

1.01), 3.47 (m, 1H), 4.94 (br. d, $J = 10.3$ Hz, 1H), 5.04 (br. d, $J = 17.4$ Hz, 1H), 5.81 (ddd, $J = 7.7, 10.3, 17.4$ Hz, 1H); ^{13}C -NMR (100 MHz, CDCl_3): $\delta = 19.9, 26.3, 26.4, 26.6, 27.6, 29.3, 35.4, 41.3, 44.0, 74.5, 112.6, 145.5$ (1,3-*syn*-**2e**: $\delta = 21.5, 26.3, 26.4, 26.6, 27.9, 29.1, 34.9, 41.2, 44.2, 73.8, 113.5, 144.2$); befriedigende Elementaranalyse.

Eingegangen am 20. Juli 1998 [Z 12176]

International Edition: *Angew. Chem. Int. Ed.* **1999**, 38, 397–400

Stichwörter: Aldehyde • Alkylierungen • Ketone • Nickel • Zink

- [1] Y. Yamamoto, A. Asao, *Chem. Rev.* **1993**, 93, 2207–2293.
 [2] a) J. Montgomery, E. Oblinger, A. V. Savchenko, *J. Am. Chem. Soc.* **1997**, 119, 4911–4920; b) H. Nakamura, H. Iwami, Y. Yamamoto, *J. Am. Chem. Soc.* **1996**, 118, 6641–6647, zit. Lit.
 [3] a) H. Yasuda, K. Tatsumi, A. Nakamura, *Acc. Chem. Res.* **1985**, 18, 120–126; b) G. Erker, K. Engel, J. L. Atwood, W. E. Hunter, *Angew. Chem.* **1983**, 95, 506–507; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1983**, 22, 494–495; c) G. Erker, U. Dorf, *Angew. Chem.* **1983**, 95, 800; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1983**, 22, 777–778.
 [4] Eine NiH-vermittelte stöchiometrische Homoallylierung von Carbonylverbindungen mit 1,3-Dienen: a) Y. Sato, M. Takimoto, M. Mori, *Synlett* **1998**, 734–736, zit. Lit.; b) übergangsmetall-katalysierte Allylierung mit 1,3-Dienen: M. Takimoto, Y. Hiraga, Y. Sato, M. Mori, *Tetrahedron Lett.* **1998**, 39, 4543–4546, zit. Lit.; c) K. Kitayama, H. Tsuji, Y. Uozumi, T. Hayashi, *Tetrahedron Lett.* **1996**, 37, 4169–4172; d) Y. Gao, H. Urabe, F. Sato, *J. Org. Chem.* **1994**, 59, 5521–5523.
 [5] Eine ähnliche Elektronenübertragung wurde für die Nickel(0)-katalysierte reduktive Kupplung von Aldehyden und Alkinen zu Allylalkoholen vorgeschlagen: E. Oblinger, J. Montgomery, *J. Am. Chem. Soc.* **1997**, 119, 9065–9066.
 [6] M. Kimura, A. Ezoe, K. Shibata, Y. Tamaru, *J. Am. Chem. Soc.* **1998**, 120, 4033–4034.
 [7] E. L. Eliel, S. H. Wilen, *Stereochemistry of Organic Compounds*, Wiley, New York, **1994**, S. 735.
 [8] Da die cyclischen Diene 1,3-Cyclohexadien und 1,3-Cyclooctadien nur komplexe Produktmischungen lieferten, kann man davon ausgehen, daß der *s-trans*-Dien-Nickel(0)-Komplex eine reaktive Spezies ist.
 [9] Es ist anzumerken, daß 5-Vinyl-2-oxa-1-palladacyclopentan, das Palladiumanalogon von **IV**, eine Ringöffnung eingeht, die formale Rückreaktion der vorliegenden Reaktion, und so Mischungen von Dienen und Carbonylverbindungen liefert: H. Harayama, T. Kuroki, M. Kimura, S. Tanaka, Y. Tamaru, *Angew. Chem.* **1997**, 109, 2449–2451; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1997**, 36, 2352–2354.

