

Polymere, z.B. den  $[n]$ -Nylons,<sup>[9]</sup> schmelzen die  $[n]$ -Polyurethane mit einer ungeraden Zahl von Methylengruppen in der Hauptkette der Monomeren bei niedrigeren Temperaturen als die  $[n]$ -Polyurethane mit einer geraden Zahl von Methylengruppen.<sup>[10]</sup> Die beobachteten Schmelzpunkte liegen um 10 bis 20 °C niedriger als die nach van Krevelens Theorie der additiven Gruppen vorhergesagten.<sup>[11]</sup> Es sollte erwähnt werden, daß man die Schmelzpunkte um etwa 5 °C anheben kann, wenn man die Fraktionen niedrigerer Molekulargewichte in einer langwierigen Soxhlet-Extraktion mit heißem Methanol entfernt.

Ein zufällig zusammengesetztes Copolymer aus 5-Isocyanatpentanol und 6-Isocyanathexanol in einem Molverhältnis von 1:1 wurde auf dem gleichen Weg wie die Homopolymere hergestellt. Anders als die Homopolymere sind die Copolymere in Chloroform löslich und vollständig amorph mit einer Glasübergangstemperatur von 8 °C laut DSC. Durch TGA wurde belegt, daß all diese Polymere bis 200 °C stabil sind, oberhalb dieser Temperatur zerfallen sie wegen der Umkehrbarkeit der Urethanbildung wieder.

Die einfache Synthese der aliphatischen  $[n]$ -Polyurethane unter Verwendung von Di-*tert*-butyltricarboxylat **2** zur Herstellung der geeigneten Monomere lieferte eine neue Klasse von Polymeren. Sie ist besonders im Hinblick auf biologisch abbaubare Polymere interessant, da die präparative Vorgehensweise auf alle Aminoalkohole mit einem Spacer von mindestens vier Kohlenstoffatomen zwischen den beiden funktionellen Einheiten anwendbar ist. Schließlich zeigt diese Arbeit auch, daß die Verwendung neuer Synthesemethoden aus der Organischen Chemie auch in der Polymersynthese sehr vielversprechend ist.

### Experimentelles

Die Synthese der  $[6]$ -Polyurethane wird an einem typischen Beispiel verdeutlicht: Eine Lösung von 5-Amino-1-pentanol (9.69 mmol, 1.00 g) in Chloroform (2 mL) wurde unter Rühren unter die Oberfläche einer Lösung von **2** (10.66 mmol, 2.80 g) in Chloroform (30 mL) injiziert. Die Lösung wurde 10 min bei Raumtemperatur unter Argon gerührt. <sup>1</sup>H-NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>):  $\delta$  = 3.67 (q, <sup>3</sup>J = 6.0 Hz, 2H; CH<sub>2</sub>OH), 3.32 (t, <sup>3</sup>J = 6.6 Hz, 2H; CH<sub>2</sub>NCO), 1.55 (br. m; 4H; CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>OH + CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>NCO), 1.40 (m, <sup>3</sup>J = 6.7 Hz, 2H; CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>); IR (CHCl<sub>3</sub>):  $\tilde{\nu}$  = 3396 (br, s), 2971 (m), 2274 (s) cm<sup>-1</sup>.

Zirkonium(IV)-acetylacetonat (0.1 Mol-%) wurde zugegeben, dann wurde 20 h in einer Argonatmosphäre unter ständigem Rühren bei Raumtemperatur polymerisiert. Die trübe Reaktionsmischung wurde in Diethylether ausgefällt (150 mL) und das polymere Produkt durch Vakuumfiltration in 63 % Ausbeute (0.81 g) erhalten. Schmp. 127 °C; Zers. bei 200 °C; <sup>1</sup>H-NMR (400 MHz, [D<sub>6</sub>]DMSO):  $\delta$  = 7.04 (br. t, 0.9H; NH, *trans*-Konformer), 6.72 (br. m, 0.1H; NH, *cis*-Konformer), 3.89 (t, <sup>3</sup>J = 6.2 Hz, 2H; CH<sub>2</sub>O), 2.95 (q, <sup>3</sup>J = 6.0 Hz, 2H; CH<sub>2</sub>N), 1.50 (m, <sup>3</sup>J = 7.2 Hz, 2H; CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>O), 1.40 (m, <sup>3</sup>J = 7.7 Hz, 2H; CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>N), 1.28 (m, <sup>3</sup>J = 6.6 Hz, 2H; CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>); <sup>13</sup>C-NMR (100 MHz, [D<sub>6</sub>]DMSO, 100 °C):  $\delta$  = 156.4 (C=O), 63.5 (CH<sub>2</sub>O), 40.1 (CH<sub>2</sub>N), 29.4 (CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>O), 28.7 (CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>N), 26.0 (CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>); IR (KBr):  $\tilde{\nu}$  = 3318 (br, s), 2944 (m), 2870 (w), 1684 (s), 1535 (s), 1263 (s) cm<sup>-1</sup>; Elementaranalyse für (C<sub>6</sub>H<sub>11</sub>NO<sub>2</sub>)<sub>n</sub>: C 55.46 % (ber. 55.80 %), H 8.67 % (8.58 %), N 10.55 % (10.85 %).

