

## Vitamin B<sub>12</sub>: Wie das Problem seiner Biosynthese gelöst wurde

**Francis Blanche, Beatrice Cameron, Joel Crouzet, Laurent Debussche, Denis Thibaut,  
Marc Vuilhorgne, Finian J. Leeper und Alan R. Battersby\***

Vitamin B<sub>12</sub> ist ein für die menschliche Gesundheit essentielles Vitamin; Mangel an Vitamin B<sub>12</sub> verursacht perniziöse Anämie. Diese biologische Aktivität hat seit jeher großes Interesse geweckt, und seit Vitamin B<sub>12</sub> als erster natürlicher Organocobalt-Komplex entdeckt und seine Molekülstruktur durch Röntgenbeugungsanalyse aufgeklärt wurde, sind Chemiker und Biochemiker gleichermaßen von seiner komplexen Architektur fasziniert gewesen. Der organische Ligand, der das Cobalt umgibt,

weist an seiner Peripherie neben den reaktiven funktionellen Gruppen eine Vielzahl von stereogenen Zentren auf. Es war diese Komplexität, die Vitamin B<sub>12</sub> mit Recht zu einer extremen Herausforderung für Synthetiker machte. Von Mikroorganismen wird diese Synthese in vivo unter vollständiger Kontrolle von Regio- und Stereochemie durchgeführt. Wie machen die Mikroorganismen das? Dieser Aufsatz erzählt die bemerkenswerte Geschichte ganz. Die Lösung dieses biosynthetischen Rätsels

war nur in Gemeinschaft von Biologen und Chemikern möglich, die jeweils das gesamte Methodenspektrum ihrer Disziplinen – von der Genetik bis hin zu Synthese und NMR-Spektroskopie – einbrachten. Für zukünftige Untersuchungen zur Biosynthese noch komplexerer natürlicher Substanzen kann diese Arbeit daher als Leitbild gelten.

**Stichworte:** Bioorganische Chemie · Biosynthese · Vitamin B<sub>12</sub>

### 1. Einleitung

1993 markiert das Ende einer Ära der Erforschung der Biosynthese von Vitamin B<sub>12</sub>, einem essentiellen Vitamin, dessen Mangel perniziöse Anämie verursacht. 25 Jahre experimenteller Forschung waren nötig, um bis 1993 den vollständigen Biosyntheseweg aufzudecken, auf dem diese bemerkenswerte cobalthaltige Verbindung in Mikroorganismen aufgebaut wird. Das war ein aufregendes Ereignis! Denn das B<sub>12</sub>-Problem war im Bereich der Biosynthese sicherlich die größte Herausforderung gewesen, weshalb es zuweilen auch als der „Mount Everest der Biosyntheseforschung“ bezeichnet wurde. Der Berg ist nun bezwungen, und zwar rechtzeitig zum 40. Jahrestag der Erstbesteigung des Mount Everest durch Hillary und Tenzing. Der „Aufstieg zum Gipfel“ verlief während der vergangenen 25 Jahre anfangs als ein stetiger Anstieg. Während dieser Phase wurden entscheidende Fortschritte gemacht und solide Basislager errichtet. Während der letzten zehn und insbesondere der letzten fünf Jahre erfolgte dann der spektakuläre, rasche Aufstieg zum

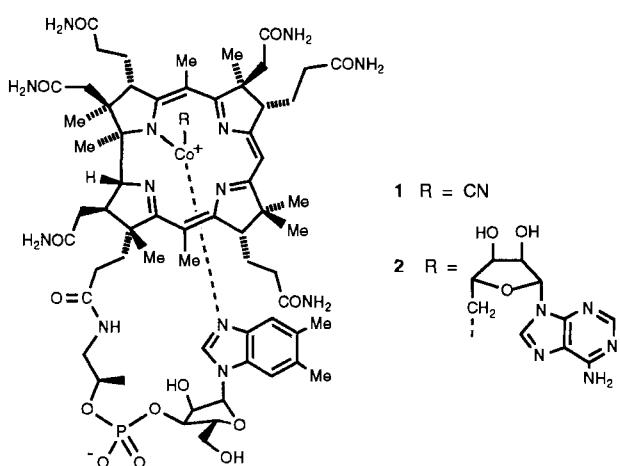
Gipfel. Es ist nun an der Zeit, den Übersichtsartikel („Re-view“ from the top) zu publizieren, der gleichsam die Gipfelflagge setzt. Wir wollen zeigen, wie der „Sturm auf den Gipfel“ in einer weitgehend europäischen Anstrengung gelang, und gleichzeitig die Spannung einer wissenschaftlichen Verfolgungsjagd vermitteln, die voller Überraschungen steckte. An den passenden Stellen unserer Darstellung werden wir Entscheidungen, Techniken und experimentelle Ansätze schildern, die sich rückblickend als besonders wichtig und entscheidend entpuppt haben. Der Schlüsselschritt war zweifellos die Wahl eines für die nachfolgenden Experimente geeigneten B<sub>12</sub>-Organismus, und es wird deutlich werden, warum es keinen besseren als *Pseudomonas denitrificans* hätte geben können. Von großer Bedeutung war auch die Entscheidung, die stattliche Reihe von Methoden, die in der Biosyntheseforschung bereits angewendet wurden, um die Möglichkeiten von Genetik und Molekularbiologie zu bereichern. Auf keinen Fall aber soll, wie es gelegentlich gern geschieht, der Eindruck erweckt werden, als sei der Rest ganz einfach, wenn erst einmal die Molekularbiologie steht. Das Gegenteil ist der Fall! Wie der Leser sehen wird, waren zu diesem Zeitpunkt noch enorme Schwierigkeiten zu überwinden, und der Weg durch diesen Irrgarten hing in beträchtlichem Maße von der Entwicklung chromatographischer Techniken für die Reinigung von Proteinen und wasserlöslichen Intermediaten ab.

Näheres zu jedem dieser Schlüsselemente erfährt der Leser im Laufe dieses Beitrags. Jedoch soll schon hier betont werden, daß das B<sub>12</sub>-Problem eine enorme Herausforderung darstellte

[\*] Prof. Sir Alan Battersby, Dr. F. J. Leeper  
University Chemical Laboratory  
Lensfield Road, Cambridge CB2 1EW (Großbritannien)  
Telefax: Int. + 223/336-362  
F. Blanche, Dr. L. Debussche, D. Thibaut, Dr. M. Vuilhorgne (Département Analyse)  
B. Cameron, Dr. J. Crouzet (Département des Biotechnologies)  
Centre de Recherche de Vitry-Alfortville  
Rhône-Poulenc Rorer S.A.  
F-94403 Vitry-sur-Seine (Frankreich)

und das Zusammenwirken vieler Disziplinen nötig war, um dieses Problem zu lösen. Zu nennen sind an dieser Stelle Genetik und Molekularbiologie, Proteinchemie und Enzymologie, organische Synthese inklusive der Markierung mit radioaktiven und stabilen Isotopen und schließlich, ein phantastisches Instrument, die NMR-Spektroskopie.

Zu Beginn sollte noch darauf hingewiesen werden, daß das  $B_{12}$ -System 1 (Cyanocobalamin) die Form ist, in der das Vitamin für medizinische und kommerzielle Zwecke isoliert wird; 1 und verwandte Derivate mit unterschiedlichen R-Gruppen werden häufig als Cobalamine bezeichnet. Die wichtigste biologisch wirksame Spezies ist das Coenzym Adenosylcobalamin 2 mit einem Adenosylrest anstelle der Cyanogruppe im Vitamin  $B_{12}$ . Später soll gezeigt werden, wann und wie dieser Rest eingebaut wird.



## 2. Die Grundlagen werden gelegt: Entdeckung der ersten drei spezifischen $B_{12}$ -Zwischenstufen

Vitamin  $B_{12}$  1 gehört zu einer Familie von strukturell verwandten und biologisch bedeutenden Pigmenten, zu der auch

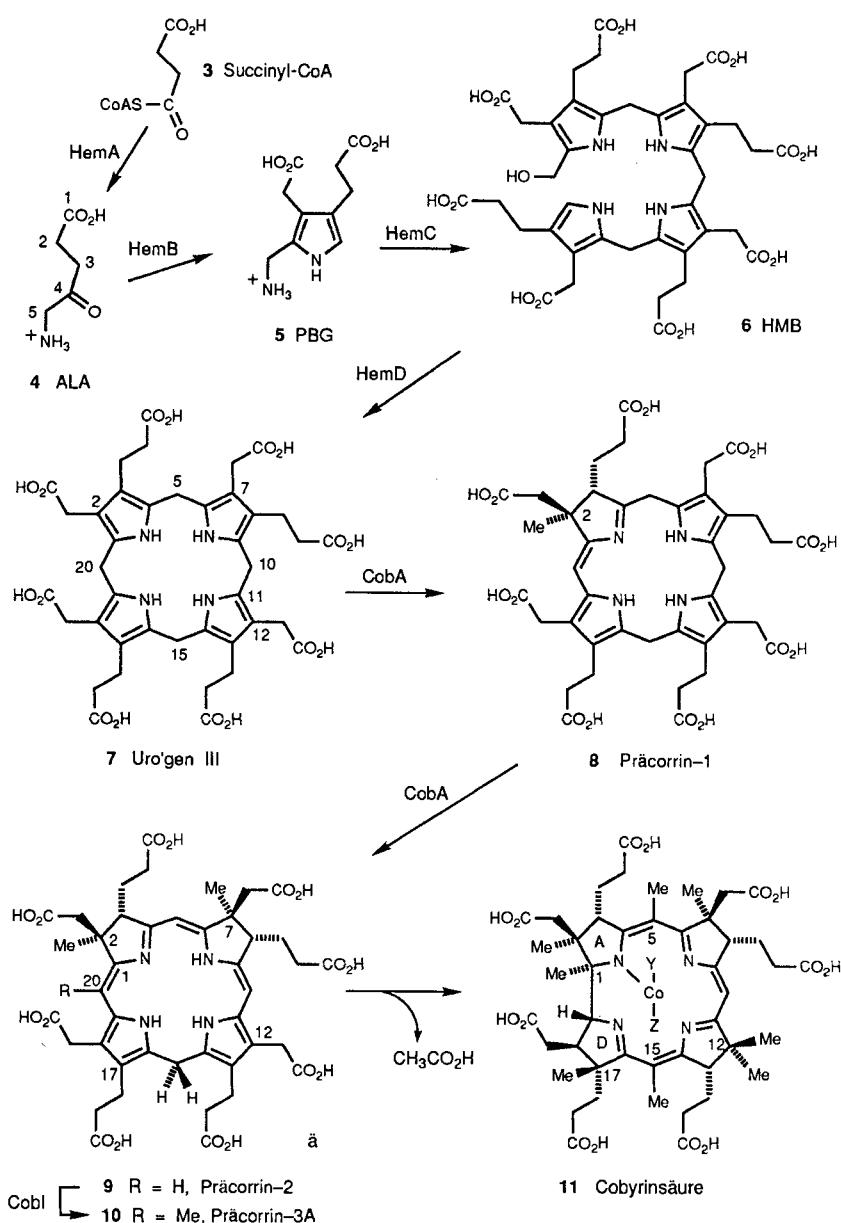
das Häm, das sauerstoffübertragende Zentrum des Hämoglobins, und das für die Photosynthese verantwortliche Chlorophyll gehören. Die Biosynthese all dieser sogenannten „Pigmente des Lebens“ folgt zunächst derselben Spur. Sie beginnt mit 5-Aminolävulinsäure (ALA) 4 (Schema 1), die im Falle von *Pseudomonas* aus Succinyl-CoA 3 und Glycin<sup>[1]</sup> biosynthetisiert wird (dies gilt auch für Tiere, Hefen und photosynthetisierende Bakterien). In Pflanzen und einigen anderen Bakterien ist das Ausgangsmaterial Glutaminsäure. Zwei Moleküle 4 werden zunächst zu Porphobilinogen (PBG) 5 kondensiert; anschließend werden vier Moleküle PBG 5 durch das Enzym Desaminase ohne Umlagerung in einer Kopf-Schwanz-Anordnung zu Hydroxymethylbilan (HMB) 6 verknüpft<sup>[2]</sup>. Danach läuft ein faszinierender, durch Cosynthetase katalysierter Ringschluß- und Umlagerungsprozeß<sup>[2]</sup> ab, bei dem Uroporphyrinogen III (Uro'gen III) 7 entsteht. Dieser Makrocyclus wird in lebenden Systemen strukturell modifiziert. Dabei werden in einer Reihe von enzymatischen Schritten, angefangen mit Decarboxylierungen und Oxidation, Häm und Chlorophyll aufgebaut. Dies gilt nicht für  $B_{12}$  1: Sein Biosyntheseweg trennt sich von dem der anderen Pigmente auf der Stufe von Uro'gen III 7. Durch Experimente mit *Propionibacterium shermanii* fand man heraus, daß diese Abweichung durch die C-Methylierung von 7 – via Methylübertragung aus S-Adenosylmethionin (SAM) – ausgelöst wird. Der Informationsgewinn aus diesen Untersuchungen war zwar beträchtlich; wir werden uns hier jedoch auf die Schilderung derjenigen Erkenntnisse beschränken, die für das Verständnis des Ganzen wesentlich sind. Alle übrigen Ergebnisse dieser Arbeiten sind in Übersichtsartikeln dargestellt<sup>[3]</sup>, in denen auch vollständige Literaturangaben zu dieser Phase der Forschung zu finden sind.