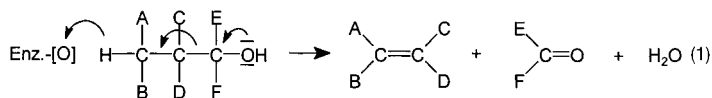
Biosynthese des Psoralens: zum Mechanismus einer Cytochrom-P450-katalysierten, oxidativen Bindungsspaltung

Volker Stanjek, Martin Miksch, Patricia Lueer, Ulrich Matern und Wilhelm Boland*

Oxidative Spaltungen von C-C-Bindungen, die unter Verbrauch von molekularem Sauerstoff zu olefinischen Produkten führen, sind im Sekundärstoffwechsel sehr weit

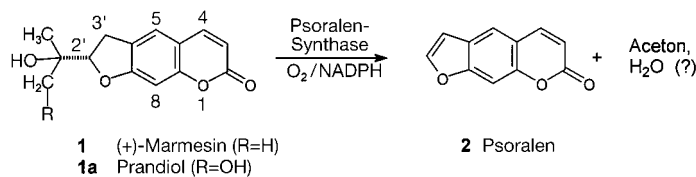
[*] Prof. Dr. W. Boland, Dr. V. Stanjek, Dr. M. Miksch
 Max-Planck-Institut für Chemische Ökologie
 Tatzendpromenade 1a, D-07745 Jena
 Fax: (+49) 3641-643670
 E-mail: Boland@ice.mpg.de
 Apothekerin P. Lueer, Prof. Dr. U. Matern
 Institut für Pharmazeutische Biologie
 Deutschhausstraße 17A, D-35037 Marburg

verbreitet. Sie sind typisch für Biosynthesen von Homo- und Nortriterpenen, für die Entstehung von 1-Alkenen aus Fettsäuren sowie zahlreichen anderen ungesättigten Naturstoffen aus oxygenierten Vorstufen [Gl. (1)].^[1]



Besonders gut untersucht sind derartige Transformationen im Steroidstoffwechsel, wo angulare Methylgruppen unter Einführung einer Doppelbindung in das Grundgerüst oxidativ entfernt werden.^[2] Stets sind Enzyme aus der großen Familie der Cytochrom-P450-Enzyme beteiligt. Dabei katalysiert ein einzelnes Enzym jeweils alle erforderlichen Teilschritte, nämlich 1) die Funktionalisierung der Methylgruppe zum primären Alkohol, 2) die Weiteroxidation zum Aldehyd und 3) die eigentliche oxidative Bindungsspaltung zum ungesättigten Norsteroid und zu Ameisensäure.^[3–6]

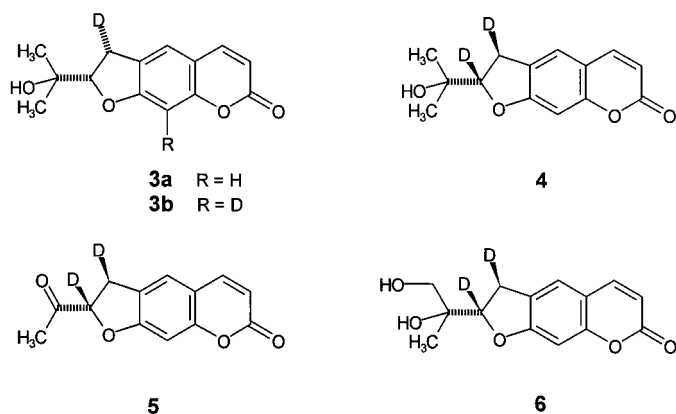
Ob dieser für den Steroidstoffwechsel abgeleitete sequentielle Abbau auf die zahlreichen anderen oxidativen Bindungsspaltungen des Sekundärstoffwechsels übertragen werden kann, ist offen. So wird z. B. auch die Dealkylierung von (+)-Marmesin **1** zum phototoxischen Furocumarin Psoralen **2** durch ein Cytochrom P450, der Psoralen-Synthase, katalysiert (Schema 1).^[7] Dieser Schritt ist für die Biosynthese der



