

Olefin-Alkylierung in der Biosynthese

VON J. W. CORNFORTH [*]

Stereochemische Untersuchungen an asymmetrisch mit Wasserstoffisotopen markierten Vorstufen deuten darauf hin, daß die enzymatische Verknüpfung von C₅-Einheiten in der Polyisoprenoid-Synthese kein konzertierter Prozeß ist, sondern in zwei Stufen abläuft: einer trans-1,2-Addition an ein Olefin, der eine trans-1,2-Eliminierung folgt. Mit ähnlichen Vorstellungen läßt sich auch die Cyclisierung von Squalenepoxid zu tetracyclischen und pentacyclischen Triterpenoiden erklären.

1. Einleitung

Eine chemische Grundlage des Lebens, in der Kohlenstoff-Kohlenstoff-Bindungen keine Rolle spielen, ist wohl kaum vorstellbar. Neuere Versuche zur Synthese biologisch wichtiger Substanzen aus einfachen Molekülen wie Methan und Blausäure – die möglicherweise auf der präbiotischen Erde im Überfluß vorhanden waren – bewiesen, daß es selbst unter diesen Bedingungen mehrere Möglichkeiten zur Knüpfung von Kohlenstoff-Kohlenstoff-Bindungen gibt. Diesen Experimenten liegt die Hypothese zugrunde, daß das Leben auf der Erde aus vorhandenen komplizierten Verbindungen entstanden ist. Notwendigerweise mußten sich Wege der Biosynthese entwickeln, ehe der Vorrat an diesen Substanzen aufgebraucht war, d. h. es mußten unter anderem Möglichkeiten zur C–C-Verknüpfung gefunden werden.

Bei der Biosynthese von Proteinen, Kohlenhydraten, Nucleinsäuren und den meisten Fetten überwiegen Kondensationen vom Aldol- und Claisen-Typ: Ein Enolat-Ion, das durch Entfernung eines zu einer Carbonylgruppe (oder manchmal einer Carboxygruppe) α -ständigen Wasserstoffatoms entsteht, greift dabei eine andere Carbonylgruppe an. Die in organischen Synthesen so häufig verwendete Alkylierung von Enolen wird bei Biosynthesen merkwürdig selten beobachtet; die meisten in der Natur vorkommenden Kohlenstoff-Kohlenstoff-Bindungen entstehen wahrscheinlich durch Reaktion der elektrophilen Carbonylgruppe mit dem nucleophilen Enolat-Ion.

(*R*)-Mevalonsäure (1), der Ausgangsstoff für alle Terpenoid-Biosynthesen, wird aus drei Molekülen des Acetyl-Coenzyms A durch Claisen-Kondensation zusammengesetzt, doch spielen Aldol- und Claisen-Kondensation für die Herstellung der weiteren Kohlenstoff-Kohlenstoff-Bindungen der Terpene keine Rolle mehr, sondern Reaktionen, die man als Olefin-Alkylierung bezeichnen kann. Deshalb sind die Enzyme der Terpenoid-Biosynthesen von besonderem Interesse [1].

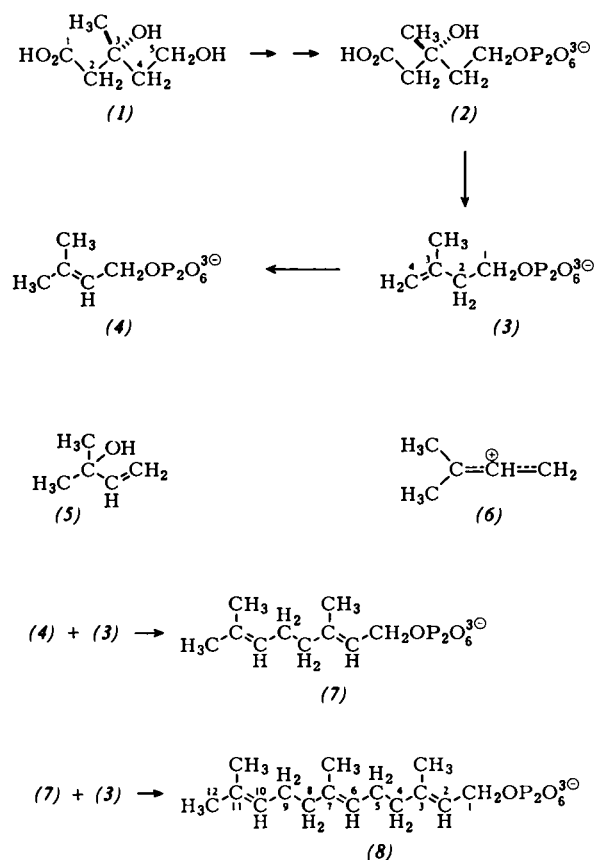
Die austretende Gruppe bei der ersten Alkylierung [(4) + (3) \rightarrow (7)] ist das Pyrophosphation. Mevalonsäure-5-pyrophosphat (2) wird durch zwei aufeinanderfolgende Phosphorylierungen von Adenosintriphosphat auf (*R*)-Mevalonsäure (1) erzeugt. Die für die spätere Alkylierung benötigte Doppelbindung entsteht durch eine konzertierte Eliminierung, wozu ebenfalls Adenosintriphosphat notwendig ist. Bei diesem Schritt erhält man anorganisches Phosphat, Adenosindiphosphat, Kohlendioxid und Isopentenylpyrophosphat (3). Die austretende Gruppe wird dann durch eine Wasserstoffverschiebung, bei der Dimethylallylpyrophosphat (4) entsteht, weiter aktiviert. Die im Vergleich zum homoallylischen Isomeren (3) erhöhte elektrophile Aktivität des allylischen Pyrophosphats (4) zeigt sich in seiner Empfindlichkeit gegenüber wäßriger Säure. Bei pH < 5 wird das Pyrophosphation von (4) rasch unter Alkylierung von Wasser eliminiert; als Hauptprodukt erhält man den Alkohol (5), der vermutlich aus dem intermediären allylischen Carbenium (6) entsteht. Die enzymatische Bildung von (4) aus (1) wurde zuerst an löslichen Extrakten aus Hefe und dann aus Leber beobachtet. Die vier verantwort-

[*] Prof. Dr. J. W. Cornforth
„Shell“ Research Limited,
Milstead Laboratory of Chemical Enzymology
Sittingbourne/Kent (England)

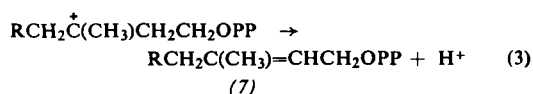
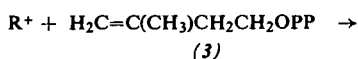
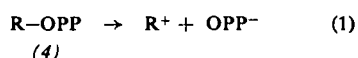
[1] Überblick über die Biosynthese von Terpenoiden: R. B. Clayton, Quart. Rev. (chem. Soc., London) 19, 168, 201 (1965).

lichen Enzyme konnten voneinander getrennt und weitgehend, wenn auch noch nicht völlig rein erhalten werden.