Normalerweise wird *Pr. shermanii* auf einem cobalthaltigen Medium gezogen. Man kann diese Zellen aufschließen und so eine Präparation löslicher Enzyme freisetzen, mit der, zusammen mit den nötigen Cofaktoren, aus einfacheren Vorläufern wie PBG 5 die Cobyrinsäure 11 hergestellt werden kann (Schema 1). Bemerkenswert in 11 ist die direkte Verknüpfung von Ring A und Ring D – ein charakteristisches Merkmal des Corrin-Ringsystems. Cobyrinsäure 11, ein später Vorläufer von  $B_{12}$

*Alan R. Battersby ist Emeritus Professor an der Universität von Cambridge (Großbritannien). Er wurde 1925 in England geboren und erwarb die akademischen Grade eines B.Sc. und M.Sc. an der Universität Manchester, den des Ph.D. in St. Andrews und die Grade eines D.Sc. und Sc.D. in Bristol bzw. Cambridge. Viele Auszeichnungen wurden ihm zuteil, darunter die Karrer-Medaille (Schweiz), die Royal Medal (Großbritannien), die Roger Adams Medal (USA), die August-Wilhelm-von-Hofmann-Denkprobe (Deutschland) und der Wolf Prize (Israel). Er interessiert sich insbesondere für die Chemie lebender Systeme (vor allem für die Biosynthese von Vitamin  $B_{12}$ ), für Musik, Camping und Forellenzucht. – Dr. F. J. Leeper ist Lecturer an der Universität Cambridge und Fellow des Emmanuel College. Seit 1982 arbeitet er mit Prof. Battersby an der Erforschung der Biosynthese von Vitamin  $B_{12}$ .*



*Während der vergangenen zehn Jahre waren an der Aufklärung der Vitamin- $B_{12}$ -Biosynthese drei Arbeitsgruppen der Firma Rhône-Poulenc Rorer beteiligt. Im Bereich der Biochemie konzentriert sich die Arbeit von Laurent Debussche und Denis Thibaut unter der Leitung von Francis Blanche auf die Enzymologie und Reinigung biosynthetischer Zwischenstufen; in Zusammenarbeit mit Beatrice Cameron leitet Joel Crouzet eine Gruppe, die sich mit der Klonierung von Bakterien sowie Genen der Biosynthese befaßt; die Strukturaufklärung liegt in den Händen von Marc Vuilhorgne.*



Schema 1. Der Biosyntheseweg von Succinyl-CoA 3 zu Präcorrin-3A 10.

**1** in *Pr. shermanii*, enthält, wie auch B<sub>12</sub>, den vollständig aufgebauten Corrin-Makrocyclus. Vermutlich geht die Biosynthese bei Verwendung der Enzympräparation aus aufgebrochenen Zellen nicht weiter als zur Cobyrinsäure, weil das Enzym, das für den nächsten Schritt auf dem Weg zu B<sub>12</sub> notwendig ist, entweder zerstört wurde, aus der löslichen Proteinpräparation verlorengegangen ist oder keinen Cofaktor mehr hat. In diesem Zusammenhang könnte von Bedeutung sein, daß das/die für die späteren Amidierungen der Carboxygruppen verantwortliche(n) Enzym(e) wenig stabil ist/sind. Diese Enzyme übertragen in *Pr. shermanii* NH<sub>2</sub> aus der Amidgruppe des Glutamins<sup>[4]</sup>.

Die Entdeckung, daß der Biosyntheseweg von B<sub>12</sub> von dem des Häms durch C-Methylierung von Uro'gen III 7 abzweigt, beruhte auf einem Experiment, das die Frage untersuchte, was passiert, wenn *Pr.-shermanii*-Zellen unter striktem Ausschluß von Cobalt gezogen werden. Die verblüffende Antwort lautete, daß die Zellen nun nicht mehr Cobyrinsäure 11 biosynthetisie-

ren, sondern stattdessen drei neue Substanzen auftreten. Diese konnten entweder auf ihrer ursprünglichen Oxidationsstufe oder (nach Luftoxidation) als ihre aromatischen Derivate isoliert werden. Um die Strukturen all dieser Verbindungen aufzuklären, bedurfte es größerer Anstrengungen, und die Ergebnisse ermöglichten es, die Reihenfolge der nächsten drei, über 7 hinausgehenden Intermediate festzustellen. Zuerst wird Uro'gen III 7 an C-2 unter Bildung von Präcorrin-1<sup>[5]</sup> 8 methyliert (Schema 1). Im nächsten Schritt methyliert dieselbe Methylase an C-7 die Verbindung 8 und bildet dabei Präcorrin-2 9. Eine zweite Methylase führt dann eine dritte Methylierung ein, und es war die erste einer ganzen Reihe von Überraschungen, daß die Methylierung an C-20 stattfand und Präcorrin-3A 10 ergab.

Durch eindeutige Markierungsexperimente konnte bewiesen werden, daß Präcorrin-3A 10 in Cobyrinsäure 11 umgewandelt wird, wenn man es mit dem vollständigen Enzymsystem aus normalen, auf einem cobalthaltigen Medium gezogenen *Pr.-shermanii*-Zellen inkubiert. Damit ist klar, daß bei Ausschluß von Cobalt aus wachsenden *Pr.-shermanii*-Zellen die Biosynthese auf der Stufe von Präcorrin-3A 10 unterbrochen wird. Eine vernünftige Erklärung dafür ist, daß in diesem Organismus die Insertion von Cobalt in den Makrocyclus auf dieser oder nahe dieser Stufe stattfindet. Diese Hypothese konnte in jüngeren Untersuchungen bestätigt werden, die in einem Fall auf Inkorporationsexperimenten mit Cobaltkomplexen der aromatisierten Derivate von 9 und 10 basierten<sup>[6]</sup>, im anderen Fall auf einer neuartigen Anwendung der Pulsmarkierung mit drei Isotopen (<sup>13</sup>C, <sup>14</sup>C, <sup>60</sup>Co) unter Verwendung normaler *Pr.-shermanii*-Zellen<sup>[7]</sup>.

Gegenwärtig weiß man erst wenig über die Enzyme des B<sub>12</sub>-Weges in *Pr. shermanii*. Das wird sich in den kommenden Jahren sicherlich ändern; zur Zeit liegt allerdings noch keines der Enzyme in gereinigter Form vor, und nur die erste, oben beschriebene Methylase konnte bislang angereichert werden (50fach)<sup>[8]</sup>. Mit *Ps. denitrificans*, dem Organismus, auf den wir uns in dieser Übersicht konzentrieren wollen, verhält es sich ganz anders; beispielsweise sind die beiden entsprechenden Methylasen, die die Umwandlung von Uro'gen III 7 in Präcorrin-3A 10 bewirken, gut charakterisiert (siehe Abschnitt 11, Tabelle 2).

Ein Vergleich der Struktur von Präcorrin-3A 10 mit der von Cobyrinsäure 11 zeigt, daß zusätzlich zum Einbau von Cobalt viele weitere Biosyntheseschritte erforderlich sind, bevor man zu Cobyrinsäure 11 gelangt. Dazu gehören: a) Ringkontraktion, b) weitere C-Methylierungen, c) Decarboxylierung des Acetatrestes an C-12 und d) mögliche Änderungen der Oxidationsstufe. Vor dem endgültigen „Gipfelsturm“ gelang es, wichtige Erkenntnisse bezüglich der Schritte a) und b) zu gewinnen. Durch Mehrfach-Markierungsexperimente im Mikromafstab konnte

nachgewiesen werden, daß bei der Ringkontraktion (Schritt a) C-20 und seine benachbarte Methylgruppe als Essigsäure abgespalten werden. Was Schritt b) betrifft, so war die bereits erwähnte Technik der Pulsmarkierung dazu eingesetzt worden, um die Reihenfolge der Anknüpfung der zusätzlichen fünf Methylgruppen zu bestimmen, die benötigt werden, um Cobyrinsäure **11** zu bilden. Diese Methode hatte man ursprünglich entwickelt, um nachzuweisen, daß die vierte Methylgruppe an C-17 eingeführt wird. Weitere Experimente zeigten, daß als fünfte die C-12  $\alpha$ -Methylgruppe in **11** eingebaut wird, gefolgt von der an C-1. Mit Sicherheit werden als letzte und ungefähr gleichzeitig die Methylgruppen an C-5 und C-15 eingebaut.

Der Leser kennt den Anfang des  $B_{12}$ -Biosyntheseweges nun aus der Vogelperspektive: Er beginnt bei Succinyl-CoA **3**, das aus dem Primärmetabolismus stammt, und verläuft über ALA **4** bis hin zu Präcorrin-3A **10**, wobei jede Zwischenstufe und die Reihenfolge ihres Auftretens bekannt sind (Schema 1). Dann klafft eine gewaltige Lücke auf, bevor wir zu Cobyrinsäure **11** gelangen. Wir wissen aber, daß irgendwo zwischen **10** und **11** Essigsäure abgespalten wird, und auch die Reihenfolge der letzten fünf Methylierungen steht fest (17, 12 $\alpha$ , 1, 5/15).

Natürlich wurden während all der Jahre große Anstrengungen unternommen, um neue auf Präcorrin-3A **10** folgende Zwischenstufen aus *Pr.-shermanii*-Zellen zu isolieren, jedoch ohne den geringsten Erfolg! Vom heutigen Standpunkt läßt sich rückblickend sagen, daß *Pr. shermanii* für diese Untersuchungen nicht der am besten geeignete Organismus war, da die Stufen jenseits von Präcorrin-3A **10** möglicherweise schwer zu handhabende Cobaltkomplexe enthalten. Aus dieser Sackgasse heraus mußte ein neuer Weg gefunden werden, und glücklicherweise ergab er sich bei der Untersuchung des aeroben Organismus *Pseudomonas denitrificans*. Mit SC510<sup>[9]</sup> entdeckte man einen Stamm, der mit dem industriell genutzten Stamm eng verwandt ist und große Mengen an  $B_{12}$  produziert. Die Produktivität von SC510 konnte gegenüber der des Ausgangsstamms MB580 durch zahlreiche chemische und physikalische Schritte der Mutagenese entscheidend verbessert werden<sup>[9]</sup>. Eine hohe  $B_{12}$ -Produktion bedeutet auch ein hohes Maß an entsprechenden Enzymaktivitäten. Das ist ganz offenkundig von großem Vorteil für Arbeiten zur Isolierung und Charakterisierung von Enzymen und ebenso für damit zusammenhängende Biosyntheseuntersuchungen. Die Enzymaktivitäten sind in Wildtypstämmen normalerweise recht niedrig; bestenfalls werden wenige Zehntel Milligramm des Vitamins pro Liter Kultur produziert. Der Wechsel zu *Ps. denitrificans* unter gleichzeitiger Ausnutzung der Möglichkeiten von Genetik und Molekularbiologie erwies sich im nachhinein als entscheidend für den Fortgang unserer Untersuchungen, und zwar auf eine Weise, die unsere Erwartungen weit übertraf.

### 3. Die biologischen Grundlagen werden gelegt: Klonierung der *cob*-Gene von *Ps. denitrificans*

#### 3.1. Die Isolierung der Cob-Mutanten

Zu Beginn dieser Untersuchungen waren weder ein Gen noch eine bezüglich der Cobalaminsynthese defekte Mutante (eine Cob-Mutante) jemals aus einem Bakterium isoliert worden. Da

außerdem keines der Enzyme des Biosyntheseweges bis zur Homogenität gereinigt worden war, standen auch keine Sequenzdaten oder Antikörper für eines der Proteine zur Verfügung. Es war daher geplant, die *cob*-Gene<sup>[10]</sup> durch Isolierung von Mutanten und anschließende genetische Komplementierung zu klonieren. Die Biosynthese von Vitamin  $B_{12}$  umfaßt viele enzymatische Schritte. Um mit hoher Wahrscheinlichkeit Mutanten zu erhalten, die bezüglich der meisten Schritte defekt sind, war die Isolierung einer sehr großen Anzahl von Mutanten nötig, deren Cobalaminsynthese gehemmt war. Zur Isolierung von Cob-Mutanten<sup>[10]</sup> aus *Pseudomonas putida* und *Agrobacterium tumefaciens*, beides Gram-negative Bakterien, die Cobalamin unter aeroben Wachstumsbedingungen produzieren, wurden zwei Verfahren eingesetzt<sup>[9]</sup>.

In *A. tumefaciens* wurden die Mutanten in der Mehrzahl durch chemische Mutagenese mit *N*-Methyl-*N'*-nitro-*N*-nitrosoguanidin erhalten. Insgesamt wurden mehr als 22000 Kolonien mit Hilfe eines mikrobiologischen Assays einzeln daraufhin untersucht, ob sie Cobalamin synthetisieren können<sup>[9]</sup>. Dabei erhielt man 148 Cob-Mutanten mit verminderter Cobalaminsynthese-Aktivität. Die *Ps.-putida*-Mutanten erhielt man durch Transposon-Tn5-Mutagenese. Das Transposon-Tn5 ist ein 5.7 Kilobasen(kb)-Segment bakterieller DNA, das mit großer Häufigkeit in das bakterielle Chromosom inserieren kann und ein Gen enthält, das eine Resistenz gegen das Aminoglycosidantibiotikum Kanamycin bewirkt. Wird das Transposon in ein Empfängerbakterium auf einem solchen Plasmid inseriert, das nicht überlebt, wenn das Bakterium repliziert, können in Gegenwart von Kanamycin nur solche Zellen überleben, in denen das Transposon in das Chromosom inseriert wurde. Die Selektion solcher Kanamycin-resistenter Klone ergibt eine Reihe von Mutanten, die eine einzige Kopie von Tn5 tragen, die zufällig in das Genom integriert wurde<sup>[11]</sup>. Die Kolonien der Cob-Mutanten wurden dadurch identifiziert, daß sie ohne hinzugefügtes Cobalamin Ethanolamin nicht als Stickstoffquelle verwenden können. Diese Selektion beruht darauf, daß für die Desaminierung von Ethanolamin durch Ethanolamin-Ammoniak-Lyase Coenzym  $B_{12}$  als Cofaktor erforderlich ist. Von insgesamt 6400 Mutantenkolonien konnten 26 nicht auf dem ethanolaminhaltigen Medium wachsen und wurden deshalb als Cob-Mutanten klassifiziert.

#### 3.2. Die Klonierung von 78 kB DNA aus *Ps. denitrificans*, das die *cob*-Gene trägt

Als nächstes mußten nun die *cob*-Gene aus *Ps. denitrificans* kloniert werden, die die erwähnten Mutationen „komplementierten“, d. h. die Cobalamin-Biosynthese in den Cob-Mutanten wieder zu ermöglichen. Dazu wurde eine Genom-Bibliothek eines Rifampin-resistenten *Ps.-denitrificans*-Stammes (SCS10 Rif<sup>r</sup>) in *E. coli* auf einem Plasmid (pXL59) konstruiert, das in eine Vielzahl anderer Bakterien (darunter auch *Ps. denitrificans*) übertragen (oder mobilisiert) werden konnte. Dabei bediente man sich eines natürlichen Phänomens, das als Konjugation bekannt ist. Diese Bibliothek bestand aus annähernd 3600 separaten Stämmen von *E. coli*. Jeder dieser Stämme enthielt ein Plasmid mit einem anderen DNA-Stück (von durchschnittlich 13 kb) aus dem Genom von *Ps. denitrificans*. Diese Plasmid-

bibliothek sollte, statistisch gesehen, mehr als 99 % des Genoms von *Ps. denitrificans* repräsentieren.

