

Abb. 1. Struktur von **4** im Kristall, Schwingungsellipsoide mit 30% Wahrscheinlichkeit (oben); Bindungslängen und -winkel (Standardabweichung 0.002 bis 0.003 Å) (unten). Monoklin, Raumgruppe $P2_1/c$, $a=9.587(1)$, $b=5.964(1)$, $c=9.968(1)$ Å, $\beta=117.01(1)$ °, $V=507.7(1)$ Å³, $Z=2$, $\rho_{\text{realt}}=1.309$, $\rho_{\text{beob}}=1.30$ g cm⁻³, Reflexe mit ($|F_0|>3\sigma(F_0)$), $R=0.039$.

und **4b** und einer polarisierten Struktur **4c** stabilisiert ist; in **4c** ähnelt der fünfgliedrige Ring dem Cyclopentadienid-

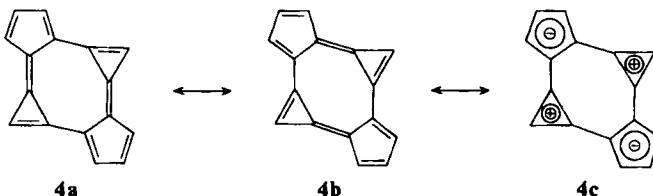
Tabelle 1. Spektroskopische Daten von **2** und **4**.

	2	4
IR (KBr) [cm ⁻¹]	1815, 1555	1782, 1550
UV (CH ₂ Cl ₂) λ_{max} [nm]	239 (4.51), 266 (4.49), 337 (4.74), 372 (4.43), 413 (4.39), (lg ϵ) 525 (2.74)	241 (4.63), 328 (4.51), 390 (4.27), 470 (2.81)
¹ H-NMR [a, b]	1.75 (s, 18 H, <i>t</i> Bu), 6.40 (t, 2 H, H-7,15, <i>J</i> =3.8 Hz), 6.87 (d, 4 H, H-6,8,14,16, <i>J</i> =3.8 Hz)	6.58 (t, 2 H, H-7,15, <i>J</i> =3.7 Hz), 7.11 (d, 4 H, H-6,8,14,16, <i>J</i> =3.7 Hz), 7.91 (s, 2 H, H-3,11)
¹³ C-NMR [a, c]	31.6 (C(CH ₃) ₃), 48.0 (C(CH ₃) ₃), 109.0 (C-1,5,9,13), 123.0 (C-7,15, <i>J</i> =170.6 Hz), 127.5 (C-6,8,14,16), 165.5 Hz), 128.2 (C-3,11), 135.9 (C-2,4,10,12)	110.2 (C-1,5,9,13), 117.8 (C-3,11, <i>J</i> =235.5 Hz), 124.7 (C-7,15, <i>J</i> =164.4 Hz), 130.5 (C-6,8,14,16, <i>J</i> =167.9 Hz), 140.9 (C-2,4,10,12)

[a] **2** in CDCl₃, **4** in CD₂Cl₂. [b] 100 MHz, 25°C. [c] 90 MHz, 25°C; Kopplungskonstanten $J_{13\text{C}-\text{H}}$.

Ion und der dreigliedrige Ring dem Cyclopropenylum-Ion^[4].

Die chemischen Eigenschaften von **4** sind mit den Vorstellungen über die π -Konfiguration in Einklang. In Übereinstimmung mit dem fehlenden Beitrag einer [16]Annulen-Struktur führt die elektrochemische Reduktion oder Alkalimetall-Reduktion zur Zersetzung; [16]Annulen bildet dabei das 18 π -System (Zweielektronen-Reduktion)^[5].



Außerdem ist die Energie des HOMOs von **4** (MINDO/3) außerordentlich hoch (−7.22 eV); dies legt nahe, daß **4** ein guter Elektronendonator ist. Während **4** sowohl mit NO₂BF₄ als auch mit CF₃COOH undefinierte Produkte ergibt (keine charakteristische Calicen-Absorption im IR-Spektrum bei ca. 1800 und ca. 1550 cm⁻¹), wird es mit *N*-Bromsuccinimid in Dichlormethan glatt zum 6,7,8,14,15,16-Hexabrom-Derivat substituiert (orange Kristalle, Fp=222–225°C (Zers.), 80%). Die nucleophile Substitution von **2** mit Diethylamin in Dichlormethan ergibt das 3-*tert*-Butylthio-11-diethylamino-Derivat (dunkelpurpurote Kristalle, Fp=116–117°C, 36%).

