

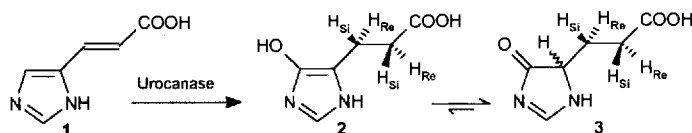
- [18] E. J. Moore, J. M. Sullivan, J. R. Norton, *J. Am. Chem. Soc.* **1986**, *108*, 2257–2263.
- [19] W. J. Sartain, J. P. Selegue, *Organometallics* **1987**, *6*, 1812–1815. Die Metall-Acidität von  $[(R_2N)_3Ti]^+$  läßt sich steigern, beispielsweise durch Verwendung von *N*-Silyl- und *N*-Arylamidoliganden: S. Friedrich, H. Memmler, L. H. Gade, W.-S. Li, M. McPartlin, *Angew. Chem.* **1994**, *106*, 705–708; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1994**, *33*, 676–678.
- [20] D. S. Williams, R. R. Schrock, *Organometallics* **1993**, *12*, 1148–1160.
- [21] G. Parkin, A. van Asselt, D. J. Leahy, L. Winnery, N. G. Hua, R. W. Quan, L. M. Henling, W. P. Schaefer, B. D. Santarsiero, J. E. Bercaw, *Inorg. Chem.* **1992**, *31*, 82–85.
- [22] A. N. Chernega, M. L. H. Green, A. G. Suárez, *J. Chem. Soc. Dalton Trans.* **1993**, 3031–3034.
- [23] S. R. Huber, T. C. Baldwin, D. E. Wigley, *Organometallics* **1993**, *12*, 91–97.
- [24] W. A. Nugent, R. J. McKinney, R. V. Kasdovski, F. A. Van-Catledge, *Inorg. Chim. Acta* **1982**, *65*, L91–L93.

## Zum Mechanismus der Urocanase-Reaktion: Bestätigung der Struktur des $NAD^+$ -Inhibitor- Adduktes durch direkte $^{13}C$ - $^{13}C$ -Kopplung\*\*

Carsten Schubert, Ymin Zhao, Jung-Hyn Shin und  
János Rétey\*

Professor Joachim Knappe zum 65. Geburtstag gewidmet

In Oxidoreduktasen fungiert das Nicotinamadeninindinucleotid ( $NAD^+$ ) als Redoxreagens. Eine andere, bis jetzt einzigartige Rolle als Elektrophil übernimmt es in der Urocanase-Reaktion (Schema 1). Urocanase (E.C. 4.2.1.49) kommt in den meisten



Schema 1. Sterischer Verlauf der Urocanase-Reaktion. Die Protonen aus dem Lösungsmittel werden an die *Re*-Positionen der Seitenkette addiert.

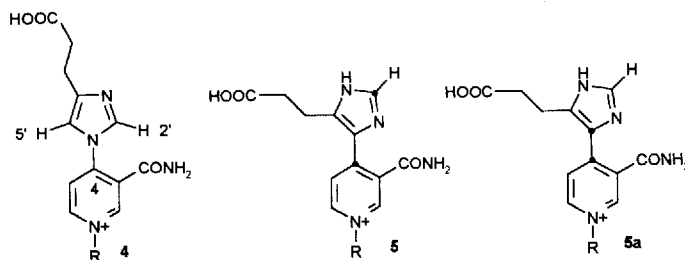
Zellen vor und katalysiert den zweiten Schritt im Abbau des Histidins. Dabei wird ein Wassermolekül auf eine ungewöhnliche Art an Urocaninsäure **1** addiert. Insbesondere die Anknüpfung eines  $OH^-$ -Ions an den elektronenreichen Imidazolring scheint chemisch unplausibel zu sein. Bei diesem Schritt spielt das fest an das Enzym gebundene  $NAD^+$  eine entscheidende Rolle. Unter Einsatz des kompetitiven Inhibitors Imidazolpropionsäure **6** konnte nach Rearomatisierung ein  $NAD^+$ -Inhibitor-Addukt isoliert werden, dem zunächst Struktur **4**<sup>[1]</sup> zugeschrieben wurde. Die Bindung des  $NAD^+$  an den Inhibitor sollte hierbei über das  $N1'$ -Atom der Imidazoleinheit erfolgen (Schema 2).

