

40. Zur Kenntnis des Faktors F430 aus methanogenen Bakterien: Struktur des proteinfreien Faktors

von Douglas A. Livingston, Andreas Pfaltz, Jakob Schreiber und Albert Eschenmoser*

Laboratorium für Organische Chemie der Eidgenössischen Technischen Hochschule, Universitätstrasse 16, CH-8092 Zürich

und Dorothe Ankel-Fuchs, Johanna Moll, Rolf Jaenchen und Rudolf K. Thauer

Fachbereich Biologie, Mikrobiologie der Philipps Universität Marburg, Lahnberge, D-3550 Marburg/Lahn

(23.XI.83)

Factor F430 from Methanogenic Bacteria: Structure of the Protein-free Factor

Summary

Factor F430, the porphinoïd nickel-containing coenzyme of the methylcoenzyme-M reductase of methanogenic bacteria is shown to be the 3³,8³,12²,13³,18²-pentaacid derivative of the pentamethylester F430M, the structure of which had been determined previously (see structural formulae 1 and 2). The structure assignment rests on chromatographic, UV/VIS-, CD-, IR-, and ¹³C-NMR-spectroscopic as well as FAB-mass spectral comparison of F430 with F430M and the pentaacid prepared by acid-catalyzed hydrolysis of F430M.

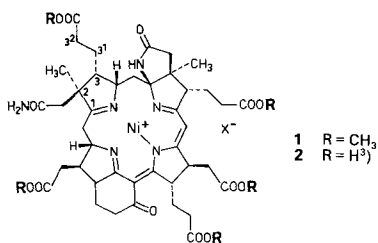
In the cells of *Methanobacterium thermoautotrophicum*, factor F430 is present in a 'bound' and also, depending on the growth conditions, in a 'free' form, the latter being defined as the part of total F430 that can be extracted from the cells under extremely mild conditions (80% EtOH at 0–4°). From the (protein)-'bound' form, F430 is extracted by subsequently treating the cells at 0–4° with 80% EtOH containing (*e.g.*) 2M LiCl.

From both sources, the extracted factor is the same pentaacid, and there is no indication for the existence of a protein-free F430 species that would contain additional (covalently bound) structural elements.

In unserer vorangegangenen Mitteilung [1] zur Kenntnis des Faktors F430 [2], eines Bestandteils der Methylcoenzym-M-Reduktase aus methanogenen Bakterien [3], haben wir über die Strukturermittlung von F430M mittels biosynthetischer, chemischer und instrumentalanalytischer Methoden berichtet. F430M ist das Perchlorat eines durch säurekatalysierte Methanolyse von F430-Isolaten [4] gewonnenen, chromatographisch und spektroskopisch einheitlichen Ni(II)-Komplexes, für den wir die Struktur 1 (X = ClO₄)¹) abgeleitet haben [1]. Seine charakteristischen UV/VIS- und CD-spektroskopischen Daten unterscheiden sich kaum von jenen, welche bislang der spektroskopischen Definition [2], Erkennung und Gehaltsbestimmung [2] [4] des natürlichen Faktors in F430-Isolaten aus methanogenen Bakterien gedient haben. Deshalb nahmen wir

¹) Die Zuordnung der Chiralität von 1 im Bereiche der Ringe A und B (jedoch nicht des Rings C) sowie der Konfiguration an C(17) sind bislang experimentell nicht direkt belegt [1].

an, dass das Chromophorsystem des bis anhin nicht als einheitlicher Stoff isolierten Faktors F430 und jenes seines Methanolyseprodukts F430M identisch sind. Hingegen wurde die Frage offen gelassen, ob im natürlichen Faktor zusätzliche Strukturelemente vorkommen, welche z. B. über Carboxylfunktionen kovalent mit dem Ligandsystem von F430 verknüpft sein könnten und damit durch die Strukturermittlung des Methanolyseprodukts F430M (ein Heptacarbonsäure-pentamethylester-Derivat) unerfasst geblieben wären. Vermutungen in dieser Richtung ergaben sich aus Beobachtungen, wonach gereinigte F430-Isolate gelchromatographisch (scheinbare) Molekulargewichte um 1500 andeuteten, und Totalhydrolysate (6N HCl, 100°) von F430-Isolaten verschiedenen Reinigungsgrades nebst NH₃ die Aminosäuren Glutaminsäure, Asparaginsäure und Glycin (in allerdings wechselnden Äquiv.-Verhältnissen) enthielten [5]. Darüber hinaus haben kürzlich *Keltjens et al.* [6] [7] ihre Interpretation experimenteller Beobachtungen beschrieben, aufgrund derer sie die Auffassung vertreten, dass sowohl Coenzym M (β -Mercapto-äthansulfonat) [6] als auch ein Tetrahydrolumazin-Derivat [7] Bestandteil des Faktors F430 (von den Autoren «Coenzym MF430» genannt) seien, sofern man denselben nicht durch Extraktion mit HClO₄ (pH 2, 0°) [2] [1], sondern durch Behandlung der Methylcoenzym-M-Reduktase mit 80% MeOH- (80°) bzw. durch Extraktion der Bakterien mit 40–60% EtOH bei 80° gewinne²⁾.



Wir beschreiben hier die Experimente, welche wir zur Aufklärung der Struktur der natürlichen Form von Faktor F430 durchgeführt haben. Die Ergebnisse dieser Versuche besagen, dass der aus den Zellen von *Methanobacterium thermoautotrophicum* (Stamm Marburg) extrahierbare Faktor F430 nichts anderes ist als die dem Methanolyseprodukt F430M entsprechende Pentacarbonsäure 2.

Die naheliegende Meinung, dass Isolierung und Erkennung der einem bekannten Pentamethylester entsprechenden Pentacarbonsäure eigentlich keine besonderen Probleme stellen sollten, verfehlt im vorliegenden Fall deshalb die Realität, weil der thermolabile [4], luftempfindliche, in Lösungsmitteln wie H₂O und MeOH, aber nicht in den üblichen organischen Lösungsmitteln lösliche Faktor F430 als corphinoider, positiv geladener Nickel(II)-Komplex in seinen (nukleophilen) Lösungsmitteln paramagnetisch ist. Damit entfallen die üblichen Möglichkeiten der ¹H- und ¹³C-NMR-spektroskopischen Charakterisierung, dies im Unterschied zum Pentamethylester F430M, der (glücklicherweise) in absolut wasserfreiem (nicht-nukleophilem) CH₂Cl₂ gut löslich und hierin diamagnetisch ist⁴⁾.

²⁾ Über weitere von der Arbeitsgruppe von *Vogels* zur Aufklärung der Struktur von nativem Faktor F430 angestellte Experimente vgl. [8].

³⁾ Bzw. deprotonierte Formen ohne externes Gegen-Ion.

⁴⁾ F430M ist in MeOH ebenfalls paramagnetisch. Vgl. hierüber auch [9].

Zu Beginn unserer Untersuchungen über die Struktur der natürlichen Form des Faktors waren wir von der Annahme ausgegangen, dass wir es mit einer Verbindung zu tun haben würden, deren Molekulargewicht dasjenige von F430M um *ca.* 500 übersteigt (vgl. oben). Substrat unserer anfänglichen Experimente war das früher [1] [4] beschriebene, nach der HClO_4 (pH 2, 0°)-Extraktionsmethode gewonnene F430-Isolat. Im Zuge von Versuchen, durch *O*-Alkylierung die Zahl der freien Carboxylgruppen zu erfassen, wurden methanolische Lösungen solcher Isolate mit Diazomethan (0°, 5 Min.) behandelt und dabei Reaktionsgemische gewonnen, aus welchen sich im DC (Silicagel, AcOEt/AcOH/H₂O 5:2:2) u. a. eine gelbe Hauptzone (R_f 0,60, Chromophorausb. *ca.* 30%) abtrennen liess. Ihr Eluat war in CH_2Cl_2 (auch in H_2O) löslich⁵⁾ und nach DC mit F430M nicht identisch, wies jedoch praktisch gleiche UV/VIS- und CD-Spektren auf wie dieses. Das FAB-MS ('fast atom bombardment' MS) zeigte einen klaren Hauptpik bei *m/g* 961 (M^+ des Pentamethylesters F430M bei 975), das ¹H-NMR-Spektrum jedoch nicht 4, sondern insgesamt 8 Methylestersingletts (Gemisch von konstitutionsisomeren Tetramethylester-monocarbonsäuren?). Dies war der erste Hinweis darauf, dass es sich bei F430 um die Pentacarbonsäure von F430M handeln könnte. Bestärkt wurde der Hinweis durch die Ergebnisse analog durchgeführter Alkylierungsexperimente mit Diazoäthan: im DC eines solchen Versuchs trat eine Hauptzone auf (Chromophorausb. *ca.* 50% gemäss $\epsilon_{430\text{ nm}}$; löslich in CH_2Cl_2), deren Eluat im FAB-MS den Hauptpik bei 1045 aufwies (rel. Molekularmasse des Pentaäthylesters) und im HPLC (*Lichrosorb Si 100-5 μ* ; $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeCN}/\text{MeOH}/1\text{M LiClO}_4$ (H_2O) 100:25:5:1; $N = 12000$) von einer durch säurekatalysierte Äthanolyse von F430-Isolat erhaltenen Pentaäthylester-Fraktion⁶⁾ nicht zu unterscheiden war. Als man jedoch versuchte, diese Veresterung an DC-gereinigten⁷⁾ F430-Fractionen (*ex* Zell-Extraktion mit HClO_4 [4] [1]) durchzuführen, waren obige Beobachtungen nicht reproduzierbar. In jene Zeit fiel unsere Beobachtung, dass F430 bereits unter ausserordentlich milden, neutralen Bedingungen, d. h. mit 80% EtOH bei 0–4°, aus Bakterienzellen freigesetzt werden kann. Auch so gewonnene und chromatographisch zusätzlich gereinigte Isolate konnten mit Diazoäthan nicht mehr brauchbar verestert werden. Der anfänglich beobachtete, relativ leichte Verlauf der alkylierenden Veresterung mit Diazoalkanen hatte anscheinend die Anwesenheit von Säurespuren in den damals verwendeten F430-Isolaten zur Voraussetzung gehabt. Schliesslich wurde festgestellt, dass Proben zweier F430-Isolate, von denen die eine aus einer Extraktion der Bakterienzellen mit HClO_4 (pH 2) und die andere aus einer Extraktion mit 80% EtOH (beide um 0°) stammte, im DC je eine gelbe Hauptzone zeigten, die in zwei Lösungsmittel-Systemen⁸⁾ nicht zu unterscheiden waren. Dies führte zum Entschluss, einen direkten Vergleich von F430 mit der partialsynthetisch durch säurekatalysierte Hydrolyse von F430M herzustellenden Pentacarbonsäure anzustreben. Die hierzu durchgeführten Isolierungs-, Reinigungs- und Charakterisierungsoperationen sind in den *Schemata 1* und *2* zusammengefasst.

