

**Zur Chemie der Thioladdition
an 2,3-Dihydro-3-ethylidendipyrin-1(10 H)-one—
eine Modellstudie zur kovalenten
Chromophor-Protein-Bindung in Biliproteiden**

Karl Grubmayr^{a,*} und Ulrike Gabriella Wagner^b

^a Institut für Chemie, Johannes-Kepler-Universität, A-4040 Linz, Austria

^b Institut für Physikalische Chemie, Karl-Franzens-Universität, A-8010 Graz,
Austria

(Eingegangen 11. September 1987. Angenommen 15. Oktober 1987)

*On the Chemistry of the Addition of Thiols to
2,3-Dihydro-3-ethylidene-dihydrodipyrin-1(10 H)-ones—a Model Study on the
Covalent Chromophore-Protein-Linkage in Biliproteins*

Addition of benzylmercaptan to 2,3-dihydro-3-ethylidenedipyrin-1(10 H)-one (*Z,Z*)-**3** was found to be a model reaction with regard to the thioether linkage of protein and chromophore in biliproteins. Isolation and characterization of the main product **4** reveals the ethylidene double bond to be attacked first by thiol according to the principles of the acid catalysed nucleophilic addition.

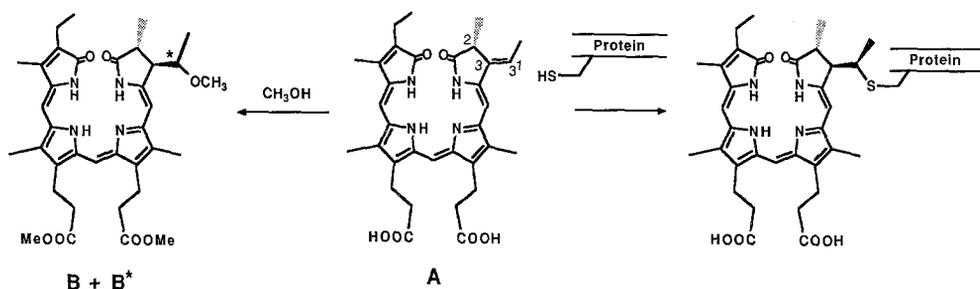
(Keywords: Biliproteins; 2,3-Dihydro-3-ethylidenedipyrin-1(10 H)-ones; Nucleophilic Addition; Crystal Structure)

Einleitung

Struktur und Funktion von Phycobiliproteiden sind im Zusammenhang mit ihren photobiologischen Aktivitäten zur Zeit Gegenstand ausgedehnter Untersuchungen. Problembedingt stehen dabei strukturelle und funktionelle Aspekte der Protein-Chromophor-Wechselwirkung im Mittelpunkt des Interesses. Charakteristisch für diese Wechselwirkung ist unter anderem eine kovalente Bindung, die Chromophor- und Proteineinheiten in strukturell eindeutiger Weise miteinander verknüpft.

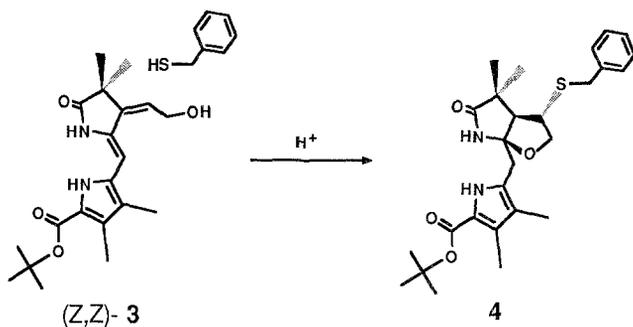
In der Regel handelt es sich dabei um eine Thioetherbrücke, die das Schwefelatom einer Cystein-Seitenkette des Apoproteins mit dem Kohlenstoffatom C-3¹ des Chromophors verbindet [1, 2]. Nach dem derzeitigen Wissensstand scheint die strukturelle Voraussetzung zum Aufbau

dieser Thioetherbindung an die Existenz einer (*E*)-3-Ethyliden-Seitenkette im Chromophor gebunden zu sein. Dieses Strukturelement ist Bestandteil der gut untersuchten Antennenpigment-Chromophore Phycocyanobilin **A** [3—7] und Phycoerythrin [8—12], sowie des Phytochromobilins [13—15], dem Chromophor des pflanzlichen Photorezeptors Phytochrom. Seit der Beobachtung über die Ausscheidung von Phycocyanobilin durch *Cyanidium caldarium*-Zellen nach Inkubation mit δ -Aminolaevulinsäure [16, 17] gelten (*E*)-3-Ethyliden-substituierte Gallenfarbstoffe als potentielle Zwischenprodukte der Biliprotein-Biosynthese.



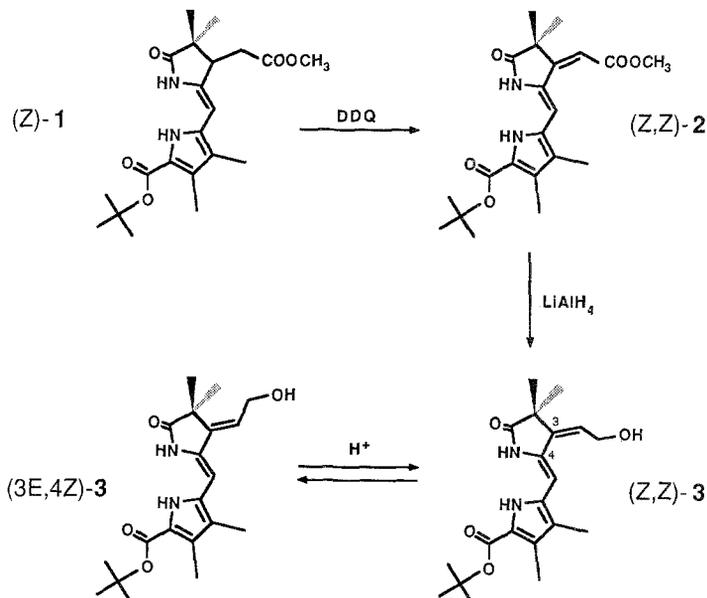
Ein Strukturvergleich dieser proteinfreien Chromophore mit jenen der proteingebundenen suggeriert natürlich als Bindungsmöglichkeit für Protein und Pigment eine Thioladdition an die Ethylidendoppelbindung; dies umso mehr, wenn die zugehörige Rückreaktion, die Abspaltung der Chromophore aus den Biliproteiden, experimentell belegt ist. Demzufolge wurden anhand von Modellreaktionen und stereochemischen Interpretationen der Relativkonfiguration im Verknüpfungsbereich [18—21] eine Reihe von reaktionsmechanistischen Überlegungen angestellt. Im Zuge dieser Arbeiten wurde die prinzipielle Additionsbereitschaft gegenüber Nucleophilen am Beispiel des Phycocyanobilin-dimethylesters mit der Isolierung und Totalsynthese zweier 3'-epimerer Methanoladdukte (**B** und **B***) eindrucksvoll demonstriert [22, 23]. Die hierfür postulierten Reaktionsmechanismen prägen seither die Vorstellungen über das Zustandekommen der Protein-Chromophor-Bindung.

Mit der Ausweitung des unlängst vorgestellten Reaktionsprinzips der nucleophilen Addition an Dihydrodipyrinone [24—26] auf vinyloge Positionen besteht nun die Möglichkeit, diese reaktionsmechanistischen Vorstellungen im Experiment nachzuvollziehen. In der vorliegenden Mitteilung soll anhand einer Modellstudie unter Verwendung des 3-(2-Hydroxyethyliden)-dihydrodipyrinons (*Z,Z*)-**3** auf die Möglichkeit der vinylogen Addition mit der Darstellung und Charakterisierung des Thioladduktes **4** aufmerksam gemacht werden.



