

CH_2Cl_2). **15:** $^1\text{H-NMR}$: δ ($J_{1,2}$ [Hz]) = 4.90 (4.3; NR), 5.10 (3.9; NR-1), 5.23 (6.5; NR-2), 5.12 (3.9; R-2), 4.89 (6.8; R-1), 4.56 (ca. 3; R); $[\alpha]_D$ = +23 ($c = 0.5$, CH_2Cl_2). – Die $^1\text{H-NMR}$ -Spektren von **16–22** ähneln sich in Hinblick auf die chemischen Verschiebung sehr stark; wie erwartet variieren nur die relativen Intensitäten der Signale. Die folgenden Signale wurden für die unterscheidbaren anomeren Protonen gemessen: δ ($J_{1,2}$ [Hz]) = 4.92 (4–4.3; NR), 5.10 (3.3–3.5; NR-1), 5.26 (6–7; R-1), 4.56 (3.5; R). Die optischen Drehwerte von **16–22** lagen alle im Bereich +20–22 ($c = 0.5$ –1 in H_2O). Positiv-Ionen-LSI-MS (Thioglycerin + NaCl/Thioglycerin + KF): **16:** m/z : 2771/2787; **17:** m/z : 3402/3418; **18** (nach Abspaltung der Lävulinsäuregruppe): m/z : 3934/3950; **19:** m/z : 4664/4680; **20:** m/z : nicht bestimmt/5310; **21:** m/z : nicht bestimmt/5940. – Die $^1\text{H-NMR}$ -Spektren von **23–28** ähneln sich in Hinblick auf die chemischen Verschiebung sehr stark; wie erwartet variieren nur die relativen Intensitäten der Signale. Die folgenden Signale wurden für die unterscheidbaren anomeren Protonen gemessen: δ ($J_{1,2}$ [Hz]) = 5.08–5.11 (1–2; NR), 5.38–5.41 (3–4; NR-1), 5.04–5.09 (1–2; CNR), 5.40–5.42 (3–4; CR), 5.05–5.09 (1–2; R-1), 5.10–5.15 (3.5; R). Die optischen Drehwerte lagen alle im Bereich +27–34 ($c = 0.4$ –0.6 in H_2O); ESI-MS (monoisotope Masse/Durchschnittsmasse/experimentelle Masse \pm Standardabweichung): **23:** m/z : 3603.5/3606.3/3605.13 \pm 0.9; **24:** m/z : 4297.5/4300.7/4296.8 \pm 0.9; **25:** m/z : 4991.4/4995.2/4993.0 \pm 2.2; **26:** m/z : 5685.3/5689.6/5687.6 \pm 2.3; **27:** m/z : 6379.2/6384.1/6381.4 \pm 3.2; **28:** m/z : 7073.1/7078.5/7077.3 \pm 3.2.

- [16] D. H. Atha, J.-C. Lormeau, M. Petitou, R. D. Rosenberg, J. Choay, *Biochemistry* **1987**, *26*, 6454–6461
- [17] Alternativ wurden ein Tetrasaccharid-Donor oder ein Hexasaccharid-Donor verwendet, die aus dem gleichen Disaccharid-Grundbaustein hergestellt wurden.
- [18] A. N. Teien, M. Lie, *Thromb. Res.* **1977**, *10*, 399–410.
- [19] J.-M. Herbert, J.-P. Héault, A. Bernat, R. G. M. van Amsterdam, G. M. T. Vogel, J.-C. Lormeau, M. Petitou, D. G. Meuleman, *Circ. Res.* **1996**, *76*, 590–600.

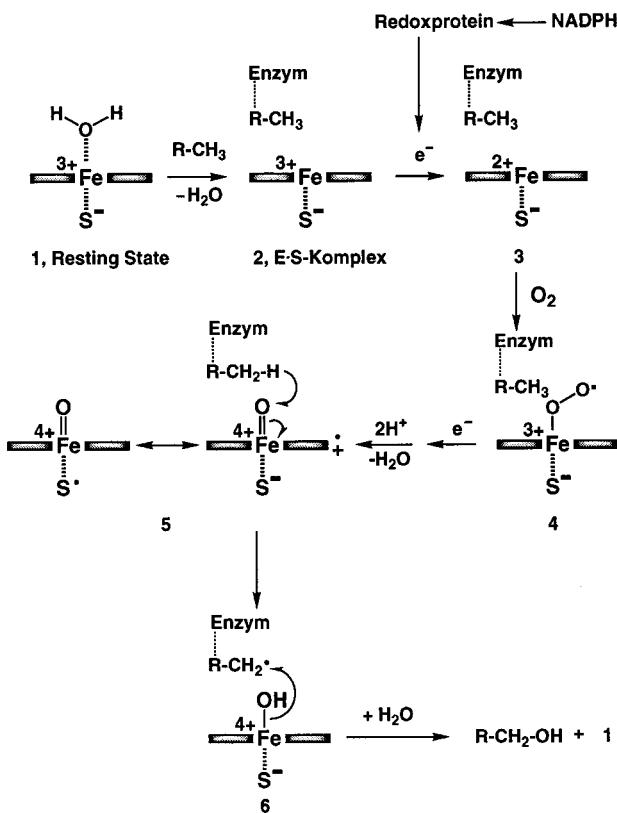
Zum Problem des Low-spin-Charakters von Cytochrom P450_{cam} im „Resting State“ – Untersuchungen von Enzymmodellen mit Puls-EPR- und ENDOR-Spektroskopie**

Hamed Aissaoui, Rainer Bachmann, Arthur Schweiger und Wolf-Dietrich Woggon*

Die in vielen Organismen vorkommenden Cytochrom-P450-Enzyme gehören zu den Häm-Thiolat-Proteinen und sind für den Metabolismus endogener und exogener Verbindungen von großer Bedeutung.^[1] Die ungewöhnliche Reaktivität dieser Enzyme beruht auf einem Eisen(III)-Protoporphyrin-IX-Komplex, der via Wasserstoffbrückenbindungen der beiden Propionsäureseitenketten und durch einen Thiolatliganden an das Protein gebunden ist. Der Thiolat-

gand koordiniert das Eisenzentrum von der proximalen Seite des Porphyrins und stammt von einem Cysteinrest einer konservativen Proteindomäne.

Die Kenntnis über verschiedene Zwischenprodukte des Katalysecyclus von Cytochrom P450 (Schema 1) beruht im wesentlichen auf Röntgenstrukturanalysen verschiedener



Schema 1. Katalysecyclus von Cytochrom P450.

