

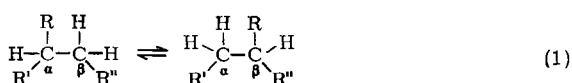
schließlich kristallisiert. Weitere Reinigung durch Sublimation im Hochvakuum bei Raumtemperatur ergibt 10–20 mg rot-schwarze Kristalle der Zusammensetzung $\text{SiJ}_4[\text{Fe}(\text{CO})_3]_2$.

Eingegangen am 16. Mai 1973 [Z 852]

Stereochemie der coenzym- B_{12} -abhängigen Methylmalonyl-CoA-Mutase-Reaktion. Untersuchung mit Äthylmalonyl-CoA^[**]

Von János Rétey und Boleslaw Zagalak^[*]

Alle bisher untersuchten coenzym- B_{12} -abhängigen enzymatischen Umlagerungen verlaufen gemäß Gl. (1).

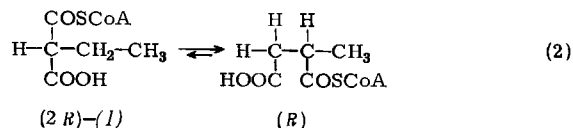


Die an C_α und C_β stattfindende Substitution von R durch H bzw. H durch R wurde in einigen Fällen stereochemisch untersucht, doch konnte immer nur eines der Zentren erfaßt werden. Bei der Glutamat-Mutase-Reaktion ($\text{R}=\text{CHNH}_2\text{—COOH}$, $\text{R}'=\text{COOH}$, $\text{R}''=\text{H}$)^[1] und bei der Propandiol-Dehydrase-Reaktion ($\text{R}=\text{R}''=\text{OH}$, $\text{R}'=\text{CH}_3$)^[2] wurde Inversion, bei der Methylmalonyl-CoA-Mutase-Reaktion ($\text{R}=\text{COSCoA}$, $\text{R}'=\text{COOH}$, $\text{R}''=\text{H}$) Retention am untersuchten Zentrum beobachtet^[3].

In Anbetracht der sonstigen Analogien zwischen diesen Reaktionen^[4] war die Verschiedenheit des sterischen Verlaufs bemerkenswert. Ist der Mechanismus der Methylmalonyl-CoA-Mutase-Reaktion wirklich verschieden von dem der beiden anderen Umlagerungen oder folgt der sterische Verlauf nicht unmittelbar aus dem Mechanismus des Umlagerungsschrittes? Um diese Frage zu beantworten, war es wünschenswert, die sterischen Verhältnisse bei der Methylmalonyl-CoA-Mutase-Reaktion möglichst an beiden Wanderungstermini aufzuklären. Methylmalonyl-CoA selbst eignet sich nicht für diese Untersuchung. Wir fanden nun, daß auch Äthylmalonyl-CoA von der Mutase aus *Propionibacterium shermanii* umgesetzt wird.

(2RS)-Äthylmalonyl-CoA, hergestellt analog (2RS)-Methylmalonyl-CoA^[5], wurde mit gereinigter Methylmalonyl-CoA-Mutase aus *Propionibacterium shermanii*^[6] umgesetzt. Die Reaktion verlief etwa 1000-mal langsamer als mit dem natürlichen Substrat, wie die gaschromatographische Analyse des in die Dimethylester übergeführten Pro-

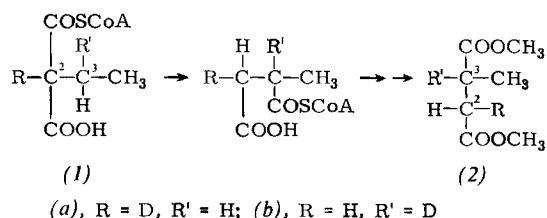
duktgemisches ergab. Gleichzeitige massenspektroskopische Untersuchung zeigte, daß es sich wirklich um ein Gemisch von Äthylmalonsäure- und Methylbernsteinsäure-dimethylestern handelte. Die Hauptmenge des Produktgemisches wurde nach Hydrolyse dünn-schichtchromatographisch getrennt und der Methylbernsteinsäure aufgrund ihres ORD-Spektrums^[7] die (R)-Chiralität zugeordnet. In der wohlbegründeten Annahme, daß das in der Mutase-Reaktion umgesetzte Äthylmalonyl-CoA (1) dieselbe Konfiguration [(2R)] besitzt wie das natürliche Substrat^[3,8], kann man die enzymatische Reaktion mit Gl. (2) beschreiben.



