

dadurch nicht von heute auf morgen revolutioniert werden, doch ist ausgehend von dieser Arbeit von Yokozawa und Suzuki mit vielfältigen neuen Impulsen zu rechnen.

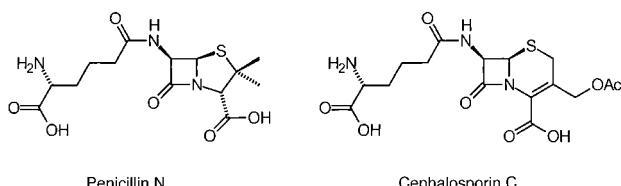
- [1] A. Echte, *Handbuch der Technischen Polymerchemie*, VCH, Weinheim, 1993.
  - [2] D. A. Tomalia, A. M. Taylor, W. A. Goddard III, *Angew. Chem.* **1990**, *2*, 119–238; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1990**, *29*, 138; M. Fischer, F. Vöggle, *Angew. Chem.* **1999**, *111*, 934–955; *Angew. Chem. Int. Ed.* **1999**, *38*, 884–905, zit. Lit.
  - [3] Siehe beispielsweise H.-H. Brinzingier, D. Fischer, R. Mülhaupt, B. Rieger, R. Waymouth, *Angew. Chem.* **1995**, *107*, 1255; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1995**, *34*, 1143.

- [4] Siehe beispielsweise D. Colombani, *Prog. Polym. Sci.* **1997**, 22, 1649; E. E. Malmström, C. J. Hawker, *Macromol. Chem. Phys.* **1998**, 199, 923; T. E. Patten, K. Matyjaszewski, *Adv. Mater.* **1998**, 10, 901, zit. Lit.
  - [5] T. Yokozawa, H. Suzuki, *J. Am. Chem. Soc.* **1999**, 121, 11573.
  - [6] I. Mita, R. F. T. Stepto, U. W. Suter, *Pure Appl. Chem.* **1994**, 66, 2483.
  - [7] R. W. Lenz, C. E. Handlovitis, H. A. Smith, *J. Polym. Sci.* **1962**, 58, 351.
  - [8] D. R. Robello, A. Ulman, E. J. Uranka, *Macromolecules* **1993**, 26, 6718.
  - [9] T. Yokozawa, H. Shimura, *J. Polym. Sci. Part A* **1999**, 37, 2607.
  - [10] Siehe beispielsweise L. H. Tagle in *Handbook of Phase Transfer Catalysis* (Hrsg.: Y. Sasson, R. Neuman), Blackie Academic & Professional, London, **1997**, S. 200.

## **Isopenicillin-N-Synthase: ein Enzym bei der Arbeit**

**Wolfdieter A. Schenk\***

Die Entdeckung des Penicillins im Jahr 1929<sup>[1]</sup> hat die Medizin revolutioniert.<sup>[2]</sup> Viele der potentiell tödlichen bakteriellen Infektionen verloren ihre Schrecken als lebensbedrohende Krankheiten – eine Situation, die sich bald wieder ändern könnte.<sup>[3]</sup> Die Penicilline (Schema 1) waren die ersten



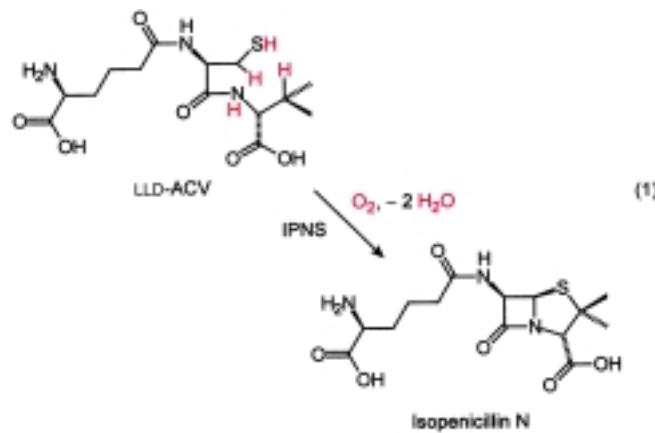
Schema 1. Struktur jeweils eines typischen Penicillins und eines typischen Cephalosporins. Ac = Acetyl.