Formen von Cytochrom P450_{cam}^[2,3] sowie auf zahlreichen Untersuchungen geeigneter Modellverbindungen.^[4] Demnach enthält der „Resting State“ von Cytochrom P450_{cam} **1** sechs Moleküle Wasser in der Substratbindungsdomäne, wovon eines direkt das Eisenzentrum koordiniert. Die Bindung des natürlichen Substrates Campher führt zu einer Entfernung sämtlicher Wassermoleküle, offenbar aber nicht durch den Substrateintrittskanal. Kürzlich durchgeführte Untersuchungen legen nahe, daß die Bindung von Campher mit einer Konformationsänderung im Bereich der Propionatseitenketten einhergeht. Es scheint, daß Arg299, das eine Salzbrücke mit einem der Propionate bildet, diese Veränderung auslöst, so daß an der proximalen Häm-Seite ein Wasseraustrittskanal zur Proteinoberfläche entsteht.^[5]

Die Veränderung der Ligandensphäre des Eisens ist begleitet von einem Wechsel des Spingleichgewichtes von >96 % Low-spin-Fe^{III} im „Resting State“ **1** zum Fe^{III} des E·S-Komplexes **2** mit überwiegendem High-spin-Charakter.^[6] Gleichzeitig verändert sich das Redoxpotential des Häm-Thiolat-Proteins von –300 mV für **1** zu –175 mV für **2**. Diese anodische Verschiebung ist essentiell für die Aufnahme eines Elektrons von NADPH über das Redoxprotein

[*] Prof. Dr. W.-D. Woggon, Dipl.-Chem. H. Aissaoui
Institut für Organische Chemie der Universität
St.-Johanns-Ring 19, CH-4056 Basel (Schweiz)
Fax: (+41) 61-267-11-02
E-mail: woggon@wolfi.chemie.unibas.ch

Dr. R. Bachmann, Prof. Dr. A. Schweiger
Laboratorium für Physikalische Chemie, Eidgenössische Technische Hochschule, CH-8092 Zürich (Schweiz)

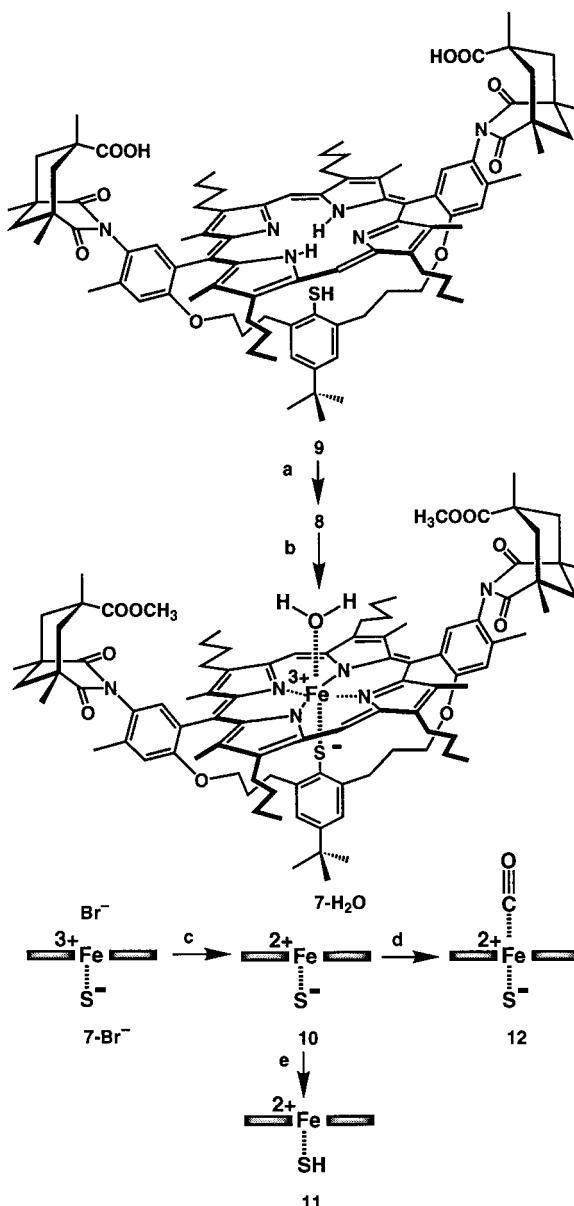
[**] Diese Arbeit wurde vom Schweizerischen Nationalfonds zur Förderung der wissenschaftlichen Forschung unterstützt. Wir danken Gunnar Jeschke für hilfreiche Diskussionen.

Putidaredoxin und die Bildung des Eisen(II)-Komplexes **3**, der Sauerstoff bindet (**4**). Die folgende reduktive Spaltung der O-O-Bindung liefert als zentrales Zwischenprodukt des Katalysezyklus den Eisen(IV)-oxo-Komplex **5**, der reaktiv genug ist, um z.B. eine O-Insertion in nichtaktivierte C-H-Bindungen zu ermöglichen.^[4] Ob diese O-Insertion, wie in Schema 1 dargestellt, grundsätzlich in zwei Schritten erfolgt oder konzertiert abläuft, ist gegenwärtig noch umstritten.^[7]

Seit der Entdeckung des Wasserclusters im „Resting State“ von P450_{cam} diskutiert man den scheinbaren Widerspruch eines Low-spin-Charakters für Eisen(III) in Gegenwart der zwei schwachen Liganden Wasser und Thiolat. Es wurde vorgechlagen, daß ^{-OH} anstelle von Wasser an das Eisen bindet oder daß der über H-Brücken gebundene Wassercluster einen hydroxidähnlichen Charakter am koordinierenden Wassermolekül induziert.^[2b,8] Tatsächlich zeigten aber ESEEM-Untersuchungen (ESEEM = electron-spin-echo envelope modulation) mit an P450_{cam} gebundenem, ¹⁷O-angereichertem Wasser, daß ein Wassermoleköl direkt an das Eisen(III)-Zentrum gebunden ist und daß ein Hydroxidion als sechster Ligand auszuschließen ist.^[9] Da diese Experimente aber die Frage offenließen, warum im vorliegenden Ligandenfeld **1** als Low-spin-System vorliegt, entschlossen wir uns, geeignete Modellverbindungen für den „Resting State“ von P450_{cam} herzustellen und diese Komplexe mit CW-EPR- sowie Puls-EPR- und ENDOR-Methoden (CW = continuous wave, EPR = electron paramagnetic resonance, ENDOR = electron nuclear double resonance) zu untersuchen. Derartige Untersuchungen sollten Rückschlüsse auf die Struktur und die Elektronenverteilung des ersten Zwischenproduktes des Katalysezyklus von Cytochrom P450_{cam} erlauben.

