

Wie die Natur Vitamin B₁₂ synthetisiert – ein Überblick über die letzten vier Milliarden Jahre **

Von A. Ian Scott *

Diese Übersicht stellt neuere experimentelle Ergebnisse der Erforschung der unendlichen Geschichte der Vitamin-B₁₂-Biosynthese vor, wobei hauptsächlich auf Arbeiten aus der Arbeitsgruppe des Autors zurückgegriffen wird. Darüber hinaus gibt sie einen persönlichen Ausblick auf die Zukunft der Naturstoff-Biosyntheseforschung. Von zentraler Bedeutung ist mittlerweile die leistungsfähige Kombination von molekularbiologischen und modernsten spektroskopischen Techniken. Jene dienen der Suche nach und der Expression von Genen, die für die Enzyme der Biosynthese codieren, diese machen die biochemischen Vorgänge im NMR-Röhrchen direkt beobachtbar. Als logische Weiterentwicklung dieser Ansätze wird die Durchführbarkeit der Eintopf-Multienzymsynthese von Naturstoffen vorgestellt. Dank der Entwicklung und Nutzung von Klonierungstechniken und der daraus resultierenden Verfügbarkeit von Enzymen für die C-C-Verknüpfung hat sich ein grundlegender Wandel im „Handwerkszeug“ des Bioorganikers vollzogen. Gleichzeitig seien aber auch die Organiker angesprochen, die sich diesen technischen Fortschritt zunutze machen wollen. Ihnen wird sich eine neue Welt natürlicher Katalysatoren erschließen, die Synthesen mit hohen Ausbeuten bei einem oftmals überraschenden, aber durchaus willkommenen Mangel an Substratspezifität versprechen. Und schließlich hoffen wir, unsere Begeisterung für diese modernen Methoden weiterzugeben, mit denen heutige wie auch künftige Generationen von Chemikern die Synthesewege der Natur zu komplexen Naturstoffen erforschen können.

1. Einleitung: die frühen Experimente

„It is a tangled skein and I am looking for a loose end.“
„The Creeping Man“^{***}

Seit Shemin et al.^[1] and Neuberger et al.^[2] in den vierziger und fünfziger Jahren ihre mittlerweile klassischen Untersuchungen zur Biosynthese des Häms begannen, sind die Bio-

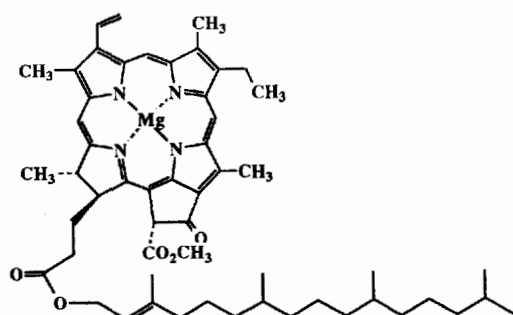
chemiker von den komplexen Mechanismen fasziniert, die der Biosynthese der Tetrapyrrol-Cofaktoren zugrundeliegen (Abb. 1). Diese ermöglichen so unterschiedliche Prozesse wie die Atmung (Häm), die Photosynthese (Chlorophyll), die Methanogenese (Coenzym F430), die Sechs-Elektronen-Sulfit- und -Nitrit-Reduktion (Sirohäm) sowie die Vitaminfunktion (B₁₂ und sein Coenzym – die Corrinioide).

Damals konnte Shemin nach Einnahme von [¹⁵N]Glycin im Selbstversuch zeigen, daß seine Häm-Stickstoffatome durch diese Aminosäure markiert worden waren^[1]. In diesen und anderen wegweisenden Untersuchungen mit [¹⁴C]-Markierung und chemischem Abbau^[3] ließ sich durch sorgfältige Experimente zeigen, daß 5-Aminolävulinsäure (ALA), der Grundbaustein für Porphyrine und Vitamin B₁₂, in Säugern aus Glycin und Succinyl-CoA gebildet wird. Unsere eigenen Arbeiten auf diesem Gebiet begannen vor rund 25 Jahren, als wir ¹³C-angereicherte Vorstufen an ganze Zellen von *Pro-*

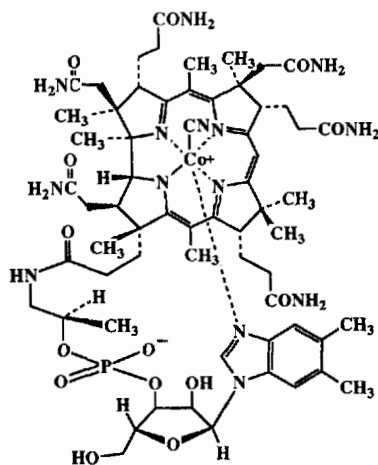
[*] Prof. A. I. Scott
Department of Chemistry, Texas A & M University
College Station, TX 77843-3255 (USA)
Telefax: Int. + 409/845-5992

[**] Nach einem Vortrag bei der 27. Euechem-Konferenz über Stereochemie, Bürgenstock (Schweiz), 26. April–4. Mai 1992. Eine ausführlichere Übersicht zu diesem Forschungsgebiet findet sich in dem Beitrag „Genetically Engineered Synthesis of Complex Natural Products“ (A. I. Scott, *Tetrahedron* **1992**, 48, 2559).

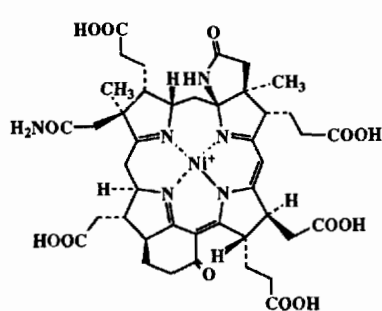
[***] Die im Text aufgeführten Sherlock-Holmes-Zitate entstammen den Werken von Sir Arthur Conan Doyle (1859–1930).



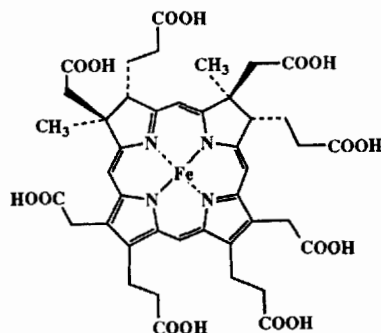
Chlorophyll-a



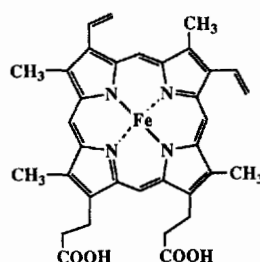
Vitamin B₁₂: Cyanocobalamin



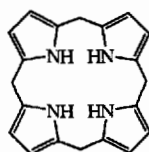
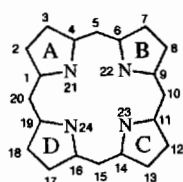
F 430



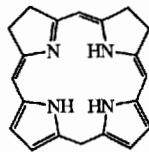
Sirohäm



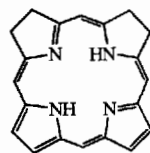
Häm



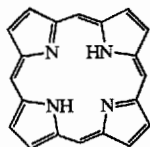
Porphyrinogen



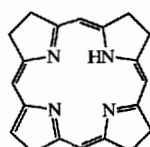
Dipyrrocorphin



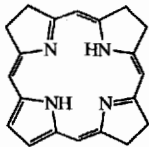
Isobacteriochlorin



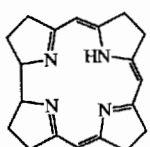
Porphyrin



Corphin



Pyrrocorphin



Corrin

Abb. 1. Oben: Die von Uroporphyrinogen (Uro'gen) III abgeleiteten Cofaktoren. Unten: Die Chromophore der makrocyclischen Tetrapyrrole.



A. Ian Scott wurde 1928 in Glasgow, Schottland, geboren. Von der Universität Glasgow erhielt er die akademischen Grade eines B.Sc., Ph.D. und D.Sc. Nach Postdoktorandaufenthalten bei M. S. Newman (Ohio State University) und Sir Derek Barton (Birkbeck College und Glasgow) sowie einer Dozentur an der Universität Glasgow (1957–62) hatte er Lehrstühle für Organische Chemie an den Universitäten Vancouver, Sussex und Yale inne. 1977 wechselte er zur Texas A & M University, wo er heute „Davidson Professor of Science“ und Direktor des Zentrums für Bio-NMR-Spektroskopie ist. Seine Forschungsinteressen konzentrieren sich auf die Schnittstellen von Organischer Chemie, NMR-Spektroskopie und „Genetic Engineering“ von Naturstoff-Biosynthesen. Stabile Isotope, Enzymologie und Genexpression werden dazu verwendet, um die Mechanismen und das Synthesepotential von Enzymen zu erforschen, die die Biosynthese von Alkaloiden, Antibiotika, Vitaminen und Steroiden bewirken. Seine Arbeiten wurden durch zahlreiche Preise ausgezeichnet, darunter kürzlich durch den A. C. Cope Scholar Award der American Chemical Society. Er ist Fellow der Royal Societies von London und Edinburgh sowie der Europäischen Akademie der Kunst und Wissenschaft, Mitglied der Wissenschaftlichen Akademie zu Siena und Gründungsmitglied der Sherlock Holmes Society von Yale.

pionibacterium shermanii verfütterten. Wir konnten seinerzeit durch NMR-Spektroskopie nachweisen, daß die B₁₂-Biosynthese mit ALA beginnt und über Porphobilinogen (PBG) zum unsymmetrischen Uroporphyrinogen (Uro'gen) verläuft – ein Weg, der allen in Abbildung 1 dargestellten Cofaktoren gemeinsam ist –, bevor die chirale Welt der Corrine betreten wird, deren stereochemische Komplexität hauptsächlich durch die C-Methylierung der pyrrolischen Ringe durch S-Adenosylmethionin (SAM) verursacht wird^[4]. In den folgenden zehn Jahren gelang (zusammen mit L. Siegel und G. Müller) durch Verwendung zellfreier Systeme von *P. shermanii* und *Clostridium tetanomorphum* auf dem Weg zu den Corrinen die Isolierung von zwei partiell methylierten Zwischenstufen, den Faktoren II und III^[4]. Wir wissen heute, daß diese oxidierten Pigmente oder „Faktoren“ auf der Stufe des Hexahydroporphyrins durch die Biosynthesemaschinerie geschleust werden. Obwohl die stabilen Isobakteriochlorin-Strukturen der Faktoren II und III hinreichend durch ¹³C-NMR-Spektroskopie an Submilligramm-Mengen aufgeklärt wurden^[4], handelt es sich bei den wahren Substraten für die Methyltransferasen der Biosynthese um ihre reduzierten (und sehr viel empfindlicheren) Formen, die Präcorrine 1–3 (Abb. 2)^[5a]. Diese Übersicht

(axialen) Liganden ist die Cyanidgruppe vermutlich zuerst als Artefakt bei der ursprünglichen Isolierung von B₁₂ eingeführt worden, was wohl auf die cyanidhaltige Tierkohle, die bei der Reinigung verwendet wurde, zurückgeführt werden kann^[5b].

1.1. Datierung des B₁₂-Weges und einige medizinische Hinweise

Auf dem gesamten Weg von ALA bis zur corrinoiden B₁₂-Struktur gibt es anscheinend keinen formalen Wechsel der Oxidationsstufe. Zusammen mit der Phylogenese der B₁₂-produzierenden Organismen^[6] und Eschenmosers bemerkenswerter Simulation der präbiotischen Uro'gen-III-Synthese aus Glutamindinitril^[7] deutet diese Tatsache darauf hin, daß nicht nur der Vorläufer für das Typ-III-Porphyrinogen, sondern auch der für das präbiotische Corrintemplat, das an den Positionen biologischer C-Methylierung Protonen trägt, leicht vorstellbar ist. Die primitiven anaeroben methanogenen Bakterien, die B₁₂, nicht aber Häm produzieren, existierten schon vor ungefähr 3.79×10^9 Jahren^[8]. Dagegen wurde die Sauerstoffregulierung durch die Pigmente

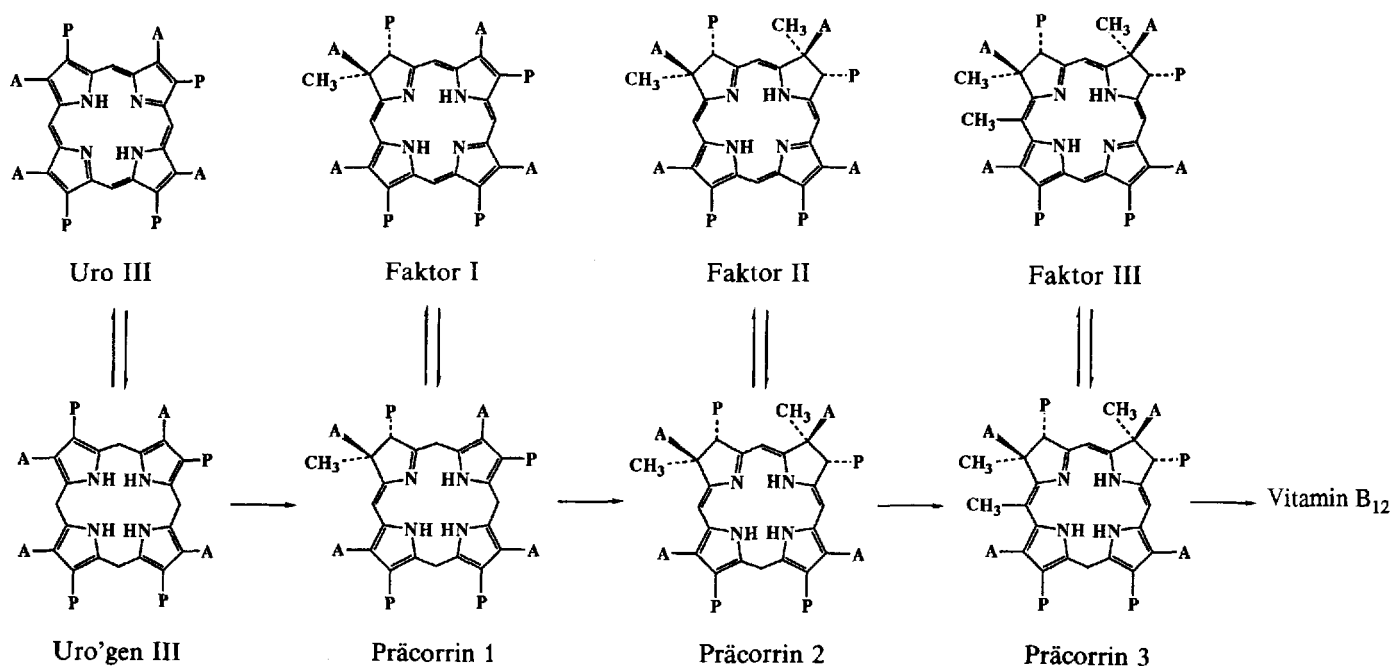


Abb. 2. Die Präcorrine 1–3 und die entsprechenden oxidierten „Faktoren“ I–III.

wird sich hauptsächlich mit den heutigen Kenntnissen über die Enzyme der Biosynthese befassen, die in nicht weniger als zwanzig Stufen in mechanistisch komplexer Weise Corrin aus ALA erzeugen. Nicht behandelt werden hier diejenigen Schritte, die das einfachste Corrin, die Cobyrinsäure, in Cyanocobalamin (Vitamin B₁₂) umwandeln, was durch Amidierung und Anknüpfung der „Nucleotidschleife“ geschieht, deren Aminoisopropylalkohol-, Phosphat-, Ribose- und Dimethylbenzimidazol-Einheiten aus Threonin, Guanosintriphosphat, Ribose bzw. Riboflavin aufgebaut sind. Anstelle der Cyanidfunktion im Cyanocobalamin trägt das physiologisch aktive Coenzym B₁₂ eine 5-Desoxyadenosylgruppe. Aufgrund der leichten Austauschbarkeit des 6.

der Atmung (Häm) und die oxygene Photosynthese (Chlorophyll) erst notwendig, als vor ungefähr 1.7 Milliarden Jahren genügend Sauerstoff in der Erdatmosphäre vorhanden war^[6, 8]. Die alten Organismen hatten also, lange bevor die oxidierten Pigmente (Häme, Cytochrome) benötigt wurden, gelernt, Corrine aus Uro'gen Typ III zu synthetisieren und Methan mit Hilfe von Coenzym F430 zu produzieren^[6]. Der Cobaltcorrin-Komplex war zusammen mit dem nickelhaltigen Coenzym F430, mit dem er das Präcorrin 2 als Vorstufe teilt, sicherlich der früheste metallorganische Cofaktor, auch wenn er stereochemisch wesentlich komplexer ist als das planare Häm. Während man die primitive, durch F430 vermittelte Methanogenese versteht, ist die Funktion der frühen

Corrine nicht so leicht zu erschließen. Denkbar sind etwa der Methyltransfer vom Methylcobalamin hin zu einer Cobalamin-abhängigen Methionin-Synthese^[9] oder auch die Carboxylierung des Methylcobalamins unter Bildung von Acetat^[10]. Was auch immer die biologische Funktion von Corrinen in Archaeobakterien gewesen sein mag, ihre anschließende Evolution und Selektion zu einem funktionellen Coenzym hat die modernen Organismen einschließlich den Menschen mit einer ganzen Reihe von außergewöhnlichen Coenzym-B₁₂-vermittelten 1,2-Verschiebungen ausgestattet, ganz zu schweigen von der Ribonucleotid-Reduktase. Alle diese Reaktionen beruhen auf der homolytischen Spaltung der einzigartigen, in einer wasserlöslichen Struktur eingebetteten Cobalt-Kohlenstoff-Bindung, die das unverwechselbare Kennzeichen aller Coenzym-B₁₂-abhängigen Umlagerungen ist^[11]. Wie wir noch zeigen werden, ist diese Evolutionshierarchie deshalb besonders interessant, weil uns die aus Uro'gen-Typ-III-abgeleiteten Pigmente überall begegnen, bis hin zum heutigen Menschen, der die vier für die Synthese von Uro'gen III erforderlichen Gene *hemA*-D benötigt, um das Häm für sein Hämoglobin herzustellen. Ergänzend sei an dieser Stelle eine historische Bemerkung erlaubt: Die akute intermittierende Porphyrrie wird durch das Fehlen des *hemC*-Gens hervorgerufen, das für Porphobilinogen (PBG)-Desaminase, das polymerisierende Enzym der Tetrapyrrol-Biosynthese, codiert. Dieser ererbte Defekt (und das damit verbundene geistesgestörte Verhalten) gilt nicht nur als Ursache für den „Königlichen Wahnsinn“ (Royal Madness) im Hause Hannover, als dessen berühmtestes Opfer Georg III. bekannt ist^[12], sondern wurde jüngst^[13] auch mit dem tragischen Leben Vincent van Goghs in Zusammenhang gebracht.

2. Die Enzyme für den Aufbau des Tetrapyrrol-Gerüsts sind *hemA*–D-codiert

„When a fact appears to be opposed
to a long chain of deductions
it invariably proves to be capable of bearing
some other interpretation...
„A Study in Scarlet“

2.1. Die Synthese von ALA: auf zwei Wegen zu einem einfachen Molekül

Die Struktur des C₅-Bausteins ALA birgt hinsichtlich seines genetischen Ursprungs eine Dualität in sich. Zum einen

gibt es die von Shemin entdeckte ALA-Synthase, die die durch Pyridoxalphosphat vermittelte decarboxylierende Kondensation von Glycin und Succinyl-CoA bewirkt (Abb. 3a). Zum anderen gibt es – in *Escherichia coli* – auch einen einfacheren Weg, der durch die Reduktion von Glutamyl-tRNA zu Glutamatsemialdehyd (GSA) (Abb. 3b) mit einer *hemA*-codierten Dehydrogenase gekennzeichnet ist. Danach folgt eine bemerkenswerte intramolekulare Transposition der Amin- und Carbonylfunktionalität von GSA zu ALA, die von *hemL* kontrolliert wird. Dieser sogenannte „C₅-Weg“ wurde zuerst in Pflanzen entdeckt, die kein B₁₂ produzieren^[14]. Mittlerweile weiß man aber^[14], daß dieser Biosyntheseweg von vielen B₁₂-produzierenden Organismen, z.B. *Salmonella* und *Clostridium thermoaceticum*^[15], beschritten wird. Die klassische Shemin-Sequenz^[1, 3] hingegen ist wahrscheinlich auf photosynthetisierende Bakterien, Hefen und Säuger beschränkt.

Unabhängig vom Ursprung der ALA schließt sich im nächsten Schritt die dehydratisierende Selbstkondensation von ALA zu PBG an. Diese Umsetzung wird durch das *hemB*-codierte Enzym ALA-Dehydratase katalysiert. Überexpression der Dehydratase^[16, 17] (bis zu 40 mg L⁻¹ in gentechnisch veränderten Zellen von *E. coli*) und ihre Immobilisierung auf Sepharose ermöglichen nun die einfache Darstellung unterschiedlich ¹³C-markierter Formen von PBG, die man für die zahlreichen Studien an ¹³C-angereicherten späteren Zwischenstufen höherer Komplexität benötigt. Setzt man die leicht zugängliche 5-Aminolävulinsäure als Substrat ein, ist die ALA-Dehydratase gleichzeitig das erste Enzym im Arsenal der Katalysatoren für die Multienzymsynthese.

