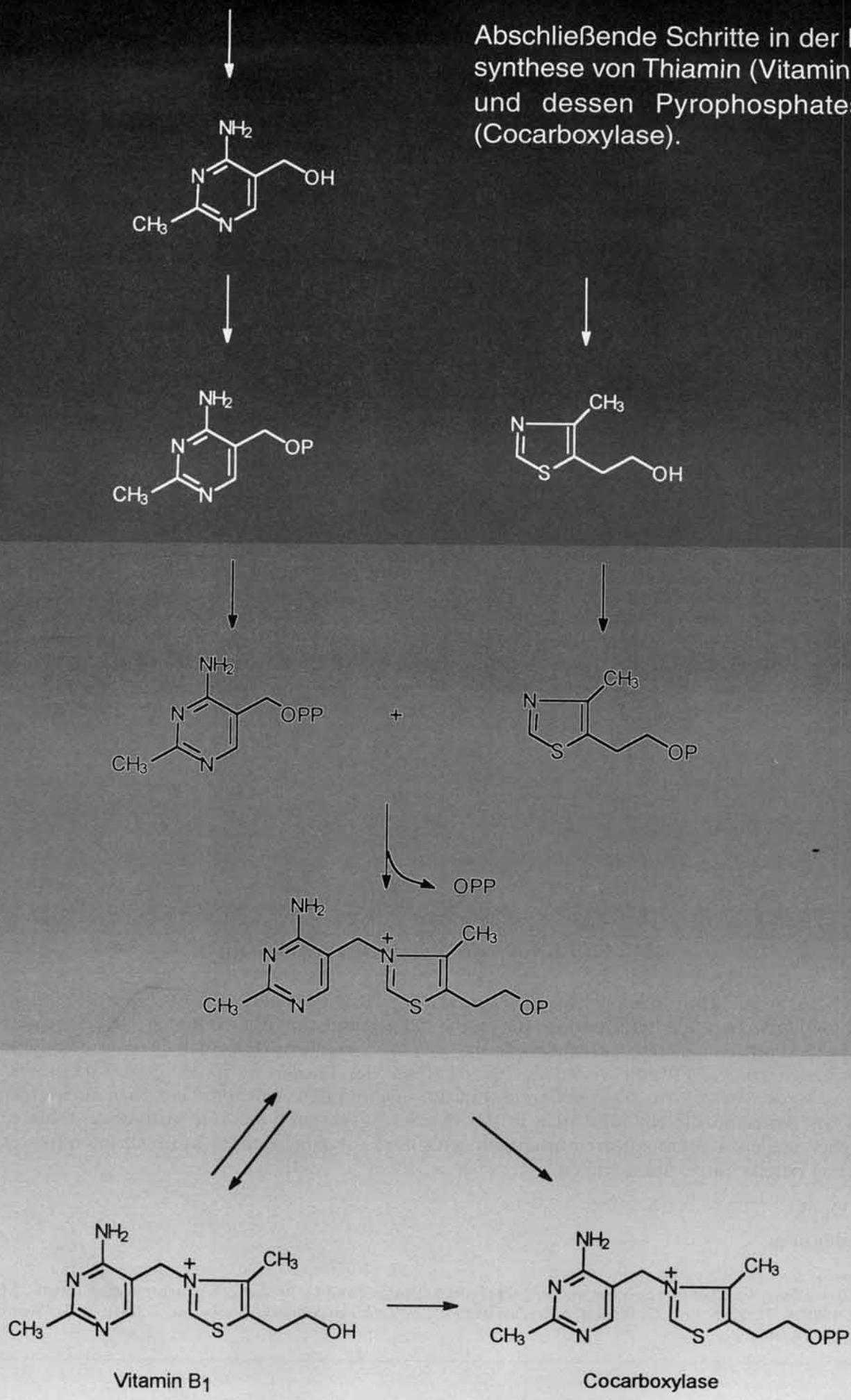


Abschließende Schritte in der Biosynthese von Thiamin (Vitamin B<sub>1</sub>) und dessen Pyrophosphatester (Cocarboxylase).



# Die Biosynthese von Vitamin B<sub>1</sub> (Thiamin): ein Beispiel für biochemische Vielfalt

Ian D. Spenser\* und Robert L. White

Die Aufklärung der Biosynthesewege zu Thiamin (Vitamin B<sub>1</sub>) und dessen Pyrophosphatester, dem wichtigen Coenzym Cocarboxylase, ist und bleibt für For- scher eine Herausforderung. Die Thiamin-Biosynthese gliedert sich in die voneinander unabhängigen Synthesewege zur Pyrimidin-Einheit 4-Amino-5-hydroxymethyl-2-methylpyrimidin und zur Thiazol-Einheit 5-(2-Hydroxyethyl)-4-methylthiazol sowie den Weg dieser Untereinheiten zum Vitamin. Die Schritte des letztgenannten Prozesses wurden vor ungefähr zwanzig Jahren vollständig aufgeklärt. Dabei stellte sich heraus, daß sich der Syntheseweg in aeroben Bakterien und Hefen zu einem gewissen Grad vom Syntheseweg in Enterobakterien unterscheidet. Dagegen sind die Synthesewege zu den Untereinheiten noch nicht zufriedenstellend erforscht. Die Pyrimidin- und die

Thiazol-Einheit entstehen in Bakterien und in Hefen auf unterschiedlichen Synthesewegen. Eine Schwierigkeit war, daß das Einbaumuster markierter Vorläufer, das von verschiedenen Arbeitsgruppen bei unterschiedlichen Mikroorganismen festgestellt wurde, nicht mit einem einzigen Biosyntheseweg für jede der beiden Untereinheiten in Einklang war. Man ist heute davon überzeugt, daß in Enterobakterien und Hefen unterschiedliche Wege vorliegen, so daß die Biosynthese von Vitamin B<sub>1</sub> ein Beispiel für biochemische Vielfalt ist. Darüber hinaus war die geringe Menge an Thiamin, die in mikrobiologischen Kulturen synthetisiert wird (ca. 15 µg pro Liter Kultur), eine weitere Schwierigkeit. Daher waren die Untersuchungen bis in die jüngste Zeit entweder auf die Verwendung radioaktiver Tracer oder den Einsatz stabiler Isotope mit anschließender

massenspektrometrischer Analyse beschränkt. Wie bekannt, führen beide Methoden zu Problemen bei der Interpretation der Resultate. Die Hochfeld-<sup>13</sup>C-NMR-Spektroskopie, die aussagekräftigste moderne Methode zur Ermittlung von Einbaumustern, wurde erst kürzlich erfolgreich zur Untersuchung der Thiamin-Biosynthese eingesetzt. Wegen dieser prinzipiellen und experimentellen Schwierigkeiten sind selbst die ersten Vorläufer der beiden relativ einfachen heterocyclischen Untereinheiten von Thiamin nicht eindeutig erkannt. Die Suche nach den Zwischenstufen, die Untersuchung der Enzyme und die Identifizierung der beteiligten Gene sind Gegenstand der aktuellen Forschung.

**Stichworte:** Biosynthesen · Enzyme · NMR-Spektroskopie · Vitamine

## 1. Einführung

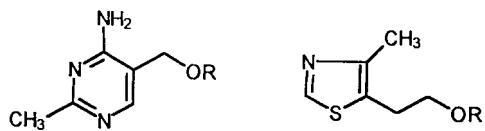
Vitamin B<sub>1</sub> **6**, der Nahrungsbestandteil, der die Beriberi-Symptome verhindert oder wieder beseitigt, wurde erstmals 1926 von B. C. P. Jansen und W. F. Donath aus Reishülsen isoliert.<sup>[1, 2a]</sup> R. R. Williams klärte 1936 dessen Struktur auf, und kurze Zeit später wurde über die Synthese berichtet.<sup>[1, 2b, 3]</sup> Die biochemische Funktion der Verbindung erkannte man im Jahre 1937,<sup>[4]</sup> als das entsprechende Pyrophosphat **8** als Cocarboxylase identifiziert wurde, die das Coenzym der Pyruvat-Decarb-

oxylase (EC 4.1.1.1), der Pyruvat-Dehydrogenase (EC 1.2.4.1), der Transketolase (EC 2.2.1.1) und anderer Enzyme ist.

Thiamin **6**<sup>[5]</sup> ist leicht zugänglich. Die jährliche Weltproduktion übersteigt 4000 Tonnen, und der Großhandelspreis liegt bei 30 bis 35 US-Dollar pro Kilogramm (Zahlen von 1993).<sup>[6]</sup> Die empfohlene tägliche Aufnahmemenge beträgt ca. 1.5 mg.<sup>[7]</sup> Um einem erneuten Auftreten der Mangelkrankheit vorzubeugen, setzt man die synthetisch hergestellte Verbindung in westlichen Industrieländern routinemäßig dem Brot zu. Es ist daher höchst erstaunlich, daß die Thiamin-Biosynthese, also die einzelnen Schritte, die Mechanismen, die Enzymologie und die Genetik dieser Schritte nur bruchstückhaft bekannt sind. Wir fassen hier den gegenwärtigen Wissensstand von der Thiamin- und der Cocarboxylase-Biosynthese zusammen.

Thiamin wird von den meisten Mikroorganismen und höheren Pflanzen synthetisiert. Auf einem konvergenten Weg entsteht Thiaminmonophosphat **7** (Schema 1) aus den phosphory-

[\*] Prof. Dr. I. D. Spenser  
Department of Chemistry, McMaster University  
Hamilton, Ontario L8S 4M1 (Canada)  
Telefax: Int + 905/522-2509  
E-mail: spenser@mcmaster.ca  
Prof. Dr. R. L. White  
Department of Chemistry, Dalhousie University  
Halifax, Nova Scotia B3H 4J3 (Canada)



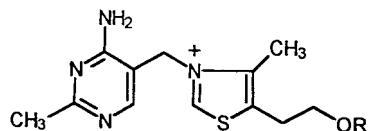
1 R = H

2 R = P

3 R = PP

4 R = H

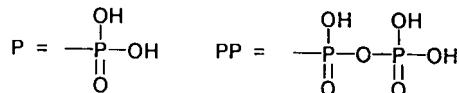
5 R = P



6 R = H

7 R = P

8 R = PP

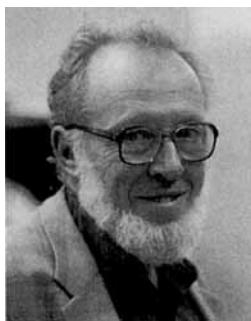
Schema 1. Vitamin B<sub>1</sub> (Thiamin) 6, seine Untereinheiten 1 und 4 und deren Phosphat- und Pyrophosphatester.

lierten, unabhängig voneinander synthetisierten Untereinheiten 4-Amino-5-hydroxymethyl-2-methylpyrimidin 1 (Pyrimidin-Einheit) und 5-(2-Hydroxyethyl)-4-methylthiazol 4 (Thiazol-Einheit). In Enterobakterien wird das aktive Coenzym, Thiaminpyrophosphat 8 (Cocarboxylase), durch Phosphorylierung aus 7 gebildet. In aeroben Bakterien und in Hefen wird 7 zu Thiamin 6 hydrolysiert und eine Pyrophosphatgruppe in einem Schritt angeknüpft, so daß 8 entsteht. Die meisten Enzyme, die am Kupplungs- und Phosphorylierungsprozeß beteiligt sind, wurden partiell gereinigt. Fast alle Gene, die für die Produktion dieser Enzyme verantwortlich sind, wurden sowohl in *Escherichia coli* als auch in Hefen lokalisiert. Wir beschreiben hier die neuen Erkenntnisse auf dem Gebiet der Enzymologie und der Genetik, die seit früher publizierten Übersichtsartikeln<sup>[8]</sup> gewonnen wurden, und dokumentieren den gegenwärtigen Wissensstand über die abschließenden Schritte der Thiamin-Biosynthese.

Produkt-Vorläufer-Beziehungen bei den heterocyclischen Untereinheiten von Thiamin wurden erst in den letzten 15 Jahren festgestellt. Abgesehen vom (5-Aminoimidazolyl)ribonucleotid (AIR) 9 (siehe Schema 2) wurde noch kein Intermediat nachgewiesen, und die Enzymologie auf dem Weg zu den beiden Untereinheiten ist vollkommen unbekannt. Erste Informationen zur Genetik dieser Synthesewege konnten dagegen erhalten werden.<sup>[9]</sup> Ob auf den Stoffwechselwegen zu den heterocyclischen Untereinheiten das freie Pyrimidin 1 und das freie Thiazol 4 oder deren Phosphatester 2 und 5 entstehen, ist noch nicht geklärt.

*Ian Spenser beendete 1948 sein Chemiestudium an der University of Birmingham (England) mit dem B. Sc. Seine Dissertation in Biochemie schloß er 1952 am King's College der University of London (England) bei William Robson ab und wurde dort im Jahre 1969 D. Sc. Von 1952 bis 1957 war er Dozent am Department of Biochemistry des Medical College am St. Bartholomew's Hospital der University of London (England). In den Jahren 1953 und 1954 arbeitete er als Postdoktorand bei Leo Marion am National Research Council of Canada Laboratorium in Ottawa. Hier führte er zusammen mit Eddie Leete, mit dem ihn eine lebenslange Freundschaft verband, die ersten Experimente mit radioaktiven Tracern durch, um Hypothesen zum biogenetischen Ursprung von Naturstoffen zu prüfen. 1957 wurde er Assistant Professor am Department of Chemistry der McMaster University in Hamilton (Kanada) und setzte dort seine Markierungsstudien bei der Alkaloid-Biosynthese fort. Gegen Ende der sechziger Jahre wandte er seine Aufmerksamkeit der Pyridoxin- und Thiamin-Biosynthese zu, mit der er sich noch heute als emeritierter Professor beschäftigt. Er war Gastprofessor an der Technical University of Denmark (bei A. Kjaer, 1977), an der University of Tokyo (bei U. Sankawa, 1983) sowie an den Universitäten von Karlsruhe (bei J. Rétey und H. Musso, 1981) und Bonn (bei E. Leistner, 1989). An der ETH Zürich war er 1971 und 1989 akademischer Gast (bei D. Arigoni). Zu seinen Ehrungen gehören ein NATO Senior Scientist Award (1982) und der John Labatt Ltd. Award des Chemical Institute of Canada (1983). Seit 1980 ist er Fellow der Royal Society of Canada.*

*Robert L. White wurde in Halifax (Nova Scotia) geboren, an dem Tag, an dem der Beitrag von Watson und Crick über die Struktur der DNA in der Zeitschrift *Nature* veröffentlicht wurde. Er schloß 1974 sein Chemiestudium mit dem B. Sc. an der Dalhousie University ab. Seine Dissertation über die Thiamin-Biosynthese beendete er 1979 bei Ian. D. Spenser an der McMaster University. Als Postdoktorand arbeitete er bei Sir Edward Abraham und Professor Jack Baldwin an der University of Oxford auf dem Gebiet der Penicillin-Biosynthese sowie bei der Firma Syntex Inc. an Enzyminhibitoren. Er ist Associate Professor für Chemie an der Dalhousie University. Sein Forschungsschwerpunkt ist die Biosynthese von Naturstoffen, insbesondere von nichtproteinogenen Aminosäuren und von Antibiotika. Im Jahre 1994 wurde er Fellow of the Chemical Institute of Canada.*



I. D. Spenser



R. L. White

Die Thiamin-Biosynthese ist ein bemerkenswertes Beispiel für biochemische Vielfalt: Diese beschränkt sich nicht nur auf die letzten Stufen der Coenzym-Biosynthese, sondern es liegen zwei völlig verschiedene Stoffwechselwege für die Pyrimidin- und Thiazol-Einheiten vor, einer in Enterobakterien und einer in Hefen. Aerobe Bakterien nutzen den „Hefe-Weg“ zur Thiazol-Biosynthese, Pflanzen dagegen den Weg der Enterobakterien.

Die Arbeiten zur Identifizierung der frühen Vorstufen werden hier kurz zusammengefaßt und die „biogenetische Anatomie“ der Pyrimidin- und Thiazol-Einheiten in Prokaryoten und Eukaryoten verglichen (für Einzelheiten der Methoden, mit denen die Orte des Einbaus markierter Substrate ermittelt wurden, um den Ursprung der Pyrimidin- und Thiazol-Einheiten festzustellen, siehe Originalliteratur). Hier werden nur die Beiträge berücksichtigt, die aufschlußreiche Ergebnisse lieferten. Frühere Übersichtsartikel vom Stand 1984/85 bieten detaillierte Zusammenfassungen der Biosynthese-Prozesse in Eukaryoten<sup>[10]</sup> und Prokaryoten.<sup>[10, 11]</sup> Hier werden insbesondere die Fortschritte der vergangenen zehn Jahre beschrieben, die Synthesewege gegenübergestellt und die ungelösten Probleme geschildert.

