

- [7] a) D. C. Dalgarno, M. C. Botfield, R. J. Rickles, *Biopolymers* **1997**, *43*, 383–400; b) J. E. Ladbury, S. Arold, *Chem. Biol.* **2000**, *7*, R3–R8.
- [8] M. Lewitzky, C. Kardinal, N. H. Gehring, E. K. Schmidt, B. Konkol, M. Eulitz, W. Birchmeier, U. Schaeper, S. Feller, *Oncogene* **2001**, im Druck.
- [9] a) A. P. Combs, T. M. Kapoor, S. Feng, J. K. Chen, L. F. Daude-Snow, S. L. Schreiber, *J. Am. Chem. Soc.* **1996**, *118*, 287–288; b) T. M. Kapoor, A. Hamilton, Andreotti, S. L. Schreiber, *J. Am. Chem. Soc.* **1998**, *120*, 23–29; c) J. P. Morken, T. M. Kapoor, S. Feng, F. Shirai, S. L. Schreiber, *J. Am. Chem. Soc.* **1998**, *120*, 30–36.
- [10] a) C. Cheadle, Y. Ivaschenko, V. South, G. H. Sealoss, S. French, R. Howk, G. A. Ricca, M. Jaye, *J. Biol. Chem.* **1994**, *269*, 24034–24039; b) A. B. Sparks, L. A. Quilliam, J. M. Thorn, C. J. Der, B. K. Kay, *J. Biol. Chem.* **1994**, *269*, 23853–23856; c) R. J. Rickles, M. C. Botfield, X. M. Zhou, P. A. Henry, J. S. Brugge, M. J. Zoller, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1995**, *92*, 10909–10913.
- [11] a) T. Wöhr, F. Wahl, A. Nefzi, B. Rohwedder, T. Sato, X. Sun, M. Mutter, *J. Am. Chem. Soc.* **1996**, *118*, 9218–9227; b) M. Mutter, T. Wöhr, S. Gioria, M. Keller, *Biopolymers* **1999**, *51*, 121–128; c) A. Wittelsberger, M. Keller, L. Scarpellino, L. Patiny, H. Acha-Orbea, M. Mutter, *Angew. Chem.* **2000**, *112*, 1153–1156; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2000**, *39*, 1111–1115.
- [12] X. Wu, B. Knudsen, S. M. Feller, J. Zheng, A. Sali, D. Cowburn, H. Hanafusa, J. Kuriyan, *Structure* **1995**, *3*, 215.
- [13] D. Bowtell, P. Fu, M. Simon, P. Senior, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1992**, *89*, 6511–6515; P. Chardin, J. H. Camonis, N. W. Gale, L. Van Aelst, M. H. Wigler, D. Bar-Sagi, *Science* **1993**, *60*, 1338–1343; M. Rozakis-Adcock, R. Fernley, J. Wade, T. Pawson, D. Bowtell, *Nature* **1993**, *363*, 83–85.
- [14] Die molekulärmechanischen Rechnungen wurden mit dem Programm-paket INSIGHTII durchgeführt (Version 97, Molecular Simulations, **1997**), die Energieminimierungen und Moleküldynamiksimulationen auf einer Silicon-Graphics-OCTANE-Workstation mit dem Programm CVFF/FDISCOVER (Version 97, Molecular Simulations, **1997**). Bei den Simulationen wurden ein Cutoff-Abstand von 2 Å, Zeitschritte von 1 fs und eine abstandsabhängige Dielektrizitätskonstante ϵ von $4.00 \cdot r$ (r = Abstand) verwendet. Die Ausgangskoordinaten des Proteinrückgrats der Grb-2-N-terminalen SH3-Domäne wurden festgehalten. Eine implizite Behandlung der Solvatation und Restraints erlaubte längere MD-Simulationen innerhalb eines geeigneten Zeitraums. Nach 5000 Minimierungsschritten nach dem Kriterium maximaler Energieabnahme wurde das System nach dem implementierten Standardverfahren FDISCOVER auf 298 K gebracht. Nach einer Initialisierungszeit von 10 ps wurde der Simulationslauf noch 1 ns fortgesetzt. Gemittelte Strukturen wurden aus den 50 ps der Simulation erhalten und in 500 Schritten nach dem Kriterium maximaler Energieabnahme weiter minimiert, es folgte eine Conjugate-gradient-Minimierung bis zu einem mittleren (rms) Gradienten von $< 0.01 \text{ kcal mol}^{-1} \text{ Å}^{-1}$. Nach diesem Verfahren wurde der Peptidligand Val-Pro-Ser(Ψ pro^{Ph,H})-Pro-Val-Ser(Ψ pro^{Ph,H})-Pro-Arg-Arg-Arg mit Val-Pro-Pro-Pro-Val-Pro-Pro-Arg-Arg-Arg, der decameren nativen SoS-Peptidsequenz 3gbq, verglichen.^[21] Fluktuationen wurden für die letzten 500 ps der Simulation analysiert.
- [15] M. Keller, M. Mutter, C. Lehmann, M. Mutter, *Synlett* **1999**, *S1*, 935–939; M. Keller, C. Lehmann, M. Mutter, *Tetrahedron* **1999**, *55*, 413–422.
- [16] J. M. Stewart, J. D. Young, *Solid Phase Peptide Synthesis*, 2. Aufl., Pierce Chemical, Rockford, IL, **1984**.
- [17] E. Klein, H. Ben-Bassat, H. Neumann, P. Ralph, J. Zeuthen, A. Polliack, F. Vanký, *Int. J. Cancer* **1976**, *18*, 421–431.
- [18] G. Posern, J. Zheng, B. S. Knudsen, C. Kardinal, K. B. Muller, J. Voss, T. Shishido, D. Cowburn, G. Cheng, B. Wang, G. D. Kruh, S. K. Burell, C. A. Jacobson, D. M. Lenz, T. J. Zamborelli, K. Adermann, H. Hanafusa, S. M. Feller, *Oncogene* **1998**, *16*, 1903–1912.
- [19] J. M. Word, S. C. Lovell, T. H. LaBean, H. C. Taylor, M. E. Zalis, B. K. Presley, J. S. Richardson, D. C. Richardson, *J. Mol. Biol.* **1999**, *285*, 1711–1733.
- [20] P. Sieber, *Tetrahedron Lett.* **1987**, *28*, 2107.
- [21] M. Wittekind, C. Mapelli, V. Lee, V. Goldfarb, M. S. Friedrichs, C. A. Meyers, L. Müller, *J. Mol. Biol.* **1997**, *267*, 933–952.

