

Vitamin B<sub>12</sub>

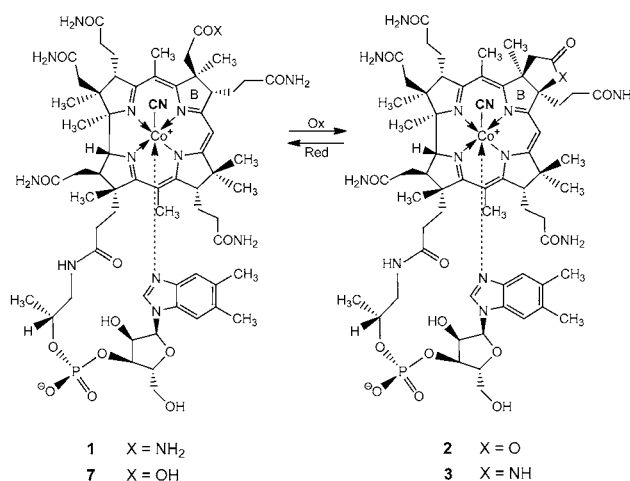
# Wiederherstellung des B<sub>12</sub>-Makrocyclus durch radikalischen Ringschluss eines blauen Secocorrins\*\*

Markus Ruetz, Sergey N. Fedosov\* und Bernhard Kräutler\*

Professor François Diederich zum 60. Geburtstag gewidmet

Der Cobyrsäureteil von Vitamin B<sub>12</sub> (**1**) beeindruckt als ein hoch substituiertes und stereochemisch komplexes Corrin.<sup>[1–4]</sup> Dessen Totalsynthese<sup>[5,6]</sup> wird von vielen als das Highlight in der organischen Synthese betrachtet.<sup>[7]</sup> Natürlich vorkommende Corrins besitzen einen Satz von charakteristischen Substituenten und strategisch positionierten Methylgruppen, die als Schutzschild gegen den Abbau angesehen werden. Die B<sub>12</sub>-Cofaktoren sind für ihre Aufgabe in der Katalyse der „schwierigen“ metallorganischen Enzymchemie in der Tat gut ausgerüstet.<sup>[8–11]</sup> Sie sind erstaunlich stabil und resistent, selbst unter den Bedingungen von Radikalreaktionen.<sup>[12]</sup> Die „Achillesferse“ natürlicher Cobalcorrine ist jedoch die enolisierbare 8-Position am Ring B: Oxidation von Vitamin B<sub>12</sub> (**1**) betrifft die 8-Position und führt effektiv zur Bildung analoger Corrinoiden, wie des Lactons **2** und des Lactams **3** (Schema 1).<sup>[13]</sup> Ein blaues Corrinoid wurde in einem erstaunlichen partiellen Abbau von Vitamin B<sub>12</sub> bei Raumtemperatur in wässriger Hydrogencarbonat-Lösung gebildet. Es zeigte sich, dass diese blaue Verbindung das Secocorrin **4** ist (Schema 2), bei dem die periphere C-C-Bindung zwischen den gesättigten Positionen 7 und 8 gespalten wurde.<sup>[14]</sup>

Wie hier berichtet, eignen sich die Carbonylfunktion am C8 und die Doppelbindung am C7 an der Stelle des beispiellosen C-C-Bindungsbruchs im blauen Secocorrin **4** für eine reduktive Wiederherstellung des Corrin-Liganden über einen bemerkenswerten Weg: Umsetzung der blauen 8-Oxo-7,8-*seco*-cobalamin-c-säure **4** mit NaBH<sub>4</sub> in einer sauerstofffreien wässrigen Lösung führte innerhalb weniger Minuten zu einem Farbwechsel von Blau nach Braun. Nach Luftoxidation und Aufarbeitung wurde rote 8 $\beta$ -Hydroxy-7-epicobalamin-c-Säure (**5**, 84 % Ausbeute) erhalten, in welcher der Corrinring wiederhergestellt war. Die UV/Vis- und CD-Spektren von **5** (Abbildung 1) passten zu jenen von Vitamin B<sub>12</sub> (**1**), was auf eine strukturelle Ähnlichkeit hindeutete. Ein ESI-MS von **5**



Schema 1.