Eingegangen am 10. Mai 1999 [Z13388]

International Edition: *Angew. Chem. Int. Ed.* **1999**, 38, 2917–2919

**Stichwörter:** Aminoalkohole • Isocyanate • Polymere • Polymerisationen • Synthesemethoden

- [1] Z. Wirpsza, *Polyurethanes: Chemistry, Technology and Applications*, Ellis Horwood, London, **1993**.
- [2] O. Bayer, *Angew. Chem. A* **1947**, 59, 257–272.
- [3] a) J. R. Schaefgen, F. H. Koontz, R. F. Tietz, *J. Polym. Sci.* **1959**, 40, 377–387; b) Y. Iwakura, *Kobunshi Kagaku* **1945**, 2, 305 [*Chem. Abstr.* **1950**, 44, 5103]; c) S. Neffgen, H. Keul, H. Höcker, *Macromolecules* **1997**, 30, 1289–1297; d) F. Bachman, J. Reimer, M. Ruppenstein, J. Thiem, *Makromol. Rapid Commun.* **1998**, 19, 21–26.
- [4] a) Y. Iwakura, K. Hayashi, K. Iwata, *Makromol. Chem.* **1965**, 89, 214–227; b) C. Y. Cho, E. J. Moran, S. R. Cherry, J. C. Stephens, P. A. Fodor, C. L. Adams, A. Sundaram, J. W. Jacobs, P. G. Schultz, *Science* **1993**, 261, 1303–1305; c) A. Masuyama, K. Tsuchiya, M. Okahara, *Bull. Chem. Soc. Jpn.* **1985**, 58, 2855–2859.
- [5] a) J. F. Kinstle, L. E. Sepulveda, *J. Polym. Sci. Polym. Lett. Ed.* **1977**, 15, 467–469; b) K. Kurita, S. Matsuda, Y. Iwakura, *Makromol. Chem. Rapid Commun.* **1980**, 1, 211–214; c) N. D. Ghadge, J. Y. Jadhav, *J. Polym. Sci.* **1983**, 21, 1941–1950.
- [6] H. W. I. Peerlings, E. W. Meijer, *Tetrahedron Lett.* **1999**, 40, 1021–1024.
- [7] Aminoalkohole mit  $x = 7, 9$  und 10 wurden über die Entschützung von  $\alpha, \omega$ -Phthalimidalkoholen mit Hydrazin zugänglich gemacht. Letztere stellte man aus  $\alpha, \omega$ -Bromalkoholen her. Aminoalkohole mit  $x = 8, 11$  und 12 wurden über die Reduktion von Aminoethylestern, die aus Lactamen erhalten wurden, zugänglich gemacht.
- [8] B. M. Pope, Y. Yamamoto, D. S. Tarbell, *Org. Synth.* **1978**, 57, 45.
- [9] S. M. Aharoni, *n-Nylons: Their Synthesis, Structure and Properties*, Wiley, Chichester, **1997**, S. 60.
- [10] Zunächst ist es erstaunlich, daß nicht die Zahl der Atome zwischen den H-Brücken-bildenden Einheiten den „Ungerade-Effekt“ ausmacht. Es sind aber viele Beispiele bekannt, bei denen die Zahl der Methylengruppen diesen Effekt auslöst.<sup>[11]</sup> Eine allgemeine Erklärung wurde unseres Wissens bisher nicht gefunden, hier sind weitere Nachforschungen nötig.
- [11] D. W. van Krevelen, *Properties of Polymers*, Elsevier, Amsterdam, **1997**, S. 151–163.

## Eine Beschleunigung der Phosphodiesterhydrolyse um den Faktor 10<sup>10</sup> durch eine zwei Metallzentren enthaltende Amino-peptidase – Übergangszustandsanaloge als Substrate?\*

Hyum Ik Park und Li-June Ming\*

Untersuchungen an chemischen Modellen auf Metallkomplexbasis für hydrolytische Metalloenzyme<sup>[1–3]</sup> haben einen Einblick in die mechanistische Rolle des Metallions (oder der Metallionen) am aktiven Zentrum und des koordinierenden nucleophilen Wassermoleküls in diesen Enzymen gebracht.<sup>[4]</sup> Infolge des Fehlens eines genau definierten aktiven Zentrums mangelt es diesen Modellkomplexen jedoch an einer spezifischen Erkennung und Katalyse von Peptidsubstraten vor Phosphoestersubstraten oder umgekehrt. Dagegen haben

[\*] Prof. L.-J. Ming, H. I. Park  
Department of Chemistry and Institute for Biomolecular Science  
University of South Florida  
Tampa, FL 33620-5250 (USA)  
Fax: (+1) 813-974-1733  
E-mail: ming@chuma.cas.usf.edu

[\*\*] Diese Arbeit wurde durch einen PYF-Award (1996) der University of South Florida unterstützt.

