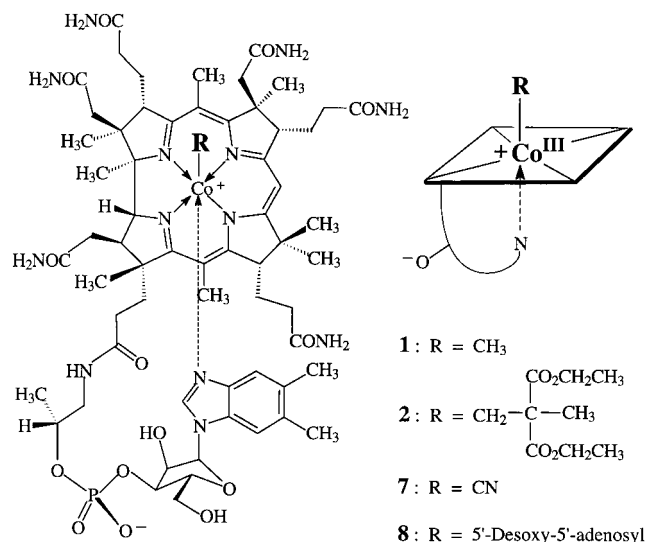


Methylcorrinoide methylieren Radikale – Ihr zweiter biologischer Wirkungsmechanismus?*

Hervé Mosimann und Bernhard Kräutler*

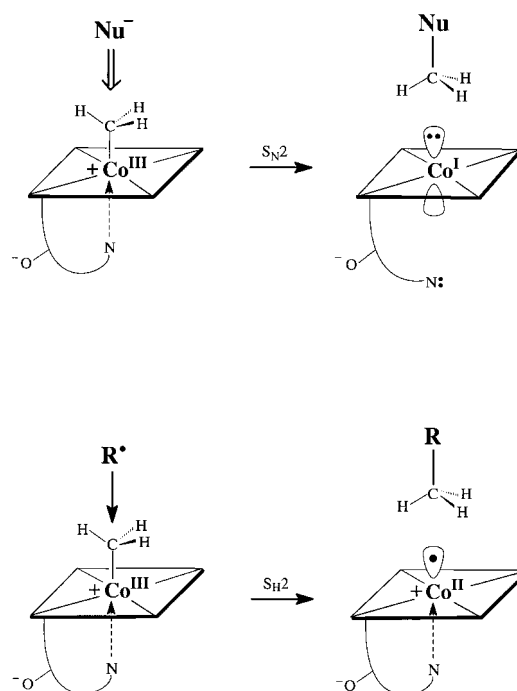
Professor Rolf Thauer zum 60. Geburtstag gewidmet

Das Vitamin-B₁₂-Derivat Methylcobalamin **1** und verwandte Methylcorrinoide sind fundamentale wichtige metallorganische Methylierungsfaktoren.^[1] In den bekannten Enzymreaktionen von **1** methyliert es durchweg Nucleophile in



nucleophilen Substitutionen (Schema 1, oben), welche auf den heterolytischen Reaktivitäten der metallorganischen Bindung der Methyl-Co^{III}- und der Co^I-Corrinoide beruhen.^[2, 3] Eingehenden Untersuchungen zufolge finden die Methyl-Transferreaktionen der B₁₂-abhängigen Methioninsynthese über zwei nucleophile Substitutionsschritte (und damit unter Netto-Retention der Konfiguration) statt, wobei aus Homocystein und N⁵-Methyltetrahydrofolat Methionin und Tetrahydrofolat gebildet werden.^[4]