2.2. Die Porphobilinogen-Desaminase: ein Enzym mit vielen Überraschungen

Das nächste, von *hemC*-codierte Enzym ist die PBG-Desaminase. Sie katalysiert die Tetramerisierung von PBG 1 zu Präuro'gen (Hydroxymethylbilan, HMB) 2^[18, 19], das anschließend durch Uro'gen-III-Synthase^[19–21] (Abb. 4) unter Umlagerung zum unsymmetrischen Uro'gen III 3 cyclisiert wird. In Abwesenheit der Uro'gen-III-Synthase dehydratisiert HMB 2 spontan zu Uro'gen I 4. Obwohl es sich dabei genau genommen nicht um einen Naturstoff handelt, hat sich Uro'gen I als Substrat für einige Methyltransferasen der Vitamin-B₁₂-Biosynthese herausgestellt.

Es gelang uns, ein Plasmid, pBG 101, zu konstruieren, das das für Desaminase codierende *hemC*-Gen von *E. coli* ent-

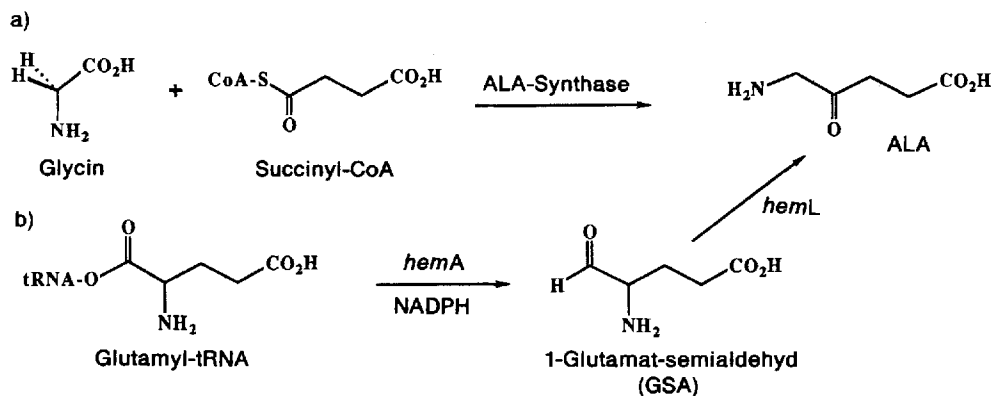


Abb. 3. Die beiden Mechanismen der ALA-Synthese: a) Der „Shemin-Weg“ und b) der „C₅-Weg“.

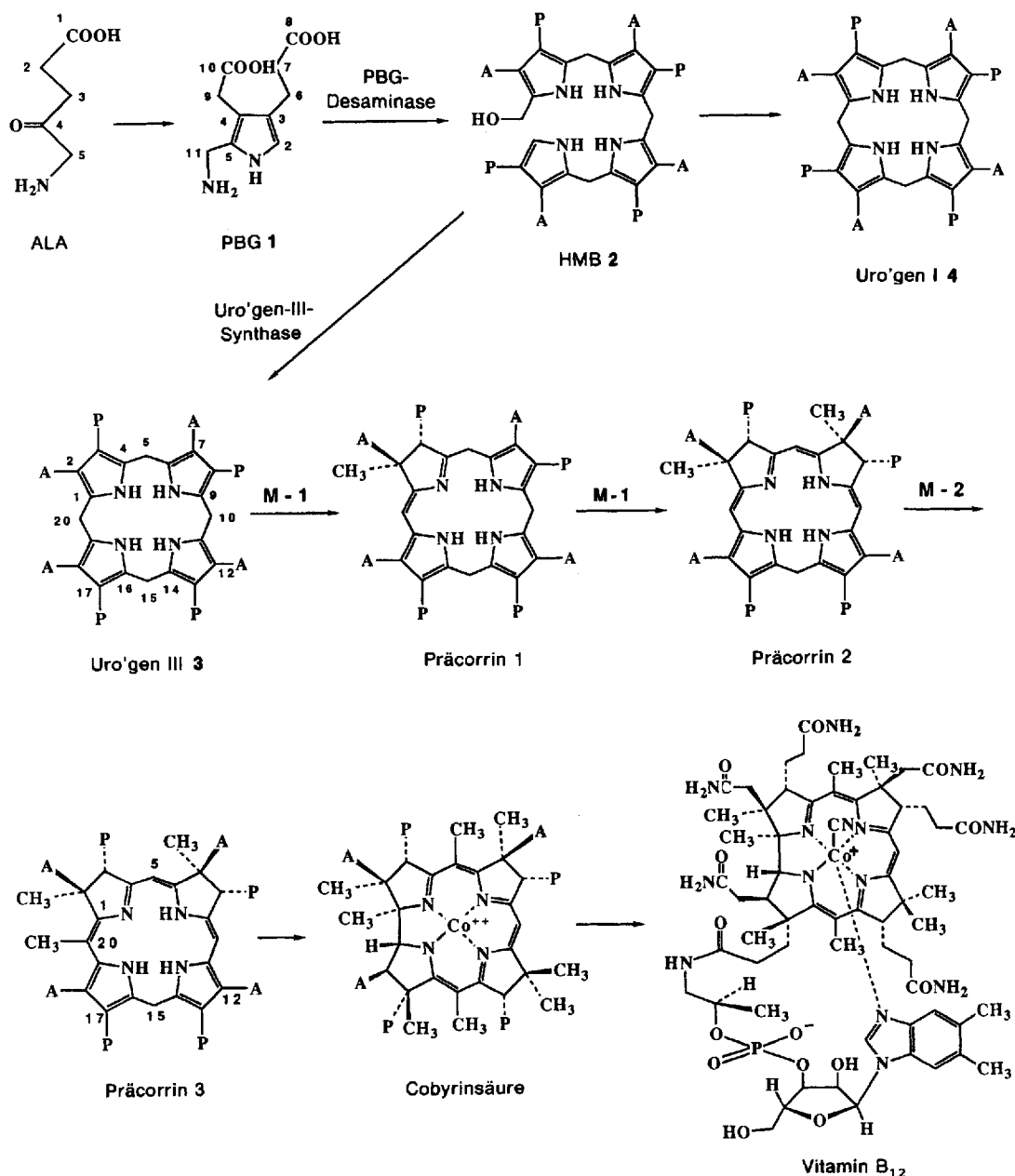
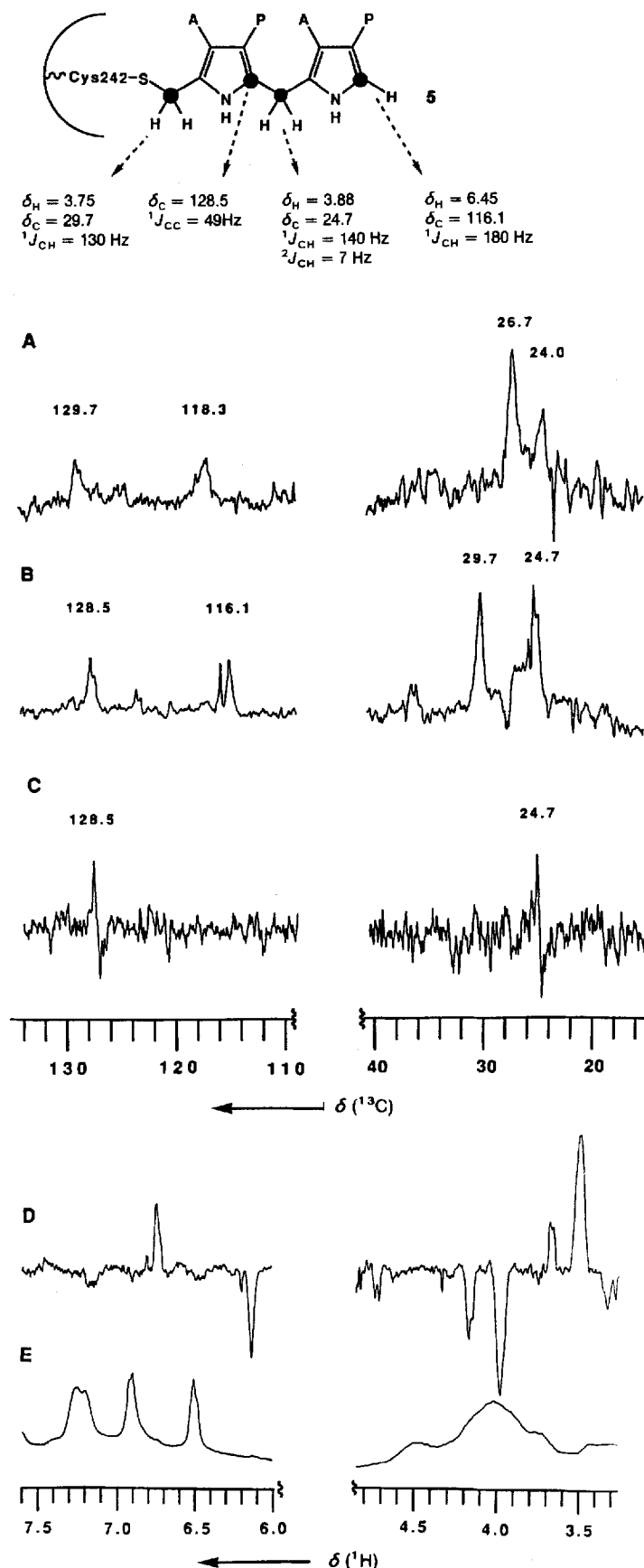


Abb. 4. Die „frühen“ Vorstufen von Vitamin B₁₂. Von ALA zu Präcorrin 3. A = CH₂COOH, P = CH₂CH₂COOH.

hält^[22, 23]. Mit diesem Plasmid transformierte *E. coli*(TB1)-Zellen produzieren mehr als 200mal soviel Desaminase wie der Wildtyp^[23] (30–40 mg L⁻¹). Damit ist der Zugang zu substantiellen Mengen reinen Enzyms für gründliche Untersuchungen zum Mechanismus der Katalyse sowie für die Darstellung späterer Zwischenstufen gewährleistet. Desaminase läßt sich außergewöhnlich gut untersuchen, weil zwischen diesem Enzym und jedem weiteren von außen zugeführten Substratmolekül eine kovalente Bindung geknüpft wird^[24–30]. Dadurch wird die Isolierung der Enzym-Substrat-Komplexe ermöglicht, die bis zu drei PBG-Einheiten (E-S₁–E-S₃) enthalten. Mit geeigneter Desaminase konnte gezeigt werden, daß an einen der vier Cysteinreste des Enzyms (Cys 242) ein neuer Cofaktor kovalent gebunden ist. Dieser hat die Struktur eines aus dem Substrat herrührenden Dipyrrromethans, an dessen freie α -Position während des Katalysezyklus vier PBG-Moleküle geknüpft werden (Abb. 5 und 6).

In Gegenwart von [5-¹³C]ALA ergab eine *E. coli*-Mutante (*hemA*⁻), deren Wachstum ALA-abhängig ist, hoch ¹³C-anreichertes Enzym für anschließende NMR-Untersuchungen. Bei pH 8 konnte man die Signale für die angereicherten Kohlenstoffatome des Dipyrrromethan-Cofaktors bei δ = 24.0 (py-CH₂-py), 26.7 (py-CH₂-X), 118.3 (α -freies Pyrrol) und 129.7 (α -substituiertes Pyrrol) eindeutig erkennen (Abb. 5A). Bei pH 12 ist die Form der Signale schärfer (Abb. 5B), und die Resonanz der CH₂-X-Gruppe ist im entfalteten Enzym zu δ = 29.7 verschoben. Aus dem Vergleich mit synthetischen Modellverbindungen geht hervor, daß eine chemische Verschiebung von δ = 26.7 in dem Bereich liegt, den man für eine α -Thiomethylpyrrolgruppe (py-CH₂-SR) erwartet. Die Bestätigung dafür, daß hier tatsächlich ein Dipyrrromethan, und nicht etwa ein Oligopyrrromethan vorliegt, lieferte schließlich das bei pH 12 aufgenommene ¹³C-INADEQUATE-NMR-Spektrum, das die erwartete Kopplung lediglich zwischen der py-CH₂-py-Gruppe (δ = 24.7)



Modell. C) ^{13}C -INADEQUATE-NMR-Spektrum (pH 12) von aus $[5\text{-}^{13}\text{C}]\text{ALA}$ 6 erhaltener Desaminase, das die Kopplung zweier benachbarter Kohlenstoffatome zeigt und so die Kopf-Schwanz-Struktur des Dipyrrromethans bestätigt. D) 300 MHz- ^1H -Heteronuclear-Mehrfachquanten-Kohärenzspektrum (pH 12) von biosynthetisch angereicherter Desaminase (2 mM). Es weist drei Signalaufpaare auf, die nur den Protonen entsprechen, die direkt mit den ^{13}C -Atomen verknüpft sind, welche ihrerseits aus $[5\text{-}^{13}\text{C}]\text{ALA}$ 6 stammen. Die beobachteten Antiphasenaufspaltungen entsprechen dabei einer ^1H - ^{13}C -Kopplung über eine Bindung. E) Das normale ^1H -NMR-Spektrum derselben Probe illustriert den Selektivitätsgewinn, der durch Verwendung der Pulssequenz in Spektrum (D) erreicht wird. Über den Spektren ist die Struktur des Dipyrrromethan-Cofaktors 5 gezeigt; seine ^1H - und ^{13}C -NMR-chemischen Verschiebungen sowie die Kopplungskonstanten bei pH 12 sind angegeben.

und dem benachbarten substituierten pyrrolischen C-Atom ($\delta = 128.5$) zeigt (Abb. 5 C und Abb. 6). Die Untersuchung der angereicherten Desaminase mit Hilfe der ^1H -Heteronuclear-Mehrfachquanten-Kohärenzspektroskopie (Abb. 5 D) zeigt, daß in Übereinstimmung mit Struktur 5 (Abb. 5 oben) lediglich fünf Protonen (von insgesamt fast 2000!) mit ^{13}C -angereicherten Kernen verknüpft waren. Anschließend wurde eine Desaminaseprobe kovalent mit dem Suizid-Inhibitor $[2,11\text{-}^{13}\text{C}_2]\text{2-Brom-PBG}$ 8 (Abb. 6) inhibiert. Das resultierende Spektrum ist lediglich mit Struktur 9 konsistent; 9 konnte kürzlich auch durch Elektrospray-Massenspektrometrie ($M_r = 34\,559$) charakterisiert werden^[30b]. Es ist also das freie α -pyrrolische C-Atom des Dipyrrromethan-Cofaktors im nativen Enzym, das kovalent mit dem Substrat (oder dem Inhibitor) verknüpft wird. Daraus ergibt sich der in Abbildung 6 dargestellte Vorschlag zu Struktur und Wirkungsweise der Desaminase.

In weiteren Untersuchungen fand man, daß zwei Mol-äquivalente PBG autokatalytisch in das Apoenzym eingebaut werden. Letzteres isolierte man durch Überexpression in einem *hemB*⁻-Stamm von *E. coli*, der selbst kein PBG produziert^[28]. Beim ersten (kinetischen) Zusammentreffen von PBG-Desaminase und Substrat kommt es dann unter Austritt von Ammoniak zur Anknüpfung von PBG an die freie α -pyrrolische Position des Dipyrrromethans. Auf diese Weise wird der E-S₁-Komplex 7 gebildet (Abb. 6)^[29, 30a]. Dieser Vorgang wiederholt sich, und es entsteht das instabile „Tetra-PBG“-Addukt 10 (E-S₄), das vor kurzem durch Elektrospray-Massenspektrometrie nachgewiesen wurde ($M_r = 35\,107$)^[30b]. Durch ortsspezifische Spaltung der Hexapyrrol-Kette (an ---, siehe Abb. 6) kommt es zur Freisetzung des Azafulvens 11, das nach stereospezifischer Hydratisierung^[19] zu HMB 2 zum Substrat für die Uro’gen-III-Synthase wird. Während das Bilan 2 bei pH 12 stabil ist, cyclisiert es bei pH-Werten ≤ 8 auf chemischem Wege zu Uro’gen I 4 (Abb. 4). Zu denselben Ergebnissen bezüglich des aktiven Zentrums kamen in unabhängigen, ergänzenden Studien 1987/1988 zwei andere Arbeitsgruppen^[31, 32]. Durch ^{13}C -Markierung läßt sich die Anzahl der PBG-Moleküle (zwei) bestimmen, die bei pH 8 in Art einer Kopf-Schwanz-Verknüpfung mit dem nativen Enzym verknüpft sind. Weiterhin läßt sich nachweisen, daß es sich bei der nucleophilen Gruppe, die das Dipyrrromethan (und damit auch die wachsende Oligopyrrol-Kette) im Enzym verankert, um eine Cys-SH-Gruppe handelt. Mit Hilfe ortsspezifischer Mutagenese^[23] und chemischer Spaltung^[31, 32] wurde Cys 242 als Anknüpfungspunkt für den Cofaktor identifiziert.

Abb. 5. Hochfeld-NMR-Spektren von PBG-Desaminase aus *E. coli* (ca. 1 mM) mit spezifisch aus $[5\text{-}^{13}\text{C}]\text{ALA}$ 6 angereichertem Dipyrrromethan-Cofaktor. A) 125 MHz- ^{13}C -NMR-Differenzspektrum zwischen unterschiedlichen, in Gegenwart oder Abwesenheit von $[5\text{-}^{13}\text{C}]\text{ALA}$ 6 gewachsenen Proben von Desaminase (pH 8), das die vier Signale der aus ALA entstammenden ^{13}C -angereicherten Kohlenstoffatome zeigt. B) Differenzspektrum gleicher Proben, aufgenommen bei pH 12. Durch Denaturierung im Alkalischen findet sich das dem Thiomethyl-Kohlenstoffatom zugeordnete Signal zu $\delta = 29.7$ tieffeldverschoben; dies steht in guter Übereinstimmung mit einem Thiomethylpyrrol-Konjugat-

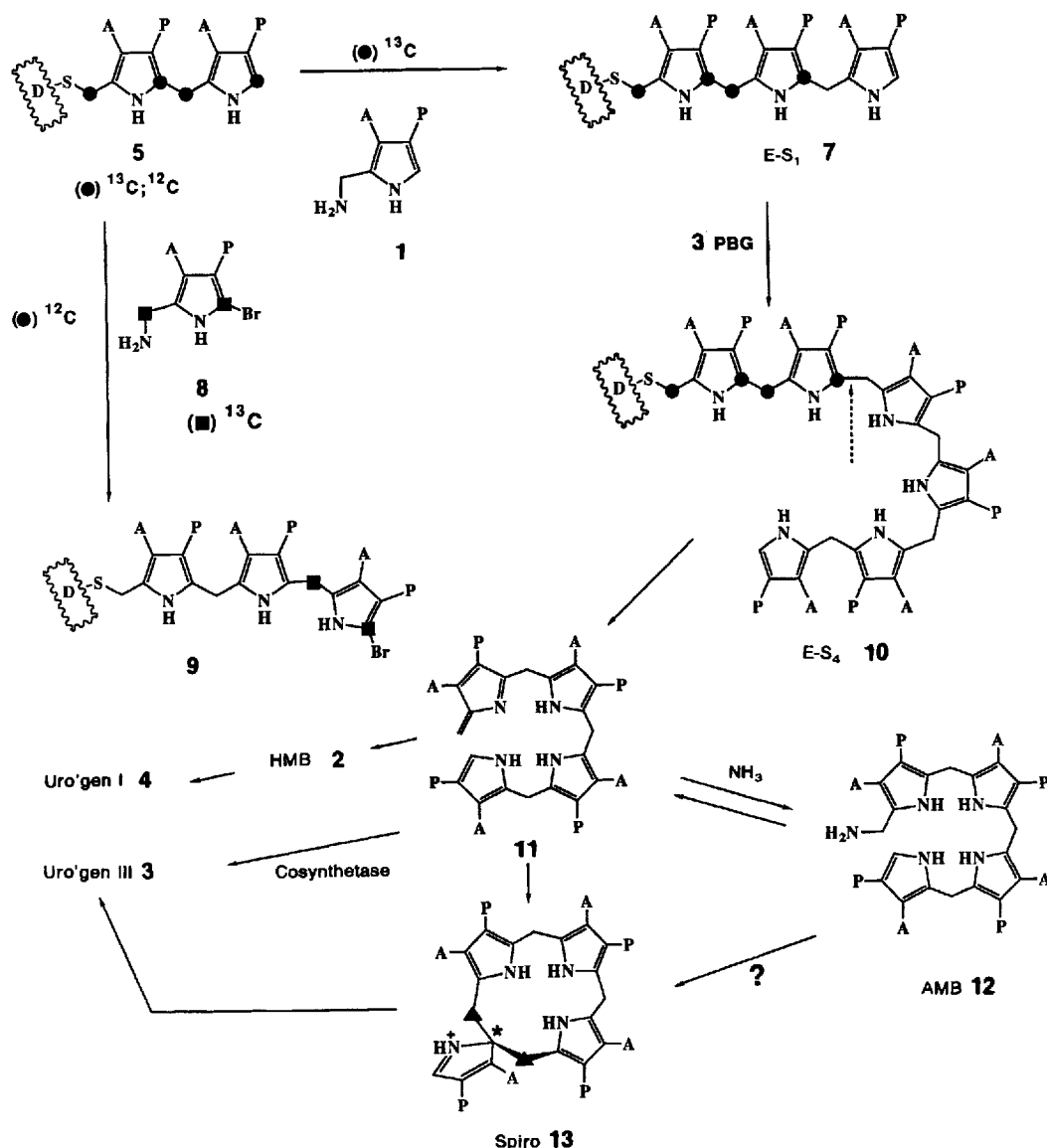


Abb. 6. Der außergewöhnliche Dipyrrromethan-Cofaktor der PBG-Desaminase, der kovalent mit Cys 242 des Enzyms verknüpft ist, und seine Rolle beim Aufbau des Tetrapyrrols; im unteren Teil sind der „Spiro-Mechanismus“ sowie die Wirkungsweise der Uro'gen-III-Synthase (Cosynthetase) gezeigt.