Antibiotika, und lange Zeit wurde der Begriff „Penicillin“ in der Öffentlichkeit als Synonym für „Antibiotikum“ verwendet.

Weitere Meilensteine wurden mit der Strukturbestimmung des Penicillins<sup>[4]</sup> und der ersten Totalsynthese eines natürlich vorkommenden Penicillins gesetzt.<sup>[5]</sup> Die Laborsynthese des Penicillins erwies sich wegen seiner bicyclischen Struktur, die den  $\beta$ -Lactamring besonders labil macht, als erhebliche Herausforderung.<sup>[6]</sup> Es ist daher nicht verwunderlich, dass die Frage „Wie macht es die Natur?“ das Augenmerk der Wissenschaftler anzog.

Die ersten Hinweise wurden aus zumeist recht indirekten Informationen erhalten.<sup>[7]</sup> Die unmittelbare Vorstufe, das

lineare Tripeptid L- $\alpha$ -Aminoadipoyl-L-cysteinyl-D-valin (LLD-ACV), wird zunächst aus seinen Aminosäurebausteinen mit Hilfe des Enzyms ACV-Synthase zusammengesetzt, das auch die nötige Epimerisierung des Valins vermittelt. Der Schlusselschritt, die stöchiometrisch einfache oxidative Cyclisierung [Gl. (1)], wird von einem einzigen Nicht-Häm-Eisenenzym



bewerkstelligt, das als Isopenicillin-N-Synthase (IPNS) bezeichnet wird. Weitere Enzyme sind dann für die Epimerisierung von Isopenicillin N (IPN) zu Penicillin N, die Derivatisierung zu anderen Penicillinen sowie die Ringerweiterung, die schließlich zu den verschiedenen Cephalosporinen führt, verantwortlich.

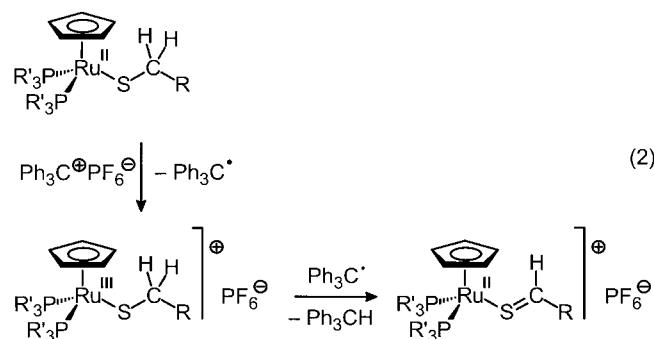
Trotz einiger Anstrengungen hat man nie irgendwelche enzymfreien Intermediate dieser Reaktion gefunden. Dies spricht dafür, dass beide Ringe innerhalb des gleichen Enzym-Substrat-Komplexes gebildet werden. Versuche mit modifizierten Substraten dienten dazu, die Eigenschaften des aktiven Zentrums festzulegen. Eine überraschende Vielfalt

[\*] Prof. Dr. W. A. Schenk  
Institut für Anorganische Chemie  
Universität Würzburg  
Am Hubland, 97074 Würzburg (Deutschland)  
Fax: (+49) 931-888-4605  
E-mail: wolfdieter.schenk@mail.uni-wuerzburg.de

