

- [11] Die Rezeptoren neigen nur sehr schwach zur Selbstaggregation. Aus Verdünnungsreihen wurden mit dem Programm Specfit die Dimerisierungskonstanten ermittelt. Diese Konstanten wurden im Modell für die Anpassung zur Ermittlung der Bindungskonstanten berücksichtigt. Der Einfachheit halber wurde eine Aggregation zu höheren Aggregaten nicht berücksichtigt. Nimmt man Trimere mit in das Modell auf, so ändert das nichts an der sehr guten Übereinstimmung zwischen der gemessenen und der rechnerisch angepassten Titrationskurve.
- [12] Synthese der Substrate: **8**: R. C. Huston, W. F. Allen, *J. Am. Chem. Soc.* **1934**, 56, 1356–1358; **9**: E. Fischer, *Ann.* **1882**, 215, 253–320.
- [13] Röntgenstrukturanalyse des Komplexes aus **2** und Koffein: $C_{74}H_{100}N_{10}O_{11} \cdot 3.5 CH_3OH$, $M_r = 1417.79$, leicht gelber Kristall, $0.5 \times 0.35 \times 0.25$ mm, $a = 13.596(1)$, $b = 13.794(1)$, $c = 22.979(1)$ Å, $\alpha = 80.09(1)$, $\beta = 82.40(1)$, $\gamma = 67.41(1)^\circ$, $V = 3909.2(4)$ Å³, $\rho_{\text{ber.}} = 1.204$ g cm⁻³, $\mu = 0.83$ cm⁻¹, Absorptionskorrektur mit dem Programm SORTAV ($0.971 \leq T \leq 0.992$), $Z = 2$, triklin, Raumgruppe $P\bar{1}$ (Nr. 2), $\lambda = 0.71073$ Å, $T = 198$ K, ω - und φ -Scans, 22410 gemessene Reflexe ($\pm h, \pm k, \pm l$), $[(\sin\theta)/\lambda] = 0.59$ Å⁻¹, 13700 unabhängige ($R_{\text{int}} = 0.033$) und 8862 beobachtete Reflexe [$I \geq 2\sigma(I)$], 911 verfeinerte Parameter, $R = 0.094$, $wR^2 = 0.267$, max./min. Restelektronendichte 1.09/–0.69 e Å⁻³ in der Nähe der Solvatmoleküle, Fehlordnung in diesen mit geometrischen Constraints verfeinert, Wasserstoffatome an den Stickstoffatomen aus der Differenz-Fourier-Rechnung, die übrigen geometrisch berechnet und alle als reitende Atome verfeinert. Die kristallographischen Daten (ohne Strukturaktoren) der in dieser Veröffentlichung beschriebenen Struktur wurden als „supplementary publication no. CCDC-139021“ beim Cambridge Crystallographic Data Centre hinterlegt. Kopien der Daten können kostenlos bei folgender Adresse in Großbritannien angefordert werden: CCDC, 12 Union Road, Cambridge CB2 1EZ (Fax: (+44) 1223-336-033; E-mail: deposit@ccdc.cam.ac.uk).
- [14] Wasserstoffbrücken zwischen den distalen N-H-Funktionen und dem Koffeinmolekül: C2-O...H-N: 1.95 Å, 0.96 Å, 171°; C6-O...H-N: 2.26 Å, 0.73 Å, 161°; N9...H-N: 1.96 Å, 1.01 Å, 176°.

