

(CHCl<sub>3</sub> + 1% CH<sub>3</sub>OH, Kieselgel PF, E. Merck) und Umkristallisieren aus CHCl<sub>3</sub>/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 anzuzeigen.

[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. Nominé, 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] [<sup>14</sup>CO]-Dimethylformamid wurde durch Destillation aus einer 200°C-Schmelze von Dimethylammoniumchlorid und [<sup>14</sup>C]-Natriumformiat in einer speziellen Mikroapparatur [10] und anschließendes Entfernen des Reaktionswassers durch Abdampfen mit CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> dargestellt.

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

## Zur Biosynthese von Häm und Vitamin B<sub>12</sub> aus [α, γ-<sup>14</sup>C<sub>2</sub>]-Uroporphyrinogen III

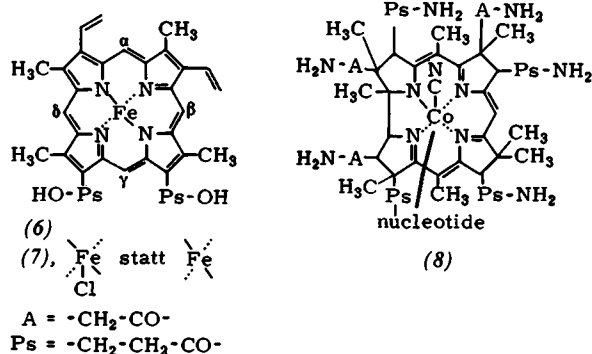
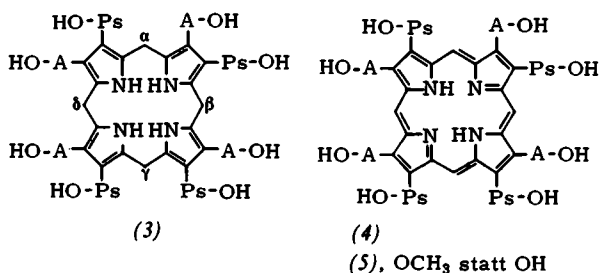
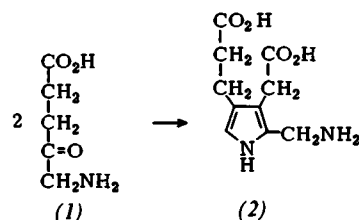
Von Burchard Franck, Dietrich Gantz, Franz-Peter Montforts und Franz Schmidtchen<sup>[\*]</sup>

Uroporphyrinogen III (3) und sein Dehydrierungsprodukt, das Uroporphyrin III (4), kommen nach mechanistischen Überlegungen<sup>[1]</sup> und einigen experimentellen Befunden<sup>[2]</sup> als Biosynthese-Vorstufen der biologisch wichtigen Tetrapyrrole Häm (6) und Vitamin B<sub>12</sub> (8) in Betracht. Uroporphyrinogen III (3) geht seinerseits aus acht Molekülen δ-Aminolävulinsäure (1) über das Monopyrrol Porphobilinogen (2) hervor<sup>[3]</sup>. Die Biosynthese von Häm (6) und Vitamin B<sub>12</sub> (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<sup>[4]</sup>, spezifisch <sup>14</sup>C-markierten [α, γ-<sup>14</sup>C<sub>2</sub>]-Uroporphyrinogen III (3) konnten wir jetzt zeigen, daß dieser Biosynthese-Baustein mit hoher Einbauquote und ohne Isomerisierung in den Blutfarbstoff Häm (6), nicht jedoch in Vitamin B<sub>12</sub> (8) umgewandelt wird.

Acht Proben von je 20 ml durch rasches Abkühlen und Auftauen hämolysierten Entenblutes<sup>[5]</sup> wurden bei 32°C während 48 Std. mit verschiedenen Mengen (0.22–1.19 μmol) [α, γ-<sup>14</sup>C<sub>2</sub>]-Uroporphyrinogen III (3)<sup>[6]</sup> 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<sup>[7]</sup> von 0.21%. Die absoluten Einbauquoten<sup>[8]</sup> lagen zwischen 33 und 61%.



Zum Nachweis, daß sich die <sup>14</sup>C-Radioaktivität des isolierten Hämins (7) nur in den Methingruppen α und γ befindet und seine Biosynthese aus (3) somit direkt und ohne Isomerisierung<sup>[9]</sup> erfolgte, wurde ein spezifischer Abbau durchgeführt. Methylierende Spaltung von (7) mit 67-proz. Jodwasserstoffsäure und Paraformaldehyd in Eisessig/H<sub>3</sub>PO<sub>2</sub><sup>[10]</sup> ergab radioaktives Phyllopyrrol (9) und radioaktive Phyllopyrrolcarbonsäure (10), die in ihren α-Methylgruppen die angegebenen Methin-C-Atome α, β, δ bzw. β, γ, δ enthalten. Ozonspaltung des Phyllopyrrolcarbonsäure-methylesters (11) in CHCl<sub>3</sub>, die unter Beteiligung mesomerer Pyrrol-Grenzstrukturen<sup>[11]</sup> bei a, b und c stattfindet, lieferte inaktives Biacetyl (12)<sup>[12]</sup> und radioaktiven Dioxohexansäure-methylester (13)<sup>[12]</sup> 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-B<sub>12</sub>-Biosynthese diente eine 1-l-Flüssigkeitskultur (Cornsteep/Glucose<sup>[14]</sup>) von *Propionibacterium shermanii* (ATCC 9617), die während der ersten drei Tage anaerob (N<sub>2</sub>) und anschließend vier Tage aerob (100 ml O<sub>2</sub>/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, Orleans-Ring 23

