

Stereochemische Untersuchungen von biologischen Alkylierungsreaktionen

Duilio Arigoni

Laboratorium für Organische Chemie, Eidgenössische Technische Hochschule Zürich

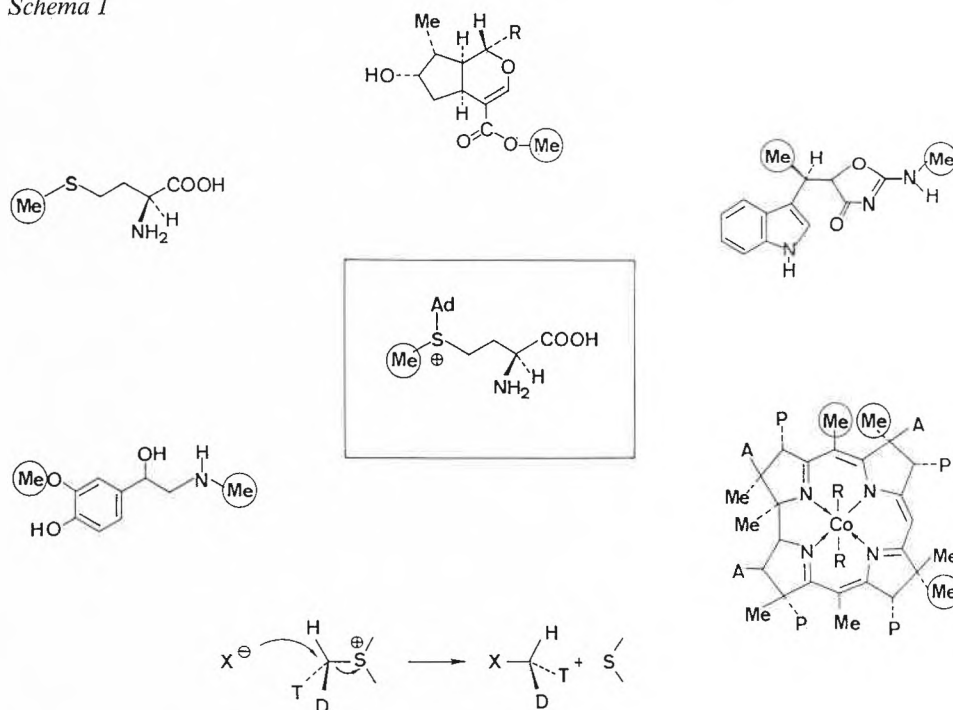


culostearinsäure, worin die neue Methylgruppe ebenfalls (*R*)-konfiguriert ist. In der wohlbegründeten Annahme, dass der eigentliche Alkylierungsschritt mit Inversion erfolgt, verlangt dieses Resultat, dass die Protonenabspaltung,

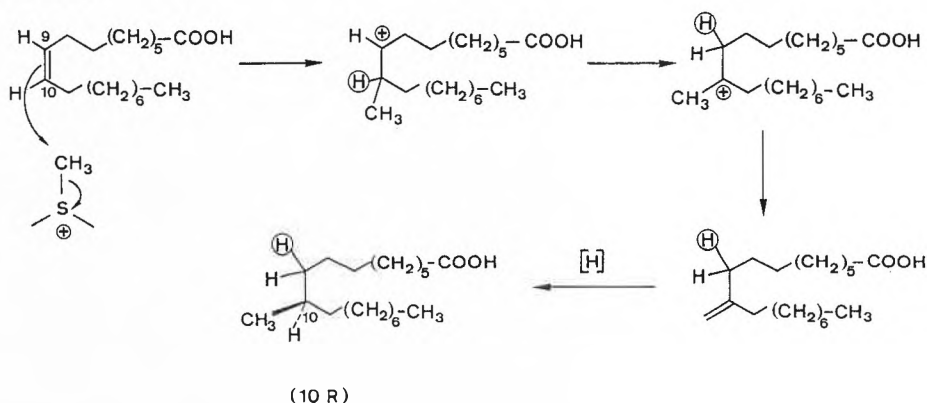
welche zur Bildung der ungesättigten Zwischenstufe führt, und die Protonen-anlagerung, welche den nachfolgenden Hydrierungsschritt einleitet, auf verschiedenen Seiten der intermediär gebildeten, neuen Doppelbindung stattfinden, wodurch eine zweite formale Inversion vorgetäuscht wird. Aus dem beobachteten Verlust von Enantiomerenreinheit lässt sich zudem für den Protonenabspaltungsschritt ein Isotopeneffekt $k_H/k_D \approx 3$ abschätzen.