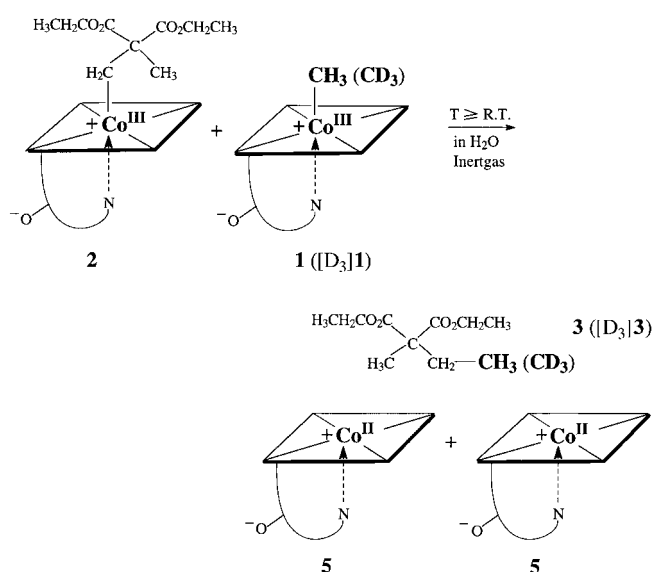
In den letzten Jahren haben biosynthetische Untersuchungen bei archaebakteriellen Lipiden^[5a] und den Antibiotika Botromycin,^[5b] Thienamycin^[6a] und Thioestrepton^[6b] Hinweise auf (bio)chemisch präzedenzlose Methylierungen (und andere Alkylierungen) an gesättigten, unaktivierten Kohlenstoffpositionen ergeben. Bei diesen Methylierungen werden die aus Methionin stammenden Methylgruppen intakt und unter Netto-Retention der Konfiguration eingebaut.^[5, 6] Arigoni und Mitarbeiter haben dafür einen radikalischen Methylierungsmechanismus mit Methylcorrin-Cofaktoren in Betracht gezogen.^[5a] Wir berichten hier über Experimente,



Schema 1.

welche erstmals die (sehr effiziente!) Methylierung von Alkylradikalen durch **1** nachweisen (siehe Schema 1, unten).

Erhitzen einer sauerstofffreien, wässrigen Lösung von 2'-Bis(ethoxycarbonyl)propylcobalamin **2**^[7] und Methylcobalamin **1**^[1, 8] (**1**:**2** = 1.6:1) auf 70 °C (ca. fünf Stunden, pH 7, Lichtausschluss) führte zur vollständigen Zersetzung von **2**. Nach Luftoxidation des Reaktionsgemisches im Dunkeln und unter Zugabe von Kaliumcyanid wurden die organischen Zersetzungsprodukte nach Extraktion mit Deuteriochloroform^[9] analysiert. Das 200-MHz-¹H-NMR-Spektrum zeigte Signale eines 4.6:1-Gemisches aus 2-Ethyl-2-methylmalonsäurediethylester **3** und 2,2-Dimethylmalonsäurediethylester **4**, entsprechend einer Gesamtausbeute von ca. 70 % (Schema 2). Ein analoges Experiment, in welchem statt **1** Trideu-



Schema 2.

[*] Prof. Dr. B. Kräutler, Dr. H. Mosimann
 Institut für Organische Chemie der Universität
 Innrain 52a, 6020 Innsbruck (Österreich)
 Fax: (+43) 512-507-2892
 E-mail: bernhard.kraeutler@uibk.ac.at

[**] Diese Arbeit wurde vom Schweizerischen Nationalfonds (H.M.) und vom Fonds zur Förderung wissenschaftlicher Forschung (FWF-Projekt-Nr. 12639) gefördert. Wir danken Prof. D. Arigoni für das Projekt anregende Diskussionen.

