

eine monomolekulare Struktur mit konstantem T_m bis hin zu viel höheren Konzentrationen ($> 10 \mu\text{M}$). Der alternierende $\text{F}^5\text{-P-F}^5\text{-P}$ -Stapel, welcher in **12** und **14** kürzer ist oder fehlt, versteift im Fall von **13** die Mitte des Oligonucleotids.^[27] Der Einfluss der intramolekularen Stapelungswechselwirkung zwischen Phenyl- und Pentafluorphenylresten auf die Duplexstabilität ist also größer als die seitliche, intermolekulare Komponente. Dies ist nicht weiter überraschend, wenn man sich die unterschiedliche Ausdehnung der Kontakte in den beiden Richtungen vor Augen hält.

Zusammenfassend lässt sich festhalten, dass komplementäre Ladungsverteilung wie in den Phenyl- und Pentafluorphenyl-C-Nucleosiden **1** und **2** ein neuartiges Designprinzip für künstliche Basenpaare darstellt. Die Resultate dieser Studie unterstreichen ferner die Bedeutung intramolekularer Stapelungskräfte für die thermodynamische Stabilisierung von Oligonucleotidduplexen. Andererseits konnten intermolekulare Stapelwechselwirkungen kürzlich in einem Basenpaar, bestehend aus zwei Bipyridinresten, genutzt werden.^[13] Eine Kombination dieser Eigenschaften könnte zu orthogonalen, nicht wasserstoffverbrückten, nicht form-komplementären Basenpaaren führen. Experimente in dieser Richtung, wie auch Versuche, das Pentafluorphenyl-Phenyl-Basenpaar mit Polymerasen zu replizieren, sind gegenwärtig im Gange.

Eingegangen am 18. Januar 2002 [Z18923]

- [1] J. A. Piccirilli, T. Krauch, S. E. Moroney, S. A. Benner, *Nature* **1990**, *343*, 33–37.
- [2] J. D. Bain, C. Switzer, A. R. Chamberlin, S. A. Benner, *Nature* **1992**, *356*, 537–539.
- [3] J. J. Voegel, S. A. Benner, *Helv. Chim. Acta* **1996**, *79*, 1863–1880; J. J. Voegel, S. A. Benner, *Helv. Chim. Acta* **1996**, *79*, 1881–1898.
- [4] T. J. Matray, E. T. Kool, *J. Am. Chem. Soc.* **1998**, *120*, 6191–6192.
- [5] R. S. Coleman, M. L. Madaras, *J. Org. Chem.* **1998**, *63*, 5700–5703.
- [6] K. M. Guckian, B. A. Schweitzer, R. X.-F. Ren, C. J. Sheils, D. C. Tahmassebi, E. T. Kool, *J. Am. Chem. Soc.* **2000**, *122*, 2213–2222.
- [7] M. Berger, A. K. Ogawa, D. L. McMinn, Y. Wu, P. G. Schultz, F. E. Romesberg, *Angew. Chem.* **2000**, *112*, 3069–3071; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2000**, *39*, 2940–2942.
- [8] E. Lee Tae, Y. Wu, G. Xia, P. G. Schultz, F. E. Romesberg, *J. Am. Chem. Soc.* **2001**, *123*, 7439–7440.
- [9] I. Singh, W. Hecker, A. K. Prasad, V. S. Parmar, O. Seitz, *Chem. Commun.* **2002**, 500–501.
- [10] M. Shionoya, K. Tanaka, *Bull. Chem. Soc. Jpn.* **2000**, *73*, 1945–1954.
- [11] E. Meggers, P. L. Holland, W. B. Tolman, F. E. Romesberg, P. G. Schultz, *J. Am. Chem. Soc.* **2000**, *122*, 10714–10715.
- [12] H. Weizman, Y. Tor, *J. Am. Chem. Soc.* **2001**, *123*, 3375–3376.
- [13] C. Brotschi, A. Häberli, C. J. Leumann, *Angew. Chem.* **2001**, *113*, 3101–3103; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2001**, *40*, 3012–3014.
- [14] F. Cozzi, F. Ponzini, R. Annunziata, M. Cinquini, J. S. Siegel, *Angew. Chem.* **1995**, *107*, 1092–1094; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1995**, *34*, 1019–1020.
- [15] R. E. Gaillard, J. F. Stoddart, A. J. P. White, B. J. Williams, D. J. Williams, *J. Org. Chem.* **1996**, *61*, 4504–4505.
- [16] G. W. Coates, A. R. Dunn, L. M. Henling, D. A. Dougherty, R. H. Grubbs, *Angew. Chem.* **1997**, *109*, 290–293; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1997**, *36*, 248–251.
- [17] F. Ponzini, R. Zagha, K. Hardcastle, J. S. Siegel, *Angew. Chem.* **2000**, *112*, 2413–2415; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2000**, *39*, 2323–2325.
- [18] C.-Y. Kim, P. P. Chandra, A. Jain, D. W. Christianson, *J. Am. Chem. Soc.* **2001**, *123*, 9620–9627.
- [19] C. R. Patrick, G. S. Prosser, *Nature* **1960**, *187*, 1021.
- [20] J. H. Williams, J. K. Cockcroft, A. N. Fitch, *Angew. Chem.* **1992**, *104*, 1666–1669; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1992**, *31*, 1655–1657.

