

der Glucoseeinheiten wird an den hydrophoben Wänden der Membranlücke adsorbiert und durch Wasserstoffbrücken sowie eine immobile hexagonale Hydrathülle^[5, 15] fixiert. Eine einzige axiale OH-Gruppe oder ein Prozent eines α -Glycosids (Maltose) reicht aus, um den langwierigen Fixierungsprozess der Moleküle zu stören. Das Viologenmolekül dringt während der zyklischen Änderung des Elektrodenpotentials in das immobile Wasservolumen ein, weil es vom elektrischen Feld der Elektrode angezogen wird.

Die beschriebenen, in neutralem Wasser praktisch irreversiblen Anlagerungsprozesse sind für sich neuartig und interessant und könnten z.B. bei Erkennungsprozessen der Oligosaccharide von Glycoproteinen an Membranoberflächen eine Rolle spielen. Hohe thermodynamische Bindungskonstanten sind von Kohlenhydraten und hydrophoben Wänden in wässrigen Medien kaum zu erwarten. Das Einfrieren von starren Hydraten und das Auftauen durch Membranprozesse erscheinen im Licht der hier beschriebenen Befunde plausibel. Vor allem aber erlaubt die Fixierung wasserlöslicher Redoxsysteme (Tyrosin, Ascorbinsäure) in Wasservolumen von der Größe einiger Kubiknanometer den Aufbau neuer supramolekularer Systeme zur photolytischen Wasserspaltung.^[16]

Eingegangen am 7. November 2001

Veränderte Fassung am 22. Februar 2002 [Z18179]

- [1] D. Voet, J. G. Voet, *Biochemie*, VCH, Weinheim, **1992**, S. 311, 354 (Enzyme); D. Voet, J. G. Voet, *Biochemie*, VCH, Weinheim, **1992**, S. 876 (DNA); D. Voet, J. G. Voet, *Biochemie*, VCH, Weinheim, **1992**, S. 259 (Glycoproteine).
- [2] G. A. Jeffrey, W. Saenger, *Hydrogen Bonding in Biological Structures*, Springer, Berlin, **1991**.
- [3] R. G. Nuzzo, D. L. Allara, *J. Am. Chem. Soc.* **1983**, *105*, 4481.
- [4] A. Ulman, *An Introduction to Ultrathin Organic Films*, Academic Press, San Diego, **1991**.
- [5] a) J.-H. Fuhrhop, T. Bedurke, M. Gnade, J. Schneider, K. Doblhofer, *Langmuir* **1997**, *13*, 455; b) W. Fudickar, J. Zimmermann, L. Ruhlmann, J. Schneider, B. Roeder, U. Siggel, J.-H. Fuhrhop, *J. Am. Chem. Soc.* **1999**, *121*, 9539; c) M. Skupin, G. Li, W. Fudickar, J. Zimmermann, B. Roeder, J.-H. Fuhrhop, *J. Am. Chem. Soc.* **2001**, *123*, 3454.
- [6] M. Vossen, F. Forstmann, *J. Chem. Phys.* **1995**, *101*, 2379.
- [7] C. Amatore, J.-M. Savéant, D. Tessier, *J. Electroanal. Chem.* **1983**, *147*, 39.
- [8] E. Delamarche, B. Michel, H. A. Biebuyck, C. Gerber, *Adv. Mater.* **1996**, *8*, 719.
- [9] O. Chailapakul, R. M. Crooks, *Langmuir* **1993**, *9*, 884.
- [10] O. Chailapakul, R. M. Crooks, *Langmuir* **1995**, *11*, 1329.
- [11] M. T. Carter, G. K. Rowe, J. N. Richardson, L. M. Tender, R. H. Terrill, R. W. Murray, *J. Am. Chem. Soc.* **1995**, *117*, 2896.
- [12] A. J. Bard, L. R. Faulkner, *Electrochemical Methods: Fundamentals and Applications*, Wiley, New York, **2001**.
- [13] C. E. D. Chidsey, *Science* **1991**, *251*, 919.
- [14] F. Franks, *Pure Appl. Chem.* **1987**, *59*, 1189.
- [15] J. Lu, M. E. Green, *J. Phys. Chem. B* **1999**, *103*, 2776.
- [16] G. Li, W. Fudickar, M. Skupin, A. Klyszcz, C. Draeger, M. Lauer, J.-H. Fuhrhop, *Angew. Chem.* **2002**, *114*, 1907; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2002**, *41*, 1829.