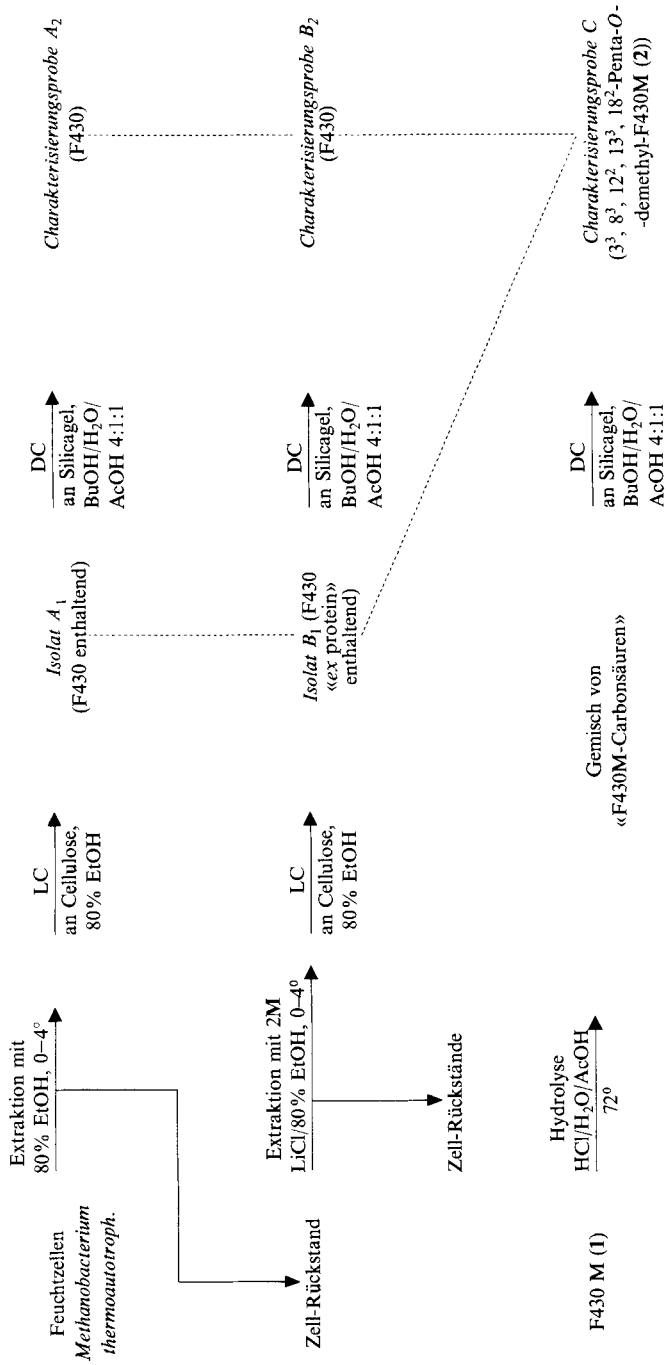
⁵⁾ Lösungen dieses Materials in CH_2Cl_2 waren relativ luftstabil, sofern Spuren von AcOH anwesend waren, jedoch luftempfindlich (rasche Bildung von violetterm Dehydrierungsprodukt, vgl. [9]) in Abwesenheit der Säurespuren.

⁶⁾ Herstellungsweise analog jener für F430M (vgl. [1]) mit EtOH statt MeOH.

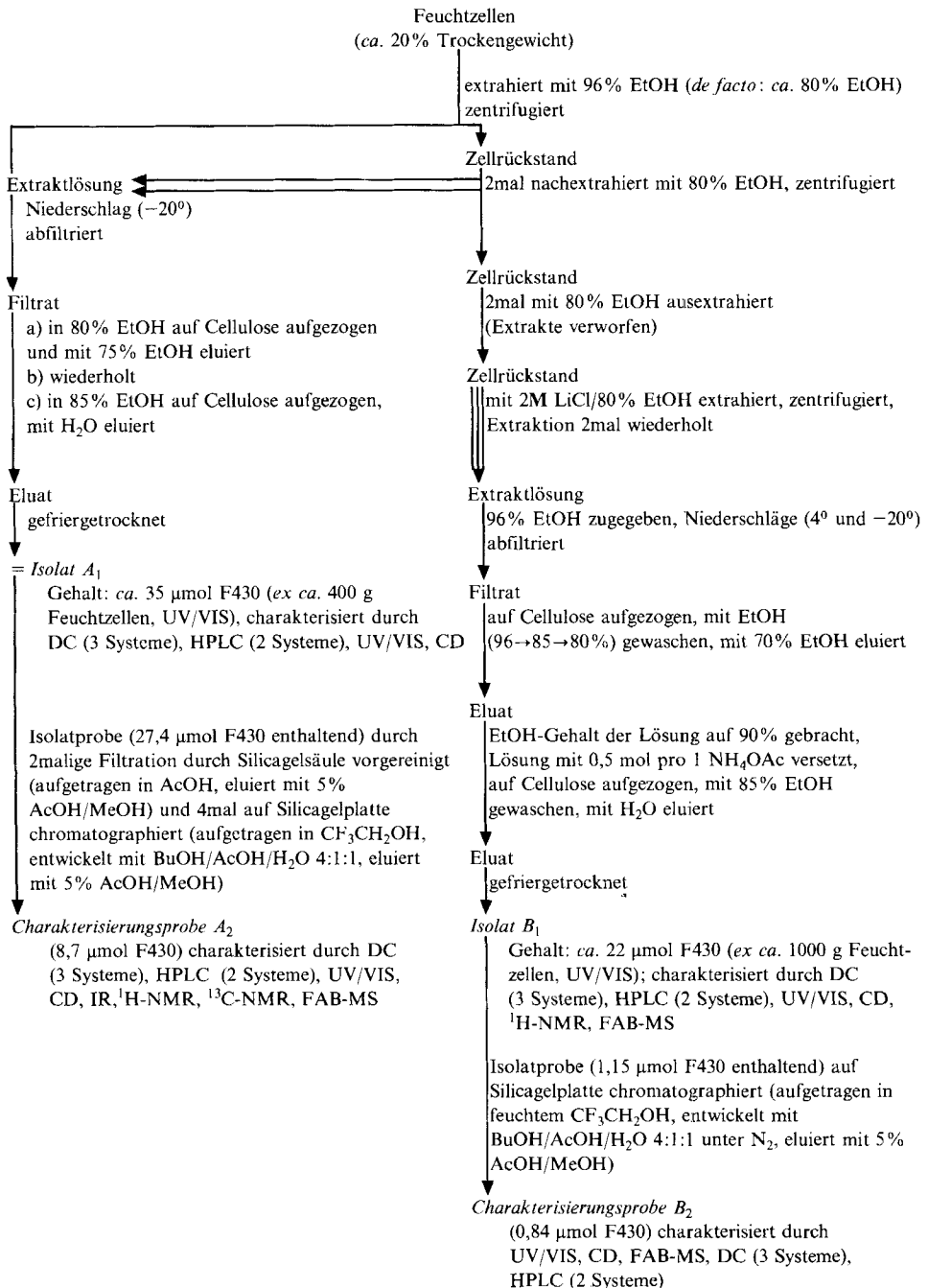
⁷⁾ DC-System von *Keltjens et al.* [6]: Silicagel, BuOH/AcOH/H₂O 4:1:1.

⁸⁾ AcOEt/AcOH/H₂O 5:2:2 und BuOH/AcOH/H₂O 4:1:1 vgl. [6].

Schema 1. Übersicht der Isolierung und Charakterisierung von F430. Chromatographische und spektroskopische Vergleiche sind mit angedeutet.



Schema 2. Isolierung von Faktor F430 aus *Methanobacterium thermoautotrophicum* (Stamm Marburg). Gehalt ca. 0,2 μmol pro g Feuchtzellen. Alle Operationen bis zu den *Isolaten A₁* und *B₁* bei 0-4°C (ohne Luft-ausschluss) ausgeführt, anschliessend bei Raumtemperatur.



Bestimmend für die Beschreibung der zwei im *Schema 2* im Detail aufgeführten Isolierungswege für die F430-Isolate A_1 und B_1 war folgende Beobachtung: Lässt man Bakterien in Ni-suffizientem Medium exponentiell wachsen, so können bis zu zwei Drittel der Menge des in den Zellen enthaltenen F430 direkt mit 80% EtOH bei 0–4° aus den Zellen herausgelöst werden. Der Rest an F430 bleibt unter diesen Extraktionsbedingungen zellgebunden, lässt sich aber bei 0–4° mit 80% EtOH, das 2M LiCl⁹⁾ enthält, leicht und vollständig extrahieren. Zwingt man die Bakterien durch Ni-Limitation zu linearem Wachstum, so enthalten die Zellen praktisch überhaupt keinen «freien», d. h. durch salzfreies 80% EtOH extrahierbaren Faktor, sondern nur «gebundenen», d. h. solchen, der sich durch 2M LiCl/80% EtOH aus den Zellen herauslösen lässt. Unsere Verwendung eines Lithiumsalzes zur extraktiven Freisetzung des «gebundenen» Faktors geht auf die arbeitshypothetische Vorstellung zurück, wonach die «Bindung» des (kationischen) Faktors mit dem Proteinteil des Holoenzym (im einfachsten Fall) in einer Ionenpaarung besteht. In der Tat gibt gereinigte Methylcoenzym-M-Reduktase beim Kontakt mit 2M LiCl/80% EtOH bei 0–4° den Faktor F430 rasch in die Lösung ab.

Wie aus *Schema 2* hervorgeht, enthält das *Isolat A₁* jenen Faktoranteil, der in den Bakterienzellen in «freier» Form vorkommt (bereits durch *salzfreies* 80% EtOH extrahierbar), während *Isolat B₁* jenen Faktoranteil erfasst, der in der Bakterienzelle in «gebundener» Form enthalten ist (nur durch *salzhaltiges* 80% EtOH extrahierbar). Beide Isolate sind (gefriergetrocknete) Substanzgemische, deren chromatographische Isolierung (Säulenchromatographie an Cellulose) sich nach dem UV/VIS-spektroskopischen Kriterium der Absorption bei 430 nm ausrichtete. Beide Isolate zeigten in drei verschiedenen DC-Systemen (vgl. *Exper. Teil*) unter mehreren (z. T. nur im UV-Licht erkennbaren) Flecken je einen gelben Hauptfleck, der in beiden Fällen im direkten Vergleich (Cochromatographie) von durch Hydrolyse von F430M erhaltenen 3³,8³,12²,13³,18²-Penta-*O*-demethyl-F430M (**2**; vgl. unten) nicht unterscheidbar war. Auch in zwei HPLC-Systemen (vgl. *Exper. Teil*) mit Detektion bei 430 nm zeigten die *Isolate A₁* und B_1 je eine Hauptfraktion mit identischer Retentionszeit, wobei wiederum beide bei der Cochromatographie mit Proben des Penta-*O*-demethyl-F430M **2** von letzterem nicht zu unterscheiden waren.