Anschließend wurde diese Plasmidbibliothek der Reihe nach in jede der Cob-Mutanten mobilisiert. Für jede Mutante wurden die 3600 verschiedenen Klonen auf ihre Cobalaminproduktion hin überprüft. Dies geschah entweder durch Auswahl der Kolonien, die auf dem ethanolaminhaltigen Medium wachsen konnten, oder durch unmittelbare Suche nach Klonen, die ähnlich viel Cobalamin produzierten wie der Elternstamm. Man geht davon aus, daß die Mutation in solchen Klonen durch das Plasmid, das sie enthält, komplementiert wird. Daher trägt ein solches Plasmid mindestens ein *cob*-Gen von *Ps. denitrificans*, das für die Korrektur des genetischen Defekts der Mutante verantwortlich ist. Auf diese Weise wurden in der Bibliothek elf Plasmide aufgefunden, die die meisten der Mutanten (17 von 26 in *Ps. putida* und 134 von 148 in *A. tumefaciens*) komplementieren konnten. Die Inserts der elf Plasmide stammen aus vier Genorten, die als Komplementationsgruppen A–D bezeichnet werden. Zusammen repräsentieren sie 78 kb DNA. Die Genorte sind mindestens 10 kb voneinander entfernt; dies deutet darauf hin, daß die Gene über das Chromosom von *Ps. denitrificans* verteilt sind<sup>[12]</sup>.

Kleinere Fragmente dieser 78 kb DNA wurden auf denselben mobilisierbaren Plasmid subkloniert. Man untersuchte nun, welche Mutanten jedes rekombinante Plasmid ergänzen konnten, und identifizierte auf diese Weise innerhalb der 78 kb mindestens 14 verschiedene *cob*-Gene.

### 3.3. Genetische Analyse und Bestimmung der Nucleotidsequenz der *cob*-Gene

Zur Identifizierung der Gene, die in den klonierten 78 kb DNA enthalten waren, wurde eine genetische Analyse durchgeführt. Um in den meisten Regionen der 78 kb weitere Mutationen hervorzurufen, wurde im wesentlichen wieder auf die Tn5-Transposon-Mutagenese zurückgegriffen. Diese Analyse zeigte, daß sechs weitere *cob*-Gene vorhanden waren<sup>[13–17]</sup>. Insgesamt fand man 22 *cob*-Gene, die man als *cobA-cobQ* und *cobS-cobW* bezeichnete. Anschließend wurde die Nucleotidsequenz von 35.9 kb der klonierten 78 kb DNA bestimmt, die die 22 Gene codierten. Zusätzlich zu den *cob*-Genen wurden noch acht andere offene Leseraster (Stücke von DNA, die für Proteine zu codieren scheinen) in der sequenzierten DNA gefunden. Die Organisation der Gene in den vier Clustern (oder Komplementationsgruppen) ist in Abbildung 1 dargestellt.

Aus der Nucleotidsequenz konnten die Aminosäuresequenzen der Cob-Proteine abgeleitet werden. Da sich fast alle Gene von *Ps. denitrificans*, die für die Coenzym-B<sub>12</sub>-Synthese erforderlich sind, unter den 22 *cob*-Genen befanden, erwies sich dieses Vorgehen als äußerst wertvoll. Darüber hinaus konnten die Aminosäuresequenzen der Cob-Proteine mit Sequenzen aus Protein-Datenbanken verglichen werden; dies ermöglichte wichtige Schlüssefolgerungen bezüglich der mutmaßlichen Funktionen einiger Proteine, insbesondere der Methyl-Transferasen. Zusätzlich wurde auch das *hemA*-Gen aus *Ps. denitrificans*, das

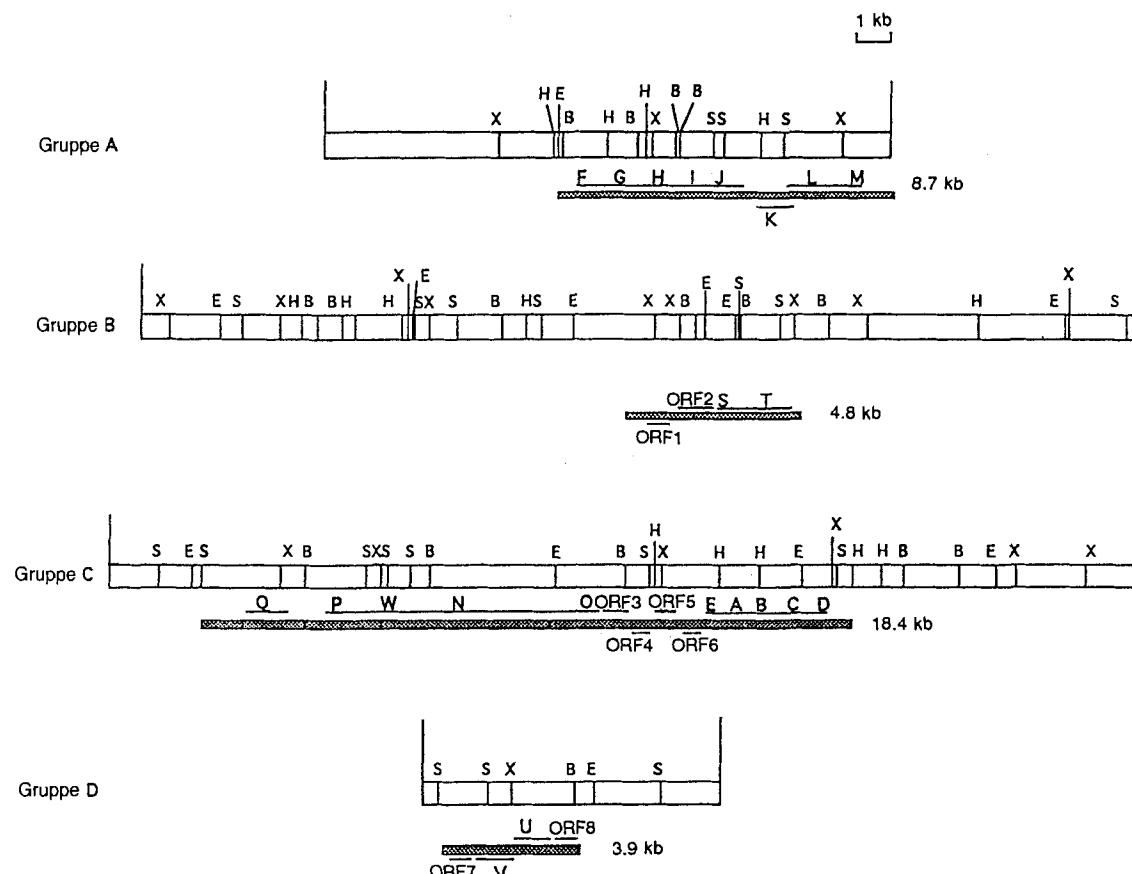


Abb. 1. Restriktionskarte der vier Komplementationsgruppen von *Ps. denitrificans*. Die Orte der *cob*-Gene werden durch die entsprechenden Buchstaben unter dem DNA-Strang angezeigt; ebenso werden offene Leseraster (ORFs) mit unbekannter Funktion angegeben. Sequenzierte Fragmente werden durch schraffierte Linien wiedergegeben. Eine Linie über der Schraffierung gibt an, daß der codierende Strang in 5'-3' Richtung von links nach rechts verläuft. Enzyme: B, *Bam* H1; E, *Eco* R1; H, *Hind* III; S, *Sst* I; X, *Xho* I.

für 5-Aminolävulinsäure-Synthase codiert, kloniert und sequenziert<sup>[18]</sup>. Dieses Gen war in keiner der für die *cob*-Gene gefundenen vier Komplementationstruppen enthalten<sup>[12]</sup>.

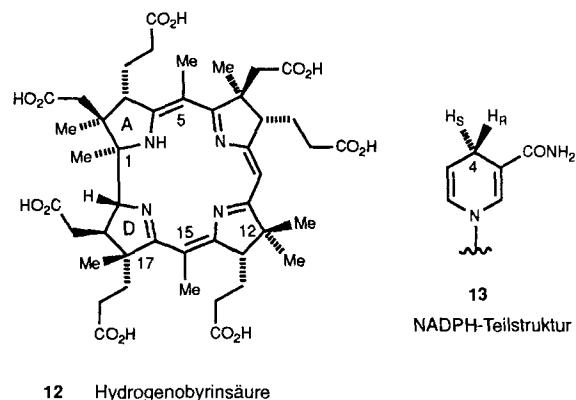
Diese Untersuchungen zur Klonierung von Genen waren für die parallel laufenden Forschungsarbeiten zur Enzymologie und Strukturchemie von großer Bedeutung. Die Ergebnisse dieser beiden Bereiche hatten dann wieder eine positive Rückkopplung auf die Molekularbiologie. Durch Identifizierung der angereichten Zwischenstufen gelang für viele der Mutantenstämme die Lokalisierung der blockierten Stufe sowie die Korrelation mit dem Gen, das die Mutation komplementierte<sup>[13–16]</sup>. Nähere Angaben zu den Mutanten, die die späteren, schon bekannten Vorstufen des B<sub>12</sub>-Syntheseweges akkumulieren, finden sich gegen Ende dieses Artikels in Tabelle 1. Ist ein bestimmtes Gen auf einem Multicopy-Plasmid vorhanden, so wird das entsprechende Protein auch vermehrt produziert. Dies ist eine große Hilfe für die enzymatischen und chemischen Untersuchungen. In einem solchen Gemeinschaftsprojekt einen Bereich gegenüber den anderen hervorzuheben, wäre zwar vermessen, doch waren die Beiträge aus Genetik und Molekularbiologie sicher von unverzichtbarem Wert.

## 4. Der Aufstieg zum Gipfel

### 4.1. Die Isolierung von Präcorrin-6A und der Nachweis seiner ungewöhnlichen Struktur

„Aus kleinen Eicheln wachsen große Eichen.“ Entscheidend für unser weiteres Vorgehen war die Beobachtung einer gelben Fluoreszenz – vergleichbar mit der sprichwörtlichen Eichel –, aus der sich alle im weiteren dargestellten Ergebnisse entwickelten. Zellen eines rekombinanten Stammes von *Ps. denitrificans* [SC510 (pXL253)], in dem acht der oben erwähnten *cob*-Gene (*F, G, H, I, J, K, L* und *M*) verstärkt worden waren, zeigten unter UV-Licht eine stark gelbe Fluoreszenz. Zu unserem Glück war die dafür verantwortliche Substanz kurz zuvor aus *Ps. denitrificans* SC510 Rif<sup>r</sup> isoliert und als Hydrogenobyrinsäure **12**, das cobaltfreie Analogon von Cobyrinsäure **11**, identifiziert worden<sup>[19]</sup>. Dieser Befund kam ziemlich unerwartet, denn obwohl amidierte Derivate der Hydrogenobyrinsäure **12** bereits bekannt waren<sup>[20]</sup>, war die Säure selbst noch nie isoliert worden. Man ging deshalb davon aus, daß sie in der Natur nicht vorkommt<sup>[21]</sup>. Später werden wir darauf eingehen, wie eindeutig nachgewiesen werden konnte, daß Hydrogenobyrinsäure **12** als Zwischenstufe in der Biosynthese von Vitamin B<sub>12</sub> in *Ps. denitrificans* auftritt. Damit war dieser Stamm, der beträchtliche Mengen eines späten corrinoiden Vorläufers von Vitamin B<sub>12</sub> produziert, der ideale Organismus für Biosynthese-Experimente. Es kostete viel Arbeit, aus diesem Stamm ein zellfreies Enzymsystem zu entwickeln, das Präcorrin-3A<sup>[22]</sup> **10** durch all die vielen Stufen effizient in Hydrogenobyrinsäure **12** umwandelt. Letztere konnte in kleinsten Mengen durch Hochdruck-Flüssigkeitschromatographie (HPLC)<sup>[23]</sup> in Verbindung mit einem Fluoreszenzdetektor nachgewiesen werden. Damit war der Weg nun frei für Untersuchungen a) zur Verbesserung der Inkubationsbedingungen und b) zur Bestimmung der für die Umwandlung von Präcorrin-3A **10** in Hydrogenobyrinsäure **12** notwendigen Co faktoren. Dabei zeigte sich, daß für diese Umwandlung neben

SAM die Anwesenheit von NADPH, also reduziertem Nicotinamidadenindinucleotidphosphat **13** (zeigt die wichtige Teilstruktur) unbedingt erforderlich war.

