

- [22] E. R. Morris, D. A. Rees, G. Young, noch unveröffentlicht.
- [23] J. C. Su, W. Z. Hassid, *Biochemistry* 1, 468 (1962).
- [24] D. A. Rees, *Biochem. J.* 81, 347 (1961).
- [25] C. J. Lawson, D. A. Rees, *Nature* 227, 392 (1970).
- [26] A. Haug, B. Larsen, O. Smidsrød, *Acta Chem. Scand.* 21, 691 (1967).
- [27] A. Haug, B. Larsen, O. Smidsrød, *Acta Chem. Scand.* 20, 183 (1966).
- [28] A. Haug, B. Larsen: *Proceedings of the Vth International Seaweed Symposium*. Pergamon Press, Oxford 1966, S. 271.
- [29] A. Haug, B. Larsen, O. Smidsrød, T. Painter, *Acta Chem. Scand.* 23, 2955 (1969).
- [30] J. Boyd, Dissertation, University College of North Wales, Bangor 1975.
- [31] E. D. T. Atkins, I. A. Niedusynski, W. Mackie, K. D. Parker, E. E. Smolko, *Biopolymers* 12, 1865 (1973).
- [32] W. Mackie, *Biochem. J.* 125, 89P (1971).
- [33] E. D. T. Atkins, I. A. Niedusynski, W. Mackie, K. D. Parker, E. E. Smolko, *Biopolymers* 12, 1879 (1973).
- [34] R. Kohn, B. Larsen, *Acta Chem. Scand.* 26, 2455 (1972).
- [35] R. Kohn, *Pure Appl. Chem.* 42, 371 (1975).
- [36] G. T. Grant, E. R. Morris, D. A. Rees, P. J. C. Smith, D. Thom, *FEBS Lett.* 32, 195 (1973).
- [37] R. O. Gould, S. E. B. Gould, D. A. Rees, W. E. Scott, *J. Chem. Soc. Perkin Trans. II* 1976, 237.
- [38] S. E. B. Gould, R. O. Gould, D. A. Rees, A. W. Wight, *J. Chem. Soc. Perkin Trans. II* 1976, 392.
- [39] E. R. Morris, D. A. Rees, D. Thom, *J. Chem. Soc. Chem. Commun.* 1973, 245.
- [40] J. Boyd, E. R. Morris, D. A. Rees, D. Thom, J. R. Turvey, noch unveröffentlicht.
- [41] O. Smidsrød, A. Haug, *Acta Chem. Scand.* 26, 2063 (1972).
- [42] B. Larsen, A. Haug, *Carbohydr. Res.* 17, 287 (1971).
- [43] A. Haug, B. Larsen, *Carbohydr. Res.* 17, 297 (1971).
- [44] J. Madgwick, A. Haug, B. Larsen, *Acta Chem. Scand.* 27, 3592 (1973).
- [45] T.-Y. Lin, W. Z. Hassid, *J. Biol. Chem.* 241, 3282 (1966).
- [46] H. Deuel, E. Stutz, *Adv. Enzymol.* 20, 341 (1968).
- [47] D. A. Rees, *Adv. Carbohydr. Chem. Biochem.* 24, 267 (1969).
- [48] D. A. Rees, A. W. Wight, *J. Chem. Soc. B* 1971, 1366.
- [49] K. J. Palmer, M. B. Hartzog, *J. Am. Chem. Soc.* 67, 2122 (1947); K. J. Palmer, R. C. Merrill, H. S. Owens, M. Ballantyne, *J. Phys. Chem.* 51, 710 (1947).
- [50] H. Kauss, A. L. Swanson, W. Z. Hassid, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 26, 234 (1967).
- [51] H. Kauss, W. Z. Hassid, *J. Biol. Chem.* 242, 3449 (1967).
- [52] R. Kohn, I. Furda, Z. Kopeck, *Collect. Czech. Chem. Commun.* 33, 264 (1968).
- [53] R. Kohn, I. Furda, *Collect. Czech. Chem. Commun.* 34, 641 (1969).
- [54] G. O. Aspinall, I. W. Cottrell, S. V. Egan, I. M. Morrison, J. N. C. White, *J. Chem. Soc. C* 1967, 1071.
- [55] S. E. B. Gould, D. A. Rees, N. G. Richardson, I. W. Steele, *Nature* 208, 876 (1965).
- [56] P. Jansson, L. Kenne, B. Lindberg, *Carbohydr. Res.* 45, 275 (1975).
- [57] L. D. Melton, L. Mindt, D. A. Rees, G. R. Sanderson, *Carbohydr. Res.* 46, 245 (1976).
- [58] S. Arnott, R. Moorhouse, D. A. Rees, unveröffentlichte Ergebnisse.
- [59] E. R. Morris, D. A. Rees, M. D. Walkinshaw, G. Young, A. Darke, *J. Mol. Biol.* 110, 1 (1977).
- [60] A. Jeannes, J. E. Pittsley, F. R. Senti, *J. Appl. Polym. Sci.* 17, 519 (1961).
- [61] I. C. M. Dea, A. Morrison, *Adv. Carbohydr. Chem. Biochem.* 31, 241 (1975).
- [62] C. A. Baker, R. L. Whistler, *Carbohydr. Res.* 45, 237 (1975).
- [63] I. C. M. Dea, A. A. McKinnon, D. A. Rees, E. J. Welsh, unveröffentlichte Ergebnisse.
- [64] E. A. Balazs: *Chemistry and Molecular Biology of the Intercellular Matrix*. Bd. 2. Academic Press, London 1970.
- [65] M. B. Mathews, J. A. Cifonelli, *J. Biol. Chem.* 240, 4140 (1965); V. P. Bhavanandan, K. Meyer, *ibid.* 243, 1052 (1968).
- [66] U. Lindahl: *M. T. P. International Review of Science, Organic Chemistry Series 2*, Bd. 7, Carbohydrates. Butterworths, London 1976, S. 283.
- [67] A. S. Perlin, B. Casu, G. R. Sanderson, J. Tse, *Carbohydr. Res.* 21, 123 (1972).
- [68] U. Lindahl, G. Bäckström, A. Malmström, L. A. Fransson, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 46, 985 (1972).
- [69] M. Höök, U. Lindahl, G. Bäckström, A. Malmström, L. A. Fransson, *J. Biol. Chem.* 249, 3908 (1974).
- [70] J. K. Sheehan, E. D. T. Atkins, I. A. Niedusynski, *J. Mol. Biol.* 91, 153 (1975).
- [71] S. Arnott, J. M. Guss, D. W. L. Hukins, M. B. Mathews, *Science* 180, 743 (1973).
- [72] D. H. Isaac, E. D. T. Atkins, *Nature New Biol.* 244, 252 (1973).
- [73] E. D. T. Atkins, D. H. Isaac, *J. Mol. Biol.* 80, 773 (1973).
- [74] J. M. Guss, D. W. L. Hukins, P. J. C. Smith, W. T. Winter, S. Arnott, R. Moorhouse, D. A. Rees, *J. Mol. Biol.* 95, 359 (1975).
- [75] E. D. T. Atkins, J. K. Sheehan, *Science* 179, 562 (1973).
- [76] S. Arnott, J. M. Guss, D. W. L. Hukins, I. C. M. Dea, D. A. Rees, *J. Mol. Biol.* 88, 175 (1974).
- [77] E. D. T. Atkins, R. Gausson, D. H. Isaac, V. Nandanwar, J. K. Sheehan, *J. Polym. Sci. B* 10, 863 (1972).
- [78] S. Arnott, J. M. Guss, D. W. L. Hukins, M. B. Mathews, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 54, 1377 (1973).
- [79] T. C. Laurent, *Fed. Proc.* 25, 1037 (1966).
- [80] A. G. Ogston, J. E. Stanier, *Biochem. J.* 49, 585 (1951).
- [81] E. A. Balazs, *Fed. Proc.* 25, 1817 (1966).
- [82] B. N. Preston, M. Davies, A. G. Ogston, *Biochem. J.* 96, 449 (1965).
- [83] D. A. Gibbs, E. W. Merrill, K. A. Smith, E. A. Balazs, *Biopolymers* 6, 777 (1968).
- [84] D. A. Gibbs, E. A. Balazs, persönliche Mitteilung.
- [85] A. Darke, E. G. Finer, R. Moorhouse, D. A. Rees, *J. Mol. Biol.* 99, 477 (1975).
- [86] M. B. Mathews, persönliche Mitteilung (siehe auch [64], dort S. 747); E. R. Morris, E. J. Welsh, unveröffentlichte Ergebnisse.

## Neuere Entwicklungen auf dem Gebiet des Vitamins B<sub>12</sub>: Von einfachen Corrinen und von Coenzym B<sub>12</sub> abhängige Enzymreaktionen

Von G. N. Schrauzer<sup>[\*]</sup>

Einfache Corrine, z. B. Vitamin B<sub>12</sub>, und Vitamin-B<sub>12</sub>-Coenzyme katalysieren eine Vielzahl von ungewöhnlichen Enzymreaktionen, für die es zum Teil noch keine Analogien aus dem Bereich der synthetischen organischen oder metallorganischen Chemie gibt. Die Mechanismen dieser Reaktionen sind zur Zeit noch Gegenstand lebhafter Diskussionen. Der vorliegende Aufsatz gibt einen Überblick über neuere Vorstellungen zur Frage der Wirkungsweise der Vitamin-B<sub>12</sub>-Coenzyme in enzymatischen Reaktionen.

### 1. Einleitung

Im ersten Teil dieser Serie wurden die wichtigsten Reaktionen des Cobaltatoms in Corrinen und in Modellverbindungen

[\*] Prof. Dr. G. N. Schrauzer  
University of California at San Diego, Revelle College  
La Jolla, Calif. 92093 (USA)

beschrieben<sup>[1]</sup>. Im vorliegenden Teil werden Corrin-abhängige Enzymreaktionen behandelt. Wir werden dabei besonders auf die Wirkungsweise der Vitamin-B<sub>12</sub>-Coenzyme eingehen. Auf die Wiedergabe von Einzelheiten, die sich auf Vorkommen, Eigenschaften und Isolierung der Enzyme beziehen, wird im allgemeinen verzichtet. Ebenso können medizinische Aspekte, also etwa physiologische Vitamin-B<sub>12</sub>-Transportmechanismen

oder Mangelkrankungen, nicht behandelt werden. Zusammenfassende Berichte hierüber finden sich in der Literatur<sup>[2, 3]</sup>. Die Komplexität der Vitamin-B<sub>12</sub>-abhängigen Enzymreaktionen erfordert zusätzlich eine Beschränkung des Themenkreises. So ist es im zur Verfügung stehenden Raum nicht möglich, alle diese Enzymreaktionen gründlich zu diskutieren oder auf historische Entwicklungen im einzelnen einzugehen. Man kann die Auffassung vertreten, daß Mechanismen von Enzymreaktionen erst dann als bewiesen gelten können, wenn sie sich unter nichtenzymatischen Bedingungen, d. h. also in Modellsystemen, zumindest im Prinzip simulieren lassen. Seit der Entdeckung von Vitamin-B<sub>12</sub>-Modellverbindungen beschäftigen wir uns in diesem Sinne mit der Aufklärung zumindest einiger der einfacher erscheinenden Reaktionen. Auch andere Forscher verwenden Vitamin-B<sub>12</sub>-Modellverbindungen mit dem gleichen Ziel. Darüber hinaus werden auch von rein biochemischer Seite immer noch neue Beiträge geliefert. Trotz erheblicher Anstrengungen weiß man über die Wirkungsweise der Vitamin-B<sub>12</sub>-Coenzyme in Enzymreaktionen aber immer noch erstaunlich wenig. Zur Zeit herrscht auf diesem Gebiet noch manche Unklarheit, die zum Teil auf unzureichende Kommunikation in diesem interdisziplinären Bereich zurückzuführen ist. Es ist daher gleichermaßen reizvoll

und notwendig, zusammenfassend über das sich noch im Fluß befindliche Forschungsgebiet zu berichten.

## 1.1. Gliederung

Die Corrin-abhängigen Enzyme lassen sich in zwei Gruppen einteilen. Die erste Gruppe umfaßt die Enzyme, in denen einfache Corrine, also z. B. Vitamin B<sub>12</sub> selbst, als Cofaktoren fungieren. Diese sind in Tabelle 1 wiedergegeben. In der zweiten Gruppe finden sich alle Enzyme, die Vitamin-B<sub>12</sub>-Coenzyme, also z. B. 5'-Desoxyadenosylcobalamin, benötigen (siehe Tabelle 2). Es ist daher sinnvoll, beide Gruppen getrennt zu behandeln.

## 1.2. Nomenklatur

Wir benutzen die gleiche abgekürzte Nomenklatur wie im ersten Teil<sup>[1]</sup>. 5'-Desoxyadenosylcobalamin (1) (Abb. 1) wird als „Coenzym B<sub>12</sub>“ bezeichnet. Alle übrigen Abkürzungen sind entweder direkt verständlich oder werden im Text erläutert. Die typischen Vitamin-B<sub>12</sub>-Modellverbindungen werden Cobaloxime genannt.

Tabelle 1. Von einfachen Corrinen abhängige Enzyme [4].

