

ANGEWANDTE CHEMIE

FORTSETZUNG DER ZEITSCHRIFT »DIE CHEMIE«

HERAUSGEGEBEN VON DER GESELLSCHAFT DEUTSCHER CHEMIKER

75. JAHRGANG

NR. 23 · SEITE 1145–1188

7. DEZEMBER 1963

Neuere chemische und biochemische Entwicklungen auf dem Vitamin-B₁₂-Gebiet

von prof. dr. k. bernhauer, dr. otto müller und dr. fritz wagner
lehrstuhl für biochemie der technischen hochschule stuttgart

- A. Nomenklatur
- B. Natürliche Corrinoide und ihre biogenetischen Beziehungen
- C. Synthesen auf dem Vitamin-B₁₂-Gebiet
 - I. Der Corrin-Ring
 - II. Partialsynthese von Corrinoiden
 - 1. Inkomplette Corrinoide
 - 2. Komplette Corrinoide
- D. Coenzym-Formen der Corrinoide
 - I. Vorkommen und Isolierung der Coenzyme
 - II. Eigenschaften und Abbau der Coenzyme
 - III. Struktur der Coenzyme
 - IV. Chemische Partialsynthese von Corrinoid-Coenzymen und Analogen
 - V. Sonstige Corrinoide mit Kobalt-Kohlenstoff-Bindung

- VI. Corrinoide mit Kobalt-Schwefel-Bindung
- VII. Biosynthese der Corrinoid-Coenzyme
- E. Enzymchemische Funktionen des Vitamins B₁₂
 - I. Intramolekulare Umlagerungen unter Beteiligung der Cobamid-Coenzyme
 - 1. Umwandlung von Glutamat in Methylaspartat
 - 2. Umwandlung von Succinyl-CoA in Methylmalonyl-CoA
 - 3. Umwandlung von 1,2-Diolen in Desoxyaldehyde
 - II. Abbau von Lysin zu Fettsäuren und Ammoniak
 - III. Rolle des Vitamins B₁₂ bei der Methionin-Synthese
- F. Molekularbiologie des Vitamins B₁₂
 - I. Kobaltatom und Corrin-Ring
 - II. Die Aminopropan-2-ol-Gruppe
 - III. Die Säureamid-Gruppen
 - IV. Der Nucleotidteil
 - V. Die 5'-Desoxyadenosyl-Gruppe der Coenzym-Formen

In den etwa fünfzehn Jahren seit der Isolierung des kristallisierten Vitamins B₁₂ durch *Folkers* und Mitarbeiter [1] in den USA und *E.L. Smith et al.* [1a] in England sind etwa 8000 Veröffentlichungen erschienen (Zusammenfassungen siehe [1b–8]). Das Arbeitsgebiet hat in jüngster Zeit vor allem durch chemische Partialsynthesen, die Entdeckung der Coenzym-Formen der Vitamin-B₁₂-Gruppe und ihre Strukturaufklärung neue Impulse erhalten.

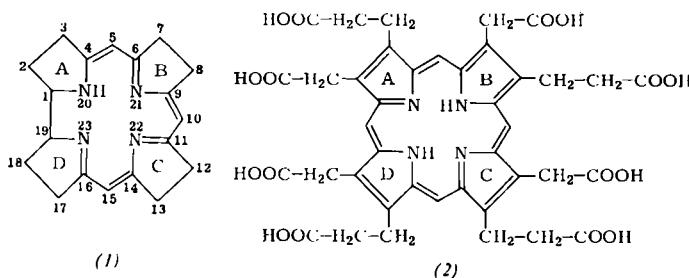
- [1] *E.L. Rickes, N.G. Brink, F.R. Koniuszy, T.R. Wood u. K. Folkers*, *Science (Washington)* 107, 396 (1948).
- [1a] *E.L. Smith u. L.F.J. Parker*, *Biochem. J.* 43, Proc. VIII (1948).
- [1b] *H. Knobloch*: *Chemie und Technik der Vitamine*. 3. Aufl., Enke-Verlag, Stuttgart 1955, S. 266.
- [2] *W. Stepp, J. Kihlau u. H. Schroeder*, *Die Vitamine und ihre klinische Anwendung*, Enke-Verlag, Stuttgart 1957, Bd. 2, S. 557.
- [3] *Vitamin B₁₂ und Intrinsic Factor*, 1. Europ. Symposium, Hamburg 1956, Enke-Verlag, Stuttgart 1957.
- [4] *W. Friedrich u. K. Bernhauer*: *Biologische und Biochemische natürlichen Vitamin-B₁₂-Analoga*, in *K. Fr. Bauer*: *Medizinische Grundlagenforschung*, Thieme-Verlag, Stuttgart 1959, Bd. 2, S. 662.
- [5] *E.L. Smith*: *Vitamin-B₁₂. Methuen u. Co. Ltd.*, London 1960.
- [6] *Vitamin B₁₂ und Intrinsic Factor*, 2. Europ. Symposium, Hamburg 1961, Enke-Verlag, Stuttgart 1962.
- [7] *W. Friedrich*, *Chemie des Vitamins B₁₂*, in *R. Ammon u. W. Dirscherl*: *Fermente, Hormone, Vitamine*, Thieme-Verlag, Stuttgart, 3. Bd., in Vorbereitung.

A. Nomenklatur [9, 10]

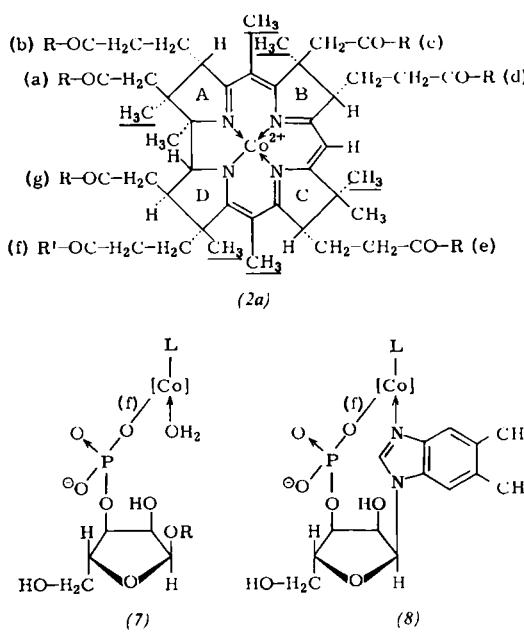
Vitamin B₁₂ enthält einen als **Corrin** (1) bezeichneten Makroring mit vier N-Atomen. Verbindungen mit diesem Ringsystem nennt man **Corrinoide**. Alle bisher in der Natur aufgefundenen Corrinoide enthalten Kobalt als Zentralatom sowie Essigsäure- und Propionsäure-Gruppen in der gleichen Anordnung wie in den Porphyrinen vom Typ III, vor allem dem Uroporphyrin III (2), doch steht in den Corrinoiden am Ring C statt des Essigsäure-Restes eine Methylgruppe.

Die **Cobyrynsäure** (3) enthält sechs zusätzliche Methylgruppen, die in der Formel des Grundgerüstes (2a) [*] unterstrichen sind, und sechs Doppelbindungen. Von

- [7a] Conference on Vitamin-B₁₂-Coenzymes, New York, April 1963; Ann. New York Acad. Sci., im Druck.
- [8] Zusammenfassende Artikel über Vitamin B₁₂ in den jährlichen Periodica, z. B. Ann. Rev. Biochem., Vitamins and Hormons, Ann. Rev. Microbiol. usw.
- [9] IUPAC Nomenclature of Biological Chemistry, J. Amer. chem. Soc. 82, 5582 (1960).
- [10] *E.L. Smith* in [6], S. 764.
- [*] Für das Ringsystem (2a) verwenden wir die Kurzbezeichnung [Co].



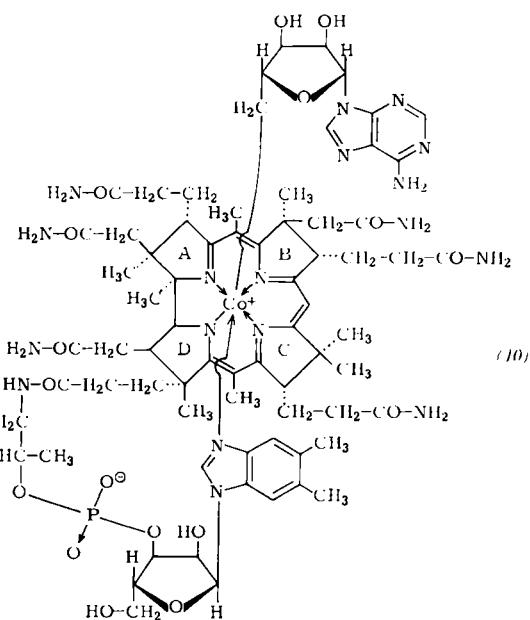
der Cobyrinsäure aus können alle weiteren Verbindungen dieser Klasse benannt werden. Für die wichtigsten Substanzen [Formeln (3) bis (10)] wurden jedoch Kurzbezeichnungen (Trivialnamen) eingeführt: Sind alle Carboxylgruppen mit Ausnahme der f-ständigen amidiert, so liegt die Cobysäure (Faktor V_{1a}) (4) [10] vor. In der Cobinsäure (5) ist die f-ständige Carboxylgruppe mit D_g-(-)-1-Aminopropan-2-ol amidiert, die anderen Carboxylgruppen sind frei. Im Cobinamid (6) ist die f-ständige Carboxylgruppe mit 1-Aminopropan-2-ol, alle anderen Carboxylgruppen sind mit Ammoniak amidiert. Im Cobamid (7), R = H, ist die freie Hydroxylgruppe des Cobinamids mit 3'-Phospho-D-ribofuranose verknüpft, doch bezeichnet man auch Corrinoide, die eine Imidazolbase, deren zweites N-Atom mit dem Co-Atom koordiniert ist, N-glykosidisch gebunden enthalten, als Cobamide. Sie können eine Benzimidazol-, Naphthimidazol-, Imidazol- oder Purinbase enthalten. Ist die Base das 5,6-Dimethylbenzimid-



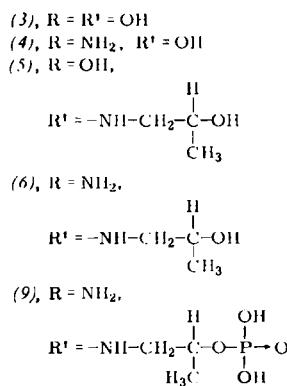
azol, so nennt man die Verbindung Cobalamin (8). Weitere Liganden am Co können Wasser oder Anionen sein: z. B. im Cyano-5,6-dimethylbenzimidazol-cobamid [Cyano-cobalamin, (8), L = CN[⊖]], Hydroxo(Aquo)-adenin-cobamid [(7), L = HO[⊖] oder H₂O, OR = an N-7 gebundenes Adenin], Diaquo-cobinamid oder in der Monocyanomonooaquocobysäure [10a].