Um weitere Aufschlüsse über den sterischen Verlauf der Reaktion zu erhalten, wurden spezifisch deuterierte Substrate eingesetzt. Zur Unterscheidung der Methin- und Methylenprotonen im Produkt bot sich die ^1H -NMR-Spektroskopie des Methylbernsteinsäure-dimethylesters an: Seine Methin- und Methylenprotonen erscheinen bei 220 MHz als drei getrennte Multipletts [(CDCl_3) , $\delta=2.35$ (q), 2.70 (q) und 2.90 (sex)]. Die Zuteilung der Methylenprotonen zu den beiden Quadruplets bei 2.35 bzw. 2.70 ppm erfolgte mit Hilfe der Spektren von stereospezifisch deuterierten Referenzproben. Behandlung von Methylfumarsäure (Mesaconsäure) bzw. Methylmaleinsäure (Citraconsäure) mit Diimid in Deuteriumoxid gab je eine Probe von racemischer *threo*-[2,3- $^2\text{H}_2$]- bzw. *erythro*-[2,3- $^2\text{H}_2$]-Methylbernsteinsäure, welche anschließend in die Dimethylester übergeführt wurden. Im entsprechenden Bereich des 220-MHz-NMR-Spektrums des *threo*-Dimethylester war nur noch ein Signal bei 2.35 ppm und in demjenigen des *erythro*-Dimethylesters ein Signal bei 2.70 ppm zu beobachten.

Diese Zuordnung der NMR-Signale war Voraussetzung für die Interpretation der folgenden enzymatischen Versuche:

Deuteriertes Äthylmalonyl-CoA (1a) wurde in Deuteriumoxid hergestellt und anschließend im gleichen Lösungsmittel mit einem epimerase-haltigen Methylmalonyl-CoA-Mutase-Präparat aus *Propionibacterium shermanii* umgesetzt. Damit war die Anwesenheit von Deuterium an C-2 sichergestellt. Nach Hydrolyse der Produkte isolierte man Methylbernsteinsäure und Äthylmalonsäure im Verhältnis 11:4, was darauf hinweist, daß die Epimerase auch mit Äthylmalonyl-CoA aktiv ist.



Der Dimethylester der auf diese Weise erhaltenen (R)-Methylbernsteinsäure (2a) (ORD) enthielt 95% monodeuterierte Moleküle (MS). Im 220-MHz-NMR-Spektrum fehlte

[*] Prof. Dr. J. Rétey
Lehrstuhl für Biochemie im Institut
für Organische Chemie der Universität
75 Karlsruhe, Richard-Willstätter-Allee
Priv.-Doz. Dr. B. Zagalak
Laboratorium für Organische Chemie
der Eidgenössischen Technischen Hochschule
Zürich (Schweiz)

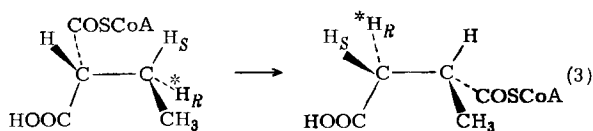
[**] Diese Arbeit wurde durch den Schweizerischen Nationalfonds zur Förderung der Wissenschaftlichen Forschung (Projekt Nr. 3.635.70) unterstützt. – Wir danken Prof. J. W. Cornforth und Dr. G. Ryback, Milstead Laboratory of Chemical Enzymology, Sittingbourne (England) für die Aufnahme der ORD-Kurven, Dr. J. Völlmin, Kinderspital Zürich, für die gekoppelte gaschromatographisch-massenspektroskopische Analyse, Priv.-Doz. Dr. J. Seibl, Laboratorium für organische Chemie der ETH Zürich für die Massenspektren und Prof. R. Ernst und Herrn A. Frei, Laboratorium für physikalische Chemie der ETH Zürich, für die Aufnahme der 220-MHz-NMR-Spektren.

das Signal bei 2.70 ppm, so daß es sich um (2*R*, 3*S*) – [3-²H]-Methylbernsteinsäure handeln mußte.