Enzym	Vorkommen	Reaktion [a]	Zusätze
Methan-Synthetase	z. B. <i>Methanosarcina barkeri</i> , <i>Methanobacterium M. o. H.</i>	$C_1 \rightarrow CH_4$	Reduktionsmittel (H <sub>2</sub> ) (ATP, H <sub>2</sub> , „Coenzym M“)
Methylarsan-Synthetase	<i>Methanobacterium M. o. H.</i>	$C_1 \xrightarrow{+ As^{3+}} AsH_3-a(CH_3)_n$	ATP, H <sub>2</sub> , „Coenzym M“ (?)
Acetat-Synthetase	<i>Clostridium thermoaceticum</i>	$C_1 + CO_2 \rightarrow CH_3CO_2^-$	Reduktionsmittel
Methionin-Synthetase	<i>Escherichia coli</i>	$5-CH_3-THFA + Homocystein \rightarrow THFA + Methionin$	Adenosylmethionin (reduzierende Bedingungen)

[a] C<sub>1</sub> sind C<sub>1</sub>-Vorläufer der Methylgruppe, schließen aber auch Verbindungen ein, die bereits eine reaktionsfähige Methylgruppe enthalten, z. B. 5-CH<sub>3</sub>-THFS [= 5-Methyl-tetrahydrofolsäure, Formel siehe Gl. (k)].

Tabelle 2. Von Coenzym B<sub>12</sub> abhängige Enzyme [4].

Enzym	Vorkommen	Reaktion	Mol.-Gew.	Zusätze
Diol-Dehydratase	<i>Aerobacter aerogenes</i>	$CH_3CH(OH)CH_2OH \rightarrow CH_3CH_2CHO + H_2O$	?	K <sup>+</sup> (NH <sub>4</sub> <sup>+</sup> )
Glycerin-Dehydratase	<i>Lactobacillus sp.</i>	$CH_2(OH)CH(OH)CH_2OH \rightarrow CH_2(OH)CH_2CHO + H_2O$	188 000	K <sup>+</sup> (NH <sub>4</sub> <sup>+</sup> )
Ethanolamin-Desaminase	<i>Clostridium sp.</i>	$CH_2(NH_2)CH_2OH \rightarrow CH_3CHO + NH_3$	520 000	K <sup>+</sup> (NH <sub>4</sub> <sup>+</sup> , Rb <sup>+</sup> )
Ribonucleotid-Reduktase	z. B. <i>Lactobacillus leichmannii</i>	$R(SH)_2 + GTP \rightarrow R(S_2)_2 + dGTP + H_2O$	70 000	Effektoren, z. B. dGTP
Methylmalonyl-CoA-Mutase	<i>Propionibacterium shermanii</i> , Schafsleber	$HO_2CCH(CH_3)COCOA \rightleftharpoons HO_2CCH_2CH_2COCOA$	56 000	
Glutamat-Mutase	z. B. <i>Clostridium tetanomorphum</i>	$HO_2C(CH_2)_2\overset{\overset{NH_3^+}{ }}{CH}CO_2H \rightleftharpoons HO_2CCH(CH_3)\overset{\overset{NH_3^+}{ }}{CH}CO_2H$	165 000 17 000	
α-Methylen-glutarat-Mutase	<i>Clostridium barkeri</i>	$HO_2C(CH_2)_2\overset{\overset{CH_2}{ }}{C}-CO_2H \rightleftharpoons HO_2CCH(CH_3)\overset{\overset{CH_2}{ }}{C}-CO_2H$	ca. 170 000	
L-β-Lysin-Aminomutase	<i>Clostridium sticklandii</i>	$\overset{\overset{NH_3^+}{ }}{CH_2}(CH_2)_2\overset{\overset{NH_3^+}{ }}{CH}CH_2CO_2^- \rightleftharpoons CH_3-\overset{\overset{NH_3^+}{ }}{CH}CH_2\overset{\overset{NH_3^+}{ }}{CH}CH_2CO_2^-$	(I) ca. 60 000 [a] (II) 160 000	K <sup>+</sup> (Rb <sup>+</sup> ), Mg <sup>2+</sup> (Mn <sup>2+</sup> ), ATP, Pyruvat
D-α-Lysin-Aminomutase	<i>Clostridium sticklandii</i>	$\overset{\overset{NH_3^+}{ }}{CH_2}(CH_2)_3\overset{\overset{NH_3^+}{ }}{CH}CO_2^- \rightleftharpoons CH_3-\overset{\overset{NH_3^+}{ }}{CH}(CH_2)_2\overset{\overset{NH_3^+}{ }}{CH}CO_2^-$	(I) ca. 60 000 (II) 160 000	K <sup>+</sup> (Rb <sup>+</sup> ), Mg <sup>2+</sup> (Mn <sup>2+</sup> ), ATP, Pyridoxal-phosphat
Ornithin-Aminomutase	<i>Clostridium sticklandii</i>	$\overset{\overset{NH_3^+}{ }}{CH_2}(CH_2)_2\overset{\overset{NH_3^+}{ }}{CH}CO_2^- \rightleftharpoons CH_3-\overset{\overset{NH_3^+}{ }}{CH}CH_2\overset{\overset{NH_3^+}{ }}{CH}CO_2^-$	(I) ca. 60 000 (II) 160 000	keine (?)

[a] Zwei Komponenten; Protein II bindet das Coenzym B<sub>12</sub>.

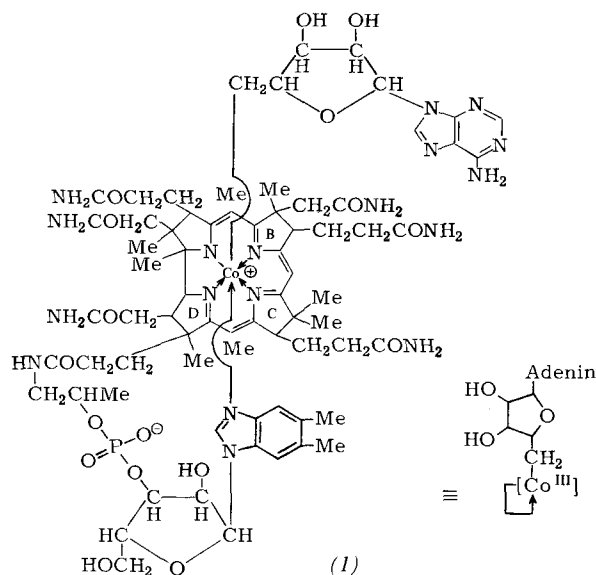


Abb. 1. Struktur des Coenzym  $B_{12}$  (1) [43, 44]. Vitamin  $B_{12}$  trägt am Cobaltatom anstelle des 5'-Desoxyadenosylrestes eine Cyanogruppe, Vitamin  $B_{12a}$  eine Hydroxylgruppe.

## 2. Von einfachen Corrinen abhängige Enzymreaktionen

Die in Tabelle 1 wiedergegebenen Enzymreaktionen laufen in Gegenwart von einfachen Corrinen, z. B. Vitamin  $B_{12a}$  (Hydroxocobalamin) ab. Einige Methanbakterien verwenden Corrin-Derivate, in denen 5,6-Dimethylbenzimidazol durch andere Basen ersetzt ist, z. B. „Faktor III“, das 5-Hydroxybenzimidazol als axiale Base enthält. Die Basenkomponente kann auch fehlen: Cobinamid besitzt ebenfalls Cofaktoreigenschaften und wurde zuweilen „Faktor B“ genannt<sup>[5]</sup>. Die Bildung von Methylarsanen ist vermutlich eine Nebenreaktion bei der Methanogenese in Gegenwart von Arsen und erfordert wahrscheinlich kein unabhängiges Enzym.

### 2.1. Methan-Biosynthese

Es gibt mehrere Bakterien, die Methan als Stoffwechsel-Endprodukt aus Cellulose, Zucker, Fettsäuren, Alkoholen, Formaldehyd, Serin, aber auch aus  $CO_2$  bilden. Diese Bakterien lassen sich im allgemeinen nur schwer in Reinkultur erhalten. Am besten untersucht sind *Methanosarcina barkeri* sowie *Methanobacterium M. o. H.* Andere Methan-produzierende Bakterien sind ebenfalls bekannt; erwähnt seien Spezies vom Genus *Methanococcus* sowie *Methanobacterium ruminantium*, *Methanospirillum* und *Methanobacterium formicium*. *Methanococcus vanneillii* wurde vor Jahren aus dem Schlamm der San Francisco Bay isoliert, ging aber später verloren. Eine tiefgekühlte, mehr als zwölf Jahre aufbewahrte Ampulle mit den Bakterienzellen war jedoch noch vorhanden. Stadtmann gelang es, den Bakterienstamm daraus erneut zu züchten. (vgl. [5]).

Methan-produzierende Bakterien finden sich bevorzugt in Faulschlamm, woraus sie „Sumpfgas“ erzeugen, das im wesentlichen aus Methan besteht. Nicht unerheblich und in Zukunft vielleicht auch wirtschaftlich interessant ist die Methanbildung in städtischen Abfall-Aufbereitungsanlagen. Schon vor dem 2. Weltkrieg wurden aus den Abwasserkläranlagen der Stadt Stuttgart pro Jahr 2 Millionen  $m^3$  Methan gewonnen, mit

denen 110 städtische Kraftfahrzeuge betrieben werden konnten<sup>[6]</sup>. Auch im Rumen der Kuh und anderer Wiederkäuer werden erhebliche Mengen Methan produziert. Hier handelt es sich allerdings um eine unerwünschte Nebenreaktion, da auf diese Weise ein Teil der zugeführten Nahrung verloren geht. Man hat errechnet<sup>[5]</sup>, daß eine ausgewachsene Kuh täglich etwa 200 Liter Methan bilden kann. Auch im menschlichen Darm wird Methan erzeugt; die Menge hängt von der Zusammensetzung der Nahrung ab.

### 2.2. Methan-Synthese in vitro

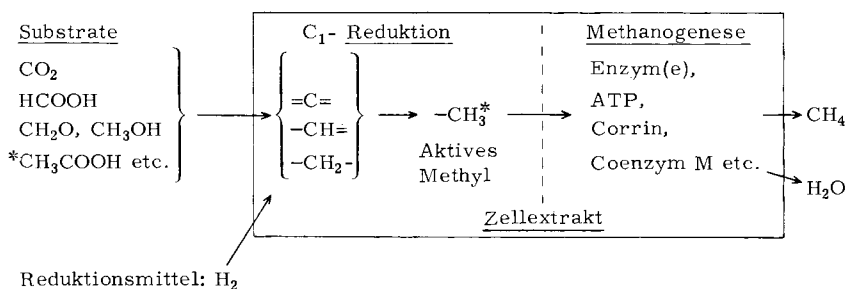
Zur Reinkultur von Methanbakterien verwendet man im allgemeinen Nährmedien, denen Ammoniak als Stickstoffquelle, B-Vitamine und Rumenflüssigkeit zugesetzt werden. Als  $C_1$ -Quellen dienen  $CO_2$ , Methanol, Ethanol, Formiat oder Acetat, als Reduktionsmittel molekularer Wasserstoff. Es gelang bisher noch nicht, die Methan-Synthetasen zu isolieren. Alle Versuche zur Methan-Synthese in vitro wurden entweder mit intakten Zellen oder in zellfreien Extrakten durchgeführt<sup>[5]</sup>. Als Substrate für die Methanbildung eignen sich auch Serin, Pyruvat, 5-Methyl-tetrahydrofolsäure ( $5-CH_3$ -THFS), 5,10-Methylen-tetrahydrofolsäure, Methylcobalamin, andere methylierte Corrine und sogar Methyl-Derivate von Vitamin- $B_{12}$ -Modellverbindungen<sup>[7]</sup>. Extrakte von *Methanobacterium M. o. H.* erfordern zur Methanbildung noch den Zusatz katalytischer Mengen an ATP. Wolfe et al. fanden, daß noch ein weiterer Cofaktor vermutlich essentiell ist, und zwar 2-Mercaptoethylsulfonat,  $HS-CH_2CH_2SO_3^-$ <sup>[8]</sup>. Diese Verbindung hat die Eigenschaften eines Coenzym und wurde daher Coenzym M genannt. In Abwesenheit von ATP wird Coenzym M von Methylcobalamin zu S-Methyl-Coenzym M methyliert. Die letztgenannte Verbindung wird bei Zusatz zu den Zellextrakten unter Methanbildung demethyliert; die Demethylierung wird durch Tripolyphosphat gehemmt<sup>[8]</sup>. Es steht noch nicht fest, ob Methan ausschließlich auf diesem Wege entsteht oder ob Methylierung und Demethylierung des Coenzym M nicht vielleicht eine Nebenreaktion sind. Andererseits werden zweifellos Methylgruppen in der Endstufe der Methanogenese auf das Corrin übertragen. Ein Corrin-enthaltendes Protein aus *Methanobacterium omelianskii*, einem Organismus, der eine symbiotische Assoziation von *Methanobacterium M. o. H.* mit einem wasserstoffbildenden Organismus ist<sup>[9]</sup>, läßt sich durch Propyliodid inaktivieren. Da die Hemmung der Methanbildung nach der Propylierung durch Lichteinwirkung wieder aufgehoben werden kann, ist anzunehmen, daß das enzymgebundene Corrin in das *n*-Propylcobalt-Derivat übergeht, dessen Co—C-Bindung durch Licht gespalten wird. Die Methan-Synthese wird auch durch halogenierte Kohlenwasserstoffe einschließlich Freon und sogar DDT gehemmt<sup>[10–12]</sup>. (Chlor-methyl)cobalamine wirken als kompetitive Inhibitoren der Methanogenese. Wie das Methan aber eigentlich gebildet wird, ist aus diesen Versuchen nicht zu entnehmen. Zeitweise wurde die Auffassung vertreten, daß bei diesen Reaktionen Methyl-Radikale auftreten<sup>[13]</sup>, doch müssen solche Mechanismen jetzt als unwahrscheinlich angesehen werden.