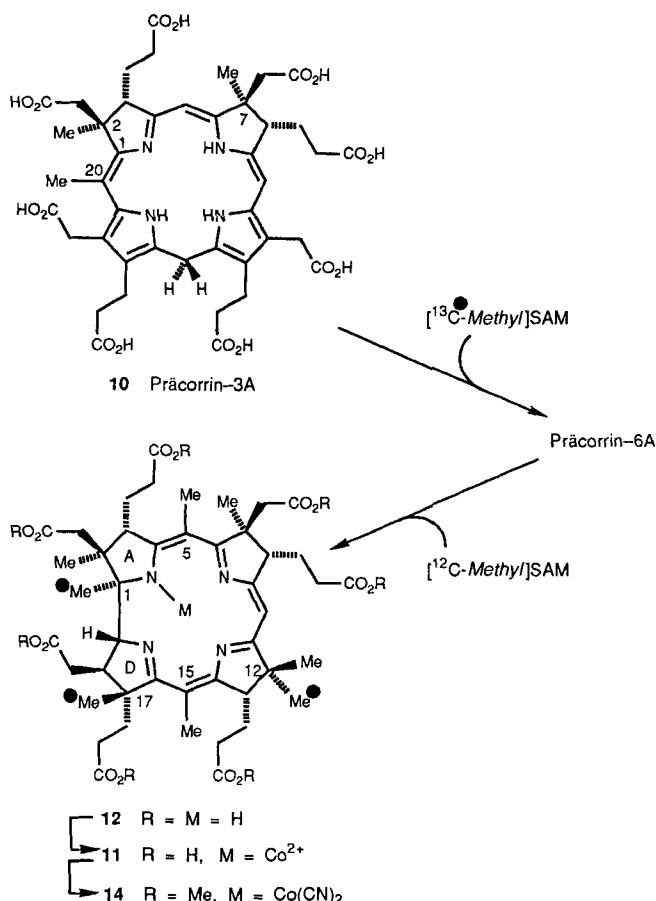


**12** Hydrogenobyrinsäure

Die Vitamin-B<sub>12</sub>-Forschung war voller Überraschungen; eine davon war sicherlich die Beteiligung von NADPH an der Biosynthese. All diejenigen, die sich mit ihr beschäftigt hatten, waren davon ausgegangen, daß sie ohne externe Redoxreaktoren auskommt. Unter dieser Voraussetzung war es natürlich besonders interessant, der Frage nachzugehen, welche Rolle NADPH spielt. Dazu wurde die Inkubation unter Ausschluß von NADPH wiederholt – das Ergebnis dieses Experiments war eine Riesenüberraschung! Es wurde nun keine Hydrogenobyrinsäure **12** mehr gebildet. Ein neues, blaßgelbes Pigment reichte sich stattdessen an. Als man dieses neue Produkt, das man enzymatisch in doppelt markierter Form (<sup>3</sup>H, <sup>14</sup>C) hergestellt hatte, mit dem oben erwähnten Enzymsystem und allen Cofaktoren einschließlich NADPH inkubierte, wurde es in hoher Ausbeute (50–90 %) und ohne signifikante Veränderung des <sup>3</sup>H: <sup>14</sup>C-Verhältnisses in Hydrogenobyrinsäure **12** umgewandelt. Dieser Befund ließ keinen Zweifel mehr daran, daß nach einer langen Zeit der Frustration schließlich doch eine neue Zwischenstufe der B<sub>12</sub>-Biosynthese gefunden worden war<sup>[24]</sup>.

Durch Synthese des neuen Produktes aus [2,7,20-Methyl-<sup>14</sup>C]Präcorrin-3A **10** und [*Methyl*-<sup>3</sup>H]SAM konnte gezeigt werden, daß während dieser Umwandlung drei neue Methylgruppen in Präcorrin-3A **10** eingebaut werden. Die blaßgelbe Zwischenstufe war also durch Hexamethylierung von Uro'gen III **7** entstanden und wurde deshalb als Präcorrin-6A bezeichnet<sup>[5]</sup>. Aus der <sup>14</sup>C-Markierung des ursprünglich eingesetzten Präcorrins-3A **10** konnte man eine zusätzliche Information ableiten, da die in Präcorrin-6A gefundene <sup>14</sup>C-Aktivität für den Verlust seiner Methylgruppe an C-20 sprach, der irgendwo auf dem Weg zu Präcorrin-6A erfolgt sein mußte. Zusammen mit den früheren Befunden bei *Pr. shermanii*, die gezeigt hatten, daß die Ringkontraktion unter Verlust von C-20 und seiner benachbarten Methylgruppe (als Essigsäure) verläuft, deutete dieses Ergebnis sehr darauf hin, daß Präcorrin-6A ein kontrahierter Makrocyclus war<sup>[24]</sup>.

An welchen Positionen finden sich die drei neuen Methylgruppen in Präcorrin-6A? Anfangs versuchte man, diese Frage indirekt zu beantworten, indem man Präcorrin-6A aus nicht-markiertem Präcorrin-3A **10** und [*Methyl*-<sup>13</sup>C]SAM herstellte, um so die drei neuen Methylgruppen zu markieren (Schema 2).



Schema 2. Bestimmung der Position der Methylgruppen in Präcorrin-6A.

Das Produkt wurde anschließend enzymatisch in Hydrogenobyrinsäure **12** umgewandelt, diesmal unter Einsatz von nichtmarkiertem SAM. Zur Analyse wurde **12** über Cobyrinsäure **11** durch nichtenzymatische Insertion von Cobalt und anschließende Veresterung in Heptamethylcobyrinat **14** (Cobester) umgewandelt (Schema 2). Man wählte diese Vorgehensweise, weil das <sup>13</sup>C-NMR-Spektrum von Cobester vollständig zugeordnet worden war<sup>[25, 26]</sup>. Das <sup>13</sup>C-NMR-Spektrum (siehe Abb. 2) zeigte, daß die C-Methylgruppen, die im Cobester an C-17, C-12 $\alpha$  und C-1 auftraten, auch in Präcorrin-6A vorhanden sind. Diese Befunde stimmen gut mit den früheren Resultaten aus Pulsmarkierungsexperimenten überein, die gezeigt hatten, daß die Methylgruppen an C-5 und C-15 von Cobyrinsäure als letzte eingebaut werden. Kürzlich konnte gezeigt werden, daß dies auch für Hydrogenobyrinsäure **12** gilt<sup>[19]</sup>.

Die massenspektrometrische Untersuchung des Präcorrin-6A-methylesters (Molekülmasse 1006) zeigte, daß Präcorrin-6A selbst eine Octacarbonsäure ist. Auch dies hatten wir nicht erwartet, denn es bedeutet, daß der Acetat-Rest an C-12, der auf irgendeiner Stufe zur 12 $\alpha$ -Methylgruppe der Hydrogenobyrinsäure **12** decarboxyliert werden muß, in Präcorrin-6A noch intakt vorliegt. Dies ist merkwürdig, weil einerseits die Decarboxylierung durch Methylierung an C-12 blockiert wird (siehe **15**), andererseits aber feststeht, daß eine der C-Methylgruppen von Präcorrin-6A letztlich an C-12 $\alpha$  der Hydrogeno-

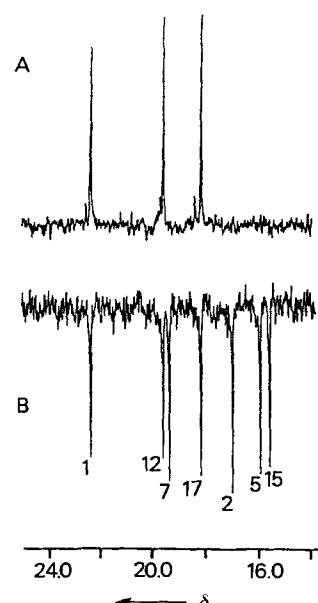
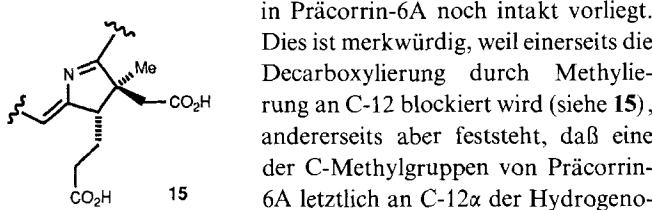
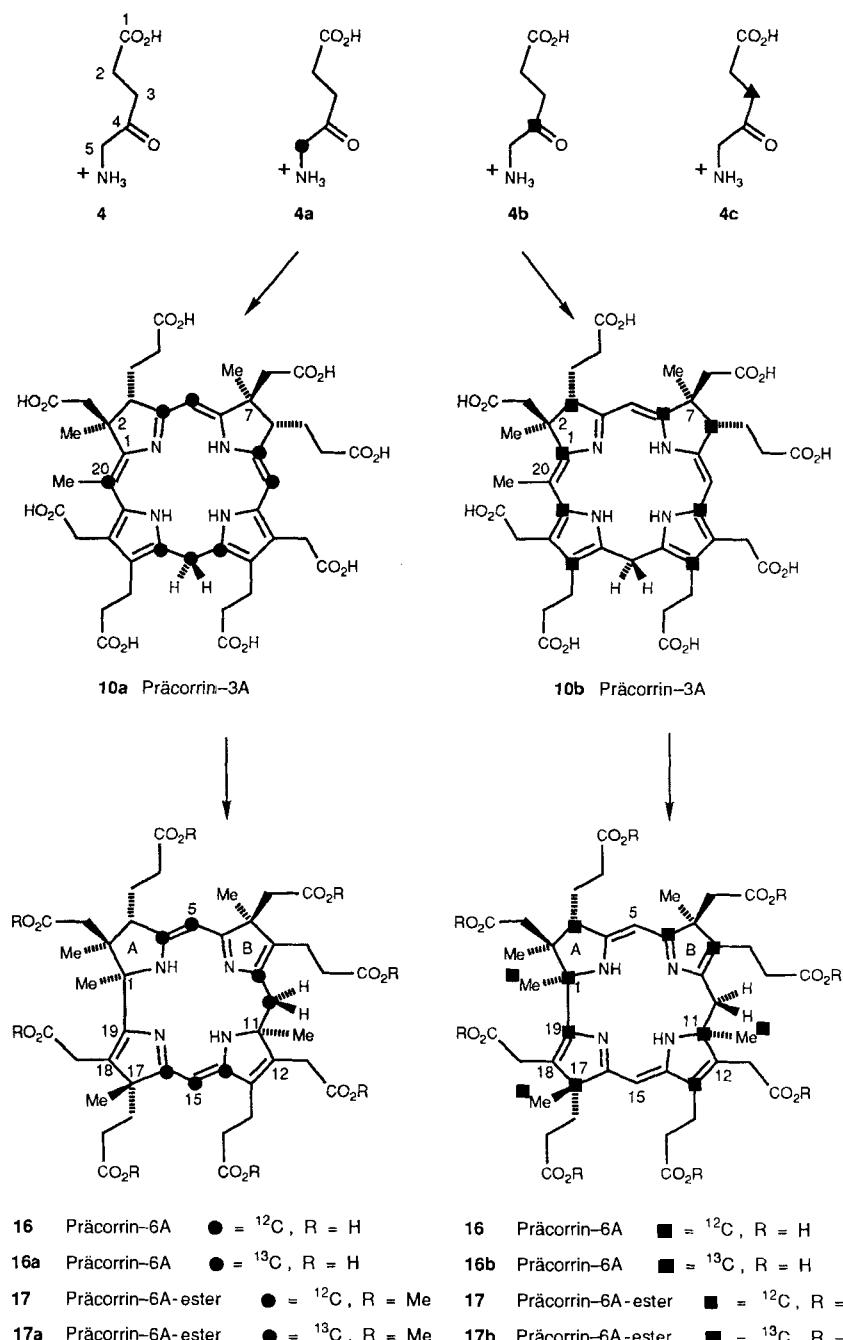


Abb. 2. Protonenrauschentkoppeltes <sup>13</sup>C-NMR-Spektrum (A) des markierten, aus Präcorrin-6A biosynthetisch hergestellten Cobesters **14** und (B) <sup>13</sup>C-Signale (natürliche Häufigkeit) aller C-Methylgruppen des nichtmarkierten Cobesters **14**.

byrinsäure **12** auftritt. Dieses Paradoxon soll gleich erklärt werden. Aus der massenspektrometrisch ermittelten Molekülmasse von 1006 ergab sich schließlich auch der Nachweis dafür, daß Präcorrin-6A der Oxidationsstufe eines Dehydrocorrins (sieben Doppelbindungen), und nicht etwa der eines Corrins (sechs Doppelbindungen) entspricht<sup>[24]</sup>. Um die Oxidationsstufe von Präcorrin-6A letztlich der des Corrins **12** anzugeleichen, ist also später noch eine Reduktion (um 2H) erforderlich. Das paßt auch zu dem Befund, daß Präcorrin-6A nur in Abwesenheit von NADPH akkumuliert wird.

Diese Informationen zur Struktur zeigten eindeutig, daß es sich bei Präcorrin-6A um einen äußerst wertvollen Informanten handelte, denn er ließ sich etwa im mittleren Bereich des Syntheseweges ansiedeln, über den man bislang nichts wußte. Aber selbst die Strukturinformationen, die wir auf dieser Stufe gewonnen hatten, paßten überhaupt nicht zu all unseren früheren Spekulationen über das, was sich während der B<sub>12</sub>-Biosynthese abspielt. Und so versuchten wir, intensiv und voller Spannung, seine Struktur vollständig aufzuklären. Wie sollte dies gelingen? Da Präcorrin-6A bis heute nicht kristallisiert werden konnte, kam eine Röntgenstrukturanalyse nicht in Betracht. Und obwohl mit beträchtlichen Mengen überexprimierter Enzyme relativ viel Präcorrin-6A gewonnen werden konnte, waren diese Substanzmengen, üblicherweise zwischen 500 µg und 1 mg, noch immer sehr gering. Da man aber – vorausgesetzt, die Verbindung wird <sup>13</sup>C-markiert gewonnen – selbst mit geringsten Substanzmengen exzellente <sup>13</sup>C-NMR-Spektren erhält, wählten wir diesen Ansatz.

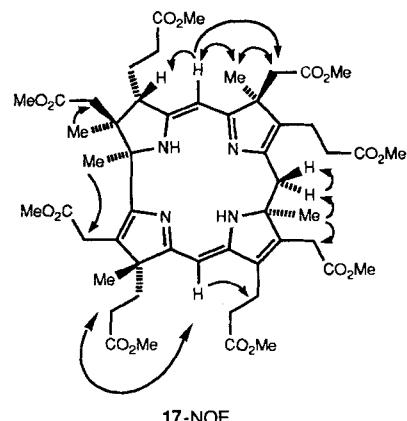
So wurde z.B. [5-<sup>13</sup>C]ALA **4a** mit der richtigen Kombination überproduzierter Enzyme in das Präcorrin-3A **10a**<sup>[22]</sup> (Schema 3) umgewandelt. Das Markierungsmuster ergibt sich zweifelsfrei aus der genauen Kenntnis<sup>[2]</sup> der Biosynthesestufen zwischen ALA **4** und Uro'gen III **7**. Das <sup>13</sup>C-Muster ist sehr nützlich, da die <sup>13</sup>C-Markierung an C-20 die einzige ist, die isoliert steht. Einzigartig ist auch die Gruppe der drei benachbarten <sup>13</sup>C-Atome um C-15; die verbleibenden beiden Paare an C-4/C-5 und C-9/C-10 können durch geeignete Experimente unterschieden werden. Das markierte Präcorrin-3A **10a** wurde

Schema 3.  $^{13}\text{C}$ -Markierung von Präcorrin-6A 16a und 16b.

anschließend mit überproduzierten Enzymen unter Verwendung von nichtmarkiertem SAM in Präcorrin-6A 16a umgewandelt; für die NMR-Untersuchungen wurde der entsprechende Octamethylester 17a isoliert. Auf die gleiche Weise wurden zwei weitere Präcorrin-6A-ester 17b und 17c (letzterer nicht abgebildet), hergestellt. Dabei ging man von  $[4-^{13}\text{C}]ALA$  4b bzw.  $[3-^{13}\text{C}]ALA$  4c aus. Für die Stufen von Präcorrin-3A 10b zu Präcorrin-6A wurde als Cofaktor  $[\text{Methyl-}^{13}\text{C}]SAM$  verwendet. So wurde, wenn man die drei Proben zusammen betrachtet, jedes Kohlenstoffatom des Makrocyclus  $^{13}\text{C}$ -markiert. Dies gilt auch für die drei C-Methylgruppen, die in den auf Präcorrin-3A folgenden Stufen eingebaut werden<sup>[27]</sup>.