Schema 1. Cytochrom-P450-katalysierte Dealkylierung von **1**.

linearen Furocumarine von zentraler Bedeutung, da das entstehende Psoralen **2** als Vorstufe für die weiteren Mitglieder dieser Substanzfamilie dient.^[8] Lineare und angulare Furocumarine sind im Pflanzenreich, besonders bei den Apiaceen, als induzierbare Abwehrstoffe weit verbreitet.^[9] Auch das Diol **1a** (Prandiol) ist als Naturstoff bekannt;^[10, 11] ein schrittweiser Abbau der Seitenkette, analog zur Dealkylierung der Steroide, ist daher naheliegend. Wir berichten hier, daß die Dealkylierung von Marmesin **1** tatsächlich nicht sequentiell verläuft, sondern daß der 2-Hydroxy-2-propyl-Substituent in einem Schritt in einer *syn*-Eliminierung als Aceton abgespalten wird. Der zwar schon früher postuliert,^[12] hier aber erstmals nachgewiesene einstufige Abbau dürfte auch repräsentativ für andere oxidative Abbaurouten zu Nor- und Secoverbindungen sein.

Der Nachweis einer einstufigen Dealkylierung und die Analyse ihres stereochemischen Verlaufs gelang unter Verwendung der spezifisch deuterierten Vorstufen **3–7**^[13] und aktiver Mikrosomen aus elicitierten Zellkulturen der Knorpelmöhre (*Ammi majus*).^[14] Werden die Mikrosomenpräparate z. B. mit [$^2\text{H}_7$]Marmesin **7** in Gegenwart von NADPH und unter Luftzutritt inkubiert,^[7] entstehen äquimolare Mengen



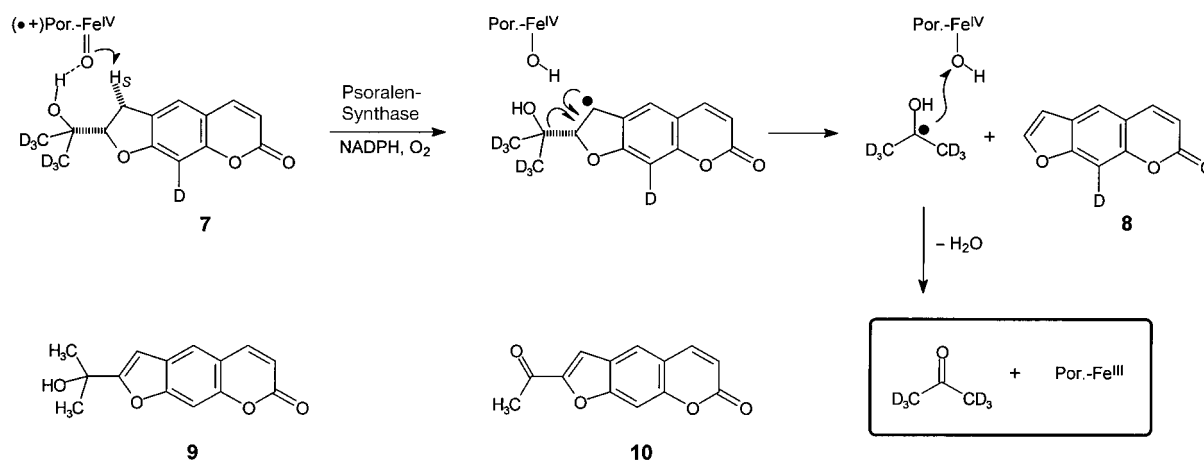
von $[8\text{-}^2\text{H}_1]$ Psoralen **8** und $[^2\text{H}_6]$ Aceton (Schema 2). Beide Produkte können durch GC-MS erfaßt und quantifiziert werden. Aufgrund des in **8** verbliebenen Deuteriumatoms kann das Reaktionsprodukt sicher von Spuren von natürlichem $[8\text{-}^1\text{H}]$ Psoralen unterschieden werden. Ca. 20–40% des entstehenden Psoralens werden unter den Reaktionsbedingungen weiter zu Bergaptol (5-Hydroxypsoralen) umgesetzt.^[7] $[^2\text{H}_6]$ Aceton läßt sich im Reaktionsansatz nach Derivatisierung mit Pentafluorbenzylhydroxylamin zum entsprechenden Imin quantitativ erfassen.^[15] Die Erhaltung aller Deuteriumatome im C_3 -Fragment schließt eine intermediäre Funktionalisierung des Substituenten aus (siehe **1a**).