Eingegangen am 1. August,
in veränderter Fassung am 15. September 1983 [Z 499]

CAS-Registry-Nummern:

1: 72649-41-3 / **2:** 72649-42-4 / **3:** 73625-08-8 / **4:** 73091-52-8 / **4** (Hexabrom-Derivat): 88245-24-3 / **4** (3-*tert*-Butylthio-11-diethylamino-Derivat): 88245-25-4 / Lithiumcyclopentadienid: 16733-97-4 / Tributylzinnhydrid: 68-73-3.

[1] K. Hafner, R. Dönges, E. Goedecke, R. Kaiser, *Angew. Chem.* 85 (1973) 362; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* 12 (1973) 337; K. Hafner, *ibid.* 75 (1963) 1041 bzw. 3 (1964) 165; *Pure Appl. Chem.* 54 (1982) 939.

[2] Z. Yoshida, *Pure Appl. Chem.* 54 (1982) 1059.

[3] J. Aihara, persönliche Mitteilung; siehe auch *Pure Appl. Chem.* 54 (1982) 1115.

[4] Die ¹H-NMR-Spektren von **4** zeigen bis −80°C kein Gleichgewicht zwischen **4a** und **4b**. NMR-Messungen bei tieferer Temperatur sind schwierig, weil **4** schlecht löslich ist. Für **4c** wird vorgeschlagen, daß auch die Pentadienid-Polarisation im Cyclopentadien-Teil (C-13,14,15,16,1) und die Allylierung-Polarisation im Cyclopropen-Teil (C-2,3,4) zum Grundzustand von **4** beitragen.

[5] J. F. M. Oth, H. Baumann, J. M. Gilles, G. Schröder, *J. Am. Chem. Soc.* 94 (1972) 3498.

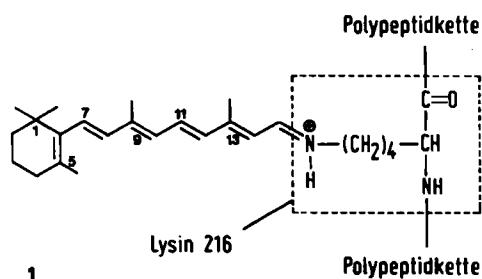
Sterisch fixiertes Retinal-Analogon verhindert Protonenpumpaktivität in Bacteriorhodopsin

Von Elisabeth Kölling*, Wolfgang Gärtner,
Dieter Oesterhelt und Ludger Ernst

Bacteriorhodopsin (BR), das Hauptmembranprotein aus *Halobacterium halobium*, enthält 13-cis- und all-trans-Retinal als prosthetische Gruppe. Es bildet mit der ε-Amino-

[*] Dipl.-Chem. E. Kölling, Dr. W. Gärtner, Prof. Dr. D. Oesterhelt
Max-Planck-Institut für Biochemie
Am Klopferspitz, D-8033 Martinsried
Doz. Dr. L. Ernst
Gesellschaft für Biotechnologische Forschung, D-3300 Braunschweig

gruppe von Lysin 216 aus dem Apoprotein Bacteriorhodopsin eine protonierte Schiff-Base (SBH^+) 1^[1].