Versuche zur Isolierung einer einheitlichen F430-Probe wurden besonders ausgehend von *Isolat A₁* durchgeführt. Vorversuche hatten gezeigt, dass das in *Isolaten* des Typs A_1 vorhandene lipophile Ballastmaterial (gewichtsmässig weitaus den Hauptanteil des Materials ausmachend) eine direkte DC-Isolierung von F430 erschwert; Vorreinigung des Materials durch zweifache Filtration in 5% AcOH/MeOH durch Kieselgel entfernte diesen Ballast. Viermalige DC-Trennung an Kieselgel (vgl. *Schema 2*) führte dann in ca. 30% Chromophorausbeute zu einer DC-einheitlichen (amorphen, gelben) *Charakterisierungsprobe A₂*, deren UV/VIS-absorbierender Anteil gemäss HPLC-Analyse zu etwa 90% aus einer Hauptkomponente bestand; diese war in drei DC-Systemen sowie in zwei HPLC-Systemen (normal und 'reverse phase') chromatographisch vom durch säurekatalysierte Hydrolyse von F430M gewonnenen Penta-*O*-demethyl-F430M **2** nicht zu unterscheiden. Die HPLC-Identität der F430-Komponente vor und nach der

⁹⁾ LiCl ist nicht spezifisch, ähnlich wirksam war z.B. auch NaClO₄.

DC-Reinigung zeigt, dass letztere keine strukturellen Veränderungen an F430 bewirkt. Der Gewichtsanteil von F430 in der *Charakterisierungsprobe* A_2 betrug 63% (ber. gemäss ϵ_{430} im UV/VIS). Unter den vier im HPLC erkannten, chromophor-haltigen Beimengungen befanden sich (gemäss Retentionszeiten) die Diastereomeren 13-Epi-F430 (1%) und 12,13-Diepi-F430 (3%) sowie das 12,13-Didehydro-Derivat F560 (5–10%)¹⁰⁾. Die letztgenannte (violette) Verunreinigung (zu erkennen an langwelliger Endabsorption in VIS- und CD-Spektrum) kann zwar im DC von der F430-Zone unschwer abgetrennt werden (vgl. *Exper. Teil*), entsteht jedoch immer wieder von neuem bei Reinigungs- und Charakterisierungsoperationen an der Luft. *Fig. 1* zeigt das UV/VIS- und das CD-Spektrum einer F560-freien A_2 -Probe, die eigens zu Charakterisierungszwecken unter Luftausschluss in entgastem Lösungsmitteln rechromatographiert und spektroskopisch untersucht (H_2O) worden war. Die Spektren entsprechen in allen Details den in H_2O aufgenommenen Spektren der Reinverbindung F430M (abgebildet in [1] S. 832 und 833).

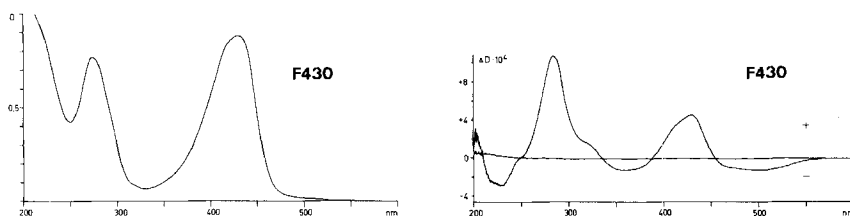


Fig. 1. UV/VIS- und CD-Spektrum von F430 in H_2O . Unter Luftausschluss rechromatographierte, in entgastem H_2O untersuchte Probe *ex* A_2 .

Die Eigenschaft des Faktors F430, in seinen Lösungsmitteln (H_2O , MeOH) *paramagnetisch* zu sein, machte die Aufgabe seines Vergleichs mit der Pentasäure **2** mittels NMR-Spektroskopie zu einem besonderen Problem. Untersuchungen an einem total-synthetischen Modellkomplex von F430 hatten gezeigt, dass die UV/VIS-Spektren von Ni(II)-Komplexen dieses Strukturtyps von der Nukleophilie des Lösungsmittels abhängen, und zwar dergestalt, dass man aus der Detailstruktur der UV-Bande solcher Spektren erkennen kann, ob der Komplex im betreffenden Lösungsmittel diamagnetisch (tetracoordiniert; z. B. in CH_2Cl_2) oder paramagnetisch (vermutlich hexacoordiniert; z. B. in H_2O , MeOH) vorliegt¹¹⁾. Ein Vergleich der UV/VIS-Spektren von F430M in MeOH⁴⁾ und CH_2Cl_2 liess ebenfalls spezifische (wenn auch geringere) Unterschiede in Struktur und Lage der Absorptionsbanden erkennen (vgl. [9]). In einer Suche nach *nicht-nukleophilen* Lösungsmitteln für F430 wurde gefunden, dass *Trifluoräthanol* für den Vergleich der ^{13}C -NMR-Spektren von F430 und der Pentasäure **2** ein brauchbares Lösungsmittel darstellt. Im 1H -NMR-Spektrum in Trifluoräthanol ist die durch Paramagnetismus bedingte Signalverbreiterung allerdings immer noch zu gross, als dass ein signifikanter 1H -NMR-Vergleich der Proben möglich gewesen wäre (vgl. *Exper. Teil*).

¹⁰⁾ Zur Isolierung und Strukturermittlung der Ring-C-Diastereomeren von F430 und F430M sowie deren Didehydro-Derivats F560 bzw. F560M vgl. [9].

¹¹⁾ Vgl. eine demnächst erscheinende Arbeit aus unserem Laboratorium sowie [10].

Tabelle 1. $^{13}\text{C-NMR}$ -Daten von F430 (Charakterisierungsproben A_2 und C) und F430M

$A_2^a)$ (vgl. Fig. 10)	$C^a)$ (vgl. Fig. 10)	F430M ^{b)} (vgl. [1])	Zuordnung für F430 [1]
199,5	199,4	194,6	C(17 ³)
190,2	190,1	188,9	C(1)
180,5	180,5 (2C?)	176,9	C(16) od. C(14)
180,3		176,7	C(9)
179,8	179,9	173,6	} ($\begin{matrix} -\text{COO}-, \\ -\text{CON}, \\ \text{C(14) od. C(16)} \end{matrix}$)
179,6 (2C)	179,7 (2C?)	173,5	
179,3	179,3	173,4	
177,9	177,8 (2C?)	173,1	
177,7		172,6 (2C)	
175,6	175,6	172,3	
174,7	174,7	171,7	
171,7	171,7	169,2	
110,4	110,4	109,6	C(15)
100,3	100,4	98,4	C(10)
94,2	94,1	92,3	C(6)
66,9	66,9	65,5	C(4)
65,1	65,1	63,7	C(19)
58,5	58,4	57,0	C(8)
55,9	55,9	54,8	C(2)
51,8	51,8	50,8	C(13)
51,4 (2C?)	51,4 (2C?)	50,3	C(17)
		50,2	C(7)
47,6	47,7	45,5 }	C(12), C(18)
46,4	46,5	45,2 }	
45,4	45,4	44,3	C(3)
44,8	44,7	43,8 }	C(2 ¹), C(7 ¹)
43,3	43,2	42,1 }	
41,9		39,7 }	C(12 ¹), C(17 ²)
39,4	39,4	38,7 }	
38,1	38,0	36,1	C(5)
37,5	37,5	34,7	C(18 ¹)
35,3	35,4 (2C)	32,8 }	C(3 ²), C(8 ²), C(13 ²)
35,1		32,6 }	
33,1	33,3	31,7 }	
31,1	31,2	29,8	C(13 ¹)
29,5	29,5	28,4	C(20)
26,6	26,6	25,7 }	C(3 ¹), C(8 ¹), C(17 ¹)
23,9	24,0	22,4 }	
22,1	22,0	20,2 }	
20,6	20,6	20,2	
15,5	15,6	15,6	$\text{CH}_3\text{-C}(7^1)$

a) In $\text{CF}_3\text{CD}_3\text{OD}$, δ -Werte in ppm bezogen auf $\delta(\text{CF}_3\text{CD}_2\text{OD}) = 126,27$ ppm (q). A_2 : ca. $6 \cdot 10^{-2}\text{M}$, $5 \cdot 10^5$ 'scans'; C: ca. $3 \cdot 10^{-2}\text{M}$, $3 \cdot 10^5$ 'scans'.

b) In CD_2Cl_2 , δ -Werte in ppm bezogen auf $\delta(\text{CD}_2\text{Cl}_2) = 58,84$ ppm; Numerierung der C-Atome vgl. [1]. Die Signale der 5 CH_3O -Gruppen bei 52,0–52,5 ppm sind nicht aufgeführt.

Tab. 1 gibt die $^{13}\text{C-NMR}$ -Daten der Charakterisierungsprobe A_2 und des Penta-*O*-demethyl-F430M **2** (Charakterisierungsprobe C) in Gegenüberstellung mit den bekannten Daten [1] des entsprechenden Pentamethylesters F430M. Mit Ausnahme eines im Spektrum der Probe A_2 bei 41,9 ppm (C(12¹)) oder C(17²)) auftretenden und im Spektrum

der *Probe C* vermutlich als Folge des ungünstigeren Signal/Rausch-Verhältnisses nicht erkennbaren Signals entsprechen sich die 40 Signale der beiden Spektren meist innerhalb 0,1 ppm (drei Signalaare im Spektrum von *C* nicht aufgelöst; vgl. *Fig. 10* im *Exper. Teil*).

Die Identität der F430-Komponenten der *Proben A₂* und *C* ist auch durch die UV/VIS-, CD- und IR-Spektren belegt. Die im *Exper. Teil* reproduzierten, relativ gut strukturierten IR-Spektren sind an Substanzfilmen¹²⁾ aufgenommen, die unter Einhaltung möglichst identischer Bedingungen durch Eindunsten von trifluoräthanolischen Lösungen der beiden Proben hergestellt wurden. Die im $\tilde{\nu}(\text{C}-\text{O})$ -Bereich auftretenden, geringen Unterschiede in den beiden Spektren lassen sich – wie ein Blick auf das IR-Spektrum von Trifluoräthanol (vgl. *Exper. Teil*) zeigt – ohne Bedenken auf einen etwas unterschiedlichen Lösungsmittelgehalt der beiden Substanzfilme zurückführen.

Beide *Proben A₂* und *C* zeigten im FAB-Kation-MS¹³⁾ den gleichen Basispeak bei m/z 905 (⁵⁸Ni); dieser entspricht der rel. Molekularmasse des kationischen Nickelkomplexes der Formel **2**.