[\*] Prof. Dr. J. Rétey, Dipl.-Chem. C. Schubert, Dr. Y. Zhao<sup>1+1</sup>, Prof. Dr. J.-H. Shin<sup>1+1</sup>  
Lehrstuhl für Biochemie im Institut für Organische Chemie der Universität  
Richard-Willstätter-Allee, D-76128 Karlsruhe  
Telefax: Int. +721/608-4823

[†] Gegenwärtige Adresse: Xiao-qu-deng-long 6, Dong-cheng-qu, 100010 Beijing (Volksrepublik China)

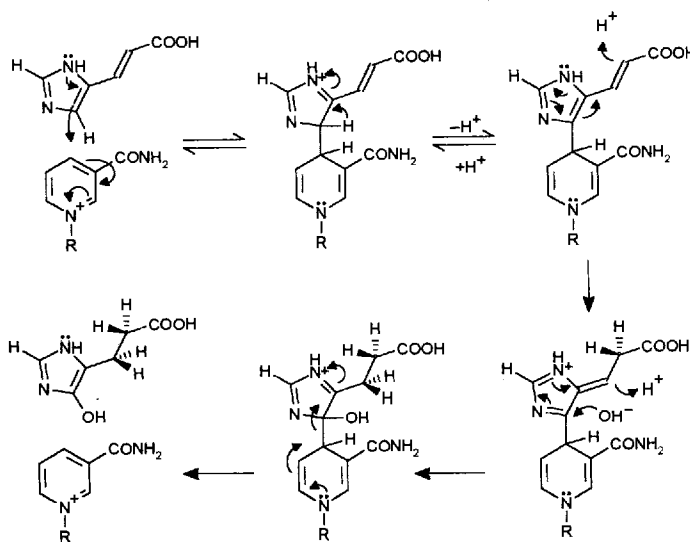
[+ ] Gegenwärtige Adresse: Department of Chemistry,  
Seoul National University Seoul 151-742 (Korea)

[\*\*] Diese Arbeit wurde von der Deutschen Forschungsgemeinschaft und dem Fonds der Chemischen Industrie gefördert. Für das 600 MHz- $^1H$ -NMR-Spektrum danken wir Dr. M. Spraul, Bruker Analytische Messtechnik GmbH, Rheinstetten/Karlsruhe. Dr. H. Röttele danken wir für das  $^{13}C$ -NMR-Spektrum des Addukts, Frau J. Herman für die Hilfe bei der Enzymisolierung und Dr. M. Lenz für den überexprimierenden Urocanase-Klon aus *E. coli*.



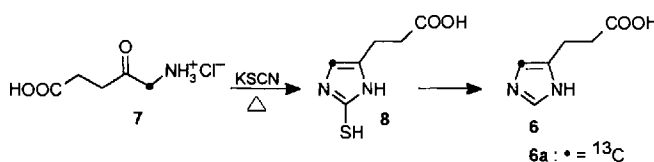
Schema 2. Strukturvorschläge für das  $NAD^+$ -Imidazolpropionsäure-Addukt ( $^{13}C$ -Markierung durch Punkte angedeutet). R = ADP-Ribosyl.

In der durch UV-Spektroskopie gestützten Annahme<sup>[1, 2]</sup>, daß Urocaninsäure in den Anfangsschritten der Reaktion das analoge kovalente Addukt bildet, wurde für die Reaktion ein Mechanismus vorgeschlagen<sup>[3]</sup>, der aber das erwähnte chemische Problem nicht löste. Weiterhin fehlte in dem  $^1H$ -NMR-Spektrum des Adduktes ein Signal für die Imidazolprotonen, was die Autoren mit einem spontanen Austausch des  $2'$ -H-Atoms mit Deuterium aus dem Lösungsmittel erklärten<sup>[1]</sup>. Klepp et al.<sup>[4]</sup> postulierten daraufhin Struktur **5** und belegten diese mit den experimentellen Befunden des in den Positionen  $2'$  (Imidazol) und **4** (Nicotinamid) spezifisch  $^{13}C$ -markierten Addukts. Somit konnte ein plausibler Mechanismus für die Urocanase-Reaktion formuliert werden (Schema 3).



