

Molekulare Schalter

DOI: 10.1002/ange.200502638

Vitamin B₁₂: eine Methylgruppe ohne Aufgabe?**

Philip Butler, Marc-Olivier Ebert, Andrzej Lyskowski,
Karl Gruber, Christoph Kratky und Bernhard Kräutler*

Professor Albert Eschenmoser zum 80. Geburtstag gewidmet

Die Faszination, die von den B₁₂-Coenzymen ausgeht, den „schönsten“ Cofaktoren in der Natur,^[1] spiegelt die Einmaligkeit und Komplexität ihrer Struktur und Chemie wider.^[2,3] B₁₂ wurde auch zu einem herausragenden Testsystem für Hypothesen über die Evolution katalytischer Bausteine essentieller Cofaktoren,^[4] und sein Corrin-Ligand könnte gemäß Eschenmoser^[5] eine Weiterentwicklung des hypothetischen B₁₂-Vorläufers „Protocobyrinsäure“ sein. Die Einführung von Methylgruppen und die charakteristische Nucleotidschleife könnten durch (nichtenzymatische) Anpassung und Selbstkonstitution zustande gekommen sein.^[4-6] Wir beschreiben hier Norvitamin B₁₂ (**1**, Co_β-Cyan-5'',6''-dimethylbenzimidazolyl-176-norcobamid)^[7] und sein metallorganisches Derivat Methylnorcobalamin (**2**, Co_β-Methyl-5'',6''-dimethylbenzimidazolyl-176-norcobamid), zwei B₁₂-Derivate, denen die Methylgruppe des Cobamid-Liganden an C176 fehlt. Veranlasst wurden unsere Studien durch die Entdeckung von Norpseudovitamin B₁₂ (**3**, Schema 1), der Cyan-Co^{III}-Form des Cofaktors von Perchlorethylenreduktase von *Sulfurospirillum multivorans*,^[8] einem natürlichen „vollständigen“ B₁₂-Cofaktor, dem die Methylgruppe an C176 fehlt.

Norvitamin B₁₂ (**1**) wurde entsprechend bereits früher für die partielle Synthese von Vitamin B₁₂ (**4**) entwickelter Me-

[*] Dr. P. Butler, Dr. M.-O. Ebert, Prof. Dr. B. Kräutler

Institut für Organische Chemie

Innrain 52a

und

Zentrum für Molekulare Biowissenschaften

Leopold-Franzens-Universität Innsbruck

6020 Innsbruck (Österreich)

Fax: (+43) 512-507-2892

E-mail: bernhard.kraeutler@uibk.ac.at

A. Lyskowski, Prof. Dr. K. Gruber, Prof. Dr. C. Kratky

Institut für Chemie

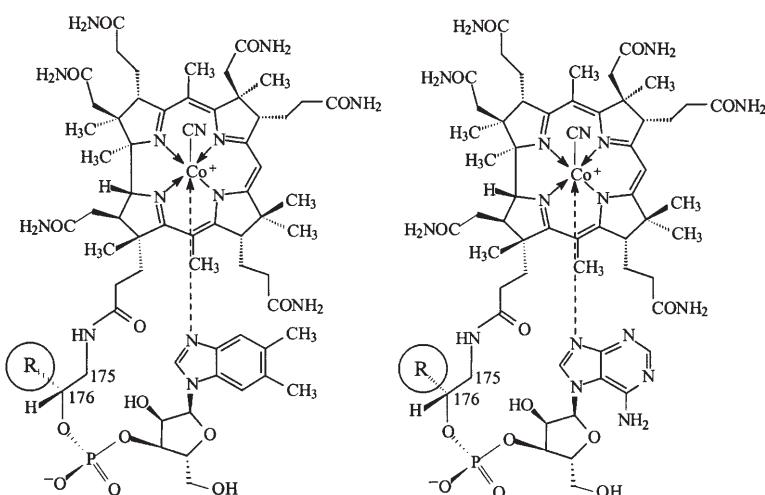
Karl-Franzens-Universität Graz

Heinrichstraße 28, 8010 Graz (Österreich)

[**] Wir danken K.-H. Ongania für die Messung der FAB-Massenspektren. Hoffmann-LaRoche sind wir für eine Spende von Vitamin B₁₂ dankbar. Das Projekt wurde unterstützt durch die Europäische Kommission (Proj. No. HPRN-CT-2002-00195) und den Österreichischen Fonds zur Förderung der wissenschaftlichen Forschung (FWF, Projekte P-13595 und P-17132). Kristallstrukturdaten wurden am Strahlengang BW7b des EMBL am DESY in Hamburg gesammelt.