Es ginge über den Rahmen dieses Artikels hinaus, eine vollständige Darstellung der NMR-Analyse zu geben; um ihre

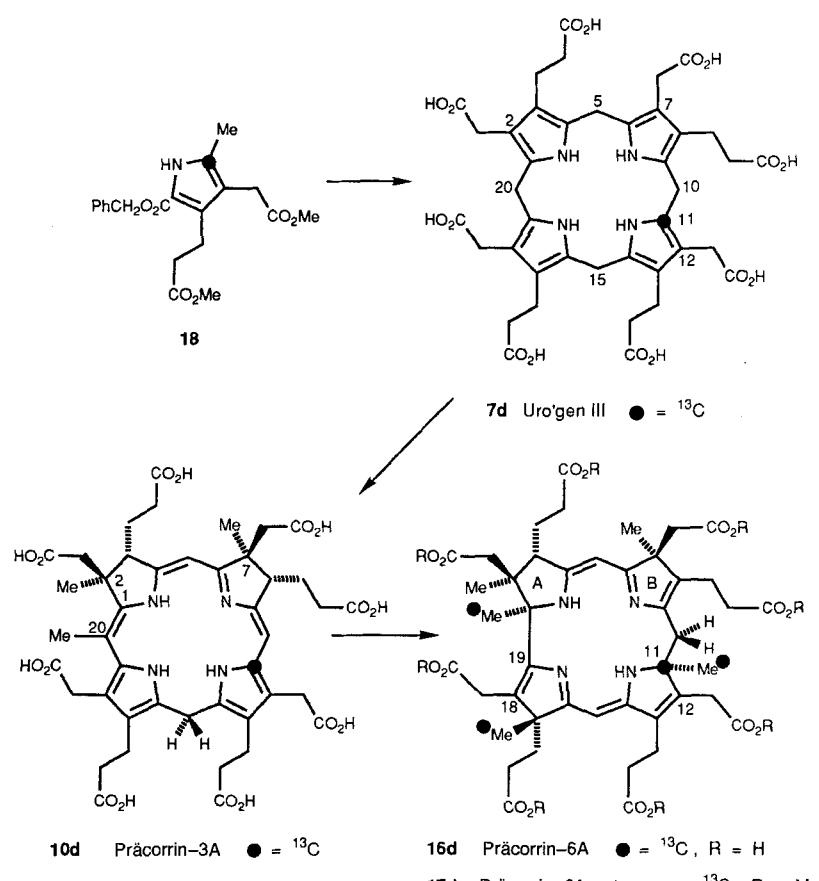
enorme Aussagekraft aber zu verdeutlichen, sollten an dieser Stelle allerdings wenigstens die wesentlichen Aspekte erläutert werden. Die erste Probe, 17a aus  $[5-^{13}\text{C}]ALA$  4a, zeigte den Verlust von C-20 von Präcorrin-3A 10a und daß C-15 nun ein  $\text{sp}^2$ -Kohlenstoffatom war. C-10 dagegen war eindeutig  $\text{sp}^3$ -hybridisiert. Vollkommen überraschend aber war das Spektrum des Präcorrin-6A-esters 17b aus  $[4-^{13}\text{C}]ALA$  4b.



Die Signale von C-1 und C-19 zeigten eindeutig, daß diese Atome direkt miteinander verknüpft sind, und bestätigten damit, daß die Ringkontraktion stattgefunden hatte. Überraschend war, daß die drei markierten Methylgruppen alle direkt mit  $^{13}\text{C}$ -Atomen verknüpft waren. Das hatten wir zwar für die Methylgruppen an C-17 und C-1 erwartet, aber ganz sicher nicht für die dritte Methylgruppe. Ganz offensichtlich konnte sich diese Gruppe nicht an C-12 befinden (wo sie in der Hydrogenobyrinsäure 12 letztlich aber auftritt), weil es sich hierbei um einen nichtmarkierten Kohlenstoff handelt. Die gesamte Beweislage deutete auf eine Methylierung am benachbarten Zentrum C-11 hin. Eine spezielle Untersuchung, die uns den ein-

deutigen Beweis lieferte, soll hier kurz beschrieben werden. Das Spektrum der Probe von Präcorrin-6A aus  $[3-^{13}\text{C}]ALA$  sowie auch die Untersuchung aller drei markierten Proben 17a, 17b und 17c (keine Formel gezeigt), z.B. durch  $^1\text{H}-^{13}\text{C}$ -NMR-Korrelationsexperimente zur Identifizierung von  $^1\text{H}-^{13}\text{C}$ -Kopplungen über bis zu drei Bindungen, ermöglichte es uns, weitere Merkmale der abgebildeten Struktur aufzuklären. Dieser Ansatz erlaubt die Untersuchung eines beträchtlichen Molekülbereiches um jedes  $^{13}\text{C}$ -markierte Zentrum; auf diese Weise läßt sich ein Konnektivitätsmuster von  $^1\text{H}$  und  $^{13}\text{C}$  um den ganzen Makrocyclus herum erstellen. Einen unabhängigen Satz von Verknüpfungen (siehe dazu die Pfeile in Struktur 17 – NOE) erhielt man durch die Untersuchung der  $^1\text{H}$ -Nuclear-Overhauser-Effekte mittels Differenzspektroskopie.

Die Summe all dieser Beweise ergab für den Präcorrin-6A-ester die verblüffende Struktur **17**, und damit für das Präcorrin-6A selbst die Struktur **16**<sup>[27, 28]</sup>. Die für C-2 und C-7 angegebenen Konfigurationen beruhen auf der mit hoher Ausbeute verlaufenden enzymatischen Umwandlung von Präcorrin-6A **16** in Hydrogenobyrinsäure **12**, für die die Konfigurationen an diesen Zentren unzweifelhaft feststehen. Diese direkte Beziehung zu **12** weist der Methylgruppe an C-11 von Präcorrin-6A **16** die  $\alpha$ -Position zu, weil die C-11-C-12-Wanderung der CH<sub>3</sub>-Gruppe mit Sicherheit suprafacial verläuft (siehe Abschnitt 4.4). Und wir wissen, daß die 12 $\alpha$ -Methylgruppe von **12** aus SAM stammt<sup>[3b]</sup>. Der Befund der C-11-Methylierung war so überraschend, daß wir ihn mit unanfechtbaren Beweisen absicherten (Schema 4).



Schema 4. Nachweis der Methylierung an C-11 in Präcorrin-6A **16d**.

Dazu führten wir die Synthese<sup>[29]</sup> von Uroporphyrin-III durch, das nur an C-11 <sup>13</sup>C-markiert war; abgebildet ist lediglich das Ausgangsmaterial **18** für diese Synthese. Das Porphyrin wurde zu [11-<sup>13</sup>C]Uro'gen III **7d** reduziert, das über [11-<sup>13</sup>C]-Präcorrin-3A **10d** unter Einsatz von [*Methyl-*<sup>13</sup>C]SAM in Präcorrin-6A **16d** umgewandelt wurde; isoliert wurde der Ester **17d**. Das <sup>13</sup>C-NMR-Signal von C-11, der einzigen Markierung im Makrocyclus, erschien, wie auch das Signal seiner benachbarten Methylgruppe, als ein 38 Hz-Dublett<sup>[29]</sup>. Damit war die Struktur **16** für Präcorrin-6A völlig gesichert.

Die eben geschilderten bemerkenswerten Entdeckungen veränderten unsere gesamten Vorstellungen über die Biosynthese von Vitamin B<sub>12</sub>; wir mußten eine ganze Reihe unserer früheren

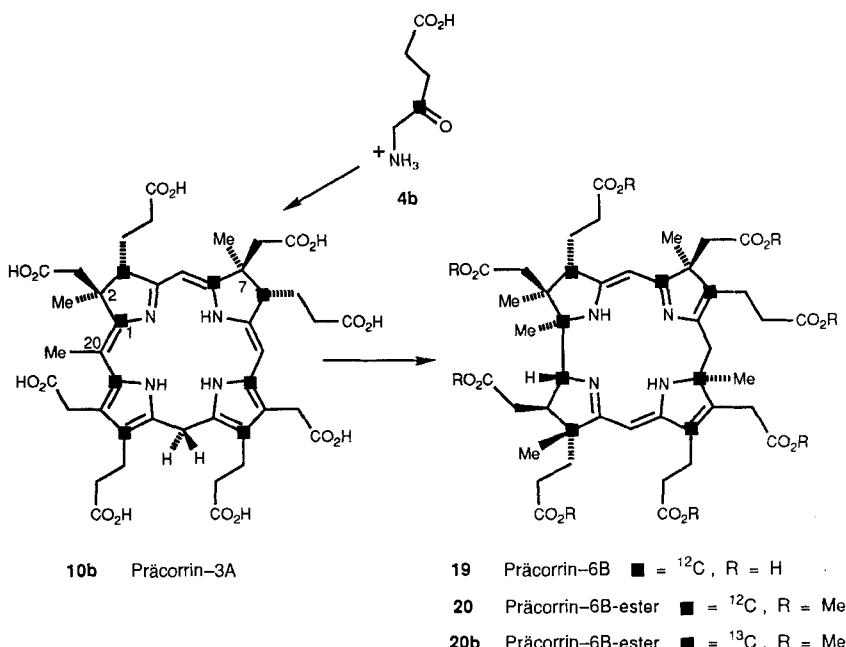
Ansichten aufgeben. Aus der Struktur von Präcorrin-6A ließ sich ableiten, daß erstens die Ringkontraktion nicht auf einer späten Stufe des Biosyntheseweges stattfindet, sondern bereits auf der hexamethylierten Stufe abläuft. Zweitens folgte daraus, daß sich die Oxidationsstufe während der Biosynthese ändert. Da Präcorrin-6A **16** zwei Wasserstoffatome ärmer ist als Uro'gen III **7** und Hydrogenobyrinsäure **12**, ist eine Oxidation auf einer frühen Stufe und eine Reduktion auf einer späteren Stufe nötig. Drittens ist der 12-Aacetat-Rest noch intakt, und seine Decarboxylierung braucht nicht vor Einführung der fünften Methylgruppe stattzufinden. Als wahrscheinlich größte Überraschung folgte aus der Struktur von Präcorrin-6A, daß die Methylgruppe, die sich nach Aufbau des Corrin-Makrocycles an C-12 befindet, ursprünglich an C-11 eingeführt wird. Man beachte, daß diese C-11-Methylierung die Bildung eines vollständig konjugierten Systems verhindert. Das erklärt auch die blaßgelbe Farbe des Präcorrins-6A **16**.

Präcorrin-6A **16** ist die entscheidende Zwischenstufe der B<sub>12</sub>-Biosynthese; von hier aus können wir uns zu B<sub>12</sub> vorarbeiten, aber auch rückwärts blicken und so die Lücke zwischen Präcorrin-3A **10** und Präcorrin-6A **16** schließen. Wir werden uns, wie auch im Laboratorium geschehen, zunächst nach vorn orientieren, um die Aufklärung des Synthesewegs bis hin zu Hydrogenobyrinsäure **12** abzuschließen.

#### 4.2. Präcorrin-6A-Reduktase und die Struktur von Präcorrin-6B

Da Präcorrin-6A **16** unter Ausschuß von NADPH und damit blockierter Reduktion angereichert wird, sollte es nach den Gesetzen der Logik möglich sein, sowohl die Reduktase als auch das normale Reduktaseprodukt, die nächste Zwischenstufe auf dem Biosyntheseweg, zu isolieren. Die Art und Weise, wie man beide erhielt, zeigt eindrucksvoll, wie eine komplexe Biosynthesesequenz untersucht werden kann, wenn erst einmal die Palette der beteiligten Enzyme zur Verfügung steht. Es sollte jedoch nicht vergessen, sondern vielmehr betont werden, daß man anfangs zwar weiß, daß viele Proteine daran beteiligt sind, nicht aber, welches Enzym wofür verantwortlich ist!

Das Reduktionsprodukt Präcorrin-6B (Schema 5) wurde zuerst so hergestellt, daß man Präcorrin-6A **16** mit dem vollständigen Satz überproduzierter Enzyme, die von dem 8.7 kb-Fragment codiert werden, jedoch ohne Zusatz von SAM inkubierte<sup>[30]</sup>. Dieses Vorgehen verhinderte die Methylierung von Präcorrin-6B, die, wie wir gleich sehen werden, an der nächsten Umwandlung beteiligt ist. Auf diese Weise reichertete sich Präcorrin-6B an und konnte entweder direkt oder, bequemer, nach Veresterung isoliert werden. Die Molekülmasse von Präcorrin-6B wurde durch Fast-Atom-Bombardment-Massenspektrometrie (FAB-MS) zu 896 ermittelt; der entsprechende Wert für den Methylester betrug 1008. Beide Werte liegen um zwei Einheiten höher als die, die man für Präcorrin-6A **16** und seinen Ester **17**

Schema 5.  $^{13}\text{C}$ -Markierung von Präcorrin-6B 20b.