- [21] T. A. Millican, G. A. Mock, M. A. Chauncey, T. P. Patel, M. A. W. Eaton, J. Gunning, S. D. Cutbush, S. Neidle, J. Mann, *Nucleic Acids Res.* **1984**, *12*, 7435–7453.
- [22] U. Wichai, S. Wosky, *Org. Lett.* **1999**, *1*, 1173–1176.
- [23] Das tritylierte Pentafluorphenyl- β -D-desoxyribosid wurde unter sauren Bedingungen (CHCl_3COOH , Pyrrol, CH_2Cl_2 , RT, 20 min) zu anomerenreinem **1** entschützt. $^1\text{H-NMR-NOE}$ (400 MHz, $[\text{D}_6]\text{DMSO}$): Einstrahlen auf das Signal von H-C(1') (5.30 ppm) und H-C(4') (3.75 ppm) führt zur Verstärkung des Signals von H-C(4') bzw. H-C(1').
- [24] B. A. Conolly in *Oligonucleotides and Analogues: A Practical Approach* (Hrsg.: F. Eckstein), Oxford University Press, Oxford, **1991**, S. 151–183.
- [25] Die Identität der synthetisierten Oligonucleotide wurde mit ESI-Massenspektrometrie überprüft.
- [26] Dieses Problem könnte durch Ersetzen des Phenylrestes in einem $\text{F}^5\text{-P}$ -Basenpaar durch einen Naphthalin- oder Indolrest behoben werden. Experimente mit entsprechend modifizierten Oligonucleotiden sind derzeit im Gange.
- [27] Experimente mit den nicht-selbstkomplementären 10-mer Duplexen d(CTGF $^{\text{F}^5}$ PF 5 PGAC)-d(GTCF $^{\text{F}^5}$ PF 5 PCAG) und d(CTGF $^{\text{F}^5}$ F 5 F 5 GAC)-d(GTCPPPPCAG) brachten keinen Aufschluss, da diese einen Schmelzpunkt von unter 10°C aufweisen.

Aktivität von Lipasen und Esterasen gegenüber tertiären Alkoholen: neue Einblicke in Struktur-Funktions-Beziehungen**

Erik Henke, Jürgen Pleiss und Uwe T. Bornscheuer*
Professor Rolf D. Schmid zum 60. Geburtstag gewidmet

Hydrolytische Enzyme sind vielseitige Biokatalysatoren und finden zunehmend Anwendungen in der organischen Synthese.^[1] Eine beträchtliche Zahl industrieller Verfahren unter Einsatz dieser Enzyme wurde bereits etabliert.^[2] Innerhalb dieser Enzymklasse werden Lipasen (E.C. 3.1.1.3) und Carboxylesterasen (E.C. 3.1.1.1) häufig eingesetzt, da sie ein sehr breites Spektrum nicht natürlicher Substrate akzeptieren, üblicherweise in organischen Lösungsmitteln sehr stabil sind und gute bis ausgezeichnete Stereoselektivität zeigen. Der weitaus größte Teil der (chiralen) Substrate, die von

