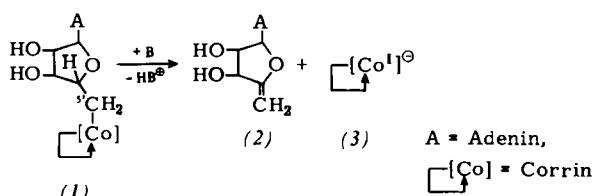


Nachweis von 4',5'-Anhydroadenosin als Spaltprodukt von Coenzym B₁₂ in funktionellen Holoenzymen^[**]

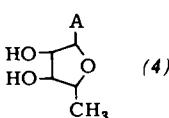
Von R. N. Katz, T. M. Vickrey und G. N. Schrauzer^[*]

Coenzym B₁₂ (5'-Desoxyadenosylcobalamin) (1) geht bei Einwirkung von Basen unter Spaltung der Co—C-Bindung in 4',5'-Anhydroadenosin (2) und das nucleophile Co(I)-Derivat des Corrins (Vitamin B_{12s}) (3) über. Eine Reaktion dieses Typs wurde als Möglichkeit der enzymatischen Coenzym-B₁₂-Aktivierung vorgeschlagen, da auf diese Weise das hochreaktive Co(I)-Derivat (3) aus (1) in Abwesenheit von Reduktionsmitteln entsteht^[1].



Versuche mit Ethanolamin-Desaminase und ¹⁴C-markiertem (1) unter anaeroben Bedingungen erbrachten Hinweise für die Anwesenheit von (2) im funktionellen Holoenzym bei schonender Aufarbeitung der Enzym-Inkubate durch Gefriertrocknung unter Lichtausschluß^[2]. Die ebenfalls beobachtete Inaktivierung des Holoenzyms durch N₂O, das Co(I)-Komplexe selektiv oxidiert, deutet auf das Vorliegen von gebundenem Vitamin B_{12s} im aktiven Enzym hin^[2].

Zur weiteren Stützung dieser Ergebnisse und unserer mechanistischen Vorstellungen unternahmen wir analoge Versuche mit D,L-Propandiol-Hydrolase (Diol-Dehydrase), diesmal jedoch unter Verwendung von 5'-³H-markiertem Coenzym B₁₂. Käufliches Enzym der Fa. Pierell S.p.A. (Mailand) wurde unter Standardbedingungen mit D,L-Propandiol als Substrat unter Argon bei 25°C inkubiert. Nach 15 bis 30 min wurden die Inkubate im Dunkeln lyophilisiert. Die festen Rückstände wurden mit 0,5 ml Methanol aufgenommen und mit nichtradioaktivem (2) sowie mit 5'-Desoxyadenosin (4) versetzt. Die methanolischen Lösungen wurden auf Papier



(Whatman No. I) getropft und im Dunkeln mit H₂O-gesättigtem 2-Butanol als aufsteigender Phase chromatographiert. Ähnliche Ergebnisse brachte die chromatographische Trennung auf Silicagelplatten [mit Ethylacetat/Methanol (6:1) als Eluierungsmittel]. Die Anwesenheit von ³H-markiertem (2) wurde durch Messung der Radioaktivitätsprofile sichergestellt^[3]. Abbildung 1 zeigt ein typisches Profil.

Verbindung (4) tritt meist nur in Spuren, zuweilen auch überhaupt nicht auf. Die Identität der als (2) angesehenen Verbindung wird durch die Ergebnisse von Versuchen gestützt, in denen die Chromatogramme mit einer 1proz. KMnO₄-Lösung in 2proz. wäßrigem Natriumcarbonat besprüht wurden.

[*] R. N. Katz, Dr. T. M. Vickrey und Prof. Dr. G. N. Schrauzer
Department of Chemistry, The University of California at San Diego,
Revelle College
La Jolla, Calif. 92093 (USA)

[**] Diese Arbeit wurde durch Grant 28485X der National Science Foundation (USA) gefördert. Wir danken Dr. H. P. C. Hogenkamp, Dr. J. G. Moffat, Dr. J. Verheyden und Dr. B. M. Babior für die Überlassung von ³H-markiertem Coenzym B₁₂, authentischem (2) sowie Ethanolamin-Desaminase. Wir danken auch Dr. E. A. Stadlbauer für experimentelle Mitarbeit zu Beginn unserer Untersuchungen.