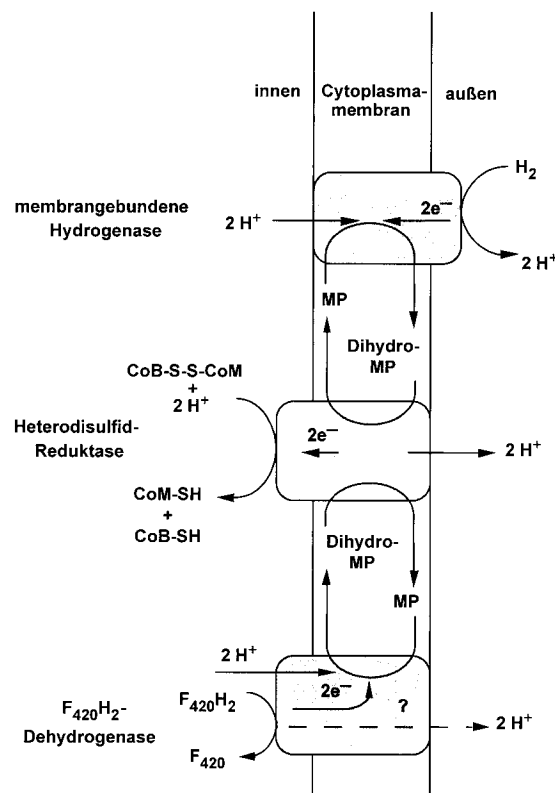
Methanophenazin: Struktur, Totalsynthese und Funktion eines neuartigen Cofaktors aus methanogenen Archaea**

Uwe Beifuss,* Mario Tietze, Sebastian Bäumer und Uwe Deppenmeier

Professor Sir Alan R. Battersby zum 75. Geburtstag gewidmet

Methanogene Organismen gehören zum Reich der Archaea und unterscheiden sich deutlich von den Eukarya und Bacteria.^[1] Die ubiquitär verbreiteten methanogenen Archaea sind strikt anaerobe Organismen, die bevorzugt in

Sedimenten von Gewässern sowie im Pansen von Wiederkäuern vorkommen. Sie stehen am Ende der anaeroben Nahrungskette und wandeln einfache Substrate wie Wasserstoff/Kohlendioxid, Ameisensäure, Methanol, Methylamine und Essigsäure in Methan um, das anschließend unter aeroben Bedingungen oxidiert werden kann und damit dem Kohlenstoff-Kreislauf wieder zugeführt wird. Aufgrund zivilisatorischer Einflüsse ist der Gehalt der Atmosphäre an Methan, das zu den Treibhausgasen zählt, während der letzten 100 Jahre deutlich angestiegen.^[2] An der Bildung des Methans durch methanogene Archaea sind zahlreiche außergewöhnliche Enzyme und ungewöhnliche Cofaktoren beteiligt. Methyl-S-CoM, die zentrale Zwischenstufe aller methanogenen Stoffwechselwege, wird unter dem katalytischen Einfluss der Methyl-CoM-Reduktase reaktiv zu Methan demethyliert.^[3] Die beiden hierfür benötigten Elektronen entstammen CoB-SH und führen zur Bildung eines Heterodisulfids (CoB-S-S-CoM) aus CoB-SH und CoM-SH.^[4] Ein energiekonservierender Schritt im Stoffwechsel methylotropher methanogener Organismen ist die Reduktion von CoB-S-S-CoM (Schema 1).^[5] Am membrangebundenen Elektronentransfer von



Schema 1. Modell des membrangebundenen Elektronentransfers von *Methanosarcina mazei* Gö1. CoM-SH = Coenzym M; CoB-SH = Coenzym B; F_{420} = Coenzym F_{420} ; $F_{420}H_2$ = reduzierte Form des Coenzym F_{420} ; MP = Methanophenazin; Dihydro-MP = reduzierte Form von Methanophenazin.

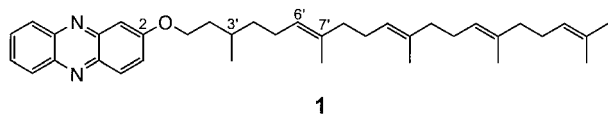
Methanosarcina mazei Gö1 sind zwei vor kurzem entdeckte, protonentranslozierende Enzymsysteme, die H_2 :Heterodisulfid-Oxidoreduktase und die $F_{420}H_2$:Heterodisulfid-Oxidoreduktase, beteiligt.^[6] Der Elektronentransport von $F_{420}H_2$ auf CoB-S-S-CoM wird durch eine $F_{420}H_2$ -Dehydrogenase ver-