Das P450-Analogon **7** wurde über **8** aus der Disäure **9** hergestellt, einer Verbindung, die wir kürzlich als P450-Enzymmodell mit Substratkennungsstellen synthetisiert hatten (Schema 2).^[10] Nach dem Einbau des Eisenzentrums isolierte man das Bromid **7-Br**⁻ ($\lambda_{\text{max}} = 400 \text{ nm}$), das nach Reduktion mit KH in Benzol/[18]Krone-6 den Eisen(II)-Komplex **10** ($\lambda_{\text{max}} = 422 \text{ nm}$) gab, der in seiner protonierten Form **11** spektroskopisch charakterisiert wurde. Die Bindung von CO an **10** führte zum hexakoordinierten Eisen(II)-Porphyrin **12**, das eine für P450-Enzyme charakteristisch verschobene Soret-Bande bei 448 nm aufwies. Reaktionen mit verschiedenen Substraten in Gegenwart von „O“-Donoren und katalytischen Mengen an **7** dokumentieren ferner, daß dieses System P450-ähnliche Reaktivität aufweist.^[11] Die Umsetzung von **7-Br**⁻ mit Wasser/Toluol in 24 h führte unter Ligandenaustausch zum Eisen(III)-Porphyrin **7-H**₂**O**, das durch eine Soret-Bande bei 408 nm charakterisiert ist. Die Bindung eines Wassermoleküls an das Eisen(III)-Zentrum von der distalen Seite wird durch das Elektrosprayionisations-(ESI)-Massenspektrum (m/z 1623 [M^+]) belegt. Demnach ist der Komplex **7** als geeignetes spektroskopisches und chemisches Enzymmodell für Cytochrom P450 anzusehen.

Im nativen P450_{cam} kann man den Wechsel vom Zustand mit hexakoordiniertem Low-spin-Fe^{III} im „Resting State“ **1** zum Zustand mit pentakoordiniertem High-spin-Fe^{III} im Enzym-Substrat-Komplex **2** leicht CW-EPR-spektroskopisch verfolgen. Der Low-spin-Zustand **1** gibt ein EPR-Spektrum mit den *g*-Werten 2.45, 2.26 und 1.91, das bei Zugabe von



Schema 2. Synthese von **7-H**₂**O**, einem spektroskopischen und chemischen Enzymmodell für den „Resting State“ von Cytochrom P450_{cam}: a) CH_2N_2 , CH_2Cl_2 , 25°C , 30 min; b) FeBr_2 , 2,6-Lutidin, Toluol, Rückfluß, 1 h; c) KH , [18]Krone-6, Benzol, 25°C , 30 min; d) CO , Toluol, 25°C , 30 min; e) Silicagel, $[\text{D}_8]\text{Toluol}$.

Campher in eine rhombisch verzerrte High-spin-Form **2** mit $g = 7.85$, 3.97 und 1.78 übergeht.^[12,13] Abbildung 1a zeigt das CW-EPR-Spektrum des synthetischen P450-Analogons **7-H**₂**O** bei 10 K. Das nahezu axialsymmetrische EPR-Spektrum mit $g_\perp = 5.67$ und $g_\parallel = 2.00$ ist charakteristisch für ein High-spin-Eisen(III)-Porphyrin ohne signifikante rhombische Beiträge des Ligandenfeldes. Es ist bekannt, daß der g_\parallel -Extremwert senkrecht zur Porphyrinebene orientiert ist und der von g_\perp in der Porphyrinebene liegt.^[14] Da sich der einzige Hinweis auf eine Koordination von Wasser an das Eisen(III)-Zentrum in **7-H**₂**O** auf ein ESI-Massenspektrum stützte, erschien uns eine vollständige Charakterisierung der Eisen(III)-Ligandsphäre durch Puls-EPR- und ENDOR-Spektroskopie sinnvoll. Der Austausch des Wasserliganden in **7-H**₂**O** in Gegen-

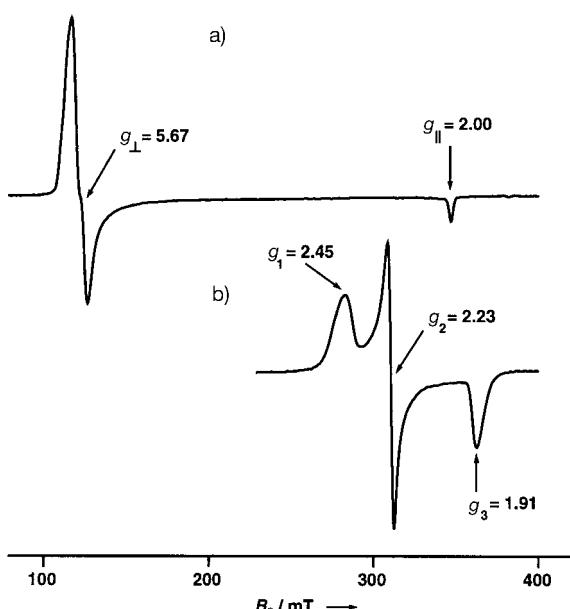
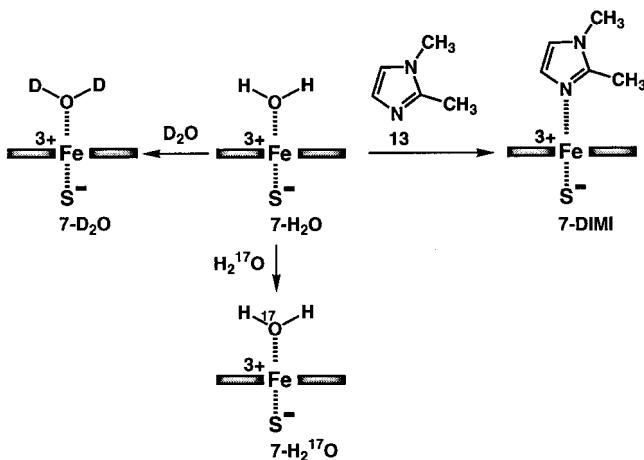


Abb. 1. a) CW-EPR-Spektrum der High-spin-Verbindung **7**-H₂O (Lösungsmittel: MTHF; $T=10\text{ K}$); b) CW-EPR-Spektrum der Low-spin-Verbindung **7**-DIMI (Lösungsmittel: MTHF; $T=100\text{ K}$).

wart von 1,2-Dimethylimidazol (DIMI) **13** im Überschüß lieferte den Low-spin-Komplex **7**-DIMI (Schema 3). Es sei betont, daß das entsprechende CW-EPR-Spektrum (Abb. 1b) g -Werte zeigt (2.45, 2.23 und 1.91), die mit denen des nativen P450_{cam} im Low-spin-Zustand **1** nahezu identisch sind. Diese spektroskopische Übereinstimmung des Komplexes **7** mit dem „Resting State“ von P450_{cam} spricht in überzeugender Weise für die Eignung von **7** als Enzymmodell.



Schema 3. Austausch des distalen, sechsten Liganden von **7**-H₂O.

Bezüglich der Koordination von Wasser an Fe^{III} sind die Protonen-Hyperfeinwechselwirkungen verschiedener ähnlicher, natürlicher High- und Low-spin-Hämsysteme aus ENDOR-Studien her bekannt.^[15] Bei High-spin-Systemen liegt die erwartete Protonen-Hyperfeinkopplung entlang g_{\parallel} ($a_{\text{iso}} + A(g_{\parallel})$) bei etwa 6 MHz und ist überwiegend von dipolarem Charakter.^[16] Das Dreipuls-ESEEM-Spektrum

von **7**-H₂O zeigt keine Hinweise auf eine derartige starke Protonenwechselwirkung (Abb. 2a). Der Austausch des Wasserliganden in **7**-H₂O im Lösungsmittelgemisch 2-Methyltetrahydrofuran(MTHF)/D₂O war nach 12 h vollständig; der gebildete Komplex **7**-D₂O zeigte im Dreipuls-ESEEM-Spektrum ein intensives Deuteriumsignalpaar, zentriert um die Kern-Zeeman-Frequenz von Deuterium und mit einer Aufspaltung von 1.04 MHz (Abb. 2b).

