

Diss. ETH Nr. 10860

**Zur Struktur und Biosynthese
der Tetraetherlipide der Archaea**

ABHANDLUNG

zur Erlangung des Titels
Doktor der Naturwissenschaften
der
EIDGENÖSSISCHEN TECHNISCHEN HOCHSCHULE
ZÜRICH

vorgelegt von
OTTO WILHELM GRÄTHER
Dipl. Chem. Universität Göttingen
geboren am 21. Juni 1964
in Tübingen (Deutschland)

Prof. Dr. D. Arigoni, Referent
PD Dr. B. Jaun, Korreferent

Zürich 1994

Zusammenfassung

Ausgangspunkt der vorliegenden Arbeit war die Beobachtung von P. Galliker, daß die Tetraetherlipide aus *Methanobacterium thermoautotrophicum* Marburg (DSM 2133), welche unter Tween 80 bedingter Streßfermentation gewonnen worden waren, neben der Normalform **4a** auch Homospezies enthalten, die eine zusätzliche Methylgruppe aufweisen [137]. Im Zusammenhang mit der Untersuchung des stereochemischen Verlaufs dieser Methylierung archaeeller Tetraetherlipide wurden folgende Ergebnisse erzielt:

1. Basierend auf den Arbeiten von Huguenin [227] wurde die Synthese von chiral markiertem (2*S*, methyl-*R*)-[methyl-(²H₁,³H₁)]Methionin (**128c**) -ausgehend von (2*S*)-[2-²H₁,2-³H₁]Kaliumacetat ((*S*)-**129**) (F-Wert=21.4, ee ≥96 % *S*) [235]- in drei Stufen realisiert. Die bisher in zwei Stufen beschriebene Herstellung des Ditosylimids **131** aus Methylaminhydrochlorid (**130**) gelang in einem Schritt, indem man ähnliche Bedingungen wählte, wie sie Huguenin in der zweiten Stufe seiner Ditosylimidsynthese angewandt hat: Mit Natriumhydrid als Base wurde **131** bei -25° C in DMF mit 90 % Ausbeute erhalten.

2. Eine Menge von ca. 5 mg chiral markiertem (2*S*, methyl-*R*)-[methyl-(²H₁,³H₁)]Methionin (**128c**) der spezifischen Aktivität (90 mCi/mMol) wurde an eine wachsende Kultur von *M. thermoautotrophicum* Marburg verfüttert. An den erhaltenen Tetraetherlipiden wurde eine totale Einbaurate von 1.6 % bestimmt. Der Kuhn-Roth-Abbau dieser Tetraetherlipide lieferte mit einer Ausbeute von 46 % Essigsäure, deren chiral markierte Methylgruppe die (*R*)-Konfiguration aufwies (F-Wert=71.6, entsprechend einem ee ca. 65 % *R*). Bezogen auf das verwendete Methionin verläuft somit die Übertragung der Methylgruppe auf die Tetraetherlipide gesamthaft unter Retention der Konfiguration. Der ursprünglich von Galliker [137] für diese Methylierung vorgeschlagene Radikalmechanismus wird in diesem Zusammenhang diskutiert.

3. Die beiden Derivate **B** und **D** wurden aus einem Tetraetherlipidpräparat von *M. thermoautotrophicum* Marburg hergestellt, das laut DC und ¹³C-NMR-Spektrum einheitlich erschien, abgesehen von geringen Mengen der Homospezies, die unter Punkt 3 unberücksichtigt bleiben sollen. Das Te-

traetherditosylat **B** lieferte unter den Bedingungen der Boord-Reaktion in einer Gesamtausbeute von ca. 65 % die Biphytandiylspaltprodukte **99**, **100** und **5a**. Der Bisenoltetraether **D** kann quantitativ zu den entsprechenden Derivaten **101**, **102** und **5a** hydrolysiert werden. Anhand der Spaltprodukte aus den regiospezifischen Etherspaltungen wurde geschlossen, daß die bisanhin mit Formel **4a** beschriebenen Tetraetherlipide aus *M. thermoautotrophicum* in Wirklichkeit eine Mischung der beiden regioisomeren Tetraetherverbindungen **4a** und **103** darstellen. In Anlehnung an das Nomenklatursystem von Nishihara et al. [156] wurde für **103** der Name Isocaldarchaeol vorgeschlagen.