[*] Priv.-Doz. Dr. U. Beifuss, Dipl.-Chem. M. Tietze
Institut für Organische Chemie der Georg-August-Universität
Tammannstraße 2, 37077 Göttingen (Deutschland)
Fax: (+49) 551-39-9660
E-mail: ubeifuss@gwdg.de
Dipl.-Biol. S. Bäumer, Priv.-Doz. Dr. U. Deppenmeier
Institut für Mikrobiologie und Genetik der Georg-August-Universität
Grisebachstraße 8, 37077 Göttingen (Deutschland)

[**] Diese Arbeit wurde von der Deutschen Forschungsgemeinschaft (Sonderforschungsbereich 416; Sachbeihilfen De 488/6-1 und De 488/4-2) sowie vom Fonds der Chemischen Industrie gefördert. Dr. J. Paust und Dr. H. Jaedicke (BASF AG, Ludwigshafen) sowie Dr. R. K. Müller (Hoffmann-La Roche Ltd., Basel) danken wir für großzügige Chemikalienspenden.

mittelt, die die Elektronen mit Hilfe von Elektronenüberträgern auf die Heterodisulfid-Reduktase überträgt. Liegt molekularer Wasserstoff vor, fungiert eine membrangebundene Hydrogenase als elektronenliefernde Komponente für die Heterodisulfid-Reduktase (Schema 1).

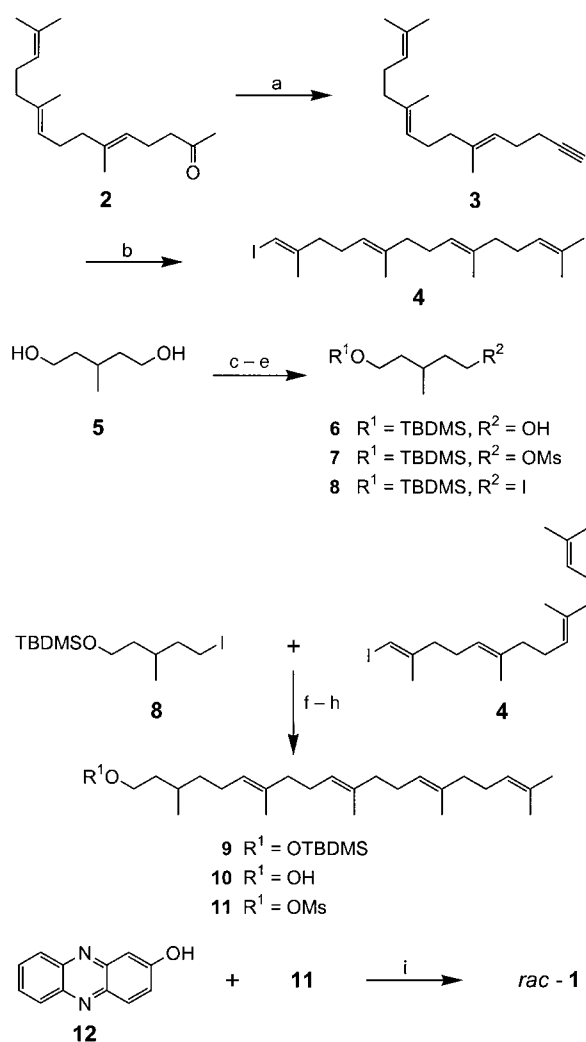
Die Struktur des Elektronenüberträgers war zunächst unbekannt. Kürzlich konnten wir aus Membranen von *Methanosarcina mazei* Gö1 einen Phenazinether isolieren.^[7] Die detaillierte NMR-Analyse des nur in geringen Mengen erhaltenen, empfindlichen Naturstoffs ergab, dass seine lipophile Seitenkette, die vermutlich für die Verankerung in der Membran sorgt, aus fünf in Kopf-Schwanz-Manier verknüpften isoprenoiden Einheiten besteht. Während die direkt über die Etherbrücke mit dem 2-Phenazinylrest verknüpfte C₅-Einheit gesättigt ist, sind die vier weiteren ungesättigt. Drei davon weisen (*E*)-konfigurierte Doppelbindungen auf. Bei dem als Methanophenazin (MP) **1** bezeichneten, redoxaktiven Naturstoff handelt es sich um das erste aus Archaea isolierte Phenazin überhaupt.