Der stereochemische Verlauf der oxidativen Gerüstspaltung wurde durch Umsetzung mit den *syn* bzw. *anti* zum 2-Hydroxy-2-propyl-Substituenten deuterierten Vorstufen **3a/3b** und **4** ermittelt.^[13] In beiden Fällen wird ausschließlich das zum C_3 -Substituenten *syn*-ständige Wasserstoffisotop abgespalten. Während die Umsetzung von **3a** unter Verlust des Deuteriumatoms an $\text{C}3'$ zu natürlichem Psoralen führt, verbleibt bei **4** die Isotopenmarkierung an $\text{C}3'$ im Molekül. Bei Verwendung von jeweils äquimolaren Mengen der Vorstufen **3a** und **4** bzw. **3b** und natürlichem Marmesin **1** werden die Substrate **1** und **4**, die ein zum C_3 -Substituenten *syn*-ständiges Protiumatom aufweisen, bevorzugt umgesetzt. Aus der massenspektrometrisch zugänglichen Verteilung der erhaltenen isotopomeren Psoralene errechnet sich damit ein

primärer kinetischer Isotopeneffekt von $k_{\text{H}}/k_{\text{D}} \approx 4$ ($T = 20^\circ\text{C}$).^[16] Hinsichtlich der Substrattoleranz der Psoralen-Synthase ist erwähnenswert, daß auch das Keton **5** von den Mikrosomen zum deuterierten $[2',3'\text{-}^2\text{H}_2]$ Psoralen deacyliert wird. Das Diol **6**^[10] ($[^2\text{H}_2]$ Prandiol) wird dagegen nicht umgesetzt. Da Konfiguration und Gesamtumsatz der Deacylierung von **5** mit den Befunden zur oxidativen Dealkylierung von Marmesin übereinstimmen, dürften beide Reaktionen vom selben Enzym katalysiert werden.

Die enzymatische Dealkylierung von Marmesin konnte auch mit den als Cytochrom-P450-Modellen bewährten Tetraphenylporphyrinatokomplexen von Fe^{III} ^[17] und Mn^{III} ^[18] nachvollzogen werden. Mit Iodosylbenzol als Oxidationsmittel sind beide Metall-Porphyrinatokomplexe in der Lage, die stereospezifisch deuterierten Marmesine **3a**, **3b**, **4** und **7** zu deuterierten Psoralenen und Aceton zu spalten (Schema 2). Erwartungsgemäß wird bei der Modellreaktion die ausschließliche *syn*-Eliminierung der enzymatischen Reaktion nicht nachvollzogen. Überraschend läßt sich aber auch nur eine mäßige Bevorzugung des besser zugänglichen *anti*-Wasserstoffatoms feststellen (*anti*:*syn* = 1.6:1). Anders als bei der enzymatischen Reaktion kann der Metall-Oxo-Komplex nicht nur die Wasserstoffatome an $\text{C}3'$ angreifen, sondern auch das Wasserstoffatom am tertiären $\text{C}2'$. Beide Primärradikale sind durch ihre Wechselwirkung mit dem aromatischen System bzw. dem benachbarten Ringsauerstoffatom stabilisiert. Als Folgeprodukt eines Angriffs auf das Wasserstoffatom an $\text{C}2'$ ist nach β -Spaltung nur Didehydromarmesin **9** zu erwarten; ein Primärradikal an $\text{C}3'$ kann zu **2** und **9** weiterreagieren. Dementsprechend erhält man beim oxidativen Abbau von Marmesinderivaten die Produkte **2** und **9** zu etwa gleichen Anteilen, während die Modelloxidation des Ketons **5** neben sehr wenig **2** überwiegend das Acetylpsoralen **10** liefert und damit die hohe Resonanzstabilisierung des an $\text{C}2'$ entstehenden Primärradikals reflektiert.^[19]