### 2.3. Mechanismus der Methan-Synthese

In Schema 1 sind die wichtigsten Reaktionen zusammengefaßt, die in zellfreien Extrakten von Methan-bildenden Bakteri-

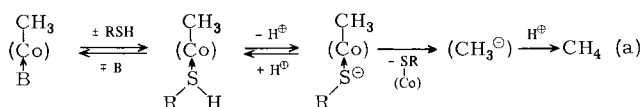
en, insbesondere von *Methanobacterium M. o. H.* auftreten. Ein voll zufriedenstellender Mechanismus kann auf der Basis des experimentellen Materials noch nicht formuliert werden.

Der Befund, daß Methylcobaloxime in den Zellextrakten von *Methanobacterium M. o. H.* unter Methanbildung demethyliert werden, ist in diesem Zusammenhang von Interesse.

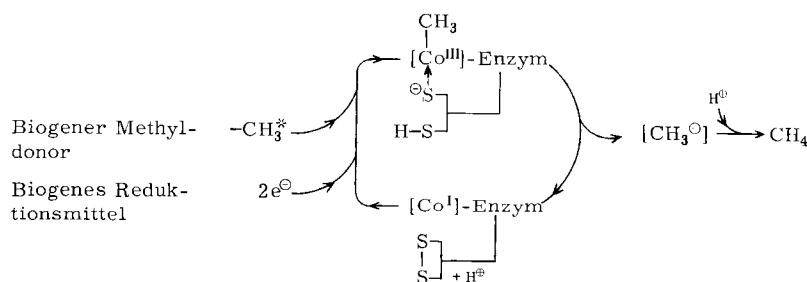


Schema 1. Enzymatische Methan-Synthese.

Wir diskutieren die Möglichkeit, daß Methan durch reduktive Spaltung der Co—C-Bindung des methylierten Corrins gebildet wird<sup>[14]</sup>. Eine derartige Reaktion wird unter nichtenzymatischen Bedingungen beobachtet (vgl. <sup>[1]</sup>). Als Reduktionsmittel eignen sich Thiole sowie insbesondere Dithiole; die Reaktion wird im Sinne von Gl. (a) formuliert. (Co) steht für das planare Ligandensystem und das Cobaltatom der Cobaloxime, die als Modellverbindungen dienen.

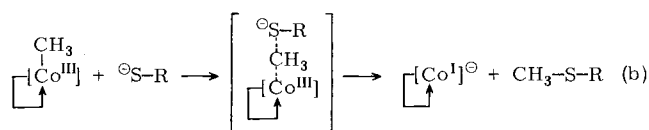


Unter der Annahme, daß im Enzym eine Dithiol-Gruppierung als biogenes Reduktionsmittel fungiert, wurde daher ein katalytischer Prozeß im Sinne von Schema 2 vorgeschlagen<sup>[14]</sup>.



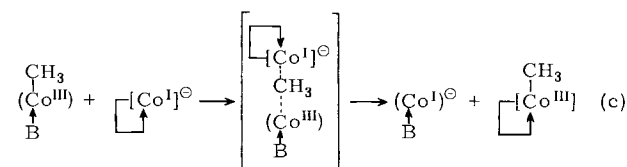
Schema 2. Vorschlag eines Mechanismus der Methan-Biosynthese.

Damals war über Coenzym M nur wenig bekannt. Als Thiol sollte es mit Methylcobalamin nichtenzymatisch in Analogie zu Gl. (a) Methan liefern. Dies konnte inzwischen bestätigt werden<sup>[15]</sup>, was freilich noch nicht bedeutet, daß Coenzym M sich auch in den Zellextrakten als Reduktionsmittel verhält. Andererseits ist bekannt<sup>[1]</sup>, daß Methylcobalamin mit Thiolat-Ionen nach Gl. (b) Methylsulfide liefert.



Gl. (b) ist demnach ein Modell der enzymatischen Demethylierung von Methylcobalamin durch Coenzym M (2-Mercaptoethylsulfonat).

Methan entsteht aus Methylcobaloximen jedoch nur, wenn die Zellextrakte mit katalytischen Mengen eines Corrins sowie von ATP versetzt werden<sup>[7]</sup>. Es lag daher nahe anzunehmen,



daß die Methylgruppen zunächst auf den Corrin-Cofaktor übertragen werden. Ein reversibler Austausch der Methylgruppen im Sinne von Gl. (c) findet unter nichtenzymatischen Bedingungen statt<sup>[16]</sup>.

Diese Interpretation führt allerdings zu Schwierigkeiten. Wäre diese Reaktion die Hauptreaktion, so sollten entweder alle Methylcobaloxime gleichschnell Methan liefern, oder es

müßte zumindest ein Zusammenhang zwischen der Reaktionsgeschwindigkeit und der Tendenz verschiedener Methylcobaloxime bestehen, die Methylgruppe zu übertragen. Dies ist jedoch nicht der Fall. Es zeigte sich stattdessen, daß die Geschwindigkeit der Methanbildung von der Natur der axialen Basen B der Cobaloxime abhängt. Zur Erklärung dieser interessanten Tatsache wurden Löslichkeitsunterschiede der Cobaloxime angeführt<sup>[17]</sup>.

Ein Zusammenhang zwischen der Löslichkeit der Modellverbindungen in polaren Lösungsmitteln und der Geschwindigkeit der enzymatischen Methanbildung besteht jedoch nicht<sup>[16]</sup>. Vergleicht man aber die Geschwindigkeit der Methanbildung nach Gl. (a) mit der Geschwindigkeit der enzymatischen Methanbildung<sup>[7, 14, 16]</sup>, so ergibt sich eine statistisch signifikante ( $P=0.05$ ) direkte Korrelation<sup>[18]</sup>. Dazu wurden die Meßwerte für 13 Modellverbindungen und für Methylcobalamin

herangezogen. Beschränkt man die Korrelationsrechnung auf Methylcobalamin und Methylcobaloxime, so ergibt sich ein linearer Korrelationskoeffizient von  $r=0.87$  (7 Versuchsdaten), mithin eine hohe statistische Signifikanz ( $P<0.01$ )<sup>[18]</sup>. Es ist somit durchaus möglich, daß Methan aus Methylcobalamin im Sinne von Schema 2 entsteht und daß auch die Methylcobaloxime durch Wechselwirkung mit einem biogenen Reduktionsmittel demethyliert werden. Die Co—C-Bindung wird durch axialen Angriff gespalten, möglicherweise durch Reaktion mit einem Thiol oder Dithiol.

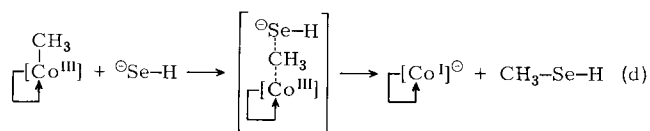
Wie diese Ausführungen erkennen lassen, ist die Methan-Biosynthese ein relativ komplizierter Vorgang. Daß sich die Natur zumindest für Teilschritte der Corrine bedient, ist nicht überraschend, da das Co(I)-Supernucleophil des Vitamins B<sub>12</sub> (Vitamin B<sub>12s</sub>) der wirksamste biologische Methylgruppenfänger ist. Auf weitere Einzelheiten, z. B. die Reduktion von CO<sub>2</sub> zu aktiven Methylgruppen, wird hier nicht eingegangen, da es sich um Corrin-unabhängige Reaktionen des C<sub>1</sub>-Stoffwechsels handelt. Es sei auch noch einmal darauf hingewiesen, daß es möglicherweise auch eine Corrin-unabhängige Methanbildung gibt (vgl. die reduktive Demethylierung des methylierten Coenzym M)<sup>[19]</sup>.

## 2.4. Methylarsan-Biosynthese

Bei Zusatz von Arsenat zu Zellextrakten von *Methanobacterium M. o. H.* bilden sich Methylarsan-Derivate, z. B. AsH(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub> und AsH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub><sup>[20]</sup>. Auch mit intakten Zellen dieses Organismus wurde die Arsen-Methylierung unter den Bedingungen der Methanogenese beobachtet; die Reaktion wird durch Selenit gehemmt. Als Donor der Methylgruppe fungiert Methylcobalamin<sup>[20]</sup>. Diese Arsen-Methylierung hat offensichtlich wenig oder nichts mit der zu ähnlichen Produkten führenden Reaktion von Schimmelpilzen wie *Penicillium glaucum* zu tun, sondern muß eng mit der Methan-Biosynthese zusammenhängen, da stets auch Methan entsteht. Methylcobalamin sowie Methylcobaloxime methylieren Arsen unter Bedingungen, bei denen auch die reduktive Spaltung der Co—C-Bindung erfolgt<sup>[16]</sup>. Die Reaktion wird durch Selenit gehemmt, das zu Selenid reduziert wird und anschließend in Methylselenid übergeht. Der Befund, daß Ethylcobalamin bei der Enzymreaktion keine Ethylarsane liefert, ist von Interesse, da Arsen auch unter nichtenzymatischen Bedingungen nicht durch Ethylcobalamin ethyliert wird; mit Ethylcobaloximen entstehen nur Spuren an Ethylarsanen<sup>[16]</sup>. Die enzymatische Arsen-Methylierung läßt sich daher im Sinne von Schema 3 plausibel erklären; die Methylierung des Selen wird dagegen als Substitution nach Gl. (d) aufgefaßt.

Die Arsen-Methylierung ist am besten als bakterielle Entgiftungsreaktion anzusehen. Auch die nachgewiesene<sup>[21]</sup> Methy-

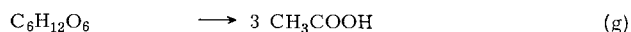
lierung von Hg<sup>2+</sup> sei in diesem Zusammenhang erwähnt. Methylcobalamin reagiert unter nichtenzymatischen Bedingun-



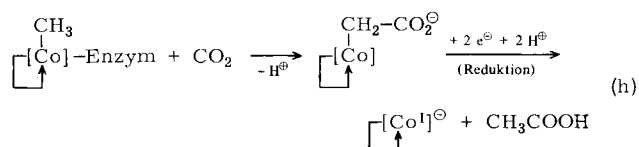
gen ebenfalls rasch mit Hg<sup>2+</sup>-Salzen zu Hg(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub><sup>[22, 23]</sup>. Die Hg-Methylierung durch Methylcobalamin in vivo könnte toxiologische Bedeutung haben<sup>[24]</sup>.

## 2.5. Acetat-Biosynthese

Acetat (oder Essigsäure) ist die Endstufe der Vergärung von Glucose, Cellulose etc. durch *Clostridium thermoaceticum*<sup>[25]</sup>. Die Summengleichungen (e) bis (g) geben den Prozeß schematisch wieder<sup>[26]</sup>.

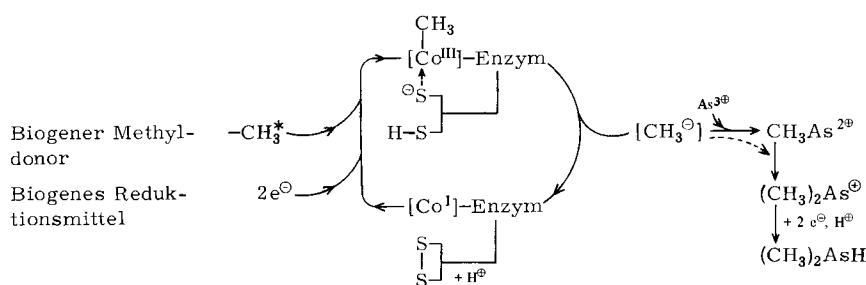


Zellfreie Extrakte von *Cl. thermoaceticum* wandeln die Methylgruppe von zugesetztem Methylcobalamin *insgesamt*, d. h. ohne Verlust von Methylwasserstoff, in Essigsäure um<sup>[27]</sup>. Bei dieser Reaktion handelt es sich somit um eines der seltenen Beispiele einer bakteriellen CO<sub>2</sub>-Assimilation; sie erfolgt nur unter reduzierenden Bedingungen und wird durch SH-blockierende Agentien gehemmt. Zunächst wurde angenommen, daß Acetat über Carboxymethylcobalamin nach Gl. (h) entsteht<sup>[28]</sup>.

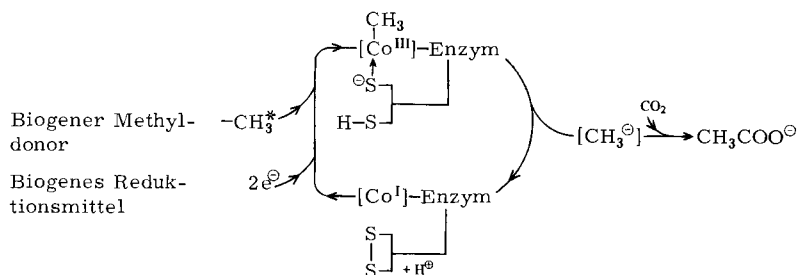


Diese Reaktion findet jedoch in Anbetracht des oben Gesagten sicher nicht statt, auch bestehen keine Hinweise für die Möglichkeit einer Aktivierung der Methylgruppe des Methylcobalamins. Auch eine CO<sub>2</sub>-Methylierung, wie sie bei Grignard-Reaktionen auftritt, kommt nicht in Frage, da Methylcobalamin nicht genügend reaktiv ist. Die Bildung von Acetat aus Methylcobalt-Komplexen konnte jedoch unter den Bedingungen der reduzierenden Spaltung der Co—C-Bindung beobachtet werden. Dies führte zu dem in Schema 4 postulierten Mechanismus der Acetat-Biosynthese<sup>[16, 29]</sup>.

