

81. Zur Kenntnis des Faktors F430 aus methanogenen Bakterien: Struktur des porphinoiden Ligandensystems

von **Andreas Pfaltz**, **Bernhard Jaun**¹⁾, **Alexander Fässler** und **Albert Eschenmoser**

Organisch-chemisches Laboratorium der Eidgenössischen Technischen Hochschule, Universitätsstrasse
16, CH-8092 Zürich

und **Rolf Jaenchen**, **Hans Harald Gilles**, **Gabriele Diekert** und **Rudolf K. Thauer**

Fachbereich Biologie Mikrobiologie, Philipps-Universität Marburg, D-3550 Marburg

(24. II. 82)

Factor F430 from Methanogenic Bacteria: Structure of the Porphinoid Ligand System

Summary

A structure is proposed for F430M, a non-crystalline methanolysis product of isolates of the nickel-containing, porphinoid factor F430 from *Methanobacterium thermoautotrophicum*.

Crucial to the structure determination are five incorporation experiments with *M. thermoautotrophicum* (strain Marburg) in which the specifically mono-¹³C-labeled biosynthetic precursors (2-¹³C)-, (3-¹³C)-, (4-¹³C)-, (5-¹³C) ALA (ALA = δ -amino-levulinic acid) and L-(methyl-¹³C)methionine were incorporated into F430 with high efficiency. The ¹³C-NMR.-spectra of the specifically labeled F430M samples derived therefrom, together with the UV./VIS. spectral data of F430M, contain all the information necessary for the deduction of the constitution of the F430M chromophore, assuming the established pattern of porphinoid biosynthesis to be operative in F430 biosynthesis. ¹H-NMR. spectroscopy and, in particular, ¹H-NMR.-NOE-difference spectroscopy corroborates and completes the constitutional assignments and, furthermore, makes possible an almost complete derivation of the molecule's relative configuration. Schemes 3 and 4 summarize the results of ¹H-NMR. spectroscopy, presenting them within the context of the proposed structure for F430M. The assignment of absolute configuration implied in the formula is given preference because of F430M's very close structural and (assumed) biosynthetic relationship to sirohydrochlorin and vitamin B₁₂ (with respect to ring C, the assignment is based on degradative evidence).

According to the proposed structure, the nickel complex F430M possesses an uroporphinoid (Type III) ligand skeleton with an additional carbocyclic ring and a chromophore system not previously encountered among natural porphinoids. It can be considered to be a (tetrahydro) derivative of the corphin system, combining structural elements of both porphyrins and corrins.

¹⁾ Arbeitsgruppe für physikalische organische Chemie (Leitung Prof. J. F. M. Oth), Organisch-chemisches Laboratorium der ETHZ.

1. Einleitung. – F430 ist die Bezeichnung eines erstmals von *Gunsalus & Wolfe* [1] an seiner charakteristischen UV./VIS.-Absorptionsbande bei 430 nm erkannten (nichtfluoreszierenden) Faktors aus *Methanobacterium thermoautotrophicum*. *Thauer et al.* [2] entdeckten die obligate Nickel-Abhängigkeit des Wachstums dieser (aus Kohlendioxid und Wasserstoff) Methan-produzierenden Bakterien und wiesen erstmals nach, dass Faktor F430 Nickel enthält [3] (vgl. auch [4]). Seither durchgeführte systematische Untersuchungen haben ergeben, dass sämtliche bislang geprüften methanogenen Bakterien zu ihrem Wachstum Nickel benötigen und Faktor F430 synthetisieren [4] [5]. Es wird vermutet [6] [7], dass Faktor F430 ein Bestandteil jenes Enzymsystems ist, das in methanogenen Bakterien die reduktive Spaltung von Methyl-coenzym M (2-Methylmercaptoäthansulfonat [8]) zu Methan und Coenzym M vermittelt.

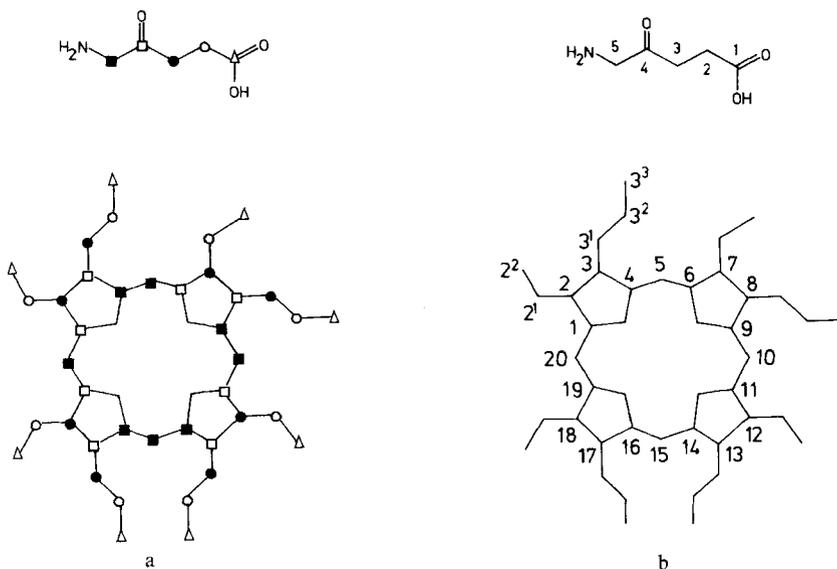
Faktor F430 lässt sich durch thermische Behandlung der Zellsuspensionen bei pH 7 (z. B. 100°, 1 Std.) [4] [9] [10], oder schonender durch Behandlung bei 0°/pH 2 [5] [11] aus den Zellen ablösen, wobei nach mehrfachen Isolierungs- und Reinigungsschritten chromatographisch und UV./VIS.-spektroskopisch charakterisierte, wasserlösliche und in unpolaren Lösungsmitteln unlösliche, amorphe Isolate erhalten werden, deren Zusammensetzung je nach Vorgehen bei der Isolierung variiert. Nach dem pH 2/0°-Ablösungsmodus gewonnene F430-Isolate sind hitzestabil [5]; diese Eigenschaft ist vermutlich dafür verantwortlich, dass nach Ablösung durch Hitzebehandlung mehrere chromatographisch differenzierbare F430-Formen beachtet werden [4], was nach Bereitung bei 0° nicht der Fall ist [5].

Faktor F430 gehört der Naturstoffgruppe der Porphinoide an. Dies geht aus den Ergebnissen einer Reihe von Einbau-Experimenten mit ¹⁴C-markierten Uroporphyrinogen(III)-Biosynthesevorläufern hervor: Zellen von *Methanobacterium thermoautotrophicum* (Stamm Marburg) bauen sowohl (2,3-¹⁴C)Bernsteinsäure [10], wie auch (4-¹⁴C)δ-Aminolävulinsäure [11] in F430 ein und zwar zu einem Ausmass, das acht Vorläufermolekeln pro Nickel-Äquivalent entspricht. Ferner haben Einbauexperimente mit L-(Methyl-¹⁴C)methionin sowie L-(Methyl-³H)methionin [12] am gleichen Organismus nachgewiesen, dass in Faktor F430 zwei aus Methionin stammende Methylgruppen vorkommen. Dies hat zur Hypothese [12] eines biosynthetischen Zusammenhangs zwischen F430 und Sirohydrochlorin geführt, was zur Tatsache passt, dass methanogene Bakterien ebenfalls Corrinioide produzieren [13] [14]. Da im Marburger Laboratorium bereits in der Anfangsphase der Untersuchungen die Vermutung aufgekommen war [3], dass es sich beim Faktor F430 um den Nickelkomplex eines Ligandsystems mit Corrin-ähnlichem Chromophor handeln könnte, wurde eine Zusammenarbeit mit dem Zürcher Laboratorium vereinbart mit dem Ziel der Strukturermittlung des Ligandsystems von F430. Im Hinblick darauf ist dann vorab die UV./VIS.-spektroskopisch geleitete Suche nach dem F430-Chromophortyp bei corphinischen und corrinischen Modellverbindungen durchgeführt worden, über deren Resultate die vorstehende Mitteilung [15] orientiert. Die vorliegende Veröffentlichung beschreibt die Untersuchungen am Naturstoff selbst, nämlich die Strukturermittlung eines Methanolyseprodukts²⁾ von Faktor F430 (hier

²⁾ Der Anstoss zu Methanolyseversuchen an Faktor F430 ging von einem Diskussionsbeitrag von Prof. B. Frank anlässlich eines Vortrags von R. K. Th. an der Universität Münster (Westfalen) aus.

F430M genannt). Nach diesen Ergebnissen steht fest, dass der Faktor aus Methanbakterien die Palette der biologisch funktionellen, porphyrinischen Naturstoffe sowohl um eine neue Kohlenstoffskelett-Variante als auch um einen bisher in der Natur nicht angebotenen (corphinischen) Chromophortyp bereichert; Faktor F430 ist zudem das erste Beispiel eines mit Nickel komplexierten natürlichen Porphinoids.

Schema 1



- a) Ursprung der C-Atome des Uroporphinoid-(Typ III)-Skeletts bei dessen Biosynthese aus acht Molekeln δ -Aminolävulininsäure [16]; b) Numerierung des C-Skeletts von Uroporphinoiden (Typ III) [17].

Grundlage des Strukturermittlungsverfahrens für F430M ist zum einen die heute detailliert bekannte biosynthetische Herkunft der Ligandskelett-C-Atome der Typ (III)-uroporphyrinischen Naturstoffe aus den C-Atomen des Vorläufers δ -Aminolävulininsäure [16] (vgl. *Schema 1*), zum andern die experimentell entscheidende Tatsache, dass *Methanobacterium thermoautotrophicum* (Stamm Marburg) mit hoher Effizienz (bis zu 70%) die exogenen Vorläufer δ -Aminolävulininsäure und L-Methionin biosynthetisch in Faktor F430 einzubauen vermag [11][12]. Im Mittelpunkt unserer F430M-Strukturermittlung steht eine Serie von fünf Biosynthese-Experimenten, in welchen die vier jeweils spezifisch an C(2)-, C(3)-, C(4)- und C(5)-mono-¹³C-markierten δ -Aminolävulininsäuren sowie das L-(Methyl-¹³C)methionin in *M. thermoautotrophicum* eingebaut und anschliessend die entsprechend markierten F430M-Proben ¹³C-spektroskopisch analysiert wurden. Aus den fünf so erhaltenen ¹³C-NMR.-Partialspektren ergab sich die Zuordnung sämtlicher Ligandskelett-¹³C-NMR.-Signale im F430M ¹³C-NMR.-Gesamtspektrum zu den C-Atomen der Biosynthesevorläufer. Im wesentlichen aus der Summe dieser ¹³C-NMR.-spektroskopischen und biosynthetischen Information und unter Verwendung der UV./VIS.-spektroskopischen Daten liess sich ausgehend von der Arbeitshypothese, dass für F430 die bislang bekannten Gesetz-

mässigkeiten der Porphinoid-Biosynthese [16] gültig sind, der Konstitutionstyp des Chromophorsystems von F430M herleiten. Die Vervollständigung und besonders die konfigurative Ergänzung des Strukturbildes hat dann vor allem die Technik der $^1\text{H-NMR-NOE-Differenzspektroskopie}$ ermöglicht.

Die als Ausgangsmaterial für die Herstellung von F430M verwendeten F430-Isolate aus *Methanobacterium thermoautotrophicum* (Stamm Marburg) entsprachen nach Art der Isolierung (0° , pH 2, 2–3 Std.), Reinigung und Charakterisierung früher beschriebenen Material [5] [18]. Das auf ein Nickel-Äquivalent bezogene, ungefähre Molgewicht eines so gewonnenen Isolats betrug etwa 1500 [19]. Im UV./VIS.-Spektrum solcher Proben lag der Extinktionswert des Absorptionsmaximums bei 430 nm jeweils um $23\,000\text{ cm}^{-1}\cdot\text{l}$ per Äquivalent Nickel [3] [9] (vgl. Fig. 1), elementaranalytisch hatten weder Schwefel noch Phosphor nachgewiesen werden können [19], und in Totalhydrolysaten (6M HCl , $100^\circ/12\text{--}48$ Std.) waren $0,9 \pm 0,1$ Äquivalente Glutaminsäure und 3 Äquivalente Ammoniak, nebst wechselnden Mengen Asparaginsäure (ca. 0,8 Äquivalente) und Glycin (ca. 0,2 Äquivalente) nachweisbar gewesen [18] [19]. Bislang handelt es sich bei solchen Isolaten nicht um einheitliche Stoffe.

2. F430M, ein Methanolyseprodukt von F430. – Innerhalb eines Bereichs von relativ milden Methanolysebedingungen (ca. $0,1\text{M}$ *p*-Toluolsulfonsäure in wasserfreiem Methanol, $30\text{--}60^\circ$, 3–24 Std., unter N_2) bildet sich aus F430-Isolaten ein dünn-schichtchromatographisch leicht erkennbares Methanolyseprodukt, das im Unterschied zum Ausgangsmaterial in organischen Lösungsmitteln wie Methylenchlorid, Chloroform und Tetrahydrofuran (aber auch in Wasser) löslich ist. In Methylenchlorid gelöst ist es gegen Luft stabil. Unter optimierten Bedingungen erhielt man nach mehrfacher chromatographischer Reinigung an NaClO_4 -imprägnierten Kieselgelplatten in 70–80% Ausbeute ein DC.- sowie $^1\text{H-}$ und $^{13}\text{C-NMR-}$ spektroskopisch einheitliches Methanolyseprodukt (F430M) als amorphes, gelbes Festkörper, der trotz wiederholter Versuche mit den verschiedensten Lösungsmitteln nicht zu kristallisieren war. Produkt (F430M) und Ausgangsmaterial (F430) zeigen in Wasser, Methanol und Äthanol ein beinahe völlig gleiches UV./VIS.-Spektrum (vgl. Fig. 1), ebenso in starker Säure (z. B. 2N wässriger H_2SO_4), wo die langwellige Absorptionsbande von 430 nach 380 nm verschoben ist. Auch die CD.-Spektren in Wasser (vgl. Fig. 2) sind genügend ähnlich, um von der Annahme ausgehen zu können, dass der Chromophor von F430 unter den verwendeten Methanolysebedingungen nicht verändert wird.

Im IR.-Spektrum von F430M in CHCl_3 (vgl. Fig. 3) erkennt man eine intensive (und komplexe) Carbonylbande bei 1730 cm^{-1} nebst einer viel schwächeren Bande bei 1675 cm^{-1} , ferner NH- und/oder OH-Banden im Bereich von $3200\text{--}3700\text{ cm}^{-1}$, sowie eine für das Perchlorat-Anion typische, intensive Bande bei 1090 cm^{-1} . Dass die Verbindung ein Perchlorat ist (vgl. auch chromatographische Isolierung), bestätigt das Verhalten von F430M bei der Elektrophorese, wo in Wasser bei pH-Werten von sowohl ca. 4, als auch ca. 10 der gelbe Chromophor kationisch wandert.

Das FAB-Kation-Massenspektrum³⁾ von F430M zeigt eine dominierende Pik-

³⁾ Wir danken Dr. Dudley Williams, Chemical Laboratory, University of Cambridge, für Aufnahme und Beurteilung des FAB-Massenspektrums von F430M. Über die in Cambridge verwendete Methodik vgl. [20].

gruppe mit Massenzahlen von 973–980 mit intensivstem Signal bei m/z 975⁴), das FD.-Massenspektrum⁵) eine Pikgruppe von m/z 975–980 mit ebenfalls intensivstem Signal bei m/z 975. Die Intensitätsverteilung in den beiden Pikgruppen, insbesondere jene des FD.-Massenspektrums (vgl. *Exper. Teil*) reflektiert die Isotopenverteilung

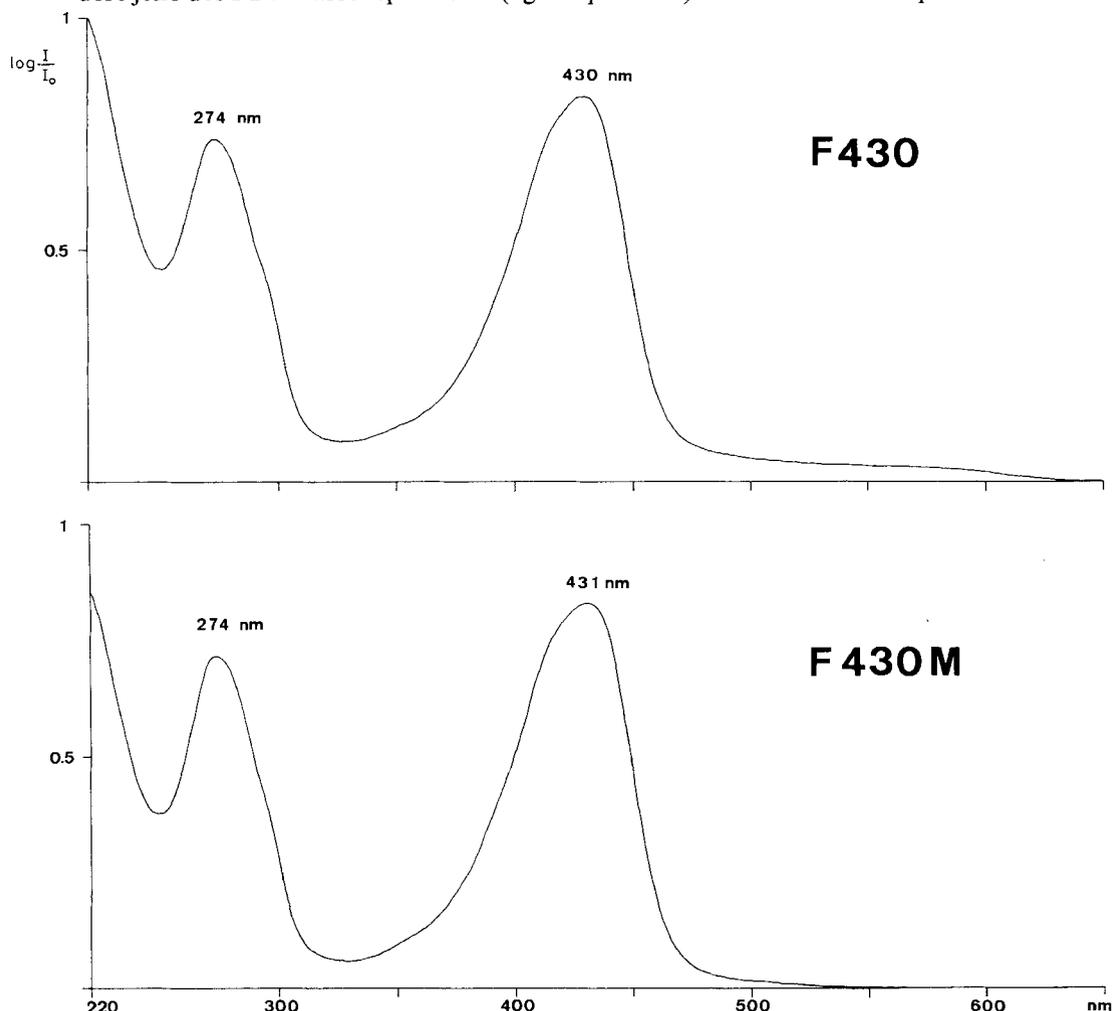


Fig. 1. a) UV./VIS.-Spektrum des F430-Isolats in Wasser ($c=0,0412$ mg/ml); b) UV./VIS.-Spektrum des Methanolyseprodukts F430M in Wasser ($c=3,59 \cdot 10^{-5}$ M)

4) Als Vergleichstest für die Eignung der neuen MS.-Methodik in der Reihe kationischer Nickel(II)-Corrin-Komplexe wurde in Cambridge auch das FAB-Kation-MS. von Nickel(II)-19-Acetyl-1,2,2,7,7,12,12,17,17-nonamethyl-corrinat-perchlorat [21] aufgenommen. Das Spektrum zeigt eine dominierende (M^+)-Pikgruppe mit Basispek bei m/z 531 (Ber. 531/⁵⁸Ni) und korrektem Isotopenmuster (vgl. *Exper. Teil*).

5) Für die Aufnahme und Beurteilung des FD./Massenspektrums von F430M danken wir Dr. H. P. Kriemler, Ciba-Geigy AG, Basel.