Die Herstellung der oben mehrfach erwähnten *Vergleichsprobe C* erfolgte durch Hydrolyse von F430M [1] in einem entgasten (1:1)-Gemisch von 1M wässriger HCl und AcOH unter striktem Luftausschluss bei 72° während 2,5 Std. Diese Reaktionsbedingungen sind ein nach eingehenden Vorversuchen eingegangener Kompromiss zwischen möglichst milden Bedingungen (zur Verhinderung der Ring-C-Epimerisierung¹⁰⁾ und genügend energischen (für eine möglichst vollständige Hydrolyse der Estergruppen). Basische Katalyse der Hydrolyse kam infolge der hohen Empfindlichkeit von F430M gegenüber oxydativen Veränderungen in basischem Medium nicht in Frage. Die Reinigung der *Charakterisierungsprobe C* geschah gleich wie bei der *Probe A₂* durch dreimalige DC an Silicagel. Nebst dem UV/VIS- und CD-Spektrum belegen das ¹³C-NMR-Spektrum (vgl. *Tab. 1*) und das FAB-MS (vgl. oben) das Vorliegen der dem Pentamethylester F430M entsprechenden Pentasäure **2**. Die Rückführung einer *Probe 2* in den Pentamethylester F430M durch säurekatalysierte Methanolyse in ca. 90% Ausbeute zeigt zusätzlich, dass sowohl die Konfiguration an der Molekelperipherie als auch die Amid- und Lactamgruppe an den Ringen A bzw. B der Pentasäure **2** bei der Hydrolyse nicht angetastet wurden.

Der im *Isolat B₁* vorhandene Faktor F430 wurde analog wie jener von *A₁* durch präparative DC isoliert. Die so erhaltene *Charakterisierungsprobe B₂* zeigte im HPLC (Hauptpeak 97%, Nebenpeak 3%, Detektion 430 nm, $N = 29000$) denselben Hauptpeak wie das *Isolat B₁*, und ihr FAB-MS zeigte die rel. Molekularmasse 905 als Basispeak. Die *Probe B₂* war auch mit den *Proben A₂* und *C* nach DC (3 Systeme), HPLC (2 Systeme) sowie UV/VIS- und CD-Spektrum identisch.

Die F430-Komponenten in allen vier Proben, nämlich im *Isolat A₁* (aus dem in den Zellen «freien» F430-Anteil), im *Isolat B₁* (aus dem in den Zellen «gebundenen» F430-Anteil) sowie in den hieraus durch DC-Trennung gewonnenen *Charakterisierungsproben A₂* bzw. *B₂*, waren im HPLC nicht unterscheidbar. Diesem Vergleichskriterium ist

¹²⁾ Wir danken Herrn R. Dohner (Instrumentalanalytische Gruppe des Organisch-chemischen Laboratoriums der ETHZ, Leitung Prof. W. Simon) für die Aufnahme dieser IR-Spektren.

¹³⁾ Wir danken Herrn Dr. J. Meili (MS-Gruppe des Organisch-chemischen Laboratoriums der ETHZ, Leitung Prof. J. Seibl) für die Aufnahme der FAB-Spektren.

hohe Signifikanz zuzumessen, denn vor allem das eine der beiden verwendeten HPLC-Systeme¹⁴⁾ (System 2: 'Reverse phase', *Spheri-5 RP 18*, 0,01M Kaliumhydrogenphosphatpuffer pH 5,6, H₂O/MeOH-Gradient) ist derart leistungsfähig, dass es Basistrennung zwischen F430 und F430-Artefakten erzielt, die strukturell sehr ähnlich sind (13-Epi-F430; 12,13-Diepi-F430 und 12,13-Didehydro-F430¹⁰⁾).

Führte man eine Probe wässriger Lösung des gereinigten Enzyms Methylcoenzym-M-Reduktase [3] in das oben erwähnte HPLC-Trennsystem ein (Raumtemperatur), so beobachtete man bei der Detektionswellenlänge 430 nm im Chromatogramm als einzigen (und einheitlichen) Pik jenen von Faktor F430 (bei Cochromatographie mit F430 der *Probe C* nicht unterscheidbar). Diese als orientierendes Versuchsergebnis zu wertende Beobachtung belegt die Auffassung, dass die proteingebundene Form des Faktors F430 (charakterisiert durch ein hypsochrom verschobenes Absorptionsmaximum um 418 nm) nach Proteinbindung direkt als die Pentasäure F430 erscheint. Dieser Sachverhalt ist in der Arbeitsgruppe von *Walsh*¹⁵⁾ durch Versuche am gereinigten Enzym und Vergleich (HPLC, FAB-MS) des hieraus freigesetzten Faktors mit F430 *ex* HClO₄-Zellextraktion eingehend demonstriert worden.

Eine von *Vogels et al.* [6] [7] postulierte, (proteinfreie) Form des Faktors F430, welche nebst dem chromophor-tragenden Strukturteil noch Coenzym M und eine Tetrahydrolumazin-Komponente enthalten soll («Coenzym MF430»), ist von uns nicht beobachtet worden¹⁶⁾. Das ¹H-NMR-Spektrum unseres *Isolats B₁* in D₂O zeigt zahlreiche Signale diamagnetischer Komponenten des Gemisches, darunter vor allem Signale des CDR-Faktors¹⁷⁾, jedoch nicht jene des Coenzym M (F430-Signale nicht sichtbar infolge von Paramagnetismus, vgl. *Fig. 14* im *Exper-Teil*). Die von *Vogels et al.* [6] erwähnte Präsenz von Coenzym M in ihren «Coenzym-MF430-Präparaten»¹⁶⁾ bezieht sich auf Material, das durch *kochendes* 80% MeOH von gereinigter Methylcoenzym-M-Reduktase abgelöst oder durch 40–60% EtOH bei 80° aus den Bakterienzellen extrahiert wurde; demgegenüber wird bei der Gewinnung unseres *Isolats B₁* der Faktor F430 in *Gegenwart von Chlorid-ionen* bei tiefer Temperatur aus den Zellen herausgelöst. Es besteht zudem die Möglichkeit, dass eine *salzfreie* Ablösung des kationischen Nickel(II)-Komplexes F430 aus dem Protein durch eine Mitablösung des *anionischen* Coenzym M (β -Mercapto-äthansulfonat) erleichtert wird. Wie auch immer die strukturelle Beziehung zwischen F430 und Coenzym M (sowie eventuell weiteren Cofaktoren) im enzymgebundenen Zustand sein mag, scheint es uns richtig, den durch Extraktion in Lösung gebrachten, proteinfreien Naturstoff F430 strukturell unabhängig von externen anionischen (oder kationischen) Partnern zu definieren.

¹⁴⁾ Wir danken Herrn Dr. *R. Hobi*, Institut für Pharmakologie und Biochemie der Veterinärmedizinischen Fakultät der Universität Zürich für seinen Hinweis auf dieses System und für die Erlaubnis, seine HPLC-Apparatur zu benutzen.

¹⁵⁾ Vortrag *C.T. Walsh*, Nickel-Enzyme Involvement in the Biogenesis of Methane, am 186th ACS National Meeting, Washington, DC, 28. August–2. Sept. (1983), Abstracts INOR 328. Am gleichen Symposium hat der eine von uns (*A. Pfaltz*) über die hier beschriebenen Ergebnisse vorgetragen. Wir danken Prof. *Walsh* (MIT) und Dr. *R. Hausinger* (MIT) für die Zusendung von Manuskripten ihrer Arbeit vor deren Publikation (*R.P. Hausinger, W.H. Orme-Johnson & Ch. Walsh*, *Biochemistry*, im Druck).

¹⁶⁾ *Vogels et al.* [6] [7] bemerken, dass ihr «Coenzym MF430» bei der DC auf Silicagel mit 70% wässrigem 2-Propanol unter gleichzeitiger Bildung von drei Chromophorderivaten «zerfällt» (!).

¹⁷⁾ Zuordnung aufgrund des Vergleichs mit dem ¹H-NMR-Spektrum von reinem, in unserem Laboratorium nach der Vorschrift von *Leigh & Wolfe* [11] isoliertem CDR-Faktor.

Wir danken Prof. G. Vogels (Nijmegen) für die Zusendung der Manuskripte der Arbeiten [6] und [8] vor deren Publikation. Die Arbeit wurde unterstützt aus Mitteln des Schweizerischen Nationalfonds zur Förderung der wissenschaftlichen Forschung (Bern), von der Deutschen Forschungsgemeinschaft (Bonn-Bad Godesberg) sowie vom Fonds der Chemischen Industrie (Frankfurt am Main). D. A. L. dankt dem Schweizerischen Nationalfonds für ein NSF-Postdoktoratsaustauschstipendium.