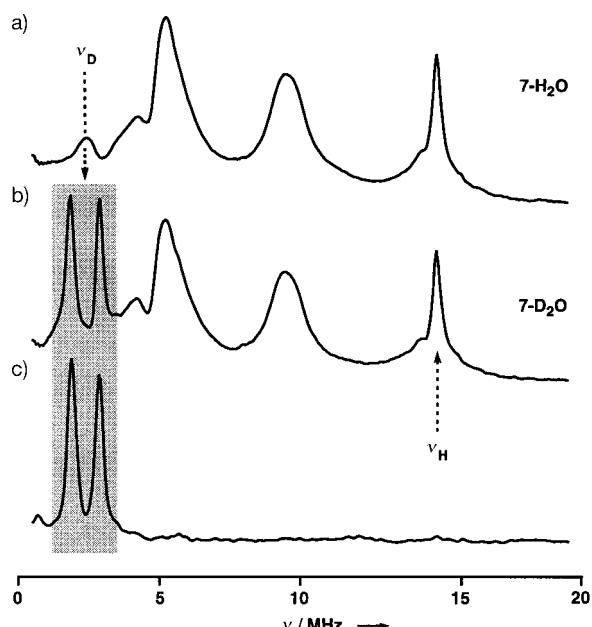


Abb. 2. a) und b) Dreipuls-ESEEM-Spektrum von **7**-H₂O und **7**-D₂O (Lösungsmittel: MTHF; $T=3.3\text{ K}$; Orientierung: g_{\parallel} ; Summe von 64 r -Werten); c) Fourier-Transformation des Verhältnisses der Zeitsignale von **7**-D₂O und **7**-H₂O.

Die Fourier-Transformation des Verhältnisses der Zeitsignale von **7**-D₂O und **7**-H₂O enthält nur die Deuteriummodulationen (Abb. 2c), obwohl prinzipiell Reste nicht unterdrückter Spektrallinien bei Frequenzen, die anderen Kernen und deren Kombinationen entsprechen, vorhanden sein sollten; die Intensitäten dieser Linien sind aber offensichtlich sehr klein und können deshalb vernachlässigt werden.^[9a,17] Aus der beobachteten Deuteriumwechselwirkung kann die erwartete Protonen-Hyperfeinkopplung senkrecht zur Porphyrinebene zu 6.77 MHz ($g_H/g_D=6.51$) berechnet werden. Genau diesen Wert für die Protonen-Hyperfeinkopplung kann man dem Davies-ENDOR-Spektrum von **7**-H₂O (Abb. 3a) entnehmen. Das entsprechende Signalpaar wird beim Austausch gegen D₂O vollständig entfernt, während alle anderen Protonenlinien bei der Austauschreaktion unverändert bleiben (Abb. 3b). Die Deuteriumsignale sind im Davies-ENDOR-Spektrum wegen der geringen Empfindlichkeit dieser Technik bei niedrigen Frequenzen nicht beobachtbar; ebenso treten die breiten Protonenlinien wegen der Totzeit des Spektrometers im Dreipuls-ESEEM-Spektrum nicht auf. Somit ergänzen sich in diesem Fall die Davies-ENDOR- und die Dreipuls-ESEEM-Spektroskopie hervorragend. Die gut aufgelösten, kleinen Protonen-Hyperfeinkopplungen (Abb. 3) können den *meso*-Protonen ($A_1=0.95\text{ MHz}$)

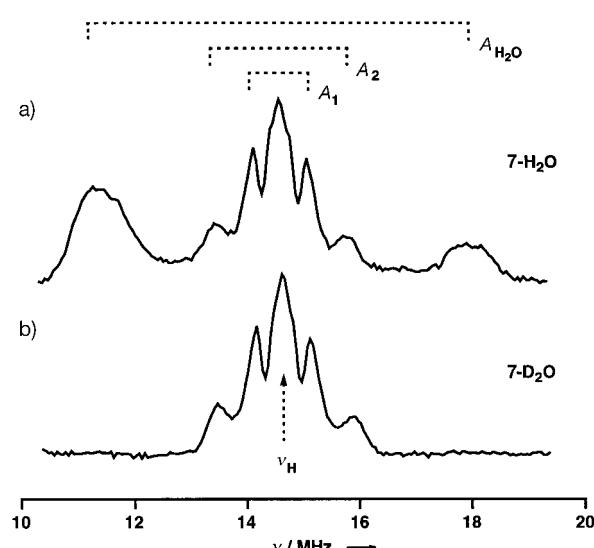


Abb. 3. Davies-ENDOR-Spektrum (Protonenbereich) a) von $7\text{-H}_2\text{O}$ und b) von $7\text{-D}_2\text{O}$ (Lösungsmittel: MTHF; $T = 3.3\text{ K}$; Orientierung: $g_{||}$).

des Porphyrinliganden und den Benzylprotonen ($A_2 = 2.30\text{ MHz}$) der „Thiophenolatbrücke“ zugeordnet werden.

In einem weiteren Experiment wurde der Wasserligand in $7\text{-H}_2\text{O}$ gegen H_2^{17}O ausgetauscht. Das CW-EPR-Spektrum des gebildeten Komplexes $7\text{-H}_2^{17}\text{O}$ zeigt keine Linienverbreiterung, das Davies-ENDOR-Spektrum hingegen erwies sich als sehr aufschlußreich (Abb. 4). Durch Subtraktion der

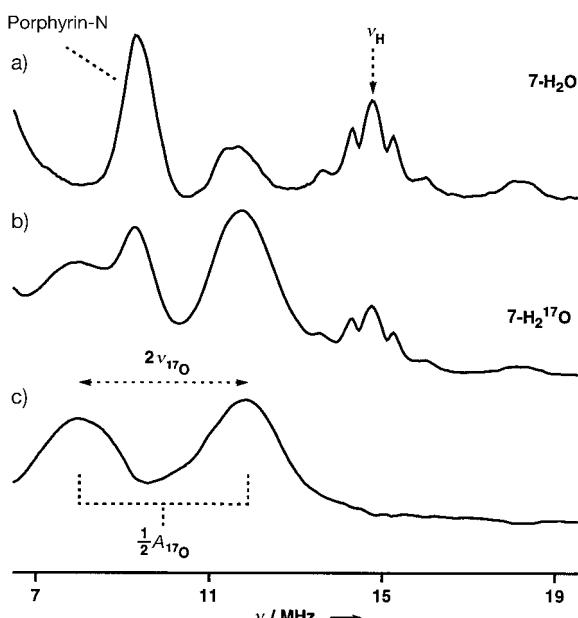


Abb. 4. a) und b) Davies-ENDOR-Spektren von $7\text{-H}_2\text{O}$ und $7\text{-H}_2^{17}\text{O}$ (nicht maßstabsmäßig; Lösungsmittel: MTHF; $T = 3.3\text{ K}$; Orientierung: $g_{||}$); c) Differenzspektrum, $7\text{-H}_2^{17}\text{O} - 7\text{-H}_2\text{O}$.

