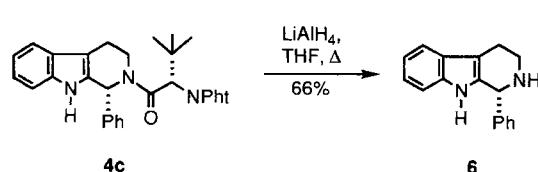


ethylether/Hexan) als analysenreine Enantiomere erhalten werden können. Aufgrund dieser vorteilhaften physikalischen Eigenschaften ist es uns auch möglich, die absolute Konfiguration der Hauptdiastereomere durch Kristallstrukturanalyse des Tetrahydro- β -carbolins **4d** eindeutig zu bestimmen^[6].

Zur Erklärung der hohen Stereoselektivität bei diesen Pictet-Spengler-Reaktionen nehmen wir an, daß bevorzugt der Übergangszustand **A** durchlaufen werden. In **A** koordiniert das Titanatom das Carbonylsauerstoffatom der Aminosäure und eines der Phthaloylgruppe, so daß ein oktaedrischer Komplex gebildet wird, in dem eine Seite der C=N-Bindung durch einen Substituenten der aktivierenden Lewis-Säure abgeschirmt wird. Dieses Modell ist in Übereinstimmung mit Ergebnissen, die für $TiCl_4$ -vermittelte Diels-Alder-Reaktionen von α,β -ungesättigten Prolinester-Amiden erhalten wurden^[7]. In **A** ist die voluminöse Aminosäureseitenkette der Ethylenbrücke zwischen der Indoleinheit und dem Iminustickstoffatom abgewandt, so daß ungünstige sterische Wechselwirkungen vermieden werden. In Analogie zu α,β -ungesättigten Amiden^[7] liegt die Acyliminiumeinheit in **A** in der *s-cis*-Konformation vor. In der *s-trans*-Konformation würden sich R^1 und das Aminosäure- α -C-Atom sehr nahe kommen, was aus sterischen Gründen ebenfalls unvorteilhaft wäre. In **A** ist der Iminsubstituent R^1 *trans*-ständig zur Ethylenbrücke. Diese Konfiguration ist bevorzugt, da bei der Ringschlußreaktion eine 1,3-Wechselwirkung zwischen R^1 und den Protonen der CH_2 -Gruppe auftreten würde, wenn R^1 und die Ethylenbrücke zueinander *cis*-ständig wären^[4]. Mit dem Übergangszustand **A** kann auch erklärt werden, daß die Stereoselektivität bei den Pictet-Spengler-Cyclisierungen verbessert werden kann, wenn die Titan-Lewis-Säure sterisch anspruchsvollere Reste aufweist (z.B. *i*Pr statt *n*Pr, siehe oben), denn dadurch wird eine der beiden diastereotopen Seiten der C=N-Bindung effizienter abgeschirmt.

Aus den Pictet-Spengler-Addukten **4** kann das chirale Auxiliar leicht durch Spaltung der Amidbindung mit Reduktionsmitteln wie $LiAlH_4$ abgelöst werden. Auf diese unkomplizierte Art konnte z.B. das Tetrahydro- β -carolin **6** enantiomerenrein aus **4c** erhalten werden^[8].



N,N-Phthaloylaminosäuren sind damit die ersten generell einsetzbaren chiralen Hilfsgruppen für die Pictet-Spengler-Reaktion. Mit ihnen kann diese wichtige Umsetzung der Alkaloidchemie effizient sterisch gelenkt werden.

Eingegangen am 30. Juni 1995 [Z 8153]

Stichworte: Aminosäuren · Asymmetrische Synthesen · Chirale Hilfsstoffe · Pictet-Spengler-Reaktionen · Tetrahydrocarboline