von Variationen sowohl am Aminoacetyl- als auch am Valinende von ACV werden toleriert, was beim Zusammentragen von Informationen zum Mechanismus sehr hilfreich war. Als man beispielsweise das D-Valin durch andere Aminosäuren ersetzte, die Allyl- oder Cyclopropylmethylgruppen als „Radikaluhren“ trugen, traten die typischen Umlagerungsprodukte auf, die darauf hinwiesen, dass ein (möglicherweise in seiner Beweglichkeit eingeschränktes) Isopropylradikal an der Bildung des Thiazolidinrings beteiligt ist.<sup>[8]</sup> Der L-Aminoacetylterminus kann durch eine Reihe von unpolaren Substituenten ähnlicher Größe ersetzt werden, die auch nicht notwendigerweise eine Carboxygruppe tragen müssen. Dies ist ein guter Hinweis darauf, dass dieser Teil der Bindungsregion von IPNS unpolar ist, aber eine zur Bildung von Wasserstoffbrücken befähigte Gruppe am Ende der Tasche hat.<sup>[7]</sup> Die zentrale Cysteineinheit kann dagegen nicht verändert werden. Im Hinblick auf die Einschränkungen, die die Bildung des gespannten  $\beta$ -Lactamrings mit sich bringt, ist das auch leicht verständlich.

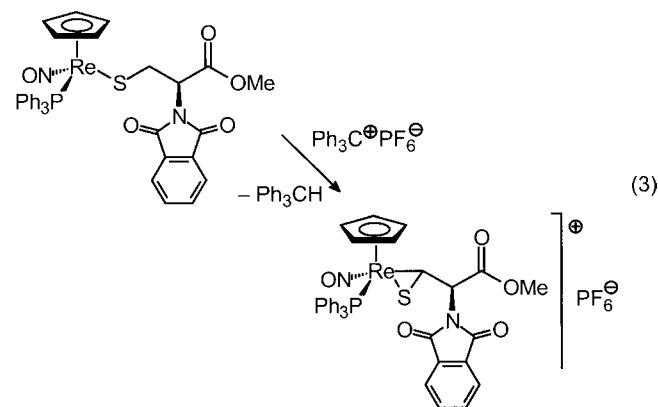
Eine Reihe geschickter geplanter Deuterierungsexperimente ergab weitere Einblicke in mechanistische Details. So wurde beispielsweise ein großer kinetischer Isotopeneffekt gefunden, als man der IPNS ein Gemisch aus in der 3-Position des Cysteins doppelt markiertem ACV und unmarkiertem ACV anbot. Andererseits unterscheidet IPNS nicht zwischen unmarkiertem und in der 3-Position des Valins markiertem ACV. Dies wurde als überzeugender Hinweis darauf gewertet, dass die Bildung des  $\beta$ -Lactamrings geschwindigkeitsbestimmend ist und vor dem Thiazolidin-Ringschluss erfolgt.<sup>[9]</sup> Weiterhin wurde mit dem Einsatz von ACV, das stereospezifisch deuteriertes Cystein enthielt, gezeigt, dass die Sequenz aus Wasserstoff-Abstraktion und Ringschluss unter Retention der Konfiguration abläuft, vielleicht über einen enzymgebundenen Thioaldehyd.<sup>[7a]</sup>

Übergangsmetallkomplexe von Thioaldehyden sind seit 1977 gut bekannt.<sup>[10]</sup> Eine Synthese metallgebundener Thioaldehyde durch Wasserstoff-Abstraktion wurde 1992 publiziert<sup>[11]</sup> [Gl. (2)] und vor kurzem auf eine ganze Reihe



aliphatischer Thioaldehyde übertragen. Darunter ist auch ein Beispiel für einen side-on-koordinierten Thioaldehyd, der sich von Cystein ableitet [Gl. (3)].<sup>[12]</sup>

Diese Reaktionen, die sogar einen ähnlich hohen kinetischen Isotopeneffekt aufweisen,<sup>[11]</sup> kann man als metallorga-