[10a] Bezeichnungen wie Benzimidazolyl- oder Adeninyl-cobamidcyanid halten wir – zumindest in der deutschen Nomenklatur – für ungewöhnlich, da die Substitution eine N-glykosidische Bindung betrifft. Ferner werden üblicherweise in der Komplexchemie anorganische Anionen, die als Liganden fungieren, dem Namen vorangestellt, also z. B. als Cyano- und nicht als

Die Corrinoide werden danach charakterisiert und eingeteilt, ob sie eine koordinationsfähige Heteroverbindung als Base enthalten oder nicht. Im ersten Fall kann



man von kompletten, im zweiten von inkompletten Corrinoiden sprechen [11]. Die beiden Gruppen unterscheiden sich deutlich in ihren physikochemischen Eigenschaften [11].



Die „Coenzym-Formen“ der Corrinoide enthalten nicht Wasser oder ein Anion als Liganden, sondern den 5'-Desoxyadenosyl-Rest. Das Vitamin-B₁₂-Coenzym (10) wird daher am einfachsten als Co-(5'-Desoxyadenosyl)-cobalamin bezeichnet.

B. Natürliche Corrinoide und ihre biogenetischen Beziehungen [12]

Kobaltfreie Corrinoide sind bisher noch nicht als Naturprodukte isoliert worden. Biogenetisch entsteht der Corrin-Ring offenbar prinzipiell in der gleichen Weise wie der Porphyrin-Ring. Die Vorstellungen über das Zustandekommen der „umgekehrten“ Anordnung der Essigsäure- und Propionsäure-Gruppen am Ring C der -Cyanid bezeichnet. Siehe H. Remy, Angew. Chem. 71, 515 (1959).

[11] K. Bernhauer u. W. Friedrich, Angew. Chem. 66, 776 (1954).

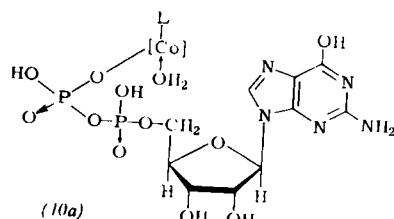
[12] K. Bernhauer, O. Müller u. F. Wagner in [6], S. 37.

Porphyrine [13,14] dürften daher auch für die Corrinoide gelten. Die zusätzlichen Methylgruppen in den Corrinoiden werden durch direkte C-Methylierung eingeführt. Völlig offen ist jedoch, wann dies geschieht, wann die Ringe A und D miteinander verknüpft werden, wann das Co-Atom eingebaut wird und wann die ursprünglich wohl vorhandene Essigsäure-Gruppe an C-12 decarboxyliert wird [14a, 14b]. Der erste Hauptabschnitt der Biogenese der Corrinoide kann formal mit der Bildung der Cobyrinsäure (3) als abgeschlossen gelten, auch wenn diese bisher nicht als Naturprodukt gefunden wurde.

Die Carboxylgruppen a bis e in (3) werden schrittweise amidiert, und die Carboxylgruppe f wird mit dem durch Decarboxylierung von L-Threonin gebildeten D-(–)-1-Aminopropan-2-ol verknüpft. Zwischenprodukte dieser Reaktionen sind Cobrysäure (4), verschiedene stark amidierte Cobinsäuren (5) und nicht vollständig amidierte Cobysäuren. Nach Versuchen in vivo und in vitro mit *P. shermanii* sind Cobyrinsäure (3) und Cobyrinsäure-monoamid wahrscheinlich keine natürlichen Zwischenprodukte [14c]. Die vollständige Amidierung führt zum Cobinamid (6), dem am weitesten verbreiteten Zwischenprodukt der Biogenese der Cobamide.

Manchmal wird ein Nucleotid oder ein Teil desselben mit einer nur teilweise amidierten Cobinsäure verknüpft, wie das Auftreten von Mono-, Di- und Tricarbonsäuren des Cobalamins bei *Propionibacterium shermanii* zeigt. Vermutlich wird die Carboxylgruppe e als letzte amidiert.

Cobinamid (6) wird mit Nucleotiden (z. B. mit α -Ribazol-phosphat bei der Bildung von Vitamin B₁₂) nicht direkt verknüpft. Wohl aber wird α -Ribazol [14d] direkt zur Biosynthese verwendet [15] und konnte in Kulturen von *P. shermanii* gefunden werden [16]. In *Nocardia rugosa* wird Cobinamid-phosphat (9) und Cobinamidpyrophosphat-guanosin (10a) zur Biosynthese von Cobamiden benutzt. Ob das Pyrophosphat



die unmittelbare Vorstufe der Cobamide ist, ließ sich noch nicht entscheiden, denn vergleichende Versuche über die Einwirkung von Aceton-Trockenpräparaten aus *P. shermanii* auf (6), (9) oder (10a) und 5,6-Dimethyl-

[13] K. D. Gibson, M. Matthew, A. Neuburger u. G. T. Tait, Nature (London) 192, 204 (1961).

[14] J. H. Mathewson u. A. H. Corwin, J. Amer. chem. Soc. 83, 135 (1961).

[14a] R. C. Bray u. D. Shemin, J. biol. Chemistry 238, 1501 (1963).

[14b] D. Shemin u. R. C. Bray in [7a].

[14c] K. Bernhauer, P. Rietz u. F. Wagner, unveröffentlicht.

[14d] α -Ribazol = 5,6-Dimethylbenzimidazol-1- α -D-ribofuranosid.

[15] P. Barbieri, G. Boretti, A. Di Marco, A. Migliacci u. C. Spalla, Biochem. biophysica Acta 57, 599 (1962).

[16] H. S. Friedmann u. D. L. Harris, Biochem. biophysic. Res. Commun. 8, 164 (1962).

benzimidazol, α -Ribazol oder α -Ribazol-phosphat ergeben bei der Kombination (9) + α -Ribazol den höchsten Umsatz [17].

Eine andere Möglichkeit ist, daß primär Cobamid (7), R=H, entsteht, daß sich eine Heterobase an dessen Co-Atom anlagert und diese schließlich mit dem Ribose-Anteil glykosidisch verknüpft wird. Für diesen Weg sprechen mehrere Befunde. Eine Entscheidung wird erst mit Hilfe markierter Substrate möglich sein, die jetzt durch chemische Synthese zugänglich geworden sind (siehe unten). Es ist durchaus möglich, daß der Einbau des Nucleotidteils in der Benzimidazol- und Purin-Reihe verschieden verläuft und auch von der Art der Mikroorganismen abhängt.

Die Basen des Nucleotidteils bedingen die große Vielfalt sowie die unterschiedlichen physikochemischen und biologischen Eigenschaften der Cobamide. Die Festigkeit, mit der die Basen an das Co-Atom gebunden sind, nimmt vom 5,6-Dimethylbenzimidazol und linearen Naphthimidazol über die sonstigen Benzimidazole und Imidazole zu den Purinen hin ab, etwa parallel zur biologischen Aktivität der Cobamide [4]. Welche Basen verwertet werden, hängt von ihrer Struktur und von der Art der Mikroorganismen ab [18–20]. Über die Biogenese der Benzimidazol- und Naphthimidazol-Basen kann man sich in Parallelen zur Biosynthese des Benzolteils im Riboflavin eine plausible Vorstellung machen [12]. Bemerkenswert ist, daß *P. shermanii* unter anaeroben Bedingungen fast nur Cobinamid (6) bildet, in Gegenwart geringer Mengen Sauerstoff aber 5,6-Dimethylbenzimidazol und somit Cobalamin (8) synthetisiert [21]. Die Basen der Purin-Reihe entstehen vermutlich zunächst als 9- β -Nucleotide, die dann hydrolytisch zu den freien Basen gespalten werden müssen, um in 7- α -glykosidischer Bindung in das Cobamid-Molekül eingebaut werden zu können.

C. Synthesen auf dem Vitamin-B₁₂-Gebiet [22]

Versuche der letzten Jahre hatten die Synthese des makrocyclischen Corrin-Systems und Partialsynthesen von Corrinoiden zum Ziel, um Zwischenprodukte der Biosynthese des Vitamins B₁₂ oder Verbindungen mit neuen biologischen Eigenschaften zu gewinnen.

I. Der Corrin-Ring

Zur Synthese des Corrins und seiner Derivate wurden mehrere Wege eingeschlagen. Todd und Mitarbeiter [23,24] studierten die Reaktionen von Δ^1 -Pyrrolin-1-oxyden, die durch Kondensation mit 2-Methyl- Δ^1 -pyrrolin-1-oxyd an seiner aktivierten Methylgruppe Dipyrrolinylmethan-Derivate ergeben und in Gegenwart von starken Basen zu 2,2'-Dipyrrolidinyl-Derivaten di-

[17] F. Wagner, unveröffentlichte Versuche, Stuttgart 1962.

[18] S. K. Kon u. J. Pawelkiewicz, 4. Intern. Congr. Biochem., Pergamon Press, London 1959, Vol. XI, S. 115.

[19] D. Perlman, Adv. appl. Microbiol. 1, 87 (1959).

[20] D. Perlman, J. M. Barrett u. P. W. Jackson in [6], S. 58.

[21] US.-Pat. 2951017 (30. Aug. 1960), Erf.: J. D. Speedie u. G. W. Hull.

[22] Zusammenfassung früherer Ergebnisse siehe [5].

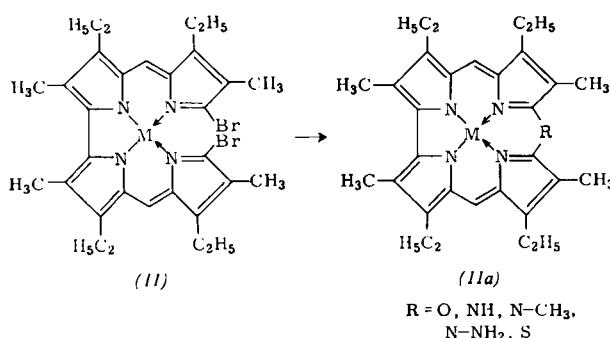
[23] Zusammenfassung siehe A. W. Johnson in [6], S. 1.