- [1] W. M. Whaley, T. R. Govindachari, *Organic Reactions*, Vol. 6, Wiley, New York, 1951, S. 151–206.
- [2] a) C. Bohlmann, R. Bohlmann, E. G. Rivera, C. Vogel, M. D. Manandhar, E. Winterfeldt, *Liebigs Ann. Chem.* **1985**, 1752–1763; b) D. L. Comins, M. M. Badawi, *Tetrahedron Lett.* **1991**, 32, 2995–2996; c) R. Amann, D. Spitzner, *Angew. Chem.* **1991**, 103, 1373–1374; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1991**, 103, 1320–1321; d) T. Soe, T. Kawate, N. Fukui, M. Nakagawa, *Tetrahedron Lett.* **1995**, 36, 1857–1860.
- [3] Übersichtsartikel: H. Waldmann, *Synlett* **1995**, 133–141.
- [4] H. Waldmann, G. Schmidt, M. Jansen, J. Geb, *Tetrahedron* **1994**, 50, 11865–11884.
- [5] a) J. Sheehan, D. W. Chapman, R. W. Roth, *J. Am. Chem. Soc.* **1952**, 74, 3822–3825; b) C. R. McArthur, P. M. Worster, A. U. Okon, *Synth. Comm.* **1983**, 13, 311–318.
- [6] Kristallstrukturdaten von **4d** ($C_{30}H_{26}N_4O_5$): nichtzentrosymmetrisch, monoklin, Raumgruppe $P2_1$ (Nr. 4), $a = 1201.3$ (1) pm , $b = 987.4$ (1) pm , $c = 1238.1$ (1) pm , $\beta = 114.48$ (2)°, $Z = 2$, $\rho_{\text{ber.}} = 1.298$ (1) g cm^{-3} , $T = 85$ °C, ω/θ -Scan, 3256 unabhängige Reflexe, Stoe-Vierkreis-Diffraktometer, $MoK\alpha$ -Strahlung, Graphitmonochromator, $2\theta_{\text{max.}} = 55$ °, Reflex-Profil-Anpassung. Die Struktur wurde mit Direkten Methoden gelöst (SHELXS-86) und mit anisotropen Temperaturfaktoren für C, N und O gegen F_0^2 verfeinert (SHELXL-93). Die Positionen sämtlicher H-Atome wurden einer Differenz-Fourier-Synthese entnommen. $R_1 = 0.030$ für $2713 F_0 > 4\sigma(F_0)$, $wR_2 = 0.079$, 431 Strukturparameter. Die absolute Konfiguration von **4d** wurde auf Grundlage der bekannten Konfiguration der sich vom (S)-Valin ableitenden Hilfsgruppe bestimmt. Weitere Einzelheiten zur Kristallstrukturuntersuchung können beim Fachinformationszentrum Karlsruhe, D-76344 Eggenstein-Leopoldshafen, unter der Hinterlegungsnummer CSD-59081 angefordert werden.
- [7] H. Waldmann, *Liebigs Ann. Chem.* **1990**, 671–680, zit. Lit.
- [8] 6: $[\alpha]_D^{25} = -4.3$ ($c = 1.0$, $CHCl_3$); Schmp. 186 °C; Literaturdaten: a) $[\alpha]_D^{25} = -4.4$ ($c = 1.0$, $CHCl_3$); Schmp. 167 °C [4]; b) (R)-6: $[\alpha]_D^{25} = +4.37$ ($c = 1.19$, $EtOH$), 27% ee; (S)-6: $[\alpha]_D^{25} = -16.4$ ($c = 0.38$, $EtOH$) (M. Nakagawa, T. Kawate, T. Kakikawa, H. Yamada, T. Matsui, T. Hino, *Tetrahedron* **1993**, 49, 1739–1748).

Elektrochemische Kupplung von Komponenten der biologischen Elektronentransportkette an modifizierte Oberflächen: molekulare Erkennung zwischen Cytochrome-c-Peroxidase und Cytochrome c**

Li Jiang, Calum J. McNeil und Jonathan M. Cooper*

Die Modifizierung von Oberflächen mit Proteinen ist eine etablierte Methode zur Herstellung analytischer Werkzeuge für die biomolekulare Erkennung. Studien über die Bindung von Liganden an Grenzflächen sind hauptsächlich auf die Immobilisierung von Antikörper-Antigen- und Avidin-Biotin-Paaren ausgerichtet^[1,2] und haben zu kommerziell erhältlichen Biosensoren^[3] und zu Techniken geführt, die eine Kontrolle des Aufbaus molekularer Aggregate erlauben^[2]. Desgleichen hat die Immobilisierung von Enzymen an Elektroden das Studium der heterogenen Biokatalyse ermöglicht und eine attraktive Sensor-technologie hervorgebracht. Dabei wird entweder indirekt ein Cofaktor, mit dem die biochemische Aktivität zusammenhängt^[4], oder ein immobilisierter anorganischer Redoxmedia-

