

Mehr α -Tocopherol aus natürlichen Quellen – Chemie versus Molekularbiologie

Wolf-D. Woggon*

Die Tocopherole **1–4** sowie die entsprechenden Tocotrienole, die man aus photosynthetisierenden Organismen isolieren kann, sind strukturverwandte Derivate von Chroman-6-ol mit Vitamin-E-Aktivität (Tabelle 1).^[1] Die Bedeutung

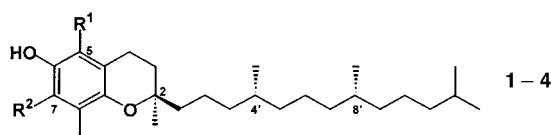


Tabelle 1. Vergleich der relativen biologischen Aktivitäten A_{rel} der Tocopherole **1–4**.

Verbindung	R ¹	R ²	$A_{\text{rel}} [\%]$
α -Tocopherol 1	CH ₃	CH ₃	100
β -Tocopherol 2	CH ₃	H	50
γ -Tocopherol 3	H	CH ₃	10
δ -Tocopherol 4	H	H	3

dieser Verbindungen für die Ernährung von Säugetieren ist zwar seit etwa achtzig Jahren bekannt, ihre Wirkungsweise auf molekularer Ebene wurde aber erst viel später genauer untersucht. Burton und Ingold fanden,^[2] daß α -Tocopherol **1**, die biologisch aktivste Verbindung der Vitamin-E-Gruppe, als Radikalketten-Abbruchreagens wirkt und das wohl wichtigste lipophile Antioxidans in lebenden Zellen ist. Mit seiner lipophilen Seitenkette wird **1** leicht in Doppelschichtmembranen eingelagert und schützt damit Zellwände gegen den oxidativen Abbau. Die Chiralität und die drei Methylgruppen am aromatischen Ring sind für die maximale biologische Aktivität von **1** essentiell.^[3]

Bei der Entwicklung von Methoden zur Synthese von enantiomerenreinem **1** war die (*R*)-Konfiguration an C2 eine besondere Herausforderung. Obwohl einige der Methoden zweifellos elegant und sogar effizient sind,^[4] kann keine ökonomisch mit der Synthese von racemischem α -Tocopherol konkurrieren,^[5] die zur Zeit etwa 90 % des weltweiten Jahresbedarfs von >22500 t deckt.^[6] Zur Gewinnung der

chiralen Tocopherole ist man nach wie vor auf natürliche Quellen wie Sonnenblumen-, Soja-, Palm- und Weizenkeimöl angewiesen. Aus ihnen isoliert man allerdings die Tocopherole **1–4** nur als Mischungen unterschiedlicher Zusammensetzung,^[1] so daß sich die Frage stellt, wie man diese Mischungen in das gewünschte **1** umwandeln kann. Hier könnten zwei kürzlich publizierte Arbeiten möglicherweise Lösungen bieten.

Der „Metabolic-engineering“-Ansatz von DellaPenna et al. beruht auf folgenden Überlegungen und experimentellen Tatsachen:^[7]

- a) Die Methylierung von γ -Tocopherol **3** ist der letzte Schritt der Biosynthese von α -Tocopherol **1**.^[8]
- b) Die γ -Tocopherol-Methyltransferase (γ -TMT) aus *Capsicum annuum* wurde bereits von Camara et al. gereinigt und ansequenziert.^[9]
- c) Organismen, in denen γ -TMT überexprimiert werden kann, würden ihr γ -Tocopherol **3**, das oft die Hauptmenge der Vitamin-E-Komponenten ist, vollständig in das gewünschte α -Tocopherol **1** umwandeln.

Da Gene, die verwandte Biosynthesesequenzen bestimmen, oft in einem Operon organisiert sind, vermuteten DellaPenna et al., daß das γ -TMT-Gen in dem Operon lokalisiert ist, das Gene enthält, die für die *p*-Hydroxyphenylpyruvat-Dioxygenase (HPPDase) kodieren.^[10] Dieses Enzym katalysiert eine wichtige Reaktion im Katabolismus aromatischer Aminosäuren – die Bildung von Homogentisinsäure, die unter anderem ein Vorläufer der monomethylierten Phenolsubstruktur der Vitamine E ist.