Synthese von Neo-Peptidoglycanen: eine überraschende Aktivität proteolytischer Enzyme**

Nicole Wehofskey, Reik Löser, Andrij Buchynskyy, Peter Welzel und Frank Bordusa*

Glycosylierungen gehören zu den häufigsten posttranslationalen Modifizierungen von Polypeptiden und haben einen großen Einfluss auf die Struktur, die Stabilität und die biologische Aktivität des Trägermoleküls. Infolge ihrer Beteiligung an Prozessen wie der Adhäsion, der Differenzierung und dem Wachstum von Zellen oder ihrer Assoziation mit Tumorzelllinien sind Glycopeptide und ihre Analoga von außerordentlichem biologischen und pharmazeutischen Interesse.^[1] Ihre Isolierung aus natürlichen Quellen oder die gentechnologische Herstellung führt jedoch üblicher Weise zu Konjugaten mit verändertem oder inhomogenem Kohlenhydrat-Anteil. Den Zugang zu definierten Kohlenhydrat-Peptid-Konjugaten ermöglicht derzeit nur die Anwendung chemischer oder chemoenzymatischer Methoden. Trotz der Vielzahl der zur Verfügung stehenden Synthesemethoden stellt die Herstellung dieser Verbindungen aufgrund ihrer Komplexität, Hydrophilie und Säure- und in einigen Fällen Basenlabilität eine große Herausforderung außerhalb jeglicher Routine dar.^[2]

In dieser Zuschrift wird über eine biokatalytische Methode berichtet, die eine selektive Acylierung von N-Glycanen mit Aminosäuren und Peptiden ermöglicht. Wie das bereits beschriebene Transglutaminase-Verfahren^[3] erlaubt diese die Modifizierung von Glutamin(Gln)-Resten mit strukturell verschiedenen Kohlenhydraten. Die Anwendung dieser Methode ist jedoch nicht auf Gln beschränkt, sondern darüber hinaus auch auf Asparagin(Asn)-Derivate übertragbar. Selbst Konjugate, deren Kohlenhydrat-Struktur an den C-Terminus des Peptids geknüpft ist, sind durch das Verfahren zugänglich. Für die Methode ist kennzeichnend, dass Clostripain aus *Clostridium histolyticum* als Biokatalysator in Kombination mit neuartigen Substratmimetika vom iso-Typ als Aminosäure- bzw. Peptid-Komponente eingesetzt wird.

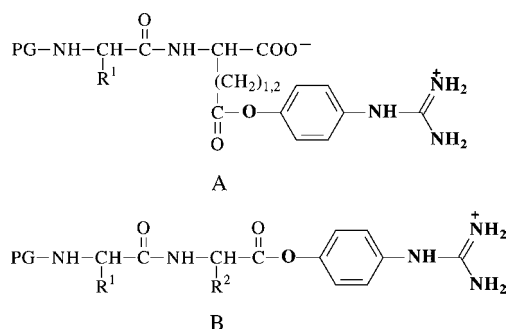
[*] Dr. F. Bordusa, Dr. N. Wehofskey
Max-Planck-Gesellschaft
Forschungsstelle „Enzymologie der Proteinfaltung“
Weinbergweg 22, 06120 Halle/Saale (Deutschland)
Fax: (+49)345-551-1972
E-mail: bordusa@enzyme-halle.mpg.de
Dipl.-Chem. A. Buchynskyy, Prof. P. Welzel
Universität Leipzig
Institut für Organische Chemie
Johannisallee 29, 04103 Leipzig (Deutschland)
Dipl.-Biochem. R. Löser
Universität Leipzig
Institut für Biochemie
Talstraße 33, 04103 Leipzig (Deutschland)

[**] Diese Arbeit wurde von der Deutschen Forschungsgemeinschaft (DFG, Innovationskolleg „Chemisches Signal und biologische Antwort“ und BO 1770/1-1) und dem Fonds der chemischen Industrie gefördert (P.W. und Liebig-Stipendium an F.B.).



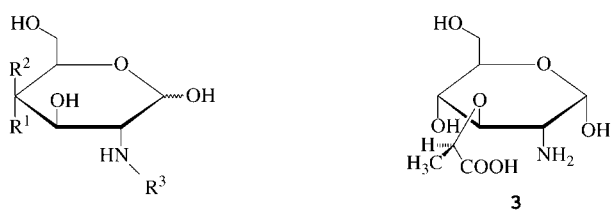
Hintergrundinformationen zu diesem Beitrag sind im WWW unter <http://www.angewandte.de> zu finden oder können beim Autor angefordert werden.

Den bereits bekannten linearen Substratmimetika ähnlich,^[4] weisen die iso-Typ-Analoga die 4-Guanidinophenylester-(OGp)-Struktur als spezifische Esterabgangsgruppe auf, wodurch die Akzeptanz für nichtspezifische Acylreste der ursprünglich hoch Arginin-spezifischen Protease vermittelt wird. Um die intrinsische Syntheseaktivität des Enzyms auf die Seitenketten von Asp und Glu zu richten, wird die OGp-Gruppe anstelle des C-Terminus mit den ω -Carboxygruppen der Aminosäureseitenketten verknüpft (Schema 1). Diese vom herkömmlichen, linearen Substratmimetika-Typ abweichende Architektur erwies sich als geeignet, um die Aktivität des Biokatalysators von der α -Carboxygruppe hin zur Carboxygruppe der Seitenketten zu verschieben. Infolge dessen wird die Synthese eines breiten Spektrums N-verknüpfter Neo-Peptidoglycane ermöglicht.