[23a] A. W. Johnson, J. T. Kay u. R. Rodrigo, J. chem. Soc. (London) 1963, 2326.

[24] V. M. Clark, Angew. Chem. 74, 881 (1962).

merisiert werden können. Über die paarweise Vereinigung von Dipyrrolinylmethan-Derivaten und 2,2'-Dipyrrolidinyl-Derivaten sowie die Einführung von sechs benachbarten und drei isolierten Asymmetriezentren liegen noch keine Berichte vor.

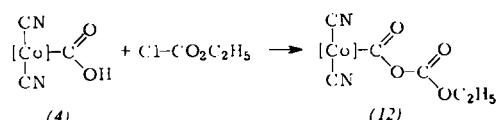
Johnson und Mitarbeiter [23] synthetisierten Pentadehydrocorrin-Derivate. Bis jetzt konnten wohl aus (11) in Gegenwart von Palladium- oder Kupfersalzen makrocyclische Verbindungen der Struktur (11a) dargestellt werden, doch enthalten diese zwischen Ring B und C eine Sauerstoff-, Stickstoff- oder Schwefelbrücke. Die Einführung einer Methinbrücke ist noch nicht gelungen [23a].



Nunmehr sind Versuche zur stereoselektiven Synthese der Ringe A und D des Corrins im Gange [24a].

II. Partialsynthese von Corrinoiden

Nahezu alle Partialsynthesen gehen von der Cobrysäure (4) aus. Diese wurde aus Faulschlamm isoliert [25] und in kristallisierter Form gewonnen [26]. Bei *P. shermanii* [27] und bei einer *N.rugosa*-Mutante [28] tritt sie als Zwischenprodukt der Vitamin-B₁₂-Biosynthese auf. Für rein chemische Synthesen aktiviert man [29] die Carboxylgruppe der Cobrysäure durch Umsetzung mit Chlorameisensäure-äthylester in Gegenwart von Triäthylamin in wasserfreiem Dimethylformamid zum gemischten Anhydrid (12), das man, ohne es zu isolieren,



mit einem nucleophilen Agens reagieren lässt. Diese aus der Peptidchemie bekannte Methode ergibt die besten Ausbeuten und ist der Carbodiimid-Methode überlegen [30].

[24a] *R. B. Woodward*, Vortrag in Basel, Juni 1963; Ref. Angew. Chem. 75, 871 (1963).

[25] *K. Bernhauer, H. Dellweg, W. Friedrich, G. Gross, F. Wagner u. P. Zeller*, Helv. chim. Acta 43, 693 (1960).

[26] *K. Bernhauer, F. Wagner u. D. Wahl*, Biochem. Z. 334, 279 (1961).

[27] *K. Bernhauer, E. Becher, G. Gross u. G. Wilharm*, Biochem. Z. 332, 562 (1960).

[28] *A. Di Marco, M. P. Marnati, A. Migliacci, A. Rusconi u. C. Spalla* in [6], S. 69.

[29] *K. Bernhauer u. F. Wagner* in [6], S. 28.

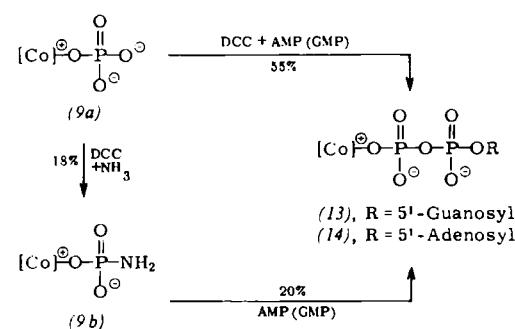
[30] *K. Bernhauer, F. Wagner u. P. Zeller*, Helv. chim. Acta 43, 696 (1960).

1. Inkomplette Corrinoide

Bei der Umsetzung von (12) mit D_g-(-)-1-Aminopropan-2-ol erhält man das natürliche Cobinamid [30], womit zugleich ein Beweis für die Struktur der Cobrysäure (4) erbracht worden ist. In gleicher Weise ergibt die Umsetzung von (12) mit anderen Alkanolaminen Cobinamid-Analoga [31, 32], von denen manche sehr starke kompetitive Antagonisten des Cobinamids bei *Escherichia coli* 113-3 sind (siehe unten).

Die Umsetzung von (12) mit α -Amino- β -hydroxycarbonsäuren (u. a. Serin, Threonin) ergibt die entsprechenden Cobinamid-Carbonsäuren [33]; mit den an der Hydroxylgruppe phosphorylierten α -Amino- β -hydroxysäuren erhält man die Phosphorsäureester [34]. Diese werden von *P. shermanii* nicht verwertet und können daher keine biosynthetischen Zwischenprodukte sein [34].

Beim Studium der Biogenese des Vitamins B₁₂ wurden Cobinamidphosphat und P(1)-Cobinamid-P(2)-guanosin-5'-pyrophosphat isoliert [35]. Durch Synthese dieser Verbindungen aus Cobrysäure (4) konnte ihre Struktur bestätigt werden. So erhält man durch Umsetzung von (12) mit DL-1-Amino-2-propylphosphat in guter Ausbeute DL-Cobinamid-phosphat (9a) [*] [36], das mit Ammoniak und N,N'-Dicyclohexyl-carbodiimid (DCC) in DL-Cobinamid-phosphorsäureamid (9b) überführt werden kann [37]. Beide Substanzen dienen zur Synthese von P(1)-DL-Cobinamid-P(2)-guanosin-5'-pyrophosphat (13) und P(1)-DL-Cobinamid-P(2)-adenosin-5'-pyrophosphat (14). Bei der Reaktion von DL-Cobinamidphosphat mit Adenosin-5'-phosphat (AMP) oder Guanosin-5'-phosphat (GMP) in Gegenwart von N,N'-Di-



cyclohexyl-carbodiimid entsteht entgegen der Erwartung [38, 39] kein symmetrisches DL-Cobinamid-pyrophosphat [37], da DL-Cobinamid-phosphat dipolarionisch ist.

[31] *K. Bernhauer u. F. Wagner*, Hoppe-Seylers Z. physiol. Chem. 322, 184 (1960).

[32] *K. Bernhauer, F. Wagner, D. Wahl u. D. Glatze*, unveröffentlicht.

[33] *K. Bernhauer u. F. Wagner*, Hoppe-Seylers Z. physiol. Chem. 332, 194 (1960).

[34] *K. Bernhauer u. F. Wagner*, Biochem. Z. 335, 325 (1962).

[35] *S. Zusammenfassung* [12].

[*] DL-Cobinamid-phosphat steht hier für Cobryl-(DL-2-hydroxypropyl)-amid. Cobinamid bedeutet das natürliche Produkt.

[36] *K. Bernhauer, F. Wagner, H. Dellweg u. P. Zeller*, Helv. chim. Acta 43, 700 (1960).

[37] *K. Bernhauer u. F. Wagner*, Biochem. Z. 335, 453 (1962).

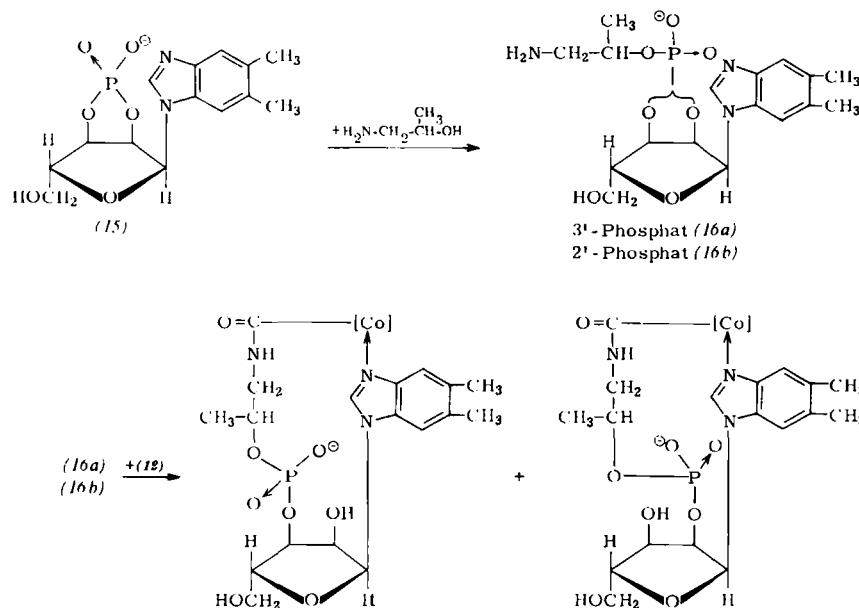
[38] *H. G. Khorana*, Fed. Proc. 19, 931 (1960).

[39] *F. Cramer*, Angew. Chem. 72, 236 (1960).

Neuerdings gelang auch die direkte Phosphorylierung des natürlichen Cobinamids (6) durch Kondensation mit β -Cyanäthylphosphat und Dicyclohexyl-carbodiimid in wasserfreiem Dimethylformamid/Pyridin zum Cobinamid-phosphorsäure- β -cyanäthylester, dessen alkalische Verseifung Cobinamid-phosphat (9) ergibt [40]. Mit den angeführten Methoden können weitere – auch isotopenmarkierte – phosphorsäure-haltige Cobinamid-Derivate dargestellt werden, die zur Aufklärung der Biosynthese des Nucleotidteils der kompletten Cobamide wertvoll sind.

2. Komplette Corrinoide

Friedrich et al. [41] gelang, ausgehend von der Cobysäure (4), erstmals die Synthese von Cobalamin (8). Dazu wurde α -Ribazol-phosphat [(1- α -D-Ribofuranosyl-5,6-dimethylbenzimidazol)-3'-dihydrogenphosphorsäureester] mit Dicyclohexyl-carbodiimid in das α -Ribazol-2'.3'-cyclophosphat (15) übergeführt. Dieses reagiert



mit einem großen Überschuß an Alkanolamin (z. B. D-1-Aminopropan-2-ol für die Cobalamin-Synthese) in Gegenwart von Na-tert. Butylat unter Bildung eines Gemisches aus etwa gleichen Teilen 3'- und 2'-Nucleotid-Ester (16a) und (16b) in ca. 70-proz. Ausbeute. Die anschließende Umsetzung des Gemisches mit einem Mol (12) in wasserfreiem Dimethylformamid ist bei 0 °C in wenigen Sekunden beendet, wobei die Ausbeute an komplettem Cobamid meist 60 bis 70 % beträgt [43].