2. Verfütterung einer an der Doppelbindung mit D und T stereospezifisch indizierten (*E*)-konfigurierten 10-Methylenstearinsäure liefert eine Tuberculostearinsäure mit (*S*)-konfigurierter Methylgruppe. In Anbetracht der bekannten (*10R*)-Konfiguration des Produktes folgt daraus, dass die biologische Hydrierung nach einem *trans*-Modus abläuft. Auch erlaubt dieses Resultat, zusammen mit dem vorher erwähnten, die Richtung der Protonenabspaltung festzulegen, welche zu der ungesättigten Zwischenstufe führt.

Schema 1



Schema 2

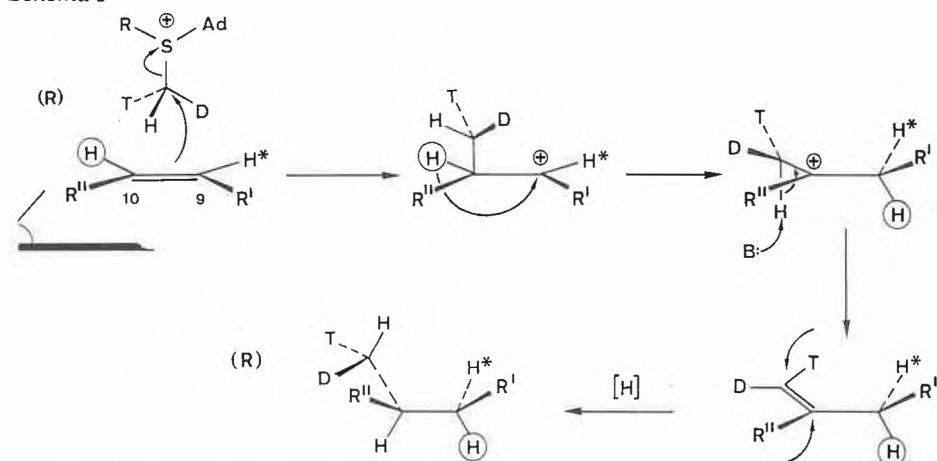


Der stereochemische Verlauf vieler biologischer Alkylierungsreaktionen, bei denen *S*-Adenosylmethionin (SAM) als C_1 -Donor dient, ist in den letzten Jahren durch Einsatz von Reagensproben mit einer chiral indizierten CHDT-Gruppe bekannter Konfiguration überprüft worden. In allen bisher untersuchten Fällen^[1,2] (eine Auswahl zeigt Schema 1) konnte nachgewiesen werden, dass die Methylübertragung unabhängig von der Natur des jeweiligen nucleophilen Zentrums erwartungsgemäss nach einem Inversionsmechanismus erfolgt. In Ergänzung und Ausweitung solcher Studien schien es reizvoll, die Biosynthese von zwei durch nachträgliche Alkylierung modifizierten Fettsäuren zu untersuchen.

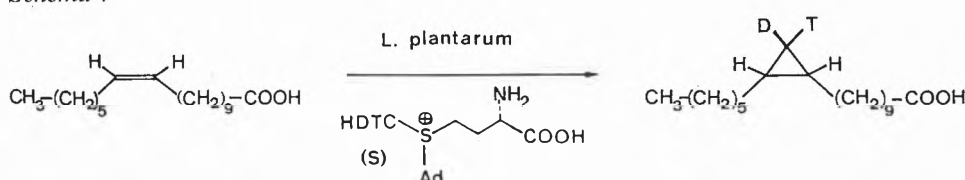
Aus früheren Arbeiten war bekannt^[3], dass die Tuberculostearinsäure in *Mycobacterium phlei* durch reduktive Alkylierung von Ölsäure unter Beteiligung von SAM gebildet wird (Schema 2). Dabei tritt als Zwischenstufe die 10-Methylenstearinsäure auf, deren Entstehung mit einer 1,2-Hydridwanderung im zuerst gebildeten Kation gekoppelt ist. Das kryptische stereochemische Bild des Gesamtvorgangs lässt sich aus folgenden Befunden rekonstruieren (vgl. Schema 3):