Da Methanogene keine herkömmlichen Chinone aufweisen, wurde vermutet, dass **1** als Elektronenüberträger in der Cytoplasmamembran fungiert und anders als andere natürliche Phenazine eine Rolle im energiekonservierenden Elektronentransport übernimmt. Da für Untersuchungen zur biologischen Funktion von **1** sowie zur Aufklärung der absoluten Konfiguration an C-3' größere Mengen des Naturstoffs benötigt werden, kam aufgrund der aufwändigen Isolierung aus *Methanosarcina mazei* Gö1 nur seine Synthese in Frage. Dabei sollte **1** konvergent aus den drei Bausteinen **4**, **8** und **12** aufgebaut werden (Schema 2). Als Schlüsselschritte waren die diastereoselektive Kupplung von **4** und **8** zu **9** sowie die anschließende Veretherung von **11** mit **12** vorgesehen. Während die Veretherung unproblematisch erschien, war nicht sicher, ob die Reaktivität des Alkylmetallderivats für die übergangsmetallkatalysierte Verknüpfung mit dem Vinylidiod ausreichend sein würde.

Zur Herstellung von **4** wurde (*E,E*)-Farnesylacetone **2** zunächst in das terminale Alkin **3** überführt,^[8] das anschließend durch Zr-katalysierte Carboaluminierung mit Trimethylaluminium und Abfangen mit Iod^[9] das (*E*)-Vinylidiod **4** in diastereomerenreiner Form mit 74% Ausbeute gab (Schema 2). Der zur Verknüpfung mit **4** benötigte C₅-Baustein *rac*-**8** konnte durch selektive Monofunktionalisierung^[10] von 3-Methylpentan-1,5-diol **5** in wenigen Stufen zugänglich gemacht werden. Der Vorteil dieser prochiralen Verbindung liegt darin, dass sich durch Differenzierung der enantiotopen (CH₂)₂OH-Gruppen die für die Bestimmung der absoluten Konfiguration des Methanophenazins **1** benötigten enantiomerenreinen Verbindungen (*R*)- und (*S*)-**8** herstellen lassen sollten.

Die Kupplung zwischen den aus *rac*-**8** in situ freigesetzten Alkylmetallverbindungen mit den aus **4** gebildeten Vinylmetall-Derivaten bereitete anfangs erhebliche Probleme, die auf eine zu geringe Reaktivität der sp³-Komponente hin-



Schema 2. a) LiTMP, THF, −78 °C; CIP(O)(OEt)₂, −78 °C → RT; LiTMP, THF, −78 °C → RT, H₂O, 75%; b) kat. [Cp₂ZrCl₂], Me₃Al, CH₂Cl₂; I₂, THF, −30 °C → RT; K₂CO₃, H₂O, 0 °C, 74%; c) NaH, TBDMSCl, THF, 83%; d) NEt₃, MsCl, CH₂Cl₂, 0 °C; e) NaI, Aceton, Rückfluss, 93% über zwei Stufen; f) **8** + ZnCl₂, Et₂O, RT → −100 °C, *t*BuLi; **4** + [Pd(PPh₃)₄] (0.05 Äquiv.), −70 °C → RT, 65%; g) TBAF, THF, RT; h) NEt₃, MsCl, CH₂Cl₂, 0 °C; i) KOH, Aliquat, THF, 90% über drei Stufen. Aliquat = 3-Methyltriocetylammmoniumchlorid, Ms = Methansulfonyl, TBAF = Tetrabutylammoniumfluorid, TBDMS = *tert*-Butyldimethylsilyl, TMP = 2,2,6,6-Tetramethylpiperidin.

