

Das bedeutet, daß die direkte Protonenübertragung zwischen den beiden funktionellen Gruppen unter Zwischenschaltung von Wasserbrücken wesentlich leichter erfolgen kann als die entsprechenden Reaktionen über die freien Protonen oder Hydroxid-Ionen.

Diese Ergebnisse sind von besonderem Interesse im Hinblick auf Enzymreaktionen, in denen durch schnelle Strukturumwandlungen (10^{-7} s) miteinander reagierende Gruppen in engen räumlichen Kontakt gebracht werden können. Sie zeigen, daß die Elementarprozesse der intramolekularen Protonenübertragung vergleichbar schnell oder schneller als Strukturumwandlungen ablaufen.

Eingegangen am 14. Januar 1972 [Z 604]

- [1] R. E. Benesch u. R. Benesch, J. Amer. Chem. Soc. 77, 5877 (1955).
- [2] K. Wallenfels u. Ch. Streffer, Biochem. Z. 346, 119 (1966).
- [3] E. Coates, C. Marsden u. B. Rigg, Trans. Faraday Soc. 65, 863 (1969).
- [4] J. T. Edsall u. J. Wyman: Biophysical Chemistry. Bd. 1. Academic Press, New York 1966.
- [5] M. Eigen u. L. de Maeyer in A. Weissberger: Technique of Organic Chemistry. Bd. 8/2, Interscience, New York 1963.
- [6] F. Peters, noch unveröffentlicht.
- [7] M. Eigen, Angew. Chem. 75, 489 (1963); Angew. Chem. internat. Edit. 3, 1 (1964).

Totalsynthese von $[\alpha, \gamma\text{-}^{14}\text{C}_2]\text{-Uroporphyrin III}$

Von Burchard Franck, Dietrich Gantz und Fritz Hüper^(*)

Uroporphyrin III (6) sowie dessen Hexahydro-Derivat, das Uroporphyrinogen III (4) werden als Biosynthese-Vorstufen der biologisch wichtigen Tetrapyrrole Häm, Chlorophyll und Vitamin B₁₂ diskutiert^[11]. Spezifisch ^{14}C -markiertes Uroporphyrin III und Uroporphyrinogen III zur Prüfung dieser Vorstellungen durch Fütterungsversuche standen bisher nicht zur Verfügung^[21]. Wir teilen hier ein Verfahren zur Totalsynthese von $[\alpha, \gamma\text{-}^{14}\text{C}_2]\text{-Uroporphyrin}$ in Form seines haltbaren, als Ausgangsmaterial für Fütterungsversuche gut geeigneten Octamethylesters (5) mit. Hieraus läßt sich das Uroporphyrinogen III durch Hydrolyse und Reduktion leicht gewinnen.

Für die spezifische ^{14}C -Markierung wurden die Methin-Gruppen α und γ ausgewählt. Zum einen läßt sich hier die Radioaktivität während der letzten Schritte einer hinsichtlich Stufenzahl und Ausbeute günstigen konvergierenden Synthese^[4] einführen und zum anderen können die entsprechenden C-Atome wichtiger biogenetischer Folgeprodukte zur Lokalisation der Radioaktivität selektiv herausgespalten werden^[5, 6].

