

- [4] M. R. Gunner, *Curr. Top. Bioenerg.* **1991**, *16*, 319.
[5] C. A. Hunter, *J. Chem. Soc. Chem. Commun.* **1991**, 749.
[6] C. A. Hunter, D. H. Purvis, *Angew. Chem.* **1992**, *104*, 779; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1992**, *31*, 792.
[7] R. S. K. A. Gamage, A. J. McQuillan, B. M. Peake, *J. Chem. Soc. Faraday Trans.* **1991**, *87*, 3653.
[8] Eine Verschiebung zu kürzeren Wellenlängen und ein Verlust an Schwingungsfeinstruktur als Folge von H-Brücken spricht für einen π - π^* -Übergang: H. H. Jaffé, M. Orchin, *Theory and Applications of Ultraviolet Spectroscopy*, Wiley, New York, 1962.
[9] Die Gleichgewichts-Moleküldynamik-Simulationen wurden mit QUANTA und dem CHARMM-Kraftfeld durchgeführt; B. R. Brooks, R. E. Brucoleri, B. D. Olafson, D. J. States, S. Swaminathan, M. Karplus, *J. Comput. Chem.* **1983**, *4*, 187. Die partiellen Atomladungen von Q und Q^- wurden mit MNDO berechnet.
[10] Die π - π -Wechselwirkungen in diesem System haben eine relativ schwache elektrostatische Komponente, und wir nehmen an, daß sie einen sehr geringen Einfluß auf die Eigenschaften des Substrats haben. Siehe C. A. Hunter, J. K. M. Sanders, *J. Am. Chem. Soc.* **1990**, *112*, 5525.
[11] Die „subtractively normalised interfacial Fourier transform infrared spectroscopy“ (SINFTIRS, normierte interfaciale Fourier-Transformations-Infrarot-Differenzspektroskopie) ist beschrieben von J. K. Foley, *Electroanal. Chem.* **1986**, *14*, 309.
[12] S. Krimm, J. Bandekar, *Adv. Protein Chem.* **1986**, *38*, 181.

Ein zwei Metalle enthaltendes Modellsystem für Cytochrom P₄₅₀: Einfluß des Membranmilieus auf die katalytische Oxidation**

Albertus P. H. J. Schenning, Dominicus H. W. Hubert, Jan H. van Esch, Martinus C. Feiters und Roeland J. M. Nolte*

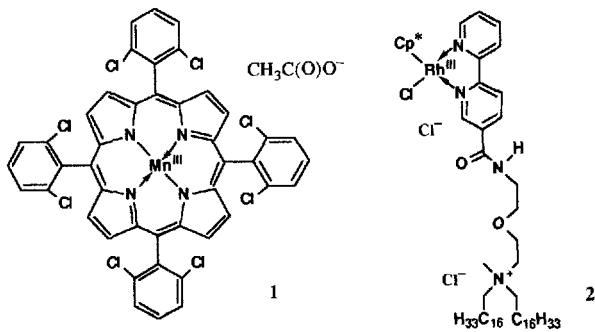
Cytochrom P₄₅₀ katalysiert eine Vielzahl von Oxidationen, darunter die Hydroxylierung von Alkanen und die Epoxidierung von Alkenen^[1]. Das aktive Zentrum dieses membrangebundenen Enzyms enthält eine Häm-Einheit und eine Thiolatgruppe als axialen Liganden. Der Katalysezyklus umfaßt die Bindung eines Substratmoleküls, die Reduktion von Eisen(III) zu Eisen(II) und die Bindung und die reduktive Spaltung von molekularem Sauerstoff, wobei formal ein Oxoeisen(V)-Komplex gebildet wird, welcher sein Sauerstoffatom auf das gebundene Substratmolekül überträgt. Das Eisenzentrum erhält die Elektronen über ein Flavoprotein von NADPH.