Hintergrundinformationen zu diesem Beitrag sind im WWW unter <http://www.angewandte.de> zu finden oder können beim Autor angefordert werden.

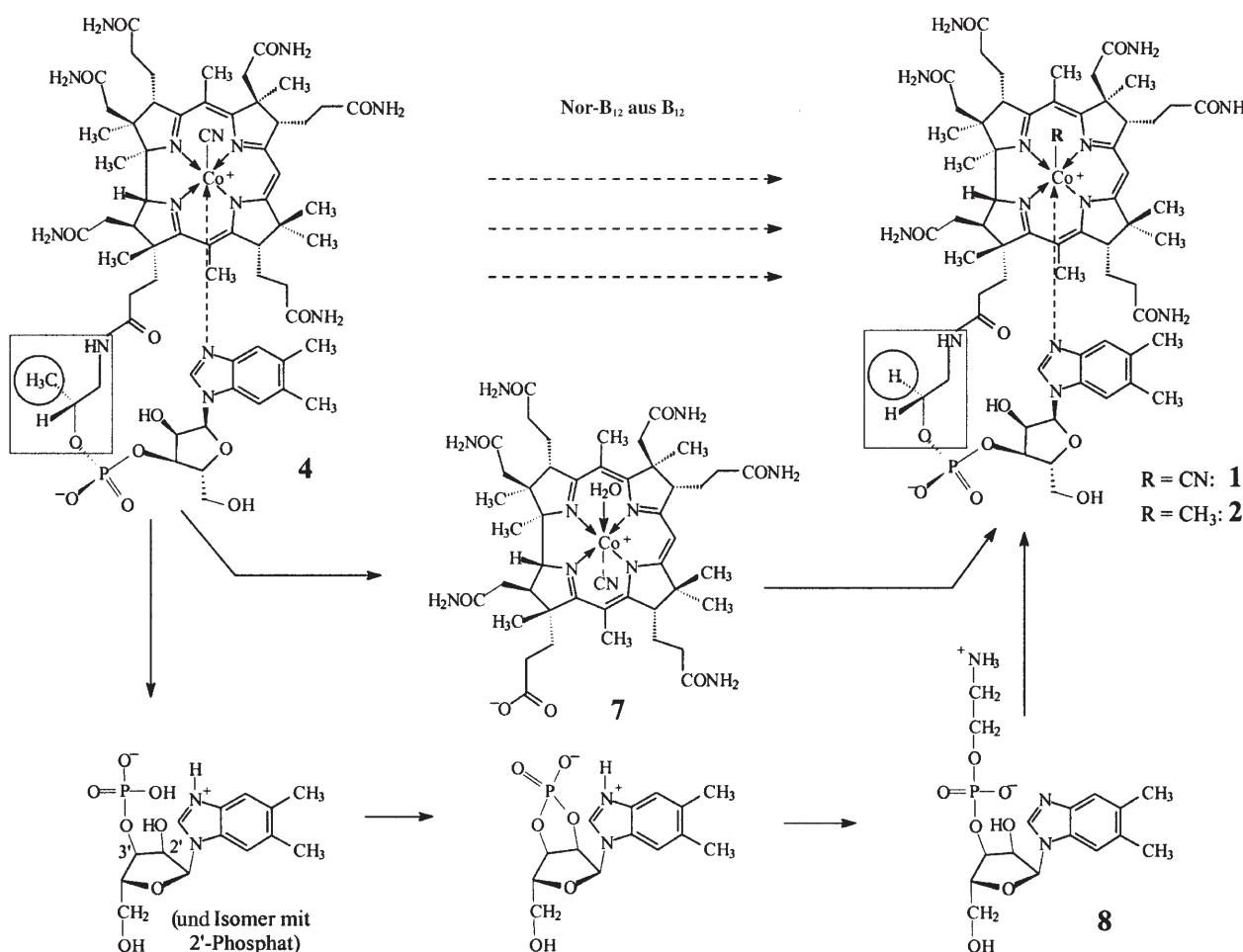


Schema 1. Strukturformeln von kompletten „base-on“-Corrinoiden. Links: Norvitamin B₁₂ (**1**, R=H), Vitamin B₁₂ (**4**, R=CH₃). Rechts: Norpseudovitamin B₁₂ (**3**, R=H), Pseudovitamin B₁₂ (**6**, R=CH₃).