Enzyme die Fähigkeit entwickelt, einen speziellen Substrattyp zu erkennen, und sind in der Lage, die entsprechenden Übergangszustände zu stabilisieren,<sup>[5]</sup> etwa den tetraedrischen Übergangszustand der Peptidhydrolyse, der sich stark von dem trigonal-bipyramidalen Übergangszustand der Phosphoesterhydrolyse unterscheidet.<sup>[4]</sup> Daher kann jede Klasse von hydrolytischen Metalloenzymen nur eine Art von Hydrolyse katalysieren, ungeachtet der Anwesenheit eines stark aktivierten koordinierenden Wassermoleküls ( $10^7$ -fache erhöhte Acidität), das für einen Angriff am Substrat zur Verfügung steht. Zudem gleichen anionische tetraedrische Phosphoester,<sup>[6]</sup> Phosphonate,<sup>[7]</sup> Phosphoamidate<sup>[8]</sup> und Halbacetale<sup>[9]</sup> dem geminalen Übergangszustandsdiol von Peptiden, Estern und Amiden, die bei der Hydrolyse durchlaufen werden; sie sind also potentielle Inhibitoren für die entsprechenden Enzyme. Deshalb ist es unwahrscheinlich, daß ein Enzym mit einem einzigen aktiven Zentrum sowohl Phosphoester- als auch Peptidsubstrate hydrolysieren kann, weil die spezifische Erkennung und Hydrolysewege für diese beiden Substrattypen sehr verschieden sind.

Wir berichten hier über eine einzigartige „alternative“ Enzymkatalyse, bei der eine Dizink-Aminopeptidase aus *Streptomyces griseus* (sAP) bemerkenswerte hydrolytische Aktivität sowohl gegenüber Peptid- als auch gegenüber Phosphodiester substraten zeigt. So kann dieses Enzym als ein Zwei-Zentren-Modell dienen, um einen tieferen Einblick in den Katalysemechanismus der durch zwei Metallzentren katalysierten Hydrolyse zu geben.

Die während der Reinigung von sAP erhaltenen Aktivitätsprofile<sup>[10, 11]</sup> und dessen Thermodesaktivierung bei 69 °C zeigen, daß die Aktivität gegenüber der Hydrolyse des Phosphodiesterasesubstrats Bis-*p*-nitrophenylphosphat (BNPP)<sup>[12]</sup> immer parallel zur Aktivität gegenüber den Aminopeptidasubstraten Leu-*p*-nitroanilid (Leu-*p*NA) und Lys-*p*NA verläuft (siehe Daten in Lit. [13] und Tabelle 1). Diese Beobachtung führt zur Annahme, daß diese beiden unterschiedlichen Typen von Hydrolysereaktionen möglicherweise durch ein einziges Enzym katalysiert werden und daß die Abnahme beider Aktivitäten der Thermodenaturierung von sAP zugeschrieben werden kann. Beide Aktivitäten werden kompetitiv durch die Dizink-Aminopeptidase-Inhibitoren Bestatin,<sup>[14]</sup> 1-Aminobutylphosphonat<sup>[7]</sup> und Leu-Hydroxamat<sup>[15]</sup> inhibiert (Tabelle 1). Zudem wirkt das „langsame Substrat“ BNPP selbst als kompetitiver Inhibitor ( $K_i = 5.1$  mM) gegenüber der Hydrolyse von Leu-*p*NA durch sAP. Basierend auf den kompetitiven Inhibitionsmustern schließen wir, daß die

Hydrolyse von BNPP im zweikernigen aktiven Zentrum von sAP stattfindet.

Wir haben zuvor gezeigt, daß  $\text{Co}^{2+}$  nacheinander an die beiden Metallbindungsstellen von apo-sAP bindet.<sup>[11]</sup> Die Hydrolyse von BNPP durch apo-sAP weist ein selektives  $\text{Co}^{2+}$ -Aktivierungsprofil auf (Spur □, Abbildung 1), ähnlich zu