Daß das α -Kohlenstoffatom eines Dipyrrromethans als nucleophiles Zentrum benutzt wird, das die Oligomerisierung von vier Moläquivalenten PBG (unter gleichzeitigem NH_3 -Verlust bei jeder sukzessiven Reaktion mit einem α -freien Pyrrol) ermöglicht, ist nicht nur wegen der damit verbundenen außerordentlichen Spezifität und Kontrolle bemerkenswert. Unseres Wissens handelt es sich dabei um einen in den Annalen der Enzymologie einzigartigen Prozeß, da das Substrat tatsächlich nicht nur ein-, sondern zweimal bei der Entstehung des Cofaktors des aktiven Zentrums verwendet wird. Noch bemerkenswerter aber ist, daß das Apoenzym ganz automatisch, ohne Beteiligung eines anderen Enzyms nur durch Zugabe von zwei PBG-Einheiten in das aktive Holoenzym umgewandelt wird.

2.3. Uro'gen-III-Synthase: molekulare Akrobatik bei der Inversion des D-Ringes

Wir kommen nun kurz auf die Uro'gen-III-Synthase, das Enzym der Umlagerung, zu sprechen. Frühe Ideen von Bo-

gorad et al.^[33], denen zufolge das Aminomethylbilan (AMB) 12 als mutmaßliches Substrat galt, trugen dazu bei, daß die Struktur dieser schwer faßbaren Spezies, die nach Synthese durch PBG-Desaminase zum Substrat für die Uro'gen-III-Synthase wird, schließlich aufgeklärt werden konnte. Dabei handelte es sich um HMB 2. Zu diesem Zeitpunkt (1978) wurde deutlich, daß AMB 12 aufgrund seiner fehlenden Aktivität als Substrat nicht mehr und nicht weniger als ein interessantes Artefakt war, das durch Zugabe von Ammoniak zu Inkubationen von Desaminase quantitativ gebildet wurde (Abb. 6). Als durch gemeinsame Klonierung der Gene *hemC* und *hemD* und ihre Überexpression in *E. coli* reine Uro'gen-III-Synthase in substantiellen, d. h. um einige hundertmal größeren Mengen als in anderen Arbeiten beschrieben^[35a], zugänglich wurde, konnte die Substratspezifität der Synthase – früher als Cosynthetase bezeichnet – erneut untersucht werden. Seit ihrer Konzeption durch Mathewson und Corwin im Jahre 1961^[33b] haben die Organiker eine besondere Vorliebe für die Spiro-Verbindung 13 entwickelt (Abb. 6). Das liegt sicherlich daran, daß sowohl ihre Entstehung durch α -pyrrolische Reaktivität als auch ihre

Fragmentierung-Rekombination die erstaunliche intramolekulare Bildung von Uro'gen III aus dem linearen Bilan Präuro'gen (HMB) **2** unter Inversion des D-Ringes zu erklären vermag. Bei Temperaturen unter 0 °C wurde in einem Kryosolvens (– 24 °C; Ethylenglykol/Puffer) unter Verwendung verschiedener ¹³C-Isotopomere von HMB als Substrat eingehend nach der Spiro-Verbindung **13** gesucht^[34]. Obwohl auf diese Weise die Reaktion der Synthese verlangsamt werden konnte (Beendigung der Reaktion nach 20 h statt nach 20 s), ließen sich keine Signale beobachten, die man dem quartären Kohlenstoffatom (in **13** mit einem Sternchen markiert; $\delta \approx 80$) oder den α -pyrrolischen Methylengruppen (schwarze Dreiecke; $\delta = 35-40$) hätte zuordnen können. Es wurde auch gefunden, daß totalsynthetisch hergestelltes, d. h. nicht mit Desaminase – die die Umwandlung von AMB zu HMB katalysieren kann – veunreinigtes AMB **12** bei hohen Konzentrationen (je 1 mmol an Enzym und Substrat) ein zwar langsames, aber produktives Substrat für die Uro'gen-III-Synthase ist. Unabhängig davon, welche Form des Bilansystems (HMB oder AMB) an diesem Prozeß beteiligt ist, weist das Ergebnis, daß keine enzymfreien Intermediate beobachtet werden konnten, entschieden darauf hin, daß die Zwischenstufe enzymgebunden vorliegt und daher nur schwer nachzuweisen ist. Ein indirekter Nachweis für den „Spiro-Mechanismus“ ergab sich aus dem Befund, daß eines der Enantiomere des entsprechenden synthetischen Ring-D Lactams die Uro'gen-III-Synthase inhibierte^[36a]. Kürzlich haben wir eine Alternative zur „Spiro-Zwischenstufe“ **13** vorgeschlagen, die in Übereinstimmung mit den bekannten Fakten^[34] das in Abbildung 7 dargestellte Konzept der Selbstkonstitution unter Bildung eines Lactons favorisiert. Dabei wird angenommen, daß auf die Bildung des Azafulvens **11** nicht die Bildung einer Kohlenstoff-Kohlenstoff-Bindung zu **13** erfolgt, sondern der Ringschluß des Makrocyclus zum Makrolid.

Die Regiospezifität dieses Schrittes spiegelt sich zum einen darin wider, daß synthetische Bilane mit fehlender Acetat-Seitenkette an Position 17 des D-Ringes keine enzymkatalysierte Umlagerung zum Typ-III-System eingehen^[21]; zum anderen zeigt sie sich in der Beobachtung, daß ein

„umgedrehtes“ Bilan mit Propionat an Position 17 (und Acetat an Position 18) enzymatisch tatsächlich eine gewisse Menge an (umgelagertem) Uro'gen I (aber auch an Uro'gen III) ergibt^[21, 36b]. Dies wiederum zeigt, daß die Bildung des Lactons, wenngleich weniger effizient, auch durch eine Propionat-Gruppe an Position 17 bewirkt werden kann. Die nun folgende Chemie ist der für die Spiro-Verbindung postulierten Fragmentierung-Rekombination recht ähnlich, abgesehen davon, daß ein „verdrehtes Makrolid“ zur zentralen Zwischenstufe wird und die Sequenz wie in Abbildung 7 dargestellt abläuft. Diese neue Hypothese läßt sich experimentell nur schwer überprüfen. Dennoch wird in Verbindung mit ¹⁸O-Markierung versucht, die Lacton-Zwischenstufe chemisch abzufangen, um auf diese Weise einen möglichen „Makrolid-Mechanismus“ für die Uro'gen-III-Synthase, deren Wirkungsweise Biochemikern seit mehr als drei Jahrzehnten rätselhaft ist, zu bestätigen oder zu verwerfen.

3. Bei der Suche nach den fehlenden Intermediaten hilft die Gentechnik weiter

*„It is an old maxim of mine
that when you have excluded the impossible,
whatever remains, however improbable, must be the truth.”
„The Beryl Coronet“*

3.1. Die ersten Methyltransferasen: ihre Spezifität und die Synthese der Präcorrine **1** und **2**

Die erste der Methylasen, die die sequentielle Bildung der Faktoren I und II (Abb. 2) katalysiert, wird S-Adenosylmethionin-Uro'gen-III-Methyltransferase (SUMT) genannt. SUMT konnte erstmals von G. Müller^[37] aus *P. shermanii*-Kulturen partiell gereinigt werden und ist mittlerweile in *Pseudomonas denitrificans* überexprimiert worden^[38]. Von *E. coli* weiß man, daß das CysG-Gen die Uro'gen-III-Methylase (M-1) codiert. Diese ist Bestandteil des Biosynthesewe-

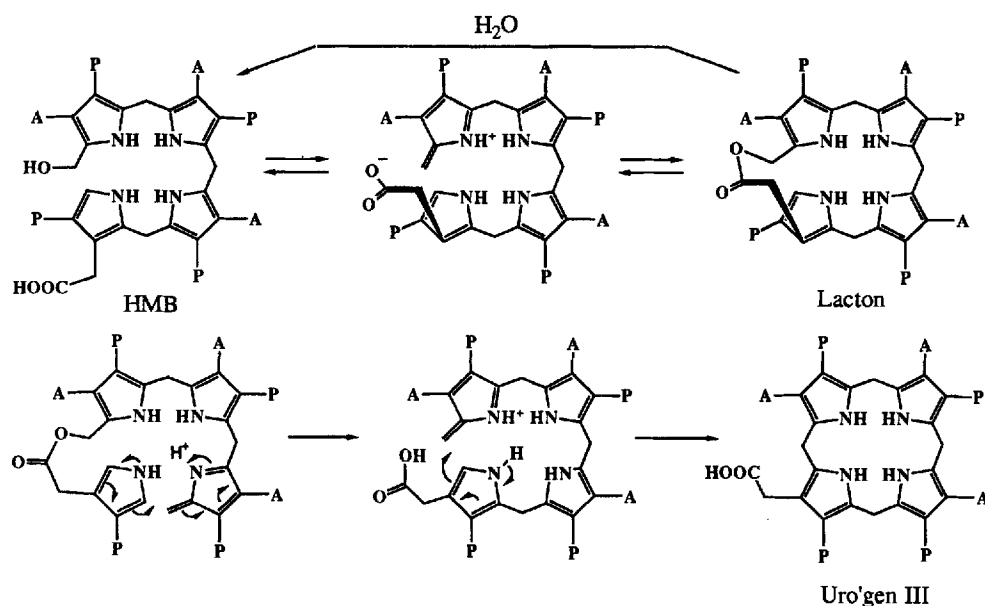


Abb. 7. Das Makrolid-Postulat für den Mechanismus der Uro'gen-III-Synthase.

ges zu Sirohäm, dem Cofaktor der Sulfid-Reduktase. Durch Anwendung gentechnischer Verfahren war es möglich, 30 mg L^{-1} dieses Enzyms herzustellen^[39a]. Obwohl SUMT und M-1 dieselbe Funktion zu erfüllen scheinen, weisen sie offenbar unterschiedliche Substratspezifitäten auf^[39b, c]. So gelang es, die durch M-1 katalysierte Reaktion NMR-spektroskopisch direkt und detailliert zu untersuchen und damit zu beweisen, daß die Struktur von Präcorrin 2 der des Dipyrrocorphin-Tautomers des Dihydro-Faktors II (Dihydrosirohydrochlorin) entspricht. Dazu wurde unter Einsatz von $[5-^{13}\text{C}]\text{ALA}$ an den mit schwarzen Quadraten markierten Positionen (Abb. 8) angereichertes Uro'gen III durch Zu-

Darüber hinaus haben kürzlich durchgeführte Markierungsexperimente^[40b] zuverlässig erkennen lassen, daß Präcorrin 1 mit der in Abbildung 4 angegebenen Struktur von dem methylierenden Enzym (SUMT) abgespalten wird.

Bei längerer Inkubation (2 h) von Uro'gen III mit M-1 kam es allerdings zu einem überraschenden Ergebnis: Statt des Präcorrins 2 (eines Dipyrrocorphins) wiesen die UV- und NMR-Spektren nun den Chromophor eines Pyrrocorphins nach, das bislang lediglich als synthetisches Hexahydporphyrin-Tautomer bekannt war^[41a]. Auf den ersten Blick schien dieser Befund zu bedeuten, daß eine weitere durch das Enzym katalysierte Dipyrrocorphin \rightarrow Pyrrocorphin-Tauto-

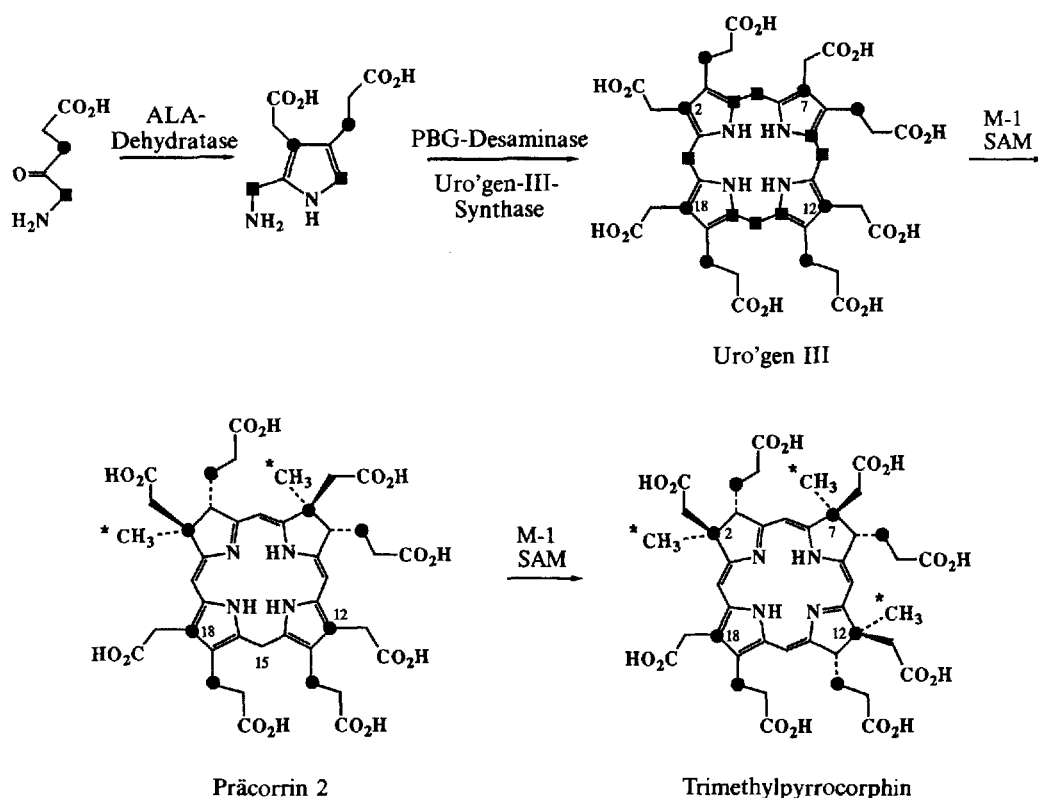


Abb. 8. Synthese von Präcorrin 2, C-Methylierung von Uro'gen III durch das Enzym M-1 und „Übermethylierung“ des Produkts im Uhrzeigersinn. Die ^{13}C -angereicherten Zentren, die zur Zuordnung der Kohlenstoffatome und der C-C-Kopplungen verwendet wurden, entstammen $[3-^{13}\text{C}](\blacksquare)$ - $[5-^{13}\text{C}](\bullet)$ -ALA und $[^{13}\text{CH}_3]\text{SAM}$ (*).

sammengabe von Dehydratase, Desaminase und Uro'gen-III-Synthase dargestellt und anschließend mit M-1 und $[^{13}\text{CH}_3]\text{SAM}$ inkubiert.

Das ^{13}C -NMR-Spektrum des so erhaltenen Präcorrins 2 wies nur ein Signal für ein angereichertes sp^3 -Kohlenstoffatom auf, das C-15 zugeordnet werden konnte. Damit fanden wir das reduzierte Zentrum. Durch Verwendung eines anderen Satzes von ^{13}C -Markierungen (\bullet aus $[3-^{13}\text{C}]\text{ALA}$) und $[^{13}\text{CH}_3]\text{SAM}$ gelang es, sowohl die sp^2 -Kohlenstoffatome C-12 und C-18 als auch die sp^3 -Zentren C-2 und C-7, die mit den ^{13}C -angereicherten Methylgruppen (*) verknüpft sind, zu lokalisieren. Dieses Ergebnis bestätigt eine frühere NMR-Analyse^[40a] des Präcorrins 2, das durch sorgfältige Reinigung des entsprechenden Methylesters unter Sauerstoffausschluß isoliert worden war; es zeigt auch, daß während der Reinigung keine weitere Tautomerisierung stattfindet. Beide Experimente untermauern das Postulat, daß Präcorrin 1, 2 und 3 als Hexahydporphinoide vorliegen.

merisierung stattgefunden hatte. Fügt man aber $[^{13}\text{CH}_3]\text{SAM}$ der Inkubation zu, trat im Bereich von $\delta = 19-21$ des NMR-Spektrums das Signal für eine dritte Methylgruppe auf. Als man Uro'gen III mit geeigneten ^{13}C -Markierungen (\bullet in Abb. 8) versah, erschienen drei Paare von Dubletts im sp^3 -Bereich ($\delta = 50-55$) des Pyrrocorphinproduktes. Die notwendigen ^{13}C -Pulsmarkierungsexperimente^[41c] sowie Fast-Atom-Bombardment(FAB)-MS-Daten führten schließlich zum Strukturvorschlag (Abb. 8)^[41b, 42] für das neue Trimethylpyrrocorphin, das in Gegenwart hoher Enzymkonzentration durch „Übermethylierung“ des normalen Substrats Uro'gen III entstanden war. M-1 wird also dazu verwendet, um eine Methylgruppe in den C-Ring einzuführen und damit den lange gesuchten „natürlichen“ Chromophor zu synthetisieren. Dieser Chromophor entspricht dem des postulierten Präcorrins 4, wenngleich sich die Regiospezifität in diesem Fall von Ring D zu Ring C ändert. Die Unspezifität von M-1 konnte

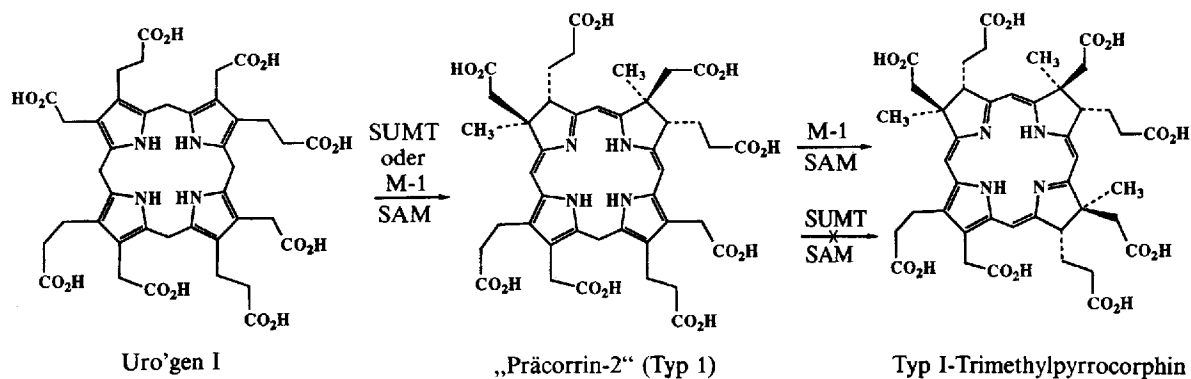


Abb. 9. Übermethylierung von Uro'gen I durch M-1 (nicht aber durch SUMT!).

des weiteren dazu genutzt werden, um ausgehend von Uro'gen-III-Isomeren eine Reihe von „unnatürlichen“ Isobakteriochlorinen und Pyrrocorphinen zu synthetisieren. So werden aus Uro'gen I die dem Präcorrin 2 und dem Typ-I-Pyrrocorphin entsprechenden methylierten Produkte hergestellt (Abb. 9).

Diese Verbindungen erinnern an eine Reihe von Tetramethyl-Typ-I-Corphinoiden (Faktoren S1-S4), die aus *P. shermanii* isoliert werden konnten^[43, 44] und, wie wir in Abschnitt 3.2 zeigen werden, in Form ihrer Zinkkomplexe vorliegen. Die totalsynthetisch dargestellten Isomere Uro'gen II und IV, in denen die Acetat(A)- und Propionat(P)-Seitenketten in der Reihenfolge AP, PA, AP, PA bzw. AP, AP, PA, PA angeordnet sind, sind ebenfalls Substrate für M-1. Interessanterweise werden dann in beiden Fällen die entsprechenden 2,7-Dimethylisobakteriochlorine gebildet^[42b]. Als man Uro'gen I mit SUMT inkubierte^[45], ließ sich aufgrund der Isolierung von Faktor II aus der Typ-I-(Sirohydrochlorin-I)-Familie auch für diese Methyltransferase ein Mangel an Spezifität erkennen, auch wenn dabei keine Pyrrocorphine beobachtet werden konnten. Dieser Befund könnte auf einen für das Enzym (SUMT) aus *P. denitrificans* wirksamen Kontrollmechanismus hindeuten, der dazu führt, daß Präcorrin 2 nicht „übermethyliert“ wird, wie man es von M-1 aus *E. coli* her kennt; dessen physiologische Funktion besteht darin, Sirohydrochlorin (Faktor II)^[39b]

für die Sulfid-Reduktase bereitzustellen, die ihrerseits für die Synthese von Cystein benötigt wird^[41]. Daß *E. coli* kein B₁₂ synthetisiert, läßt auf einen evolutionären Prozeß schließen, in dem die C-Methylierungsmaschinerie zwar erhalten geblieben ist, aber nur noch dazu gebraucht wird, um die Methylgruppen an C-2 und C-7 einzuführen.