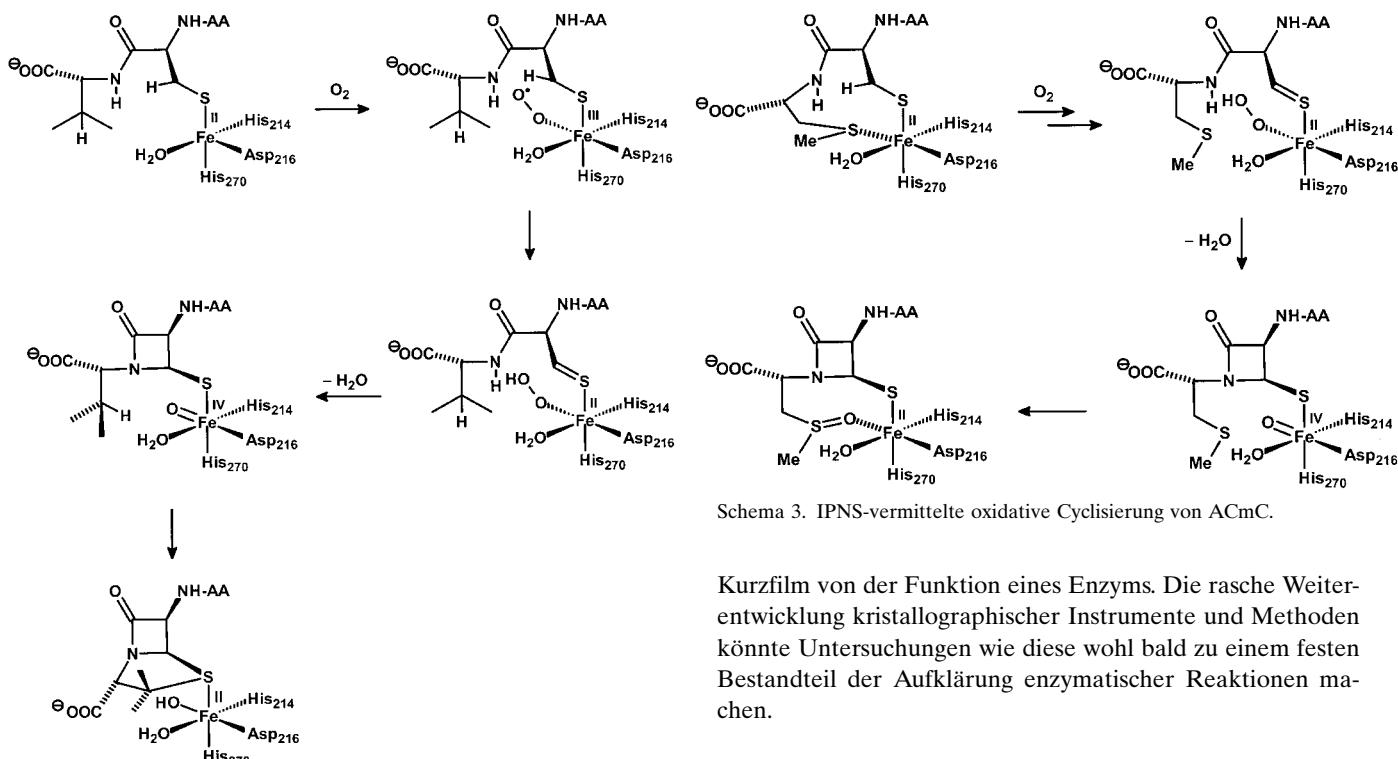


nische Analoga des Wasserstoff-Abstraktionsschrittes der Penicillin-Biosynthese ansehen. Weiterhin ist auch die Addition von Nucleophilen an metallgebundene Thioaldehyde gut dokumentiert,<sup>[13]</sup> was den vorgeschlagenen Mechanismus zusätzlich stützt.