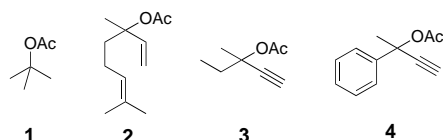
[*] Prof. Dr. U. T. Bornscheuer, Dr. E. Henke
Institut für Chemie & Biochemie
Abt. Technische Chemie & Biotechnologie
Universität Greifswald
Soldmannstraße 16, 17487 Greifswald (Deutschland)
Fax: (+49) 3834-86-4346
E-mail: bornsche@uni-greifswald.de
Dr. J. Pleiss
Institut für Technische Biochemie
Universität Stuttgart
Allmandring 31
70569 Stuttgart (Deutschland)

[**] Wir danken Prof. R. D. Schmid (Institut für Technische Biochemie (ITB), Universität Stuttgart) für hilfreiche Diskussionen und Sandra Vorlová (ITB) für die Bereitstellung rekombinanter hAChE und bAChE. Diese Arbeit wurde von der Deutschen Forschungsgemeinschaft finanziell unterstützt (Bo 1475/2-1).

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

Hydrolasen umgesetzt werden, sind jedoch sekundäre Alkohole gefolgt von Carbonsäuren und primären Alkoholen. Chirale tertiäre Alkohole (TA) und deren Ester (TAEs) stellen eine Gruppe bedeutender Verbindungen dar, die in einer ganzen Reihe von Naturstoffen, z. B., α -Terpineol, Linalool, vorkommen und nützliche Synthesebausteine^[3] sind. Leider sind jedoch nur sehr wenige Hydrolasen bekannt, die diese Verbindungen als Substrate akzeptieren.^[4] Zusätzlich sind die beobachteten Reaktionsraten und/oder Enantioselektivitäten sehr gering und folglich erscheint eine Anwendung eher unwahrscheinlich. Strukturelle Gründe für diesen Mangel an Aktivität – abgesehen von der deutlich verminderten chemischen Reaktivität im Vergleich zu sekundären Alkoholen – und Stereoselektivität wurden bislang nicht gefunden, obwohl die Raumstrukturen mehrerer Lipasen und Esterasen seit über einem Jahrzehnt bekannt sind.

Am Anfang unserer Untersuchungen prüften wir 25 kommerziell erhältliche Enzympräparate hinsichtlich ihrer Aktivität gegenüber den vier Modellacetaten **1–4** (Schema 1). Im Einklang mit der Literatur fanden wir, dass nur eine Lipase



Schema 1. Ester tertiärer Alkohole (TAEs), die als Modellverbindungen eingesetzt wurden.

aus *Candida rugosa* (CRL)^[4c,d] und die Lipase A aus *Candida antarctica* (CAL-A)^[4e] Aktivität zeigten. Die Proteinstruktur von CAL-A ist unbekannt und eine Sequenzanalyse ergab keine große Homologie zu bekannten Proteinstrukturen.^[5] Daher wurden weitere Untersuchungen auf die sehr gut charakterisierte CRL beschränkt. Ein Vergleich der Raumstruktur der CRL mit Enzymen, die gegenüber TAEs nicht aktiv sind, ergab, dass die Alkoholbindungstasche der CRL 1.5 bis 2 Å größer ist (Tabelle 1) und folglich eine Bindung des nahezu sphärischen Restes eines tertiären Alkohols erlaubt. Die Aminosäuresequenz der CRL enthält ein GGGX-Motiv,

