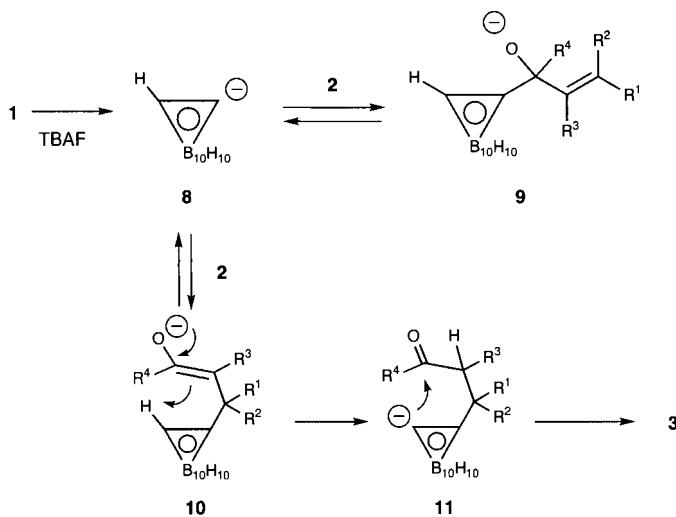


Ausbeute. Ein möglicher Mechanismus für diese beispiellose Anellierung ist in Schema 2 wiedergegeben. Das aus **1** mit TBAF gebildete anionische Intermediat **8** reagiert demnach in einer 1,2- und in einer 1,4-Addition mit **2** zum 1,2-Addukt **9** bzw. zum 1,4-Addukt **10**, die miteinander im Gleichgewicht



Schema 2. Mechanismus der [2+3]-Anellierung von **1** und **2**.

stehen sollten. Die Bildung von **9** ist nach den in Abbildung 2 gezeigten Ergebnissen ein kinetisch kontrollierter Prozeß. Aus dem thermodynamisch stabileren Addukt **10** entsteht durch Protonenaustausch das 1,2-Carboran-Anion **11**, das zu **3** cyclisiert.<sup>[10]</sup> Im Fall von Cyclohexenon könnte das durch 1,4-Addition erhaltene Enolat zwar ein Proton vom Carborankäfig abspalten, aber die Annäherung der Carbonylgruppe an das so entstandene Carboran-Anion ist aus geometrischen Gründen nicht möglich, so daß mit **2i** keine Anellierung eintritt.

Derzeit untersuchen wir die Anwendungsbreite und die Grenzen dieser neuen Anellierung, insbesondere im Hinblick auf die Herstellung biologisch aktiver Carborane, die sich für die Bor-Neutroneneinfang-Therapie<sup>[11]</sup> eignen.

Eingegangen am 6. August 1996 [Z9428]

**Stichworte:** Aldehyde · Anellierungen · Carborane · Ketone

- [1] Übersichtsartikel: *Comprehensive Organic Synthesis*, Vol. 5 (Hrsg.: B. M. Trost), Pergamon, Oxford, 1991, S. 240–314.  
 [2] a) Allylübergangsmetallkomplexe: A. Cutler, D. Ehntholt, W. P. Giering, P. Lennon, S. Raghu, A. Rosan, M. Rosenblum, J. Tancrède, D. Wells, *J. Am. Chem. Soc.* **1976**, *98*, 3495; M. Calligaris, G. Carturan, G. Nardin, A. Scrivanti, A. Wojcicki, *Organometallics* **1983**, *2*, 865; H. Kurosawa, A. Urabe, K. Miki, N. Kasai, *ibid.* **1986**, *5*, 2002; b) Allylsilane: R. L. Danheiser, D. J. Cariati, A. Basak, *J. Am. Chem. Soc.* **1981**, *103*, 1604; c) Trimethylsilylmethan: B. M. Trost, D. M. T. Chan, *ibid.* **1979**, *101*, 6432; B. M. Trost, *Angew. Chem.* **1986**, *98*, 1; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1986**, *25*, 1; d) Cyclopropenonacetale: D. L. Boger, C. E. Brotherton, *J. Am. Chem. Soc.* **1984**, *106*, 805; e) Nitrone: R. L. Funk, G. L. Bolton, J. U. Daggett, M. M. Hansen, L. H. M. Horcher, *Tetrahedron* **1985**, *41*, 3479; W. Oppolzer, S. Siles, R. L. Snowden, B. H. Bakker, M.

Petrzilka, *ibid.* **1985**, *41*, 3497; A. Padwa, D. N. Kline, K. F. Koehler, M. Matzinger, M. K. Venkatraman, *J. Org. Chem.* **1987**, *52*, 3909; D. P. Curran, C. J. Fenk, *Tetrahedron Lett.* **1986**, *27*, 4865.

- [3] Über die Reaktion von 1,2-dikationischen  $C_2$ - mit 1,3-dianionischen  $C_3$ -Synthesebausteinen wurde berichtet: G. A. Molander, D. C. Shubert, *J. Am. Chem. Soc.* **1986**, *108*, 4683.