Die Acetat-Biosynthese nach Schema 4 hat somit viel mit der Methan- und Methylarsan-Biosynthese gemeinsam. Sie



Schema 3. Postulierter Mechanismus der enzymatischen Arsen-Methylierung.

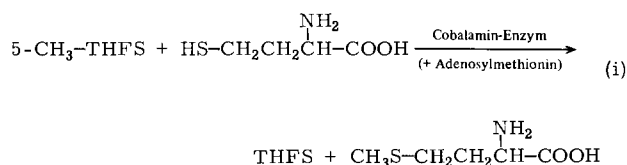


Schema 4. Postulierter Mechanismus der enzymatischen Synthese von Acetat aus Methylcobalamin.

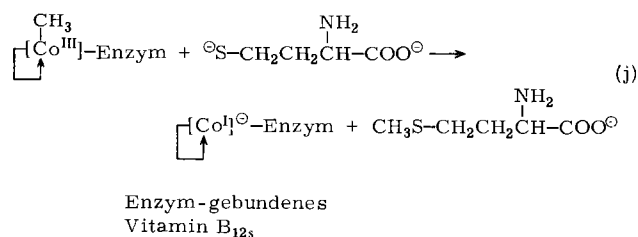
muß jedoch in einem weitgehend protonenfreien Zentrum des Enzyms erfolgen, damit die  $\text{CH}_3^-$ -artige Spezies nicht zu Methan protoniert wird. Es wäre interessant festzustellen, ob *Cl. thermoaceticum* unter bestimmten Bedingungen nicht auch Methan oder Methylarsane erzeugen kann.

## 2.6. Methionin-Synthese in *Escherichia coli*

Aus *E. coli* wurde ein Enzym isoliert, das die Methylgruppe von 5-Methyl-tetrahydrofolsäure (5- $\text{CH}_3$ -THFS) auf Homocystein unter Bildung von Methionin überträgt [Gl. (i)]<sup>[30–36]</sup>.



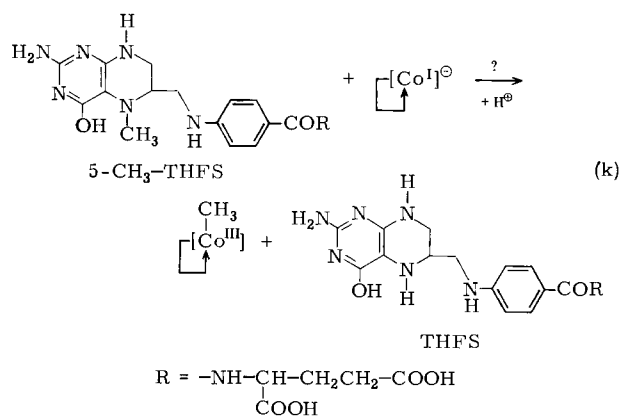
Eine Corrin-abhängige Methioninsynthese findet auch in tierischen Geweben statt, aber nicht in Pflanzen. Als Cofaktor ist außer dem Cobalamin noch Adenosylmethionin erforderlich. Von diesem Cofaktor wird das Enzym-gebundene Vitamin  $\text{B}_{12\text{s}}$  rascher als von 5- $\text{CH}_3$ -THFS methyliert. Als Endstufe der Methioninbildung wird eine Reaktion nach Gl. (j) angenommen; eine analoge Methioninsynthese aus Homocystein und Methylcobaloxim wurde unter nichtenzymatischen Bedingungen verwirklicht.



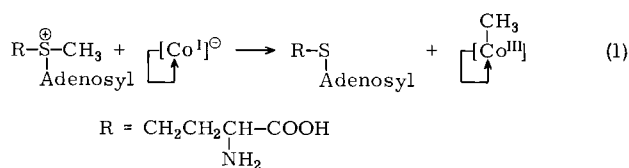
Voraussetzung für eine Umsetzung von Methylcobalamin nach Gl. (j) ist das Vorliegen des Homocysteinyldianions, da Homocystein als solches ähnlich wie andere Thiole die  $\text{Co-C}$ -Bindung des Methylcobalamins reaktiv spaltet [vgl. Gl. (b)].

Demgegenüber ist es bis heute noch nicht gelungen, durch Reaktion von  $\text{CH}_3$ -THFS mit Vitamin  $\text{B}_{12\text{r}}$  oder Vitamin  $\text{B}_{12\text{s}}$  Methylcobalamin nichtenzymatisch darzustellen [Gl. (k)].

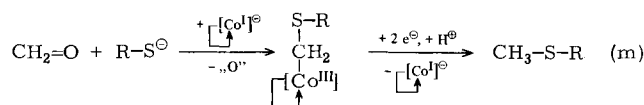
Man muß annehmen, daß diese Reaktion direkt nur nach einer spezifischen Aktivierung der Methylgruppe vor sich geht, oder daß das Cobalamin durch 5- $\text{CH}_3$ -THFS unter Mitwirkung des Enzyms indirekt methyliert wird. Wie im einzelnen



Gl. (k) enzymatisch ermöglicht wird, ist ein noch ungelöstes Problem. Auch die Rolle des Adenosylmethionins ist noch nicht ganz aufgeklärt; Reaktion (l) zu Adenosylhomocystein läuft nichtenzymatisch außerordentlich leicht ab.



Könnte Methionin nicht auch aus Homocystein und einem  $\text{C}_1$ -Fragment von der Oxidationsstufe des Formaldehyds entstehen? Thiole werden in Gegenwart von Formaldehyd und mit Vitamin  $\text{B}_{12\text{s}}$  als Katalysator glatt *S*-methyliert [Gl. (m)]<sup>[37, 38]</sup>.

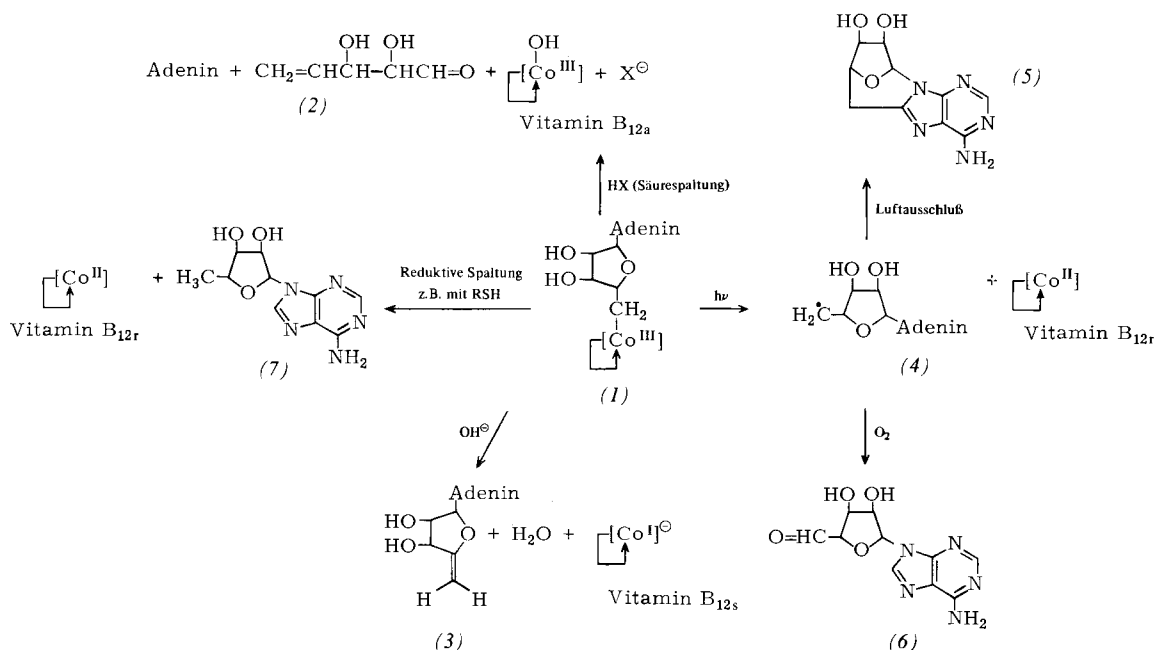


## 3. Von Coenzym $\text{B}_{12}$ abhängige Enzymreaktionen

### 3.1. Eigenschaften und Reaktionen des Coenzym $\text{B}_{12}$

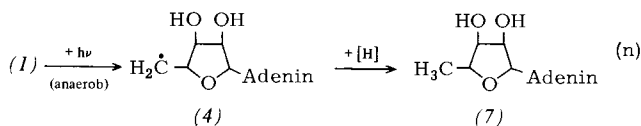
Wie aus Tabelle 2 ersichtlich ist, sind mindestens neun Enzyme bekannt, in denen Coenzym  $\text{B}_{12}$  als Cofaktor fungiert. Die Struktur des Coenzym  $\text{B}_{12}$  (siehe Abb. 1) gibt keinerlei Hinweise auf dessen Wirkungsweise. Es wird allgemein angenommen, daß das Coenzym durch Bindung an die Apoenzyme unter Spaltung der  $\text{Co-C}$ -Bindung in eine reaktionsfähige Form umgewandelt wird. Wie diese Aktivierung des Coenzym stattfindet, ist jedoch noch unklar. Coenzym  $\text{B}_{12}$  oder 5'-Desoxyadenosylcobalamin (1) ist im festen Zustand sowie in neu-

traler wäßriger Lösung stabil. Eine irreversible Zersetzung in Hydroxocobalamin (Vitamin B<sub>12a</sub>), Adenin und D-erythro-2,3-Dihydroxy-pent-4-enal (2) erfolgt auf Zusatz von Säuren<sup>[39]</sup>. In alkalischer Lösung wird die Co—C-Bindung unter Bildung von Vitamin B<sub>12s</sub> und 4',5'-Anhydroadenosin (3) gespalten<sup>[40]</sup>. Bei der Einwirkung von Licht wird die Co—C-Bindung homolytisch gelöst. Dabei entsteht primär das 5'-Desoxyadenosyl-Radikal (4), das sich intramolekular in das cyclische Adenosinoid (5) umwandelt<sup>[41]</sup>. In Gegenwart von Luft-sauerstoff wird (4) vorwiegend zu (6) oxidiert. Die Co—C-Bindung läßt sich auch reduktiv durch Reaktion mit Thiolen oder Dithiolen spalten. Dabei bildet sich 5'-Desoxyadenosin (7) (siehe Schema 5)<sup>[16]</sup>. Verbindung (7) kann auch aus dem 5'-Desoxyadenosyl-Radikal (4) bei der Photolyse des Coenzym in Lösungsmitteln auftreten, denen freie Radikale Wasserstoffatome entreißen können, also z. B. in Alkoholen [Gl. (n)].



Schema 5. Reaktionen des Coenzym B<sub>12</sub> (1) (siehe auch Abb. 1).

Schließlich sei noch erwähnt, daß (1) auch durch alkalische Cyanidlösungen irreversibel zersetzt wird. Außer der möglichen Rekombination von Vitamin B<sub>12r</sub> mit (4) sind alle

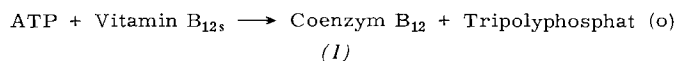


Co—C-Spaltungsreaktionen irreversibel; eine mögliche Ausnahme bildet die baseninduzierte Zersetzung, die zu Vitamin B<sub>12s</sub> und Anhydroadenosin (3) führt<sup>[40]</sup>.

### 3.2. Biosynthese des Coenzym B<sub>12</sub>

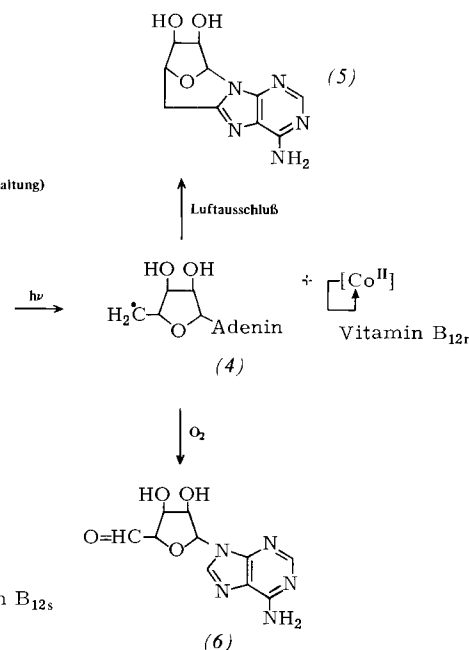
Coenzym B<sub>12</sub> (1) wird von einer Reihe von Mikroorganismen synthetisiert und wurde erstmals von Barker et al.<sup>[41, 42]</sup> aus Extrakten von *Cl. tetanomorphum* isoliert. In der Endstufe der Biosynthese von (1) wird der Adenosylrest von ATP

unter reduzierenden Bedingungen an Vitamin B<sub>12s</sub> angelagert; daneben bildet sich Tripolyphosphat [Gl. (o)]<sup>[45, 46]</sup>.



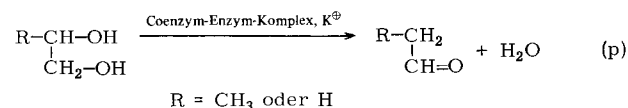
Eine Reaktion im Sinne von Gl. (o) wurde unter nichtenzymatischen Bedingungen noch nicht beobachtet. Bei der Biosynthese von (1) wird vermutlich die C—O—P-Bindung des ATP spezifisch aktiviert oder aber in Vitamin-B<sub>12</sub>-unabhängiger Reaktion zunächst gelöst.