Durch Überexpression in der Hefe *Pichia pastoris* zu erhöhter Enantioselektivität: neue Aspekte bei der Anwendung von Schweineleber-Esterase**

Anna Musidowska, Stefan Lange und
Uwe T. Bornscheuer*

Professor Günter Schmidt-Kastner
zum 75. Geburtstag gewidmet

Lipasen und Esterasen lassen sich als effiziente Biokatalysatoren zur Herstellung einer Vielzahl optisch aktiver Verbindungen einsetzen.^[1] Während jedoch eine ganze Reihe von Lipasen – insbesondere mikrobiellen Ursprungs – kommerziell erhältlich ist, gibt es nur sehr wenige Esterasen, die für den Einsatz in einer Racematspaltung oder Desymmetrisierung zur Verfügung stehen. In der Mehrzahl der Publikationen wird Schweineleber-Esterase^[2] (PLE, *pig liver esterase*) verwendet. Obwohl gezeigt werden konnte, dass mit dieser Präparation eine Vielzahl von Verbindungen mit teilweise sehr hoher Stereoselektivität umgesetzt werden kann, ist dessen Verwendung doch mit einer Reihe von Nachteilen verbunden. Neben einer Variation des Esteraseanteils zwischen verschiedenen Chargen ist insbesondere die Anwesenheit weiterer Hydrolasen als problematisch bezüglich der Selektivität anzusehen.^[3] Außerdem liegt Schweineleber-Esterase in Form mehrerer Isoenzyme vor,^[4] die sich teilweise erheblich in ihrer Substratspezifität unterscheiden. So gelang es nach elektrophoretischer Trennung durch isoelektrische Fokussierung, Fraktionen zu isolieren, die unter anderem bevorzugt Butyrylcholin (ähnlich der Butyrylcholin-Esterase), Prolin- β -Naphthylamid und Methylbutyrat spalten.^[5a,b] Öhrner und Mitarbeiter^[5c] fanden nicht nur einen Einfluss der Kettenlänge von *p*-Nitrophenylestern auf die Aktivität verschiedener PLE-Fraktionen, sondern auch eine deutliche Änderung der Enantioselektivität bei der Hydrolyse pro-stereogener Substrate. Im Gegensatz hierzu berichteten Jones und Mitarbeiter, dass verschiedene Isoenzyme nahezu keine Unterschiede in der stereoselektiven Hydrolyse mehrerer monocyclischer und acyclischer Diester zeigten. Lediglich Unterschiede in der Aktivität wurden festgestellt.^[6]