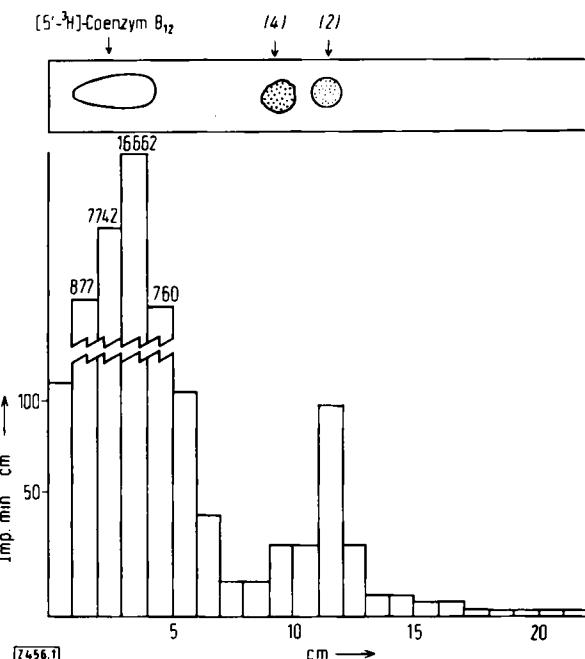


Abb. 1. Radioaktivitätsprofil eines Papierchromatogramms (auf Whatman No. I) des in Methanol aufgenommenen Rückstands nach der Gefriertrocknung einer mit 5'-³H-markiertem Coenzym B₁₂ inkubierten Lösung von D,L-Propandiol-Hydrolase nach Reaktion mit Propandiol als Substrat. Die authentischen, nichtaktiven Verbindungen (2) und (4) wurden vor der Chromatographie (mit H₂O-gesättigtem 2-Butanol) zugesetzt. Die Verbindungen wurden auf den Chromatogrammen durch UV-Licht bzw. I₂-Dampf sichtbar gemacht.

Dieses Reagens oxidiert (4) nur langsam, (2) dagegen rasch an der olefinischen Doppelbindung^[4]. Die im Chromatogramm ursprünglich vorhandene ³H-Aktivität im R_f-Bereich von (2) sinkt bei dieser Behandlung auf 38 % des ursprünglichen Wertes. Da (4) nicht immer und allenfalls in Spuren nachweisbar war, schließen wir, daß es als Produkt einer reduktiven Co—C-Spaltung von (1) entsteht, die unter nicht-enzymatischen Bedingungen ebenfalls beobachtet wurde^[5].

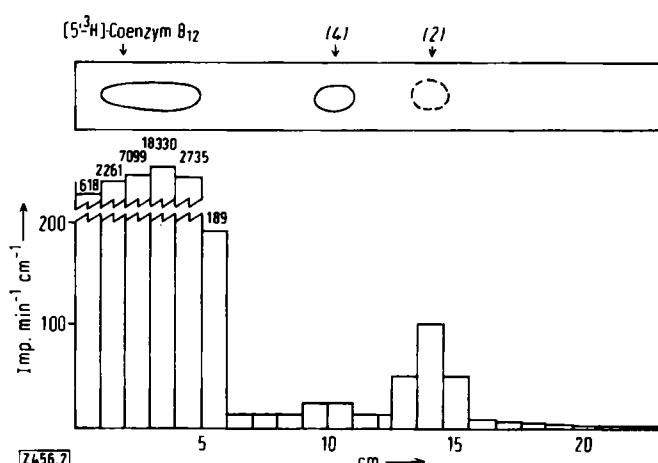


Abb. 2. Radioaktivitätsprofil eines Papierchromatogramms (auf Whatman No. I) des in Methanol aufgenommenen Rückstands einer mit 5'-³H-markiertem Coenzym B₁₂ inkubierten Lösung von Ethanolamin-Desaminase nach Reaktion mit Ethanolamin als Substrat. (Reaktionsbedingungen siehe [2, 6].)