Die Verknüpfung der Zwischenstufen (3) und (4) ist der erste und charakteristische Schritt in der Biosynthese der Polyisoprenoide. Bei dieser enzymatischen Reaktion bildet sich unter Verlust eines Protons und eines Pyrophosphations ein neues allylisches Pyrophosphat. Mit den löslichen Leber- und Hefeextrakten, die bislang am besten untersucht worden sind, erhält man dabei Geranylpyrophosphat (7). Dieses allylische Pyrophosphat kann dann, offensichtlich unter Beteiligung des gleichen Enzyms, mit einem weiteren Molekül Isopentenylpyrophosphat (3) zum C₁₅-Derivat Farnesylpyrophosphat (8) reagieren. Die weitere Kettenverlängerung zu Geranyl-geranyl-pyrophosphat verläuft mit diesem Enzymsystem allerdings unmeßbar langsam.



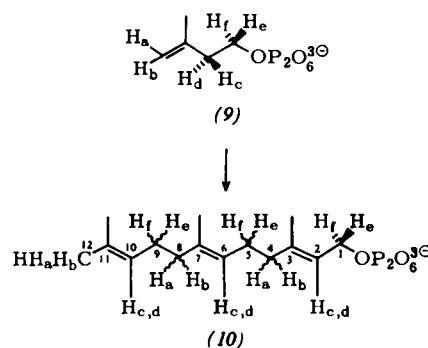
Die Bildung von (7) könnte über zwei Carboniumion-Zwischenstufen verlaufen:



Auch die Isomerisierung des Isopentenylpyrophosphats zu Dimethylallylpyrophosphat kann durch die Gleichungen (2) und (3) gedeutet werden, wenn R⁺ durch H⁺ ersetzt wird.

2. Stereochemische Überlegungen

Um die am Enzym ablaufenden Vorgänge im einzelnen zu verstehen, benötigt man mehr Informationen als durch die bislang angewendeten Methoden beigebracht werden können. Während der letzten Jahre haben Popják und ich deshalb die Stereochemie der Biosynthese von Polyisoprenoiden, besonders am Beispiel des Squalens, untersucht.



Es ist nicht sofort zu erkennen, daß man auf diesem Wege zu einem tieferen Verständnis gelangen kann, denn die optische Asymmetrie der Mevalonsäure und ihrer Phosphate geht ja beim Übergang in Isopentenyl- und Dimethylallylpyrophosphat verloren. Im Isopentenylpyrophosphat gibt es nun aber drei Methylen-Gruppen. Wenn man die beiden Wasserstoffatome an jeder Methylengruppe gemäß (9) unterscheiden und das Schicksal jedes Wasserstoffatoms z.B. bei der enzymatischen Bildung von Farnesylpyrophosphat (10) verfolgen könnte, wären einige Schlüsse über das Geschehen am Enzym möglich. Unter der Annahme, daß in den stereochemischen Sequenzregeln^[2] H_a höher als H_b und H_e höher als H_f eingestuft sind, gilt folgendes:

1. Wenn die Isomerisierungen und die mit den Koppelungsreaktionen einhergehenden Eliminierungen stereospezifisch sind, werden die Positionen 2, 6 und 10 in (10) je nach der Stereochemie von H_c oder H_d besetzt. Bei nicht-stereospezifischen Reaktionen wären H_c und H_d gleichmäßig auf diese Stellungen verteilt.

2. Bei der Bildung der Kohlenstoff-Kohlenstoff-Bindungen zwischen C-4 und C-5 sowie C-8 und C-9 müssen Pyrophosphationen verdrängt werden. Die absoluten Konfigurationen an C-5 und C-9 in (10) werden (S) sein, wenn diese Verdrängungen unter gleichzeitiger Inversion der Konfiguration stattfinden, und (R), wenn Retention der Konfiguration die Regel ist. Sind diese Verdrängungen (wie oft bei Carboniumion-Reaktionen) nicht-stereospezifisch, resultieren an C-5 und C-9 (RS)-Konfigurationen.

[2] R. S. Cahn, C. K. Ingold u. V. Prelog, *Experientia* 12, 81 (1956).

3. Die beiden Seiten der Doppelbindung im Isopentenylpyrophosphat [oberhalb und unterhalb der Projektionsebene der Struktur (9)] sind in einer asymmetrischen Umgebung nicht äquivalent. Die absoluten Konfigurationen an C-4 und C-8 in (10) werden (*S*) sein, wenn die neue Kohlenstoff-Kohlenstoff-Bindung durch Angriff unterhalb dieser Ebene gebildet wird, und (*R*), wenn der Angriff von oben stattfindet.

Diese drei potentiell stereospezifischen Prozesse legen das stereochemische Verhalten sämtlicher Atome fest, die bei der Kopplung bleibend verändert werden. Die Isomerisierung ist nicht so eindeutig festgelegt, da die Umwandlung von Isopentenylpyrophosphat (3) in Dimethylallylpyrophosphat (4) die Verschiebung eines Wasserstoffions erfordert. Die endständige Methylengruppe in (3) kann das Ion von oberhalb oder von unterhalb der Ebene der Doppelbindung aufnehmen; die Methylgruppe ist aber nur dann chiral [vgl. die C-12-Methylgruppe in (10)], wenn der eintretende Wasserstoff sowohl von H_a als auch von H_b unterschieden werden kann. Die einzige Möglichkeit, die beiden Wasserstoffatome in einem Paar (H_{ab} , H_{cd} , H_{ef}) zu unterscheiden, besteht darin, eines von beiden mit einem Wasserstoffisotop zu markieren. Um die neugebildete Methylgruppe des Dimethylallylphosphats chiral zu machen, müssen alle drei Wasserstoffisotope angewendet werden. Die Stereochemie der Wasserstoffaddition kann nur aufgeklärt werden, wenn man eine Möglichkeit findet, um diese Chiralität zu messen.

2.1. Herstellung der isotope markierten Verbindungen

Die unmittelbare Isotopenmarkierung von Isopentenylpyrophosphat (3) bereitet Schwierigkeiten. Seine Vorstufe, Mevalonsäure (1), eignet sich besser dazu, hauptsächlich weil die Mevalonsäure bereits ein Asymmetriezentrum am C-3 hat und weil nur (*R*)-Mevalonsäure vom Enzym phosphoryliert wird [3,4].

Wenn man ein Wasserstoffatom an C-4 oder C-5 der Mevalonsäure (1) stereospezifisch durch Deuterium oder Tritium ersetzt, wird diese Konfiguration an den entsprechenden Stellen (C-2 bzw. C-1) des enzymatisch aus der Mevalonsäure gebildeten Isopentenylpyrophosphats (3) erhalten bleiben, da die Bindungen an diesen Kohlenstoffatomen nicht geändert werden. Wenn die Mevalonsäure jedoch an C-2 stereospezifisch markiert wird, sollte die Geometrie an C-4 im Isopentenylpyrophosphat außer von der Chiralität an C-2 des Mevalonats vom Mechanismus der Eliminierungsreaktion (2) \rightarrow (3) abhängen. Deshalb muß auch die Orientierung des Wasserstoffisotops an C-4 des Isopentenylpyrophosphats bestimmt werden – es genügt nicht, wie bei C-1 und C-2 nur die Konfiguration der Stammsubstanz Mevalonat zu kennen.