1. Verfütterung von Methionin mit einer (*R*)-CHDT-Gruppe liefert eine Tuber-

Schema 3



Schema 4



3. Verfütterung einer an C-9 deuterierten Ölsäure liefert eine Tuberculostearinsäure mit (S)-Konfiguration des neugebildeten deuterierten Zentrums (zur Identifikation des Produktes konnte die bemerkenswerte Beobachtung ausgenutzt werden, dass racemische Formen der zwei in Frage kommenden monodeuterierten Diastereomere unterschiedliche ^{13}C -NMR-Signale für ihre C-8-Methylengruppen aufweisen). Da die Hydridwanderung auf suprafaciale Art zu erfolgen hat, lässt sich aus dem Resultat die absolute Konfiguration der erstgebildeten kationischen Zwischenstufe und somit die Richtung der Methylübertragung ableiten.

Das sich aus den Daten für die Umwandlung Ölsäure $\rightarrow$ Tuberculostearinsäure ergebende, vollständige stereochemische Bild ist in Schema 3 dargestellt. In seinen wesentlichen Zügen stimmt dieses Bild mit demjenigen überein, welches früher bei drei verschiedenen Organismen für die mechanistisch ähnliche Umwandlung von Steroiden mit normaler Seitenkette in 24-Methylenderivate ermittelt wurde^[1,2,4]. Charakteristisches Merkmal, dem wahrscheinlich primäre mechanistische Bedeutung zukommt, ist in allen diesen Fällen die räumliche Trennung von Alkylierungsmittel und der Base, welche die den Vorgang abschliessende Protonenabspaltung ermöglicht und die jeweils auf der entge-

engesetzten Seite der zu alkylierenden Doppelbindung lokalisiert ist.

Verschiedene Verhältnisse – das heisst gleichseitige Orientierung von Alkylierungsmittel und Protonenacceptor bezüglich der reagierenden Doppelbindung – müssen indessen bei jener aktiven Enzymstelle vorliegen, welche in *Lactobacillus plantarum* die SAM-abhängige Cyclopropanierung von Vaccensäure zu Lactobacillinsäure katalysiert^[5] (vgl. Schema 4). Durch Einsatz von Verbindungen mit chiraler Methylgruppe und Ermittlung der Konfiguration der gebildeten doppelt markierten Spezies anhand eines mehrstufigen Abbaus, der die gezielte und stereokontrollierte Rückführung des markierten Zentrums in eine Methylgruppe ermöglicht, konnte der Nachweis erbracht werden, dass der Protonenverlust aus dem intermediär auftretenden, protonierten Cyclopropanderivat einer strengen stereochemischen Kontrolle unterliegt und spezifisch in Richtung des Alkylkettenendes erfolgt. Der paradoxe Befund, wonach in den gleichzeitig entstehenden, lediglich mit T markierten Molekülen die Markierung statistisch auf beide diastereotopischen Positionen verteilt ist, wirft unerwartetes Licht auf die reversible Natur des Deprotonierungsprozesses.

Den Herren Paul Hanselmann, Dr. Jean-Pierre Obrecht und Dr. Bruno Martinoni möchte ich für ihre kompetente Mitarbeit und ausdauernde Begeisterung danken.

- [1] D. Arigoni, in «Molecular Interactions and Activity in Proteins», Ciba Found. Symp. New Ser. 60 (1978) 243.
- [2] H. G. Floss, M. D. Tsai, R. B. Woodard, *Top. Stereochem.* 15 (1984) 253.
- [3] E. Lederer, *Quart. Rev. Chem. Soc.* 23 (1969) 453.
- [4] M. M. Mihailovic, Dissertation ETH No. 7535 (1984).
- [5] T. Y. Liu, K. Hofmann, *Biochemistry* 1 (1962) 189.