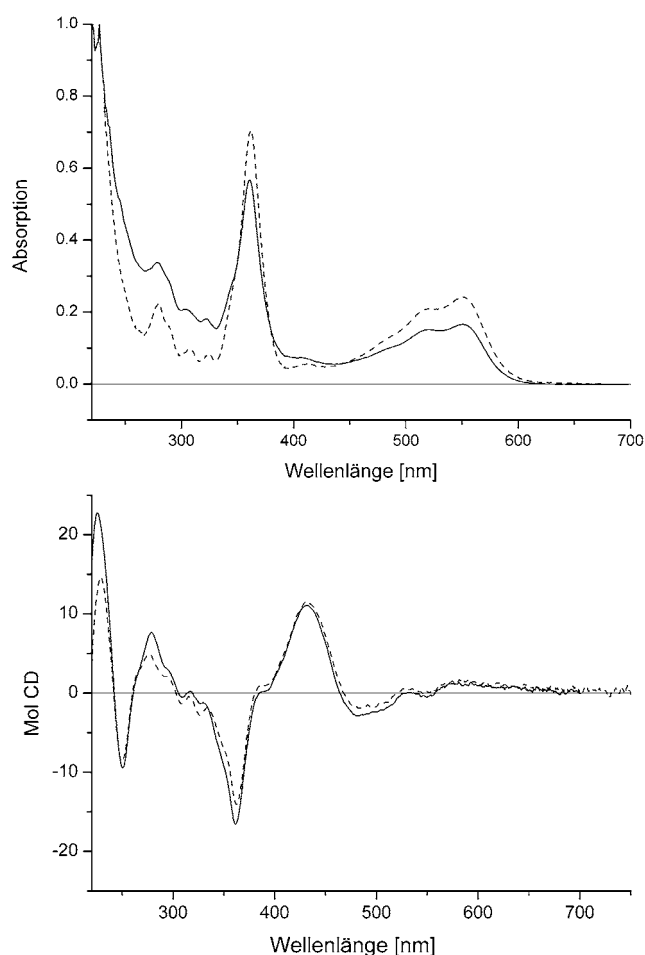
zeigte ein Pseudo-Molekülion bei *m/z* 1372.4, d.h. bei 2 Masseneinheiten mehr als das blaue Secocorrin **4** und 17 mehr als **1**. Der Vergleich der <sup>1</sup>H-NMR-Spektren von **5** mit jenen von **4** und **1** zeigte die erwarteten Unterschiede in der chemischen Verschiebung der Protonen am Ring B. Die vollständige Zuordnung der <sup>1</sup>H- und <sup>13</sup>C-Signale der H-Atome und aller C-Atome, mit Ausnahme des Cyanid-Kohlenstoffs (siehe Hintergrundinformationen, Tabelle S1), wurde mittels NMR-Spektren von **5** in D<sub>2</sub>O oder H<sub>2</sub>O/D<sub>2</sub>O (9:1) erhalten. Der Tieffeldbereich des <sup>1</sup>H-NMR-Spektrums von **5** wies hohe Ähnlichkeit mit Vitamin B<sub>12</sub> (**1**) auf.<sup>[15]</sup> Im Unterschied zum Spektrum des blauen Secocorrins **4** war z.B. das Signal bei 6.16 ppm (C7'-Vinylgruppe in **4**) nicht vorhanden. Ein HMBC-Spektrum zeigte Korrelationen zwischen den Protonen der d-Seitenkette und C7 und zwischen der c-Seitenkette und C8. Dies ergab den Nachweis für die Wiederherstellung der C7-C8-Bindung von Ring B in **5**. Jedoch besaß das C8 in **5** eine <sup>13</sup>C-Verschiebung von 86.3 ppm (d.h. verglichen mit C8 in **1** um 28.1 ppm tieffeldverschoben). Dieser Wert stimmte mit einer direkt gebundenen Hydroxygruppe überein. Aus den ROESY-Spektren von **5** konnte die relative Konfiguration am C7 und C8 bestimmt werden. (Abbildung S5). <sup>1</sup>H, <sup>1</sup>H-Korrelationen zwischen der Nukleotidbase und den Seitenketten c und d wiesen darauf hin, dass sich diese beiden Gruppen auf der „unteren“ α-Seite des Corrinrings befinden. Aus den spektroskopischen Daten wurde die Struktur von **5** als Co $\beta$ -Cyano-8 $\beta$ -hydroxy-7-epicobalamin-c-Säure abgeleitet (**5**, Schema 2).

[\*] Mag. M. Ruetz, Prof. Dr. B. Kräutler  
Institut für Organische Chemie und Centrum für Molekulare  
Biowissenschaften (CMBI), Universität Innsbruck  
Innrain 80/82, 6020 Innsbruck (Österreich)  
E-Mail: bernhard.kraeutler@uibk.ac.at  
Homepage: <http://www.uibk.ac.at/organic/en>

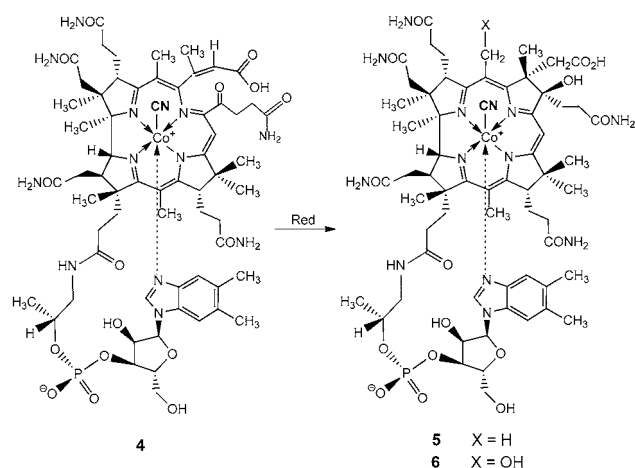
Dr. S. N. Fedosov  
Department of Engineering Science, Aarhus University, Science  
Park, Gustav Wieds Vej 10, 8000 Aarhus C (Dänemark)  
E-Mail: snf@mb.au.dk

[\*\*] Wir danken Dr. Thomas Müller für die Aufnahme der Massenspektren.

Hintergrundinformationen zu diesem Beitrag sind im WWW unter <http://dx.doi.org/10.1002/ange.201202878> zu finden.



**Abbildung 1.** UV/Vis-Spektren (oben) und CD-Spektren (unten) von **5** (schwarze Linien) und **1** (gestrichelte Linien) in Wasser. UV/Vis-Spektren:  $c(\mathbf{5}) = 2.57 \times 10^{-5}$  M;  $c(\mathbf{1}) = 3.2 \times 10^{-5}$  M. CD-Spektren:  $c(\mathbf{5}) = 2.57 \times 10^{-5}$  M;  $c(\mathbf{1}) = 2.4 \times 10^{-5}$  M.