Im Laboratorium gelingt die Synthese von (1) durch Umsetzung von Vitamin B<sub>12s</sub> mit Adenosin-Derivaten, in denen die 2',3'-Hydroxylgruppen durch Schutzgruppen, gewöhnlich Toluolsulfonylgruppen, blockiert sind. Nach der Reaktion werden die Schutzgruppen durch milde Säurehydrolyse wieder entfernt.



### 3.3. Diol-Dehydratasen

In *Aerobacter aerogenes* wiesen Abeles et al.<sup>[47]</sup> ein Enzym nach, das D,L-1,2-Propandiol und Ethylenglykol in Propionaldehyd bzw. Acetaldehyd überführt [Gl. (p)].

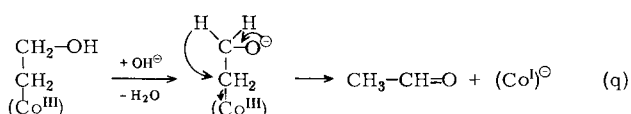


In einem *Lactobacillus* fand man ein Enzym, das analog die Umwandlung von Glycerin in 2-Hydroxypropionaldehyd katalysiert<sup>[48]</sup>. Diese Reaktion tritt bei der alkoholischen Gärung auf und gilt als unerwünscht, da bei der Destillation das geschmacksverderbende Acrolein entsteht. Die Diol-Dehydratase aus *A. aerogenes* wurde erst in letzter Zeit in relativ reiner Form isoliert. Das Enzym enthält Thiolgruppen vermutlich in der Nähe des Coenzym-Bindungszentrums. Vor kurzem wurde nachgewiesen, daß das Enzym auch einige der früher

als Inhibitoren angesehene substituierte Dirole dehydratisiert. So wird 1,2-Butandiol in Butyraldehyd übergeführt, und aus 2,3-Butandiol entsteht 2-Butanon<sup>[49]</sup>. Das funktionelle Holoenzym wird durch Sauerstoff inaktiviert. Das Ausmaß der O<sub>2</sub>-Empfindlichkeit des Holoenzym hängt von der Vorbehandlung des Enzyms ab. Werden Lösungen des Apoenzyms unter Luftausschluß bereit und aufbewahrt, so erhält man im allgemeinen stärker sauerstoffempfindliche Holoenzympräparate als wenn das Apoenzym zunächst aerob gelöst wird. Wir vermuten<sup>[50]</sup>, daß das Diol-Dehydratase-Apoenzym in mindestens zwei aktiven Formen existieren kann, die sich durch ihren Gehalt an freien SH-Gruppen unterscheiden. Luft-sauerstoff scheint die SH-Gruppen zu Disulfid zu oxidieren; dabei entsteht eine weniger O<sub>2</sub>-empfindliche Modifikation des Holoenzym. Diese Ansicht wird dadurch gestützt, daß sich die reduzierte, stärker O<sub>2</sub>-empfindliche Modifikation durch Behandlung des oxidierten Apoenzyms mit milden Reduktionsmitteln teilweise wieder herstellen läßt<sup>[50]</sup>.

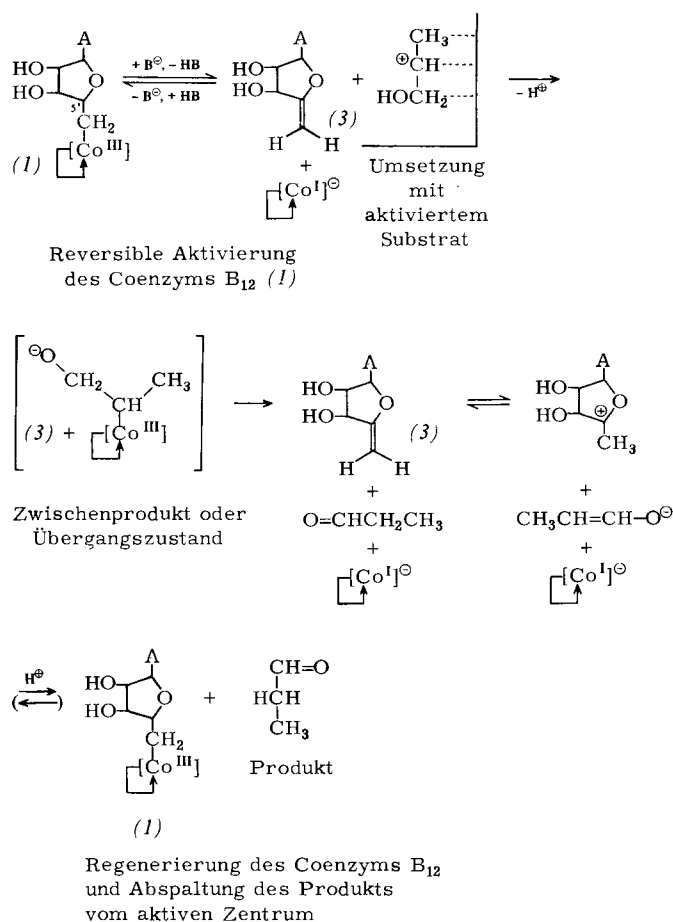
### 3.3.1. Mechanismus der enzymatischen Dehydratisierung von Diolen

1,2-Diole lassen sich leicht durch Säurebehandlung in Aldehyde oder ggf. Ketone überführen. So gelingt z. B. die Umwandlung von Phenylglykol in Phenylacetaldehyd durch Wasserdampfdestillation einer Lösung des Diols in 12proz. H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>. Wie soll sich aber Ethylenglykol unter Mitwirkung von Coenzym B<sub>12</sub> in Acetaldehyd umwandeln? Die Beobachtung, daß die Modellverbindung  $\beta$ -Hydroxyethylcobaloxim von Basen glatt in Acetaldehyd und Cobaloxim(I) zerlegt wird, führte uns bereits vor zehn Jahren zu der Annahme, daß ein analoger Prozeß auch bei der enzymatischen Diol-Dehydratisierung stattfindet [Gl. (q)]<sup>[51]</sup>.



Da Glykole selbst nicht mit Vitamin B<sub>12</sub>, oder dem analogen Cobaloxim(I) reagieren, mußte eine spezifische Aktivierung der Substrate durch das Enzym postuliert werden<sup>[29]</sup>. Enzymgebundenes Vitamin B<sub>12</sub> wird im Rahmen des von uns vorgeschlagenen Mechanismus durch eine baseinduzierte Eliminierungsreaktion aus Coenzym B<sub>12</sub> erzeugt. Das dabei entstehende enzymgebundene 4',5'-Anhydroadenosin (3) befindet sich demnach in der Nähe des aktiven Zentrums und tauscht mit dem Produkt Protonen aus. Nach Schema 6 ist also die Austauschreaktion zwischen Protonen in der 5'-Position des Coenzym und Protonen des Substrats eine vom katalytischen Vorgang der Glykol-Dehydratisierung unabhängige Nebenreaktion. Sie tritt nach dieser Auffassung unmittelbar nach der Bildung des Aldehyds am aktiven Zentrum des Enzyms ein und wird ionisch formuliert. Derartige Austauschreaktionen wurden in Modellsystemen bereits realisiert und sind in Einklang mit den in Schema 6 angenommenen Vorgängen<sup>[29]</sup>. Im Abschnitt 3.3.2 wird ein Alternativmechanismus diskutiert, in dem die gleichen Vorgänge radikalisch formuliert werden.

Der Mechanismus in Schema 6 wird gestützt durch die Beobachtung, daß funktionelle Diol-Dehydratase in der sauerstoffempfindlichen Modifikation auch durch N<sub>2</sub>O, und zwar fast ebenso stark wie durch O<sub>2</sub>, inaktiviert wird<sup>[50]</sup>. Wie schon

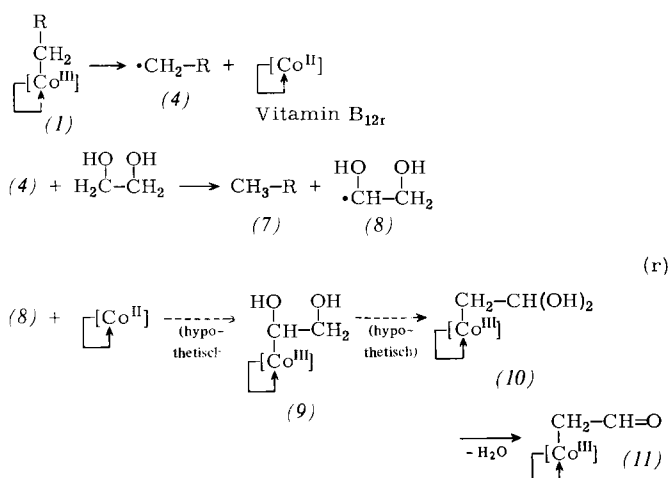


Schema 6. Vorgeschlagener Mechanismus der enzymatischen Umwandlung von D,L-1,2-Propandiol in Propionaldehyd [29]. A=Adeninrest. Das Enzym ist im Formelschema weggelassen worden.

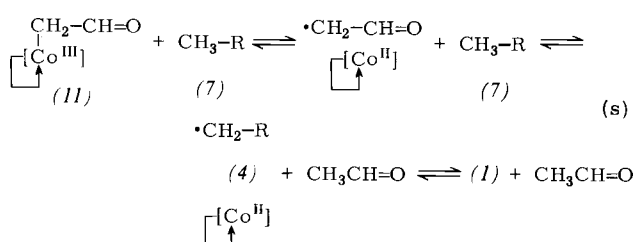
im ersten Teil<sup>[11]</sup> ausgeführt wurde, ist N<sub>2</sub>O ein spezifisches Oxidationsmittel für Vitamin B<sub>12</sub>. Die Inaktivierung deutet somit auf die Anwesenheit von enzymgebundenem Vitamin B<sub>12</sub>. Vor kurzem wurde auch (3) im Holoenzym nachgewiesen<sup>[52]</sup>. Gegen unseren Mechanismus wurde eingewendet, daß z. B. beobachtete Isotopenaustauscheffekte sich nicht mit Schema 6 vereinbaren lassen<sup>[53]</sup>. Auf die meisten Einwände wurde schon an anderer Stelle<sup>[54]</sup> näher eingegangen; wir halten Schema 6 immer noch für *prinzipiell* richtig. Inzwischen wurde ein Alternativmechanismus vorgeschlagen, der auf anderen Annahmen beruht; er wird im folgenden diskutiert.

### 3.3.2. Alternativmechanismus der enzymatischen Dehydratisierung

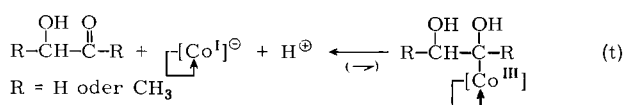
Abeles und andere Forscher halten es für möglich, daß die Diol-Dehydratisierung nach einem Radikalmechanismus verläuft<sup>[55]</sup>. Es wird angenommen, daß das Coenzym B<sub>12</sub> (1) durch *Homolyse* der Co—C-Bindung aktiviert wird. Das dabei entstehende Radikal (4) entzieht dem Glykol ein H-Atom und geht dadurch in 5'-Desoxyadenosin (7) über. Das Glykol-Radikal (8) lagert sich dann an enzymgebundenes Vitamin B<sub>12</sub>, an. Über ein 1,2-Dihydroxyethylcobalamin (9), das sich umlagert, bildet sich Formylmethylcobalamin (11) oder dessen Hydrat (10) [Gl. (r). Das Enzym ist in den Formeln weggelassen worden].



Aus (11) soll der Acetaldehyd durch Homolyse der Co—C-Bindung und Wasserstoffabstraktion aus (7) entstehen. Auf diese Weise wird das Radikal (4) zurückgebildet, das mit Vitamin B<sub>12r</sub> unter Regenerierung von (1) reagiert [Gl. (s)]<sup>[55]</sup>.



Dieser Mechanismus wurde aufgestellt, um die Bildung von <sup>3</sup>H-markiertem Acetaldehyd aus unmarkiertem Glykol und dem Holoenzym zu erklären, das <sup>3</sup>H in der 5'-Position des Coenzyms enthält<sup>[56]</sup>. Nimmt man an, daß diese Austauschreaktion zwischen Substrat und Coenzym erfolgt, so müssen in der Tat Radikalmechanismen wie in den Gleichungen (r) und (s) postuliert werden. Es kommt jedoch auch dann zu einem Austausch der 5'-<sup>3</sup>H-Atome des Coenzyms, wenn das Enzym mit dem Produkt inkubiert wird. Man müßte daher annehmen, daß die radikalischen Wasserstoff-Austauschreaktionen reversibel ablaufen, obwohl die enzymatische Glykol-Dehydratisierung nicht umkehrbar ist. Bei Versuchen, die Reaktionen (r) und (s) im Modell zu verifizieren, traten große Schwierigkeiten auf. Es gelang bisher nicht, Hinweise für die Existenzfähigkeit von Verbindungen des Typs (9) zu erhalten, so daß sich die postulierte Umlagerung von (9) in (10) experimentell nicht nachprüfen ließ. Wir fassen (9) als „Corrinhydrin“ des Glykolaldehyds auf; das Gleichgewicht der Reaktion (t) liegt weit auf der linken Seite<sup>[57a]</sup>.



Inzwischen wurde auch gefunden, daß sich radiolytisch erzeugte Glykol-Radikale mit Vitamin B<sub>12r</sub> nicht im Sinne von Gl. (r) zu (9) umsetzen<sup>[57b]</sup>.