Experimenteller Teil

Vorbemerkungen. Gehaltsbestimmungen von F430 aufgrund des UV/VIS-Spektrums sind bezogen auf den ϵ -Wert des Pentamethylesters F430M [1], $\epsilon_{430} = 23\,100$ (H₂O) bzw. 21 900 (MeOH). Lösungsmittelgehalte sind in Vol.-% angegeben. EtOH (96%) war mit Petroläther denaturiert. Übrige Lösungsmittel, sofern nicht anders angegeben: *Fluka puriss. redest.* Cellulose: mikrokristallin, *Merck Acivel*[®] Art. 2331 für die Säulenchromatographie. UV/VIS-Spektren: Angabe von λ_{\max} in nm. Die beschriebenen F430-Proben waren hygroskopisch, was eine genaue Bestimmung der ϵ -Werte durch Einwaage erschwerte. Als (relative) Bandenintensitäten sind deshalb die optischen Dichten D angegeben. Abkürzungen: sh, Schulter; br., breit. CD-Spektren: Angaben in nm ($\Delta\epsilon$). Die für die Berechnung der $\Delta\epsilon$ -Werte benötigten Konzentrationen wurden im UV/VIS-Spektrum bestimmt unter der Annahme, dass die ϵ -Werte von F430 und von F430M ($\epsilon_{430} = 23\,100$ in H₂O) übereinstimmen. FAB-MS [12]: Angabe von m/z (%). *Kratos MS-50* mit FAB-Ausrüstung (*M-Scan Ltd.*); Matrix: Glycerin unter Zugabe von SeO₂ (vgl. *Fussnote 13* und eine spätere Publikation von J. Meili und J. Seibl). *Dünnschichtchromatographie (DC)*: Anal. DC auf HPTLC-Fertigplatten, Kieselgel 60 F_{254} (*Merck 5642*); präp. DC auf DC-Fertigplatten (Glas), Kieselgel 60 F_{254} , Schichtdicke 0,25 mm (*Merck 5715*); Lösungsmittelsysteme: AcOEt/AcOH/H₂O 5:2:2 (System 1); BuOH/AcOH/H₂O 4:1:1 (System 2)⁷); CF₃CH₂OH/AcOH/H₂O 4:1:1 (System 3). Die Proben wurden als CF₃CH₂OH-Lösungen aufgetragen, schwerlösliche Proben wurden durch Zugabe einer Spur H₂O zum CF₃CH₂OH in Lösung gebracht. Bei anal. DC wurden die Platten über eine Strecke von 10 cm entwickelt. Trennleistung der 3 DC-Systeme unter optimalen Bedingungen: System 1: Trennung in F560 (R_f 0,30) und F430 + F430-Isomere (F430 bei R_f 0,36 unvollständig getrennt von einem langgezogenen Fleck der F430-Isomeren bei R_f 0,35); System 2: Trennung in F560 (R_f 0,13), F430-Isomeren (2 knapp getrennte Flecken bei R_f 0,16 und 0,17) und F430 (R_f 0,21); System 3: Trennung in F560 (R_f 0,49), F430 (R_f 0,53) und F430-Isomeren (1 Fleck, R_f 0,56). Die Lösungsmittelsysteme wurden jeweils frisch zubereitet. *Hochdruckflüssigchromatographie (HPLC)*: *HPLC (System 1)*: Apparat vgl. [13], 1,0 × 25-cm-Säule, *Technsil* 5 μ m; Lösungsmittelsystem: 0,02M LiH₂PO₄ in MeOH/H₂O 5:1 (pH 5,2); Fluss 1,0 ml/Min.; Druck 50 bar; Detektion bei 430 nm. Die Proben wurden als CF₃CH₂OH-Lösungen eingespritzt. *HPLC (System 2)*¹⁴): Zwei in Serie angeordnete Säulen (*Spheri-5*, *RP 18*, 5 μ m; Hersteller: *Brownlee Labs*), Vorsäule 0,46 × 3 cm, analytische Säule 0,46 × 25 cm; 2 *Altex*-Pumpen (Modell 110A) gesteuert durch einen *Altex*-Mikroprozessor (Modell 420); Detektor: *UVICON-720-LC*-Spektrophotometer; Lösungsmittelsysteme: (A) 0,01M KH₂PO₄/K₂HPO₄ (pH 5,6); (B) MeOH/H₂O 4:1. Das System wurde zuerst 10 Min. mit Lösungsmittel (A) äquilibriert. Nach dem Einspritzen wurde Lösungsmittel (B) beigemischt, wobei der Anteil an (B) während 20 Min. linear von 0 auf 20 Vol.-% erhöht wurde. Dann wurde 10 Min. mit (A)/20 Vol.-% (B) weitereluiert. Fluss: 1 ml/Min. Druck: 190 bar. Retentionszeit = t_R , theoretische Bodenzahl = N . *IR-Spektren*: Die F430-Proben wurden in Form einer ca. 5 Gew.-% Lösung in CF₃CH₂OH auf eine *Intran-2*-Platte aufgetragen. Das Lösungsmittel liess man bei RT. verdunsten und trocknete den entstandenen Film 10 Min. auf einer Heizplatte bei 50°. Das Spektrum wurde im Durchlichtverfahren mit einem *Perkin-Elmer*-Spektrometer (*PE 283*), gekoppelt mit einer *Perkin-Elmer*-IR-Datenstation, von 4000–700 cm⁻¹ in Transmission aufgenommen. *NMR-Spektren*: *Bruker WM 300* (300 MHz für ¹H, 75 MHz für ¹³C). Die frisch chromatographierten F430-Proben wurden vor Aufnahme des Spektrums in CF₃CH₂OH gelöst und i. HV. eingeengt, um andere Lösungsmittel zu entfernen. Dieser Vorgang wurde 1 × mit CF₃CH₂OH und 2 × mit wenig CF₃CD₂OD wiederholt. Die Probe wurde ca. 30 Min. i. HV. getrocknet, bevor sie in CF₃CD₂OD (98% D, *Stohler Isotope Chemicals*) gelöst und in ein NMR-Röhrchen filtriert wurde. Alle Manipulationen wurden im Handschuhsack unter N₂ durchgeführt. Das NMR-Röhrchen wurde unter N₂ mit einem Plastikstopfen und Parafilm verschlossen. δ -Werte in ppm bezogen auf CF₃CHDOD-Signal bei 3,920 (q) bzw. CF₃CD₂OD-Signal bei 126,27 ppm (q).

1. Isolierung von F430 aus methanogenen Bakterien. – *Methanobacterium thermoautotrophicum* (Stamm Marburg) wurde wie früher beschrieben [14] auf H₂ und CO₂ in einem Mineralsalzmedium gezogen, das 5 μ mol NiCl₂ enthielt. Bei dieser Nickelkonzentration haben die Zellen den höchsten F430-Gehalt (ca. 200 nmol/g Feuchtzellen = ca. 1000 nmol/g Trockenzellen). Aus solchen Zellen lassen sich mit 80% EtOH/H₂O bei 4° nur etwa 75–80% des in den Bakterien enthaltenen Faktors extrahieren («freier Faktor F430», *Isolat A*₁ und *Cha*

rakterisierungsprobe A_2). Die restlichen 25–20% sind bei 4° mit 2M LiCl in 80% EtOH extrahierbar («gebundener Faktor F430», *Isolat B₁* und *Charakterisierungsprobe B₂*).

1.1. *Isolierung des im Zellmaterial «frei» vorkommenden Faktors F430.* 1.1.1. *Isolat A₁*. Alle nachstehend beschriebenen Operationen wurden bei 0–4° und ohne Luftausschluss durchgeführt. In einem *Waring*-Mischer wurden ca. 400 g Feuchtzellen (Trockengewicht ca. 80 g) mit 1,6 l 96% EtOH (entspricht zusammen mit H₂O-Gehalt der Zellen ca. 80% EtOH) sukzessive vermischt. Nach 10min. (durch Kühl-Intervalle unterbrochenem) Mischen wurde das ungelöste Material durch Zentrifugation (10 Min., 16000 × g) abgetrennt und der Kuchen 2mal mit je 600 ml 80% EtOH (1 l davon hergestellt aus 800 ml 96% EtOH/200 ml H₂O) extrahiert. (Bei weiterem Extrahieren mit 80% EtOH ging kein F430 mehr in Lösung.) Die (vereinigte) Extraktlösung wurde 24 Std. bei –20° aufbewahrt, wobei beträchtliche Mengen gelbes Material (hauptsächlich Faktor F420 [15]) ausfielen, das man durch Filtration (Faltenfilter, 32 cm, Qualität 15 *Bürzer*, Hatzfeld) abtrennte. Das Filtrat wurde auf eine mit 80% EtOH äquilibrierte Cellulose-Säule ($l = 12$ cm, $d = 6$ cm) aufgezogen und die Kolonne mit 80% EtOH solange gewaschen (ca. 4 l), bis F430 im Eluat erschien. Die Elution des Faktors erfolgte mit 75% EtOH. Die F430-haltigen Fraktionen (ca. 1,1 l) wurden vereinigt und die EtOH-Konzentration durch Zugabe von 96% EtOH auf 85% gebracht. Die gelbe Lösung wurde hierauf auf eine zweite Cellulose-Kolonne (8 × 4 cm) aufgezogen, worauf analog verfahren wurde wie bei der ersten. Das Eluat wurde schliesslich auf eine dritte Cellulose-Kolonne (5 × 4 cm) aufgezogen, woraus man nach Waschen mit 80% EtOH den Faktor mit reinem H₂O (300 ml) eluierte. Das Eluat wurde auf –55° abgekühlt und dann gefriergetrocknet (= *Isolat A₁*). So gewonnene Isolate waren gelblich und enthielten zwischen 30 und 40 µmol F430 (UV/VIS).

1.1.2. *Charakterisierungsprobe A₂ (= Faktor F430)*. Alle nachstehend beschriebenen Operationen wurden bei Raumtemperatur und ohne Luftausschluss durchgeführt. Eine Lösung von 1,04 g *Isolat A₁* (27 µmol F430 enthaltend; UV/VIS) in 5 ml AcOH (*Merck, pro analysi*) wurde auf eine Silicagelkolonne aufgezogen ($d = 1,5$ cm, 10 g Silicagel *Merck 7734*, aufgeschlämmt in 5% AcOH/MeOH). Man eluierte solange mit 5% AcOH/MeOH bis die Kolonne praktisch farblos war; die dabei eluierte cognacfarbene Fraktion (ca. 30 ml) befreite man i. RV. von der Hauptmenge des Lösungsmittels (nicht über 30°) und unterwarf den resultierenden roten Sirup nochmals dem gleichen Filtrationsverfahren an einer Silicagelkolonne. Dadurch wurde das lipophile Ballastmaterial, das in orientierenden Vorversuchen eine direkte DC-Auftrennung des *Isolats A₁* gestört hatte, entfernt.

Das Material wurde, in möglichst wenig CF₃CH₂OH (frisch destilliert) gelöst, auf 7 DC-Platten (20 cm × 20 cm) aufgetragen und die Platten während 9 Std. mit System 2 entwickelt: Gelbe Hauptzone, R_f 0,17 (F430), gelbe Nebenzone, R_f 0,12 (Gemisch von 13-Epi- und 12,13-Diepi-F430), und violette Nebenzone, R_f 0,08 (F560). Die Zuordnung dieser Zonen beruht auf Vorversuchen, in welchen die Methanolysprodukte der 3 Zonen mit den entsprechenden, in ihrer Struktur aufgeklärten [9] Pentamethylestern F430M, 13-Epi- und 12,13-Diepi-F430M sowie F560M identifiziert wurden (HPLC, DC, UV/VIS).

Das Material der Hauptzone wurde mit 5% AcOH/MeOH extrahiert, die Extraktionslösung von der Hauptmenge des Lösungsmittels i. RV. (30°) befreit und der rote Rückstand sofort 3 sukzessiven DC-Trennungen unterworfen (System 2; zuerst 2 Platten 20 cm × 20 cm, dann 1 Platte 20 cm × 10 cm und schliesslich 1 Platte 20 cm × 2 cm; Entwicklungsdistanz 20 cm), wobei die letzte Platte vorgängig zwecks Entfernung von eluierbaren Plattenbestandteilen mit MeOH vorentwickelt und anschliessend bei 140° reaktiviert worden war. Bei den 3 letzten DC-Trennungen wurde jeweils nebst der gelben Hauptzone (R_f 0,17) nur die violette Nebenzone (R_f 0,08) beobachtet (partielle Autoxydation, aber keine Epimerisierung während der DC-Trennung). Trocknung des Hauptzonenmaterials bei 0,01 Torr während 30 Min. ergab 12,4 mg gelbe amorphe *Charakterisierungsprobe A₂*, nach UV/VIS 8,7 µmol (entsprechend 7,8 mg; ber. für Molekulargewicht eines Zwitterions) F430 enthaltend (32% Ausb. bzgl. *Isolat A₁*).