[*] Dr. J. M. Cooper, Dr. L. Jiang
Department of Electronics and Electrical Engineering
University of Glasgow
GB – Glasgow G12 8LT (Großbritannien)
Telefax: Int. + 44/3304907
E-mail: jmcooper@elec.gla.ac.uk
Dr. C. J. McNeil
Department of Clinical Biochemistry
University of Newcastle upon Tyne (Großbritannien)

[**] Wir danken Prof. J. E. Erman, Northern Illinois University (USA), für die Überlassung einer Probe von CcP. Diese Arbeit wurde vom Engineering and Physical Sciences Research Council (EPSRC) (GR/J30189) gefördert.

tor, der elektrochemisch mit einem Protein kommuniziert, gemessen^[5].

Während des letzten Jahrzehnts wurden viele Forschungsergebnisse über den direkten Elektronentransport (ET) zwischen immobilisierten Proteinen und leitfähigen Oberflächen veröffentlicht, wobei man bis heute allerdings auf die Untersuchung kleiner Modellproteine beschränkt war^[6, 7]. Die richtige Modifizierung einer Elektrode ermöglicht das Studium einfacher, quasi-reversibler bioelektrochemischer Vorgänge. In einem speziellen Beispiel wird ein Film verwendet, der durch Selbstorganisation einer ω -Mercaptocarbonsäure auf einer Goldoberfläche entsteht, um die Kinetik des Elektronentransfers von Cytochrome c (Cyt c) über eine einfache Carbodiimidkupplung zu messen^[7]. Diese Art Aufbau ist für Forschungsprojekte im Bereich der Biosensoren interessant, weil sich so größere Proteine mit Elektroden „verdrahten“ lassen, ohne daß ET-Mediatoren verwendet werden müssen. Wir stellen nun eine Weiterentwicklung dieser Ideen vor und führen Beweise dafür an, daß mit den o. g. Techniken auch die molekulare Erkennung zwischen Redoxproteinen studiert werden können. Wir zeigen, wie molekulare Komponenten der biologischen ET-Kette immobilisiert werden können und demonstrieren den direkten Elektronentransfer zwischen der modifizierten Goldelektrode und den immobilisierten Häm-Proteinen. Weiterhin wird das verstärkte elektrokatalytische Signal gemessen, das aus der heterogenen biomolekularen Erkennung an der mit dem Protein modifizierten Oberfläche resultiert.

Cytochrome-c-Peroxidase (CcP, EC 1.11.1.5) ist ein Enzym mit einem Häm-Molekül (35 kDa), daß als alternativer terminaler Acceptor (Komplex IV) in anaerober Hefe (*Saccharomyces cerevisiae*) fungiert. Seine Wechselwirkung mit Cyt c (12.6 kDa), einem anderen Häm-Protein, führte zu einem Modell des Protein-Protein-Elektronentransfers^[8]. CcP reagiert schnell mit H_2O_2 unter Bildung eines zweifach oxidierten Enzyms, das ein gebundenes Radikal enthält (Verbindung II). Dieses Intermediat reagiert mit zwei Molekülen des reduzierten Cytochrome c (Cyt c_{red}), wobei die reduzierte Form von CcP (Fe^{III}) wiederhergestellt wird. Der Elektronentransfer erfolgt über eine große Entfernung und zwischen den beiden Häm-Zentren des Cyt-c-CcP-Komplexes, der durch Ionenpaarung zwischen Lysingruppen in Cyt c und einem Ring saurer Aminosäureseitengruppen stabilisiert wird, die um die Häm-Kante von CcP angeordnet sind^[8]. Für uns ist der Cyt-c-CcP-Komplex deshalb von besonderem Interesse, weil durch die Wechselwirkung der beiden Proteine auch Wege für den Elektronentransport aufgebaut werden.