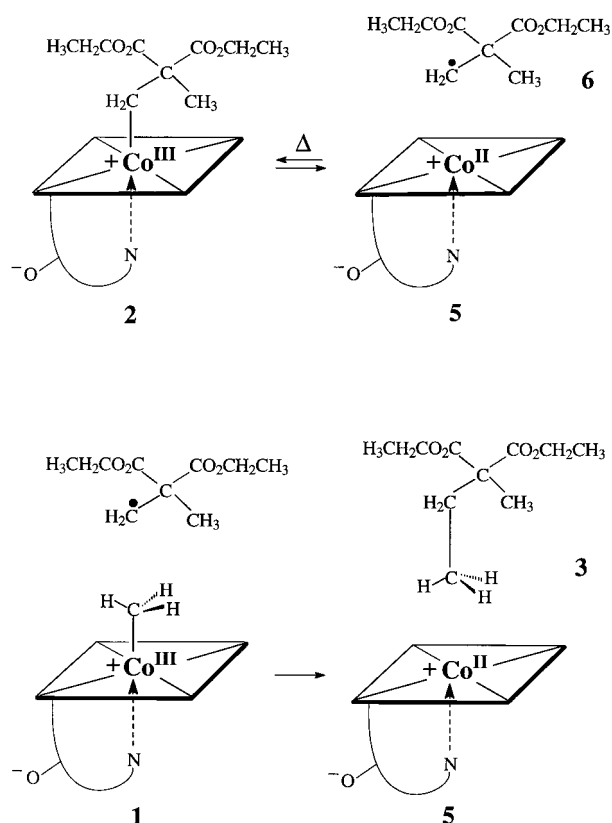
teromethylcobalamin [D_3]1 eingesetzt wurde, lieferte [D_3]3 und 4 (4.7:1-Gemisch, ca. 70 % Ausbeute, Deuterierungsgrad von [D_3]3: 95 ± 5 % laut NMR). Bei Raumtemperatur setzt sich 2 in einer sauerstofffreien, wässrigen Lösung von 1 selbst nach 17 Stunden nur zu etwa 30 % und unter Bildung eines ca. 3:1-Gemisches aus 3 und 4 um.

Das metallorganische Vitamin- B_{12} -Derivat 2 ist eine thermisch labile Verbindung, die selbst bei Raumtemperatur rasch unter Homolyse zu Cob(II)alamin 5 und zum 2-Bisethoxycarbonylpropyl-Radikal 6 zerfällt.^[7, 10] In qualitativer Übereinstimmung mit früheren Experimenten^[7] beträgt die effektive Halbwertszeit der thermischen Zersetzung von 2 in wässriger, sauerstoffgesättigter, pH-neutraler Lösung bei 27 °C ca. 50 min. In strikt sauerstofffreier, wässriger Lösung ist 2 (25 °C, pH 7) selbst nach ca. 20 Stunden nahezu unzersetzt (UV/Vis). In einem analogen Experiment bei 70 °C wird 2 nach ca. sieben Stunden vollständig zu Co^{II} -Corrinen (>90 %, UV/Vis) und 2,2-Dimethylmalonsäurediethylester (ca. 40 %) zersetzt.^[11] Wässrige Lösungen von Methylcobalamin 1 sind (in Abwesenheit von Licht und von Nucleophilen) bei Raumtemperatur fast unbegrenzt stabil. In Gegenwart des Radikalfängers 2,2,6,6-Tetramethylpiperidinyl-1-oxyl (TEMPO) zersetzt sich 1 selbst bei 130 °C (in Ethylenglycol) nur mit einer effektiven Halbwertszeit von ca. vier Stunden.^[12] Bei der Thermolyse von 1 bei ca. 200 °C entstehen Methan und Ethan (ca. 1:1).^[13]

Unsere experimentellen Resultate sind darauf zurückzuführen, dass bei der Thermolyse von 2 in Gegenwart von 1 das thermolabile 2 zunächst zum Co^{II} -Corrin 5 und zum 2-Bisethoxycarbonylpropyl-Radikal 6 zerfällt und die Abstraktion der Cobalt-gebundenen Methylgruppe von 1 durch das Radikal 6 dann zum organischen Methylierungsprodukt 3 führt (Schema 3).