Die Orte der C-Methylierung sowohl in der Typ-I- als auch in der Typ-III-Reihe erinnern an die von Eschenmoser et al. entdeckte^[46] biomimetische C-Methylierung der Hexahydroporphyrine; ihre Regiospezifität stimmt mit den Prinzipien überein, die für den stabilisierenden Effekt eines vinylogenen Ketimin-Systems aufgestellt wurden (Abb. 10)^[47]. So führt die chemische Dipyrrrocorphin → Pyrrocorphin-Umwandlung nicht nur zur Bildung des bevorzugten Ketimin-Systems des Pyrrocorphins, sondern kann in Gegenwart einer Methylgruppe an C-20 durch die Anwesenheit des koordinierenden Metalls kontrolliert werden. Die Faszination dieser in-vitro-Modelle besteht darin, daß die Methylierung des D-Ringes (C-17) durch die Gegenwart von Magnesium bewirkt werden kann, was der in der Natur gefundenen Methylierungssequenz entspricht. Derlei Experimente ließen uns darauf hoffen, daß wir die Methylasen des B₁₂-Weges, die sowohl natürliche als auch unnatürliche Pyrrocorphine und Corphine synthetisieren, dazu benutzen könnten, um einige der fehlenden Intermediate des Biosyntheseweges darzustellen. Es ist in diesem Zusammenhang auch interessant,

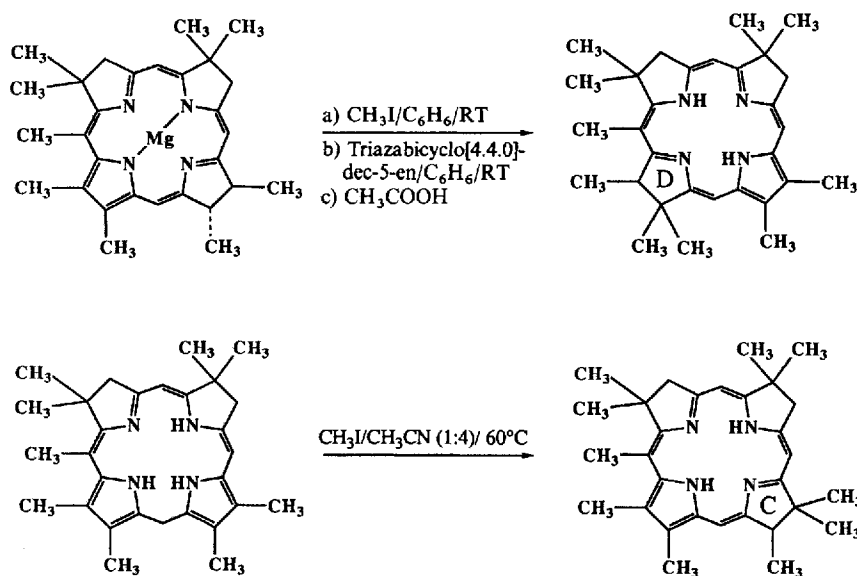


Abb. 10. „Metallvermittelte“ Kontrolle der Regiospezifität bei der biomimetischen C-Methylierung der Pyrrocorphine nach Eschenmoser et al. Man beachte, daß die Methylierung in Gegenwart von Mg²⁺ in Ring D, und nicht in Ring C stattfindet. RT = Raumtemperatur.

daß es an der Instabilität dieser Substanzen gegenüber Sauerstoff liegt, daß wir bislang unter aeroben Bedingungen (> 5 ppm O₂) keine anderen Zwischenprodukte isolieren konnten als eben die durch Oxidation der entsprechenden Präcorrine 1–3 gebildeten Faktoren I–III (Abb. 2).

3.2. Auf dem Weg zu den Corrinen: ein „Umsatteln“ von *E. coli* auf *Salmonella*

Bei unserer Suche nach den Enzymen der Biosynthese von Präcorrin 2 haben wir uns bislang auf die „Häm-Gen-Box“ (Abb. 11) in *E. coli* gestützt. Diese ist für die Synthese von

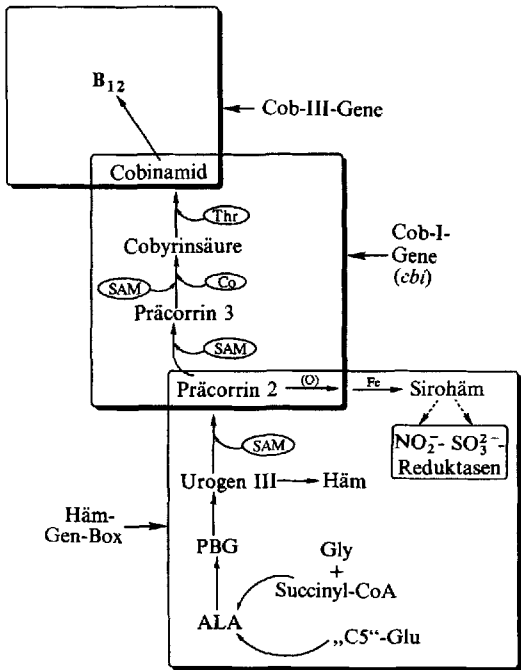
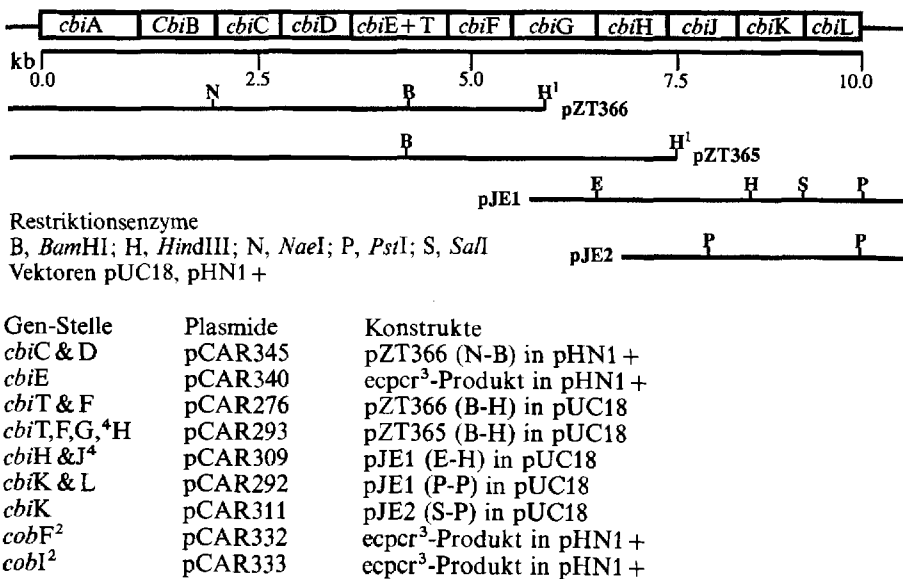


Abb. 11. Die Häm-Gen-Box in *E. coli* und die cob-Gen-Box in *Salmonella* für die Biosynthese von B₁₂.

Präcorrin 2, einer Vorstufe des Sirohydrochlorins (Faktor II)^[39b], verantwortlich. Sirohydrochlorin wird durch Einbau von Eisen zu Sirohäm umgewandelt, einem Cofaktor für die Sechs-Elektronen-Sulfit-Reduktase von *E. coli*^[4]. Zum Glück überschneiden sich die Synthesewege für Häm und Corrin in *E. coli* und *Salmonella typhimurium*. *E. coli* selbst produziert zwar kein B₁₂, dennoch hat uns die Entdeckung von J. Roth et al.^[48a], daß bei der anaeroben Fermentation von *S. typhimurium* Vitamin B₁₂ gebildet wird, in die Lage versetzt, unter Ausnutzung der vielfältigen, für diesen Organismus verfügbaren Gen- und Klonierungstechniken mehr über die Synthese von Vitamin B₁₂ zu erfahren. Durch Mutation und Komplementationstests konnten drei Genorte nach 13, 34 und 41 Minuten identifiziert werden^[48]. Der Hauptgencluster nach 41 Minuten enthält die Information für die Maschinerie (Cob I), die für die Synthese von Cobinamid aus Präcorrin 2 (Abb. 11) benötigt wird. Dieser Prozeß umfaßt die sechs C-Methylierungen (an C-1, C-5, C-12, C-15, C-17 und C-20), die Decarboxylierung (des Acetatrestes an C-12), Ringkontraktion, den Verlust der Essigsäure (von C-20 mitsamt der benachbarten Methylgruppe), Amidierung sowie Cobalteinbau unter Kontrolle der *chi*-Gene. Damit enthält die für die Synthese des Cobinamids verantwortliche Cob-I-Region alle *chi*-Gene, die für diese Biosynthesefunktionen codieren. Dank der Großzügigkeit von Professor Roth konnten wir seine Sequenzdaten (10 kb) für die Klonierung und Überexpression der Genprodukte einsetzen. Sie entsprechen zwölf offenen Leserastern (ORF), die für die Synthese von Cobyrynsäure aus Präcorrin 2 erforderlich sind (Abb. 12).

Zehn der im *cob*-Operon von *S. typhimurium* aufgefundenen *chi*-Gene wurden für die Expression aus den vier verschiedenen Plasmiden (Abb. 12) subkloniert. Wie durch SDS-PAGE (SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese) nachgewiesen werden konnte, wurden mit Ausnahme von *chiD* alle Gene in *E. coli* exprimiert; davon konnten sieben Genprodukte aus der löslichen Fraktion der Zell-Lysate des entsprechenden Stammes gereinigt werden. Zwei weitere Genpro-



¹ HindIII-Stelle im pBR329-Klonierungsvektor
² *P.-denitrificans*-Gen
³ Expressionskassette für Polymerase-Kettenreaktion
⁴ Bildet unlösliche Einschußkörper

Abb. 12. Subklonierung der *chi*-Gene aus *S. typhimurium* zur Expression. Wir danken Dr. J. Roth, University of Utah, für die großzügige Überlassung der *chi*-Gene im Plasmid pBR329 (pZT365, pZT366, pJE1 und pJE2). Die hochgestellten Zahlen 1–4 beziehen sich auf die Fußnoten am Ende der Abbildung.

dukte, die von *cbiG* und *cbiI*, wurden in der unlöslichen Fraktion gefunden. Anschließend wurde die aminoterminal Sequenz eines jeden gereinigten Proteins bestimmt und dazu benutzt, die aus der Nucleotidsequenz vorhergesagte Lokalisierung der offenen Leseraster zu bestätigen^[48c]. Die Genprodukte von *cbiE*, *cbiF*, *cbiH* und *cbiL* konnten als SAM-bindende Proteine identifiziert werden. Aufgrund ihrer Homologie zu anderen Methyltransferasen^[49a, b] gelten sie als aussichtsreichste Kandidaten für Methyltransferaseaktivität. Wie kürzlich berichtet wurde^[49c], hat das Genprodukt von *cobL* aus *P. denitrificans* zwei Funktionen, und zwar die der Methylierung (von C-5 und C-15) und die der Decarboxylierung des Ring-C-Acetats. SDS-PAGE und Analyse der aminoterminalen Sequenz haben gezeigt, daß in *S. typhimurium* zwei getrennte Genprodukte (die von *cbiE* und *cbiT*) vorliegen, die dem Genprodukt von *cobL* entsprechen, wobei *cbiE* zur Methyltransferase- und *cbiT* zur Decarboxylase-region homolog ist. In *Salmonella* sind also die 5,15-Methylase- und die Decarboxylierungsaktivität voneinander getrennt.

Aufgrund seiner Homologie mit dem Genprodukt von *cobI* in *P. denitrificans* (31 % Identität, 71 % Konservierung) wurde geschlossen, daß es sich beim Genprodukt des *cbiL* um die Präcorrin-2-Methyltransferase (M-2) in *S. typhimurium* handelt. Unter Verwendung des exprimierten Proteins, oder besser noch des *cobI*-Enzyms, konnte die Eintopf-Multienzymsynthese von Präcorrin 3 aus ALA verwirklicht werden (Abb. 13). Sie gelang sowohl im NMR-Röhrchen als

ein Puls mit [¹³CH₃]-markiertem SAM. Durch NMR-Untersuchung der unterschiedlichen Intensitäten der [¹³CH₃]-Methylresonanzen des so gebildeten Cobesters fand man (in drei unabhängigen Studien) heraus^[51a-c], daß der Methylgruppeneinbau in folgender Reihenfolge stattfindet: C-Methylierung an C-17, gefolgt von der an C-12 (von der wir mittlerweile wissen, daß sie zuerst an C-11 stattfindet, siehe unten) und schließlich an C-1, C-5 und C-15. Diese Differenzierung zwischen C-5 und C-15 wurde in *P. shermanii* nachgewiesen^[51a]; die umgekehrte Reihenfolge für die C-5- und C-15-Methylierungen wurde dagegen gefunden, als man Extrakte von *Clostridium tetanomorphum* einsetzte^[51b]. In einer dritten Untersuchung (*P. denitrificans*)^[51c] konnte nicht zwischen der C-5- und der C-15-Methylierung unterschieden werden. Sicherlich ist es eine erfreuliche Übereinstimmung, daß die erste Alkylierung des Präcorrin-3-Templats an C-17 und die weiteren Methylierungen dann an C-11 und C-1 erfolgen. Diese Übereinstimmung bedingt aber auch gewisse Einschränkungen bezüglich des Strukturtyps, den man für die fehlenden Zwischenstufen Präcorrin 4, 5 und 6 gemäß Methylinsertion an C-17, C-11 bzw. C-1 erwartet. Die stereochemische Analyse der Methylgruppe an C-17 in Vitamin B₁₂ verdeutlicht, daß von den insgesamt fünf an quartäre Kohlenstoffatome des Vitamins gebundene Methylgruppen nur die an C-17 β -orientiert ist. Diese Konfiguration wurde bereits 1976^[4] erklärt. Damals schlugen wir vor, daß die Methylierung tatsächlich zuerst an C-19 stattfindet. Anschließend Ringöffnung und Recyclisierung durch einen erlaubten 16 π -Elektronen-Prozeß ergeben zunächst die β -orientierte C-19-Methylgruppe. Schließlich führen zwei [1,5]-sigmatrope Verschiebungen zur β -orientierten Methylgruppe an C-17. Mit anderen Worten: Bevor die vierte Methylgruppe ihre endgültige Position an C-17 einnimmt, könnte ein Prozeß ablaufen, der dem für C-11 gefundenen ähnelt, wo es später zur Wanderung der Methylgruppe von C-11 zu C-12 kommt. In diesem Fall würde Präcorrin 4 entweder der Struktur mit β -ständiger Methylgruppe an C-18 oder C-19 entsprechen (Abb. 14).

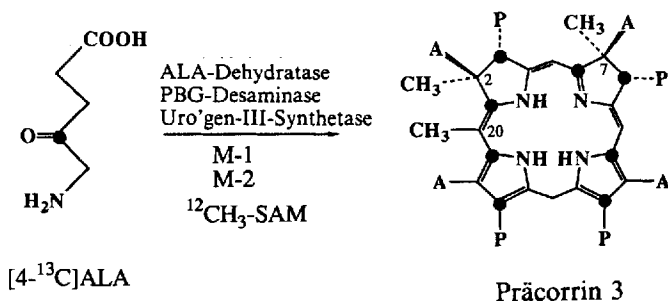


Abb. 13. Multienzymsynthese von Präcorrin 3.

auch präparativ (im Multimilligramm-Maßstab) durch Zugabe der fünf überexprimierten Enzyme zum Substrat ALA in Gegenwart von SAM^[50]. Die Struktur von Präcorrin 3, einem Dipyrrocorphin mit der in Abbildung 13 angegebenen Konstitution, zeigt gegenüber Präcorrin 2 feine Unterschiede im ¹³C-NMR-Spektrum, die den Einfluß der neu eingeführten Methylgruppe an C-20 auf das konjugierte System widerspiegeln. Im Ergebnis überwiegt dasjenige Tautomer, dessen Elektronenanordnung für den nächsten C-Methylierungsschritt vorbereitet ist und durch ¹³C-Anreicherung direkt NMR-spektroskopisch beobachtet werden kann.

Einen Anhaltspunkt für die mutmaßliche Reihenfolge des Einbaus der weiteren Methylgruppen an der Peripherie dieser letzten Zwischenstufe, dem Präcorrin 3, geben uns die früher durchgeführten Pulsmarkierungsexperimente. Dazu waren die Substrate Uro'gen III sowie die Präcorrine 2 und 3 (als Faktoren II bzw. III) in Gegenwart von SAM zunächst für einige Stunden mit einem zellfreien Extrakt, der Cobyrinsäure synthetisieren konnte, inkubiert worden; darauf folgte

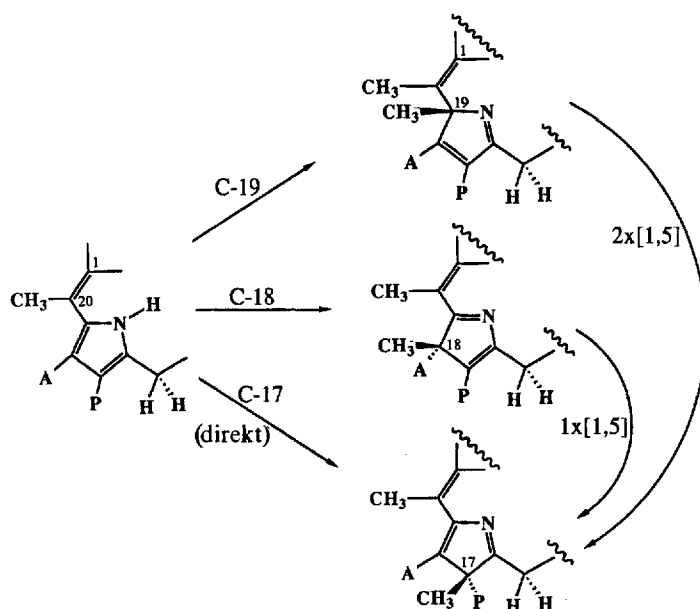


Abb. 14. Mögliche Orte für die C-Methylierung im Ring D des Präcorrins 3 und anschließende [1,5]-sigmatrope Verschiebungen, die den Einbau der Methylgruppe an C-17 der Corrine erklären.

Um die bisher unbekannt gebliebenen Präcorrin-Zwischenstufen aufzufinden, wurde Präcorrin 3 der Reihe nach mit jeder der mutmaßlichen (überexprimierten) Methyltransferasen aus *cbiE*, H, F und L in Gegenwart von SAM inkubiert. Das Ergebnis war verblüffend: C-Methylierung wurde nur durch das Genprodukt von ORF-7 (*cbiF*) katalysiert, und es stellte sich heraus, daß diese Methylierung an C-11 stattgefunden hatte! Bei der neuen Verbindung, die durch direkte NMR-spektroskopische Beobachtung (Abb. 15) als das kinetische Produkt identifiziert wurde, handelt es sich um ein modifiziertes Corphin mit der vierten Methylgruppe an C-11. Da die biochemische Umwandlung dieses Corphins in Cobyrynsäure bislang noch nicht durchgeführt worden ist, haben wir die neue Verbindung, deren Struktur an einen der vier möglichen Strukturvorschläge für Faktor S3 erinnert^[43, 44], als 4x^[52] bezeichnet. Die für diesen aus *P. shermanii* isolierten Metaboliten verfügbaren spektroskopischen Daten^[43, 44] ließen keine Unterscheidung zwischen einer Methylierung an C-1 oder C-11 zu. Mittlerweile wissen wir aber, daß das richtige Isomer dasjenige ist, das durch (α)-Methylierung an C-11 (\equiv C-16) des Uro'gen-I-Templats entstanden ist.

Der neue Strukturvorschlag für Faktor S3 wurde durch eine zweite Multienzymsynthese exakt bestätigt. Für dieses Experiment wurde [4-¹³C]ALA als Substrat mit einer Mischung aus Dehydratase, Desaminase (\rightarrow Uro'gen I),

cysG^[*], *cbiF* und SAM in einer Eintopfreaktion umgesetzt (Abb. 16a). In Abwesenheit des vierten Enzyms (*cbiF*) akkumuliert 2,7,12-Trimethylpyrrocorphin (Abb. 9); fügte man aber *cbiF* hinzu, so erschien ein neues Signal bei $\delta = 79$, das den Einbau einer vierten (α)-Methylgruppe an Position C-16 anzeigte (Abb. 16a). Der resultierende Zinkkomplex war in Form seines Octamethylesters in jeder Hinsicht identisch mit dem zuvor aus *P. shermanii* isolierten Faktor S3^[52b].