Die Herstellung von Enzymen in gleich bleibender und definierter Zusammensetzung lässt sich durch Überexpression der kodierenden Gene in geeigneten Wirtorganismen wie *Escherichia coli*, *Pichia pastoris* oder *Aspergillus oryzae*

[*] Prof. Dr. U. T. Bornscheuer, A. Musidowska
Institut für Chemie und Biochemie

AK Technische Chemie & Biotechnologie

Universität Greifswald

Soldmannstraße 16, 17487 Greifswald (Deutschland)

Fax: (+49) 3834-86-4373

E-mail: bornsche@mail.uni-greifswald.de

S. Lange

Institut für Technische Biochemie

Universität Stuttgart (Deutschland)

[**] Wir danken der Konrad-Adenauer-Stiftung (St. Augustin) für die Gewährung eines Stipendiums für A.M., Prof. R. D. Schmid (Institut für Technische Biochemie, Universität Stuttgart) für seine Unterstützung und Diskussionsbereitschaft und A. Gollin für die Synthesen der Acetate.

erreichen. Tatsächlich werden so bereits mehrere Esterasen^[7] und Lipasen^[8] produziert. Die Klonierung putativer Schweineleber-Esterase-Gene wurde bereits beschrieben: So klonierten Takahashi und Mitarbeiter^[9] das Gen einer Prolin- β -naphthyl-Amidase aus Schweineleber. Später konnte von dieser^[10] und Heymanns^[11] Arbeitsgruppe gezeigt werden, dass es sich hier mit großer Wahrscheinlichkeit jedoch um Schweineleber-Esterase handelt. Gleiches gilt für eine Glycerinester-Hydrolase,^[12] deren Sequenz sich nur durch 16 Aminosäuren von der von Takahashi beschriebenen unterscheidet. Die funktionelle Expression von aktivem Enzym wurde jedoch von keiner der Arbeitsgruppen beschrieben.

Uns ist es nun erstmals gelungen, PLE aktiv durch Überexpression in der Hefe *Pichia pastoris* herzustellen.^[13] Somit können wir nun rekombinante PLE (rPLE) in gleich bleibender Produktqualität ohne störende Einflüsse weiterer Isoenzyme und anderer Hydrolasen herstellen. Die rPLE zeigt nahezu identische pH- und Temperaturprofile^[13] und ein ähnliches Substratspektrum bei der Hydrolyse einfacher (achiraler) Ester und Triacylglyceride wie nichtrekombinante PLE (Abbildung 1). Hervorzuheben ist aber, dass nur rPLE