Die vorgeschlagene Abstraktion der Cobalt-gebundenen Methylgruppe von 1 durch ein primäres Alkylradikal (6) lässt sich auf Grund von Abschätzungen der homolytischen Bindungsdissoziationsenergien (BDE) als sehr exothermer Reaktionsschritt charakterisieren ($\Delta H^\circ \approx -48 \text{ kcal mol}^{-1}$).^[14] Nach unseren Experimenten konkurriert die Abstraktion der metallorganisch gebundenen Methylgruppe von 1 durch 6 erfolgreich mit der Rekombination von 6 mit dem Co^{II} -Corrin 5 zu 2 (ebenfalls deutlich exotherme und vermutlich nahezu diffusionskontrollierte Reaktion^[16]). Wir führen die Bildung von 3 aus 1 und 2 auf eine Substitution des Cobaltcorrin-Teils von 1 durch das Alkylradikal 6 zurück. Derartige intermolekulare homolytische Substitutionen an einem direkt metallgebundenen gesättigten Kohlenstoffatom durch ein (kurzlebiges organisches) Radikal waren bislang unbekannt,^[17] wohl aber solche mit (persistenten) Metall-Radikaloiden (wie Co^I -Komplexen etc.^[18, 19]). Das Auftreten ähnlicher intramolekularer Reaktionsmechanismen^[17, 18] wurde früher für die Bildung von (substituierten) Cycloalkanen aus metallorganisch überbrückten B_{12} -Dimeren,^[20] wie auch aus Hexenyl-Cobaloximen^[18] vorgeschlagen. In den näher charakterisierten Fällen wurde festgestellt, dass die homolytischen Substitutionsreaktionen unter stereochemischer Inversion verlaufen.^[17, 18]

Dank seiner charakteristisch geringen homolytischen Co-C-BDE^[12] hat 1 gegenüber Radikal(oid)en die Reaktivität



Schema 3.

eines „latent“ (persistenten) Methylradikals^[19, 21] und sollte ähnlich Coenzym B_{12} 8 (der „reversibel wirkenden Quelle eines Alkylradikals“^[23]) als Partner in biologischen Radikalreaktionen in Betracht gezogen werden. Der enzymatische Methylgruppentransfer von 1 auf ein Kohlenstoff-zentriertes Radikal sollte (bei entsprechender Isotopensubstitution) unter Inversion der Methylgruppenkonfiguration ablaufen (also unter Netto-Retention der Konfiguration bei Methionin). In den genannten Fällen ungewöhnlicher biosynthetischer C-Methylierungen ist die Methylgruppenkonfiguration im Methylierungsprodukt dieselbe wie in der Biosynthesestufe Methionin.^[5, 6] Unsere Untersuchungen unterstützen damit die vorgeschlagene Beteiligung von Methylcorrinoiden in radikalischen Kohlenstoff-Methylierungen bei Biosynthesen.^[5]

Die metallorganische Reaktivitätscharakteristik von Methylcobalamin 1, einer biologisch wichtigen Verbindung zur Methylierung von Nucleophilen,^[2-4] ist also um jene eines effizienten Methylierungsmittels von Radikalen zu erweitern.^[24] Methylcorrinoiden sind damit auch als „latente Methylradikale“ aufzufassen und sind geeignete Biosynthese-Coenzyme für homolytische Methylierungen.

Experimentelles

Trideuteromethylcob(III)alamin [D_3]1: Herstellung nach Tollinger et al.^[8] unter Verwendung von Trideuteromethyljodid statt [^{13}C]Methyljodid. Deuterierungsgrad 98 ± 5 % laut 1H -NMR und FAB-MS.

2'-Bis(ethoxycarbonyl)propylcobalamin 2: Unter Luftausschluss (Handschuhkasten, <10 ppm O_2) wurde Aquocobalaminchlorid (200 mg, 0.145 mmol) in 5 mL wässriger 0.1M $LiClO_4$ -Lösung an einer Quecksil-