Jetzt muß noch die absolute Konfiguration des neuen Chiralitätszentrums an C-16 bestimmt und überprüft werden, ob Faktor S3 durch eine [1,5]-sigmatrope Verschiebung in Faktor S1 umgewandelt wird (Abb. 16b). Diese neuen Befunde^[52] deuten auf eine mangelnde Substratspezifität der Methyltransferasen bezüglich C-Methylierung hin. Zugleich bestätigen sie, daß *cbiF* als Methyltransferase fungiert, die die α -Stellung pyrrolischer Ringe von Typ-I- und Typ-III-Pyrrocorphinen angreift. Darüber hinaus erschließen diese Ergebnisse den Weg zu einer Syntheschemie, die auf der C-Methylierung elektronenreicher Zentren beruht.

Für die Methylierungssequenz und die Stereochemie der Corrin-Biosynthese hat die Entdeckung, daß Faktor S3 aus Uro'gen I, M-1 und *cbiF*^[52b] synthetisiert werden kann,

[*] Diese Kurzbezeichnungen werden sowohl für das Gen als auch für das Genprodukt verwendet.

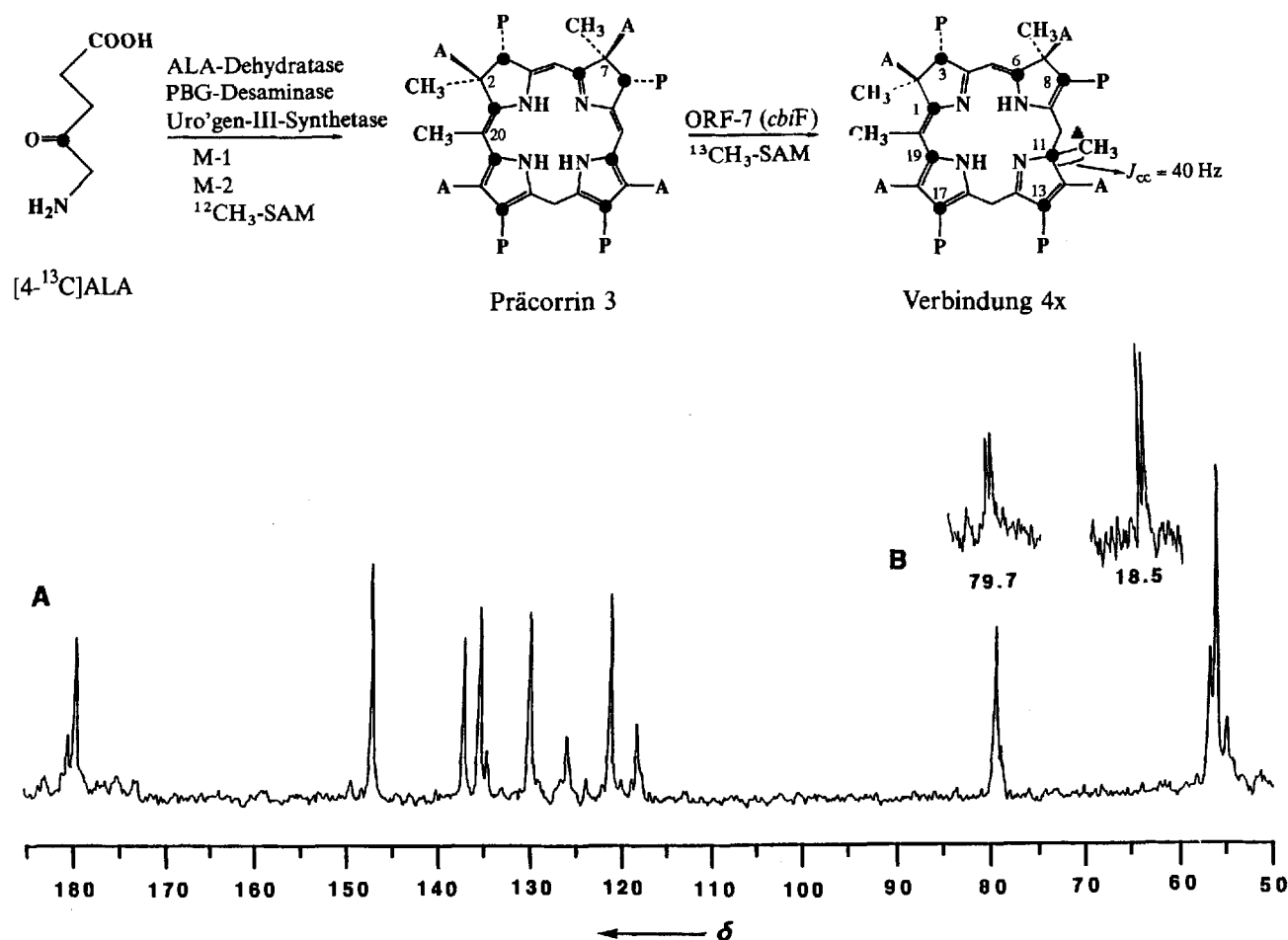


Abb. 15. Multienzymsynthese der Verbindung 4x mit dem Genprodukt von *cbiF* und SAM. Das ¹³C-NMR-Spektrum von 4x (A) zeigt drei sp²-Resonanzen bei $\delta = 134.8$, 136.5 und 120.7 (C-8, C-13 bzw. C-17), aber nur ein Signal bei $\delta = 55.5$ für einen sp²-Propionat-Terminus (C-3) sowie eines bei $\delta = 79.7$, das typisch ist für ein einem Stickstoffatom benachbartes sp³-Kohlenstoffatom (C-11). Der Einschub B zeigt die Kopplung ($J(\text{C},\text{C}) = 40 \text{ Hz}$) zwischen dem neuen Signal für ¹³CH₃ ($\delta = 18.5$) und dem Signal für C-11 bei $\delta = 79.7$.

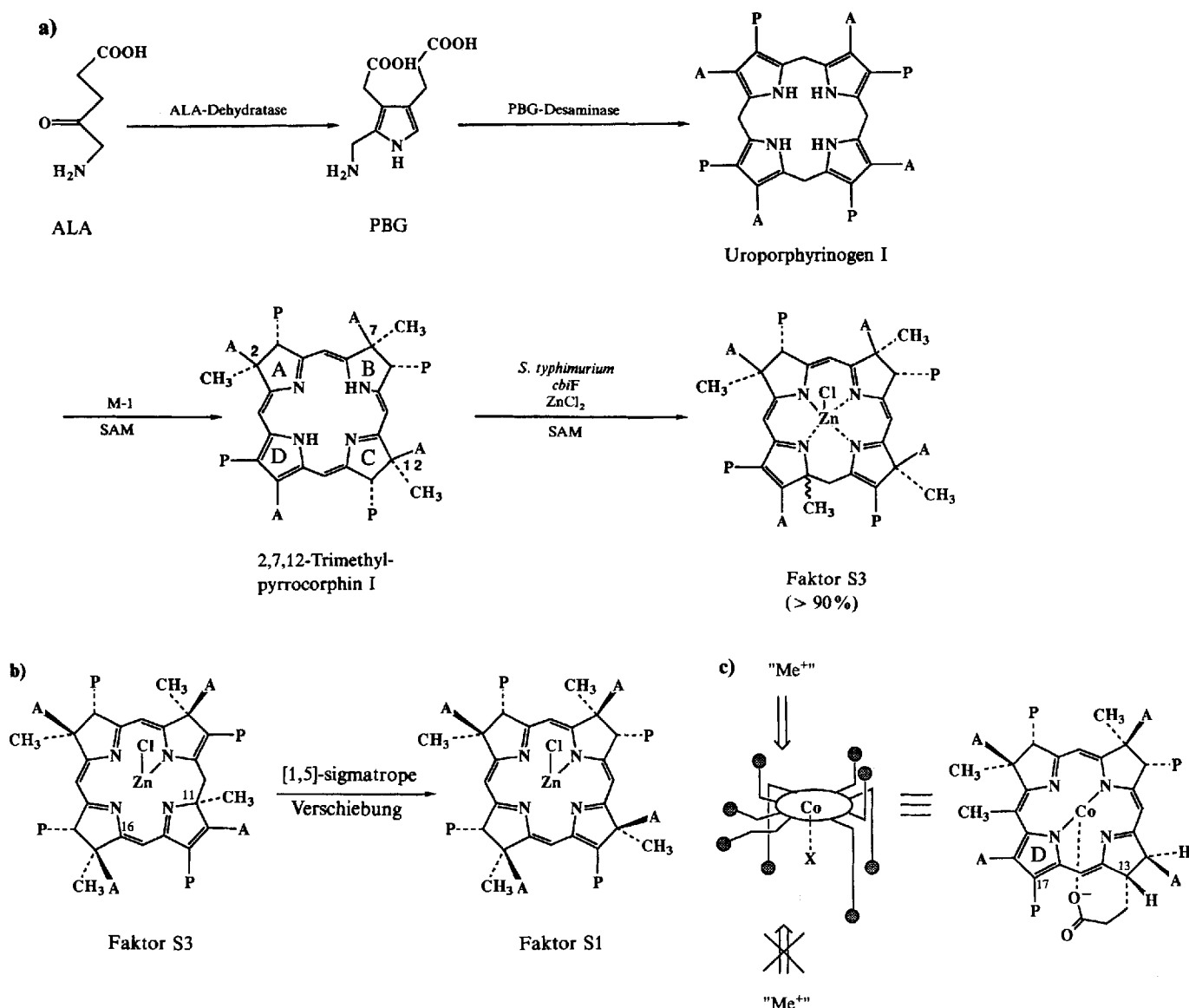


Abb. 16. a) Multienzymsynthese für Faktor S3. b) Ein Erklärungsversuch zur (chemischen?) Umwandlung von Faktor S3 in Faktor S1. Man beachte, daß die Symmetrie des Typ-I-Templats die Rotation der für den Faktor S3 angegebenen Struktur um 90° im Uhrzeigersinn zuläßt, um die scheinbare Reihenfolge der C-Methylierungsschritte zu verändern. c) Die mögliche Rolle der drei Propionat-Seitenketten des Ring-D-Pyrrocorphin-Tautomers von Cobalt-Präcorrin 3 bei der Lenkung der aus SAM eintretenden Methylgruppe auf die (obere) β -Seite des vierten („südwestlichen“) Propionat-Terminus.

weitreichende Konsequenzen, da hier der stereospezifische Methyltransfer an einem „unnatürlichen“ Substrat demonstriert werden konnte. Unter dem Eindruck dieser jüngsten Ergebnisse soll nun noch einmal auf die Regulation von Regio- und Stereochemie der auf Präcorrin 3 folgenden Methylasen durch Koordination mit divalenten Metallen eingegangen werden.

3.3. Die Rolle von Metallen in der Corrin-Biosynthese

Koordinierende Metall-Ionen, z.B. Zn^{2+} und Co^{3+} , sind sowohl in den Substraten für die Typ-I- als auch in denen für die Typ-III-Tetramethylierung enthalten. Es läßt sich nun vermuten, daß die regio- und stereospezifische C-Methylierung von metallhaltigem Präcorrin 3 nicht nur durch den induktiven Effekt der Methylgruppe an C-20, sondern auch durch das koordinierende Metall kontrolliert wird. Durch Tautomerisierung zum Ring-D-Pyrrocorphinat (Abb. 16c),

das die thermodynamisch bevorzugte all-*trans*-Konfiguration der Seitenketten (beginnend bei Ring A) aufweist, kann Cobalt-Präcorrin 3 für die Methylierung an C-17 dargestellt werden. Dieser Prozeß verlangt die α -Orientierung des Ring-C-Propionats an C-13. Seine Wechselwirkung mit der Koordinationssphäre des Metalls sowie den Propionat-Seitenketten an C-3 und C-8 führt zu einer sterischen Abschirmung der α -Seite des Makrocyclus, so daß die vierte Methylierung (an C-17) ausschließlich an der β -Seite erfolgen kann. Diese Argumentation gilt auch für die bereits oben diskutierte mögliche β -Methylierung an C-18 (oder sogar an C-19).

Das Fehlen von Cobalt in einer kürzlich isolierten Mutante von *P. denitrificans*^[49, 53, 54], die die acht zur Synthese des metallfreien Präcorrins 6x^[53, 54] (und damit von Hydrogenobyrinsäure) benötigten Gene enthält, läßt aber auch den Schluß zu, daß Cobalt durch Zink oder Magnesium ersetzt werden kann, um dieselbe Regio- und Stereospezifität bezüglich C-Methylierung und Ringkontraktion wie in der Cobalt-Reihe zu erzielen. Weil die Anwesenheit eines koordinie-

renden Metalls bei dieser Art von Prozeß ganz offenkundig eine strikte Regiokontrolle ausübt, müssen wir unsere bislang metallfreien Substrate nun noch einmal in Form ihrer Cobalt- und Zinkkomplexe untersuchen, um so den Einfluß des Metalls auf die Spezifität der C-Methylierung in der Corrin-Biosynthese zu bestimmen. Die besondere Rolle von Cobalt wird in Abschnitt 4 diskutiert.

3.4. Vergleich der Gene von *Salmonella* und *P. denitrificans* für die Corrin-Synthese

Wir können nun die Homologien und Funktionen der klonierten Gene von *Salmonella* und *Pseudomonas* miteinander vergleichen (Abb. 17). Dabei zeigt die Gegenüberstellung der Aminosäuresequenzen der Genprodukte, die wir aus der Nucleotidsequenz der Gene von *P. denitrificans* und *S. typhimurium* abgeleitet haben, eine Homologie zwischen den Genprodukten *cobH* und *cbiC*, *cobI* und *cbiL*, *cobJ* und *cbiH*, *cobK* und *cbiJ*, *cobL* und *cbiE* + T sowie *cobM* und *cbiF*. Keine Homologen fanden wir dagegen für die Genprodukte *cobF*, *cobG*, *cbiD* und *cbiG* (Abb. 17).

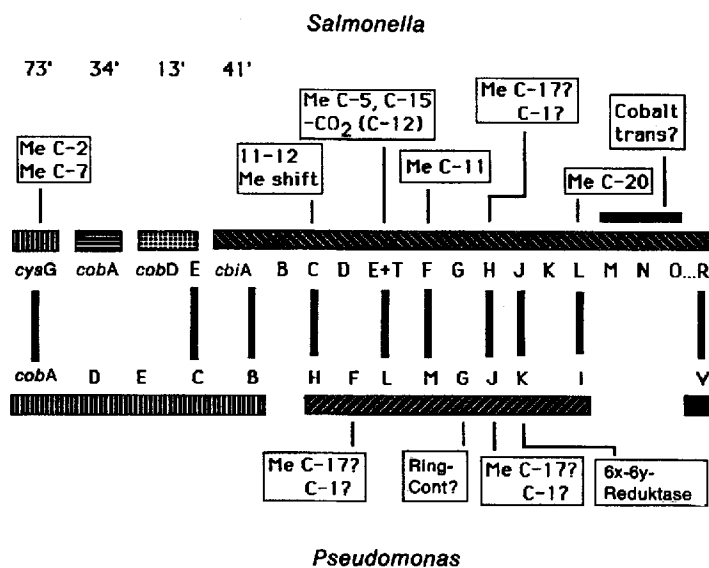


Abb. 17. Ort und Funktionen einiger bekannter Gene für die B₁₂-Biosynthese in *Salmonella typhimurium* [49, 50] und *Pseudomonas denitrificans* [50, 53–56]. In *S. typhimurium* sind die Gene bei 13' (*cobD*, *cobE*; Zugabe von Aminopropanol), 34' (*cobA*; Adenosylierung), 41' (*cbiA*-R; Cobinamid-Biosynthese) und 73' (*cysG*; Uro-gen-III-Methyltransferase) kartiert. Die Homologien zwischen den Genprodukten von *S. typhimurium* und *P. denitrificans* sind angegeben. Zur Erörterung ihrer Funktionen siehe Text.

Kürzlich wurden die Enzyme von *P. denitrificans* beschrieben, die die Reduktion von Präcorrin 6x zu Präcorrin 6y (*cobK*), die Bismethylierung und Decarboxylierung von Präcorrin 6y zu Präcorrin 8x (*cobL*) sowie die Umlagerung von Präcorrin 8x zu Hydrogenobyrynsäure (*cobH*) bewirken (Abb. 18) [49, 55, 56a]. Die restlichen Gene (*cobF*, G, J und M) codieren höchstwahrscheinlich für Enzyme, die für die Synthese von Präcorrin 6x aus Präcorrin 3 verantwortlich sind. Hierbei handelt es sich um eine Umwandlung, bei der mehrere empfindliche Zwischenstufen durchlaufen werden müssen, die durch SAM-abhängige C-Methylierungen an C-1, C-11 und C-17 sowie durch Ringkontraktion-Desacylierung

(von C-20 und seiner benachbarten Methylgruppe) entstehen. Von diesen Zwischenstufen ließ sich keine einzige aus den Lysaten des rekombinanten *P. denitrificans*-Stammes isolieren; vermutlich werden sie durch die bei der Isolierung von Präcorrin 6x verwendeten Verfahren (Oxidation/Veresterung) zerstört.

Wir sind noch immer auf der Suche nach den C-17- und C-1-Methylasen, nach der sogenannten Ring-Contractase/Desacylase sowie nach der Cobalt-Insertase. Wichtige Anhaltspunkte für den Mechanismus der Biosynthese der Corrine geben zum einen die kürzlich vorgeschlagene Struktur für Präcorrin 8x, das durch Methylierung an C-5 und C-15 sowie Decarboxylierung des C-Ringes gebildet wird, und zum anderen das Gen (*cobH*), das die Mutase für die anschließende Transposition von C-11 nach C-12 (Abb. 18) codiert [55, 56]. Man darf jedoch nicht vergessen, daß keine dieser Verbindungen Cobalt enthält und daß das Endprodukt des Acht-Gen-Systems, das in *P. denitrificans* überexprimiert wird, Hydrogenobyrynsäure (d.h. die cobaltfreie Cobyrynsäure) ist. Das Fehlen von Cobalt in den *P. denitrificans*-Metaboliten Präcorrin 6x und 8x legt die Vermutung nahe, daß das Gen für die Cobaltinsertion nicht in dem für die Überexpression verwendeten Acht-Gen-Cluster [56b], sondern an anderer Stelle lokalisiert ist und daß die Amidierung der Cobyrynsäure in diesem Organismus vor dem Cobalteinbau stattfindet. Dies erinnert daran, daß in photosynthetisierenden Bakterien cobaltfreie Corrinoiden (mit Nucleotidschleife) gefunden worden sind. So werden cobaltfreie Corrinoiden von *Rhodospseudomonas spheroides* und *Chromatium vinosum* [57] wie auch von einem *P. denitrificans*-Stamm produziert, der durch den Einbau eines Plasmids mit acht Genen der Corrinsynthese genetisch verändert worden ist [53]. Auf der anderen Seite ist Hydrogenobyrynsäure in *P. shermanii* keine Vorstufe für die Cobyrynsäure [58], und selbst im Falle des genetisch veränderten Stammes von *P. denitrificans* kann Cobalt nur auf chemischem Wege in die Hydrogenobyrynsäure eingebaut werden. Offenbar sind metallische Cofaktoren für die anaeroben B₁₂-Produzenten bedeutsam. Man kann daher annehmen, daß in aeroben Organismen Cobalt durch divalente Metalle wie Mg²⁺ und Zn²⁺ ersetzt und die metallfreien Corrinoiden oder Präcorrinoiden durch Extraktion (≡ Dekomplexierung) isoliert werden können. Die umgekehrte Situation treffen wir in *P. shermanii* (und wahrscheinlich auch in *S. typhimurium*) an. Ist Cobalt erst einmal in die Präcorrine 2 und 3 (siehe Abschnitt 4) eingebaut, so kann es auf einer späteren Stufe nicht mehr aus den stark koordinierenden Liganden (den ringkontrahierten Zwischenstufen) wie etwa Präcorrin 6x usw. austreten; es ist allgemein bekannt, daß Cobalt auf chemischem Wege nicht einfach [59] aus Cobyrynsäure, den Cobalaminen und B₁₂ entfernt werden kann, ohne den makrocyclischen Liganden zu zerstören oder ihn zumindest zu öffnen. Es ist ungewiß, ob sich die Abfolge des Biosynthesegeschehens, wie etwa C-Methylierung, Ringkontraktion, Oxidationsstufeneinstellung und Amidierung, durch die Anwesenheit (oder Abwesenheit) von Cobalt in den präcorrinoiden Zwischenstufen radikal verändert. Dies bleibt durch Austausch der beiden (metallhaltigen oder metallfreien) Substratklassen zwischen den Biosyntheseezymen der aeroben und anaeroben B₁₂-produzierenden Bakterien zu entscheiden.