thoden^[7,9,10] hergestellt. Kondensation von Cobysäure (**7**) (erhalten durch Hydrolyse von **4**)^[7,11] mit (2-Aminoethyl)-3-(α -ribazolyl)-diphosphat (**8**) und Kristallisation aus wässriger

Aceton ergab **1** in 73% Ausbeute (Schema 2). Das chromatographische Verhalten von **1** glich dem von **4**, und die UV/Vis-Spektren von **1** und **4** waren praktisch nicht unterscheidbar. FAB-Massenspektren von **1** zeigten ein Pseudo-Molekülion bei *m/z* 1341, d.h. bei 14 Masseneinheiten weniger als bei **4**. Desgleichen wiesen die chemischen Verschiebungen in den ¹H-NMR- und ¹³C-NMR-Spektren^[12] darauf hin, dass C176 keine Methylgruppe trägt. Der Vergleich der für **4** verfügbaren NMR-Daten^[13,14] mit Spektren von **1** belegte nur die zu erwartenden lokalen Substituenteneffekte einer in **1** fehlenden Methylgruppe auf die chemischen Verschiebungen (siehe *Experimentelles*^[15] und Hintergrundinformationen, Tabelle S1).

Kristalle von Norvitamin B₁₂ (**1**) wurden aus wässrigem Aceton erhalten, und die Struktur wurde mit Synchrotronstrahlung mit einer Auflösung von 0.85 Å bestimmt (Abbildung 1).^[15] Die erhaltene Struktur ist der von Vitamin B₁₂ (**4**)^[16] sehr ähnlich. Unterschiede bestehen in einer etwas längeren Co-N-Bindung zwischen dem Cobaltzentrum und der unteren axialen Base in **1** (2.047(5) Å gegenüber



Schema 2. Herstellung von Norvitamin B₁₂ (**1**) und Methylnorcobalamin (**2**) ausgehend von Vitamin B₁₂ (**4**) über Cobysäure (**7**) (Details siehe Hintergrundinformationen).^[15]

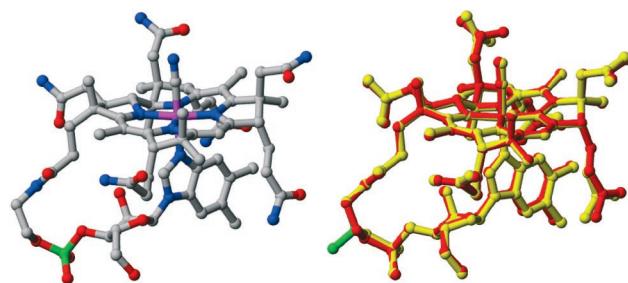


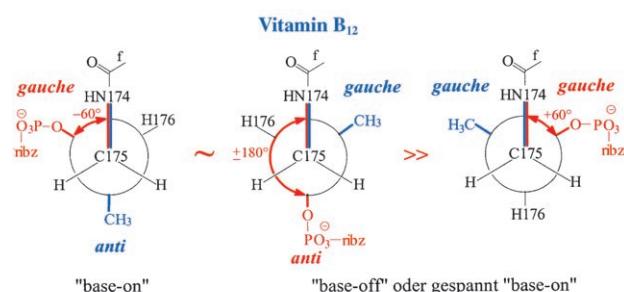
Abbildung 1. Links: Struktur von Norvitamin B₁₂ (**1**) im Kristall, Kugel-Stab-Modell: C grau, N blau, O rot, P grün, Co rosa; rechts: Überlagerung von Modellen der 3D-Strukturen von **1** (rot) und von Vitamin B₁₂ (**4**).^[16] (gelb, C176-Methyl in Grün).