berielektrode zu Cob(II)amin (UV/Vis) reduziert (-1.1 V vs. 0.1 N Kalmel-Referenzelektrode (0.1 NCE), Ladungsverbrauch: 2.06 F mol $^{-1}$). Unter Lichtausschluss wurden eine 0.5 M wässrige Lösung von *p*-Toluolsulfonsäure (0.520 mL) und dann 2-Brommethyl-2-methylmalonsäurediethylester^[25a] (0.178 mL, 0.867 mmol) in 1 mL Methanol zugegeben. Die Elektrolyse wurde bei -1.0 V vs. 0.1 NCE 2.5 h fortgesetzt. Die Lösungsmittel wurden dann bei Raumtemperatur abgezogen. Der Rückstand wurde in wenig Methanol gelöst, mit Aceton gefällt, mit Aceton gewaschen und getrocknet: 231 mg **2-H**⁺ (als Tosylat; 94% Ausbeute) als orange-farbener Festkörper (enthält noch 5% Aquocobalamin). UV/Vis (H_2O , pH 2): λ_{max} ($lg \epsilon$) = 451 s (3.76), 421 (3.78), 296 s (4.17), 285 (4.23), 266 (4.30); 1H -NMR (500 MHz, D_2O , pD 2): δ = 9.10 (s, $1H$), 7.55 (d, $2H$), 7.41 (s, $1H$), 7.35 (s, $1H$), 7.22 (d, $2H$), 7.04 (s, $1H$), 6.40 (d, $1H$), 4.82 (dd, $1H$), 4.66 (dd, $1H$), 4.62 (m, $1H$), 4.58 (d, $1H$), 4.21 – 4.15 (m, $1H$), 4.07 (d, $1H$), 3.92 – 3.85 (m, $2H$), 3.80 – 3.72 (m, $4H$), 3.64 (dd, $1H$), 3.43 (d, $1H$), 3.18 (dd, $1H$), 3.06 (dd, $1H$), 2.77 – 2.64 (m, $3H$), 2.45 – 2.08 (m, $10H$), 2.27 (s, $6H$), 2.24 (s, $3H$), 2.08 (s, $3H$), 2.04 (s, $3H$), 2.04 – 1.89 (m, $5H$), 1.80 – 1.60 (m, $4H$), 1.75 (s, $3H$), 1.53 (s, $3H$), 1.40 (s, $3H$), 1.30 (s, $3H$), 1.29 (d, $1H$), 1.15 (s, $3H$), 1.03 (d, $3H$), 0.95 (t, $3H$), 0.86 (t, $3H$), 0.54 (d, $1H$), 0.50 (s, $3H$), -0.07 (s, $3H$); FAB-MS (*o*-Nitrobenzylalkohol(NOBA)-Matrix): m/z (%): $1518.5/1517.5/1516.5$ ($17/22/28$) [$M+H^+$], $1331.5/1330.5/1329.4$ ($38/76/100$) [$M+H^+ - C_9H_{15}O_4$].

Thermolyse von **2** in Gegenwart von **1**: **2-H**⁺ (30.0 mg 17% Wasser, 0.0135 mmol) wurde in 3 mL 10 mM Salzsäure gelöst. Das Lösungsmittel wurde abgezogen und der Rückstand getrocknet. Analog wurde **1** (29.0 mg, 0.0216 mmol) in 5 mL Wasser gelöst und getrocknet. Unter Licht- und Luftausschluss (Handschuhkasten, <10 ppm O_2) wurden beide Verbindungen in 4 mL 0.1 M Phosphatpuffer (pH 7) gelöst. Die sauerstofffreie Mischung wurde dann unter Lichtausschluss 5 h auf $70^\circ C$ erhitzt, dann wurden 2 mL sauerstoffgesättigtes Wasser und 0.054 mL 0.5 M wässrige KCN-Lösung zugegeben und es wurde dreimal mit je 0.6 mL $CDCl_3$ extrahiert. Der Extrakt wurde durch trockene Watte filtriert. 200 -MHz- 1H -NMR-spektroskopisch identifizierte man ein Gemisch ($4.6:1$) aus **3**^[25b] und **4**^[25c]. Die Gesamtausbeute (ca. 70%) wurde durch Vergleich mit dem Restsignal des $CHCl_3$ in $CDCl_3$ (gegen Anthracen standardisiert) bestimmt. **3**: 1H -NMR ($CDCl_3$, 200 MHz):^[25b] δ = 4.19 (q, J = 7.1 , OEt), 1.92 (q, J = 7.5 , Et-C(2)), 1.39 (s, CH_3 -C(2)), 1.25 (t, J = 7.1 , OEt), 0.88 (t, J = 7.5 , Et-C(2)).