Ergebnisse

Der experimentelle Aufwand, der zur Zeit für die Synthese naturstoffgerecht substituierter Dihydrodipyrinone erforderlich ist [6, 7], veranlaßte uns, eine weniger aufwendige Variante, die Synthese der Modellverbindungen $(Z,Z)\text{-}3$ auszuarbeiten. Diese Verbindung besitzt mit der exozyklisch liegenden Doppelbindung in Position 3 das gewünschte, zur Ethylidengruppe der Naturstoffe analoge Strukturelement und ist über eine zweistufige Reaktionsfolge verhältnismäßig einfach aus dem gut zugänglichen Dihydrodipyrinon $(Z)\text{-}1$ erhältlich.

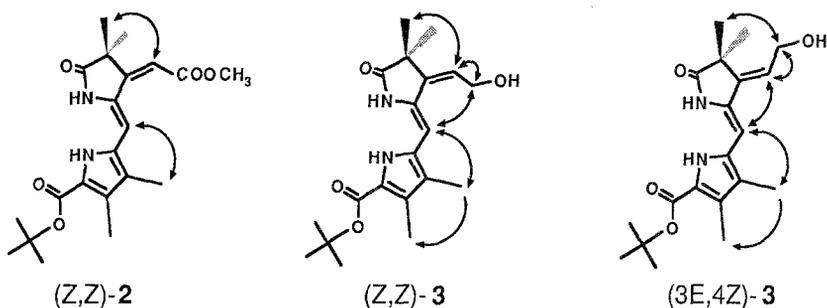


Im ersten Schritt wird die exozyklische Doppelbindung oxidativ über die Umsetzung von (*Z*)-**1** mit 2,3-Dichloro-5,6-dicyanobenzochinon (*DDQ*) eingeführt. Das dabei gebildete Oxidationsprodukt (*Z,Z*)-**2** wird chromatographisch isoliert. Seine Haltbarkeit ist begrenzt und entspricht nicht der, die Dihydrodipyrrinone normalerweise besitzen. Es ist anzunehmen, daß die neu geschaffene Delokalisierungsmöglichkeit für das pyrrolische Elektronenpaar in Richtung Methylestercarbonylgruppe genutzt und damit die für Dihydrodipyrrinone typische Donoraktivität in Position 5 [24] abgeschwächt wird. Die ausgeprägte Tieffeldverschiebung des *meso*-Protons im ¹H-NMR-Spektrum [$\delta = 7.80$ (*Z,Z*)-**2** und 5.31 ppm (*Z*)-**1**] spricht für diese Annahme.

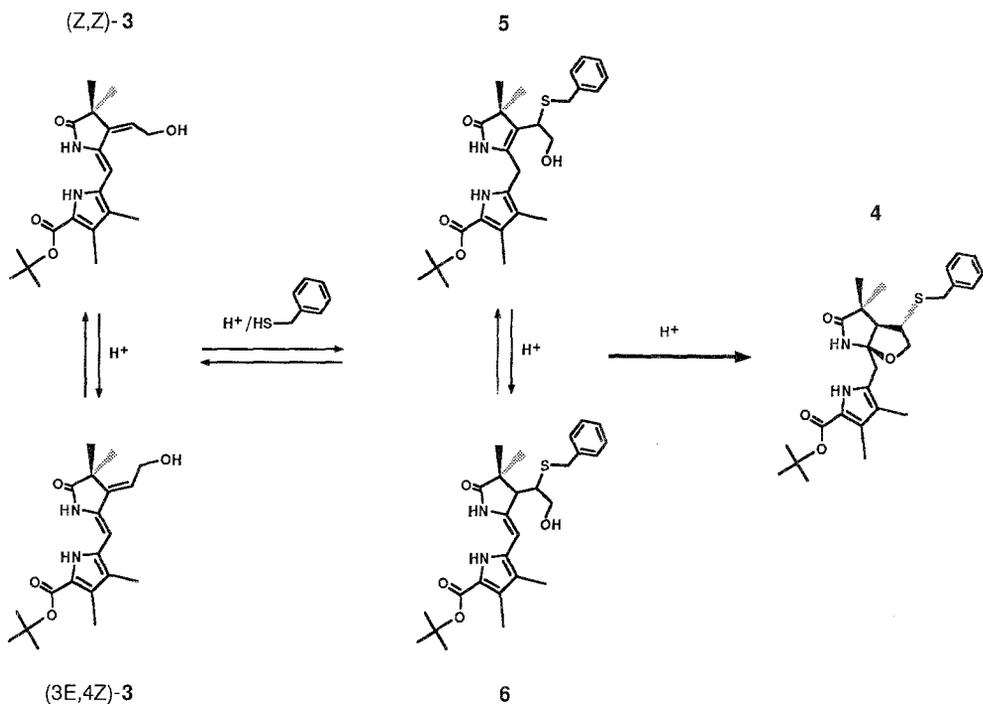
Mit der anschließenden LiAlH₄-Reduktion des Methylesters zum gewünschten Alkohol (*Z,Z*)-**3** wird die vinylog amidartige Stabilisierung von (*Z,Z*)-**2** aufgehoben, und über die konjugative Destabilisierung der beiden Stickstoff-Elektronenpaare die Donoreigenschaften in Position 5 wieder hergestellt. Das kommt auch mit der sauer katalysierten *Z* → *E*-Isomerisierung der 3-ständigen Doppelbindung zum Ausdruck: (*Z,Z*)-**3** isomerisiert in *d*-Chloroform (10 mg/0.5 ml) nach dem Zusatz von katalytischen Mengen Trifluoressigsäure (2 μ l) innerhalb einer halben Stunde zu einem 1:1-Gemisch aus (*Z,Z*)-**3** und (3*E*, 4*Z*)-**3**. Den ¹H-NMR-spektroskopischen Untersuchungen nach bleibt dieser Zustand über mehrere Stunden erhalten und ändert sich erst bei Zugabe größerer Säuremengen; aufgrund der dabei auftretenden Signalüberlappung ist eine eindeutige Strukturzuordnung der Folgeprodukte nicht mehr möglich; denkbar wäre allerdings die Bildung der beiden Konfigurationsisomeren (3*Z*, 4*E*)-**3** und (*E,E*)-**3**. Die Möglichkeit einer intramolekularen nucleophilen Addition der Alkoholgruppe an die exocyclische (C4 = C5)-Doppelbindung von (*Z,Z*)-**3** ist aus sterischen Gründen auszuschließen; die Reaktionsgeometrie ist für eine Zyklisierung zu ungünstig.

Die Zuordnung der Konfigurationen von (*Z,Z*)-**2**, (*Z,Z*)-**3** und (3*E*, 4*Z*)-**3** gelingt mit Hilfe der Kern-*Overhauser*-Differenzspektroskopie problemlos. Die beobachteten Kern-*Overhauser*-Effekte sind in der nachfolgenden Übersicht zusammengefaßt. Ihre Interpretation ermöglicht auch die Zuordnung einer *syn*-Konformation bezüglich der (C5—C6)-Einfachbindung.

Für die Durchführung der Schlüsselreaktion, der Addition von Benzylmercaptan an die 3ständige Doppelbindung von (*Z,Z*)-**3** wurden die üblichen Reaktionsbedingungen der nucleophilen Addition an Dihydrodipyrrinone [25] angewendet. Demnach erfolgte der Umsatz von (*Z,Z*)-**3** mit überschüssigem Benzylmercaptan und Trifluoressigsäure in Chloroform bei Raumtemperatur. Er führte zu einem Substanzgemisch, in dem die Additionsverbindung **4** dominierte. Formalen Strukturbetrachtungen nach ist sie das Produkt der erwarteten intermolekularen Thiol-



addition an die exozyklische Doppelbindung in Position 3 und einer intramolekularen Addition der Hydroxygruppe an die Brückendoppelbindung in Stellung 4. Die vermuteten Zwischenprodukte, die tautomeren Enamide **5** und **6**, konnten trotz versuchter Trennung und Charakterisierung der Nebenproduktanteile nicht nachgewiesen werden.