Schema 1. Allgemeine Struktur von iso-Typ (A) und klassischen linear-Typ Substratmimetika (B). Die spezifische 4-Guanidinophenylester-Gruppe (OGp) ist fett hervorgehoben. PG = Schutzgruppe; R¹, R² = individuelle Seitenketten.

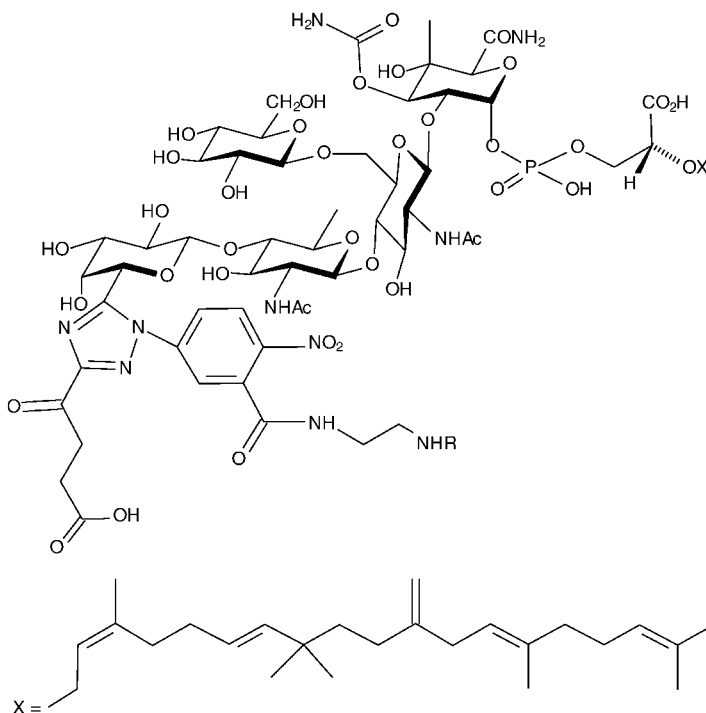
Zunächst wurde untersucht, ob Clostripain in der Lage ist, N-Glycane zu acylieren. Zu diesem Zweck wurden die einfachen Aminosucker D-Glucosamin **1a**, D-Galactosamin **2** und Muraminsäure **3** mit dem klassischen linearen Substratmimetikum Boc-Phe-Gly-Gly-OGp (Boc = *tert*-Butoxycarbonyl) als Acyldonor umgesetzt. Da von der OGp-Struktur bekannt ist, dass sie die Akzeptanz nichtspezifischer (nicht Arg-enthaltender) Peptide durch Clostripain vermitteln kann, wurde sie als spezifitätsimitierende Abgangsgruppe ausgewählt.^[4c, 5] Die Reaktionen wurden in gepufferter wässriger Lösung bei pH 8.0 durchgeführt, wobei ein Gehalt von 10% DMF und Konzentrationen an Peptid, Kohlenhydrat und Enzym von 2 mM, 20 mM bzw. 20 μ M gewählt wurden.^[6] Aus HPLC-Untersuchungen war ersichtlich, dass nach Inkubationszeiten zwischen 30 und 40 min in allen Fällen ein vollständiger Esterumsatz erreicht wurde, der zu Ausbeuten von 68% (im Falle von **1a**), 70% (**2**) und 64% (**3**) führte. Die Syntheseprodukte wurden nach ihrer Abtrennung durch Verseifungsexperimente sowie massenspektrometrisch und NMR-spektroskopisch nachgewiesen.^[7] In allen Fällen konnten ausschließlich monoacylierte Kohlenhydrate identifiziert und außer dem hydrolysierten Peptidester keine weiteren Nebenprodukte gefunden werden. Die Tatsache, dass beim Einsatz von *N*-Acetyl-D-Glucosamin **1b** keine Verknüpfungsreaktion stattfindet, steht im Einklang mit den NMR-Daten und der Verseifungsbeständigkeit der erhaltenen Produkte.



1a: R¹ = OH, R² = H, R³ = H

1b: R¹ = OH, R² = H, R³ = Acetyl

2: R¹ = H, R² = OH, R³ = H



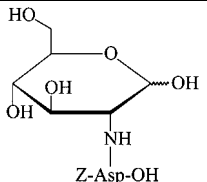
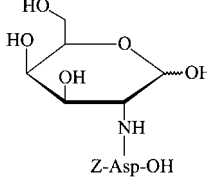
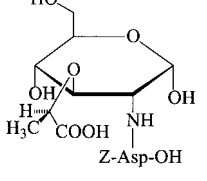
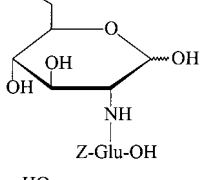
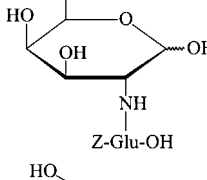
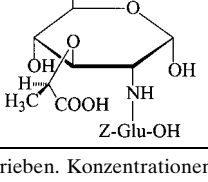
4a: R = H