**Schema 2.**

Wurde eine Lösung des 7,8-Secocobalamins **4** in Methanol bei  $-0.6$  V vs.  $0.1$  N Kalomel-Elektrode unter  $N_2$ -Atmosphäre reduziert, wechselte die Farbe von Blau nach Braun, was dem Vorhandensein von  $Co^{II}$ -Corrinen entsprach. Auch nach 4 h

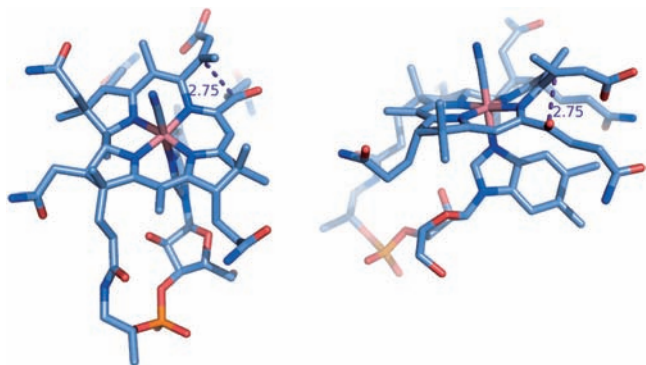
Elektrolyse, nachdem  $1.8 \text{ F mol}^{-1}$  verbraucht waren, blieb die Reduktionsmischung braun. Behandlung mit Luft führte zu einem sofortigen Farbwechsel nach Rot. Zwei rote Verbindungen mit nahezu identischen UV/Vis-Spektren (ca. 80 % Rohausbeute) wurden mittels HPLC gefunden und durch Umkehrphasen-Chromatographie getrennt. Die weniger polare Fraktion wurde mittels HPLC, UV/Vis- und NMR-Spektroskopie als  $8_\beta$ -Hydroxy-7-epicobalamin-c-säure **5** identifiziert. Das Pseudo-Molekölion im ESI-Spektrum (bei  $m/z$  1388.4) der polaren Verbindung **6** deutete im Vergleich zu **5** auf die Anwesenheit eines zusätzlichen Sauerstoffatoms hin. Das  $^1\text{H}$ -NMR-Spektrum von **6** zeigte ein neues AB-System bei 4.93/4.94 ppm, aber es fehlte das Singulett der Methylgruppe C51. Ansonsten war das Spektrum von **6** ähnlich jenem von **5**, einschließlich des bekannten Fehlens des Signals für das Proton am C8. Ebenfalls vorhanden waren die ROESY-Korrelationen der zwei Methylenprotonen der c-Seitenkette (bei 3.35/3.57 ppm) mit den Protonen der d-Seitenkette. Daher war die relative Konfiguration an den Positionen 7 und 8 in **6** die gleiche wie in **5**. Das neue AB-System (bei 4.93/4.94 ppm) korrelierte mit dem Proton der c-Seitenkette bei 3.57 ppm, der Methylgruppe C7A und dem Proton am C3. Deshalb befand sich das neue AB-System am C51, was das Fehlen des Singulett der Methylgruppe C51 erklärt. Im Hauptprodukt der elektrochemischen Reduktion von **4** waren also zwei Hydroxygruppen vorhanden, eine davon am C51. Das rote Corrinoid **6** wurde daher als  $Co_\beta$ -Cyano-51,8 $\beta$ -dihydroxy-7-epicobalamin-c-säure (**6**) identifiziert, mit einem intakten Corrinring und mit einer auf der  $\alpha$ -Seite des Corrin-Makrocyclus liegenden c-Seitenkette (Schema 2).

Zur Untersuchung der mechanistischen Grundlage der bemerkenswerten Bildung von **6** wurde eine elektrochemische Reduktion von **4** in  $CD_3OD$  durchgeführt. Die entsprechenden Produkte ( $[D_n]\text{-5}$  und  $[D_m]\text{-6}$ ) wurden auf ihre Isotopenmarkierung hin untersucht (siehe Hintergrundinformationen). Entsprechend den  $^1\text{H}$ -NMR- und ESI-MS-Spektren bestand  $[D_n]\text{-5}$  zu 45 % aus  $[D_1]\text{-5}$  und zu 55 % aus  $[D_2]\text{-5}$ , mit einem fast 100-proz. Deuterierungsgrad am C-51 und 45 % am C-81.

Der Corrinteil von Vitamin  $B_{12}$  verfügt über thermodynamische Eigenschaften,<sup>[1]</sup> die ihm eine faszinierende Neigung zur Renaturierung unter geeigneten Reaktionsbedingungen verleihen (z.B.: Reduktion des  $B_{12}$ -Oxidationsprodukts **2** ergibt  $B_{12}$ -c-Säure **7**).<sup>[5,16]</sup> Wie hier dargestellt, lieferte der reduktive Ringschluss von Ring B des blauen Secocorrins **4** das Corrin **5** und eröffnete einen neuen effizienten Weg zum  $B_{12}$ -Makrocyclus. In verwandten reduktiven C-C-Bindungsknüpfungen von Cobalt- oder Nickelkomplexen des 5,6-Secocorrins konnte der Corrinring von Cobyrynsäure-Derivaten ebenso wieder hergestellt werden.<sup>[17,18]</sup> Der Templateffekt von Übergangsmetallionen und die Redox-Kommunikation zwischen Tetrapyrrol-Ligand und dem koordinierten Metallzentrum wurden strategisch eingesetzt, um die entscheidenden Schritte der Ringbildung des Corrins zu unterstützen.<sup>[19,20]</sup> Die ursprünglichen Ansätze von Eschenmoser und Woodward für die vollständige Synthese von Vitamin  $B_{12}$  sahen eine besonders schwierige Aufgabe in der Bildung der hoch substituierten C-C-Bindung zwischen den Ringen A und D des Corrinrings.<sup>[5,6]</sup> Um diese Herausforde-

rung der Synthese zu meistern, wurde eine beeindruckende photochemische Ringschlussreaktion entwickelt.<sup>[21]</sup>

Der Spaltungsort von Ring B in **4** enthält zwei ungesättigte Kohlenstoffe (C7 und C8), die eine besondere kurze „nicht-bindende“ Wechselwirkung zeigen (2.75 Å).<sup>[14]</sup> (Abbildung 2). Der reduktive Ringschluss von Ring B erfolgt offensichtlich ohne Konformationsänderung der Substituen-