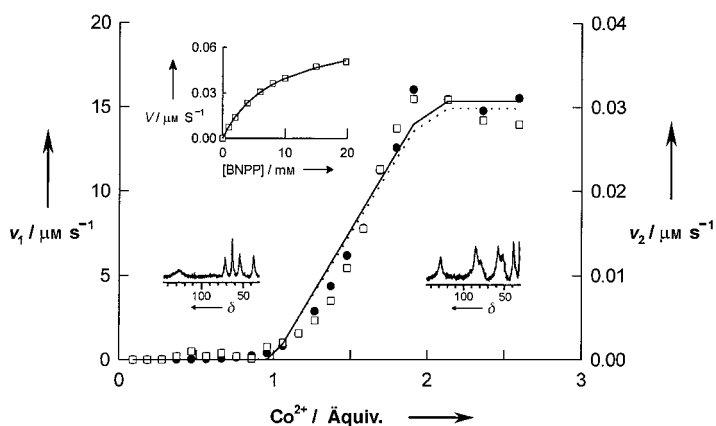


Abbildung 1. Aktivierung von apo-sAP (0.112 mM in 0.1 M MES-Puffer bei pH 6.1) durch  $\text{Co}^{2+}$  für die Hydrolyse von Lys-*p*NA (2.5 mM, ●,  $v_1$ ) und BNPP (5 mM, □,  $v_2$ ) in 0.1 M HEPES-Puffer bei 30 °C und pH 8.0 (HEPES = 2[4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl]ethansulfonsäure). Die durchgezogenen (Lys-*p*NA) und gepunkteten Linien (BNPP) wurden aus den Meßdaten unter Annahme idealer selektiver Metallbindung berechnet. Der obere Einschub ist ein Graph einer Michaelis-Menten-Kinetik für die Hydrolyse von BNPP, der zu  $k_{\text{cat}} = 0.45 \text{ s}^{-1}$  und  $K_m = 4.5 \text{ mM}$  führt. Die abgebildeten  $^1\text{H}$ -NMR-Spektren (Bruker AMX 360 bei 360.13 MHz, 298 K, 90°-Puls und Vorsättigung zur Lösungsmittelunterdrückung) zeigen das Binden von einem (links) und zwei  $\text{Co}^{2+}$ -Ionen (rechts) an apo-sAP.

der Hydrolyse eines Peptidsubstrats<sup>[11]</sup> (Spur ●), was vermuten läßt, daß beide Hydrolysen im zweikernigen aktiven Zentrum von sAP ablaufen. Diese aufeinanderfolgende Bindung von  $\text{Co}^{2+}$  an apo-sAP wurde auch aus NMR-spektroskopischen Untersuchungen geschlossen (siehe untere Einschübe in Abbildung 1).<sup>[12]</sup> Die Hydrolyse von BNPP durch eine mögliche Verunreinigung mit Phosphodiesterase kann deshalb durch diese Aktivierungsstudien mit stöchiometrischen Metallmengen ausgeschlossen werden.

Es wurde eine vollständige Michaelis-Menten-Analyse der BNPP-Hydrolyse durch sAP durchgeführt (siehe oberer Einschub in Abbildung 1 und Tabelle 1). Bemerkenswert ist, daß die Geschwindigkeitskonstante zweiter Ordnung der BNPP-Hydrolyse durch sAP ( $100 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$  bezogen auf  $k_{\text{cat}}/K_m$ ) unter milden Bedingungen (30 °C und pH 8.0) die von

Tabelle 1. Hydrolysen von Aminopeptidasubstraten und BNPP durch sAP (die ersten aktiven von der Ionenaustauschersäule eluierten Fraktionen) in 0.1 M HEPES-Puffer bei pH 8.0 in Gegenwart von 2 mM  $\text{Ca}^{2+}$  bei 30 °C.

Substrate	Hitzedesaktivierung <sup>[a]</sup> 7 h [%]	$K_i$ [µM] <sup>[b]</sup>			Kinetische Parameter <sup>[c]</sup>		
		Bestatin <sup>[d]</sup>	ABP <sup>[d]</sup>	Leu-NHOH <sup>[e]</sup>	$k_{\text{cat}}$ [s <sup>-1</sup> ]	$K_m$ [mM]	$k_{\text{cat}}/K_m$ [M <sup>-1</sup> s <sup>-1</sup> ]
BNPP	22	1.3 ± 0.1	1.5 ± 0.2	40 ± 13	0.45 ± 0.02	4.5 ± 0.4	100
Leu- <i>p</i> NA	21	1.5 ± 0.2	1.9 ± 0.2	38 ± 10	657 ± 54	0.45 ± 0.42	1.46 × 10 <sup>6</sup>
Ala- <i>p</i> NA	19	1.2	1.9	30	3.6 ± 0.4	5.0 ± 0.4	720
Lys- <i>p</i> NA	26	2.1	1.9	52	1.5 ± 0.2	7.1 ± 0.8	211

[a] BNPP, 10 mM; Leu-*p*NA, 1 mM; Ala-*p*NA, 10 mM und Lys-*p*NA, 10 mM in 0.1 M HEPES bei pH 8.0 und 69 °C. Die Aktivitäten sind bezogen auf unbehandelte Vergleichsproben. [b] Aus drei unterschiedlichen Inhibitor-Konzentrationen erhalten.<sup>[5b]</sup> Der  $K_i$ -Wert von BNPP bei der Hydrolyse von Leu-*p*NA ist 5.1 mM. [c] Die Substrat-Konzentrationen waren: BNPP: 1.0–20 mM; Leu-*p*NA: 0.1–2.0 mM; Ala-*p*NA: 1–20 mM und Lys-*p*NA: 1–20 mM. Die Ausgangsgeschwindigkeiten wurden über die Änderung der Absorption bei 405 nm für Peptidsubstrate ( $\epsilon = 10600 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ ) und für BNPP ( $\epsilon = 17500 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ ) bestimmt. [d] 1, 2 und 4 µM, 3 h mit sAP vorinkubiert; ABP = 1-Aminobutylphosphonat. [e] 25, 50 und 100 µM, ohne Inkubation.