Auf diese Weise wurden außer Cobalamin [41] 5-Methoxybenzimidazol-cobamid und 2-Methyladenin-cobamid dargestellt [42]. Die durch Reaktion der 3'-(D-1-Amino-2-propyl)nucleotidester erhaltenen kompletten Cobamide erwiesen sich als identisch mit den entspre-

[40] F. Wagner, Biochem. Z. 336, 99 (1962).

[41] W. Friedrich, G. Gross, K. Bernhauer u. P. Zeller, Helv. chim. Acta 43, 704 (1960).

[42] W. Friedrich u. H. C. Heinrich, Biochem. Z. 333, 550 (1961).

[43] W. Friedrich in [6], S. 8.

chenden Naturprodukten, was zugleich ein weiterer Beweis für ihre analytisch ermittelte Struktur ist.

Das Isomerengemisch (16a)/(16b) kann entweder an DEAE-Cellulose oder papierchromatographisch getrennt werden, oder man setzt es ohne vorhergehende Trennung mit (11) um und erhält durch Papierelektrophorese bei pH = 2,7 die reinen 3'- und 2'-Vitamin-B₁₂-Derivate [43].

Das hier beschriebene Syntheseschema erlaubt den Aufbau zahlreicher Vitamin-B₁₂-Derivate [43], in denen vor allem die D-1-Aminopropan-2-ol-Gruppe des Cobalamins durch andere Alkanolamine ersetzt ist (siehe unten). Diese unnatürlichen Produkte sind zur Aufklärung der biochemischen Funktion der D-1-Aminopropan-2-ol-Gruppe von Interesse. Einige dieser Verbindungen erwiesen sich als außerordentlich starke kompetitive Antagonisten des Cobalamins (siehe unten).

Außer dem unnatürlichen 2'-Isomer des Cobalamins [41] konnte kürzlich durch Kondensation von Cobinamidphosphat und 2',3'-Isopropyliden- α -ribazol mit Dicyclohexyl-

carbodiimid und anschließende Abspaltung der Isopropyliden-Gruppe auch das 5'-Isomer des Cobalamins dargestellt werden [40]. Dieses 5'-Isomer wurde auch durch Kondensation von α -Ribazol-5'-phosphat mit 1-(Benzoyloxycarbonyl-amino)-2-propanol in Gegenwart von Dicyclohexyl-carbodiimid, anschließende hydrolytische Abspaltung der Carbobenzoxy-Gruppe und Umsetzung des so erhaltenen Diesters mit (12) dargestellt [43a]. Die direkte Phosphorylierung des Cobalamins – nach der für die Phosphorylierung von Cobinamid bereits beschriebenen Methode – liefert Cobalamin-5'-phosphat [40].

D. Coenzym-Formen der Corrinoide

Die handelsübliche Cyano-Form des Cobalamins ist ein Kunstprodukt, das bei der Gewinnung des Vitamins aus natürlichen Vorstufen unter der Einwirkung von Cyanid-Ionen entsteht. Aus natürlichen Substraten lässt sich bei strengem Ausschluß von Cyanid-Ionen nur die Hydroxo (Aquo)-Form isolieren. Sie ist durch ihre gute Depot-

[43a] W. Friedrich, Z. Naturforsch. 18b, 455 (1963).

wirkung der Cyano-Form überlegen [44–45] und ist daher die Form, in der man Vitamin B₁₂ heute im allgemeinen appliziert. Das natürliche Vitamin B₁₂ ist aber die vor wenigen Jahren aufgefundene Coenzym-Form.

I. Vorkommen und Isolierung der Coenzyme [46]

Die Corrinoid-Coenzyme wurden von *Barker* und Mitarbeitern [47] beim Studium der enzymatischen Umlagerung von Glutaminsäure zu β-Methylasparaginsäure entdeckt. Das Enzymsystem ist lichtempfindlich und wird am Tageslicht oder bei der Einwirkung von Cyanid-Ionen unwirksam. Zunächst wurden die Coenzym-Formen von 5,6-Dimethylbenzimidazol-cobamid, Benzimidazol-cobamid und Adenin-cobamid isoliert [47]. Später konnten auch die Coenzym-Formen von Cobinamid [48, 49], Cobinamid-pyrophosphat-guanosin [48], Cobyrnsäure [50] und mehreren unnatürlichen Cobamiden [51, 52] aus Mikroorganismen gewonnen werden. Auch in der Leber von Mensch, Schaf, Kaninchen und Küken liegt Vitamin B₁₂ stets in seiner Coenzym-Form (10) vor [53].

Zur Isolierung der Coenzym-Formen extrahiert man Bakterien durch Kochen mit 75 bis 80-proz. Äthanol oder einem neutralen wäßrigen Puffer [46] oder mit 60-proz. wäßrigem Aceton bei Zimmertemperatur [54]; Aceton-Trockenpulver von Bakterien werden mit Wasser extrahiert [48]. Nach dem Einengen der Lösungen extrahiert man mit Mischungen von Phenol und Chloroform oder o-Dichlorbenzol (40:60 w/w). Die mehrmals mit Wasser gewaschene organische Phase versetzt man mit Chloroform und n-Butanol und kann die Corrinoid-Coenzyme dann mit Wasser ausschütteln. Restliches Phenol entfernt man mit Chloroform. Die im Vakuum eingegangene wäßrige Lösung enthält in der Regel Coenzym-Gemische, die durch Säulenchromatographie an Cellulose, Paperelektrophorese und Ionenaustausch getrennt werden können [46, 54].

II. Eigenschaften und Abbau der Coenzyme

Am auffallendsten ist die hohe Lichtempfindlichkeit der isolierten Coenzyme und ihre eigenartige Spaltung durch Cyanid. Ferner wird die koordinative Bindung zwischen Kobalt und dem Imidazol-Stickstoff bereits bei pH < 6

[44] E. E. Gabbe u. H. C. Heinrich in [6], S. 116.

[44a] G. B. J. Glass, H. R. Skeggs, D. H. Lee, E. L. Jones u. W. W. Hardy in [6], S. 673.

[45] G. B. J. Glass, D. H. Lee, H. R. Skeggs u. J. L. Stanley, Fed. Proc. 21, 471 (1962).

[46] H. A. Barker in [6], S. 82.

[47] H. A. Barker, H. Weissbach u. R. D. Smyth, Proc. nat. Acad. Sci. USA 44, 1093 (1958).

[48] J. Pawelkiewicz, B. Bartosiński u. W. Walerych, Bull. Acad. polon. Sci., Sér. Sci. biol. 8, 123 (1960).

[49] K. Bernhauer, P. Gaiser, O. Müller u. O. Wagner, Biochem. Z. 333, 106 (1960).

[50] A. Migliacci u. A. Rusconi, Biochim. biophysica Acta 50, 370 (1961).

[51] K. Bernhauer, O. Müller u. G. Müller, Biochem. Z. 335, 37 (1961).

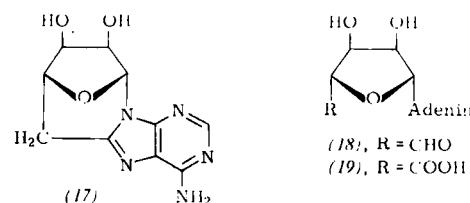
[52] J. I. Toohey, D. Perlman u. H. A. Barker, J. biol. Chemistry 236, 2119 (1961).

[53] J. I. Toohey u. H. A. Barker, J. biol. Chemistry 236, 560 (1961).

[54] K. Bernhauer, P. Gaiser, E. Irion, G. Müller, O. Müller u. O. Wagner, unveröffentlicht.

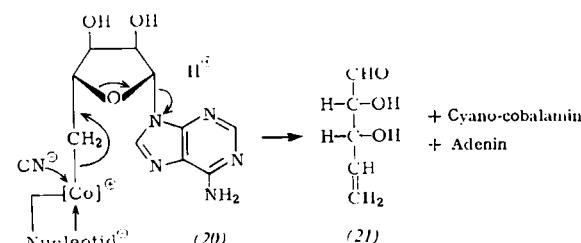
gelöst, wenn die Heterobase ein Purin ist, und bei pH < 2,5, wenn das Coenzym ein Benzimidazol enthält [46].

Aus der Wertigkeit des Kobalts im Cobalamin-Coenzym (siehe unten) und aus dem Auftreten einer reduzierten Form des Cobalamins (B_{12r}) bei der Belichtung unter Ausschluß von Sauerstoff [55, 56] ergibt sich, daß der Adenin enthaltende Ligand als Radikal abgespalten wird. Bei Ausschluß von Sauerstoff stabilisiert sich das Radikal unter Bildung des cyclischen Nucleosids (17) [57, 57a]; an der Luft entsteht nur teilweise das cyclische



Nucleosid. Zum Teil reagiert das Radikal mit Sauerstoff unter Bildung von Adenosin-5'-aldehyd (18) [58] oder Adenosin-5'-carbonsäure (19) [59]. Luft oxydiert die Form B_{12r} innerhalb weniger Sekunden zu Hydroxo(Aquo)-cobalamin. In Bindung an ein Protein sind die Corrinoid-Coenzyme viel stabiler als in freiem Zustand.

Durch Cyanid wird das Cobalamin-Coenzym (20) [= (10)] unter Abspaltung von Adenin und erythro-3,4-



Dihydroxy-1-penten-5-al (21) in Cyanocobalamin umgewandelt [46, 59, 59a]. Diese Reaktion wird durch Luftsauerstoff nicht beeinflußt [55].

Die anderen Corrinoid-Coenzyme werden durch Licht und Cyanid in der gleichen Weise gespalten wie das Cobalamin-Coenzym, doch mit recht verschiedener Geschwindigkeit [60].

Bei der Einwirkung von Jod auf das Cobalamin-Coenzym in wäßriger Lösung entstehen Hydroxo(Aquo)-cobalamin und 5'-Jod-5'-desoxyadenosin [54].

[55] K. Bernhauer u. O. Müller, Biochem. Z. 334, 199 (1961).

[56] R. O. Brady u. H. A. Barker, Biochem. biophysic. Res. Commun. 4, 373 (1961).

[57] H. P. C. Hogenkamp u. H. A. Barker, Fed. Proc. 21, 470 (1962).

[57a] H. P. C. Hogenkamp, J. biol. Chemistry 238, 477 (1963).

[58] H. P. C. Hogenkamp, J. N. Ladd u. H. A. Barker, J. biol. Chemistry 237, 1950 (1962).