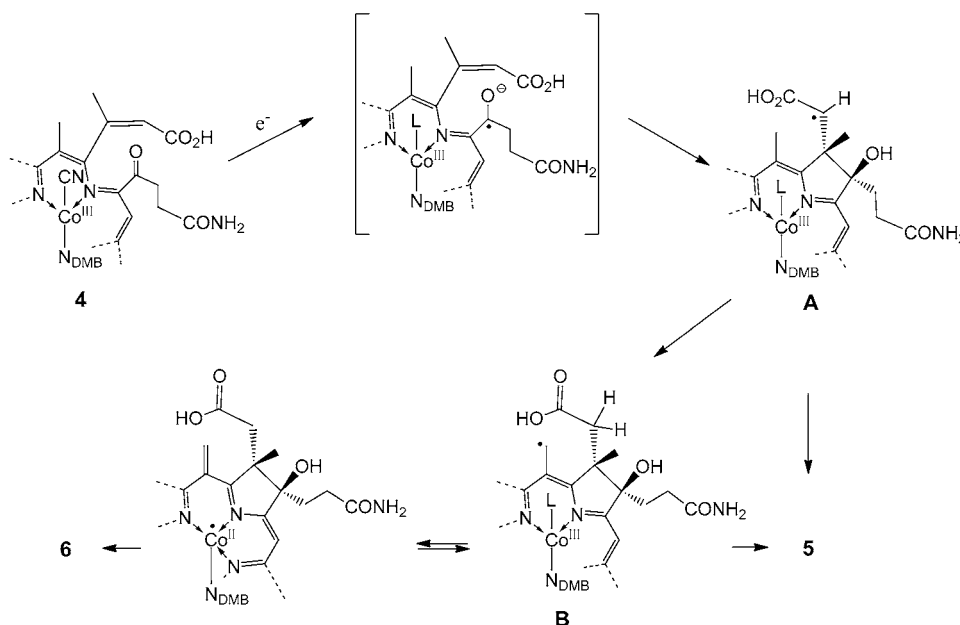
**Abbildung 2.** Zwei Projektionen der Struktur des blauen Secocorrins **4** laut Röntgenstrukturanalyse.<sup>[14]</sup>

ten am C7 und C8. Die Reduktion von **4** mit NaBH<sub>4</sub> ergibt das Corrin **5** ohne den Einbau eines Wasserstoffatoms vom Reduktionsmittel.<sup>[22]</sup> Diese Reaktion dürfte demnach über Elektronen- und Protonentransferreaktionen und radikalische Zwischenstufen ablaufen. Dieser mechanistische Aspekt wurde durch die elektrochemische Reduktion des Secocorrins **4** untersucht. Dieses Experiment ergab nicht nur das corrinoides Reduktionsprodukt **5**, sondern auch **6**, ein Corrinoid-Analog von **5**, in dem die Methylgruppe an der 5-meso-Position hydroxyliert war. Die Veränderungen, die am C51-Kohlenstoffatom von **6** beobachtet wurden, erinnerten an frühere Erfahrungen mit unerwarteten Reaktionen an den Methylgruppen der zwei meso-Positionen der Cobyrynsäure, welche durch Radikalmechanismen erklärt wurden.<sup>[23,24]</sup>

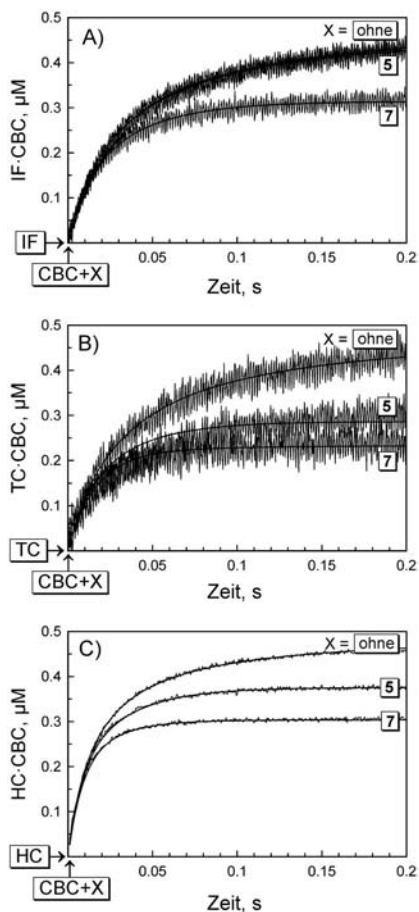
Wie in Schema 3 dargestellt, kann ein Radikalmechanismus die Bildung der zwei Corrinoid-Produkte **5** und **6**, unter den Bedingungen des oben erwähnten Elektrosynthese-Experiments, erklären. Radikal **A** wird als ein mögliches, kurzlebiges Zwischenprodukt im Schritt von **5** zu **6** angesehen. Es könnte durch Ein-Elektron-Reduktion des Liganden- $\pi$ -Systems

des blauen Secocorrins **4** und rasche radikalische C-C-Bindungsbildung zwischen C7 und C8 entstehen. Die Struktur von **4** zeigt tatsächlich einen kurzen, nicht-bindenden Kontakt zwischen C7 und C8 und ist für die Bildung der C-C-Bindung bereits gut programmiert (Abbildung 2). Folglich könnten der bindungsbildende Prozess und der Elektronentransfer konzentriert erfolgen. Das Radikal am Kohlenstoff C7<sup>1</sup> von **A** wäre dann passend positioniert, um ein H-Atom von der nahegelegenen Methylgruppe C51 zu abstrahieren, was das stabilisierte Radikal **B** ergäbe. Das  $\pi$ -delokalisierte Radikal **B** ergäbe **6** durch Elektronentransfer zum zentralen Cobaltatom und Addition eines Lösungsmittel-Nukleophils (MeOH oder H<sub>2</sub>O) an C51. Auch die Bildung von [**D<sub>n</sub>**]-**5** aus Experimenten in CD<sub>3</sub>OD stützt dieses mechanistische Szenario: [**D<sub>n</sub>**]-**5** (partiell) deuteriert am C51 wird vermutlich über Radikal **B** und die Abstraktion eines Deuteriumatoms von (der Methylgruppe von) CD<sub>3</sub>OD gebildet.