beiden ENDOR-Spektren von $7\text{-H}_2^{17}\text{O}$ und $7\text{-H}_2\text{O}$ erhält man zwei intensive ^{17}O -Linien, zentriert bei $1/2 A(^{17}\text{O})$ ($A(^{17}\text{O}) = 19.83\text{ MHz}$). Die Aufspaltung der beiden Signale entspricht der zweifachen Kern-Zeeman-Frequenz von ^{17}O ($2\nu(^{17}\text{O}) = 3.98\text{ MHz}$), wobei die beobachtete Linienverbreiterung auf

der Kern-Quadrupol-Wechselwirkung von ^{17}O ($I = 5/2$) beruht. Diese ^{17}O -Hyperfeinkopplung ist bemerkenswert stark im Vergleich zur schwachen Fe- ^{17}O -Wechselwirkung im Low-spin-Zustand **1**, wo die Elektronendichte der ungepaarten Elektronen überwiegend im d_{yz} -Orbital von Fe^{III} lokalisiert ist.^[9a]

$7\text{-H}_2\text{O}$ ist demnach ohne Zweifel ein hexakoordiniertes Eisen(III)-Porphyrin, bei dem ein Wassermolekül und ein Thiolatligand das Eisenzentrum koordinieren. Im Unterschied zu **1**, dem „Resting State“ von $\text{P}450_{\text{cam}}$, ist das synthetische Enzymmodell $7\text{-H}_2\text{O}$ eindeutig im High-spin-Zustand und wechselt nur dann in einen Low-spin-Zustand, wenn der Wasserligand gegen einen stärkeren Liganden, z. B. 1,2-Dimethylimidazol (**13**), ausgetauscht wird.

Wie bereits diskutiert, haben ESEEM-Studien mit dem Enzym $\text{P}450_{\text{cam}}$ ergeben,^[9] daß tatsächlich ein Wassermolekül und nicht ein Hydroxidion das Eisenzentrum koordiniert. Berücksichtigt man diese und die hier vorliegenden Ergebnisse, so folgt daraus unmittelbar, daß die Koordination von Wasser nicht der einzige entscheidende Faktor für die Bildung eines Low-spin-Systems für den „Resting State“ von $\text{P}450_{\text{cam}}$ sein kann. Unsere Resultate sind die erste experimentelle Bestätigung für kürzlich durchgeführte Rechnungen,^[18] INDO/ROHF-Rechnungen und Moleküldynamiksimulationen von Cytochrom $\text{P}450_{\text{cam}}$ führen zur Annahme, daß zwei kooperative Faktoren den Low-spin-Zustand von **1** stabilisieren: Die Koordination von Wasser mit Eisen(III) vermindert die Energiedifferenz zwischen dem High-spin- und dem Low-spin-Zustand von 75.4 auf 15.9 kJ mol^{-1} , und das elektrische Feld des Proteins stabilisiert den Low-spin-Zustand um 7.5 kJ mol^{-1} unterhalb des High-spin-Zustandes. Bezuglich unseres Enzymmodells ergibt eine einfache Abschätzung, daß eine Punktladung im Abstand von 7 \AA oberhalb der Porphyrinebene von $7\text{-H}_2\text{O}$ ein elektrostatisches Potential von etwa 2 V erzeugen würde. Entsprechend den Rechnungen^[18] würde dies ausreichen, um den Low-spin-Zustand energetisch signifikant gegenüber dem High-spin-Zustand zu stabilisieren. Experimente mit positiv geladenen Substituenten an den Kemp-Säure-Gruppen von $7\text{-H}_2\text{O}$ sind in Vorbereitung, um den Einfluß des elektrischen Feldes auf den Spinzustand des Eisen(III)-Hämthiolats zu untersuchen.^[19]

Experimentelles

8: Zu einer Lösung von 60 mg (0.04 mmol) **9**^[10] in 10 mL CH_2Cl_2 wurden tropfenweise 3 mL einer 0.23 M CH_2N_2 -Lösung in Diethylether gegeben. Die rote Lösung wurde 30 min unter Argon bei 25°C gerührt, anschließend engte man im Vakuum ein und reinigte den Rückstand durch Flash-Chromatographie an Silicagel (Toluol/AcOEt, 8/2). Man isolierte 52 mg (0.033 mmol , 83%) **8** als roten Feststoff. DC (Toluol/AcOEt, 8/2): $R_f = 0.85$; Schmp. $> 250^\circ\text{C}$; UV/Vis (CH_2Cl_2): $\lambda_{\text{max}} (\%) = 416$ (100), 510 (12), 574 (8), 588 (5), 654 nm (3); $^1\text{H-NMR}$ (300 MHz , $[\text{D}_6]\text{Aceton}$): $\delta = 10.15$ (s, 2 H , meso-H), 8.35 (s, 2 H , Ar-H), 7.17 (s, 2 H , Ar-H), 6.26 (s, 2 H , Ar-H), 4.05 – 4.01 (m, 8 H , Pyrrol- CH_2), 3.71 – 3.69 (m, 4 H , OCH_2), 3.35 (s, 6 H , COOMe), 2.80 – 2.77 (s, 12 H , Pyrrol- CH_3 , sowie m, 4 H , H_{aq}), 2.39 (d, $J = 13.02\text{ Hz}$, 2 H , H_{aq}), 2.30 (s, 6 H , Ar- CH_3), 2.17 – 2.13 (m, 8 H , Pyrrol- CH_2CH_2), 1.82 – 1.77 (m, 8 H , Pyrrol-(CH_2CH_2)), 1.43 (s, 16 H , 4Me), 1.29 (s, 6 H , 2Me), 1.16 (m, 6 H , H_{ax}), 1.09 (t, 12 H , Pyrrol-(CH_2CH_2)), 0.86 (s, 9 H , tBu), 0.85 (m, 4 H , OCH_2CH_2), 0.62 – 0.50 (m, 4 H , $\text{O}(\text{CH}_2)_2\text{CH}_2$), -2.10 (s, 1 H , NH), -2.65 (s, 1 H , NH), -3.10 (s, 1 H , SH); ESI-MS

(CH₂Cl₂/MeOH, 1/9); *m/z*: 1552 [M⁺]; MALDI-TOF: *m/z*: 1551 [M⁺] (C₉₆H₁₂₂N₆O₁₀S (1550.89)).