Wegen der biologischen Bedeutung von Cytochrom P₄₅₀ – dieses Enzym spielt eine entscheidende Rolle beim Stoffwechsel endogener und xenobiotischer Verbindungen – und weil dieser Prototyp eines Oxidationskatalysators als Modell für eine neue Generation von synthetischen Katalysatoren dienen könnte, wird gegenwärtig in vielen Arbeitsgruppen versucht, die Funktionsweise von Cytochrom P₄₅₀ mit Modellverbindungen zu simulieren^[2]. Bisher sind nur wenige Modelle beschrieben worden, die die wesentlichen Merkmale des natürlichen Systems miteinander verbinden, also molekularen Sauerstoff als Oxidationsmittel, ein Metalloporphyrin als Katalysator, einen Elektronendonator und ein Membransystem, das diese Komponenten enthält^[3]. Alle Modelle haben den Nachteil, daß sie eine sehr schwache katalytische Aktivität aufweisen.

[*] Prof. Dr. R. J. M. Nolte, Dipl.-Chem. A. P. H. J. Schenning, D. H. W. Hubert, Dr. J. H. van Esch, Dr. M. C. Feiters
Department of Organic Chemistry
NSR Center, University of Nijmegen
Toernooiveld, NL-6525 ED Nijmegen (Niederlande)
Telefax: Int. +31-55-34-50

[**] Diese Arbeit wurde von der holländischen Foundation for Chemical Research (SON) mit finanziellen Mitteln der holländischen Organization for Scientific Research (NWO) gefördert.

Bei unseren Untersuchungen neuartiger, supramolekularer Katalysatoren fanden wir, daß der Rhodiumkomplex [Rh^{III}(η^5 -Cp*)(bpy)Cl₂] (Cp* = Pentamethylcyclopentadienyl, bpy = 2,2'-Bipyridin) ein wirksamer Katalysator für die Reduktion von Mangan(III)-Porphyrrinen durch Natriumformiat ist^[4]. Wir berichten nun über ein membrangebundenes Cytochrome-P₄₅₀-Modell, das Alkene mit beachtlichen Wechselzahlen epoxidiert. Das System ist aufgebaut aus Vesikeln, die [Mn^{III}(t₂,₆-diClPP)] 1 als Katalysator^[5], N-Methylimidazol als axialen Liganden und den amphiphilen Rhodium(III)-Komplex 2^[6] zusammen mit Natriumformiat als Elektronendonator enthalten. Wir stellten fest, daß die Art der Membran einen enormen Einfluß auf die katalytische Aktivität des Modellsystems hat.



Das Manganporphyrin 1 und der Rhodiumkomplex 2 wurden mit der Ethanol-Injektionsmethode^[7] in positiv geladene Vesikel aus Dimethyldioctadecylammoniumchlorid (DODAC)^[8] und in negativ geladene Vesikel aus Dihexadecylphosphat (DHP)^[8] eingebaut. Mit Gelpermeationschromatographie und Elektronenmikroskopie konnte gezeigt werden, daß das Porphyrin und der Rhodiumkomplex an die Doppelschichten der Vesikel gebunden waren und daß die Struktur der Vesikel durch den Einbau nicht zerstört wurde. Der Durchmesser der Vesikel beider Amphiphile betrug ca. 4000 Å. Die Fluoreszenzspektren von H₂-t₂,₆-diClPP zeigten sowohl in DODAC- als auch in DHP-Vesikeln keine Selbstlöschung, wenn das Molverhältnis von Porphyrin zu Amphiphil kleiner war als 0.005 ($T = 70^\circ\text{C}$). Dies zeigt, daß sich unterhalb dieses Wertes die Porphyrinmoleküle nicht aneinanderlagern^[9]. Die Zugabe wasserlöslicher Quencher (NaI und CuSO₄) im Falle der DODAC- bzw. DHP-Vesikel veränderte das Fluoreszenzspektrum von Vesikel-gebundenem H₂-t₂,₆-diClPP nicht. Wahrscheinlich befindet sich das Porphyrin im Inneren der Doppelschichtmembran der Vesikel. ESR-Untersuchungen mit [Cu^{II}(t₂,₆-diClPP)] anstelle von 1 ließen erkennen, daß die Porphyrinmoleküle in beiden Vesikeltypen parallel zur Oberfläche ausgerichtet sind^[10]. Der Aufbau des Modellsystems ist in Abbildung 1 dargestellt.