Die Proteine wurden unter Verwendung von 3,3'-Dithiobis-sulfosuccinimidylpropionat (DTSSP) immobilisiert. DTSSP bindet spontan an eine blanke Goldelektrode, und die Oberflächenbedeckung wurde durch Integration des Oxidationspeaks bei 150 mV vs. Ag/AgCl auf $1.5 \times 10^{-10} \text{ mol cm}^{-2}$ geschätzt. Um die Cyt-c-CcP-Wechselwirkung elektrochemisch zu verfolgen, wurde zunächst Cyt c immobilisiert. Die an der Oberfläche von Cyt c befindlichen Lysinreste genügen, um dieses Enzym direkt und ohne Zusatz weiterer Reagentien mit DTSSP umzusetzen. Der an der Goldelektrode entstehende biomolekulare Film ermöglicht so den elektrochemischen Zugang zum Häm-Redoxzentrum von Cyt c (experimentell bestimmtes Halbstufenpotential $E_{1/2} = -153 \text{ mV}$ vs. Ag/AgCl, $\Delta E_p = 70 \text{ mV}$, $v = 10 \text{ mVs}^{-1}$; der Elektrolyt wurde vor Verwendung von Sauerstoff befreit) (Abb. 1). Die Integration des Reduktionsstromes des immobilisierten Cyt c ergab eine Oberflächenkonzentration von $4.1 \times 10^{-11} \text{ mol cm}^{-2}$. Ähnliche Werte wurden auch von anderen Forschungsgruppen für immobilisierte Proteine an selbstorganisierten Monoschichten gefunden^[5].

Cyt c hat 18 an der Oberfläche befindliche Lysingruppen, die an DTSSP binden könnten. Die Route des Elektronentransfers innerhalb des biomolekularen Films kann als statistisch gemittelter Pfad angesehen werden, dessen Verlauf von der Wahrscheinlichkeit abhängt, mit der ein bestimmtes primäres Amin der Proteinoberfläche an DTSSP bindet. Eine gewichtete Geschwindigkeitskonstante für den Elektronentransfer zwischen dem Protein und der Elektrode, k_{ET}^0 , wurde unter Verwendung des Modells von Lavoron auf 0.18 s^{-1} geschätzt^[9]. Die

lineare Abhängigkeit der Peakströme von der Geschwindigkeit der Potentialveränderung (zwischen 10 und 50 mVs^{-1} . Daten nicht gezeigt) spricht dafür, daß Cyt c an die Oberfläche gebunden ist [z.B. für $i_{pa}, y/nA = 9.7 \times (/\text{mVs}^{-1}) + 0.8 (/\text{nA})$]. Diese Annahme wurde durch die Persistenz des Proteinredoxsignals nach gründlichem Waschen weiter untermauert.

Auf die Zugabe von H_2O_2 zur Au-Cyt-c-Elektrode, erfolgt eine Verstärkung des Reduktionsstromes, was auf die Reduktion des Wasserstoffperoxids zurückzuführen ist (Abb. 2b)^[10].

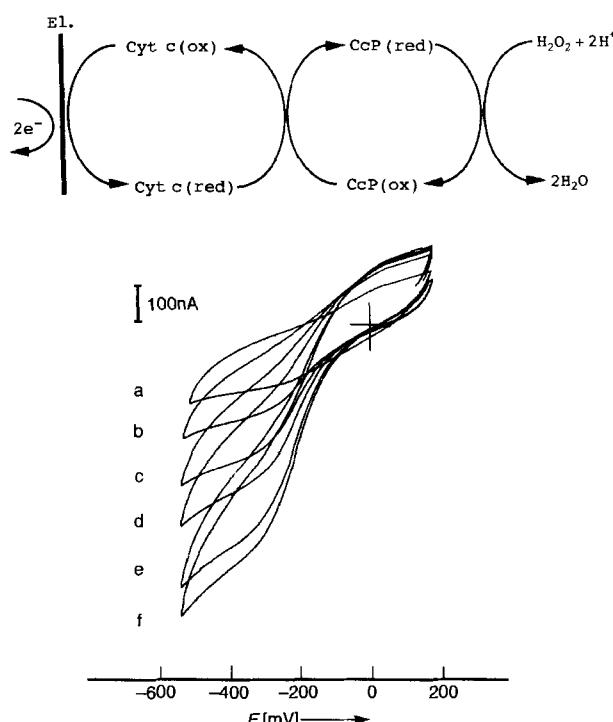


Abb. 1. Cyclovoltammogramm von immobilisiertem Cyt c (Au/DTSSP/Cyt c, gegen Ag/AgCl-Elektrode) in O_2 -freiem Natriumphosphatpuffer (0.1 mol dm^{-3} , pH 6.3, $v = 10 \text{ mVs}^{-1}$) (durchgezogene Linie). Kontrollexperimente sind ebenfalls gezeigt: Cyclovoltammogramm der DTSSP-Monoschicht (Au/DTSSP) (gepunktete Linie; Cyclovoltammogramm von apo-Cyt-c in Gegenwart von $0.5 \mu\text{M}$ CcP (gestrichelte Linie).