Deuterium und Tritium wurden enzymatisch an C-5 der Mevalonsäure eingeführt [5]. Ein aus Schweineleber extrahierbares Enzym, die Mevaldat-Reduktase [6],

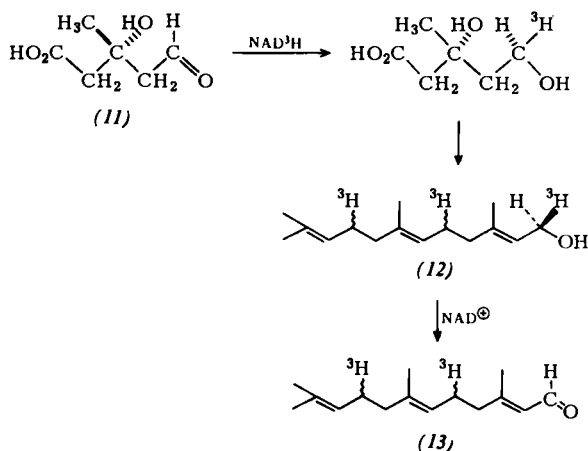
[3] F. Lynen u. M. Grassl, Hoppe-Seylers Z. physiol. Chem. 313, 291 (1958).

[4] R. H. Cornforth, J. W. Cornforth u. G. Popják, Tetrahedron 18, 1351 (1962).

[5] C. Donninger u. G. Popják, Proc. Roy. Soc. (London), Ser. B 163, 465 (1966).

[6] M. J. Schlesinger u. M. J. Coon, J. biol. Chemistry 236, 2421 (1961).

überträgt Wasserstoff von $NAD-2H$ bzw. $NAD-3H$ auf Mevaldsäure (11), den Aldehyd der Mevalonsäure; NADH selbst kann leicht mit Deuterium oder Tritium markiert werden. Merkwürdigerweise reduziert das Enzym sowohl die (*R*)- als auch die (*S*)-Form der Mevaldsäure; dieser Mangel an Stereospezifität bezieht sich aber auf eine abseits vom Reaktionszentrum liegende Stelle. Auf diese Weise hergestellte tritiummarkierte Mevalonsäure wurde mit einem Extrakt löslicher Enzyme aus Rattenleber in Farnesylpyrophosphat übergeführt, das enzymatisch zu Farnesol hydrolysiert werden konnte (alkalische Phosphatase).



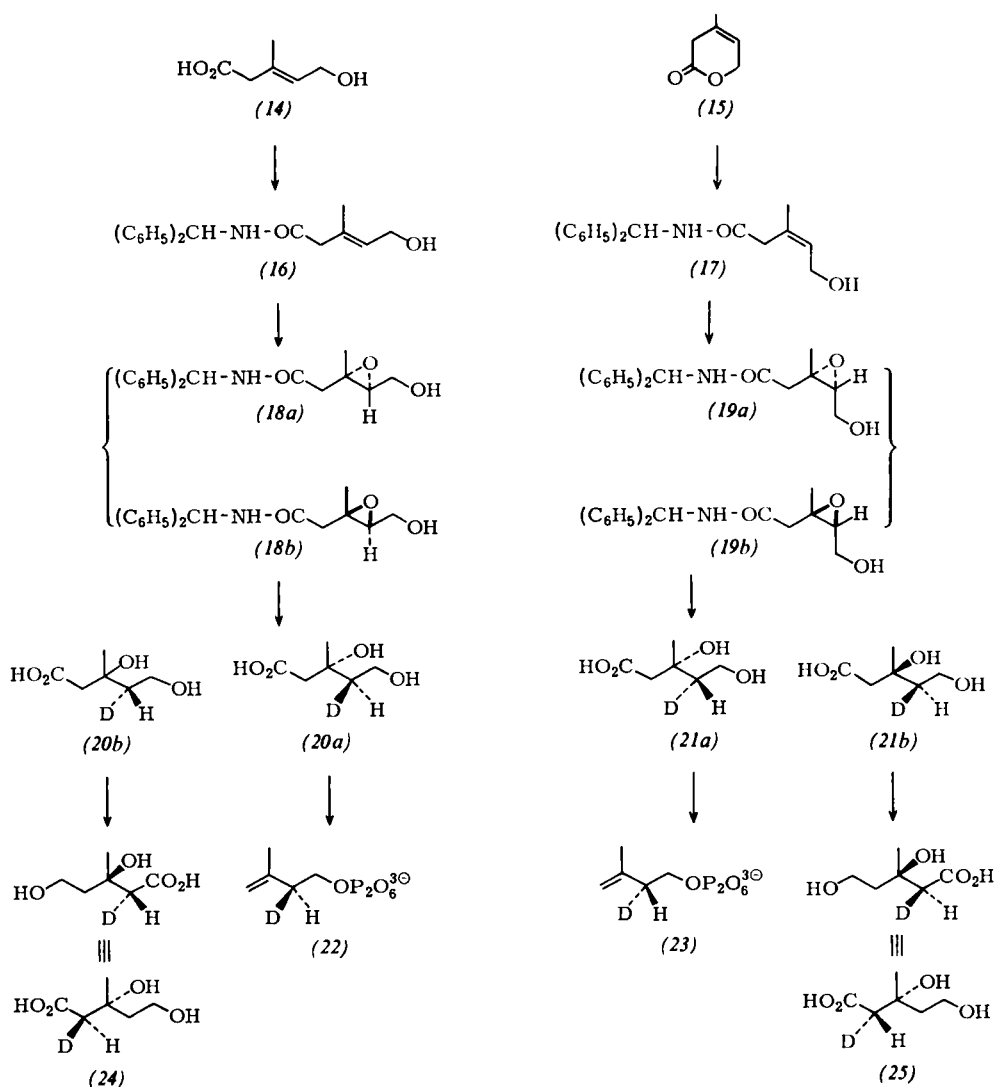
Als man dieses markierte Farnesol (12) mit NAD^+ in Gegenwart von Leber-Alkohol-Dehydrogenase zu Farnesal (13) oxidierte, ging ein Drittel des Tritiums, d.h. alles Tritium an C-1, verloren.

Die Orientierung des Wasserstoffs, der aus primären Alkoholen mit Leber-Alkohol-Dehydrogenase entfernt wird, ist bei Äthanol als pro-*R* bestimmt worden. Falls die Alkohol-Dehydrogenase für Farnesol die gleiche Stereospezifität hat wie für Äthanol – was zu erwarten ist – dann sollte der durch die Mevaldat-Reduktase in das Mevalonat eingeführte isotope Wasserstoff ebenfalls die Konfiguration (5*R*) hervorbringen. Experimente mit Geraniol als Modell für Farnesol bestätigten diese Vorstellungen [7], indem sie zeigten, daß die Leber-Alkohol-Dehydrogenase den pro-*R*-Wasserstoff aus dem Geraniol entfernt. Später konnten die Spezifitäten für Geraniol und für Äthanol [*] direkt verglichen werden. Das Geraniol war durch Reduktion von Geranial mit $NAD-3H$ in Gegenwart von Leber-Alkohol-Dehydrogenase markiert und chemisch zu Äthanol abgebaut worden. Mit Leber-Alkohol-Dehydrogenase (oder Hefe-Alkohol-Dehydrogenase) verlor dieses Äthanol sein ganzes Tritium. Für die stereospezifische Markierung an C-4 und C-2 der Mevalonsäure wurden chemische Methoden verwendet. Die Säure (14) und das Lacton (15) [8] wurden zunächst in die geometrisch isomeren Benzhydrylamine (16) bzw. (17) umgewandelt. Beide wurden epoxidiert und anschließend mit LiBD_4 reduziert.

[7] C. Donninger u. G. Ryback, Biochem. J. 91, 10P (1964).

[*] D. Arigoni u. H. Weber, persönliche Mitteilung.