Wir untersuchten zuerst den Einfluß der Membranmatrix auf die Reduktion des Mangan(III)-Porphyrrins. Dazu wurde der zeitliche Verlauf der Abnahme der Absorption bei 660 nm (Mn^{III}-Porphyrin) und der Zunahme der Absorption bei 448 nm (Mn^{II}-Porphyrin) im UV/VIS-Spektrum verfolgt, und zwar sowohl unter Argon als auch in Gegenwart von Luft. Das Molverhältnis von Rhodiumkomplex zu Manganporphyrin wurde von 0.5 bis 10 variiert. Unter Argon wurde das Mn^{III}-Porphyrin sowohl in DODAC- als auch in DHP-Vesikeln bei allen getesteten Rh/Mn-Verhältnissen reduziert. Die Reduktionsgeschwindigkeit stieg dabei linear mit der Rh^{III}-Konzentration an. Bei gleichem Rh/Mn-Verhältnis war die Reduktionsgeschwindig-

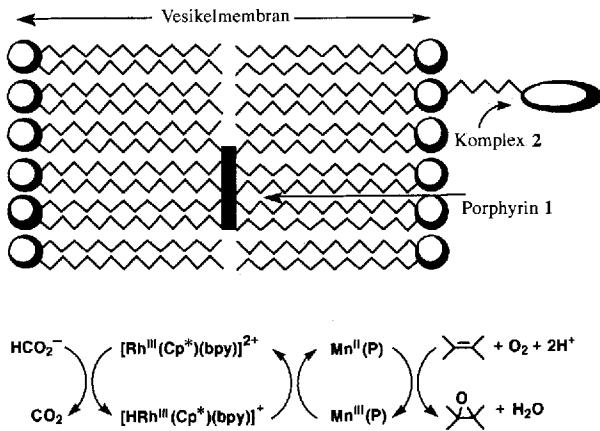


Abb. 1. Schematische Darstellung des Cytochrom-P₄₅₀-Modellsystems und der katalysierten Reaktionen.

keit in DODAC-Vesikeln höher als in DHP-Vesikeln ($[Rh]/[Mn] = 1$; $k_0(\text{DODAC}) > 100 \text{ nmol L}^{-1} \text{s}^{-1}$, $k_0(\text{DHP}) = 20 \pm 2 \text{ nmol L}^{-1} \text{s}^{-1}$). Die Reduktion von Mn^{III} in DODAC-Vesikeln lief auch in Gegenwart von Luft ab. Ein ähnliches Ergebnis wurde für DHP-Vesikel erhalten, wenn das Verhältnis Rh/Mn größer als 1 war, andernfalls wurde Mn^{II} reoxidiert. In Abwesenheit des Rh^{III}-Komplexes oder des Formiat fand keine Reduktion statt. Diese Ergebnisse zeigen, daß das Rhodium-Formiat-System das membrangebundene Mn^{III}-Porphyrrin zu reduzieren vermag. Vermutlich wirkt dabei der Rhodiumkomplex – in Übereinstimmung mit früheren Beobachtungen^[4] – als redoxaktiver Phasentransfer-Katalysator. Die Reduktion von Mn^{III} verläuft in den positiv geladenen Vesikeln rascher als in den negativ geladenen, weil bei den ersten die Formiatkonzentration an der Grenzfläche zwischen der Doppelschichtmembran und der wässrigen Phase höher ist. Die Tatsache, daß in DODAC-Vesikeln generell und in DHP-Vesikeln bei einem Rh/Mn-Verhältnis von über 1 Mn^{II} nicht reoxidiert wird, weist darauf hin, daß die Reduktion von Mn^{III} erheblich schneller abläuft als die Reoxidation.