Für die Experimente wurden *Synechocystis* PCC6803 (Cyanobakterium) und die Pflanze *Arabidopsis thaliana* ausgewählt, da die photosynthetisch aktiven Zellen beider Spezies >95 % **1** enthalten, wohingegen in den Samen von *Arabidopsis thaliana* nur etwa 1 % **1** gefunden wird. Dies bedeutet, daß in den erstgenannten Zelltypen eine ausreichende γ -TMT-Aktivität vorliegt, während sie in den Samen fehlt; letztere sind die hauptsächliche Vitamin-E-Quelle für die menschliche Ernährung.

Basierend auf den Sequenzdaten von Camara et al.^[9] und dem bekannten Gen, das für die *Arabidopsis*-HPPDase kodiert,^[10] charakterisierten DellaPenna et al. das γ -TMT-Gen in *Synechocystis* PCC6803 und in *Arabidopsis thaliana*, indem sie eine „Null-Mutante“ in *Synechocystis* und funktionelle Formen beider Gene in *E. coli* herstellten. Beide

[*] Prof. Dr. W.-D. Woggon
Institut für Organische Chemie der Universität
St.-Johanns-Ring 19, CH-4056 Basel (Schweiz)
Fax: (+41) 61-267-11-02
E-mail: woggon@wolfi.chemie.unibas.ch

rekombinanten Wildtyp- γ -TMT-Proteine katalysierten die Umwandlung von **3** in **1**, während die Null-Mutante keine Methyltransferase-Aktivität aufwies. Nach Einführung eines Vektors in *Arabidopsis*, der das eigene γ -TMT-Gen und einen aus Karotten stammenden, samenspezifischen Promotor enthielt, produzierten die *Arabidopsis*-Samen 95% α -Tocopherol **1**, 1% β -Tocopherol **2** und 4% γ -Tocopherol **3**. Unter diesen Bedingungen werden also offenbar die Hauptmengen an γ -und δ -Tocopherol methyliert, d.h., das Enzym γ -TMT katalysiert regiospezifisch die Methylierung am Chromanol-C5-Atom. Unter Berücksichtigung der relativen biologischen Aktivitäten der Tocopherole (Tabelle 1) sind demnach die Samen dieser *Arabidopsis*-Zelllinien, in denen γ -TMT überexprimiert ist, etwa neunmal aktiver als entsprechende Wildtypzellen. Der Gesamtgehalt an Vitamin-E-aktiven Verbindungen bleibt dagegen unverändert.

Eine Alternative zu genetisch modifizierten Pflanzen ist im Prinzip, die natürlich vorkommende Mischung der Tocopherole **1–4** chemisch in die biologisch aktivste Komponente α -Tocopherol **1** umzuwandeln. Diese Variante wurde vor wenigen Jahren von Müller und Schneider eingehend untersucht.^[11] Optimale Resultate wurden erzielt, wenn eine Tocopherolmischung mit einem Mannich-Reagens, z.B. einer 1:1-Mischung von Formaldehyd und Morpholin, ohne Lösungsmittel erhitzt wurde und die gebildeten Benzylamine **2'**, **3'** und **4'** ohne weitere Reinigung an Pd/C mit H₂ reduziert wurden. Unter diesen Bedingungen war die Ausbeute an den Tocopherolen nahezu quantitativ, und die GC-Analyse belegte die Effizienz der Umwandlung: 98% **1**, 0.8% **2**, 1.2% **3**. Mit dieser Methode ist es also möglich, irgendeine natürlich vorkommende Tocopherolmischung in hoher Ausbeute und im kg-Maßstab in **1** zu überführen. Insofern scheint derzeit die chemische Variante der molekularbiologischen von Della-Penna et al. noch überlegen zu sein. Beide Methoden sind allerdings mit dem Nachteil behaftet, daß sie von dem sehr geringen Vitamin-E-Gehalt in photosynthetisierenden Organismen ausgehen.

