

Wir haben den Rezeptor **1** so weiterentwickelt, daß er auch Dinucleotide binden kann^[15]. Moleküle wie **1** sollten auch den Transport von Nucleotiden durch Membranen ermöglichen^[16].

Eingegangen am 12. August 1991 [Z 4867]

- [1] J. Rebek, Jr., *Angew. Chem.* **1990**, *102*, 261–272; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1990**, *29*, 245–255, zit. Lit.
- [2] A. D. Hamilton, D. van Engen, *J. Am. Chem. Soc.* **1987**, *109*, 5035–5036.
- [3] T. R. Kelly, M. P. Maguire, *J. Am. Chem. Soc.* **1987**, *109*, 6549–6551.
- [4] J. C. Medina, C. Li, S. G. Bott, J. L. Atwood, G. W. Gokel, *J. Am. Chem. Soc.* **1991**, *113*, 366–367.
- [5] Y. Kikuchi, Y. Kato, Y. Tanaka, H. Toi, Y. Aoyama, *J. Am. Chem. Soc.* **1991**, *113*, 1349–1354.
- [6] R. P. Bonar-Law, A. P. Davis, B. A. Murray, *Angew. Chem.* **1990**, *102*, 1497–1499; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1990**, *29*, 1407–1408.
- [7] F. P. Schmidtchen, *Tetrahedron Lett.* **1989**, *30*, 4493–4496; H. Kurzmeier, F. P. Schmidtchen, *J. Org. Chem.* **1990**, *55*, 3749.
- [8] W. Hosseini, A. J. Blacker, J.-M. Lehn, *J. Am. Chem. Soc.* **1990**, *112*, 3896–3904.
- [9] A. Galán, E. Pueyo, A. Salmerón, J. de Mendoza, *Tetrahedron Lett.* **1991**, *32*, 1827–1830.
- [10] A. Echavarren, A. Galán, J.-M. Lehn, J. de Mendoza, *J. Am. Chem. Soc.* **1989**, *111*, 4994–4995.
- [11] K. S. Jeong, T. Tjivikua, A. Muehldorf, G. Deslongchamps, M. Famulok, J. Rebek, Jr., *J. Am. Chem. Soc.* **1991**, *113*, 201–209.
- [12] Alle neuen Verbindungen wurden durch einen vollständigen Satz von hochaufgelösten Spektren charakterisiert. Der Rezeptor zeigt in deuteriertem Dimethylsulfoxid ($[D_6]DMSO$) in den bei den Versuchen benutzten Konzentrationen (10^{-2} bis 10^{-5} M) keine Tendenz zur Aggregation.
- [13] W. Saenger, *Principles of Nucleic Acid Structure*, Springer, New York, **1984**, Kap. 6.
- [14] A. R. Fersht, J.-P. Shi, J. Knill-Jones, D. M. Lowe, A. J. Wilkinson, D. M. Blow, P. Brick, P. Carter, M. M. Waye, G. Winter, *Nature* **1985**, *314*, 235–239.
- [15] A. Galán, J. de Mendoza, C. Toiron, M. Bruix, G. Deslongchamps, J. Rebek, Jr., *J. Am. Chem. Soc.* **1991**, *113*, 9424–9425.
- [16] Zu Fortschritten beim Transport von Nucleosiden und Nucleotiden siehe: H. Furuta, K. Furuta, J. L. Sessler, *J. Am. Chem. Soc.* **1991**, *113*, 4706–4707; H. Furuta, M. J. Cyr, J. L. Sessler, *ibid.* **1991**, *113*, 6677–6678.

Bildung eines toxischen Dimerisierungsproduktes aus 3,4-Dichloranilin durch Lignin-Peroxidase von *Phanerochaete chrysosporium* **

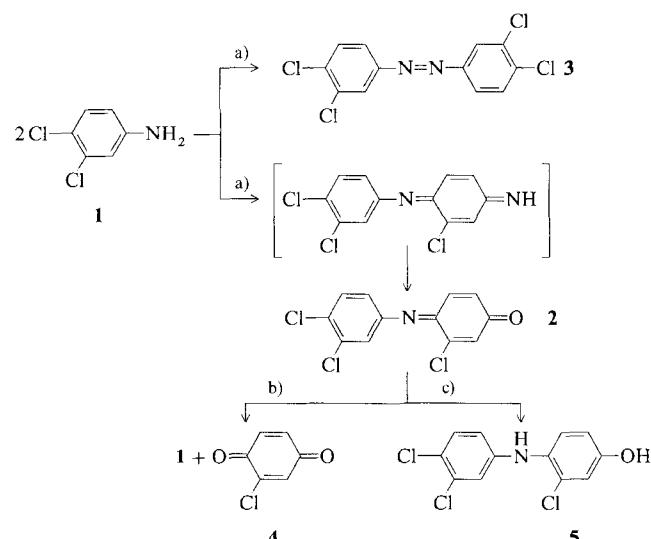
Von Dietmar Helmut Pieper, Reinhard Winkler und Heinrich Sandermann, Jr.*