[8] J. W. Cornforth, R. H. Cornforth, G. Popják u. I. Y. Gore, Biochem. J. 69, 146 (1958).



Nach alkalischer Hydrolyse erhielt man zwei Proben von Mevalonsäure, die an C-4 stereospezifisch mit Deuterium markiert war.

Aufgrund der Synthese müssen diese beiden Mevalonsäuren jeweils aus zwei verschiedenen Racematen bestehen. Die Epoxidierung einer Doppelbindung durch eine Peroxysäure ist eine *cis*-Addition von Sauerstoff; die Reduktion eines Epoxids mit einem Metallhydrid führt zu einer Inversion der Konfiguration an dem Zentrum, von welchem der Sauerstoff verdrängt wird. Daher ergibt das Benzhydrazid (16) ein racemisches Gemisch der enantiomeren Epoxide (18a) und (18b), aus dem durch Reduktion und Hydrolyse das racemische Gemisch (20a) und (20b) gebildet wird; demgegenüber führt das Benzhydrazid (17) über (19a) und (19b) zu (21a) und (21b). Weil die Mevalon-Kinase nur die (3*R*)-Form der Mevalonsäure phosphoryliert, verhalten sich die racemischen Mischungen (20) und (21) ihr gegenüber, als ob nur (20a) und (21a) vorhanden wären. Sobald die Folge der enzymatischen Reaktionen bis zum Isopentenylpyrophosphat (3) fortgeschritten ist, wird die Asymmetrie an C-3 des Mevalonats aufgehoben, aber die asymmetrische Markierung bleibt erhalten; (20a) ergibt ausschließlich das (2*S*)-Enantiomere (22), während (21a) ausschließlich in das (2*R*)-Enantiomere (23) übergeht [9].

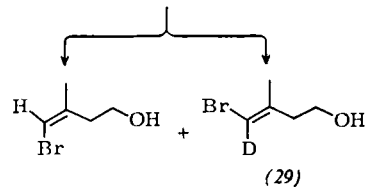
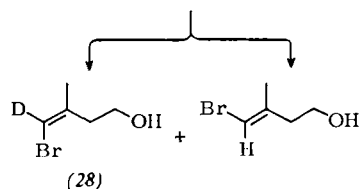
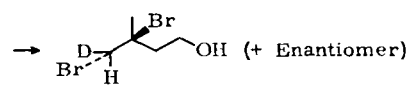
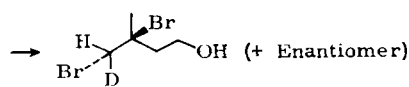
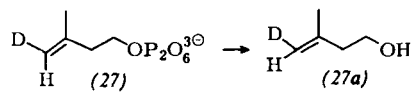
Die diastereomeren Mevalonsäuren (20) und (21) waren auch bei der asymmetrischen Markierung der Mevalonsäure an C-2 mit Wasserstoff nützlich. Wenn die Carboxy- mit der Hydroxymethylgruppe der Mevalonsäure ausgetauscht wird, erhält man wieder Mevalonsäure, mit dem Unterschied, daß C-4 zu C-2 und eine (3*R*)- zu einer (3*S*)-Mevalonsäure umgestaltet worden ist. Dadurch wird aus der enzymatisch inaktiven Komponente (20b) die enzymatisch aktive (3*R*)[2*R*-2-D₁]-Mevalonsäure (24). Durch die gleiche Behandlung des racemischen Gemischs (21) erhält man (25) als einzige enzymatisch aktive Spezies.

Die Umwandlung der funktionellen Gruppen gelang in drei Stufen [10]: 1. C-4-markierte Silbermevalonate wurden mit Methyljodid verestert; 2. die Methylmevalonate konnten mit Zinkpermanganat in kaltem Aceton zu den Monomethylestern der 3-Hydroxy-3-methylglutarsäuren oxidiert werden; 3. die Lithiumsalze ließen sich mit LiBH₄ zu C-2-markierten Mevalonaten reduzieren.

Die von Mevalonsäure-5-pyrophosphat (2) zu Isopentenylpyrophosphat (3) führende Enzymreaktion ist eine *trans*-Eliminierung von Wasser und Kohlendioxid, so daß man aus (3*R*)[2*R*-2-D₁]-Mevalonat *cis*-[4-D₁]-Isopentenylpyrophosphat (26) und aus

[9] J. W. Cornforth, R. H. Cornforth, C. Donninger u. G. Popják, Proc. Roy. Soc. (London), Ser. B 163, 492 (1966).

[10] J. W. Cornforth, R. H. Cornforth, G. Popják u. L. S. Yen-goyan, J. biol. Chemistry 241, 3970 (1966).



(3 R)[2 S-2-D₁]-Mevalonat *trans*-[4-D₁]-Isopentenylpyrophosphat (27) erhält. Dies war jedoch nicht a priori bekannt, und so mußte die Geometrie der beiden Deuterioisopentenylpyrophosphate, die enzymatisch aus den beiden Mevalonsäuren hergestellt worden waren, gesichert werden^[10]. Dies geschah durch enzymatische Hydrolyse beider Verbindungen zu Isopentenol (26a) bzw. (27a), gefolgt von einer Addition von Brom an die Doppelbindung und Eliminierung von Bromwasserstoff mit methanolischem Alkali unter Bedingungen, die eine E₂-Reaktion begünstigen. Das Hauptprodukt ist ein Gemisch aus *trans*-4-Bromisopentenol und einer kleinen Menge des *cis*-Isomeren. Da die Addition von Brom spezifisch in *trans*-Stellung und die Eliminierung vorzugsweise in *trans*-Stellung erfolgt, ergibt sich, daß das Deuterium aus *cis*-[4-D₁]-Isopentenol im *cis*-4-Bromisopentenol erhalten bleibt und in der *trans*-Verbindung nicht mehr vorhanden ist; das Umgekehrte sollte für *trans*-[4-D₁]-Isopentenol gelten. Durch Trennung der geometrisch isomeren Bromisopentenoile (durch Gaschromatographie) und Prüfung jedes Isomeren auf Deuterium (durch Massenspektrometrie) konnte gezeigt werden, daß in *cis*-4-Bromisopentenol (28), letztlich gewonnen aus (3 R)-[2 R-2-D₁]-Mevalonat (24), und in *trans*-4-Bromisopentenol (29), gewonnen aus dem (3 R)[2 S-2-D₁]-Mevalonat (25), Deuterium erhalten geblieben war. Die anderen beiden Bromisopentenoile hatten das Deuterium weitgehend verloren. Damit waren die enzymatische Bildung von Isopentenylpyrophosphat als *trans*-Eliminierung und die stereochemische Korrelation zwischen C-2-markierten Mevalonaten und C-4-markierten Isopentenylpyrophosphaten gesichert.

3. Bildung von Polyisoprenoiden aus C₅-Einheiten

Um die Stereochemie der Alkylierung zu Polyisoprenoiden zu ermitteln, wurde der Weg des Deuteriums oder Tritiums aus dem stereospezifisch markierten Mevalonat bei der Biosynthese an zellfreien Extrakten aus Rattenleber verfolgt. Als Endprodukt wurde manchmal Farnesylpyrophosphat, manchmal Squalen untersucht.