Die erfolgreiche Bestimmung der Struktur von IPNS, wiederum durch die Arbeitsgruppe von Baldwin,<sup>[14]</sup> war ein großer Durchbruch auf diesem Gebiet. Die Kristalle wurden unter anaeroben Bedingungen gezüchtet, sodass dem Enzym der für die Reaktion nötige Sauerstoff fehlte. Mit diesem Trick war es sogar möglich, eine Messung am intakten Enzym-Substrat-Komplex durchzuführen. Darüber hinaus wurde durch Behandlung mit Stickstoffmonoxid der analoge Nitrosylkomplex erhalten, der als ein unreaktives Strukturmodell des O<sub>2</sub>-Additionsprodukts gelten kann. In beiden Fällen sind die Carboxylatgruppen an den Enden des ACV über Wasserstoffbrücken mit dem umgebenden Protein verankert. Dadurch wird das Substrat in eine gestreckte und den  $\beta$ -Lactam-Ringschluss begünstigende Konformation gebracht.

Aufbauend auf diesen reichhaltigen Informationen konnte ein detaillierter Mechanismus der Wirkung von IPNS formuliert werden (Schema 2). Nach Bindung des Substrats ACV über die deprotonierte Thiolgruppe des Cysteins nimmt das Eisen unter Wechsel der Oxidationsstufe ein Molekül Disauerstoff auf. Intramolekularer Transfer eines Wasserstoffatoms von C-3 der Cysteineinheit bringt das Eisen zurück zur Oxidationsstufe +II und erzeugt einen Thioaldehyd- und einen Hydroperoxyliganden. Letzterer deprotoniert die Amidfunktion, die dann durch nucleophilen Angriff am Thioaldehyd-Kohlenstoffatom den  $\beta$ -Lactamring schließt. Damit kommt auch das Wasserstoffatom an C-3 des Valins in nähere Nachbarschaft zum hoch elektrophilen Eisen(IV)-Oxoliganden. Ein weiterer Wasserstofftransfer folgt, der wahrscheinlich zur Bildung eines Isopropylradikals führt, das dann das Thiolat-Schwefelatom angreift und damit auch den Thiazolidinring schließt.

Diese eigentlich schon schlüssige Arbeit wurde jetzt, wiederum durch Baldwins Arbeitsgruppe, durch eine Reihe von Experimenten gekrönt, dank derer IPNS nun eines der am besten verstandenen Enzyme ist.<sup>[15]</sup> Ein Kristall des IPNS-ACV-Komplexes wurde 320 min mit 4 MPa Disauerstoff behandelt und danach die Struktur des Komplexes bestimmt. Es stellte sich heraus, dass das Substrat ACV dadurch in das Produkt IPN überführt worden war, das aber an das aktive



Schema 2. Mechanismus der Biosynthese von Isopenicillin N. AA = Aminoacidoyl.

Zentrum gebunden blieb (eine gewisse Restelektronendichte wies darauf hin, dass unter diesen Bedingungen etwa 30 % des Substrats unverändert bleiben). In einer anderen Versuchsreihe wurde IPNS mit dem modifizierten Substrat ACmC, bei dem Valin durch S-Methylcystein ersetzt worden war, komplexiert. Die Struktur des aktiven Zentrums von IPNS-ACmC ist der von IPNS-ACV sehr ähnlich, lediglich die S-Methylgruppe besetzt jetzt die sechste Koordinationsstelle am Eisen. Behandeln dieses Kristalls mit Disauerstoff (2 MPa, 10 min) ergab ein monocyclisches  $\beta$ -Lactamprodukt, das an das aktive Zentrum über das Cystein-Schwefelatom und eine Methylsulfenylgruppe gebunden ist. Letztere dürfte aus einer Ablösung an der vermuteten Fe<sup>IV</sup>-oxo-Zwischenstufe entstanden sein (Schema 3).

Diese Spezies ist ein gutes Modell für das monocyclische  $\beta$ -Lactam-Zwischenprodukt bei der IPN-Synthese, dessen kurzzeitige Existenz schon zuvor vermutet worden war (siehe oben). Abbildung 1 zeigt eine Überlagerung der vier Strukturen. Besonders bemerkenswert ist die Dehnung der Fe-S-Bindung im Endprodukt, die die Ablösung des IPN vom aktiven Zentrum vorwegnimmt.