### 1.1. Methoden

Zum biosynthetischen Einbau markierter Substrate in Thiamin wurden bisher nur solche Untersuchungen veröffentlicht, bei denen radioaktive Tracer oder stabile Isotope (mit anschließender massenspektrometrischer Analyse) genutzt wurden. Die Hochfeld-<sup>13</sup>C-NMR-Spektroskopie, die aussagefähigste moderne Methode zur Ermittlung von Einbaumustern, wurde erst kürzlich erfolgreich zur Untersuchung der Thiamin-Biosynthese eingesetzt.<sup>[12, 13]</sup>

Die Methode der radioaktiven Tracer erfordert nicht nur die Isolierung von Thiamin und dessen Abtrennung von anderen ionischen, wasserlöslichen Verbindungen wie Aminosäuren (dieses Verfahren ist schwierig durchführbar, so daß das gewünschte Produkt meistens mit Spuren von anderen radioaktiven Verbindungen verunreinigt ist); deshalb erfordert die Methode die Herstellung und Reinigung von Derivaten im Mikromßstab. Da die Verbindungen, deren Radioaktivität gemessen wurde, nicht vollständig rein vorlagen, wurden manchmal falsche Schlüsse gezogen. Vermutlich wurde aus diesem Grund fälschlicherweise geschlossen, daß Methionin an der Biosynthese der Thiazol-Einheit von Thiamin beteiligt ist. Die meisten Berichte über Experimente mit radioaktiven Tracern enthalten keine Beschreibung der verwendeten Reinigungs- und Abbauverfahren.

Aus Gründen der internen Kontrolle ist es wichtig, die Verteilung der Gesamtradioaktivität im ganzen Thiaminmoleköl zu verfolgen und nicht nur in einer der beiden Untereinheiten: Nur so wurde erkannt, daß Glycin zwar bei Enterobakterien in die Pyrimidin-Einheit (aber nicht in die Thiazol-Einheit) eingebaut wird, bei Hefen allerdings in die Thiazol-Einheit (und nicht in die Pyrimidin-Einheit). Damit war bewiesen, daß Prokaryoten einen anderen Syntheseweg beschreiten als Eukaryoten.

Zur massenspektrometrischen Untersuchung der Verbindungen ist deren vorherige gaschromatographische Trennung notwendig. Keine der Arbeiten, bei der eine massenspektrometrischen Analyse durchgeführt wurde, enthält Primärdaten

darüber, wie effektiv Verunreinigungen gaschromatographisch abgetrennt werden konnten. So ist oft keine Aussage über die Reinheit der Substanzen möglich, deren Radioaktivität oder Fragmentierungsmuster als Grundlage für biosynthetische Schlußfolgerungen dienen.

In kürzlich durchgeführten Untersuchungen<sup>[12, 13]</sup> haben wir durch Hochfeld-NMR-Spektroskopie den Einbau von Substanzen nachgewiesen, die mit den stabilen Isotopen <sup>13</sup>C oder <sup>2</sup>H markiert waren. Insbesondere wenn Proben als Substrate verwendet wurden, bei denen benachbarte Kohlenstoffatome vollständig <sup>13</sup>C-markiert waren („bindungsmarkierte“ Proben), konnte ein entscheidender Fortschritt erzielt werden; so kann der Transfer intakter Einheiten aus mehreren Kohlenstoffatomen vom Vorläufer ins Biosyntheseprodukt verfolgt werden. Bindungsmarkierte Substrate, bei denen <sup>2</sup>H-markierte Atome an <sup>13</sup>C-markierte Atome gebunden sind, können auf ähnliche Weise verwendet werden. Mit <sup>14</sup>C-markierten Proben konnte lediglich die Übertragung einzelner Kohlenstoffatome, nicht jedoch die von Einheiten aus mehreren Kohlenstoffatomen, verfolgt werden.

Zwar werden <sup>13</sup>C-Atome durch NMR-Spektroskopie mit einer Empfindlichkeit detektiert, die ungefähr um drei Größenordnungen niedriger ist als die der <sup>14</sup>C-Flüssigkeitsszintillations-Zählung,<sup>[14]</sup> dennoch ist die Anwendung von <sup>13</sup>C-markierten und insbesondere von <sup>13</sup>C-bindungsmarkierten Substanzen gegenwärtig die Methode der Wahl bei Biosynthese-Untersuchungen, mit denen Vorläufer-Produkt-Beziehungen geklärt werden sollen. Ein entscheidender Vorteil der Methode ist, daß durch <sup>13</sup>C-NMR-Spektroskopie nicht nur die Position der Markierung, sondern auch die Identität der markierten Probe und ihre chemische Reinheit ermittelt werden können. So wird mit <sup>13</sup>C-markierten Substraten die chemische Umsetzung sehr kleiner Probenmengen auf ein Minimum beschränkt; diese ist bei biochemischen Untersuchungen mit radioaktiven Tracern<sup>[15]</sup> unumgänglich, einerseits um radioaktive Produkte zu derivatisieren, denn nur so kann die radiochemische Reinheit ermittelt werden, und andererseits um Reaktionssequenzen kontrollierten chemischen Abbaus durchzuführen und so den Ort der Markierung festzustellen.

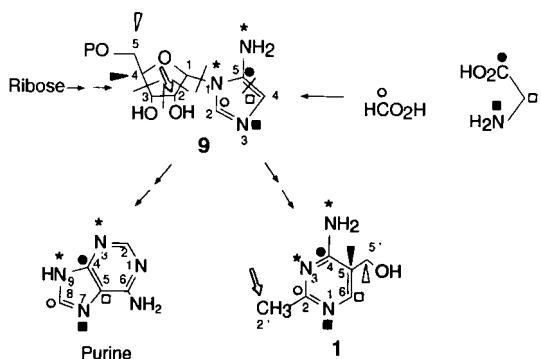
Studien mit <sup>13</sup>C-Tracern sind nur erfolgreich, wenn die Signale im <sup>13</sup>C-NMR-Spektrum des Produkts verlässlich zuzuordnen sind und der Grad der <sup>13</sup>C-Anreicherung im Produkt für eine Detektion durch Hochfeld-NMR-Spektroskopie ausreichend ist. Geringe Markierungsgrade an einzelnen Positionen des Produktes sind viel schwieriger festzustellen als eine Anreicherung bei bindungsmarkierten Proben. Im ersten Fall kann die Signalverstärkung nur durch Vergleich mit der Signalintensität einer Probe mit natürlicher Häufigkeit an <sup>13</sup>C festgestellt werden; im zweiten Fall wird die Markierung, die auf den Einbau benachbarter, <sup>13</sup>C-markierter Kohlenstoffatome zurückzuführen ist, durch das Auftreten neuer Satellitenpeaks deutlich, die im Spektrum der nichtmarkierten Probe fehlen. Treten diese Satellitenpeaks im <sup>13</sup>C-NMR-Spektrum eines Biosyntheseproduktes auf, läßt dies auf den Einbau <sup>13</sup>C-<sup>13</sup>C-, also bindungsmarkierter Substrate schließen und ist ein Beweis dafür, daß eine Einheit aus mehreren Kohlenstoffatomen vom Substrat auf das Produkt übertragen wurde.

Eine wichtige praktische Einschränkung dieser Methode ist, daß – abgesehen von den gängigsten Substraten – nur sehr

wenige  $^{13}\text{C}$ -markierte und insbesondere  $^{13}\text{C}$ -bindungsmarkierte Verbindungen kommerziell erhältlich sind; diese sind darüber hinaus relativ teuer. Für spezielle Untersuchungen müssen die markierten Substrate daher aus verfügbaren markierten Chemikalien synthetisiert werden.

## 2. Die Biosynthese der Pyrimidin-Einheit

Gemäß der Ergebnisse von Isotopenexperimenten, die bei Organismen wie Hefen (*Candida utilis* und *Saccharomyces cerevisiae*) und Enterobakterien (*E. coli* und *Salmonella typhimurium*) durchgeführt wurden, wird die Pyrimidin-Einheit von Thiamin auf unterschiedlichen Wegen synthetisiert. Formiat ist zwar stets beteiligt, nimmt aber verschiedene Positionen im Pyrimidinring ein (C4 bzw. C2). Glycin und Ribose sind die Vorläufer für die anderen Kohlenstoffatome in Prokaryoten, *E. coli* und *S. typhimurium* (Schema 2). In Eukaryoten wird Glycin nicht

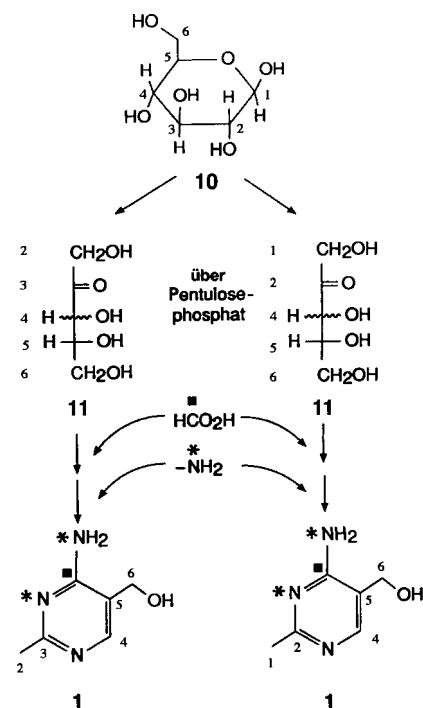


Schema 2. Die Biosynthese der Pyrimidin-Einheit 1 von Thiamin in fakultativ anaeroben Bakterien. Die Vorläufer-Produkt-Beziehungen verdeutlichen die Beteiligung von 9, einer Purin-Vorstufe (N\* stammt aus dem Amid-N-Atom von Glutamin; für Zwischenstufen auf dem Weg von 9 nach 1 siehe Schema 4; die mit Symbolen gekennzeichneten Atome wurden in mehreren Experimenten isotopenmarkiert).

zum Aufbau der Pyrimidin-Einheit genutzt; Glucose liefert, vermutlich über Pentulosephosphat, alle übrigen Kohlenstoffatome (Schema 3). Es gibt Hinweise auf die Identität einiger Intermediate zwischen den frühen Vorläufern und dem Endprodukt; allerdings konnten obligate Zwischenstufen bisher nicht identifiziert werden, und der Mechanismus, nach dem die Bausteine zur Endstruktur zusammengesetzt werden, ist nahezu unbekannt.

### 2.1. Formiat und Glycin als Vorläufer

Formiat war der erste Vorläufer der Pyrimidin-Einheit, der durch Isotopen-Tracer-Experimente identifiziert wurde.<sup>[16]</sup> Durch chemischen Abbau von Thiamin aus  $[^{14}\text{C}]$ Formiat wurde festgestellt, daß die Markierung bei *E. coli* B<sup>[17]</sup> und anderen Prokaryoten<sup>[18, 19]</sup> ausschließlich in der C2-Position der Pyrimidin-Einheit auftritt (Schema 2), in *S. cerevisiae*<sup>[20, 21]</sup> und anderen Eukaryoten<sup>[19]</sup> dagegen ausschließlich in der C4-Position der Pyrimidin-Einheit (siehe Schema 3). Nur ein Fall ist bekannt, in dem die Markierung sowohl die C2- (zu ca. 75%) als auch die C4-Position (zu ca. 25%) der Pyrimidin-Einheit einnimmt.<sup>[22]</sup>



Schema 3. Die Biosynthese der Pyrimidin-Einheit 1 in Eukaryoten (Hauptweg). Vorläufer-Produkt-Beziehungen. Die Zahlen an den Kohlenstoffatomen beziehen sich auf die Kohlenstoffatome von Glucose 10 (N\* stammt aus dem Amid-N-Atom von Glutamin).

Bei Enterobakterien liefert Glycin drei Atome des Pyrimidinrings. So stellte man bei einer Glycin-abhängigen Mutante von *S. typhimurium* LT2<sup>[23]</sup> einen starken Einbau von  $[1-^{14}\text{C}]$ - und  $[2-^{14}\text{C}]$ Glycin fest. Wie durch chemischen Abbau nachgewiesen wurde, traten die Carboxy(C1)- und die Methylen(C2)-Gruppe von Glycin in den Positionen C4<sup>[18]</sup> bzw. C6<sup>[24]</sup> der Pyrimidin-Einheit auf (siehe Schema 2). Analoge Ergebnisse erhielt man aus massenspektrometrischen Untersuchungen von Thiamin, das aus *E. coli* B isoliert wurde, nachdem die Bakterien jeweils mit  $[1-^{13}\text{C}]$ -,  $[2-^{13}\text{C}]$ - und  $[^{15}\text{N}]$ Glycin<sup>[25]</sup> inkubiert worden waren. Ob Glycin als intakte Einheit in die C6-, C4- und N1-Positionen des Pyrimidinrings eingebaut wird, muß noch geklärt werden.

Bei Eukaryoten, genauer bei *S. cerevisiae*, liegen die Markierungen aus  $[2-^{14}\text{C}]$ -<sup>[26]</sup> und  $[^{15}\text{N}]$ Glycin<sup>[27]</sup> in der Thiazol-Einheit (siehe Schema 6) und nicht in der Pyrimidin-Einheit von Thiamin vor. Anderen Studien zufolge wurden Markierungen aus  $[1-^{14}\text{C}]$ Glycin,<sup>[28]</sup>  $[^{15}\text{N}]$ Glycin<sup>[29]</sup> oder  $[^{15}\text{N}, 2-^{13}\text{C}]$ Glycin<sup>[12]</sup> nicht in die Pyrimidin-Einheit eingebaut.

### 2.2. (5-Aminoimidazolyl)ribonucleotid, eine späte Vorstufe in Enterobakterien

Formiat und Glycin sind seit vielen Jahren als Vorstufen des Purinrings bekannt.<sup>[30]</sup> Das (5-Aminoimidazolyl)ribonucleotid (AIR) 9 tritt dabei als Intermediat auf (Schema 2). C2 des Ring-Systems von 9 stammt aus Formiat, die C<sub>2'</sub>N-Einheit, N3, C4, C5, aus der intakten N-C-C-Kette von Glycin. Die übrigen Stickstoffatome, N1 und NH<sub>2</sub>, stammen aus dem Amidstickstoffatom von Glutamin (Schema 2). Bei *E. coli* haben die drei Stick-

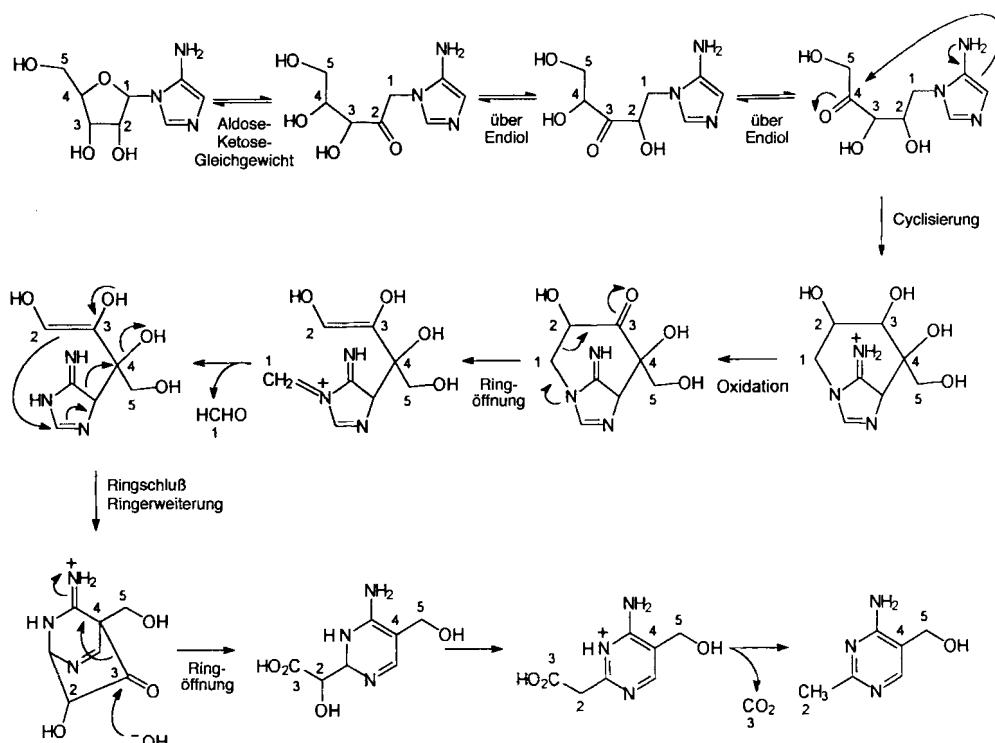
stoffatome der Pyrimidin-Einheit denselben Ursprung: N1 stammt aus Glycin,<sup>[25]</sup> die beiden anderen Stickstoffatome aus Glutamin.<sup>[29]</sup> Weil **9** die Anforderungen einer Mutante von *S. typhimurium* LT2 erfüllte, bei der sowohl der Syntheseweg zum Purin- als auch zum Pyrimidinring von Thiamin blockiert war, schlossen Newell und Tucker,<sup>[31]</sup> daß **9** auch eine Schlüsselstellung in der Biosynthese der Pyrimidin-Einheit von Thiamin einnehmen müßte. Diese Hypothese wurde durch zwei weitere Experimente gestützt: Markiertes **9**, das biosynthetisch aus  $[1-^{14}\text{C}]$ Glycin erhalten wurde, wird in die Pyrimidin-Einheit eingebaut, ohne daß die spezifische Aktivität herabgesetzt wird;<sup>[31]</sup> die Markierung des  $[3-^{15}\text{N}]$ - und des  $[^{15}\text{NH}_2]$ (5-Aminoimidazolyl)ribonucleosids tritt in N1 bzw.  $\text{NH}_2$  der Pyrimidin-Einheit auf.<sup>[32]</sup>