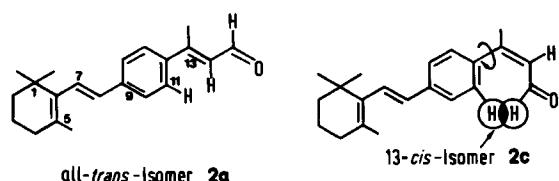


1

Belichtung induziert in BR ($\lambda_{\text{max}} = 568 \text{ nm}$) einen photochemischen Cyclus, bei dem mehrere Zwischenprodukte spektroskopisch (Absorption) nachgewiesen werden konnten ($\text{BR}_{\text{trans}}\text{-}568 \rightarrow \text{K-610} \rightarrow \text{L}_{\text{cis}}\text{-}550 \rightarrow \text{M}_{\text{cis}}\text{-}412 \rightarrow \text{O-}660 \rightarrow \text{BR}_{\text{trans}}\text{-}568$; Absorptionsmaxima in nm)^[2]. Sie entstehen unter anderem durch Deprotonierung/Reprotonierung der SBH^+ und durch all-trans-/13-cis-Isomerisierung des Retinals^[3]. Sterische und elektronische Vorgaben des Proteins ermöglichen die thermische Rückreaktion von der 13-cis-($\text{M}_{\text{cis}}\text{-}412$) zur all-trans-Form ($\text{BR}_{\text{trans}}\text{-}568$) im Cyclus, an den ein gerichteter Protonentransport gekoppelt ist, d.h., Bacteriorhodopsin wirkt als „lichtgetriebene Protonenpumpe“.

Modifizierte Retinale können in das aus Retinal-negativen Zellmutanten isolierte Apoprotein eingebaut und auf ihre Funktionsfähigkeit geprüft werden. Dabei zeigte sich ein starker Einfluß spezifisch für die Substitution an C-13 des Retinals auf Chromophor und Funktion des Proteins. Insbesondere ist in Analoga ohne 13-Methylgruppe die Reisomerisierung 13-cis → all-trans so gestört, daß der Protonentransport drastisch verlangsamt wird^[4].

Das Retinal-Analogon 2 (3-[4-[2-(2,6,6-Trimethyl-1-cyclohexenyl)vinyl]phenyl]-2-butenal) haben wir aus der Säure^[5] durch Reduktion (LiAlH_4)/Oxidation (MnO_2) hergestellt und spektroskopisch ($^1\text{H-NMR}$, IR, MS, UV) charakterisiert. 2 kann als ein zwischen C-9 und C-12 überbrücktes, 10,11-s-cis-fixiertes Retinal angesehen werden, das als neues Strukturelement einen aromatischen Ring enthält (Numerierung der Atome wie bei Retinal). Das all-trans-Isomer 2a ist in Lösung vorwiegend planar. Wie die Formelzeichnung andeutet, kann sich das 13-cis-Isomer 2c aufgrund sterischer Hinderung nur dann bilden, wenn gleichzeitig eine Drehung um die 12,13-Einfachbindung stattfindet.



Bei Belichtung in Isopropylalkohol isomerisiert 2a zur 7-cis- 2b und zur 13-cis-Verbindung 2c, die im photostationären Gleichgewicht (10 min Belichtung) im Verhältnis 20:13:67 vorliegen. Die Zuordnung gelang nach HPLC-Trennung durch 400 MHz- $^1\text{H-NMR}$ -Spektroskopie (Tabelle 1). Das 7-cis,13-cis-Isomer konnte nicht nachgewiesen werden.

Die trans-Konfiguration der 13,14-Doppelbindung des 7-cis-Isomers 2b wurde durch ein NOE-Experiment bestimmt (Einstrahlung in die 13-Methylresonanz bewirkt In-

Tabelle 1. $^1\text{H-NMR}$ -Daten der Verbindungen 2a (all-trans), 2b (7-cis), 2c (13-cis) und all-trans-Retinal (in CDCl_3). δ -Werte, J in Hz.

	13-Me $^4\text{J}(13\text{-Me},14)$	H-7 $^3\text{J}(7,8)$	H-8	Aryl	H-14 $^3\text{J}(14,15)$	H-15 $^3\text{J}(14,15)$
2a	2.57 1.2	6.81 16.4	6.35	7.49	6.43	10.10 7.9
2b	2.55 1.3	6.18 12.5	6.42	7.47	6.43	10.18 7.9
2c	2.32 1.4	6.77 16.3	6.37	7.27/7.44	6.13	9.54 8.1
Retinal	2.32 1.2	6.33 16.0	6.15	—	5.96	10.09 8.1