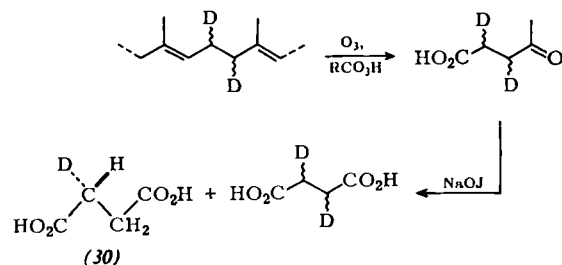
Wenn man Farnesylpyrophosphat enzymatisch aus drei Mevalonateinheiten synthetisiert, werden drei

Wasserstoffatome eliminiert, die ursprünglich jeweils an C-4 des Mevalonats gebunden waren.

Bei der enzymatischen Hydrolyse des biosynthetisch aus (3*R*)[4-*R*-D₁]-Mevalonat hergestellten Farnesylpyrophosphats entstand ein Farnesol, in dem die drei Deuteriumatome erhalten geblieben waren, während aus (3*R*)[4-*S*-D₁]-Mevalonat deuteriumfreies Farnesol gebildet wurde, wie sich massenspektrometrisch nachweisen ließ^[9]. Dieses Ergebnis konnte durch Untersuchung von Squalen, das aus C-4-deuterierten oder C-4-tritierten Mevalonaten biosynthetisiert wurde, bestätigt werden: der 4-*R*-Wasserstoff blieb erhalten, und der 4-*S*-Wasserstoff ging verloren.

Wenn C-2- oder C-5-markierte Mevalonate als Stammsubstanzen gebraucht wurden, genügte nur Deuterium zur Markierung. Farnesol oder Squalen, die man enzymatisch aus diesen markierten Stammsubstanzen erhielt, wurden durch Ozonolyse abgebaut; die Lävulinsäure mit den zu untersuchenden potentiell asymmetrischen Zentren konnte mit alkalischem Natriumhypodit hauptsächlich zu Jodoform und Bernsteinsäure oxidiert werden.

Wir hatten für einen anderen Zweck bereits asymmetrisch markierte Monodeuteriobernsteinsäure von bekannter absoluter Konfiguration hergestellt und gezeigt, daß wenige Milligramm genügen, um ihre optische Aktivität im ultravioletten Bereich mit einem modernen Spektropolarimeter zu messen



($[\alpha]_{250\text{ nm}} = \pm 18^\circ$). Aus (3*R*)[5*R*-5-D₁]-Mevalonat^[9] biosynthetisch hergestelltes Squalen und aus (3*R*)[2*R*-2-D₁]-Mevalonat^[10] hergestelltes Farnesol wurden wie beschrieben zu Bernsteinsäure abgebaut. Beide Male wurde hauptsächlich [2*R*-2-D₁]-Bernsteinsäure (30) erhalten, deren optische Aktivität dem Deuteriumgehalt der Probe entsprach; der Deuteriumgehalt wurde durch Massenspektrometrie des Methylesters oder des Anhydrids ermittelt^[11].

Nehmen wir an, ein Molekül Isopentenylpyrophosphat, das von einem Molekül eines primären allyli-

[11] G. Popják u. J. W. Cornforth, *Biochem. J.* **101**, 553 (1966).

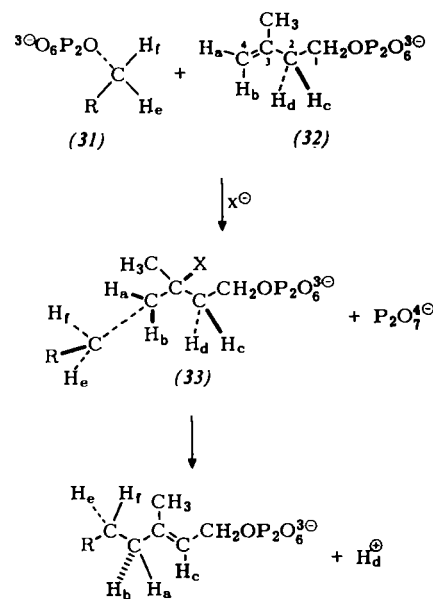
schen Pyrophosphats (31) alkyliert werden soll, orientiert sich am Enzym wie in (32) dargestellt. Die beiden Kohlenstoffatome der Doppelbindung und die vier an sie gebundenen Atome liegen in der Papierebene. Dann zeigen unsere Ergebnisse, daß 1. vollkommene Inversion am primären allylischen Kohlenstoffatom (C-2) stattfindet, wenn das Pyrophosphation verdrängt wird und die neue C–C-Bindung zustandekommt, daß 2. diese Bindung von unterhalb der Doppelbindungsebene des Isopentenylpyrophosphats gebildet wird, und daß 3. das 2*R*-Wasserstoffatom des Isopentenylpyrophosphats eliminiert wird, wenn sich die neue *trans*-Doppelbindung bildet.

Aus 1 kann man folgern, daß die Kondensation nicht durch die Bildung eines Carboniumions aus dem allylischen Pyrophosphat eingeleitet werden kann, es sei denn, daß die Rotation um die C–CH₂⁺-Bindung des Carboniumions aus räumlichen Gründen behindert ist oder daß sich die neue C–C-Bindung so rasch bildet, daß die Zeit für diese Rotation nicht ausreicht. Ohne solche Hypothesen kommt man bei der Annahme aus, daß die neue Bindung sich bildet, während die alte Bindung aufbricht: Dies wäre eine Reaktion vom S_N2-Typ, bei dem die Inversion der Konfiguration der Normalfall ist. Damit ist aber die Bildung der C–C-Bindung als konzertierter Prozeß anzusehen.

Darf man diese Vorstellung ausdehnen und die ganze Kondensation als konzertierten Vorgang betrachten, als kontinuierliche Verschiebung von Elektronen, die an der (C-2)-H_R-Bindung des Isopentenylpyrophosphats beginnt und mit der Entfernung des Pyrophosphations endet? Wenn die stereochemischen Voraussetzungen 2 und 3 gleichzeitig gelten sollen, ist dies unwahrscheinlich. Da im Produkt eine *trans*-Doppelbindung geknüpft wird, müßte das gesamte Isopentenylpyrophosphatmolekül für eine konzertierte Reaktion wie in (32) gezeigt orientiert sein, d. h. H_R an C-2 (das ist H_d) müßte sich unterhalb der Papierebene befinden. Da die Elektronen der C–H_R-Bindung für die Bildung der neuen Doppelbindung gebraucht werden, werden dem C-Atom 3 des Isopentenylpyrophosphats Elektronen zugeleitet (um die neue Doppelbindung zu bilden) und ihm von der gleichen Seite (um die neue C–C-Einfachbindung zu bilden) entzogen: Dies liefe auf eine nucleophile Substitution unter Konfigurationserhaltung hinaus. Dieser Vorgang scheint energetisch weit weniger begünstigt als ein konzertierter Mechanismus zu sein, bei dem Elektronen an entgegengesetzten Seiten des C-3 zugeführt und abgezogen werden; im vorliegenden Fall würde dies aber entweder zu einer *cis*-Doppelbindung oder zur Eliminierung von H_S führen, was beides im Gegensatz zu den Beobachtungen steht. So wird denn auch H_S und nicht H_R bei der Biosynthese des Kautschuks (der *cis*-Doppelbindungen enthält) eliminiert.