dass im aktiven Zentrum des Enzyms positioniert ist.^[6] Dieses Aminosäuremuster, dass sich in einer Proteinschleife in der Nähe der Bindungsstelle der Carbonsäuregruppe des Substrates befindet, ist an der Bildung der so genannten Oxyanionbindungstasche beteiligt. Diese stabilisiert das Carbonylsauerstoffanion des tetraedrischen Intermediates während des Katalysezyklus der Esterhydrolyse durch zwei H-Brücken, die aus zwei Amidgruppen des Proteingerüsts stammen. Im Unterschied hierzu, weisen die meisten kommerziellen Lipasen und Esterasen an dieser Stelle des aktiven Zentrums ein GX-Motiv auf^[6] und eine Aminosäure mit einer voluminösen Seitenkette (bezeichnet mit X) bildet die H-Brücke. Bislang wurden das GX- und das GGGX-Motiv in α/β -Hydrolasen rein phänomenologisch betrachtet; ein direkter Zusammenhang mit den katalytischen Eigenschaften dieser Enzyme wurde jedoch nicht identifiziert.

Basierend auf den strukturellen Unterschieden zwischen den GGGX- und den GX-Typ α/β -Hydrolasen wurde ein Computermodell entwickelt (Details finden sich in den Hintergrundinformationen). Ein tiefgehender Vergleich der strukturellen Daten der CRL mit inaktiven GX-Hydrolasen, z. B. der Lipase aus *Pseudomonas cepacia* (PCL), ergab, dass in Hydrolasen vom GX-Typ der Carbonylsauerstoff des X-Restes, z. B. Leucin in PCL, an der Stelle in die Bindungstasche ragt, an der das C $_{\alpha}$ des Alkoholrestes des Substrates inkorporiert wird (Abbildung 1a). Im Falle eines quartären C $_{\alpha}$, wie es in TAEs vorliegt, kommt es zu einer repulsiven Interaktion zwischen dem Carbonylsauerstoff und den sphärisch angeordneten Substituenten dieses C $_{\alpha}$. In CRL hingegen, sorgt die GGGX-Schleife aufgrund der kleinen H-Reste des Glycins für eine hochflexible Konformation (Abbildung 1b). Zusätzlich ist der Carbonylsauerstoff parallel zur Bindungstasche orientiert, sodass der Raum für einen voluminösen Rest wie eine tertiäre Alkylgruppe an dieser kritischen Stelle der Enzymstruktur ausreicht. Dieser Befund wurde zunächst durch Computersimulation der Substrat-Enzym-Komplexe mit Esterasen und Lipasen des GX- und GGGX-Typs und anschließend experimentell mit mehreren GGGX-Typ α/β -Hydrolasen verifiziert, die durch einen Vergleich von Aminosäuresequenzen in öffentlichen Datenbanken im Internet gefunden worden waren.

Von den so identifizierten Enzymen wurden Acetylcholinesterasen aus drei Spezies (aus dem Zitteraal, *Electrophorus electricus*, (eeAChE), einer Schlange, *Bungarus fasciatus*, (bAChE) und dem Menschen (hAChE)), zwei Carboxylesterasen (*p*-Nitrobenzylesterase aus *Bacillus subtilis* (BsubpNBE) und Schweineleberesterase (PLE)), und eine weitere Lipase (aus *Geotrichum candidum* (GCL)) auf ihre Aktivität in der Hydrolyse der Modellacetate **1–4** untersucht. PLE und eeAChE wurden als kommerziell erhältliche gefriergetrocknete Pulver eingesetzt; GCL,^[7] bAChE und hAChE^[8] wurden in der methylotrophen Hefe *Pichia pastoris* produziert. Das für BsubpNBE kodierende Gen wurde aus genomischer DNS von *B. subtilis* DSM 402 gewonnen und die Esterase in hohen Ausbeuten in *E. coli* exprimiert (Details hierzu finden sich in den Hintergrundinformationen).

Mit Ausnahme von GCL, hydrolysierten alle diese GGGX-Typ- α/β -Hydrolasen die Modellester (Tabelle 2). Lediglich eeAChE zeigte keine messbare Aktivität gegen *tert*-Butyl-

Tabelle 1. Vergleich der Abstände zwischen dem Proton des Histidins und dem Carbonylsauerstoff für die angegebenen Reste der Oxyanionbindungstasche (N $_{\epsilon}$, His-H-O $_{\text{Carb}}$) im aktiven Zentrum verschiedener GX- und GGGX-Typ- α/β -Hydrolasen.