4. In Erweiterung dieser Arbeiten wurde an zwei repräsentativen Vertretern der Archaea -*Thermoplasma acidophilum* und *Sulfolobus solfataricus*- belegt, daß die Regioisomerie der Tetraetherlipide in dieser Domäne allgemein auftritt. Anhand der Ausbeuten der Produkte **99-102** und **5a** aus den beiden regiospezifischen Etherspaltungen ergab sich ein Verhältnis von 55:45 für Isocaldarchaeol- zu Caldarchaeollipiden.

5. Zur Bestimmung der Lage der zusätzlichen Methylgruppe im homologen Tetraethermakrozyklus wurde das von Caldarchaeol **4a*** abstammende Spaltprodukt **100*** aus der Boord-Reaktion in fünf bzw. drei Stufen in die beiden Monoalkohole **108*** und **111*** überführt. Nachdem die MS/MS-Technik zur Abklärung der Regiochemie dieser Methylierung versagte, führte die ¹³C-NMR-Spektroskopie zum Erfolg: In einer Meßreihe mit steigenden Anteilen des Verschiebungs-Reagenz' Eu(fod)₃ ließ sich die Konstitution von **108*** als 20-Homobiphytan-1-ol und die von **111*** als 13 Homobiphytan-1-ol bestimmen. Im Rahmen der Genauigkeit der verwendeten NMR-Methode waren die beiden Monoalkohole **108*** und **111*** frei vom jeweils anderen Regioisomer. Aus diesen Resultaten folgt, daß **4a** regiospezifisch in primär verknüpften Phytanylhälften methyliert wird. Homoisocaldarchaeole (z. B. **103***) sind überwiegend (ca. 5,5:1) in der primär verknüpften C₄₀-Kette methyliert.

6. In sämtlichen im Rahmen der vorliegenden Arbeit durchgeführten Analysen von Biphytandiylderivaten ergaben sich keinerlei Hinweise auf doppelt methylierte C₄₀-Ketten. Aus dem FAB-Massenspektrum des Bisenoltetraethers **D** ergaben sich allerdings Hinweise, daß in *M. thermoautotrophicum* Marburg neben **4a*** und **103*** auch Bishomotetraetherspezies vorkommen. Während sich im Falle des Bishomocaldarchaeols die antiparallele Anordnung der Homobiphytandiylketten aus dem Ergebnis der mit den

Monoalkoholen **108*** und **111*** durchgeführten ^{13}C -NMR-Experimenten ableitet, ergeben sich beim Bishomoisocaldarchaeol neue regiochemische Aspekte, die im Rahmen dieser Arbeit nicht mehr erörtert werden konnten.

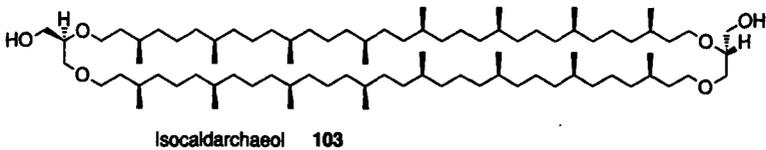
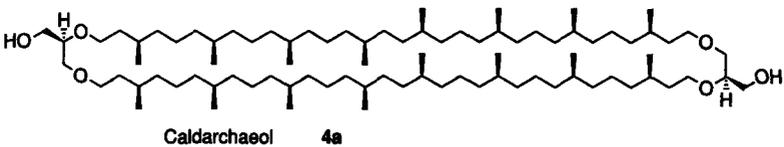
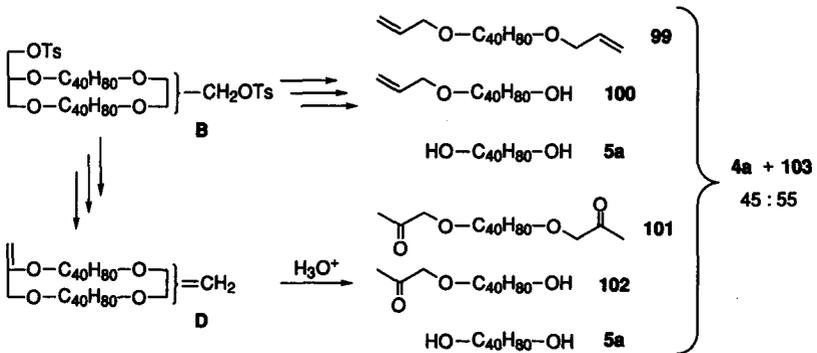
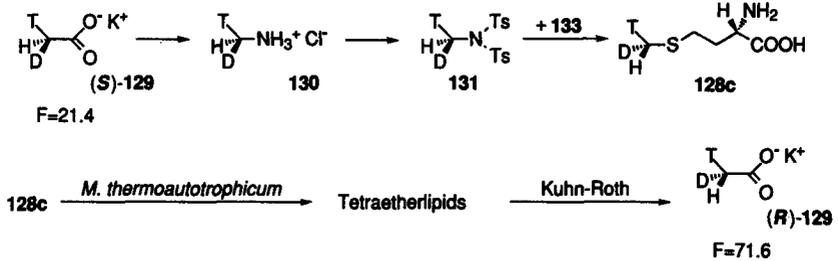
7. Bei Fermentationen unter Ausschluß von Tween 80 konnten in den Tetraetherlipiden aus *M. thermoautotrophicum* Marburg ca. 25 % der Tetraether-Homospezies nachgewiesen werden. Aufgrund der „Isoprenoidverdünnung“ liegt dieser Prozentsatz an Homospezies kaum über der Nachweisgrenze für ^{13}C -NMR-Experimente. Erst die verbesserte FAB-MS-Technik ermöglichte zuverlässige Analysen. *M. thermoautotrophicum* Marburg ist also auch unter normalen Bedingungen in der Lage, seine Tetraetherlipide zu methylieren. Dem Detergens Tween 80 kann somit nur eine stimulierende Rolle zugeschrieben werden.