Mit dem oxidierten ACmC als Modell für das  $\beta$ -Lactam-Intermediate erstellt diese Serie von Strukturen gewissermaßen einen detaillierten

Schema 3. IPNS-vermittelte oxidative Cyclisierung von ACmC.

Kurzfilm von der Funktion eines Enzyms. Die rasche Weiterentwicklung kristallographischer Instrumente und Methoden könnte Untersuchungen wie diese wohl bald zu einem festen Bestandteil der Aufklärung enzymatischer Reaktionen machen.

- [1] A. Fleming, *Brit. J. Exp. Path.* **1929**, *10*, 226.
- [2] E. Chain, H. W. Florey, A. D. Gardner, N. G. Heatley, M. A. Jennings, J. Orr-Ewing, A. G. Sanders, *Lancet* **1940**, 226–228.
- [3] D. Niccolai, L. Tarsi, R. J. Thomas, *Chem. Commun.* **1997**, 2333–2342.
- [4] D. Crowfoot, C. W. Bunn, B. W. Rogers-Low, A. Turner-Jones in *The Chemistry of Penicillin* (Hrsg.: H. T. Clarke, J. R. Johnson, R. Robinson), Princeton University Press, Princeton, **1949**, Kap. 11.
- [5] a) J. C. Sheehan, K. R. Henery-Logan, *J. Am. Chem. Soc.* **1957**, *79*, 1262–1263; b) J. C. Sheehan, K. R. Henery-Logan, *J. Am. Chem. Soc.* **1959**, *81*, 3089–3094.
- [6] K. C. Nicolaou, E. J. Sorenson, *Classics in Total Synthesis*, VCH, Weinheim, **1996**, Kap. 3.
- [7] a) J. E. Baldwin, M. Bradley, *Chem. Rev.* **1990**, *90*, 1079–1088; b) J. E. Baldwin, C. J. Schofield in *The Chemistry of  $\beta$ -lactams* (Hrsg.: M. I. Page), Chapman and Hall, London, **1992**, Kap. 1.
- [8] a) J. E. Baldwin, R. M. Adlington, B. P. Domayne-Hayman, G. Knight, H.-H. Ting, *J. Chem. Soc. Chem. Commun.* **1987**, 1661–

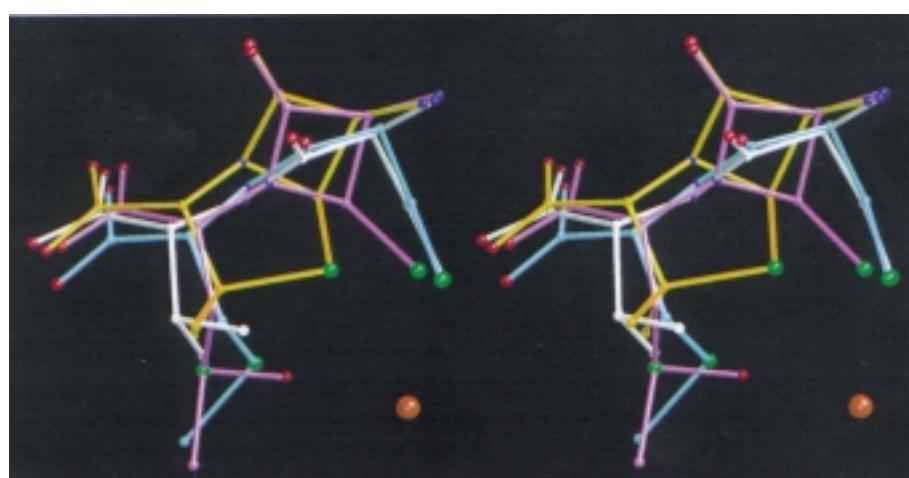


Abbildung 1. Stereoskopische Ansicht überlagerter Strukturen des aktiven Zentrums von IPNS, komplexiert mit ACV (weiß), ACmC (blau), oxidiertem ACmC (pink) und IPN (gelb). Wiedergegeben mit freundlicher Genehmigung von *Nature* (*Nature* **1999**, *401*, 721–724), © 1999, Macmillan Magazines Ltd.