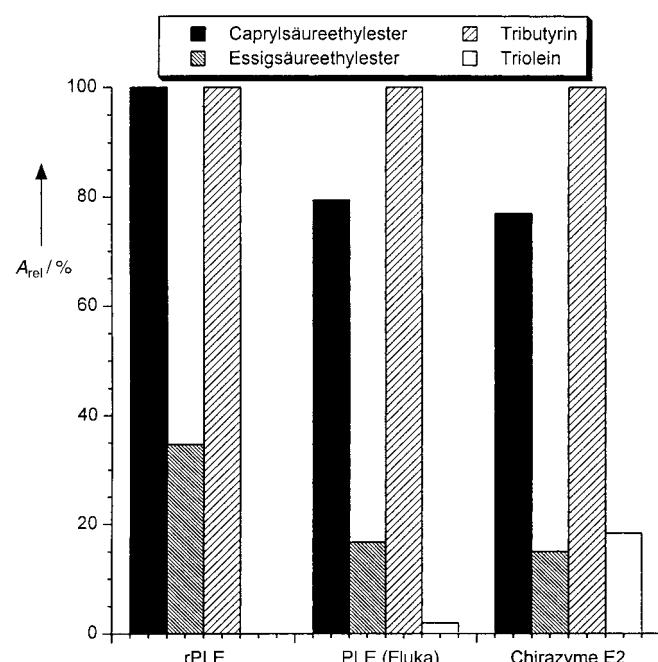


Abbildung 1. Vergleich der hydrolytischen Aktivität (A_{rel}) von rekombinanter PLE (rPLE) mit der von kommerziellen Präparaten von Fluka und Roche Diagnostics (Chirazyme E-2) gegenüber verschiedenen achiralen Estern.

kein Triolein spaltet, welches ein typisches Lipasesubstrat ist. Dies belegt die Verunreinigung kommerzieller Präparate durch andere Hydrolasen. Neben der biochemischen Charakterisierung des rekombinanten Proteins^[13] war für uns jedoch vor allem die Enantioselektivität der rPLE bei der Umsetzung chiraler Substrate im Vergleich zu kommerziellen Präparaten^[14] von Interesse, da dies das mit Abstand wichtigste Einsatzgebiet der PLE darstellt.

Während bei PLE-katalysierten Racematspaltungen von (*R,S*)-(1-Phenylethyl)acetat **1** in allen Fällen ähnliche Enan-

tioselektivitäten^[15] zwischen $E = 5.7$ und 7.9 ermittelt wurden (Tabelle 1), beobachteten wir jedoch bei der Hydrolyse von (*R,S*)-(1-Phenyl-2-propyl)acetat **2** (Tabelle 2) bzw. (*R,S*)-(1-Phenyl-2-butyl)acetat **3** (Tabelle 3) deutlich höhere Enantio-

Tabelle 1. Enantioselektivität verschiedener Schweineleber-Esterasen bei der kinetischen Racematspaltung von **1**.

PLE ^[a]	<i>t</i> [h]	Enantiomerenüberschuss		Umsatz [%]	<i>E</i> ^[b]
		<i>ee_S</i> [%] ^[c]	<i>ee_P</i> [%] ^[c]		
Rekombinant	1	58	53	53	5.7
Fluka	1.5	65	56	54	6.8
Sigma	1	72	58	55	7.8
Chirazyme E-1	5	73	58	56	7.9

[a] In allen Reaktionen wurden 0.5 Einheiten (bezogen auf den pNPA-Test) eingesetzt. [b] Die Enantioselektivität *E* wurde gemäß Chen et al.^[15] berechnet. [c] In allen Fällen hatte der Produktalkohol **1a** (*R*)-Konfiguration und das nicht umgesetzte Acetat **1** (*S*)-Konfiguration.

Tabelle 2. Enantioselektivität verschiedener Schweineleber-Esterasen bei der kinetischen Racematspaltung von **2**.

PLE ^[a]	<i>t</i> [h]	Enantiomerenüberschuss		Umsatz [%]	<i>E</i> ^[b]
		<i>ee_S</i> [%]	<i>ee_P</i> [%]		
Rekombinant	2	75 (<i>R</i>)	70 (<i>S</i>)	52	12.6
Fluka	1.5	35 (<i>S</i>)	44 (<i>R</i>)	44	3.6
Sigma	1.5	24 (<i>S</i>)	32 (<i>R</i>)	43	2.4
Chirazyme E-1	1.5	22 (<i>S</i>)	43 (<i>R</i>)	34	3.1
Chirazyme E-2	1	9 (<i>S</i>)	9 (<i>R</i>)	50	1.3

[a],[b] Siehe Tabelle 1.

