

- [2] A. Levitzki, *Eur. J. Biochem.* **1994**, *226*, 1–13.
[3] J. F. Hancock, H. Paterson, C. J. Marshall, *Cell* **1990**, *63*, 133–139.
[4] Übersichten: a) D. M. Leonard, *J. Med. Chem.* **1997**, *40*, 2971–1990.
b) S. Ayral-Kaloustian, J. S. Skotnicki, *Annu. Rep. Med. Chem.* **1996**, *31*, 171–180; c) G. L. Bolton, J. S. Sebolt-Leopold, J. C. Hodges, *ibid.* **1994**, *29*, 165–174; d) F. Tamanoi, *Trends Biochem. Sci.* **1993**, *18*, 350–353; e) R. M. J. Liskamp, *Angew. Chem.* **1994**, *106*, 313–315; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1994**, *33*, 633–636.
[5] L. Sepp-Lorenzino, Z. Ma, E. Rands, N. E. Kohl, J. B. Gibbs, A. Oliff, N. Rosen, *Cancer Res.* **1995**, *55*, 5302–5309.
[6] P. F. Lebowitz, J. P. Davide, G. C. Prendergast, *Mol. Cell. Biol.* **1995**, *15*, 6613–6622.
[7] J. B. Gibbs, S. L. Graham, G. D. Hartman, K. S. Koblan, N. E. Kohl, C. A. Omer, A. Oliff, *Curr. Opin. Chem. Biol.* **1997**, *1*, 197–203.
[8] a) J. B. Gibbs, A. Oliff, *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* **1997**, *37*, 143–166; b) I. Sattler, F. Tamanoi in *Molecular Biology Intelligence Unit Series* (Hrsg.: M. H. Austin), RG Landes, Austin, TX, **1996**, S. 95–137; c) S. L. Graham, T. M. Williams, *Exp. Opin. Ther. Patents* **1996**, *6*, 1295–1304.
[9] J. E. Buss, J. C. Marsters, Jr., *Chem. Biol.* **1995**, *2*, 787–791.
[10] K. Shiomi, H. Yang, J. Inokoshi, D. Van der Pyl, A. Nakagawa, H. Takeshima, S. Omura, *J. Antibiot.* **1993**, *46*, 229–234.
[11] N. Shigematsu, K. Hayashi, N. Kayakiri, S. Takase, M. Hashimoto, H. Tanaka, *J. Org. Chem.* **1993**, *58*, 170–175.
[12] U. Schöllkopf, U. Groth, C. Deng, *Angew. Chem.* **1981**, *93*, 793–795; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1981**, *20*, 798–800.
[13] a) G. Höfle, W. Steglich, *Synthesis* **1972**, 619–629; b) J. Inanaga, K. Hirata, H. Sacki, T. Katsuki, M. Yamaguchi, *Bull. Chem. Soc. Jpn.* **1979**, *52*, 1989–1993.
[14] O. Mitsunobu, *Synthesis* **1981**, 1–28.
[15] Das als Referenzprobe verwendete natürliche Pepticinamin E^[10] wurde freundlicherweise von Prof. Satoshi Omura, The Kitasato Institute, Tokio (Japan), zur Verfügung gestellt.
[16] D. L. Pompliano, R. P. Gomez, N. J. Anthony, *J. Am. Chem. Soc.* **1992**, *114*, 7945–7946.
[17] S. Tabor, C. C. Richardson, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1985**, *82*, 1074–1078.
[18] R. Gomez, L. E. Goodman, S. K. Tripathy, E. O'Rourke, V. Manne, F. Tamanoi, *Biochem. J.* **1993**, *289*, 25–31.

Methyltransfer von Methanol auf Co-Cobyminate: ein Modell für die Coenzym-B₁₂-abhängige Methyltransferase?**

Alexander Schnyder, Tamis Darbre* und Reinhart Keese*

Manche methanogene und acetogene Bakterien können Methanol als Methylquelle für die Bildung von Methan oder Acetyl-CoA verwenden.^[1–4] In den bekannten Beispielen wirken Co-Corrinoide als prothetische Gruppen und bilden

[*] Dr. T. Darbre, Prof. Dr. R. Keese, Dipl.-Chem. A. Schnyder
Departement für Chemie und Biochemie der Universität
Freiestrasse 3, CH-3012 Bern (Schweiz)
Fax: (+41) 31 631 3423
E-mail: reinhart.keese@ioc.unibe.ch

[**] Diese Arbeit wurde durch das Europaprogramm Training and Mobility of Researchers (Projekt-Nr. FMRX-CT96-0018) und den Schweizerischen Nationalfonds zur Förderung der wissenschaftlichen Forschung (Projekt-Nr. 20-43565.95) unterstützt. Wir danken Prof. R. Thauer (Max-Planck-Institut für terrestrische Mikrobiologie, Marburg) für die Mitteilung unveröffentlichter Ergebnisse. Hintergrundinformationen zu diesem Beitrag sind im WWW unter <http://www-wiley-vch.de/home/angewandte/> zu finden oder vom Autor anzufordern.