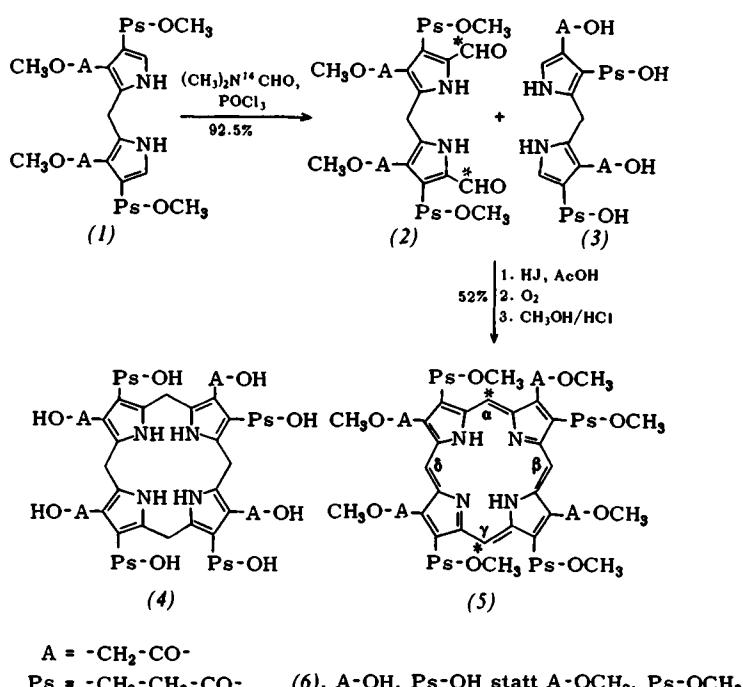
In Anlehnung an MacDonald^[7] und Treibs^[8] wurden in 13- bzw. 11-stufigen Synthesen die Dipyrrylmethane (1) und (3) dargestellt. Um (1) für einen anschließenden säurekatalysierten Porphyrin-Ringschluß in den radioaktiven Dialdehyd (2) zu überführen, kam nur die Vilsmeier-Reaktion mit $[^{14}\text{CO}]\text{-Dimethylformamid}/\text{POCl}_3$ in Betracht. Bei anderen Aldehydsynthesen beeinträchtigt der erforderliche höhere Überschuß an radioaktivem Formylierungsreagens die Radioaktivitätsausbeute erheblich. Auch bei der Vilsmeier-Reaktion von (1) wurde das radioaktive Dimethylformamid entgegen der sonst bei Isotopenmarkierungen üblichen Verfahrensweise in einem wenn auch geringeren Überschuß eingesetzt, um das wegen der langwierigen Darstellung wertvollere Dipyrrylmethan (1) mit optimaler Ausbeute reagieren zu lassen. So betrug die Gewichtsausbeute der Überführung von (1) in den ^{14}C -markierten Dialdehyd (2) 92.5% bei einer Radioaktivitätsausbeute von 17%. Kondensation des radioaktiven Dialdehyds (2) mit dem Dipyrrylmethan (3) in Eisessig bei Gegenwart von Jodwasserstoffsaure, anschließende Luftoxidation und Methylierung mit Methanol/HCl ergaben mit 52% Ausbeute, bezogen auf (2), den radioaktiven, kristallisierten Uroporphyrin-III-octamethylester (5), $\text{Fp} = 258\text{--}261^\circ\text{C}$ ($258\text{--}260^\circ\text{C}$)^[7].

$[(^{14}\text{CHO})_2]\text{-Dipyrrylmethan-dicarbaldehyd}$ (2):

Zu 140 mg (1.9 mmol, 2.5 mCi) $[^{14}\text{CO}]\text{-Dimethylformamid}$ ^[9] in 0.2 ml wasserfreiem CH_2Cl_2 wurden unter Eiskühlung nacheinander 0.18 ml (2.0 mmol) POCl_3 , tropfenweise eine Lösung von 100 mg (0.22 mmol) des Dipyrrylmethans (1) in 1 ml wasserfreiem CH_2Cl_2 und 0.05 ml (0.54 mmol) POCl_3 gegeben. Diese Reaktionsmischung hielt man 1 Std. auf 20°C , erwärmt dann 1 Std. auf 50°C , wobei das CH_2Cl_2 abdestillierte, kühlte wieder auf 0°C ab, löste in 100 ml Eiswasser und versetzte bis zur schwach alkalischen Reaktion mit Natriumacetat. Nach drei Tagen wurde das Reaktionsprodukt abfiltriert, mit Wasser gewaschen und aus 60-proz. Äthanol umkristallisiert; 103 mg (92.5%), 0.43 mCi (17%) Dialdehyd (2).

$[\alpha, \gamma\text{-}^{14}\text{C}_2]\text{-Uroporphyrin-III-octamethylester}$ (5):

Eine Lösung von 99 mg (0.19 mmol, 0.15 mCi) (2) und 77.6 mg (0.19 mmol) (3) in 120 ml Eisessig wurde mit 0.6 ml 56-proz. HJ in 28 ml Eisessig versetzt^[7]. Nach 20 min. gab man zu der tiefroten Reaktionsmischung 1.9 g Natriumacetat in 28 ml Eisessig, leitete Luft ein, saugte nach 24 Std. den dunkelbraunen Niederschlag ab, ließ ihn gelöst in 5-proz. methanolischer HCl 24 Std. bei 20°C stehen und extrahierte nach Zugabe von Eiswasser mit CHCl_3 . Der getrocknete Rückstand des CHCl_3 -Auszugs wurde durch Schichtchromatographie



[*] Prof. Dr. B. Franck und Dr. D. Gantz
Organisch-Chemisches Institut der Universität
44 Münster, Orléans-Ring 23
Dr. F. Hüper, jetzige Anschrift:
Farbenfabriken Bayer AG
56 Wuppertal-Elberfeld

(CHCl₃ + 1% CH₃OH, Kieselgel PF, E. Merck) und Umkristallisieren aus CHCl₃/Aceton gereinigt; 92.5 mg, 0.079 mCi (52%) (5).