gab man in zwei gleichen Anteilen am ersten und zweiten Tag 4.29  $\mu\text{mol}$  [ $\alpha, \gamma$ - $^{14}\text{C}_2$ ]-Uroporphyrinogen III der spezifischen Radioaktivität 0.79 mCi/mmol. Anschließend wurde das gebildete Vitamin B<sub>12</sub> (6.6 mg) mikrobiologisch

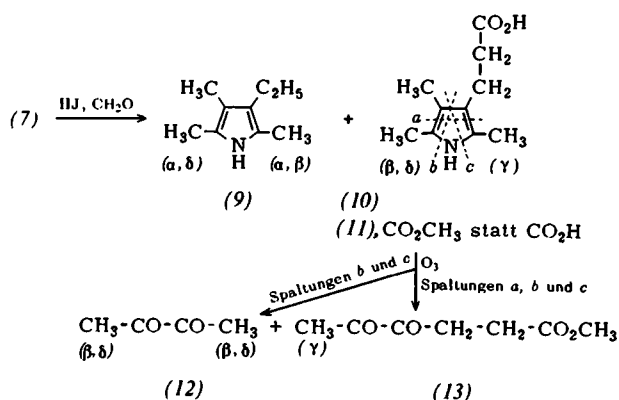


Tabelle. Radioaktivität des Hämins (7) und seiner Abbauprodukte.

Substanz	Spez. Radioakt. ( $\mu\text{Ci}/\text{mmol}$ )	Markierte C-Atome pro Molekül	
		ber.	gef. [13]
(7)	1.37	2	2.0
(9)	0.334	0.5	0.49
(11)	0.335	0.5	0.49
(12)	0.0002	0	0.00
(13)	0.0448	max. 0.5	0.066 [13]

bestimmt<sup>[15]</sup>, nach Zusatz von inaktivem Vitamin B<sub>12</sub> isoliert und seine spezifische Radioaktivität gemessen. Sie betrug für das unverdünnte Vitamin 0.017  $\mu\text{Ci}/\text{mmol}$ , entsprechend einer nicht mehr signifikanten spezifischen Einbauquote von  $<0.0025\%$ <sup>[16]</sup>.

Eingegangen am 14. Januar 1972 [Z 599b]

[1] D. Shemin, *Naturwissenschaften* 57, 185 (1970); J. H. Mathewson u. A. H. Corwin, *J. Amer. Chem. Soc.* 83, 135 (1961); L. Bogorad u. R. F. Troxler in P. Bernfeld: *Biogenesis of Natural Compounds*. 2. Aufl., Pergamon Press, Oxford 1967, S. 247.

[2] R. A. Neve, R. F. Labbe u. R. A. Aldrich, *J. Amer. Chem. Soc.* 78, 691 (1956); D. Mauzerall u. S. Granick, *J. Biol. Chem.* 232, 1141 (1958); B. F. Burnham u. R. A. Plane, *Biochem. J.* 98, 13c (1966).

[3] D. Shemin u. C. S. Russell, *J. Amer. Chem. Soc.* 75, 4873 (1953); S. Schwartz, K. Ikeda, I. M. Miller u. C. J. Watson, *Science* 129, 40 (1959); C. Bray u. D. Shemin, *J. Biol. Chem.* 238, 1501 (1963).

[4] B. Franck, D. Gantz u. F. Hüper, *Angew. Chem.* 84, 432 (1972); *Angew. Chem. internat. Edit.* 11, Nr. 5 (1972).

[5] S. Granick, *J. Biol. Chem.* 232, 1101 (1958).

[6] Aus [ $\alpha, \gamma$ - $^{14}\text{C}_2$ ]-Uroporphyrin-III-octamethylester [4] (5) durch Hydrolyse der Estergruppen bei 20°C mit 20-proz. wäßriger HCl und anschließende Reduktion mit 2.5-proz. Natriumamalgam in wäßriger Lösung gewonnen.

[7] Spez. Radioaktivität des isolierten radioaktiven Hämins dividiert durch die des verfütterten [ $\alpha, \gamma$ - $^{14}\text{C}_2$ ]-Uroporphyrinogens III  $\times 100$ .

[8] Gesamtradioaktivität des isolierten radioaktiven Hämins dividiert durch die des verfütterten [ $\alpha, \gamma$ - $^{14}\text{C}_2$ ]-Uroporphyrinogens III  $\times 100$ .

[9] Uroporphyrinogene isomerisieren z. B. leicht in saurer Lösung, L. Bogorad u. G. S. Marks, *J. Biol. Chem.* 235, 2127 (1960); D. Mauzerall, *J. Amer. Chem. Soc.* 82, 2602 (1960).