Die vereinigten violetten Zonen ergaben nach Rechromatographie eine F560-Probe, die nach UV/VIS (bezogen auf $\epsilon_{576} = 8300$, vgl. [9]) 4,6 µmol enthielt (17% bzgl. F430-Gehalt in *Isolat A₁*). UV/VIS (5% AcOH/MeOH): 576 (flach, 0,36), 476 (0,34), 430 (sh, 0,29), 340–355 (Plateau, 0,20), 294 (0,55).

Die nach der spektroskopischen Charakterisierung zurückgewonnene *Probe A₂* enthielt ca. 10% F560 (vgl. Kap. 3.2, Fussnote 18). Um ein UV/VIS und ein CD von reinem F430 zu erhalten, wurde ein Teil der *Charakterisierungsprobe A₂* nochmals chromatographiert (5 × 10cm-DC-Platte, System 2). Chromatographie, Isolierung und Vorbereitung der UV/VIS-Probe erfolgte im Handschuhsack unter N₂-Atmosphäre. Die von der violetten F560-Zone vollständig abgetrennte gelbe F430-Zone wurde von der noch feuchten Platte abgekratzt, das Kieselgel 20 Min. bei RT. i. HV. getrocknet und mit entgastem H₂O extrahiert. Die Lösung wurde mit entgastem H₂O verdünnt, bis die opt. Dichte bei 430 nm ca. 0,9 betrug. Während der Lagerung über Nacht in gefrorenem Zustand bei –24° in einem unter N₂ verschlossenen Schlickkolben veränderte sich das UV/VIS der Probe nicht. Kurz vor Aufnahme des UV/VIS wurde die Lösung im Handschuhsack aufgetaut und in eine UV-Küvette

transferiert. In der unter N_2 mit Teflonstopfen und Parafilm verschlossenen Küvette wurde zuerst ein UV/VIS, dann ein CD aufgenommen.

1.2. *Isolierung des im Zellmaterial «gebunden» vorkommenden Faktors F430.* 1.2.1. *Isolat B₁.* Alle nachstehend beschriebenen Operationen wurden bei 0–4° und ohne Luftausschluss durchgeführt. Nach der 3maligen Extraktion des freien F430 aus 1000 g Zellen (Feuchtgewicht) mit 80% EtOH (vgl. oben) wurde der Rückstand weitere 2mal mit 600 ml 80% EtOH bei 4° extrahiert, um UV-absorbierendes Material zu entfernen. Dann wurden die so extrahierten Zellen (nur noch 265 g Feuchtgewicht) in 750 ml 2M LiCl in 80% EtOH suspendiert und bei 4° 1 Std. gerührt. Nach Zentrifugation (1 h, 16000 × g) wurde ein gelber Überstand und ein Kuchen gewonnen, der weitere 2mal mit 500 ml 2M LiCl in 80% EtOH bei 4° nachextrahiert wurde. Der Kuchen enthielt jetzt kein F430 mehr, was durch Extraktion mit 10 mM HClO₄ [4] nachgewiesen wurde. Die vereinigten Überstände (1,75 l) wurden mit 5,4 l 96% EtOH versetzt und 30 Min. bei 4° gerührt. Ausgefälltes Material wurde abfiltriert, nach 12 Std. bei –20° wurde erneut filtriert und das Filtrat (nach Aufwärmen auf 4°) auf eine Cellulose-Säule (6 × 6 cm; mit 96% EtOH äquilibriert) aufgetragen. Unter diesen Bedingungen adsorbierte sich F430 an die Cellulose. Die Säule wurde zunächst mit 5 l 96% EtOH gewaschen, dann mit 5 l 90% EtOH, gefolgt von 2 l 85% EtOH und 1 l 80% EtOH. Anschliessend wurde F430 mit 70% EtOH eluiert. Vor der Chromatographie des Faktors auf einer zweiten Cellulose-Säule (6 × 6 cm) wurde die EtOH-Konzentration auf 90% gebracht und die Lösung mit 0,5 mol AcONH₄ l versetzt. (Die Zugabe von AcONH₄ war notwendig, um den Faktor erneut an die Cellulose zu binden; die Bindung ist von der Salzkonzentration abhängig. In 80–90% EtOH ist die Bindung umso besser, je mehr Salz zugegen ist. AcONH₄ wurde gewählt, da dieses Salz durch Lyophilisieren entfernt werden kann.) Nach Bindung wurde die zweite Säule solange mit 85% EtOH (ohne AcONH₄) gewaschen, bis F430 im Eluat erstmals auftauchte. F430 wurde dann mit H₂O eluiert, das Eluat bei –55° eingefroren und lyophilisiert (= *Isolat B₁*). Gehalt: 22 μmol F430 gemäss UV/VIS.

1.2.2. *Charakterisierungsprobe B₂ (= Faktor F430).* Eine Lösung von 14,4 mg *Isolat B₁* in 5,2 ml H₂O zeigte gemäss UV/VIS einen Gehalt an F430 von 1,15 μmol. Die Lösung wurde i. V. bei RT. eingengt und der Rückstand als CF₃CH₂OH-Lösung unter N_2 im Handschuhsack auf eine DC-Platte aufgetragen und chromatographiert. (DC-Platte, Laufmittel und Isolierung des Materials aus der Hauptzone: vgl. Kap. 1.1.2). Neben der gelben Hauptzone (R_f 0,19, F430) waren folgende, nur sehr schwache Banden zu erkennen: R_f 0,01 (schwach gelb), 0,09 (bei 350 nm blau fluoreszierend), 0,12 (violett, F560), 0,14 (gelb, Gemisch von 13-Epi- und 12,13-Diepi-F430), 0,39 und 0,57 (beide blau fluoreszierend bei 350 nm). Das aus der Hauptzone (R_f 0,19) eluierte, gelbe Material (= *Charakterisierungsprobe B₂*) trocknete man 3 Std. bei RT/0,01 Torr; es enthielt nach UV/VIS 0,84 μmol F430 (73% Ausb. bzgl. *B₁*; Gewichtsmenge geschätzt um 1 mg).

2. *Herstellung von 3³,8³,12²,13³,18²-Penta-O-demethyl-F430M durch Hydrolyse des Pentamethylesters F430M (Charakterisierungsprobe C).* – Zwei Portionen (9,3 und 10,3 mg) von total 19,6 mg (18,6 μmol) F430M wurden je in einer Ampulle in 3 ml 1N HCl (*Merck p. a.*)/AcOH (*Merck p. a.*) 1:1 gelöst. Die Lösungen wurden durch 3faches Ausfrieren i. HV. entgast und in der unter HV. abgeschmolzenen Ampulle 2,5 h auf 72° (Ölbad-temp.) erhitzt. Die beiden Lösungen wurden i. V. eingengt und die resultierenden gelben Rückstände in CF₃CH₂OH auf 2 DC-Platten (20 × 20 cm) aufgetragen und mit System 2 während 5 Std. über eine Strecke von 15 cm entwickelt. Die von mehreren gelben Nebenonen nur unvollständig getrennte Hauptzone (R_f 0,17) wurde mit 5% AcOH/MeOH eluiert und nach dem Einengen i. V. erneut auf 2 DC-Platten mit System 2 chromatographiert. Die Isolate aus der Hauptzone der beiden Chromatogramme wurden vereinigt und nochmals auf 1 DC-Platte (20 × 20 cm; zuvor 1mal mit MeOH entwickelt, um Verunreinigungen im Trägermaterial zu entfernen, und vor Gebrauch bei 140° aktiviert) wiederum mit System 2 chromatographiert. Eluieren, Einengen und 30 Min. Trocknen bei RT./0,01 Torr lieferten 6,0 mg gelbe, amorphe *Charakterisierungsprobe C* (nach UV/VIS 5,1 μmol F430; F430-Gehalt von *C* ca. 80 Gew.-%; 28% Ausb. bzgl. F430M).

Ein Aliquot (0,36 μmol) von *C* wurde nach der Vorschrift in [1] methanolysiert. Das in 90% Ausbeute (UV/VIS) isolierte Rohprodukt war im UV/VIS, DC (Kieselgel/NaClO₄; CH₂Cl₂/MeOH 13:1) und HPLC (*Lichrosorb Si 100-5* μ; CH₂Cl₂/MeCN/*i*-PrOH/0,02N LiClO₄ in H₂O 500:100:25:4; *N* = 8200 [9], Coinjektion mit F430M) von authentischem F430M [1] nicht zu unterscheiden.

Alle gelben und violetten Nebenonen aus den 3 präp. DC wurden zusammen eluiert und das isolierte Substanzgemisch methanolysiert [1]. Das HPLC des Rohprodukts zeigte folgende Zusammensetzung: 29% F430M, 13% 13-Epi-F430M, 11% 12,13-Diepi-F430M, 48% F560M. (Daneben waren noch zahlreiche weitere nicht zugeordnete Piks geringer Intensität zu erkennen.) Die im UV/VIS bestimmte Chromophorausbeute betrug ca. 7 μmol (ca. 40% bezogen auf Edukt-F430M).

3. *Charakterisierung von Faktor F430.* – 3.1. *Isolat A₁, DC (System 1):* gelber Hauptfleck (R_f 0,42), sehr schwacher violetter Nebenfleck (R_f ca. 0,39, F560); im UV (350 nm) 2 fluoreszierende Flecken (R_f 0,20 und 0,07) neben zahlreichen weiteren schwächer fluoreszierenden Flecken. *DC (System 2):* gelber Hauptfleck (R_f

0,18), gelber Nebenleck (R_f 0,15, F430-Isomeren), sehr schwacher violetter Nebenleck (R_f 0,11, F560); im UV (350 nm) 2 fluoreszierende Hauptflecken (R_f 0,11 und 0,02) und zahlreiche weitere Flecken. DC (System 3): gelber Hauptleck (R_f 0,55), sehr schwacher violetter Nebenleck (R_f 0,52, F560); im UV (350 nm) 2 fluoreszierende Hauptflecken (R_f 0,16 und 0,05) und zahlreiche weitere Flecken. Cochromatographie der F430-Fraktion aus HPLC (System 1) von A_1 mit Probe C ergab in allen 3 DC-Systemen einen einheitlichen gelben Hauptleck. HPLC (System 1): t_R 16,5 Min., $N = 13000$; breiter Nebenpik (2 überlappende Fraktionen; ca. 20% der Intensität des Hauptpiks) bei t_R 21,4 Min. (F430-Isomeren, F560). Coinjection mit A_2 und Coinjection mit C zeigte keine erkennbare Verbreiterung des Hauptpiks. HPLC (System 2): t_R 21,1 Min., $N = 29000$; Nebenpiks bei t_R 19,2 (6% des Hauptpiks), t_R 20,2 (12%; 12,13-Diepi-F430) und t_R 23,7 Min. (9%; 13-Epi-F430) (Detektion bei 430 nm; vgl. Fig. 2). Detektion bei 275 nm zeigte zusätzlich zahlreiche weitere Piks zwischen t_R 0 und 30 Min. (vgl. Fig. 3). Coinjection mit C (Detektion bei 430 nm) ergab keine erkennbare Verbreiterung des Hauptpiks.