Schema 3. Vorgeschlagener Mechanismus für die Urocanase-Reaktion. R = ADP-Ribosyl.

Einen endgültigen Beweis für Struktur **5** würde ein Nachweis der direkten  $^{13}C$ - $^{13}C$ -Kopplung im doppelt  $^{13}C$ -markierten Addukt **5a** liefern. Hier beschreiben wir die Synthese der  $[5'-^{13}C]$ -Imidazolpropionsäure **6a** sowie die Isolierung und die NMR-spektroskopische Charakterisierung des daraus enzymatisch gebildeten Adduktes **5a**. Die bereits bekannte 5-Amino- $[5-^{13}C]$ -lävulinsäure · HCl **7** wurde als ein geeigneter Vorläufer von **6a**



nach der Vorschrift von Pfaltz et al.<sup>[5]</sup> aus Cu<sup>I</sup> [<sup>13</sup>C]N (99% <sup>13</sup>C)<sup>[6]</sup> und 3-Chlorformylpropionsäuremethylester synthetisiert. Der Ringschluß zum Imidazolthiol **8** erfolgte durch Kondensation von **7** mit KSCN<sup>[7]</sup>. Anschließend Oxidation mit Fe<sub>2</sub>(SO<sub>4</sub>)<sub>3</sub><sup>[8]</sup> und Ionenaustauschchromatographie (Dowex 50W X 4, H<sup>+</sup>-Form) führten zum gewünschten Produkt **6a** (Tabelle 1). [4-<sup>13</sup>C]Nicotinsäure (99% <sup>13</sup>C) wurde nach der Vorschrift von Oberfrank et al.<sup>[9]</sup> synthetisiert und biosynthetisch in die Urocanase eingebaut<sup>[4]</sup>. Die Fermentation von *Pseudomonas putida* nic II (eine Nicotinsäure-auxotrophe Mutante), die Isolierung des markierten Enzyms und die enzymatische Bildung des NAD<sup>+</sup>-Imidazolpropionsäure-Adduktes erfolgten wie von Klepp et al. beschrieben<sup>[4]</sup>. 250 mg (2.03 µmol) <sup>13</sup>C-markierte Urocanase und 48 mg (300 µmol) [5'-<sup>13</sup>C]Imidazolpropionsäure · HCl wurden dabei eingesetzt.

Tabelle 1. Spektroskopische Daten für die Verbindungen **5a** und **6a**. NMR-Spektren in D<sub>2</sub>O, Natrium-3-trimethylsilyl-[<sup>2</sup>H<sub>5</sub>]propionat (TSP) als Standard für <sup>1</sup>H-, externe Dioxan-Referenz (δ = 68.0) als Standard für <sup>13</sup>C-NMR-Spektren. A bezeichnet Positionen im Adeninrest, α und β beziehen sich auf die Positionen der Propionsäureseitenkette, die ungestrichenen und die gestrichenen Angaben auf den Pyridinium- bzw. Imidazolring. Wassersignal der <sup>1</sup>H-NMR-Spektren durch Vorsättigung unterdrückt.

**5a**: <sup>1</sup>H-NMR (600 MHz; D<sub>2</sub>O, pD = 9.0): δ = 8.88 (d, <sup>3</sup>J(H2, <sup>13</sup>C4) = 5.4 Hz, 1H, H2), 8.78 (t, <sup>3</sup>J(H6, <sup>13</sup>C4) = 6.2 Hz, <sup>3</sup>J(H6, H5) = 6.8 Hz, 1H, H6), 8.33 (s, 1H, A8), 8.01 (s, 1H, A2), 7.93 (dd, <sup>3</sup>J(H5, <sup>13</sup>C5') = 6.7 Hz, <sup>3</sup>J(H5, H6) = 6.8 Hz, 1H, H5), 7.61 (d, <sup>3</sup>J(H2', <sup>13</sup>C5') = 9.5 Hz, 1H, H2'); <sup>1</sup>H-NMR (400 MHz; D<sub>2</sub>O, pD = 9.0): δ = 3.05 (dt, <sup>3</sup>J(β-H, α-H) = 7.0 Hz, <sup>3</sup>J(<sup>1</sup>H, <sup>13</sup>C) ≈ 2 Hz, 2H, β-H), 2.47 (t, <sup>3</sup>J(α-H, β-H) = 7.0 Hz, 2H, α-H); <sup>13</sup>C-NMR (100 MHz; D<sub>2</sub>O, pD = 8.0, ca. 320 µg): δ = 130.12 (d, <sup>1</sup>J(<sup>13</sup>C5', <sup>13</sup>C4) ≈ 70 Hz, 1C, C5'), 151.12 (d, <sup>1</sup>J(<sup>13</sup>C4, <sup>13</sup>C5') = 70 Hz, 1C, C4).