Die anschließende Zugabe von CcP (Abb. 2c–2f) ergab wesentliche Erhöhungen der Reduktionsströme, was mit der enzymatischen Regenerierung von immobilisiertem Cyt c_(ox) und dessen elektrokatalytischer Reduktion an der Elektrodenoberfläche erklärt werden kann. Das Reaktionsschema ist in Abbildung 2 illustriert.

Dergleiche Au-Cyt c Aufbau wurde auch zur Untersuchung der Protein-Protein-Erkennung in Abwesenheit von H₂O₂ verwendet. Zu diesem Zweck wurden ET-Reaktionen zwischen löslichem CcP_(ox) und der modifizierten Elektrode untersucht (Abb. 3). Wie aufgrund der biologischen Funktion und der rela-

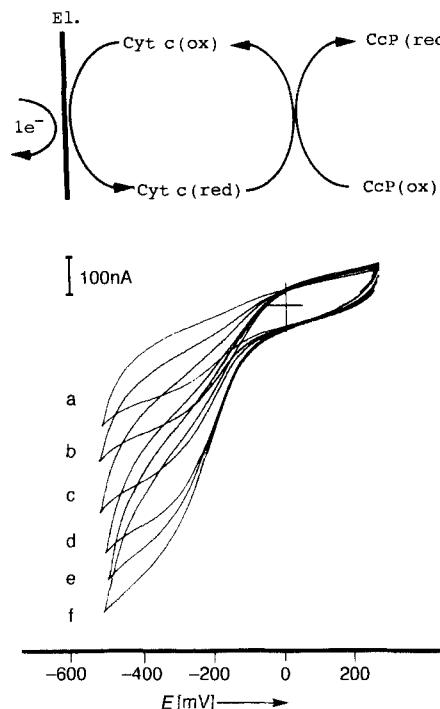


Abb. 3. Cyclovoltammogramme von a) immobilisiertem Cyt c, b) verstärkt durch die Zugabe von 0.30 μ M, c) 0.60 μ M, d) 0.90 μ M, e) 1.8 μ M und f) 2.4 μ M CcP, in Abwesenheit von H₂O₂ ($v = 5 \text{ mVs}^{-1}$) (alle anderen Bedingungen siehe Legende zu Abb. 2). Die einzelnen Reaktionen sind über den Cyclovoltammogrammen schematisch dargestellt.

tiv freien Zugänglichkeit des immobilisierten Häm-Redoxzentrums erwartet wurde, kann CcP das immobilisierte Cyt c_(ox) via Verbindung I regenerieren, was zu einer Verstärkung des Reduktionsstromes an der Elektrode führt. Dies ist in Abbildung 3 schematisch dargestellt.

In einer Serie von ergänzenden Experimenten wurde auch CcP mit DTSSP immobilisiert und elektrochemisch in sauerstofffreiem Elektrolyt charakterisiert (Abb. 4). Die gewichtete Geschwindigkeitskonstante k_{ET}^0 wurde zu 0.04 s^{-1} berechnet. Dieser Wert ist niedriger als bei Cyt c was wahrscheinlich von einem längeren Übertragungsweg zwischen dem Häm-Zentrum und der Goldoberfläche herrührt. Die Zuordnung dieses Weges ist schwierig, da 23 Lysingruppen auf der Oberfläche von CcP für die Bindung mit DTSSP zur Verfügung stehen.

Trägt man i_{pa} oder i_{pc} gegen v auf (z.B. für i_{pa} , $y/(\text{nA}) = 9.1 \times (/\text{mVs}^{-1}) + 2.7/(\text{nA})$, Daten nicht gezeigt), so erhält man lineare Abhängigkeiten, die bestätigen, daß die elektrochemischen Reaktionen nur an der Oberfläche stattfinden. Das Halbstufenpotential $E'_{1/2}$ für immobilisiertes CcP wurde auf -254 mV (vs. Ag/AgCl, $v = 10 \text{ mVs}^{-1}$) geschätzt. Im Vergleich dazu liegt das Reduktionspotential für CcP in Lösung (Verbin-