tensitätserhöhung des Aldehydsignals). Die Tieffeldverschiebung (Ringstromeffekt) der 13-Methylprotonen im 7-cis- 2b und im all-trans-Isomer 2a im Vergleich zur Verschiebung dieser Protonen in der 13-cis-Form 2c und in Retinal zeigt, daß der aromatische Ring und die Vinylgruppe mit der 13,14-Doppelbindung bevorzugt planar angeordnet sind. In der 13-cis-Verbindung 2c ergeben die Arylprotonen aufgrund der diamagnetischen Anisotropie der Carbonylfunktion ein AA'BB'-Spektrum; außerdem liegt das Signal des Aldehydprotons gegenüber dem des all-trans-Isomers 2a bei höherem Feld, was mit Literaturdaten für cis- und trans- β -Methylzimtaldehyd übereinstimmt^[6]. Aus den NMR-Daten in Tabelle 1 ergibt sich für das 13-cis-Isomer 2c eine Konformation, in der das Kettenende durch Drehung um die 12,13-Einfachbindung aus der Ebene des aromatischen Ringes herausragt.

Nur die all-trans-Verbindung 2a rekonstituiert innerhalb weniger Minuten mit isoliertem Apoprotein unter Bildung einer protonierten Schiff-Base und bathochromer Verschiebung des Absorptionsmaximums auf 490 nm (Tabelle 2). Mehrständiges Belassen der Präparation mit der 13-cis-Probe 2c bei Raumtemperatur führt zur langsamen Isomerisierung nach all-trans und Bildung des Chromophors bei 490 nm, was durch Extraktion des Retinal-Analogs aus dem Protein und anschließende Bestimmung der Isomerenverteilung nachgewiesen werden konnte. Verbindung 2 ist das erste Retinal-Analogon, dessen 13-cis-Konfiguration nicht in die Bindungsstelle des Bacteriorhodopsins paßt. Dies kann nur auf der nicht planaren Anordnung von C-11 bis C-14 beruhen. Bei der 7-cis-Verbindung 2b wurde keine entsprechende thermische Isomerisierung beobachtet; die Rekonstitution fand erst nach Belichtung statt ($\lambda_{\text{max}} = 490 \text{ nm}$). Auch aus diesen rekonstituierten Proben war nach Belichtungsexperimenten (bis zu 30 min) ausschließlich das all-trans-Isomer 2a zu isolieren.

Tabelle 2. Absorptionsmaxima der Verbindungen 2a, 2b, 2c und all-trans-Retinal, der dazugehörigen protonierten Schiff-Basen $n\text{Bu}-\text{NH}=\text{CHR}$ mit *n*-Butylamin sowie der Bacteriorhodopsine.

Retinal oder Analogon	prot. Schiff-Base	Bacteriorhodopsin	$\tilde{\nu}_1 - \tilde{\nu}_2$ [cm $^{-1}$]	
λ_{max} [nm] (ϵ) [a]	λ_{max} [nm] ($\tilde{\nu}_1$ [cm $^{-1}$]) [a]	λ_{max} [nm] ($\tilde{\nu}_2$ [cm $^{-1}$]) [b]	$(\tilde{\nu}_1 - \tilde{\nu}_2)$ [kJ mol $^{-1}$] [b]	
2a	330 (20 000)	380 (26 320)	490 (20 410)	5910 (70.7)
2b	323 (10 000)	372	—	—
2c	305 (11 000)	365	—	—
Retinal	380 (43 000)	440 (22 730)	568 (17 610)	5120 (61.3)

[a] In Isopropylalkohol. [b] In Wasser.

Die Absorption der protonierten Schiff-Base im Protein ist gegenüber der protonierten Schiff-Base mit *n*-Butylamin bathochrom verschoben. Die ähnliche Differenz der Wellenzahlen ($\tilde{\nu}_1 - \tilde{\nu}_2$) (vgl. Tabelle 2) läßt für Retinal und das Analogon **2** auf ähnliche Wechselwirkungen mit der Bindungsstelle des Proteins schließen.