In $^1\text{H-NMR}$ -spektroskopisch kontrollierten Vorversuchen wurde festgestellt, daß die Addition der sauren Katalyse bedarf, und daß die dadurch

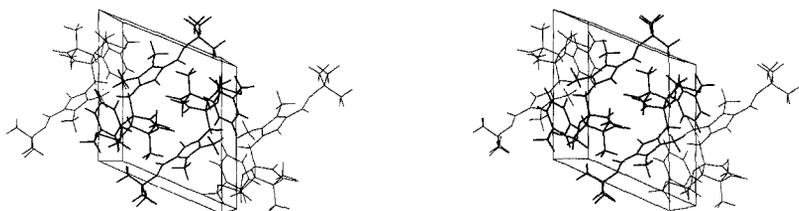


Abb. 2. Stereopackungsbild von **4**. Ein zentrosymmetrisches Dimer ist jeweils fett gezeichnet. Die kristallographischen Achsen haben folgende Orientierung: *X* nach hinten, *Y* von rechts nach links; *Z* aufwärts

ausgelöste Gleichgewichtseinstellung zwischen (*Z,Z*)-**3** und (*3E*, *4Z*)-**3** den Additionsvorgängen vorgelagert ist. Es kann deshalb nicht entschieden werden, ob beide Verbindungen als gleichwertige oder unterschiedlich reaktive Substrate für die Addition zur Verfügung stehen.

Die Relativkonfiguration des Addukts **4** wurde anfangs über Messungen charakteristischer Kern-*Overhauser*-Effekte ($2\text{-CH}_3 \rightarrow 4\text{-CH}$; $2\text{-CH}_3' \rightarrow 3^1\text{-CH}$; $4\text{-CH} \rightarrow 5\text{-CH}_2$) bestimmt; sie läßt sich zweckmäßig mit den Deskriptoren (*3RS*, *3¹SR*, *4RS*) oder (*u,u*) angeben. Wesentlich genauere Strukturinformationen erhält man aus der Röntgen-Kristallstrukturanalyse (siehe Abb. 1 und 2). Von besonderem Interesse sind im Hinblick auf Stabilitäts- und Reaktivitätsbetrachtungen die Fünfringkonformationen des bicyclischen Fragments. Sie erweisen sich als bekannt und stehen in bester Übereinstimmung mit denen eines in einer vorangegangenen Mitteilung beschriebenen, analog strukturierten Addukts [26]: der Lactamring besitzt eine durchwegs planare Geometrie, der anellierte Furoring eine weitgehend *envelope*-artige Konformation; die zugehörigen Ringpuckering-Amplituden betragen 0.10 und 0.40 Å; der Betrag des (C1—N10—C4—O17)-Torsionswinkel von 118.8° ergibt für die C4—O17-Bindung eine quasi-äquatorale Orientierung bezüglich der Lactamringebene. Diese Strukturmerkmale weisen das Addukt **4** als eine sehr stabile Verbindung aus. Es ist zu vermuten, daß es als das stabilste aller möglichen Additionsprodukte bevorzugt gebildet wird.

Diskussion

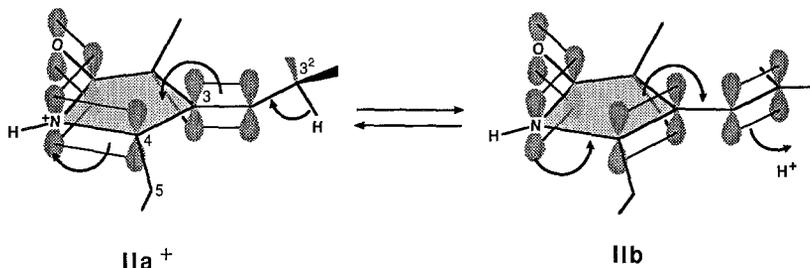
Das chemische Potential der konjugativen Wechselwirkung zwischen Pyrrol- und Enamiddonor ermöglicht 2,3-Dihydrodipyrin-1(*10H*)-onen **I** eine Reihe eng erflochtener, protonenkatalysierter Reaktionen einzugehen: dazu gehören die Tautomerisierungen zum entsprechenden N-Acylimin (**Ia** [27]) und den 2,5- bzw. 4,5-Dihydroformen (**Ib** [28] und **Ic** [29]), die Diastereomerisierung an C3 (**Id**) und der exozyklischen Doppelbindung (**Ie** [24, 25, 28]), sowie die Addition von Nucleophilen (**If** [24—26, 30]). 3-Ethyliden-2,3-Dihydrodipyrin-1(*10H*)-one **II** vermögen nach dem Prinzip der Vinylogie zusätzliche Reaktionsvarianten auszu-

bei Dihydrodipyrinonen festgestellten Verlauf der analogen C4=C5-Konfigurationsänderung und den damit verbundenen Tautomerisierungsreaktionen [25] vorgenommen werden. Zentrale Bedeutung kommt dabei dem durch Protonierung an C-5 entstandenen N-Acylimmoniumion (*Z*)-**IIa**⁺ zu. Es vermag die Tautomerisierung zum vinylogenen Enamid (*syn*)-**IIb** einzuleiten, dessen rotationsfähige, vinyliche Einfachbindung die strukturellen Voraussetzungen für die *Z*→*E*-Isomerisierung schafft. Aus der entsprechenden *anti*-Konformation heraus erfolgt dann im Zuge der rückläufigen Tautomerisierung über (*E*)-**IIa**⁺ die Bildung von (3*E*, 4*Z*)-**3**.

Diese Reaktionssequenz ist reversibel. Das kann aus dem nahezu konstant bleibenden, ¹H-NMR-spektroskopisch bestimmten 1:1-Verhältnis von (*Z,Z*)-**3** und (3*E*, 4*Z*)-**3** während der Thioladdition zu **4** geschlossen werden und erklärt vielleicht auch die Beobachtung, daß die im sauren Reaktionsmilieu durchgeführten Chromophorabspaltungen aus C-Phycocyanin und Phytochrom P_r immer zu den beiden stereoisomeren (*Z*)- und (*E*)-3-Ethyliden-bilindionen führen [31]. Eine thermodynamisch fundierte Erläuterung zur Triebkraft dieser Reaktion bedarf jedoch in Anbetracht des Befunds, daß aus Spaltungsversuchen mit siedendem Methanol nur (*E*)-Isomere isoliert werden [5, 11], eine Miteinbeziehung der jeweiligen Reaktions- bzw. Gleichgewichtsbedingungen. Erklärungsversuche, die nur auf den strukturellen Unterschieden der beiden Isomeren aufbauen und dabei das chemische Umfeld außer acht lassen, sind in diesem Fall mit Unsicherheiten behaftet. Im Fall des Phycocyanobilin-dimethylesters genügt beispielsweise Rückflußkochen in Methanol um eine „quantitative Gleichgewichtsverschiebung“ vom (3*Z*)- zum (3*E*)-Isomeren hin auszulösen [23]. Trotzdem ist man aber geneigt, die unterschiedlichen sterischen Hinderungen des 3¹-ständigen Substituenten in (3*Z*)- und (3*E*)-konfigurierten Derivaten als eine der Ursachen für das Abfließen der Reaktion in die *Z*→*E*-Richtung anzusehen. In (*Z,Z*)-**3** bewirkt die über den Lactamring fixierte cisoide Konformation der beiden (*Z*)-konfigurierten Doppelbindungen einen ausgeprägten Kontakt der Hydroxymethyleinheit mit dem *meso*-Wasserstoffatom; im (3*E*, 4*Z*)-Isomeren hingegen sind die Platzverhältnisse für den Hydroxymethylrest im Zwischenraum der geminalen Methylgruppen in Position 2 günstiger. Ähnliche Argumente wurden schon früher für die Erklärung der baseninduzierten *cis-trans*-Isomerisierung 2,3-dialkylsubstituierter Dihydrodipyrinone angeführt [32].