UV/VIS (H_2O): 429 (0,98), ca. 343 (Plateau, 0,29), 268 (1,71); $D_{268}/D_{430} \approx 1,7$. CD (H_2O): 502 (-6,13), 451 (0), 429 (+13,0), 394 (0), 361 (-6,84), 327 (0), 313 (sh, +3,54), 282 (+26,6), 243 (0) (vgl. Fig. 4). Dieses CD entspricht dem CD von isoliertem F430 (vgl. Fig. 1).

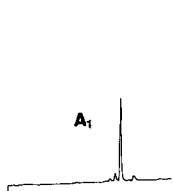


Fig. 2. HPLC des Isolats A_1 . System 2; Detektion bei 430 nm.



Fig. 3. HPLC des Isolats A_1 . System 2; Detektion bei 275 nm.

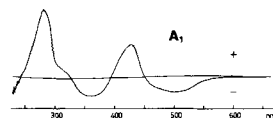


Fig. 4. CD-Spektrum des Isolats A_1 in H_2O

3.2. Charakterisierungsprobe A_2 . DC: Ein einheitlicher gelber Fleck in allen 3 Systemen (R_f vgl. DC von A_1), durch Cochromatographie in allen 3 Systemen von Probe C nicht unterscheidbar. HPLC (System 1): t_R 16,9 Min., $N = 13000$; Nebenpik bei t_R 20,8 Min. (ca. 4% der Intensität des Hauptpiks). Coinjection mit A_1 ergab keine erkennbare Pikverbreiterung. HPLC (System 2; 430 nm): t_R 20,7 Min., $N = 28000$; Nebenpiks bei t_R 18,7 (3% des Hauptpiks; unbekannt), 19,6 (3%; 12,13-Diepi-F430), 21,9 (3%; F560), 22,9 (1%; 13-Epi-F430) Min. (vgl. Fig. 5); Coinjection mit Probe C ergab keine erkennbare Pikverbreiterung.

UV/VIS (H_2O): 430 (0,94; mit flachem Ausläufer bis 640 (D_{560} 0,04) verursacht durch ca. 10% F560)¹⁸, 296 (sh, 0,48), 274 (0,86) (vgl. Fig. 6). CD (H_2O): 500–580 (-2,45), Plateau infolge Verunreinigung mit F560¹⁸,

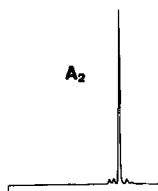


Fig. 5. HPLC der Probe A_2 . System 2; Detektion bei 430 nm.

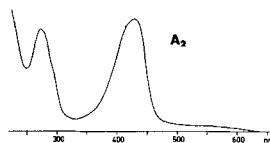


Fig. 6. UV/VIS-Spektrum der Probe A_2 in H_2O ¹⁸

¹⁸) UV/VIS- bzw. CD-Spektrum einer Probe, von welcher vorgängig das ¹³C-NMR- bzw. das ¹H-NMR-Spektrum aufgenommen worden war und welche deshalb zusätzliche Anteile an F560 enthielt.

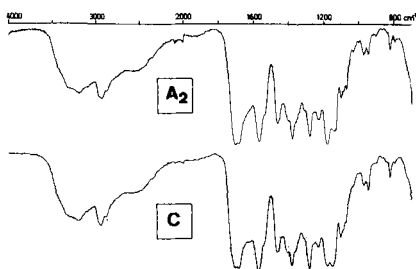
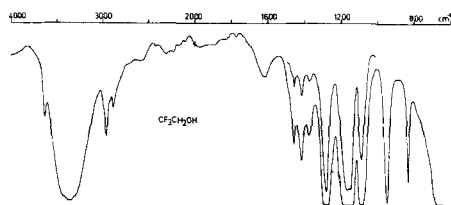
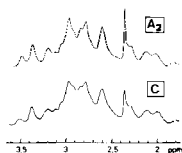
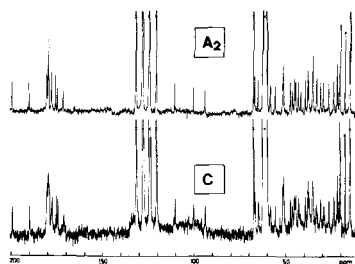
Fig. 7. IR-Spektren der Proben A₂ und C (Film)

Fig. 8. IR-Spektrum von Trifluoräthanol (Film)

459 (0), 430 (+12,5), 388 (0), 361 (-2,70), 337 (0), 320 (sh, +4,17), 283 (+27,5), 248 (0), 229 (-5,88), ca. 220 (-7,0). Fig. 1 im Allgem. Teil zeigt das UV/VIS und CD einer (anaerob) nachgereinigten Probe A₂ (vgl. Kap. 1.1.2), die frei von F560 ist. Daten dazu: UV/VIS (H₂O): 430 (0,88), ca. 418 (sh, 0,84), ca. 295 (sh, 0,42), 274 (0,78). CD (H₂O): ca. 500 (flach, -3,14), 455 (0), 430 (+12,0), 388 (0), ca. 358 (-3,14), 335 (0), ca. 323 (sh, 3,54), 285 (+28,0), 250 (0), 229 (-8,12), 218 (sh, -7,07), 209 (0). IR (Film, vgl. Vorbemerkungen): u. a. 3320m (br.), 3200m (br.), ca. 2500m (br.), 1705s, 1683s, 1570s (sh bei 1537), 1463m, 1380s (sh bei 1404 und 1358), 1279s (vermutl. Lsm.), 1230m, 1180s, 1143s (vermutl. Lsm.), 1100m (vermutl. Lsm.), 970w, 945w (vermutl. Lsm.), 820w (vgl. Fig. 7). Die Intensitätsunterschiede in den IR von A₂ und C (Fig. 7) wurden mit Hilfe der Datenstation angeglichen. Die Normierung erfolgte bezüglich der Banden bei 1683 und 1705 cm⁻¹. Die beiden hauptsächlichsten Abweichungen (vgl. rel. Intensität benachbarter Banden) bei 1150 und 945 cm⁻¹ sind auf Unterschiede im Lösungsmittelgehalt der beiden Proben zurückzuführen. Das IR eines möglichst analog mit reinem Trifluoräthanol hergestellten Films (vgl. Fig. 8) zeigt intensive Banden bei 1278, 1147/1165, 1085 und 945 cm⁻¹. ¹H-NMR (CF₃CD₂OD): Unstrukturierte, verbreiterte Signale bei 1,45, 1,84, 1,89, 2,05, 2,15, 2,31, 2,38 (vermutlich CH₃COOH), 2,63, 2,80, 2,86, 2,94, 2,99, 3,07, 3,14, 3,22, 3,39, 3,51, 4,85, 6,29 (vgl. Fig. 9); zusätzlich Signale von Lösungsmitteln und von viel intensiveren und scharf strukturierten Verunreinigungen: 1,55 (t, J = 7); 1,57 (t, J = 7); 3,78 (s); 3,92 (q, J = 7); 4,05 (q, J = 7); 4,24 (q, J = 9); 5,49 (s) nebst schwachem m bei 0,6 ppm. Fig. 9 zeigt zum Vergleich den gleichen Ausschnitt des ¹H-NMR der Probe C (vgl. unten). ¹³C-NMR:

Fig. 9. ¹H-NMR-Spektren der Proben A₂ und C in CF₃CD₂OD (Ausschnitt)Fig. 10. ¹³C-NMR-Spektren der Proben A₂ und in CF₃CD₂OD (vgl. Tab. 1). Lösungsmittelsignale sind mit x bezeichnet. Das Signal/Rausch-Verhältnis im Spektrum von Probe C ist um den Faktor 3 kleiner als im Spektrum von Probe A₂.

vgl. Tab. 1 im Allgem. Teil und Fig. 10. MS (FAB): 902 (5), 903 (20), 904 (28), 905 (100, M^+ (^{58}Ni)), 906 (86), 907 (83), 908 (51), 909 (28), 910 (15), 911 (6), 912 (3)¹⁹.

3.3. *Isolat B₁ DC*: In allen Systemen (1, 2 und 3) 1 gelber Hauptfleck, extrem schwacher violetter Nebenfleck (F560) und 2 nur im UV bei 350 nm sichtbare, fluoreszierende Flecken (R_f entsprechend DC von A_1). Die im DC von A_1 im UV sichtbaren, zahlreichen weiteren Flecken waren im DC von B_1 ebenfalls zu erkennen, aber deutlich schwächer. Cochromatographie mit *C* in allen 3 Systemen ergab jeweils einen einheitlichen gelben Hauptfleck. HPLC (System 1): t_R 17,7 Min., $N = 14000$; Coinjection mit *C* ergab keine erkennbare Pikverbreiterung. HPLC (System 2): t_R 21,2 Min., $N = 25000$; übrige Piks < 2% (Detektion bei 430 nm; vgl. Fig. 11); Detektion bei 275 nm: Piks bei 2,3 Min. (16% des F430-Piks), 5,0 Min. (25%), 19,5 (18%), 21,2 (100%; F430), 23,8 (60%) (vgl. Fig. 12). Coinjection mit *C* ergab keine erkennbare Verbreiterung des F430-Piks.

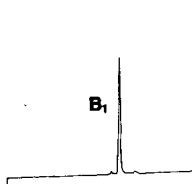


Fig. 11. HPLC des Isolats B_1 . System 2; Detektion bei 430 nm.

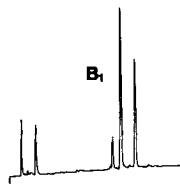


Fig. 12. HPLC des Isolats B_1 . System 2; Detektion bei 275 nm.