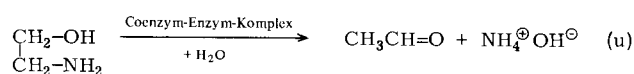
Ein weiterer Einwand gegen Reaktion (s) ergab sich beim Versuch, Formylmethylcobalamin (11) der Homolyse der Co—C-Bindung zu unterwerfen. Sowohl bei der thermischen Spaltung als auch bei der Bestrahlung mit Licht zerfällt (11) glatt und ohne intermediäre Bildung von Vitamin B<sub>12r</sub> in

Acetaldehyd und Hydroxocobalamin [siehe Gl. (q) im ersten Teil]<sup>[1, 58]</sup>. Es ist somit nicht gelungen, den postulierten Radikalmechanismus der Diol-Dehydratisierung experimentell zu stützen. Das heißt natürlich nicht, daß es keine Radikal-induzierten Umlagerungen von 1,2-Diolen in Aldehyde gibt. So entsteht z. B. bei Einwirkung von Fentons Reagens auf Glykol auch Acetaldehyd. Auch lassen sich bei der Photolyse von Methylcobaloxim in Gegenwart von Glykol geringe Mengen Acetaldehyd nachweisen, wenn die Reaktion in saurer Lösung durchgeführt wird<sup>[59]</sup>. Wir untersuchten die gleiche Reaktion in neutraler Lösung. Unter diesen Bedingungen scheinen die Glykol-Radikale zu Erythrit und verwandten Verbindungen zu dimerisieren<sup>[57a]</sup>. Da die Homolyse der Co—C-Bindung des Coenzyms B<sub>12</sub> bei seiner enzymatischen Aktivierung gegenwärtig für möglich gehalten wird, sei darauf hingewiesen, daß ein derartiger Prozeß aus energetischen Gründen unwahrscheinlich ist. Eine Stütze für die Beteiligung von (7) an den Enzymreaktionen wird darin gesehen, daß (7) bei der Aufarbeitung von Enzyminkubaten zuweilen in Spuren nachgewiesen wurde. Da (7) aus (1) durch reduktive Co—C-Bindungsspaltung entstehen kann [vgl. Gl. (n) und Schema 5], ist es durchaus möglich, daß (7) das Produkt einer Nebenreaktion ist, die nichts mit dem Enzym-katalysierten Vorgang zu tun hat.

Schließlich sind auch ESR-Messungen an Diol-Dehydratase zur Stützung des Radikalmechanismus der Coenzym-B<sub>12</sub>-abhängigen Enzymreaktionen herangezogen worden. Unter bestimmten Versuchsbedingungen lassen sich zwar paramagnetische Spezies nachweisen, eine Interpretation der wenig charakteristischen Signale gelang jedoch noch nicht.

### 3.4. Ethanolamin-Desaminase

Dieses Enzym wurde in *Clostridium* sp. entdeckt<sup>[60]</sup> und als Coenzym-B<sub>12</sub>-abhängig erkannt. Die eingehende Untersuchung des Enzyms verdanken wir Babior<sup>[61]</sup>; die katalysierte Reaktion ist in Gl. (u) wiedergegeben.

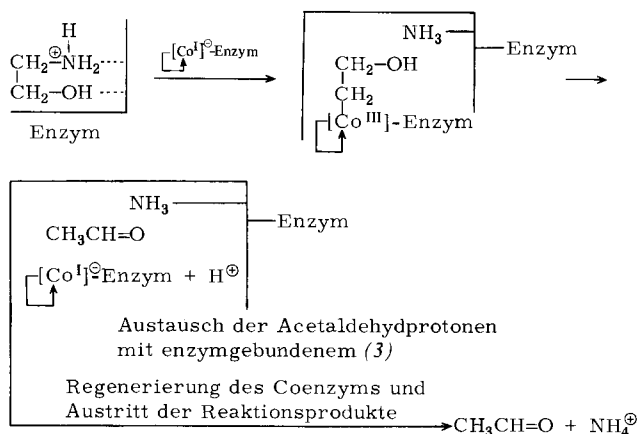


Das Apoenzym hat ein Mol.-Gew. von 520000 und wird von 5 M Guanidiniumchlorid in inaktive Untereinheiten vom Mol.-Gew. 51000 zerlegt. Das Sauerstoffatom des Aminoethanols (Ethanolamins) bleibt bei der Umwandlung in Acetaldehyd am gleichen Kohlenstoffatom haften. Das Enzym muß mit der Diol-Dehydratase verwandt sein, da Glykol als stöchiometrisches Substrat fungiert. Bei Verwendung von [<sup>3</sup>H]-2-Aminoethanol als Substrat tritt <sup>3</sup>H in die 5'-Position des enzymgebundenen Coenzyms. Für Reaktion (u) wurde daher (wie bei der Diol-Dehydratase) sowohl ein ionischer als auch ein radikalischer Mechanismus postuliert.

#### 3.4.1. Mechanismus der enzymatischen Desaminierung von Aminoethanol

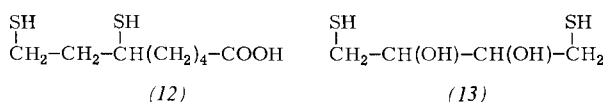
Wir fanden<sup>[62]</sup>, daß Ethanolamin-Desaminase durch Sauerstoff sowie durch N<sub>2</sub>O inaktiviert wird, und schlossen daraus, daß das enzymgebundene Coenzym (1) ein nucleophiles Cobalt(I)-Atom enthält. Durch Inkubation von <sup>14</sup>C-markiertem Coenzym B<sub>12</sub> gelang es uns auch, Spuren von (3) bei schonender Aufarbeitung des funktionellen Holoenzyms nachzu-

weisen. Auf Grund der Ergebnisse von Modellversuchen sowie der hier angeführten enzymatischen Studien wurde daher der im Schema 7 dargelegte ionische Mechanismus postuliert<sup>[62]</sup>. Ähnlich wie bei der Diol-Dehydratase sehen wir keine Möglichkeit zur Stützung eines Radikalmechanismus (vgl. Abschnitt 3.3.2).

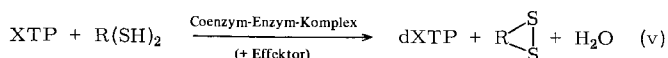


### 3.5. Ribonucleotid-Reduktase

In *Lactobacillus leichmannii* findet sich ein Coenzym-B<sub>12</sub>-abhängiges Enzym, das die Reduktion von Ribonucleotiden in



Desoxyribonucleotide katalysiert<sup>[63, 64]</sup>. Als Reduktionsmittel dient ein Thioredoxin, in vitro können jedoch auch Dithiole, z. B. Dihydroliponsäure (12) oder Dithioerythrit (13), eingesetzt werden [Gl. (v)].



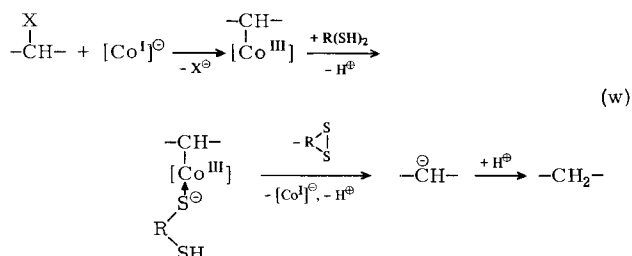
Als Effektoren der Enzymreaktion (v) wirken Desoxyribonucleotide. Das Enzym wurde auch in Extrakten von *Lactobacillus acidophilus* und *Rhizobium melioli* nachgewiesen und ist vermutlich auch in anderen Organismen vorhanden<sup>[65, 66]</sup>. Allerdings gibt es auch Ribonucleotid-Reduktasen, die Corrin-unabhängig sind. Das Enzym ist nichtspezifisch in bezug auf die Basenkomponente der Substrate. Änderungen am Ribose-Rest wirken sich jedoch recht stark aus. Da katalytische Mengen an Desoxyribonucleotiden die Enzymaktivität erhöhen, wird angenommen, daß diese Effektoren durch Bindung an das Apoenzym eine Konformationsänderung hervorrufen. Inkubiert man das Enzym mit 5'-<sup>3</sup>H-markiertem (1), tritt ein Austausch von <sup>3</sup>H mit den Protonen des Lösungsmittels (Wasser) ein<sup>[67]</sup>. Bei niedriger Enzymkonzentration ist die Menge an ausgetauschtem <sup>3</sup>H<sup>+</sup> der Ausbeute an reduziertem Substrat proportional. Führt man die Enzymreaktion in <sup>3</sup>H<sub>2</sub>O durch, so wird <sup>3</sup>H sowohl in das enzymgebundene Coenzym als auch in das Produkt eingebaut. Der Ersatz der OH-Gruppe an C-2 durch H erfolgt unter Retention. Das Apoenzym enthält vermutlich SH-Gruppen in der Nähe des Coenzym-Bindungscentrums. Vitamin B<sub>12a</sub> wirkt nicht als Coenzym,

wird jedoch auf Zusatz von Dithiol und Effektor zu Vitamin B<sub>12r</sub> reduziert. In derartigen Lösungen werden ESR-Signale von Vitamin B<sub>12r</sub> mit hochaufgelöster <sup>14</sup>N-Superhyperfeinstruktur beobachtet<sup>[68]</sup>; 5,6-Dimethylbenzimidazol bleibt demnach unter diesen Bedingungen axial an das Cobaltatom koordiniert. Auch das funktionelle, mit (1) inkubierte Enzym ergibt ESR-Signale, die eine gewisse Ähnlichkeit mit den ESR-Signalen anderer Coenzym-B<sub>12</sub>-abhängiger Enzyme aufweisen<sup>[69]</sup>. Die Deutung steht jedoch noch aus.

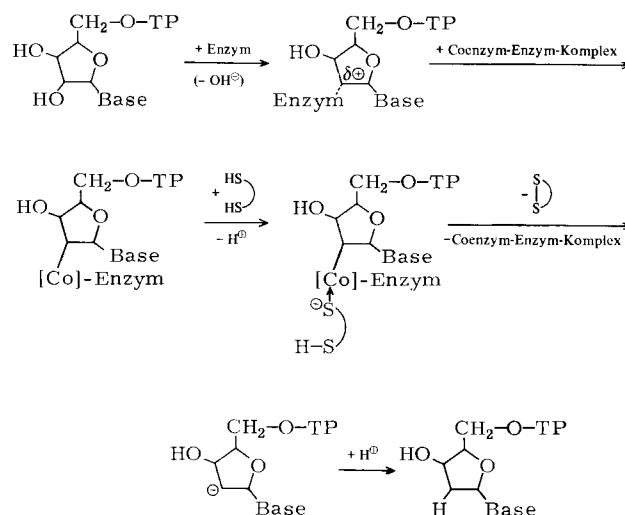
#### 3.5.1. Mechanismus der enzymatischen Reduktion von Ribonucleotiden

Man hat für die Ribonucleotid-Reduktion Radikalmechanismen vorgeschlagen, in denen 5'-Desoxyadenosin (7) als Wasserstoffüberträger fungiert und das Radikal (4) dem Dithiol ein Wasserstoffatom entreißt<sup>[64]</sup>. In Gegenwart überschüssigen Thiols müßten freilich Radikalreaktionen rasch zum Stillstand kommen, da Thiole ja gute Radikalfänger sind. In diesem Sinne postulierte Mechanismen sind daher unbefriedigend (man vergleiche das hypothetische Schema in <sup>[64]</sup>).

Aus eigenen Untersuchungen stammt ein ionischer Mechanismus, der auch mit Ergebnissen von Modellreaktionen weitgehend in Einklang steht<sup>[16]</sup>. Grundlage ist die reduktive Spaltung von Organocobalaminen durch Thiole, die als Prototyp von katalytischen Reaktionen angesehen werden kann, bei denen Substrate in Gegenwart von Corrinen reduziert werden [Gl. (w)].