Die Ethylidensubstitution erhöht vermutlich auch die Tautomerisierungsgeschwindigkeiten der beiden Enamidformen **II** und **IIb**. Im Unterschied zur Tautomerisierung 3-alkylsubstituierter Dihydrodipyrinone **I** und **Ib** erfolgen die C-Protonierungen bzw. CH-Deprotonierungen nie am Ringkohlenstoff C-3, sondern immer nur an den exozyklischen Koh-

lenstoffatomen C-3² und C-5. Aufgrund der freien Drehbarkeit um die zugehörigen (C3¹—C3²)- und (C4—C5)-Einfachbindungen kann dort der Aufbau stereoelektronisch günstiger Reaktivkonformationen für σ (C—H)-Bindungsbildung bzw. -trennung problemlos und ohne energieaufwendige Veränderung der von Beginn an günstigen planaren Lactamringgeometrie vorgenommen werden.

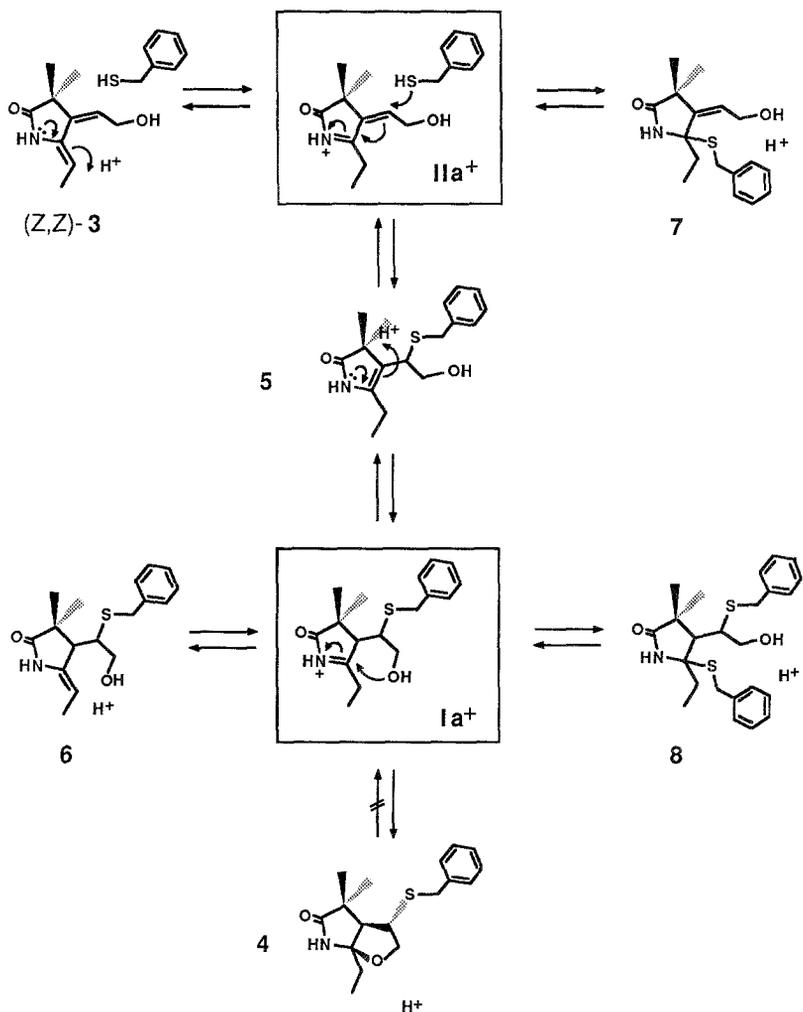


Thioladdition an die Ethylidendoppelbindung

Die reaktionsmechanistischen Grundlagen der nucleophilen Addition an die exozyklische (C4 = C5)-Doppelbindung von Dihydrodipyrrinonen [25] gestattet unter Berücksichtigung des Vinylogieprinzips die Erstellung eines allgemeinen Reaktionsschemas zum Additionsverhalten von (*Z,Z*)-**3** bzw. (*3E*, *4Z*)-**3** gegenüber Benzylmercaptan. Der besseren Übersicht wegen bleiben dabei die stereochemischen Aspekte vorläufig unberücksichtigt. Im nachfolgenden Formelschema wird das Konfigurationsisomere (*Z,Z*)-**3** willkürlich als Edukt ausgewählt.

Das eigentliche Substrat der Addition stellt das N-Acylimmonium **IIa**⁺ dar, das infolge der Säurekatalyse über die *meso*-C-Protonierung des Enamids (*Z,Z*)-**3** entsteht. Für den nucleophilen Angriff des Benzylmercaptans stehen seine Kohlenstoffatome C-3¹ und C-4 zur Verfügung. Von den beiden möglichen Additionsprodukten **5** und **7** besitzt ersteres aufgrund seines Enamidcharakters die strukturellen Voraussetzungen für eine zweite Addition. Seine C-3-Protonierung führt nämlich erneut zu einem N-Acylimmonium, **Ia**⁺, das im Zuge einer Zyklisierung zu **4** die Alkohol-Hydroxylgruppe intramolekular addieren kann oder nach erfolgter 5-CH-Deprotonierung in das Dihydrodipyrrinon **6** übergeht. Prinzipiell besteht auch noch die Möglichkeit einer weiteren Addition von Benzylmercaptan unter der Bildung von **8**.

Diese reaktionsmechanistischen Vorstellungen gewinnen mit der Isolierung von **4** an Bedeutung. Sie lassen erkennen, daß die Voraussetzungen für die Grundzustandschemie 3-ethylidensubstituierter Dihydrodipyrrinone vor allem in ihrer Fähigkeit zur Enamid/N-Acylimin-Tautomerie

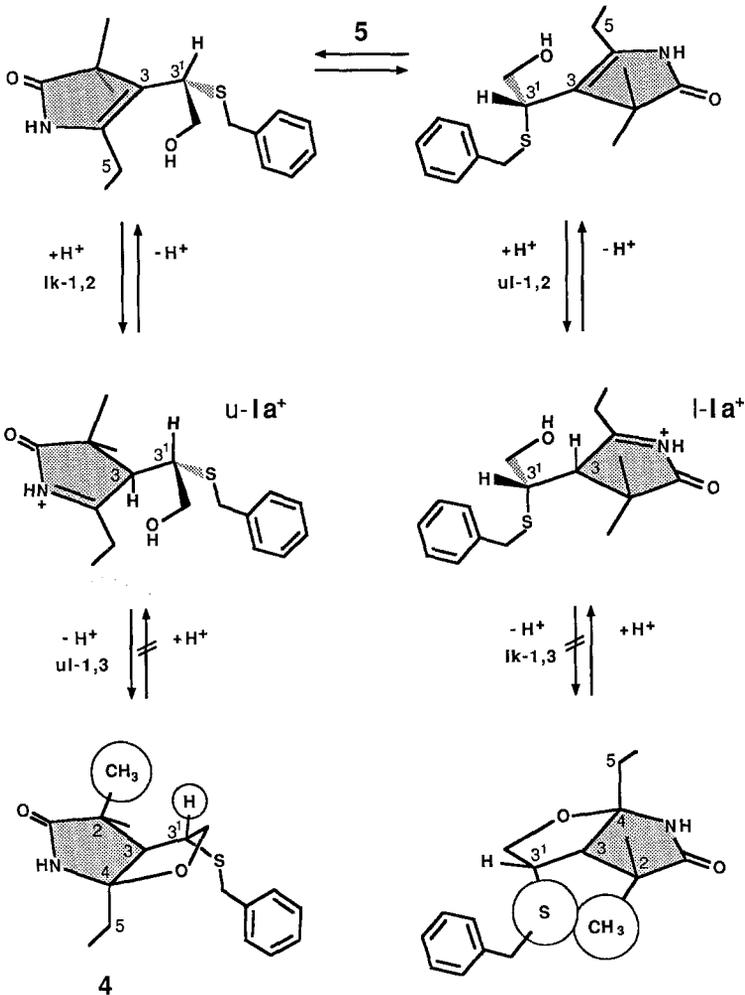


liegt, und daß die Annahme, vinyloge N-Acylimmoniumionen als die eigentlichen Substrate der Thioladdition zu betrachten, berechtigt ist.