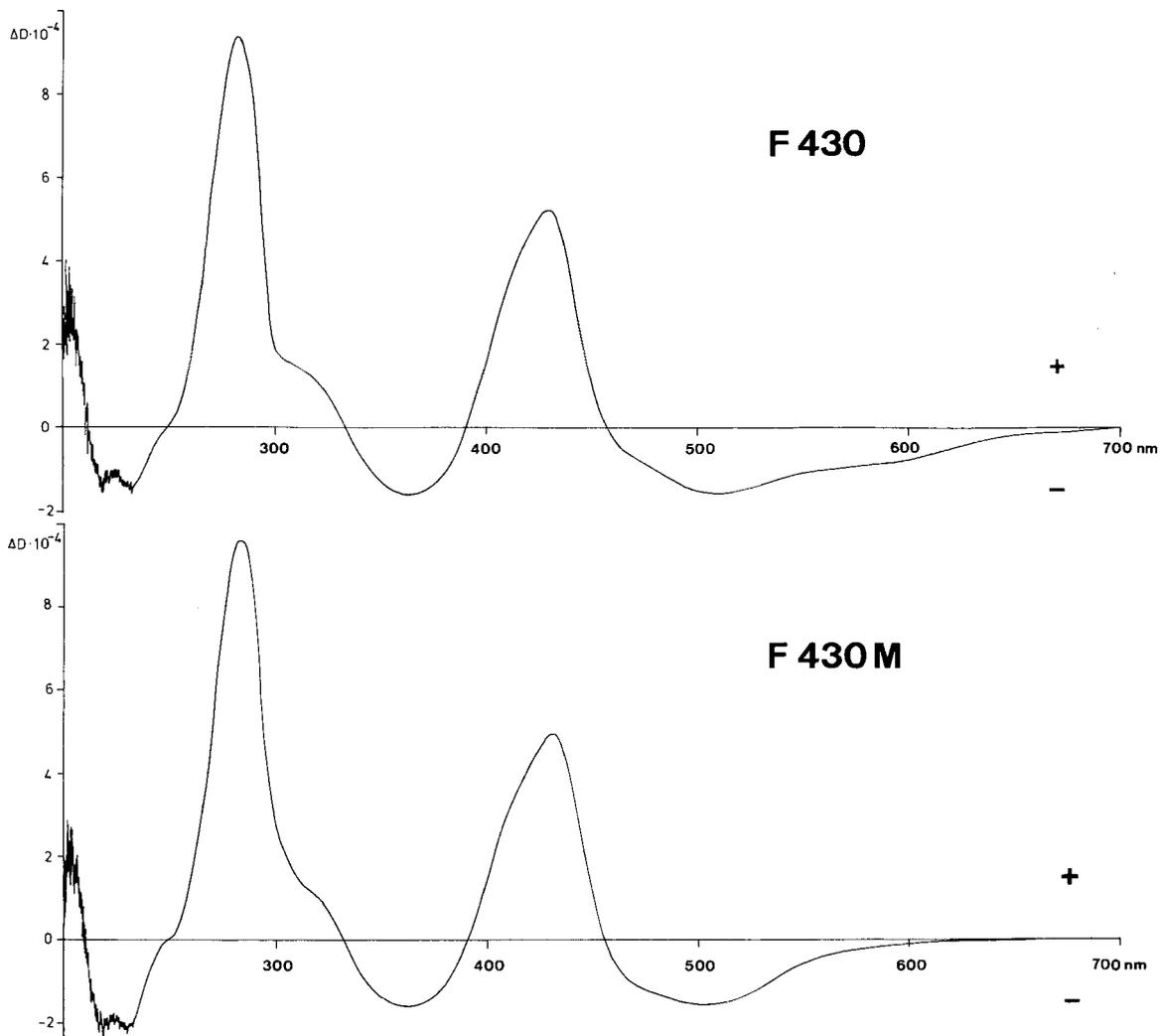


Fig. 2. a) CD-Spektrum des F430-Isolats in Wasser ($c=0,0412$ mg/ml); b) CD-Spektrum des Methanolyseprodukts F430M in Wasser ($c=3,59 \cdot 10^{-5}$ M)

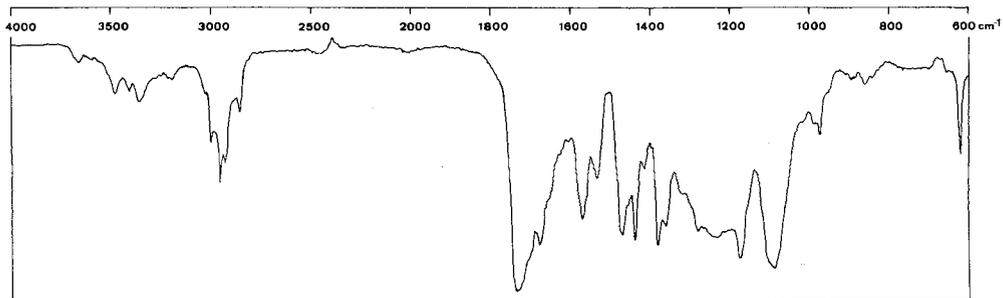


Fig. 3. IR-Spektrum von F430M in CHCl_3 (ca. 4%)

lung des Nickel-Ions. Dieses Isotopenmuster, die Elementarzusammensetzung (vgl. unten), das elektrophoretische Verhalten und die Perchloratbande im IR.-Spektrum stehen dafür, dass F430M *das Perchlorat eines positiv geladenen und – wie die NMR.-Spektren zeigen – diamagnetischen Nickel(II)-Komplex-Ions* ist.

3. ^{13}C -NMR.-spektroskopische Konstitutionsanalyse von F430M. – Das breitband- ^1H -entkoppelte ^{13}C -NMR.-Spektrum von F430M (vgl. Fig. 4) in CD_2Cl_2 enthält 43 Signale, die aufgrund der Integration im «inverse gated» Spektrum⁶⁾ 47 C-Atomen entsprechen. Davon gehören gemäss der im «off-resonance»-entkoppelten Spektrum beobachteten Multiplizitäten der ^{13}C -Signale 7 C-Atome zu Methylgruppen, 14 zu Methylengruppen, 9 zu Methingruppen, und 17 C-Atome sind quaternär. Somit sind insgesamt 58 H-Atome aus dem ^{13}C -NMR.-Spektrum indirekt zu erkennen. Durch Integration direkt erfassbar sind im ^1H -NMR.-Spektrum von F430M in CD_2Cl_2 insgesamt $61 \pm \text{ca. } 2$ H-Atome, wovon deren drei (aufgrund der Konzentrationsabhängigkeit der chemischen Verschiebung von drei Signalen zu je 1 H) an Heteroatome gebunden sind. Unterstellt man die Anwesenheit von vier porphinoïden Skelett-N-Atomen und zieht man die im ^1H -NMR.-Spektrum klar erkennbaren 5 Methoxycarbonylgruppen (10 Ester-O-Atome) in Rechnung, so erfordert das von den beiden Massenspektren nahegelegte Ionengewicht von 975 noch zusätzlich insgesamt drei O- und zwei N-Atome, *was einer Elementarzusammensetzung $\text{C}_{47}\text{H}_{61}\text{N}_6\text{NiO}_{13} \cdot \text{ClO}_4$ für F430M entspricht*. Die für diese Bruttoformel aufgrund des bisher Gesagten noch bestehenden Unsicherheiten (Fehlergrenze der ^1H -Integration, $[M \pm H]$ -Basispitze in den Massenspektren) werden durch die unten ausführlich dargelegten Detailanalysen der ^1H - und ^{13}C -NMR.-Spektren behoben.

Figur 4a zeigt das breitband- ^1H -entkoppelte Gesamt- ^{13}C -NMR.-Spektrum von F430M mit natürlicher Isotopenhäufigkeit in CD_2Cl_2 und ihm gegenübergestellt die breitband-entkoppelten Partial- ^{13}C -NMR.-Spektren 4b–4f von F430M-Proben, die aus den biosynthetischen Einbauexperimenten stammen, in welchen die fünf spezifisch ^{13}C -monomarkierten Verbindungen L-(Methyl- ^{13}C)methionin, (2- ^{13}C)-, (3- ^{13}C)-, (4- ^{13}C)- und (5- ^{13}C)- δ -Aminolävulinsäure unter früher beschriebenen Bedingungen [11] [12] in *Methanobacterium thermoautotrophicum* (Stamm Marburg) eingebaut wurden. Die ^{13}C -Anreicherung in den fünf zur spektroskopischen Untersuchung gelangten F430M-Proben liegt im Bereich von ca. 30 bis ca. 60%.

Partialspektrum 4b bestätigt das aus früheren Einbauversuchen mit L-(Methyl- ^{14}C)methionin und L-(Methyl- ^3H)methionin in *M. thermoautotrophicum* gewonnene Ergebnis, dass im F430 zwei aus Methionin stammende Methylgruppen vorkommen. Der früher aus Einbauversuchen mit (2,3- ^{14}C)Bernsteinsäure [10] und (4- ^{14}C)ALA⁷⁾ [11] abgeleitete Einbau von insgesamt 8 ALA-Einheiten in F430 findet sich in den Partialspektren 4c–4f ebenfalls bestätigt, wobei hier zugleich auch klar wird, dass während des Einbaus keines der fünf ALA-C-Atome verlorenght

6) Die durch NOE und unterschiedliche Relaxationszeiten bedingte Verfälschung der Signalintensitäten wird durch Einführung eines «pulse delays» (ca. $5 \times T_1$) mit ausgeschaltetem Entkoppler vermieden [22].

7) ALA = δ -Amino-lävulinsäure.

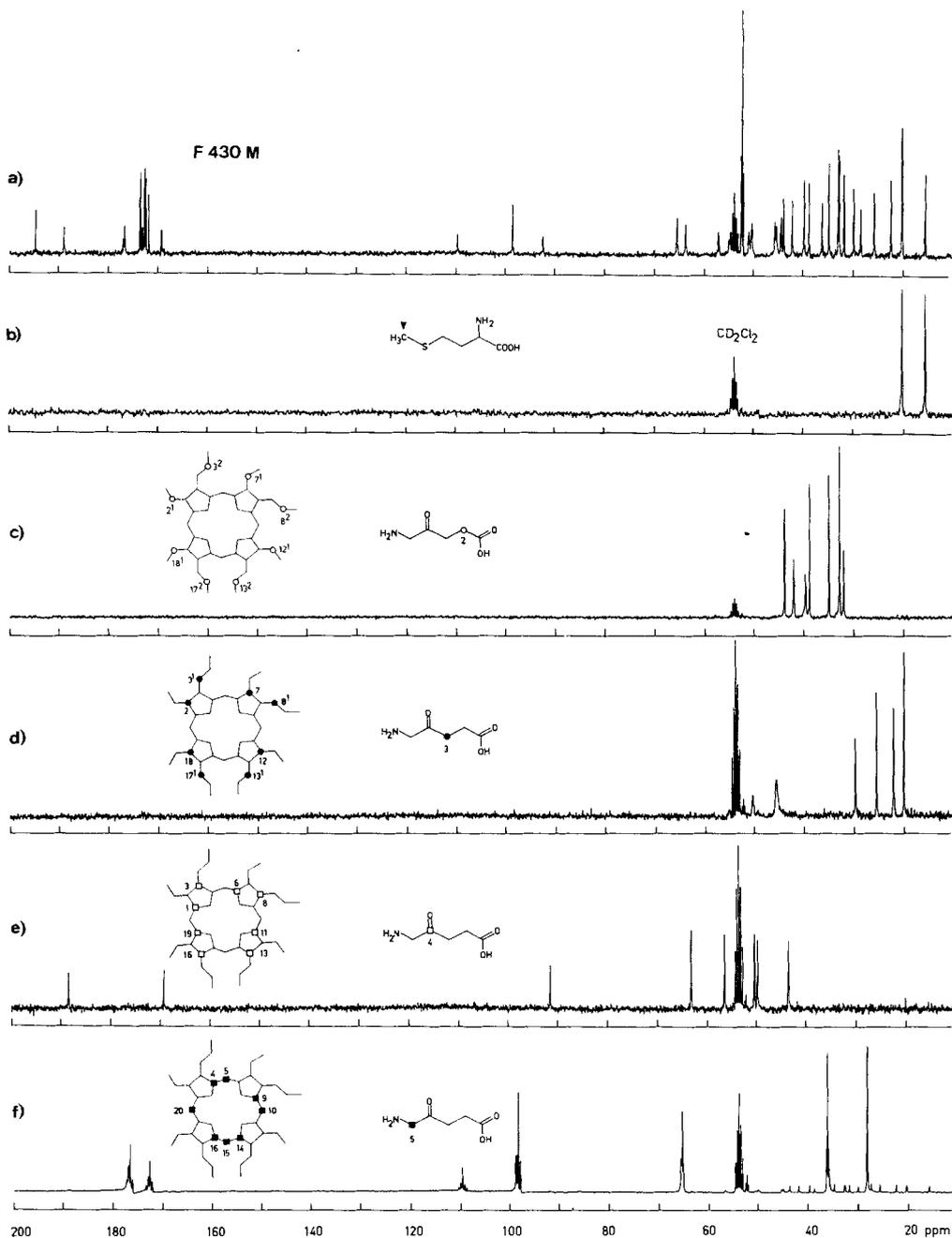


Fig. 4. a) ^1H -breitbandentkoppeltes ^{13}C -NMR.-Spektrum (75 MHz) von F430M mit natürlicher ^{13}C -Häufigkeit (in CD_2Cl_2 , $c=0,15\text{M}$, Pulswinkel = 45° , relaxation delay 0,3 Sek., spektrale Breite 18000 Hz in 16K, Linienverbreiterung 0,5 Hz, 26000 scans); b–f) ^1H -breitbandentkoppelte ^{13}C -NMR.-Spektra (75 MHz) von biosynthetisch durch Einbau von spezifisch mono- ^{13}C -markiertem Vorläufer erhaltenen F430M-Proben (Vorläufer vgl. Formeln in der Figur) ($c=0,02\text{M}$, Aufnahmebedingungen wie a), 5000–80000 scans). Zahlenwerte sämtlicher ^{13}C -Spektra: vgl. Tabelle.

Tabelle. ^{13}C -NMR.-Daten von F430M in CD_2Cl_2 (vgl. Formelbild 1A)

A) F430M mit natürlicher Isotopenhäufigkeit (Fig. 4a)							
Signal ^{a)}	Zuordnung ^{b)}	Herkunft ^{b)}	Signal	Zuordnung	Herkunft		
194,6 s	17 ³	△	50,8 d	13 ^{d)}	□		
188,9 s	1	□	50,3 d	17	□		
176,9 s	16 (14)	■	50,2 s	7	●		
176,7 s	9	■	45,5 d	12	●		
173,6 s			45,2 d	18	●		
173,5 s	-COO-	△	44,3 d	3	□		
173,4 s			-CON<	43,8 t	7 ¹	○	
173,1 s	14 (16)	■	42,1 t	2 ¹	○		
172,6 s (2C) ^{c)}			39,7 t	12 ¹	○		
172,3 s			38,7 t	17 ¹	○		
171,7 s			36,1 t	5	■		
169,2 s			11	□	34,7 t	18 ¹	○
109,6 s			15	■	32,8 t	3 ²	○
98,4 d	10	■	32,6 t	8 ²	○		
92,3 s	6	□	31,7 t	13 ²	○		
65,5 d	4	■	29,8 t	13 ¹	●		
63,7 d	19	□	28,4 t	20	■		
57,0 d	8	□	25,7 t	8 ¹	●		
54,8 s	2	●	22,4 t	3 ¹	●		
52,5 qa	OCH ₃	□	20,2 t	17 ¹	●		
52,3 qa (3C) ^{c)}			20,2 qa	H ₃ C-2 ¹ e)			
52,0 qa			15,6 qa	H ₃ C-7 ¹			

B) F430M ex L-(Methyl- ^{13}C)-Methionin (Fig. 4b): 20,2 (qa), 15,6 (qa)^{f)}

C) F430M ex (2- ^{13}C)ALA (O) (Fig. 4c): 43,8 (t), 41,6 (t), 39,1 (t), 38,6 (t), 34,8 (t), 32,7 (t, 2C), 32,0 (t)

D) F430M ex (3- ^{13}C)ALA (●) (Fig. 4d): 55,1 (s), 50,4 (s), 45,5 (d, 2C), 29,8 (t), 25,6 (t), 22,2 (t), 20,1 (t)

E) F430M ex (4- ^{13}C)ALA (□) (Fig. 4e): 188,7 (s), 169,5 (s), 91,6 (s), 63,5 (d), 56,7 (d), 50,7 (d), 50,0 (d), 43,8 (d)

F) F430M ex (5- ^{13}C)ALA (■) (Fig. 4f)g): 176,9, 176,5, 172,5, 109,6, 98,3, 65,5, 36,0, 28,2

a) δ -Werte in ppm bezogen auf δ (CD_2Cl_2) = 53,84 ppm; Multiplizität (s, d, t, qa) aus dem «off-resonance»-Spektrum.

b) Numerierung der C-Atome und Symbole: Vgl. Schema 1 und Formelbilder in Fig. 4.

c) Durch Integration im «inverse gated» Spektrum⁶⁾ bestimmt.

d) Durch selektive $\{^1\text{H}\}$ - ^{13}C -Entkopplung zugeordnet.

e) Durch selektive $\{^1\text{H}\}$ - ^{13}C -Entkopplung im Spektrum von F430M ex L-(Methyl- ^{13}C)methionin zugeordnet¹⁾.

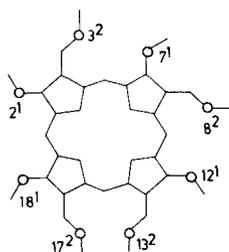
f) Selektive $\{^1\text{H}\}$ - ^{13}C -Entkopplung: {1,11 ppm} → 20,2 ppm; {1,20 ppm} → 15,6 ppm.

g) Multiplizität im «off-resonance»-Spektrum vgl. Daten unter A; Signalform und (^{13}C - ^{13}C)-Kopplungskonstanten vgl. Fig. 5.

(bezüglich C(1) vgl. unten), und keine merkliche konstitutionelle Vermischung der ^{13}C -Markierung vor dem Einbau stattfindet.

Unterstellt man, dass die Biosynthese von F430 aus ALA dem bisher bei allen natürlichen Porphinoiden als gültig befundenen Biosyntheseweg [16] über Porphobilinogen und Uroporphyrinogen (Typ III) folgt, so lässt sich aus der Summe der in den Figuren 4a–4f illustrierten ^{13}C -spektroskopischen Information der Konstitutionstyp von F430M herleiten. Von der Peripherie zum Zentrum des Ligandensystems vorrückend, läuft die Argumentation wie folgt:

Struktur A

ex-(2-¹³C)ALA (vgl. ¹³C-NMR.-Spektrum 4c)

Die sieben Signale des ¹³C-Partialspektrums der ex-(2-¹³C-ALA)Probe (vgl. Struktur A und Spektrum 4c) stehen nach Multiplizität und chemischer Verschiebung für acht gesättigte Methylen-C-Atome (Signal bei 32,7 ppm integriert für 2 C-Atome und entspricht im Gesamtspektrum 4a den zwei aufgelösten CH₂-Signalen bei 32,6 und 32,8 ppm⁸⁾). Acht aus dem C(2) von ALA stammende, gesättigte CH₂-Gruppen in F430M implizieren, dass auch sämtliche acht C(1)-Atome von ALA in F430M vorhanden sind. Die zugehörigen acht ¹³C-Signale sind im Gesamtspektrum 4a leicht lokalisierbar (vgl. auch unten): Alle sind Singulette mit chemischen Verschiebungen in einem Bereich (171,7 bis 194,6 ppm), der für Signale der sp²-C-Atome von carbonylischen Gruppen charakteristisch ist⁹⁾. Von diesen acht potentiellen Carboxylfunktionen ex-C(1) von ALA liegen deren fünf in F430M als Methoxycarbonylgruppen vor, wie die Signale von insgesamt fünf CH₃O-C-Atomen im Bereiche 52,0 bis 52,5 ppm¹⁰⁾ im ¹³C-Gesamtspektrum anzeigen; diese Signale sind nebst den (ex-C(1))-C-Signalen die einzigen, die nur im Gesamtspektrum und in keinem der fünf ¹³C-Partialspektren auftreten. Die Bruttoformel weist zweien der drei verbleibenden Carboxylfunktionen die Form einer Amid- bzw. Lactamgruppe (mit insgesamt 3 NH) zu¹¹⁾, für das letzte der acht (potentiellen) Carboxyl-C-Atome steht jedoch nebst dem Carbonyl-O-Atom kein weiteres Heteroatom als Bindungspartner mehr zur Verfügung (weiteres darüber vgl. unten).