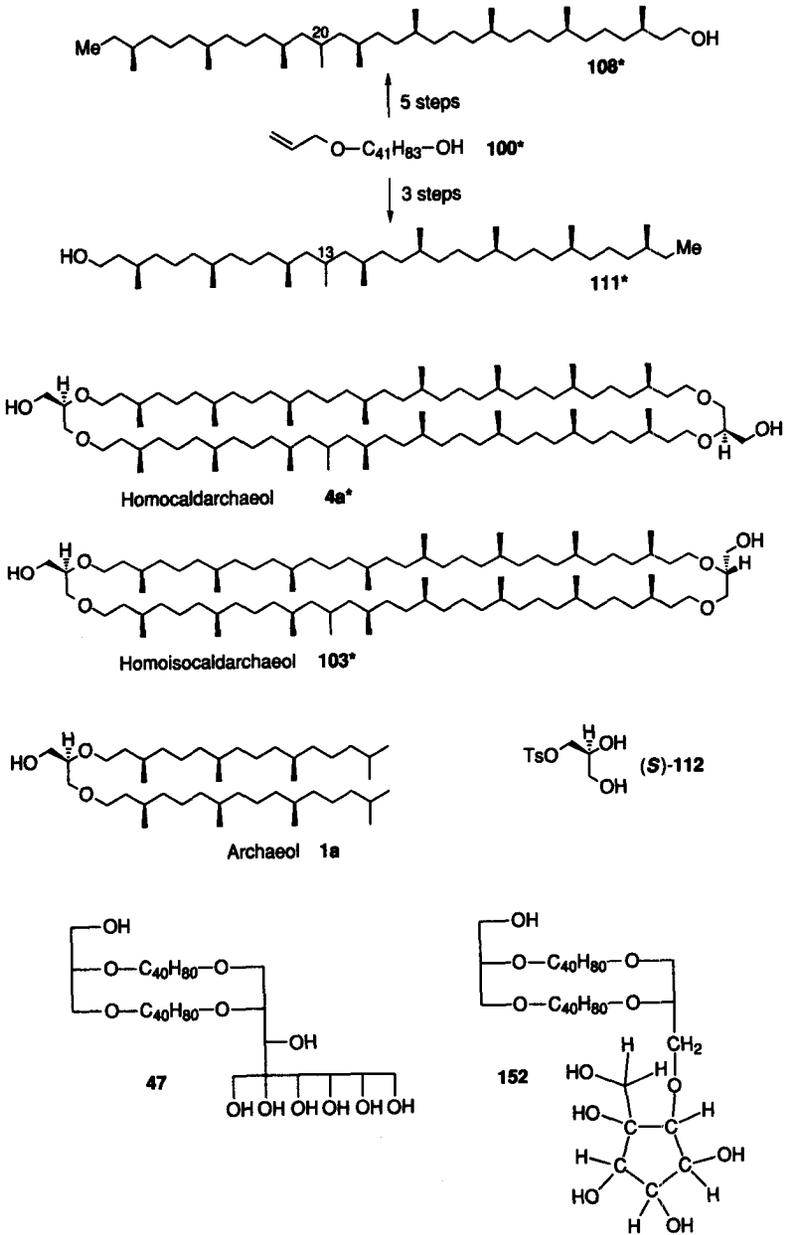
8. Für die Dietherlipide **1a** konnten weder massenspektrometrisch noch durch Radioaktivitätsmessungen nach Einbauversuchen irgendwelche Hinweise auf Homoarchaeollipide erhalten werden.