[59] A. W. Johnson u. N. Shaw, Proc. chem. Soc. (London) 1961, 447.

[59a] A. W. Johnson u. N. Shaw, J. chem. Soc. (London) 1962, 4608.

[60] O. Müller u. G. Müller, Biochem. Z. 336, 299 (1962).

III. Struktur der Coenzyme

Die Konstitution des Cobalamin-Coenzymes (10) wurde im wesentlichen durch Röntgenstrukturanalyse aufgeklärt [61] und später durch partielle Synthese bestätigt (siehe unten).

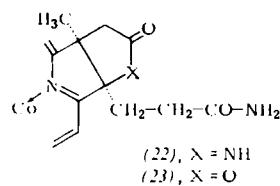
Im Cobalamin-Coenzym nimmt der 5'-Desoxyadenosyl-Rest die im Vitamin B₁₂ durch Cyanid besetzte sechste Koordinationsstelle ein. Er ist über C-5' kovalent mit dem Co-Atom verknüpft. Untersuchungen des Cobalamin-Coenzyms nach der Röntgenkanten-Methode ergeben, daß es – wie Vitamin B₁₂ – Co³⁺ enthält [62], was mit seinem elektrophoretischen Verhalten übereinstimmt. Für Co³⁺ spricht auch das Elektronen-Spin-Resonanz-Spektrum des Cobalamin-Coenzys [62a]. Daher müssen die Ergebnisse magnetochemischer Messungen an wäßrigen Lösungen von Cobalamin- und Cobinamid-Coenzym, die für Co²⁺ sprechen [63–65], anders gedeutet werden.

Im Cobinamid-Coenzym befindet sich an der Stelle des Nucleotids die Hydroxo(Aquo)-Gruppe. Das durch Abbau des Cobalamin-Coenzys (10) mit Cer(III)-hydroxyd erhältliche Cobinamid-Coenzym [66] ist mit dem Naturprodukt identisch, woraus sich die Lage des Nucleosids in diesem ergibt.

Ungeklärt blieb zunächst, ob der Corrin-Ring in den Coenzym-Formen die üblichen sechs Doppelbindungen besitzt. Durch Röntgenstrukturanalyse [61] konnten die Bindungsverhältnisse und die Zahl der H-Atome im Corrin-Gerüst des Cobalamin-Coenzys (10) noch nicht exakt ermittelt werden. Auch die Partialsynthese der Coenzym-Formen, die eine Reduktion des Co-Atoms erfordert, läßt keinen Schluß auf die Struktur des Corrin-Ringes zu.

Die Synthese von Co-Methyl-cobalamin in tritiumhaltigem Wasser führt zu einem radioaktiven Produkt [67]. Dessen Tritium befindet sich jedoch in der an das Kobalt gebundenen Methylgruppe, wie durch aerobe Photolyse und Absfangen des gebildeten Formaldehyds als Dimedon-Addukt gezeigt wurde [67a]. Dies spricht dafür, daß das konjugierte System des Corrin-Rings in den Coenzym-Formen mit dem der Cyano-Formen identisch ist [67a].

Allerdings konnte gezeigt werden [67], daß die Coenzym-Formen keine Reaktionen eingehen, die beim Cyano- und Hydroxo-cobalamin durch die Aktivierung von C-8 (CN-Doppelbindung in Allylstellung) zustande kommen. So wird Cyano-cobalamin (8), L = CN, durch Luftsauerstoff



[61] P. G. Lenhert u. D. Crowfoot-Hodgkin, Nature (London) 192, 937 (1961).

[62] D. Heintz, Diplomarbeit, Universität München, 1962.

[62a] H. P. C. Hogenkamp, H. A. Barker u. H. S. Mason, Arch. Biochem. Biophysics 100, 353 (1963).

[63] A. W. Johnson u. N. Shaw, Proc. chem. Soc. (London) 1960, 420.

[64] L. Nowicki u. J. Pawelkiewicz, Bull. Acad. pol. Sci., Sér. Sci. biol. 8, 433 (1960).

[65] K. Bernhauer, P. Gaiser, O. Müller, E. Müller u. F. Günther, Biochem. Z. 333, 560 (1961).

[66] K. Bernhauer u. O. Müller, Biochem. Z. 335, 44 (1961).

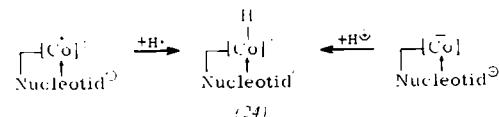
[67] F. Wagner u. P. Renz, Tetrahedron Letters 1963, 259.

[67a] F. Wagner u. K. Bernhauer in [7a].

in alkalischer Lösung zum Lactam (22) dehydriert [68], wogegen Cobalamin-Coenzym, Cobalamin-sulfonat, oder Co-Methyl-cobalamin unter gleichen Bedingungen nicht dehydriert werden. Äquimolare Mengen Chloramin T oder Bromwasser oxydieren Cyanocobalamin zum Lacton (23), erst ein Überschuß an Chloramin T oder Bromwasser wirkt halogenierend [68]. Dagegen werden die Coenzym-Formen bei der Einwirkung von einem Mol Chloramin T nicht oxydiert, sondern in ein einheitliches Monochlor-Derivat übergeführt [67]. Analog wirkt das erste Äquivalent Bromwasser oder N-Bromsuccinimid [68a].

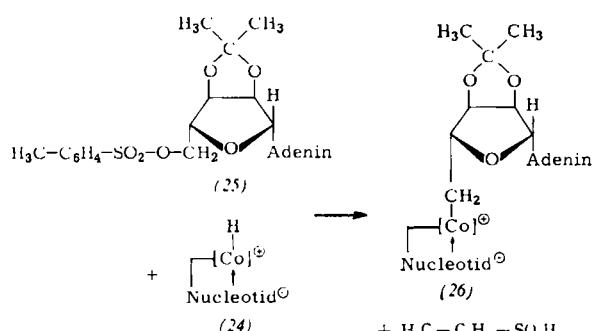
IV. Chemische Partialsynthese von Corrinoid-Coenzymen und Analogen

Reduziert man Vitamin B₁₂ in NH₄Cl-Lösung [69], Na-tronlauge oder Essigsäure mit Zink bei strengem Ausschluß von Luftsauerstoff, so entsteht zunächst gelbes B_{12f}. Bei längerer Einwirkung geht die Reduktion weiter unter Bildung eines hellblauen bis grünen Produktes, das man auch mit anderen Reduktionsmitteln, z. B. Chrom(II)-Salzen und Natriumborhydrid [70, 71], erhält. So reduziertes Cobalamin reagiert mit Diazomethan zu Co-Methyl-cobalamin und ist somit ein Co-Hydrid (24) [60]. Es entsteht durch Reaktion des Co²⁺-Komplexes mit nascierendem Wasserstoff oder aus dem intermedial auftretenden Komplex mit Co¹⁺ durch Aufnahme eines Protons. Auch die Additionsreaktionen des Reduktionsproduktes (siehe unten) sprechen für eine Kobalt-Wasserstoff-Bindung in diesem.



Cobalamin-hydrid ist bei Ausschluß von Luftsauerstoff im wäßrigen Medium beständig. An der Luft geht es innerhalb weniger Sekunden in Hydroxo(Aquo)-cobalamin über.

Die Hydride anderer Corrinoide, z. B. von Benzimidazol-cobamid, Adenin-cobamid und Cobinamid, können ebenso gewonnen werden. Das Kobaltatom der Corrinoide erhält durch Reduktion zum Hydrid nucleophilen Charakter und reagiert daher mit Verbindungen, die ein elektrophiles Zentrum enthalten.



[68] R. Bonnet, J. R. Cannon, V. M. Clark, A. W. Johnson, L. F. J. Parker, E. L. Smith u. A. R. Todd, J. chem. Soc. (London) 1957, 1158.

[68a] F. Wagner u. V. Koppenhagen, unveröffentlicht.

[69] O. Schindler, Helv. chim. Acta 34, 1356 (1951).

[70] R. N. Boos, J. E. Can u. J. B. Conn, Science (Washington) 117, 603 (1953).

[71] F. P. Siegel, Dissertation, University of Illinois, USA, 1955.

Cobalamin-Coenzym entsteht durch Umsetzung des Cobalamin-hydrids (24) mit 2'.3'-Isopropyliden-5'-tosyadenosin (25) zu (26) und anschließende Abspaltung der Isopropyliden-Gruppe mit verdünnter Säure [60, 72, 73, 73a]. Ebenso erhält man aus Cobalamin-hydrid und 2'.3'-Isopropyliden-5'-tosylinosin das Hypoxanthin-Analoge [72, 74] des Cobalamin-Coenzymes, das bereits durch Desaminierung von Cobalamin-Coenzym dargestellt worden war [75]. Auch das Uridin-Analoge [72] und das Guanosin-Analoge des Cobalamin-Coenzymes konnten gewonnen werden [74]. Bemerkenswerterweise ist das synthetisch hergestellte Cobinamid-Coenzym mit dem Naturprodukt identisch [74], was dafür spricht, daß sich das H-Atom am Co in den Hydriden stets auf der gleichen Seite des Moleküls befindet.

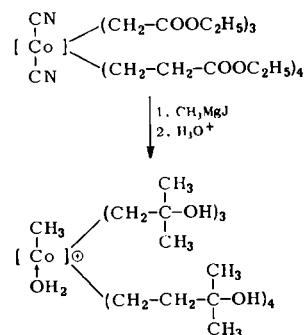
V. Sonstige Corrinoide mit Kobalt-Kohlenstoff-Bindung

Alkyl-Verbindungen des Cobalamins erhält man durch Umsetzung von Cobalamin-hydrid mit Alkylhalogeniden, Schwefelsäurediestern oder Toluolsulfonsäureestern [60, 72–74]. Die Reaktionen sind bereits bei Zimmertemperatur nach wenigen Minuten beendet. Auch mit Sulfonium-Verbindungen wie S-Methylmethionin oder S-Adenosyl-methionin kann man Co-Methyl-cobalamin herstellen [74, 75a]. Cobalamin-hydrid reagiert außerdem mit Acetylen- und Äthylen-Verbindungen unter Anlagerung, z. B. mit Acrylsäure zu Co-β-Carboxyäthyl-cobalamin [73a, 75b] oder mit Tetrahydrofuran zu Co-δ-Hydroxybutyl-cobalamin [74]. Die Co-Alkyl-Corrinoide stehen – wie auf Grund ihrer Struktur zu erwarten – in ihrem Verhalten den Corrinoid-Coenzymen sehr nahe. Sie werden durch Licht an der Luft zu den entsprechenden Hydroxo(Aquo)-corrinoiden gespalten. Auch die UV-Absorptionspektren der Co-Alkyl-corrinoide sind denen der entsprechenden Corrinoid-Coenzyme sehr ähnlich. Durch Cyanid werden die Co-Alkyl-corrinoide aber – im Gegensatz zu den Coenzym-Formen – nicht gespalten.