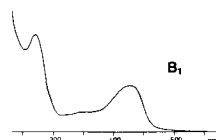


Fig. 13. UV/VIS-Spektrum des Isolats B_1 in H_2O

UV/VIS (H_2O): 430 (0,95), 343 (flache sh, 0,38), 272 (1,98; vgl. Fig. 13). CD (H_2O): 502 (-3,88), 453 (0), 429 (+11,2), 399 (0), 365 (-2,67), 338 (0), 320 (sh, +4,85), 282 (+33,3), 247 (0); sehr ähnlich CD von A_1 , vgl. Fig. 4. $^1\text{H-NMR}$ (2,1 μmol in ca. 0,5 ml D_2O , ca. 25°): keine Signale von F430 (F430 ist in H_2O paramagnetisch); die auftretenden Signale (vgl. Fig. 14a) stammen (vom DHO-Signal abgesehen) von den im *Isolat B₁* anwesenden, diamagnetischen Komponenten. Dabei fehlen die Signale von Coenzym M, denn die entsprechenden Signale (m bei 2,82–2,88 und 3,16–3,19) treten erst nach Zugabe von 1 Moläquiv. Coenzym M (Natriumsalz) zur Messlösung auf; vgl. $^1\text{H-NMR}$ vor (Fig. 14b) und nach (Fig. 14c) Zugabe von Coenzym M. Zum Vergleich wurden folgende $^1\text{H-NMR}$ separat unter gleichen Bedingungen aufgenommen. $^1\text{H-NMR}$ (Coenzym M, Natriumsalz; D_2O): 2,85–2,90 (m); 3,16–3,21 (m). $^1\text{H-NMR}$ (S-Methyl-coenzym M, Natriumsalz, D_2O): 2,84–2,89 (m); 3,15–3,21 (m). $^1\text{H-NMR}$ (Coenzym-M-disulfid, Dinatriumsalz; D_2O): 3,05–3,11 (m); 3,27–3,34 (m). Die im $^1\text{H-NMR}$ von B_1 (vgl. Fig. 14a, b und c) bei 2,70–2,75 und 3,36–3,41 auftretenden t -artiger Signale sowie die Signale bei 4,19 (s), 4,96 (s), 6,65 (s), 6,94 (d), 7,16 (d) und 7,62 (s) stammen vom mitanwesenden CDR-Faktor [11]. MS (FAB): 903 (21), 904 (22), 905 (100, M^+ (^{58}Ni)), 906 (67), 907 (69), 908 (27), 909 (17), 910 (8), 911 (7)¹⁹. Zusätzliche Pikgruppe des mitanwesenden CDR-Faktors [11] bei 747 (17), 748 (14), 749 (115), 750 (50), 751 (18)¹⁷.

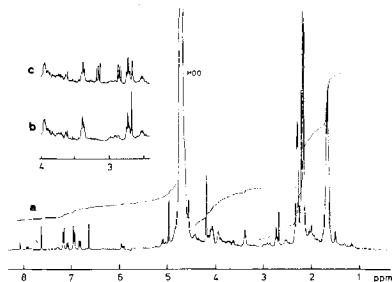


Fig. 14. $^1\text{H-NMR}$ -Spektrum des Isolats B_1 in D_2O . a) Gesamtspektrum. b) Ausschnitt vor Zugabe von Coenzym M. c) Ausschnitt nach Zugabe einer äquimolaren Menge Coenzym M (Natriumsalz).

¹⁹) Berechnete Isotopenverteilung für M^+ : 905 (100), 906 (50), 907 (54), 908 (25), 909 (13), 910 (4), 911 (3), 912 (2). Dehydrierungsreaktionen sowie eine partielle Reduktion der Probe durch die Glycerin-Matrix dürften für die davon abweichende, beobachtete Isotopen-Verteilung verantwortlich sein.

3.4. *Charakterisierungsprobe B₂. DC*: Einziger und einheitlicher gelber Fleck in allen 3 Systemen (R_f wie im DC von A_1); durch Cochromatographie in allen 3 Systemen von C unterscheidbar. *HPLC* (System 2; 430 nm): t_R 21,3 Min., $N = 29000$, Nebenpik 22,6 Min. (F560, ca. 3% des Hauptpiks). Coinjection mit C ergab keine erkennbare Pikverbreiterung.

UV/VIS (H_2O): 431 (0,95, flacher Ausläufer bis 640 nm verursacht durch Verunreinigung mit F560)¹⁸, 297 (sh, 0,48), 274 (0,91); praktisch identisch mit jenem von A_2 (vgl. Fig. 6). CD (H_2O): 580–500 (Plateau infolge Verunreinigung mit F560) (-2,19), 459 (0), 430 (+12,2), 390 (0), 361 (-2,68), 337 (0), 320 (sh, +4,39), 284 (+28,0), 247 (0), 231 (-5,12), 218 (-5,36); Kurvenverlauf praktisch identisch wie bei CD von A_2 . MS (FAB): 903 (25), 904 (22), 905 (100, M^+ (⁵⁸Ni)), 906 (58), 907 (64), 908 (31), 909 (16), 910 (8), 911 (6)¹⁹. Die Pikgruppe um 749 (CDR-Faktor, vgl. B_1) ist nicht mehr vorhanden.

3.5. *Charakterisierungsprobe C. DC*: Einheitlicher gelber Fleck in allen 3 Systemen (R_f gleich wie im DC von A_1). *HPLC* (System 1): t_R 18,5 Min., $N = 13000$ (mit schwacher sh bei 19,0 Min.), breiter Nebenpik bei 22,1 Min. (4% des Hauptpiks). *HPLC* (System 2): t_R 18,1 Min., $N = 21000$; nicht identifizierte Nebenpiks bei t_R 16,3 Min. (6% des Hauptpiks) und t_R 23,6 (7%) (vgl. Fig. 15).

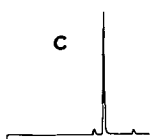


Fig. 15. *HPLC* der Probe C . System 2; Detektion bei 430 nm.

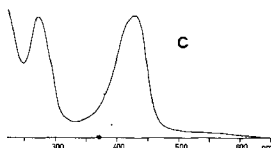


Fig. 16. UV/VIS-Spektrum der Probe C in H_2O ¹⁸

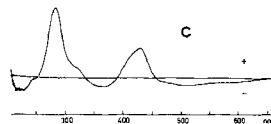


Fig. 17. CD-Spektrum der Probe C in H_2O ¹⁸

UV/VIS (H_2O): 430 (0,97 mit flachem Ausläufer bis 630 verursacht durch Verunreinigung mit F560¹⁸), 296 (sh, 0,56), 274 (0,96) (Fig. 16). CD (H_2O): 505 (-3,10, flacher Ausläufer bis ca. 640¹⁸), 458 (0), 430 (+12,1), 391 (0), 364 (-3,33), 337 (0), 320 (sh, +4,29), 285 (+28,1), 254 (0), 248 (sh, -0,95), 229 (-5,48), 218 (-5,48) (Fig. 17). IR: u. a. 3320m (br.), 3200m (br.), 2500m (br.), 1705s, 1683s, 1570s (sh bei 1535), 1463m, 1380s (sh bei 1404 und 1355), 1279s (vermutl. Lsm.), 1230m, 1180s, 1148 (vermutl. Lsm.), 1100 (vermutl. Lsm.), 970w, 945w (vermutl. Lsm.), 821w (vgl. Fig. 7). ¹H-NMR (CF_3CD_2OD): Unstrukturierte breite Signale bei 1,45, 1,84, 1,89, 2,04, 2,15, 2,33, 2,39 (vermutl. CH_3COOH), 2,64, 2,80, 2,86, 2,94, 2,99, 3,07, 3,13, 3,22, 3,39, 3,52, 4,84, 6,30 (vgl. Fig. 9); des weitern treten die gleichen scharf und viel intensiveren Lösungsmittel/Verunreinigungssignale wie im Spektrum der Probe A_2 auf (vgl. oben). ¹³C-NMR (CF_3CD_2OD): vgl. Tab. 1 und Fig. 10. MS (FAB): 902 (8), 903 (25), 904 (27), 905 (93, M^+ (⁵⁸Ni)), 906 (100), 907 (92), 908 (64), 909 (31), 910 (17), 911 (9); zweite Pikgruppe: 917 (8), 918 (22), 919 (61), 920 (62), 921 (58), 922 (40), 923 (26), 924 (15), 925 (10), 926 (7). Die Pikgruppe bei 919 ($M^+ + 14$) wurde auf geringe Mengen (vgl. HPLC) von F430-monomethylestern in Probe C zurückgeführt (höhere FAB-Flüchtigkeit im Vergleich zur Pentasäure?). Eine kleine Menge der Probe C wurde deshalb zur Kontrolle nachträglich durch präp. HPLC (System 2) gereinigt. Das dabei aus der Hauptfraktion (vgl. anal. HPLC von C) gewonnene, HPLC-einheitliche Material zeigte im MS (FAB) nur noch die Basispikgruppe bei 905¹⁹: 903 (16), 904 (16), 905 (100), 906 (56), 907 (55), 908 (26), 909 (14).

LITERATURVERZEICHNIS

- [1] *A. Pfaltz, B. Jaun, A. Fässler, A. Eschenmoser, R. Jaenchen, H. H. Gilles, G. Diekert & R. K. Thauer*, *Helv. Chim. Acta* **65**, 828 (1982).
- [2] *R. P. Gunsalus & R. S. Wolfe*, *FEMS Microbiol. Lett.* **3**, 191 (1978); *G. Diekert, B. Klee & R. K. Thauer*, *Arch. Microbiol.* **124**, 103 (1980); *W. B. Whitman & R. S. Wolfe*, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **92**, 1196 (1980).
- [3] *W. L. Ellefson & R. S. Wolfe*, *J. Biol. Chem.* **256**, 4259 (1981); *W. L. Ellefson, W. B. Whitman & R. S. Wolfe*, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **79**, 3707 (1982).
- [4] *G. Diekert, U. Konheiser, K. Piechulla & R. K. Thauer*, *J. Bacteriol.* **148**, 459 (1981).
- [5] *G. Diekert, H. H. Gilles, R. Jaenchen & R. K. Thauer*, *Arch. Microbiol.* **128**, 256 (1980).
- [6] *J. T. Keltjens, W. B. Whitman, C. G. Caerteling, A. M. van Kooten, R. S. Wolfe & G. D. Vogels*, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **108**, 495 (1982).
- [7] *J. T. Keltjens, C. G. Caerteling, A. M. van Kooten, H. F. van Dijk & G. D. Vogels*, *Biochim. Biophys. Acta* **743**, 351 (1983).
- [8] *J. T. Keltjens, C. G. Caerteling, A. M. van Kooten, H. F. van Dijk & G. D. Vogels*, *Arch. Biochem. Biophys.* **223**, 235 (1983).
- [9] *A. Pfaltz, D. A. Livingston, B. Jaun, R. K. Thauer & A. Eschenmoser*, in Vorbereitung.
- [10] *A. Fässler, A. Pfaltz, P. M. Müller, S. Farooq, C. Kratky, B. Kräutler & A. Eschenmoser*, *Helv. Chim. Acta* **65**, 812 (1982).
- [11] *J. A. Leigh & R. S. Wolfe*, *J. Biol. Chem.* **258**, 7536 (1983).
- [12] *D. H. Williams, C. Bradley, G. Bojesen, S. Santikarn & L. C. E. Taylor*, *J. Am. Chem. Soc.* **103**, 5700 (1981); *M. Barber, R. S. Bordoli, R. D. Sedgwick & A. N. Tyler*, *Nature (London)* **293**, 270 (1981).
- [13] *E. Walter, J. Schreiber, E. Zass & A. Eschenmoser*, *Helv. Chim. Acta* **62**, 899 (1979).
- [14] *P. Schönheit, J. Moll & R. K. Thauer*, *Arch. Microbiol.* **127**, 59 (1980).
- [15] *L. D. Eirich, G. D. Vogels & R. S. Wolfe*, *Biochemistry* **17**, 4583 (1978).