9. Die absolute Konfiguration der Glyceroleinheiten archaeeller Etherlipide wurde durch ein weiteres Experiment abgesichert: Durch Behandlung des natürlichen, ditosylierten Regioisomerenmischens der Tetraetherlipide aus *M. thermoautotrophicum* Marburg mit Bortrichlorid wurde enantiomerenreines (2*S*)-Tosylglycerol (*sn*-1-Tosylglycerol) ((*S*)-**112**) ($[\alpha]_{\text{D}} = +9.4^\circ$; $c=3$, MeOH) erhalten. In unabhängigen Experimenten mit synthetischen Dietherlipiden **1c** wurde belegt, daß das betreffende Stereozentrum bei der Etherspaltung mit Bortrichlorid unangetastet bleibt. Für die Glyceroleinheiten der archaeellen Diglyceroltetraether-Lipidkerne vom Caldarchaeol- sowie vom Isocaldarchaeoltyp folgt somit die (2*R*)-Konfiguration.

10. Für die Calditoltetraetherlipide der Ordnung *Sulfolobales* wurde bereits früher die Struktur **47** abgeleitet [132]. Bei der Überprüfung der Calditoltetraetherlipide aus *Sulfolobus solfataricus* auf die bei Glycerol-dialkylglycerol-tetraethern vorkommende Regioisomerie hin, stieß man bei den spektroskopischen Daten auf Diskrepanzen mit Literaturangaben. Die Interpretation der ein- und zweidimensionalen NMR-Daten unseres Lipidpräparates resultierte in der neuen Struktur **152**. NOE-Experimente erlaubten zusätzlich eine gewisse Aussage zur relativen Konfiguration der fünf chiralen Zentren am Cyclopentanring. Entgegen anders lautenden Literaturberichten lassen sich die Calditoltetraetherlipide nicht durch Perjodspaltung und anschließende reduktive Aufarbeitung in Glycerol-dialkyl-

glycerol-tetraether überführen. Die Anordnung der Glyceroleinheiten bei den Calditoltetraetherlipiden **152** bleibt somit bis auf weiteres ungeklärt. Die in Formel **152** gezeigte antiparallele Anordnung der Glyceroleinheiten basiert auf Langworthys willkürlicher Annahme [45].





Summary

The stereochemical course of an unusual methylation of the tetraether lipids from *M. thermoautotrophicum* Marburg (DSM 2133), discovered by Galliker [137] after chemical degradation of tetraether lipids isolated from Tween 80 caused stress fermentation was investigated and the following results were obtained:

1. According to the work from Huguenin [227] the synthesis of (2*S*, methyl-*R*)-[methyl-(²H₁,³H₁)]methionine (**128c**) carrying a chiral methyl group was realized in three steps starting from chiral (2*S*)-[2-²H₁,2-³H₁]potassium acetate ((*S*)-**129**) (F-value=21.4, ee ≥96 % *S*) [235]. Huguenin's two step procedure for the preparation of the ditosyl imid **131** from methylamine hydrochloride (**130**) was shortened to one step using similar reaction conditions: with sodium hydride **131** was provided at -25 ° C in DMF in 90 % yield.

2. A sample of ca. 5 mg chiral (2*S*, methyl-*R*)-[methyl-(²H₁,³H₁)]methionine (**128c**) of the specific activity (90 mCi/mMol) was fed to a growing culture of *M. thermoautotrophicum* Marburg. An total incorporation rate of 1.6 % was determined for the tetraether lipids. The Kuhn-Roth-Oxidation of these lipids provided acetic acid carrying a chiral labelled methyl group which shows the (*R*)-configuration (F-value=71.6, ee ca. 65 % *R*). Thus the methylation occurs with net retention of the configuration relative to the labelled methionine used. A radical mechanism for the additional methylation, originally suggested by Galliker [137], is discussed in this context.

3. The derivatives **B** and **D** were prepared from a specimen of tetraether lipids of *M. thermoautotrophicum* Marburg which appeared homogeneous by TLC and ¹³C-NMR-spectroscopy besides small amounts of the homo-species which are not considered under item 3. The Boord-elimination reaction with the ditosylate **B** generated the biphytandiyl-derivatives **99**, **100** and **5a** in a total yield of 65 %. Similarly the bisenoltetraether **D** was quantitatively hydrolyzed to **101**, **102** and **5a**. The products of the regiospecific ether cleavage led to the conclusion that the tetraether lipids from *M. thermoautotrophicum*, hitherto described by structure **4a**, are indeed a mixture of the regioisomeric compounds **4a** and **103**. According to the nomenclature of Nishihara et al. [156] **103** was named isocaldarchaeol.