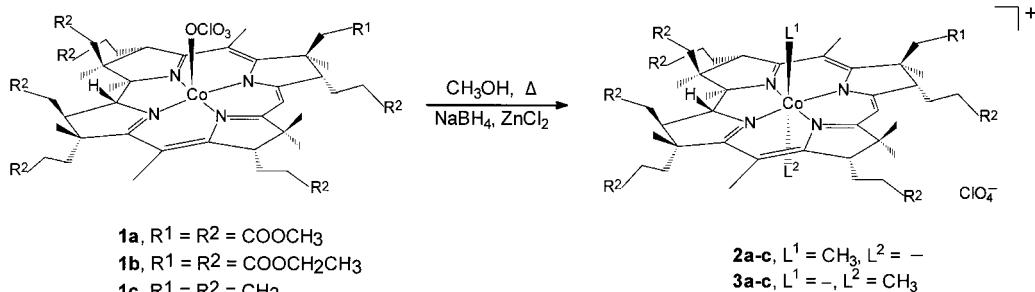
Co-CH₃-Komplexe, aus denen die CH₃-Gruppe auf Coenzym M (HSCH₂CH₂SO₃[–]) oder bei der Bildung von Acetyl-CoA möglicherweise auf Tetrahydrofolsäure übertragen wird. Aus Experimenten mit chiralen CHDT-Gruppen geht eindeutig hervor, daß der Methyltransfer auf Co^I in Enzymreaktionen über eine nucleophile Substitution verläuft.^[5, 6] Da OH-Gruppen im allgemeinen durch einen energieverbrauchenden Prozeß aktiviert werden müssen, um zur Abgangsgruppe in Substitutionsreaktionen zu werden, ist die Frage nach der Art der Aktivierung in derartigen Enzymreaktionen von besonderer Bedeutung.^[7] Während für die Übertragung der N⁵-Methylgruppe auf Cob(I)-alamin wie bei der durch Methionin-Synthetase katalysierten Reaktion eine Protonierung des N⁵-Methyltetrahydrofolats als wirkungsvollste Methode der Aktivierung vorgeschlagen wurde, kommt ATP für die Aktivierung von Methanol in Frage.^[10]

Kürzlich wurde allerdings berichtet, daß Zn²⁺ ein essentieller Faktor für die Übertragung der Methylgruppe von Methanol auf Co^I in methanogenen Bakterien ist. Die Gibbs-Energie ΔG° für die Bildung von Methylcobalamin aus Cob(I)-alamin und Methanol betrug dabei ca. –7 kJ mol^{–1}.^[11] Zn²⁺ ist eine starke Lewis-Säure und kann Substrate von Hydrolasen für einen Angriff durch ein Nucleophil wie Wasser aktivieren.^[12] Weitere Beispiele für die Aktivierung von Substraten durch Zn²⁺ wurden kürzlich beschrieben.^[13, 14]

Schließt man eine Aktivierung von Methanol durch Umwandlung in Methylphosphat oder andere Ester für diese Reaktion aus, stellt sich bei der Entwicklung von Modellsystemen die Frage, ob eine direkte Übertragung der CH₃-Gruppe von Methanol möglich ist, wenn Co^I als Supernucleophil^[15] reagiert und die OH-Gruppe durch reversible Komplexierung mit einer Lewis-Säure aktiviert wird.^[16] Um die Reaktivität von Methanol unter solchen Randbedingungen zu klären und die mögliche Rolle von Zn²⁺ als Aktivator in S_N2-Reaktionen mit Co^I als Supernucleophil zu untersuchen, haben wir die in Schema 1 dargestellte Reaktion durchgeführt.

Behandelt man den Co^{II}-Komplex **1a** in CH₃OH mit einem Überschuß an NaBH₄ in Gegenwart von ZnCl₂ bei Raumtemperatur oder 37°C, wird Co^{II} zu Co^I reduziert, erkennbar durch einen sofortigen Farbumschlag von Orange nach Dunkelgrün. Unter diesen Bedingungen konnte nach 3 h kein Co-CH₃-Komplex **2a** nachgewiesen werden. Wurde die Reaktionsmischung jedoch 3 h unter Rückfluß erhitzt, erhielt man **2a** und **3a** in einer Ausbeute von 15–20% und im Verhältnis 10:1. In Abwesenheit der Lewis-Säure findet keine Methylierung statt. Dieses Ergebnis ist vereinbar mit einer Methylierung, in der CH₃OH durch Zn²⁺ aktiviert wird, aber auch mit einem intra- oder einem intermolekularen CH₃-Transfer von einer der Methoxycarbonylgruppen. Eine intramolekulare S_N2-Reaktion ist unwahrscheinlich, da mit den kurzen Alkylketten die stereoelektronisch erforderliche lineare Anordnung zwischen Co^I und der Methoxycarbonylgruppe nicht möglich ist.^[17, 18]