Nach den bisherigen Erfahrungen erscheint es auch vertretbar, die Reversibilität der Additions- und Protonierungsschritte zu postulieren und damit die bevorzugte Bildung des bicyklischen Addukts 4 seiner größeren Stabilität zuzuschreiben. 4 besitzt nämlich, wie die Ergebnisse der Röntgenstrukturanalyse zeigen, jene Strukturmerkmale, die eine sauer katalysierte Ringöffnung zu **1a⁺** unter den vorgegebenen Reaktionsbedingungen beträchtlich erschweren. Für den glatten Verlauf einer solchen Eliminierung ist nach stereoelektronischen Prinzipien eine *periplanare*

Orientierung der σ (C4—O)-Bindung im Bezug auf die π -Ebene des Lactamteils erforderlich. Eine solche Reaktivkonformation kann aber im relativ starren Gerüst des Bicyklus, in dem die *clinale* Anordnung fixiert zu sein scheint, nicht eingenommen werden. Die bicyklische Additionsverbindung **4** ist demnach das „Abfangprodukt“ der primär gebildeten Thioladdukte **5** und **6**.

Unter Mitberücksichtigung der stereochemischen Gegebenheiten ist diese Behauptung jedoch zu präzisieren. Die Relativkonfiguration von **4** läßt nämlich erkennen, daß für die abschließende Ringschlußreaktion nur N-Acylimmoniumionen mit *u*-Konfiguration (*u*-**1a**⁺) hinsichtlich der



Zentren C-3 und C-3¹ akzeptiert werden. Der Grund dafür liegt in der sterischen Wechselwirkung des Benzylthiosubstituenten mit einer der beiden 2-ständigen Methylgruppen. Diese Wechselwirkung bleibt nur für die Zyklisierung zu **4** gering; für den Ringschluß zum (3*RS*,3¹*RS*,4*RS*)- bzw. (*l,l*)-Diastereomeren ist sie zu groß.

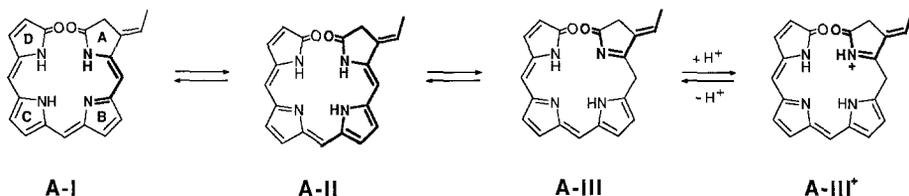
Wegen der Reversibilität der Protonierung von **5** in Position 3 stehen *u*- und *l*-konfigurierte N-Acylimmoniumionen im Gleichgewicht. Die für die Zyklisierung zu **4** verbrauchten Mengen an *u*-**1a**⁺ werden demnach aus *l*-**1a**⁺ über **5** nachgebildet. Im Prinzip sind diese Überlegungen auch für alle anderen Reaktionen des Additionsschemas gültig, die als Gleichgewichtsreaktionen dem Ringschluß vorgelagert sind. Im Falle der diastereomeren Edukte (*Z,Z*)-**3** und (3*E*,4*Z*)-**3** ist diese Überlegung experimentell belegt, im Falle der einzelnen Zwischenstufen und ihrer Diastereomere bleibt sie eine Vermutung. Dennoch entsteht der Eindruck, als sei das Addukt **4** das letzte und seiner Stereochemie wegen auch das stabilste Glied in der Kette jener Zwischenprodukte und Stereoisomeren, die im Zuge einer solchen Reaktionssequenz gebildet werden können.

Zusammenfassung

Mit der Isolierung des Additionsproduktes **4** kann die Möglichkeit der Thioladdition an die 3-ständige Ethylidendoppelbindung von 2,3-Dihydrodipyrinonen nachgewiesen werden. Der Modellcharakter dieser Reaktion für den Aufbau der Chromophor-Protein-Thioetherbindung liegt mit dem Vergleich von Edukt- und Produktstrukturen im Bereich des Lactamringes auf der Hand, auch wenn das Substitutionsmuster mit den 2-ständigen geminalen Methylgruppen und der Hydroxylgruppe in Position 3² nicht mit dem der Naturstoffe übereinstimmt. Diese auf den ersten Blick als Modellschwäche auszulegenden Strukturunterschiede sind aber im Grunde notwendig, um den Vorgang der Addition überschaubar zu machen. Die Verwendung einer 2,2-dimethylsubstituierten Modellverbindungen reduziert einerseits die Anzahl möglicher diastereomerer Additionsprodukte und macht andererseits die in säurehaltigen Lösungen stattfindende Tautomerisierung zu 4,5-Dihydrodipyrinonen [29] unmöglich. Die Hydroxylgruppe hingegen erfüllt ihre Funktion als Abfangreagens für die primär gebildeten Thioladdukte.

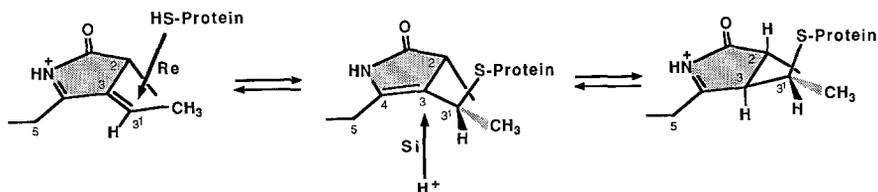
Eine dritte, strukturell bedingte Abweichung des Modells besteht im Vorliegen eines 1*H*-Pyrrolsubstituenten anstelle einer Azafulven-Einheit des Ringes B. Ausgelöst durch die bereits diskutierte [24], vinylog amidartige Stabilisierung bevorzugen 2,3-Dihydrobilindione die tautomere Form **A-I** gegenüber der Form **A-II**. Letztere ist aber aufgrund der konjugativen Donor-Donor-Wechselwirkung des Ring-B-Pyrrols mit dem Ring-A-Enamid die reaktivere. Die Modellverbindung (*Z,Z*)-**3** ist eine

Teilstruktur dieses Tautomeren. Die Annahme, daß die Addition von Thiolen an die Ethylidendoppelbindung von 2,3-Dihydrobilindionen ihren Ausgang vom Tautomeren **A-II** nimmt, liegt somit näher als die Vermutung einer Modellschwäche.



Die Additionsbereitschaft ist aber damit noch nicht gegeben. Sie bedarf einer neuerlichen, durch H/D-Austausch in Position 5 nachgewiesenen [20] Tautomerisierung des Ring-A-Enamids zum entsprechenden N-Acylimin **A-III**. Die Verwendung von Säure erweist sich dabei als vorteilhaft. Sie fördert die Bildung hoch reaktiver N-Acylimmoniumionen **A-III⁺** und ermöglicht damit eine rasche Addition des Thiols in vinyloger Position samt der anschließenden Tautomerisierung unter sehr milden Reaktionsbedingungen. Da die Säurekatalyse auch zur Beschleunigung der entsprechenden Rückreaktionen beiträgt, unterliegt die Adduktbildung der thermodynamischen Kontrolle. Dies kommt bei proteingebundenen Gallenpigmenten beispielsweise mit der sterisch günstigen *trans*-Konfiguration ihrer C-2 und C-3-Substituenten zum Ausdruck.

Letztlich erlauben diese reaktionsmechanistischen Vorstellungen unter Mitberücksichtigung der inzwischen bekannten (2*R*,3*R*,3'*R*)-Absolutkonfiguration des C-Phycocyanins die Stereochemie der Thioetherbindung mit einem Angriff des Thiols auf die *Re*-Seite des C-3'-Kohlenstoffs der (*E*)-konfigurierten Ethylidendoppelbindung festzulegen. Diese Festlegung stützt sich erstens auf die Beobachtung, daß die über die Biosynthese des Phycocyanobilins vorgegebene (*R*)-Absolutkonfiguration an C-2 im sauren Milieu erhalten bleibt [5], zweitens, daß im eigentlichen Additionsschritt die Vorteile der doppelten Stereodifferenzierung wirksam werden, und drittens, die Reversibilität der anschließenden C-3-Protonierung die Bildung des thermodynamisch stabileren *trans*-2,3-Konfigurationsisomeren ermöglicht.