Vor nunmehr sechs Jahren wurde entdeckt, daß der auf den Ligninabbau spezialisierte Weißfäulepilz, *Phanerochaete chrysosporium*, die ungewöhnliche Fähigkeit hat, freie chlorierte Kohlenwasserstoffe und freie sowie Lignin-gebundene chlorierte Aniline zu metabolisieren und zum Teil in beträchtlichem Maße (bis zu CO_2) abzubauen^[1]. Seither beschäftigt sich eine Reihe von Arbeitsgruppen mit dem möglichen Einsatz des Pilzes zur biologischen Dekontaminierung^[2]. Häufig vermutet man, daß extrazelluläre Lignin-Peroxidasen (Ligninase) am Abbau von Fremdstoffen beteiligt sind. Hierfür ergaben sich im Fall von Benzo[a]pyren und von chlorierten Phenolen experimentelle Hinweise^[3], nicht aber im Fall der Mineralisierung von DDT (1,1,1-Trichlor-2,2-bis(4-chlorphenyl)ethan) oder von chlorierten Anilinen^[4]. Wir haben jetzt als Ergänzung unserer früheren in-vivo-Untersuchungen^[1b, 5] den Umsatz von 3,4-Dichloranilin **1** durch die Lignin-Peroxidase von *P. chrysosporium*

[*] Prof. Dr. H. Sandermann, Dr. D. H. Pieper, Dr. R. Winkler
GSF-Forschungszentrum für Umwelt und Gesundheit
GmbH Institut für Biochemische Pflanzenpathologie
Ingolstädter Landstraße 1, W-8042 Neuherberg

[**] Diese Arbeit wurde von der Deutschen Forschungsgemeinschaft (Sa 180/15-5), dem Bundesministerium für Forschung und Technologie (PBE 038657) und dem Fonds der Chemischen Industrie gefördert.

geprüft. Dabei bildete sich die dem 2,3,7,8-Tetrachlor-*p*-dibenzodioxin in Struktur und Toxizität vergleichbare Verbindung 3,4,3',4'-Tetrachlorazobenzol **3**^[6].



Schema 1. Umwandlung von 3,4-Dichloranilin **1** zum toxischen 3,4,3',4'-Tetrachlorazobenzol **3** sowie 2,3,4'-Trichlor-4-hydroxydiphenylamin **5**.
a) Ligninase, b) Säurekatalyse, c) Ascorbinsäure.

Ein Lignin-Peroxidase-Präparat wurde aus dem Kulturerstand von unter kohlenstofflimitierten Bedingungen wachsendem Mycel von *P. chrysosporium*^[7] gewonnen und durch Ultrafiltration und mehrmaliges Waschen mit Tartratpuffer von Begleitkomponenten des Nährmediums gereinigt^[8]. Die Umsatzgeschwindigkeit von **1** durch dieses Rohpräparat betrug in Tartratpuffer (50 mM, pH 3.2) ca. 30 % derjenigen des Standardsubstrates Veratrylalkohol^[8].

Die nach vollständigem Umsatz von **1** (1 mL einer 100 mM Lösung nach 20 min Inkubation mit 0.02 U Lignin-Peroxidase) gebildeten Produkte wurden zunächst einer Umkehrphasen-HPLC-Analyse mit Gradientenelution auf einer analytischen Säule unterzogen. Zur Vermeidung von Artefakten wurden die Proben direkt injiziert^[9]. Die Analyse zeigte, daß sich verschiedene unpolare Produkte bildeten (Nettoretentionsvolumen von **1**: 2.9 mL; Nettoretentionsvolumina der Produkte > 6 mL), ein Hinweis auf Oligomerisierungsreaktionen. Um die Reaktion durch Radioaktivitätsdetektion quantifizieren zu können, wurde $[^{14}C]$ -3,4-Dichloranilin als Ausgangsverbindung eingesetzt. Bei der HPLC-Trennung wurde zuerst **1** eluiert. Etwa 95 % der eingesetzten Radioaktivität wurde in den folgenden Eluaten gefunden, und zwar 60 % beim Hauptprodukt **2** (Nettoretentionsvolumen, 7.6 mL) und 15 % beim Produkt **3** (Nettoretentionsvolumen, 14.3 mL). Polare Produkte entstanden, im Gegensatz zu in-vitro-Untersuchungen an Benzo[a]pyren und chlorsubstituierten Phenolen^[3], nicht.