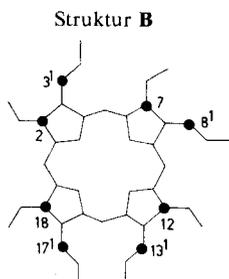
Zum Nachweis der uroporphinoiden Seitenketten fehlen noch die Signale der vier C(β)-Atome der Propionsäurereste; diese Signale finden sich im Partialspektrum 4d der ex-(3-¹³C-ALA)Probe (vgl. Struktur B) als vier CH₂-Signale im Bereiche von 20,1 bis 29,8 ppm. F430M weist die vollständige Serie der uroporphinoiden Propionsäure- und Essigsäure-Ketten (-CH₂CH₂CO-) und (-CH₂CO-) auf.

⁸⁾ Die vor allem in den Partialspektren 4c und 4d beobachteten, gegenüber dem Gesamtspektrum 4a leicht unterschiedlichen Signallagen und Signalbreiten dürften auf die um einen Faktor von 10-30 geringere Messkonzentration bei den Partialspektren zurückzuführen sein.

⁹⁾ Das Signal bei 172,6 ppm fällt gemäss Integration⁶⁾ mit dem (sp²-C)-Signal eines ex-(5-¹³C)ALA-C-Atoms zusammen.

¹⁰⁾ Drei Signale, das mittlere unter ihnen nach Integration⁶⁾ drei (CH₃O)-C-Atomen entsprechend.

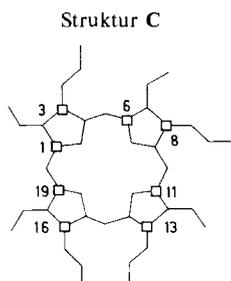
¹¹⁾ Die an sich denkbare Variante Amidgruppe/Lactongruppe entfällt aufgrund der chemischen Verschiebung des ¹³C-Signals von C(6) und der ¹H-NMR.-NOE-differenzspektroskopischen Beobachtungen (vgl. unten).



ex-(3-¹³C)ALA (vgl. ¹³C-NMR.-Spektrum 4d)

Die zweite Vierergruppe der Signale des *Partialspektrums* 4d entspricht den Makroring-C-Atomen C(2), C(7), C(12) und C(18) (vgl. *Struktur B*) *ex*-(3-¹³C)ALA; ihre chemische Verschiebung und «off-resonance» Multiplizität informieren über den Oxydationszustand der Ligandperipherie im Bereiche der Fünfringe. *Spektrum* 4d zeigt nebst der bereits erwähnten Vierergruppe von gesättigten CH₂-Signalen zwei bei 45,5 ppm zusammenfallende Signale von Methin-sp³-C-Atomen (im Gesamtspektrum aufgelöst bei 45,2 und 45,5 ppm⁸) sowie zwei Singulette bei 50,4 und 55,1 ppm, die zwei gesättigten und vierfach substituierten C-Atomen zugehören. Die unten dargelegte ¹H-NMR.-NOE-Differenzspektroskopie von F430M wird zeigen, dass es die im Ring A und B liegenden C-Atome C(2) und C(7) sind, welche kein H-Atom tragen, und dass an diesen beiden C-Atomen (wie beim Sirohydrochlorin) die aus Methionin stammenden Methylgruppen sitzen.

Die verbleibenden vier Ligandperipherie-C-Atome C(3), C(8), C(13) und C(17) werden durch den (4-¹³C)ALA-Einbau erfasst (vgl. *Struktur C*): alle vier sind gesättigte Methin-C-Atome, deren Signale in der insgesamt fünf Signale umfassenden Signalgruppe zwischen 43,8 bis 63,5 ppm liegen. *Die Fünfring-Peripherie des porphyrinoiden Ligandsystems von F430M besteht somit durchgehend aus tetraedrisch substituierten C-Atomen.*

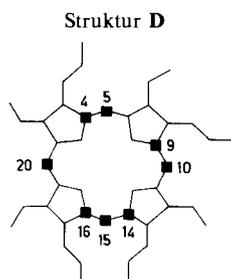


ex-(4-¹³C)ALA (vgl. ¹³C-NMR.-Spektrum 4e)

Das *Partialspektrum* 4e (vgl. *Struktur C*) weist zusätzlich zur bereits erwähnten Gruppe von Hochfeld-CH-Signalen zwei Tieffeld-Singulette bei 169,5 und 188,7 ppm, sowie ein Mittelfeld-Singulett bei 91,6 ppm auf. Die chemischen Verschiebungen der beiden erstgenannten Signale liegen bei zu extremen Tieffeldwerten, um

sp^2 -C-Atomen ohne zusätzliche Heteroatom-Substitution zu entsprechen. Sie gehören deshalb zu jener Vierergruppe von C-Atomen, die gleichzeitig noch ein Ligand-N-Atom tragen (C(1), C(6), C(11) und C(19)). Dieser inneren Gruppe von N-tragenden C-Atomen ebenfalls zuzuordnen sind das Mittelfeld-Singulett bei 91,6 ppm, sowie das in der Hochfeldgruppe liegende CH-Signal bei 63,5 ppm. Das Mittelfeldsignal liegt nach allen zur Verfügung stehenden Modelldaten bei zu hohem Feld, um von einem sp^2 -hybridisierten *ex*-C(4)-C-Atom zu stammen. Die weitere Analyse (vgl. unten) wird diesem Mittelfeldsignal ein tetraedrisches C-Atom mit zweifacher N-Substitution zuordnen. Hier halten wir fest, dass von der Gruppe der vier *ex*-C(4)- «Chromophor-C-Atome» C(1), C(6), C(11) und C(19) nur deren zwei sp^2 -C-Atome sind.

Keines der acht Signale des *Partialspektrums 4e* zeigt Anzeichen einer $^{13}C,^{13}C$ -Kopplung, die auf direkte Nachbarschaft von zwei markierten C-Atomen hinweisen würde. Damit entfällt für F430M die Möglichkeit einer Direktverknüpfung der Ringe A und D, wie sie im Ligandensystem der natürlichen Corrinoide vorkommt. Dies geht mit dem ^{13}C -NMR.-spektroskopischen Befund einher, dass sämtliche C-Atome des Uroporphorinogen-Skeletts in F430M anwesend sind.



ex-(^{13}C)ALA (vgl. ^{13}C -NMR.-Spektrum 4f)

Der mit dem *Partialspektrum 4e* gewonnene Teileinblick in den zentralen Chromophorbereich wird durch die Information aus dem Einbau von (^{13}C)ALA entscheidend erweitert (vgl. *Struktur D*). Vorab enthält das *Partialspektrum 4f* insgesamt acht Signale; zwei davon, nämlich jene bei 176,9 und 176,7 ppm im Gesamtspektrum, sind im Partialspektrum überlagert. Im besonderen treten nun hier die aus den *Battersby'schen* Arbeiten [16a] bekannten, für Typ-III-Uroporphinoide aus (^{13}C)ALA charakteristischen $^{13}C,^{13}C$ -Kopplungsmuster benachbart liegender, markierter C-Atome auf. Diese Kopplungen sind aus dem in *Figur 5* gespreizt wiedergegebenen ^{13}C -NMR.-Partialspektrum ersichtlich. Dieses *breitband-¹H-entkoppelte* Partialspektrum zeigt ein ^{13}C -ungekoppeltes Singulett bei 28,2 ppm, ferner die $^{13}C,^{13}C$ -gekoppelten Signale eines Paares benachbarter ^{13}C -Atome als Dublette¹²⁾

¹²⁾ Die Signale in *Fig. 5* haben durch den Umstand, dass der Markierungsgrad der Probe nur ca. 50% beträgt, ein komplexeres Erscheinungsbild. Ein mit einem benachbarten ^{13}C -Kern gekoppeltes C-Atom erscheint als Überlagerung eines Singulett und Dubletts, was ein scheinbares Triplet ergibt (Linienintensität ca. 1:2:1). Das verbreiterte scheinbare Quintuplett um 109,6 ppm setzt sich aus einem Singulett, zwei Dubletts und einem Dublett × Dublett zusammen und ist dem mit zwei Nachbarn gekoppelten C-Atom zuzuordnen.

bei 36,0 und 65,5 ppm ($J=36$ Hz), ein weiteres Dublettenpaar¹²⁾ bei 98,3 und 176,5 ppm ($J=64$ Hz) und schliesslich die drei Signalgruppen von drei benachbarten ¹³C-Atomen, nämlich ein dublettiertes Dublett¹²⁾ bei 109,6 ppm ($J=59$ und 70 Hz), sowie zwei Dublette¹²⁾ bei 172,5 ($J=59$ Hz) bzw. 176,9 ($J=70$ Hz) ppm. Das Kopplungsmuster schliesst die Uroporphinoid-Gerüste Typ I und II aus¹³⁾, allerdings nicht Typ IV; dieser ist jedoch (von seiner geringen biosynthetischen Plausibilität ganz abgesehen) mit zahlreichen Befunden der ¹H-NMR.-NOE-Differenzspektroskopie von F430M (vgl. unten) nicht vereinbar.

Das ungekoppelte ¹³C-Signal bei 28,2 ppm (Fig. 5) gehört im Uroporphinoid (Typ III)-Gerüst dem C-Atom C(20), nach chemischer Verschiebung und (Triplett)-Multiplizität des Signals im «off-resonance» Spektrum ist C(20) in F430M ein CH₂-

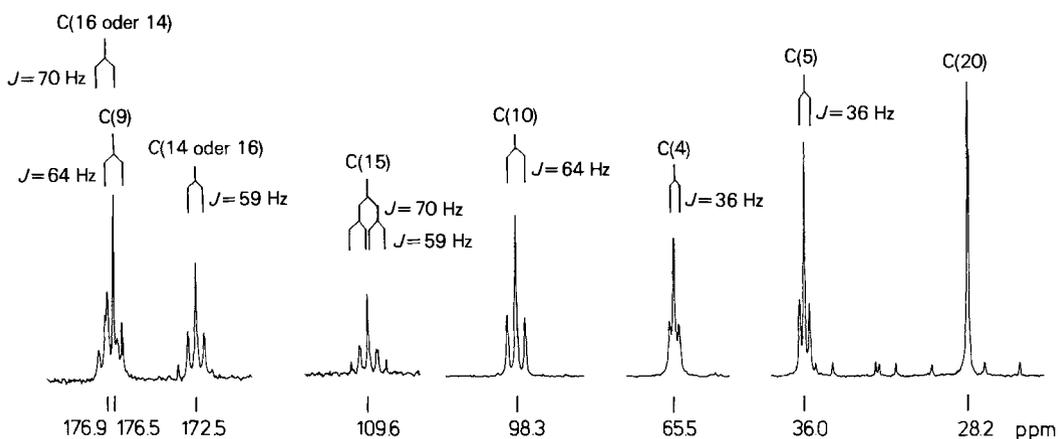
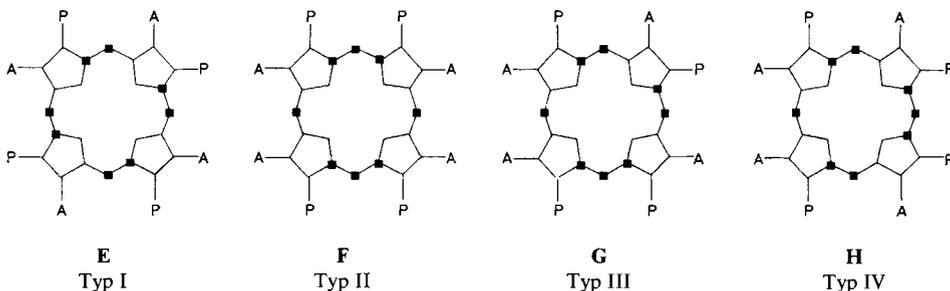


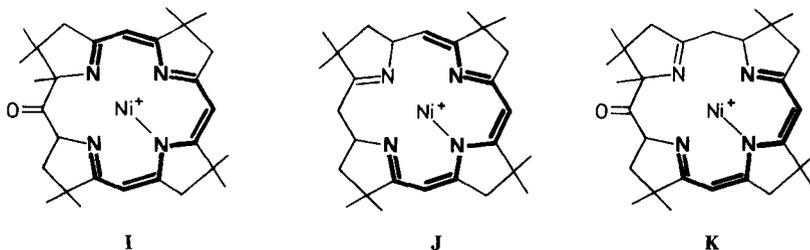
Fig. 5. ¹H-breitbandenkoppeltes ¹³C-NMR.-Spektrum von F430M ex-(5-¹³C)ALA in CD₂Cl₂ (Spektrum 4f gespreizt, 80 000 scans)

¹³⁾ Die Strukturen E-H illustrieren die für Uroporphinoid-Skelette der Fischer'schen Typen 1-IV [23] bei einer Biosynthese aus spezifisch monomarkiertem (5-¹³C)ALA zu erwartenden Verteilungen der ¹³C-Markierung.



meso-sp³-C-Atom. Dieses Signal ist das erste unter sämtlichen bisher besprochenen ¹³C-Signalen, bei welchem eine *Absolutzuordnung* zu einem ganz bestimmten C-Atom im Ligandskelett möglich ist (vgl. *Struktur D*). Den zweiten Fall dieser Art stellt das Signal des *meso*-C-Atoms C(15) bei 109,6 ppm dar, dessen ¹³C,¹³C-Kopplungsbild (*Fig. 5*) als Folge der Stellung von C(15) zwischen zwei markierten Nachbarn einzigartig ist. Sowohl C(15), wie auch die beiden markierten Nachbarn C(14) und C(16) sind sp²-C-Atome (chemische Verschiebung). Eines der beiden gekoppelten Signalpaare steht ebenfalls für zwei benachbarte sp²-C-Atome; davon entspricht das Signal bei höherem Feld (98,3 ppm) einem der beiden *meso*-C-Atome C(10) oder C(5), und das Tieffeld-Signal (176,5 ppm) einem der N-tragenden C-Atome C(9) oder C(4). Das verbleibende der beiden ¹³C,¹³C-kopplenden Signalpaare steht nach chemischer Verschiebung, ¹³C,¹³C-Kopplungskonstante und Multiplizität im «off-resonance»-Gesamtspektrum (Triplett bei 36,1 ppm, Dublett bei 65,5 ppm) für ein sp³-C-Atom-Paar NCH-CH₂; es handelt sich entweder um das Paar C(4), C(5), oder dann C(9), C(10). *Die Entscheidung hierüber bringt das UV./VIS.-Spektrum von F430M*, welches unter Zuhilfenahme der in der vorstehenden Arbeit beschriebenen, am Modellsystem gewonnenen Kenntnisse [15]¹⁴) eine Aussage über die Ausdehnung des Chromophorbezirks machen lässt. *Danach hat sich der Chromophor von F430M über drei (und nicht vier) Ligand-N-Zentren zu erstrecken*, wobei das Doppelbindungssystem auf Atome des zentralen Makrorings beschränkt sein muss (alle C-Atome der Fünfring-Peripherie sind gesättigt, vgl. oben). Da nun der Bereich der drei C-Atome mit dem (absolut zugeordneten) *meso*-C-Atom C(15) ungesättigt ist und das (ebenfalls absolut zugeordnete) *meso*-C-Atom C(20) gesättigt, muss das Signal des zweiten ungesättigten *meso*-C-Atoms (98,3 ppm) der Stellung C(10) zwischen den Ringen B und C gehören, und das vom *Partialspektrum 4f* geforderte Paar von *gesättigten* (NCH-CH₂)-C-Atomen muss das Paar C(4), C(5) sein. Indem das UV./VIS.-Spektrum keine Unterbrechung des Doppelbindungssystems zwischen C(9) und C(16) zulässt, muss auch C(11) im Chromophorbereich liegen; damit ist eines der beiden bisher nicht erklärten Tieffeldsignale des *Partialspektrums 4e* zugeordnet. Für das zweite Tieffeldsignal jenes Spektrums kämen nun an sich noch C(1), C(6) und C(19) (vgl. *Struktur C*) in Frage; die beiden letztgenannten Möglichkeiten entfallen jedoch aus chemischen Gründen (vgl. unten). Damit gehört das zweite Tieffeldsignal des *Partialspektrums 4e* dem C-Atom C(1), und Ring A trägt eine von

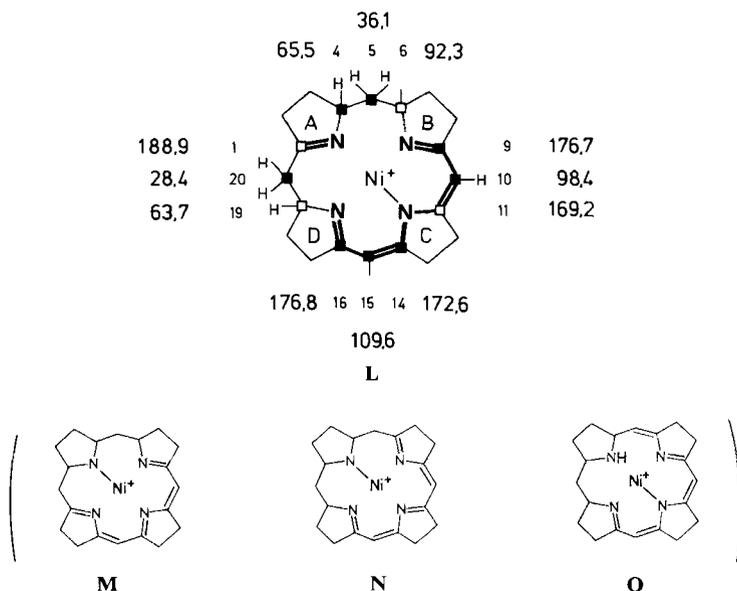
¹⁴) Die Strukturen **I**, **J** und **K** zeigen die hier als UV./VIS.-Modellsysteme massgebenden Chromophortypen. Über deren UV./VIS.-Spektren vgl. [15].



C(1) ausgehende, isolierte (C=N)-Doppelbindung¹⁵). Somit gibt es in F430M fünf Chromophordoppelbindungen, und diese sind im zentralen Makroring im Sinne der Struktur L angeordnet. Darüber hinaus kommen – von den acht endständigen Acylfunktionen abgesehen – keine weiteren Mehrfachbindungen vor (vgl. Schema 2).

Der «aus chemischen Gründen» vorgenommene Ausschluss der zu L alternativen Chromophortypen M und N beruht auf der corrinchemischen Erfahrung [25], dass derartige nicht-vinamidinische¹⁶), linearkonjugierte Polyketimin-Doppelbindungssysteme (zweifellos als Folge hoher Elektrophilie) ausser in stark saurem Milieu nicht stabil sind, sondern als enaminiische Tautomere existieren (vgl. z. B. [27]). So müsste ein Chromophor des Typs N z. B. als das enaminiische Tautomer O vorliegen, weil mit dessen Bildung aus N eine zweifellos hohe konjugative Stabilisierung einhergehen würde (corrinische Chromophorkonjugation!). Oben erwähnte ¹³C-spektroskopische Daten verbieten Doppelbindungen an C(5) und C(20) (ebenso an sämtlichen C-Atomen der Fünfring-Peripherie), womit alle Enaminisierungsmöglichkeiten für M und N, und damit auch diese formal möglichen Chromophorvarianten entfallen.

Schema 2. Konstitution des F430M-Chromophors mit Zuordnung der ¹³C-Signale (δ -Werte in ppm entsprechen jenen des Gesamtspektrums 4a; δ -Werte für C(16) und C(14) sind eventuell zu vertauschen)



¹⁵) Von den beiden Tieffeldsignalen des Partialspektrums 4e muss das Singulett bei 188,7 ppm dem C-Atom C(1) gehören, es liegt deutlich tiefer als die Signale entsprechender C-Atome innerhalb des Chromophorbereichs. Diese Tieffeldlage ist für *isolierte* (komplexierte) (C=N)-Doppelbindungen charakteristisch, wie mehrere Modell-Nickel(II)-Komplexe [15], sowie Cobalt(III)-Corrin-Komplexe mit unterbrochenem Chromophor [24] zeigen.