Die Corrinoid-hydride reagieren auch mit acylierenden Agentien, wie Säureanhydriden und Acylhalogeniden, unter Bildung von Co-Acyldervaten. Diese sind ebenfalls gegen Licht und Cyanid und außerdem gegen Alkali empfindlich [60]. Bemerkenswert ist, daß der durch Reaktion des Cobalamin-hydrids mit Chlorameisensäure-äthylester erhältliche Cobalamin-Co-carbonsäureäthylester ein UV-Absorptionspektrum besitzt, das dem des Cyanocobalamins viel ähnlicher ist, als dem der Coenzym-Formen [74].

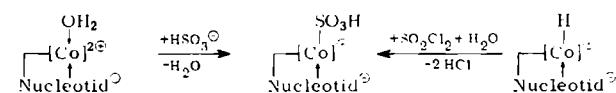
Man kann aber auch Cyano- oder Hydroxocorrinoide mit Co^{3+} als Zentralatom direkt in coenzymartige Verbindungen umwandeln, wenn man von Substanzen ausgeht, die in indifferenten Solventien löslich sind und so mit Grignard-

Verbindungen oder Lithium-Alkylen umgesetzt werden können. So ergibt z. B. Cobyrinsäureheptaäthylester mit überschüssigem Methylmagnesiumjodid in Tetrahydrofuran/Äther nach anschließender Zersetzung mit verdünnter Essigsäure ein Co-Methyl-Derivat des entsprechenden tertiären Alkohols [67a].

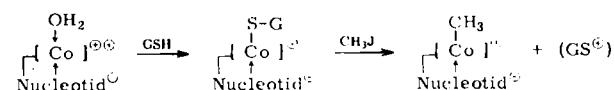


VI. Corrinoide mit Kobalt-Schwefel-Bindung

Bei der Einwirkung von Sulfit oder schwefliger Säure auf Cyano- oder Hydroxo(Aquo)-corrinoide entstehen Substanzen, die große Ähnlichkeit mit den Corrinoid-Coenzymen haben [76–80]. Sie sind wie diese lichtempfindlich, zeigen ähnliche UV-Absorptionsspektren und werden durch Cyanid in die Cyanocorrinoide umgewandelt. Die Derivate des Cobalamins und Cobinamids konnten in kristallisierte Form gewonnen werden [76, 79, 79a]. Sie entstehen auch durch Umsetzung von Cobalamin-hydrid oder Cobinamid-hydrid mit Sulfurylchlorid [79]. Diese Reaktionen und die IR-Spektren zeigen, daß diese Corrinoide eine Kobalt-Schwefel-Bindung enthalten. Bis zur Festlegung der Nomenklatur der neuen Verbindungsklasse bezeichnen wir die Substanzen



als Cobalamin-Co-sulfonsäure bzw. Cobinamid-Co-sulfonsäure. Analog wurden Co-p-Toluolsulfonyl- und Co-Benzolsulfonyl-cobinamid hergestellt, die nicht lichtempfindlich sind [79].



Setzt man Aquo-cobalamin mit Glutathion (GSH) um, so erhält man intermediär Co-S-Glutathionyl-cobalamin, das mit einem elektrophilen Agens wie Methyljodid zu Co-Methyl-cobalamin reagiert [67a].

[72] E. L. Smith, L. Merwyn, A. W. Johnson u. N. Shaw, Nature (London) 194, 1175 (1962).

[73] K. Bernhauer, O. Müller u. G. Müller, Biochem. Z. 336, 102 (1962).

[73a] A. W. Johnson, N. Shaw u. E. L. Smith, J. chem. Soc. (London) 1963, 4146.

[74] O. Müller u. G. Müller, Biochem. Z. 336, 299 (1962).

[75] O. Müller u. G. Müller, Biochem. Z. 335, 340 (1962).

[75a] W. Friedrich u. E. Königk, Biochem. Z. 336, 444 (1962).

[75b] E. L. Smith u. L. Merwyn, Biochem. J. 86, 2P (1963).

[76] K. Bernhauer, O. Müller u. O. Wagner in [6], S. 110.

[77] K. Bernhauer, P. Renz u. F. Wagner, Biochem. Z. 335, 443 (1962).

[78] Ph. George, D. H. Irvine u. St. C. Glauser, Ann. New York Acad. Sci. 88, 393 (1960).

[79] K. Bernhauer u. O. Wagner, Biochem. Z. 337, 366 (1963).

[79a] D. H. Dolphin, A. W. Johnson u. N. Shaw, Nature (London) 199, 170 (1963).

[80] J. A. Hill, J. M. Pratt u. R. J. P. Williams, J. theoret. Biol. 3, 423 (1962).

VII. Biosynthese der Corrinoid-Coenzyme

Alle Corrinoide kommen in der Natur offenbar in der Coenzym-Form vor. Diese entsteht vermutlich bald nach der Synthese des Corrin-Ringes und dem Einbau des Co-Atoms, wohl auf der Stufe einer Penta-carbonsäure, die (wie andere verwandte Polycarbon-säuren) enzymatisch in ihre Coenzym-Form umgewandelt werden kann [81]. Die weitere Biogenese bis zu den kompletten Cobamiden spielt sich dann höchst-wahrscheinlich an den Coenzym-Formen oder an solchen Verbindungen ab, die bereits die wesentlichen Strukturmerkmale der Coenzym-Formen haben (siehe unten).

Die Biosynthese des 5'-Desoxyadenosyl-Teils und dessen Verknüpfung mit dem Co-Atom wurde vor allem mit Enzymsystemen aus Mikroorganismen studiert, zunächst mit Aceton-Trockenpräparaten [82–84], sodann mit Extrakten aus Bakterienzellen [85–89] und schließlich mit einem auf das 337-fache angereicherten Enzym-präparat [90]. Mit einem solchen benötigt man außer einem Corrinoid und ATP für die Coenzym-Synthese Mn²⁺, K⁺, reduziertes Flavin-adenin-dinucleotid und eine Sulfhydryl-Verbindung. Wie mit ¹⁴C-markiertem ATP gezeigt werden konnte, entstammt diesem der 5'-Desoxyadenosyl-Rest der Coenzyme [87–90]. Der Verlauf der Übertragung des 5'-Desoxyadenosyl-Restes ist aber noch völlig unklar. Die enzymatische Umwandlung von Cyano-cobalamin in das Cobalamin-Coenzym soll in einem Schritt erfolgen [91]. Ausgehend von Cobin-amid gelang jedoch die Isolierung eines labilen, licht-empfindlichen, gelben, offenbar reduzierten Produktes, das in seinen physikochemischen Eigenschaften an chemisch reduziertes Cobinamid erinnert, und das in einem zweiten Reaktionsschritt in Gegenwart von Adenosintriphosphat (ATP) und Dihydro-flavinmono-nucleotid (FMNH₂) Cobinamid - Coenzym ergibt [92,93].

- [81] K. Bernhauer, H. Beisbarth, P. Rietz u. F. Wagner, unveröffentlicht.
- [82] K. Bernhauer, P. Gaiser, O. Müller u. O. Wagner, Biochem. Z. 333, 106 (1960).
- [83] J. Pawelkiewicz, B. Bartosiński u. W. Walerych, Bull. Acad. polon. Sci., Sér. Sci. biol. 8, 123 (1960).
- [84] J. Pawelkiewicz, B. Bartosiński u. W. Walerych, Acta biochim. polon. 8, 131 (1961).
- [85] H. Weissbach, B. G. Redfield u. A. Peterkofsky, J. biol. Chemistry 236, PC40 (1961).
- [86] R. O. Brady u. H. A. Barker, Biochem. biophysic. Res. Commun. 4, 464 (1961).
- [87] A. Peterkofsky, B. G. Redfield u. H. Weissbach, Biochem. biophysic. Res. Commun. 5, 213 (1961).
- [88] A. Peterkofsky u. H. Weissbach, Fed. Proc. 21, 470 (1962).
- [89] B. Bartosiński u. J. Pawelkiewicz, Bull. Acad. polon. Sci., Sér. Sci. biol. 10, 121 (1962).
- [90] R. O. Brady, E. G. Castanera u. H. A. Barker, J. biol. Chemistry 237, 2325 (1962).
- [91] H. Weissbach, B. G. Redfield u. A. Peterkofsky, J. biol. Chemistry 237, 3217 (1962).
- [92] B. Bartosiński, Bull. Acad. polon. Sci., Sér. Sci. biol. 10, 189 (1962).
- [93] Über die Umwandlung von B_{12f} in B₁₂-Coenzym siehe [88].

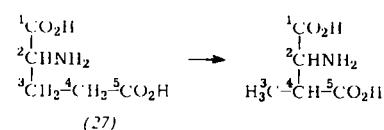
E. Enzymchemische Funktionen des Vitamins B₁₂

I. Intramolekulare Umlagerungen unter Beteiligung der Cobamid-Coenzyme

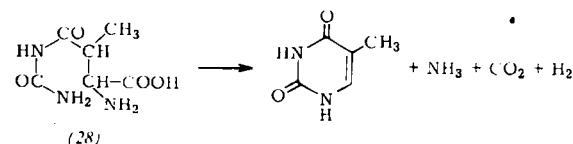
Enzymreaktionen, an denen sich Cobamid-Coenzyme beteiligen, sind zumeist intramolekulare Isomerisierun-gen.

1. Umwandlung von Glutamat in Methylaspartat

Das Studium dieser Reaktion bei *Clostridium tetano-morphum* führte zur Entdeckung der Coenzym-Formen der Cobamide [46]. Die Glutamat-Isomerase-Reaktion kann aufgefaßt werden als intramolekulare, reversible Übertragung einer Glycingruppe zwischen den α- und



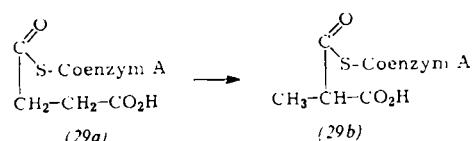
β-C-Atomen des Propionsäure-Anteils der Glutaminsäure (27), unter gleichzeitiger Verschiebung eines H-Atoms in umgekehrter Richtung [46]. Bei dieser Reaktion sind nur Cobamid-Coenzyme wirksam, nicht aber inkomplette Formen [94,94a].