Die NMR-Analyse von 8 $\beta$ -Hydroxy-7-epicobalamin-c-Säure (**5**) zeigte, dass fünf der sieben Seitenketten an die Unterseite des Corrinrests gebunden sind. Daher wurde die Fähigkeit von **5** getestet, die drei humanen Transportproteine für B<sub>12</sub> zu binden, den intrinsischen Faktor (IF), Transcobalamin (TC) und Haptocorrin (HC).<sup>[25]</sup> Die Fähigkeit dieser B<sub>12</sub>-bindenden Proteine, zwischen Vitamin B<sub>12</sub> und seinen Analoga zu unterscheiden, nimmt in der Reihenfolge IF > TC > HC für alle getesteten Corrinoiden ab (siehe Lit. [26]). Die Kinetik des Bindungsprozesses von **5** wurde mittels des fluoreszierenden B<sub>12</sub>-Konjugats CBC gemessen.<sup>[27]</sup> Die Assoziation dieses Reporterliganden mit B<sub>12</sub>-bindenden Proteinen führt zu einer erhöhten Fluoreszenz von CBC. Die Konkurrenz zwischen dem B<sub>12</sub>-Analog **5** und CBC um die Wechselwirkung mit den B<sub>12</sub>-bindenden Proteinen wurde



**Schema 3.** Elektrochemische Reduktion des 7,8-Secocobalamins **4**. Vorgeschlagene Radikalzwischenstufen auf dem Weg zur Co $\beta$ -Cyano-8 $\beta$ -hydroxy-7-epicobalamin-c-Säure **5** und Co $\beta$ -Cyano-51,8 $\beta$ -dihydroxy-7-epicobalamin-c-Säure **6**.



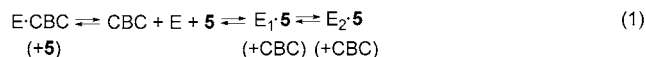
**Abbildung 3.** Bindungskinetik des B<sub>12</sub>-Analog **5** in Konkurrenz mit dem fluoreszierenden B<sub>12</sub>-Konjugat CBC. Endkonzentration in allen Fällen: 0.5 µM Protein, 0.5 µM CBC, 4.5 µM Testligand X (**5** oder **7**), 21 °C, pH 7.5. Dicke Linien zeigen die Simulationen mit den berechneten Werten für die Bindung des Testliganden X (**5** oder **7**) an A) Intrinsischer Faktor (IF), B) Transcobalamin (TC), C) Haptocorrin (HC).

über die Zeitabhängigkeit der CBC-Fluoreszenz analysiert (Abbildung 3).

Der Prozess, in welchem der Komplex E:CBC durch Fluoreszenz nachweisbar war, gehorchte dem konkurrierenden Bindungsschema  $E \xrightarrow{k_{+1}} E \rightarrow E:CBC$  (wobei  $E = IF, HC$  oder  $TC$ ). Unter Annahme einer innerhalb von 0.2 s effektiv irreversiblen Bindung des  $B_{12}$ -Analog **5** wurde eine sehr geringe Bindungsgeschwindigkeit aller drei  $B_{12}$ -bindenden Proteine berechnet. Die Bindung von **5** an IF war in unserem Versuchsaufbau ( $k_{+1} \leq 0.1 \times 10^6 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ ) kaum nachweisbar. Vitamin- $B_{12}$ -c-säure (**7**) bindet unter denselben Bedingungen um ein bis zwei Größenordnungen schneller ( $k_{+c} = 2.7/6.1/6.0 \times 10^6 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$  für IF/TC/HC; siehe die vergleichenden Datensätze in Abbildung 3 und Lit. [14] für weitere Details). Die schlechte Primärbindung des  $B_{12}$ -Analog **5** ist vermutlich durch eine sterische Hinderung seiner umorientierten Carboxygruppe mit Glu379 von IF, mit Gln389 von TC bzw. mit Gly391 von HC verursacht, welche zu den primären Bindungsstellen von Vitamin  $B_{12}$  (**1**) gehören.<sup>[26]</sup>

In einer zweiten Versuchsserie wurde die Dissoziation des B<sub>12</sub>-Analoges **5** nach Bindung an das Protein E und anschließender Einwirkung von CBC untersucht (Abbildung S8). Die

beobachtete Reaktion entsprach dem Mechanismus in Gleichung (1), bei welcher der Komplex E-CBC über die Zeit



verfolgt wurde. Die Formeln E<sub>1</sub>·5 und E<sub>2</sub>·5 stehen für den primären Protein-Liganden-Komplex mit noch nicht vollständig angepassten Domänen α··5·β, sowie für den Sekundärkomplex mit den zusammengefügt Domänen α·5·β (= E<sub>2</sub>·5). Die Bindungsgeschwindigkeiten der Primärbindung wurden durch Computerangleich der Daten berechnet (Tabelle 1 und Abbildung S8).

**Tabelle 1:** Berechnete Geschwindigkeitskonstanten der Wechselwirkung zwischen **5** und den spezifischen B<sub>12</sub>-Bindungsproteinen IF, TC und HC (= „E“) und effektive Dissoziationskonstanten  $K_d^{app}$  (**5**), basierend auf dem allgemeinen Bindungsschema nach Gleichung (1).