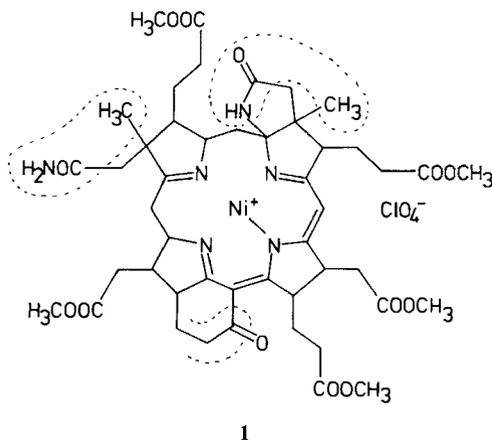
¹⁶) «Vinamidin» = 3-Imino-1-propenylamin, Strukturelement eines «vinylogenen Amidins»; vgl. [26].

Die eingangs begründete (und durch die bisherige ^{13}C -NMR.-Analyse gestützte) Bruttoformel für F430M verlangt eine Doppelbindungs/Ringzahl-Summe von 20. Nebst den 13 Doppelbindungen $\text{C}=\text{C}$ und $\text{C}=\text{O}$ müssten demnach insgesamt sieben Ringe vorkommen, d. h. die Komplettierung der partiellen Struktur L zur vollen Struktur von F430M erfordert zwei zusätzliche Ringe. Diese Forderung trifft sich mit der ^{13}C -NMR.-spektroskopisch erkennbaren Existenz von zwei bisher unbesetzten Substitutionsstellen am zentralen Makroring: Das absolut zugeordnete 109,6 ppm-Signal des Meso-C-Atoms C(15) (*Partialspektrum 4f*) ist im Gegensatz zum Signal des C(10)-Meso-C-Atoms (*d* bei 98,3 ppm) im «off-resonance» Gesamtspektrum ein Singulett, diese *meso*-Stellung trägt demnach einen zusätzlichen Substituenten. Dieser ist gemäss chemischer Verschiebung des C(15)-Signals nicht über ein Heteroatom mit C(15) verknüpft. Die zweite freie Substitutionsstelle zeigt das Mittelfeld-Singulett bei 91,6 ppm im *Partialspektrum 4e* an; hier handelt es sich entweder um C(6) oder C(19) am zentralen Makroring. Die chemische Verschiebung des Signals passt für einen zusätzlichen Heteroatoms substituenten.

Für die Herleitung des Konstitutionstyps der zwei Zusatzringe ist der früher erwähnte Befund wichtig, dass nur fünf der insgesamt acht endständigen sp^2 -C-Atome in den Seitenketten einer Methoxycarbonylgruppe angehören und den restlichen drei als Heteroatom-Bindungspartner insgesamt drei O- und zwei N-Atome (mit insgesamt 3 H) zur Verfügung stehen. Nach diesen Kriterien, sowie in Berücksichtigung von Art und konstitutioneller Umgebung der unbesetzten Zentralringpositionen ist der eine Zusatzring ein *Lactamring*¹⁷⁾ und der andere ein *Carbocyclus*, welcher einer intramolekularen Acylierung der Mesostellung C(15) durch einen der Propionsäurereste der Ringe C oder D entspricht. Für das zugehörige Carbonyl-C-Atom findet sich im ^{13}C -NMR.-Gesamtspektrum das erforderliche Signal bei 194,6 ppm, und zwar als ein deutlich von der Gruppe der Ester- bzw. Amid-Carbonylsignale nach tieferem Feld verschobenes Einzelsignal in einem Bereich der chemischen Verschiebung, der für Carbonyl-C-Atome α,β -ungesättigter Ketone charakteristisch ist. Dass die aus chemischen Beweggründen¹⁷⁾ aufgekommene Vermutung zutrifft, wonach der Lactam-Zusatzring an C(6) im Ring B (und nicht an C(19) im Ring D) liegen soll, hat erst die ^1H -NMR.-NOE-Differenzspektroskopie gezeigt (vgl. unten). Diese hat die noch unterzubringende, primäre Säureamidfunktion in die Essigsäureseitenkette des Ringes A verlegt und auch nachgewiesen, dass der carbocyclische Zusatzring zur *meso*-Stellung C(15) die Propionsäurekette des Ringes D betrifft.

Die Formel 1 zeigt das bis hierhin abgeleitete, vollständige Konstitutionsbild von F430M. Diese Konstitutionszuordnung entspringt grösstenteils der ^{13}C -NMR.-spektroskopischen Information, welche sich aus dem biosynthetischen Einbau der fünf spezifisch ^{13}C -markierten Biosynthesevorläufer von F430 ergeben hat. Die durch Strichelung markierten Bezirke der Formel geben an, welche Teile des Konstitutionsbildes vorgehend aus Ergebnissen der nachstehend erläuterten ^1H -NMR.-NOE-Differenzspektroskopie stammen: Es sind dies die Entscheidung darüber, welche beiden der vier Fünfringe C-methyliert sind, welche beiden der acht

¹⁷⁾ Vgl. Struktur und Bildungsweise der sogenannten «gelben Corrinoiden» [24]. In diesen zeigen Lactamring-tragende C(6)-C-Atome ^{13}C -Singulette um 90 ppm.



Carboxylfunktionen in Amid- bzw. Lactamform vorliegen und schliesslich, welche der beiden Propionsäureketten der Ringe C und D den carbocyclischen Zusatzring bilden.

4. $^1\text{H-NMR}$ -spektroskopische Konstitutions- und Konfigurationsanalyse von F430M. – Bei der Auswertung des komplexen $^1\text{H-NMR}$ -Spektrums von F430M fiel neueren, insbesondere von *Hall & Sanders* [28] propagierten Techniken der NMR-Spektroskopie eine entscheidende Rolle zu; es sind dies die Analyse von «partially relaxed» NMR-Spektren [28], die Entkopplungs-Differenzspektroskopie¹⁸⁾ [28] und vor allem die NOE-Differenzspektroskopie¹⁹⁾ [28] [29].

Im 300-MHz- $^1\text{H-NMR}$ -Spektrum von F430M in CD_2Cl_2 (vgl. *Fig. 6a*) sind auf Anheb bei 1,11 und 1,20 ppm die Methylsingulette der beiden (von Methionin stammenden) C-Methylgruppen sowie die Methylsingulette der fünf Methoxycarbonylgruppen²⁰⁾ um 3,6 bis 3,7 ppm zu erkennen. Oberhalb 4 ppm finden sich nebst dem H-C(10)-Singulett bei 5,72 ppm drei weitere Signale (je 1 H), deren Signallage und Konzentrationsabhängigkeit der chemischen Verschiebung (Abwanderung nach höherem Feld bei Verdünnen der Messlösung) und Signalform auf eine primäre Amidfunktion (zwei verbreiterte Singulette bei 5,68 und 6,44 ppm) und eine sekundäre Lactamfunktion (relativ scharfes Signal bei 7,18 ppm) hindeuten. Diese Zuordnung wird durch die Beobachtung eines «saturation transfers» zwischen den beiden verbreiterten Signalen gestützt²¹⁾. Hinzu kommt in diesem Spektralbereich

¹⁸⁾ Differenz zwischen entkoppelten und nicht-entkoppelten Spektren.

¹⁹⁾ NOE: Nuclear *Overhauser* Effect.

²⁰⁾ Eines der Signale besitzt gemäss Integration doppelte Intensität.

²¹⁾ Bei Zugabe von Deuteriomethanol oder D_2O zur Messlösung beobachtete man starke Verbreiterung und Verschiebung der $^1\text{H-NMR}$ -Signale, was wohl auf Paramagnetismus infolge zusätzlicher Koordination der nukleophilen Zutaten an Nickel zurückzuführen ist. Deshalb entfielen Deuterierungsexperimente. Die beobachtete Sättigungsübertragung ist als Indiz für das Vorliegen einer primären Amidfunktion (Rotation um die $\text{NH}_2\text{-CO}$ -Bindung) deshalb stichhaltig, weil der Wassergehalt der Messlösung extrem tief ist (vgl. *Exper. Teil*). Über Signallage und Signalform von Amid- und Lactamgruppen in ähnlichen Systemen vgl. die Literatur über «gelbe Corrine» [24], insbesondere die *Figuren* in [24b].

das alleinstehende, triplettoide Signal bei 4,48 ppm, das durch selektive $\{^1\text{H}\}\text{-}^{13}\text{C}$ -Entkopplung eindeutig als Signal des Protons am C-Atom C(4) identifiziert ist. Diese Zuordnung bildet die Ausgangsbasis für die vollständige Konstitutions- und Konfigurationszuordnung im Bereich der Ringe A und B durch Entkopplungsexperimente und NOE-Differenzspektroskopie. Als Bezugspunkt für die Konfigurationszuordnung unterstellen wir (vorläufig willkürlich) die β -Lage von H-C(4).

Konventionelle $\{^1\text{H}\}\text{-}^1\text{H}$ -Doppelresonanz weist eine Kopplung von $\text{H}_\beta\text{-C}(4)$ mit dem Proton eines Triplets bei 1,53 ppm ($J=13$ Hz) nach. Dieses Nachbarproton von $\text{H}_\beta\text{-C}(4)$ besitzt nur einen weiteren Kopplungspartner, nämlich das Proton eines Dubletts bei 1,87 ppm ($J=13$ Hz). Die Signale bei 1,53 und 1,87 ppm bilden den AB-Teil eines ABX-Systems ($J_{AB}=13$, $J_{AX}=13$, $J_{BX}\approx 0$) und sind den Methenprotonen an C(5) zuzuordnen. Das 1,53-ppm-Triplett kann nicht H-C(3) zugehören, da das Signal des Kopplungspartners bei 1,87 ppm ein Dublett ist²²). Die weiteren Kopplungspartner von $\text{H}_\beta\text{-C}(4)$ lassen sich nur mittels Entkopplungs-Differenzspektroskopie auffinden: Unter einem komplexen Signalhaufen verborgen ein Multiplett bei 2,68 ppm, das mit dem Signal von $\text{H}_\beta\text{-C}(4)$ mit 12 Hz koppelt und demnach das Signal des Nachbarprotons H-C(3) darstellt, ferner ein mit $\text{H}_\beta\text{-C}(4)$ nur schwach ($J\approx 1$ Hz) gekoppeltes verbreitertes, dublettisiertes Dublett bei 3,12 ppm (die spätere Analyse wird diese Kopplung als Fernkopplung von $\text{H}_\beta\text{-C}(4)$ mit der Methylengruppe an C(20) identifizieren) (vgl. Fig. 6b)²³). Im NOE-Differenzspektrum, das beim Einstrahlen in $\text{H}_\beta\text{-C}(4)$ erhalten wurde (vgl. Fig. 7B), treten als intensive Signale das H-C(3)-Multiplett bei 2,68 ppm und das Lactam-(NH)-Signal bei 7,18 ppm auf, und deutlich schwächer eines der H-C(5)-Signale, nämlich das Dublett bei 1,87 ppm²⁴). Der starke NOE von H-C(4) auf das Lactam-NH-Proton verlangt, dass der Lactamring an C(6) (und nicht an C(19)) gebunden und bezüglich H-C(4) cis-ständig vorliegt; das intensive NOE-Differenzsignal von H-C(3) belegt die cis-Anordnung der H-Atome H-C(3) und H-C(4).

Als Konsequenz der (quasi-diaxialen) cis-Anordnung von Lactamring und H-C(4) liegen das $\text{H}_\alpha\text{-C}(5)$ quasi-axial und das $\text{H}_\beta\text{-C}(5)$ quasi-äquatorial am zentralen Makroring; hieraus folgt die Zuordnung des 1,53-ppm-Triplets (*trans*-Kopplung 13 Hz) zu $\text{H}_\alpha\text{-C}(5)$ und jene des 1,87-ppm-Dubletts ($J\approx 0$ Hz) zu $\text{H}_\beta\text{-C}(5)$. Selektive Einstrahlung auf das Methylsingulett bei 1,20 ppm erzeugt einen intensiven NOE auf das $\text{H}_\alpha\text{-C}(5)$ -Triplett bei 1,53 ppm (Fig. 7C); dasselbe Triplett erfährt einen (schwächeren) NOE bei Einstrahlung in das Methylsignal bei 1,11 ppm (Fig. 7D). Diese NOE beweisen, dass die beiden aus Methionin stammenden Methylgruppen nicht an den C-Atomen C(12) und C(18), sondern im Bereich der Ringe A und B an den C-Atomen C(2) und C(7) sitzen (vgl. Diskussion des Partialspektrums 4d und Struktur

²²) Das 1,87-ppm-Proton müsste in diesem Fall ein H-C(3¹) sein, und dieses kann nicht als Dublett auftreten.

²³) Das $d\times d$ -Signal bei 3,12 ppm ist von einem quartettoiden Multiplett (H-C(12) vgl. unten) überlagert; die beiden Signale können in den «partially relaxed» Spektren getrennt voneinander beobachtet werden.

²⁴) Das NOE-Spektrum zeigt ein INDOR-Signal (vgl. *Exper. Teil*) im Bereich des Signals des zweiten C(5)-Protons. Aufgrund ihrer Form, chemischen Verschiebung und NOE-Korrelation mit der Methylgruppe an C(2) (vgl. unten) sind die restlichen schwächeren NOE-Signale bei 1,57 und 2,25 ppm (Fig. 7D) den Protonen an C(3²) und C(3¹) zuzuordnen.

B). Die Methylgruppe des Singulett bei 1,11 ppm ist durch einen NOE mit beiden Protonen der Methylengruppe an C(20) verknüpft und liegt deshalb an C(2) (Fig. 7D). Das H–C(20)-Signal bei 3,12 ppm ist als solches identifiziert durch selektive $\{^1\text{H}\}$ - ^{13}C -Entkopplung und die bereits erwähnte Fernkopplung mit dem H–C(4)-Signal. Dies ist durch die Signalstruktur der Protonen an C(20) bestätigt: Zwei Signale bei 2,98 (Dublett) und 3,12 ppm (Dublett \times Dublett)²³⁾ bilden mit einem tripletoiden Signal bei 3,53 ppm ein *ABX*-System ($J_{AB}=18$, $J_{AX}\ll 1$, $J_{BX}=9$ Hz). Die 18-Hz-Geminalkopplung verknüpft die beiden Protonen an C(20), und die 9-Hz-Kopplung führt zum H–C(19), auf dessen chemische Verschiebung noch zurückzukommen sein wird.

Die beiden Methylgruppen an C(2) und C(7) liegen auf der α -Seite des Makroringes. Für die Methylgruppe im Ring A folgt dies aus dem bereits erwähnten NOE auf H $_{\alpha}$ -C(5) (auf H $_{\beta}$ -C(5) ist kein Effekt beobachtbar) und aus dem NOE auf die beiden Protonen von C(3¹) (Multiplette bei 1,58 und 1,76 ppm, in «partially relaxed» NMR.-Spektren durch Kopplung mit H–C(3) identifiziert) (Fig. 7D). Die Methylgruppe im Ring B zeigt nebst dem erwähnten starken NOE auf H $_{\alpha}$ -C(5) einen deutlich schwächeren auf H $_{\beta}$ -C(5). Die α -Lage der Methylgruppe ist zudem gegeben durch die *cis*-Lage der Lactamfunktion bezüglich H–C(4) und der aus thermodynamischen Gründen²⁵⁾ sich ergebenden Annahme der *cis*-Verknüpfung von Lactamring²⁶⁾ und Ring B. Im NOE-Differenzspektrum mit Einstrahlung in die Ring-B-Methylgruppe (Fig. 7C) tritt u. a. ein intensives Multipllett bei 1,96 ppm auf, das anhand einer 8-Hz-Kopplung mit dem H–C(8)-Signal bei 2,84 ppm (Dublett \times Dublett; $J=8$ und 3 Hz; *via* NOE ausgehend von H–C(10) identifiziert) einem der beiden CH₂-Protonen von C(8¹) zugeordnet werden muss. Im gleichen Experiment ist das NOE-Differenzsignal von H–C(8) hingegen sehr schwach. Dies belegt die *cis*-Anordnung der Ring-B-Methylgruppe und der Ring-B-Propionylseitenkette.

Die noch anstehende Frage, welche der verbleibenden Säureketten die primäre Amidgruppe stellt, lässt sich durch einen NOE ausgehend von den NH₂-Protonen auf die CH₂-Gruppe in α -Stellung zur Amidfunktion beantworten. In «partially relaxed» NMR.-Spektren können zwei mit Geminalkopplungen von je 17 Hz versehene, nicht weiter gekoppelte *AB*-Systeme bei 2,43/2,51 und 2,64/2,78 ppm, die im Normalspektrum von anderen Signalen überdeckt sind, an ihrer charakteristischen Form erkannt werden (vgl. Fig. 8a). Das *AB*-System bei tieferem Feld erfährt einen deutlichen NOE durch Einstrahlung in die NH₂-Protonen der Amidfunktion, und gehört deshalb zu den Methylenprotonen in deren α -Stellung (Fig. 7E). Die NOE-Korrelation dieses *AB*-Systems mit der Ring-A-Methylgruppe legt fest, dass die Essigsäureseitenkette in Ring A die primäre Amidfunktion trägt. Damit sind sämtliche Fragen der Konstitution und Konfiguration (von der absoluten abgesehen) im Ring A/B-Bereich beantwortet.

Ausgehend vom Ring-B-Proton H–C(8) und einem der Protonen von C(8¹) gelangt man durch NOE-Korrelation *via* das *meso*-Proton H–C(10) zum H–C(12)

²⁵⁾ Ausnahmsweise besteht im vorliegenden Fall das thermodynamische Argument wohl zu Recht, und zwar infolge einer (anzunehmenden) hohen kinetischen Labilität des Lactamringes bezüglich reversibler Öffnung an C(6).

²⁶⁾ Eine Sechsring-Lactambrücke zwischen C(6) und der Carbonylfunktion C(8³) ist durch die beobachtete NOE-Korrelation zwischen Ring-B-Methyl und C(8^{1,2})-Protonen auszuschliessen.