Verbindung (2) wurde auch in analogen Versuchen mit ³H-markiertem Coenzym B₁₂ und Ethanolamin-Desaminase nachgewiesen: Abbildung 2 zeigt ein typisches Radioaktivitätsprofil. Wir beobachteten (2) nur unter anaeroben Bedingungen und bei Aufarbeitung der Inkubate durch Gefriertrock-

nung bei ca. –78 °C (Trockeneis/Aceton) und nicht mit inaktiven Enzympräparaten^[6].

Der Nachweis von (2) in zwei coenzym-B₁₂-abhängigen Enzymen stützt unsere Vorstellung, daß (1) enzymatisch durch *Heterolyse* und nicht durch Homolyse der Co—C-Bindung aktiviert wird und daß das außerordentlich stark nucleophile Co(I)-Derivat des Corrins als katalytisch aktive Spezies fungiert.

Eingegangen am 26. März 1976 [Z 456]

CAS-Registry-Nummern:

(1): 13870-90-1 / (2): 20535-04-0 / (3): 18534-66-2 / (4): 4754-39-6

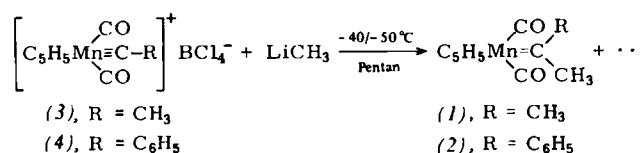
- [1] G. N. Schrauzer u. J. W. Sibert, J. Am. Chem. Soc. 92, 1022 (1970).
 - [2] G. N. Schrauzer u. E. A. Stadlbauer, Bioinorg. Chem. 4, 185 (1975).
 - [3] Andere Nucleosid-Derivate wurden nicht nachgewiesen, wenn unter Lichtausschluß gearbeitet wurde.
 - [4] Dr. J. Verheyden, Syntex S. A., Stanford, Calif. (USA), persönliche Mitteilung.
 - [5] G. N. Schrauzer, J. A. Seck, R. J. Holland, T. M. Beckham, E. M. Rubin u. J. W. Sibert, Bioinorg. Chem. 2, 93 (1972).
 - [6] Die Versuche wurden in Pyrex-Zentrifugen-Röhrchen (Fassungsvermögen: 15 ml) durchgeführt, die vorher mit Gummi-Serumverschlüssen versehen und 20 min mit reinem Ar durchspült wurden. Sie wurden dann mit Al-Folie umhüllt. Eine Ampulle des käuflichen Enzyms (29 mg, 7.0 Einheiten) wurde in 7.0 ml 0.01 M Kaliumphosphat-Puffer (pH = 7.4) gelöst; die Lösung enthielt 2% (v/v) Propandiol als Substrat. In der Regel wurden 0.9 ml dieser Enzmilösung in die Zentrifugen-Röhrchen injiziert. Die Reaktion wurde durch Zugabe von 12.6 nmol Coenzym B₁₂ in 0.1 ml H₂O eingeleitet. Die ³H-Aktivität des Coenzymlösung betrug 11.3 nC (25000 Impulse/min).

Dimethylcarben- und Methylphenylcarbendicarbo- nyl(η -cyclopentadienyl)mangan^[1]

*Von Ernst Otto Fischer, Roger Lee Clough, Gerhard Besl und
Fritz Roland Kreißl^[*]*

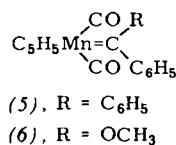
Die neuen Manganverbindungen (1) und (2) sind die ersten Übergangsmetall-Carben-Komplexe, in denen ein Dialkyl- oder ein Alkylarylcarben als Ligand an einem Metall stabilisiert ist. Diarylcarben-Komplexe des gleichen Systems sind bereits bekannt^[2].

(1) und (2) entstehen bei der Reaktion der kationischen Carbin-Komplexe (3) bzw. (4) mit Methylolithium:



Die roten, kristallinen Produkte sind in organischen Solventien gut löslich. Ihre Zusammensetzung und Struktur geht aus der Elementaranalyse und spektroskopischen Untersuchungen hervor.

Die IR-Spektren (in n-Hexan) zeigen im vco-Bereich jeweils zwei intensive Banden. Ihre Verschiebung zu höheren Wellenzahlen im Vergleich mit dem analogen Phenylmethoxycarbonyl-Komplex (6)^[3] stützt die Annahme einer stärkeren Rückbindung vom Metall zum Carbenkohlenstoff.