Die  $\text{CH}_3$ -Gruppe, C2', und die C<sub>2</sub>-Gruppe, C5, C5', der Pyrimidin-Einheit leiten sich nicht vom Aminoimidazolkern des (5-Aminoimidazolyl)ribonucleosids oder -ribonucleotids ab. Der Riboseteil von **9** wurde als Vorstufe von C5, C5' der Pyrimidin-Einheit vorgeschlagen, als man feststellte, daß in *E. coli* (IFO 13168) C5' durch [6-<sup>14</sup>C]Glucose markiert wurde.<sup>[13]</sup> Die Überführung einer intakten C<sub>2</sub>-Einheit aus D-[1,2,3,4,5,6-<sup>13</sup>C<sub>6</sub>]Glucose in die C<sub>2</sub>-Einheit C5, C5' des Pyrimidinrings in der *E.-coli*-B-Mutante WG2 konnte kürzlich durch <sup>13</sup>C-NMR-Spektroskopie bestätigt werden.<sup>[12]</sup> Daß **9** alle Kohlenstoffatome der Pyrimidin-Einheit liefert, stellten David und Mitarbeiter beim *S.-typhimurium*-Stamm thi 10/T von Newell und Tucker fest.

Durch das  $[U-^{13}C](5\text{-Aminoimidazolyl})\text{ribonucleosid}$  wurde die Pyrimidin-Einheit in Gegenwart von Glucose mit  $^{13}C$  markiert, allerdings trat keine Markierung auf, wenn man  $[U-^{13}C]\text{Glucose}$  und das unmarkierte  $(5\text{-Aminoimidazolyl})\text{ribonucleosid}$  einsetzte. In einem weiteren Experiment wurde die Markierung des  $5\text{-Aminoimidazolyl-}[U-^{14}C]\text{ribonucleosids}$  vorwiegend an C2' und C5, C5' nachgewiesen, den drei Atomen, die nicht aus dem 5-Aminoimidazolring stammen. Untersuchungen mit radioaktiven Proben des  $(5\text{-Aminoimidazolyl})\text{ribonucleosids}$ <sup>[35]</sup> und des  $5\text{-Aminoimidazolyl-}[2-^{13}C]\text{ribonucleosids}$ <sup>[32]</sup> ergaben, daß sich C2' der Pyrimidin-Einheit von C2 des Riboseteils des  $(5\text{-Aminoimidazolyl})\text{ribonucleosids}$  ableitet. Die Umsetzung läuft intramolekular ab, wie aus dem gleichzeitigen Einbau von  $[^{13}C]\text{Ribose}$ - und  $[^{15}N]\text{Imidazol-markiertem}$   $(5\text{-Aminoimidazolyl})\text{ribonucleosid}$  geschlossen wurde.<sup>[32]</sup>

In Prokaryoten ist **9** demnach nicht nur ein Intermediat in der Biosynthese der Nucleinsäure-Purine, sondern auch in der der Pyrimidin-Einheit von Thiamin. Die Ergebnisse der beschriebenen Isotopenexperimente (siehe Schema 2) können folgender-

maßen gedeutet werden: Die Umsetzung des (5-Aminoimidazolyl)ribonucleosids (oder (5-Aminoimidazolyl)ribonucleotids) zur Pyrimidin-Einheit (oder zum entsprechenden 5'-Phosphatester) erfordert die Spaltung von fünf Bindungen des Vorläufers (Imidazol C4, C5; Ribose C1, C2; C2, C3; C3, C4; Imidazol N1, Ribose C1). Gleichzeitig werden zwei Kohlenstoffatome, C1 und C3 der Ribose-Einheit, entfernt und drei neue Bindungen geknüpft (Imidazol C2, Ribose C2 zu Pyrimidin C2, C2'; Imidazol C4, Ribose C4 zu Pyrimidin C6, C5; Imidazol C5, Ribose C4 zu Pyrimidin C4, C5). Die Ergebnisse legen einen intramolekularen Prozeß nahe. Eine chemisch sinnvolle Hypothese zum Mechanismus eines derartigen Prozesses ist in Schema 4 dargestellt.



Schema 4. Eine chemisch sinnvolle Hypothese zum Mechanismus der intramolekularen Umsetzung des (5-Aminoimidazolyl)ribonucleosids in die Pyrimidin-Einheit von Thiamin in Prokaryoten.

### 2.3. Glucose als Vorstufe in Hefen

Bei Hefen stammen die Kohlenstoffatome der Pyrimidin-Einheit von Thiamin aus Formiat und Glucose. Während das (5-Aminoimidazolyl)ribonucleotid ein Vorläufer von Nucleinsäure-Purinen bei *S. cerevisiae* – und vermutlich auch bei anderen Eukaryoten<sup>[30]</sup> – ist, tritt es bei dieser Hefe nicht als Zwischenstufe der Thiamin-Biosynthese auf. Der Biosyntheseweg zur Pyrimidin-Einheit bei Hefen unterscheidet sich darüber hinaus von dem bei Enterobakterien in der Art, wie Kohlenhydrat-Vorstufen eingebaut werden. Bei *C. utilis* wurden Markierungen aus  $[1-^{14}\text{C}]$ -,  $[2-^{14}\text{C}]$ - und  $[6-^{14}\text{C}]$ Glucose in die Pyrimidin-Einheit eingebaut, aber man erhielt widersprüchliche Ergebnisse bei dem Versuch, die genaue Position der Markierung zu ermitteln.<sup>[36]</sup> Bei *S. cerevisiae* ATCC 24903 konnte die Verteilung der Markierung aus  $[1-^{14}\text{C}]$ -,  $[2-^{14}\text{C}]$ -,  $[6-^{14}\text{C}]$ - und  $[6-^{14}\text{C}, 6-^3\text{H}]$ Glucose und aus  $[1-^{14}\text{C}]$ Fructose in der Pyrimidin-Einheit durch vollständigen chemischen Abbau ermittelt werden.<sup>[22]</sup> Dabei trat ein komplexes Verteilungsmuster auf, ein Hinweis

auf zwei voneinander unabhängige Synthesewege, einen Haupt- und einen Nebenweg. Auf dem Hauptweg (Schema 3) wird Formiat als C4 in die Pyrimidin-Einheit eingebaut, die fünf Kohlenstoffatome C2', C2, C6, C5 und C5' der Pyrimidin-Einheit stammen aus Glucose, Vorläufer ist vermutlich die Pentulose 11. Auf dem in Schema 3 nicht dargestellten Nebenweg tritt Formiat als C2 in der Pyrimidin-Einheit auf, und die letztlich aus Glucose stammenden Kohlenstoffatome C1, C2 einer Pentulose liefern C5, C4 der Pyrimidin-Einheit. Der Ursprung von C2', C5' und C6 ist noch unbekannt. Diese Zweigleisigkeit wurde bisher in keinem anderen Stamm von *S. cerevisiae* und auch nicht in einem anderen Eukaryot festgestellt.

Gemäß einer kürzlich durchgeföhrten <sup>13</sup>C-NMR-Untersuchung über den Einbau von Markierungen aus D-[1,2,3,4,5,6-<sup>13</sup>C<sub>6</sub>]Glucose in Thiamin bei *S. cerevisiae* ATCC 7752 (= IFO 1234) werden eine intakte C<sub>2</sub>-Einheit von Glucose in die C<sub>2</sub>-Einheit C2', C2 und eine intakte C<sub>3</sub>-Einheit in die C<sub>3</sub>-Einheit C6, C5, C5' der Pyrimidin-Einheit von Thiamin überführt.<sup>[12]</sup> Dies bestätigt die Art des Einbaus von Glucose im Hauptweg, wie er durch <sup>14</sup>C-Markierungsstudien nachgewiesen wurde. Bei diesem Hefestamm gab es keine Hinweise auf den Nebenweg.

#### 2.4. Späte Pyrimidin-Vorstufen in Hefen

Nach einem früheren Bericht über die Isolierung einer späten Vorstufe der Pyrimidin-Einheit<sup>[37]</sup> in *S. cerevisiae* weist diese Verbindung ein UV-Absorptionsmaximum bei 259 nm auf. Im <sup>1</sup>H-NMR-Spektrum treten drei Signale auf:  $\delta = 2.0$  (s, 3 H,  $\text{CH}_3\text{CO} ?$ ), 6.2 (d, 2 H, Vinylgruppe  $\text{CH}_2\text{CH} = ?$ ) und 8.5 (t, 3 H, ?). Ohne weitere Information kann kein Strukturvorschlag gemacht werden, so daß die Verbindung erneut isoliert werden muß, bevor man verlässliche Schlüsse ziehen kann.

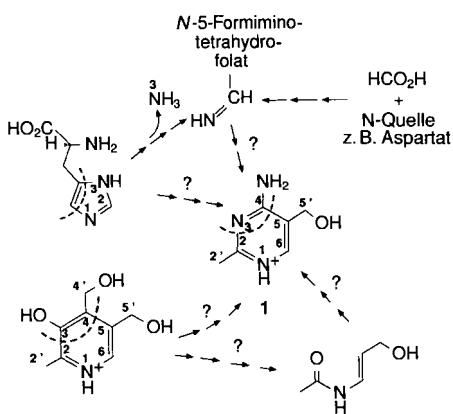
Histidin<sup>[38]</sup> und Pyridoxin<sup>[39, 40]</sup> sind kürzlich als Vorläufer der Pyrimidin-Einheit von Thiamin bei *S. cerevisiae* IFO 1234 vorgestellt worden (Schema 5). Die Markierung aus L-[2-<sup>14</sup>C]-Histidin wird in eine unbekannte Position der Pyrimidin-Einheit eingebaut (vermutlich C4) – wobei sich die spezifische Aktivität kaum ändert – die aus [1,3-<sup>15</sup>N]<sub>2</sub>Histidin tritt in N3 und der NH<sub>2</sub>-Gruppe der Pyrimidin-Einheit auf. N1 von Histidin stammt aus der NH<sub>2</sub>-Gruppe von Asparaginsäure, eine Markierung aus [<sup>15</sup>N]Asparaginsäure kann als N3 der Pyrimidin-Einheit

nachgewiesen werden; daher schloß man, daß N1 von Histidin N3 der Pyrimidin-Einheit liefert und N3 von Histidin, das aus dem Amidstickstoffatom von Glutamin stammt, zur NH<sub>2</sub>-Gruppe des Produktes wird. Allerdings können sowohl N3 als auch die NH<sub>2</sub>-Gruppe der Pyrimidin-Einheit aus dem Amidstickstoffatom von Glutamin stammen.<sup>[29]</sup> <sup>15</sup>N aus DL-[ $\alpha$ -Amino-<sup>15</sup>N]Histidin wurde nicht in die Pyrimidin-Einheit eingebaut, genauso wenig spielen die übrigen Kohlenstoffatome von Histidin bei der Biosynthese eine Rolle.<sup>[41]</sup> Demnach wird ein intaktes N1,C2,N3-Bruchstück von Histidin, entstanden durch die Spaltung des Imidazolrings, zur N-C-N-Einheit, N3, C4, NH<sub>2</sub>, der Pyrimidin-Einheit. Sowohl der Einbau eines intakten Histidin-Fragments als auch ein früher Aminierungsschritt im Pyrimidin-Syntheseweg sind in Einklang mit der Tatsache, daß deuteriertes 4-Hydroxy-5-hydroxymethyl-2-methylpyrimidin bei *S. cerevisiae* nicht eingebaut wird.<sup>[42]</sup>

Der Einbau eines intakten N-C-N-Bruchstücks aus Histidin wurde allerdings noch nicht experimentell untersucht. Eine andere Interpretation der Ergebnisse ist plausibel: Der Histidin-Katabolismus – über Urocansäure und 4-Imidazolon-5-propionsäure – ist ein Stoffwechselprozeß, der bei Bakterien gründlich untersucht wurde, aber nicht bei Hefen. Bei diesem Prozeß wird die N1,C2-Einheit des Imidazolkerns von Histidin – also das Stickstoffatom aus Aspartat und das Kohlenstoffatom aus Formiat – auf Folsäure übertragen. Es entstehen *N*-5-Formiminotetrahydrofolat<sup>[43]</sup> und anschließend *N*-5-Formyltetrahydrofolat, zwei der klassischen C<sub>1</sub>-Donoren zum Formiat-Einbau.<sup>[44]</sup> Nach unserer Vorstellung ist es wahrscheinlich, daß C2 und möglicherweise auch N1 des Histidinkerns auf diesem indirekten Weg in den Pyrimidinkern von Thiamin gelangen (Schema 5).

Das C<sub>2</sub>NC<sub>3</sub>-Fragment der Pyrimidin-Einheit, C2', C2, N1, C6, C5, C5', leitet sich vermutlich direkt aus der entsprechenden C<sub>2</sub>NC<sub>3</sub>-Pyridoxol-Einheit ab.<sup>[40]</sup> Dies wurde aus Ergebnissen von Konkurrenzexperimenten mit <sup>15</sup>NH<sub>4</sub><sup>+</sup>Cl<sup>-</sup> in Gegenwart unmarkierter Substrate wie Pyridoxol<sup>[39]</sup> sowie aus Versuchen zum Einbau <sup>13</sup>C- und <sup>2</sup>H-markierter Proben von Pyridoxol geschlossen.<sup>[40]</sup> Die Pyridoxol-Biosynthese ist bei Hefen gänzlich unerforscht. Möglicherweise folgt sie nicht dem Weg, der sich für die Pyridoxol-Biosynthese in *E. coli* abzeichnet.<sup>[45]</sup> Nach bisherigen Kenntnissen findet bei *E. coli* kein direkter Einbau eines Pyridoxolfragments in die Pyrimidin-Einheit statt; der Einbau markierter Substrate (z. B. Pyruvat und Glycin) in Pyridoxol bei *E. coli* einerseits<sup>[45]</sup> und in die Pyrimidin-Einheit bei Hefen andererseits sind nicht in Einklang.

Welche Konsequenzen sich aus dem Einbau eines intakten Pyridoxol-Bruchstücks in die Pyrimidin-Einheit ergeben, kann erst abgeschätzt werden, wenn etwas über Biosynthese und Stoffwechsel von Pyridoxol in Eukaryoten bekannt ist. Der Pyridoxin-Katabolismus wurde bei Bodenbakterien untersucht, die das Vitamin als ausschließliche Kohlenstoff- und Stickstoff-Quelle nutzen können.<sup>[46-48]</sup> In diesen Organismen tritt folgende Reaktionssequenz auf: Oxidation der C4'- und C5'-Hydroxymethylgruppen von Pyridoxol und anschließender Verlust der Carboxygruppe an C4; die entstandene 3-Hydroxy-2-methylpyridin-5-carbonsäure<sup>[46, 47]</sup> unterliegt einer enzymkatalysierten oxidativen Spaltung an der C2,C3-Bindung des Pyridinkerns, so daß 4-N-Acetylarnino-3-carboxybut-3-ensäure, CH<sub>3</sub>-



Schema 5. Einbau von Fragmenten aus Pyridoxol und L-Histidin in die Pyrimidin-Einheit von Thiamin bei Hefen gemäß Literaturangaben.