Protein (E)	$E \xrightarrow{k_{+C}} E$ $k_{+C} [M^{-1} s^{-1}]$	$E \xrightarrow{k_{+1,-1}} E_1 \cdot 5$ $k_{+1,-1} [M^{-1} s^{-1}], [s^{-1}]$	$E_1 \cdot 5 \xrightarrow{k_{+2,-2}} E_2 \cdot 5$ $k_{+2,-2} [s^{-1}]$	$K_d^{app}(5)^{[a]}$ [M]
IF	$64/50 \times 10^6$	$k_{+1} \approx 0.1 \times 10^6$ $k_{-1} = 3$	$k_{+2} = 0.6$ $k_{-2} = 0.7$	$16 \times 10^{-6}$
TC	$61 \times 10^6$	$k_{+1} = 3.5 \times 10^6$ $k_{-1} = 0.06$	$k_{+2} = 0.002$ $k_{-2} = 0.0004$	$2.8 \times 10^{-9}$
HC	$125 \times 10^6$	$k_{+1} = 2.5 \times 10^6$ $k_{-1} = 0.04$	$k_{+2} = 0.01$ $k_{-2} = 0.02$	$1.1 \times 10^{-8}$

[a] Effektive Dissoziationskonstante von **5**.  $K_d^{\text{app}}(\mathbf{5}) = K_{1/2} = 1/[k_{+1}/k_{-1} + (k_{+1}/k_{-1}) \cdot (k_{+2}/k_{-2})]$ .

Ähnlich wie die Bindungsgeschwindigkeiten zeigte die durchschnittliche Affinität des Corrin **5** eine „falsche“ Reihenfolge (d.h.  $TC > HC > IF$ ) für die Bindung an die  $B_{12}$ -Transportproteine, wobei TC der beste Binder für dieses  $B_{12}$ -Analog ist. Alle anderen  $B_{12}$ -Analoge zeigen die „normale“ Reihenfolge der Affinität (d.h.  $HC > TC > IF$ ) mit HC als stärkstem Binder. Erstaunlicherweise erhöhte sich die Bindungsstärke von Analog **5** an TC über einen Inkubationszeitraum von 30 min. Während dieser Zeit sank der Prozentsatz des leichter dissoziierbaren Komplexes  $E_1\mathbf{5}$  von 75 % (2 min) auf 15 % (32 min). Stattdessen bildete sich der „stabilere“ Komplex  $E_2\mathbf{5}$ . Diese Verschiebung äußerte sich in einer erhöhten Amplitude der langsamen Dissoziationsphase. (Abbildung S8).

Die Stabilisierung des B<sub>12</sub>-Analog **5** in der Bindungsstelle von TC verursachte eine 6-fache Erhöhung in der durchschnittlichen Gleichgewichtsaffinität ( $K_d^{app}$ ). Dennoch verminderte sich die Geschwindigkeit der Dissoziation um den Faktor 120 und wurde im Vergleich zu IF und HC sehr langsam. Die verzögerte Dissoziation des Corrins **5** von TC könnte unter anderem auch durch die Bildung einer Wasserstoffbrücke zwischen dem Aminosäurerest His173 und der C8-OH-Gruppe von **5** im Komplex TC:**5** verursacht sein. Dieser Aminosäurerest ist nur in TC vorhanden und befindet sich im Komplex TC:**5** vermutlich oberhalb der C8-OH-Gruppe. Die bemerkenswert langsame Dissoziation von TC:**5** macht den Komplex ausreichend langlebig (wenn unter In-vitro-Bedingungen gebildet), um über die Blutzirkulation zu Geweben transportiert zu werden.



Die effiziente Bildung des roten Corrins  $\text{Co}_\beta$ -Cyano-8 $\beta$ -hydroxy-7-epicobalamin-c-säure (**5**) aus dem blauen Secocorrin **4** belegt die beträchtliche Neigung des Corrinrings von Vitamin  $\text{B}_{12}$ , unter geeigneten (Reduktions-)Bedingungen wieder zu entstehen (für ein weniger drastisches Beispiel siehe Lit. [29]). Ein schneller Radikalprozess ermöglicht die Ringschlussreaktion **4**  $\rightarrow$  **5**, die einen neuen Typus eines Vitamin- $\text{B}_{12}$ -Analog, ein 7-Epicobalamin, produziert. In diesem  $\text{B}_{12}$ -Analog ragen fünf der sieben Seitenketten von der „Unterseite“ des  $\text{B}_{12}$ -Makrocyclus hervor. Die Bindung von **5** an das  $\text{B}_{12}$ -Transportprotein intrinsischer Faktor (IF) ist besonders schwach ( $K_d = 16 \mu\text{M}$ ) und zeigt eine noch nie beobachtete Reihenfolge  $\text{TC} > \text{HC} > \text{IF}$ . Das  $\text{B}_{12}$ -Analog **5** bindet um mindestens fünf Größenordnungen weniger stark als Vitamin  $\text{B}_{12}$  (**1**) und um ein bis zwei Größenordnungen langsamer und weniger stark als  $\text{B}_{12}$ -c-säure (**7**). Dies unterstreicht die Fähigkeit dieser spezifischen und starken  $\text{B}_{12}$ -Binder, zwischen Vitamin  $\text{B}_{12}$  (**1**) und seinen nahen Verwandten zu unterscheiden. Bei den typischen physiologischen  $\text{B}_{12}$ -Konzentrationen im menschlichen Körper würde das 7-Epicobalamin **5** von keinem der drei humanen  $\text{B}_{12}$ -Bindungsproteine signifikant gebunden. Dies ist das erste Beispiel eines  $\text{B}_{12}$ -Analog, das die wichtigsten  $\text{B}_{12}$ -Strukturelemente beibehält und dennoch kaum von einem dieser  $\text{B}_{12}$ -Bindungsproteine gebunden wird.