- [4] A. Misumi, K. Iwanaga, K. Furuta, H. Yamamoto, *J. Am. Chem. Soc.* **1985**, *107*, 3343; K. Furuta, A. Misumi, A. Mori, N. Ikeda, H. Yamamoto, *Tetrahedron Lett.* **1984**, *25*, 669; A. Misumi, K. Furuta, H. Yamamoto, *ibid.* **1984**, *25*, 671.

- [5] T. Ibuka, T. Aoyagi, F. Yoneda, Y. Yamamoto, *J. Organomet. Chem.* **1985**, *287*, C18.

- [6] Synthese von **1**: Zu einer Lösung von 1,2-Dicarbadodecarboran (0.72 g, 5 mmol) in wasserfreiem THF (50 mL) wurde bei  $-78^{\circ}\text{C}$  tropfenweise und unter Rühren  $n\text{BuLi}$  in Hexan (1.6 M, 3.13 mL, 5 mmol) gegeben. Die Mischung wurde 30 min bei  $-78^{\circ}\text{C}$  gerührt, worauf man Trimethylsilylchlorid (0.67 mL, 5.28 mmol) tropfenweise zugab. Die Lösung wurde 1 h gerührt, dann auf Raumtemperatur erwärmt und die Reaktion durch Zugabe von Wasser abgebrochen. Man extrahierte die Reaktionslösung mit Diethylether und trocknete den Extrakt über wasserfreiem Magnesiumsulfat. Das Lösungsmittel wurde verdampft und der Rückstand säulenchromatographisch gereinigt (Sili-cagel, Hexan), wobei **1** als weißer Feststoff in 86 % Ausbeute (0.93 g, 4.3 mmol) erhalten wurde. In diesem Fall wurde kein Bis(trimethylsilyl)-substituiertes Carboran erhalten; die Verwendung einer verdünnten Lösung von Lithiocarboran ist zur selektiven Herstellung des monosilylierten Carborans wesentlich.

- [7] Bei der palladiumkatalysierten Addition eines Carboranyltributylstannans an Zimtaldehyd wurde nur das 1,2-Addukt erhalten: H. Nakamura, N. Sadayori, M. Sekido, Y. Yamamoto, *J. Chem. Soc. Chem. Commun.* **1994**, 2581.

- [8] Die durch TBAF beschleunigte Addition von **1** an aromatische und aliphatische Aldehyde lieferte 1,2-Addukte in guten bis sehr guten Ausbeuten: J. Cai, H. Nemoto, H. Nakamura, B. Singaram, Y. Yamamoto, *Chem. Lett.* **1996**, 791.

- [9] Der Silylther **6** wurde durch 1,2-Addition von 1-Lithio-1,2-dicarba-closo-dodecarboran(12) an Crotonaldehyd in THF hergestellt.

- [10] Der Mechanismus dieser Reaktion, der eine Sequenz aus 1,4-Addition, Protonaustausch und Addition enthält, ähnelt dem der Reaktion von 2,3-Bis(phenylsulfonyl)-1,3-butadien mit aktivierten Methylenen: A. Padwa, S. S. Murphree, Z. Ni, S. H. Watterson, *J. Org. Chem.* **1996**, *61*, 3829.

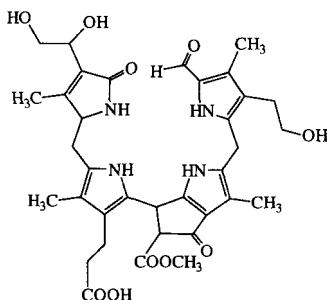
- [11] Übersichtsartikel: M. F. Hawthorne, *Angew. Chem.* **1993**, *105*, 997; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1993**, *32*, 950.

## Dem Chlorophyllabbau in Pflanzen auf der Spur – Konstitutionsaufklärung eines „fluoreszierenden“ Chlorophyllkataboliten

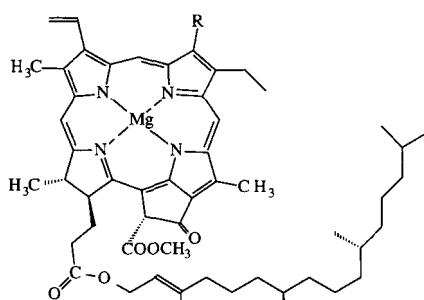
Walter Mühlacker, Karl-Hans Ongania, Bernhard Kräutler,\* Philippe Matile und Stefan Hörtensteiner

Beim Chlorophyllabbau in Pflanzen, bis vor kurzem noch ein großes biologisches Rätsel,<sup>[1]</sup> werden die grünen Pigmente in seneszenten Blättern<sup>[2]</sup> unerwartet rasch zu farblosen, „nicht-fluoreszierenden“ linearen Tetrapyrrolen abgebaut.<sup>[3–7]</sup> Ein erstes und allen früheren Erwartungen<sup>[1]</sup> widersprechendes Struktur-Leitmotiv beim Chlorophyllabbau wurde vor etwa fünf Jahren durch die Aufklärung der Struktur des Secophytoperphyrinats *Hv-NCC-1* **1** aus seneszenten Primärblättern von Gerste (*Hordeum vulgare* cv. Gerbel) ermittelt.<sup>[4]</sup> Inzwischen sind aus vergilbenden Blättern verschiedener Pflanzenarten weitere farblose („nichtfluoreszierende“) Chlorophyllkataboliten isoliert worden,<sup>[5–7]</sup> die alle den in **1** festgestellten Strukturtyp