$\text{CONHCH}=\text{C}(\text{CO}_2\text{H})\text{CH}_2\text{CO}_2\text{H}$  ( $\alpha$ -N-Acetylaminomethylenbernsteinsäure<sup>[46]</sup>) entsteht, die weiter abgebaut wird.<sup>[48]</sup> Nach Ergebnissen von Tracer-Untersuchungen sind Pyridoxol und die Pyrimidin-Einheit von Thiamin biogenetisch verwandt. Eine Zwischenstufe, die diese Verwandtschaft verdeutlichen könnte, würde bei einer analogen Reaktionsfolge geliefert, bei der die C5'-Hydroxymethylgruppe nicht oxidiert wird, sondern bis zur Ringöffnung erhalten bleibt.

### 3. Die Biosynthese der Thiazol-Einheit

Isotopen-Fütterungsversuche, die zur Identifizierung der ersten Vorstufen durchgeführt wurden, ergaben, daß Enterobakterien und Hefen zur Biosynthese der Thiazol-Einheit **4** unterschiedliche Wege nutzen. In *E. coli* und *S. typhimurium* liefern L-Tyrosin **14** und 1-Desoxy-D-xylulose **15** die Stickstoff- und Kohlenstoffatome der Thiazol-Einheit, in Hefen dagegen Glycin und die D-Pentulose **11** (Schema 6). Grüne Pflanzen schlagen vermutlich denselben Syntheseweg ein wie Enterobakterien,

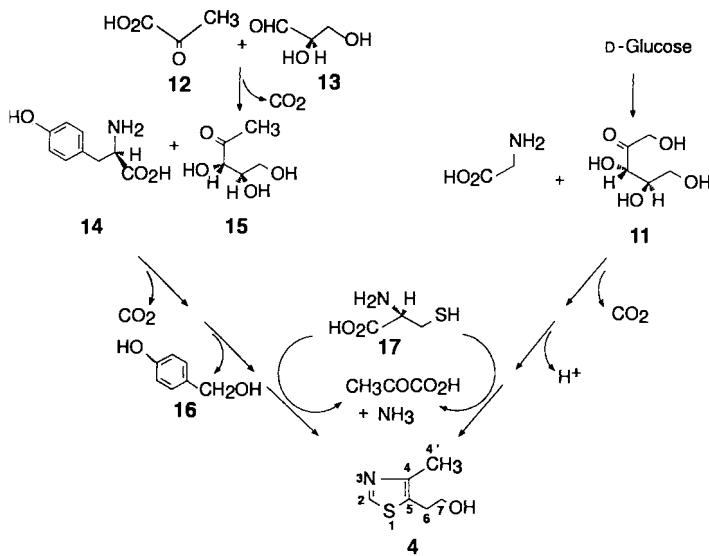
weiterer enzymologischer und genetischer Untersuchungen möglich sein. Im allgemeinen wird Cystein als Quelle für das Schwefelatom in Enterobakterien angesehen. Markierungen aus [<sup>35</sup>S]Cystein oder [<sup>35</sup>S]Methionin werden bei *E. coli* ATCC 9637<sup>[49]</sup> mit gleicher Effizienz eingebaut; für *E. coli* IFO 13168<sup>[50, 51]</sup> wurde allerdings von einem stärkeren Cystein-Einbau berichtet. Cystein verringert die Aufnahme von Markierungen aus [<sup>35</sup>S]Sulfat bei der *E. coli*-Mutante 70-17<sup>[52]</sup> und aus [<sup>35</sup>S]Thiocystein bei *E. coli* K12  $\text{hp}\lambda^-$ , und zwar effektiver als Methionin.<sup>[53]</sup> Allerdings reduziert Methionin bei *S. typhimurium* ATCC 23592 den Cystein-Einbau.<sup>[54]</sup>

Markierungen aus L-[<sup>35</sup>S]Cystein und L-[<sup>35</sup>S]Methionin werden von *S. cerevisiae* in Thiamin eingebaut. Die Berichte über die relative Effizienz des Einbaus aus beiden Substraten sind widersprüchlich.<sup>[50, 51]</sup> Bei *S. cerevisiae* NCYC 1062 war L-Methionin wirkungsvoller als L-Cystein bezüglich der Verringerung der <sup>35</sup>S-Aufnahme aus [<sup>35</sup>S]Sulfat, allerdings hatten andere schwefelhaltige Substanzen (einschließlich  $\text{Na}_2\text{S}$ ) die gleiche Wirkung.<sup>[55]</sup>

### 3.2. Glycin und Tyrosin als Vorstufen

In Hefen und aeroben Bakterien liefert ein CN-Fragment, das durch Decarboxylierung von Glycin entstanden ist, das C2,N-Fragment der Thiazol-Einheit. So bauen *B. subtilis*, *P. putida*,<sup>[56]</sup> *S. cerevisiae*<sup>[27, 56]</sup> und andere Eukaryoten<sup>[56]</sup> die Markierung aus [<sup>15</sup>N]Glycin in die Thiazol-Einheit ein. Die Markierung aus [ $\alpha$ -<sup>14</sup>C]Glycin tritt bei *B. subtilis* ATCC 6633<sup>[57]</sup> ausschließlich an C2 der Thiazol-Einheit auf. Dies konnte auch bei mehreren Stämmen von *S. cerevisiae*<sup>[26, 27, 58, 59]</sup> durch chemischen Abbau nachgewiesen werden. Die Carboxygruppe von Glycin tritt nicht in Thiamin auf.<sup>[27, 59]</sup> Die Überführung einer intakten <sup>15</sup>N-<sup>13</sup>C-Einheit aus [<sup>15</sup>N,2-<sup>13</sup>C]Glycin in das N3,C2-Fragment der Thiazol-Einheit wurde kürzlich festgestellt.<sup>[12]</sup>

Dagegen wird die Markierung aus [ $\alpha$ -<sup>14</sup>C]Glycin bei *S. typhimurium*<sup>[60]</sup> nicht in die Thiazol-Einheit aufgenommen. Darüber hinaus bauen weder *E. coli* noch *Enterobacter aerogenes* die Markierung aus [<sup>15</sup>N]Glycin in die Thiazol-Einheit ein.<sup>[56]</sup> Durch das Stickstoff- und das  $\alpha$ -Kohlenstoffatom einer anderen Aminosäure (Tyrosin) wird das C2,N-Fragment der Thiazol-Einheit geliefert. Bei *E. coli*<sup>[56, 61]</sup> und *E. aerogenes*<sup>[56]</sup> wird das Stickstoffatom von [<sup>15</sup>N]Tyrosin in die Thiazol-Einheit eingebaut; die Markierung von [ $\alpha$ -<sup>14</sup>C]Tyrosin tritt bei *E. coli*<sup>[62]</sup> und *S. typhimurium*<sup>[60]</sup> an C2 der Thiazol-Einheit auf (siehe Schema 6). Diese Markierung wurde auch in Gegenwart von unmarkiertem Glycin und Methionin eingebaut, so daß diese Aminosäuren wahrscheinlich nicht am biosynthetischen Aufbau der Einheit beteiligt sind. Der Einbau der Markierung aus [ $\alpha$ -<sup>14</sup>C]Tyrosin in Thiamin wurde auch für Chloroplasten aus Spinatblättern berichtet, allerdings wurde die Position der Markierung nicht ermittelt.<sup>[63]</sup> In *E. coli* wird nur C2 der Thiazol-Einheit durch [ $\text{U}$ -<sup>14</sup>C]Tyrosin<sup>[62]</sup> markiert. Dies deutet darauf hin, daß nur das  $\alpha$ -Kohlenstoffatom von Tyrosin in die Thiazol-Einheit eingebaut wird. Der Einbau einer intakten  $\alpha$ -C,N-Einheit aus Tyrosin ist wahrscheinlich, allerdings nicht experimentell bewiesen. Deuterium aus [<sup>3',5'-2</sup>H<sub>2</sub>]Tyrosin wird von *E. coli* B in *p*-Hydroxybenzylalkohol **16** eingebaut; da sich



Schema 6. Die Biosynthese der Thiazol-Einheit **4** in fakultativ anaeroben Prokaryoten (*E. coli* und andere Enterobakterien sowie höhere Pflanzen, links) und in Eukaryoten (aerobe Bakterien, Hefen, rechts); Vorläufer-Produkt-Beziehungen; für Schritte zwischen **14** + **15** und **4** siehe Schema 7, für Schritte zwischen **11** und **4** siehe Schema 8.

während der Hefe-Syntheseweg von aeroben Bakterien genutzt wird (*Bacillus subtilis* und *Pseudomonas putida*). Das Schwefelatom stammt möglicherweise aus Cystein **17**. Die Bildung der Thiazol-Einheit aus diesen Substraten kann mit chemisch sinnvollen Hypothesen erklärt werden (siehe Schema 7 und 8). Allerdings wurden die Zwischenstufen des Syntheseweges bisher nicht identifiziert.

#### 3.1. Die Quelle des Schwefelatoms

Zwar wurden Konkurrenzexperimente und Versuche durchgeführt, um die Effizienz des Einbaus zu untersuchen, aber endgültige Schlußfolgerungen werden nur anhand von Ergebnissen

*p*-Hydroxybenzylalkohol- und Thiaminsynthese entsprechen, sollte **16** während der Thiamin-Biosynthese entstehen.<sup>[64]</sup>

Bei *B. subtilis* oder *P. putida*<sup>[56]</sup> wird keine Markierung aus [<sup>15</sup>N]Tyrosin in die Thiamin-Einheit aufgenommen, bei *S. cerevisiae* keine aus [ $\alpha$ -<sup>14</sup>C]Tyrosin.<sup>[26]</sup> Die Tatsache, daß sich Glycin- und Tyrosin-Einbau gegenseitig ausschließen, zeigt, daß zwei Wege für die Thiazol-Biosynthese vorliegen, einer in aeroben Bakterien und Hefen, ein anderer in Enterobakterien und Pflanzen (siehe Schema 6).

### 3.3. Kohlenhydrat-Vorstufen in Enterobakterien

Den ersten Hinweis auf den Ursprung der C<sub>5</sub>-Kette der Thiazol-Einheit lieferten Untersuchungen an *E. coli* B über den Einbau von Glucose, Glycerin und Brenztraubensäure, die mit stabilen Isotopen markiert waren.<sup>[65]</sup> Der mehrfache Einbau von Deuterium aus [ $1-^2\text{H}$ ]Glucose und der Einbau einer Markierung aus [ $\text{U}-^{13}\text{C}_6$ ]Glucose sind Hinweise darauf, daß eine C<sub>3</sub>-Einheit (die C5, C6, C7 liefert) mit einer C<sub>2</sub>-Einheit (die C4', C4 liefert) verknüpft wird. Die Thiazol-Kohlenstoffatome, die sich aus der C<sub>3</sub>-Einheit ableiten, wurden auch durch [6,6'-<sup>2</sup>H<sub>2</sub>]- und [5,6,6'-<sup>2</sup>H<sub>3</sub>]Glucose markiert.<sup>[65]</sup> Darüber hinaus ist der Einbau von (R)-[(R,S)-1-<sup>2</sup>H]- und (R)-[(R,S)-1-<sup>2</sup>H,1-<sup>18</sup>O]Glycerin mit der Hypothese eines C<sub>3</sub>-Vorläufers in Einklang.<sup>[66]</sup> Die Vermutung, daß sich die C<sub>2</sub>-Einheit von Pyruvat ableitet, wird gestützt durch die Tatsache, daß bei *E. coli* eine intakte CD<sub>3</sub>-Gruppe aus [3-<sup>2</sup>H<sub>3</sub>]Pyruvat<sup>[65]</sup> und Markierungen aus [ $\text{U}-^{14}\text{C}$ ]Alanin, [3-<sup>14</sup>C]- und [2-<sup>14</sup>C]Pyruvat<sup>[51]</sup> eingebaut werden.

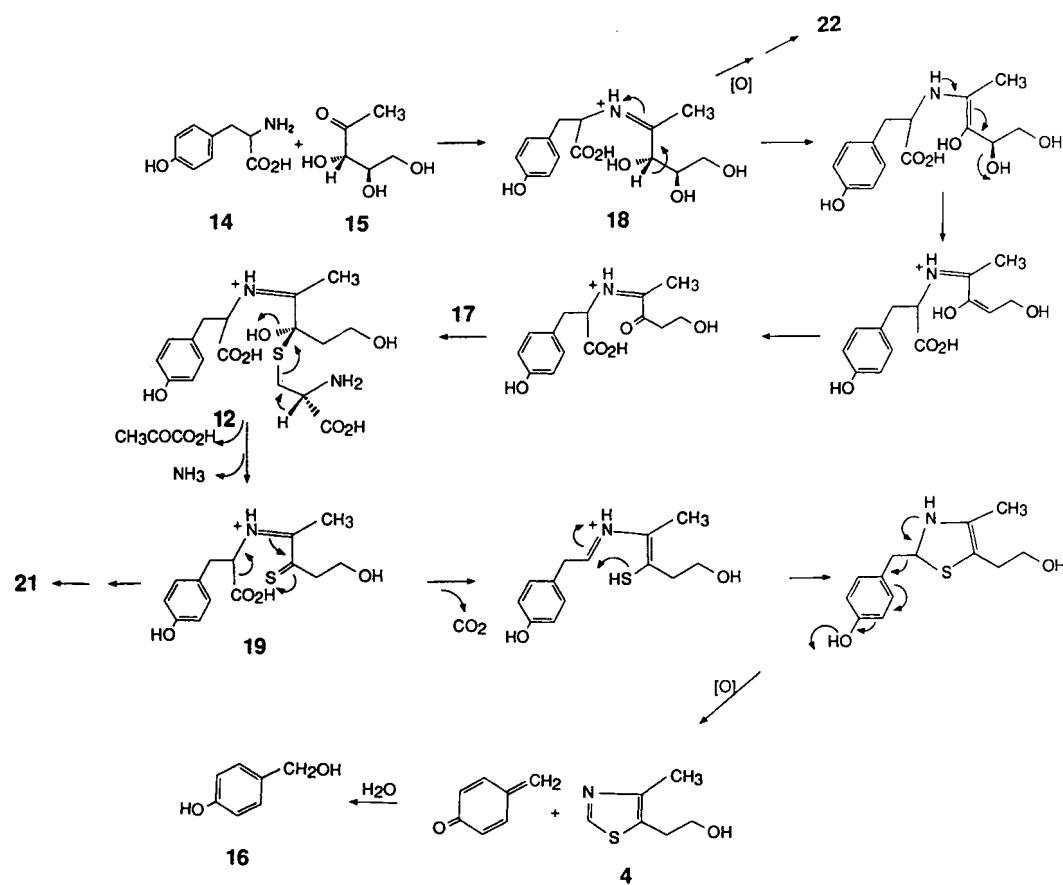
Allerdings wurde [ $\text{U}-^{14}\text{C}$ ]-Alanin bei *S. typhimurium* ATCC 23592 nicht eingebaut.<sup>[60]</sup> Kürzlich wurde ein überzeugender Hinweis für den Aufbau der C<sub>5</sub>-Einheit aus zwei kleineren Bruchstücken geliefert, die sich von D-[1,2,3,4,5,6-<sup>13</sup>C<sub>6</sub>]Glucose ableiten: In der *E. coli*-B-Mutante WG2 werden zwei intakte Einheiten in die Thiazol-Einheit von Thiamin eingebaut – eine C<sub>2</sub>-Einheit, die die Positionen C4' und C4, sowie eine C<sub>3</sub>-Einheit, die die Positionen C5, C6 und C7 einnimmt. Dies konnte <sup>13</sup>C-NMR-spektroskopisch nachgewiesen werden.<sup>[12]</sup>

Die C<sub>5</sub>-Verbindung, die aus der Verknüpfung der C<sub>2</sub>- und C<sub>3</sub>-Fragmente hervorgeht und ein direkter Vorläufer der C<sub>5</sub>-Kette der Thiazol-Einheit ist, wurde bei *E. coli* als 1-Desoxy-D-xylulose **15** identifiziert.<sup>[67, 68]</sup> [1-<sup>2</sup>H<sub>3</sub>],