Diese Überlegungen haben uns veranlaßt, für die Alkylierung einen Zweistufenmechanismus unter Beteiligung einer Elektronendonator-Gruppe X zu postulieren. Diese Gruppe könnte Bestandteil des Enzyms oder ein an das Enzym gebundenes Wassermolekül

oder ein Sauerstoffatom der Pyrophosphatgruppe des Isopentenylpyrophosphats sein, eine von Johnson^[12] schon vor Kenntnis der stereochemischen Einzelheiten aufgestellte Hypothese. Die erste Stufe ist dann eine *trans*-Addition der allylischen Gruppe von (31) und von X an die Doppelbindung des Isopentenylpyrophosphats; die zweite Stufe ist eine *trans*-Eliminierung von X und H_R aus der Zwischenstufe (33) unter Bildung der Doppelbindung. Wenn die Gruppe X eine formale negative Ladung trägt, geht ihre Bindung an C-3 vielleicht in keinem Stadium über die einer engen Ionenpaarbindung hinaus.



Diese Vorstellungen erklären die beobachtete Stereochemie der Kondensation zufriedenstellend. Es ist jedoch noch eine andere Erklärung möglich.

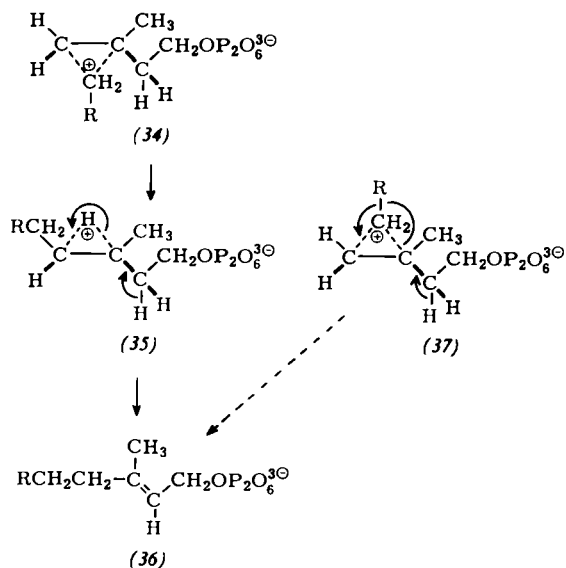
In einer klassischen Publikation^[13] haben Eschenmoser, Ruzicka, Jeger und Arigoni gezeigt, wie die Cyclisierung von *trans*-Squalen ohne Bildung stabiler Zwischenstufen zu allen bekannten Typen tetracyclischer und pentacyclischer Triterpene über eine Folge stereospezifischer Stufen führen könnte. Man nahm an, daß die Cyclisierungen, die als Olefin-Alkylierungen klassifiziert werden können, über eine „antiparallele“ (*trans*-) Addition eines Carboniumions und einer Elektronendonatorgruppe (hier der π -Elektronen einer anderen Doppelbindung) an eine Doppelbindung verlaufen. Um die beobachtete stereochemische Anordnung des Endproduktes herzuleiten, war es stets notwendig, eine oder mehrere stereospezifische intramolekulare Umlagerungen nicht-klassischer Carboniumionen zu postulieren. Manchmal mußten zwei aufeinanderfolgende stereospezifische Umlagerungen eines Kations angenommen werden.

Analog könnte die beobachtete Stereochemie der Alkylierung des Isopentenylpyrophosphats zu erklären sein. Demzufolge wäre der erste Schritt die Bildung eines nicht-klassischen Carboniumions (34); dieses würde sich intramolekular in ein weiteres nicht-klassisches Ion (35) umlagern, das durch

[12] W. S. Johnson u. R. A. Bell, Tetrahedron Letters Nr. 12, S. 27 (1960).

[13] A. Eschenmoser, L. Ruzicka, O. Jeger u. D. Arigoni, Helv. chim. Acta 38, 1890 (1955).

die nun stereospezifisch begünstigte Eliminierung von H_R das Endprodukt (36) ergeben würde. Es ist ein logischer Nachteil dieses Mechanismus, daß die Bildung des nicht-klassischen Carboniums von der anderen Seite der Doppelbindung her [wie in (37)] eine mechanistisch ähnliche Bildung von (36) zulassen würde, ohne daß man eine Zwischenstufe postulieren müßte.



Formal kann man den Mechanismus (34) \rightarrow (36) als äquivalent dem X-Gruppen-Mechanismus ansehen, wenn man die Elektronen einer C-H-Bindung als X-Gruppe betrachtet. Der wesentliche Unterschied zum X-Gruppen-Mechanismus ist räumlicher Art. Die Umlagerung von (34) zu (35) erfordert eine große räumliche Verschiebung der allylischen Gruppe R (oder des ganzen Isopentenylpyrophosphatmoleküls). Diese Verschiebung muß (da keine stabile Zwischenstufe erlaubt ist) am aktiven Zentrum des kondensierenden Enzyms stattfinden, an welchem die Substrate schon für die erste Phase der Reaktion gebunden worden waren. Wenn man außerdem bedenkt, daß die Gruppe R groß sein kann und daß sie durch ihre allylische Doppelbindung wenig Bewegungsfreiheit am Ort der Verknüpfung mit dem Isopentenylpyrophosphat hat, dann wird die Schwierigkeit offensichtlich, eine intramolekulare Umlagerung von (34) nach (35) zu postulieren. Dies kann man als Argument für den X-Gruppen-Mechanismus betrachten, da das aktive Zentrum eines Enzyms ein spezifisches Substrat in einer für die Reaktion günstigen spezifischen Konformation wahrscheinlich umso besser binden kann, je weniger das Substrat sich während der enzymatischen Reaktion bewegen muß. Beim X-Gruppen-Mechanismus ist wenig Bewegung notwendig.

4. Cyclisierung von Squalen zu Triterpenoiden

Es ist lehrreich zu untersuchen, ob die Cyclisierung des Squalens zu tetracyclischen und pentacyclischen Triterpenoiden durch X-Gruppen-Mechanismen anstelle der ursprünglichen Konzeption der stereospezifischen intramolekularen Umlagerungen von Carbonium-

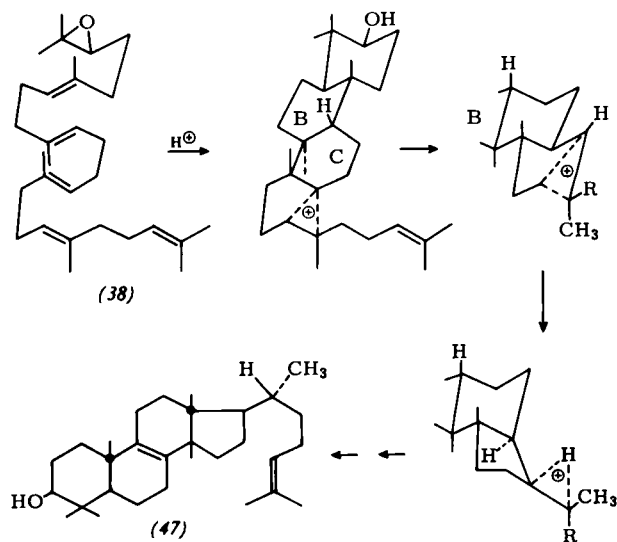
ionen formuliert werden kann. Dies erweist sich als möglich. Die ersten drei Postulate des ursprünglichen Schemas können beibehalten werden: daß all-*trans*-Squalen der Ausgangspunkt ist, daß die Substratmoleküle bevorzugte Konformationen für die Cyclisierung annehmen, und daß (um die dritte Voraussetzung anders auszudrücken), wann immer Elektronen von einem substituierten Kohlenstoffatom abgezogen werden, dieser Mangel von der gegenüberliegenden Seite ausgeglichen wird. Das vierte Postulat, daß zwischen dem Squalen und dem Endprodukt kein stabiles Zwischenprodukt vorkommt, kann für X-Gruppen-Mechanismen nicht akzeptiert werden.