Experimenteller Teil

Darstellung und Charakterisierung von (*Z,Z*)-2, (*Z,Z*)-3, (*3E,4Z*)-3 und 4

Die Schmelzpunkte bestimmte man mit einem *Kofler*-Heiztischmikroskop (Reichert): sie sind unkorrigiert. Für die Aufnahme der ^1H - und ^{13}C -NMR-Spektren stand ein Bruker WM-360-Spektrometer mit entsprechenden 5-mm-Probenköpfen zur Verfügung. Für die ^1H -NMR-Spektren diente *TMS* als interner Standard; für die ^{13}C -NMR-Spektren beziehen sich die Verschiebungen auf das $^{13}\text{CDCl}_3$ -Signal mit $\delta = 77.0$ ppm. Die Aufnahme der ^{13}C -NMR-Spektren wurde über breitbandmodulierte Entkopplung bei einer Entkopplerleistung von 5 W während 1.6 s Aquisitionszeit und 0.5 W während 0.8 s Relaxationsverzögerung vorgenommen. Die Zuordnung bestimmter ^{13}C -NMR-Signale wurde lediglich über den Vergleich mit einschlägigen Literaturdaten [33–35] getroffen. Die Aufnahme der Nuclear-Overhauser-Differenzspektren erfolgte durch zyklische Akkumulation von je 4 „dummy scans“ und je 16 FIDs für je eine on- und je eine off-resonance-Entkopplerfrequenz. Die Subtraktion der off-resonance-FIDs von den NOE-FIDs wurde am Ende eines jeden Zyklus vorgenommen; erst dann wurde das Ergebnis gespeichert. Insgesamt wurden 16 Zyklen (2×256 scans) pro Differenzspektrum durchlaufen. Die Einstrahlzeit betrug 0.8 s. Die Entkopplerleistung von 0.2 W wurde mit 40 dB abgeschwächt. Die weitere spektroskopische Charakterisierung wurde mit den Spektrometern Zeiss IMR 25 (IR), Perkin-Elmer-330 (UV) und Finnigan-MAT-212-M (MS) vorgenommen.

Als Adsorbens für die Säulenchromatographie verwendete man Kieselgel 60 (Merck); für die präparative Dünnschichtchromatographie kamen Fertigplatten mit einer 2 mm dicken Schicht aus Kieselgel 60 $F_{254+366}$ (Merck) zum Einsatz. Die analytische Dünnschichtchromatographie wurde mit Kieselgel 60 F_{254} (Merck) beschichteten Aluminiumfolien durchgeführt.

Die im folgenden verwendete Nomenklatur orientiert sich an den Empfehlungen der IUPAC [36]; hinsichtlich der Bezifferung ist nur für das Stammsystem des Dipyrin-1(10*H*)-ons eine Übereinstimmung mit der in den vorangegangenen Abschnitten verwendeten, aus der Röntgenstrukturanalyse stammenden Numerierung gegeben.

(*Z*)-2,3-Dihydro-3-[(*Z*)-metoxycarbonylmethyliden]-1-oxo-2,2,7,8-tetramethyldipyrin-9(10*H*)-carbonsäure-*tert*-butylester [(*Z,Z*)-2; $\text{C}_{21}\text{H}_{28}\text{N}_2\text{O}_5$]

Zu 25 ml einer eisgekühlten, absoluten Etherlösung von 106 mg (0.272 mmol) Dihydrodipyrinon (*Z*)-1 [37] tropft man innerhalb von 15 min eine Lösung von 64 mg (0.282 mmol) 2,3-Dichlor-5,6-dicyano-*p*-benzochinon (*DDQ*) in 15 ml absolutem Ether. Nach 15 min Rühren bei Raumtemperatur zieht man den Ether ab, nimmt den Rückstand in einer 10/1-Methylenchlorid/Methanol-Mischung auf und appliziert auf einer Kieselgelsäule. Man eluiert mit einer 50/1-Methylenchlorid/Methanol-Mischung und erhält 54 mg (51%) schnell wanderndes, gelb gefärbtes Produkt (*Z,Z*)-2. Schmp.: 213–215 °C (unter teilweiser Zersetzung).

^1H -NMR (CDCl_3 , 360 MHz): $\delta = 8.69$ (s, breit, 1H, NH-Pyrrol), 7.92 (s, breit, 1H, NH-Lactam), 7.80 (s, 1H, =CH—CO), 5.86 (s, 1H, =CH-5), 3.78 (s, 3H, O—CH₃), 2.24 (s, 3H, CH₃-8), 2.02 (s, 3H, CH₃-7), 1.57 (s, 9H, *tert*-Butyl), 1.36 [s, 6H, (CH₃)₂C] ppm.

^{13}C -NMR (CDCl_3 , 80 MHz): $\delta = 179.1$ (CO-Lactam); 166.1 (CO-Methylester); 161.0 (CO-*tert*-Butylester); 155.9 (C-4); 130.9, 128.7, 127.7, 127.0 (C-6, C-8, C-9 bzw. C-7); 113.5 (C-3); 102.8 [—CH = (C-3)]; 91.5 (C-5); 80.9 (C-*tert*-Butyl); 51.7 (O—CH₃); 46.4 (C-2); 28.5 [(CH₃)₃-*tert*-Butyl]; 25.5 [(CH₃)₂C]; 10.5, 9.8 [CH₃-(C-8) bzw. CH₃-(C-7)] ppm.

IR (CHCl₃): $\nu = 1719$ (s), 1701 (s), 1697 (sh), 1672 (m) cm⁻¹.
 UV-VIS (CH₃OH): $\nu = 240$ (11 000), 282 (17 100), 397 (5 800) nm (ϵ).
 MS (70 eV, 170 °C): m/e (%) = 388 (M^+ , 58), 332 (100), 317 (57), 314 (47), 313 (46), 301 (38), 283 (51), 273 (70), 255 (80), 229 (58).
 R_f -Wert (Kieselgel; Methylenchlorid/Aceton = 10/1): 0.6.

(*Z*)-2,3-Dihydro-3-[(*Z*)-2-hydroxyethyliden]-1-oxo-2,2,7,8-tetramethyl-dipyr-
 rin-9(10*H*)-carbonsäure-*tert*-butylester [(*Z,Z*)-3; C₂₀H₂₈N₂O₄]

Zu einer bei Raumtemperatur gerührten Suspension von 102 mg (0.263 mmol) Dihydrodipyrromethenon (*Z,Z*)-2 in 25 ml absolutem Ether gibt man 20 mg (0.526 mmol) Lithiumaluminiumhydrid in zwei Portionen im Abstand von 30 min. Nach 1 Stunde Rühren werden insgesamt 50 ml Wasser vorsichtig zugegeben. Die Reaktionsmischung wird mit 2*N*-Salzsäure neutralisiert und fünfmal mit je 10 ml Ether extrahiert. Die vereinigten Etherphasen werden mit gesättigter Natriumhydrogencarbonatlösung gewaschen, mit Kaliumcarbonat getrocknet, und anschließend das Lösungsmittel abgezogen. Der Rückstand wird säulenchromatographiert (Kieselgel, Methylenchlorid/Methanol = 50/1). Man eluiert zuerst 4 mg (4%) Edukt (*Z,Z*)-2, dann 55 mg (58%) Produkt (*Z,Z*)-3. Schmp.: 95–97 °C.

¹H-NMR (CDCl₃, 360 MHz): $\delta = 8.79$ (s, breit, 1H, NH-Pyrrol), 7.98 (s, breit, 1H, NH-Lactam), 5.80 (t, $J = 5.7$ Hz, 1H, =CH—CH₂—), 5.52 (s, 1H, =CH-5), 4.56 (d, $J = 5.7$ Hz, 2H, =CH—CH₂—), 2.23 (s, 3H, CH₃-8), 1.95 (s, 3H, CH₃-7), 1.56 (s, 9H, *tert*-Butyl), 1.30 [s, 6H, (CH₃)₂C] ppm.