5-<sup>2</sup>H<sub>1</sub>]1-Desoxy-D-xylulose (1-Desoxy-D-*threo*-pentulose) wird vollständig in die Thiazol-Einheit eingebaut, wie das Auftreten von Deuterium in den Positionen C4' und C7 belegt.<sup>[67]</sup> Ein Einbau des entsprechenden D-*erythro*-Isomers findet nicht statt.<sup>[68]</sup>

Kürzlich wurden zwingende Beweise dafür erhalten, daß **15** als vollständige Einheit in die Thiazol-Einheit von Thiamin eingebaut wird: Durch <sup>13</sup>C-NMR-Spektroskopie wurde bei der *E. coli*-B-Mutante WG2 nachgewiesen, daß die intakte <sup>13</sup>C-<sup>13</sup>C-Bindung von [2,3-<sup>13</sup>C<sub>2</sub>]1-Desoxy-D-xylulose<sup>[69]</sup> in der C<sub>2</sub>-Einheit, C4, C5, der Thiazol-Einheit von Thiamin auftrat.<sup>[13]</sup> Ähnliche Untersuchungen ergaben, daß diese Pentulose auch ein späterer Vorläufer von Pyridoxin ist, einem weiteren B-Vitamin.<sup>[13, 45]</sup>

1-Desoxy-D-xylulose **15** wurde aus Kulturen von *Streptomyces hygroscopicus* UC-5601<sup>[70]</sup> und aus teilweise gereinigten, zellfreien Extrakten mehrerer Bakterienarten isoliert, die mit Pyruvat **12**, D-Glycerinaldehyd **13** und Thiaminpyrophosphat inkubiert worden waren.<sup>[71]</sup> Die Bildung von **15** wurde durch Papierchromatographie bei zellfreien Extrakten vieler Bakterien nachgewiesen; in Hefe- und Pilzextrakten wurden allerdings signifikant geringere Mengen gebildet.<sup>[71]</sup> Pyruvat-Dehydrogenase (EC 1.2.4.1), die aus *B. subtilis* IFO 13719 und *E. coli* isoliert wurde, katalysiert die Kondensation von **12** mit **13**.<sup>[72]</sup> Der Aufbau des Thiazol-Vorläufers 1-Desoxy-D-xylulose **15**, der durch die Pyruvat-Dehydrogenase katalysiert wird, erfordert Thiaminpyrophosphat als Coenzym auf dem Thiazol-Syntheseweg der Thiamin-Biosynthese. Dies ist zwar bemerkenswert, aber



Schema 7. Hypothese zum Mechanismus der Biosynthese der Thiazol-Einheit aus L-Tyrosin **14** und 1-Desoxy-D-xylulose **15** in fakultativ anaeroben Prokaryoten; für Schritte zwischen **18** und **22** siehe Schema 10, für Schritte zwischen **19** und **21** siehe Schema 9.

nicht einzigartig: Sowohl Pyridoxin<sup>[73]</sup> als auch Biotin<sup>[74]</sup> sind an ihrer eigenen Biosynthese beteiligt.

In Enterobakterien wird die Thiazol-Einheit somit von Tyrosin **14**, 1-Desoxy-D-xylulose **15** (oder 1-Desoxy-D-xylulose-5-phosphat) und einem Schwefeldonor (z. B. Cystein **17**) aufgebaut. Nach Bildung der Schiff-Base **18** und anschließenden Tautomerisierungs-, Decarboxylierungs-, Eliminierungs- und Additionsreaktionen werden die Thiazol-Einheit **4** und *p*-Hydroxybenzylalkohol **16**<sup>[64]</sup> geliefert (Schema 7). Bei 1-Desoxy-D-xylulose **15** als Vorstufe ist ein Oxidationsschritt erforderlich. Dieser kann durch oxidative Spaltung von Tyrosin (Schema 7) erfolgen oder durch Oxidation der Desoxyxylulose-Einheit an C3 mit anschließendem reduktivem Zerfall von Tyrosin (analog zum Deprotonierungsschritt auf dem Glycin-Syntheseweg in Schema 8). Wie eine Untersuchung der *p*-Hydroxybenzyl-Deri-

Bildung zweier Metaboliten, 5-(2-Hydroxyethyl)-4-methylthiazol-2-carbonsäure **21**<sup>[76]</sup> und 5-(1,2-Dihydroxyethyl)-4-methylthiazol **22**<sup>[77]</sup> erklären zu können. Diese sind strukturchemisch mit der Thiazol-Einheit verwandt. Die Markierung von [Carboxy-<sup>14</sup>C]Tyrosin wird in **21** eingebaut. Diese Verbindungen sind vermutlich eher Nebenprodukte als Zwischenstufen der Thiamin-Biosynthese.

### 3.4. Kohlenhydrat-Vorstufen in Hefen

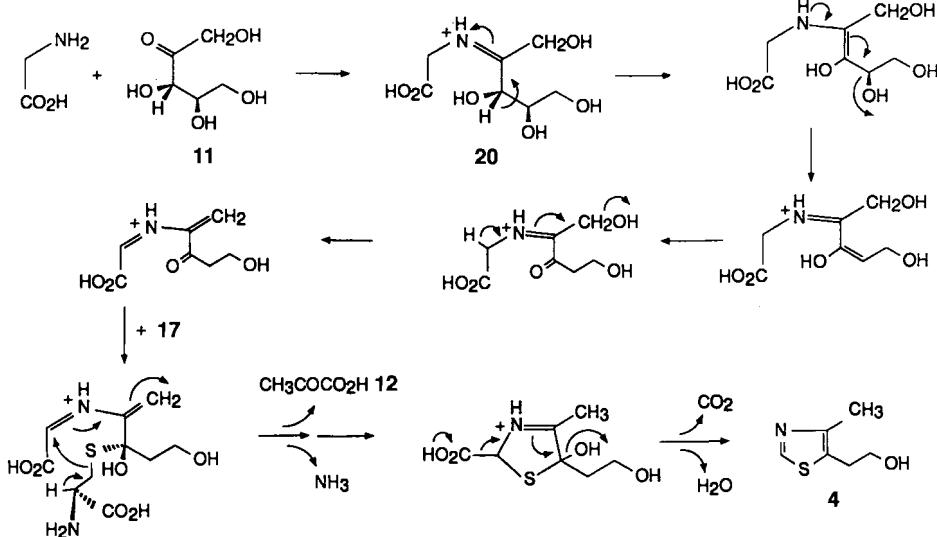
Auch die C<sub>5</sub>-Kette der Thiazol-Einheit in *S. cerevisiae* ATCC 24903<sup>[78, 79]</sup> stammt aus einem Kohlenhydrat. Nach Markierungsstudien entsteht sie aus einer intakten Pentulose und nicht durch Verknüpfung einer C<sub>3</sub>- mit einer C<sub>2</sub>-Einheit über 1-Desoxy-D-xylulose **15**. Bei *S. cerevisiae* kann der Beweis nur indirekt geführt werden, weil Hefen nicht auf einem Medium aus Pentosen gezüchtet und daher der Einbau markierter Pentosen nicht direkt untersucht werden kann. Das indirekte Indiz ist allerdings beweiskräftig.

Markierungen aus [3-<sup>14</sup>C]Pyruvat<sup>[51, 79]</sup>, [U-<sup>14</sup>C]Alanin<sup>[51]</sup> und [U-<sup>14</sup>C]Lactat<sup>[79]</sup> wurden nicht eingebaut; gemäß der Markierungsmuster bei [1-<sup>14</sup>C]-, [2-<sup>14</sup>C]- und [6-<sup>14</sup>C]Glucose sowie bei [1-<sup>14</sup>C]Fructose und [1-<sup>14</sup>C]Glycerin, die durch chemischen Abbau ermittelt wurden, wird das C<sub>5</sub>-Fragment der Thiazol-Einheit sowohl über den oxidativen als auch über den nichtoxidativen Zweig des Pentosephosphatweges gebildet.<sup>[79]</sup>

Ein ähnliches Muster wurde erhalten,

wenn man *C. utilis* mit [1-<sup>14</sup>C]-, [2-<sup>14</sup>C]- und [6-<sup>14</sup>C]Glucose behandelte.<sup>[51, 80]</sup> Darüber hinaus ergab ein Experiment mit [6-<sup>14</sup>C, 6-<sup>3</sup>H]Glucose<sup>[78, 79]</sup> bei *S. cerevisiae*, daß die intakte <sup>14</sup>C, <sup>3</sup>H-Markierung an C7 der Hydroxyethyl-Seitenkette auftrat, die <sup>14</sup>C-Markierung dagegen nur an der CH<sub>3</sub>-Gruppe (C4'). Diese Ergebnisse sind nicht mit 1-Desoxy-D-xylulose **15** als Zwischenstufe in Einklang, wohl aber mit D-Xylulose oder D-Ribulose (oder ihren 5-Phosphaten) als Intermediaten. Damit ist wahrscheinlich die Bildung der Schiff-Base **20** aus Glycin und der D-Pentulose **11** oder einem D-Pentulosephosphat der erste Schritt auf dem Weg zum Thiazol in Hefen (siehe Schema 8). Durch eine Reaktionsfolge, analog zu der zum Produkt aus Tyrosin/Desoxyxylulose (siehe Schema 7), wird die Thiazol-Einheit geliefert. Ein Oxidationsschritt ist allerdings nicht nötig, weil eine Pentulose- und keine Desoxypentulose-Vorstufe an diesem Prozeß beteiligt ist.

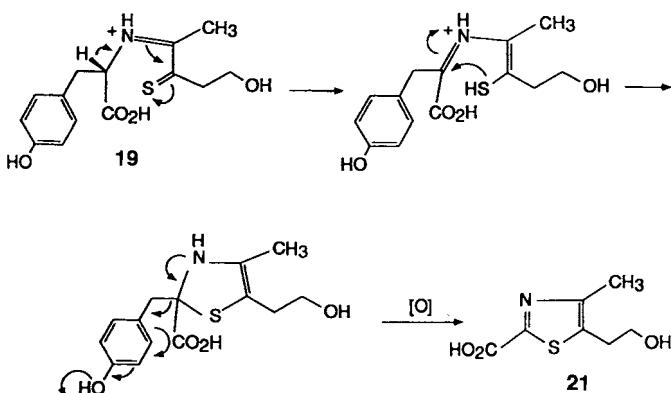
Die Schlußfolgerungen aus den Arbeiten mit radioaktiven Isotopen wurden durch <sup>13</sup>C-NMR-Spektroskopie bestätigt: Bei *S. cerevisiae* ATCC 7752 (= IFO 1234) wird eine intakte C<sub>5</sub>-Einheit aus D-[1,2,3,4,5,6-<sup>13</sup>C<sub>6</sub>]Glucose als C<sub>5</sub>-Kette (C4', C4 bis C7) in die Thiazol-Einheit von Thiamin eingebaut.<sup>[12]</sup>



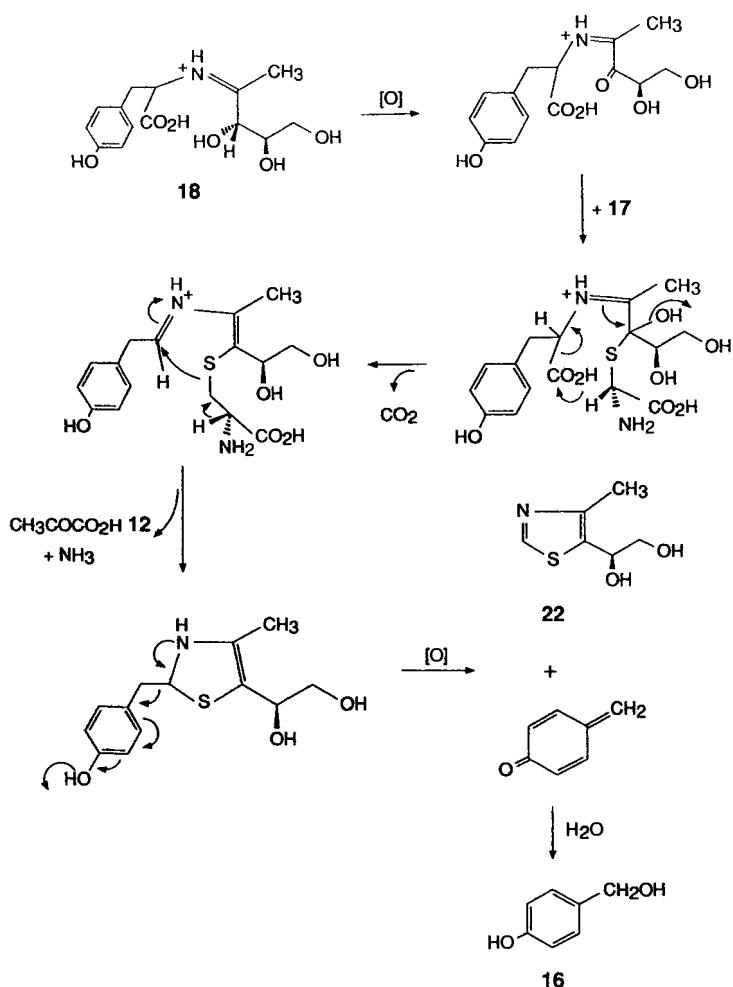
Schema 8. Hypothese zum Mechanismus der Biosynthese der Thiazol-Einheit aus Glycin und der D-Pentulose **11** in Eukaryoten.

vate der Thiamin- und der Thiazol-Einheit ergab, ist bei *E. coli*-Mutanten die Spaltung der *p*-Hydroxybenzyl-Einheit mit der Thiazol-Bildung verknüpft, und nicht mit späteren Biosyntheseschritten.<sup>[75]</sup>

Geringfügige Änderungen müssen an dieser Reaktionsfolge vorgenommen werden (Schema 9 und 10), um bei *E. coli* die



Schema 9. Bildung der Thiazolcarbonsäure **21**, eines Nebenprodukts des Thiazol-Synthesewegs in fakultativ anaeroben Prokaryoten.



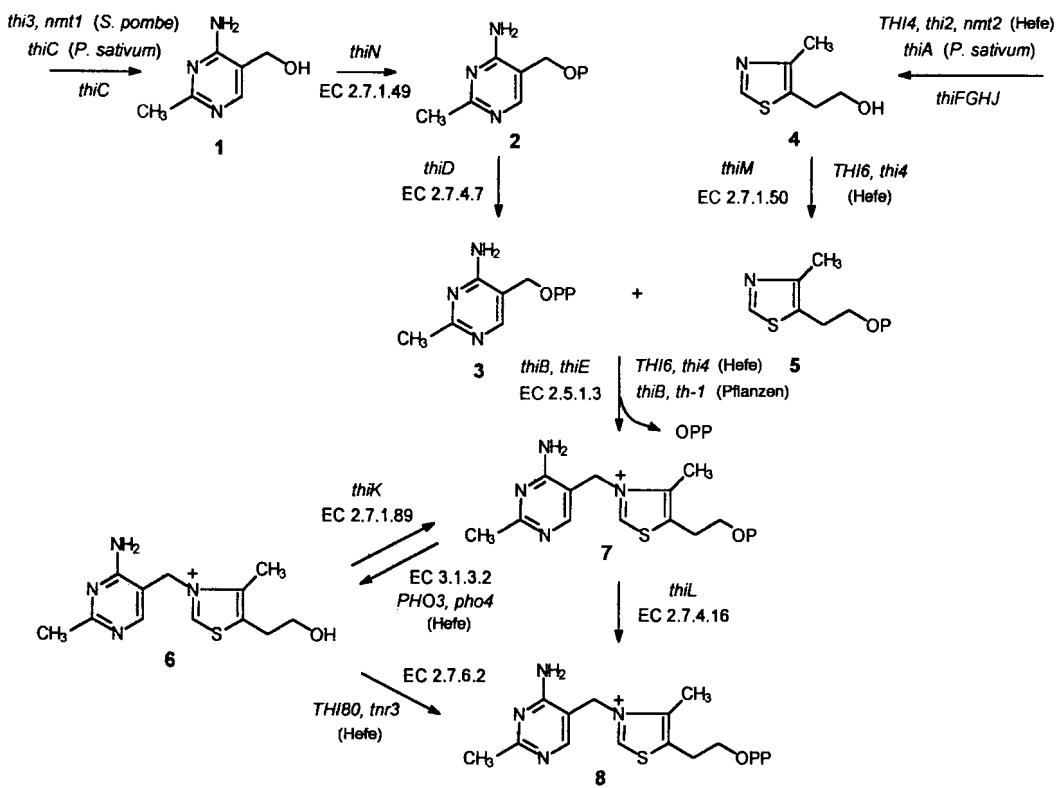
Schema 10. Bildung von Dihydroxyethylthiazol **22**, eines Nebenprodukts des Thiazol-Synthesewegs in fakultativ anaeroben Prokaryoten.