wiesen. Erst durch die Pd⁰-katalysierte Kupplung der aus *rac*-**8**, *tert*-Butyllithium und Zinkchlorid in situ gebildeten Organozinkverbindung mit dem Vinylidiod **4** gelang der (*E*)-selektive Aufbau der C-6',C-7'-Doppelbindung^[11] des Sesterterpen-Bausteins **9** in 65% Ausbeute. Spaltung des *tert*-Butyldimethylsilyl ethers und Aktivierung des resultierenden Alkohols **10** mit Methansulfonsäurechlorid lieferten das Mesylat **11**, das mit 2-Hydroxyphenazin **12**^[12] zu *rac*-**1** verethert^[13] wurde. Verzichtete man auf die Isolierung und die Reinigung verschiedener Zwischenstufen, ließ sich *rac*-**1** ausgehend von Farnesylacetone **2** in über 30% Gesamtausbeute herstellen. Das synthetische Methanophenazin *rac*-**1** stimmte in allen spektroskopischen Daten mit dem Naturstoff überein.^[14] Ausgehend von enantiomerenreinen C₅-Bausteinen werden auf diesem Weg auch **1** und *ent*-**1** zugänglich sein,

sodass so auch die absolute Konfiguration des Naturstoffs bestimmt werden kann.

Erste Experimente zur biologischen Funktion, die mit der Modellverbindung 2-Hydroxyphenazin **12** und ihrer reduzierten Form (Dihydro-**12**) durchgeführt wurden, ergaben, dass alle Schlüsselenzyme mit dem artifiziellen Elektronenüberträger reagieren.^[7] Nach Abschluss der Totalsynthese konnten entsprechende Untersuchungen auch mit *rac*-**1** durchgeführt werden (Tabelle 1). Hierzu wurden gewaschene Cytoplasmamembranen von *Methanosarcina mazei* Gö1 mit *rac*-**1** ver-

Tabelle 1. Spezifische Aktivitäten der Enzyme der $F_{420}H_2$:Heterodisulfid-Oxidoreduktase- und der H_2 :Heterodisulfid-Oxidoreduktase-Systeme.

Enzym	Elektronen-donor	Elektronen-acceptor	spez. Akt. ^[a] [U mg Protein ⁻¹]
$F_{420}H_2$ -Dehydrogenase	$F_{420}H_2$	12	0.20
$F_{420}H_2$ -Dehydrogenase	$F_{420}H_2$	MP	0.15
membranebundene Hydrogenase	H_2	12	2.2
membranebundene Hydrogenase	H_2	MP	3.2
Heterodisulfid-Reduktase	Dihydro- 12	CoB-S-S-CoM	2.3
Heterodisulfid-Reduktase	Dihydro-MP	CoB-S-S-CoM	2.6

[a] 1 U = 1 μ mol Substratumsatz pro Minute.

setzt und die Aktivitäten der betreffenden Enzyme bestimmt. Die Ergebnisse deuten darauf hin, dass Methanophenazin **1** sowohl der membrangebundenen Hydrogenase als auch der $F_{420}H_2$ -Dehydrogenase als Elektronenacceptor dient, wenn H_2 bzw. $F_{420}H_2$ als Elektronendonoren zugesetzt wurden. Darüber hinaus nutzt die Heterodisulfid-Reduktase die reduzierte Form von Methanophenazin (Dihydro-MP) als Elektronendonator für die Heterodisulfid-Reduktion. Demnach ist MP in der Lage, den Elektronentransport zwischen den membrangebundenen Enzymen zu vermitteln, sodass die Umsetzungen durch die protonentranslozierenden Elektronentransportsysteme^[6] in jeweils zwei Teilreaktionen untergliedert werden können (siehe Schema 1).

Damit wurde Methanophenazin **1** als das erste am Elektronentransport in biologischen Systemen beteiligte Phenazin-Derivat charakterisiert. Den hier vorgestellten Experimenten zufolge entspricht seine Rolle im Energiestoffwechsel methanogener Organismen der des Ubichinons in Mitochondrien und Bakterien.