Nach den Befunden aus den enzymatischen Umsetzungen und den Modellreaktionen läßt sich die Dealkylierung von Marmesin gemäß Schema 2 als Angriff eines Porphyrin- $\text{Fe}^{\text{IV}}\text{-O}$ -Radikalkations auf $\text{C}3'\text{-H}_5$ des Substrats **7** formulieren. Es entsteht ein benzylisches Radikal, das durch β -Spaltung in $[8\text{-}^2\text{H}]$ Psoralen **8** und ein 2-Hydroxy-2-propoxyradikal zer-



Schema 2. Psoralen-Synthase-katalysierte Dealkylierung von **7**, mechanistischer Verlauf sowie die Produkte **9** und **10** aus den Modellreaktionen mit Tetraphenylporphyrinatokomplexen von Fe^{III} und von Mn^{III} . Por. = Porphyrinato.

fällt. Aus einem „Oxygen-Rebound“^[20] zum unmittelbar benachbarten Porphyrin-Fe^{IV}-OH-Zentrum resultiert dann das Hydrat von [2H₆]Aceton. Ganz analog kann auch das Keton **5** umgesetzt werden, wobei nun Psoralen und Essigsäure über ein intermediäres Acylradikal entstehen sollten. Eine von Birch und Mitarbeitern postulierte mechanistische Alternative^[21] über ein Carbeniumion an C3' als Intermediat einer heterolytischen Fragmentierung en route zum Psoralen wird durch unsere Befunde nicht gestützt, da an C3' hydroxylierte Intermediate als Vorstufen eines Carbeniumions weder bei der Modellreaktion noch bei der enzymatischen Umsetzung registriert wurden. Darüber hinaus sollte eine heterolytische Fragmentierung eines 3'-Hydroxymarmesins auch eher als *anti*-Eliminierung verlaufen. Vielmehr ist die fast ausnahmslos zu beobachtende *syn*-Eliminierung eines Alkyl- oder Acylrestes zusammen mit einem vicinalen Wasserstoffatom^[1, 4] in sehr guter Übereinstimmung mit dem radikalischen Abstraktions- und Rekombinationsprozeß^[20] von Schema 2. Nach Disproportionierung des Primärradikals (β -Spaltung) zum Olefin kann das sich ablösende Alkoxy- oder Acylradikal sofort vom benachbarten Reaktionszentrum des Cytochroms P450 übernommen werden, so daß das Auftreten freier Radikale wirksam unterbunden wird.

Die hier beschriebene Reaktionssequenz ist vermutlich auch repräsentativ für einige bislang mechanistisch noch unverstandene Ringspaltungen zu Secoverbindungen. So konnten für die bei der Biosynthese von Indol- und Chincona-Alkaloiden stattfindende zentrale Umwandlung von Loganin zu Secologanin^[22] niemals Intermediate nachgewiesen werden. Ähnliches gilt für die am Ring A des Triterpenoids β -Amyrin erfolgende oxidative Öffnung zu Nyctanthinsäure^[23] oder für den Abbau des acyclischen Geranylacetons zu 4,8-Dimethyl-1,3,7-nonatrien, einem im Pflanzenstoffwechsel weitverbreiteten Indikator für Herbivorie.^[24] Der Befund, daß auch das acyclische Geranylaceton über eine *syn*-Eliminierung zum Olefin und Essigsäure abgebaut wird,^[24, 25] unterstreicht nachdrücklich die Bedeutung dieses stereochemischen Aspekts für Cytochrom-P450-katalysierte oxidative Bindungsspaltungen.