Der Umsatz von **1** in präparativem Maßstab (1 mmol) erfolgte trotz der sehr geringen Pufferkapazität in Phosphatpuffer (500 mM, pH 3.2), um eine Überladung der präparativen HPLC-Säule durch extrahierbaren Tartratpuffer zu vermeiden. Hierzu wurde 1 L einer 1 mM Lösung von **1** mit Lignin-Peroxidase entsprechend einer Gesamtaktivität von 18 U, bezogen auf den Umsatz von Veratrylalkohol, versetzt, und die Reaktion durch Zugabe von H_2O_2 in Konzentrationsschritten von jeweils 40 μ M gestartet. Nach vollständigem Umsatz von **1** wurde das Reaktionsgemisch mit Ethylacetat extrahiert und das eingeengte Extrakt nach Lösen in Acetonitril zur Reinigung von **2** und **3** einer präparativen HPLC-Trennung^[10] unterzogen. Hierdurch konnten **2** und **3** gereinigt werden.

3 wurde mit UV/VIS- und ^1H -NMR-Spektroskopie eindeutig als 3,4,3',4'-Tetrachlorazobenzol identifiziert^[11]. **2** erwies sich als relativ instabil. Durch Säurekatalyse (Zugabe von HCl zu einer Endkonzentration von 0.5 M) erfolgte eine rasche Spaltung von **2** in **1** und 2-Chlor-*p*-benzochinon **4**.

Die Zugabe von Ascorbinsäure zu **2** bewirkte eine quantitative Umwandlung zu **5** (Nettoretentionsvolumen unter analytischen HPLC-Bedingungen^[19], 6.6 mL); diese Umwandlung zu **5** konnte auch als spontane Reaktion nachgewiesen werden. Massenspektrum und hochauflösendes Massenspektrum der durch präparative HPLC gereinigten Verbindung **5** belegen die Summenformel $\text{C}_{12}\text{H}_8\text{OCl}_3\text{N}^{[12]}$. Das ^1H -NMR-Spektrum deutet darauf hin, daß **5** die bisher in der Literatur nicht beschriebene Verbindung 2,3',4'-Trichlor-4-hydroxydiphenylamin ist^[13]. Die toxikologischen Eigenschaften sind unbekannt.

Die zur Bildung von **5** führenden Reaktionsschritte lassen sich aus literaturbekannten Synthesen ableiten. Die aus **1** durch Lignin-Peroxidase gebildeten Radikale sollten über eine *N*-*para*-Kopplung zu *N*-(3',4'-Dichlorphenyl)-*p*-2-chlorbenzochinonidimin abreagieren. Ein analoges Dimer wurde als Metabolit einer durch Peroxidase katalysierten Umwandlung von 4-Chloranilin schon beschrieben^[14]. Durch spontane Hydrolyse wurde dort das korrespondierende Chinonimin gebildet.

Daß Verbindung **2** zur Substanzklasse der Chinonmonoimine gehört, zeigt der spontane Zerfall zu **1** und **4** unter Säureeinfluß^[15]. Die Reduktion von **2** durch Ascorbinsäure führte folgerichtig zur Bildung von **5** (siehe Schema 1).

Die vorliegenden Ergebnisse zeigen, daß die enzymatische Aktivität der Lignin-Peroxidase gegenüber **1** mit guter Ausbeute zur Bildung der hochtoxischen Verbindung **3** führt. Ausbeuten zwischen 10 und 15 % an **3** wurden bei verschiedenen pH-Werten (2.5–4.5), Konzentrationen von **1** (10–200 μM) und Puffersystemen (Tartrat-, Dimethylsuccinat- und Citratpuffer) erreicht. Die Bildung von **3** aus **1** wurde mit Peroxidase-Präparaten schon früher qualitativ nachgewiesen^[16]. Auch die Synthese von chlorierten Dibenzodioxinen und Dibenzofuranen aus Chlorphenolen wurde durch Peroxidasen in geringer Ausbeute katalysiert^[17].