Hydrolase	PDB-Code ^[a]	Typ	Reste der Oxyanionbindungstasche	N $_{\epsilon}$, His-H-O $_{\text{Carb}}$ [Å]
PCL	4LIP	GX	G L17	5.88
PAL	1EX9	GX	G M15	6.00
CVL	1CVL	GX	G L17	4.06
CAL-B	1TCA	GX	G T65	6.29
HLL	1TIB	GX	G S83	6.44
CRL	1LPM	GGGX	FGG G134 F	7.76
BsubpNBE	Homologiemodell	GGAX	FGG A107 F	7.67
hAChE	1CLJ	GGGX	YGG G122F	7.48
eeAChE	1C2B	GGGX	YGG G121 F	7.83
BACH	Homologiemodell	GGGX	YGG G123 F	7.25

[a]PDB = Protein Data Bank (<http://www.resb.org/pdb/>).

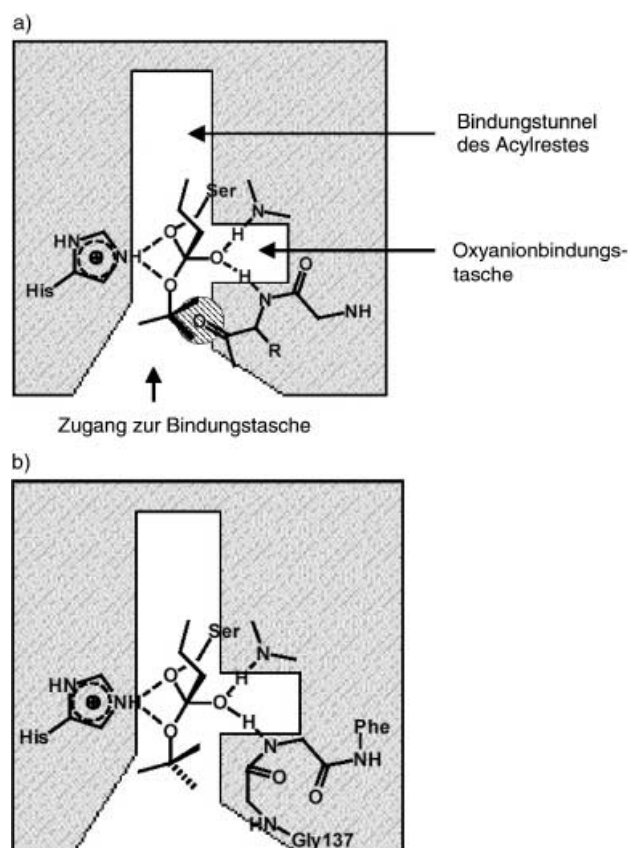


Abbildung 1. a) Schematische Darstellung der Bindungstasche von Hydrolasen des GX-Typs. Der Carbonylsauerstoff der Oxyanionbindungstasche zeigt in die Bindungstasche des Alkoholrestes. Die Interaktion dieses Sauerstoffs mit dem quaternären C_α des TAE verhindert eine adäquate Bindung des Substrates. b) Schematische Darstellung der Bindungstasche von Hydrolasen des GGGX-Typs. Das Carbonylgrundgerüst des flexiblen Triple-Glycinmotivs ist parallel zu der Wand angeordnet, die die Bindungstasche begrenzt. Dies führt zu einer erhöhten Fähigkeit, raumerfüllende Substrate zu binden.

acetat **1**. Allerdings war **1** auch ein schlechtes Substrat für die anderen Biokatalysatoren. Im Unterschied hierzu wurden die Verbindungen **2–4** mit hohen Raten hydrolysiert, wobei bis zu 77% Umsatz erzielt wurde (Tabelle 3). Die Aktivität von BsubpNBE für **4** wurde zu 3890 mU mg⁻¹ Protein berechnet; die der PLE-Präparation Chirazyme E-1 lag bei 1640 mU mg⁻¹ Protein und war folglich 17–20 mal höher als bei **1**. Obwohl die Aktivitäten und Umsätze hoch waren,

Tabelle 2. Aktivität von Hydrolasen gegenüber **1** im Vergleich zu natürlichen Substraten. Die Aktivitäten wurden mit pH-stat-Tests bei pH 7.5 und 40 °C (eeAChE: 25 °C) ermittelt.