Es ließ sich zwar zeigen, daß Triterpenoide jedes bekannten Typs aus Squalen durch einen „non-stop“-Mechanismus entstehen könnten, doch verlangt diese Vorstellung mehrere miteinander schwer verträgliche Eigenschaften vom Enzym, das die Cyclisierung vermittelt.

Da keine stabile Zwischenstufe erlaubt ist, muß man annehmen, daß der ganze Prozeß an einem einzigen Enzym abläuft. Dieses Enzym muß am gleichen aktiven Zentrum dazu fähig sein, der Squalenkette eine bestimmte Konformation aufzuzwingen und der Kette andererseits eine beträchtliche Bewegungsfreiheit während der Umlagerung zu gestatten; es muß darüberhinaus die intramolekularen, raumfordernden Umlagerungen der Carboniumionen stereochemisch steuern können, ohne chemisch in sie einzugreifen. — Wenn sich im Gegensatz dazu stabile Zwischenstufen bilden, können mehrere Enzyme mitwirken, an deren aktive Zentren weniger hohe Anforderungen gestellt werden müssen.

4.1. Bildung von Lanosterin aus Squalen

Über die Bildung des Lanosterins (47) aus Squalen ist bereits mehr bekannt als über die Bildung der anderen cyclischen Terpenoide. Offensichtlich handelt es sich nicht um eine „non-stop“-Reaktion, da es den Anschein hat, daß Squalenepoxid (38) eine obligate Zwischenstufe ist [14, 15]. Das klassische Cyclisierungs-



Schema 1.

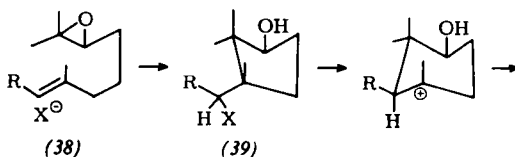
[14] E. J. Corey, W. E. Russey u. P. R. O. de Montellano, J. Amer. chem. Soc. 88, 4750 (1966).

[15] E. E. van Tamelen, J. D. Willett, R. B. Clayton u. K. E. Lord, J. Amer. chem. Soc. 88, 4752 (1966).

prinzip, hier ausgehend von dieser Zwischenstufe, wird in Schema 1 gezeigt.

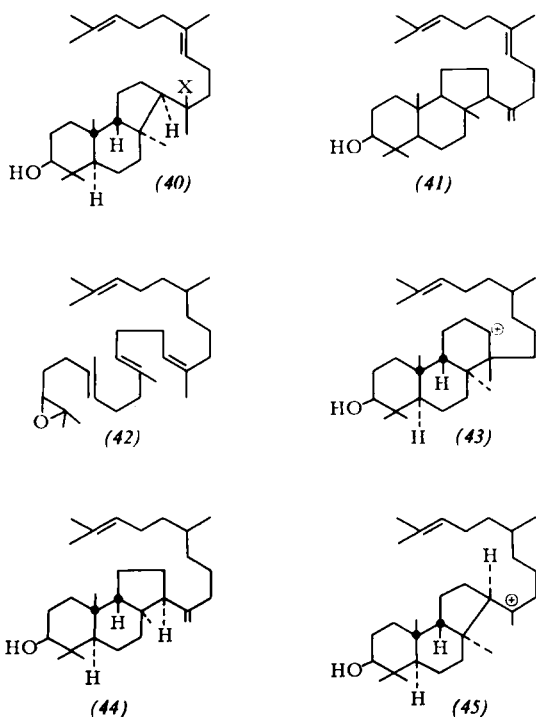
Es soll nun geprüft werden, ob sich diese Ringschlüsse und die darauffolgenden Umlagerungen nicht auch durch einen X-Gruppen-Mechanismus deuten lassen.

Bildung der Ringe A und B: Hier kann nur dann eine externe X-Gruppe einbezogen werden, wenn man postuliert, daß die erste Cyclisierung zu einem Cyclopentanring [(39) im Falle von Ring A] führt und daß dessen Umlagerung zu einem Cyclohexyliumion jeder weiteren Cyclisierung vorausgeht.



Bei dieser Reaktion scheint es keinen Grund dafür zu geben, daß die Ringe A und B nicht in einem konzertierten Prozeß geschlossen werden, da die π -Elektronen der am nächsten stehenden Doppelbindung die Rolle der X-Gruppe übernehmen können und da von vornherein sechsgliedrige Ringe gebildet werden. Überdies ist die Reaktion eine anti-Markownikow-Addition an die Doppelbindung und schon aus diesem Grund energetisch ungünstig.

Bildung von Ring C: Hier führt das Eingreifen einer X-Gruppe zu einer Cyclisierung im Markownikow-Sinne, und die Bildung einer Zwischenstufe (40) wäre begünstigt (obgleich sich auch hier der Cyclopentanring in das energetisch weniger bevorzugte Cyclohexyliumion umwandeln muß, bevor sich weitere Ringe bilden können). Außerdem ist bei der nicht-enzymatischen Cyclisierung des Squalenepoxids tatsächlich das Perhydrocyclopentanaphthalin-Derivat



(41) gefunden worden, ein Anzeichen dafür, daß diese Art der Cyclisierung energetisch günstig ist [16]. Schließlich ließ sich Dihydrosqualenepoxid (42) enzymatisch teilweise zu einer Mischung von Produkten cyclisieren, in der der Alkohol (44) wahrscheinlich überwiegt [17]. Dieser könnte durch Eliminierung von HX aus (40) entstehen.

Um zu entscheiden, ob dieser Befund ein Beweis für eine Zwischenstufe – wie etwa (40) – ist, können wir den „normalen“ Mechanismus betrachten. In diesem wird der sechsgliedrige Ring C direkt durch Wiederholung der konzertierten Cyclisierung, die zu den Ringen A und B führte, gebildet. Dies ist eine anti-Markownikow-Cyclisierung, die aber am Enzym durch eine geeignete Anordnung des Substrats gefördert werden könnte, da die π -Elektronen der benachbarten Doppelbindung für die Vervollständigung der Addition nur im anti-Markownikow-Sinne verfügbar sind. Wenn diese π -Elektronen nicht zur Verfügung stehen, wie im Dihydrosqualenepoxid (42), darf man annehmen, daß bei der Cyclisierung das Kation (43) entsteht. In Abwesenheit einer Elektronendonorguppe sollte es sich in die stabilere tertiäre Form (45) umlagern. Durch Verlust eines Protons könnte (45) sehr wohl das Olefin (44) als Hauptprodukt geben, da ein Wasserstoffatom in der Methylgruppe stets in einer günstigen Stellung für die abschließende Eliminierung steht. Hieraus folgt, daß das Eingreifen einer X-Gruppe in die Bildung des Rings C zwar durchaus möglich, aber nicht unbedingt notwendig ist.