Wie Funktionsuntersuchungen mit Zellvesikeln zeigen, vermittelt der Chromophor aus Verbindung **2** und Bacteriorhodopsin keine Protonenpumpaktivität. Ebenso konnte in Untersuchungen des Photocyclus mit ns-Laserpulsen am isolierten, rekonstituierten Protein kein Ausbleichen bei 490 nm beobachtet werden. Diese beiden Befunde verdeutlichen die Notwendigkeit einer *all-trans*-/13-*cis*-Isomerisierung für die Funktion des Bacteriorhodopsins. Gestützt wird diese Folgerung durch Befunde mit Retinal-Analoga, deren Konfiguration an der 13,14-Doppelbindung durch Überbrückung fixiert wurde^[7].

Anders als Retinal erfordert das -Analogon **2a** zur Isomerisierung in die 13-*cis*-Form **2c** aufgrund der fixierten 10,11-*s-cis*-Bindung und der daraus resultierenden Drehung um die 12,13-Einfachbindung Raum für die 13-Methylgruppe über oder unter der Polyenebene. Dieser Raum ist im Protein jedoch offenbar nicht vorhanden (kein 13-*cis*-Isomer im Protein). Hieraus läßt sich der Schluß ziehen, daß – als Voraussetzung für Protonentranslokation in Bacteriorhodopsin – sterische Vorgaben des Proteins eine *all-trans*-/13-*cis*-Isomerisierung bei Belichtung ermöglichen und zugleich die thermische Reisomerisierung unterstützen.

Eingegangen am 22. August,
in veränderter Fassung am 12. Oktober 1983 [Z 525]

- [1] D. Oesterhelt, W. Stoeckenius, *Nature New Biol.* 233 (1971) 149.
- [2] R. H. Lozier, R. A. Bogomolni, W. Stoeckenius, *Biophys. J.* 15 (1975) 955.
- [3] M. Braiman, R. Mathies, *Biochemistry* 19 (1980) 5421.
- [4] W. Gärtner, P. Towner, H. Hopf, D. Oesterhelt, *Biochemistry* 22 (1983) 2637.
- [5] A. Franke (BASF), unveröffentlicht.
- [6] G. Quinkert, M. Hintzmann, P. Michaelis, P. Jürges, H. Appelt, U. Krüger, *Justus Liebigs Ann. Chem.* 748 (1971) 38.
- [7] J.-M. Fang, J. D. Carriker, V. Balogh-Nair, K. Nakanishi, *J. Am. Chem. Soc.* 105 (1983) 5162.

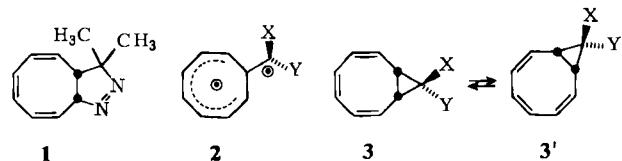
Zum Mechanismus der Cyclopropan-„walk“-Umlagerung: Synthese und Eigenschaften des 2-Diazopropan-Adduktes von Cyclooctatetraen**

Von Frank-Gerrit Klärner* und Volker Glock

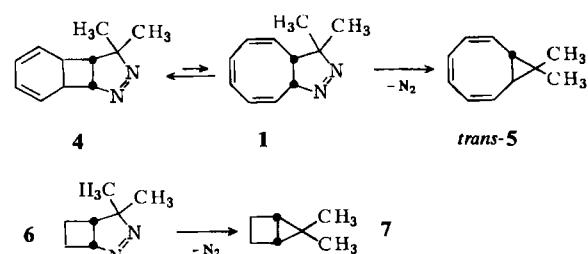
Ob die stereospezifischen Cyclopropan-„walk“-Umlagerungen der vinylogen Systeme Bicyclo[2.1.0]pent-2-en, Bicyclo[4.1.0]hepta-2,4-dien (Norcaradien) und *cis*-Bicyclo[6.1.0]nona-2,4,6-trien konzertiert oder zweistufig über Diradikale ablaufen, läßt sich anhand von Ergebnissen aus stereochemischen und kinetischen Untersuchungen nicht ohne weiteres entscheiden^[1]. Wir versuchten daher, die möglichen diradikalischen Zwischenstufen auf unabhängigem Weg zu generieren. Hier berichten wir über Synthese und Thermolyse von **1**, das eine geeignete Vorstufe für ein Diradikal vom Typ **2**, dem potentiellen Intermediärprodukt der „walk“-Umlagerung **3** → **3'**, ist.