Aus diesem Ergebnis folgt, daß die Substitution an C-2 des Äthylmalonyl-CoA unter Retention verläuft.

Um das stereochemische Bild abzurunden, benötigte man noch eine in der Methylengruppe stereospezifisch deuterierte Äthylmalonyl-CoA-Probe. Ausgehend von (R)-[1-²H]-Äthanol^[9], welches enzymatisch erhalten wurde^[10], synthetisierte man (3*S*)-[3-²H]-Äthylmalonsäure durch Alkylierung von Diäthylmalonat mit dem entsprechenden Äthyltosylat. Die bei der Substitution erwartete Inversion der Konfiguration wurde durch Decarboxylierung der deuterierten Äthylmalonsäure zu (3*S*)-[3-²H]-Buttersäure und Aufnahme von deren ORD-Kurve^[11] bestätigt.

Das Mono-Coenzym-A-Derivat (1*b*) der so hergestellten und charakterisierten (3*S*)-[3-²H]-Äthylmalonsäure wurde mit Methylmalonyl-CoA-Mutase in (2*R*)-2-Methylsuccinyl-CoA umgewandelt, welches nach Hydrolyse und Behandlung der Säurekomponente mit Diazomethan als Dimethylester (2*b*) massen- und NMR-spektroskopisch untersucht wurde. Das Massenspektrum bestätigte eine vollständige Beibehaltung des Wasserstoffisotops im Laufe der enzymatischen Umsetzung, während dessen Stellung in der Methinposition aus dem NMR-Spektrum hervorging.



Daraus folgt, daß von der Methylmalonyl-CoA-Mutase aus *Propionibacterium shermanii* das 3-²H-Atom des Äthylmalonyl-CoA beansprucht wird und die Substitution auch an C-3 unter Retention stattfindet [Gl. (3)].

Eingegangen am 22. Mai 1973 [Z 855]

[1] M. Sprecher, R. L. Switzer u. D. B. Sprinson, J. Biol. Chem. 241, 864 (1966).

[2] J. Rétey, A. Umani-Ronchi u. D. Arigoni, Experientia 22, 72 (1966); B. Zagalak, P. A. Frey, G. L. Karabatsos u. R. H. Abeles, J. Biol. Chem. 241, 3028 (1966).

[3] M. Sprecher, M. J. Clark u. D. B. Sprinson, Biochem. Biophys. Res. Commun. 15, 581 (1964); J. Rétey, zitiert durch D. Arigoni u. E. L. Eliel, Top. Stereochem. 4, 203 (1969).

[4] P. A. Frey u. R. H. Abeles, J. Biol. Chem. 241, 2732 (1966); J. Rétey u. D. Arigoni, Experientia 22, 783 (1966); G. J. Cardinale u. R. H. Abeles, Biochim. Biophys. Acta 132, 517 (1967); H. A. Barker, Biochem. J. 105, 1 (1967).

[5] P. Overath, E. R. Stadtman, G. M. Kellerman u. F. Lynen, Biochem. Z. 336, 77 (1962).

[6] R. W. Kellenmeyer, S. H. G. Allen, R. Stjernholm u. H. G. Wood, J. Biol. Chem. 239, 2562 (1964); R. W. Kellenmeyer u. H. G. Wood, Methods in Enzymol. 13, 207 (1969); B. Zagalak u. J. Rétey, unveröffentlicht.

[7] A. Fredga, J. P. Jennings, W. Klyne, P. M. Scopes, B. Sjöberg u. S. Sjöberg, J. Chem. Soc. 1965, 3928.

[8] J. Rétey u. F. Lynen, Biochem. Biophys. Res. Commun. 16, 358 (1964); Biochem. Z. 342, 256 (1965).