7-Br⁻: Unter Schutzgas wurden zu einer Lösung von 50 mg (0.032 mmol) **8** in 10 mL Toluol unter Rückfluß drei Tropfen 2,6-Lutidin und eine Spatelspitze FeBr₂ gegeben. Die dunkelbraune Lösung wurde 1 h unter Rückfluß erhitzt, anschließend eingeeengt und der Rückstand durch Flash-Chromatographie an Silicagel (Toluol/AcOEt, 8/2) gereinigt. Man erhielt 39 mg (0.024 mmol, 76 %) **7-Br⁻** als braunen Feststoff. DC (Toluol/AcOEt, 8/2): *R_f*=0.75; Schmp. >250 °C; UV/Vis (Toluol): λ_{max} (%) = 400 (100), 512 (8), 592 nm (5); ¹H-NMR (250 MHz, CDCl₃): δ = 78.9 (br. s, 2H, *meso*-H), 40.5 (s, 12H, Pyrrol-CH₃), 38.5 (s, 8H, Pyrrol-CH₂), 12.8 (s, 2H, Ar-H), 9.5 (m, 4H, Ar-H), 5.3 (s, 6H, COOME), 4.96 (m, 6H, OCH₂, 4H_{aq}), 3.84 (m, 6H, OCH₂CH₂, 4H_{aq}), 3.23 (s, 6H, Ar-CH₃), 2.99 (m, 8H, 2H_{ax}+2H_{aq}), Pyrrol-CH₂CH₂), 2.69 (m, 8H, Pyrrol-(CH₂)₂CH₂), 2.45 (s, 6H, 2Me), 1.77 (s, 12H, 4Me), 1.3 (m, 12H, Pyrrol-(CH₂)₃CH₃), 0.91 (s, 9H, *t*Bu), 0.11 (s, 4H, O(CH₂)₂CH₂); ESI-MS (CH₂Cl₂/MeOH, 1/9); *m/z*: 1606[M⁺]; MALDI-TOF: *m/z*: 1606[M⁺] (C₉₆H₁₁₉N₆O₁₀FeS (1603.81)); bei beiden MS-Methoden wird als M⁺-Peak der des Moleküls ohne das Gegenion Br⁻ erhalten.

7-H₂O: 10 mg (6.23 μmol) **7-Br⁻** wurden in einer Mischung aus 2 mL Toluol und 0.5 mL Wasser 20 h bei 25 °C unter Argon gerührt. Anschließend wurde die organische Phase abgetrennt und im Vakuum eingeeengt. Der braune Rückstand wurde durch Flash-Chromatographie an Silicagel gereinigt (Toluol/AcOEt, 8/2) und gab 7 mg (4.32 μmol, 69 %) **7-H₂O** als braunen Feststoff; UV/Vis (CH₂Cl₂): λ_{max} (%) = 408 (100), 519 (7), 595 nm (3); ESI-MS (CH₂Cl₂/MeOH, 1/9); *m/z*: 1623 [M⁺] (C₉₆H₁₂₁N₆O₁₁FeS (1621.82)).

10 und 11: Unter Schutzgas wurde zu einer Lösung von 10 mg (6.23 μmol) **7-Br⁻** in 0.2 mL [D₆]Benzol eine Spatelspitze KH sowie [18]Krone-6 im Überschuß gegeben. Die resultierende rote Lösung wurde 30 min bei 25 °C gerührt, danach wurde eine Probe entnommen, um die vollständige Bildung von **10** nachzuweisen; UV/Vis (Toluol): λ_{max} (%) = 422 (100), 565 (8), 655 nm (5). Die Reaktionsmischung wurde durch Flash-Chromatographie an Silicagel ([D₈]Toluol) getrennt und **11** als roter Feststoff isoliert; UV/Vis (Toluol): λ_{max} (%) = 418 (100), 486 (13), 510 (9), 564 (5), 622 (3), 648 nm (2); ¹H-NMR (250 MHz, [D₈]Toluol): δ = 39.96 (s, 2H, *meso*-H), 7.1 (s, 4H, Ar-H), 6.96 (s, 2H, Ar-H), 4.50 (m, Pyrrol-CH₂), 4.28 (m, 4H, OCH₂), 3.9–2.5 (m, 32H), 2.38 (s, 6H, Ar-CH₃), 2.11 (m, 2H), 1.65 (m, 8H, Pyrrol-CH₂CH₂), 1.59 (m, 8H, Pyrrol-(CH₂)₂CH₂), 1.32 (m, 12H, Pyrrol-(CH₂)₃CH₃), 1.11 (m, 4H, OCH₂CH₂), 0.92 (s, 9H, *t*Bu), 0.37 (m, 4H, O(CH₂)₂CH₂), –42 (s, 1H, SH).

12: In eine Lösung von **10** in Toluol wurde 3 h CO eingeleitet. Die Bildung des hexakoordinierten CO-Komplexes **12** wurde UV/Vis-spektroskopisch nachgewiesen; UV/Vis (CH₂Cl₂): λ_{max} (%) = 416 (100), 448 (27), 510 (8), 574 (5), 654 nm (2).

7-DIMI: 18.4 mg (0.191 mmol) 1,2-Dimethylimidazol **13** wurden zu einer Lösung von 3 mg (1.87 μmol) **7-Br⁻** in 0.2 mL 2-Methyltetrahydrofuran gegeben. Die rotbraune Lösung wurde 24 h unter Argon bei 25 °C gerührt. Anschließend wurde im Vakuum bis zur Trockne eingeeengt, in 3 mL Toluol aufgenommen und durch Celite filtriert, um den Überschuß an 1,2-Dimethylimidazol zu entfernen. Nach Entfernung des Lösungsmittels am Vakuum erhielt man einen braunen Feststoff; UV/Vis (CH₂Cl₂): λ_{max} (%) = 402 (100), 512 (8), 592 nm (5).

7-D₂O und 7-H₂¹⁷O: Zu 250 μL einer 10 mM Lösung von **7-H₂O** in 2-Methyltetrahydrofuran wurden 100 μL D₂O (Cambridge Isotope Laboratories, D-Anreicherung 99.996 %) bzw. 100 μL H₂¹⁷O (Cambridge Isotope Laboratories, ¹⁷O-Anreicherung 46 %) gegeben und die Gemische bei 25 °C unter Argon 12 h gerührt. Nach Abtrennung der Wasserphase wurde die Lösung jeweils direkt für die EPR-Experimente verwendet.

EPR- und ENDOR-Probenvorbereitung: Die Lösungen von **7-H₂O**, **7-D₂O**, **7-H₂¹⁷O** und **7-DIMI** in 2-Methyltetrahydrofuran (Fluka, purum), Konzentration 5–10 mM, wurden in ein EPR-Probenröhrchen gefüllt und anschließend mehrmals durch das Anlegen eines Vakuums ent gast.