[*] Prof. Dr. F.-G. Klärner, Dipl.-Chem. V. Glock
Abteilung für Chemie der Universität
Postfach 102148, D-4630 Bochum 1

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



Anders als mit Diazomethan und Diazoethan^[2] reagiert Cyclooctatetraen mit Diazopropan bereits bei -15°C hauptsächlich zum bicyclischen Dihydropyrazol **1**, das sich von dem als Nebenprodukt entstandenen tricyclischen Dihydropyrazol **4** durch Umsetzung mit *N*-Phenylmaleimid und anschließende Säulenchromatographie (Florisil, Ether-Pentan (1:3), -20°C) isomerenfrei abtrennen läßt (Ausbeute: 7.6%, bezogen auf 2-Diazopropan)^[3]. Ähnlich wie bei anderen bicyclischen Cyclooctatrien-Derivaten^[4] tritt schon bei Raumtemperatur die Valenzisomerisierung **1** → **4** (25°C: $\tau_{1/2} = 89$ min) ein.



Schema 1. $k_{1,4} = 6.3 \times 10^{11} \exp [(-21.4 \pm 0.4) \text{ kcal/RT}]$; $K = [4]_{\infty} : [1]_{\infty} > 100$; $k_{4,5} = 2.7 \times 10^{15} \exp [(-34.3 \pm 0.7) \text{ kcal/RT}]$; $k_{6,7} = 7.4 \times 10^{15} \exp [(-39.8 \pm 0.5) \text{ kcal/RT}]$.

Beim Erhitzen des tricyclischen Dihydropyrazols **4** findet ab 110°C zu 95% eine N₂-Abspaltung zum *trans*- und *cis*-9,9-Dimethylbicyclo[6.1.0]nona-2,4,6-trien **5** im gaschromatographisch bestimmten Verhältnis von 149:1^[5] statt. Außerdem beobachtet man 5% Cycloreversion zu 3,3-Dimethyl-3*H*-pyrazol^[6] und Benzol. Die Struktur des neuen Kohlenwasserstoffs *trans*-**5**^[7] ergibt sich eindeutig aus seinen spektralen Daten^[8]. Aus dem Vergleich der in Schema 1 aufgeführten Aktivierungsparameter der Reaktionen **4** → **5** und **6** → **7** geht hervor, daß die N₂-Abspaltung in **4** bei 110°C 500mal schneller als im strukturell verwandten Cyclobuten-Diazopropan-Addukt **6** ist. Dieser Befund weist darauf hin, daß die N₂-Abspaltung nicht aus dem Tricyclus **4**, sondern aus dem valenzisomeren Bicyclus **1** erfolgt.

Um weiteren Einblick in die Reaktion **4** → **5** zu gewinnen, wird das thermische Verhalten von [1,2-D₂]-**4** untersucht, das sich aus **4** durch basisch induzierten H/D-Austausch in Tetrahydrofuran (THF) gewinnen läßt (KO_t-C₄H₉, D₂O-THF, Raumtemp., 16 h, Ausbeute: 19%). Der in Schema 2 angegebene Deuteriumgehalt ergibt sich aus ¹H- und ²H-NMR-Spektrum. Nach einer partiellen Thermolyse von [1,2-D₂]-**4** (110°C, 140 min, Umsatz: 50%) sind Gehalt und Position der Deuteriumatome im zurückgewonnenen Edukt unverändert. Nach der ¹H- und ²H-NMR-Analyse besteht das Hauptprodukt aus den in gleichen Anteilen gebildeten Regioisomeren *trans*-[1,2-D₂]- und -[2,3-D₂]-**5**.

Die überraschende Bildung von *trans*-**5** aus dem *cis*-konfigurierten Dihydropyrazol **4** läßt sich folgendermaßen erklären: Nach der Valenzisomerisierung **4** → **1** beginnt die N₂-Abspaltung aus der in Schema 2 gezeigten *exo*-Konformation von **1**, die sicherlich thermodynamisch gegenüber der *endo*-Konformation bevorzugt ist. Die Struktur der möglichen Diradikal-Zwischenstufen **8** und/oder **2** ähnelt