Experimentelles

Alle enzymatischen Umsetzungen wurden mit Mikrosomen aus elicitierten Zellkulturen von *Ammi majus* durchgeführt.^[14] Jeweils 40.0 nmol des entsprechenden racemischen Marmesinderivates^[13] wurden in 25.0 μ L eines 50.0 mM Tris/HCl-Puffers mit 1.0 mM EDTA (pH 7.5) gelöst und mit 10.0 μ L einer 10.0 mM NADPH-Lösung im gleichen Puffer und 20.0 μ L einer Mikrosomensuspension versetzt. Nach 30 min bei 20 °C wurden die Reaktionsprodukte durch Festphasenextraktion (SPME) an einem mit Polymethyldisiloxan beschichteten Träger adsorbiert (30 min Gleichgewichtseinstellung) und anschließend im Einlaß eines Gaschromatographen bei 250 °C desorbiert^[26] (GC-MS: Fisons MD800, Trennsäule: SE 30, 10 m \times 0.31 mm, Trägergas: He, Temperaturprogramm: 50 °C (2 min), 20 °C min⁻¹ \rightarrow 280 °C, Massenbereich: 35–350 Da s⁻¹, Interface: 270 °C). Jeweils ca. 5 % der Substrate **3a**, **3b**, **4** und **7** wurden umgesetzt. Zur Erfassung von Aceton oder [2H₆]Aceton wurden dem Reaktionsansatz vor der Festphasenextraktion 5.0 μ L einer 0.1 mM Lösung von Pentafluorbenzylhydroxylamin im genannten Tris/HCl-Puffer zugesetzt.^[15] Die Bildung des Imins ist nach 30 min abgeschlossen, und das enzymatisch freigesetzte Aceton kann nach Kalibrierung mit authentischen Referenzen (Aceton und [2H₆]Aceton) zusammen mit den Furocumarinen durch GC-MS quantifiziert werden.

Bei den Modellreaktionen wurden je 1.4 mmol des Metalloporphyrinato-komplexes (Fe³⁺ oder Mn³⁺) und 8.1 mmol der deuterierten (\pm)-Marmesine **3a**, **3b**, **4** oder **7** mit 22.0 mmol Iodosylbenzol bei 4 °C 8 h in Dichlormethan (3.0 mL) gerührt. Die Analyse der Reaktionsprodukte erfolgte ohne vorangehende Aufarbeitung durch GC-MS. Ca. 10 % des jeweiligen Substrates wurden umgesetzt. Das Carbonylfragment wurde wie beschrieben durch Reaktion mit Pentafluorbenzylhydroxylamin erfaßt.^[15]

Eingegangen am 9. Mai 1997,

veränderte Fassung am 7. Oktober 1998 [Z10426]

International Edition: *Angew. Chem. Int. Ed.* **1999**, 38, 400–402

Stichwörter: Biosynthese • Cytochrome • Eliminierungen • Furocumarine • Porphyrinoide