Bei Protozoen ist das Carbamyl-Derivat (28) des Methylaspartats eine Vorstufe des Thymins, was den Vitamin-B₁₂-Bedarf für die Desoxyribonucleinsäure-Synthese erklären würde [95]. Für Ratten dürfte dieser Weg der Biosynthese des Thymins jedoch nicht zutreffen [96].

2. Umwandlung von Succinyl-Coenzym A in Methylmalonyl-Coenzym A

Diese Reaktion wird durch die Methylmalonyl-Coenzym-A-Isomerase katalysiert und besteht in der Übertragung der Thioester-Gruppe zwischen den α- und β-C-Atomen des Propionsäure-Teils des Moleküls [(29a) bis (29b)], was mit markierten Substraten gezeigt wurde [97,98]. Mit gereinigter Isomerase wird aus tritiertem



[94] H. A. Barker, Fed. Proc. 20, 956 (1961).

[94a] H. A. Barker, F. Suzuki, A. Iodice u. V. Rooze in [7a].

[95] H. D. Isenberg, E. Seifter u. J. I. Berkman, Biochim. biophysica Acta 39, 187 (1960).

[96] R. E. Webb, S. Kirschfeld u. B. C. Johnson in [6], S. 198.

[97] Zusammenfassung: P. Overath in [6], S. 155.

[98] C. S. Hegre, S. J. Miller u. M. D. Lane, Biochim. biophysica Acta 56, 538 (1962).

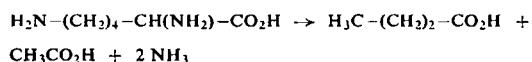
Wasser bei der Umlagerung kein Tritium aufgenommen [99]. Über den Reaktionsmechanismus s. ferner [99a, 99b].

Diese Reaktion spielt eine wichtige Rolle bei der biologischen Verwertung der Propionsäure und anderer Fett- und Aminosäuren [100 – 102b]. Bemerkenswerterweise wird im menschlichen Urin bei megaloblastischer Anämie zehn- bis zwanzigmal so viel Methylmalonat ausgeschieden wie im Normalfall; dessen Anhäufung im Gewebe könnte daher zu den Symptomen der perniciösen Anämie Anlaß geben [103].

3. Umwandlung von 1,2-Diolen in Desoxyaldehyde

Diese intramolekulare Oxydo-Reduktion wurde durch zellfreie Extrakte aus *Aerobacter aerogenes* oder *Clostridium perfringens* in Gegenwart einiger Cobamid-Coenzyme verwirklicht und an den Reaktionen 1,2-Propandiol → Propionaldehyd und Äthylenglykol → Acetaldehyd studiert [104, 104a]. Dabei konnte durch Versuche in schwerem Wasser wahrscheinlich gemacht werden, daß die Umwandlung in einer intramolekularen Verlagerung von Wasserstoff als Hydrid-Ion unter gleichzeitiger Verdrängung einer OH-Gruppe besteht [105]. Neuerdings wurde Acetaldol als Zwischenprodukt der Reaktion diskutiert [106]. Lactobacillus-Extrakte wandeln Glycerin in β-Hydroxypropionaldehyd um [106a, 106b].

II. Abbau von Lysin zu Fettsäuren und Ammoniak

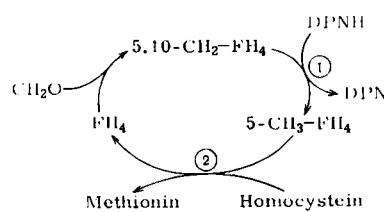


Für diese durch Clostridien bewerkstelligte Reaktion benötigen gealterte oder mit Aktivkohle behandelte Zellpräparate Pyruvat, Diphosphopyridinnucleotid, Fe^{2+} , Acetyl-Coenzym A und Cobalamin-Coenzym [107, 107a].

- [99] P. Overath, G. M. Kellermann, F. Lynen, H. P. Fritz u. H. J. Keller, Biochem. Z. 335, 500 (1962).
- [99a] H. G. Wood in [7a].
- [99b] J. D. Erfle, J. M. Clark jr. u. B. C. Johnson in [7a].
- [100] P. Overath, E. R. Stadtman, G. M. Kellerman u. F. Lynen, Biochem. Z. 336, 77 (1962).
- [101] W. A. Ayers, Arch. Biochem. Biophysics 96, 210 (1962).
- [102] H. R. V. Arnstein u. A. M. White, Biochem. J. 79, 3P (1961); 83, 264 (1962).
- [102a] S. Ochoa in [7a].
- [102b] F. Lynen in [7a].
- [103] A. M. White, Biochem. J. 84, 41P (1962).
- [104] R. H. Abeles u. H. A. Lee jr., J. biol. Chemistry 236, PC1 (1961); 236, 2347 (1961).
- [104a] H. A. Lee u. R. H. Abeles, J. biol. Chemistry 238, 2367 (1963).
- [105] A. M. Brownstein u. R. H. Abeles, J. biol. Chemistry 236, 1199 (1961).
- [106] B. Zagala u. J. Pawelkiewicz, Life Sci. 8, 395 (1962).
- [106a] K. L. Smiley u. M. Sobolov, Arch. Biochem. Biophysics 97, 538 (1962).
- [106b] K. L. Smiley u. M. Sobolov in [7a].
- [107] T. C. Stadtman, Fed. Proc. 21, 470 (1962).
- [107a] T. C. Stadtman, J. biol. Chemistry 238, 2766 (1963).

III. Rolle des Vitamins B₁₂ bei der Methionin-Synthese

An der Übertragung einer Methylgruppe von der N(5)-Methyl-tetrahydrofolsäure auf Homocystein ist außer einigen Cofaktoren ein Cobalamin-Enzym [108–112a] beteiligt. Der Prozeß verläuft in einem Cyclus [112], der die bereits bekannte enge biochemische Beziehung zwischen Folsäure und Vitamin B₁₂ erklärt (Schema 1). Möglicherweise ist dieses enzymatische System ein



Schema 1. Rolle des Vitamins B₁₂ bei der Übertragung einer Methylgruppe in der Methionin-Synthese

- (1) 5,10-Methylentetrahydrofolat-Reduktase
- (2) B₁₂-Enzym, DPNH, FADH₂, ATP, Mg²⁺

Hauptpunkt der Stoffwechselfunktion des Vitamins B₁₂ in tierischen Zellen, vielleicht sogar der Schlüssel zu verschiedenen Anämien, denn bei Mangel an Vitamin B₁₂ steigt die Menge an Methyl-tetrahydrofolsäure im Blut auf ein Vielfaches des Normalen, und durch Blockierung des Folsäure-Cyclus mag die Synthese wichtiger Zellbestandteile (Purine und Pyrimidine) gehemmt sein [112].

Wirksamer Bestandteil des Vitamin-B₁₂-Enzyms bei der Methionin-Synthese dürfte Co-Methyl-cobalamin sein, denn bei dessen Inkubation mit Homocystein und einem gereinigten Apo-Vitamin-B₁₂-Enzym wird Methionin synthetisiert, wobei die am Kobalt gebundene Methylgruppe verwertet wird [113, 113a].

Methionin lässt sich auch nicht-enzymatisch durch anaerobe Photolyse von Co-Methyl-cobalamin in Gegenwart von Homocystein synthetisieren. Homocystein gibt mit Cobalamin-Coenzym unter gleichen Bedingungen S-Adenosyl-homocystein [114]. Diese Reaktionen lassen sich durch das Auftreten eines freien Radikals bei der Photolyse erklären.

Die Wirkung der Coenzym-Formen in den beschriebenen Enzymsystemen erklärt nur einen Teil der vielseiti-

- [108] F. T. Hatch, A. R. Larrabee, R. E. Cathon u. J. M. Buchanan, J. biol. Chemistry 236, 1095 (1961).
- [109] Sh. Takeyama, F. T. Hatch u. J. B. Buchanan, J. biol. Chemistry 236, 1102 (1961).
- [110] M. A. Foster, G. Tejerina u. D. D. Woods, Biochem. J. 81, 1P (1961).
- [111] M. A. Foster, K. M. Jones u. D. D. Woods, Biochem. J. 80, 519 (1961).
- [112] A. R. Larrabee, S. Rosenthal, R. E. Cathon u. J. M. Buchanan, J. biol. Chemistry 238, 1025 (1963).
- [112a] J. M. Buchanan in [7a].
- [113] J. R. Guest, S. Friedman, D. Woods u. E. L. Smith, Nature (London) 195, 340 (1962).
- [113a] J. R. Guest, S. Friedman, M. J. Dilworth u. D. D. Woods in [7a].
- [114] A. W. Johnson, N. Shaw u. F. Wagner, Biochim. biophysica Acta 72, 107 (1963).

gen, lebenswichtigen Funktionen des Vitamins B₁₂ [115]. Das Vitamin wirkt außerdem als Cofaktor bei der Reduktion der Ribonucleoside zu Desoxyribonucleosiden [116–118], beim Einbau von Aminosäuren in Eiweiß [119, 120], sowie im Kohlenhydrat- und Fettstoffwechsel [121, 122].

IV. Enzymatische Synthese von Methan

Durch ein Enzymsystem aus *Methanosarcina barceri* wird in Gegenwart von Pyruvat die Methylgruppe des Co-Methyl-Cobalamins in stöchiometrischem Verhältnis in Methan umgewandelt, wie mit Hilfe des markierten Substrates gezeigt werden konnte [122a]. Dieselbe Reaktion bewerkstelligen Extrakte von *Methanobacillus omelanskii* in Gegenwart von ATP [122b].

F. Molekularbiologie des Vitamins B₁₂

Die Aufklärung der biochemischen Bedeutung einzelner Molekülteile im Vitamin B₁₂ gelang – wie bei anderen Vitaminen – in erster Linie durch Prüfung der biologischen Wirkung von Analogen, die chemisch oder biochemisch hergestellt worden waren. Antagonistisch wirkende Analoge eignen sich möglicherweise zur Behandlung der Leukämie oder anderer maligner Erkrankungen (Zusammenfassungen siehe [123, 124]).