Zn<sup>2+</sup>-enthaltenden Modellen (typischerweise im Bereich von  $1.3\text{--}12.7 \times 10^{-5} \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$  bei 35 °C und pH 8.6–10.5) mindestens um den Faktor  $10^6$  übertrifft.<sup>[2, 16]</sup> Auch die spezifische Aktivität gegenüber der Hydrolyse von 1 mM BNPP wurde zu  $33.7 \text{ nmol min}^{-1} \text{ mg}^{-1}$  bestimmt. Dieser Wert ist höher als der für die Hydrolyse von 1 mM Gly-pNA durch sAP ( $\leq 19.3 \text{ nmol min}^{-1} \text{ mg}^{-1}$ , aus Lit. [10b] berechnet) und übertrifft die Aktivitäten von mehreren Phosphoesterasen gegenüber der Hydrolyse von 1 mM BNPP. Zum Beispiel betragen die spezifischen Aktivitäten der alkalischen Phosphatase aus Rinderdarm, Hühnerdarm und *Escherichia coli* 41.5, 16.5 bzw.  $11.1 \text{ nmol min}^{-1} \text{ mg}^{-1}$ , und die von saurer Phosphatase aus Weizenkeimen  $1.9 \text{ nmol min}^{-1} \text{ mg}^{-1}$ .<sup>[12]</sup> Die Aktivitäten von 5'-Nucleotid-Phosphodiesterase aus Rinderdarm und Schlangengift, 3'-Nucleotid-Phosphodiesterase aus Rinderdarm und cAMP-Phosphodiesterase aus Rinderherz betragen 2450, 82.3, 0.8 bzw.  $0.3 \text{ nmol min}^{-1} \text{ mg}^{-1}$ .<sup>[12]</sup>

Obwohl sich das Phosphodiesterasesubstrat BNPP wegen der *p*-Nitrogruppe sehr leicht hydrolysieren läßt, ist die Geschwindigkeit der Autohydrolyse mit einer Geschwindigkeitskonstante erster Ordnung von  $3 \times 10^{-10} \text{ s}^{-1}$  bei pH 7.0 und 50 °C<sup>[2b]</sup> und  $6.3 \times 10^{-8} \text{ s}^{-1}$  bei pH 10.0 und 100 °C<sup>[17]</sup> immer noch sehr gering. Die Geschwindigkeitskonstante pseudo-erster Ordnung der BNPP-Hydrolyse durch sAP kann aus der Michaelis-Menten-Kinetik bei geringen Substratkonzentrationen, den Bedingungen, die in vielen chemischen Modellstudien verwendet werden, extrapoliert werden.<sup>[1–3]</sup> Der bei pH 8 und 30 °C erhaltene Wert von  $1.0 \text{ s}^{-1}$  ist ungefähr  $10^{10}$  mal größer als die Geschwindigkeitskonstante erster Ordnung der Autohydrolyse dieses Substrats unter ähnlichen Bedingungen. Diese Geschwindigkeitserhöhung ist durchaus bemerkenswert, wenn man berücksichtigt, daß dieser Phosphodiester ein Übergangszustandsanalogon für die Peptid- und Esterhydrolyse ist<sup>[6]</sup> und vermutlich nicht durch Peptidasen hydrolysiert wird. Zudem ist die Geschwindigkeit der unkatalysierten Phosphodiesterhydrolyse generell ungefähr um den Faktor  $10^4$  kleiner als die von Peptiden.<sup>[18]</sup> Der wesentlich kleinere Wert für  $k_{\text{cat}}/K_{\text{m}}$  für die Hydrolyse von BNPP gegenüber der Hydrolyse des besten Peptidsubstrats Leu-pNA durch sAP ist deshalb durchaus zu erwarten (Tabelle 1). Die geringere Geschwindigkeit der Hydrolyse von Phosphodiestern wird der kinetischen Inertheit<sup>[19]</sup> zugeschrieben, da der nucleophile Angriff von Hydroxidionen an der negativ geladenen Phosphatgruppe aufgrund der Ladungsabstoßung benachteiligt ist. Dennoch kann ein zweikerniges Zentrum wie in sAP die Ladung an der Phosphateneinheit sehr effektiv neutralisieren.