[9] R. U. Lemieux u. J. Howard, Can. J. Chem. 41, 308 (1963); H. Weber, J. Seibl u. D. Arigoni, Helv. Chim. Acta 49, 741 (1966).

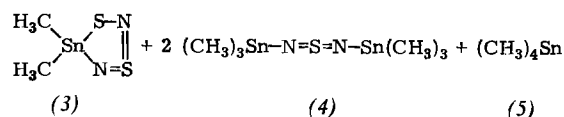
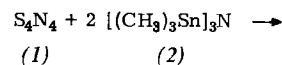
[10] H. Günther, F. Biller, M. Kellner u. H. Simon, Angew. Chem. 85, 141 (1973); Angew. Chem. internat. Edit. 12, 146 (1973); H. Günther, M. A. Alizade, M. Kellner, F. Biller u. H. Simon, Z. Naturforsch., im Druck. Wir danken Prof. H. Simon für die Überlassung des Manuskriptes vor der Veröffentlichung.

[11] L. Bücklers, A. Umani-Ronchi, J. Rétey u. D. Arigoni, Experientia 26, 931 (1970).

(CH₃)₂SnS₂N₂ – ein fünfgliedriger Zinn-Schwefel-Stickstoff-Ring^[**]

Von Herbert W. Roesky und Hartmut Wiezer^[*]

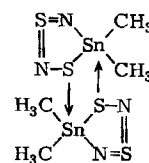
Tetraschwefeltetranitrid^[1] (1) reagiert mit Tris(trimethylstannyl)amin (2) im Molverhältnis 1:2 nahezu quantitativ zu 5,5-Dimethyl-1,3λ⁴,2,4,5-dithiadiazastannol (3), N,N'-Bis(trimethylstannyl)schwefeldiimid^[2] (4) und Tetramethylstannan (5).



Nach IR-Untersuchungen bilden sich aus (1) und (2) zunächst jedoch nur (4) und Schwefel. Bei Vakuumsublimation der Primärprodukte (45°C/ca. 0.01 Torr) entstehen daraus (3) und (5). Nucleophiler Angriff des Schwefels an einem Sn-Atom von (4) führt dabei unter Wanderung einer Methylgruppe zum Ringschluß.

Die bei Raumtemperatur feste, gelbe Verbindung (3) zersetzt sich bei 198°C und läßt sich aus CH₂Cl₂ umkristallisieren. Sie wurde durch Elementaranalyse und durch das Massenspektrum charakterisiert: m/e=242 Molekül-Ion (rel. Int. 58%), 227 M – CH₃, (100), 212 M – 2CH₃ (5), 196 (CH₃)₂SnSN (4), 181 CH₃SnSN (16), 166 SnSN (12), 135 CH₃Sn (33), 120 Sn (23), 46 SN (42); die zinnhaltigen Fragmente sind nur mit ¹²⁰Sn angegeben.

Die kryoskopische Molekulargewichtsbestimmung in Benzol (gef. 489) und die osmometrische in Chloroform (gef. 479) ergeben – im Gegensatz zur Gasphase – für (3) in Lösung die doppelte relative Molekülmasse, woraus wir auf eine Dimeren-Struktur entsprechend



schließen. Nach dem ¹H-NMR-Spektrum bei Raumtemperatur (TMS ext.) sind die Methylgruppen äquivalent: δ = –0.95 ppm; J_{H–¹¹⁷Sn} = 66.3, J_{H–¹¹⁹Sn} = 69.3 Hz. Das IR-Spektrum (KBr-Preßling) zeigt Absorptionen bei 2960s, 2880s, 1393s, 1186s, 1064st, 1034sst, 901st, 778st, 737s, 702st cm^{–1}.

Arbeitsvorschrift:

Zur Suspension von 2.1 g (1.14 mmol) S₄N₄ in 150 ml CH₂Cl₂ läßt man bei –20°C 11.5 g (2.28 mmol)

[*] Prof. Dr. H. W. Roesky und Dipl.-Chem. H. Wiezer
Anorganisch-chemisches Institut I der Universität
6 Frankfurt, Robert-Mayer-Straße 7–9

[**] Diese Arbeit wurde vom Fonds der Chemischen Industrie unterstützt.