I. Kobaltatom und Corrin-Ring

Im Vitamin B₁₂ ist das Metallatom – zum Unterschied von den Verhältnissen bei den Porphyrinen – so fest verankert, daß es bisher nicht gelungen ist, es ohne Zerstörung des Moleküls zu entfernen. Das Co-Atom nimmt an der Mesomerie des Corrinsystems teil. Es ist in den Cobamid-Coenzymen – mit koordiniertem Nucleotid – so tief im Molekül eingebettet, daß es mit einem Substrat nicht direkt in Kontakt treten kann. Möglicherweise wird der Kontakt durch einen peripheren Teil des Moleküls vermittelt [46, 125].

[115] E. L. R. Stokstadt, *Annu. Rev. Biochem.* 31, 451 (1961).

[116] L. A. Manson in [6], S. 191.

[117] A. Wacker in [6], S. 196.

[118] W. S. Beck u. M. Levin, *Biochim. biophysica Acta* 55, 245 (1962).

[119] R. Mehta, S. R. Wagle u. B. C. Johnson, *Biochim. biophysica Acta* 35, 286 (1959).

[120] H. R. V. Arnstein u. A. M. White in [6], S. 211.

[121] C.-T. Ling u. B. F. Chow in [3], S. 127.

[122] D. K. Biswas u. B. C. Johnson in [6], S. 210.

[122a] B. A. Blaylock u. Th. C. Stadtman, *Biochem. biophys. Res. Commun.* 11, 34 (1963).

[122b] M. J. Wolin, E. A. Wolin u. R. S. Wolfe, *Biochem. biophys. Res. Commun.* 12, 464 (1963).

[123] E. L. Smith in [6], S. 226.

[124] H. C. Heinrich u. E. E. Gabbe in [6], S. 252.

[125] H. A. Barker, *Fed. Proc.* 20, 956 (1961).

Einen ersten Einblick in die Bedeutung des Corrin-Ringes ermöglichen Beobachtungen über die unterschiedliche Reaktionsweise der beiden Koordinationsstellen des Co-Atoms in den inkompletten Corrinoiden. So befindet sich – nach der Röntgenstrukturanalyse – die Cyano-Gruppe in der Monocyanomonochloro-hexacarbonsäure [126] oder in der Monocyanomonoaquocobyrnsäure (4) [127] dort, wo im Cobalamin (8) das Nucleotid koordiniert ist. Ferner ist im Dicyano-cobinamid, (6) mit 2 CN⁻ als Liganden, die eine CN-Gruppe sehr fest gebunden, die andere nur locker [77]. Es ist bemerkenswert, daß man aus Cobinamid durch chemische Synthese nur die mit dem natürlichen Produkt identische Coenzym-Form erhält und kein Isomeres [74]. In Parallelen dazu wird synthetisches Co-Butylcobinamid durch *P. shermanii* in das gleiche Co-Butylcobalamin umgewandelt, das direkt aus Cobalamin synthetisiert werden kann [74]. Die Hydrid-Bildung kann beim Cobinamid daher nur an der (in den hier wiedergegebenen Formeln) „oberen“ Koordinationsstelle stattfinden, und das muß für die inkompletten Corrinoiden ebenso gelten wie für die kompletten. Vielleicht spielt hier die nicht völlig planare Anordnung des Corrin-Ringes [126] oder der Transeeffekt [128] eine Rolle.

II. Die 1-Aminopropan-2-ol-Gruppe

Die 1-Aminopropan-2-ol-Gruppe hat überraschenderweise eine besondere molekularbiologische Bedeutung, wie die Prüfung von zahlreichen Analogen mit abgewandeltem Alkanolamin-Teil [124] zeigt. Die bemer-

Tabelle I. Wirkung von Cobalamin- und Cobinamid-Analogen gegen *E. coli* 113-3 im Röhrchentest

I-Aminoäthan-2-ol-Gruppe mit Substituenten an		Wachstumswirkung im Vergleich mit		Hemmindex [129]	
C-1	C-2	Cobalamin (=100)	Cobinamid (=100)	Cobalamin	Cobinamid
H	H	83	71	0	0
H	CH ₃ (D)	100	100	0	0
H	CH ₃ (L)	60	80	0	0
H	Phenyl (DL)	0,01	0,01	17	32
H	2 CH ₃	45	36	0	0
CH ₃	CH ₃	1	36	0	0
CH ₃	H	0,1	0,01	6	7
C ₂ H ₅	H	—	0,01	—	5
2 CH ₃	H	0,1	0,01	3	3

kenswertesten Vertreter sind in Tabelle I angeführt. Für die Wachstumswirkung der chemisch und teilweise biochemisch gewonnenen Analogen bei *E. coli* 113-3 findet man beim Vergleich mit Cobalamin [130] und Cobin-

[126] D. C. Hodgkin et al., *Nature (London)* 176, 325 (1955).

[127] D. C. Hodgkin, persönliche Mitteilung.

[128] J. V. Quagliano u. L. Schubert, *Chem. Reviews* 50, 201 (1952).

[129] Der Hemmindex gibt an, in welchem Mol-Verhältnis der Hemmstoff das durch Cobalamin oder Cobinamid verursachte Wachstum um 50 % verhindert.

[130] H. C. Heinrich, W. Friedrich u. P. Riedel, *Biochem. Z.* 334, 284 (1961).

amid [32] jeweils etwa übereinstimmende Werte, solange an C-1 der 1-Aminoäthan-2-ol-Gruppe kein Substituent steht (Tabelle 1). Substituenten am C-Atom 2 setzen – falls es sich nicht um große Substituenten handelt – die Wachstumswirkung gegenüber denjenigen der Naturprodukte nicht allzu stark herab. Substitutionen am C-Atom 1 haben dagegen eine starke kompetitive antagonistische Wirkung zur Folge. Dies gilt bei den Cobinamid-Analogen [32] und den Cobalamin-Analogen [130a] auch für die Coenzym-Formen. Die Cobalamin-Antimetaboliten hemmen auch das Wachstum von *Ochromonas malhamensis* und wirken bei dekompen-sierten Pernicious-Patienten anti-erythrocytopoetisch [130]. Die gegenüber *E. coli* wachstumsfördernden Cobinamid-Analogen werden von *P. shermanii* in Gegenwart von 5,6-Dimethylbenzimidazol in die Cobalamin-Analogen umgewandelt. Das gilt nicht für die Cobinamid-Antagonisten [32].

III. Die Säureamid-Gruppen

Die Carboxylgruppen a bis e und g [siehe Formel (2a)] müssen amidiert sein, damit das Vitamin-B₁₂-Molekül biochemisch wirksam ist; Cobalamin-carbonsäuren sind bei *E.coli* inaktiv oder wirken antagonistisch [123, 131]. Die einzelnen Säureamid-Gruppen haben aber verschiedene biochemische Bedeutung, denn am stärksten antagonistisch gegen *E. coli* wirkt diejenige Cobalamin-monocarbonsäure [123, 132], die bei der biosynthetischen Amidierung das letzte Zwischenprodukt ist [81, 132], und die auch bei schonender Säure-Hydrolyse des Cobalamins überwiegend entsteht. In ihr ist vermutlich die e-ständige Carboxylgruppe frei [81]. Ihr Hemmindex (vgl. [129]) gegen *E. coli* beträgt 40 [133]. Alkylamide des Cobalamins – hergestellt durch Alkylamidierung der Carbonsäuren – wirken bei *E. coli* gleichfalls antagonistisch. Am stärksten wirken das Monomethylamid und das Hydrazid der bei der Hydrolyse des Cobalamins überwiegend auftretenden Monocarbonsäure (Hemmindex = 50) [123].

[130a] W. Friedrich, H. C. Heinrich, E. Königk u. P. Schulze in [7a].

[131] E. L. Smith in [3], S. 1.

[132] K. Bernhauer, E. Becher, G. Gross u. G. Wilharm, Biochem. Z. 332, 562 (1960).

[133] A. M. Kelemen, E. Czanyi u. A. Simon, Acta physiol. Acad. Sci. hung. 21, 177 (1962).

IV. Der Nucleotidteil

In vivo besitzen offenbar nur die Cobamid-Coenzyme, die Nucleotide enthalten, biochemische Funktionen, während den inkompletten Formen nur die Rolle von Zwischenprodukten der Biosynthese zukommt. In biologischen Systemen, in denen die inkompletten Formen aktiv sind (z. B. in Wachstumstesten), werden sie in komplett Cobamid-Coenzyme umgewandelt. In einigen enzymatischen Systemen ist allerdings auch das Cobinamid-Coenzym [6], mit H₂O und 5'-Desoxyadenosyl als Liganden am Co] schwach wirksam, so bei der Methylmalonyl-Isomerase [100] und bei der Umwandlung von Äthylenglykol in Acetaldehyd [106].

Die Art der Base im Nucleotidteil ist bei Bakterien nur von untergeordneter Bedeutung, wohl aber sehr wichtig für das Protozoon *O. malhamensis* und im tierischen Organismus. Hier sind nur Cobamide der Benzimidazol- und Naphthimidazol-Reihe wirksam. Obgleich bereits zahlreiche Cobamid-Analoga mit verschiedenen unnatürlichen Basen hergestellt worden sind [4, 18, 19], gelang es nicht, auf diesem Weg einen Cobalamin-Antagonisten mit gutem Hemmindex zu gewinnen. Die 3'-Phosphorsäureester-Bindung im Nucleotid ermöglicht der Base die Koordination am Kobalt [siehe Formel (8)], wodurch das Molekül seinen kompletten Charakter erhält, der biochemisch offenbar wichtig ist. Die 2'-Analogen, bei denen die Bindung zwischen Co und Imidazolring geschwächt ist, erwiesen sich stets als biologisch weniger aktiv [124].

V. Die 5'-Desoxyadenosyl-Gruppe der Coenzym-Formen

Die 5'-Desoxyadenosyl-Gruppe ist für die Aktivität der Coenzym-Formen in den oben genannten Enzymsystemen erforderlich. Ihr Ersatz durch andere Liganden wie 5'-Desoxyinosin, 5'-Desoxyuridin oder Alkylgruppen, führt entweder zum Verlust der Wirkung oder zu kompetitiven Antagonisten [72, 100]. Dagegen ist die 5'-Desoxyadenosyl-Gruppe für die Biosynthese des Vitamin-B₁₂-Moleküls nicht erforderlich, denn Co-Äthyl- und besonders Co-Butyl-cobinamid werden von *P. shermanii* in Gegenwart von 5,6-Dimethylbenzimidazol in vivo in die Co-Alkyl-cobalamine und erst bei längerer Versuchsdauer in Cobalamin-Coenzym umgewandelt [74].

Eingegangen am 4. Februar 1963 [A 310]
Ergänzt am 21. Oktober 1963.