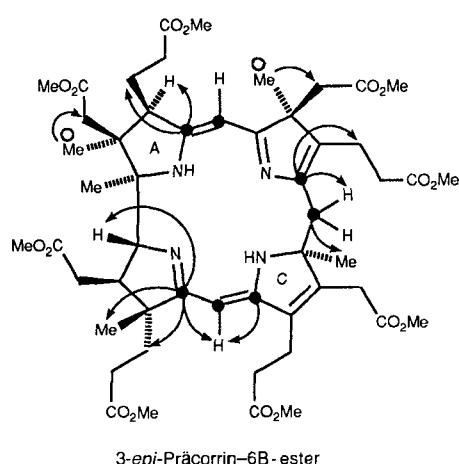
gefunden hatte. Dies beweist, daß bei der Bildung von Präcorrin-6B nur ein einziger Reduktionsschritt stattgefunden haben kann. Darüber hinaus zeigt die Massenänderung von Präcorrin-6B zu seinem Methylester, daß *acht* Carboxygruppen vorhanden sind. Das bedeutet, daß auf dieser Stufe keine Decarboxylie rung des 12-Acetats erfolgt ist. Im weiteren stellt sich heraus, daß der oben erwähnte Octamethylester als eine Mischung von zwei C-3-Epimeren vorlag. Eine solche Bildung von Epimeren ist uns bereits aus der Chemie<sup>[31]</sup> vieler der methylierten Makrocyclen in Schema 1 vertraut. In diesem Fall verursachte sie keinerlei Probleme, da sich die Epimeren trennen ließen und ihre Strukturen mit der Strategie, die für die Untersuchung von Präcorrin-6A **16** entwickelt worden war, aufgeklärt werden konnten<sup>[32]</sup>. So wurden sie also aus [4- $^{13}\text{C}$ ]ALA **4b** und, in einem weiteren Experiment, aus [5- $^{13}\text{C}$ ]ALA **4a** durch kombinierten Einsatz der dazu notwendigen *zehn* überproduzierten Enzyme biosynthetisch hergestellt (Schema 5). Die isolierten Octamethylester der entstandenen Isotopomere von Präcorrin-6B und seinem Epimer wurden dann eingehend NMR-spektroskopisch

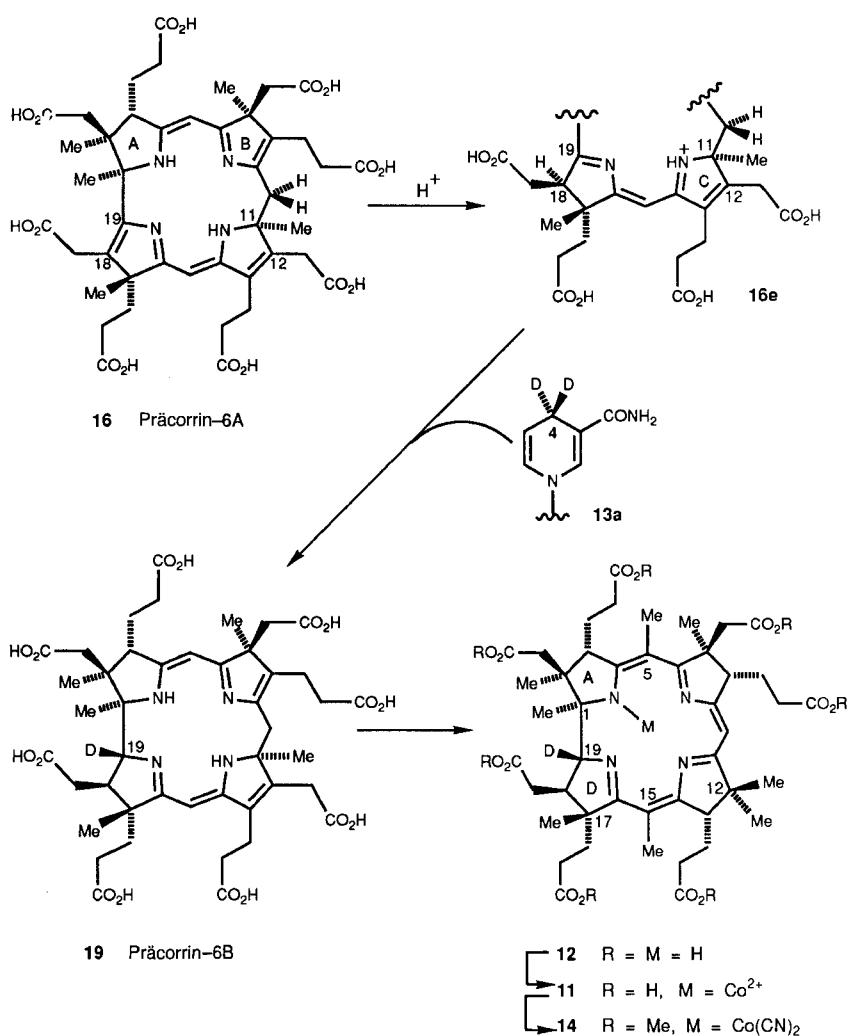
untersucht; diese Phase unserer Arbeit soll lediglich an einem Beispiel illustriert werden.

Der aus [4- $^{13}\text{C}$ ]ALA **4b** abgeleitete markierte Präcorrin-6B-ester **20b** und sein Epimer wurden durch Hochfeld- $^{13}\text{C}$ -NMR-Spektroskopie untersucht; dabei erwiesen sich C-1 und C-19 als die einzigen  $^{13}\text{C}$ -Zentren, die direkt miteinander verknüpft waren. Aus der chemischen Verschiebung folgte, daß C-19 ein  $\text{sp}^3$ -Kohlenstoffatom war, wohingegen es sich bei C-19 in Präcorrin-6A **16** um ein  $\text{sp}^2$ -Kohlenstoffatom handelte. Damit war klar, daß die C-18/C-19-Doppelbindung von **16** in Präcorrin-6B reduziert worden war. Wie im Präcorrin-6A-ester **17** handelte es sich bei C-8 um ein  $\text{sp}^2$ - und bei C-10 um ein  $\text{sp}^3$ -Kohlenstoffatom. Darüber hinaus ergaben die Spektren, daß das 3-*epi*-Isomer gegenüber dem normalen Isomer mit unveränderter Konfiguration an C-3 in leichtem Über schuß (60% der Gesamtmenge) gebildet worden war. Daher wurde das 3-*epi*-Isomer für  $^{1}\text{H}$ - $^{13}\text{C}$ -Weitbereichs-Korrelationsexperimente eingesetzt. Man wählte das optimale

Delay für 10 Hz-Kopplungen, um so die  $^{13}\text{C}$ - $^{1}\text{H}$ -Kopplungen über bis zu drei Bindungen zu detektieren. Damit ergaben sich für den 3-*epi*-Präcorrin-6B-ester die durch Pfeile dargestellten Konnektivitäten. Die Gesamtschau der Ergebnisse, zusammen mit den Resultaten aus den Experimenten mit dem aus [5- $^{13}\text{C}$ ]ALA **4a** erhaltenen Präcorrin-6B-ester **20a** (nicht abgebildet), ergaben für den Präcorrin-6B-ester zweifelsfrei die Struktur **20**. Daraus folgt, daß Präcorrin-6B selbst die Struktur<sup>[32]</sup> **19** hat oder ein davon abgeleitetes Tautomer ist<sup>[28]</sup>. An diesem Punkt des Syntheseweges war die Oxidationsstufe von Präcorrin-6B **19** gut auf die Oxidationsstufe von Hydrogenobyrinsäure **12** abgestimmt. Da Präcorrin-6B mit hoher Ausbeute in Hydrogenobyrinsäure **12** umgewandelt wird und die  $\beta$ -Konfiguration von H-19 über jeden Zweifel erhaben ist, gehen wir davon aus, daß die Konfiguration an C-19 von **19** der hier angegebenen entspricht.

Für das Gesamtverständnis war es wichtig, a) die Regiospezifität und b) die Stereospezifität des oben beschriebenen Reduktionsprozesses zu untersuchen. So stellte sich für a) die Frage, an welchem Kohlenstoffatom der C-18/C-19-Doppelbindung das Hydridäquivalent aus NADPH addiert, und für b), von welcher Seite des NADPH es entfernt wird. Um die erste Frage zu beantworten, wurde [ $4-^2\text{H}_2$ ]NADPH **13a** synthetisiert, das an C-4 zu 95% deuteriert war. Es wurde eingesetzt, um Präcorrin-6A **16** mit der stark angereicherten Reduktase zu reduzieren (Schema 6). Das auf diese Weise gebildete Präcorrin-6B **19** wurde anschließend mit Hilfe eines Enzymsystems, das keine Hydrogenobyrinsäure **12** enthielt, in **12** umgewandelt. Durch nicht-enzymatische Insertion von Cobalt stellte man daraus Cobyrinsäure **11** dar, die nach Veresterung Heptamethylcobyrinat (Cobester) **14** ergab. Das  $^{1}\text{H}$ -NMR-Spektrum von Cobester war schon früher vollständig zugeordnet worden<sup>[25, 26]</sup>, und das Spektrum des biosynthetisch gewonnenen Produktes belegte, daß C-19 25–30 % Deuterium trug. Die sorgfältige Untersuchung des  $^2\text{H}$ -markierten Cobesters durch NMR- und Massenspektrome-





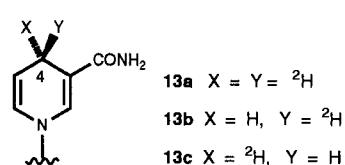
Schema 6. Nachweis, an welcher Stelle die Hydridübertragung bei der Reduktion von Präcorrin-6A 16 erfolgt.

trie ergab, daß C-19 das einzige Kohlenstoffatom mit Deutерium-Markierung war<sup>[33]</sup>.

Mit 25–30 % fiel die <sup>2</sup>H-Inkorporation an C-19 relativ niedrig aus, obwohl NADPH an C-4 fast vollständig deuteriert war. Der Grund dafür ist wahrscheinlich darin zu suchen, daß ein teilweiser Austausch des Deuteriums an C-4 des Cofaktors mit dem Medium stattfindet. Dies ist ein (über Flavine ablaufender?) bekannter Prozeß. Der kinetische Isotopeneffekt begünstigt wegen des großen Überschusses an Cofaktor eher den <sup>1</sup>H- als den <sup>2</sup>H-Transfer. Dennoch belegen die Ergebnisse, daß die Reduktase den Hydridtransfer spezifisch an C-19 von Präcorrin-6A 16 katalysiert. Das ergibt, mechanistisch gesehen, einen Sinn, wenn Präcorrin-6A vor dem Transfer des Hydrid-Ions aus NADPH unter Bildung von 16e an C-18 protoniert wird (Schema 6)<sup>[33]</sup>. Mit [4R-<sup>2</sup>H]NADPH 13b und [4S-<sup>2</sup>H]NADPH 13c konnte bewiesen werden<sup>[34]</sup>, und zwar durch genau dieselbe

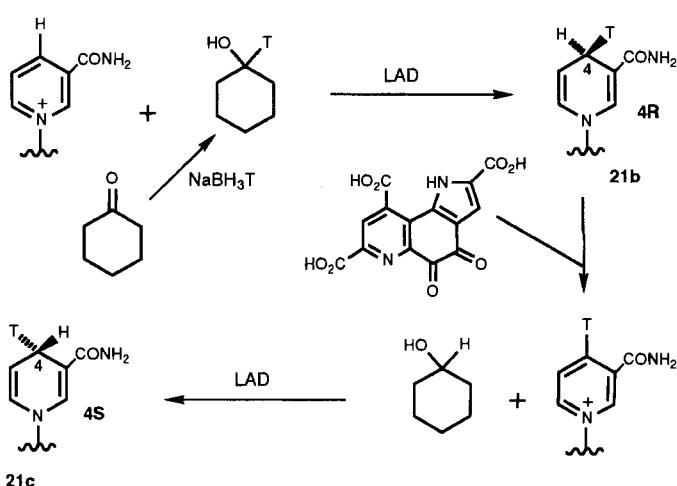
Methode, daß die Reduktase spezifisch H<sub>R</sub> des Cofaktors 13 überträgt.

All diese Experimente haben zweifelsfrei gezeigt, daß die B<sub>12</sub>-Bio-



synthese im Aerobier *Ps. denitrificans* einen Reduktionsschritt benötigt. Aber gilt das auch für *Pr. shermanii*, einen Organismus, der normalerweise anaerob oder bestenfalls mikroaerophil wächst? Da es sich hierbei um ein sehr viel komplexeres Problem handelt, ist es angebracht, seine Lösung ausführlicher darzustellen. Die Schwierigkeiten liegen darin begründet, daß a) nur rohe Enzympräparationen zur Verfügung stehen (vgl. oben die Verwendung der ziemlich reinen Reduktase), weshalb der Austausch zwischen den Nicotinamid-Cofaktoren und dem Medium in noch größerem Ausmaß stattfinden wird als bei den oben beschriebenen Experimenten, b) die Umwandlung in das Produkt sehr gering ausfallen wird und c), falls in diesem Organismus tatsächlich eine Reduktion erfolgt, unbekannt bleibt, ob es sich beim Cofaktor um NADH oder NADPH handelt.