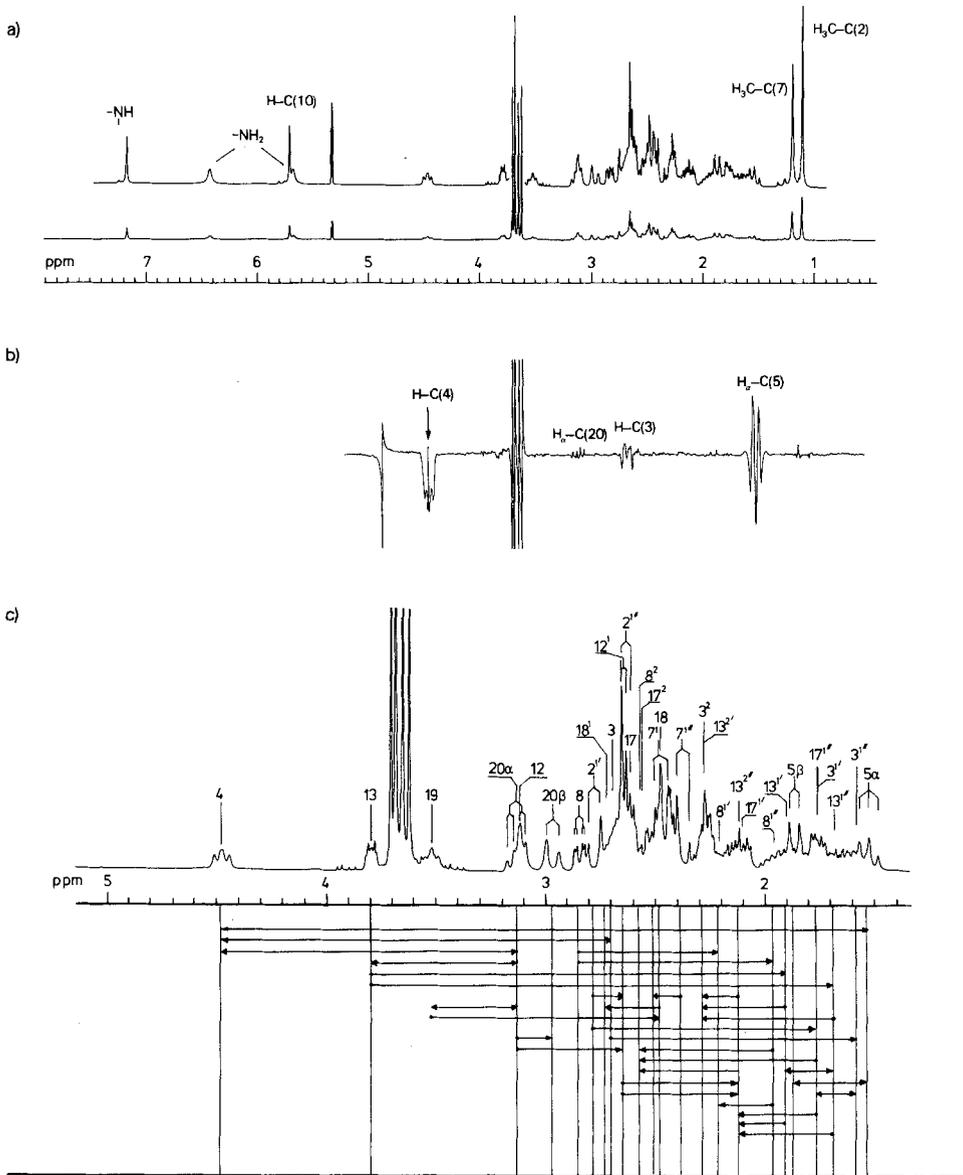
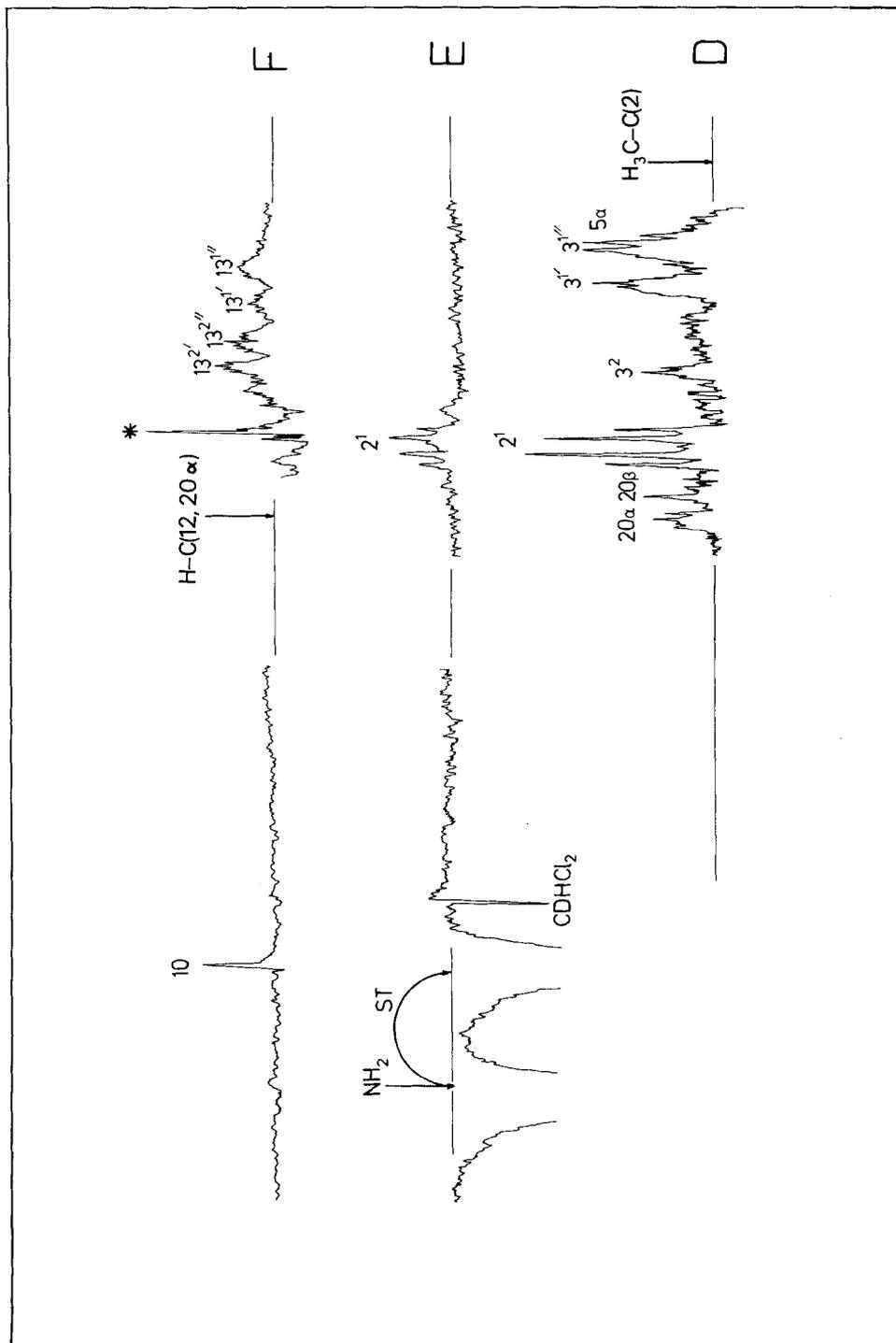


Fig. 6. ^1H -FT-NMR.-Spektrum (300 MHz) von F430M in CD_2Cl_2 ($c=0,05\text{M}$, Pulswinkel 30° , spektrale Breite 3600 Hz in 32K, 256 scans)

a) Gesamtes Spektrum.

b) Entkopplungs-Differenzspektrum unter Einstrahlung bei 4,5 ppm (H-C(4)) und 4,9 ppm (Referenz), 256 scans.

c) Teilspektrum von 1,4–5,2 ppm, gespreizt mit Zuordnung und Schema der durchgeführten Entkopplungen.



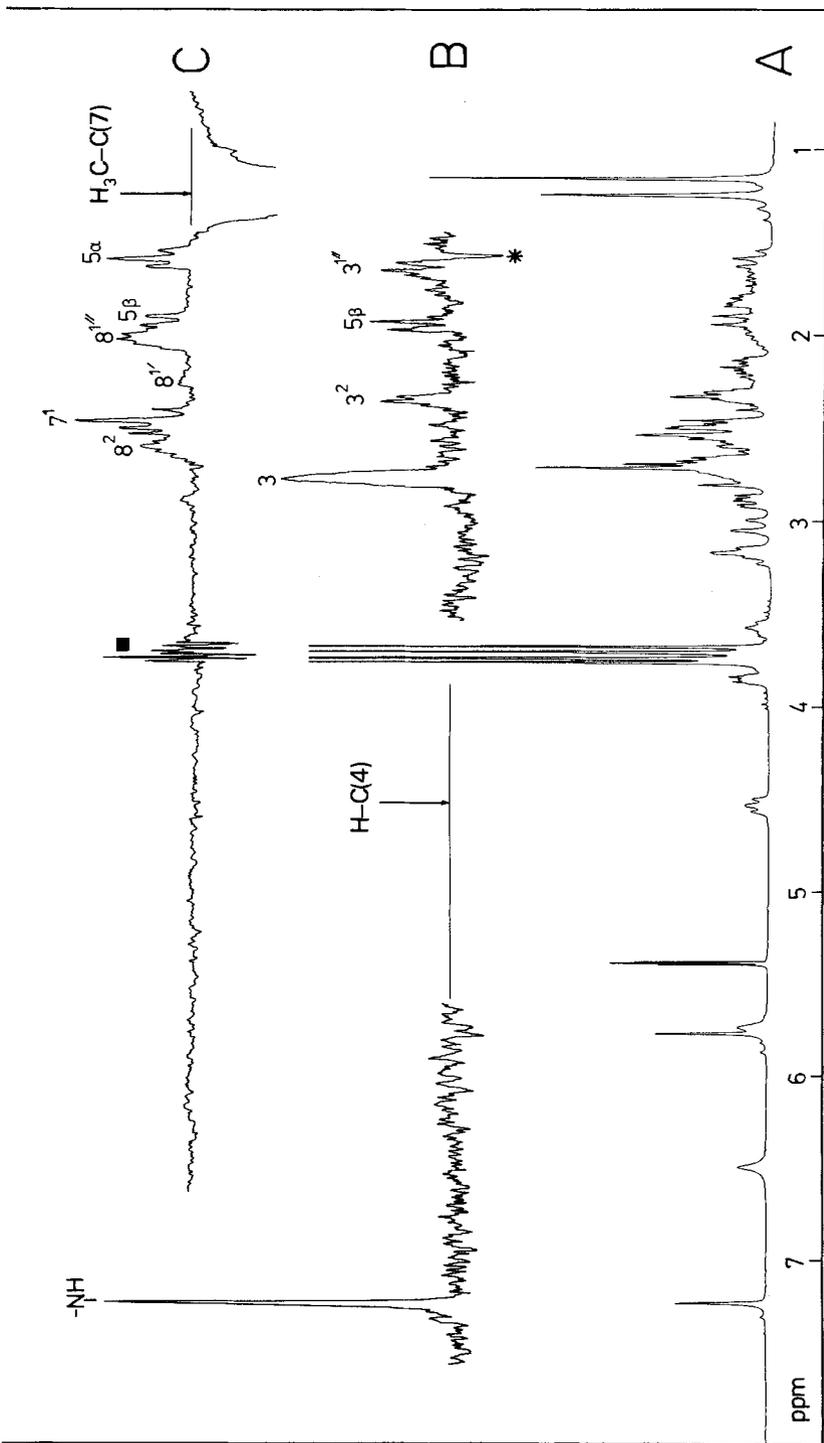


Fig. 7. Homonukleare ¹H-NOE-Differenzspektren von F430M in CD₂Cl₂ (c = 0,05M, 25° C)

- A) Referenzspektrum ohne NOE.
 - B) Einstrahlung bei 4,5 ppm (H-C(4)) und 0 ppm (Referenz) mit $\gamma H_2/2\pi = 50$ Hz. Je 512 scans, Linienverbreiterung 1 Hz.
 - C) Einstrahlung bei 1,20 ppm (H₃C-C(7)) und 0 ppm (Referenz) mit $\gamma H_2/2\pi = 30$ Hz. Je 2400 scans, Linienverbreiterung 1 Hz.
 - D) Einstrahlung bei 1,11 ppm (H₃C-C(2)) und 0 ppm (Referenz) mit $\gamma H_2/2\pi = 30$ Hz. Je 2400 scans, Linienverbreiterung 1 Hz.
 - E) Einstrahlung bei 6,4 ppm (NH₂) und 0 ppm (Referenz) mit $\gamma H_2/2\pi = 60$ Hz. Je 612 scans, Linienverbreiterung 1 Hz.
 - F) Abwechselnde Einstrahlung der Einzellinien um 3,12 ppm (H-C(12)), H-C(20α) und 0 ppm (Referenz) mit $\gamma H_2/2\pi = 30$ Hz. Je 2400 scans, Linienverbreiterung 1 Hz.
- ST Saturation Transfer. * pseudo-INDOR Signale. ■ Nicht vollständig genullte Signale ohne NOE.

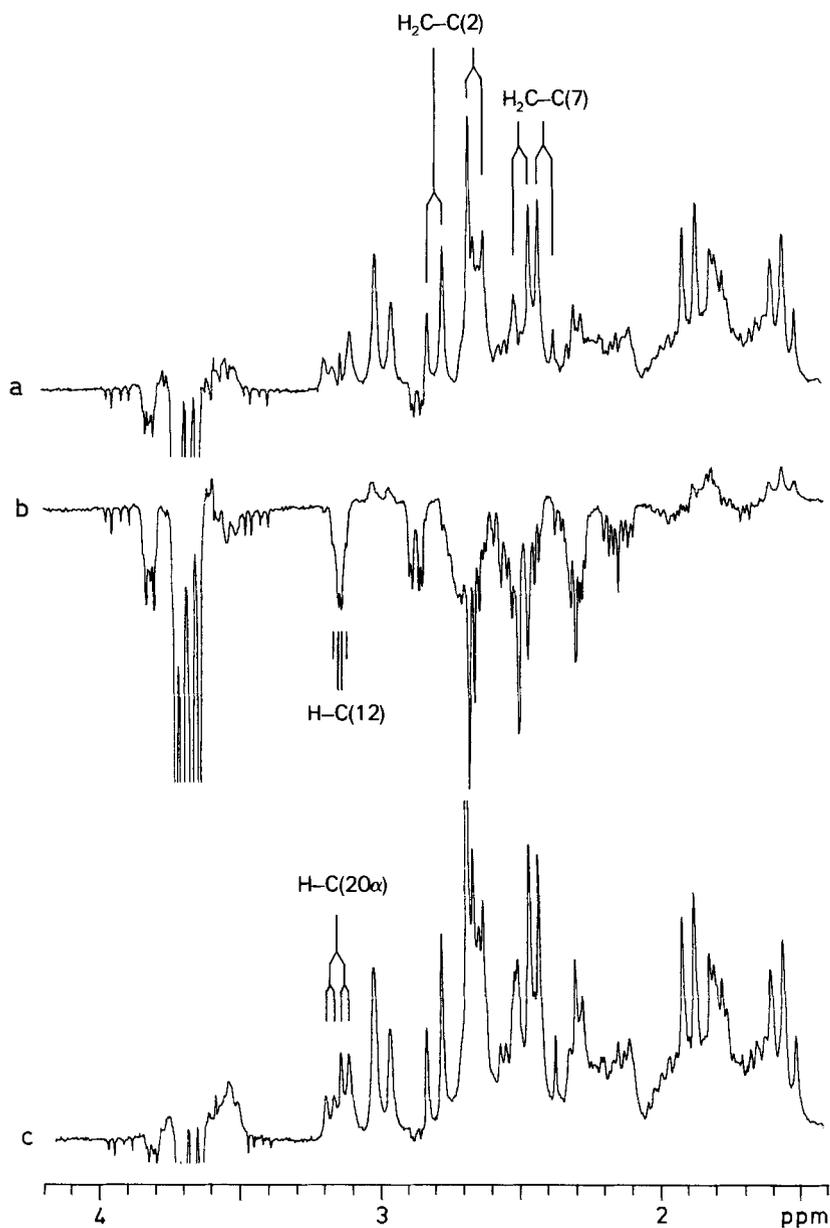


Fig. 8. «Inversion recovery» (= "partially relaxed") $^1\text{H-NMR}$ -Spektrum zur Separierung überlappender Signale

- a) 180° - τ - 90° Sequenz mit $\tau=0,2$ s, 96 scans.
- b) 180° - τ - 90° Sequenz mit $\tau=0,1$ s, 96 scans.
- c) 180° - τ - 90° Sequenz mit $\tau=2,5$ s, 96 scans.

vom Ring C. Dieses zeigt sich in «partially relaxed» NMR.-Spektren als quartetoides Signal bei 3,12 ppm²³⁾ (Fig. 8b). Die allylische Kopplung zwischen H–C(10) und H–C(12) ist derart schwach ($J \leq 0,5$ Hz), dass sie nur im Entkopplungs-Differenzspektrum feststellbar ist, was auf eine *quasi*-äquatoriale Lage des H–C(12) relativ zum π -System hindeutet [30]. Die Frage, ob H–C(12) α - oder β -Lage einnimmt, muss offen bleiben.

Eine 3-Hz-Kopplung führt von H–C(12) zu H–C(13), welches im Spektrum isoliert erkennbar als Multiplett bei 3,80 ppm auftritt. Das im Vergleich zu den Protonen in analoger Lage H–C(8) (2,84 ppm) und H–C(12) (3,12 ppm) nach auffallend tiefem Feld verschobene Signal von H–C(13) ist ein erster Hinweis auf die Richtigkeit der in der Konstitutionsformel **1** enthaltenen Annahme, dass der carbocyclische Zusatzring an der *meso*-Stellung C(15) von der Propionsäurekette des Ringes D ausgeht: Ein *quasi*-äquatoriales H–C(13) liegt in diesem Fall im Entschirmbereich der Carbonyldoppelbindung dieses Ringes. Diese Interpretation impliziert eine *trans*-Anordnung von H–C(12) und H–C(13), sowie eine diaxiale Lage der Ring-C-Seitenketten (vgl. Kap. 6).

Die Bestätigung dieser Konstitutionszuordnung für den carbocyclischen Zusatzring liefert der NOE von H–C(12) auf die Methylenprotonen in α -Stellung zur Methoxycarbonylgruppe der Propionsäurekette des Ringes C. (Fig. 7F). In der alternativen Konstitution (Zusatzring ausgehend von Ring C) läge diese α -Methylen-Gruppe nicht im NOE-Bereich von H–C(12)²⁷⁾.

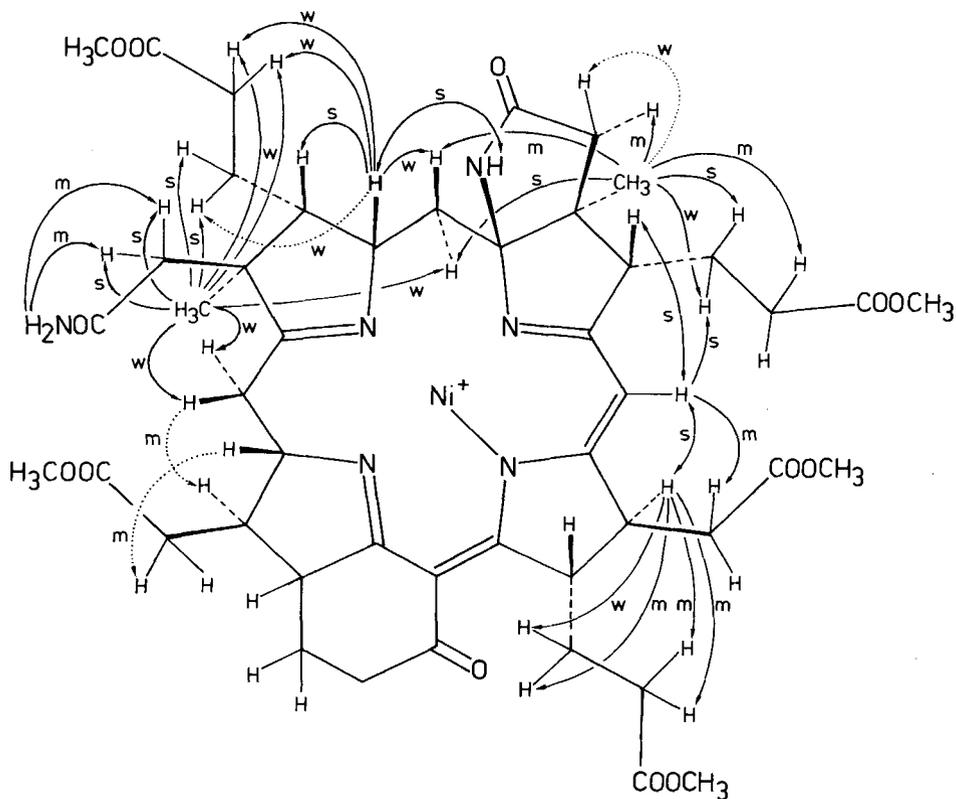
Die Methylgruppe am Ring A ist der Ausgangspunkt für eine Konfigurationszuordnung an C(19). Der NOE auf die beiden H-Atome an C(20) ist etwa gleich stark (Fig. 7D). Ein Molekülmodell vermag diese Tatsache unter der Voraussetzung zu deuten, dass H–C(19) β -Lage einnimmt; nur so liegen H_{α} -C(20) und H_{β} -C(20) in ähnlicher Entfernung zur *quasi*-axialen Ring-A-Methylgruppe (eine *quasi*-äquatoriale Lage dieser Methylgruppe ist mit ihrem NOE zu H_{α} -C(5) nicht vereinbar). Das Molekülmodell mit *cis*-Anordnung von H–C(19) und H–C(4) vermag auch die relative Hochfeld-Lage des H–C(19)-Signals bei 3,53 ppm zu deuten (vgl. H–C(4) bei 4,48 ppm und entsprechende Werte in Modellkomplexen [15]): Ähnlich wie bei der röntgenstrukturanalytisch untersuchten, in [15] beschriebenen Nickel (II)-tetrahydro-corphinat-Modellverbindung liegt H–C(19) im Abschirmkegel der (C=N)-Doppelbindung im Ring A.

