–421.  
 [22] E. Layne, *Methods Enzymol.* **1957**, 3, 447–454.

## Halogen-Magnesium-Austausch mit Trialkylmagnesaten zur Herstellung von Aryl- und Alkenylmagnesium-Reagentien\*\*

Kazuya Kitagawa, Atsushi Inoue, Hiroshi Shinokubo und Koichiro Oshima\*

Metallorganische  $\sigma$ -Komplexe wie  $R_2CuLi$ ,  $R_3ZnLi$  oder  $R_4AlLi$  sind beliebte Reagentien in der organischen Synthese und in zahllosen Arbeiten hat man sich mit der Entwicklung neuer Methoden unter Verwendung von  $\sigma$ -Komplexen beschäftigt. Neuerdings wurden auch mehrere Synthesemethoden beschrieben, in denen  $R_3MnLi$  eingesetzt wird.<sup>[1]</sup> Es ist bekannt, dass diese  $\sigma$ -Komplexe in einigen Fällen einen Halogen-Metall-Austausch induzieren.<sup>[2]</sup>

Knochel et al. haben kürzlich gezeigt, dass polyfunktionelle Aryl- und Alkenylmagnesium-Reagentien über einen Iod-Magnesium-Austausch mit  $RMgX$  hergestellt werden können.<sup>[3, 4]</sup> Uns schien, dass für einen solchen Halogen-Magnesium-Austausch ein Magnesium- $\sigma$ -Komplex ( $R_3MgLi$ )<sup>[5]</sup> besser geeignet sein könnte als ein Alkylmagnesiumhalogenid ( $RMgX$ ). Tatsächlich liefert die Umsetzung von Arylhalogeniden oder Alkenyliodiden mit Trialkylmagnesaten, die aus  $RMgX$  und zwei Äquivalenten Alkylolithium gebildet worden waren, die entsprechenden Organomagnesiumreagentien in

guten bis hervorragenden Ausbeuten. Die entsprechenden Ergebnisse sind in Tabelle 1 gezeigt.<sup>[6]</sup> Mehrere Eigenschaften der Reaktion sind bemerkenswert. So können nicht nur Aryliodide, sondern auch Arylbromide<sup>[7]</sup> effizient in die entsprechenden Magnesiumreagentien überführt werden.

Tabelle 1. Herstellung von Arylmagnesaten und deren Reaktion mit Elektrophilen.

| Nr. | ArX | Bedingungen <sup>[a]</sup><br>Rea- T [°C] t [h]<br>gens | Elektrophil                                | Produkt | Ausb.<br>[%] |
|-----|-----|---|--|---------|--------------|
| 1   |     | A 0 0.5   | $n\text{-C}_6\text{H}_{13}\text{CHO}$      |         | 80           |
| 2   |     | A 0 0.5   | $\text{CH}_2=\text{CHCH}_2\text{Br}$       |         | 87           |
| 3   |     | A -78 0.5   | PhCHO                                      |         | 93           |
| 4   |     | A -78 1   | $n\text{-C}_6\text{H}_{13}\text{CHO}$      |         | 60           |
| 5   |     | A 0 0.5   | $\text{CH}_2=\text{CHCH}_2\text{Br}$       |         | 73           |
| 6   |     | A 0 0.5   | $\text{C}_2\text{H}_5\text{CHO}$           |         | 87           |
| 7   |     | A 0 0.5   | $\text{CH}_2=\text{CHCH}_2\text{Br}$       |         | 84           |
| 8   |     | A 0 0.5   | $\text{C}_2\text{H}_5\text{CHO}$           |         | 94           |
| 9   |     | A 0 0.5   | $\text{CH}_2=\text{CHCH}_2\text{Br}$       |         | 97           |
| 10  |     | B 0 0.5   | $\text{C}_2\text{H}_5\text{CHO}$           |         | 78           |
| 11  |     | A -78 1   | $n\text{-C}_6\text{H}_{13}\text{CHO}$      |         | 50           |
| 12  |     | B -78 1   | $n\text{-C}_6\text{H}_{13}\text{CHO}$      |         | 71           |
| 13  |     | B -78 1   | $\text{CH}_2=\text{CHCH}_2\text{Br}^{[b]}$ |         | 99           |
| 14  |     | B -78 1   | $n\text{-C}_6\text{H}_{13}\text{CHO}$      |         | 60           |
| 15  |     | B -78 1   | $\text{CH}_2=\text{CHCH}_2\text{Br}^{[b]}$ |         | 87           |
| 16  |     | B -78 1   | $\text{CH}_2=\text{CHCH}_2\text{Br}^{[b]}$ |         | 79           |

[a] Reagents A:  $n\text{Bu}_3\text{MgLi}$ , Reagents B:  $i\text{PrBu}_2\text{MgLi}$ . [b] In Gegenwart von  $\text{CuCN} \cdot 2\text{LiCl}$ .

\* Prof. Dr. K. Oshima, K. Kitagawa, A. Inoue, Dr. H. Shinokubo  
 Department of Material Chemistry  
 Graduate School of Engineering, Kyoto University  
 Kyoto 606–8501 (Japan)  
 Fax: (+81) 75-753-4863  
 E-mail: oshima@fm1.kuic.kyoto-u.ac.jp

\*\* Diese Arbeit wurde durch einen Grant-in-Aid for Scientific Research vom japanischen Ministerium für Bildung, Wissenschaft, Sport und Kultur unterstützt.