In früheren Untersuchungen^[1b, 5] war unter den gewählten Kulturbedingungen die Bildung von **3** aus **1** *in vivo* nicht nachweisbar. Dies resultiert aus einer inzwischen nachgewiesenen, schnellen Konjugatbildung, die **1** dem Umsatz durch Lignin-Peroxidase weitgehend entzieht. Das gleichzeitige Vorhandensein toxifizierender und detoxifizierender Konkurrenzreaktionen erfordert eine genaue Kontrolle der Reaktionsbedingungen bei biotechnologischen Anwendungen des Weißfäulepilzes.

Eingegangen am 7. August 1991 [Z 4857]

CAS-Registry-Nummern:

1, 95-76-1; 3, 14047-09-7; **4**, 695-99-8; Lignin-Peroxidase, 42613-30-9.

- [1] a) J. A. Bumpus, M. Tien, D. Wright, S. D. Aust, *Science* **1985**, *228*, 1434–1436; D. C. Eaton, *Enzyme Microb. Technol.* **1985**, *7*, 194–196; b) M. Arjmand, H. Sandermann, Jr., *J. Agric. Food Chem.* **1985**, *33*, 1055–1060.
- [2] J. A. Bumpus, *Appl. Environ. Microbiol.* **1989**, *56*, 154–158; R. T. Lamar, M. J. Larsen, T. K. Kirk, *ibid.* **1990**, *56*, 3519–3526.
- [3] S. D. Haemmerli, M. S. A. Leisola, D. Sanglard, A. Fiechter, *J. Biol. Chem.* **1986**, *261*, 6900–6903; K. E. Hammel, P. J. Tardone, *Biochemistry* **1988**, *27*, 6563–6568; K. Valli, M. H. Gold, *J. Bacteriol.* **1991**, *173*, 345–352.
- [4] a) A. Köhler, A. Jäger, H. Willershausen, H. Graf, *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **1988**, *29*, 618–620; b) R. Winkler, H. Sandermann, *Int. Congr. Pestic. Chem. 7th* **1990**, Abstract Nr. 06C–03.
- [5] M. Arjmand, H. Sandermann, *Z. Naturforsch. C* **1986**, *41*, 206–214.
- [6] A. Poland, J. C. Knutson, *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* **1982**, *22*, 517–554; J. V. Pothuluri, J. A. Hinson, C. E. Cerniglia, *J. Environ. Qual.* **1991**, *20*, 330–347.