EPR- und ENDOR-Ausrüstung: CW-EPR-Spektren bei 100 K wurden an einem Bruker-ESP-300-Spektrometer (Mikrowellenfrequenz 9.485 GHz) unter Verwendung eines Flüssig-Stickstoff-Kryostaten aufgenommen. Die CW-EPR-Spektren bei 10 K und alle Pulse-EPR- und ENDOR-Spektren (durchwegs 3.3 K) wurden an einem Bruker-ESP-380-Spektrometer (Mikrowellenfrequenz 9.717 GHz) unter Verwendung eines Oxford-Flüssig-

Helium-Kryostaten aufgenommen. Die CW-EPR-Spektren der gefrorenen Lösungen wurden bei einer Mikrowellenleistung von 20 mW, einer Modulationsamplitude von 0.5 mT und einer Modulationsfrequenz von 100 kHz aufgenommen. Das Magnetfeld wurde mit einem Bruker-NMR-Gaußmeter ER 035M gemessen. Alle Puls-EPR- und ENDOR-Messungen wurden mit einer Repetitionsrate von 1 kHz durchgeführt.

Dreipuls-ESEEM:^[20] Die Experimente wurden mit der Pulssequenz $\pi/2-\tau-\pi/2-t-\pi/2-\tau$ -Echo durchgeführt, wobei die Pulslänge 16 ns betrug. Die Echointensität wurde als Funktion der Zeit *t* gemessen, welche von 16 bis 8200 ns in Schritten von 8 ns inkrementiert wurde. *t* wurde zwischen 88 und 592 ns in Schritten von 8 ns variiert, um Signalverzerrungen durch den Unterdrückungseffekt („blinde Stellen“) zu vermeiden. Ein Vierschritt-Phasencyclus wurde verwendet, um unerwünschte Echobbeiträge zu eliminieren.^[21]

Davies-ENDOR:^[22] Die Spektren wurden mit der Pulssequenz $\pi-t-\pi/2-\tau-\pi-\tau$ -Echo aufgenommen, wobei Pulslängen von 48 und 96 ns für die $\pi/2$ - und die π -Pulse sowie ein *t*-Wert von 104 ns verwendet wurden. Ein selektiver Radiofrequenz(RF)- π -Puls mit variabler Frequenz ν_{RF} wurde während des Zeitintervalls *t* eingestrahlt. Die Länge des Radiofrequenzpulses betrug 8504 ns, und die Frequenz ν_{RF} wurde in Schritten von 50 kHz inkrementiert.

EPR- und ENDOR-Datenauswertung: Alle Datenauswertungen wurden mit dem Programm MATLAB 5.1. (The MathWorks, Inc., Naticle, MA) durchgeführt. Die Zeitsignale der Dreipuls-ESEEM-Daten wurden mit einem Polynom 5. Grades basislinienkorrigiert und mit einer Hamming-Funktion apodisiert. Vor der Fourier-Transformation wurde ein Zero-filling durchgeführt. Alle Frequenzbereich-Dreipuls-ESEEM-Resultate sind als Absolutwertspektren dargestellt. Um den Unterdrückungseffekt zu eliminieren, wurden die Dreipuls-ESEEM-Spektren, welche bei verschiedenen *t*-Werten aufgenommen wurden, addiert.

Eingegangen am 2. Juni 1998 [Z11932]

Stichwörter: Cytochrom P450 • Enzymmimetica • EPR-Spektroskopie • Porphyrinoide

- [1] P. Ortiz de Montellano, *Cytochrome P450. Structure, Mechanism, and Biochemistry*, 1. Aufl., Plenum, New York, **1986**; 2. Aufl., Plenum, New York, **1995**.
- [2] a) T. L. Poulos, B. C. Finzel, I. C. Gunsalus, G. C. Wagner, J. Kraut, *J. Biol. Chem.* **1985**, 260, 16122–16130; b) T. L. Poulos, B. C. Finzel, A. J. Howard, *Biochemistry* **1986**, 25, 5314–5322.
- [3] a) T. L. Poulos, B. C. Finzel, A. J. Howard, *J. Mol. Biol.* **1987**, 195, 687–700; b) R. Raag, T. L. Poulos, *Biochemistry* **1989**, 28, 916–922; c) R. Raag, T. L. Poulos, *Biochemistry* **1989**, 28, 7586–7592.
- [4] W.-D. Woggon, *Top. Curr. Chem.* **1996**, 184, 39–96.
- [5] T. I. Oprea, G. Hummer, A. E. Garcia, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1997**, 94, 2133–2138.
- [6] S. G. Sligar, *Biochemistry* **1976**, 15, 5399–5406.
- [7] a) S. Shaik, M. Filatov, D. Schröder, H. Schwarz, *Chem. Eur. J.* **1998**, 4, 193–199; b) M. Newcomb, M.-H. Le Tadic, D. A. Putt, P. F. Hollenberg, *J. Am. Chem. Soc.* **1995**, 117, 3312–3313; c) M. Newcomb, M.-H. Le Tadic-Biadatti, D. L. Chestney, E. S. Roberts, P. F. Hollenberg, *J. Am. Chem. Soc.* **1995**, 117, 12085–12091.
- [8] G. H. Loew, J. Collins, B. Luke, A. Waleh, A. Pudzianowski, *Enzyme* **1986**, 36, 54–78.
- [9] a) H. Thomann, M. Bernardo, D. Goldfarb, P. M. H. Kroneck, V. Ullrich, *J. Am. Chem. Soc.* **1995**, 117, 8243–8251; b) D. Goldfarb, M. Bernardo, H. Thomann, P. M. H. Kroneck, V. Ullrich, *J. Am. Chem. Soc.* **1996**, 118, 2686–2693.
- [10] H. Aissaoui, S. Ghirlanda, C. Gmür, W.-D. Woggon, *J. Mol. Catal. A* **1996**, 113, 393–402.
- [11] H. Aissaoui, W.-D. Woggon, noch unveröffentlichte Ergebnisse.
- [12] R. Tsai, C. A. Yu, I. C. Gunsalus, J. Peisach, W. Blumberg, W. H. Orme-Johnson, H. Beinert, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1970**, 66, 1157–1163.
- [13] J. D. Lipscomb, *Biochemistry* **1980**, 19, 3590–3599.
- [14] C. P. Scholes, A. Lapidot, R. Mascarenhas, T. Inubushi, R. A. Isaacson, G. Feher, *J. Am. Chem. Soc.* **1982**, 104, 2724–2735.