Das Proton an C(18) kann im Entkopplungs-Differenzspektrum durch eine 9-Hz-Kopplung mit H–C(19) lokalisiert werden (Multiplett bei 2,5 ppm). NOE-Differenzspektren ausgehend von H–C(19) lieferten indessen keinen schlüssigen Hinweis auf die Konfiguration von H–C(18). Die Lage und Form der Signale von H₂C(18¹) konnten nur ungefähr bestimmt werden; deshalb sind im NOE-Differenzspektrum beobachtete Multiplette zwischen 2,4 und 2,7 ppm nicht eindeutig diesen Protonen zuzuordnen (was den Nachweis der *trans*-Anordnung von H–C(19) und H–C(18) erbracht hätte). Auch gelang es nicht, die NOE-Partner von H–C(18) zu ermitteln, da dessen Signal mit anderen Multipletten überlagert ist, was eine selektive

²⁷⁾ Durch eine Serie von Entkopplungsexperimenten sind die Signale der Protonen an C(13²) und C(13¹) und ebenso jene von C(12¹) lokalisiert (vgl. Fig. 6c).

im Bereich des Ringes D. Vorweggenommen sind im Formelbild die Zuordnung der Konfiguration des Ring-C-Strukturbezirks relativ zum A/B-Strukturteil, sowie eine Antwort auf die Frage nach der absoluten Konfiguration von F430M.

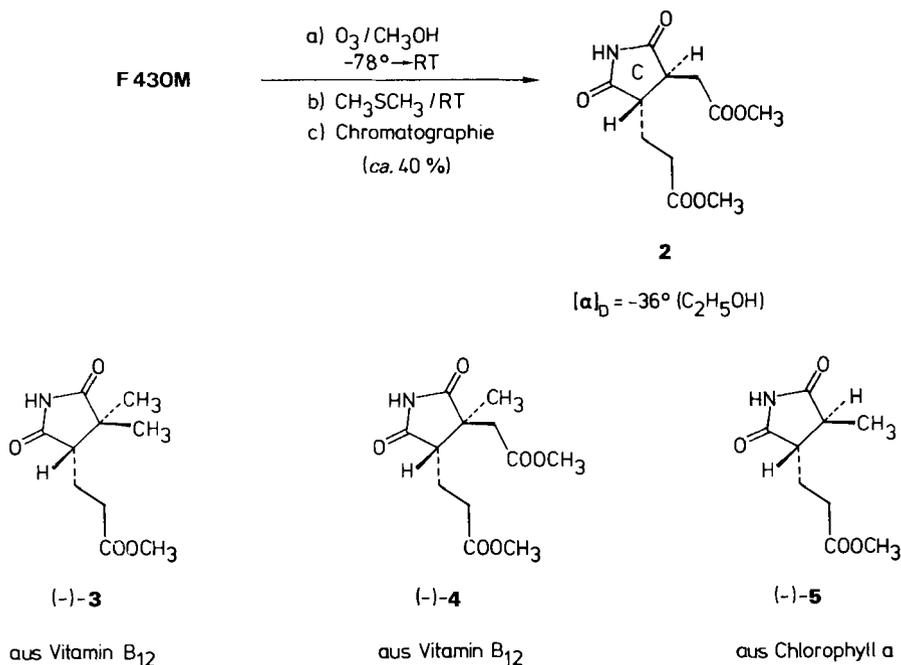
Schema 4. Strukturvorschlag **1A** mit Zusammenfassung der $^1\text{H-NMR-NOE-Korrelationen}$ (die Pfeile zeigen vom eingestrahlichten zum beobachteten Proton; \longrightarrow sicher zugeordnete NOE; \dashrightarrow NOE, deren Zuordnung wegen unbefriedigendem S/N-Verhältnis oder nicht genau bekannter Signalform unsicher ist; s, m, w = starker, mittelstarker, schwacher NOE)



5. Absolute Konfiguration von F430M. – Die Konstitutionsformel von F430M legt die Möglichkeit nahe, durch ozonolytischen Abbau und gezielte Suche nach einem Ring-C-Bruchstück sowohl die relative als auch absolute Konfiguration des Ring-C-Strukturbezirks auf chemischem Weg zu ermitteln. Eine solche Möglichkeit ist insbesondere deshalb willkommen, weil die $^1\text{H-NMR-Spektroskopie}$ keine Information über die Konfiguration des Ring-C-Bezirks relativ zu den Konfigurationszentren des A/B-Bezirks zu geben imstande war. Zielverbindung eines Ozonabbaus von F430M hatte der Ring-C-Imido-dimethylester **2** (oder dessen Enantiomeres) zu sein, da die chiroptischen Daten der konstitutionell nahe verwandten und in ihrer absoluten Konfiguration bekannten Verbindungen (–)-**3**, (–)-**4** und (–)-**5**

(*Schema 5*) aus den Arbeiten zur Synthese (und auch des Abbaus) von Vitamin B₁₂ [31], bzw. aus dem Abbau von Chlorophyll a [32] zu Vergleichszwecken zur Verfügung stehen.

Schema 5. Ozonabbau von F430M mit Isolierung des Ring-C-Bruchstücks (–)–2 und Struktur der Vergleichsverbindungen



Ozonolyse von F430M in Methanol und reduktive Aufarbeitung des Reaktionsgemisches mit Dimethylsulfid lieferten nach chromatographischer Reinigung an Silicagel das Ring-C-Bruchstück in DC.- und ¹H-NMR.-spektroskopisch einheitlicher (öliger) Form in rund 40% Ausbeute. Sein CD.-, IR.- und 300-MHz-¹H-NMR.-Spektrum belegen die Struktur **2** (vgl. *Exper. Teil*).

Das CD.-Spektrum von (–)-**2** stimmt in seinen Kenndaten mit dem von *Brockmann* [32] beschriebenen CD.-Spektrum von (–)-**5** weitgehend überein²⁹⁾, und – wie *Figur 9* illustriert – weisen (–)-**2**, (–)-**3**, (–)-**4** und (–)-**5** alle einen *Cotton*-Effekt um 250 nm gleichen Sinns auf. *Diese durchgehende Entsprechung der chiroptischen Daten weist dem Ozonolyseprodukt von F430M die (S,S)-Konfiguration zu.*

Da der Ring-C-Bezirk mit dem übrigen Teil der F430M-Struktur nicht ¹H-NMR.-spektroskopisch konfiguratv korreliert ist, impliziert die Kenntnis der absoluten Konfiguration der Ring-C-Teilstruktur nicht eine solche von F430M. Wir

²⁹⁾ Zum Vergleich: CD.-Spektrum von (–)-**2** (*c* = 2,4 · 10^{–4}M, C₂H₅OH): *ca.* 275 (0), 248 (–3230), 233 (0), 223 (+1920), 211 (0) λ ([θ]); CD.-Spektrum von (–)-**5** [32] (*c* = 6,3 · 10^{–3}M, in CH₃OH): *ca.* 275 (0), 250 (–2020), 233 (0), 225 (+1130), 215 (+520) λ ([θ]); [α]_D²⁰ von (–)-**5** (CH₃OH): –63°.

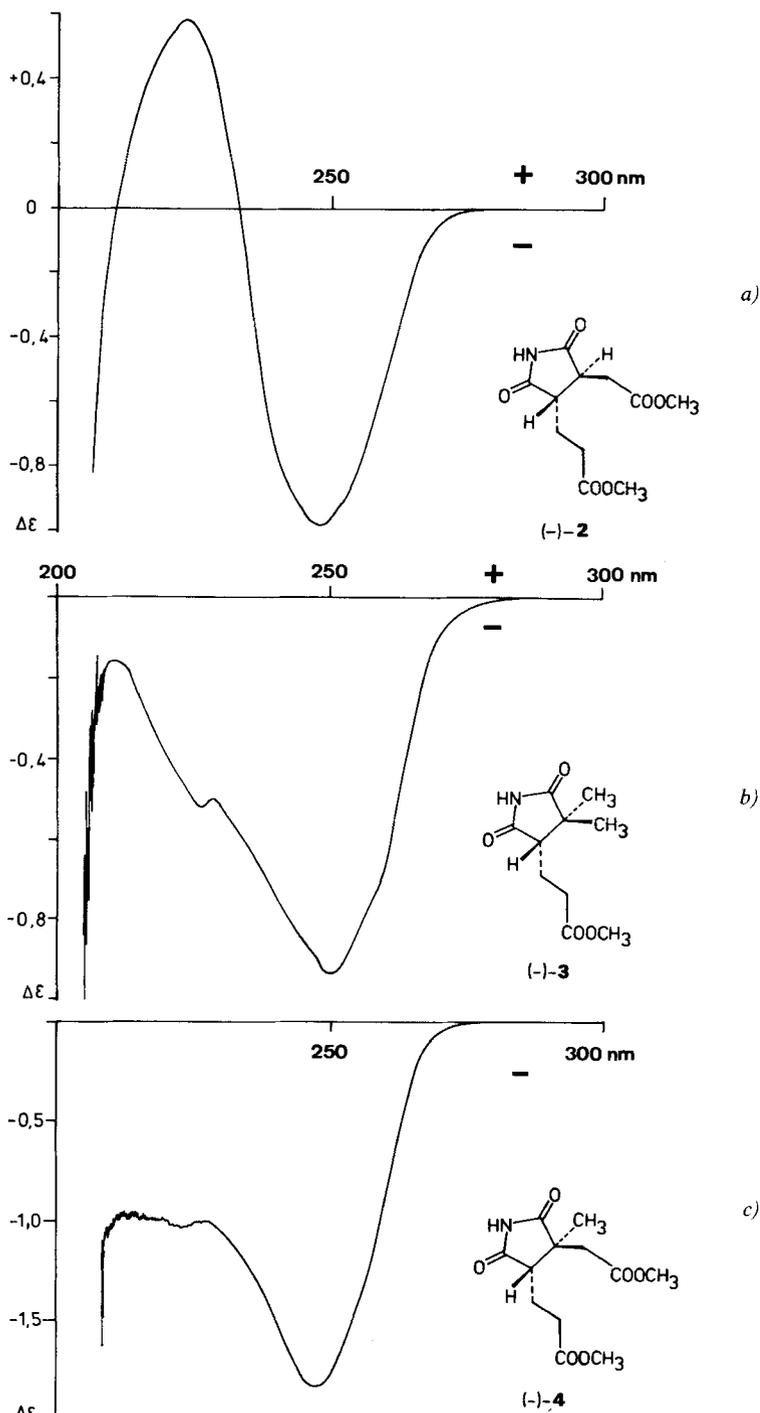
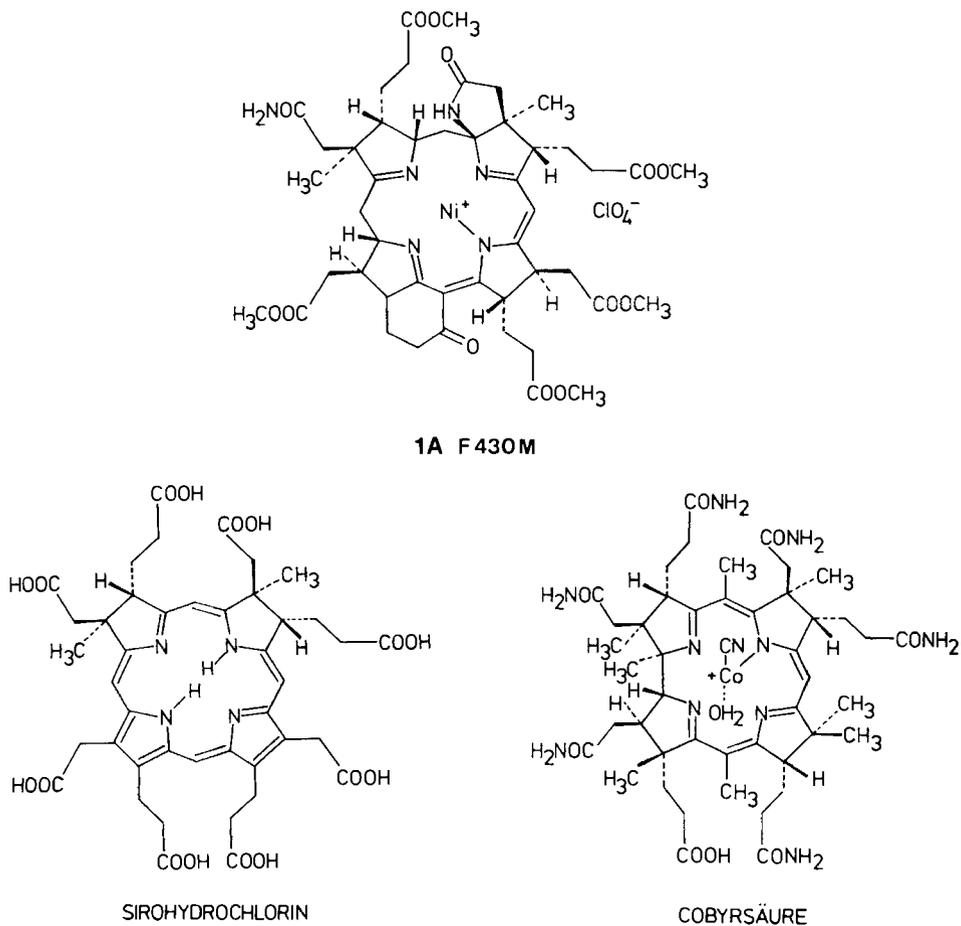


Fig. 9. CD-Spektren in C_2H_5OH von: a) (-)-2; $c=2,41 \cdot 10^{-4}M$; b) (-)-3; $c=3,01 \cdot 10^{-4}M$; c) (-)-4; $c=1,48 \cdot 10^{-3}M$

verfügen zur Zeit über keine experimentellen Ergebnisse³⁰⁾, die eine unabhängige Zuordnung der absoluten Konfiguration im Strukturbezirk der Ringe A und B erlauben würden. Die in der Formel **1A** enthaltene Zuordnung beruht auf der *Annahme*, dass Faktor *F430M* im Strukturbereich der Ringe A und B die gleiche absolute Konfiguration besitzt wie Sirohydrochlorin [33] und Vitamin B₁₂ [34] (vgl. Schema 6). Grundlage unserer Präferenz für diese Zuordnung ist die offensichtliche konstitutionelle Verwandtschaft von F430M und Sirohydrochlorin, deren gleiche (relative) Konfiguration an den (konstitutionell entsprechenden) Chiralitätszentren an der Peripherie der Ringe A und B, die (für andere Organismen) bekannte Tatsache, dass

Schema 6. Strukturvorschlag **1A** für *F430M* und Vergleich mit den Strukturen von Sirohydrochlorin und Cobyrssäure

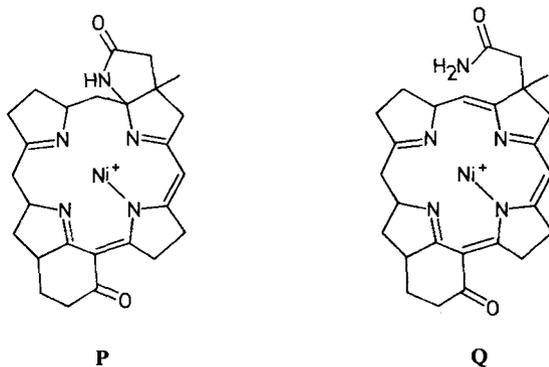


³⁰⁾ Es ist uns (noch) nicht gelungen, beim Ozonabbau von F430M das Ring-B-Bruchstück als Imid **4** zu fassen.

Sirohydrochlorin am Biosyntheseweg zu Vitamin B₁₂ liegt [33] [16b, d], und schliesslich das Vorkommen von Corrinoiden in methanogenen Bakterien [13], *Methanobacterium thermoautotrophicum* inbegriffen [14]. Wir implizieren damit die Vermutung, dass Sirohydrochlorin (bzw. dessen C,D-dipyrrolisches Dihydroderivat) nicht nur am Biosyntheseweg zu Vitamin B₁₂, sondern auch an jenem zum Faktor F430 liegt. Mit der vorgenommenen Zuordnung ergibt sich übrigens eine Übereinstimmung der Konfiguration an sämtlichen biosynthetisch sich entsprechenden Chiralitätszentren in F430M, Sirohydrochlorin und Vitamin B₁₂.

6. Schlussbemerkungen. – Vorab ist festzuhalten, dass mit der Strukturformel des Methanolyseprodukts F430M nur der porphinoide Kern des Faktors F430 erkannt ist. Wesentliche Fragen über die Struktur des Faktors bleiben offen, so die Frage nach der Natur und Bindungsart von peripher gebundenen, durch Isolierung und Methanolyse abgelösten Strukturteilen³¹⁾ (vgl. die wechselnden Mengen Aminosäuren nach Totalhydrolyse von F430-Isolaten). Künftige Untersuchungen werden sich auch mit der Frage zu befassen haben, ob die Struktur von F430M – von den fünf Methoxycarbonylgruppen abgesehen – nicht auch artefaktäre Strukturelemente enthält, die bereits bei der Zellablösung von Faktor F430 entstehen. Im besonderen scheint uns der Strukturbezirk um den Lactamring am Ring B Möglichkeiten wie die Strukturen **P** und **Q** zu bieten (vgl. *Schema 7*), wenn man bedenkt, wie leicht in der Corrinreihe fünfgliedrige Lactam- oder Lactonbildungen in diesem Teil des Ligandensystems stattfinden [24] [35].

Schema 7. Beobachtete (**P**) und potentielle (**Q**) Form des Chromophors von F430M



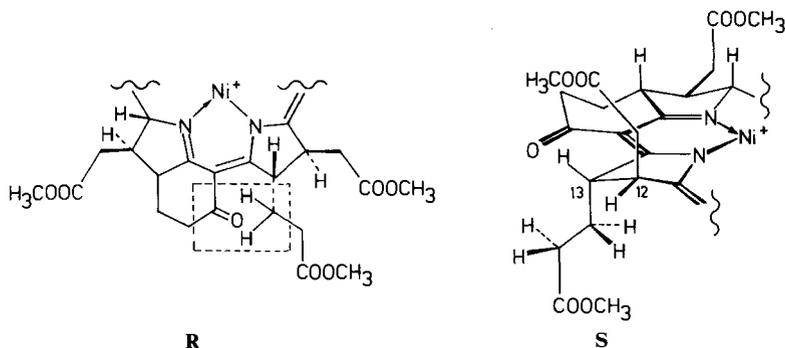
Auffallendes und bisher bei natürlichen Porphinoiden nicht angetroffenes Strukturmerkmal von F430M ist der zusätzliche carbocyclische Ring zwischen den Ringen C und D³²⁾. Die Natur seiner Entstehung ist unschwer als intramolekulare,

³¹⁾ Von besonderem Interesse ist die Beobachtung von *J. T. Keltjens & G. D. Vogels* (Dept. of Microbiology, Univ. of Nijmegen), wonach u. a. auch Coenzym M in (anders gewonnenen) Isolaten von F430 vorkommt (Privatmitteilung von Prof. *Vogels*).

³²⁾ Hingegen sind solche Strukturelemente intramolekular acylierter *meso*-Stellungen bei Porphinoiden auf chemischem Wege schon erzeugt worden; vgl. das Beispiel des Anhydro-bonellins [36].

elektrophile Acylierung der *meso*-Stellung C(15) in einem Zustand enaminischer Reaktivität (vgl. die *meso*-Methylgruppen der natürlichen Corrine) zu erkennen. Vom Standpunkt des chemischen Verhaltens her gesehen, bedeutet die Anfügung einer Carbonylfunktion an die Mesostellung eines vinamidinischen Chromophors eine Stabilisierung desselben, indem die Reaktivität solcher Chromophorsysteme dominant nukleophil, d. h. von ihrem enaminischen Charakter her geprägt ist³³).