#### 4. Die Kupplung der beiden Untereinheiten und die Phosphorylierung von Thiamin

Die Identifizierung der phosphorylierten Derivate, die Zwischenstufen in der Biosynthese von **6** und dessen Pyrophosphatester **8** sind, sowie die Isolierung und Anreicherung der Enzyme, die die Syntheseschritte in *E. coli* und *S. cerevisiae* katalysieren, war bis 1975 abgeschlossen.<sup>[8, 10, 11]</sup> Die abschließenden Schritte der Cocarboxylase-Biosynthese sind in Schema 11 dargestellt. Literaturhinweise zur Kupplung der Untereinheiten und zu den Phosphorylierungsschritten, die zu Thiaminpyrophosphat **8** führen, sind in Tabelle 1 zusammengefaßt. Im folgenden wird nur auf die neueren Beiträge eingegangen.

#### 4.1. Enzyme

Enzymaktivitäten bezüglich Phosphorylierung und Kupplung der heterocyclischen Untereinheiten sowie bezüglich Phosphorylierung von Thiamin und Thiaminmonophosphat wurden in Rohextrakten festgestellt, die aus *E.-coli*-Mutanten erhalten wurden. Die Hydroxymethylpyrimidin-Kinase (EC 2.7.1.49) konnte aus den Rohextrakten 3300fach angereichert werden.<sup>[88]</sup> Die Thiaminphosphat-Pyrophosphorylase (EC 2.5.1.3) wurde aus rekombinanten *E. coli*<sup>[75]</sup> und ein Enzympräparat mit Hydroxyethylthiazol-Kinase (EC 2.7.1.50)- und Thiaminphosphat-Pyrophosphorylase (EC 2.5.1.3)-Aktivität aus *S. cerevisiae* isoliert.<sup>[85]</sup> Dieses bifunktionelle Protein ist ein Oktamer, das sich aus 60-kDa-Untereinheiten zusammensetzt, und zwei separate Katalysezentren entsprechend der beiden Aktivitäten aufzuweisen scheint. Auch



Schema 11. Abschließende Schritte in der Biosynthese von Thiamin (Vitamin B<sub>1</sub>) 6 und seinem Pyrophosphat-ester (Cocarboxylase) 8. Angegeben sind auch die Enzyme und Gene (von *E. coli*, wenn nicht anders vermerkt), die an den einzelnen Schritten beteiligt sind.

Tabelle 1. Literatur zur Biosynthese von Thiaminpyrophosphat 8: Enzyme für die Phosphorylierung und die Kupplung der beiden Untereinheiten.

EC-Nummer	Name	Bakterien	Literatur Hefe	andere
2.5.1.3	Thiaminphosphat-Pyrophosphorylase (Thiaminphosphat-Synthase) (3 + 5 → 7)	[75, 81, 82][a]	[83, 84, 85][b]	[86, 87][c]
2.7.1.49	Hydroxymethylpyrimidin-Kinase (1 → 2)	[82, 88][a]	[83, 89][b]	
2.7.1.50	Hydroxyethylthiazol-Kinase (4 → 5)	[82][a]	[83, 85, 90][b]	
2.7.4.7	Phosphomethylpyrimidin-Kinase (2 → 3)	[82][a]	[83, 89][b]	
2.7.4.16	Thiaminphosphat-Kinase (7 → 8)	[91, 92b][a]		
2.7.1.89	Thiamin-Kinase (6 → 7)	[92a, b][a]		
2.7.6.2	Thiaminpyrophospho-Kinase (6 → 8)	[93][e]	[83, 94, 95][b]	[96][c] [95, 97][f]
3.1.3.2	Thiaminphosphat-Phosphatase (7 → 6)	[98][e]	[99, 100][b] [101, 102, 103][d]	[87][c]

[a] *E. coli*. [b] *S. cerevisiae*. [c] Pflanzen. [d] *Schizosaccharomyces pombe*. [e] *Paracoccus denitrificans*. [f] Säugetiere.

die Thiaminphosphat-Pyrophosphorylase und die Thiaminphosphat-Phosphatase der Pflanze *Arabidopsis thaliana* wurden abgetrennt und durch Gelfiltration teilweise gereinigt.<sup>[87]</sup> Eine glycosylierte saure Phosphatase (EC 3.1.3.2) wurde sowohl aus *S. cerevisiae*<sup>[99]</sup> als auch aus einem transformiertem *S. pombe*-

Stamm<sup>[101, 103]</sup> ungefähr 10fach angereichert. Diese Enzyme wirken als Thiaminphosphat-Phosphatasen.<sup>[100, 102]</sup> Auch die deglycosylierten Enzyme bewahrten ihre Aktivität als Saure Phosphatasen bei und wiesen gemäß SDS-Gelektrophorese eine Molekülmasse von 56 kDa auf.

## 5. Genetik der Thiamin-Biosynthese

Die genetischen Untersuchungen der Synthesewege zu den beiden Thiamin-Untereinheiten befinden sich noch im Anfangsstadium. Bisher konnte man weder Gene noch Genprodukte zweifelsfrei den einzelnen Syntheseschritten zuordnen. Dagegen konnten bei *E. coli* und den Prokaryoten *S. cerevisiae* und *S. pombe* die Gene identifiziert werden, die für das Kupplungs-enzym und die Kininasen kodieren. Diese Enzyme sind an den letzten Schritten der Thiaminpyrophosphat-Biosynthese beteiligt. Die genetische Information, die für diese Organismen gesammelt wurde, ist in Tabelle 2 zusammengefaßt.

### 5.1. Genetik des Synthesewegs zur Pyrimidin-Einheit

Einzelne Gene, die beim Syntheseweg zur Pyrimidin-Einheit von Thiamin eine Rolle spielen, wurden für mehrere Organismen beschrieben und in unterschiedlichem Ausmaß charakterisiert. Das *E. coli*-Gen *thiC* wurde sequenziert; es komplementiert Mutanten, die auf Pyrimidin angewiesen sind. Die *thi3*-Mutante von *S. pombe* benötigt die Pyrimidin-Einheit für

Tabelle 2. Gene, die an der Biosynthese von Thiaminpyrophosphat 8 beteiligt sind.

Schritt	Name	<i>E. coli</i>		Name	<i>S. cerevisiae</i>		Name	<i>S. pombe</i>	
		Chromosom [min][a]	Länge [b]		Chromosom [a]	Länge [b]		Chromosom [a]	Länge [b]
Pyrimidin-Syntheseweg	<i>thiC</i> [9, 104]	90[9, 104]	627[9]	N0295[105]	XIV (L)[105]	340[105]	<i>thi3</i> [102] ( <i>nmt1</i> )[106]	III (R)[107]	346[106]
Thiazol-Syntheseweg	<i>thiF</i> [9]	90[9]	250[9]	<i>THI4</i> [108] ( <i>MOL1</i> )	VII (R)[109]	326[108]	<i>thi2</i> [102, 110] ( <i>nmt2</i> )[111]	II (R)[107]	301[111]
Thiazol-Syntheseweg	<i>thiG</i> [9]	90[9]	324[9]						
Thiazol-Syntheseweg	<i>thiH</i> [9]	90[9]	377[9]						
Thiazol-Syntheseweg	<i>thiJ</i> [112]	9.5[112]							
Pyrimidin-Kinase	<i>thiN</i> [88]	46[88]							
Pyrimidin-P-kinase	<i>thiD</i> [88, 113]	46[88]							
Thiazol-Kinase	<i>thiM</i> [88, 114]	46[88]		<i>THI6</i> [115]	XVI[115]	540[115]	<i>thi4</i> [102, 107, 116] ( <i>L</i> )[107]	I (L)[107]	518[107]
Kupplung der Untereinheiten	<i>thiB</i> [117] <i>thiE</i> [9, 75]	90[9]	211[9]	<i>THI6</i> [115]	XVI[115]	540[115]	<i>thi4</i> [102, 107, 116] ( <i>L</i> )[107]	I (L)[107]	518[107]
Thiamin-P-kinase	<i>thiL</i> [88, 118]	9[88, 118]							
Thiamin-Kinase	<i>thiK</i> [88, 118]	25[88, 118]							
Thiamin-Phosphatase				<i>PHO3</i> [101, 119, 120]	II[121]	467[119]	<i>pho4</i> [101, 122]		463[103]
Thiamin-PP-kinase				<i>THI80</i> [123]	XV (R)[123]	319[123]	<i>tnt3</i> [116] ( <i>ntf1</i> )[128]	I (L)[116]	569[116]
Regulator-Gene				<i>THI2</i> [124] ( <i>PHO6</i> )[125]	II[124]		<i>thi1</i> [107, 127] ( <i>ntf1</i> )[128]		775[127]
Regulator-Gene				<i>THI3</i> [126]	IV[126]		<i>tnt1</i> [107, 129] <i>tnt2</i> [107, 129] <i>tnt3</i> [107, 116, 129]		569[116]

[a] Lokalisierung auf dem Chromosom: L und R stehen für den linken bzw. rechten Arm des Chromosoms. [b] Zahl der Aminosäuren in der Polypeptidkette, die von der jeweiligen Gensequenz codiert wird.

das Wachstum.<sup>[102]</sup> Das Gen *thi3* ist ein Allel zu dem durch Thiamin reprimierbarem Gen *nmt1*, das kloniert und sequenziert wurde.<sup>[106]</sup> Homologe von *nmt1* wurden in *Aspergillus parasiticus* und *S. cerevisiae* nachgewiesen.<sup>[105]</sup> Die Aminosäuresequenzen der drei Genprodukte sind zu mehr als 60% identisch. Jedes enthält einen Cystein-Cluster in einer Domäne, die vermutlich die Membran durchspannt. Die Gene *tnr1*, *tnr2*, *tnr3* und *thi1* regulieren *thi3*.<sup>[129]</sup> Der Promotor von *nmt1* wird von *ntf1*<sup>+</sup> reguliert, einem Gen, das identisch zu *thi1* ist. Dieses codiert für ein Protein, das homolog zu den Transkriptionsfaktoren mit charakteristischem Cys<sub>6</sub>-Zinkfinger ist.<sup>[128]</sup> Bei der höheren Pflanze *Pisum sativum* konnte das Gen *thic* des Pyrimidin-Synthesewegs auf dem Chromosom 3 kartiert werden.<sup>[130]</sup> Eine *alt*-Mutante konnte normalisiert werden, indem die Pyrimidin-Einheit zur Verfügung gestellt wurde.<sup>[131]</sup>

Die Vielfalt der Synthesewege zur Pyrimidin-Einheit wurde in Abschnitt 2 beschrieben. Nach Untersuchungen zur Genetik können *S.-typhimurium*-Mutanten, deren (5-Aminoimidazol)ribonucleotid-Bildung blockiert ist, auch ohne Zufuhr von exogenem Thiamin wachsen,<sup>[132]</sup> da ein alternativer Weg zu 9 beschritten werden kann. Dieser Weg unterscheidet sich vom Purinstoffwechselweg der Nucleinsäuren und wird eingeschlagen, wenn das Bakterium anaerob<sup>[133a]</sup> oder aerob auf bestimmten Kohlenstoffquellen<sup>[133b]</sup> kultiviert wird. Ein Gen dieses Synthesewegs wurde kloniert und sequenziert; gemäß der Sequenzanalyse enthält das Genprodukt eine NAD/FAD-Bindungstasche.<sup>[134]</sup> Erst vor kurzem wurde ein zweites Gen identifiziert und einem alternativen Stoffwechselweg für die Umsetzung vom (5-Aminoimidazolyl)ribonucleotid zur Pyrimidin-Einheit zugeordnet.<sup>[135]</sup>

## 5.2. Die Genetik des Synthesewegs zur Thiazol-Einheit

Thiazol-Gene konnte man auf Chromosomen von *E. coli*<sup>[9]</sup> und *S. typhimurium*<sup>[136]</sup> in einem Cluster eng miteinander verknüpfter Thiamin-Gene bei 90 min lokalisieren. Die Transkription des *S.-typhimurium*-Clusters wird von Thiamin reguliert. Der *E.-coli*-Cluster (Tabelle 2) wurde kloniert und sequenziert. Die *thiF*-, *thiG*- und *thiH*-Mutanten reagierten nicht auf 1-Desoxy-D-xylulose 15, was darauf hindeutet, daß diese Gene für die Thiazol-Synthese aus 15 benötigt werden. Die gemessenen Molekülmassen für die Polypeptide, die aus *thiF* und *thiG* exprimiert wurden, waren um einiges kleiner, als die, die aus der DNA-Sequenz vorhergesagt wurden.<sup>[9]</sup> Die für das *thiF*-Polypeptid vorhergesagte Sequenz ist homolog zu der vom MoeB-Protein, das vermutlich am Schwefeleinbau in der Biosynthese von Molybdopterin beteiligt ist. Die Untersuchungen zur Genetik ergaben, daß die Thiazol-Biosynthese in Enterobakterien vermutlich mindestens vier enzymkatalysierte Schritte umfaßt, die Art der Schritte muß allerdings noch ermittelt werden.

Einzelne Gene des Thiazol-Synthesewegs (Tabelle 2) wurden in mehreren Eukaryoten identifiziert. Ein Thiazol-Gen aus *P. sativum*, *thiA*, wurde auf dem Chromosom 2 kartiert.<sup>[130]</sup> Die Sequenzen der Gene *thi1* (*Zea mays*),<sup>[137]</sup> *thi2* oder *nmt2* (*S. pombe*)<sup>[111]</sup> und *THI4* oder *MOL1* (*S. cerevisiae*)<sup>[108]</sup> sind homolog zur Sequenz des *Fusarium*-Gens *sti35*, das für ein durch Stress induzierbares Protein codiert.<sup>[138]</sup> In jeder abgeleiteten Aminosäuresequenz befindet sich eine mutmaßliche Bin-

dungsstelle für ein Dinucleotid; demnach ist ein NAD- oder FAD-Enzym am Thiazol-Syntheseweg beteiligt.<sup>[137]</sup> Die Expression von *thi2* kann sowohl durch Thiamin als auch durch die Thiazol-Einheit unterdrückt werden. Sie wird von vier Regulator-Genen (*tnr1*, *tnr2*, *tnr3* und *thi1*) kontrolliert.<sup>[110, 129]</sup> Das allele Gen *nmt2* wird zusammen mit *nmt1* reguliert.<sup>[111]</sup>

## 5.3. Die Genetik der Kupplung

Die Gene, die für das Kupplungsenzym und die fünf Kinasen codieren, die an den letzten Schritten der Thiaminpyrophosphat-Biosynthese beteiligt sind, befinden sich in vier Abschnitten des *E.-coli*-Chromosoms (Tabelle 2). Das *thiE*-Gen wurde ursprünglich dem Thiazol-Syntheseweg zugeordnet;<sup>[9]</sup> es codiert allerdings für ein Enzym, das die phosphorylierten Untereinheiten verknüpft.<sup>[75]</sup> Es wurde sequenziert<sup>[9]</sup> und in *E. coli* BL21 (DE3) überexprimiert.<sup>[75]</sup> Das überexprimierte Polypeptid katalysiert die Kupplung der heterocyclischen Untereinheiten 3 und 5. Dagegen ist eine Thiazol-Einheit mit *p*-Hydroxybenzylgruppe kein Substrat, was darauf hindeutet, daß diese Gruppe des Tyrosin-Vorläufers (siehe Schema 7) vor der Kupplung der Untereinheiten abgespalten wird. Eine *E.-coli*-Transformante mit den Genen *thiK* (Thiamin-Kinase) und *thiL* (Thiaminmonophosphat-Kinase) wies eine erhöhte Konzentration an Thiaminphosphaten auf.<sup>[139]</sup> Über die Genetik anderer Bakterien ist nicht viel bekannt. So wurde ein Operon aus *B. subtilis* sequenziert, das Thiamin-Gene enthält,<sup>[140]</sup> und auf einem Megaplasmid von *Rhizobium meliloti* wurden Gene lokalisiert, die *E.-coli-thi*-Mutanten komplementieren.<sup>[141]</sup>