Experimentelles

Die Anzucht von *Methanosarcina mazei* Gö1 und die Präparation von Cytoplasmamembranen erfolgten wie in Lit. [7] beschrieben. Die photometrischen Untersuchungen zur Bestimmung der Enzymaktivitäten wurden bei Raumtemperatur in verschließbaren Glasküvetten (1.7 mL) durchgeführt, die zuvor mit N_2 oder H_2 gespült worden waren. Die optisch-enzymatische Bestimmung der $F_{420}H_2$ -abhängigen Reduktion von MP und die von Dihydro-MP abhängige Heterodisulfid-Reduktion wurden unter N_2 durchgeführt. Zur Erfassung der H_2 -abhängigen Reduktion von MP wurde die Küvette mit H_2 befüllt. Der Start der Reaktionen erfolgte durch Zugabe der jeweiligen Elektronenacceptoren. Die Endkonzentrationen der Reaktanten betrugen: F_{420} : 25 μ M; **12**: 25 μ M; MP: 24 μ M (Stammlösung in Dimethylformamid) und CoB-S-S-CoM: 38 μ M. Die Proteinkonzentration betrug 7.5 μ g Membranprotein pro mL Ansatz. Extinktionskoeffizienten: F_{420} : $\epsilon_{420} = 40 \text{ mm}^{-1} \text{ cm}^{-1}$; MP: $\epsilon_{414} = 3.17 \text{ mm}^{-1} \text{ cm}^{-1}$; **12**: $\epsilon_{425} = 4.5 \text{ mm}^{-1} \text{ cm}^{-1}$.

Eingegangen am 1. Februar 2000 [Z14627]