[\*] Prof. Dr. B. Kräutler, Mag. W. Mühlacker, Univ.-Doz. Dr. K.-H. Ongania  
 Institut für Organische Chemie der Universität  
 Innrain 52a, A-6020 Innsbruck (Österreich)  
 Telefax: Int. + 512/507-2892  
 E-mail: Bernhard.Kraeutler@uibk.ac.at  
 Prof. Dr. P. Matile, Dr. S. Hörtensteiner  
 Institut für Pflanzenbiologie, Universität Zürich (Schweiz)



Hv-NCC-1 1

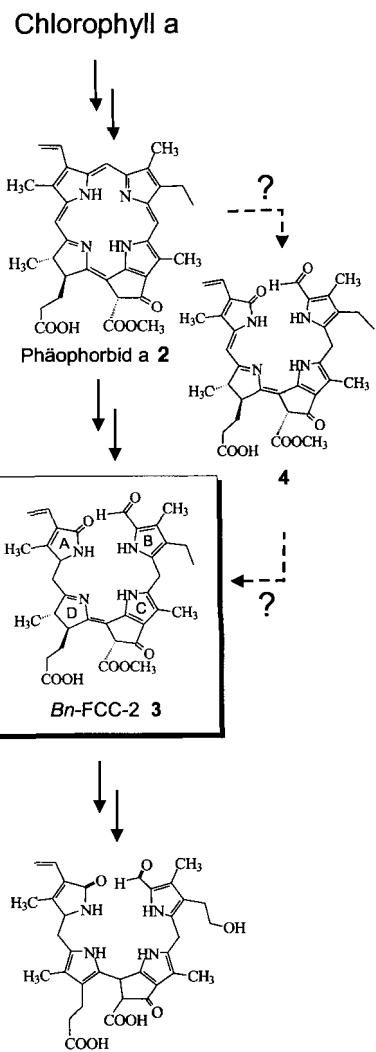
R = CH<sub>3</sub> :Chlorophyll a  
R = CHO :Chlorophyll b

eines 4,5-Seco-4,5-dioxophytoporphyrinats aufweisen. Diese Grundstruktur ist ein Hinweis auf einen (strukturell) einheitlichen Abbauweg in Pflanzen, dessen Schlüsselschritt eine enzymatische, oxidative Ringöffnung von Phäophorbid a 2 ist.<sup>[8]</sup> Aus HPLC-Analysen senescenter Pflanzenmaterialien liegen seit einiger Zeit Indizien für intermediaire, bislang nicht faßbare „fluoreszierende“ Chlorophyllkataboliten vor,<sup>[9]</sup> deren Struktur Aufschluß über die kritischen „frühen“ Abbauschritte geben könnte.

Wir beschreiben hier die Struktur eines derartigen „fluoreszierenden“ Chlorophyllkataboliten, dem *Bn-FCC-2 3*, der enzymatisch *in vitro* aus Phäophorbid a 2 erhalten wurde. Aus Phäophorbid a 2 wurde 3 durch ein Enzympräparat aus Chloroplasten senescenter Kotyledonen von *Brassica napus*<sup>[8]</sup> hergestellt, das mit Glucose-6-phosphat, Dihydronicotinamidadenin-dinucleotidphosphat (NADPH), Ferredoxin und Glucose-6-phosphat-Dehydrogenase versetzt worden war. Nach zweimaliger HPLC-chromatographischer Reinigung, Entsalzen und Lyophilisieren des Eluats konnte einheitliches 3 als hellgelbes Pulver isoliert werden.

Die Konstitution von 3, einem 1-Formyl-19-oxobilan, konnte spektroskopisch abgeleitet werden:<sup>[10]</sup> Die Summenformel von 3 wurde durch hochauflösende FAB/MS im Kationenmodus anhand des Quasi-Moleküliums bei  $m/z$  629.3011  $\pm$  0.004 ( $C_{35}H_{41}N_4O_7$  ber. 629.2975) zu  $C_{35}H_{40}N_4O_7$  bestimmt: Das UV/Vis-Spektrum von 3 wies Absorptionsmaxima bei 321 und 361 nm auf (Abb. 1). Das Absorptionsmaximum bei 361 nm sowie die Photolumineszenz von 3 bei 450 nm sind auf ein konjugiertes  $\pi$ -System zurückzuführen,<sup>[11]</sup> das sich über die Ringe C und D erstreckt (Schema 1).