- [7] Die Anzucht in kohlenstofflimitierten agierten Kulturen erfolgte nach A. Jaeger, S. Croan, T. K. Kirk, *Appl. Environ. Microbiol.* **1985**, *50*, 1274–1278.
- [8] Enzymisolierung und Enzymtests mit Veratrylalkohol als Testsubstrat wurden wie in [4a] oder wie von M. Tien, T. K. Kirk, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1984**, *81*, 2280–2284 beschrieben durchgeführt. Zur Bestimmung der Umsatzgeschwindigkeit von **1** wurden 1 mL einer 50–200 μM Lösung mit 5×10^{-3} – 2×10^{-2} U Ligninase und 40 μM H_2O_2 versetzt und der Substratumsatz mit Umkehrphasen-HPLC auf einer analytischen Säule (Lichrosphere RP8, 5 μm , 4 \times 125 mm, UV-Detektion bei 210 nm) verfolgt. Bei isokratischer Elution mit saurem (0.1 % Phosphorsäure) wäßrigem Acetonitril (54 %) betrug das Nettoretentionsvolumen 2.9 mL.
- [9] Trennsäule Lichrosphere RP8, 5 μm , 4 \times 125 mm, UV-Detektion bei 210 und 254 nm. Die Elution (Flußrate 1 mL pro min) erfolgte mit saurem (0.1 % Phosphorsäure) wäßrigem Fließmittel zunächst über 3 Minuten isokratisch (54 % Acetonitril) mit anschließendem linearen Gradienten über 7 min auf 90 % Acetonitril und folgender isokratischer Elution mit 90 % Acetonitril.
- [10] Trennsäule Lichrosphere RP8, 5 μm , 16 \times 250 mm, UV-Detektion bei 340 nm. Eluent: mit Phosphorsäure (0.1 %) angesäuertes wäßriges Fließmittel, linearer Gradient über 5 min von 45 auf 55 % Acetonitril mit folgendem Gradienten über 10 min von 55 auf 90 % Acetonitril und anschließender isokratischer Elution mit 90 % Acetonitril; Flußrate, 7 mL pro min.
- [11] UV/VIS (Methanol): λ_{max} [nm] ($\log \varepsilon$) = 239 (4.28), 330 (4.36), vergleiche H. A. B. Linke, D. Pramer, *Z. Naturforschung. B* **1969**, *24*, 997–999. ^1H -NMR ($[\text{D}_6]\text{Aceton}$): δ = 7.97 (dd, 2 H, J = 2.2, 8.6 Hz), 8.12 (d, 2 H, J = 2.2 Hz), 18.85 (d, 2 H, J = 8.6 Hz) siehe auch M. T. S. Hsia, C. F. Burant, *J. Assoc. Off. Anal. Chem.* **1979**, *62*, 746–750. Diese Daten sprechen für die Übereinstimmung mit dem *trans*-Isomer.
- [12] Hochauflösende MS: m/z 286.9675 (berechnet für $^{12}\text{C}_{12}^{1}\text{H}_8^{25}\text{Cl}_3^{4}\text{N}^{16}\text{O}$: m/z 286.9671) MS (70 eV): m/z (%) 294 (2), 293 (7), 292 (18), 291 (38), 290 (53), 289 (100), 288 (59), 287 (96), 255 (1), 254 (2), 253 (5), 252 (4), 251 (6), 220 (15), 219 (33), 218 (46), 217 (75).
- [13] ^1H -NMR ($[\text{D}_6]\text{Aceton}$): δ = 6.76 (dd, 1 H, J = 2.7, 8.8 Hz), 6.86 (dd, 1 H, J = 2.7, 8.8 Hz), 6.90 (d, 1 H, J = 2.7 Hz), 7.00 (d, 1 H, J = 2.7 Hz), 7.25 (d, 1 H, J = 8.6 Hz), 7.30 (d, 1 H, J = 8.6 Hz); UV/VIS (Methanol): λ_{max} [nm] ($\log \varepsilon$) = 212 (4.82), 281 (4.52), 493 (1.90).
- [14] K. E. Simmons, R. D. Minard, A. J. Freyer, J.-M. Bollag, *Int. J. Environ. Anal. Chem.* **1986**, *26*, 209–227; K. E. Simmons, R. D. Minard, J.-M. Bollag, *Environ. Sci. Technol.* **1987**, *21*, 999–1003.
- [15] B. C. Saunders, A. G. Holmes-Siedle, B. P. Stark, *Peroxidase*, Butterworth, Washington D. C., **1964**, S. 14.
- [16] H. B. Lieb, C. C. Still, *Plant Physiol.* **1969**, *44*, 1672–1673; L. M. Bordeleau, R. Bartha, *Can. J. Microbiol.* **1972**, *18*, 1873–1882.
- [17] A. Svenson, L.-O. Kjeller, C. Rappe, *Environ. Sci. Technol.* **1989**, *23*, 900–902; L. G. Öberg, B. Glas, S. E. Swanson, C. Rappe, K. G. Paul, *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* **1990**, *19*, 930–938; H.-C. Wagner, K.-W. Schramm, O. Hutzinger, *Z. Umweltchem. Ökotoxikol.* **1990**, *2*, 63–65.

Unerwartete oxidative Ringöffnung eines (Octadehydrocorrinato)nickel(II)-Salzes zu einem Chlorophin-Derivat **

Von Chi K. Chang*, Weishih Wu, Shuenn-Shing Chern und Shee-Ming Peng*

Vor kurzem wurde gezeigt, daß in d-Typ-Cytochromen *vic*-Dihydroxychlorin oder dessen Lacton als Häm-prosthetische Gruppe vorhanden ist^[1]. Die Diolstruktur läßt vermuten, daß diese grünen Häm-Verbindungen biosynthetisch durch Epoxidierung der β - β -Doppelbindung des Porphyrins entstehen. Bei der Suche nach einem solchen Epoxychlorin untersuch-

[*] Prof. C. K. Chang, Dr. W. Wu
Department of Chemistry
Michigan State University
East Lansing, MI 48824 (USA)
Prof. S.-M. Peng, S.-S. Chern
Department of Chemistry
National Taiwan University
Taipei (Taiwan)

[**] Diese Arbeit wurde von den National Institutes of Health (GM 34468 und GM 36 520) an der Michigan State University und vom National Science Council (NSC) der Republik China (NSC80-0208-M002-58) gefördert. C. K. C. dankt dem NSC und der National Taiwan University für die Gastprofessur.