- [1] C. R. Woese, O. Kandler, M. L. Wheelis, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1990**, *87*, 4576–4579.
- [2] R. Conrad, *Microbiol. Rev.* **1996**, *60*, 609–640.
- [3] R. K. Thauer, *Microbiology* **1998**, *144*, 2377–2406.
- [4] R. K. Thauer, R. Hedderich, R. Fischer in *Methanogenesis* (Hrsg.: J. G. Ferry), Chapman & Hall, New York, **1993**, S. 209–252.
- [5] J. Ellermann, R. Hedderich, R. Böcher, R. K. Thauer, *Eur. J. Biochem.* **1988**, *172*, 669–677.
- [6] U. Deppenmeier, T. Lienard, G. Gottschalk, *FEBS Lett.* **1999**, *457*, 291–297.
- [7] H.-J. Abken, M. Tietze, J. Brodersen, S. Bäumer, U. Beifuss, U. Deppenmeier, *J. Bacteriol.* **1998**, *180*, 2027–2032.
- [8] E. Negishi, A. O. King, W. L. Klima, *J. Org. Chem.* **1980**, *45*, 2526–2528.
- [9] a) S. V. Ley, A. Armstrong, D. Diez-Martin, M. J. Ford, P. Grice, J. G. Knight, H. C. Kolb, A. Madin, C. A. Marby, S. Mukherjee, A. N. Shaw, A. M. Z. Slawin, S. Vile, A. D. White, D. J. Williams, M. Woods, *J. Chem. Soc. Perkin Trans. 1* **1991**, 667–692; b) E. Negishi, D. E. Van Horn, A. O. King, N. Okukado, *Synthesis* **1979**, 501–502; c) D. E. Van Horn, E. Negishi, *J. Am. Chem. Soc.* **1978**, *100*, 2252–2254.
- [10] P. J. McDougal, J. G. Rico, Y. Oh, B. D. Condon, *J. Org. Chem.* **1986**, *51*, 3388–3390.
- [11] A. B. Smith III, Y. Qiu, D. R. Jones, K. Kobayashi, *J. Am. Chem. Soc.* **1995**, *117*, 12011–12012.
- [12] a) R. Ott, *Monatsh. Chem.* **1959**, *90*, 827–838; b) F. Kehrman, F. Cherpillod, *Helv. Chim. Acta* **1924**, *7*, 973–980; c) R. Willstätter, F. Müller, *Chem. Ber.* **1911**, *44*, 2171–2185.
- [13] A. Loupy, J. Sansoulet, F. Vaziri-Zand, *Bull. Soc. Chim. Fr.* **1987**, 1027–1035.
- [14] $R_f = 0.51$ (Diethylether/Hexan 1/1); $^1\text{H-NMR}$ (500 MHz, C_6D_6 , TMS): $\delta = 0.83$ (d, $^3J = 6.6$ Hz, 3H; 3'-CH₃), 1.14–1.23 (m, 1H; 4'-H_A), 1.32–1.39 (m, 1H; 4'-H_B), 1.44 (dt, $^2J = 13.5$, $^3J = 6.4$ Hz, 1H; 2'-H_A), 1.56 (s, 3H; 19'-CH₃), 1.60–1.65 (m, 1H; 3'-H), überlagert von 1.61, 1.62, 1.64 (3s, je 3H; 7'-CH₃, 11'-CH₃, 15'-CH₃), 1.68 (d, $^4J = 0.8$ Hz, 3H; 20'-H₃), 1.72 (ddt, $^2J = 13.5$, $^3J = 5.4$, 6.8 Hz, 1H; 2'-H_B), 1.97–2.27 (m, 14H; 5'-H₂, 8'-H₂, 9'-H₂, 12'-H₂, 13'-H₂, 16'-H₂, 17'-H₂), 3.79 (dt, $^2J = 10.7$, $^3J = 6.8$ Hz, 1H; 1'-H_A), 3.81 (dt, $^2J = 10.7$, $^3J = 6.4$ Hz, 1H; 1'-H_B), 5.25 (tt, $^3J = 6.9$, $^4J = 1.4$ Hz, 1H; 18'-H), 5.28–5.38 (m, 3H; 6'-H, 10'-H, 14'-H), 7.29 (ddd, $^3J = 8.6$, 6.8, $^4J = 1.6$ Hz, 1H; 7-H oder 8-H), 7.32 (dd, $^3J = 9.6$, $^4J = 2.8$ Hz, 1H; 3-H), 7.35 (ddd, $^3J = 8.6$, 6.8, $^4J = 1.6$ Hz, 1H; 8-H oder 7-H), 7.53 (d, $^4J = 2.8$ Hz, 1H; 1-H), 8.12 (d, $^3J = 9.6$ Hz, 1H; 4-H), 8.30 (dd, $^3J = 8.6$, $^4J = 1.6$ Hz, 1H; 6-H oder 9-H), 8.31 (dd, $^3J = 8.6$, $^4J = 1.6$ Hz, 1H; 6-H oder 9-H); $^{13}\text{C-NMR}$ (125 MHz, C_6D_6): $\delta = 16.12$, 16.13, 16.15 (7'-CH₃, 11'-CH₃, 15'-CH₃), 17.73 (19'-CH₃), 19.56 (3'-CH₃), 25.78 (C-20'), 25.83 (C-5'), 27.11, 27.12, 27.23 (C-9', C-13', C-17'), 29.80 (C-3'), 36.01 (C-2'), 37.45 (C-4'), 40.20, 40.23 (C-8', C-12', C-16'), 66.91 (C-1'), 105.80 (C-1), 124.73, 124.77, 124.93, (C-10', C-14', C-18'), 125.04 (C-6'), 126.29 (C-3), 128.29 (C-7 oder C-8), 129.58 (C-8 oder C-7), 130.15 (C-6 oder C-9), 130.27 (C-9 oder C-6), 131.08 (C-19'), 131.30 (C-4), 134.99, 135.04, 135.09 (C-7', C-11', C-15'), 141.36 (C-4a), 142.63 (C-5a oder C-9a), 144.12 (C-9a oder C-5a), 145.89 (C-10a), 160.78 (C-2); IR (Film): $\tilde{\nu} = 3059 \text{ cm}^{-1}$ (CH, olefin.), 2954, 2924, 2853 (CH, aliph.), 1632, 1605, 1560, 1518 (C=C), 1483, 1445 (CH₂, CH₃), 1380, 1360 (CH₃), 1196 (C–O–C), 828, 757 (C=C, arom.); UV (CH₃CN): λ_{max} (lg ϵ) = 388 (3.72), 355 (3.78), 256 nm (4.71); MS (70 eV): m/z (%): 538 (100) [M^+], 470 (6) [$M^+ - C_5H_8$], 402 (8) [$M^+ - 2C_5H_8$], 334 (20) [$M^+ - 3C_5H_8$], 265 (4) [$M^+ - 3C_5H_8 - C_5H_9$], 196 (82) [$C_{12}H_8N_2O^+$], 168 (7) [$C_{12}H_8N_2O^+ - CO$]; HR-MS: ber. für $C_{37}H_{30}N_2O$: 538.3923; gef.: 538.3923.