Um diese Probleme zu bewältigen, wurde die wesentlich höhere Empfindlichkeit der Tritium-Markierung ausgenutzt. Zunächst wurden [4R-<sup>3</sup>H]NADH 21b, [4S-<sup>3</sup>H]NADH 21c, [4R-<sup>3</sup>H]NADPH und [4S-<sup>3</sup>H]NADPH synthetisiert<sup>[35]</sup>. Der Weg, auf dem die beiden ersten Verbindungen hergestellt wurden, ist in Schema 7 wiedergegeben. Auf ähnliche Weise wurden die beiden anderen zugänglich gemacht. Sodann inkubierte man die beiden 4R-Cofaktoren zusammen mit dem vollständigen zellfreien Enzymsystem<sup>[7, 36]</sup> aus *Pr.-shermanii*-Zellen sowie mit <sup>14</sup>C-markiertem Präcorrin-2 9 als Substrat. Dieses zellfreie System kann alle notwendigen Biosyntheseschritte ausführen, die zur Umwandlung von Präcorrin-2 9 in Cobyrinsäure 11 erforderlich sind. Das wichtige Ergebnis dabei war, daß Tritium zwar in die Cobyrinsäure 11, die aus dem Experiment mit den 4R-Cofaktoren isoliert worden war, inkorporiert wurde, nicht jedoch in die Cobyrinsäure 11, die man aus



Schema 7. Synthese von [4R-<sup>3</sup>H]NADH 21b und von [4S-<sup>3</sup>H]NADH 21c.  
LAD = Leber-Alkohol-Dehydrogenase.

dem parallel durchgeföhrten Experiment mit den beiden 4S-Iso-  
meren erhalten hatte; interessanterweise handelt es sich hierbei  
um dieselbe stereochemische Selektivität, die wir bei den Unter-  
suchungen an *Ps. denitrificans* beobachtet haben. Der Abbau  
der  $^3\text{H}$ -markierten Cobyrinsäure **11** zeigte, daß sich das Tritium  
irgendwo an den Ringen A und D befand. Abgesehen von den  
Wasserstoffatomen der Methylgruppen, die uns hier nicht wei-  
ter beschäftigen sollen, werden während der Umwandlung von  
Präcorrin-2 **9** in **11** lediglich H-18 und H-19 eingeföhrte. Da H-18  
aus dem Medium stammt<sup>[37]</sup>, muß sich das Tritium an C-19  
befinden<sup>[38]</sup>. Sowohl in aeroben als auch anaeroben (mikro-  
aerophilen) Organismen ist die Reduktion also eine notwendige  
Stufe der  $\text{B}_{12}$ -Biosynthese.

Als sich herausstellte, daß Präcorrin-6B **19** das Dihydroderiva-  
vat von Präcorrin-6A **16** ist, wurde versucht, die Reduktase in  
reiner Form zu isolieren. Wie immer lag der Schlüssel zur Lö-  
sung darin, ein geeignetes Assay zu entwickeln. In diesem Fall  
verwendeten wir ein gekoppeltes Enzymassay<sup>[30]</sup>. Diese Wahl  
wurde getroffen, weil wir wußten, daß die in der Biosynthesese-  
quenz auf Präcorrin-6B **19** folgende Stufe durch eine Methylase  
katalysiert wird, für die das *cobL*-Gen (darüber in Abschnitt 4.3  
mehr) codiert. So wurde das von der Reduktase erzeugte Prä-  
corrin-6B **19** in situ methyliert. Dazu setzte man einen beträcht-  
lichen Überschuß des CobL-Enzyms wie auch von [ $^{14}\text{C}$ -Me-  
thy]SAM ein. Da die Methylierung erst nach Bildung von  
Präcorrin-6B **19** erfolgen kann, war die Bestimmung der Radio-  
aktivität des Endproduktes ein Maß für die Reduktase-Aktivi-  
tät in der zu untersuchenden Probe. Auf diesem Weg konnte  
gezeigt werden, daß Zellextrakte des rekombinanten Stammes,  
in dem das 8.7 kb-DNA-Fragment überexprimiert worden war,  
eine zehnmal höhere Reduktase-Aktivität aufwiesen als der ent-  
sprechende, nicht überexprimierte Elternstamm. Der gentech-  
nisch veränderte Stamm wurde zwar zur Isolierung des Enzyms  
verwendet, dennoch war die Menge an Enzym in den Zellen  
überraschend niedrig. Letztendlich war eine 14 000fache Anrei-  
cherung nötig, um Präcorrin-6A-Reduktase in homogener  
Form zu erhalten. Es konnte gezeigt werden, daß sie Präcorrin-  
6A **16** durch einen NADPH-abhängigen reduktiven Prozeß in  
Präcorrin-6B **19** umwandelt<sup>[30]</sup>.

Aus der Analyse der N-terminalen Sequenz der Präcorrin-6A-  
Reduktase und der Analyse dreier interner Sequenzen, die bei  
der Trypsinspaltung des Enzyms erhalten wurden, folgt, daß  
dieses Protein durch das *cobK*-Gen codiert wird<sup>[30]</sup>. Interessanter-  
weise ist der *cobK* codierende Strang komplementär zu dem  
Strang, der für die anderen sieben *cob*-Gene auf dem 8.7 kb-  
DNA-Fragment codiert. Außerdem überlappt die für *cobK* co-  
dierende Sequenz mit denen für *cobJ* und *cobL* (Abb. 1); mögli-  
cherweise kontrolliert diese Anordnung den relativen Grad der  
Expression von *cobK* und seinen Nachbarn. Zudem scheint mit  
24.4% Identität und 45% Ähnlichkeit eine signifikante Bezie-  
hung zwischen CobK und dem CbiJ-Protein aus *Salmonella typhimurium* (Tabelle 2) zu bestehen. Beide Proteine haben ähnliche  
Molekülmassen, und die Identitätsbereiche erstrecken  
sich über ihre Gesamtänge. Das CbiJ-Protein in *S. typhimurium*  
kann daher zu Recht als das Homologe von Präcorrin-6A-  
Reduktase in *Ps. denitrificans* angesehen werden. Damit ist sehr wahrscheinlich, daß auch für die  $\text{B}_{12}$ -Biosynthese im  
Anaerobier *S. typhimurium* ein Reduktionsschritt erforderlich  
ist.

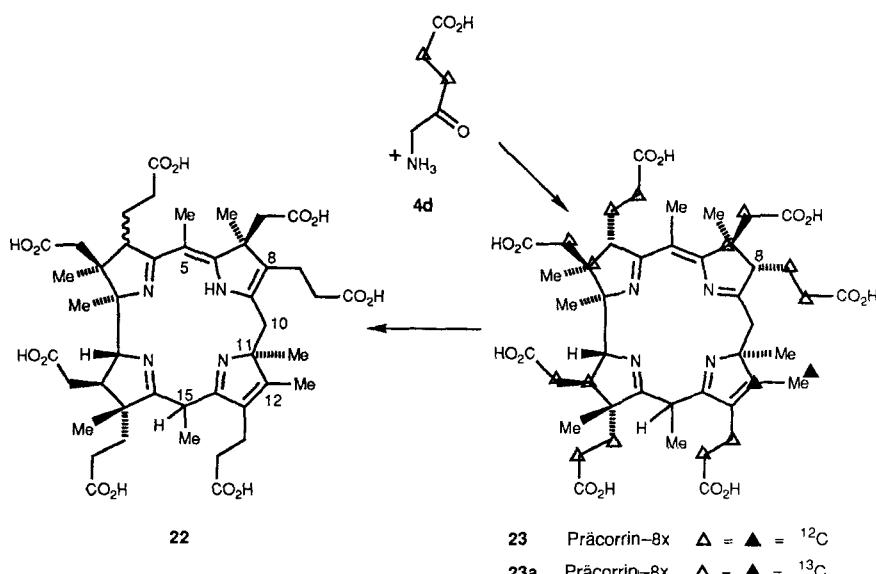
### 4.3. Isolierung und Struktur von Präcorrin-8x

Es ist nun an der Zeit, eine Bestandsaufnahme der Verände-  
rungen zu machen, die für die Umwandlung von Präcorrin-6B  
**19** in Hydrogenobyrinsäure **12** nötig sind. Dazu gehören in die-  
sem Stadium der Untersuchung in noch unbekannter Reihenfol-  
ge, a) die Wanderung der C-11-Methylgruppe nach C-12, b) die  
Decarboxylierung des Acetatrestes an C-12 und c) die Methylier-  
ung an C-5 und C-15. Zu Beginn mußte geprüft werden, ob die  
verfügbarer Enzyme Präcorrin-6B **19** als Substrat verwenden  
können. Da es gut möglich war, daß die nächste Stufe eine  
Methylierung umfaßte, galt eine Untersuchung – und sie war  
erfolgreich – der Methylübertragung aus [*Methyl*- $^3\text{H}$ ]SAM auf  
Präcorrin-6B. Das führte zur Selektion des durch *cobL* codierten  
Enzyms, mit dem es uns nach Isolierung im präparativen  
Maßstab gelang, Präcorrin-6B **19** in Präcorrin-8x umzuwan-  
deln<sup>[39]</sup>. Nach der Beschreibung der Strukturaufklärung von  
Präcorrin-8x werden wir noch einmal auf dieses Enzym zurück-  
kommen<sup>[40]</sup>.

Ein bequemeres Verfahren zur Darstellung von Präcorrin-8x  
als die Verwendung des CobL-Enzyms beruht auf der Beobach-  
tung, daß der letzte Schritt der Biosynthese, bei dem Präcorrin-  
8x in Hydrogenobyrinsäure **12** umgewandelt wird, eine starke  
Produkthemmung zeigt<sup>[39, 41]</sup>. Dazu wurde [ $^{14}\text{C}$ -markiertes Prä-  
corrin-3A (wie **10**), das aus [ $4\text{-}^{14}\text{C}$ ]ALA (wie **4**) hergestellt wor-  
den war, mit denselben, schon früher eingesetzten acht überpro-  
duzierten Enzymen sowie mit [*Methyl*- $^3\text{H}$ ]SAM und einem  
zehnfachen molaren Überschuß nichtmarkierter Hydrogenobyr-  
insäure inkubiert. Unter diesen Bedingungen entstand als Pro-  
dukt [ $^3\text{H}$ ,  $^{14}\text{C}$ ]Präcorrin-8x, und nicht etwa die markierte Hy-  
drogenobyrinsäure. Sein  $^3\text{H}$ : $^{14}\text{C}$ -Verhältnis ließ erkennen, daß  
fünf Methylgruppen eingeföhrte worden waren<sup>[42]</sup>. Damit han-  
delt es sich bei dem neuen Produkt um ein octamethyliertes Deri-  
vat von Uro'gen III **7**; die Verbindung wurde daher als Präcor-  
rin-8x bezeichnet<sup>[40]</sup>. Massenspektrometrische Messungen an  
Präcorrin-8x und seinem Methylester bestätigten diese Befunde  
und ergaben zudem, daß es sich bei diesem Produkt um eine  
Heptacarbonsäure handelt. Die bemerkenswerte Schlußfolge-  
rung war also, daß das CobL-Enzym zwei ganz unterschiedliche  
Reaktionstypen katalysiert, und zwar Decarboxylierung und  
C-Methylierung. Die Methylierung findet wahrscheinlich an C-  
5 und C-15 statt, da dies die beiden einzigen Methylgruppen  
sind, die in Präcorrin-6B **19** noch nicht eingebaut sind. Durch  
Inkubation mit dem vollständigen Enzymsystem wurde das  
doppelt-markierte Präcorrin-8x sehr effizient in Hydrogenobyr-  
insäure **12** überführt. Während dieser Umwandlung kam es zu  
keiner signifikanten Veränderung des  $^3\text{H}$ : $^{14}\text{C}$ -Verhältnisses.  
Damit war der Nachweis erbracht, daß Präcorrin-8x eine weite-  
re neue Zwischenstufe auf dem Weg zu Vitamin  $\text{B}_{12}$  ist<sup>[42]</sup>.

Im Gegensatz zu den Octamethylestern von Präcorrin-6A **16**  
und Präcorrin-6B **19**, die einigermaßen stabil sind, war der Hep-  
tamethylester von Präcorrin-8x gegenüber Oxidation so anfäl-  
lig, daß er sich nicht für NMR-Untersuchungen eignete. Zu  
unserem Entsetzen zeigten auch die  $^{13}\text{C}$ -NMR-Spektren von  
Präcorrin-8x, das als Lösung in schwach saurem Wasser unter-  
sucht wurde, einen wahren Wald von Signalen. Schließlich fan-  
den wir den Grund dafür heraus: Was anfangs ein einziges enzy-  
matisches Produkt gewesen sein muß, hatte sich, selbst unter  
diesen sehr milden Bedingungen, in ein Gemisch aus mindestens

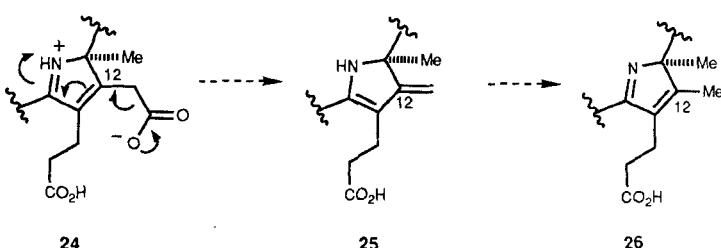
fünf eng miteinander verwandten Verbindungen umgewandelt. Die Entdeckung, daß sich alle fünf Formen langsam in dasselbe, letztlich stabile Isomer umwandeln, wies uns einen Weg aus dieser scheinbar aussichtslosen Situation. Mit einem nun festen Ziel vor Augen konnte die bereits im Fall von Präcorrin-6A **16** und Präcorrin-6B **19** so erfolgreiche Methode der Mehrfach-<sup>13</sup>C-Markierung dazu benutzt werden, um der stabilen Form von Präcorrin-8x die Struktur **22** zuzuordnen<sup>[43]</sup> (Schema 8). Tatsächlich befanden sich die beiden neuen C-Methylgruppen an C-5 und C-15; C-15 war, wie auch C-10, sp<sup>3</sup>-hybridisiert, während C-8 im sp<sup>2</sup>-Zustand vorlag. Die Festlegung der Konfigurationen an allen Zentren außer an C-3 und C-15 beruht darauf, daß Präcorrin-8x enzymatisch in Hydrogenobyrinsäure **12** überführt werden kann. Da sich Hydrogenobyrinsäure aber nicht bildet, wenn die stabile Form von Präcorrin-8x mit dem besagten Enzymsystem inkubiert wird, ließen sich die Konfigurationen an C-3 und C-15 (die sich verändert haben könnten) zu diesem Zeitpunkt der Untersuchung noch nicht bestimmen.



Schema 8. Strukturaufklärung von Präcorrin-8x **23**.