4b: R = Phenylacetyl

Im nächsten Schritt wurde untersucht, inwiefern sich diese Methode auf die Knüpfung von N-Glycanen an die Carboxygruppen der Seitenketten von Asp und Glu übertragen lässt. Hierfür sind mindestens zwei Bedingungen essentiell: 1) Die Überwindung der nativen Arg-Spezifität der Protease und 2) die Lenkung der intrinsischen Syntheseaktivität vom C α -Carboxylat (Rückgrat) zum Carboxylat der Seitenkette von Asp und Glu. Durch eine Verschiebung der OGp-Gruppe vom C α - zum ω -Carboxylat des Peptidsubstrates könnten beide Bedingungen gleichzeitig erfüllt werden. Um diese Hypothese zu prüfen, nutzen wir zunächst die einfachen Aminosäurederivate Z-Glu(OGp)-OH und Z-Asp(OGp)-OH (Z = Benzyloxycarbonyl) als Vorläufer. Die Synthese dieser Ester verläuft ähnlich wie die Synthese der C α -veresterten Analoga unter Anwendung einer inversen Schutzgruppenstrategie für die Carboxygruppen von Asp und Glu.^[8] Die enzymatischen Reaktionen wurden wiederum unter den gleichen Bedingungen und Eduktkonzentrationen wie für Boc-Phe-Gly-Gly-OGp beschrieben durchgeführt. In analoger Weise wurden sowohl HPLC, NMR-Spektroskopie und

Massenspektrometrie als auch Verseifungsexperimente für die Produktanalyse herangezogen. Die Selektivität der Reaktionen wurde zusätzlich durch den Einsatz der blockierten Aminokomponente **1b** abgesichert. Die Reaktionsausbeuten sind in Tabelle 1 zusammengefasst und dokumentieren die produktive Bindung beider Aminosäureester in das aktive Zentrum des Enzyms, die in der Bildung des entsprechenden N-verknüpften Neo-Peptidoglycans resultiert. Lediglich die Reaktionen mit **1b** führten zu keiner Produktbildung, was für eine durch NMR-Spektroskopie und Verseifungsexperimente verifizierte ausschließliche N-Acylierung spricht. Für alle anderen Kohlenhydrate (**1a**, **2**, **3**) wurden Produktausbeuten im Bereich von 67–73 % erzielt, was den für Boc-Phe-Gly-Gly-OGp erhaltenen Werten entspricht.

Tabelle 1. Produktausbeuten *X* der Clostripain-katalysierten Kohlenhydrat-Aminosäure-Kupplungen.^[a]

Acyldonor	Kohlenhydrat-Acceptor	Produkt	<i>X</i> [%]
Z-Asp(OGp)-OH	1a		72
Z-Asp(OGp)-OH	2		73
Z-Asp(OGp)-OH	3		71
Z-Glu(OGp)-OH	1a		67
Z-Glu(OGp)-OH	2		68
Z-Glu(OGp)-OH	3		67

[a] Bedingungen wie in Lit. [6] beschrieben. Konzentrationen: [Donor] = 2 mM, [Acceptor] = 20 mM, [Clostripain] = 20 μ M.

Aufgrund der offensichtlichen Unabhängigkeit der Methode von Struktur und Typ des Acyldonors untersuchten wir auch, ob diese zur Modifizierung Asp-enthaltender Peptide anstelle des monomeren Asp-Derivats geeignet ist. Hierfür wurde die Leu-Enkephalin-Sequenz Z-Asp-Tyr-Gly-Gly-Phe-Leu-OH als Modell ausgewählt. Die biologische Relevanz des Modells beruht auf einem Befund, wonach die Glycosylierung eines verwandten Peptids seine Affinität zu Opiat-Rezeptoren drastisch erhöht.^[9] Das Vorläuferpeptid Z-Asp(OGp)-Tyr-Gly-Gly-Phe-Leu-OH wurde durch herkömmliche Festphasenpeptidsynthese am Wang-Harz unter Anwendung der Fmoc-Strategie hergestellt. Um die Esterbindung einzuführen, wurde für den letzten Kupplungsschritt Z-Asp(OGp-(Boc)₂)-OH verwendet. Die Abspaltung des Peptids vom Harz durch TFA verlief unter gleichzeitiger Deblockierung der Tyr-Seitenkette und der OGp-Gruppe, wodurch der für die enzymatische Synthese erforderliche Peptidester erhalten wurde. Eine Enzymkonzentration von 20 μ M und eine Inkubationszeit von weniger als 15 min unter Beibehaltung aller anderen Reaktionsbedingungen und Eduktkonzentrationen führten zum kompletten Esterumsatz, woraus Produktausbeuten von 70 % (im Falle von **1a**), 69 % (**2**) und 66 % (**3**) resultierten. Mit Ausnahme des hydrolysierten Peptidesters konnten keine weiteren Nebenprodukte nachgewiesen werden. Die Bestätigung der Selektivität der Reaktionen erfolgte wie bereits beschrieben.