Auf dieser Basis wurde der in Schema 8 wiedergegebene Mechanismus für die Coenzym-B<sub>12</sub>-abhängige Ribonucleotid-Reduktion vorgeschlagen. Der Nachweis von enzymgebundenem Vitamin B<sub>12s</sub> mit N<sub>2</sub>O gelang hier nicht<sup>[70]</sup>, da das Holoenzym auch durch Luftsauerstoff nicht wesentlich inaktiviert



Schema 8. Postulierter Mechanismus der Ribonucleotid-Reduktion [16]. TP = Triphosphat.

wird. Dagegen gelang eine überraschende Beobachtung, die als Stütze für den in Schema 8 postulierten Mechanismus angesehen werden kann. *Jacobsen* und *Huennekens* berichteten 1969, daß die Geschwindigkeit der Ribonucleotid-Reduktion von der Zusammensetzung und Konzentration der verwendeten Pufferlösungen abhängt<sup>[71]</sup>. Diese Autoren interpretierten die beobachteten Effekte als Hinweis für chaotrope Wirkungen der Puffer-Anionen auf das Enzym. Beim Studium der Wirkung von Puffern auf die Methanbildung bei der reduktiven Spaltung von Methylcobaloxim durch Dithioerythrit (13) oder Dihydroliponsäure (12) fanden wir praktisch die gleichen Effekte in einem nichtenzymatischen System. Die in Abbildung 2

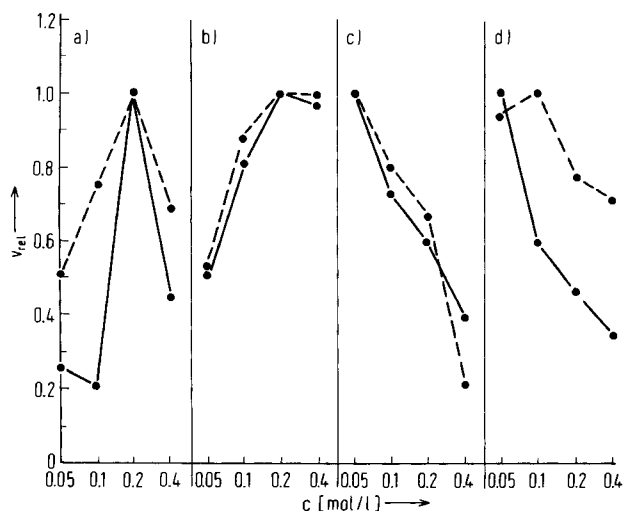


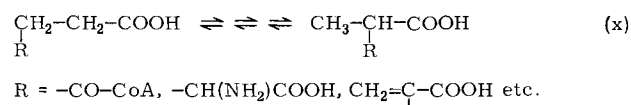
Abb. 2. Geschwindigkeitsprofile der enzymatischen Reduktion von Ribonucleotid (----) und der Methanbildung aus Methyl(aquo)cobaloxim (—) in Tris- und Phosphatpuffer mit Dithioerythrit (13) und Dihydroliponsäure (12) als Reduktionsmittel [16].  $v_{rel}$ : relative Reaktionsgeschwindigkeit; c: Konzentration des Puffers, a) Trispuffer + (13); b) Phosphatpuffer + (13); c) Trispuffer + (12); d) Phosphatpuffer + (12).

wiedergegebenen relativen Reaktionsgeschwindigkeiten der Ribonucleotid-Reduktion und der nichtenzymatischen Spaltung der Co—C-Bindung des Methylcobaloxims in verschiedenen Puffern sind statistisch signifikant miteinander korreliert [ $r=0.71$ ,  $P<0.01$ ]<sup>[18]</sup>. Diese bemerkenswerte Übereinstimmung zwischen zwei nicht unmittelbar als verwandt zu erkennenden Reaktionen wird verständlich, wenn angenommen wird, daß bei der Ribonucleotid-Reduktion und der Methanbildung die gleichen Vorgänge geschwindigkeitsbestimmend sind. Vermutlich handelt es sich dabei um die axiale Anlagerung der Dithiole an das Cobaltatom, die offenbar von Art und Konzentration der verwendeten Puffer abhängt. Ähnlich wie bei den anderen Coenzym-B<sub>12</sub>-abhängigen Enzymen muß auch bei der Ribonucleotid-Reduktase angenommen werden, daß das Coenzym durch Bindung an das Apoenzym aktiviert wird. Wir glauben, daß diese Aktivierung im Sinne einer  $\beta$ -Eliminierung erfolgt, haben hierfür aber noch keine direkten Hinweise.

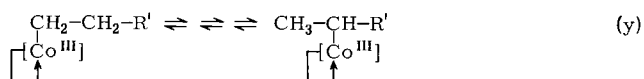
### 3.6. Coenzym-B<sub>12</sub>-abhängige Mutasen

Die bis jetzt bekannt gewordenen Mutasen<sup>[72-81]</sup> (vgl. Tabelle 2) zeichnen sich durch hohe Substrat-Spezifität aus. Die katalysierten Umlagerungen sind reversibel und finden ohne Austausch mit Protonen des Lösungsmittels statt. Man fand jedoch wiederum einen Austausch zwischen Substratprotonen und dem Wasserstoff in der 5'-Position des enzymgebun-

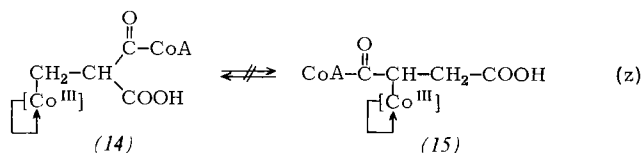
denen Coenzym. In den Substraten wandert der Wasserstoff zwischen zwei benachbarten Kohlenstoffatomen, und bei allen Reaktionen wird *formal* der Rest R reversibel zwischen Position 3 und 2 von Propionsäure ausgetauscht [Gl. (x)].



Wir schlugen vor, daß Organocobalamin-Zwischenprodukte bei diesen Reaktionen im Sinne von Gl. (v) isomerisieren<sup>[4]</sup>.



Es gibt experimentelle Hinweise, daß derartige Umlagerungen stattfinden [vgl. Gl. (h) im ersten Teil]<sup>[1]</sup>. Man müßte hier jedoch annehmen, daß zur Bildung der Organocobalt-Zwischenprodukte C—C-Bindungen reversibel gelöst und geschlossen werden. Hierfür gibt es noch keine guten Beispiele aus der organischen Chemie. *Ingraham* schlug bereits 1964 vor, daß die Umlagerung von Methylmalonyl-CoA über einen Organocobaltkomplex vom Typ (14) abläuft<sup>[82]</sup>. Wir untersuchten eine Verbindung vom Typ (15), konnten jedoch keine Umlagerungstendenz feststellen [Gl. (z)]<sup>[83]</sup>.



Lowe und Ingraham gelang es 1971, wenigstens einen möglichen Teilschritt einer derartigen Umlagerung im Modell durchzuführen<sup>[84]</sup>, aber auch diese Reaktion ist nicht ganz mit den enzymatischen Vorgängen zu vereinbaren (Näheres siehe <sup>[4]</sup>). Besondere Schwierigkeiten bereitet der Versuch, die Umlagerung z. B. von Succinyl-CoA in Methylmalonyl-CoA zu formulieren. Trotz hoffnungsvoller Ansätze durch neuere Arbeiten anderer Autoren<sup>[85, 86]</sup> müssen alle Erklärungsversuche noch mit einiger Vorsicht betrachtet werden, zumal über die aktivierende Wirkung der Enzyme auf die Substrate noch nichts bekannt ist.

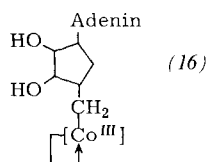
### 3.7. Aminomutasen

Extrakte von *Cl. sticklandii* katalysieren die reversible Umwandlung von  $\alpha$ -Lysin in  $\beta$ -Lysin. Analoge Isomerisierungen wurden mit Arginin und Ornithin beobachtet. Bei allen Reaktionen scheinen die Aminogruppe und ein Wasserstoffatom gleichzeitig zu wandern. Alle Aminomutasen bestehen aus zwei Proteinkomponenten (vgl. Tabelle 2). In einigen Fällen erhöht sich die Enzymaktivität durch zweiwertige Metall-Kationen (z. B.  $Mg^{2+}$  oder  $Mn^{2+}$ ) sowie durch katalytische Mengen an ATP. Mindestens eine Aminomutase erfordert auch Pyridoxalphosphat als Cofaktor. Im Hinblick auf die Komplexität dieser Enzyme wird auf eine Diskussion verzichtet.

### 3.8. Analoge des Coenzym B<sub>12</sub>

Aus den obigen Ausführungen wird ersichtlich, daß das Verständnis der Wirkungsweise des Coenzym B<sub>12</sub> (1) eng

mit der Frage zusammenhängt, wie es im Enzym aktiviert wird. Es gibt im wesentlichen zwei Alternativen: Homolytische oder heterolytische Co—C-Spaltung. Um das Problem seiner Lösung näherzubringen, hat man daher Analoge des Coenzym dargestellt<sup>[87]</sup> und auf enzymatische Aktivität hin untersucht. Dabei stellte sich heraus, daß bereits geringfügige Änderungen am Molekül des Coenzym zu einem Verlust an enzymatischer Aktivität führen können. Von den vielen Coenzym-B<sub>12</sub>-Analogen sei hier lediglich Verbindung (16) erwähnt. Der Ersatz des Ribosesauerstoffs durch eine CH<sub>2</sub>-Gruppe bewirkt eine wesentliche Verringerung der Coenzymaktivität bei der Dioldehydratase-Reaktion<sup>[153]</sup>, die auf die höhere Be-



ständigkeit der Co—C-Bindung in (16) verglichen mit (1) zurückgeführt wurde. Von starken Basen wird die Co—C-Bindung in (16) jedoch gespalten<sup>[88]</sup>. Kürzlich wurde beobachtet, daß sich die Aktivität von (16) in der Diol-Dehydratase durch kurzzeitige Lichtbestrahlung des Pseudo-Holoenzym erhöhen läßt<sup>[88]</sup>. Dieser Effekt wurde einer lichtinduzierten Heterolyse der Co—C-Bindung im enzymgebundenen (16) zugeschrieben. Bei der Bestrahlung einer alkalischen Lösung von (16) unter Luftausschluß entsteht Vitamin B<sub>12s</sub><sup>[89]</sup>. Wir schlossen aus diesen Befunden, daß sich die Co—C-Bindung im Coenzym oder in (16) während der enzymatischen Reaktion nicht unbedingt abwechselnd öffnet und schließt<sup>[88]</sup>. Jedenfalls sind auch diese Ergebnisse mit dem Mechanismus in Schema 6 vereinbar.

#### 4. Schlußbemerkungen

Der vorliegende Bericht läßt einige Ansätze erkennen, die uns hoffen lassen, daß die Wirkungsweise der Vitamin-B<sub>12</sub>-Coenzyme in Enzymreaktionen eines Tages detailliert beschrieben werden kann. Er zeigt aber auch, daß eine Reihe schwerwiegender Probleme noch ungelöst ist. Wenngleich auch Modelluntersuchungen den richtigen Weg weisen, gibt es doch immer noch eine Kluft zwischen biochemischer und metallorganischer Interpretation der gleichen Phänomene. So wird Coenzym B<sub>12</sub> von der einen Seite als Zwischenträger von Substratwasserstoff in Radikalreaktionen angesehen, von der anderen, die wir vertreten, werden die beobachteten Wasserstoff-Austauschreaktionen zwischen dem Adenosylrest des Coenzym und den Substraten oder Produkten ionisch formuliert und als Nebenreaktionen aufgefaßt, die nicht direkt mit den enzymatisch katalysierten Reaktionen zusammenhängen. Eine Entscheidung für eine der beiden Ansichten sei dem Leser überlassen.

*Der vorliegende Bericht wurde mit Unterstützung der National Science Foundation (Grant CHE-76-10890) geschrieben.*

Eingegangen am 9. August 1976 [A 155]

[1] G. N. Schrauzer, *Angew. Chem.* 88, 465 (1976); *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* 15, 417 (1976).

[2] E. L. Smith: *Vitamin B<sub>12</sub>*, 3. Aufl., Methuen, London 1965.