Im 500-MHz-<sup>1</sup>H-NMR-Spektrum traten Signale aller 36 an Kohlenstoffatome gebundenen Protonen auf (H/D-Austausch führte zum allmählichen Verschwinden des Singulett von

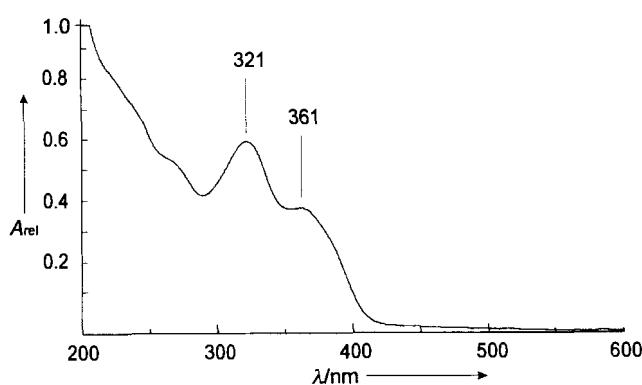


Schema 1. Postulierter Chlorophyll-a-Abbauweg.

HC(13<sup>2</sup>) bei  $\delta$  = 4.62): unter anderem Signale einer Vinyl- und einer Ethylgruppe, ein Singulett bei  $\delta$  = 9.33 von einer Formylgruppe sowie vier Singulets von Methylgruppen, davon eines von einer Ester-Methylgruppe. Eine fünfte Methylgruppe führte zu einem Dublett bei  $\delta$  = 1.13. Homonukleare 2D-Experimente (DQF-COSY, TOCSY)<sup>[12]</sup> ergaben für 3 ein Spektrum mit sechs Spinsystemen (Abb. 2). Die <sup>13</sup>C-chemische Verschiebung der Signale von Protonen-tragenden Kohlenstoffatomen erhielt man aus HMQC-Spektren.<sup>[12]</sup> Durch ROESY-Spektren<sup>[12]</sup> konnte die Abfolge der Substituenten am Tetrapyrrol-Grundgerüst und damit auch die Position der oxidativen Ringöffnung eindeutig festgelegt werden.

Aus den spektroskopischen Daten kann für 3 die Struktur eines 3<sup>1,3<sup>2</sup></sup>-Didehydro-13<sup>2</sup>-methoxycarbonyl-4,5-seco-4,5-dioxo-1,4,5,10,17,18,20-(22H)-octahydrophytoporphyrinats abgeleitet werden.<sup>[13]</sup> Dieses optisch aktive 1-Formyl-19-oxobilan weist vier einheitlich konfigurierte stereogene Zentren auf, drei davon (13<sup>2</sup>, 17 und 18) nach den ROESY-Spektren mit derselben relativen Konfiguration wie im Phäophorbid a 2. In 3 sollte deshalb auch die absolute Konfiguration der drei Zentren dieselbe sein wie in 2.

Das hier charakterisierte, fluoreszierende Secophytoporphyrinat 3 weist HPLC-chromatographisch,<sup>[14]</sup> UV/Vis- und Lumines-

Abb. 1. UV/Vis-Spektrum einer Lösung von *Bn-FCC-2 3* in Wasser.

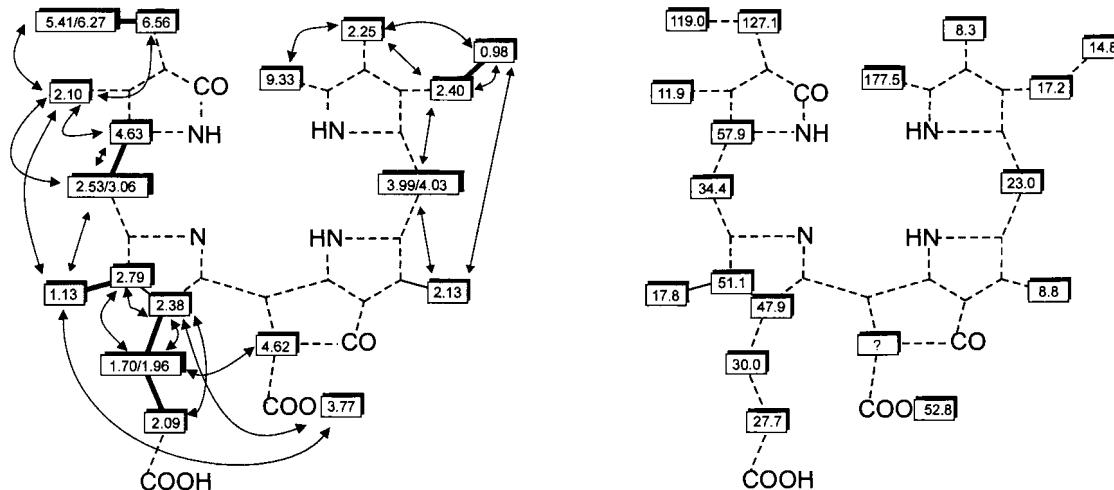


Abb. 2. Links: Zuordnung der Protonensignale im 500 MHz-<sup>1</sup>H-NMR-Spektrum von Bn-FCC-2 in MeOD und homonukleare Korrelationen aus COSY- und NOE-Spektren (ausgezogene Linien und Pfeile); rechts: Zuordnung der <sup>13</sup>C-Signale durch heteronukleare Korrelationen mit direkt gebundenen Protonen aus HMQC-Spektren.