- 1663; b) J. E. Baldwin, M. Bradley, N. J. Turner, R. M. Adlington, A. R. Pitt, H. Sheridan, *Tetrahedron* **1991**, *47*, 8203–8222; c) J. E. Baldwin, M. Bradley, N. J. Turner, R. M. Adlington, A. R. Pitt, A. E. Derome, *Tetrahedron* **1991**, *47*, 8223–8242.
- [9] J. E. Baldwin, R. M. Adlington, S. E. Moroney, L. D. Field, H.-H. Ting, *J. Chem. Soc. Chem. Commun.* **1984**, 984–986.
- [10] a) T. J. Collins, W. R. Roper, *J. Chem. Soc. Chem. Commun.* **1977**, 901–902; b) R. G. W. Gingerich, R. J. Angelici, *J. Am. Chem. Soc.* **1979**, *101*, 5604–5608; c) R. D. Adams, N. M. Golembeski, J. P. Selegue, *Organometallics* **1982**, *1*, 240–245; d) M. Herberhold, W. Ehrenreich, W. Bühlmeier, *Angew. Chem.* **1983**, *95*, 332–333; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1983**, *22*, 315–316; e) W. Paul, H. Werner, *Angew. Chem.* **1983**, *95*, 333–334; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1983**, *22*, 316–317; f) W. E. Buhro, A. T. Patton, C. E. Strouse, J. A. Gladysz, F. B. McCormick, M. C. Etter, *J. Am. Chem. Soc.* **1983**, *105*, 1056–1058.
- [11] a) W. A. Schenk, T. Stur, E. Dombrowski, *Inorg. Chem.* **1992**, *31*, 723–727; b) W. A. Schenk, T. Stur, E. Dombrowski, *J. Organomet. Chem.* **1994**, *472*, 257–273.
- [12] N. Burzlaff, W. A. Schenk, *Eur. J. Inorg. Chem.* **1999**, 1435–1443.
- [13] H. Fischer, R. Stumpf, G. Roth, *Adv. Organomet. Chem.* **1999**, *43*, 125–196.
- [14] P. L. Roach, I. J. Clifton, C. M. H. Hensgens, N. Shibata, C. J. Shofield, J. Hajdu, J. E. Baldwin, *Nature* **1997**, *387*, 827–830.
- [15] N. I. Burzlaff, P. J. Rutledge, I. J. Clifton, C. M. H. Hensgens, M. Pickford, R. M. Adlington, P. L. Roach, J. E. Baldwin, *Nature* **1999**, *401*, 721–724.

+++ ANGEWANDTE CHEMIE – A TRULY INTERNATIONAL JOURNAL +++

# ANGEWANDTE CHEMIE

Meet Angewandte Readers all over the world

Angewandte Chemie finds its authors, readers, and subscribers from all parts of the world.

Where do the authors come from?

Region	Percentage
Western Europe	47%
USA/Canada	22%
Japan	15%
Asia	10%
Australia/NZ	2%
Others	3%
Eastern Europe	1%

Join the world of Angewandte authors!  
Submit your best research results to this international top journal.

Where do the readers/subscribers come from?

Region	Percentage
USA/Canada	35%
Western Europe	37%
Japan	17%
Asia	4%
Australia/NZ	2%
Others	2%
Eastern Europe	2%

Join the world of Angewandte subscribers today! Order your subscription now with the Order Form on the last page of this issue.

WILEY-VCH, P.O. Box 10 11 61, 69451 Weinheim, Germany  
Phone +49 (6201) 606-328, Fax +49 (6201) 606-348  
e-mail: sales-journals@wiley-vch.de, <http://www.wiley-vch.de>

**WILEY-VCH**

ANGEWANDTE CHEMIE  
INTERNATIONAL EDITION  
1999  
38/17