- [15] a) R. Lobrutto, C. P. Scholes, G. C. Wagner, I. C. Gunsalus, P. G. Debrunner, *J. Am. Chem. Soc.* **1980**, *102*, 1167–1170; b) Y.-C. Fann, N. C. Gerber, P. A. Osmulski, L. P. Hager, S. G. Sligar, B. M. Hoffman, *J. Am. Chem. Soc.* **1994**, *116*, 5989–5990.
- [16] C. F. Mulks, C. P. Scholes, L. C. Dickinson, A. Lapidot, *J. Am. Chem. Soc.* **1979**, *101*, 1645–1654.
- [17] J. Peisach, W. B. Mims, J. L. Davis, *J. Biol. Chem.* **1984**, *259*, 2704–2706.
- [18] D. Harris, G. H. Loew, *J. Am. Chem. Soc.* **1993**, *115*, 8775–8779.
- [19] H. Aissaoui, R. Bachmann, A. Schweiger, W.-D. Woggon, noch unveröffentlichte Ergebnisse.
- [20] a) A. Schweiger, *Angew. Chem.* **1991**, *103*, 223–250; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1991**, *30*, 265–292; b) S. A. Dikanov, Y. D. Tsvetkov, *Electron Spin Echo Envelope Modulation (ESEEM) Spectroscopy*, CRC, Boca Raton, FL, **1992**.
- [21] J.-M. Fauth, A. Schweiger, L. Braunschweiler, J. Forrer, R. R. Ernst, *J. Magn. Reson.* **1986**, *66*, 74–85.
- [22] E. R. Davies, *Phys. Lett. A* **1974**, *47A*, 1–2; b) C. Gemperle, A. Schweiger, *Chem. Rev.* **1991**, *91*, 1481–1505.

überzogen sind. Ein besonders interessanter Aspekt ist, daß der gesamte Vorgang in einer homogenen Phase abläuft, obwohl die Nucleation als heterogen anzusehen ist, da sie an einer Flüssig-fest-Grenzfläche stattfindet.

Unser Interesse galt bisher der Kristallisation von Calcium- und in geringerem Maße Strontiumcarbonat auf selbstorganisierten Monoschichten aus langketigen Thiolen, die auf goldbeschichteten Glassubstraten in zwei Dimensionen (2D) organisiert sind.^[8–11] Angeregt durch die in Lebewesen ablaufenden Prozesse, haben wir den Einfluß unterschiedlicher Substituenten in ω -Position der Thiolketten auf die Art und Morphologie der entstehenden Calciumcarbonat-Modifikationen (Aragonit, Calcit oder Vaterit) untersucht. In manchen Fällen wurde ein klarer Zusammenhang zwischen der 2D-Struktur der SAM und den darauf wachsenden Kristallen festgestellt.^[9] Diese Arbeiten ergänzen frühere Untersuchungen und geben so einen Einblick in die templatinduzierte Kristallisation carbonathaltiger Biominerale; darüber hinaus sind sie wegweisend für milde Syntheserouten zu nützlichen Materialien.

Im Verlauf dieser Untersuchungen rückten Goldkolloide in den Mittelpunkt unseres Interesses. Deren geringe Größe (mit den hier vorgestellten Methoden im Bereich von 2–10 nm) sorgt dafür, daß eine vergleichsweise große Oberfläche erhalten wird. Die Selbstorganisation von Thiolen auf Goldkolloiden bietet die Möglichkeit zur Herstellung von Partikeln, die gegen Selbstaggregation geschützt sind und deren Löslichkeit in verschiedenen Lösungsmitteln durch Variation von Größe und ω -Funktionalitäten der Thiole eingestellt werden kann.^[12, 13] Thiolbeschichtete Goldkolloide können chromatographisch gereinigt, verdampft, kondensiert, ausgefällt und wieder aufgelöst werden. Sie weisen damit Eigenschaften auf, die üblicherweise Molekülen zugeschrieben werden.^[12, 14, 15] Vor kurzem gelang es uns, Goldkolloide mit einem Polymerisationskatalysator auf Ru-Basis zu beschichten und so ein Material zu erhalten, das Eigenschaften homogener und heterogener Katalysatoren vereint.^[16] Werden Goldkolloide mit *p*-Sulfanylphenol beschichtet, so ist das Produkt bei pH $\gtrsim 12$ wasserlöslich.^[13] Obwohl eine Lösung dieser Kolloide als homogen zu bezeichnen ist, verfügen die Kolloide über eine definierte Oberfläche. Sie können deshalb zur heterogenen Kristallkeimbildung in gesättigten Lösungen genutzt werden. Dabei ist die unterschiedliche Topologie von planaren und runden Templayen zu beachten. Die Verwendung von Goldkolloiden anstelle planarer Goldsubstrate eröffnet die Möglichkeit, neuartige Kristall- oder Kristallaggregatgeometrien durch die templatinduzierte Kristallisation hervorzubringen.

Fritz et al.^[17] haben die Bildung von flachen Perlen auf anorganischen Substraten untersucht, die zwischen Schale und Mantel einer roten Abalone-Muschel gebracht wurden. Dabei bilden sich zuerst orientierte Calcit- und Proteinschichten. Anschließend wachsen Stapel von Aragonitkristalliten entlang ihrer pseudo-sechszähligen Kristallachse. Die Proteine bilden sich in den Epithelzellen des Muschelmantels. Unser Ansatz unterscheidet sich hiervon deutlich: Wir versuchen nicht, das natürliche Wachstum von Perlen zu simulieren, sondern wir lassen uns durch die Art, wie sie gebildet werden, anregen. Das in dieser Arbeit verwendete

Kristallisation von Calcitkugeln durch maßgeschneiderte Nucleationskeime**

Jörg Küther, Ram Seshadri und Wolfgang Tremel*

Professor Bernt Krebs zum 60. Geburtstag gewidmet

Viele lebende Organismen können die Kristallisation mancher anorganischer Mineralien sehr genau kontrollieren.^[1] Durch diese Kontrolle von Form und Modifikation entstehen Bausteine, die optimal an ihre jeweilige Funktion angepaßt sind. Die Produkte entsprechen manchmal nicht denen, die man unter thermodynamischen Aspekten erwartet. Werden komplexe Komposite aus hochorganisierten Mineralien und organischen Matrices aufgebaut, so werden die Zusammenhänge in Organismen wesentlich komplexer.^[2] Die Bedeutung anorganisch-organischer Grenzflächen für das Studium der Biomineralisation ist bereits früh erkannt worden. Langmuir-Monoschichten,^[3] proteinbeschichtete Substrate,^[4] Polymerdispersionen,^[5] micellare Medien^[6] und selbstorganisierte Monoschichten (SAMs)^[7–9] wurden als Template oder Substrate für die Kristallisation von Mineralien wie Calciumcarbonat genutzt. Wir zeigen hier, daß gebräuchliche SAM-Methoden verwendet werden können, um auf nanoskopischer Ebene Oberflächen gezielt zur heterogenen Nucleation anorganischer Verbindungen aus wäßrigen Lösungen einzusetzen. Als Nucleationskeime werden dabei ca. 5 nm große Goldkolloide eingesetzt, die mit einer selbstorganisierten Monoschicht aus *p*-Sulfanylphenol

[*] Prof. Dr. W. Tremel, Dr. J. Küther, Dr. R. Seshadri
Institut für Anorganische Chemie
und Analytische Chemie der Universität
Johann-Joachim-Becher-Weg 24, D-55099 Mainz
Fax: (+49) 6131-39-3922
E-mail: tremel@indigotrem1.chemie.uni-mainz.de

[**] Wir danken der Degussa AG, Hanau, für großzügige Goldspenden und Dr. Gabriele Nelles für die AFM-Untersuchungen. Diese Arbeit wurde vom Fonds der chemischen Industrie unterstützt.