nesenzspektroskopisch dieselben Eigenschaften auf wie der authentische Bn-FCC-2, der weniger polare von zwei FCCs aus seneszenten Ölrapss-Kotyledonen.<sup>[9a]</sup> Wir gehen daher davon aus, daß 3 und Bn-FCC-2 identisch und ein Intermediat des natürlichen Chlorophyllabbau ist. Bn-FCC-2 3 ist aus Phäophorbid a 2 formal durch Anlagerung von einem Sauerstoff- und zwei Wasserstoffmolekülen ableitbar. Eine mögliche Abbau-Zwischenstufe in seneszenten Raps-Kotyledonen ist damit das 4,5-Seco-4,5-dioxo-4,5,10,17,18-(22H)-hexahydrophytoporphyrinat 4, das durch enzymkatalysierte Reduktion zu 3 führen könnte. Der weitere Abbau von 3 zum nichtfluoreszierenden Bn-NCC-3 5a<sup>[5b]</sup> beinhaltet (in noch unbekannter Reihenfolge) die endständige Hydroxylierung der Ethylgruppe am Ring B, die Tautomerisierung von einem 4,5-Seco-4,5-dioxo-1,4,5,10,17,18,20-(22H)-octahydrophytoporphyrinat zu einem 4,5-Seco-4,5-dioxo-1,4,5,10,15,20-(22H,24H)-octahydrophytoporphyrinat<sup>[15]</sup> und (vermutlich zuletzt)<sup>[16]</sup> die Hydrolyse der Estergruppe.

Die Dimethylesterform von 4 ist von Gossauer und Mitarbeiter aus roten Tetrapyrrol-Exkreten der Grünalge *Chlorella protothecoides* isoliert, strukturell charakterisiert und als Abkömmling von Chlorophyllkataboliten identifiziert worden.<sup>[17]</sup> Isotopenmarkierungsexperimente ergaben, daß dabei (nur) eines der beiden neuen Sauerstoffatome aus molekularem Sauerstoff stammt.<sup>[18]</sup> Es bleibt zu klären, ob der pflanzliche Chlorophyllabbauweg in dieser Hinsicht mit dem der Grünalge übereinstimmt. Interessanterweise wurden in *Chlorella protothecoides*<sup>[17]</sup> Kataboliten von Chlorophyll a und Chlorophyll b nachgewiesen,<sup>[17]</sup> in Pflanzen nur solche von Chlorophyll a.<sup>[2-8]</sup>

Mit der Strukturaufklärung des „fluoreszierenden“ Chlorophyllkataboliten Bn-FCC-2 3 ist nicht nur ein wichtiger Schritt zur Beschreibung des pflanzlichen Chlorophyllabbau getan, sondern auch zu Experimenten, die die Charakterisierung der in seneszenten Pflanzen einzigartigen enzymatischen Oxygenolyse des Chlorin-Makrorings zum Ziel haben.

#### Experimentelles

Chloroplastenmembranen 670 g seneszenten Kotyledonen von *Brassica napus* L. cv. Arabella [8,9] wurden in 12.5 mL 25 mM Tris(hydroxymethyl)aminomethan(Tris)-2-(N-Morpholino)ethansulfonsäure(Mes)-Puffer (pH = 8) suspendiert, in Gegenwart von 1% Triton-X-100 30 min lang bei 4 °C solubilisiert und anschließend 1 h bei 260 000 g zentrifugiert. Der Überstand (löslicher Membranextrakt) wurde mit

830 µL 60 mM NADPH, 830 µL 100 mM Glucose-6-phosphat, 25 µL Glucose-6-phosphat-Dehydrogenase (0.5 µL<sup>-1</sup>), 400 µL Ferredoxin (10 µg µL<sup>-1</sup>) und 2 mg Phäophorbid a 2 versetzt, 1 h bei RT im Dunkeln stehengelassen und dann 19 mL MeOH zugegeben. Die Reaktionsmischung wurde zentrifugiert (10 min bei 12000 g), der Überstand mit 8 mL H<sub>2</sub>O verdünnt und durch HPLC getrennt (Säule: Stagroma, Wallisellen, Schweiz, Spherisorb ODS-2 5 µm, 8 × 125 mm; MeOH/100 mM Kaliumphosphat 55/45, pH = 7; Fließgeschwindigkeit 2.8 mL min<sup>-1</sup>; UV-Detektion bei 320 nm; Emission bei 450 nm, Anregung bei 320 nm). Fraktionen mit einer Retentionszeit von ca. 10 min wurden gesammelt und unter N<sub>2</sub> eingefroren. Die vereinigten Fraktionen wurden durch Zugabe von 100 mM Kaliumphosphat (pH = 7) auf 10 Vol.-% MeOH verdünnt und auf eine Waters-C18-SepPak-Kartusche aufgetragen. Mit MeOH/40 mM Kaliumphosphat (pH = 7) 9/1 wurde eine gelbe Fraktion eluiert, die mit H<sub>2</sub>O auf 50 Vol.-% MeOH verdünnt und wie beschrieben durch HPLC gereinigt wurde. Die HPLC-Eluate wurden auf eine C18-Kartusche aufgebracht und mit 20 mL H<sub>2</sub>O gewaschen. Mit MeOH/H<sub>2</sub>O 9/1 wurde 3 eluiert, das Eluat sofort bei T < 0 °C getrocknet und so ca. 0.1 mg 3 erhalten (gelbliches Pulver).