Es mag Organikern (und auch Evolutionstheoretikern) unvorstellbar erscheinen, daß ein so komplexes Zielmolekül

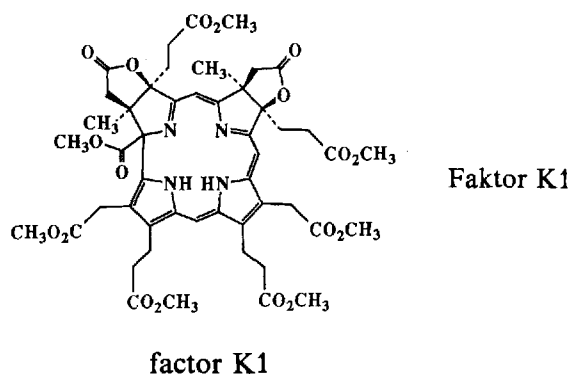
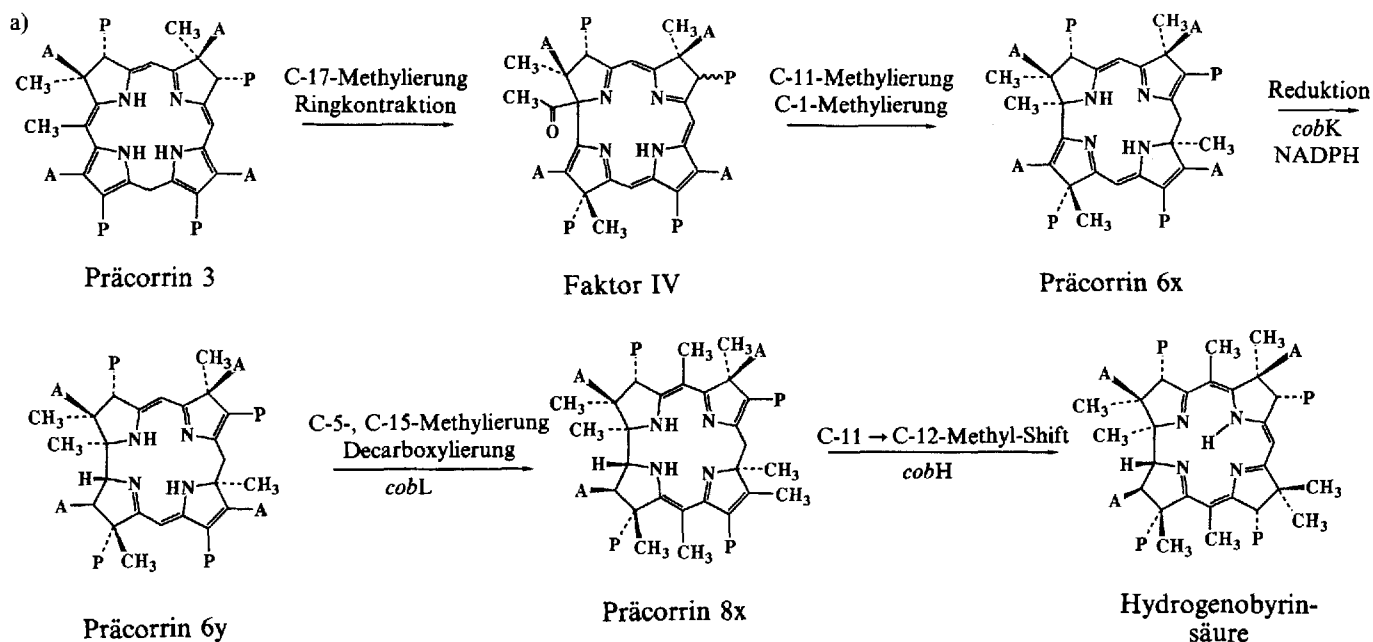


Abb. 18a. Die Präcorrine 6x, 6y und 8x – kürzlich entdeckte metallfreie Vorstufen der Hydrogenobyrinsäure im Expressionssystem von *P. denitrificans*. – Seit das ursprüngliche Manuskript dieses Artikels eingereicht wurde, sind zwei bedeutende Entdeckungen gemacht worden, die die Annahme einer „frühen“ Ringkontraktion stützen. Erstens hat der aus *P. shermanii* isolierte Faktor K1 (G. Müller, B. Kallenbach, A. I. Scott, H. J. Williams, unveröffentlicht) die allgemeine Struktur eines Ring-A,B-bismethylierten Dehydrocorrins. Obwohl dieses Dehydrocorrin bislang noch nicht als Vorläufer für Vitamin B₁₂ eingesetzt wurde, weist seine Struktur deutlich auf die Möglichkeit einer oxidativen Ringkontraktion von Präcorrin 2 oder 3 hin, da Faktor K1 keine Methylgruppe an C-17 aufweist. Der jüngst veröffentlichte Befund (D. Thibaut, L. Debussche, D. Fréchet, F. Herman, M. Vuilhorgne, F. Blanche, *J. Chem. Soc. Chem. Commun.* **1993**, 513), daß es sich bei Faktor IV in *P. denitrificans* um ein biologisches Intermediat handelt, liefert einen zweiten Beweis für die oxidative Ringkontraktion sowie die C-17-Methylierung von Präcorrin 3 (oder Faktor III), wenngleich über die Reihenfolge dieser Prozesse bis jetzt noch keine Erkenntnisse vorliegen.

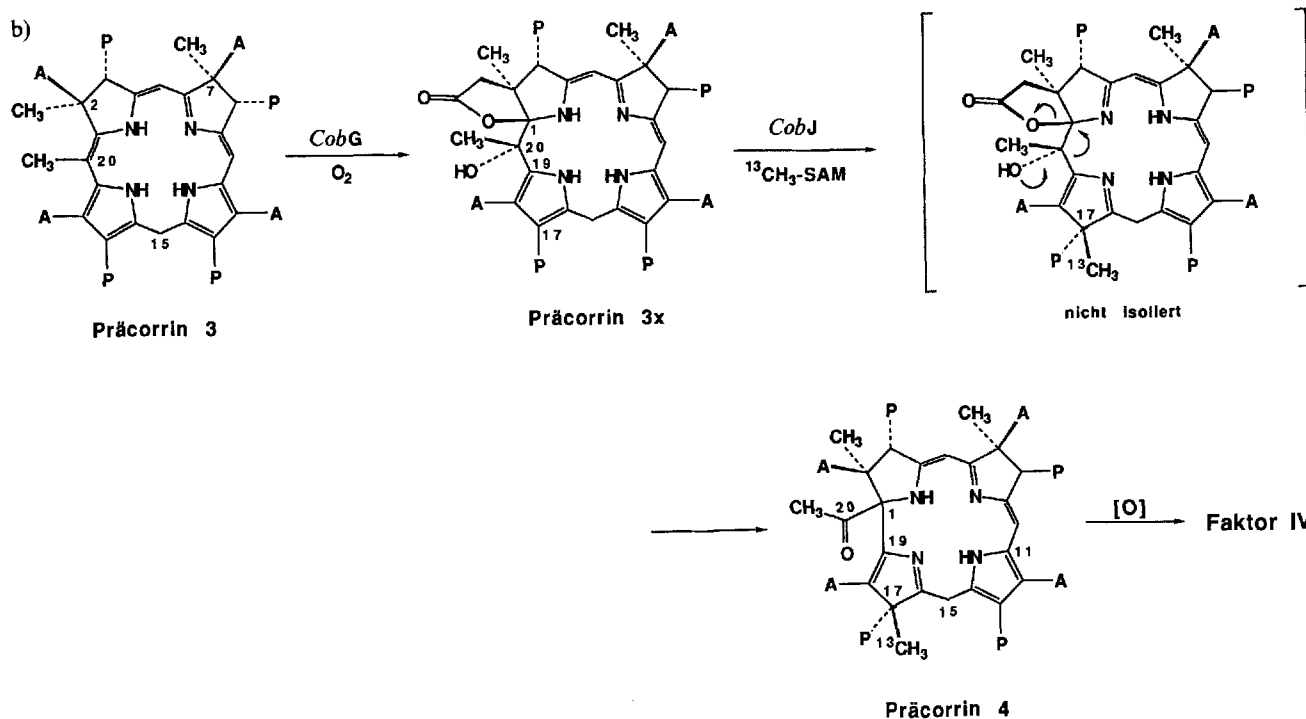


Abb. 18b. Anmerkung bei der Korrektur (15. Juli 1993): Ein experimenteller Nachweis, daß die Reaktionssequenz von Präcorrin 3 zu Faktor IV über das neue Intermediat Präcorrin 3x verläuft, gelang kürzlich mit den *cobG*- und *-J*-Genen aus *P. denitrificans*. Ein oxidativer Schritt gefolgt von einer Pinacol-artigen Ringkontraktion und Methylierung an C-17 (*cobJ*) führen zu einem Produkt, dessen Oxidationsprodukt mit Faktor IV identisch ist (A. I. Scott, C. A. Roessner, N. J. Stolowich, J. B. Spencer, C. Min, *FEBS Lett.* **1993**, im Druck).

wie B₁₂ (oder auch nur Cobyrynsäure) auf zwei unterschiedlichen, parallel verlaufenden Wegen erreicht werden kann; und dennoch deuten die Indizien darauf hin, daß die Enzyme des aeroben und des anaeroben Syntheseweges unterschiedliche, nämlich cobaltfreie und cobaltkoordinierte, Substrate produzieren und umsetzen.

4. Cobalteinbau: Experimente mit *P. shermanii*

„When you follow two separate chains of thought,
Watson, you will find some point of intersection
which should approximate the truth.“
„The Disappearance of Lady Frances Carfax“

In Zusammenarbeit mit G. Müller haben wir zeigen können^[60a], daß in Extrakten von *P. shermanii* Cobalt in die Präcorrine 2 und 3 eingebaut wird und daß die so entstandenen Metallkomplexe in diesen Organismen als Substrate für die Cobyrynsäure-Synthese dienen (Abb. 19).

Der Vergleich des Synthesepotentials zellfreier Extrakte aus *P. shermanii*, die (A) in Abwesenheit und (B) in Anwesenheit von Co²⁺ gewachsen waren, zeigte, daß die Isolierung des oxidierten Cobaltkomplexes von Präcorrin 2 (Cobalt-Faktor II) erst nach Inkubation des Extraktes (A) mit ALA, SAM und Co²⁺ gelang. Dagegen konnte der Cobaltkomplex von Faktor III aus Extrakt (B) direkt isoliert werden. Anschließend wurden die Extrakte (A) und (B) durch Gelfiltration partiell gereinigt, um kleine endogene Moleküle zu entfernen. Das gereinigte System A kann Cobyrynsäure erst nach Zugabe der Substrate SAM/Co²⁺/ALA oder SAM/Co²⁺/Faktor III synthetisieren. Das gereinigte System B kann dagegen Corrin in Anwesenheit von SAM, jedoch ohne Beteiligung von Co²⁺ oder irgendeines weiteren Substrates synthetisieren.

Daß es sich bei Cobalt-Präcorrin 3 um das wahre Substrat handelt, kann man daraus ersehen, daß der doppelt markier-

te (C³H₃/¹⁴C) Cobalt-Faktor III unter Retention von zwei Dritteln des ursprünglichen ³H/¹⁴C-Verhältnisses inkorporiert wurde. Dies entspricht dem Verlust der C³H₃-Gruppe und von C-20 als Essigsäure. Aus Konkurrenzexperimenten läßt sich ersehen, daß eine intakte Bioumwandlung der Cobalt-Faktoren II und III in Cobyrynsäure ohne Austausch des koordinierenden Metalls erfolgt. Allerdings läßt sich in Abwesenheit von Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA) ein gewisser Cobaltaustausch zwischen den Komplexen beobachten. In sorgfältig durchgeführten Experimenten gelang in Gegenwart von [C³H₃]SAM die zellfreie Umwandlung von ¹⁴C-markiertem Cobalt-Faktor II zu Cobalt-Faktor III mit einem ³H/¹⁴C-Verhältnis von 1.15 sowie die Umwandlung in Cobyrynsäure mit einem ³H/¹⁴C-Verhältnis von 5.65, wie man es beim Einbau von fünf Methylgruppen erwartet. Als es schließlich noch gelang, den Cobalt-Faktor III nach Inkubation des Faktors III mit einem Homogenat von *P. shermanii* zu isolieren^[60b], konnte gezeigt werden, daß die Cobaltinkorporation in diesem Organismus ein enzymatischer Prozeß ist. Damit steht zweifelsfrei fest, daß Cobalt in *P. shermanii* (und wahrscheinlich auch in *Salmonella*) viel früher eingebaut wird als in *P. denitrificans*.

5. Ringkontraktion: zeitliche Aufschlüsselung eines einzigartigen Isotopenaustausches an einer Carbonylgruppe auf dem Weg zu Vitamin B₁₂

„It is quite a three-pipe problem.“
„The Red Headed League“

Die Struktur von Präcorrin 6x verlangt, daß die Ringkontraktion in *P. denitrificans* zwischen Präcorrin 3 und Präcorrin 6x stattfindet, also vor den beiden letzten Methylierungen an C-5 und C-15 und vor der Decarboxylierung (C-12-Acetat). Bislang fehlt allerdings jeglicher Beweis dafür, daß den Präcorrinen 4a, 5a und 6a entsprechende Zwi-

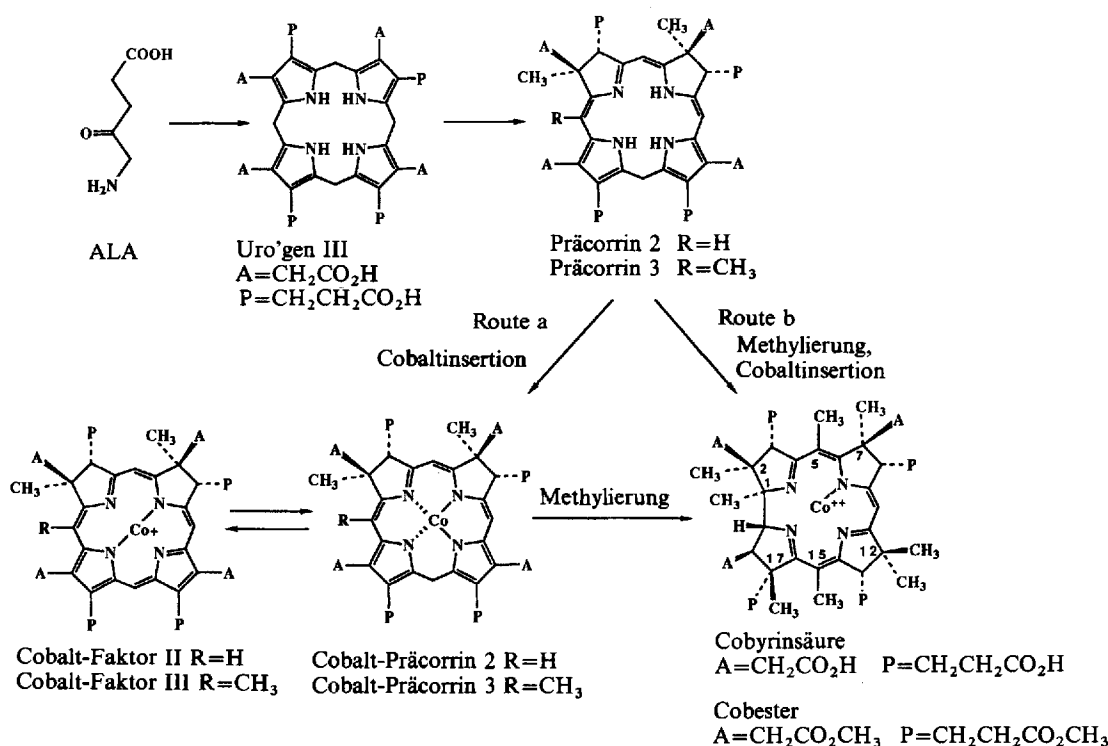


Abb. 19. Zeitliche Aufschlüsselung der Cobaltinsertion in die Präcorrine 2 und 3 (Route a) in *P. shermanii*.

schenstufen auch tatsächlich auftreten (zu Strukturvorschlägen für die Präcorrine 4a, 5a und 6a siehe Abb. 20). Durch NMR-Untersuchungen konnte allerdings schon gezeigt wer-

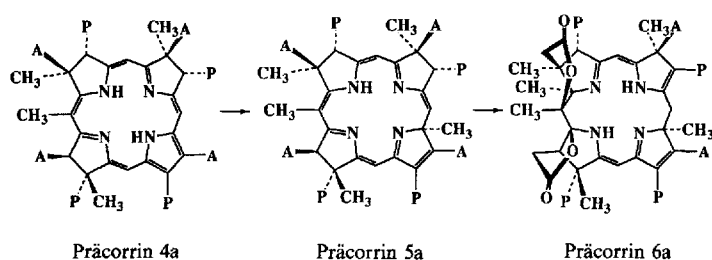


Abb. 20. Strukturvorschläge für die fehlenden Intermediate, die Präcorrine 4a, 5a und 6a. Da mehrere tautomere und sogar isomere Strukturen für die bislang unbekannten Tetra- und Pentamethyl-Zwischenstufen möglich sind, haben wir hier die Bezeichnungen 4a und 5a gewählt, um diese Ungewißheit zum Ausdruck zu bringen. Das gleiche gilt für die Hexamethyl-Reihe, in der nur 6a charakterisiert worden ist. Der Methylierung an C-1 im Ring A könnte somit die Alkylierung an C-20 und die 1,2-Wanderung als Teil der Ringkontraktion vorausgegangen sein. Obwohl C-11-Methyltransferase-Aktivität nachgewiesen werden konnte (Abb. 15), ist es bislang keiner der mit der B₁₂-Biosynthese beschäftigten Forschungsgruppen gelungen, das Genprodukt zu identifizieren, das für die Methylierung an C-17 (der mutmaßlichen Struktur von Präcorrin 4a entsprechend) verantwortlich ist; siehe aber Abbildung 18. Es bleibt daher die logische Möglichkeit, daß die Ringkontraktion der Methylierung an C-17 (und damit an C-11) vorangeht. Anders ausgedrückt: Die Ring-Contractase könnte Präcorrin 3 (oder sogar Faktor III!) als Substrat verwenden. Das würde zwar unseren bevorzugten Vorstellungen zum zeitlichen Ablauf der Eliminierung von Essigsäure aus C-20 mitsamt der Methylgruppe entgegenstehen. Es wäre aber eine weitere große Überraschung in der verwickelten Geschichte der Corrin-Synthese, die die Natur hier für uns bereithält. Für eine solche Hypothese muß der experimentelle Beweis allerdings durch Verwendung der Genbibliotheken von *S. typhimurium* und *P. denitrificans* noch erbracht werden. Siehe auch Legende zu Abbildung 18.

den, daß in *P. shermanii* nur die Carbonylgruppe an C-27 (die Ring-A-Carbonsäureamidgruppe in B₁₂) einzigartig am Mechanismus der Ringkontraktion, die sich an die C-Methylierung von C-17, C-11 und C-1 anschließt, beteiligt ist.

Durch ¹⁸O-Markierung fand man heraus^[61], daß es im Laufe der Biosynthese von B₁₂ zu einem fast vollständigen ¹⁸O/¹⁶O-Austausch des Carbonyl-Sauerstoffatoms einer der drei Acetamidogruppen kommt. Dieses Resultat hat weitreichende Konsequenzen für den Mechanismus, der für die Biosynthese der Corrine vorgeschlagen worden ist. Um die Ringkontraktion vom porphyrinoiden zum corrinoiden Templat zu erklären, die zum Einbau der Lösungsmittelmarkierung durch Hydrolyse führt, geht eine Hypothese davon aus^[62], daß es zwischen der Acetatgruppe des Rings A (C-27) und C-20 zur Bildung eines δ-Lactons kommt (Mechanismus A, Abb. 21). Eine zweite Hypothese schlägt vor^[63], daß nur die Acetatcarbonylgruppe (C-61) des D-Ringes an der Bildung eines δ-Lactons zu C-20 beteiligt ist. In dem sich anschließenden Hydrolyseschritt würde der Austausch der ¹⁸O-Markierung (≥ 50%) ausschließlich an C-61 beobachtet werden (Mechanismus B, Abb. 21). Damit wird die eindeutige Zuordnung der ¹³C-NMR-Signale für die beiden Acetatcarbonyl-C-Atome entscheidend, da die Analyse des ¹⁸O/¹⁶O-Austausches auf den Isotopenverschiebungen von ¹⁸O auf die ¹³C=O-Resonanzen beruht.

Leider unterscheiden sich in den NMR-Spektren der Cobalamine^[64–66] die chemischen Verschiebungen der fraglichen Carbonylgruppen (C-27 und C-61) gewöhnlich um weniger als Δδ = 0.3; in einigen Fällen überlagern sie sich sogar^[65, 66]. Das Problem konnte durch Erhöhung der Auf-

lösung im 2D(HMBC)-Experiment mit Hilfe spezifischer ¹³C-Anreicherung gelöst werden. Dazu wurde Cyanocobalamin auf biosynthetischem Wege an allen sieben Carbonyl-Kohlenstoffatomen durch Verfütterung von [1-¹³C]ALA an Zellen von *P. shermanii* angereichert. Im anschließend aufgenommenen hochaufgelösten (< 4 Hz/pt in F₁) HMBC-Spektrum kann man alle sieben Carbonyl-Kohlenstoffatome deutlich voneinander unterscheiden. Noch wichtiger ist, daß die Signale für C-27 und C-61, die im eindimensionalen Spektrum nur durch Δδ = 0.2 voneinander getrennt sind, nun durch Korrelation zu ihren benachbarten Protonen

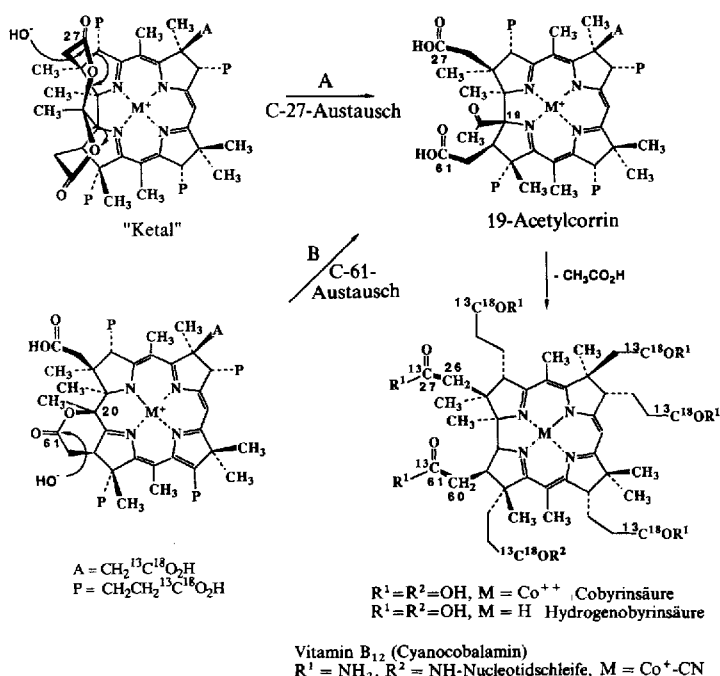


Abb. 21. Mögliche Mechanismen für den ¹⁸O/¹⁶O-Austausch während der Ringkontraktion. Die Vorschläge sind in ihrer ursprünglichen Form angegeben, obwohl inzwischen bekannt ist, daß die Ringkontraktion an einer cobaltfreien Struktur mit sechs oder weniger Methylgruppen stattfinden kann und daß sich in Aerobiern die Acetylgruppe an C-1 und nicht an C-19 befindet. (siehe Abb. 18).