Eingegangen am 14. Januar 1972 [Z 599a]

[1] J. Lascelles: Tetrapyrrole Biosynthesis and its Regulation. Benjamin, New York 1964; L. Bogorad u. R. F. Troxler in P. Bernfeld: Biogenesis of Natural Compounds. 2. Aufl., Pergamon Press, Oxford 1967, S. 247.

[2] Uniform markiertes Uroporphyrin III und Uroporphyrinogen III, die bereits biosynthetisch gewonnen wurden [3], sind ungeeignet, die mögliche Umlagerung in Isomere bei Biosyntheseuntersuchungen anzudeuten.

[3] L. Bogorad u. G. S. Marks, Biochim. Biophys. Acta 41, 356 (1960); K. Salomon, J. E. Richmond u. K. I. Altmann, J. Biol. Chem. 196, 462 (1952).

[4] L. Velluz, J. Ralls u. G. Nomine, Angew. Chem. 77, 185 (1965); Angew. Chem. internat. Edit. 4, 181 (1965); R. E. Ireland: Organic Synthesis. Prentice-Hall, Englewood Cliffs, N. J. 1969.

[5] F. Schmidtchen, Diplomarbeit, Universität Münster 1970.

[6] B. Franck, D. Gantz, F.-P. Montforts u. F. Schmidtchen, Angew. Chem. 84, 433 (1972); Angew. Chem. internat. Edit. 11, Nr. 5 (1972).

[7] E. J. Tarlton, S. F. MacDonald u. E. Baltazzi, J. Amer. Chem. Soc. 82, 4389 (1960).

[8] A. Treibs u. W. Ott, Liebigs Ann. Chem. 615, 137 (1958).

[9] [¹⁴CO]-Dimethylformamid wurde durch Destillation aus einer 200°C-Schmelze von Dimethylammoniumchlorid und [¹⁴C]-Natriumformiat in einer speziellen Mikroapparatur [10] und anschließendes Entfernen des Reaktionswassers durch Abdampfen mit CH₂Cl₂ dargestellt.

[10] D. Gantz, Dissertation, Universität Münster 1971.

Zur Biosynthese von Häm und Vitamin B₁₂ aus [α,γ-¹⁴C₂]-Uroporphyrinogen III

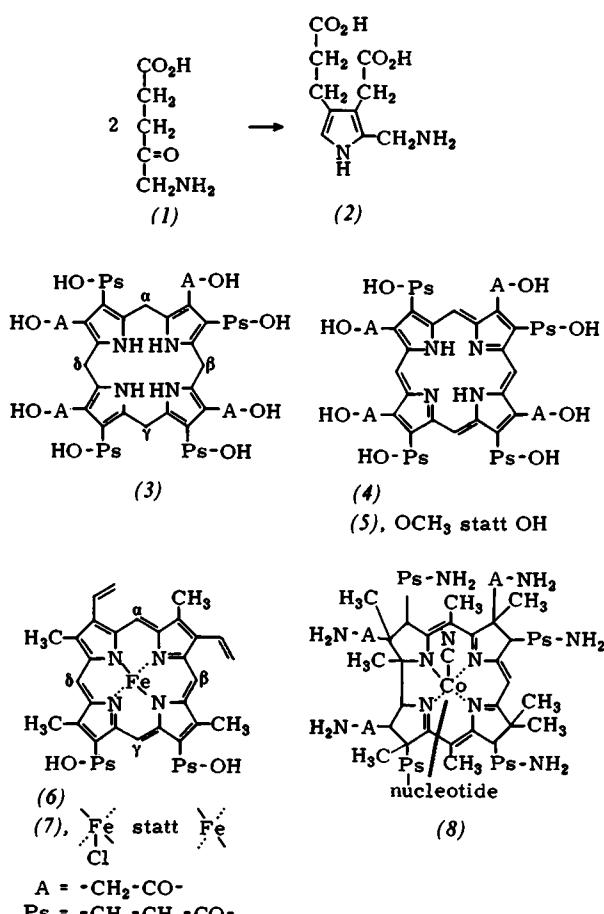
Von Burchard Franck, Dietrich Gantz,
Franz-Peter Montforts und Franz Schmidtchen^(*)