[10] M. W. Roomi u. S. F. MacDonald, *Canad. J. Chem.* 48, 139 (1970); R. A. Chapman, M. W. Roomi, T. C. Morton, D. T. Krajcarski u. S. F. MacDonald, *ibid.* 49, 3544 (1971).

[11] J. Wibaut, *J. Chim. Physique*, 53, 143 (1956).

[12] Isoliert als 2,4-Dinitrophenylosazon.

[13] Die gefundenen spez. Radioaktivitäten der Abbauprodukte wurden auf die des isolierten radioaktiven Hämins (7) mit zwei  $^{14}\text{C}$ -Atomen bezogen. Da sich die Radioaktivität der Methingruppen  $\alpha$  und  $\gamma$  beim Hämin-Abbau auf je zwei Moleküle Phyllopyrrol (9) bzw. Phyllopyrrol-carbonsäuremethylester (11) verteilt, sollten diese Abbauprodukte jeweils 25% der Hämin-Radioaktivität enthalten. Der 4,5-Diohexensäure-methylester (13) kann nur einen Bruchteil der Radioaktivität der  $\gamma$ -Methylgruppe von (7) enthalten, da er bei der Ozonolyse von (11) überwiegend durch Spaltung nach a und nur wenig nach b und c gebildet wird.

[14] J. D. Speedie u. G. W. Hull, US-Pat. 2951107 (1960); *Chem. Abstr.* 54, 15852i (1960).

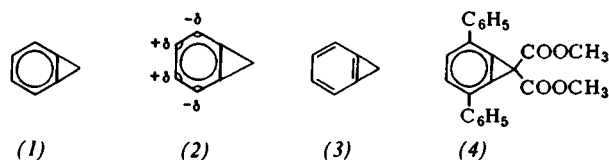
[15] *United States Pharmacopeia* 15, 885 (1955); Firmenschrift Difco Laboratories: *Microbiological Assay of Vitamins and Amino Acids*. Difco Company, Detroit 1964, S. 17.

[16] Nach Abschluß unserer Fütterungsversuche teilten G. Müller u. W. Dieterle, *Hoppe-Seyler's Z. physiol. Chem.* 352, 143 (1971) mit, daß sie mit einem biosynthetisch gewonnenem Gemisch  $^{14}\text{C}$ -markierter Uroporphyrinogene I und III an Zellsuspensionen von *Propionibacterium shermanii* ebenfalls keinen Einbau in den Corrinring des Vitamins B<sub>12</sub> beobachteten.

## Röntgen-Strukturanalyse eines Benzocyclopropen-Derivates

Von Ernst Carstensen-Oeser, Berthold Müller und Heinz Dürr<sup>[\*]</sup>

Bei der Angliederung eines gespannten kleinen Ringes wird der Benzolring beträchtlich deformiert. Die bisherigen NMR-spektroskopischen Untersuchungen und Rechnungen<sup>[1-3]</sup> an Benzocyclopropen (1) ergaben Hinweise auf die Art der Winkeldeformation (2)<sup>[3]</sup> und auf die Veränderung der Bindungslängen im sechsgliedrigen Ring derart, daß die Bevorzugung der mesomeren Grenzstruktur (3) diskutiert wurde<sup>[1,2]</sup>.



Um die Effekte quantitativ zu bestimmen, haben wir die Röntgenstrukturanalyse eines Benzocyclopropens durchgeführt. Hierfür ist Dimethyl-2,5-diphenyl-benzocyclopropen-1,1-dicarboxylat (4)<sup>[4]</sup> besonders geeignet: Es kristallisiert in gut ausgebildeten farblosen Nadeln vom  $\text{Fp} \geq 175^\circ\text{C}$ .

Die Kristalle sind monoklin, Raumgruppe  $\text{P}2_1/a$ ;  $a = 22.15 \pm 0.01$ ,  $b = 7.91 \pm 0.01$ ,  $c = 10.92 \pm 0.01$  Å;  $\beta = 99.2 \pm 0.1^\circ$ ;  $Z = 4$ . Die Intensitäten von 3542 Reflexen wurden auf einem automatischen Diffraktometer vermessen. Wir bestimmten die Vorzeichen der 297 Reflexe mit den größten E-Werten durch Anwendung von Tripelproduktmethoden<sup>[5]</sup>.

Das durch E-Fouriersynthese erhaltene Strukturmodell wurde bis zu einem R-Wert von 7.7% verfeinert.

Das Ergebnis der Untersuchungen (Abb. 1) bestätigt die Winkeldeformation im Sinne von (2). Die durch den angelierten ungesättigten Dreiring verursachten Ver-

[\*] Dr. E. Carstensen-Oeser und Dipl.-Ing. B. Müller  
Eduard-Zintl-Institut der Technischen Hochschule  
Lehrstuhl für Strukturforschung  
61 Darmstadt, Hochschulstraße 4  
Doz. Dr. H. Dürr  
Institut für Organische Chemie der Universität  
66 Saarbrücken 15