Thermolyse von **2** in Gegenwart von $[D_3]1$: Mit $[D_3]1$ statt **1** entstanden aus **2** 2-(2,2,2-Trideuteroethyl)-2-methylmalonsäurediethylester $[D_3]3$ und **4** ($4.7:1$, 71%). $[D_3]3$: 1H -NMR ($CDCl_3$, 200 MHz): 4.19 (q, J = 7.1 , OEt); 1.89 (br. s, Et-C(2)); 1.39 (s, CH_3 -C(2)); 1.25 (t, J = 7.1 , OEt).

Eingegangen am 25. Juni 1999 [Z13632]

- [1] W. Friedrich, *Vitamin B₁₂ und verwandte Corrinoiden*, Vol. III/2 der Reihe *Fermente, Hormone und Vitamine* (Hrsg.: R. Ammon, W. Dirscherl), Thieme, Stuttgart, **1975**.
- [2] J. M. Pratt, *Inorganic Chemistry of Vitamin B₁₂*, Academic Press, New York, **1972**.
- [3] B. Kräutler in *Vitamin B₁₂ and B₁₂ Proteins* (Hrsg.: B. Kräutler, D. Arigoni, B. T. Golding), WILEY-VCH, Weinheim, **1998**, S. 3–43.
- [4] a) C. L. Drennan, S. Huang, J. T. Drummond, R. G. Matthews, M. L. Ludwig, *Science* **1994**, *266*, 1669–1674; b) M. L. Ludwig, R. G. Matthews, *Annu. Rev. Biochem.* **1997**, *66*, 269–313.
- [5] a) P. Galliker, O. Gräther, M. Rümmler, W. Fitz, D. Arigoni in *Vitamin B₁₂ and B₁₂ Proteins* (Hrsg.: B. Kräutler, D. Arigoni, B. T. Golding), WILEY-VCH, Weinheim, **1998**, S. 447–458; b) L. Kellenberger, D. Holmes, B. Martinoni, D. Arigoni, *Chimia* **1996**, *50*, 344.
- [6] a) D. R. Houck, K. Kobayashi, J. M. Williamson, H. G. Floss, *J. Am. Chem. Soc.* **1986**, *108*, 5365–5366; b) P. Zhou, D. O'Hagan, U. Mocek, Z. Zeng, L.-D. Yuen, T. Frenzel, C. J. Unkefer, J. M. Beale, H. G. Floss, *J. Am. Chem. Soc.* **1989**, *111*, 7274–7276.
- [7] J. H. Grate, J. W. Grate, G. N. Schrauzer, *J. Am. Chem. Soc.* **1982**, *104*, 1588–1594.
- [8] M. Tollinger, T. Dérier, R. Konrat, B. Kräutler, *J. Mol. Catal. A* **1997**, *116*, 147–155.
- [9] Die wässrige Fraktion eines analogen Experimentes enthielt Vitamin B₁₂ **7** und **1** im Verhältnis $1.7:1.0$ (1H -NMR).