### Experimentelles

Allgemein. 7,8-Secocobalamin (**4**) und  $\text{B}_{12}$ -c-säure (**7**) wurden nach Lit. [14,16] hergestellt (siehe Hintergrundinformationen für weitere allgemeine Angaben).

Synthese von **5**. In einer Handschuhbox wurden 0.43 mg (0.31  $\mu\text{mol}$ ) **4** in 0.3 mL entgastem Wasser gelöst und die Lösung mit ca. 0.05 mg  $\text{NaBH}_4$  versetzt. Die Farbe der Lösung wechselte von Blau nach Rot innerhalb weniger Minuten. Nach 15 min wurde der Kolben aus der Handschuhbox entfernt und die Reaktion durch Luftoxidation gestoppt. Nach Aufarbeitung (siehe Hintergrundinformationen) wurden 0.36 mg (0.26  $\mu\text{mol}$ ; 84 % Ausbeute) **5** als mikrokristalliner Niederschlag erhalten. UV/Vis (Hitachi U 3000,  $\text{H}_2\text{O}$ ,  $c = 2.6 \times 10^{-5} \text{ M}$ ):  $\lambda_{\text{max}}(\log \epsilon) = 551(3.81)$ , 519(3.77), 407(3.46), 361(4.34), 322(3.85), 306(3.91), 278(4.12) nm. CD (JASCO J715,  $\text{H}_2\text{O}$ ,  $c = 2.6 \times 10^{-5} \text{ M}$ ):  $\lambda_{\text{max}}$ ,  $\lambda_{\text{min}}$  ( $\Delta \epsilon$ ) [ $\text{nm} (\text{mol}^{-1} \text{ cm}^2 \text{ cm}^{-1})$ ]: 581 (1.4), 530 (0.1), 482.5 (−2.9), 432.5 (11.1), 361.5 (−16.6), 317.5 (0.2), 309.5 (−0.5), 278.5 (7.6), 250.5 (−9.4) (siehe Abbildung 1).  $^1\text{H}$ - und  $^{13}\text{C}$ -NMR: siehe Hintergrundinformationen, Tabelle S1. ESI-MS (Finnigan MAT95S, Detektion positiver Ionen, MeOH): 1410.4 (16,  $[\text{M}+\text{K}]^+$ ), 1394.4 (18,  $[\text{M}+\text{Na}]^+$ ), 1374.4 (33), 1373.4 (73), 1372.4 (100,  $[\text{M}+\text{H}]^+$ ), 1354.4 (22,  $[\text{M}-\text{H}_2\text{O}]^+$ ), 1226.3 (18,  $[\text{M}-\text{C}_9\text{H}_9\text{N}_2]^+$ ), 1014.3 (17,  $[\text{M}-\text{C}_{14}\text{H}_{18}\text{N}_2\text{O}_7\text{P}]^+$ ).

Elektrosynthese von **6**. In einer Handschuhbox wurden 1.1 mg (0.80  $\mu\text{mol}$ ) **4** in 3.0 mL Elektrolytlösung (0.1 M TBAHFP in MeOH) gelöst und in die kathodische Kammer der Elektrolysezelle gegeben. Nach 4 h Reduktion bei −0.6 V vs. 0.1 N Kalomel-Elektrode an einer Quecksilberelektrode wurden 1.8 Fmol $^{-1}$  verbraucht. Die Elektrolyse wurde dann gestoppt und die Lösung aufgearbeitet (siehe Hintergrundinformationen). Ein rotes Rohprodukt wurde erhalten, das laut HPLC aus zwei Verbindungen besteht. Die zwei Verbindungen wurden mittels präparativer HPLC getrennt. Nach Entsalzung und Ausfällung (siehe Hintergrundinformationen) wurden 0.18 mg **5** (0.15  $\mu\text{mol}$  17.8%) und 0.55 mg **6** (0.39  $\mu\text{mol}$ , 48.7%) als mikrokristalline Pulver erhalten. Charakterisierung von **6**: UV/Vis (Hitachi U 3000,  $\text{H}_2\text{O}$ ,  $c = 2.12 \times 10^{-5} \text{ M}$ ):  $\lambda_{\text{max}}(\log \epsilon) = 546.5(3.83)$ , 520(3.78), 402(3.53), 358(4.29), 320(3.84), 304(3.89), 279(4.14) nm.  $^1\text{H}$ -NMR: siehe

Hintergrundinformationen, Tabelle S1. ESI-MS (Finnigan MAT95S, Detektion positiver Ionen, MeOH): 1410. (22,  $[\text{M}+\text{Na}]^+$ ), 1390.5 (50), 1389.5 (83), 1388.5 (100,  $[\text{M}+\text{H}]^+$ ), 1242.4 (26)  $[\text{M}-\text{C}_9\text{H}_9\text{N}_2]^+$ , 1030.4 (35)  $[\text{M}-\text{C}_{14}\text{H}_{18}\text{N}_2\text{O}_7\text{P}]^+$ .

Bindungs- und Dissoziationsexperimente mit  $\text{B}_{12}$ -Transportproteinen. Die Reaktionen wurden in 0.2 M Na-Phosphatpuffer, pH 7.5, 21 °C durchgeführt. Die Bindungskinetik wurde am Stopped-Flow-Spektrofluorometer DX.17 MV (Applied Biophysics, UK) verfolgt, unter Verwendung der Fluoreszenz des  $\text{B}_{12}$ -Konjugats CBC,<sup>[25,27]</sup> Anregung 525 nm, Emission > 550 nm, Spalt 1.5 mm, Spannung 380–400 V, Bandfilter 18.6 nm, Lichtweg 1 cm. Bindungsreaktionen wurden durch rasches Mischen des  $\text{B}_{12}$ -Bindungsproteins E (HC, TC oder IF) entweder mit CBC allein oder mit CBC und  $\text{B}_{12}$ -Analog **5** gestartet. Maximale Amplitude der Fluoreszenzantwort (E + CBC) entsprach 0.5  $\mu\text{M}$  des E-CBC-Komplexes. Dieser wurde durch die Anwesenheit des nicht fluoreszierenden, konkurrierenden  $\text{B}_{12}$ -Analog **5** beeinflusst. Alle aufgenommenen Reaktionen in Abbildung 3 und Abbildung S8 repräsentieren Mittelwerte von 3–6 Einzelkurven. Für weitere Details siehe Legende in Abbildung 3.