¹³C-NMR (CDCl₃, 80 MHz): $\delta = 180.8$ (CO-Lactam); 161.5 (CO-Ester); 140.8 (C-4); 134.2, 126.6 [C-3 bzw. =CH-(C-3)]; 127.9, 127.0, 121.0, 119.9 (C-6, C-8, C-9, bzw. C-7); 96.1 (C-5); 80.8 (C-*tert*-Butyl); 60.0 (CH₂-O); 44.5 (C-2); 28.5 [(CH₃)₃-*tert*-Butyl]; 25.3 [(CH₃)₂C]; 10.6, 9.6 [CH₃-(C-8) bzw. CH₃-(C-7)] ppm.

IR (CHCl₃): $\nu = 1719$ (s), 1692 (m), 1670 (m) cm⁻¹.

UV (CH₃OH): $\lambda = 225$ (11 700), 275 (9 600), 337 (11 900) nm (ϵ).

MS (70 eV, 170 °C) m/e (%) = 360 (M^+ , 76), 304 (94), 286 (72), 273 (73), 255 (83), 229 (72), 199 (49), 139 (100).

R_f -Wert (Kieselgel; Chloroform/Methanol = 20/1): 0.4.

(*Z*)-2,3-Dihydro-3-[(*Z*)-2-hydroxyethyliden]-1-oxo-2,2,7,8-tetramethyl-dipyr-
 rin-9(10*H*)-carbonsäure-*tert*-butylester [(3*E*,4*Z*)-3; C₂₀H₂₈N₂O₄]

Die Bildung von (*E,Z*)-3 wurde lediglich ¹H-NMR-spektroskopisch nachgewiesen. (3*E*,4*Z*)-3 entsteht in CDCl₃-Lösungen von (*Z,Z*)-3 (10 mg/0.5 ml) nach Zugabe von Trifluoressigsäure (2 μ l). Nach etwa 30 min wird der Gleichgewichtszustand [(3*E*,4*Z*)-3:(*Z,Z*)-3 = 1:1] erreicht. Die nach der Aufarbeitung durchgeführten Versuche, die beiden Isomeren mit üblichen chromatographischen Methoden zu trennen schlugen fehl. Die im folgenden angegebenen ¹H-NMR-Daten entstammen dem Spektrum eines Isomerengemischs.

¹H-NMR (CDCl₃, 360 MHz): $\delta = 8.64$ (s, breit, 1H, NH-Pyrrol), (s, breit, 1H, NH-Lactam), 6.24 (t, $J = 7.1$ Hz, 1H, =CH—CH₂—), 5.82 (s, 1H, =CH-5), 4.50 (d, $J = 7.1$ Hz, 2H, =CH—CH₂—), 2.23 (s, 3H, CH₃-8), 1.95 (s, 3H, CH₃-7), 1.56 (s, 9H, *tert*-Butyl), 1.42 [s, 6H, (CH₃)₂C] ppm.

(3*RS*, 3'*SR*, 4*RS*)-3'-Benzylthio-2,3,3',3'',4,5-hexahydro-1-oxo-2,2,7,8-tetramethyl-furo[2,3-*c*]dipyrin-9(10*H*)-carbonsäure-*tert*-butylester [4; C₂₇H₃₆N₂O₄S]

2 ml einer Chloroformlösung von 18 mg (0,050 mmol) Ethylidendihydrodipyrromethenon (*Z,Z*)-3, 25 μ l (0.212 mmol) Benzylmercaptan und 15 μ l (0.196 mmol) Trifluoressigsäure werden bei 25 °C unter Argon 12 h gerührt. Nach dem Abziehen

des Lösungsmittels wird der verbleibende Rückstand einer präparativen Schichtchromatographie unterworfen (Kieselgel, 2 mm; Methylenchlorid/Methanol = 50/3; zweimalige Entwicklung). Eluieren der intensivsten Zone mit einer 10/3-Methylenchlorid/Methanol-Mischung führt zu 11 mg (45%) **4**, das aus Methanol umkristallisiert werden kann. Schmp.: 169–170 °C.

¹H-NMR (CDCl₃, 360 MHz): δ = 9.06 (s, breit, 1 H, NH-Pyrrol); 7.2–7.4 (m, 5 H, Phenyl); 5.97 (s, breit, 1 H, NH-Lactam); 3.85, 3.82, 3.15, 2.28 (ABMX-System, $J_{AB} = 10.2$ Hz, $J_{AM} = 2.2$ Hz, $J_{AX} = J_{BX} = 0$ Hz, $J_{BM} = 4.2$ Hz, $J_{MX} = 2.2$ Hz, 4H, AB = CH₂—O—, M = S—CH, X = —CH-3); 3.77, 3.72 (AB-System, $J_{AB} = 13.8$ Hz, 2H, S—CH₂); 3.14, 3.05 (AB-System, $J_{AB} = 14.7$ Hz, 2H, CH₂-5); 2.22 (s, 3H, CH₃-8); 1.93 (s, 3H, CH₃-7); 1.55 (s, 9H, *tert*-Butyl); 1.06, 0.98 (2s, je 3H, 2CH₃-2) ppm.

¹³C-NMR (CDCl₃, 80 MHz): δ = 179.9 (CO-Lactam); 161.4 (CO-Ester); 137.5 (Phenyl-C-1); 128.9, 128.8 (Phenyl-C-3 und -C-5 bzw. Phenyl-C-2 und -C-6); 127.5 (Phenyl-C-4); 126.1, 125.7, 119.9, 118.8 (C-6, C-8, C-9 bzw. C-7); 96.6 (C-4); 80.3 (C-*tert*-Butyl); 71.6, 60.7, 45.7, 42.7, 36.8, 36.4, 29.0, 21.1 [O—CH₂, C-3¹, C-3, C-2, C-5, S—CH₂ bzw. 2CH₃-(C-2)]; 28.6 [(CH₃)₃-*tert*-Butyl]; 10.6, 9.1 [CH₃-(C-8) bzw. CH₃-(C-7)] ppm.

IR (CHCl₃): ν = 1697 (s), 1672 (m) cm⁻¹.

UV (CH₃OH): λ = 248 (sh, 8100), 276 (17700) nm (ε).

MS (70 eV, 120 °C): *m/e* (%) = 484 (*M*⁺, 1), 276 (10), 209 (11), 153 (8), 109 (8), 91 (100).

R_f-Wert (Kieselgel; Chloroform/Methanol = 20/1): 0.6.

Röntgenstrukturanalyse von **4**

Die Verbindung **4** kristallisiert bei Raumtemperatur aus Methanol-Lösungen. Die Messungen wurden mit einem modifizierten STOE-4-Kreis-Diffraktometer mit MoK_α-Strahlung (λ = 0.71069 Å, Graphit Monochromator) bei 97 ± 0.5 K unter Verwendung einer NONIUS-Tieftemperatureinrichtung und eines EUROTHERM-Temperaturreglers durchgeführt. Zur Unterdrückung von Eisablagerungen wurde das Diffraktometer in einer glove-box aufgestellt, in der der atmosphärische Wassergehalt mit Hilfe von Silicagel gesenkt wurde.

Wichtige experimentelle Parameter und Meßdaten sind in Tabelle 1 zusammengefaßt. Die Koordinaten der Kristallstruktur werden beim *Cambridge Crystallographic Data File* [38] hinterlegt. Sie sind auch der Literatur [39] zu entnehmen.

Aufgrund der Verzwilligung der Kristalle wurden die Scanbreiten so gewählt, daß sie über beide Teilmaxima reichten. Als Obergrenze für die Aufspaltung der Reflexmaxima wurde 1° toleriert. Die so erhaltene Orientierungsmatrix repräsentiert deshalb einen Mittelwert zweier geringfügig gegeneinander verdrehter Zellen.