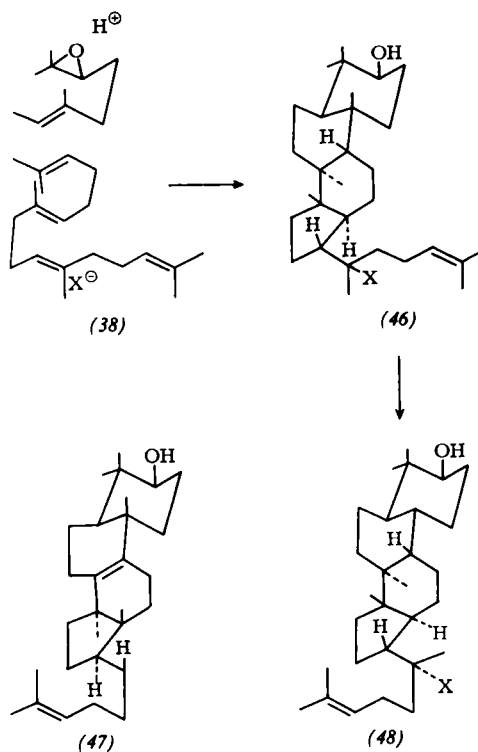
Bildung von Ring D: Dies ist eine Cyclisierung im Markownikow-Sinne, und es gibt keinen Grund anzunehmen, daß sich zuerst ein sechsgliedriger Ring bildet, der sich in einen fünfgliedrigen umlagert. (Die Einwände gegen eine stufenweise Umlagerung nicht-klassischer Kationen wie in Schema 1 sind bereits vorgebracht worden.) Die Alternative dazu ist die Annahme einer Elektronendonorguppe X, die die Addition zu Ende führt. Wenn man voraussetzt, daß die anderen Cyclisierungen konzertiert ablaufen, hat man eine Vielfach-Elektronenverschiebung, die vom Squalenepoxid (38) zur Zwischenstufe (46) führt. Diese Cyclisierung erforderte für keinen Molekülteil eine größere Verschiebung.

Die Umlagerung zu Lanosterin kann direkt vom letzten nicht-klassischen Kation in Schema 1 ausgehen, da die vier wandernden Gruppen und das Proton, das zuletzt eliminiert werden soll, bereits eine günstige *trans-anti-trans-anti-trans*-Anordnung haben. Für eine analoge Umlagerung der Zwischenstufe (46) ist eine vorausgehende Rotation von 120° um die Einfachbindung, die die Seitenkette mit Ring D verbindet, notwendig. Dies ergibt die Konformation (48) und könnte auf einem von drei Wegen erreicht werden:

1. Die Rotation ist auf die Seitenkette beschränkt und findet ohne Ablösung der Stufe (46) vom Enzym, an

[16] E. E. van Tamelen, J. D. Willett, M. Schwartz u. R. Nadeau, J. Amer. chem. Soc. 88, 5937 (1966).

[17] E. E. van Tamelen, K. B. Sharpless, R. Hanzlik, R. B. Clayton, A. L. Burlingame u. P. C. Wszolek, J. Amer. chem. Soc. 89, 7151 (1967).



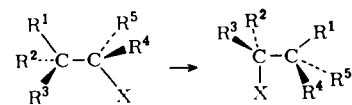
welchem sie gebildet worden war, statt. Zum Beispiel kann die Gruppe X ein Wassermolekül sein, das an eine anionische Stelle des Enzyms gebunden ist; nach der Cyclisierung kann die resultierende OH-Gruppe an eine kationische Stelle wandern, wo ihre die Umlagerung einleitende Abtrennung erleichtert würde. Dies würde verlangen, daß sich auch die übrige Seitenkette um 120° dreht; dieser Teil des Moleküls braucht aber nicht am aktiven Zentrum gebunden zu sein und kann anscheinend erheblich verändert werden, ohne daß dadurch die Cyclisierung beeinträchtigt wird [18].

2. Die Zwischenstufe (46) wird durch ihre X-Gruppe an das Enzym gebunden, während der Rest des Moleküls – vielleicht an einem benachbarten Teil des Enzyms – in der für die Umlagerung günstige Konfiguration gebracht wird.

3. Die Zwischenstufe (46) dissoziiert vom Enzym ab, und die Umlagerung mitsamt der Eliminierung von HX und der Bildung von Lanosterin (47) findet an einem anderen Enzym statt.

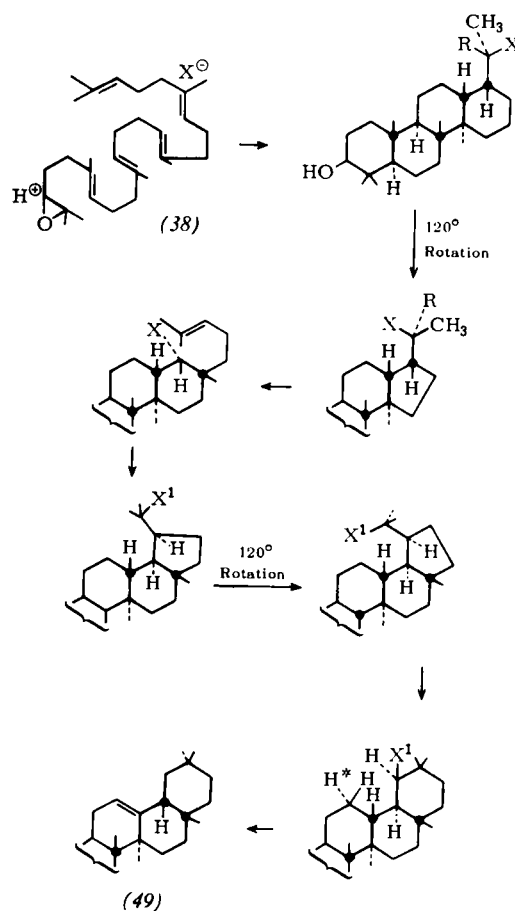
Auch bei pentacyclischen Triterpenoiden können X-Gruppen-Mechanismen Strukturen und Stereochemie erklären; man muß jedoch das Eingreifen zweier X-Gruppen annehmen und eine zweimalige 1,2-Umlagerung postulieren.

[18] E. E. van Tamelen, K. B. Sharpless, J. D. Willett, R. B. Clayton u. A. L. Burlingame, J. Amer. chem. Soc. 89, 3920 (1967).



Einige Beispiele dieses Umlagerungstyps sind bereits bekannt, z. B. die Umlagerung von $5\alpha,6\beta$ -Dibromcholestan und anderer vicinal disubstituierter Steroide [19].

Der postulierte Verlauf der Cyclisierung zu β -Amyrin (49) ist in Schema 2 dargestellt. Selbstverständlich kann man nicht annehmen, daß dieser Prozeß an einem einzigen Enzym stattfindet, und daher müßte man noch wenigstens eine Zwischenstufe zwischen



Schema 2.

Squalenepoxid (38) und β -Amyrin (49) finden, falls der X-Gruppen-Mechanismus richtig ist. Der Nachweis solch einer Zwischenstufe wird auch eine Entscheidung zwischen dem ursprünglich vorgeschlagenen „non-stop“-Mechanismus und dem Stufenmechanismus, den unsere stereochemischen Untersuchungen nahegelegt haben, gestatten.

Eingegangen am 20. Mai 1968 [A 669]

Übersetzt von G. Wagner und Dr. H. F. Ebel, Heidelberg

[19] D. H. Barton u. J. F. King, J. chem. Soc. (London) 1958, 4398.