Eingegangen am 26. September 1996 [Z 9593]

**Stichworte:** Chlorophylllderivate • Porphyrinoide • Strukturaufklärung

- [1] G. A. F. Hendry, J. D. Houghton, S. B. Brown in *Chlorophylls* (Hrsg.: H. Scheer), CRC, Boca Raton, 1991, S. 465.
- [2] P. Matile, B. Kräutler, *Chem. unserer Zeit* **1995**, 29, 298–306.
- [3] K. H. Bortlik, C. Peisker, P. Matile, *J. Plant Physiol.* **1990**, 136, 161–165.
- [4] a) B. Kräutler, B. Jaun, K. Bortlik, M. Schellenberg, P. Matile, *Angew. Chem. 1991*, 103, 1354–1357; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1991**, 30, 1315–1318; b) B. Kräutler, B. Jaun, W. Amrein, K. Bortlik, M. Schellenberg, P. Matile, *Plant Physiol. Biochem.* **1992**, 30, 333–346.
- [5] a) W. Mühlacker, B. Kräutler, S. Ginsburg, P. Matile, *Helv. Chim. Acta* **1993**, 76, 2976–2980; b) W. Mühlacker, B. Kräutler, *Plant Physiol. Biochem.* **1996**, 34, 61–75.
- [6] J. Iturraspe, N. Moyano, B. Frydman, *J. Org. Chem.* **1995**, 60, 6664–6665.
- [7] C. Curty, N. Engel, *Phytochemistry* **1996**, 42, 1531–1536.
- [8] S. Hörtsteiner, F. Vicentini, P. Matile, *New Phytol.* **1995**, 129, 237–246.
- [9] a) S. Ginsburg, M. Schellenberg, P. Matile, *Plant Physiol.* **1994**, 105, 545–554; b) A. Bachmann, S. Fernández-López, S. Ginsburg, H. Thomas, J. C. Bouwkamp, T. Solomos, P. Matile, *New Phytol.* **1994**, 126, 593–600.
- [10] 3: <sup>1</sup>H-NMR (500 MHz, Varian UNITYplus 500, ca. 0.4 mM in CD<sub>3</sub>OD, unter Argon, –20 °C:  $\delta$ (J in Hz) = 0.98 (t, J = 7.7, H<sub>3</sub>C(8<sup>2</sup>)), 1.13 (d, J = 7.2, H<sub>3</sub>C(18<sup>1</sup>)), 1.70 und 1.96 (m, H<sub>3</sub>C(17<sup>1</sup>)), 2.09 (m, H<sub>2</sub>C(17<sup>2</sup>)), 2.10 (s, H<sub>3</sub>C(2<sup>1</sup>)), 2.13 (s, H<sub>3</sub>C(12<sup>1</sup>)), 2.25 (s, H<sub>3</sub>C(7<sup>1</sup>)), 2.38 (m, HC(17)), überlagert von 2.40 (q, J = 7.7, H<sub>2</sub>C(8<sup>1</sup>)), 2.53 und 3.06 (AM-Teil eines AMX-Systems, J(AM) = 18, J(AX) = 8.5, J(MX) = 3.4, H<sub>2</sub>C(20)), 2.79 (qd, J = 7.2, 1.7, HC(18)), 3.77 (s, H<sub>3</sub>C(13<sup>3</sup>)), 3.99 und 4.03 (AB-System, J(AB) = 16.4, H<sub>2</sub>C(10)), 4.62 (s, HC(13<sup>2</sup>)), 4.63 (X-Teil des AMX-Systems, HC(1)), 5.41 (dd, J = 12.8, 2.2, H<sub>2</sub>Cis(3<sup>2</sup>)), 6.27 (dd, J = 17.1, 2.2, H<sub>trans</sub>C(3<sup>2</sup>)), 6.56 (dd, J = 12.8, 17.1, HC(3<sup>1</sup>)), 9.33 (s, HC(5)); <sup>13</sup>C-NMR (siehe Abb. 2); FAB-MS (Finnigan MAT-95, Glycerin-Matrix, Caesiumionen-Beschuß, 20 k eV): m/z (%): 631.1 (12), 630.1 (35), 629.1 (87, C<sub>33</sub>H<sub>41</sub>N<sub>4</sub>O<sub>7</sub>, [M + 1]<sup>+</sup>), genaue exp. Masse: m/z = 629.3011 ± 0.004, 628.1 (14), 509.1 (5), 508.1 (24, [M + 1 – C<sub>2</sub>H<sub>5</sub>NO]<sup>+</sup>),