Abschließend haben wir die Methode hinsichtlich ihrer Fähigkeit, komplexe Kohlenhydrate zu modifizieren, untersucht. Zu diesem Zweck wurde ein partialsynthetisches, aminofunktionalisiertes Analogon von Moenomycin A^[10] **4a** mit den vier Aminosäure- und Peptid-Vorläufern zur Reaktion gebracht. Aus Gründen der Syntheseökonomie wurden letztere in 1.25-fachen Überschüssen gegenüber **4a** in Konzentrationen von 25 mM bzw. 20 mM eingesetzt. Alle anderen Reaktionsbedingungen eingeschlossen der geringe Gehalt an organischem Lösungsmittel wurden unverändert beibehalten. Nach einer Stunde und vollständigem Esterumsatz wurden die Reaktionen unterbrochen und mit HPLC und Massenspektrometrie analysiert. Abbildung 1A zeigt ausgewählte HPLC-Chromatogramme, die exemplarisch den Verlauf der Katalyse am Beispiel der Reaktion des Peptid-Vorläufers mit **4a** illustrieren. Ähnlich zu den Reaktionen bei denen monomere Kohlenhydrate eingesetzt wurden, konnte nur die Bildung von monoacyliertem **4a** beobachtet werden. Hinsichtlich der Effizienz der Synthesen wurden für die Reaktionen mit Boc-Phe-Gly-Gly-OGp 24 %, mit Z-Asp(OGp)-Tyr-Gly-Gly-Phe-Leu-OH und Z-Glu(OGp)-OH jeweils 26 % und mit Z-Asp(OGp)-OH 29 % des gewünschten Produktes erhalten. Im Unterschied dazu führte das N-Phenylacetyl-Moenomycin-Derivat **4b**, das zur Verifizierung der Syntheseselektivität diente, zu keiner Produktbildung. Vergleicht man diese Ausbeuten mit denen von über 70 % für die monomeren Kohlenhydrate (**1a**, **2**, **3**), so führt das sterisch anspruchsvolle Moenomycin-Derivat offenbar zu einer Verringerung der Syntheseeffizienz. In diesem Kontext sei jedoch daran erinnert, dass Moenomycin nicht nur ein komplexes Kohlenhydrat, sondern auch eine amphiphile Verbindung mit einer starken Neigung zur Bildung von Micellen ist (CMC von nicht-modifiziertem Moenomycin: 0.5 mM bei pH 6.8).^[11]

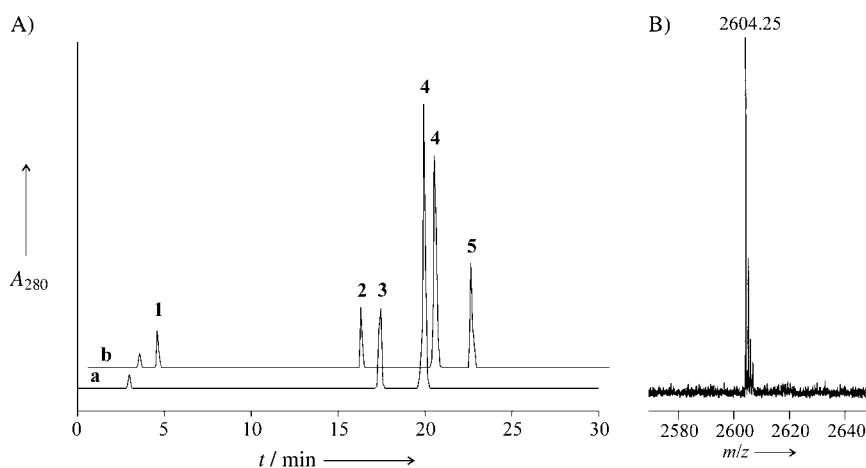


Abbildung 1. Analyse der Clostripain-katalysierten Kupplung von Z-Asp(OGp)-Tyr-Gly-Gly-Phe-Leu-OH mit **4a** durch HPLC (A) und MALDI-ToF-Massenspektrometrie (B).^[7] A) a) vor Enzymzugabe; b) nach 30 min. 1, freigesetztes 4-Guanidinophenol; 2, Z-Asp-Tyr-Gly-Gly-Phe-Leu-OH; 3, Z-Asp(OGp)-Tyr-Gly-Gly-Phe-Leu-OH; 4, Moenomycin A; 5, Z-Asp(Moenomycin)-Tyr-Gly-Gly-Phe-Leu-OH. A_{280} = Absorption bei 280 nm. B) M(ber.): 2602,96.

Derzeit ist noch unklar, ob und in welchem Ausmaß die Micellenbildung oder die Steigerung der Komplexität des Kohlenhydrat-Gerüsts zu diesem Effekt beitragen. Nimmt man an, dass die Micellenbildung grundsätzlich die Diffusionsgeschwindigkeit verringert und somit Moenomycin daran hindert, das Acylenzym anzugreifen, so sprechen diese Resultate für eine relativ breite Akzeptanz von hochkomplexen und gewöhnlich nichtmicellaren N-Glycanen durch das Enzym.