Um eine intermolekulare Substitution an einer der Methoxycarbonylgruppen auszuschließen, wurde die Methylierung in CD₃OH als Lösungsmittel durchgeführt. Nach 3 h konnte nur der CD₃-Co-Komplex, aber kein **2a** nachgewiesen werden. Allerdings wurden unter diesen Bedingungen die

Schema 1. Methylierung der Co-Komplexe **1a–c**.

CH₃O-Gruppen des Heptamethylcobyrinates **1a** teilweise gegen CD₃O-Gruppen ausgetauscht. Analog konnten nach der Reaktion des Heptaethylesters **1b** die Co-CH₃-Komplexe **2b** und **3b**, nicht aber Co-C₂H₅-Verbindungen nachgewiesen werden,^[19] doch wurde auch hierbei eine partielle Umestellung festgestellt. Um einen intermolekularen CH₃-Transfer von einer der Estergruppen vollständig auszuschließen, wurde die Methylierung mit dem Heptaalkyl-Co^{II}-Komplex **1c** durchgeführt. Dieser lieferte in CH₃OH unter Rückfluß in 3 h einen Co-CH₃-Komplex in 3 % Ausbeute.^[20]

Wenngleich diese Reaktionen noch nicht optimiert worden sind, ist erkennbar, daß Co^I-Corrinide mit Methanol in Abwesenheit von ATP methyliert werden können. Der supernucleophile Co^I-Komplex reagiert mit Methanol, wenn die Abgangsgruppe durch die Lewis-Säure ZnCl₂ aktiviert wird.^[21] Derzeit untersuchen wir die Übertragung einer CH₃-Gruppe von Cobalt auf Thiole und die Kombination dieser beiden Reaktionen in einem Katalysecyclus.

Experimentelles

Methylierung mit Methanol: Die Lösung von **1a**^[22] (25 mg, 0.022 mmol) in 10 mL wasserfreiem CH₃OH wurde nach der Entfernung von O₂ (Ultraschall, N₂, 30 min) mit 8.4 mg (10 Äquiv.) NaBH₄ und 200 mg ZnCl₂ versetzt und unter Lichtausschluß 3 h unter Rückfluß erhitzt. **2a** wurde dünnenschichtchromatographisch durch Vergleich mit einer Probe, die mit MeI hergestellt worden war, nachgewiesen. (**2a**: R_f = 0.54, **3a**: R_f = 0.27; CH₂Cl₂/Diethylether:THF 2:2:1^[23]). Zur weiteren Identifizierung von **2a** wurde das Reaktionsgemisch mit 1 mL HClO₄ (60 %) sowie 2 mL H₂O versetzt und mit CH₂Cl₂ extrahiert. Nach dem Trocknen über MgSO₄ und Entfernen des Lösungsmittels wurde das ¹H-NMR-Spektrum des Rohproduktes in CDCl₃ mit TMS als internem Standard aufgenommen (**2a**: δ(Co-CH₃) = -0.13, **3a**: δ(Co-CH₃) = -0.22). Die Ausbeute wurde aus dem Flächenverhältnis der ¹H-NMR-Signale für die Protonen an C(10) aller Corrinide zu den Co-CH₃-Peaks der Isomere **2a/3a** bestimmt. – Die Methylierungen von **1b**^[19] und **1c**^[24–26] wurden analog durchgeführt.

Eingegangen am 22. Oktober 1997 [Z11062]

Stichwörter: Alkylierungen · Corrinide · Enzymmodelle · Lewis-Säuren · Supernucleophile

Hintergrundinformationen verfügbar

- [1] P. van der Meijden, B. W. te Brommelstroet, C. M. Poirot, C. van der Drift, G. D. Vogels, *J. Bacteriol.* **1984**, *160*, 629–635.
- [2] U. Harms, R. K. Thauer, *Eur. J. Biochem.* **1996**, *235*, 629–659.
- [3] G. M. LeClerc, D. A. Grahame, *J. Biol. Chem.* **1996**, *271*, 18725–18731.