4. To extend our work it was shown with the two representative archaeal species *Thermoplasma acidophilum* and *Sulfolobus solfataricus* that the regioisomerism of the tetraether lipids is a common feature in the archaea domain. For isocaldarchaeol- and caldarchaeol lipids a ratio of 55:45 was calculated from the yields of the products of the regiospecific ether cleavage **99-102** and **5a**.

5. To determine the position of the additional methyl group in the homologous tetraether macrocycle the asymmetric product **100*** from the Boord-reaction was converted into the corresponding monoalcohols **108*** and **111*** in five and three steps, respectively. Whereas the two monoalcohols could not be differentiated by the MS/MS-technique, the ^{13}C -NMR-spectroscopy was successful: In a series of experiments with increasing proportions of the shift-reagent $\text{Eu}(\text{fod})_3$ the constitution of **108*** was established as 20-homobiphytan-1-ol whereas that of **111*** was determined as 13-homobiphytan-1-ol. The samples of the monoalcohols **108** and **111** appeared free from the corresponding regioisomer within the precision of the NMR-technique used. From these results it follows that **4a** is regiospecific methylated in the primary linked phytanyl half of the C_{40} -alkyl chain. Homoisocaldarchaeol lipids (i. e. **103***) are also methylated mainly (about 5.5:1) in the primary linked biphytandiyl units.

6. In the samples of biphytandiyl derivatives analyzed during this work no indication was obtained for the presence of doubly-methylated C_{40} -alkyl-chains. However the FAB-mass-spectrum of the bisenoltetraether **D** shows that the tetraether lipids of *M. thermoautotrophicum* Marburg besides **4a*** and **103*** contain bishomotetraether species. In the case of the bishomocaldarchaeol the antiparallel arrangement of the homobiphytandiyl units follows from the results out of the ^{13}C -NMR-investigation of the monoalcohols **108*** and **111***. The methylation of homoisocaldarchaeol **103*** involves additional regiochemical aspects which were not investigated during this work.

7. Samples of tetraether lipids from *M. thermoautotrophicum* Marburg grown under the exclusion of Tween 80 contained approximately 25 % of the homospecies. Due to the "isoprenoid dilution" such a proportion of homospecies could hardly be detected in ^{13}C -NMR-experiments. And only, the improved FAB-MS-technique allowed reliable analysis. *M. thermoautotrophicum* Marburg is capable of methylating its tetraether lipids under normal conditions and the detergent Tween 80 plays only a stimulating role.

8. The occurrence of homoarchaeol lipids has been ruled out both by MS-methods and the negative results of incorporation experiments with samples of radioactive labelled methionine

9. The absolute configuration of the glycerol units of archaeal ether lipids was verified by an independent method: Treatment of the naturally derived ditosylated mixture of regioisomeric tetraether lipids from *M. thermoautotrophicum* Marburg with boron trichloride yielded enantiomeric pure (2*S*)-tosyl glycerol (*sn*-1-tosyl glycerol) ((*S*)-**112**) ($[\alpha]_D^{25} = +9.4^\circ$; $c=3$, MeOH). Independent experiments with diether lipids **1c** have shown that the glycerol stereocenter of the tetraether lipids remains unchanged during the ether fission by boron trichloride. Consequently, the glycerol units of archaeal diglycerol tetraether lipid cores possess the (2*R*)-configuration in both the caldarchaeol- and isocaldarchaeol type.

10. Structure **47** was established earlier for the calditol tetraether lipids of the order *Sulfolobales* [132]. During an examination of the calditol tetraether lipids from *Sulfolobus solfataricus* several differences were detected in comparison with spectral data reported in the literature. Interpretation of the one- and two-dimensional NMR-data of our own lipid sample led to the new structure **152**. A probable relative configuration of the chiral centers of the cyclopentyl ring rests on NOE-difference-experiments. Contrary to literature reports calditol tetraether lipids are not convertible into glycerol dialkyl glycerol tetraethers by periodate cleavage and reductive workup. The arrangement of the glycerol units in the calditol tetraether lipids **152** therefore remains undetermined. The antiparallel arrangement shown in **152** rests upon Langworthys arbitrary suggestion [45].