Wir haben hier eine effektive, auf dem Protease/Substratmimetika-Ansatz beruhende Methode zur Synthese von N-verknüpften Neo-Peptidoglycanen beschrieben. Diese Methode ermöglicht die selektive Verknüpfung der Carboxylat-Gruppen von Asp- und Glu-Seitenketten wie auch des C-Terminus von Peptiden mit sowohl einfachen monomeren als auch hochkomplexen säure- und basenlabilen Kohlenhydratderivaten unter außerordentlich milden Reaktionsbedingungen in Ausbeuten zwischen 24 und 73 %. Aufgrund der bekannten Unabhängigkeit des klassischen Substratmimetika-Konzeptes vom individuellen Acylrest, darf insbesondere für die Abkömmlinge des linearen Typs eine hohe Flexibilität hinsichtlich der Anwendbarkeit dieser Synthesemethode gegenüber der Sequenz des Peptidvorläufers erwartet werden. Lediglich die Anwesenheit spezifischer Arg-Reste im Peptid könnte zu unerwünschten Spaltungsreaktionen führen.^[12] Für solche Fälle verspricht die Anwendung von geschützten Arg-Seitenketten eine elegante Lösung. Unserem Wissen nach existiert kein anderes biokatalytisches System mit einer vergleichbaren synthetischen Flexibilität sowohl gegenüber der Peptid- als auch der Kohlenhydrat-Komponente. Diese Charakteristika machen diese Methode zu einem effizienten und allgemein anwendbaren Verfahren für die Synthese von N-verknüpften Neo-Peptidoglycanen und Aminosäure-Kohlenhydrat-Bausteinen.

Eingegangen am 14. November 2001
Veränderte Fassung am 5. April 2002 [Z18217]

[1] Übersichtsartikel: a) P. M. St. Hilaire, M. Meldal, *Angew. Chem.* **2000**, *112*, 1210–1228; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2000**, *39*, 1162–1179; b) O. Seitz, *ChemBioChem* **2000**, *1*, 214–246; c) R. A. Dwek, *Chem. Rev.* **1996**, *96*, 683–720; d) H. Lis, N. Sharon, *Eur. J. Biochem.* **1993**, *218*, 1–27; e) A. Varki, *Glycobiology* **1993**, *3*, 97–130.

[2] Übersichtsartikel: a) H. Herzner, T. Reipen, M. Schultz, H. Kunz, *Chem. Rev.* **2000**, *100*, 4495–4537; b) G. Arsequell, G. Valencia, *Tetrahedron: Asymmetry* **1999**, *10*, 3045–3094; c) C. M. Taylor, *Tetrahedron* **1998**, *54*, 11317–11362.

[3] a) S.-C. B. Yan, F. Wold, *Biochemistry* **1984**, *23*, 3759–3765; b) D. Ramos, P. Rollin, W. Klaffke, *Angew. Chem.* **2000**, *112*, 406–408; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2000**, *39*, 396–398.

[4] a) V. Schellenberger, H.-D. Jakubke, N. P. Zapevalova, Y. V. Mitin, *Biotechnol. Bioeng.* **1991**, *38*, 104–108; b) H. Sekizaki, K. Itoh, E. Toyota, K. Tanizawa, *Chem. Pharm. Bull.* **1996**, *44*, 1577–1579, 1585–1587; c) F. Bordusa, D. Ullmann, C. Elsner, H.-D. Jakubke, *Angew. Chem.* **1997**, *109*, 2563–2565; *Angew. Chem. Int. Ed.* **1997**, *36*, 2473–2475; d) M.

Thormann, S. Thust, H.-J. Hofmann, F. Bordusa, *Biochemistry* **1999**, *38*, 6056–6062; e) V. Cerovsky, J. Kockskämper, H. G. Glitsch, F. Bordusa, *ChemBioChem* **2000**, *2*, 126–129.

[5] a) R. Günther, F. Bordusa, *Chem. Eur. J.* **2000**, *6*, 463–467; b) R. Günther, A. Stein, F. Bordusa, *J. Org. Chem.* **2000**, *65*, 1672–1679.

[6] Die enzymatischen Reaktionen wurden in einem Volumen von 0.5 mL 0.1 M N-(2-Hydroxyethyl)piperazin-N'-(2-ethansulfonsäure) (Hepes), pH 8.0, 0.1 M NaCl, 0.01 M CaCl₂, 10 % (v/v) Dimethylformamid (DMF) bei 25 °C durchgeführt. Die Aminosäure- und Peptidester wurden in 10 % DMF/Wasser gelöst, während die Kohlenhydrate in der entsprechenden Pufferlösung suspendiert wurden. Durch Zugabe von NaOH wurde der pH-Wert wieder auf 8.0 eingestellt. Nach dem Mischen der Reaktanten wurden die Reaktionen durch Zugabe von vorinkubiertem Enzym (1 mM DL-Dithiothreitol, 2.5 mM CaCl₂ in Wasser für 2 h) gestartet. In definierten Zeitintervallen wurden die Reaktionen durch Zugabe von 1 % Trifluoressigsäure unterbrochen und wie in Lit. [7] beschrieben analysiert. Zur Kontrolle eventueller spontaner Reaktionen wurden in allen Fällen Parallelreaktionen ohne Enzym analysiert. Auf Grundlage dieser Kontrollen, kann die nicht-enzymatische Synthese ausgeschlossen werden. Das Ausmaß der spontanen Hydrolyse des Acyldonor-Esters belief sich auf unter 5 %.