26-H (δ = 2.35) und 60-H (δ = 2.70) eindeutig zugeordnet werden können (Abb. 22 A, B). Die chemischen Verschiebungen dieser Protonen konnten vorher bestimmt werden^[65]. Dies beweist, daß wir in einer früheren Arbeit tatsächlich die korrekte Zuordnung für C-27 (δ = 178.40) getroffen hatten, und es bedeutet, daß allein die Acetatgruppe von Ring A, und nicht etwa die von Ring D, wenigstens einmal (und möglicherweise mehr als einmal) an Reaktionen beteiligt ist, in deren Verlauf es zu einem fast vollständigen Austausch der ¹⁸O-markierten Carbonylgruppe an C-27 mit dem ¹⁶O aus dem Medium kommt^[67].

Als nächstes stellt sich die Frage, zu welchem Zeitpunkt der ¹⁸O-Verlust stattfindet: vor oder nach der Bildung von Uro'gen III, dem ersten tetrapyrrolischen Makrocyclus des B₁₂-Weges. Im Prinzip läßt sich diese Frage durch Beobachtung der ¹⁸O-induzierten Änderungen der chemischen Verschiebungen im ¹³C-NMR-Spektrum von Uro'gen III beantworten, das man aus [1-¹³C, 1-¹⁸O₂]5-Aminolävulin-säure (ALA) erhält. Obwohl man zwischen den beiden Sätzen von ¹³C-NMR-Signalen, die aus je vier Signalen für die

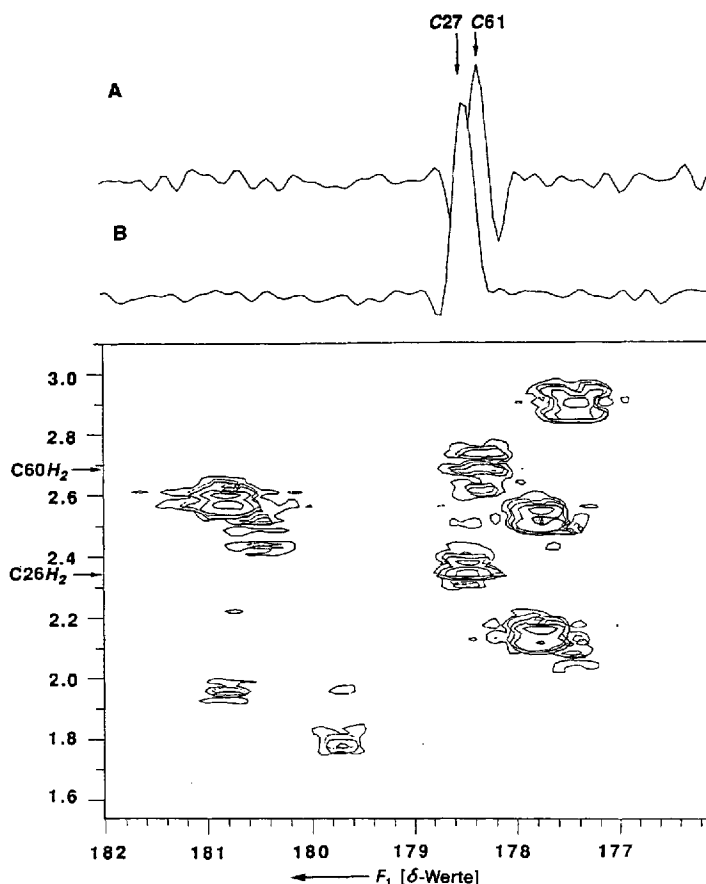


Abb. 22. 2D-HMBC-NMR-Spektrum (300 MHz, ^1H ; 75 MHz, ^{13}C) von Cyanocobalamin, das aus Zellen von *P. shermanii* isoliert wurde, die auf $[1\text{-}^{13}\text{C}]\text{ALA}$ gezogen worden waren. Die Spektren A und B zeigen Schnitte durch $\delta = 2.70$ bzw. $\delta = 2.35$. Sie bestätigen die Korrelation über zwei Bindungen zwischen C-61 ($\delta = 178.28$) und 60-H in A sowie C-27 ($\delta = 178.40$) und 26-H in B (zur Numerierung siehe Abb. 21).

Acetat- und Propionatcarbonylgruppen des Uro'gen III bestehen, unterscheiden kann, ist eine spezifische Zuordnung der einzelnen Acetat- und Propionatcarbonylgruppen aus Symmetriegründen nicht möglich. Aus diesem Dilemma führt eine Methode heraus, die die eindeutige Zuordnung der Ring-A- und Ring-D-Acetatcarbonylgruppen ermöglicht. Zudem liefert sie uns Informationen über einen möglichen ^{18}O -Austausch über Uro'gen III hinaus, also nach Einbau der ersten beiden Methylgruppen an C-2 und C-7 in die Biosynthesestufe Präcorrin 2. Wie in Abschnitt 3.1 erwähnt, wird Uro'gen III in Gegenwart von SAM durch M-1 effizient zu Trimethylpyrrocorphin C-methyliert. In Trimethylpyrrocorphin sind die Signale für alle vier Acetatcarbonylgruppen im ^{13}C -NMR-Spektrum sauber aufgelöst. Nachdem wir nun das Trimethylpyrrocorphin aus $[1\text{-}^{13}\text{C}, 1\text{-}^{18}\text{O}_2]\text{ALA}$ unter Zuhilfenahme des erforderlichen Enzymsatzes in H_2^{16}O hergestellt hatten, ergab die Analyse der ^{18}O -gestörten ^{13}C -NMR-chemischen Verschiebungen für die Acetat- und Propionatcarbonylgruppen im Produkt, daß kein Austausch des ^{18}O durch ^{16}O des Lösungsmittels stattgefunden hatte. Der Austausch des Ring-A-Acetatcarbonyl-O-Atoms in Cyanocobalamin gegen Wasser aus dem Medium erfolgt aus diesem Grund zum größten Teil in einer Zwischenstufe nach Präcorrin 2. Zum einen ist dieses Ergebnis^[67] von Bedeutung, weil sich auf diese Weise der genaue Zeitpunkt des Austausches bestimmen läßt. Zum ande-

ren dient es dazu, das weitere Schicksal des ^{18}O der Carbonylgruppen in Uro'gen III zu verfolgen. Eine von diesen Carbonylgruppen könnte vielleicht dazu veranlaßt werden, ^{16}O unter stark alkalischen Bedingungen abzufangen. Dies wäre ein Nachweis für die möglichen, bereits diskutierten Lacton-Zwischenstufen bei der Entstehung von Uro'gen III.

Betrachten wir noch einmal den Mechanismus der Corrin-Biosynthese, so steht nunmehr fest, daß das Ring-A-Acetat (C-27) mindestens einmal vor und/oder während der Ringkontraktion eine Gerüstfunktion übernimmt und dann durch Hydrolyse an C-27 freigesetzt wird. Das Ring-D-Acetat aber wird – entgegen einer früheren Hypothese^[63] – weder direkt hydrolysiert, noch nimmt es am Hydrolyseschritt teil, auch wenn es möglicherweise an der Ketalbildung des 19-Acetylsystems beteiligt ist (Abb. 21).

6. Evolution des Porphyrin-Corrin-Weges. Warum Typ III?

„In solving a problem of this sort,
the grand thing is to be able to reason backwards.“
„A Study in Scarlet“

Vergleicht man primitive Anaerobier mit den (anaeroben) photosynthetisierenden und aeroben Mikroorganismen, so scheint es sicher zu sein, daß für die Corrin-Biosynthese duale oder parallele Biosynthesewege existieren (Abb. 23). Die nachfolgenden biochemischen Abläufe könnten durch die „Präregistration“^[47] eines präbiotischen Corrintemplats sehr wohl in Richtung einer Typ-III- statt einer Typ-I-Welt gelenkt worden sein. Denn die Gene der Uro'gen-III-Synthese waren für die anschließende Ringkontraktion, die eine Nachbarstellung der beiden Acetat-Seitenketten in Ring A und D^[47] im Uro'gen III verlangt, erforderlich.

Zu dem Zeitpunkt, als Häm, Chlorophyll und die Cytochrome als Cofaktoren für Sauerstofftransport, Photosyn-

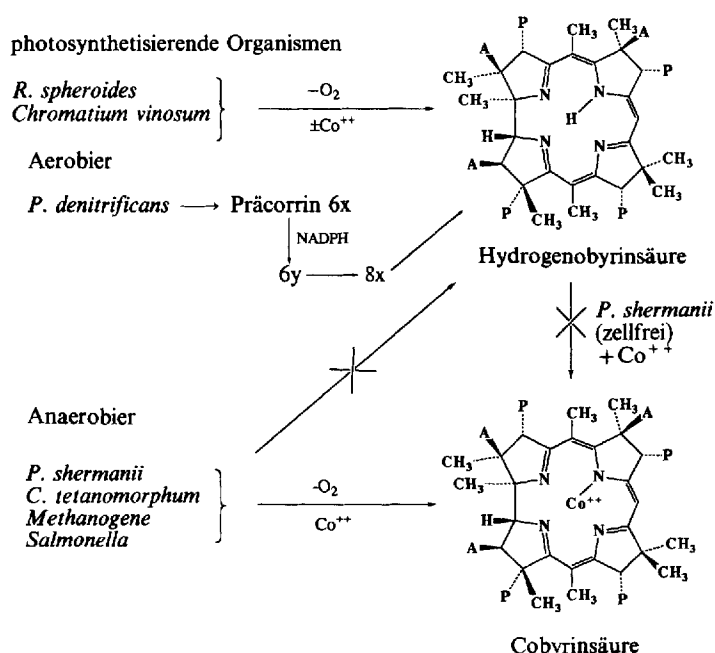


Abb. 23. Parallele (oxidative und metallfreie) Wege zu den Corrinen in Bakterien.

these bzw. O₂-Aktivierung notwendig wurden, fiel die Wahl der Natur auf Uro'gen III, da dieses Templat bereits als Bestandteil der Corrin-Synthese unter genetischer Kontrolle vorhanden war. All diese faszinierenden Fragen lassen sich nur schwer direkt beantworten. Aber selbst im Kontext der „modernen“ B₁₂-Biosynthese bietet die Dualität der Biosynthesewege (mit oder ohne Sauerstoff) eine Spur für die evolutionäre Präferenz, die man heute eher lateral als vertikal sehen muß.

7. Epilog

„It is a capital mistake to theorize before you have all the evidence.“

„A Study in Scarlet“

Dieser Aufsatz zur Biosynthese des Vitamins B₁₂ hat deutlich gezeigt, wie sich unsere früheren Vorstellungen und die seinerzeit verfügbaren Techniken zur experimentellen Klärung mechanistischer Probleme der B₁₂-Biosynthese einschließlich der Isolierung der nach Uro'gen III auftretenden Zwischenstufen im Laufe von 25 Jahren und im Licht unserer Erfahrung gewandelt haben. Die moderne Gentechnik und NMR-Spektroskopie haben es uns schließlich möglich gemacht, den zuvor undurchdringbaren Schleier des Geheimnisses zu lüften, der über dem von der Natur gewählten Weg zu Vitamin B₁₂ lag. Aber selbst mit den heute verfügbaren hervorragenden Methoden, die wir der Physik und der Biologie verdanken, bleiben einige Schritte der Biosynthese noch immer im Verborgenen. Wahrscheinlich bedarf es weiterer technischer Fortschritte, um die noch verbliebenen faszinierenden Probleme – die enzymatische Methylierung der Kohlenstoffatome C-1 und C-17, die „black box“ der Ringkontraktion-Desacetylierung und schließlich den Cobalteinbau – zu lösen. Der Anfang vom Ende scheint allerdings in Sicht. Viele Überraschungen sind uns auf diesem Weg begegnet. Unsere Achtung vor den eleganten, fein aufeinander abgestimmten Prozessen, die die rätselhafte Verbindung zwischen Porphyrinoiden und Corrinoiden ausmachen, ist dabei gestiegen. Das alte Sprichwort „Hoffnungsvoll reisen ist besser als ankommen“ gibt eine treffende Beschreibung unserer Reise zu den Corrinen: In mehrfacher Hinsicht werden wir hoch erfreut, und doch auch betrübt sein, wenn die letzten Rätsel der Vitamin-B₁₂-Enzymologie gelöst sind.

Unsere Expedition auf dem oftmals mühseligen Weg der Enträtselung der B₁₂-Biosynthese wurde von meinen früheren Doktoranden, Postdoktoranden und technischen Mitarbeitern begleitet und ermöglicht. Sie alle haben an dieser schwierigen, aber lohnenden Suche mit großer Sachkenntnis tatkräftig mitgewirkt. In chronologischer Reihenfolge, beginnend mit dem Jahr 1967, waren dies: Dr. D. White (heute Upjohn), Dr. C. A. Townsend (Johns Hopkins), Dr. K. Okada (Nagoya), Dr. M. Kajiwarra (Tokio), Dr. R. J. Cushley (Victoria, B.C.), Dr. E. Lee (Seoul), Dr. B. Yagen (Jerusalem), Dr. N. Georgopapadakou (Roche), Dr. K. S. Ho (Massachusetts), Dr. S. Klieze (Hoechst), Dr. G. H. Temme (Dow), Dr. I. M. Armitage (Yale), Dr. S.-L. Lee (Corning), Dr. T. Takahashi (Japan), P. Demou (Yale), Dr. D. Petrocine (New York), Dr. K. Kang (Korea), Dr. H. Klein (Köln), Dr. A. Gossauer (Fribourg), Dr. A. J. Irwin (Ontario), Dr. S. K. Chung (Korea), Dr. K. Obaia (†) (Japan), Dr. P. J. Whitman (New Jersey), Dr. G. Burton (Buenos Aires), Dr. H. Nordlov (Stockholm),

Dr. P. Fagerness (Upjohn), Dr. S. Hosozawa (Otsuka Co.), Dr. H. Matsumoto (Daiichi Co.), Dr. J. B. Hansen (Kopenhagen), Dr. K. Shishido (Japan), Dr. J. N. S. Evans (Pullman, Washington), Dr. N. E. Mackenzie (Tucson), Dr. R. L. Baxter (Edinburgh), Dr. A. Boyd (Edinburgh), Dr. R. C. Davies (Edinburgh), Dr. I. Ichinose (Japan), Dr. T. Oh-hama (Japan), Dr. S. K. Grant (Merck), Dr. P. Karuso (Australien), Dr. T. Hoshino (Japan), Dr. K. Clemens (Scripps Institute), Dr. A. R. Jacobson (Cambridge, Mass.), Dr. P. Yon-Hin (Houston) und Dr. D. Becker (Israel).

Besonderer Dank gilt meinen Kollegen, den Professoren G. Müller (Stuttgart), P. M. Jordan (London) und J. Roth (Utah). Zu Dank verpflichtet bin ich auch meiner jetzigen Gruppe von hochmotivierten jungen Mitarbeitern, deren jüngste Entdeckungen den Hauptteil dieses Artikels ausmachen: Drs. P. J. Santander, R. Danso-Danquah, M. D. Gonzalez, M. J. Warren, K. Iida, C. Pichon, T. Xue, P. Nayar und J. B. Spencer, ferner B. P. Atshaves, K. Campbell, S. Estrada, N. Anousis, C. Min, S. Ozaki und J. Park. Ständigen Rat erhielten sie bei ihren molekularbiologischen, enzymologischen und NMR-spektroskopischen Studien von den Drs. Charles Roessner, Neal Stolowich und Howard Williams. Herr Y. Gao war unermüdlich bei der Betreuung der NMR-Geräte. Unsere Arbeiten wurden von den National Institutes of Health (NIH), der National Science Foundation (NSF), der Robert A. Welch Foundation, dem Science and Engineering Research Council (SERC, Großbritannien) und der NATO großzügig gefördert.

Eingegangen am 21. September 1992,
ergänzte Fassung am 29. April 1993 [A 916]
Übersetzt von Dr. Uwe Beifuss, Göttingen

- [1] D. Shemin, D. Rittenberg, *J. Biol. Chem.* **1945**, 159, 567.
- [2] H. M. Muir, A. Neuberger, *Biochem. J.* **1950**, 47, 97.
- [3] P. M. Jordan, *New Compr. Biochem.* **1991**, 19, 1.
- [4] Übersicht: A. I. Scott, *Acc. Chem. Res.* **1978**, 11, 29. Faktor II erwies sich als identisch mit Sirohydrochlorin, dem metallfreien Cofaktor der Sulfid-Reduktase aus *E. coli*. Dieser benötigt Sirohäm, den Eisenkomplex von Faktor II, als Teil seiner biochemischen Maschinerie, um Cystein in einem reduktiven Sechselektronen-Prozeß zu synthetisieren. Es ist bemerkenswert, daß die Sulfid-Reduktase an dieser Stelle eine B₁₂-Zwischenstufe benutzt. A. I. Scott, A. J. Irwin, L. M. Siegel, J. N. Shoolery, *J. Am. Chem. Soc.* **1978**, 100, 316.
- [5] a) F. J. Leeper, *Nat. Prod. Rep.* **1985**, 2, 561; *ibid.* **1987**, 4, 441; *ibid.* **1989**, 6, 171; b) H. A. Barker, H. Weissbach, R. D. Smyth, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1958**, 44, 1093.
- [6] N. H. Georgopapadokou, A. I. Scott, *J. Theor. Biol.* **1977**, 69, 381.
- [7] G. Ksander, G. Bold, R. Lattmann, C. Lehmann, T. Früh, Y.-B. Yang, K. Inomata, H.-P. Buser, J. Schreiber, E. Zass, A. Eschenmoser, *Helv. Chim. Acta* **1987**, 70, 1115.
- [8] M. Eigen, B. F. Lindemann, M. Tietze, R. Winkler-Oswatitsch, A. Dress, A. von Haeseler, *Science* **1989**, 244, 673; S. F. Mason, *Chemical Evolution: Origins of the Elements, Molecules, and Living Systems*, Oxford University Press, Oxford, **1991**; *Earth's Earliest Biosphere* (Hrsg.: W. Schopf), Princeton University Press, Princeton, NJ, USA, **1983**.
- [9] R. T. Taylor in *B₁₂*, Vol. 2, (Hrsg.: D. Dolphin), Wiley, New York, **1982**, Kapitel 12.
- [10] L. J. Ljungdahl, H. G. Wood in *B₁₂*, Vol. 2, (Hrsg.: D. Dolphin), Wiley, New York, **1982**, Kapitel 7.
- [11] Nahezu der gesamte zweite Band von *B₁₂* [(Hrsg.: D. Dolphin), Wiley, New York, **1982**] ist den faszinierenden Umlagerungen gewidmet, die durch das Coenzym B₁₂ katalysiert werden. Es ist erstaunlich, daß Organismen wie *Salmonella typhimurium* für ihr Gedeihen B₁₂ zwar nicht zu benötigen scheinen, trotzdem aber die Gene für die B₁₂-Synthese, auch wenn es sich dabei um stille Gene handelt, bewahrt haben (R. M. Jeter, B. M. Olivera, J. R. Roth, *J. Bacteriol.* **1984**, 170, 2078). Es stellt sich damit die Frage, welche „anaerobe“ Funktion man B₁₂ in diesem und verwandten Organismen wie beispielsweise den methanogenen Bakterien zuschreiben kann.
- [12] I. Macalpine, R. Hunter, *George III and the Mad Business*, Random House, New York, **1969**.
- [13] *New York Times*, **21. Dezember 1991**.
- [14] Übersicht: S. I. Beale, *New Compr. Biochem.* **1991**, 19, 155.
- [15] T. Oh-hama, N. J. Stolowich, A. I. Scott, *Int. J. Biochem.* **1991**, 23, 1417.
- [16] C. A. Roessner, unveröffentlichte Ergebnisse.
- [17] Siehe Lit. [3], S. 19.