Tabelle 3. Enantioselektivität verschiedener Schweineleber-Esterasen bei der kinetischen Racematspaltung von **3**.

PLE ^[a]	<i>t</i> [h]	Enantiomerenüberschuss		Umsatz [%]	<i>E</i> ^[b]
		<i>ee_S</i> [%] ^[c]	<i>ee_P</i> [%] ^[c]		
Rekombinant	2	57	> 99	36	> 100
Fluka	2	12	12	49	1.4
Sigma	1	17	11	59	1.5
Chirazyme E-1	2	19	18	52	1.7
Chirazyme E-2	1	58	40	59	4.0

[a],[b] Siehe Tabelle 1. [c] In allen Fällen hatte der Produktalkohol **3a** (*S*)-Konfiguration und das nicht umgesetzte Acetat **3** (*R*)-Konfiguration.

selektivitäten als bei den Reaktionen mit PLE-Präparaten von Fluka, Sigma oder Roche (Chirazyme E-1 bzw. E-2). Bei der Hydrolyse von **3** zeigten diese Präparate nur sehr geringe Enantioselektivitäten ($E = 1.4$ –4.0), während mit rekombinanter PLE E -Werte $\gg 100$ bestimmt wurden (Tabelle 3). Für **2** fiel diese Steigerung der Enantioselektivität geringer aus, jedoch beobachteten wir hier eine Umkehrung in der Enantiopräferenz (Tabelle 2). Während mit den kommerziellen Esterasen bevorzugt der (*R*)-Alkohol gebildet wurde, endstand mit rPLE der (*S*)-Alkohol. Diese Ergebnisse können dadurch erklärt werden, dass wir die γ -Untereinheit der PLE kloniert haben,^[13] während kommerzielle Präparate ein Gemisch von Untereinheiten enthalten, die sich bezüglich Sequenz und Molekulargewicht deutlich unterscheiden,^[5] was sich natürlich auch auf die Substrat- und Enantioselektivität auswirken kann.

Folglich ermöglicht die Verwendung der rekombinanten PLE nun auch die Herstellung von Verbindungen in hoher

optischer Reinheit, die bisher nicht durch PLE-katalysierte Reaktionen zugänglich waren. Zusätzlich können durch die gelungene funktionelle Expression nun die Enzymeigenschaften durch positionsgerichtete Mutagenese oder gerichtete Evolution^[16] manipuliert werden.

Experimentelles

Herstellung der rekombinanten Schweineleber-Esterase (rPLE): Zur Expression der rPLE wurde die Hefe *Pichia pastoris* – die das für die Esterase kodierende Gen unter Kontrolle des Methanol-induzierbaren Alkoholoxidase-1-Promotors (AOX1) genomisch integriert trägt – entsprechend der Anleitung des Herstellers (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) zunächst in Glycerin-haltigem (1% (v/v)) BMGY-Medium und anschließend in BMMY-Medium, das 0.5% (v/v) Methanol als C-Quelle und Induktor enthält, kultiviert. Die Induktion der rPLE-Expression wurde durch tägliche Zugabe von 0.5% (v/v) Methanol aufrechterhalten. Nach 96 h wurden die Zellen durch Zentrifugieren entfernt und der Überstand mit 20 mL Centricons (NMWL 30000, Ultracel-PL Membran, Millipore) 15 min bei 4000 g eingeengt. Die so erhaltene Aktivität betrug 10 U mL⁻¹ (pNPA-Test) bzw. ~500 U mg⁻¹ Protein.

Bestimmung der Esteraseaktivität: Die photometrische Bestimmung der Esteraseaktivität erfolgte durch Hydrolyse von *p*-Nitrophenylacetat (pNPA).^[7d] Eine Einheit (U) Esterase entspricht der Menge Enzym, die 1 μmol *p*-Nitrophenol pro Minute freisetzt.