Hydrolase	spez. Aktivität (natürliches Substrat) für 1 [mU mg ⁻¹ Protein]	spez. Aktivität für 1 [mU mg ⁻¹ Protein]
CRL (Amano AYS)	44 000 ^[a]	10
GCL-B	83 000 ^[a]	— ^[e]
EeAChE	200 000 ^[b]	— ^[e]
CAL-A (Chirazyme L5, Iyo)	117 000 ^[c]	50
PLE (Chirazyme E1, Iyo)	157 000 ^[d]	80
PLE (Chirazyme E2, Iyo)	103 000 ^[d]	160
BsubpNBE	170 000 ^[c]	230

[a] Triolein. [b] Acetylthiocholin. [c] Tributyrin. [d] Ethylbutyrat. [e] Keine Aktivität.

überstieg die Enantioselektivität aller Hydrolasen für **2–4** in keinem Fall $E = 10$ (bAChE) und lag meist im Bereich von $E = 1.5–4$ (Daten nicht gezeigt).

Ein weiterer Hinweis, dass das GGGX-Motiv entscheidend für die Aktivität gegenüber tertiären Alkoholen ist, zeigen Versuche Aktivität gegenüber TAEs durch gerichtete Evolution^[9] einer GX-Typ-Esterase zu generieren. Hierzu wurden Mutantenbibliotheken der Gene zweier Esterasen aus *Pseudomonas fluorescens*^[10] und *Bacillus stearothermophilus*^[11] durch fehlerhafte PCR^[12] und DNS-Shuffling^[13] erzeugt und die Proteine durch Expression unter einem starken Rhamnose-induzierbaren Promotor^[14] in *E. coli* hergestellt. Es konnten jedoch keine aktiven Mutanten im Screening einer Bibliothek von etwa 15 000 Esterasevarianten gefunden werden.

Wir konnten zeigen, dass das für einige Lipasen beschriebene GGGX-Motiv nicht nur eine Rolle in der Stabilisierung des tetraedrischen Intermediates während der Katalyse spielt, sondern die Aktivität gegenüber tertiären Alkoholen kontrolliert. Mit Ausnahme von GCL hydrolysierten alle untersuchten Esterasen und Lipasen, die ein GGGX-Motiv tragen, die Modellacetate. Für GCL vermuten wir, dass diese Lipase möglicherweise andere Ester tertiärer Alkohole umsetzen wird.

Die Sequenzhomologie der untersuchten GGGX-Typ-Hydrolasen, die aus Bakterien, Hefen und tierischen Quellen stammen, ist gering und nur kleine Bereiche um das GGGX-Motiv und das Serin des aktiven Zentrums sind konserviert. Dies spiegelt sich auch in den großen Unterschieden zwischen den natürlichen Substraten wider, die von diesen Hydrolasen

Tabelle 3. Aktivität von GGGX-Typ-Hydrolasen gegenüber den Substraten **2–4**. Die Reaktionen wurden bei pH 7.5 und 40 °C (AChEs 25 °C) durchgeführt.