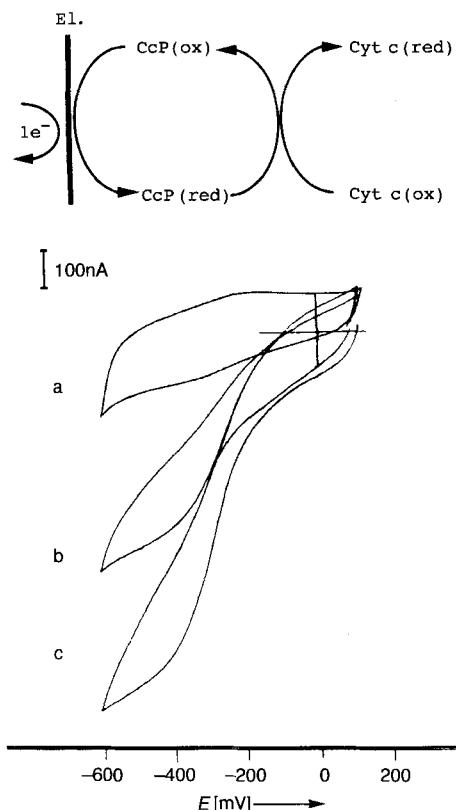


Abb. 4. Cyclovoltammogramme von immobilisiertem CcP in a) 0.1 mol dm^{-3} Na-triumpophosphatpuffer (pH 6.3) sowie b)–c) nach Zugabe von 7.0 μM bzw. 42 μM Cyt c ($v = 5 \text{ mVs}^{-1}$). Die Einelektronen-Enzym-Oxidation von immobilisiertem CcP durch gelöste Cyt c mit nachfolgender elektrochemischer Reduktion ist schematisch dargestellt.

dung II, Fe^{III}-Ionen) bei 848 mV vs. Ag/AgCl^[11]. Diese große Änderung im Redoxverhalten der Enzyme liegt an der deutlich anderen physikalischen und chemischen Umgebung des immobilisierten Häm-Redoxzentrums. Die Integration des Reduktionspeaks von immobilisiertem CcP zeigte, daß die Oberflächenbelegung der Elektroden mit $2.8 \times 10^{-11} \text{ mol cm}^{-2}$ niedriger war, als bei der Cyt-c-Elektrode.

Auf die Zugabe von löslichem Cyt c zur Au-CcP-Elektrode wurde eine Verstärkung des CcP-Reduktionsstromes beobachtet (Abb. 4). Die Redoxbedingungen innerhalb der elektrochemischen Zelle wurden so gewählt, daß die Reaktion umgekehrt verläuft wie in der Natur; diese unnatürliche Reaktion wurde auch durch Laserradiolyse untersucht^[8]. Bei der natürlichen Reaktion fungiert CcP bei der Oxidation von Cyt c_(red) als terminaler Elektronenacceptor ($E_{1/2}^{\text{Cyt c}} = +40 \text{ mV}$ vs. Ag/AgCl)^[12].

Schon früher war gezeigt worden, daß gelöste Komponenten der ET-Kette mit Monoschichten an Elektrodenoberflächen kommunizieren^[13–15]. Die von uns beschriebene elektrochemische Untersuchung von immobilisierten Komponenten der ET-Kette bietet allerdings Vorteile. Unser System ahmt die Natur insofern nach, als verschiedene Proteinwechselwirkungen an verschiedenen Phasengrenzen stattfinden. Außerdem können Probleme, die vom Widerstand der Lösung herrühren, vernachlässigt werden. Zwei Aspekte dieser Arbeit sind von besonderem Interesse: Zum einen konnte gezeigt werden, daß eine direkte Übertragung eines Faraday'schen Signals aufgrund der Proteinerkennung an einer mit einem Protein modifizierten Oberfläche möglich ist. Zum anderen demonstrieren die verwendeten Techniken die Möglichkeiten zur Manipulation des Redoxcharakters biologischer Moleküle.