**6a**: <sup>1</sup>H-NMR (400 MHz; D<sub>2</sub>O, pD = 4.6): δ = 2.60 (t, <sup>3</sup>J(α-H, β-H) = 7.3 Hz, 2H, α-H), 2.96 (dtr, <sup>3</sup>J(β-H, α-H) = 7.3 Hz, <sup>3</sup>J(<sup>1</sup>H, <sup>13</sup>C) = 4.4 Hz, 2H, β-H), 7.20 (dd, <sup>1</sup>J(<sup>1</sup>H, <sup>13</sup>C) = 200.3 Hz, <sup>4</sup>J = 1.3 Hz, 1H, H5'), 8.55 (dd, <sup>3</sup>J = 5.4 Hz, <sup>4</sup>J = 1.4 Hz, 1H, H2'); <sup>13</sup>C-NMR (100 MHz; D<sub>2</sub>O, pD = 3.9): δ = 20.99 (β-C), 34.80 (α-C), 116.44 (C5'), 133.85 (C2'), 133.69 (C4'), 179.25 (COOH); MS (70 eV): m/z: 141.14 [M<sup>+</sup>].

Im <sup>13</sup>C-NMR-Spektrum (Tabelle 1) des partiell gereinigten doppelmarkierten Adduktes **5a** (Abb. 1) erkennt man zwei Dubletts bei δ = 130.12 bzw. 151.12 mit einer Kopplungskonstante von 70 Hz, die einer direkten <sup>13</sup>C-<sup>13</sup>C-Kopplung entspricht. Das Singulett bei δ = 144.04 stammt von nichtumgesetztem [4-<sup>13</sup>C]NAD<sup>+</sup>. Im Tieffeldausschnitt des <sup>1</sup>H-NMR-Spektrums von **5a** (Abb. 2, Tabelle 1) entsprechen die meisten Signale denjenigen des Adduktes **5** aus [4-<sup>13</sup>C]NAD<sup>+</sup> und [2'-<sup>13</sup>C]Imidazolpropionsäure. Eine zusätzliche Kopplung von <sup>3</sup>J = 6.7 Hz erkennt man beim H5-Signal (δ = 7.93) infolge der vicinalen Kopplung mit dem 5'-<sup>13</sup>C-Atom. Das H2'-Signal (δ = 7.61) weist

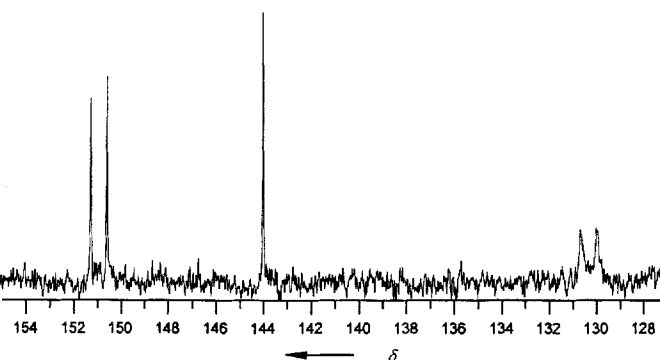


Abb. 1. Tieffeldausschnitt des <sup>13</sup>C-NMR-Spektrums des [4-<sup>13</sup>C]NAD<sup>+</sup>-[5'-<sup>13</sup>C]-Imidazolpropionsäure-Adduktes **5a**.