In einer zweiten Versuchsreihe untersuchten wir, ob unser membrangebundenes Cytochrom-P₄₅₀-Modellsystem Alkene epoxidieren kann. Die Ergebnisse sind in Tabelle 1 aufgeführt. Alle untersuchten Substrate wurden durch das auf DHP-Vesikeln basierende katalytische System epoxidiert. Die Wechsel-

Tabelle 1. Epoxidierung von Alkenen durch das membrangebundene Cytochrom-P₄₅₀-Modellsystem [a].

Nr.	Membranbildner	Substrat	Produkt [b]	Wechselzahl [c]
1	DHP	α -Pinen	α -Pinenoxid	360
2	DHP	cis-Stilben	cis-Stilbenoxid	45
3	DHP	Limonen	Limonenoxid	50
4	DHP	Styrol	Styroxid [d]	55
5	DHP [e]	Styrol	Styroxid	5
6	DODAC	Styrol	–	0
7	DODAC [e]	Styrol	–	0

[a] Reaktionsbedingungen: siehe *Experimentelles*. Die Reaktion wurde mit Gas-Flüssig-Chromatographie (GLC) 1 h lang verfolgt. Danach war der Katalysator noch intakt. [b] Das einzige Reaktionsprodukt war das Epoxid; dieses zerstellt sich allmählich zu anderen Produkten. Die Zersetzungssprozesse waren vom Rh/Mn-Molverhältnis unabhängig. Es wurde kein Epoxid gebildet, wenn keine Vesikel vorhanden waren oder eine Komponente des katalytischen Systems fehlte. [c] [Epoxid]/[I] pro Stunde, berechnet anhand des Anfangsbereichs der Zeit-Umsatz-Kurve. α -Pinenoxid wandelt sich innerhalb einer Stunde zu über 90% in Pinocamphon um. Das Limonenoxid zerstellt sich zu ca. 50% zu bislang nicht identifizierten Produkten. [d] Styroxid und Stilbenoxid waren unter den experimentellen Bedingungen stabil. [e] Molverhältnis Rh/Mn = 10.

zahlen sind höher als die mit dem neulich von uns beschriebenen Zweiphasensystem erreichten^[4]. Sie liegen im gleichen Bereich wie die mit dem natürlichen System zu beobachtenden Wechselzahlen (1 nmol Produkt pro min pro nmol Cytochrom P₄₅₀)^[11]. Anders als beim Zweiphasensystem bleibt der Katalysator während der Reaktion weitgehend intakt. Die Bedeutung des Membranmilieus für die katalytische Epoxidierung trat zutage, als die DHP-Vesikel durch DODAC-Vesikel ersetzt wurden. In diesem Membransystem wurden Alkene nicht epoxidiert (vgl. die letzten zwei Zeilen von Tabelle 1). Wahrscheinlich ist an der positiv geladenen Grenzfläche die Konzentration an H⁺-Ionen zu niedrig, um die Bildung der katalytisch aktiven Oxomangan(v)-Spezies zu ermöglichen^[11]. Wurde im DHP-System das Rh/Mn-Verhältnis von 1 auf 10 erhöht, so nahm die Wechselzahl der Reaktion beträchtlich ab (Tabelle 1, Zeile 5). Diese Erscheinung ist möglicherweise darauf zurückzuführen, daß aufgrund der höheren Konzentration an Rhodiumzentren mehr Elektronen verfügbar sind. Dies begünstigt eine Nebenreaktion, bei der Wasser entsteht (den „unproduktiven Reaktionspfad“)^[11].

Fassen wir zusammen: Wir haben ein zwei Metalle enthaltendes, membrangebundenes Cytochrom-P₄₅₀-Modellsystem entwickelt, das die Epoxidierung von Alkenen mit beachtlichen Wechselzahlen katalysiert. Momentan untersuchen wir, ob auch katalytisch aktive Systeme zugänglich sind, die Substratselektivität zeigen.