Enzym ^[a]	Substrat					
	2		3		4	
	<i>t</i> [h]	Umsatz [%]	<i>t</i> [h]	Umsatz [%]	<i>t</i> [h]	Umsatz [%]
PLE, Chirazyme E-1, 390 U	2	53	8	48	0.5	50
PLE, Chirazyme E-2, 270 U	2	69	8	72	n.b. ^[b]	n.b. ^[b]
CRL-CLEC, 10 mg	2	56	8	23	0.5	77
hAChE, 37.5 U	24	17	48	5	4	39
eeAChE, 100 U	24	26	48	10	4	50
bAChE, 100 U	8	57	48	6	4	66
CAL-A, 480 U	24	41	48	71	2	59
BsubpNBE, 350 U	0.8	50	0.6	50	0.3	50

[a] Units verweisen auf die Aktivität gegenüber den natürlichen Substraten, vgl. Tabelle 2. [b] Nicht bestimmt.

akzeptiert werden.^[15] Dies bedeutet aber auch, dass die Kenntnis der üblichen biokatalytischen Aktivitäten dieser Enzyme nicht vermuten lässt, dass sie alle die Aktivität gegenüber tertiären Alkoholen gemeinsam haben. Darüber hinaus konnten wir bereits zeigen, dass unser Computermodell auch die Vorhersage des Einflusses von Mutationen erlaubt, die eine erhöhte und sogar umgekehrte Stereoselektivität in der Racematspaltung der Modellacetate aufweisen.^[16]

Experimentelles

Alle experimentellen Details finden sich in den Hintergrundinformationen.

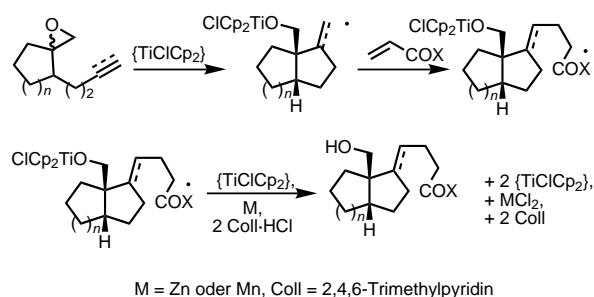
Eingegangen am 13. Januar 2002 [Z18885]

- [1] U. T. Bornscheuer, R. J. Kazlauskas, *Hydrolases in Organic Synthesis—Regio- and Stereoselective Biotransformations*, Wiley-VCH, Weinheim, **1999**.
- [2] A. Liese, K. Seelbach, C. Wandrey, *Industrial Biotransformations*, Wiley-VCH, Weinheim, **2000**.
- [3] A. J. Blacker, R. A. Holt Zeneca Ltd., Int. Patent Application WO 94/24305 **1994**.
- [4] a) M. Pogorevc, U. T. Strauss, M. Hayn, K. Faber, *Monatsh. Chem.* **2000**, *131*, 639–644; b) A. Schlacher, T. Stanzer, J. Osprian, M. Mischitz, E. Klingsbichel, K. Faber, H. Schwab, *J. Biotechnol.* **1998**, *62*, 47–54; c) D. O'Hagan, N. A. Zaidi, *Tetrahedron: Asymmetry* **1994**, *5*, 1111–1118; d) D. O'Hagan, N. A. Zaidi, *J. Chem. Soc. Perkin Trans. I* **1992**, 947–948; e) J. A. Bosley, J. Casey, A. R. Macrae, G. MyCock, US Patent Application US 5,658,769 **1997**.
- [5] D. L. Ollis, E. Cheah, M. Cygler, B. Dijkstra, F. Frolow, S. Franken, M. Harel, S. J. Remington, I. Silman, *Protein Eng.* **1992**, *5*, 197–211.
- [6] J. Pleiss, M. Fischer, M. Peiker, C. Thiele, R. D. Schmid, *J. Mol. Catal. B* **2000**, *10*, 491–508. Das GGGX-Motiv enthält mitunter ein Alanin (GGAX) anstelle eines Glycins, wie es in Tabelle 1 für BsubpNBE gezeigt ist.
- [7] E. Catoni, C. Schmidt-Dannert, S. Brocca, R. D. Schmid, *Biotechnol. Tech.* **1997**, *11*, 689–695.
- [8] S. Vorlova, J. Schmitt, R. D. Schmid, *Adv. Synth. Catal.*, eingereicht.
- [9] a) U. T. Bornscheuer, M. Pohl, *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2001**, *5*, 137–143; b) M. T. Reetz, *Angew. Chem.* **2001**, *113*, 292–320; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2001**, *40*, 284–310; c) F. H. Arnold, A. A. Volkov, *Curr. Opin. Chem. Biol.* **1999**, *3*, 54–59.
- [10] N. Krebsfänger, K. Schierholz, U. T. Bornscheuer, *J. Biotechnol.* **1998**, *60*, 105–111.
- [11] Y. Amaki, E. E. Tulin, S. Ueda, K. Ohmiya, T. Yamane, *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **1992**, *56*, 238–241.
- [12] J.-P. Vartanian, M. Henry, S. Wain-Hobson, *Nucleic Acids Res.* **1996**, *24*, 2627–2631.
- [13] a) W. P. C. Stemmer, *Nature* **1994**, *370*, 389–391; b) H. Zhao, F. H. Arnold, *Nucleic Acids Res.* **1997**, *25*, 1307–1308.
- [14] T. Stumpp, B. Wilms, J. Altenbuchner, *BIOspektrum* **2000**, *6*, 33–36.
- [15] a) R. D. Schmid, R. Verger, *Angew. Chem.* **1998**, *110*, 1694–1720; *Angew. Chem. Int. Ed.* **1998**, *37*, 1608–1633; b) R. Verger, *Trends Biotechnol.* **1997**, *15*, 32–38.
- [16] E. Henke, U. T. Bornscheuer, J. Pleiss, noch unveröffentlichte Ergebnisse.