Eingegangen am 15. April 2012

Online veröffentlicht am 14. Juni 2012

**Stichwörter:** Cobalt-Komplex · Elektrosynthese · Radikalreaktionen · Ringbildung · Vitamin  $\text{B}_{12}$

- [1] A. Eschenmoser, *Angew. Chem.* **1988**, 100, 5; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1988**, 27, 5.
- [2] A. R. Battersby in *Vitamin  $\text{B}_{12}$  and  $\text{B}_{12}$ -Proteins* (Hrsg.: B. Kräutler, D. Arigoni, B. T. Golding), Wiley-VCH, Weinheim, **1998**, S. 47.
- [3] R. G. Matthews in *Metal-Carbon Bonds in Enzymes and Co-factors*, Vol. 6 (Hrsg.: A. Sigel, H. Sigel, R. K. O. Sigel), The Royal Society of Chemistry, Cambridge, **2009**, S. 53.
- [4] A. Eschenmoser, *Angew. Chem.* **2011**, 123, 12618; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2011**, 50, 12412.
- [5] A. Eschenmoser, C. E. Wintner, *Science* **1977**, 196, 1410.
- [6] R. B. Woodward in *Vitamin  $\text{B}_{12}$ , Proceedings of the Third European Symposium on Vitamin  $\text{B}_{12}$  and Intrinsic Factor* (Hrsg.: B. Zagalak, W. Friedrich), Walter de Gruyter, Berlin, **1979**, S. 37.
- [7] K. C. Nicolaou, T. Montagnon, *Molecules that changed the world*, Wiley-VCH, Weinheim, **2008**.
- [8] T. Toraya, *Chem. Rev.* **2003**, 103, 2095.
- [9] W. Buckel, B. T. Golding, *Annu. Rev. Microbiol.* **2006**, 60, 27.
- [10] R. Banerjee, S. W. Ragsdale, *Annu. Rev. Biochem.* **2003**, 72, 209.
- [11] E. N. G. Marsh, C. L. Drennan, *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2001**, 5, 499.
- [12] B. Kräutler, B. Puffer, *Angew. Chem.* **2011**, 123, 9965; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2011**, 50, 9791.
- [13] R. Bonnett in  *$\text{B}_{12}$ , Vol. I* (Hrsg.: D. Dolphin), Wiley, New York, **1982**, S. 201.
- [14] S. N. Fedosov, M. Ruetz, K. Gruber, N. U. Fedosova, B. Kräutler, *Biochemistry* **2011**, 50, 8090.
- [15] B. Kräutler, R. Konrat, E. Stupperich, G. Färber, K. Gruber, C. Kratky, *Inorg. Chem.* **1994**, 33, 4128.
- [16] A. Rieder, R. B. Hannak, R. Konrat, B. Kräutler, *BioFactors* **1996**, 5, 233.
- [17] R. P. Hinze, H. M. Schiebel, H. Laas, K. P. Heise, A. Gossauer, H. H. Inhoffen, *Liebigs Ann. Chem.* **1979**, 811.
- [18] G. Holze, H. H. Inhoffen, *Angew. Chem.* **1985**, 97, 887; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1985**, 24, 867.
- [19] A. Eschenmoser, *Q. Rev. Chem. Soc.* **1970**, 24, 366.
- [20] A. W. Johnson, W. R. Overend, *J. Chem. Soc. Perkin Trans. I* **1972**, 2681.

- [21] Y. Yamada, D. Miljkovic, P. Wehrli, B. Golding, P. Löliger, R. Keese, K. Müller, A. Eschenmoser, *Angew. Chem.* **1969**, 81, 301; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1969**, 8, 343.
- [22] In einem analogen Experiment von **4** mit NaBD<sub>4</sub> zeigte das Reduktionsprodukt **5** keinen signifikanten Deuteriumeinbau laut <sup>1</sup>H-NMR und ESI-Massenspektren. Dies zeigt an, dass das Hydrid (oder Deuterium von NaBD<sub>4</sub>) an keines der Kohlenstoffzentrum eingebaut wurde.
- [23] N. J. Lewis, R. Nussberger, B. Kräutler, A. Eschenmoser, *Angew. Chem.* **1983**, 95, 744; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1983**, 22, 736.
- [24] C. Nussbaumer, D. Arigoni, *Angew. Chem.* **1983**, 95, 746; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1983**, 22, 737.
- [25] S. N. Fedosov in *Water Soluble Vitamins* (Hrsg.: O. Stanger), Springer, Berlin, **2011**, S. 347.
- [26] S. Fedosov, N. Fedosova, B. Kräutler, E. Nexø, T. Petersen, *Biochemistry* **2007**, 46, 6446.
- [27] S. N. Fedosov, C. B. Grissom, N. U. Fedosova, S. K. Moestrup, E. Nexø, T. E. Petersen, *FEBS J.* **2006**, 273, 4742.
- [28] J. Wuerges, S. Geremia, L. Randaccio, *Biochem. J.* **2007**, 403, 431.
- [29] B. Kräutler, *Chem. Eur. J.* **2012**, DOI: 10.1002/chem.201200830.
-