Bei *E. coli* wurden Gene und Enzyme charakterisiert, die den Phosphorylierungs- oder Kupplungsschritten zugeordnet werden konnten. Dagegen codieren die eukaryotischen Gene *THI6* (*S. cerevisiae*)<sup>[115]</sup> und *thi4* (*S. pombe*)<sup>[102, 107, 116]</sup> für bifunktionelle Enzyme, die sowohl Thiazol-Kinase- als auch Thiaminphosphat-Pyrophosphorylase-Aktivität aufweisen. Die Molekülmasse, die für das *THI6*-Genprodukt errechnet wurde, entspricht der für das gereinigte Enzym gemessenen.<sup>[85]</sup> Einige Bereiche der Aminosäuresequenz sind homolog zu denen, die für die *thiE*- und *thiF*-Genprodukte bei *E. coli* vorhergesagt wurden.<sup>[115]</sup> Das *thi4*-Gen von *S. pombe* wird von Thiamin und – zu einem gewissen Grad – auch von der Thiazol-Einheit reprimiert.<sup>[107]</sup>

Die Gene *PHO3* (*S. cerevisiae*)<sup>[101, 119]</sup> und *pho4* (*S. pombe*),<sup>[101, 103, 122]</sup> die für eine durch Thiamin reprimierbare Saure Phosphatase (EC 3.1.3.2) codieren, wurden sequenziert und sind sich nur zu 27% ähnlich.<sup>[103]</sup> Jedes Gen weist eine viel stärker ausgeprägte Homologie zu den entsprechenden durch Phosphat reprimierbaren Genen *PHO5*<sup>[119]</sup> und *pho1* der Sauren Phosphatase auf.<sup>[142]</sup> Gemäß der Gensequenzen beider Hefen enthalten die durch Phosphat und Thiamin reprimierbaren Sauren Phosphatasen spaltbare Aminosäure-Signalsequenzen und eine gleiche Zahl potentieller Glycosilierungsstellen.<sup>[103, 119]</sup>

Wie Experimente unter Genzerstörung ergaben, sind die Gene *THI80* (*S. cerevisiae*)<sup>[123]</sup> und *trn3* (*S. pombe*),<sup>[116]</sup> die für die Thiamin-Pyrophosphokinase (EC 2.7.6.2) codieren, für das Wachstum essentiell. Eine verminderte Aktivität der Thiamin-Pyrophosphokinase wurde in *thi80*-<sup>[143]</sup> und *trn3*-Mutanten

ten<sup>[116]</sup> festgestellt. Die carboxyterminale Aminosäuresequenz des *trn3*-Polypeptids ist zu 31 % identisch<sup>[116]</sup> mit der des kürzeren Polypeptids, das von *THI80*<sup>[123]</sup> codiert wird.

Die Thiamin-Biosynthese in Hefen wird von mehreren Regulator-Genen kontrolliert. Die beiden positiven Regulatoren *THI2* (*PHO6*)<sup>[124, 125]</sup> und *THI3*<sup>[126]</sup> in *S. cerevisiae* dienen zur Expression der durch Thiamin reprimierbaren Sauren Phosphatase sowie der Enzyme, die zur Phosphorylierung und Kupplung der Pyrimidin- und Thiazol-Einheiten notwendig sind.<sup>[125, 126]</sup> In *S. pombe* kontrollieren drei negative Regulatoren (*tnt1*, *tnt2* und *tnt3*) und ein positiver Regulator (*thi1*)<sup>[107, 129]</sup> die Gene *pho4* und *thi4* sowie *thi3* und *thi2* aus dem Pyrimidin- bzw. dem Thiazol-Syntheseweg. Das *tnt3*-Genprodukt, die Thiamin-Pyrophosphokinase, hat sowohl eine katalytische als auch eine Regulator-Funktion.<sup>[116]</sup> Die Sequenz des positiven Regulators *thi1* ist homolog zu den Sequenzen der Transkriptionsfaktoren aus *S. cerevisiae*, die eine Cys<sub>6</sub>-Zinkfinger-Domäne enthalten.<sup>[127]</sup>

Bei der *thi1*-Mutante der höheren Pflanze *A. thaliana* fehlt die Thiaminphosphat-Pyrophosphorylase.<sup>[87]</sup> Das Gen *thiB* aus der höheren Pflanze *P. sativum* wurde auf dem Chromosom 6 kartiert.<sup>[130]</sup> Da die *thiB*-Mutanten nur auf die Zufuhr von intaktem Thiamin reagierten, muß das *thiB*-Genprodukt an der Kupplung der Untereinheiten oder an einem späteren Schritt des Synthesewegs beteiligt sein.

## 6. Zusammenfassung und Ausblick

Wie Untersuchungen an Pflanzen und mehreren Arten von Mikroorganismen ergaben, existieren unterschiedliche Wege für die Thiamin-Biosynthese. Die meisten Enzyme und Gene, die an den Phosphorylierungs- und Kupplungsschritten (siehe Schema 11) beteiligt sind, konnten identifiziert werden. Thiaminpyrophosphat wird in Enterobakterien direkt aus Thiaminmonophosphat, in Hefen und aeroben Bakterien aus Thiamin gebildet. Die Phosphorylierung der Thiazol-Einheit und die Kupplung der Untereinheiten wird in Hefen von einem einzigen Enzym katalysiert, während in Enterobakterien für jeden Schritt verschiedene Enzyme genutzt werden. Über die Mechanismen dieser enzymkatalysierten Reaktionen ist zur Zeit sehr wenig bekannt.

Bei Hefen und Enterobakterien wurden verschiedene frühe Vorstufen für jede der beiden heterocyclischen Untereinheiten durch Isotopenmarkierungsexperimente identifiziert. Die unmittelbaren Vorstufen der Pyrimidin-Einheit sind bei Hefen noch unbekannt; vermutlich liegen zwei Synthesewege vor, einer in Hefen und einer in Enterobakterien. Über die Art der frühen Vorstufen der beiden Untereinheiten bei aeroben Bakterien und höheren Pflanzen ist noch weniger Information verfügbar.

Wahrscheinlich verlaufen die Synthesewege zu jeder Untereinheit über mehrere enzymkatalysierte Schritte. Allerdings wurden bisher weder obligate Zwischenstufen identifiziert, noch Enzyme nachgewiesen, die für diese Synthesewege spezifisch sind. Lediglich einige wenige Gene konnten lokalisiert werden. Weil Mikroorganismen nur sehr geringe Mengen an Thiamin produzieren, werden weitere Fortschritte auf diesem Gebiet vermutlich nur durch die Untersuchung überexprimierter Genprodukte erzielt werden.

Unserer Ansicht nach können die Zwischenstufen und der detaillierte Mechanismus der Biosynthesewege zur Pyrimidin- und Thiazol-Einheit nur durch Kombination aus genetischen, enzymologischen und chemischen (Isotopen- und Synthese-) Methoden ermittelt werden. Wir hoffen, daß durch die vorliegende Übersicht über den gegenwärtigen Kenntnisstand Wissenschaftler dazu ermutigt werden, durch Kombination dieser Methoden das schwierige Problem der Thiamin-Biosynthese zu lösen.

*Wir danken für die finanzielle Unterstützung durch das National Institute of General Medical Sciences, den US Public Health Service (GM50778 für I. D. S.) und durch das Natural Sciences and Engineering Research Council of Canada (R. L. W.).*

Eingegangen am 18. März,  
veränderte Fassung vom 28. Oktober 1996 [A 159]  
Übersetzt von Dipl.-Chem. E. Kiefer, Linkenheim-Hochstetten

- [1] B. C. P. Jansen in *The Vitamins Chemistry, Physiology, Pathology, Methods*, Vol. 5 (Hrsg.: W. H. Sebrell, Jr., R. S. Harris), 2. Aufl., Academic Press, New York, 1972, S. 99–102.
- [2] a) R. R. Williams, R. D. Spies, *Vitamin B<sub>1</sub> (Thiamin) and its Use in Medicine*, MacMillan, New York, 1938, S. 138–143; b) *ibid.*, S. 144–157; c) *ibid.*, S. 123–129; d) *ibid.*, S. 134–135.
- [3] Für weitere Berichte über Entdeckung [2a], Isolierung [2a], Strukturaufklärung und Synthese [2b] von Thiamin siehe z. B.: a) E. P. Steyn-Parvé, C. H. Monfoort in *Comprehensive Biochemistry*, Vol. 11 (Hrsg.: M. Florkin, E. H. Stotz), Elsevier, Amsterdam, 1963, S. 3–22; b) W. Friedrich, *Vitamins*, de Gruyter, Berlin, 1988, S. 341–346.
- [4] K. Lohmann, P. Schuster, *Naturwissenschaften* 1937, 25, 26–27.
- [5] Die Bezeichnung Thiamin wurde 1937 [2d] für 6 vorgeschlagen und 1965 von der International Union of Biochemistry empfohlen. *IUPAC Information Bulletin*, Nr. 25, February 1966, S. 19 oder *Eur. J. Biochem.* 1967, 2, 1–2. Dieser Name ersetzt ältere Bezeichnungen wie Antiberiberi-Vitamin oder Aneurin.
- [6] G. Moine, H.-P. Hohmann in *Ullmann's Encyclopedia of Industrial Chemistry*, Vol. 27 (Hrsg.: B. Elvers, S. Hawkins), 5. Aufl., VCH, Weinheim, Germany, 1996, S. 506–521.
- [7] National Research Council (U. S.), Subcommittee on the 10th Edition of the RDAs Food and Nutrition Board Commission on Life Sciences, *Recommended Dietary Allowances*, 10. Aufl., National Academy Press, Washington, 1989, S. 125–132.
- [8] a) G. M. Brown in *Metabolic Pathways*, Vol. 4 (Hrsg.: D. M. Greenberg), 3. Aufl., Academic Press, New York, 1970, S. 369–381; b) *Comprehensive Biochemistry*, Vol. 21 (Hrsg.: M. Florkin, E. H. Stotz), Elsevier, Amsterdam, 1971, S. 1–9; c) I. G. Leder in *Metabolic Pathways*, Vol. 7 (Hrsg.: D. M. Greenberg), 3. Aufl., Academic Press, New York, 1975, S. 57–85.
- [9] P. B. Vander Horn, A. D. Backstrom, V. Stewart, T. P. Begley, *J. Bacteriol.* 1993, 175, 982–992.
- [10] D. W. Young, *Nat. Prod. Rep.* 1986, 3, 395–419.
- [11] G. M. Brown, J. M. Williamson in *Escherichia coli and Salmonella typhimurium. Cellular and Molecular Biology*, Vol. 1 (Hrsg.: F. C. Neidhardt), American Society for Microbiology, Washington, 1987, S. 521–538.
- [12] K. Himmeldirk, I. D. Spenser, unveröffentlichte Ergebnisse.
- [13] K. Himmeldirk, I. A. Kennedy, R. E. Hill, B. G. Sayer, I. D. Spenser, *Chem. Commun.* 1996, 1187–1188.
- [14] Siehe Fußnoten 6 und 7 in G. Grue-Sørensen, I. D. Spenser, *Can. J. Chem.* 1989, 67, 998–1009.
- [15] R. E. Hill, I. D. Spenser in *Vitamin B6 Pyridoxal Phosphate: Chemical, Biochemical, and Medical Aspects*, Part A (Hrsg.: D. Dolphin, R. Poulson, O. Avramovic), Wiley, New York, 1986, S. 417–476.
- [16] M. J. Pine, R. Guthrie, *J. Bacteriol.* 1959, 78, 545–549.
- [17] H. Kumaoka, G. M. Brown, *Arch. Biochem. Biophys.* 1967, 122, 378–384.
- [18] B. Estramareix, M. Lesieur, *Biochim. Biophys. Acta* 1969, 192, 375–377.
- [19] K. Yamada, M. Morisaki, H. Kumaoka, *Biochim. Biophys. Acta* 1983, 756, 41–48.
- [20] S. David, B. Estramareix, H. Hirshfeld, *Biochim. Biophys. Acta* 1967, 148, 11–21.
- [21] K. Uchida, K. Yamada, H. Kumaoka, *Bitamin* 1982, 56, 235–240.
- [22] G. Grue-Sørensen, R. L. White, I. D. Spenser, *J. Am. Chem. Soc.* 1986, 108, 146–158.
- [23] P. C. Newell, R. G. Tucker, *Biochem. J.* 1968, 106, 271–277.
- [24] B. Estramareix, *Biochim. Biophys. Acta* 1970, 208, 170–171.
- [25] R. H. White, F. B. Rudolph, *Biochemistry* 1979, 18, 2632–2636.
- [26] R. L. White, I. D. Spenser, *Biochem. J.* 1979, 179, 315–325.

[27] P. E. Linnett, J. Walker, *Biochem. J.* **1968**, *109*, 161–168.

[28] K. Yamada, K. Tazuya, H. Kumaoka, *Bitamin* **1990**, *64*, 295–299.

[29] K. Tazuya, M. Tanaka, M. Morisaki, K. Yamada, H. Kumaoka, *Biochem. Int.* **1987**, *14*, 769–777.

[30] Für eine neuere Zusammenfassung der frühen Literatur siehe: T. Kozluk, I. D. Spenser, *J. Am. Chem. Soc.* **1987**, *109*, 4698–4702.

[31] P. C. Newell, R. G. Tucker, *Biochem. J.* **1968**, *106*, 279–287.

[32] B. Estramareix, S. David, *Biochim. Biophys. Acta* **1990**, *1035*, 154–160.

[33] a) K. Yamada, H. Kumaoka, *Biochem. Int.* **1982**, *5*, 771–776; b) *J. Nutr. Sci. Vitaminol.* **1983**, *29*, 389–398.

[34] B. Estramareix, M. Thérissod, *J. Am. Chem. Soc.* **1984**, *106*, 3857–3860.

[35] B. Estramareix, S. David, *Biochim. Biophys. Res. Commun.* **1986**, *134*, 1136–1141.

[36] K. Tazuya, M. Yamamoto, M. Hayashiji, K. Yamada, H. Kumaoka, *Biochem. Int.* **1986**, *12*, 661–668.

[37] W. H. Sträfling, *FEBS Lett.* **1970**, *9*, 27–29.

[38] a) K. Tazuya, K. Yamada, H. Kumaoka, *Biochim. Biophys. Acta* **1989**, *990*, 73–79; b) K. Tazuya, C. Azumi, K. Yamada, H. Kumaoka, *Bitamin* **1993**, *67*, 681–688.

[39] K. Tazuya, K. Yamada, H. Kumaoka, *Biochem. Mol. Biol. Int.* **1993**, *30*, 893–899.

[40] a) K. Tazuya, C. Azumi, K. Yamada, H. Kumaoka, *Biochem. Mol. Biol. Int.* **1994**, *33*, 769–774; b) *ibid.* **1995**, *36*, 883–888.

[41] K. Yamada, persönliche Mitteilung.

[42] R. L. Baxter, A. B. Hanley, H. W. S. Chan, *J. Chem. Soc. Perkin Trans. 1* **1990**, 2963–2966.

[43] D. M. Greenberg in *Metabolic Pathways*, Vol. 3 (Hrsg.: D. M. Greenberg), 3. Aufl., Academic Press, New York, **1969**, S. 129–136.

[44] V. Herbert, J. R. Bertino in *The Vitamins Chemistry, Physiology, Pathology, Methods*, Vol. 7 (Hrsg.: P. György, W. N. Pearson), 2. Aufl., Academic Press, New York, **1967**, S. 243–276.

[45] I. D. Spenser, R. E. Hill, *Nat. Prod. Rep.* **1995**, *12*, 555–565.

[46] L. G. Sparrow, P. P. K. Ho, T. K. Sundaram, D. Zach, E. J. Nyns, E. E. Snell, *J. Biol. Chem.* **1969**, *244*, 2590–2600.

[47] a) T. Yagi, G. M. Kishore, E. E. Snell, *J. Biol. Chem.* **1983**, *258*, 9419–9425; b) M. J. K. Nelson, E. E. Snell, *ibid.* **1986**, *261*, 15115–15120.

[48] M. S. Huynh, E. E. Snell, *J. Biol. Chem.* **1985**, *260*, 2379–2383.

[49] H. Kumaoka, *J. Vitaminol.* **1963**, *9*, 188–190.

[50] K. Tazuya, K. Yamada, K. Nakamura, H. Kumaoka, *Biochim. Biophys. Acta* **1987**, *924*, 210–215.