Der Mechanismus der Hydrolyse von BNPP durch sAP kann auf der Grundlage der Kristallstrukturanalyse von sAP<sup>[20]</sup> und von Inhibitor-Komplexen der Leucin-Aminopeptidase (LAP) aus Rinderaugen, in denen die Aminogruppe an ein Zinkatom koordiniert und eine *gem*-Diolat-artige CO<sup>–</sup>-Gruppe die beiden Zinkionen verbrückt,<sup>[7a, 9, 21]</sup> postuliert werden (Abbildung 2). Da BNPP und Leu-pNA kompetitiv an sAP binden, können sie trotz der fehlenden Aminogruppe in BNPP in einer ähnlichen Weise an das aktive Zentrum binden. Bei diesem Modell ist das Phosphoratom von BNPP gegenüber einem nucleophilen Angriff durch ein koordiniertes Wassermolekül zugänglich.

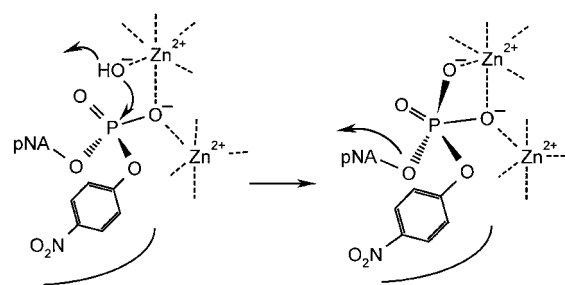


Abbildung 2. Ein möglicher Mechanismus für die Hydrolyse von BNPP durch die zwei Metallzentren enthaltende *Streptomyces*-Aminopeptidase, bei dem die überbrückende P-O<sup>–</sup>-Einheit die überbrückende Carbonylgruppe eines Peptidsubstrats nachahmt, während die Aminogruppe des Peptidsubstrates in BNPP fehlt. Vermutlich greift ein koordinierendes Hydroxidion eines Zn<sup>2+</sup>-Atoms am Phosphoratom in der *trans*-Position zur Abgangsgruppe an. Eine alternative Bindungsmöglichkeit könnte sein, daß die P=O-Einheit die Aminogruppe des Peptidsubstrates nachahmt, die an ein Zn<sup>2+</sup>-Ion bindet.

Wir haben hier einen beispiellosen Fall beschrieben, bei dem ein Übergangszustands-analoger Phosphodiester wirklich ein Substrat für eine Dizink-Aminopeptidase ist, das mit einer enormen Geschwindigkeitssteigerung ungefähr um den Faktor  $10^{10}$  hydrolysiert wird. Solche Mechanismen wurden auch bei mehreren anderen Hydrolyseenzymen vorgeschlagen, die mehrere Metallzentren enthalten, darunter Ureasen, Nucleasen und Ribozyme.<sup>[4a, 22]</sup> Die zwei Metallzentren enthaltende Metalloprotease sAP, die diese einzigartige alternative Katalyse zeigt, kann so als Modellsystem für weitere Untersuchungen der Hydrolysen von Peptiden und Phosphodiestern dienen, die durch zwei Metallzentren vermittelt werden.

Eingegangen am 18. Januar,

veränderte Fassung am 15. April 1999 [Z12922]

International Edition: *Angew. Chem. Int. Ed.* **1999**, 38, 2914–2916

**Stichwörter:** Enzymkatalyse • Hydrolysen • Koordinationschemie • Metalloproteine

- [1] a) E. Kimura, *Prog. Inorg. Chem.* **1994**, 41, 443–491; b) E. Kimura, T. Koike, *Adv. Inorg. Chem.* **1997**, 44, 229–261.
- [2] a) C. Bazzicalupi, A. Bencini, A. Bianchi, V. Fusi, C. Giorgi, P. Paoletti, B. Valtancoli, D. Zanchi, *Inorg. Chem.* **1997**, 36, 2784–2790; b) J. Chin, M. Banaszczuk, V. Jubian, X. Zou, *J. Am. Chem. Soc.* **1989**, 111, 186–190; c) M. J. Young, J. Chin, *J. Am. Chem. Soc.* **1995**, 117, 10577–10578.
- [3] a) E. Kimura, H. Hashimoto, T. Koike, *J. Am. Chem. Soc.* **1996**, 118, 10963–10970; b) E. L. Hegg, J. N. Burstyn, *Inorg. Chem.* **1996**, 35, 7474–7481; c) J. N. Burstyn, K. A. Deal, *Inorg. Chem.* **1993**, 32, 3585–3586; d) E. L. Hegg, J. N. Burstyn, *J. Am. Chem. Soc.* **1995**, 117, 7015–7016; d) A. Tsubouchi, T. C. Bruce, *J. Am. Chem. Soc.* **1994**, 116, 11614–11618.
- [4] a) N. Sträter, W. N. Lipscomb, T. Klabunde, B. Krebs, *Angew. Chem.* **1996**, 108, 2158–2191; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1996**, 35, 2024–2055; b) W. N. Lipscomb, N. Sträter, *Chem. Rev.* **1996**, 96, 2375–2433; c) D. Gani, J. Wilkie, *Chem. Soc. Rev.* **1995**, 55–63; d) C. B. Black, H. W. Huang, J. A. Cowan, *Coord. Chem. Rev.* **1994**, 135/136, 165–202; e) M. Fothergill, M. F. Goodman, J. Petruska, A. Warshel, *J. Am. Chem. Soc.* **1995**, 117, 11619–11627; f) H. Kim, W. N. Lipscomb, *Biochemistry* **1993**, 32, 8465–8478; g) E. E. Kim, H. W. Wyckoff, *J. Mol. Biol.* **1991**, 218, 449–464; h) D. W. Christianson, W. N. Lipscomb, *Acc. Chem. Res.* **1989**, 22, 62–69; i) B. W. Matthews, *Acc. Chem. Res.* **1988**, 21, 333–340.