- [3] a) H. A. Whipple: *Vitamin B<sub>12</sub> Coenzymes*. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 112, 2 (1964); b) *Vitamin B<sub>12</sub> and Intrinsic Factor*, 1<sup>st</sup> European Symposium. Enke, Stuttgart 1962; c) R. Ammon, W. Dirscherl: *Vitamin B<sub>12</sub> und verwandte Corrinoiden*. Thieme, Stuttgart 1975.
- [4] G. N. Schrauzer, *Fortschr. Chem. Org. Naturst.* 31, 593 (1974).
- [5] R. S. Wolfe, *Adv. Microb. Physiol.* 6, 107 (1971) u. dort zitierte Literatur.
- [6] H. Kluth: *Wunder des Fortschritts*. A. Scherl-Verlag, Berlin 1939, S. 91.
- [7] B. C. McBride, J. M. Wood, J. W. Sibert, G. N. Schrauzer, *J. Am. Chem. Soc.* 90, 5276 (1968).
- [8] C. D. Taylor, D. Craig, R. S. Wolfe, *J. Biol. Chem.* 249, 4879 (1974).
- [9] M. P. Bryant, E. A. Wolin, M. J. Wolin, R. S. Wolfe, *Arch. Microbiol.* 59, 20 (1967).
- [10] T. Bauchop, *J. Bacteriol.* 94, 171 (1967).
- [11] J. M. Wood, F. S. Kennedy, R. S. Wolfe, *Biochemistry* 7, 1707 (1968).
- [12] B. C. McBride, R. S. Wolfe, *Nature* 234, 551 (1971).
- [13] M. W. Penley, J. M. Wood, *Biochim. Biophys. Acta* 273, 265 (1972).
- [14] J. W. Sibert, G. N. Schrauzer, *J. Am. Chem. Soc.* 92, 1421 (1970).
- [15] Unveröffentlichte Versuche mit J. H. Grate.
- [16] G. N. Schrauzer, J. A. Seck, R. J. Holland, T. M. Beckham, E. A. Rubin, J. W. Sibert, *Bioinorg. Chem.* 2, 93 (1973).
- [17] M. W. Penley, D. G. Brown, J. M. Wood, *Biochemistry* 9, 4203 (1970).
- [18] Die statistischen Rechnungen wurden nach der Methode der linearen Regression durchgeführt; G. N. Schrauzer, unveröffentlicht.
- [19] a) C. D. Taylor, R. S. Wolfe, *J. Biol. Chem.* 249, 4879 (1974); b) 249, 4886 (1974).
- [20] B. C. McBride, R. S. Wolfe, *Biochemistry* 10, 4312 (1971).
- [21] J. M. Wood, F. S. Kennedy, C. G. Rosen, *Nature* 220, 123 (1968).
- [22] H. A. O. Hill, J. M. Pratt, S. Ridsdale, F. R. Williams, R. J. P. Williams, *Chem. Commun.* 1970, 341.
- [23] G. N. Schrauzer, J. H. Weber, T. M. Beckham, R. K. Y. Ho, *Tetrahedron Lett.* 1971, 275.
- [24] J. M. Wood, *Naturwissenschaften* 62, 1 (1975).
- [25] H. A. Barker, M. D. Kamen, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 31, 219 (1945).
- [26] J. M. Poston, K. Kuratomi, E. R. Stadtman, *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 112, 804 (1964).
- [27] D. J. Parker, H. G. Wood, R. K. Ghambeer, L. G. Ljungdahl, *Biochemistry* 11, 3074 (1974).
- [28] L. G. Ljungdahl, H. G. Wood, *Annu. Rev. Microbiol.* 23, 515 (1970).
- [29] G. N. Schrauzer, J. W. Sibert, *J. Am. Chem. Soc.* 92, 3609 (1970).
- [30] J. M. Buchanan, H. L. Elford, R. E. Loughlin, B. M. McDougall, S. Rosenthal, *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 112, 756 (1964).
- [31] J. R. Guest, S. Friedman, M. J. Dilworth, D. D. Woods, *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 112, 774 (1964).
- [32] H. W. Dickerman, B. G. Redfield, J. G. Bieri, H. Weissbach, *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 112, 791 (1964).
- [33] A. R. Larrabee, S. Rosenthal, R. E. Cathou, J. M. Buchanan, *J. Am. Chem. Soc.* 83, 4094 (1961).
- [34] R. T. Taylor, H. Weissbach, *J. Biol. Chem.* 242, 1502 (1967).
- [35] R. L. Blakley: *The Biochemistry of Folic Acid and Related Pteridines*. North Holland Publ. Co., Amsterdam 1969, Kap. 9, S. 332.
- [36] H. Weissbach, R. T. Taylor, *Vitam. Horm.* 28, 415 (1970).
- [37] G. N. Schrauzer, R. J. Windgassen, *J. Am. Chem. Soc.* 89, 3607 (1967).
- [38] G. N. Schrauzer, R. J. Windgassen, *Nature* 214, 492 (1967).
- [39] D. A. Dolphin, A. W. Johnson, R. Rodrigo, *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 112, 590 (1964).
- [40] G. N. Schrauzer, J. W. Sibert, *J. Am. Chem. Soc.* 92, 1022 (1970).
- [41] H. P. C. Hogenkamp, H. A. Barker, *Fed. Proc.* 21, 470 (1962).
- [42] H. A. Barker, R. D. Smyth, H. Weissbach, J. I. Toohey, J. N. Ladd, B. E. Volcani, *J. Biol. Chem.* 235, 480 (1960).
- [43] P. G. Lenhart, D. Crowfoot-Hodgkin, *Nature* 192, 937 (1961).
- [44] P. G. Lenhart, *Proc. Roy. Soc. A* 303, 45 (1968).
- [45] A. Peterkofsky, H. Weissbach, *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 112, 622 (1964).
- [46] J. B. Pawelkiewicz, B. Bartosinski, W. Walerych, *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 112, 638 (1964).
- [47] R. H. Abeles, H. A. Lee, Jr., *J. Biol. Chem.* 238, 2367 (1963).
- [48] K. L. Smiley, M. Sobolov, *Arch. Biochem. Biophys.* 97, 538 (1962).
- [49] T. Toraya, T. Shirakashi, T. Kosuga, S. Fukui, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 69, 475 (1976).
- [50] G. N. Schrauzer, J. Seck, R. J. Holland, *Z. Naturforsch.* 28c, 1 (1973).
- [51] G. N. Schrauzer, R. J. Windgassen, *J. Am. Chem. Soc.* 89, 143 (1967).
- [52] R. N. Katz, T. M. Vickrey, G. N. Schrauzer, *Angew. Chem.* 88, 583 (1976); *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* 15, 542 (1976).
- [53] R. H. Abeles, *Adv. Chem. Ser.* 100, 346 (1971).
- [54] G. N. Schrauzer, *Adv. Chem. Ser.* 100, 1 (1971).
- [55] R. H. Abeles, D. A. Dolphin, *Acc. Chem. Res.* 9, 114 (1976) und dort zitierte Literatur.
- [56] P. A. Frey, M. K. Essenberg, R. H. Abeles, *J. Biol. Chem.* 242, 5369 (1967).
- [57] a) G. N. Schrauzer, W. J. Michaely, R. J. Holland, *J. Am. Chem. Soc.* 95, 2024 (1973); b) R. Blackburn, M. K. Yaw, G. O. Phillips, A. L. Swallow, *Trans. Faraday Soc.* 1975, 2277.
- [58] T. M. Vickrey, R. N. Katz, G. N. Schrauzer, *J. Am. Chem. Soc.* 97, 7248 (1975).

- [59] B. T. Golding, T. J. Kemp, E. Nocchi, W. P. Watson, *Angew. Chem.* 87, 841 (1975); *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* 14, 813 (1975).
- [60] C. Bradbeer, *J. Biol. Chem.* 240, 4669, 4675 (1965).
- [61] B. M. Babior, *Acc. Chem. Res.* 8, 376 (1975) und dort zitierte Literatur.
- [62] G. N. Schrauzer, E. A. Stadlbauer, *Bioinorg. Chem.* 4, 185 (1975).
- [63] R. L. Blakley, *J. Biol. Chem.* 240, 2173 (1965).
- [64] H. P. C. Hogenkamp, G. N. Sando, *Struct. Bonding* 20, 23 (1975) und dort zitierte Literatur.
- [65] R. L. Blakley, R. K. Ghambeer, P. F. Nixon, E. Vitols, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 20, 439 (1965).
- [66] F. K. Gleason, H. P. C. Hogenkamp, *J. Biol. Chem.* 245, 4894 (1970).
- [67] a) R. H. Abeles, W. S. Beck, *J. Biol. Chem.* 242, 186 (1971); b) W. S. Beck, R. H. Abeles, W. G. Robinson, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 25, 421 (1966).
- [68] J. A. Hamilton, R. Yamada, R. L. Blakley, H. P. C. Hogenkamp, F. D. Looney, M. E. Winfield, *Biochemistry* 10, 347 (1971).
- [69] W. H. Orme-Johnson, H. Beinert, R. L. Blakley, *J. Biol. Chem.* 249, 2338 (1974).
- [70] In Gegenwart von Thiolen ist der Nachweis von Vitamin B<sub>12</sub> oder von Cobalt(II)-Derivaten der Modellverbindungen im allgemeinen schwierig, weil sich Cobalamin- bzw. Cobaloxim-thiolate bilden. Diese Cobalt-Schwefel-Verbindungen können gewissermaßen als Cobalt(II)-Nucleophile in situ angesehen werden, da das Cobaltatom in den Komplexen in Gegenwart von Thiolen glatt alkyliert werden kann, auch wenn man die Cobalt(II)-Derivate selbst spektroskopisch nicht nachweisen kann.
- [71] D. W. Jacobsen, F. M. Huennekens, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 37, 793 (1969).
- [72] R. Stjernholm, H. G. Wood, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 47, 303 (1961).
- [73] H. Eggerer, E. R. Stadtman, P. Overath, F. Lynen, *Biochem. Z.* 333, 1 (1960).
- [74] R. W. Kellermeier, H. G. Wood, *Biochemistry* 1, 1124 (1962).
- [75] W. W. Miller, J. H. Richards, *J. Am. Chem. Soc.* 91, 1498 (1969).
- [76] H. F. Kung, S. Cederbaum, L. Tsai, T. C. Stadtman, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 65, 978 (1970).
- [77] H. F. Kung, T. C. Stadtman, *J. Biol. Chem.* 246, 3378 (1971).
- [78] H. F. Kung, L. Tsai, *J. Biol. Chem.* 246, 6436 (1971).
- [79] H. A. Barker, V. Rooze, F. Suzuki, A. A. Iodice, *J. Biol. Chem.* 239, 3260 (1964).
- [80] A. A. Iodice, H. A. Barker, *J. Biol. Chem.* 238, 2094 (1963).
- [81] R. G. Eagar, Jr., B. G. Baltimore, M. M. Herbst, H. A. Barker, J. H. Richards, *Biochemistry* 11, 253 (1972).
- [82] L. L. Ingraham, *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 112, 713 (1964).
- [83] G. N. Schrauzer, R. J. Windgassen, *J. Am. Chem. Soc.* 89, 1999 (1967).
- [84] J. N. Lowe, L. L. Ingraham, *J. Am. Chem. Soc.* 93, 3801 (1971).
- [85] G. Bidlingmaier, H. Flohr, U. M. Kempe, T. Krebs, J. Retey, *Angew. Chem.* 87, 877 (1975); *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* 14, 822 (1975).
- [86] P. Dowd, M. Shapiro, K. Kang, *J. Am. Chem. Soc.* 97, 4754 (1975).
- [87] H. P. C. Hogenkamp, *Biochemistry* 13, 2736 (1974).
- [88] G. N. Schrauzer, R. N. Katz, J. H. Grate, T. M. Vickrey, *Angew. Chem.* 88, 186 (1976); *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* 15, 170 (1976).
- [89] Bei der Photolyse von (16) beobachtet man neben Vitamin B<sub>12</sub> jeweils auch Vitamin B<sub>12</sub>. Die Küvetten für die Photolyse müssen speziell vakuum-entgast werden, um Spuren an Sauerstoff zu entfernen. Bei sorgfältiger Durchführung erhält man Vitamin B<sub>12</sub> als Hauptprodukt der Lichtzersetzung von (16). Bestrahlt man Lösungen von Diol-Dehydratase, die mit (1) als Coenzym inkubiert wurden, so beobachtet man keine Erhöhung, sondern eine leichte Erniedrigung der enzymatischen Aktivität. Auch diese Versuche müssen unter streng anaeroben Bedingungen durchgeführt werden [88].

## ZUSCHRIFTEN

Zuschriften sind kurze vorläufige Berichte über Forschungsergebnisse aus allen Gebieten der Chemie. Vom Inhalt der Arbeiten muß zu erwarten sein, daß er aufgrund seiner Bedeutung, Neuartigkeit oder weiten Anwendbarkeit bei sehr vielen Chemikern allgemeine Beachtung finden wird. Autoren von Zuschriften werden gebeten, bei Einreichung ihrer Manuskripte der Redaktion mitzuteilen, welche Gründe in diesem Sinne für eine vorrangige Veröffentlichung sprechen. Die gleichen Gründe sollen im Manuskript deutlich zum Ausdruck kommen. Manuskripte, von denen sich bei eingehender Beratung in der Redaktion und mit auswärtigen Gutachtern herausstellt, daß sie diesen Voraussetzungen nicht entsprechen, werden den Autoren mit der Bitte zurückgesandt, sie in einer Spezialzeitschrift erscheinen zu lassen, die sich direkt an den Fachmann des behandelten Gebietes wendet.

### Synthese von Thiol- und Selenolestern aus Carbonsäuren und Thiolen bzw. Selenolen<sup>[\*\*]</sup>

Von Hans-Joachim Gais<sup>[\*]</sup>

Professor Robert B. Woodward zum 60. Geburtstag gewidmet

Thiolester (1) und Selenolester (2) besitzen gegenüber Nucleophilen häufig eine größere und selektivere Reaktivität als

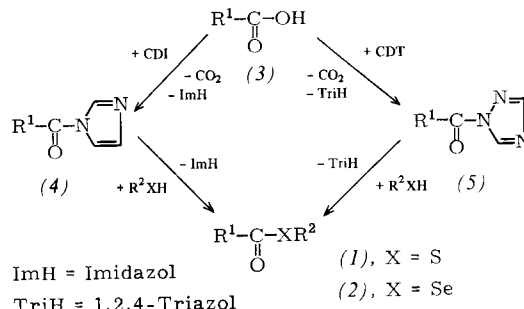
[\*] Dr. H.-J. Gais

Institut für Organische Chemie der Technischen Hochschule  
Petersenstraße 15, D-6100 Darmstadt

[\*\*] Professor K. Hafner danke ich für die Unterstützung dieser Arbeit.

ihre O-Analoga, die durch Aktivierung mit Schwermetall-Ionen oder Oxidationsmitteln noch gesteigert wird. Diese Eigenschaften machen (1) und (2) zu wertvollen Acylüberträgern und erlauben selektive Umwandlungen in komplexen Molekülen. Besonders die Totalsynthese der Makrolid-Antibiotika und Cytochalasane und die Synthese von Acyl-Coenzym A verlangen einfache, milde und allgemein anwendbare Methoden zur Darstellung von (1) und (2).

Carbonsäure-imidazole (4) oder -1,2,4-triazole (5) sind mit nahezu quantitativen Ausbeuten aus Carbonsäuren (3) und Carbonyl-diimidazol (CDI) bzw. -1,2,4-triazol (CDT) zugänglich<sup>[1]</sup>. Wie wir fanden, reagieren (4) und (5) mit aliphatischen<sup>[2]</sup> und aromatischen Thiolen oder Selenolen mit ausgezeichneten Ausbeuten zu (1) und (2) (Tabellen 1 und 2)<sup>[3]</sup>.



Die Aktivierung von (3) mit CDI oder CDT und die Acylierung der Thiole oder Selenole werden ohne Isolierung von (4) oder (5) in inerten wasserfreien Lösungsmitteln bei oder unterhalb Raumtemperatur bei nahezu neutralem pH durchgeführt. Die Umsetzungen sind bei aromatischen Thiolen und Selenolen nach wenigen Minuten, bei aliphatischen Thiolen innerhalb einiger Stunden beendet. Das neben (1) und (2)