- [1] W. Boland, *Pure Appl. Chem.* **1993**, 65, 1133–1142.
- [2] a) M. Akhtar, J. N. Wright, *Nat. Prod. Rep.* **1991**, 527–551, zit. Lit.; b) „Bioorganic Chemistry, Models and Applications“: W.-D. Woggon, *Top. Curr. Chem.* **1996**, 184, 39–96, zit. Lit.
- [3] A. Z. Shyadehi, D. C. Lamb, S. L. Kelly, D. E. Kelly, W.-H. Schunck, J. N. Wright, D. Corina, M. Akhtar, *J. Biol. Chem.* **1996**, 271, 12445–12450, zit. Lit.
- [4] M. Akhtar, J. N. Wright, A. Z. Shyadehi, P. Robichaud, *Pure Appl. Chem.* **1994**, 66, 2387–2390.
- [5] P. Lee-Robichaud, A. Z. Shyadehi, J. N. Wright, M. E. Akhtar, M. Akhtar, *Biochemistry* **1995**, 34, 14104–14113.
- [6] M. Akhtar, D. Corina, S. Miller, A. Z. Shyadehi, J. N. Wright, *Biochemistry* **1994**, 33, 4410–4418, zit. Lit.
- [7] H. Wendorff, U. Matern, *Eur. J. Biochem.* **1986**, 161, 391–398.
- [8] K. D. Hauffe, K. Hahlbrock, D. Scheel, *Z. Naturforsch. C* **1986**, 41, 228–239.
- [9] R. D. H. Murray, J. Méndez, S. A. Brown, *The Natural Coumarins*, Wiley, Chichester, **1982**.
- [10] A. Z. Abyshev, I. V. Brodskii, *Khim. Prir. Soedin* **1974**, 5, 574–575.
- [11] S. K. Garg, N. D. Sharma, S. R. Gupta, *Planta Med.* **1981**, 43, 306–308.
- [12] T. Hakamatsuka, M. F. Hashim, Y. Ebizuka, U. Sankawa, *Tetrahedron* **1991**, 47, 5969–5978.
- [13] V. Stanjek, M. Miksch, W. Boland, *Tetrahedron* **1997**, 53, 17699–17710.
- [14] D. Hamerski, R. C. Beier, R. E. Kneusel, U. Matern, K. Himmelsbach, *Phytochemistry* **1990**, 29, 1137–1142.
- [15] D. Cancilla, S. S. Que Hee, *J. Chromatogr.* **1992**, 627, 1–16.
- [16] A. Sorokin, A. Robert, B. Meunier, *J. Am. Chem. Soc.* **1993**, 115, 7293–7299.
- [17] T. J. McMurry, J. T. Groves in *Cytochrome P-450, Structure, Mechanism, and Biochemistry* (Hrsg.: P. R. Ortiz de Montellano), Plenum, New York, **1986**, S. 1–28.
- [18] P. W. White, *Bioorg. Chem.* **1990**, 18, 440–456.
- [19] F. G. Bordwell, G.-Z. Ji, X. Zhang, *J. Org. Chem.* **1991**, 56, 5254–5256.
- [20] J. T. Groves, G. A. McClusky, *J. Am. Chem. Soc.* **1976**, 98, 859–861.
- [21] a) A. J. Birch, M. Maung, A. Pelter, *Aust. J. Chem.* **1969**, 22, 1923–1932; b) C. F. Neville, M. F. Grundon, V. N. Ramachandran, G. Reisch, J. Reisch, *J. Chem. Soc. Perkin Trans. 1* **1991**, 2261–2268.
- [22] S. Damtoft, H. Franzyk, S. R. Jensen, *Phytochemistry* **1995**, 38, 615–624.
- [23] G. H. Witham, *Proc. Chem. Soc.* **1960**, 2016–2020.
- [24] a) W. Boland, Z. Feng, J. Donath, A. Gäbler, *Naturwissenschaften* **1992**, 79, 368–371; b) W. Boland, A. Gäbler, M. Gilbert, Z. Feng, *Tetrahedron* **1998**, 54, 14725–14736.
- [25] W. Boland, Z. Feng, J. Donath, in *Flavor Precursors* (Hrsg.: P. Schreier), Allured, Wheaton, IL, USA, **1993**, S. 123–136.
- [26] J. Pawliszyn, M. J. Yang, Z. Zhang, *Z. Anal. Chem.* **1994**, 66, 844–853.