- 507.1 (22), 506.1 (7); UV/Vis ( $\text{H}_2\text{O}$ ):  $\lambda_{\text{max}}$  (rel.  $\epsilon$ ) = 361 (0.70), 321 (1.0), 264 nm(sh, 1.06); CD( $\text{H}_2\text{O}$ ):  $\lambda_{\text{max/min}}$  (rel.  $\Delta\epsilon$ ) = 360 (sh, 0.60), 328 (1.00), 282 (−0.50), 238 (−0.67), 205 nm(−1.65).
- [11] H. Falk, *The Chemistry of Linear Oligopyrroles and Bile Pigments*, Springer, Wien, 1989.
- [12] a) H. Kessler, M. Gehrke, C. Griesinger, *Angew. Chem.* 1988, 100, 507–554; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* 1988, 27, 490–537; b) A. Bax, M. F. Summers, *J. Am. Chem. Soc.* 1986, 108, 2093–2094.
- [13] G. P. Moss, *Pure Appl. Chem.* 1987, 59, 779–832.
- [14] Zur Anreicherung des in vergilbenden Raps-Kotyledonen nur in Spuren auffreitenden *Bn*-FCC-2 wurden partikelfreie wässrige Extrakte auf SepPak-Kartuschen aufgetragen und mit wenig MeOH/ $\text{H}_2\text{O}$  9/1 eluiert: *Bn*-FCC-2 aus Raps-Kotyledonen wurde mit 3 durch analytische HPLC [9 a], UV/Vis-spektroskopisch und anhand seiner Lumineszenz identifiziert.
- [15] Versuche von Eschenmoser und Mitarbeitern gaben Hinweise auf die günstige Thermodynamik der Bildung von Pyrroleinheiten in Tautomerisierungen an (metallfreien) Hydrochlorophyrinen (A. Eschenmoser, *Angew. Chem.* 1988, 100, 5–40; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* 1988, 27, 5–40); über die Tautomerisierbarkeit eines Gemisches von zu 3 verwandten 4,5-Seco-4,5-dioxo-octahydrophosphyrinaten zu linearen Tetrapyrrolen des Strukturtyps von 1 wurde kürzlich von Engel et al. berichtet: N. Engel, C. Curty, A. Gossauer, *Plant Physiol. Biochem.* 1996, 34, 77–83.
- [16] In *Hv*-NCC-1 1 [4] und in einigen anderen pflanzlichen NCCs [6, 7] ist die Methoxycarbonylgruppe an der 13<sup>2</sup>-Position (wie in *Bn*-FCC-2 3) intakt; im pflanzlichen Chlorophyllabbau ist eine „frühe“ Hydrolyse dieser Estergruppe also nicht angezeigt, entgegen eines kürzlichen Vorschlags von Gossauer und Engel [17 b].
- [17] a) J. Iturraspe, N. Engel, A. Gossauer, *Phytochemistry* 1994, 35, 1387–1390; b) A. Gossauer, N. Engel, *J. Photochem. Photobiol. B: Biology* 1996, 32, 141–151.
- [18] C. Curty, N. Engel, A. Gossauer, *FEBS Lett.* 1995, 364, 41–44.

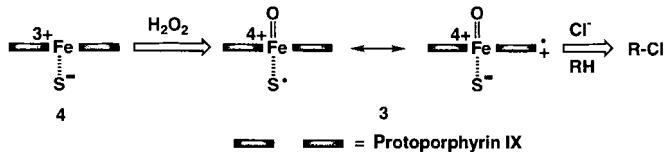
## Neue Enzymmodelle für die Chlorperoxidase – Synthesen und katalytische Reaktionen\*\*

Hans-Achim Wagenknecht und  
Wolf-Dietrich Woggon\*

Die zu den Häm-Thiolat-Proteinen gehörenden Enzyme Cytochrom P450,<sup>[1]</sup> NO-Synthase<sup>[2]</sup> und Chlorperoxidase (CPO)<sup>[3]</sup> spielen eine bedeutende Rolle beim Metabolismus endogener und exogener Verbindungen. Die inhärente Reaktivität dieser Enzyme beruht auf der Anwesenheit eines Eisenprotoporphyrin-IX-Komplexes im aktiven Zentrum, der über Wasserstoffbrückenbindungen beider Propionatseitenketten, über hydrophobe Wechselwirkungen und durch einen Thiolatliganden an das Protein gebunden ist. Letzterer stammt von einem Cysteinrest, der einer konservierten Proteinregion angehört und an das Metall in dem Halbraum des Porphyrins koordiniert ist, der der Substrat- und Sauerstoffbindungsstelle gegenüberliegt. Der Thiolatligand beeinflußt maßgeblich die chemische Reaktivität<sup>[4]</sup> und das Redoxpotential<sup>[5]</sup> des Eisenporphyrins. Ferner ergaben die Röntgenstrukturanalysen verschiedener Formen von Cytochrom P450<sub>cam</sub><sup>[6]</sup> und CPO<sup>[7]</sup>, daß der Thiolatligand nicht nur an Eisen, sondern zusätzlich über Wasserstoffbrücken an zwei Aminosäuren des Peptidrückgrates gebunden ist.