- [4] E. Stupperich, R. Konle, *Appl. Environ. Microbiol.* **1993**, *59*, 3110–3116.
- [5] E. Stupperich, 4th European Symposium on Vitamin B₁₂ and B₁₂ Proteins, Innsbruck, Österreich, **1996**.
- [6] a) T. M. Zydowsky, L. F. Courtney, V. Frasca, K. Kobayashi, S. J. Benkovic, H. G. Floss, *J. Am. Chem. Soc.* **1986**, *108*, 3152–3153; b) L. D. Zydowsky, T. M. Zydowsky, E. S. Haas, J. W. Brown, J. N. Reeve, H. G. Floss, *ibid.* **1987**, *109*, 7922–7933.
- [7] Es sind nur wenige Reaktionen mit OH⁻ als Abgangsgruppe bekannt: die baseninduzierte Dehydratisierung von Aldolen^[8] sowie die baseninduzierte Epoxidierung von Michael-Systemen mit H₂O₂ unter basischen Bedingungen.^[9]
- [8] A. T. Nielsen, W. J. Houlihan, *Org. React.* **1968**, *16*, 1; R. L. Reeves in *Chemistry of the Carbonyl Group* (Hrsg.: S. Patai), Wiley-Interscience, New York, **1966**, S. 580–593; H. O. House in *Modern Synthetic Reactions*, 2. Aufl. (Hrsg.: W. A. Benjamin), Menlo Park, California, **1972**, S. 629–682.
- [9] C. A. Bunton, G. J. Minkoff, *J. Chem. Soc.* **1949**, 665–670.
- [10] J. T. Jarrett, M. Amaralunga, C. L. Drennan, R. H. Sands, J. D. Scholten, M. L. Ludwig, R. G. Matthews, *Biochemistry*, **1996**, *35*, 2464–2475.
- [11] R. Thauer, K. Sauer, *Eur. J. Biochem.* **1997**, *249*, 280–285.
- [12] I. Bertini, *Inorg. Chem.* **1990**, *29*, 1460–1463.
- [13] J. C. Gonzales, K. Pearson, J. E. Penner-Hahn, R. G. Matthews, *Biochemistry* **1996**, *35*, 12228–12234.
- [14] J. J. Wilker, S. J. Lippard, *J. Am. Chem. Soc.* **1995**, *117*, 8682–8683.
- [15] G. N. Schrauzer, J. W. Sibert, R. J. Windgassen, *J. Am. Chem. Soc.* **1968**, *90*, 6681–6688.
- [16] Wir konnten zeigen, daß Monomethylphosphat den Co-Komplex **1a** bei 37 °C unter den oben beschriebenen Bedingungen alkyliert. Für weitere Substrate wie Trimethylphosphat, die mit B₁₂-Derivaten reagieren, siehe: a) J. M. Pratt, *Inorganic Chemistry of Vitamin B₁₂*, Academic Press, London, **1972**, Kap. 12; b) J. M. Pratt in *Metal ions in Biological Systems*, Vol. 30 (Hrsg.: H. Sigel, A. Sigel), Marcel Dekker, New York, **1992**, Kap. 8.
- [17] L. Tenud, S. Farooq, J. Seibl, A. Eschenmoser, *Helv. Chim. Acta* **1970**, *53*, 2059–2069.
- [18] Die intramolekulare Spaltung einer Estergruppe, die vom Corrinring durch sieben Atome getrennt ist, wurde beschrieben: M. J. Pfammatter, Dissertation, Universität Bern, **1997**.
- [19] Der Heptaethylester **1b** wurde aus Vitamin B₁₂ und Ethanol analog zu **1a** hergestellt.^[22] Die Vergleichssubstanz Heptaethyl-Co-ethylcobyrinat wurde durch Reduktion von **1b** und Alkylierung mit C₂H₅I hergestellt und als ein Gemisch von α/β-Isomeren erhalten.
- [20] Ob **2c** oder isomeres **3c** unter diesen Bedingungen entsteht, wurde noch nicht untersucht.
- [21] Die Methylierung von **1a** konnte auch mit wasserfreiem MgCl₂ in einer Ausbeute von 7 % erreicht werden.
- [22] S. Müller, A. Wolleb, L. Walder, R. Keese, *Helv. Chim. Acta* **1990**, *73*, 1659–1668.
- [23] B. Kräutler, C. Caderas, *Helv. Chim. Acta* **1984**, *67*, 1891–1896.
- [24] B. Grüning, G. Holze, A. Gossauer, L. Ernst, *Helv. Chim. Acta* **1985**, *68*, 1771–1781.
- [25] B. Grüning, A. Gossauer, *Tetrahedron Lett.* **1979**, 3497–3498.
- [26] Y. Murakami, Y. Hisaeda, A. Kajihara, *Bull. Chem. Soc. Jpn.* **1983**, *56*, 3642–3646.