[51] K. Yamada, *Bitamin* **1992**, *66*, 1–24.

[52] B. Estramareix, D. Gaudry, M. Thérissod, *Biochimie* **1977**, *59*, 857–859.

[53] E. DeMoll, W. Shive, *Biochim. Biophys. Res. Commun.* **1985**, *132*, 217–222.

[54] E. Bellion, D. H. Kirkley, *Biochim. Biophys. Acta* **1977**, *497*, 323–328.

[55] C. H. S. Hitchcock, J. Walker, *Biochem. J.* **1961**, *80*, 137–148.

[56] K. Tazuya, M. Morisaki, K. Yamada, H. Kumaoka, K. Saiki, *Biochem. Int.* **1987**, *14*, 153–160.

[57] R. L. White, unveröffentlichte Ergebnisse.

[58] P. E. Linnett, J. Walker, *J. Chem. Soc. C* **1967**, 796–799.

[59] P. E. Linnett, J. Walker, *Biochim. Biophys. Acta* **1969**, *184*, 381–385.

[60] E. Bellion, D. H. Kirkley, J. R. Faust, *Biochim. Biophys. Acta* **1976**, *437*, 229–237.

[61] R. H. White, F. B. Rudolph, *Biochim. Biophys. Acta* **1978**, *542*, 340–347.

[62] B. Estramareix, M. Thérissod, *Biochim. Biophys. Acta* **1972**, *273*, 275–282.

[63] J.-H. Julliard, R. Douce, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1991**, *88*, 2042–2045.

[64] R. H. White, *Biochim. Biophys. Acta* **1979**, *583*, 55–62.

[65] R. H. White, *Biochemistry* **1978**, *17*, 3833–3840.

[66] R. H. White, *Experientia* **1980**, *36*, 637–638.

[67] a) S. David, B. Estramareix, J.-C. Fischer, M. Thérissod, *J. Am. Chem. Soc.* **1981**, *103*, 7341–7342; b) *J. Chem. Soc. Perkin Trans. 1* **1982**, 2131–2137.

[68] M. Thérissod, J.-C. Fischer, B. Estramareix, *Biochim. Biophys. Res. Commun.* **1981**, *98*, 374–379.

[69] I. A. Kennedy, T. Hemscheidt, J. F. Britten, I. D. Spenser, *Can. J. Chem.* **1995**, *73*, 1329–1337.

[70] a) L. Slechta, L. E. Johnson, *J. Antibiot.* **1976**, *29*, 685–687; b) H. Hoeksema, L. Baczyński, *ibid.* **1976**, *29*, 688–691.

[71] A. Yokota, K.-I. Sasajima, *Agric. Biol. Chem.* **1984**, *48*, 149–158.

[72] A. Yokota, K.-I. Sasajima, *Agric. Biol. Chem.* **1986**, *50*, 2517–2524.

[73] C. Drewke, M. Klein, D. Clade, A. Arenz, R. Müller, E. Leistner, *FEBS Lett.* **1996**, *390*, 179–182.

[74] I. Sanyal, S.-L. Lee, D. H. Flint, *J. Am. Chem. Soc.* **1994**, *116*, 2637–2638.

[75] A. D. Backstrom, R. A. S. McMordie, T. P. Begley, *J. Am. Chem. Soc.* **1995**, *117*, 2351–2352.

[76] B. Estramareix, M. Thérissod, *Biochim. Biophys. Res. Commun.* **1980**, *95*, 1017–1022.

[77] M. Thérissod, D. Gaudry, B. Estramareix, *Nouv. J. Chim.* **1978**, *2*, 119–121.

[78] R. L. White, I. D. Spenser, *J. Am. Chem. Soc.* **1979**, *101*, 5102–5104.

[79] R. L. White, I. D. Spenser, *J. Am. Chem. Soc.* **1982**, *104*, 4934–4943.

[80] K. Yamada, M. Yamamoto, M. Hayashiji, K. Tazuya, H. Kumaoka, *Biochem. Int.* **1985**, *10*, 689–694.

[81] Y. Kayama, T. Kawasaki, *Arch. Biochem. Biophys.* **1973**, *158*, 242–248.

[82] Y. Nose, Y. Tokuda, M. Hirabayashi, A. Iwashima, *J. Vitaminol.* **1964**, *10*, 105–110.

[83] G. W. Caminer, G. M. Brown, *J. Biol. Chem.* **1960**, *235*, 2411–2417.

[84] a) I. G. Leder, *J. Biol. Chem.* **1961**, *236*, 3066–3071; b) *Methods Enzymol.* **1970**, *18A*, 207–212.

[85] Y. Kawasaki, *J. Bacteriol.* **1993**, *175*, 5153–5158.

[86] a) H. Mitsuda, T. Tanaka, F. Kawai, *J. Vitaminol.* **1970**, *16*, 263–267; b) H. Mitsuda, T. Tanaka, Y. Takii, F. Kawai, *ibid.* **1971**, *17*, 89–95.

[87] Y. Komeda, M. Tanaka, T. Nishimura, *Plant Physiol.* **1988**, *88*, 248–250.

[88] H. Nakayama, *Bitamin* **1990**, *64*, 619–632.

[89] a) L. M. Lewin, G. M. Brown, *J. Biol. Chem.* **1961**, *236*, 2768–2771; b) G. M. Brown, *Methods Enzymol.* **1970**, *18A*, 203–207.

[90] Suzuki-Zirô, A. Kobata, *J. Biochem. (Tokyo)* **1960**, *47*, 262–265.

[91] a) H. Nishino, A. Iwashima, Y. Nose, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **1971**, *45*, 363–368; b) H. Nishino, *J. Biochem. (Tokyo)* **1972**, *72*, 1093–1100.

[92] a) A. Iwashima, H. Nishino, Y. Nose, *Biochim. Biophys. Acta* **1972**, *258*, 333–336; b) H. Nakayama, R. Hayashi, *J. Bacteriol.* **1972**, *109*, 936–938; *ibid.* **1972**, *112*, 1118–1126.

[93] a) H. Sanemori, Y. Egi, T. Kawasaki, *J. Bacteriol.* **1976**, *126*, 1030–1036; b) H. Sanemori, T. Kawasaki, *J. Biochem. (Tokyo)* **1980**, *88*, 223–230.

[94] a) E. P. Steyn-Parvé, *Biochim. Biophys. Acta* **1952**, *8*, 310–324; b) N. Shimazono, Y. Mano, R. Tanaka, Y. Kaziro, *J. Biochem. (Tokyo)* **1959**, *46*, 959–961; c) Y. Kaziro, *ibid.* **1959**, *46*, 1523–1539; d) Y. Kaziro, R. Tanaka, Y. Mano, N. Shimazono, *ibid.* **1961**, *49*, 472–476.

[95] A. I. Voskoboyev, Y. M. Ostrovsky, *Ann. NY Acad. Sci.* **1982**, *378*, 161–176.

[96] a) H. Mitsuda, Y. Takii, K. Iwami, K. Yasumoto, *J. Nutr. Sci. Vitaminol.* **1975**, *21*, 19–26; b) *ibid.* **1975**, *21*, 103–115; c) *ibid.* **1975**, *21*, 189–98.

[97] a) F. Leuthardt, H. Nielsen, *Helv. Chim. Acta* **1952**, *35*, 1196–1209; b) Y. Mano, *J. Biochem. (Tokyo)* **1960**, *47*, 283–289; c) C. J. Gubler, *Methods Enzymol.* **1970**, *18A*, 219–221; d) Y. Egi, S. Koyama, T. Shioda, K. Yamada, T. Kawasaki, *Biochim. Biophys. Acta* **1992**, *1160*, 171–178.

[98] T. Kawasaki, Y. Egi, H. Sanemori, *J. Bacteriol.* **1977**, *130*, 542–544.

[99] K. Nosaka, H. Nishimura, A. Iwashima, *Biochim. Biophys. Acta* **1988**, *967*, 49–55.

[100] K. Nosaka, *Biochim. Biophys. Acta* **1990**, *1037*, 147–154.

[101] M. E. Schweingruber, R. Fluri, K. Maundrell, A.-M. Schweingruber, E. Dumermuth, *J. Biol. Chem.* **1986**, *261*, 15877–15882.

[102] A. M. Schweingruber, J. Dlugonski, E. Edenharter, M. E. Schweingruber, *Curr. Genet.* **1991**, *19*, 249–254.

[103] J. Yang, M. E. Schweingruber, *Curr. Genet.* **1990**, *18*, 269–272.

[104] a) T. Kawasaki, Y. Nose, *J. Biochem. (Tokyo)* **1969**, *65*, 417–425; b) B. J. Bachmann, K. B. Low, A. L. Taylor, *Bacteriol. Rev.* **1976**, *40*, 116–167.

[105] L. Van Dyck, A. Pascual-Ahuir, B. Purnelle, A. Goffeau, *Yeast* **1995**, *11*, 987–991.

[106] K. Maundrell, *J. Biol. Chem.* **1990**, *265*, 10857–10864.

[107] A. Zurlinden, M. E. Schweingruber, *J. Bacteriol.* **1994**, *176*, 6631–6635.

[108] a) U. M. Praekelt, P. A. Meacock, *Yeast* **1992**, *8*, 699–710; b) U. M. Praekelt, K. L. Byrne, P. A. Meacock, *ibid.* **1994**, *10*, 481–490.

[109] J. Skala, A. Nawrocki, A. Goffeau, *Yeast* **1995**, *11*, 1421–1427.

[110] A. Zurlinden, M. E. Schweingruber, *Gene* **1992**, *117*, 141–143.

[111] A. G. O. Manetti, M. Rosetto, K. G. Maundrell, *Yeast* **1994**, *10*, 1075–1082.

[112] T. P. Begley, *Nat. Prod. Rep.* **1996**, *13*, 177–185.

[113] N. Imamura, H. Nakayama, *Experientia* **1981**, *37*, 1265–1266.

[114] T. Mizote, H. Nakayama, *J. Bacteriol.* **1989**, *171*, 3228–3232.

[115] K. Nosaka, H. Nishimura, Y. Kawasaki, T. Tsujihara, A. Iwashima, *J. Biol. Chem.* **1994**, *269*, 30510–30516.

[116] H. Fankhauser, A. Zurlinden, A.-M. Schweingruber, E. Edenharter, M. E. Schweingruber, *J. Biol. Chem.* **1995**, *270*, 28457–28462.

[117] a) T. Kawasaki, T. Nakata, Y. Nose, *J. Bacteriol.* **1968**, *95*, 1483–1485; b) A. L. Taylor, *Bacteriol. Rev.* **1970**, *34*, 155–175.

[118] N. Imamura, H. Nakayama, *J. Bacteriol.* **1982**, *151*, 708–717; Berichtigung: *ibid.* **1982**, *152*, 1308.

[119] W. Bajwa, B. Meyhac, H. Rudolph, A.-M. Schweingruber, A. Hinnen, *Nucl. Acids Res.* **1984**, *12*, 7721–7739.

[120] K. Nosaka, Y. Kaneko, H. Nishimura, A. Iwashima, *FEMS Microbiol. Lett.* **1989**, *60*, 55–59.

[121] A. Toh-e, Y. Ueda, S.-I. Kakimoto, Y. Oshima, *J. Bacteriol.* **1973**, *113*, 727–738.

[122] K. Maundrell, P. Nurse, F. Schönholzer, M. E. Schweingruber, *Gene* **1985**, *39*, 223–230.

[123] K. Nosaka, Y. Kaneko, H. Nishimura, A. Iwashima, *J. Biol. Chem.* **1993**, *268*, 17440–17447.

[124] H. Nishimura, Y. Kawasaki, Y. Kaneko, K. Nosaka, A. Iwashima, *FEBS Lett.* **1992**, *297*, 155–158.

[125] Y. Kawasaki, K. Nosaka, Y. Kaneko, H. Nishimura, A. Iwashima, *J. Bacteriol.* **1990**, *172*, 6145–6147.

[126] H. Nishimura, Y. Kawasaki, Y. Kaneko, K. Nosaka, A. Iwashima, *J. Bacteriol.* **1992**, *174*, 4701–4706.

[127] H. Fankhauser, M. E. Schweingruber, *Gene* **1994**, *147*, 141–144.

[128] C. S. L. Tang, A. Bueno, P. Russell, *J. Biol. Chem.* **1994**, *269*, 11921–11926.

[129] A.-M. Schweingruber, H. Fankhauser, J. Dlugonski, C. Steinmann-Loss, M. E. Schweingruber, *Genetics* **1992**, *130*, 445–449.

[130] S. Kumar, S. B. Sharma, *Mol. Gen. Genet.* **1986**, *204*, 473–476.

[131] W. M. Proebsting, S. P. Maggard, W. W. Guo, *J. Plant Physiol.* **1990**, *136*, 231–235.

[132] D. M. Downs, J. R. Roth, *J. Bacteriol.* **1991**, *173*, 6597–6604.

[133] a) D. M. Downs, *J. Bacteriol.* **1992**, *174*, 1515–1521; b) L. Petersen, J. Enos-Berlage, D. M. Downs, *Genetics* **1996**, *143*, 37–44.

[134] D. M. Downs, L. Petersen, *J. Bacteriol.* **1994**, *176*, 4858–4864.

[135] L. Petersen, D. M. Downs, *J. Bacteriol.* **1996**, *178*, 5676–5682.

[136] E. Webb, F. Febres, D. M. Downs, *J. Bacteriol.* **1996**, *178*, 2533–2538.

[137] F. C. Belanger, T. Leustek, B. Chu, A. L. Kriz, *Plant Mol. Biol.* **1995**, *29*, 809–821.

[138] G. H. Choi, E. T. Marek, C. L. Schardl, M. G. Richey, S. Chang, D. A. Smith, *J. Bacteriol.* **1990**, *172*, 4522–4528.

[139] T. Fujio, M. Hayashi, A. Iida, T. Nishi, T. Hagihara (Kyowa Hakko Kogyo Company, Ltd.), EP-A 417953, **1991** [*Chem. Abstr.* **1991**, *114*, 227508t].

[140] P. Glaser, F. Kunst, M. Arnaud, M.-P. Coudart, W. Gonzales, M.-F. Hullo, M. Ionescu, B. Lubochinsky, L. Marcelino, I. Moszer, E. Presecan, M. Santanna, E. Schneider, J. Schweizer, A. Vertes, G. Rapoport, A. Danchin, *Mol. Microbiol.* **1993**, *10*, 371–384.

[141] T. M. Finan, B. Kunkel, G. F. De Vos, E. R. Signer, *J. Bacteriol.* **1986**, *167*, 66–72.

[142] S. Elliott, C.-W. Chang, M. E. Schweingruber, J. Schaller, E. E. Rickli, J. Carbon, *J. Biol. Chem.* **1986**, *261*, 2936–2941.

[143] H. Nishimura, Y. Kawasaki, K. Nosaka, Y. Kaneko, A. Iwashima, *J. Bacteriol.* **1991**, *173*, 2716–2719.

## Hinterlegen von Daten aus Röntgenstrukturanalysen

Um Autoren und Gutachtern das Leben zu erleichtern, haben das Cambridge Crystallographic Data Centre (CCDC) und das Fachinformationszentrum Karlsruhe (FIZ) ihre Vorgehensweisen für das Hinterlegen von Daten zu Einkristall-Röntgenstrukturanalysen vereinheitlicht.

**Bitte hinterlegen Sie deshalb Ihre Daten vor dem Einreichen Ihres Beitrags elektronisch** bei der jeweils richtigen Datenbank, d. h. beim CCDC für organische und metallorganische Verbindungen und beim FIZ für anorganische Verbindungen. Beide Datenbanken geben Ihnen hier gerne Hilfestellung (siehe unsere *Hinweise für Autoren* im ersten Heft dieses Jahres). In der Regel wird Ihnen von dort innerhalb von zwei Arbeitstagen eine Hinterlegungsnummer mitgeteilt, die Sie bitte mit dem jeweiligen Standardtext (siehe *Hinweise für Autoren*) in Ihr Manuskript aufnehmen. Dies ermöglicht es Gutachtern, sich schnell und einfach die Strukturdaten zu besorgen, wenn sie Ihnen für die Urteilsfindung wichtig scheinen.

Dieses Verfahren wird einheitlich von den Redaktionen der Zeitschriften *Advanced Materials*, *Angewandte Chemie*, *Chemische Berichte/Recueil*, *Chemistry—A European Journal* und *Liebigs Annalen/Recueil* angewendet.