- [18] G. Burton, P. E. Fagerness, S. Hosazawa, P. M. Jordan, A. I. Scott, *J. Chem. Soc. Chem. Commun.* **1979**, 202.
- [19] A. R. Battersby, C. J. R. Fookes, K. E. Gustafson-Potter, G. W. J. Matcham, E. McDonald, *J. Chem. Soc. Chem. Commun.* **1979**, 1115.
- [20] P. M. Jordan, G. Burton, H. Nordlov, M. M. Schneider, L. M. Pryde, A. I. Scott, *J. Chem. Soc. Chem. Commun.* **1979**, 204.
- [21] Übersichten: F. J. Leeper, *Nat. Prod. Rep.* **1985**, 2, 19, 561; *ibid.* **1987**, 4, 441; *ibid.* **1989**, 6, 171.
- [22] A. I. Scott, *J. Heterocycl. Chem.* **1987**, 14, 75.
- [23] A. I. Scott, C. A. Roessner, N. J. Stolowich, P. Karuso, H. J. Williams, S. K. Grant, M. D. Gonzalez, T. Hoshino, *Biochemistry* **1988**, 27, 7984.
- [24] P. M. Anderson, R. J. Desnick, *J. Biol. Chem.* **1980**, 255, 1993.
- [25] A. Berry, P. M. Jordan, J. S. Seehra, *FEBS Lett.* **1981**, 129, 220.
- [26] A. R. Battersby, C. J. R. Fookes, G. Hart, G. W. J. Matcham, P. S. J. Pandey, *J. Chem. Soc. Perkin Trans. 1* **1983**, 3041.
- [27] P. M. Jordan, A. Berry, *Biochem. J.* **1981**, 195, 177.
- [28] A. I. Scott, C. A. Roessner, K. R. Clemens, N. J. Stolowich, P. J. Santander, M. D. Gonzalez, *FEBS Lett.* **1988**, 242, 319.
- [29] A. I. Scott, N. J. Stolowich, H. J. Williams, M. D. Gonzalez, C. A. Roessner, S. K. Grant, C. Pichon, *J. Am. Chem. Soc.* **1988**, 110, 5898.
- [30] a) P. M. Jordan, M. J. Warren, H. J. Williams, N. J. Stolowich, C. A. Roessner, S. K. Grant, A. I. Scott, *FEBS Lett.* **1988**, 235, 189. b) R. T. Aplin, J. E. Baldwin, C. Pichon, C. A. Roessner, A. I. Scott, C. J. Schofield, N. J. Stolowich, M. J. Warren, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **1991**, 1, 503.
- [31] a) M. J. Warren, P. M. Jordan, *FEBS Lett.* **1987**, 225, 87; b) M. J. Warren, P. M. Jordan, *Biochemistry* **1989**, 27, 9020.
- [32] a) G. J. Hart, A. D. Miller, F. J. Leeper, A. R. Battersby, *J. Chem. Soc. Chem. Commun.* **1987**, 1762; b) A. D. Miller, G. J. Hart, L. C. Packman, A. R. Battersby, *Biochem. J.* **1988**, 254, 915; c) C. J. Hart, A. D. Miller, A. R. Battersby, *ibid.* **1988**, 252, 909; d) U. Beifuss, G. J. Hart, A. D. Miller, A. R. Battersby, *Tetrahedron Lett.* **1988**, 29, 2591.
- [33] a) R. Radmer, L. Bogorad, *Biochemistry* **1972**, 11, 904; b) J. H. Mathewson, A. H. Corwin, *J. Am. Chem. Soc.* **1961**, 83, 135.
- [34] A. I. Scott, C. A. Roessner, P. Karuso, N. J. Stolowich, B. P. Atshaves, unveröffentlichte Ergebnisse; A. I. Scott, *Pure Appl. Chem.* **1990**, 62, 1269.
- [35] a) A. F. Alwan, B. I. A. Mgeje, P. M. Jordan, *Biochem. J.* **1989**, 264, 397; b) N. Crockett, P. R. Alefounder, A. R. Battersby, C. Abell, *Tetrahedron* **1991**, 47, 6003.
- [36] a) W. M. Stork, M. G. Baker, P. R. Raithby, F. J. Leeper, A. R. Battersby, *J. Chem. Soc. Chem. Commun.* **1985**, 1294; b) A. R. Battersby, J. R. Fookes, G. W. J. Matcham, E. McDonald, R. Hollenstein, *J. Chem. Soc. Perkin Trans. 1* **1983**, 3031.
- [37] G. Müller in *Vitamin B₁₂* (Hrsg.: B. Zagalak, W. Friedrich), de Gruyter, New York, **1979**, S. 279. Er beschreibt hier eine Methylase aus *P. shermanii*, die Uro'gen I als Substrat verwenden kann. Das Produkt wurde nicht charakterisiert.
- [38] B. Cameron, K. Briggs, S. Pridmore, G. Brefort, J. Crouzet, *J. Bacteriol.* **1989**, 171, 547; F. Blanche, D. Debussche, D. Thibaut, J. Crouzet, B. Cameron, *ibid.* **1989**, 171, 4222.
- [39] a) M. J. Warren, C. A. Roessner, P. J. Santander, A. I. Scott, *Biochem. J.* **1990**, 265, 725. b) Jüngste Untersuchungen an M-1, dem Genprodukt von *cysG*, haben erbracht, daß das Enzym tatsächlich bifunktionell ist. Es verhält sich in Gegenwart von NAD sowohl wie eine Methyltransferase als auch wie eine spezifische Dehydrogenase. Letztere ist für die Synthese des für die Sirohämproduktion benötigten Sirohydrochlorins (Faktor II) aus Präcorrin 2 verantwortlich. Nur in Abwesenheit von NAD zeigt M-1 katalytische Aktivität bei der Übermethylierung von Präcorrin 2. c) J. B. Spencer, C. A. Roessner, N. J. Stolowich, A. I. Scott, unveröffentlichte Ergebnisse.
- [40] a) A. R. Battersby, K. Frobel, F. Hammerschmidt, C. Jones, *J. Chem. Soc. Chem. Commun.* **1982**, 455; b) R. D. Brunt, F. J. Leeper, I. Grgurina, A. R. Battersby, *ibid.* **1989**, 428.
- [41] a) R. Schwesinger, R. Waditschatka, J. Rigby, R. Nordmann, W. B. Schweizer, E. Zass, A. Eschenmoser, *Helv. Chim. Acta* **1982**, 65, 600; R. Waditschatka, Dissertation, Nr. 7707, *Die Porphyrinogen \rightleftharpoons Pyrrocorphin-Tautomerisierung*, ETH Zürich, **1985**; b) M. J. Warren, N. J. Stolowich, P. J. Santander, C. A. Roessner, B. A. Sowa, A. I. Scott, *FEBS Lett.* **1990**, 261, 76. c) Es konnte durch ein gepulstes „Isotopen-Verdünnungsexperiment“ gezeigt werden, daß die Struktur des Trimethylpyrrocorphins (Abb. 8) einer C-Methylierung „im Uhrzeigersinn“ entspricht. Dabei wurde eine starke ¹³C-Anreicherung an C-2 und C-7, eine mittlere Anreicherung an C-12 und eine sehr geringe an C-18 im Substrat Uro'gen III dadurch erreicht, daß man unterschiedlich ¹³C-angereicherte E-S-Komplexe von Desaminase zu HMB (Abb. 4) und dann durch Cosynthetase zu Uro'gen III umwandelte. Das ¹³C-NMR-Spektrum des C-methylierten Produktes aus dem so erhaltenen Uro'gen III, das Trimethylpyrrocorphin (Abb. 8), wies starke sp³-Signale für C-2 und C-7, ein Signal mittlerer Intensität (sp²) für C-12 und fast kein C-18 entsprechendes Signal im sp²-Bereich auf. Dies zeigt, daß die dritte Methylierung an C-12 stattgefunden hat. Allerdings verrät das entsprechende Trimethylpyrrocorphin (Abb. 9) aufgrund der inhärenten Symmetrie des Typ-I-Templats nichts von seiner Methylierungssequenz, da die dritte Methylgruppe formal entweder an C-12 oder an C-17 hätte eingebaut werden können, wie sich bei einer 90°-Drehung der Struktur erkennen läßt. Für die weitere Argumentation gehen wir davon aus, daß die Methylierungen mit dem Typ-III-Sy-
- stem übereinstimmen (Abb. 8), das heißt, daß sie immer im Uhrzeigersinn ablaufen.
- [42] a) A. I. Scott, M. J. Warren, C. A. Roessner, N. J. Stolowich, P. J. Santander, *J. Chem. Soc. Chem. Commun.* **1990**, 593; b) M. J. Warren, M. D. Gonzalez, H. J. Williams, N. J. Stolowich, A. I. Scott, *J. Am. Chem. Soc.* **1990**, 112, 5343.
- [43] G. Müller, J. Schmiedl, E. Schneider, R. Sedlmeier, G. Wörner, A. I. Scott, H. J. Williams, P. J. Santander, N. J. Stolowich, P. E. Fagerness, N. E. Mackenzie, *J. Am. Chem. Soc.* **1986**, 108, 7875.
- [44] G. Müller, J. Schmiedl, L. Savidis, G. Wirth, A. I. Scott, P. J. Santander, H. J. Williams, N. J. Stolowich, H.-P. Kriemler, *J. Am. Chem. Soc.* **1987**, 109, 6902.
- [45] A. I. Scott, H. J. Williams, N. J. Stolowich, P. Karuso, M. D. Gonzalez, F. Blanche, D. Thibaut, G. Müller, G. Wörner, *J. Chem. Soc. Chem. Commun.* **1989**, 522.
- [46] C. Leumann, K. Hilpert, J. Schreiber, A. Eschenmoser, *J. Chem. Soc. Chem. Commun.* **1983**, 1404.
- [47] Übersicht: A. Eschenmoser, *Angew. Chem.* **1988**, 100, 5; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1988**, 27, 5.
- [48] a) R. M. Jeter, J. R. Roth, *J. Bacteriol.* **1987**, 169, 3189; b) J. R. Roth, C. Crabau, T. G. Doak in *Chemical Aspects of Enzyme Biotechnology; Fundamentals* (Hrsg.: T. O. Baldwin, F. M. Raushel, A. I. Scott), Plenum, New York, **1990**, S. 317; c) J. R. Roth, persönliche Mitteilung.
- [49] a) D. Thibaut, M. Corder, J. Crouzet, L. Debussche, B. Cameron, F. Blanche, *J. Bacteriol.* **1990**, 172, 6245, zit. Lit.; b) J. Crouzet, F. Blanche, B. Cameron, D. Thibaut, L. Debussche in *Chemical Aspects of Enzyme Biotechnology; Fundamentals* (Hrsg.: T. O. Baldwin, F. M. Raushel, A. I. Scott), Plenum, New York, **1990**, S. 299; c) F. Blanche, A. Famechon, D. Thibaut, L. Debussche, B. Cameron, J. Crouzet, *J. Bacteriol.* **1992**, 174, 1050.
- [50] M. J. Warren, C. A. Roessner, S.-I. Ozaki, N. J. Stolowich, P. J. Santander, A. I. Scott, *Biochemistry* **1992**, 31, 603.
- [51] a) A. I. Scott, *Acc. Chem. Res.* **1990**, 23, 308, zit. Lit.; b) H. C. Uzar, A. R. Battersby, T. A. Carpenter, F. J. Leeper, *J. Chem. Soc. Perkin Trans. 1* **1987**, 1689; c) F. Blanche, D. Thibaut, D. Frechet, M. Vuilhorgne, J. Crouzet, B. Cameron, G. Müller, K. Hlineny, U. Traub-Eberhard, M. Zboron, *Angew. Chem.* **1990**, 102, 947; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1990**, 29, 884.
- [52] a) C. A. Roessner, M. J. Warren, P. J. Santander, B. P. Atshaves, S.-I. Ozaki, N. J. Stolowich, K. Iida, A. I. Scott, *FEBS Lett.* **1992**, 301, 73; b) S.-I. Ozaki, C. A. Roessner, N. J. Stolowich, G. Müller, unveröffentlicht. – Wie wir kürzlich gefunden haben (J. B. Spencer, A. I. Scott, unveröffentlichte Ergebnisse), erfüllt das *cysG*-Genprodukt (M-1) zusätzlich zur C-Methylierung von Uro'gen III zu Präcorrin 2 mindestens drei weitere Funktionen. In Gegenwart von M-1 und NAD wird Präcorrin 2 zu Faktor II (Sirohydrochlorin, Abb. 2) dehydriert, der bei Zugabe von Fe²⁺ (wiederum in Gegenwart von M-1) katalytisch zu Sirohäm (Abb. 1) metalliert wird. Weiterhin wurde für Typ-I-Uro'gen als Substrat gefunden, daß *cysG* nicht nur drei C-Methylgruppen (an C-2, C-7 und C-17) einbaut (Abb. 9), sondern auch den Einbau von Zn²⁺ in das entstehende Trimethylpyrrocorphin katalysiert und dieses Metalls substrat erstaunlicherweise dazu benutzt, eine vierte Methylgruppe an C-17 einzubauen, was insgesamt zur Multienzymthese von Faktor S1 führt. Entgegen unserer früheren Ansicht gibt es für Faktor S1 eine eigene Biosynthese, und er wird nicht durch eine 1,2-Verschiebung der C-11-Methylgruppe aus Faktor S3 hergeleitet (Abb. 14). In einer Arbeit (mit J. B. Spencer, C. A. Roessner und N. J. Stolowich) konnte kürzlich auch gezeigt werden, daß *cysG* nicht nur als Eisen- und Zink-Chelatase dient, sondern auch Co²⁺ in Faktor II einbaut. Damit ist *cysG* die erste Methyltransferase und möglicherweise auch die Cobalt-Chelatase des anaeroben B₁₂-Biosyntheseweges. Dieser Vorschlag erfährt eine willkommene Bestätigung durch den Nachweis, daß 66 *cysG*-Mutanten von *Salmonella typhimurium* nicht in der Lage sind, entweder Sirohäm oder Vitamin B₁₂ zu synthetisieren (B. S. Goldman, J. R. Roth, *J. Bacteriol.* **1993**, 175, 1457–1466). *cysG* (*M_r* ≈ 50000) scheint die ursprüngliche Methyltransferase/Dehydrogenase der anaeroben B₁₂-produzierenden Bakterien zu sein; die späteren spezialisierten Methyltransferasen (wie SUMT, *M_r* ≈ 26000) haben diese Multifunktionalität verloren, zu der auch der Metalleinbau (Fe²⁺, Co²⁺, Zn²⁺, Ni²⁺) und die Fähigkeit zur „Übermethylierung“ des Di/Pyrrocorphinatemplats an den Positionen C-12 und C-17 gehören. Wie M. J. Warren (persönliche Mitteilung) durch Mutagenese- und Verkürzungsexperimente beweisen konnte, sind die Bindungsstellen für Metalle und NAD mit den N-terminalen Resten 1–200 assoziiert. Das *cysG*-Genprodukt sollte daher besser als Sirohäm-Synthase bezeichnet werden.
- [53] D. Thibaut, L. Debussche, F. Blanche, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1990**, 87, 8795.
- [54] D. Thibaut, F. Blanche, L. Debussche, F. J. Leeper, A. R. Battersby, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1990**, 87, 8800.
- [55] F. Blanche, D. Thibaut, A. Famechon, L. Debussche, B. Cameron, J. Crouzet, *J. Bacteriol.* **1992**, 174, 1036.
- [56] a) D. Thibaut, M. Couder, A. Famechon, L. Debussche, B. Cameron, J. Crouzet, F. Blanche, *J. Bacteriol.* **1992**, 174, 1043. b) Das Gen für den Cobalteinbau ist kürzlich in *P. denitrificans* gefunden worden. Es codiert für Cobalt-Chelatase, deren Substrat das a,c-Diamid der Hydrogenobyrinsäure ist. L. Debussche, M. Couder, D. Thibaut, B. Cameron, J. Crouzet, F. Blanche, *Abstr. 18th IUPAC Symp. Chem. Nat. Prod.*, Straßburg,

- 1992, 473; c) D. Thibault, F. Kiuchi, L. Debussche, F. Blanche, M. Kodera, F. J. Leeper, A. R. Battersby, *J. Chem. Soc. Chem. Commun.* **1992**, 982.
- [57] V. B. Koppenhagen in *B₁₂*, Vol. 2 (Hrsg.: D. Dolphin), Wiley, New York, **1982**, S. 105–149.
- [58] T. E. Podschun, G. Müller, *Angew. Chem.* **1985**, 97, 63; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1985**, 24, 46.
- [59] Zur Entfernung von Cobalt in einem Modellsystem siehe N. J. Lewis, A. Pfaltz, A. Eschenmoser, *Angew. Chem.* **1983**, 95, 743; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1983**, 22, 735.
- [60] a) G. Müller, F. Zipfel, K. Hlineny, E. Savvidis, R. Hertle, U. Traub-Eberhard, A. I. Scott, H. J. Williams, N. J. Stolowich, P. J. Santander, M. J. Warren, F. Blanche, D. Thibaut, *J. Am. Chem. Soc.* **1991**, 113, 9893; b) P. J. Santander, unveröffentlichte Ergebnisse.
- [61] K. Kurumaya, T. Okazaki, M. Kajiwaru, *Chem. Pharm. Bull.* **1989**, 37, 1151.
- [62] Der für die Ringkontraktion vorgeschlagene Mechanismus ist eine stereoelektronisch diktierte dyotrope 1,2-Umlagerung antiperiplanarer Gruppen innerhalb der Dilacton-Struktur (Lit. [47]). Die Präcorrine 4a, 5a und 6a sind hypothetische Strukturen. Sie ergeben sich aus der Reihenfolge der C-Methylierungen, die indirekt aus ¹³C-Pulsmarkierungsexperimenten abgeleitet ist und auf chemischen Modellen beruht (Lit. [47]). Die Verbindung zwischen dem hypothetischen 6a und Präcorrin 6x, der bekannten metallfreien Zwischenstufe aus *P. denitrificans*, entsteht durch Ringkontraktion und Verlust von Essigsäure. Hierbei wird die Oxidationsstufe in Präcorrin 6x um ein Doppelbindungsäquivalent erhöht (Abb. 18). Es bleibt zu überprüfen, ob derselbe Mechanismus für *P. shermanii* gilt, da a) Cobalt hier bereits vor der Ringkontraktion eingebaut ist und b) kein Bedarf für NADPH zu bestehen scheint (6x → 6y). Dies läßt wiederum auf
- duale Synthesewege für aerobe und anaerobe B₁₂-produzierende Organismen schließen, wobei die anaeroben keinen Wechsel in der Oxidationsstufe von ALA zu Cobyrynsäure erfordern.
- [63] H. C. Uzar, A. R. Battersby, *J. Chem. Soc. Chem. Commun.* **1985**, 585; F. J. Leeper, *Nat. Prod. Rep.* **1985**, 2, 561. Bei den beiden in Lit. [47, 63] vorgeschlagenen Mechanismen ging man davon aus, daß alle fünf C-Methylierungen und die Decarboxylierung in Ring C vor der Ringkontraktion stattfinden. Der tatsächliche Ablauf kann durch An- oder Abwesenheit von Cobalt in den Substraten verändert werden. So hat in aeroben, genetisch veränderten Zellen von *P. denitrificans* die isolierbare Zwischenstufe Präcorrin 6x bereits Ringkontraktion und Desacylierung durchlaufen. Sie benötigt aber noch die Methylgruppen an C-5 und C-15, um die Wanderung der Methylgruppe von C-11 zu C-12 mit Decarboxylierung sowie NADPH-vermittelte Reduktion zu Hydrogenobyrynsäure zu ermöglichen. In diesem System wird Hydrogenobyrynsäure enzymatisch nicht metalliert (Abb. 18). In *P. shermanii* jedoch dienen die Cobaltkomplexe der Präcorrine als Substrate für die nachfolgenden Methylierungen (und die Ringkontraktion) (Abb. 19). Um die mechanistischen Vorschläge für die Ringkontraktion deutlich zu machen, sind diese in ihrer ursprünglichen Form angegeben.
- [64] G. T. Bratt, H. P. C. Hogenkamp, *Biochemistry* **1984**, 23, 5653.
- [65] M. F. Summers, L. G. Marzilli, A. Bax, *J. Am. Chem. Soc.* **1986**, 108, 4285.
- [66] T. G. Pagano, P. G. Yohannes, B. P. Hay, J. R. Scott, R. G. Finke, L. G. Marzilli, *J. Am. Chem. Soc.* **1989**, 111, 1484; T. G. Pagano, L. G. Marzilli, *Biochemistry* **1989**, 28, 7213.
- [67] A. I. Scott, N. J. Stolowich, B. P. Atshaves, P. Karuso, M. J. Warren, H. J. Williams, M. Kajiwaru, K. Kurumaya, T. Okazaki, *J. Am. Chem. Soc.* **1991**, 113, 9891.



Willy P., Doktorand,
neue Routen zur Spitzenforschung
erkundend - zuverlässige Orientierung gibt
ihm sein ganz persönliches Exemplar der
ANGEWANDTEN

Bestellen auch Sie gleich Ihr
persönliches Abonnement der Angewandten!
Anruf beim VCH-Leserservice genügt:
0 62 01/ 606-199 (Fax -117).