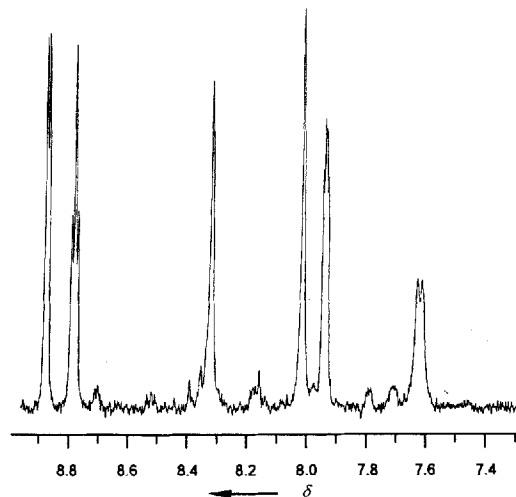


Abb. 2. Tieffeldausschnitt des <sup>1</sup>H-NMR-Spektrums des [4-<sup>13</sup>C]NAD<sup>+</sup>-[5'-<sup>13</sup>C]-Imidazolpropionsäure-Adduktes **5a**.

nur eine vicinale Kopplung mit <sup>3</sup>J = 9.5 Hz auf, die direkte mit <sup>1</sup>J = 212 Hz wie im Spektrum von **5**<sup>[4]</sup> fehlt hier. Eine zusätzliche vicinale <sup>1</sup>H-<sup>13</sup>C-Kopplung findet man auch im Signal der β-Methylengruppe der Seitenkette vom Imidazolpropionsäureteil des Adduktes **5a**. All diese Befunde erhärten den Vorschlag von Klepp et al.<sup>[4]</sup>, daß es sich beim isolierten NAD<sup>+</sup>-Imidazolpropionsäure-Addukt um Struktur **5** handelt. Der im Schema 3 wiedergegebene Mechanismus der Urocanase-Reaktion erscheint also um so wahrscheinlicher.

Eingegangen am 3. Februar 1994 [Z 6665]

- [1] L. H. Matherly, C. W. DeBrosse, A. T. Phillips, *Biochemistry* **1982**, *21*, 2789–2794.
- [2] L. H. Matherly, K. A. Johnson, A. T. Phillips, *Biochemistry* **1982**, *21*, 2795–2798.
- [3] R. M. Egan, L. H. Matherly, A. T. Phillips, *Biochemistry* **1981**, *20*, 132–137.
- [4] J. Klepp, A. Failert-Müller, K. Grimm, W. E. Hull, J. Rétey, *Eur. J. Biochem.* **1990**, *192*, 669–676.
- [5] A. Pfaltz, S. Anwar, *Tetrahedron Lett.* **1984**, *25*, 2977–2980.
- [6] H. J. Barber, *J. Chem. Soc.* **1943**, 79.
- [7] R. W. Wynn, A. H. Corwin, *J. Org. Chem.* **1950**, *15*, 203–208.
- [8] T. Furuta, M. Katayama, H. Shibasaki, Y. Kasuya, *J. Chem. Soc. Perkin Trans. I* **1992**, 1643–1648.
- [9] M. Oberfrank, W. E. Hull, J. Rétey, *Eur. J. Biochem.* **1984**, *140*, 157–161.

## Erste Cycloadditionsreaktionen mit dimeren Arsenium-Ionen\*\*

Neil Burford\*, Trenton M. Parks, Pradip K. Bakshi und T. Stanley Cameron\*

Kleine Moleküle mit koordinativ ungesättigten Zentren sind eine hervorragende Ausgangsbasis für die Entwicklung neuer Synthesestrategien. Carbene **1** sind das vielleicht bekannteste Beispiel<sup>[1]</sup> für solche Moleküle, und erst kürzlich wurde über neu-

[\*] Dr. N. Burford, T. M. Parks, P. K. Bakshi, Dr. T. S. Cameron  
Department of Chemistry, Dalhousie University  
Halifax, Nova Scotia B3H 4J3 (Kanada)  
Telefax: Int. + 902/494-1310

[\*\*] In diesem Beitrag werden durchgehend die eingeführten Bezeichnungen Phosphonium- und Arsenium-Ion anstelle der IUPAC-konformen Namen Phospanylium- bzw. Arsanylium-Ion verwendet.