- [5] a) L. Pauling, *Am. Sci.* **1948**, 36, 51–58; b) C. Walsh, *Enzymatic Reaction Mechanisms*, Freeman, New York, **1979**.
- [6] a) K. Nishida, Y. Ohta, M. Ito, Y. Nagamura, S. Kitahara, K. Fujii, I. Ishiguro, *Biochim. Biophys. Acta* **1996**, 1313, 47–53; b) C. V. Preuss, C. K. Svensson, *Biochem. Pharmacol.* **1996**, 51, 1661–1668; c) L. Luan, T. Sugiyama, S. Takai, Y. Usami, T. Adachi, Y. Katagiri, K. Hirano, *Biol. Pharmacol. Bull.* **1997**, 20, 71–75.
- [7] a) N. Sträter, W. N. Lipscomb, *Biochemistry* **1995**, 34, 9200–9210; b) B. Lejczak, P. Kafarski, J. Zygmunt, *Biochemistry* **1989**, 28, 3549–3555.
- [8] D. E. Tronrud, H. M. Holden, B. W. Matthews, *Eur. J. Biochem.* **1986**, 157, 261.
- [9] N. Sträter, W. N. Lipscomb, *Biochemistry* **1995**, 34, 14792–14800.
- [10] a) A. Spungin, S. Blumberg, *Eur. J. Biochem.* **1989**, 183, 471–477; b) D. Ben-Meir, A. Spungin, R. Ashkenazi, S. Blumberg, *Eur. J. Biochem.* **1993**, 212, 107–112.
- [11] L.-Y. Lin, H. I. Park, L.-J. Ming, *J. Biol. Inorg. Chem.* **1997**, 2, 744–749.
- [12] a) J. S. Kelly, D. E. Dardinger, L. G. Butler, *Biochemistry* **1975**, 14, 4983–4988; b) J. S. Kelly, L. G. Burtler, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **1975**, 66, 316–321.
- [13] Das Roh-Enzymgemisch zeigt bedeutende Aktivitäten ( $\text{nmol min}^{-1} \text{mg}^{-1}$ ) gegenüber mehreren Substraten von Aminopeptidasen und Phosphoesterasen: 1 mM Leu-pNA, 9300; 2.5 mM Lys-pNA, 57; 5 mM p-Nitrophenylphosphat, 5.2 und 5 mM BNPP, 4.8. Nach Inkubation des Gemisches (7 h bei 69 °C) war eine Hydrolyse von 10 mM p-Nitrophenylphosphat nicht zu beobachten; Leu-pNA (1 mM), 67% blieb zurück; Lys-pNA (10 mM), 28%; Ala-pNA (10 mM), 49%; BNPP (10 mM), 42%. Während der chromatographischen Schritte (Gelfiltration und DEAE-Ionenaustausch) verläuft die Phosphodiesterase-Aktivität parallel zur Aminopeptidase-Aktivität. Dieses Verfahren ergibt eine reine Aminopeptidase, deren Aktivität durch Demetallierung ausgeschaltet und durch verschiedene Metallionen in unterschiedlichem Ausmaß reaktiviert werden kann.
- [14] a) H. Umezawa, T. Aoyagi, H. Suda, M. Hamada, T. Takeuchi, *J. Antibiotics* **1976**, 29, 97–99; b) S. H. Wilkes, J. M. Prescott, *J. Biol. Chem.* **1985**, 260, 13154–13162; c) S. K. Burley, P. R. David, R. M. Sweet, A. Taylor, W. N. Lipscomb, *J. Mol. Biol.* **1992**, 224, 113–140.
- [15] a) B. Chevrier, H. D'Orchymont, C. Schalk, C. Tarnus, D. Moras, *Eur. J. Biochem.* **1996**, 237, 393–398; b) S. H. Wilkes, J. M. Prescott, *J. Biol. Chem.* **1983**, 256, 13517–13521.
- [16] T. Koike, E. Kimura, *J. Am. Chem. Soc.* **1991**, 113, 8935–8941.
- [17] A. J. Kirby, M. Younas, *J. Chem. Soc. B* **1970**, 510–513.
- [18] A. Radzicka, R. Wolfenden, *Science* **1995**, 267, 90–93.
- [19] a) F. H. Westheimer, *Science* **1987**, 235, 1173–1178; b) D. Kahne, W. C. Still, *J. Am. Chem. Soc.* **1988**, 110, 7529–7534.
- [20] H. M. Greenbalt, O. Almog, B. Maras, B. Spungin-Bialik, D. Barra, S. Blumberg, G. Shoham, *J. Mol. Biol.* **1997**, 265, 620–636.
- [21] a) S. K. Burly, P. R. David, W. N. Lipscomb, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1991**, 88, 6916–6920; b) H. Kim, W. N. Lipscomb, *Biochemistry* **1993**, 32, 8465–8478.
- [22] Übersichtsartikel: D. E. Wilcox, *Chem. Rev.* **1996**, 96, 2435–2458.