2.011(10) Å in **4**), einer geringfügig größeren Basen-Verkipfung (Differenz der Winkel Co-N3N-C9N und Co-N3N-C2N) von 11.6(0.6)° in **1** (gegenüber 9.7(1.1)° in **4**) und einer geringfügig verkleinerten Faltung des Corrin-Liganden von 18.0(0.3)° in **4** auf 15.8(0.1)° in **1**. Diese Unterschiede sind konsistent mit dem vergleichbaren mechanochemischen und sterischen Einfluss der Nucleotidfunktion in **1** und **4**.^[17] Kleinere strukturelle Unterschiede tauchen außerdem nur in den Bereichen des Ethanolaminlinkers und der Phosphat- und Ribosegruppen der Nucleotidschleife auf. Mit Ausnahme der Orientierung der Amidgruppe der Seitenkette *a* waren sogar die Konformationen der Amidseitenketten in **1** und **4** praktisch identisch.

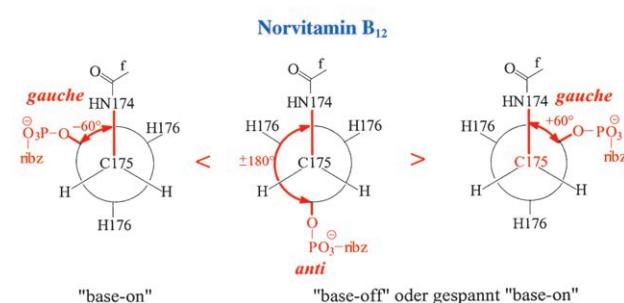
Kristallines Methylnorcobalamin (**2**) wurde aus **4** durch In-situ-Methylierung des elektrochemisch hergestellten Norcob(I)-alamin (**9**).^[18] mit Methyltoluolsulfonat in 80 % Ausbeute erhalten. Die UV/Vis-Spektren von **2** und dem homologen Methylcobalamin (**5**) waren praktisch nicht unterscheidbar. FAB-Massenspektren von **2** wiesen ein Pseudo-Molekülion bei *m/z* 1330 auf, d.h. bei 14 Masseneinheiten weniger als bei **5**. Desgleichen war das Fehlen der Methylgruppe an C176 durch Vergleiche der ¹H-NMR- und ¹³C-NMR-Spektren^[12] von **2** und **5**^[13,19] klar ersichtlich (siehe *Experimentelles* und Hintergrundinformationen, Tabelle S1). Abgesehen von den erwarteten lokalen Substituenteneffekten der Methylgruppe auf die chemischen Verschiebungen waren wiederum keine signifikanten Unterschiede in den NMR-Spektren zu beobachten.

Ein Einfluss der Methylgruppe auf die konformativen Eigenschaften von Vitamin B₁₂ (**4**) und Methylcobalamin (**5**) konnte also weder aus den spektroskopischen Daten noch aus der Kristallstruktur von **1** abgeleitet werden. Tatsächlich besetzt die Methylgruppe an C176 sowohl in **4** als auch in Pseudovitamin B₁₂ (**6**).^[8] eine kaum beeinträchtigte Stelle, die sich antiperiplanar zu N174 und antikinal zu P des Phosphatlinkers befindet (Stelle H_{proR}(176) in **1**) (Abbildung 2). Die Methylgruppe an C176 übt somit keinen spezifischen Einfluss auf die Konformation der Nucleotidschleife bekannter B₁₂-Coenzyme in ihrer „base-on“-Form aus. Eine Destabilisierung der alternativen, gestaffelten „base-off“-Konformationen ist jedoch zu erwarten (siehe unten sowie Abbildungen 2 und 3).