CPO, die zuerst aus dem Pilz *Caldariomyces fumago* isoliert wurde,<sup>[8]</sup> ist das vielseitigste der Häm-Thiolat-Proteine: Sie katalysiert nicht nur die Halogenierung aktiver C-H-Bindungen, sondern auch Reaktionen, die von der Peroxidase, der Ka-

talase und von Cytochrom P450 bekannt<sup>[1]</sup> und deren Mechanismen abgesehen von einigen Details gut untersucht sind.<sup>[9]</sup> Die Halogenierung aktiver C-H-Bindungen wird von CPO in Gegenwart von  $\text{H}_2\text{O}_2$  und  $\text{Cl}^-$  bei pH = 3 katalysiert. Als Substrate dienen 1,3-Diketone wie Monochlordinomedon 1, das zu 2,2-Dichlordinomedon 2 umgesetzt wird. Es wurde vorgeschlagen,<sup>[10]</sup> daß die Halogenierung über 3 verläuft, einem Zwischenprodukt, das durch die Reaktion des Ruhezustands 4 von CPO mit  $\text{H}_2\text{O}_2$  gebildet wird (Schema 1). Darüber hinaus wurde



Schema 1. Reaktion von  $\text{H}_2\text{O}_2$  mit dem Ruhezustand 4 von Chlorperoxidase zum Oxoeisen(IV)-intermediat 3 des Katalysezyklus.

vermutet,<sup>[10]</sup> daß 3 zunächst mit  $\text{Cl}^-$  reagiert und anschließend in Abhängigkeit von der  $\text{Cl}^-$ -Konzentration entweder  $\text{Cl}_2$  oder HOCl freigesetzt, das dann geeignete Substrate RH in Lösung halogeniert.

Die Annahme, daß die Halogenierung nicht am aktiven Zentrum, sondern durch „freies“ HOCl in Lösung erfolgt, stützt sich im wesentlichen auf die Tatsache, daß apolare, kleine Substrate oft nichtstereospezifisch chloriert werden.<sup>[11]</sup> Allerdings wurde berichtet, daß die CPO-katalysierte Addition von HOBr (KBr/ $\text{H}_2\text{O}_2$ , pH = 3) an peracetylierte Glycale stereospezifisch verläuft.<sup>[12]</sup> Demnach ist der Mechanismus der enzymatischen Chlorierung trotz zahlreicher Untersuchungen unklar,<sup>[13]</sup> insbesondere wurden reaktive Zwischenprodukte bisher nicht eindeutig nachgewiesen.

Wir berichten hier über das Design, die Synthese und die katalytischen Reaktionen neuer Enzymmodellverbindungen für CPO und diskutieren ihre Bedeutung für die enzymatische Reaktion. Am besten eignet sich für solche Untersuchungen ein Eisenporphyrin, dessen Koordinationssphäre den Häm-Thiolat-Proteinen möglichst nahekommt, das unter günstigen Reaktionsbedingungen  $\text{OCl}$  oder HOCl bindet und in Gegenwart von Substraten als  $\text{Cl}^+$ -Donor fungiert. Ein geeignetes Zielmolekül ist demzufolge das Eisen(III)-diphenylporphyrin 5 (Schema 2), das durch Überbrückung einerseits und durch zwei Pivaloylsubstituenten<sup>[14]</sup> andererseits sowohl gegen  $\mu$ -Oxodimerbildung als auch gegen  $\pi$ -Stacking geschützt ist. Die Brücke enthält einen Thiophenolatliganden, dessen Koordination mit dem Metall durch die starre Verknüpfung mit dem Porphyrinchromophor gewährleistet ist und der aus sterischen Gründen nicht dekomplexieren kann.<sup>[14]</sup>

Die Synthese des Porphyrinliganden wurde durch Kondensation des geschützten Aldehyds 6<sup>[15]</sup> mit dem Dipyrrylmethan 7<sup>[16]</sup> unter Säurekatalyse durchgeführt (Schema 2).<sup>[17]</sup> Die Produktmischung, die noch Chlorine enthielt, wurde zur vollständigen Oxidation mit *o*-Chloranil umgesetzt und nach Insertion von Zink(II) chromatographisch gereinigt. Die anschließende Spaltung der Phenylmethylether<sup>[18]</sup> ergab das Porphyrin 8 als nichttrennbares Mischung der  $\alpha,\alpha$ - und  $\alpha,\beta$ -Atropisomere (in Schema 2 ist nur  $\alpha,\alpha$ -8 dargestellt), die unter isomerisierenden Bedingungen mit dem Dimesylat 9<sup>[16]</sup> kondensiert wurden.<sup>[14]</sup> Die Abspaltung der Schutzgruppe am Thiophenol führte zu 10 und die anschließende Eiseninsertion zu 5.

Der Komplex 5 ist ein High-spin-Eisen(III)-porphyrin ( $g = 6.393$  und 2.073) mit einer Soret-Bande bei 408 nm. Der wasserfreie Komplex weist eine  $\lambda_{\text{max}}$  von 400 nm auf, die der Soret-

[\*] Prof. Dr. W.-D. Woggon, Dipl.-Chem. H.-A. Wagenknecht

Institut für Organische Chemie der Universität  
St. Johanns-Ring 19, CH-4056 Basel (Schweiz)  
Telefax: Int. + 61/267-1102

[\*\*] Das Forschungsprojekt wurde finanziell vom Schweizerischen Nationalfonds zur Förderung der wissenschaftlichen Forschung unterstützt.