IR: ν_{CO} -Absorption [cm^{-1}]

(1)	(2)	(5) [2]	(6) [3.4]
1974	1980	1977	1960
1910	1918	1919	1897

Im $^1\text{H-NMR}$ -Spektrum von (1) findet man zwei scharfe Linien bei $\delta = 5.07$ (C_5H_5) und 3.02 ppm (CH_3) im Intensitätsverhältnis 5:6 (in $[\text{D}_6]$ -Aceton, rel. $\text{CD}_2\text{HCOCOD}_3 = 2.03$ ppm). (2) zeigt bei 7.2 ppm ein Multiplett (C_6H_5) sowie bei 4.75 (C_5H_5) und 3.15 ppm (CH_3) je ein Singulett (Intensität 5:5:3; aufgenommen in CDCl_3 , rel. TMS int.). – Bei $^{13}\text{C-NMR}$ -Messungen erscheint das Signal des Carbenkohlenstoffs von (1) und (2) bei deutlich tieferem Feld als das von (6).

¹³C-NMR-Verschiebungen [ppm], aufgenommen bei –55 °C in [D₆]-Aceton, rel. CD₃COCD₃ = 206.5 ppm.

	δ C-Carbon	δ CO	δ C ₆ H ₅	δ C ₅ H ₅	δ CH ₃
(1)	372.75	233.36	—	89.99	52.29
(2)	363.69	232.92	167.01	90.63	68.41
			127.31		
			125.26		
			118.90		
(6)	334.76	233.24	156.43	88.36	63.87
			128.06		
			127.73		
			123.42		

In den Massenspektren beobachtet man das Molekül-Ion bei $m/e = 218$ [(1)] bzw. 280 [(2)] und die sukzessive Abspaltung zweier CO-Gruppen, des Carben- und des C_5H_5 -Liganden.

Arbeitsvorschrift:

Alle Arbeiten sind in wasser- und sauerstoff-freien Lösungsmitteln unter N₂ auszuführen.

Dicarbonyl(η-cyclopentadienyl)methylcarbinmangan-tetrachloroborat (3): In die Lösung von 1.76 g (7.5 mmol) $C_5H_5Mn(CO)_2C[CH_3(OCH_3)]^{13}$ in 100 ml Pentan wird bei $-40^{\circ}C$ unter Rühren BCl_3 eingeleitet. Der entstehende Niederschlag wird abfiltriert, mehrmals mit Pentan gewaschen und am Hochvakuum getrocknet. Zur weiteren Reinigung löst man die Substanz in CH_2Cl_2 und überschichtet mit Pentan. Auf diese Weise erhält man nach dem Trocknen analytisch reines (3) in Form eines feinkristallinen, gelborangen, thermolabilen Pulvers. Ausbeute: 2.16 g (80.7%).

Dicarbonyl(η-cyclopentadienyl)dimethylcarbenmangan (**1**): Zur Suspension von 1.94 g (5.45 mmol) (**3**) in 50 ml Pentan werden bei -40°C 120 mg (5.45 mmol) LiCH₃, suspendiert in 50 ml Pentan, gegeben. Nach 3 h Röhren bei dieser Temperatur wird die rote Lösung von den festen Komponenten des Reaktionsgemisches abgetrennt, auf 50 ml eingeengt und an einer Kieselgel-Säule bei -25°C mit Pentan chromatographiert. Von drei Zonen enthält die mittlere, rote Zone das gewünschte Produkt. Nach Abziehen des Lösungsmittels und Umkristallisation aus Pentan erhält man (**1**) als dunkelrote Kristalle, die unterhalb Raumtemperatur schmelzen. Ausbeute: 220 mg (18 %).

Dicarbonyl(η-cyclopentadienyl)methylphenylcarbenemangan (2): Zur Suspension von 3.1 g (7 mmol) (4)^[14] [Darstellung

[*] Prof. Dr. E. O. Fischer, R. L. Clough, Ph. D., Dipl.-Chem. G. Besenius und Dr. E. B. Kraißl.

und Dr. F. R. KREIBI
Anorganisch-chemisches Institut der Technischen Universität
Arcisstraße 21, 8000 München 2