Uroporphyrinogen III (3) und sein Dehydrierungsprodukt, das Uroporphyrin III (4), kommen nach mechanistischen Überlegungen^[11] und einigen experimentellen Befunden^[22] als Biosynthese-Vorstufen der biologisch wichtigen Tetrapyrrole Häm (6) und Vitamin B₁₂ (8) in Betracht. Uroporphyrinogen III (3) geht seinerseits aus acht Molekülen δ-Aminolävulinsäure (1) über das Monopyrrol Porphobilinogen (2) hervor^[31]. Die Biosynthese von Häm (6) und Vitamin B₁₂ (8) ist bis zum Porphobilinogen (2) durch Isotopenversuche weitgehend gesichert.

Für den Übergang vom Porphobilinogen (2) zu den genannten Tetrapyrrolen (6) und (8) stand ein Beweis der angenommenen Biosynthese-Zwischenstufen durch Fütterungsversuche mit radioaktiv markierten Vorstufen noch aus. Mit dem erstmalig verfügbaren^[4], spezifisch ¹⁴C-markierten [α,γ-¹⁴C₂]-Uroporphyrinogen III (3)^[6] konnten wir jetzt zeigen, daß dieser Biosynthese-Baustein mit hoher Einbauquote und ohne Isomerisierung in den Blutfarbstoff Häm (6), nicht jedoch in Vitamin B₁₂ (8) umgewandelt wird.

Acht Proben von je 20 ml durch rasches Abkühlen und Auftauen hämolysierten Entenblutes^[5] wurden bei 32°C während 48 Std. mit verschiedenen Mengen (0.22–1.19 μmol) [α,γ-¹⁴C₂]-Uroporphyrinogen III (3)^[6] der spezifischen Radioaktivität 0.79 mCi/mmol inkubiert und einzeln aufgearbeitet. Die mittlere Radioaktivität des erhaltenen, quantitativ von metallfreien Porphyrinen befreiten

und bis zur konstanten Radioaktivität gereinigten Hämins (7) betrug 1.65 μCi/mmol, entsprechend einer spezifischen Einbauquote^[7] von 0.21%. Die absoluten Einbauquoten^[8] lagen zwischen 33 und 61%.



Zum Nachweis, daß sich die ¹⁴C-Radioaktivität des isolierten Hämins (7) nur in den Methingruppen α und γ befindet und seine Biosynthese aus (3) somit direkt und ohne Isomerisierung^[9] erfolgte, wurde ein spezifischer Abbau durchgeführt. Methylierende Spaltung von (7) mit 67-proz. Jodwasserstoffsäure und Paraformaldehyd in Eisessig/H₃PO₄^[10] ergab radioaktives Phyllopyrrol (9) und radioaktive Phyllo-pyrrolcarbonsäure (10), die in ihren α-Methylgruppen die angegebenen Methin-C-Atome α, β, δ bzw. β, γ, δ enthalten. Ozonspaltung des Phyllo-pyrrolcarbonsäure-methylesters (11) in CHCl₃, die unter Beteiligung mesomerer Pyrrol-Grenzstrukturen^[11] bei α, β und γ stattfindet, lieferte inaktives Biacetyl (12)^[12] und radioaktiven Dioxohexansäure-methylester (13)^[12] mit den Methin-C-Atomen β und δ bzw. γ in den Methylgruppen. Die aus den gefundenen spezifischen Radioaktivitäten der Abbauprodukte (9) und (11)–(13) ermittelte relative Anzahl markierter C-Atome (Tabelle) zeigt an, daß nur die Methingruppen α und γ radioaktiv sind. Die Inaktivität des Biacetyls (12), welches nur β- und δ-Methin-C-Atome enthalten kann, schließt eine Markierung dieser Positionen aus.

Zur Untersuchung der Vitamin-B₁₂-Biosynthese diente eine 1-l-Flüssigkeitsskultur (Cornsteep/Glucose^[14]) von *Propionibacterium shermannii* (ATCC 9617), die während der ersten drei Tage anaerob (N₂) und anschließend vier Tage aerob (100 ml O₂/min) gehalten wurde. Hierzu

[*] Prof. Dr. B. Franck, Dr. D. Gantz, Dipl.-Chem. F.-P. Montforts und Dipl.-Chem. F. Schmidtchen
Organisch-Chemisches Institut der Universität
44 Münster, Orléans-Ring 23