## Isoporphycen, das vierte Porphyrin-Konstitutionsisomer mit $\text{N}_4$ -Kern – Auftreten von *E/Z*-Isomerie\*\*

Emanuel Vogel,\* Peter Scholz, Ralf Demuth, Christoph Erben, Martin Bröring, Hans Schmickler, Johann Lex, Georg Hohlneicher,\* Dominik Bremm und Yun-Dong Wu\*

Professor Satoru Masamune zum 70. Geburtstag gewidmet

Die Synthese von Porphycen **1** im Jahr 1986<sup>[1]</sup> führte zu der Erkenntnis, daß von Porphyrin – prinzipiell – nicht weniger als sieben Konstitutionsisomere mit einem  $\text{N}_4$ -Kern möglich sind.<sup>[2]</sup> Im Unterschied zum Porphyrin kommt bei den Konstitutionsisomeren, bedingt durch die Gegenwart von einer oder zwei formalen Doppelbindungen, *E/Z*-Isomerie als geometrische Variationsmöglichkeit ins Spiel. Nachdem sich **1** als Porphyrin-ähnliche Verbindung erwiesen hatte, war offenkundig, daß die Isomere ein vielversprechendes neues Kapitel der Porphyrinchemie einleiteten.<sup>[3]</sup> Wenn es je eines weiteren Ansporns zur Synthese der Isomere bedurft hätte, dann lieferten ihn die in einem japanischen und einem polnischen Arbeitskreis gleichzeitig aufgespürten invertierten Porphyrine.<sup>[4]</sup>

Zu Porphycen **1**, das nach ab-initio-Rechnungen (BLYP/6-31G\*\*,-Verfahren) ca. 2 kcal mol<sup>-1</sup> stabiler ist als Porphyrin, gesellten sich inzwischen Hemiporphycen **2**<sup>[6]</sup> und Corphycen **3** (jeweils als Octaalkylderivate),<sup>[7]</sup> die in der Stabilitätsskala der Konstitutionsisomere auf **1** folgenden Cyclotetrapyrrole (5 bzw. 12 kcal mol<sup>-1</sup> energiereicher als Porphyrin).<sup>[5]</sup> Wie Porphyrin sind **1–3** (siehe Schema 1) vorzügliche Komplexbildner (dies war nicht mit Sicherheit vorauszusehen, da der  $\text{N}_4$ -Kern der drei Isomere eine geringere Fläche umfaßt und mehr oder weniger stark von der quadratischen Form abweicht). Eine Vielzahl vergleichender Untersuchungen zwischen den Metallkomplexen der Isomere und den entsprechenden Metalloporphyrinen bot sich somit an.

Die Isoporphycene [Porphyrine-(3.0.1.0)] **4** und **5** (Schema 1), in der Stabilitätsskala der Isomere an vierter Stelle stehend,<sup>[5]</sup> sind nicht nur als Komplexbildner und anderer Porphyrin-relevanter Eigenschaften wegen von Interesse, sondern beanspruchen auch unter dem Aspekt Stereoisomerie Aufmerksamkeit. Anders als im Fall der Konstitutionsisomere **1–3**, bei denen das *Z*- gegenüber dem *E*-Isomer

[\*] Prof. Dr. E. Vogel, Dr. P. Scholz, Dr. R. Demuth, Dr. C. Erben, Dr. M. Bröring, Dr. H. Schmickler, Dr. J. Lex  
Institut für Organische Chemie der Universität  
Greinstraße 4, D-50939 Köln  
Fax: (+49) 221-470-5057  
E-mail: emanuel.vogel@uni-koeln.de  
Prof. Dr. G. Hohlneicher, D. Bremm  
Institut für Physikalische Chemie der Universität  
Luxemburger Straße 116, D-50939 Köln  
Fax: (+49) 221-470-5144  
Prof. Dr. Y.-D. Wu  
Department of Chemistry  
The Hong Kong University of Science & Technology  
Clear Water Bay, Kowloon, Hong Kong (China)

[\*\*] Diese Arbeit wurde von der Deutschen Forschungsgemeinschaft und dem Fonds der Chemischen Industrie unterstützt.