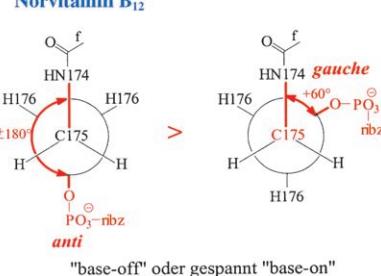
Die Methylgruppe an C176 wird durch Threoninphosphat eingeführt,^[20] während Serin als biosynthetischer Vorläufer



„base-off“ oder gespannt „base-on“



Norvitamin B₁₂



Norvitamin B₁₂

Abbildung 2. Qualitative Analyse des Einflusses der Methylgruppe an C176 mithilfe idealisierter Konformationen um die C175-C176-Bindung. Oben: Cobalamine (z. B. Vitamin B₁₂); unten: Norcobalamine (z. B. Norvitamin B₁₂). Ein Diederwinkel von ungefähr -60° wird in „base-on“-Cobalaminen beobachtet und ist für „präcyclische“ Formen notwendig (= „base-off“-Form, in der die Base zur Koordination am Cobaltzentrum vororientiert ist),^[6] andere gestaffelte Konformationen ($+60^\circ$, 180°) sind „base-off“ und ermöglichen damit keine nichtgespannten „base-on“-Formen. Die Methylgruppe an C176 von Vitamin B₁₂ ist *gauche* und destabilisiert demnach die 60° - und 180° -„base-off“-Konformationen, aber nicht die -60° -„base-on“-Konformation (ribz = α -Ribazol = 5'',6''-Dimethylbenzimidazolyl- α -Nucleosid).

für den Ethanolaminlinker der Norcobamide in Betracht gezogen wird.^[8] Die Anwesenheit der Methylgruppe in Vitamin B₁₂ (**4**) ist damit wohl weder eine Folge eines eingeschränkten biosynthetischen Angebots (Threonin kontra Serin) noch einer inhärenten spezifischen Anpassung der „base-on“-Form der vollständigen Cobamide. Gemäß Eschenmoser^[4,6] ist jedoch zu erwarten, dass eine Methylgruppe an C176 (und die *R*-Konfiguration) zu weniger instabilen „präcyclischen“ (noch „base-off“-) Konformationen der angehängten Nucleotidkette führt und damit die Bildungstendenz der Cobalt-koordinierten „base-on“-Form erhöht. Dies würde einerseits die Selbstkonstitution der vollständigen B₁₂-Struktur unterstützen.^[6] Andererseits ist auch eine Beeinflussung des „base-on“/„base-off“-Gleichgewichts vollständiger Cobamide denkbar. Diese können als molekulare Schalter verstanden werden, die ihre metallorganische Redoxchemie steuern.^[21] Eine solche Eigenschaft wäre unter Umständen auch von großer Wichtigkeit für die Bindung und Erkennung (der „base-on“- oder der „base-off“-Form) vollständiger B₁₂-Derivate durch biologische Makromoleküle wie Proteine^[2,3,22,23] und Oligonukleotide.^[21,24]

Um den Einfluss der C176-Methylgruppe auf ein repräsentatives B₁₂-„base-on“/„base-off“-Gleichgewicht abzuschätzen, wurde die Bereitschaft zur säureinduzierten Dekoordinierung des Nucleotids von Methylnorcobalamin (**2**) bestimmt und mit dem entsprechenden Vorgang beim Me-

thylcobalamin (**5**)^[25] verglichen. In der „base-on“-Form von **5** äußert sich die starke intramolekulare Koordination der Dimethylbenzimidazolbase durch einen niedrigen pK_a -Wert von **H-5⁺** (am N3N protoniertes **5**) von 2.90.^[25] Mit UV/Vis-Spektrophotometrie konnte für die protonierte „base-off“-Form von **2** (**H-2⁺**) ein $pK_a(\mathbf{H-2}^+)$ von 3.24 bestimmt werden (Abbildung 3). Mit $pK_a(\mathbf{H-2}^+) - pK_a(\mathbf{H-5}^+) = 0.34$ ist **2** ungefähr zweimal basischer als **5** (mit Protonierung am Dimethylbenzimidazol-Stickstoff N3N). Die pK_a -Werte lassen darauf schließen, dass die Nucleotid-koordinierte „base-on“-Form von **2** bei Raumtemperatur eine um den Faktor 2.1 geringere Bildungswahrscheinlichkeit hat als die von **5**.