Das Substratspektrum der PLE wurde mittels pH-Stat (Schott, Mainz) durch Hydrolyse verschiedener Ester (Caprylsäureethylester, Essigsäureethylester, Tributyrin oder Triolein) bei 37 °C und pH 7.5 ermittelt.^[7d] Eine Einheit (U) Esterase entspricht der Menge Enzym, die 1 μmol Säure pro Minute freisetzt. Die höchste so ermittelte Aktivität wurde als 100%-Wert angenommen.

Esterase-katalysierte Racematspaltung der Acetate: Hierzu wurden 10 mM der Acetate **1–3**, gelöst in Natriumphosphatpuffer (pH 7.5, 50 mM), in 1-mL-Reaktionsgefäß gegeben und die Racematspaltung durch Zugabe von 0.5 U (bezogen auf den pNPA-Test) Esterase gestartet. Zum Abbruch der Reaktion wurde das Gemisch mit Methylenechlorid extrahiert und die organische Phase über wasserfreiem Natriumsulfat getrocknet. Die Bestimmung der Enantiomerenreinheit und des Umsatzes erfolgte gaschromatographisch (Säule: Heptakis(2,6-O-methyl-3-O-pentyl)-β-cyclodextrin, Trägergas: H₂, Flammenionisationsdetektor).

Retentionszeiten [min]: **1** (100 °C isotherm): (*S*)-**1** 3.7, (*R*)-**1** 5.8, (*R*)-**1a** 6.7, (*S*)-**1a** 7.6; **2** (75 °C isotherm): (*S*)-**2** 26.5, (*R*)-**2** 42.3, (*S*)-**2a** 32.6, (*R*)-**2a** 34.2; **3** (90 °C isotherm): (*S*)-**3** 17.6, (*R*)-**3** 20.2, (*S*)-**3a** 24.8, (*R*)-**3a** 27.4. Die absolute Konfiguration basierte für **1** auf einem Vergleich mit käuflichem (*R*)-**1a**. Bei **2** und **3** diente die literaturbekannte^[17] (*R*)-Präferenz der Lipase Amano PS als Bezug.

Eingegangen am 13. Dezember 2000 [Z16264]
Auf Wunsch der Autoren erst jetzt veröffentlicht

- [1] a) U. T. Bornscheuer, R. J. Kazlauskas, *Hydrolases in Organic Synthesis—Regio- and Stereoselective Biotransformations*, Wiley-VCH, Weinheim, 1999; b) R. D. Schmid, R. Verger, *Angew. Chem.* **1998**, *110*, 1694–1720; *Angew. Chem. Int. Ed.* **1998**, *37*, 1608–1633; c) K. Faber, *Biotransformations in Organic Chemistry*, Springer, Berlin, 2000.
- [2] a) L.-M. Zhu, M. C. Tedford, *Tetrahedron* **1990**, *46*, 6587–6611; b) J. B. Jones, *Pure Appl. Chem.* **1990**, *62*, 1445–1448; c) C. Tamm, *Indian J. Chem. Sect. B* **1993**, *32*, 190–194; d) S. J. Phythian in *Biotechnology, Vol. 8a* (Hrsg.: H.-J. Rehm, G. Reed, A. Pühler, P. J. W. Stadler, D. R. Kelly), Wiley-VCH, Weinheim, 1998, S. 193–241.
- [3] D. Seebach, M. Eberle, *Chimia* **1986**, *40*, 315–318.
- [4] D. Farb, W. D. Jencks, *Arch. Biochem. Biophys.* **1980**, *203*, 214–226.
- [5] a) E. Heymann, W. Junge, *Eur. J. Biochem.* **1979**, *95*, 509–518; b) W. Junge, E. Heymann, *Eur. J. Biochem.* **1979**, *95*, 519–525; c) N. Öhrner, A. Mattson, T. Norin, K. Hult, *Biocatalysis* **1990**, *4*, 81–88.
- [6] L. K. P. Lam, C. M. Brown, B. deJeso, L. Lym, E. J. Toone, J. B. Jones, *J. Am. Chem. Soc.* **1988**, *110*, 4409–4411.