Hier scheint DellaPennas Ansatz die Möglichkeit aufzuzeigen, transgene Pflanzen zu erzeugen, die α -Tocopherol **1** in

größeren Mengen produzieren. Es ist aber wahrscheinlich naiv zu glauben, daß derartige Organismen sehr bald zur Verfügung stehen werden, da offensichtlich eine beträchtliche Zahl enzymatischer Reaktionen dereguliert werden muß. De facto haben DellaPenna et al. lediglich die letzte, einfachste Reaktion der Tocopherol-Biosynthese modifiziert, die an sich wenig mit der Regulation der vorangehenden Stufen zu tun hat. Darüber hinaus ist nicht ganz nachvollziehbar, warum ihr Ansatz so hervorragende Ergebnisse lieferte. Denn eigentlich ist es recht unwahrscheinlich, daß strukturell und funktionell so verschiedene Enzyme wie HPPDase und γ -TMT auf dem gleichen Operon lokalisiert sind.

Es ist klar, daß der Gehalt irgendeines Organismus an **1** nur dann wesentlich erhöht werden kann, wenn es gelingt, „frühe“ enzymatische Reaktionen seiner Biosynthese zu steuern oder die entsprechenden Enzyme zu exprimieren. Die Entwicklung einer Pflanze, die einen lipophilen Metaboliten in ökonomisch nützlichen Mengen produziert, den sie normalerweise nur in geringen Konzentrationen, sozusagen als Nebenprodukt, erzeugt, erfordert wahrscheinlich eine langfristige gemeinsame Strategie von Pflanzenbiologen, Chemikern und Molekularbiologen, insbesondere um die Konsequenzen der Überexprimierung wesentlicher Gene auf den Lebenszyklus der betreffenden Pflanze zu evaluieren. Kurzfristig gesehen scheint eine Kombination molekularbiologischer Techniken mit chemischen Verfahren am erfolgversprechendsten.

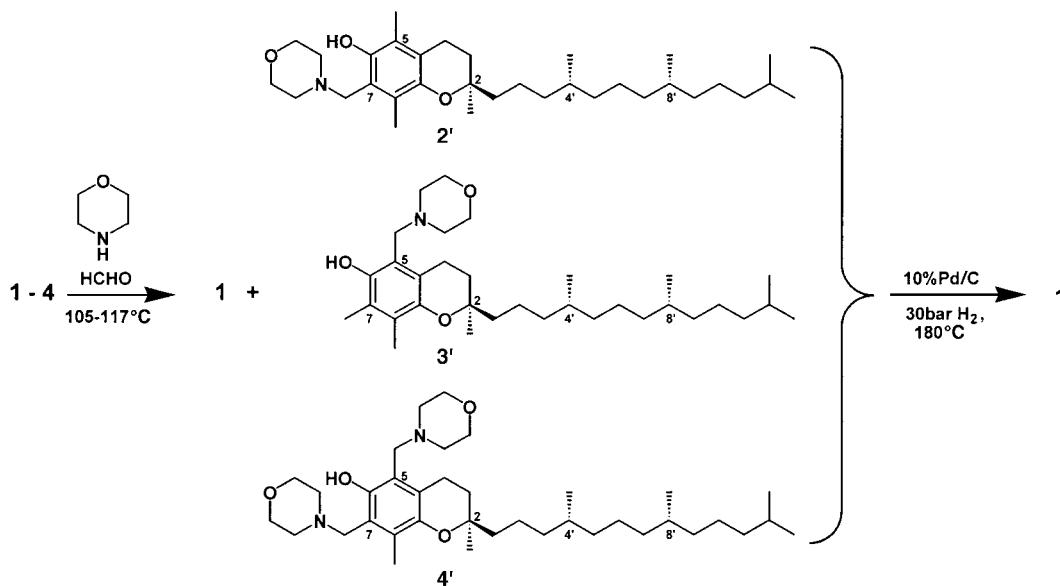
International Edition: *Angew. Chem. Int. Ed.* **1999**, *38*, 2715–2716