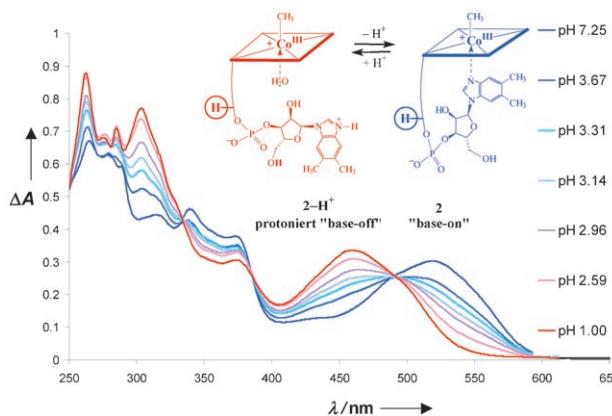


Abbildung 3. Der B_{12} -„Molekülschalter“ mit **2** und **2-H⁺**: pH-Abhängigkeit der UV/Vis-Spektren wässriger Pufferlösungen von **2** ($[\mathbf{2}] = 0.45 \text{ mM}$, pH-Werte wie angegeben, 1.0 M KCl, Raumtemperatur, siehe Hintergrundinformationen).

Wie zu erwarten war,^[4] ist die Methylgruppe an C176 der „vollständigen“ Cobamide – z.B. Vitamin B_{12} (**4**) oder Methylcobalamin (**5**) – von Bedeutung. Sie hilft in der Bildung der „base-on“-Form, wie sich durch qualitative Konformationsanalyse einsehen lässt (Abbildung 2). Dabei wird am Corrin-gebundenen Cobaltzentrum ein konstitutioneller Einfluss der C176-Methylgruppe beobachtet, der über beachtlich große Distanzen wirkt. Die Methylgruppe erleichtert die elf Bindungen entfernt stattfindende Koordination des Cobalts durch die Nucleotidbase. Bei den Norcobamiden, denen diese Methylgruppe fehlt, wird dementsprechend eine höhere Tendenz zur Bildung der „base-off“-Form und zur Reduktion bei positiveren elektrochemischen Potentialen vorausgesagt.^[18,26] Dies ist relevant für dehalogenierende anaerobe Mikroorganismen, von denen eines das Norcobamid Norpseudo- B_{12} als Cofaktor verwendet.^[8]

Die Anwesenheit der Methylgruppe an C176 in den Cobamiden ist eine Eigenschaft der vollständigen „ B_{12} -Dinucleotide“: Sie bewirkt eine stabilere „base-on“-Konstitution und erleichtert die (reversible) schleifenförmige Rückbindung einer Nucleotidkomponente an die andere (ein Cobaltcorrin). Die Neigung zur Bildung einer solchen Schleife ist eine inhärente Eigenschaft der B_{12} -Struktur und wird als essenziell für die Rolle betrachtet, die B_{12} möglicherweise in Urformen des Lebens spielte.^[4] Dieses Strukturmerkmal (von B_{12}) ist wohl in Cofaktoren einmalig, in den

B_{12} -abhängigen Enzymen jedoch nur teilweise erhalten. Hier werden beide konstitutionellen Typen von B_{12} -Cofaktoren gefunden, „base-on“ und „base-off“. In einigen Organismen scheint die Anwesenheit der Methylgruppe an C176 der „vollständigen“ Cobamide nur eine nicht weiter funktionale Konsequenz der genetisch programmierten B_{12} -Biosynthese zu sein. Die Methylgruppe an C176 scheint damit den „fossilen Ursprung“ der B_{12} -Struktur^[5] widerzuspiegeln und lädt zu weiteren Untersuchungen ein, wie sie in unseren Labors durchgeführt werden.

Eingegangen am 27. Juli 2005
Online veröffentlicht am 22. Dezember 2005

Stichwörter: Bioorganometallchemie · Konformationsanalyse · Molekulare Schalter · Strukturaufklärung · Vitamin B_{12}