- [10] In sauren Lösungen wird **2** an der Nucleotidbase zu **2-H**⁺ protoniert, welches eine über 100 -mal geringere Zersetzungstendenz aufweist als **2**.
- [11] Es gab aber keine NMR-spektroskopischen Hinweise auf Folgeprodukte einer Umlagerung von **6** zum Methylsuccinyl-Radikal (Untersuchungen über **6** und verwandte Radikale in Lösung: S. Wollowitz, J. Halpern, *J. Am. Chem. Soc.* **1988**, *110*, 3112–3120).
- [12] B. D. Martin, R. G. Finke, *J. Am. Chem. Soc.* **1992**, *114*, 585–592.
- [13] G. N. Schrauzer, J. W. Sibert, R. J. Windgassen, *J. Am. Chem. Soc.* **1968**, *90*, 6681–6688.
- [14] Co-C-BDE(**1**) ≈ 37 kcal mol $^{-1}$; ^{12}C -C-BDE(**3**) ≈ 85 kcal mol $^{-1}$.^[15]
- [15] A. J. Gordon, R. A. Ford in *The Chemist's Companion*, Wiley, New York, **1972**.
- [16] J. F. Endicott, G. J. Ferraudi, *J. Am. Chem. Soc.* **1977**, *99*, 243–245.
- [17] J. C. Walton, *Acc. Chem. Res.* **1998**, *31*, 99–107.
- [18] M. D. Johnson, *Acc. Chem. Res.* **1983**, *16*, 343–349.
- [19] B. Kräutler, *Helv. Chim. Acta* **1987**, *70*, 1268–1278.
- [20] B. Kräutler, T. Dérier, P. Liu, W. Mühlecker, M. Puchberger, K. Gruber, C. Kratky, *Angew. Chem.* **1995**, *107*, 66–69; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1995**, *34*, 84–86.
- [21] Die Befunde, dass Ethan das Hauptprodukt der Photolyse^[13] und der reduktiven Elektrolyse^[22] von **1** ist, wurden mit einer Dimerisierung von Methylradikalen erklärt.^[13, 22] Eine direkte Reaktion von Methylradikalen mit dem intakten Methylcorrinoid **1** ist nach unseren Ergebnissen (ebenfalls) in Betracht zu ziehen.
- [22] K. A. Robinson, E. Itabashi, H. B. Mark, Jr., *Inorg. Chem.* **1982**, *21*, 3571–3573.
- [23] J. Halpern, *Science* **1985**, *227*, 869–875.
- [24] Komplementär dazu sind Co^{II}-Corrinoiden wie **5** (die biologisch wichtige Radikalfänger sind^[3]) Verbindungen, die reaktive (radikalische) Methylierungspartner homolytisch demethylieren.^[8, 19]
- [25] a) Y. Murakami, Y. Hisaeda, T. Ozaki, T. Tashiro, T. Ohno, Y. Tani, Y. Matsuda, *Bull. Chem. Soc. Jpn.* **1987**, *60*, 311–324; b) F. Björkling, J. Boutelje, S. Gatenbeck, K. Hult, T. Norin, P. Szmulik, *Tetrahedron* **1985**, *41*, 1347–1352; c) L. Kiriazis, E. Kalatzis, N. E. Alexandrou, *J. Heterocycl. Chem.* **1989**, *26*, 155–160.

Inter-/intramolekulare Domino-Carbolithierung: eine vielseitige Synthesemethode für Cyclopentane**

Xudong Wei und Richard J. K. Taylor*

Die Carbolithierung von Alkenen und Alkinen ist für die Synthese besonders nützlich, da neben einer neuen C-C-Bindung auch eine lithiumorganische Verbindung gebildet wird, die direkt oder nach Transmetallierung weiter umgesetzt werden kann.^[1–4] Bisher blieben derartige Reaktionen zwar im Wesentlichen auf Alkene und Alkine beschränkt, die durch Konjugation mit einer Carbonylgruppe oder ähnlichen elektronenziehenden Gruppen aktiviert sind, aber für diese Substrate sind zahlreiche Beispiele beschrieben. Mit der Entwicklung verbesserter Verfahren zur Herstellung lithiumorganischer Reagentien^[5] gab es in den letzten Jahren auch bei der Carbolithierung nichtaktivierter Alkene und Alkine

[*] Prof. R. J. K. Taylor, Dr. X. Wei
Department of Chemistry
University of York
Heslington, York, YO105DD (Großbritannien)
Fax: (+44) 1904-434-523
E-mail: rjkt1@york.ac.uk

[**] Wir danken dem EPSRC für ein Forschungsstipendium (X.W.).