Schema 8

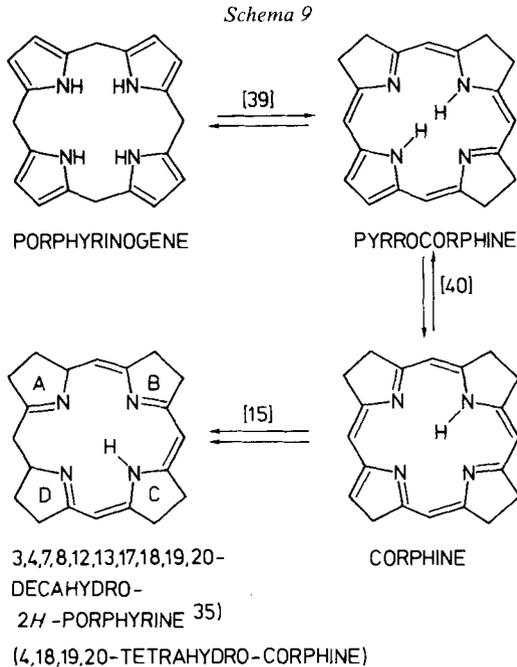


Darüber hinaus erkennt man an Molekülmodellen von F430M die Möglichkeit einer besonderen strukturellen Funktion dieses carbocyclischen Zusatzringes: Durch ihn, d. h. im speziellen durch den Raumspruch der Carbonylgruppe, erfährt die Propionsäurekette am Ring C eine beträchtliche sterische Behinderung für den Fall, dass sie eine *quais*-äquatoriale Lage einnimmt (vgl. *Struktur R* in *Schema 8*). In der Tat weisen die ¹H-NMR.-Daten der Ring-C-Region (vgl. *Kap. 4*) darauf hin, dass die beiden Ring-C-Seitenketten *quasi*-*di*-axial angeordnet sind (vgl. *Struktur S* in *Schema 8*). Soweit eine solche Anordnung durch den Raumspruch des carbocyclischen Ringes erzwungen wird, bedeutet die Existenz dieses Zusatzringes für F430M eine Stabilisierung der Ring-C-Region gegenüber Pyrrolisierung durch Tautomerisierung oder Dehydrierung. Diese Art der Argumentation entspricht übrigens völlig jener, die *Woodward* [37] bei seiner nunmehr klassischen retrosynthetischen Analyse der Chlorophyll-a-Struktur vor rund zwei Jahrzehnten verwendet hat.

Ob unsere Vermutung zutrifft, dass die beobachtete thermische Umwandlung von Faktor F430-Isolaten in «UV./VIS.-Isomeren» [5] einer stufenweisen Umkehr der Konfiguration der Ring-C-Seitenketten entspricht, werden entsprechende Ozonolyse-Experimente zeigen müssen.

F430M enthält einen in der Naturstoffgruppe der Porphinoide bisher nicht angetroffenen Chromophortyp. Von allen bekannten biologisch funktionellen Porphinoiden ist dieser Chromophor der am stärksten reduzierte; er liegt – wie die zu **P** äquivalente Formel **Q** (*Schema 7*) illustriert – auf der Oxydationsstufe eines

³³) Die deutlich erhöhte Stabilität von 15-cyansubstituierten Corrin- und Präcorrin-Derivaten im Vergleich zu entsprechenden Descyan-Verbindungen ist eine generelle Erfahrung aus den Arbeiten zur Synthese von Vitamin B₁₂ und Modell-Corrinen [35] [25].



Tetrahydro-uroporphyrinogens. Mit F430M tritt uns auch erstmals aus der Natur ein Ligandsystem entgegen, das als *Derivat des Corphinsystems* (vgl. *Schema 9*)³⁴ betrachtet werden kann. Dass dieser konstitutionelle Zusammenhang keineswegs nur formaler Art ist, geht aus dem in der vorstehenden Mitteilung [15] beschriebenen Befund hervor, dass der Chromophor eines Nickel(II)-corphinats in zwei Reduktionsschritten ziemlich selektiv in den (potentiellen) Chromophor von F430M übergehen kann (vgl. *Schema 9*). Damit aber steht der Chromophortyp von F430M in unmittelbarer «chemischer Nachbarschaft» zum Strukturtyp der Porphyrinogene, denn letzterer ist *via* die kürzlich aufgefundene Porphyrinogen \rightleftharpoons Pyrrocorphinat-Tautomerisierung [39][40] direkt mit dem Strukturtyp der Corphine verbunden. Diese Zusammenhänge weisen darauf hin, dass die Entdeckung von Faktor F430 – von der offensichtlich bedeutungsvollen biologischen Wirkung ganz abgesehen – auch im Hinblick auf kürzlich aufgeworfene [41], den Ursprung der natürlichen Porphinoidstrukturen betreffende Fragen wesentliche Einsichten zu geben verspricht.

Wir danken Prof. *J. F. M. Oth* (ETHZ) für seine grosszügige Unterstützung des Projekts, Prof. *D. Arigoni* (ETHZ) für wertvolle Ratschläge zu den Einbauversuchen, Dr. *E. Zass* (ETHZ) für seine Mithilfe bei der Fertigstellung des Manuskripts und Frau *Johanna Moll* (Marburg) für technische Mitarbeit.

Die Arbeit wurde finanziell unterstützt vom *Schweizerischen Nationalfonds zur Förderung der wissenschaftlichen Forschung* (Bern), von der *Deutschen Forschungsgemeinschaft* (Bonn-Bad Godesberg) sowie dem *Fonds der Chemischen Industrie* (Frankfurt am Main).

³⁴) Zur Ligandsystem-Benennung «Corphin» vgl. [38].

³⁵) Numerierungsart der Doppelbindungslagen im Naturprodukt entsprechend.

Experimenteller Teil

1. Methanolyse von Faktor F430. – Die Lösung von 27 mg (ca. 0,02 mmol) Faktor-F430-Isolat aus *Methanobacterium thermoautotrophicum*, Stamm Marburg (Isolierung und Reinigung vgl. [5]) und 190 mg (1 mmol) wasserfreier *p*-Toluolsulfonsäure in 15 ml abs. Methanol wurde 3 Std. bei 40° unter N₂ gerührt, dann auf 0° abgekühlt, mit 50 ml CH₂Cl₂ versetzt und 3mal mit wässrigem 0,1N NaClO₄ extrahiert. Die organische Phase wurde durch Watte filtriert, eingengt und der braune Rückstand auf 6 NaClO₄-imprägnierten³⁶⁾ Kieselgel-DC-Platten³⁷⁾ mit CH₂Cl₂/CH₃OH 15:1 chromatographiert. Durch 4malige Entwicklung konnte die hellgelbe Hauptzone (R_f 0,2 nach einmaliger Entwicklung) von einer leicht apolarer laufenden Mischzone getrennt werden. Das Kieselgel der Hauptzone wurde mit einer Spatelspitze KClO₄ verrieben und mit CH₂Cl₂/CH₃OH 5:1 eluiert. Nach Eindampfen wurde das Produkt in CH₂Cl₂ aufgenommen, zur Entfernung der Perchlorate und des Kieselgels mit wenig Wasser geschüttelt und auf einer halben DC.-Platte³⁷⁾ nochmals chromatographiert. Die Platte wurde mit einer Lösung von NaClO₄ in Essigester (5 g/l) und anschliessend mit CH₂Cl₂/CH₃OH 15:1 entwickelt³⁸⁾. Das Produkt wurde, wie bei der ersten Chromatographie beschrieben, isoliert und über Nacht bei RT./10⁻³ Torr getrocknet. Das als amorpher Festkörper isolierte F430M ist sowohl in fester Form, als auch in CH₂Cl₂ gelöst, gegenüber Luft stabil. Ausbeute: 14,5 mg (ca. 75%).

*Spektroskopische Daten von Faktor F430M*³⁹⁾. – UV./VIS. (H₂O): 431 (23100), 418 (S, 21500), 296 (S, 10500), 274 (20000) nm (ε); vgl. Fig. 1b. – UV./VIS. (2N H₂SO₄): 440 (7100) S, 380 (16800), 364 (15600) S, 276 (10600) S, 245 (13900) S. – CD. (H₂O): 502 (–4,18), 456 (0), 432 (+14,1), 390 (0), 361 (–4,18), 333 (0), 322 (S, +2,91), 284 (+26,7), 248 (0), 229 (–6,13), 218 (–5,99), 209 (0) nm (Δε); vgl. Fig. 2b. – IR. (CHCl₃): 3660w, 3480w, 3410w, 3360w, 3200w, 1733s (mit S bei 1700), 1676m, 1650m, 1570m, 1532w, 1470m, 1438m, 1413w, 1381m, 1360m, 1176m, 1090s, 975w, 622m cm⁻¹; vgl. Fig. 3. – ¹H- und ¹³C-NMR.: vgl. Fig. 4 und 6, Tabelle und Kap. 3 unten. – FAB-MS.³⁾ (Kation-Spektrum): 973 (19), 974 (19), 975 (100), 976 (90), 977 (86), 978 (52), 979 (26), 980 (12), 981 (7) m/z (%).

FD-MS.⁵⁾ von Faktor F430M (Ionenquellentemp. 80° C, Lösungsmittel CH₃OH; zur Methodik vgl. [33e]):

m/z		975	976	977	978	979	980	981
Rel. Intensität	Gef. ⁴⁰⁾	100	55	54	26	15	8	3
	Ber. ⁴⁰⁾	100	56	57	28	14	5	3

Zum Vergleich:

FAB-MS. von Nickel(II)-19-acetyl-1,2,2,7,7,12,12,17,17-nonamethyl-corrinat-perchlorat [21]⁴⁾:

m/z		529	530	531	532	533	534	535	536	537
Rel. Intensität	Gef.	5	5	100	41	51	21	13	4	3
	Ber.	–	–	100	36	45	16	8	2	2
		(531 = M ⁺ -ClO ₄ / ⁵⁸ Ni)								

2. ¹³C-markierte Proben von F430M. – Einbau von ALA und Methionin in F430 vgl. [11][12]. Isolierung von ¹³C-markiertem Faktor F430 und Methanolyse zu F430M: siehe oben.

³⁶⁾ Die DC.-Platten³⁷⁾ wurden durch kurzes Eintauchen in eine methanolische NaClO₄-Lösung (10 g/l) imprägniert, 6 Std. an der Luft und anschliessend 4 Std. bei 120° getrocknet.

³⁷⁾ Merck-Fertigplatten, Kieselgel 60; ohne Fluoreszenzindikator; Schichtdicke 0,25 mm; vor Gebrauch einmal mit CH₃OH entwickelt und anschliessend 4 Std. bei 120° aktiviert, um eine Verunreinigung zu entfernen, die im ¹H-NMR.-Spektrum durch ein Singulett bei 1,26 ppm sowie weitere schwächere Signale zwischen 0,2 und 1,0 ppm zu erkennen war.

³⁸⁾ Ohne diese Nachreinigung traten im ¹H-NMR.-Spektrum Signale der in der Fussnote 37 erwähnten Verunreinigung auf.

³⁹⁾ S = Schulter.

⁴⁰⁾ Gefundene Intensitäten: Mittelwert aus 9 verschiedenen Spektren. Die berechneten Intensitäten gelten für M⁺ = C₄₇H₆₁N₆NiO₁₃.

a) *Einbau von L-(Methyl-¹³C)methionin.* L-(Methyl-¹³C)methionin (90% ¹³C; Prochem. BOC Ltd. (London). Konzentration im Einbaumedium: 1,3 mmol/l. Methanolyse: 2,1 mg F430M-Isolat, 80 mg *p*-TsOH, 7 ml CH₃OH; Ausbeute: 1,5 mg F430M; Markierungsgrad: ca. 50% (im ¹H-NMR.-Spektrum anhand der Linienintensitäten der durch ¹H,¹³C-Kopplung von 130 Hz zu scheinbaren Triplettten aufgespaltenen Methylsignale bei 1,11 und 1,20 ppm bestimmt).

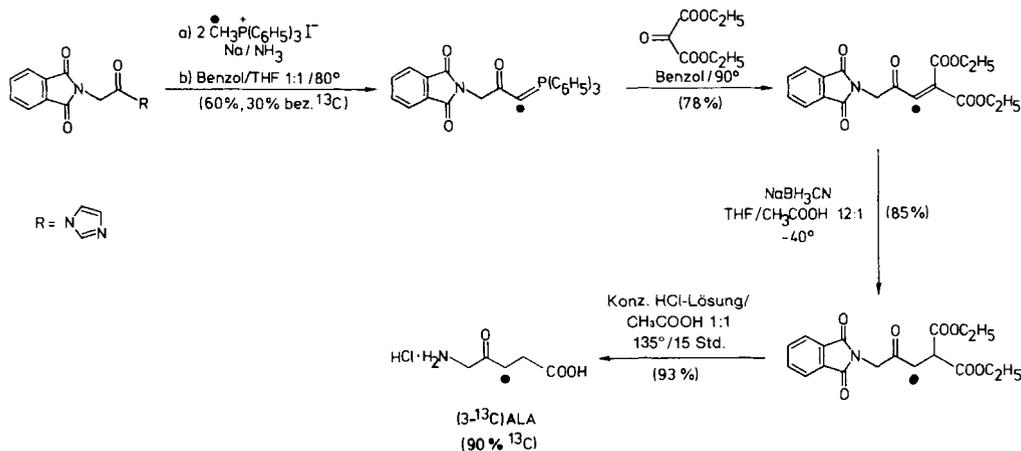
b) *Einbau von (2-¹³C)ALA.* (2-¹³C)ALA (90% ¹³C; in unserem Laboratorium von Etter [42] im Rahmen seiner Promotionsarbeit hergestellt; exper. Details vgl. [42]); Konzentration im Einbaumedium: 0,48 mmol/l. Methanolyse: 2,1 mg F430-Isolat, 70 mg *p*-TsOH, 7 ml CH₃OH; Ausbeute: 1,3 mg F430M; Markierungsgrad⁴¹⁾: ca. 60%.

c) *Einbau von (3-¹³C)ALA.* (3-¹³C)ALA (90% ¹³C) wurde ausgehend von (¹³C)-Methyljodid und Phthaloylglycin gemäss Schema 10 hergestellt; exper. Details in [43]. Konzentration im Einbaumedium: 0,24 mmol/l. Methanolyse: 4,0 mg F430-Isolat, 190 mg *p*-TsOH, 15 ml CH₃OH; Ausbeute: 2,0 mg F430M; Markierungsgrad⁴¹⁾: ca. 30%.

d) *Einbau von (4-¹³C)ALA.* (4-¹³C)ALA (90% ¹³C; CEA, Service des Molécules Marquées de France, Gif-sur-Yvette). Konzentration im Einbaumedium: 0,24 mmol/l; Markierungsgrad⁴¹⁾: ca. 30%. Methanolyse: 5 mg F430-Isolat; 60 mg *p*-TsOH, 6 ml CH₃OH; Ausbeute: 1,8 mg F430M; Markierungsgrad⁴¹⁾: ca. 30%.

e) *Einbau von (5-¹³C)ALA.* (5-¹³C)ALA (90% ¹³C; Merck, Sharp & Dohme Canada, ausgeliefert von IC Chemikalien GmbH, D-8000 München 71). Konzentration im Einbaumedium: 0,24 mmol/l; Markierungsgrad: ca. 50%. Im ¹³C-NMR.-Spektrum anhand der durch ¹³C,¹³C-Kopplung aufgespaltenen Signale (Intensitätsverhältnis *s:d* ≈ 1) bestimmt (vgl. Fig. 5).

Schema 10. *Synthese von (3-¹³C)ALA ausgehend von ¹³CH₃I bzw. (Methyl-¹³C)triphenylphosphoniumjodid [43]*



3. NMR.-Spektroskopie von F430M. – Die ¹H- und ¹³C-NMR.-Spektren wurden auf einem Bruker WM 300 Spektrometer aufgenommen. Die 90°-Pulslänge (5-mm-Probenkopf) betrug 6,5 μs für ¹H und 19 μs für ¹³C. Die ¹H-NMR.-Spektren wurden mit 32K Datenpunkten (0,08 Hz/Pkt.), die ¹³C-Spektren mit 16K (1 Hz/Pt.) gemessen. Für die Differenzspektroskopie wurden 8K oder 16K Datenpunkte verwendet. Alle Spektren wurden mit Quadratur-Empfang akkumuliert. Die Spektren wurden ohne interne Referenz aufgenommen; die angegebenen chemischen Verschiebungen beziehen sich auf die δ-Skala, wobei CHDCl₂ und ¹³CD₂Cl₂ die Werte von 5,33 resp. 53,84 ppm zugeordnet wurden.

Probenherstellung. Die Probe wurde in 0,3 ml CH₂Cl₂ gelöst, mit 1 ml CCl₄ (über CaH₂ dest.) ausgefällt, i. V. eingedampft und der Rückstand 3mal mit je 0,5 ml CCl₄ gewaschen. Anschliessend wurde im

⁴¹⁾ Abgeschätzt aus der Einbaurrate von (4-¹⁴C)ALA unter analogen Einbaubedingungen [11].

Handschuhsack unter N_2 eine Lösung in 0,1 ml CD_2Cl_2 (99% D; über CaH_2 dest.) zubereitet, die mit 0,3 ml CCl_4 verdünnt und i. V. eingengt wurde⁴²). Diese Behandlung wurde 3mal wiederholt, die letzten beiden Male mit reinem CD_2Cl_2 (je 0,1 ml) ohne Zugabe von CCl_4 . Der Rückstand trocknete 30 Min. bei RT. i. HV., bevor er im Handschuhsack unter N_2 in CD_2Cl_2 gelöst und in ein NMR.-Röhrchen filtriert wurde. Die Probenlösung für die 1H - und ^{13}C -NMR.-Spektren (inkl. Entkopplungs- und NOE-Differenzspektren sowie «partially relaxed» NMR.-Spektren) von F430M mit natürlicher Isotopenhäufigkeit wurde durch wiederholtes Ausfrieren i. HV. (10^{-5} Torr) entgast und das NMR.-Röhrchen anschliessend unter Vakuum abgeschmolzen. Die Messlösung wurde zwischen den einzelnen Messungen bei -30° aufbewahrt. Proben geringer Substanzmengen (< 3 mg), wie z. B. die ^{13}C -markierten Proben, wurden in einer (nicht abgeschmolzenen) 5-mm-Mikrozelle gemessen.

Differenz-Entkopplungs-Experimente. Das verwendete Programm akkumuliert abwechselnd je 16 FID mit positivem Vorzeichen und der Entkopplerfrequenz «on-resonance» und 16 FID mit negativem Vorzeichen, Entkopplerfrequenz «off-resonance». Zur weitgehenden Vermeidung der durch die *Bloch-Siegert*-Verschiebung hervorgerufenen schlechten Nullung der nicht entkoppelten Signale wurde die «off-resonance»-Frequenz möglichst nahe bei der «on-resonance»-Frequenz in einen signalfreien Bereich gelegt. In einigen Fällen erwies sich die gleichzeitige Anwendung von Doppelresonanz und «inversion-recovery» als hilfreich bei der Zuordnung überlappender Multipletts.

Nuclear Overhauser Differenz-Spektroskopie. Es wurden zyklisch je 16 FID bei drei verschiedenen «on-resonance»-Entkopplerfrequenzen und einer «off-resonance»-Frequenz akkumuliert und direkt auf den Plattenspeicher geschrieben. Typischerweise wurden insgesamt je 2000 FID akkumuliert. Subtraktion des Null-FID von den drei NOE-FID und anschliessende *Fourier*-Transformation (Linienverbreiterung 1–2 Hz) führte zu NOE-Differenzspektren, in denen scharfe Signale ohne NOE (z. B. Methoxycarbonylgruppen) bis auf ca. 0,3% der ursprünglichen Signalhöhe genullt waren. Wegen der kurzen Relaxationszeiten⁴³) genügten Einstrahlzeiten von 1–2 s für den vollen Aufbau des statischen NOE⁴⁴). Die Entkopplerleistungen lagen zwischen 32 und 42 dB unterhalb 0,2 Watt ($\gamma H_2/2\pi = 60$ bis 20 Hz), wobei oft zugunsten der Selektivität auf volle Sättigung verzichtet wurde⁴⁵). Die relativ hohe, für gleichmässige Bestrahlung von Multipletten benötigte Leistung führte in vielen Fällen zur ungleichmässigen Mitbestrahlung von benachbarten Signalen und damit zu unerwünschten INDOR-Effekten. Diese Schwierigkeit konnte durch abwechselnde Bestrahlung der einzelnen Linien des Multipletts mit niedriger Leistung teilweise behoben werden. Dabei wurde mit einer Umschaltfrequenz von 10–20 Hz jede Linie im Cyclus während 50–100 ms bestrahlt.