[7] Die Reaktionen wurden unter optimierten Bedingungen durch Reversed-phase-HPLC (LiChrospher, 5 µm, 125 × 3 mm; Merck) analysiert. Die Detektion erfolgte bei 254 nm (monomere Kohlenhydrate) bzw. 280 nm (Moenomycin, Leu-Enkephalin-Derivat). Massenspektren wurden für getrennte und lyophilisierte Proben durch MALDI-ToF- oder ESI-Ionisation (MALDI 5 V5.1.2, Kratos Kompakt bzw. Apex II/7 Tesla, Bruker-Daltonics) aufgenommen. NMR-Untersuchungen (GEMINI 300, Varian) wurden zur Prüfung der Identität der Reaktanten und Produkte (außer Moenomycin und seinen Konjugaten) verwendet. Verseifungsexperimente wurden durch Inkubation der Syntheseprodukte in 50 % Methanol/Wasser (pH 11) für 1 Stunde und wiederholte Analyse mit HPLC durchgeführt.

[8] Zur Synthese von Substratmimetika des linearen Typs s. z. B.: N. Müller, F. Bordusa, *Anal. Biochem.* **2000**, *286*, 86–90 und darin zitierte Literatur. Die isomeren Z-Glu/Asp(OGp)-OH-Ester wurden durch Kondensation von Z-Glu/Asp-OtBu und 4-[N,N'-Bis(Boc)-guanidino]phenol (Verhältnis 1:2) mit N-[(Dimethylamino)-1H-1,2,3-triazolo[4,5-b]pyridin-1-ylmethyl]-N-methylmethanaminium hexafluorophosphat-N-oxid (HATU) als Kupplungsreagenz, N-Ethyl-diisopropylamin als Base und DMF als Lösungsmittel bei 0 °C hergestellt. Die Behandlung der geschützten Aminosäurediester-Produkte mit TFA führte zur Boc/tBu-Abspaltung, wodurch die Z-Glu/Asp(OGp)-OH-Ester als Endprodukte entstanden. Identität und Reinheit der Ester wurde durch analytische HPLC, NMR-Spektroskopie und

Thermospray-Massenspektrometrie überprüft. Durch diese optimierte Synthesemethode konnte die Bildung isomerer Ester unterdrückt werden.

- [9] R. E. Rodriguez, F. D. Rodriguez, M. P. Sacristan, J. L. Torres, G. Valencia, J. M. G. Anton, *Neurosci. Lett.* **1989**, *101*, 89–94.
- [10] a) U. Kempin, L. Hennig, D. Knoll, P. Welzel, D. Müller, A. Markus, J. van Heijenoort, *Tetrahedron* **1997**, *53*, 17 669–17 690; b) A. Anikin, A. Buchynskyy, U. Kempin, K. Stembera, P. Welzel, G. Lantzsch, *Angew. Chem.* **1999**, *111*, 3931–3935; *Angew. Chem. Int. Ed.* **1999**, *38*, 3703–3707.
- [11] G. Lantzsch, H. Binder, H. Heerklotz, P. Welzel, G. Klose, *Langmuir* **1998**, *14*, 4095–4104.
- [12] N. Wehofsky, S. W. Kirbach, M. Haensler, J.-D. Wissmann, F. Bordusa, *Org. Lett.* **2000**, *2*, 2027–2030.

Untersuchung von reaktiven Zwischenstufen bei chemischen Reaktionen in Lösung mit Elektrospray-Ionisations-Massenspektrometrie: Radikalkettenreaktionen**

Jens Griep-Raming, Sven Meyer, Torsten Bruhn und Jürgen O. Metzger*

Professor Hans J. Schäfer zum 65. Geburtstag gewidmet

Der Reaktionsmechanismus ist die detaillierte Schritt-für-Schritt-Beschreibung einer chemischen Reaktion. Die meisten chemischen Reaktionen laufen in einer komplexen Folge von Reaktionsschritten über verschiedene reaktive Zwischenstufen ab. Die wichtigsten reaktiven Zwischenstufen bei organischen Reaktionen in Lösung sind Carbokationen, Carbanionen, Carbene und Radikale. Natürlich sind Chemiker seit langem in der Lage, diese reaktiven Zwischenstufen indirekt mit chemischen und physikalischen Methoden nachzuweisen. Spektroskopische Methoden stehen zur Verfügung, sie direkt und im Detail zu studieren.^[1] Olah untersuchte zum Beispiel stabile Carbokationen in „magischer Säure“ unter Nicht-Reaktions-Bedingungen.^[2] Transiente Carbokationen mit chromophoren Gruppen wurden mit UV-Spektroskopie untersucht.^[3, 4] Für Radikale wurde die ESR-Spektroskopie und in besonderen Fällen auch CIDNP und UV-Spektroskopie eingesetzt.^[5, 6] Es ist bemerkenswert, dass diese Methoden im Allgemeinen – möglicherweise gibt es einige Ausnahmen –