- [1] J. Stubbe, *Science* **1994**, *266*, 1663–1664.
- [2] *Vitamin B_{12} and B_{12} -Proteins* (Hrsg.: B. Kräutler, B. T. Golding, D. Arigoni), Wiley-VCH, Weinheim, **1998**.
- [3] *Chemistry and Biochemistry of B_{12}* (Hrsg.: R. Banerjee), Wiley, New York, **1999**.
- [4] A. Eschenmoser, *Angew. Chem.* **1988**, *100*, 5–40; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1988**, *27*, 5–40.
- [5] A. Eschenmoser, *Nova Acta Leopold.* **1982**, *55*, No. 247.
- [6] A. Eschenmoser, F. Kreppelt, unveröffentlichte Ergebnisse; siehe F. Kreppelt, Dissertation Nr. 9458, Eidgenössische Technische Hochschule Zürich, **1991**.
- [7] Frühere Arbeiten wurden zusammengefasst in: W. Friedrich in *Fermente, Hormone und Vitamine, Vol. III/2* (Hrsg.: R. Ammon, W. Dirscherl), Thieme, Stuttgart, **1975**, S. 25.
- [8] B. Kräutler, W. Fieber, S. Ostermann, M. Fasching, K.-H. Ongania, K. Gruber, C. Kratky, C. Mikl, A. Siebert, G. Diekert, *Helv. Chim. Acta* **2003**, *86*, 3698–3716.
- [9] R. B. Woodward in *Vitamin B_{12} , Proceedings of the 3rd European Symposium on Vitamin B_{12} and Intrinsic Factor* (Hrsg.: B. Zagalak, W. Friedrich), de Gruyter, Berlin, **1979**, S. 37–87.
- [10] a) W. Friedrich in *Vitamin B_{12} and Intrinsic Factor* (Hrsg.: H. C. Heinrich), Enke, Stuttgart, **1962**, S. 62–72; b) K. Bernhauer, O. Müller, F. Wagner, *Angew. Chem.* **1963**, *75*, 1145–1188; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1964**, *3*, 200–211.
- [11] R. Bonnet in *B_{12}* (Hrsg.: D. Dolphin), Wiley, New York, **1982**, S. 201–243.
- [12] R. Konrat, M. Tollinger, B. Kräutler in *Vitamin B_{12} and B_{12} -Proteins* (Hrsg.: B. Kräutler, B. T. Golding, D. Arigoni), Wiley-VCH, Weinheim, **1998**, S. 349–368.
- [13] K. Brown in *Chemistry and Biochemistry of B_{12}* (Hrsg.: R. Banerjee), Wiley, New York, **1999**, S. 197–237.
- [14] A. M. Calafat, L. G. Marzilli, *J. Am. Chem. Soc.* **1993**, *115*, 9182–9190.
- [15] Ausgewählte spektroskopische Daten: **1**: UV/Vis ($c = 5.59 \times 10^{-4} \text{ M}, \text{H}_2\text{O}$): 548 (3.85), 518.5 (3.80), 407 (3.47), 360 (4.36), 321.5 (3.81), 304.5 (3.88), 277.5 (4.10); FAB-MS: 1343.5 (13), 1342.5 (22), 1341.5 (24, $[\text{M}+\text{H}]^+$), 1317.6 (57), 1316.4 (100), 1315.5 (94, $[\text{M}+\text{H}-\text{CN}]^+$); **2**: UV/Vis ($c = 4.51 \times 10^{-4} \text{ M}$, 0.1 M Phosphat-Puffer, pH 7.25): 518.5 (3.83), 373.5 (3.93), 339 (4.01), 314.5 (4.00), 279 (4.15), 265 (4.18); FAB-MS: 1332.6 (24), 1331.6 (43), 1330.6 (52, $[\text{M}+\text{H}]^+$), 1317.6 (68), 1316.5 (100), 1315.6 (76, $[\text{M}+\text{H}-\text{CH}_3]^+$); **8**: $^1\text{H-NMR}$ (300 MHz, D_2O): $\delta = 2.37$ (3H, s, CH_3), 2.39 (3H, s, CH_3), 3.19 (2H, t, $\text{H}_2\text{NCH}_2\text{CH}_2\text{O}$), 3.83 (1H, dd, $J = 4.2, 12.6 \text{ Hz}$, $\text{H}_a\text{C5R}$), 3.95 (1H, dd, $J = 2.7, 12.6 \text{ Hz}$, $\text{H}_b\text{C5R}$), 4.08 (2H, m, $\text{H}_2\text{NCH}_2\text{CH}_2\text{O}$), 4.62 (1H, m, HC4R), 4.7–4.9 (Wassersignal überlagert Signale von HC2R, HC3R), 6.41 (1H, d, $J = 4.5 \text{ Hz}$, HC1R), 7.45 (1H, s, aromatisches CH),