- [7] a) V. Khalameyzer, U. T. Bornscheuer, *Biotechnol. Lett.* **1999**, *21*, 101–104; b) N. Krebsfänger, F. Zocher, J. Altenbuchner, U. T. Bornscheuer, *Enzyme Microb. Technol.* **1998**, *21*, 641–646; c) M. Nishizawa, M. Shimizu, H. Ohkawa, M. Kanaoka, *Appl. Environ. Microbiol.* **1995**, *61*, 3208–3215; d) V. Khalameyzer, I. Fischer, U. T. Bornscheuer, J. Altenbuchner, *Appl. Environ. Microbiol.* **1999**, *65*, 477–482.
- [8] a) D. T. Ouyen, C. Schmidt-Dannert, R. D. Schmid, *Appl. Environ. Microbiol.* **1999**, *65*, 787–794; b) E. Catoni, C. Schmidt-Dannert, S. Brocca, R. D. Schmid, *Biotechnol. Tech.* **1997**, *11*, 689–695; c) B. Huge-Jensen, F. Andreasen, T. Christensen, M. Christensen, L. Thim, E. Boel, *Lipids* **1989**, *24*, 781–785.
- [9] a) T. Takahashi, A. Ikai, K. Takahashi, *J. Biol. Chem.* **1989**, *264*, 11565–11571; b) T. Takahashi, M. Nishigai, A. Ikai, K. Takahashi, *FEBS Lett.* **1991**, *280*, 297–300.
- [10] M. Matsushima, H. Inoue, M. Ichinose, S. Tsukada, K. Miki, K. Kurokawa, T. Takahashi, K. Takahashi, *FEBS Lett.* **1991**, *293*, 37–41.
- [11] E. Heymann, K. Peter, *Biol. Chem. Hoppe-Seyler* **1993**, *374*, 1033–1036.
- [12] L. David, X. J. Guo, C. Villard, A. Moulin, A. Puigserver, *Eur. J. Biochem.* **1998**, *257*, 142–148.
- [13] Klonierung und Expression der rPLE: S. Lange, A. Musidowska, C. Schmidt-Dannert, J. Schmitt, U. T. Bornscheuer, *ChemBioChem* **2001**, *2*, 576–582.
- [14] Zum Vergleich wurden PLE-Präparationen der Firmen Fluka, Sigma und Roche Diagnostics (Chirazyme E-1, E-2) verwendet.
- [15] C. S. Chen, Y. Fujimoto, G. Girdaukas, C. J. Sih, *J. Am. Chem. Soc.* **1982**, *104*, 7294–7299.
- [16] a) U. T. Bornscheuer, *Biocatal. Biotransform.* **2001**, *19*, 84–96; b) U. T. Bornscheuer, *Angew. Chem.* **1998**, *110*, 3285–3288; *Angew. Chem. Int. Ed.* **1998**, *37*, 3105–3108; c) F. H. Arnold, *Acc. Chem. Res.* **1998**, *31*, 125–131.
- [17] A. L. Gutman, D. Brenner, A. Boltanski, *Tetrahedron: Asymmetry* **1993**, *4*, 839–844.

Reversible σ-Dimerisierung bei der Redoxumschaltung von 1,3,5-Tripyrrolidinobenzol – ein neuer molekularer Schalter**

Jürgen Heinze,* Christian Willmann und Peter Bäuerle

Seit mehr als 20 Jahren wird in der Literatur die Dimerisierung von Radikalionen konjugierter, aromatischer Systeme diskutiert.^[1–10] Im Falle von Radikalkationen postulieren viele Autoren auf der Grundlage ihrer experimentellen Daten die Bildung von schwach wechselwirkenden π-Dimeren, können aber mit dieser Annahme die Untersuchungsergebnisse nur partiell erklären. Dagegen steht im Falle von Radikal anionen

[*] Prof. Dr. J. Heinze, C. Willmann

Institut für Physikalische Chemie der Universität Freiburg und
Freiburger Materialforschungszentrum
Albertstraße 21, 79104 Freiburg (Deutschland)

Fax: (+49) 7612036237

E-mail: heinze@uni-freiburg.de

Prof. Dr. P. Bäuerle

Abteilung Organische Chemie II

Universität Ulm

Albert-Einstein-Allee 11, 891018 Ulm (Deutschland)

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