

DISS. ETH NO. 7535

BIOSYNTHESIS OF PHYTOSTEROLS
IN TREBOUXIA SP.: STERIC COURSE
OF THE C-ALKYLATION STEP

D I S S E R T A T I O N

submitted to the
SWISS FEDERAL INSTITUTE OF TECHNOLOGY
ZURICH

for the degree of Doctor of Natural Sciences

Presented by
M I L A N M. M I H A I L O V I C
B. Sc. Chem. University of Belgrade
born May 3, 1954
citizen of Yugoslavia

Accepted on the recommendation of
Prof. Dr. D. Arigoni, referee
Prof. Dr. V. Prelog, co-referee

Zürich 1984

Summary

In connection with studies on the methylation of the side chain double bond in the biosynthesis of phytosterols by the green algal species Trebouxia, the following results were obtained :

- 1) Both (24S)- and (24R)-cyclolaudenols were synthesized from the allylic propionates 37a and 37b by the application of a stereoselective [3.3] sigmatropic (Claisen) rearrangement. Comparison of their spectra with those of authentic cyclolaudenol showed that the latter compound has the (24S)-configuration.
- 2) Synthesis of several samples of (24S)- and (24R)-cyclolaudenols specifically labelled with deuterium and/or ^{13}C , allowed an unequivocal assignment of the ^{13}C -NMR signals for the carbon atoms C-24, C-25, C-26, C-27 and C-28 in this two epimers.
- 3) [27- ^{13}C]-Cycloartenol and [24- ^2H , 27- ^{13}C]-cycloartenol were prepared in four steps from cycloartenyl acetate. Incubation of the singly labelled compound with Trebouxia microsomes gave cyclolaudenol labelled at C-27 and 24-methylenecycloartanol specifically labelled in the Si-methyl group attached to C-25. Incorporation of the doubly labelled cycloartenol into 24-methylenecycloartanol has revealed the occurrence of a 1,2-hydride shift in the biosynthesis of 24-methylenecycloartanol.
- 4) A method for the stereospecific conversion of the methylene group of 24-methylenecycloartanol and cyclolaudenol, doubly labelled with tritium and deuterium, into a chiral methyl group was developed (Schemes 37 and 40). Using this method, the configuration of the doubly labelled 24-methylenecycloartenol derived from

(S)-[³H, ²H-methyl]-SAM was established.

These data together with additional results, obtained in collaboration with Dr. W. Guilford, provide a complete picture for the stereochemical course of the parallel reactions which lead from cycloartenol to cyclolaudenol and to 24-methylene-cycloartanol. The picture obtained here matches in every detail the one observed previously for similar alkylation process responsible for formation of ergosterol in yeast and Claviceps paspali.

Zusammenfassung

Es wurde die Methylierung der Steroid-Seitenkette in der Biosynthese von Phytosterinen durch die Grünalge Trebouxia untersucht.

Die Resultate sind:

1) Durch eine [3.3]-sigmatrope Umlagerung wurde aus den allylischen Propionaten 37a und 37b (24S)- und (24R)-Cyclolaudenol hergestellt. Der Vergleich der NMR-Spektren mit jenem des natürlichen Cyclolaudenol zeigte, dass diesem die (24S)-Konfiguration zukommt.

2) Die Synthese verschiedener Proben von (24S)- und (24R)-Cyclolaudenol, welches mit Deuterium und/oder ^{13}C -markiert war, erlaubte eine eindeutige Zuordnung der Signale im ^{13}C -NMR Spektrum für die Kohlenstoffatome C-24, C-25, C-26, C-27 und C-28 in diesen Epimeren.

3) [$27\text{-}^{13}\text{C}$]- und [$24\text{-}^2\text{H}$, $27\text{-}^{13}\text{C}$]-Cycloartenol wurde in vier Stufen aus Cycloartenol synthetisiert.

Inkubation der einfach markierten Verbindung mit Trebouxia Mikrosomen, ergab am C-27 markiertes Cyclolaudenol und 24-Methylencycloartanol, dass an der Si-Methylgruppe spezifisch markiert war. Durch Einbau von doppelt markiertem Cycloartenol in 24-Methylencycloartanol konnte ein 1,2-Hydridwanderung in der Biosynthese von 24-Methylencycloartanol nachgewiesen werden.

4) Es wurde eine Methode für die stereospezifische Umwandlung der Methylengruppe von Cyclolaudenol und 24-Methylencycloartanol in eine Methylgruppe und deren Abbau zu Essigsäure entwickelt. Durch Anwendung dieser Methode an doppelt

indizierten Verbindungen konnte die Konfiguration von 24-Methylencycloartanol, welches aus (S)-[³H,²H-Methyl]-SAM entstanden war, ermittelt werden.

Diese Fakten, zusammen mit zusätzlichen Resultaten, die in Zusammenarbeit mit Dr. W. Guilford erreicht wurden, ergeben ein vollständiges Bild des stereochemischen Ablaufes der parallelen Reaktionen, die von Cycloartenol zu Cyclolaudenol und zu 24-Methylencycloartanol führen. Dieses Bild entspricht völlig demjenigen der Bildung von Ergosterin bei Hefe und Claviceps paspali.