Stichwörter: Cyanobakterien • Gentechnik • Methyltransferasen • Tocopherole • Vitamine

[1] A. Kamal-Eldin, L.-A. Appelqvist, *Lipids* **1996**, *31*, 671–701; *Vitamine, Physiologie, Pathophysiologie, Therapie* (Hrsg.: H. K. Biesalski, J. Schrezenmeir, P. Weber, H. E. Weiss), Thieme, Stuttgart, **1997**.

[2] G. W. Burton, K. U. Ingold, *Acc. Chem. Res.* **1986**, *19*, 194–201.

[3] J. Kreimayer, M. Schmidt, *Pharm. Ztg.* **1998**, *143*, 823–828.

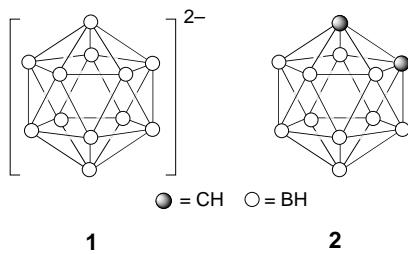


- [4] L. F. Tietze, J. Görlicher, *Synthesis* **1997**, 877–885; E. Mizuguchi, K. Achiwa, *Tetrahedron: Asymmetry* **1993**, 4, 2303–2306; T. Sugai, N. Watanabe, H. Ohta, *Tetrahedron: Asymmetry* **1991**, 2, 371–376; S. Takano, Y. Shimazaki, K. Ogazawara, *Heterocycles* **1990**, 31, 917–921.
- [5] T. Netscher, *Chimia* **1996**, 50, 563–567.
- [6] M. Eggersdorfer, *Wirkstoffe* **1996**, 24–32 (Broschüre der BASF Aktiengesellschaft).
- [7] D. Shintani, D. DellaPenna, *Science* **1998**, 282, 2098–2100.
- [8] A. Stocker, H. Fretz, H. Frick, A. Rüttimann, W.-D. Woggon, *Bioorg. Med. Chem.* **1996**, 4, 1129–1134; A. Stocker, T. Netscher, A. Rüttimann, R. K. Müller, H. Schneider, L. J. Todaro, G. Derungs, W.-D. Woggon, *Helv. Chim. Acta* **1994**, 77, 1721–1737; A. Stocker, A. Rüttimann, W.-D. Woggon, *Helv. Chim. Acta* **1993**, 76, 1729–1738.
- [9] A. d'Harlingue, B. Camara, *J. Biol. Chem.* **1985**, 260, 15200–15203.
- [10] S. R. Norris, T. R. Barette, D. DellaPenna, *Plant Cell* **1995**, 7, 2139–2143.
- [11] R. K. Müller, H. Schneider (Hoffmann-LaRoche AG), EP-B 0 735 033 A1, **1996**.

Ikosaedrische Bausteine: Weisen sie den Weg zu Dendrimeren mit zwölf primären Verzweigungen?

Catherine E. Housecroft*

Einer der frühen Fortschritte in der Borcluster-Chemie war die strukturelle Charakterisierung von $[B_{12}H_{12}]^{2-}$ durch Lipscomb et al.^[1] und damit einhergehend die Bestätigung der Ikosaedersymmetrie dieses Käfigs. Im Verlauf der letzten 40 Jahre wurde eine erstaunliche Fülle von borhaltigen Clustern, inklusive solcher mit Carboran-Grundgerüsten, synthetisiert,^[2, 3] die den Theoretikern Anlaß zu scheinbar niemals endenden Fragen bezüglich der Bindungsverhältnisse und der Elektronenbilanz gegeben haben. Die ikosaedrischen Cluster $[B_{12}H_{12}]^{2-}$ **1** und $1,2-C_2B_{10}H_{12}$ **2** sowie die 1,7- und 1,12