Experimentelles

Reduktionsversuche: Die gewünschten Mengen vorgefertigter Lösungen von **1**, **2**, N-Methylimidazol und DHP oder DODAC in Chloroform wurden in einem Reagensglas gemischt. Das Lösungsmittel wurde im Stickstoffstrom entfernt, wobei ein homogener Film zurückblieb. Dieser Film wurde in 100 µL Ethanol/THF (1/1, v/v) gelöst und in 1.25 mL 75 °C warmen Wassers injiziert. Die Suspension wurde 30 min mit Argon gespült und in eine Küvette injiziert, die 1.25 mL eines 75 °C warmen Ethylmorpholin/Natriumformiat-Puffers enthielt. Resultierendes Milieu: 2.4 µM **1**, 2.4 × n µM **2** (n = Rh/Mn-Molverhältnis), 3.95 µM N-Methylimidazol und 910 µM DODAC bzw. DHP in einem Ethylmorpholin/Natriumformiat-Puffer (50 mM/250 mM, pH = 7.0); T = 70 °C.

Epoxidierungsversuche: Milieubedingungen nach dem Mischen wie zuvor mit n = 1, jedoch mit dem Substrat als zusätzlichem Bestandteil (200 µM). Diesmal wurden die 100 µL der Ethanol/THF-Lösung direkt in 2.5 mL Pufferlösung (75 °C) injiziert. Das Substrat wurde zugesetzt und das Reaktionsgemisch von Zeit zu Zeit analysiert, indem ein Aliquot von 0.2 mL entnommen und mit 0.1 mL Diethylether versetzt wurde, der Mesitylen als internen Standard enthielt. Diese Mischung wurde kräftig geschüttelt (Vortex-Gerät) und zentrifugiert. Nach der Phasentrennung wurde eine Probe von 5 µL aus der Diethylether-Schicht entnommen und mit GLC analysiert (Säule: Chrompack, WCOT/CP-SIL5CB; Temperaturprogramm: 70 °C (2 min), 10 K min⁻¹, 220 °C (2 min)).

Eingegangen am 2. Mai 1994 [Z 6891]

- [1] F. P. Guengerich, *J. Biol. Chem.* **1991**, *266*, 10019.
- [2] J. P. Collman, X. Zhang, V. J. Lee, E. S. Uffelman, J. I. Brauman, *Science* **1993**, *261*, 1404.
- [3] a) J. H. van Esch, M. F. Roks, R. J. M. Nolte, *J. Am. Chem. Soc.* **1986**, *108*, 6093; b) J. T. Groves, R. Neumann, *ibid.* **1989**, *111*, 2900; c) J. T. Groves, S. B. Ungashe, *ibid.* **1990**, *112*, 7796.
- [4] P. A. Gosling, J. H. van Esch, M. A. M. Hoffmann, R. J. M. Nolte, *J. Chem. Soc. Chem. Commun.* **1993**, 472.
- [5] A. D. Adler, F. L. Longo, F. Kampas, J. Kim, *J. Inorg. Nucl. Chem.* **1970**, *32*, 2443.
- [6] a) U. Kölle, M. Grützel, *Angew. Chem.* **1987**, *99*, 572; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1987**, *26*, 567; b) J. H. van Esch, M. C. Feiters, R. J. M. Nolte, *J. Org. Chem.*, eingereicht.
- [7] L. A. M. Rupert, D. Hoekstra, J. B. F. N. Engberts, *J. Am. Chem. Soc.* **1985**, *107*, 2628.
- [8] A. M. Carmona-Ribeiro, *Chem. Soc. Rev.* **1992**, 209.
- [9] A. P. H. J. Schenning, D. H. W. Hubert, M. C. Feiters, R. J. M. Nolte, unveröffentlicht.
- [10] J. H. van Esch, M. C. Feiters, A. M. Peters, R. J. M. Nolte, *J. Phys. Chem.* **1994**, *98*, 5541.
- [11] I. Tabushi, M. Kodera, *J. Am. Chem. Soc.* **1986**, *108*, 1101.