Stereoselektive Synthese von tri- und tetrasubstituierten Olefinen durch Domino-Cyclisierungs-Additions-Reaktionen mit Vinylradikalen**

Andreas Gansäuer,* Marianna Pierobon und Harald Bluhm

Für die Synthese sind solche Reaktionen attraktiv, die durch Umwandlung von einfachen Edukten mit hoher Massenübertragung unter katalytischen Bedingungen zu komplexen Molekülen führen.^[1] Eine in dieser Hinsicht vielversprechende Reaktion ist die Kombination unserer Titanocen-katalysierten Cyclisierung^[2] von geeigneten ungesättigten Epoxiden mit intermolekularen Additionen an α,β -ungesättigte Carbonylverbindungen (Schema 1).^[3] Hieraus resultiert eine Umwandlung durch eine radikalische Domino-Reaktion mit einer Cyclisierungs-Additions-Sequenz.^[4] Ein



Schema 1. Allgemeines Konzept der Titanocen-katalysierten Domino-Reaktionen mit Vinylradikalen.

besonderer Aspekt der Reaktion liegt in der Möglichkeit, Vinylradikale als Zwischenstufe für die intermolekulare Synthese von Olefinen zu erzeugen. Nach unserem Kenntnisstand wurde diese letzte Umwandlung bislang nur selten zur stereoselektiven Herstellung tetrasubstituierter Alkene eingesetzt. Bisher ist lediglich die Verwendung von tributylstannyl- und phenylselenylsubstituierten Vinylradikalen beschrieben.^[5]

Wir begannen unsere Untersuchungen mit Olefinen als Radikalacceptoren in Cyclisierungen. Einige unserer Resultate sind in Tabelle 1 zusammengefasst. Die Synthese der Epoxide erfolgte nach Lit. [2e]

Es zeigte sich, dass nach der Domino-Reaktion die gewünschten Produkte isoliert werden konnten. Größere Mengen des nicht gewünschten Produkts der intermolekularen Addition ohne Cyclisierung (13%) wurden einzig mit **3**

[*] Prof. Dr. A. Gansäuer, Dr. M. Pierobon, Dr. H. Bluhm
Kekulé-Institut für Organische Chemie und Biochemie
Universität Bonn
Gerhard-Domagk-Straße 1, 53127 Bonn (Deutschland)
Fax: (+49) 228-73-4760
E-mail: andreas.gansaueuer@uni-bonn.de

[**] Wir danken der Deutschen Forschungsgemeinschaft (Gerhard-Hess-Programm) für die finanzielle Unterstützung.

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