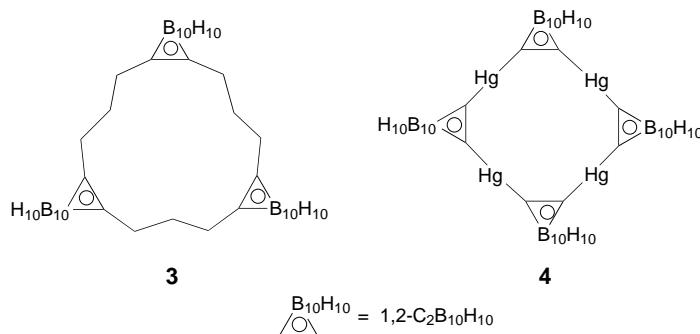


-Isomere von **2** gehören nach wie vor zu den am häufigsten untersuchten Clustern; ihre große Stabilität hat die Entwicklung einer breit gefächerten Chemie ermöglicht.

Bei der Mehrzahl der beschriebenen Verbindungen handelt es sich allerdings um Einzelkäfige. Über eine Mehrfachfunktionalisierung von Boran- und Carboranclustern wurde relativ selten berichtet. Frühe Beiträge hierzu waren Chlorierungen und Bromierungen von $[B_{10}H_{10}]^{2-}$ und $[B_{12}H_{12}]^{2-}$.^[4] In den letzten Jahren wurden weitere Erfolge erzielt, z.B. in den Arbeitsgruppen von Hawthorne (die Permethylierung von $C_2B_{10}H_{12}$, $Me_2C_2B_{10}H_{10}$ und verwandten Verbindungen sowie

die Synthese von $1,2-C_2H_2B_{10}(CHCl_2)_{10}$),^[5–7] Paetzold (perbromierte, -iodierte und -methylierte Derivate der Azaborane $4-ClC_6H_4NB_9H_9$ und $MeNB_{11}H_{11}$),^[8] Wilbur (die Periodierung von 1,2- und 1,7- $C_2B_{10}H_{12}$ und von Carboranen mit einem Kohlenstoffatom)^[9] und Michl (die Synthese von $[CB_{11}Me_{12}]^-$ und dem stabilen Radikal $CB_{11}Me_{12}^\cdot$, dem ersten isolierten neutralen metallfreien Borcluster-Radikal).^[10, 11] Die Mehrfachfunktionalisierung des Käfigs ist ein bedeutender Schritt vorwärts und sollte einen Durchbruch bei der Entwicklung eines neuen Gebiets der Boran- und Carborancluster-Chemie ermöglichen, in dem Borcluster zu einem festen Bestandteil der supramolekularen Chemie werden könnten.

Bisher hat die Funktionalisierung der Kohlenstoffatome von Carboran-Käfigen zu zahlreichen Derivaten geführt, wobei der Einbindung von Clustern in cyclische Anordnungen im Hinblick auf unserer Thematik besondere Bedeutung zukommt. Beispiele sind arenekoppelte Systeme,^[12] ein verwandtes cyclisches Trimer, das von Wade und Mitarbeitern durch Behandlung von $2,6-Br_2H_3C_5N$ mit $1,7-Cu_2-1,7-C_2B_{10}H_{10}$ erhalten wurde,^[13] sowie Makrocyclen vom Typ **3** und **4** aus



der Hawthorne-Gruppe.^[14–16] Besonders interessant ist der Makrocyclus **4**, da er als Wirt für ein Halogenid-Ion fungiert, womit wir einer Zusammenführung von Boran- und supra-

[*] Prof. Dr. C. E. Housecroft

Institut für Anorganische Chemie der Universität
Spitalstrasse 51, CH-4056 Basel (Schweiz)
Fax: (+41) 61-267-1014
E-mail: housecroft@ubaclu.unibas.ch