7.53 (1H, s, aromatisches CH), 8.34 ppm (1H, s, HC2N). UV/Vis ($c = 9.97 \times 10^{-4}$ M, 0.1M Phosphat-Puffer, pH 7.25): 286.5 (4.05), 278.5 (4.07), 248 (4.21). ESI-MS: 439.97 (20, $[M+K]^+$), 423.97 (5, $[M+Na]^+$), 404.03 (5), 403.02 (20), 402.01 (100, $[M+H]^+$), 146.97(10). Weitere Einzelheiten sind in den Hintergrundinformationen beschrieben. Strukturbestimmung von **1**: Kristalle wurden aus Wasser/Aceton gezüchtet. Diffractionsdaten (Raumgruppe $P2_12_12_1$, $a = 15.573$, $b = 22.846$, $c = 24.583$ Å, $R_{\text{sym}} = 0.039$) bis zu einer maximalen Auflösung von 0.85 Å wurden bei 103 K mittels Synchrotronstrahlung ($\lambda = 0.8426$ Å) am Strahlengang BW7b am EMBL/DESY in Hamburg aufgenommen. Verfeinerung auf F^2 (7744 eindeutige Reflexe, 1131 Parameter und 1693 Restraints) konvergierte bei kristallographischen R -Werten von $R1 = 0.0796$ und $wR2 = 0.2137$ für alle Reflexe. Weitere Einzelheiten sind in den Hintergrundinformationen beschrieben. CCDC 278482 (**1**) enthält die ausführlichen kristallographischen Daten zu dieser Veröffentlichung. Die Daten sind kostenlos beim Cambridge Crystallographic Data Centre über www.ccdc.cam.ac.uk/data_request/cif erhältlich.

- [16] B. Kräutler, R. Konrat, E. Stupperich, G. Färber, K. Gruber, C. Kratky, *Inorg. Chem.* **1994**, *33*, 4128–4139.
- [17] C. Kratky, B. Kräutler in *Chemistry and Biochemistry of B_{12}* (Hrsg.: R. Banerjee), Wiley, New York, **1999**, S. 9–41. Der Faltungswinkel des Corrin-Liganden wird (hier) als Winkel zwischen den besten Ebenen durch Atome (N1-C4-C5-C6-C9-C10 (Ebene 1) und C10-C11-N3-C14-C15-C16-N4 (Ebene 2) definiert (Atomnummerierung siehe Hintergrundinformationen).
- [18] B. Kräutler in *Chemistry and Biochemistry of B_{12}* (Hrsg.: R. Banerjee), Wiley, New York, **1999**, S. 315–339.
- [19] M. Tollinger, T. Dérer, R. Konrat, B. Kräutler, *J. Mol. Catal. A* **1997**, *116*, 147–155.
- [20] D. Thibaut, F. Blanche, B. Cameron, J. Crouzet, L. Debussche, E. Rémy, M. Vuilhorgne in *Vitamin B_{12} and B_{12} -Proteins* (Hrsg.: B. Kräutler, B. T. Golding, D. Arigoni), Wiley-VCH, Weinheim, **1998**, S. 63–80.
- [21] S. Gschösser, K. Gruber, C. Kratky, C. Eichmüller, B. Kräutler, *Angew. Chem.* **2005**, *117*, 2324–2328; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2005**, *44*, 2284–2288.
- [22] S. Fedosov, L. Berglund, N. U. Fedosova, E. Nexø, T. E. Petersen, *J. Chem. Biol.* **2002**, *277*, 9989–9996.
- [23] C. L. Drennan, S. Huang, J. T. Drummond, R. G. Matthews, M. L. Ludwig, *Science* **1994**, *266*, 1669–1674.
- [24] A. Nahvi, N. Sudarsan, M. S. Ebert, X. Zou, K. L. Brown, R. R. Breaker, *Chem. Biol.* **2002**, *9*, 1043–1049.
- [25] K. L. Brown, S. Peck-Siler, *Inorg. Chem.* **1988**, *27*, 3548–3555.
- [26] D. Lexa, J. M. Savéant, *Acc. Chem. Res.* **1983**, *16*, 235–243.