nicht geeignet sind, diese reaktiven Intermediate in Reaktionslösungen wie in einer Radikalkettenreaktion direkt nachzuweisen und zu untersuchen. Weiterhin können Substrate, Intermediate und Endprodukte mit diesen Methoden meistens nicht beobachtet werden. Hierzu wären zusätzliche Messungen notwendig. Offensichtlich wäre es von großer Bedeutung, eine einfache Methode zur Untersuchung von Reaktionen zur Verfügung zu haben, die es gleichzeitig erlaubt, Substrate, Zwischenprodukte, Produkte und insbesondere reaktive Zwischenstufen direkt zu beobachten. Eine solche Methode könnte neue und wichtige Einblicke in den Reaktionsverlauf ermöglichen und unser Verständnis des Mechanismus vertiefen. Außerdem sollte die Methode für das schnelle Testen im Mikromaßstab anwendbar sein und damit zu einer nachhaltigen Entwicklung beitragen.^[7]

Kürzlich wurde die Elektrospray-Ionisations-Massenspektrometrie (ESI-MS)^[8] erfolgreich für die Untersuchung von einigen chemischen Reaktionen in Lösung eingesetzt. Die Untersuchungen wurden meistens offline durchgeführt, z. B. bei der Oxidation von Tetrahydropterinen zu Radikalkationen,^[9] homogen katalysierten Reaktionen wie der Suzuki-Reaktion^[10] und der Palladium-katalysierten oxidativen Selbst-Kupplung von Arylboronsäuren.^[11] Arakawa et al. nutzten ein System, in dem eine Durchfluss-Photoreaktionszelle online an ein ESI-MS gekoppelt wurde. Damit untersuchten sie Zwischenprodukte von photochemischen Reaktionen von einigen Übergangsmetallkomplexen, die eine Lebensdauer von wenigen Minuten aufweisen.^[12] Die Oxidation von Eisen(II)-bleomycin mit Iodosylbenzol wurde online untersucht, wobei einige Intermediate detektiert werden konnten.^[13] Chen et al. verwendeten die ESI-MS zur Erzeugung und Isolierung der aktiven Spezies von homogen katalysierten Reaktionen wie der Ziegler-Natta-Polymerisation^[14] oder der Olefin-Metathese^[15] und untersuchten die Reaktion der aktiven Spezies mit dem Substrat in der Gasphase. Feichtinger und Plattner untersuchten mit der gleichen Technik die Bildung und Reaktion der aktiven Spezies von Epoxidierungskatalysatoren, z. B. von Oxomangan-Salen-Komplexen.^[16] Wir beschrieben die Möglichkeit, stabile Radikale in Lösung durch ESI-MS^[17] zu untersuchen und berichten nun über unsere Ergebnisse zum Nachweis von transienten Radikalen in Radikalkettenreaktionen.

Es gibt viele präparativ wichtige Radikalkettenreaktionen in Lösungen.^[18] Es gibt jedoch keine Methode, mit der man die transienten Radikale in diesen Reaktionen direkt nachweisen und untersuchen kann. Radikale sind Neutralteilchen und Neutralteilchen können normalerweise mit ESI-MS nicht erfasst werden. Radikalreaktionen können jedoch durch Lewis-Säuren vermittelt werden, wenn das Substrat eine Lewis-Base ist, die das Metallatom einer Lewis-Säure in Lösung chelatisieren kann.^[19] Wir haben kürzlich gezeigt, dass Glutarsäuredialkylester mit Lewis-Säuren wie LiClO₄, MgBr₂ und Scandiumtriflat Sc(OTf)₃ in Diethylether Komplexe bilden.^[20] Wir nahmen an, dass diese Komplexe, z. B. mit Sc(OTf)₃, zu einem Chelat-Komplexkation und zum Triflatanion dissoziieren sollten und so den Nachweis des komplexierten Esters durch ESI-MS erlauben würde.^[21] Dieses erwies sich als möglich: 2-Iodadipinsäurediethylester **1** wurde mit 1.2 Äquivalenten Sc(OTf)₃ in Diethylether gemischt, und

[*] Prof. Dr. J. O. Metzger, Dipl.-Chem. S. Meyer, Dipl.-Chem. T. Bruhn
Fachbereich Chemie
Carl von Ossietzky Universität Oldenburg
Carl-von-Ossietzky-Straße 9–11
26111 Oldenburg (Deutschland)
Fax: (+49) 441-798-3329
E-mail: juergen.metzger@uni-oldenburg.de

Dr. J. Griep-Raming
Thermo Finnigan MAT GmbH
Barkhausenstraße 2
28197 Bremen (Deutschland)

[**] Wir danken der Deutschen Forschungsgemeinschaft für die finanzielle Unterstützung.

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