Experimentelles

Pferdeherz-Cyt-c und -CcP wurden durch Mischen (30 min) einer Proteinlösung ($c = 10 \text{ mg mL}^{-1}$) mit einem Überschuss an DTSSP (10 mM Lösung in 100 mM Natriumphosphatpuffer, pH 6.3) immobilisiert. Alternativ wurde eine Lösung von Na_2HPO_4 (10 mM dm^{-3} in Dimethylsulfoxid, 1:5 mit H_2O verdünnt) verwendet. Eine Goldelektrode ($A = 0.031 \text{ cm}^2$, mit Aluminiumoxid der Korngröße 0.05 μm poliert, mit 25% H_2O_2 in H_2SO_4 behandelt und in Wasser 15 min mit Ultraschall beschallt) wurde in der Enzymlösung ca. 12 h bei 4 °C inkubiert. Alle elektrochemischen Messungen wurden mit einem BAS-CV-37-Potentiostat durchgeführt und entweder analog oder digital aufgezeichnet. Die Gleichstromcyclovoltammetrie wurde in verschlossenen Zwei-Kammer-Elektrolysezellen mit einem Arbeitsvolumen von 500 μL durchgeführt.

Die elektrochemischen Messungen wurden in Natriumphosphatpuffer durchgeführt (0.1 mM dm^{-3} , pH 6.3, zur Entfernung von Sauerstoff wurde die Lösung vor der Messung 15 min mit Stickstoff durchspült). Die Lösung wurde während des Experiments in einer Stickstoffatmosphäre gehandhabt. Ebenso wurden alle Vorratslösungen vor der Einschleusung in die elektrochemische Zelle auf die gleiche Weise behandelt. Die Abwesenheit von Sauerstoff in den Lösungen wurde mit einer unmodifizierten Goldelektrode, die auf einer Spannung von -300 mV vs. Ag/AgCl gehalten wurde, überprüft. Kontrollexperimente, in denen die Häm-Redoxzentren der Proteine durch Inkubation der Elektrode in 4.0 M Guanidin \times HCl (pH 6.0, ca. 12 h, Waschen) entfernt wurden, wurden für beide Elektroden durchgeführt. Die Ergebnisse für Cyt c sind in Abbildung 1 gezeigt (siehe Legende zu Abb. 1).

Eingegangen am 28. April,
veränderte Fassung am 14. August 1995 [Z 7939]

Stichworte: Bioelektrochemie · Cytochrom-c-Peroxidase · Elektronentransport · Immobilisierte Elektroden

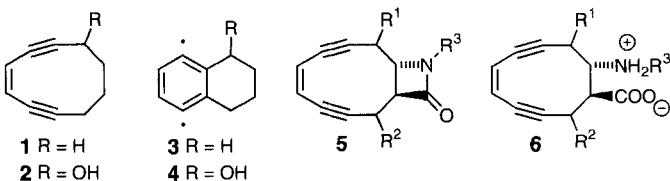
- [1] H. Ebato, J. N. Herron, W. Müller, Y. O. Kahata, H. Ringsdorf, P. Suci, *Angew. Chem.* **1992**, *104*, 1064–1067; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1992**, *31*, 1087–1090.
- [2] D. J. Pritchard, H. Morgan, J. M. Cooper, *Angew. Chem.* **1995**, *107*, 84–86; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1995**, *34*, 91–93.
- [3] D. Altshuh, M. C. Dubs, E. Weiss, G. Zederlutz, M. H. V. Vanregenmortel, *Biochemistry* **1992**, *31*, 6298–6304.
- [4] L. C. Clark, C. Lyons, *Ann. NY Acad. Sci.* **1962**, *102*, 29–45.
- [5] I. Willner, N. Lapidot, A. Riklin, R. Kasher, E. Zahavy, E. Katz, *J. Am. Chem. Soc.* **1994**, *116*, 1428–1441.
- [6] J. M. Cooper, K. Greenough, C. J. McNeil, *J. Electroanal. Chem.* **1993**, *347*, 267–275.
- [7] M. Collinson, E. F. Bowden, M. J. Tarlov, *Langmuir* **1992**, *8*, 1247–1250.
- [8] E. Cheung, K. Taylor, J. A. Kornblatt, A. M. English, G. McLendon, A. Miller, *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* **1986**, *83*, 1330–1333.
- [9] E. Laviron, *J. Electroanal. Chem.* **1979**, *101*, 19–28.
- [10] J. Wilshire, D. T. Sawyer, *Acc. Chem. Res.* **1979**, *12*, 105–110.
- [11] W. L. Purcell, J. E. Erman, *J. Am. Chem. Soc.* **1976**, *98*, 7033–7037.
- [12] D. C. Rees, *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* **1985**, *82*, 3082–3085.
- [13] F. A. Armstrong, A. M. Lannon, *J. Am. Chem. Soc.* **1987**, *109*, 7211–7212.
- [14] M. Lion-Dagan, E. Katz, I. Willner, *J. Chem. Soc. Chem. Commun.* **1994**, 2741.
- [15] S. Bagby, P. D. Barker, L. H. Guo, H. A. O. Hill, *Biochemistry* **1990**, *29*, 3213–3219.
- [16] A. F. Corin, R. A. Hake, G. McLendon, J. T. Hazzard, G. Tollin, *Biochemistry* **1993**, *32*, 2756–2762.