4. Ozonolyse von F430M. – In eine Lösung von 5,0 mg ($4,6 \cdot 10^{-3}$ mmol) F430M in 3 ml wasserfreiem Methanol wurde bei $-78^\circ C$ während 15 Min. ozonisierter Sauerstoff eingeleitet (*Fischer* Ozongenerator; 10 l O_2 /Std.), bis die gelbe Farbe der Reaktionslösung in ein schwaches Blassgrün übergegangen war. Man liess auf RT. aufwärmen, spülte 10 Min. mit N_2 und gab 0,2 ml Dimethylsulfid zu. Nach 2 Std. bei RT. wurde die Lösung eingengt und der Rückstand an einer Säule (0,5 \times 11 cm; Kieselgel G für die Dünnschichtchromatographie mit Gipszusatz, *Merck*) unter schwachem N_2 -Druck chromatographiert (Kurzkolonnen-Chromatographie [44]). Äther eluierte als Hauptfraktion 0,6 mg (ca. 50%) eines farblosen Öls ($R_f = 0,27$; mit I_2 sichtbar), gefolgt von Spuren einer nicht weiter identifizierten Komponente ($R_f = 0,16$). Nach Aufnahme eines IR.-Spektrums wurde das Hauptprodukt nochmals wie oben chromatographiert. Von den verbleibenden 0,3 mg Substanz wurde ein CD.- und ein 1H -NMR.-Spektrum aufge-

⁴²) Die Behandlung mit CCl_4 diente zur Entfernung von Wasser und anderer, evtl. vorhandener Lösungsmittelpuren. Vor allem in Lösungen geringer Konzentration (z. B. bei den ^{13}C -markierten Proben) verursachte die Anwesenheit von Wasser oder polarer Lösungsmittel wie CH_3OH eine z. T. starke Verbreiterung und Verschiebung der 1H - und ^{13}C -NMR.-Signale.

⁴³) Abgesehen von den CH_3O -Protonen liegen die experimentellen T_1 -Werte (Nullmethode) zwischen ca. 0,3 s für H_β -C(20) bzw. H_3C -C(7) und 1,0 s für H-C(13).

⁴⁴) Die gemessenen NOE-Effekte (0,5–5%) waren durchwegs kleiner als die theoretisch erwarteten Werte, was, bestätigt durch die kurzen T_1 -Werte, auf eine rel. lange Korrelationszeit schliessen lässt. Abschätzungen aus Lösungsmitteledaten und Molekelradius ergeben $\tau_c = ca. 5 \times 10^{-10}$ Sek., womit die Bedingung $\omega^2 \tau_c^2 \ll 1$ nicht mehr erfüllt und der Maximalwert des NOE deutlich kleiner als 50% ist.

⁴⁵) Die gemessenen NOE-Werte sind deshalb nicht streng quantitativ vergleichbar und werden im *Schema 4* mit «stark», «mittel», und «schwach» qualifiziert.

nommen sowie die optische Drehung bestimmt. – CD. ($2,4 \cdot 10^{-4} \text{M}$ in $\text{C}_2\text{H}_5\text{OH}$, vgl. Fig. 9a): ca. 275 (0), 248 (–0,98), 233 (0), 223 (+0,58), 211 (0) nm ($\Delta\epsilon$). $[\alpha]^{23}$ ($c=0,0031$, $\text{C}_2\text{H}_5\text{OH}$): –36 (589), –32 (578), –32 (546), –87 (436), –135 (365) $^\circ(\text{nm})$ (infolge geringer Messkonzentration relativ ungenaue Werte; Fehlergrenze $\pm 6^\circ$). – IR. (CDCl_3)⁴⁶: 3395w, 1784m, 1730s, 1437m, 1410w, 1371m, 1347m cm^{-1} . – $^1\text{H-NMR}$. (300 MHz, CDCl_3 , vgl. Fig. 10): 7,70 (br. s, 1 H, NH); 3,71/3,68 (2s, je 3 H, CH_3O); 2,91 (*d* × *d*, $J=7$ und 18 Hz, 1 H, H–C(2¹)); 2,78 (Signalhaufen, 3 H, H–C(2), H–C(2¹) und H–C(3)); 2,58 (*t*, $J=7$ Hz, 2 H, $\text{H}_2\text{C}(3^2)$); 1,98–2,22 (*m*, 2 H, $\text{H}_2\text{C}(3^1)$); schwache Fremdsignale bei 1,56 (vermutlich H_2O), 1,2–1,3 (*m*, ca. 0,8 H) und 0,9 (*m*, ca. 0,5 H) ppm. Einstrahlen bei 2,06 ppm führt zu einem s bei 2,58 ppm und zur Veränderung der Signalregion bei 2,78 ppm.

Chiroptische Eigenschaften der Vergleichssubstanzen (–)-3 und (–)-4:

(–)-3: CD. ($3,0 \cdot 10^{-4} \text{M}$ in $\text{C}_2\text{H}_5\text{OH}$, vgl. Fig. 9b): ca. 275 (0), 250 (–0,92), 226 (–0,53) nm ($\Delta\epsilon$). $[\alpha]^{25}$ ($c=0,88$, CHCl_3): –62 (589), –62,5 (578), –68 (546), –126,5 (436), –214 (365).

(–)-4: CD. ($1,5 \cdot 10^{-3} \text{M}$ in $\text{C}_2\text{H}_5\text{OH}$, vgl. Fig. 9c): ca. 275 (0), 248 (–1,82), 223 (–1,04) nm ($\Delta\epsilon$). $[\alpha]^{23}$ ($c=1,00$, CHCl_3): –79 (589), –82,5 (578), –94 (546), –169 (436), –286 (365).

Die CD-Spektren wurden zum direkten Vergleich mit (–)-2 an authentischen Proben von (–)-3 aus [31b] und (–)-4 aus [31a] aufgenommen. Die Drehwerte stammen aus den Dissertationen von P. Löliger und P. Dubs ([31a, b], vgl. auch [31c]).

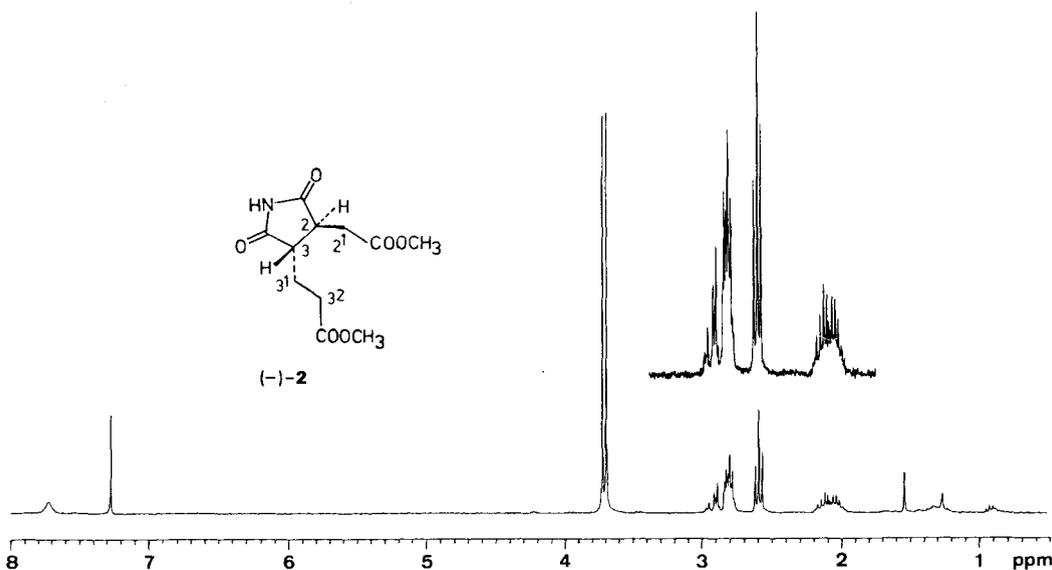


Fig. 10. 300-MHz- $^1\text{H-NMR}$ -Spektrum von (–)-2 ($c=8 \cdot 10^{-3} \text{M}$ in CDCl_3 ; 328 scans)

⁴⁶) Das IR-Spektrum von (–)-2 ist demjenigen von (–)-4 sehr ähnlich: 3395w, 1780m, 1730s, 1457w, 1437m, 1403w, 1382w cm^{-1} (CHCl_3).

LITERATURVERZEICHNIS

- [1] R. P. Gunsalus & R. S. Wolfe, *FEMS Microbiol. Lett.* 3, 191 (1978).
- [2] P. Schönheit, J. Moll & R. K. Thauer, *Arch. Microbiol.* 123, 105 (1979).
- [3] G. Diekert, B. Klee & R. K. Thauer, *Arch. Microbiol.* 124, 103 (1980).
- [4] W. B. Whitman & R. S. Wolfe, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 92, 1196 (1980).
- [5] G. Diekert, U. Konheiser, K. Piechulla & R. K. Thauer, *J. Bact.* 148, 459 (1981).
- [6] W. L. Ellefson & R. S. Wolfe, *J. Biol. Chem.* 256, 4259 (1981); *idem*, in: «Microbial Growth on C₁-compounds» (Ed. H. Dalton), Heyden, London 1981, S. 171.
- [7] J. T. Keltjens & G. D. Vogels, in: l. c. [6], S. 152.
- [8] B. C. McBride & R. S. Wolfe, *Biochemistry* 10, 2317 (1971); C. D. Taylor & R. S. Wolfe, *J. Biol. Chem.* 249, 4879 (1974).
- [9] G. Diekert, B. Weber & R. K. Thauer, *Arch. Microbiol.* 127, 273 (1980).
- [10] G. Diekert, H. H. Gilles, R. Jaenchen & R. K. Thauer, *Arch. Microbiol.* 128, 256 (1980).
- [11] G. Diekert, R. Jaenchen & R. K. Thauer, *FEBS Lett.* 119, 118 (1980).
- [12] R. Jaenchen, G. Diekert & R. K. Thauer, *FEBS Lett.* 130, 133 (1981).
- [13] W. Friedrich, «Vitamin B₁₂ und verwandte Corrinoid» («Fermente, Hormone, Vitamine») (Hrsg. R. Amman, W. Dirscherl) Bd. III/2), Thieme Verlag, Stuttgart 1975, S. 237.
- [14] J. Krzycki & S. G. Zeikus, *Curr. Microbiol.* 3, 243 (1980); P. Scherer & H. Salm, *Acta Biotechnol.* 1, 57 (1981).
- [15] A. Fässler, A. Pfaltz, P. M. Müller, S. Farooq, Ch. Kratky, B. Kräutler & A. Eschenmoser, *Helv. Chim. Acta* 65, 812 (1982).
- [16] a) A. R. Battersby & E. McDonald, «Origin of the Pigments of Life: The Type-III Problem in Porphyrin Biosynthesis», *Accounts Chem. Res.* 12, 14 (1979); b) A. I. Scott, «Application of CMR spectroscopy to the Study of Porphyrin and Corrin Biosynthesis in vitro and in vivo», *Pure Appl. Chem.* 53, 1215 (1981); c) A. R. Battersby & E. McDonald, «Biosynthesis of Porphyrins, Chlorins and Corrins», in: «Porphyrins and Metalloporphyrins», (Ed. K. M. Smith), Elsevier, Amsterdam 1975, S. 61–116; d) A. R. Battersby & E. McDonald, «Biosynthesis of the Corrin Macrocycle», in: «Vitamin B₁₂» (Ed. D. Dolphin), Vol. 1, Wiley-Interscience, N. Y. 1982, S. 107.
- [17] R. Bonnett, in: «The Porphyrins» (Ed. D. Dolphin), Vol. 1, Academic Press, New York 1978, S. 1.
- [18] R. K. Thauer, G. Diekert & P. Schönheit, *Trends Biochem. Sci.* 1980, 304; R. K. Thauer, *Zentralbl. Bakteriol., Mikrobiol. Hyg., Ab. 1, Orig. C*, im Druck.
- [19] G. Diekert, E. G. Graf, H. H. Gilles & R. K. Thauer, unveröffentlicht.
- [20] a) D. H. Williams, C. Bradley, G. Bojesen, S. Santikarn & L. C. E. Taylor, *J. Am. Chem. Soc.* 103, 5700 (1981); b) M. Barber, R. S. Bordoli, R. D. Sedgwick & A. N. Tyler, *Nature* 293, 270 (1981).
- [21] V. Rasetti, A. Pfaltz, Ch. Kratky & A. Eschenmoser, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 78, 16 (1981); V. Rasetti, K. Hilpert, A. Fässler, A. Pfaltz & A. Eschenmoser, *Angew. Chem.* 93, 1108 (1981); *ibid.* *Int. Ed. Engl.* 20, 1058 (1981).
- [22] F. W. Wehrli & T. Wirthlin, «Interpretation of ¹³C-NMR Spectra», Heyden, London 1978, S. 145, 265.
- [23] H. Fischer & W. Orth, «Die Chemie des Pyrrols» II. Band, Leipzig 1937, S. 176 (Reprint-Ausgabe, Johnson Reprint Corporation 1968).
- [24] a) G. Schlingmann, B. Dresow, L. Ernst & V. B. Koppenhagen, *Justus Liebigs Ann. Chem.* 1981, 2061; b) G. Schlingmann, *Diss. TU Braunschweig* 1979; c) B. Dresow, *Diss. TU Braunschweig* 1978; d) G. Schlingmann, B. Dresow, V. B. Koppenhagen, W. Becker & W. S. Sheldrick, *Angew. Chem.* 92, 304 (1980); *ibid.* *Int. Ed. Engl.* 19, 321 (1980); e) A. Gossauer, B. Grüning, L. Crust, W. Becker & W. S. Sheldrick, *Angew. Chem.* 89, 486 (1977); *ibid.* *Int. Ed. Engl.* 16, 481 (1977).
- [25] A. Eschenmoser, *Quart. Rev.* 24, 366 (1970); A. Eschenmoser, *Chem. Soc. Rev.* 5, 377 (1976).
- [26] D. Lloyd & H. McNab, *Angew. Chem.* 88, 496 (1976); *ibid.* *Int. Ed. Engl.* 15, 459 (1976).
- [27] A. P. Johnson, P. Wehrli, R. Fletcher & A. Eschenmoser, *Angew. Chem.* 80, 622 (1968); *ibid.* *Int. Ed. Engl.* 7, 623 (1968); P. M. Müller, S. Farooq, B. Hardegger, W. S. Salmond & A. Eschenmoser, *Angew. Chem.* 85, 954 (1973); *ibid.* *Int. Ed. Engl.* 12, 914 (1973).
- [28] L. D. Hall & J. K. M. Sanders, *J. Am. Chem. Soc.* 102, 5703 (1980).
- [29] R. Richarz & K. Wüthrich, *J. Magn. Reson.* 30, 147 (1978); G. E. Chapman, B. D. Abercrombie, P. D. Cary & E. M. Bradbury, *J. Magn. Reson.* 31, 459 (1978).

- [30] *D. Bormann, A. Fischli, R. Keese & A. Eschenmoser*, *Angew. Chem.* 79, 867 (1967); *ibid.* *Int. Ed. Engl.* 6, 868 (1967); *E. L. Winnacker*, «Ligandreaktivität synthetischer Kobalt(III)-Corrin-komplexe», *Diss. ETH* Nr. 4177, *Juris Druck + Verlag, Zürich* 1968, S. 10–17.
- [31] a) *P. Löliger*, «Darstellung eines die Ringe B und C umfassenden Zwischenprodukts zur Synthese von Vitamin B₁₂», *Diss. ETH* Nr. 4074, *Juris Druck + Verlag, Zürich* 1968, S. 66–69; b) *P. Dubs*, «Beiträge zur Synthese von Vitamin B₁₂», *Diss. ETH* Nr. 4297, *Juris Druck + Verlag, Zürich* 1969, S. 34; c) *M. Imfeld*, «Zur Kenntnis der Methylierungsprozesse in der Biosynthese von Vitamin B₁₂ und von Methylcobalamin», *Diss. ETH (Gruppe Prof. Arigoni)* Nr. 6565, *Juris Druck + Verlag, Zürich* 1980.
- [32] *H. Brockmann jr.*, *Justus Liebigs Ann. Chem.* 754, 139 (1971); *H. Brockmann & R. Tacke-Karimadian*, *ibid.* 1979, 419.
- [33] a) *A. R. Battersby, K. Jones, E. McDonald, J. A. Robinson & H. R. Morris*, *Tetrahedron Lett.* 1977, 2213; *A. R. Battersby, E. McDonald, H. R. Morris, M. Thompson, D. C. Williams, V. Ya. Bykhovskiy, N. I. Zaitseva & V. N. Bukin*, *ibid.* 1977, 2217; *A. R. Battersby, E. McDonald, M. Thompson, V. Ya. Bykhovskiy*, *ibid.* 1978, 150; b) *A. I. Scott, A. J. Irwin, L. M. Siegel & J. N. Shoolery*, *J. Am. Chem. Soc.* 100, 316 und 7987 (1978); c) *M. J. Murphy, L. M. Siegel, H. Kamin & D. Rosenthal*, *J. Biol. Chem.* 248, 251 und 2801 (1973); d) *V. Ya. Bykhovskiy, N. I. Zaitseva & V. N. Bukin*, *Dokl. Akad. Nauk SSSR* 224, 1431 (1975), engl. Übersetzung: *ibid.* (*Biochem. Sect.*) 224, 454 (1975); e) *K. H. Bergmann, R. Deeg, K. D. Gneuss, H. P. Kriemler & G. Müller*, *Z. Physiol. Chem.* 358, 339 (1977).
- [34] *D. Crowfoot-Hodgkin, J. Kamper, J. Lindsey, M. Mackay, J. Pickworth, J. H. Robertson, C. B. Shoemaker, J. G. White, R. J. Prosen & K. N. Trueblood*, *Proc. Roy. Soc. A242*, 288 (1957).
- [35] *R. B. Woodward*, *Pure Appl. Chem.* 33, 145 (1973); *A. Eschenmoser*, *Pure Appl. Chem. Suppl.* 1971 (23. *Int. Congress, Boston*), Vol. 2, 69; *A. Eschenmoser & C. Wintner*, *Science* 196, 1410 (1977).
- [36] *L. Agius, J. A. Ballantine, V. Ferrito, V. Jaccarini, P. Murray-Rust, A. Pelter, A. F. Psaila & P. J. Schembri*, *Pure Appl. Chem.* 51, 1847 (1979).
- [37] *R. B. Woodward*, «Totalsynthese des Chlorophylls», *Angew. Chem.* 72, 651 (1960).
- [38] *A. P. Johnson, P. Wehrli, R. Fletcher & A. Eschenmoser*, *Angew. Chem.* 80, 622 (1968); *ibid.* *Int. Ed. Engl.* 7, 623 (1968).
- [39] *J. E. Johansen, V. Piermattie, Ch. Angst, E. Diener, Ch. Kratky & A. Eschenmoser*, *Angew. Chem.* 91, 273 (1981); *ibid.* *Int. Ed. Engl.* 20, 261 (1981).
- [40] *R. Schwesinger, R. Waditschatka, J. Rigby, R. Nordmann, W. B. Schweizer, E. Zass & A. Eschenmoser*, *Helv. Chim. Acta* 65, 600 (1982).
- [41] *A. Eschenmoser*, «Über organische Naturstoffsynthese: von der Synthese des Vitamins B₁₂ zur Frage nach dem Ursprung der Corrinstruktur», *Nova Acta Leopoldina, Neue Folge* Nr. 247, Bd. 55, J. A. Barth, Leipzig 1982, S. 5–47; *A. Eschenmoser*, in: «Vitamin B₁₂ (*Proc. 3rd Europ. Symp. Zürich*)», (Hrsg. B. Zagalak, W. Friedrich), W. de Gruyter, Berlin 1979, S. 89.
- [42] *R. Etter*, «Derivate der Chlorophyll-Reihe», *Diss. ETH* Nr. 6384, *aku-Fotodruck, Zürich* 1979, S. 164–177.
- [43] *A. Fässler*, *Diss. ETH Zürich* (in Vorbereitung).
- [44] *B. J. Hunt & W. Rigby*, *Chem. Ind. (London)* 1967, 1868.
- [45] *J. Jeener, B. H. Meier, P. Bachmann & R. R. Ernst*, *J. Chem. Phys.* 71, 4546 (1979).