Die Intensitätsdaten, gemessen nach der „background-signal-background“-Methode, wurden in der üblichen Weise verarbeitet (Lp-Korrekturen, keine Absorptionskorrektur). Die Struktur ließ sich problemlos mit direkten Methoden lösen und über „least-squares“ (*F*-Werte) verfeinern. Dabei wurden alle Nichtwasserstoffatome anisotrop verfeinert. Die Protonenpositionen konnten aus Differenz-Fouriersynthesen bestimmt werden. In den letzten Verfeinerungszyklen wurden die Kohlenstoff- bzw. Stickstoff-Wasserstoffabstände fixiert (C-H: 1.08 Å, N-H: 1.07 Å).

Für die Auswertung gelangten folgende, teilweise modifizierte Computerprogramme zur Anwendung: Multan [40], Shelx [41], Pluto [42] und Ortep [43].

Tabelle 1. Zusammenfassung experimenteller Parameter und Meßdaten für die Röntgenstrukturanalyse von 4

Summenformel	$C_{27}H_{36}N_2O_4S$	Standardreflexe: Indizes	1 0 3
Kristallgröße [mm]	0.33 x 0.3 x 0.15		2 1 4
Raumgruppe	P 1		3 -6 5
Z	2		
Zelldimensionen a[Å]	10.938(6)	Frequenz	100
b[Å]	11.534(7)	maximale Schwankung	± 4%
c[Å]	11.649(6)	Zahl der gemessenen Reflexe	5341
α [°]	109.55(5)	Zahl der unabhängigen Reflexe	4877
β [°]	91.72(4)	Zahl der signifikanten Reflexe	
γ [°]	107.27(5)	$ F_o > 4\sigma(F_o)$	2795
V[Å ³]	1308.8(7)		
Scanbreite [°] (ω/θ -Scan)	1.5	R/R _w -Wert	0.069 / 0.062
berechnete Dichte [gcm ⁻³]	1.230	a/b aus $w_i = a/(\sigma^2(F_i) + b(F_i)^2)$	1.8 / 0.0002
Zahl und 2θ -Bereich [°] von			
Reflexen zur Bestimmung	81	Zahl der Observablen	2797
der Gitterparameter	$6 \leq 2\theta \leq 35$	Zahl der Parameter	456
Grenzen der	$3.5 \leq 2\theta \leq 50^\circ$	höchster Peak in letzter	
Intensitätsdatensammlung	$-13 \leq h \leq 13$	ΔF -Fourier-Synthese [eÅ ⁻³]	0.21
	$-13 \leq k \leq 13$		
	$0 \leq l \leq 13$		

Dank

Wir danken Herrn Prof. Dr. *H. Falk* für seine stete Diskussionsbereitschaft und das Interesse an dieser Arbeit, Herrn Doz. Dr. *C. Kratky* für seine Hilfestellung im Bereich der Röntgenstrukturanalyse und Herrn Dipl.-Ing. *J. Lehner* für die Aufnahme der Massenspektren. *U.G. Wagner* dankt der *Gesellschaft Österreichischer Chemiker* für ein Dissertationsstipendium.

Literatur

- [1] *Schirmer T, Huber R, Schneider M, Bode W, Zuber H, Miller M, Hackert ML* (1986) *J Mol Biol* 188: 651
- [2] *Bishop JE, Rapoport H, Klotz VA, Chan CF, Glazer AN, Füglistaller P, Zuber H* (1987) *J Am Chem Soc* 109: 875
- [3] *Cole WJ, Chapman DJ, Siegelmann HW* (1968) *Biochemistry* 7: 2929
- [4] *Rüdiger W, O'Carra P* (1969) *Eur J Biochem* 7: 509
- [5] *Brockmann H jr, Knobloch G* (1973) *Chem Ber* 106: 803
- [6] *Gossauer A, Hirsch W* (1974) *Liebigs Ann Chem* 1974: 1496
- [7] *Gossauer A, Hinze R-P* (1978) *J Org Chem* 43: 283

- [8] *Chapman DJ, Cole DJ, Siegelman HW* (1967) *J Am Chem Soc* 89: 5976
- [9] *Crespi HL, Katz JJ* (1969) *Phytochemistry* 8: 759
- [10] *Rüdiger W, O'Carra P, O'h Eocha C* (1967) *Nature* 215: 1477
- [11] *Gossauer A, Klahr E* (1979) *Chem Ber* 112: 2243
- [12] *Gossauer A, Weller J-P* (1980) *J Am Chem Soc* 100: 5928
- [13] *Grombein S, Rüdiger W, Zimmermann H* (1975) *Hoppe Seylers Z Physiol Chem* 356: 1709
- [14] *Klein G, Grombein S, Rüdiger W* (1977) *Hoppe Seylers Z Physiol Chem* 358: 1077
- [15] *Weller J-P, Gossauer A* (1980) *Chem Ber* 113: 1603
- [16] *Troxler RF, Bogorad L* (1966) *Plant Physiol* 41: 491
- [17] *Troxler RF, Kelly P, Brown SB* (1978) *Biochem J* 172: 569
- [18] *Klein G, Rüdiger W* (1978) *Liebigs Ann Chem* 1978: 267
- [19] *Schoch S, Klein G, Linsenmeier U, Rüdiger W* (1976) *Liebigs Ann Chem* 1976: 549
- [20] *Lagarias JC, Glazer AN, Rapoport H* (1979) *J Am Chem Soc* 101: 5030
- [21] *Lagarias JC, Rapoport H* (1980) *J Am Chem Soc* 102: 4821
- [22] *Gossauer A, Hinze R-P, Kutschan R* (1981) *Chem Ber* 114: 132
- [23] *Gossauer A* (1983) *Tetrahedron* 39: 1933
- [24] *Grubmayr K, Kapl G* (1988) *Monatsh Chemie* 119: 605
- [25] *Grubmayr K, Wagner UG* (1988) *Monatsh Chemie* 119: 793
- [26] *Grubmayr K, Wagner UG* (1988) *Monatsh Chemie* 119: 813
- [27] *Farrera JA, Ribó JM, Serra X, Trull FR* (1986) *Liebigs Ann Chem* 1986: 1241
- [28] *Falk H, Grubmayr K, Kapl G, Zrunek U* (1982) *Monatsh Chem* 113: 1329
- [29] *Plieninger H, Preuss I* (1983) *Liebigs Ann Chem* 1983: 585
- [30] *Falk H, Zrunek U* (1983) *Monatsh Chem* 114: 983
- [31] *Rüdiger W, Brandlmeier T, Blos I, Gossauer A, Weller J-P* (1980) *Z Naturforsch C*: 763
- [32] *Gossauer A, Blacha-Puller M* (1981) *Liebigs Ann Chem* 1981: 1492
- [33] *Falk H, Grubmayr K, Müller N, Vormayr G* (1985) *Monatsh Chem* 116: 53
- [34] *Wray V, Gossauer A, Grüning B, Reifentahl G, Zilch H* (1979) *J Chem Soc Perkin Trans II* 1979: 1558
- [35] *Falk H, Müller N, Vormayr G* (1984) *Org Magn Reson* 22: 576
- [36] *Moss GP* (1987) *Pure Appl Chem* 59: 779
- [37] *Grubmayr K* (1982) *Monatsh Chem* 113: 1073
- [38] *Allen FH, Kennard O, Taylor R* (1983) *Acc Chem Res* 16: 146
- [39] *Wagner GU* (1987) Dissertation, Karl-Franzens-Universität Graz
- [40] *German G, Main P, Woolfson MM* (1971) *Acta Cryst A* 27: 368
- [41] *Sheldrick GM* (1976) *Shelx 76*, a program for crystal structure determination. University of Cambridge, Cambridge, England
- [42] *Motherwell S* (1976) Program Pluto. University of Cambridge, Cambridge, England
- [43] *Johnson CK* (1976) Ortep report ORNL 5138. Oak Ridge National Laboratory, Oak Ridge, Tennessee, U.S.A.