Lactendiine: eine neue Klasse von chemisch aktivierbaren cyclischen Endiinen **

Luca Banfi und Giuseppe Guanti*

Nachdem vor kurzem die starke Antitumor-Aktivität von natürlich vorkommenden cyclischen Endiinen entdeckt worden ist, sind derzeit etliche Bemühungen auf das Design und die Synthese von analogen Verbindungen gerichtet, die nach dem gleichen Prinzip wirken, deren Molekülstrukturen aber weniger komplex sind^[1]. Idealerweise sind solche Mimetica an sich inaktiv und werden chemisch aktiviert, indem ein Strukturelement, das die Endiineinheit in einer stabilen Form blockiert, kontrolliert entfernt und so die DNA-schädigende Form freigesetzt wird. Darüber hinaus sollten diese Verbindungen zur Steigerung von Selektivität und Wirksamkeit über geeignete Ankergruppen verfügen, über die DNA-bindende Agentien gebunden werden können^[1c, 2].

In diesem Zusammenhang untersuchten wir eine neue Klasse von synthetischen Endiinen, die sich durch einen an ein zehngliedriges cyclisches Endiin *trans*-anellierten β -Lactamring auszeichnen (**5**) und die wir „Lactendiine“ nennen. Diese sind Analoga der bekannten Stammverbindungen **1**^[3] und **2**^[4], die bei 37 °C mit mäßiger Geschwindigkeit in einer Bergman-Cycloaromatisierung zu den hochreaktiven Aryl-Diradikalen **3** bzw. **4** reagieren. Wir



gingen davon aus, daß Lactendiine hinsichtlich einer Cycloaromatisierung vollkommen stabil sind und daß ihre Hydrolyseprodukte **6** reaktiver als die Stammverbindungen **1** und **2** sein sollten. Die erste Annahme beruhte zum einen auf den Arbeiten von Nicolaou, Bergman et al.^[5], die nachgewiesen haben, daß zehngliedrige, an Dioxolanone *trans*-anellierte Endiine nicht reaktiv sind, und zum anderen auf Molekilmekanik(MM)-Rechnungen^[6], nach denen das aromatische Cyclisierungsprodukt stark gespannt sein muß. Die zweite Annahme war weniger offensichtlich; die MM-Rechnungen^[6] deuteten auf eine sehr kurze Lebensdauer von **6** bei 37 °C. Daher könnte eine In-vivo-Öffnung des β -Lactamrings als Auslöser für die Überführung des möglichen Endiin-Prodrugs **5** in die wirksamen Spezies **6** sein. Weitere Vorteile der Verbindungen **5** bestehen in ihrer einfachen Struktur, weshalb ihre Totalsynthese leichter erreichbar sein sollte, und in der Möglichkeit, über die Substituenten R¹, R² und R³ DNA-bindende Agentien anzuknüpfen.

Um unsere Annahmen zu überprüfen, haben wir nun die ersten Verbindungen dieser Klasse hergestellt. Die eingeschlagene Syntheseroute (Schema 1) beginnt mit dem 2-Azetidinon **7**, das nach bekannten Verfahren^[7] in sechs Stufen aus D,L-Asparaginsäure zugänglich ist^[8]. Nach Schützen der Stickstofffunktion^[9]

[*] Prof. G. Guanti, Dr. L. Banfi
Istituto di Chimica Organica e CNR
Centro di Studio per la Chimica dei Composti Cicloalifatici ed Aromatici
corso Europa 26, I-16132 Genua (Italien)
Telefax: Int. +10/3 53 82 18

[**] Wir danken Herrn Andrea Basso für wertvolle Zusammenarbeit. Diese Arbeit wurde vom Consiglio Nazionale delle Ricerche (CNR) und vom Ministero per l'Università e la Ricerca Scientifica e Tecnologica (MURST) gefördert.