Unser Interesse konzentrierte sich nun auf die Frage, welche der bereits erwähnten fünf eng verwandten Formen von Präcorrin-8x nun die wahre Zwischenstufe der Biosynthese war. In diesem Punkt brachte uns die HPLC-Trennung der fünf Formen ein gutes Stück voran. Es ließ sich zeigen, daß eine von ihnen enzymatisch schneller und effizienter in Hydrogenobyrinsäure **12** umgewandelt wurde als die anderen. Noch besser war, daß diese Form bei hohen pH-Werten einigermaßen stabil war. Wie oben beschrieben wurde nun diese wahre Zwischenstufe aus Präcorrin-3A (wie **10**) hergestellt, das seinerseits aus [2,3-<sup>13</sup>C<sub>2</sub>]ALA **4d** biosynthetisch zugänglich war. Dieses Experiment war dazu angelegt, C-12 und das mit ihm verknüpfte Kohlenstoffatom in Präcorrin-8x zu untersuchen; vergessen wir dabei nicht, daß man bei Arbeiten im Halbmikromäßigstab NMR-Informationen nur von <sup>13</sup>C-markierten Atomen und ihren Nachbarn erhält. Die Ergebnisse zeigten, daß sich eine Methylgruppe an C-12 befindet, das selbst sp<sup>2</sup>-konfiguriert ist. Diese beiden Kohlenstoffatome sind in Struktur **23a** durch

schwarze Dreiecke markiert. Bei der Decarboxylierung entsteht zunächst eine Methylengruppe, die sich aber durch Tautomerisierung in eine Methylgruppe umwandelt (Schema 9). Aufgrund



Schema 9. Zum Mechanismus der Decarboxylierung der Acetatgruppe an C-12.

der bereits vorgestellten Ergebnisse und der weiterer umfangreicher <sup>1</sup>H-NMR-Untersuchungen mit dem wahren Präcorrin-8x ergab sich Struktur **23** für diese Zwischenstufe<sup>[43]</sup>. Die sp<sup>3</sup>-Hybridisierung von C-8 in Präcorrin-8x **23**

wurde <sup>13</sup>C-NMR-spektroskopisch nachgewiesen. Dazu mußte man das Spektrum einer aus [4-<sup>13</sup>C]ALA und [*Methyl-*<sup>13</sup>C]JSAM hergestellten Probe im ursprünglichen, schwach sauren Wasser so schnell aufnehmen, daß es nicht zu einer nennenswerten Umwandlung von Präcorrin-8x in seine stabile Form kommen konnte. Im Bereich von  $\delta \approx 99$ , wo das C-8-Signal der stabilen Form erscheint, fand man nur ein äußerst schwaches Signal, das aber mit zunehmender Umwandlung in **22** an Intensität gewann.

An dieser Stelle ist eine Bemerkung zur Bildung von mindestens vier weiteren Formen des wahren Präcorrins-8x **23** angebracht. Dabei kann man davon ausgehen, daß es bei der Umwandlung von **23** in **22** durch Ausbildung des über die Ringe A und B ausgedehnten Amidinsystems zu einer Stabilisierung kommt<sup>[44]</sup>. Zusätzlich zu den in **22** und **23** dargestellten Tautomeren

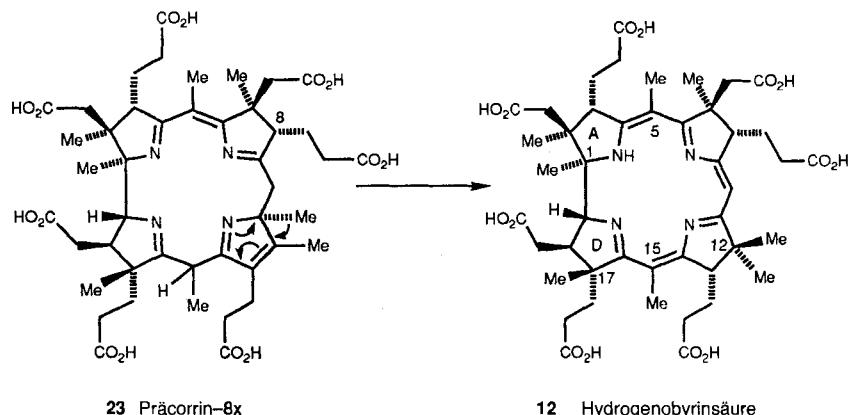
können die beiden voneinander getrennten Chromophore in Form weiterer Tautomere vorkommen; darüber hinaus ist eine Epimerisierung an C-3, C-8 und C-15 möglich. Die verschiedenen Kombinationen dieser Regio- und Stereoisomere sind für die Bildung unterschiedlicher Formen verantwortlich, die sich aber schließlich alle in die thermodynamisch stabilere Form **22** umwandeln. Die Klärung der stereochemischen Einzelheiten und anderer Details bleibt zukünftigen Untersuchungen vorbehalten. Erst einmal müssen wichtige Probleme gelöst werden. Da die Natur von Präcorrin-8x **23** nun fast vollständig aufgedeckt werden konnte, war dies sicherlich die richtige Vorgehensweise!

Das für die Umwandlung von Präcorrin-6B **19** in Präcorrin-8x **23** verantwortliche Enzym konnte aus einem gentechnisch veränderten Stamm [SC510(pXL253)] aus *Ps. denitrificans* durch schnelle Protein-Liquidchromatographie (FPLC) bis zur Homogenität<sup>[39]</sup> gereinigt werden. Dieses vom *cobL*-Gen codierte Protein ist ein Polypeptid mit  $M_r$  43 000  $\pm$  1000. Dieses

Ergebnis stimmt gut mit dem aus der Gensequenz berechneten Wert von 42 900 Dalton überein. Gelpermeationsstudien deuten jedoch auf eine starke Assoziation im nativen Zustand hin. Dabei treten möglicherweise Octamere auf. Wir haben bereits auf die bemerkenswerte Eigenschaft dieses Enzyms hingewiesen, sowohl C-Methylierung als auch Decarboxylierung zu katalysieren. Gegenwärtig ist die Reihenfolge der beiden Methylierungen und der Decarboxylierung noch unbekannt. Wir wissen aber bereits, daß man bei der Inkubation von Präcorrin-6A **16** mit der Standardpräparation von acht Enzymen (einschließlich CobL), aber ohne SAM, als Endprodukt Präcorrin-6B **19**, und nicht seine 12-decarboxyierte Form erhält. Daher geht der Decarboxylie rung wahrscheinlich mindestens eine C-Methylierung voraus. Vergleicht man einmal die CobL-Sequenz mit den Sequenzen anderer Methyl-Transferasen der  $B_{12}$ -Biosynthese (CobA, CobI und, wie wir später noch sehen werden, auch CobF, CobJ und CobM), kann einem Teil des CobL-Proteins die Funktion einer Methyl-Transferase zugeschrieben werden. Außerdem existiert ein zusätzlicher carboxyterminaler Bereich von  $M_r \approx 20\,000$ , der wahrscheinlich die Decarboxylase-Aktivität trägt<sup>[14, 39]</sup>. Diese Doppelaktivität hat man als das Ergebnis einer Fusion zwischen ursprünglich voneinander getrennten Vorgängergenen gedeutet, von denen das eine für die C-5/C-15-Methylase-Aktivität, das andere für die Acetat-Decarboxylase-Aktivität codiert<sup>[39]</sup>. Erst kürzlich wurde diese Interpretation durch die Beschreibung zweier getrennter Gene, *cbiE* und *cbiT* bei der Biosynthese in *Salmonella typhimurium* gestützt<sup>[45]</sup>. Die beiden Genprodukte weisen jeweils eine starke Homologie mit den amioterminalen und den carboxyterminalen Regionen von CobL auf (Tabelle 2).

#### 4.4. Die letzte Umlagerung zur Bildung des Corrin-Makrocyclus

Präcorrin-8x **23** und Hydrogenobyrinsäure **12** sind Isomere. Die Umwandlung von **23** in **12** wird durch die Wanderung der C-11-Methylgruppe nach C-12 initiiert. Hierbei handelt es sich um eine [1,5]-sigmatrope Umlagerung, die suprafacial verläuft. Auf diese Weise wird die Blockade beseitigt, die die Bildung eines konjugierten Systems verhindert. Das Molekül kann nun zu der aufgrund ihres ausgedehnten konjugierten Systems thermodynamisch stabileren Hydrogenobyrinsäure **12** tautomerisieren (Schema 10). Man wußte bereits, daß die Umlagerung von einem Enzym katalysiert wird, das in der Mischung der überproduzierten Proteine vorkommt, die routinemäßig für viele der oben beschriebenen Untersuchungen verwendet worden waren. Es wurde zuerst als ein Protein isoliert<sup>[19]</sup>, das Hydrogenobyrinsäure **12** spezifisch bindet. Erst später wurde klar, daß es sich bei diesem Protein um genau das Enzym handelte, das die Bildung von Hydrogenobyrinsäure **12** aus Präcorrin-8x **23** katalysiert. Die Analyse der N-terminalen Sequenz dieses Proteins zeigte, daß das dazugehörige Gen *cobH* war. Das sind die Irrungen und Wirrungen wissenschaftlicher Forschung! Bald war ein



Schema 10. Umlagerung von Präcorrin-8x **23** in Hydrogenobyrinsäure **12**.

Stamm von *Ps. denitrificans* [SC510 Rif<sup>r</sup> (pXL1149)] mit *cobH* als dem einzigen amplifizierten Gen konstruiert. Aus dem löslichen Protein dieses Stammes erhielt man durch wiederholte FPLC-Faktionierung an einer Reihe unterschiedlicher Säulen reines CobH-Enzym; als Assay diente die Hydrogenobyrinsäure-Synthase-Aktivität<sup>[42]</sup>. Einen zusätzlichen Beweis, daß das richtige Enzym und das richtige Gen für die C-11–C-12-Umlagerung entdeckt worden waren, lieferte ein weiterer gentechnisch veränderter Stamm von *Ps. denitrificans*, in dem *cobH* nicht überexprimiert worden war. Die anschließende Umwandlung von Präcorrin-6A **16** durch das lösliche Enzymsystem dieses Stammes wurde genau auf der Stufe von Präcorrin-8x **23** unterbrochen, das mit 45% Ausbeute isoliert wurde<sup>[42]</sup>.

Unter den üblichen denaturierenden Bedingungen beträgt die relative Molekulmasse des CobH-Enzyms  $M_r = 22\,000 \pm 1000$ , und Gelpermeationsstudien ergaben, daß das Protein monomer vorliegt<sup>[42]</sup>. Enzyme, die Umlagerungen katalysieren, wecken immer ein besonderes Interesse, und man fragt sich hier natürlich, auf welche Weise CobH die C-11–C-12-Methylwanderung katalysiert. Ring-C von Präcorrin-8x **23** ist ein disubstituiertes Pyrrolenin, das in der Lage sein sollte, von allein Umlagerungen einzugehen<sup>[46]</sup> – genau das aber tut es nicht! Möglicherweise besteht der enzymatische Trick darin, Präcorrin-8x **23** durch Bindung an das Enzym aus einer ungünstigen in eine günstige Konformation zu überführen, die die stereoelektronischen Erfordernisse der Umlagerung erfüllt. Da dieses Enzym in größeren Mengen verfügbar ist und es sich um ein relativ kleines monomeres Protein handelt, lohnt es sich sicherlich, hier weiterzuforschen.

In unserem Überblick haben wir bis jetzt, wie in Schema 1 zusammengefaßt, den frühen Teil der  $B_{12}$ -Biosynthese beschrieben, der bei ALA **4** beginnt und bis zu Präcorrin-3A **10** reicht. Daran schloß sich eine ausführlichere Beschreibung der Entdeckung von Präcorrin-6A **16** an, die es ermöglichte, den Rest des Biosyntheseweges bis zu Hydrogenobyrinsäure **12** aufzuklären. Dabei fanden wir zwei weitere neue Zwischenstufen, Präcorrin-6B **19** und Präcorrin-8x **23**. Nachdem wir uns von Präcorrin-6A **16** aus zunächst bis zur Hydrogenobyrinsäure vorgearbeitet haben, wollen wir uns nun rückwärts auf Präcorrin-3A **10** zubewegen und auf diese Weise die einzige noch verbliebene Lücke auf dem Weg zur ersten corrinoiden Zwischenstufe **12** schließen. Zuvor soll jedoch noch ein anderer Punkt aufgegriffen werden.

## 5. Zur Synthese mit überproduzierten Enzymen

Ohne jeden weiteren Kommentar war in diesem Rückblick vielfach davon die Rede gewesen, daß komplexe Verbindungen „enzymatisch synthetisiert werden“. Dabei verwendete man jeweils eine Kombination von Enzymen, die durch Überexpression der entsprechenden Gene in größeren Mengen zugänglich waren. Die Möglichkeiten, die dieser Ansatz eröffnet, sind insbesondere für Organiker viel zu wichtig, um stillschweigend darüber hinwegzugehen. So umfaßte z.B. die In-vitro-Synthese von Präcorrin-6A **16** aus ALA **4** – Grundlage aller hier vorgestellten Arbeiten zur Strukturaufklärung – den kombinierten Einsatz von insgesamt neun überproduzierten Enzymen<sup>[24]</sup>. Bei der ganz ähnlichen Synthese von Hydrogenobyrinsäure **12** war sogar das sequentielle Zusammenspiel von zwölf überproduzierten Enzymen notwendig<sup>[24]</sup>. In beiden Fällen konnte ausreichend Material für weitere enzymatische und spektroskopische Experimente gewonnen werden. Dies waren, soweit wir wissen, die ersten Beispiele (1990), in denen für derartige Synthesen eine große Anzahl überproduzierter Enzyme verwendet worden ist. Mit Sicherheit gilt dies für die Chemie der Tetrapyrrole. Aber auch andere Gruppen haben auf diesem oder jenem Gebiet ähnliche Beispiele gefunden<sup>[3d, 47]</sup>, auch wenn in der Regel nicht so viele Enzyme beteiligt gewesen sind.

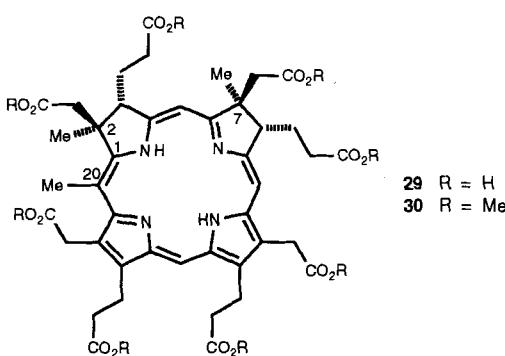
Am Beispiel der Synthese von Präcorrin-3A **10** läßt sich durch Vergleich des nichtenzymatischen mit dem enzymatischen Ansatz eindrucksvoll die gewaltige Leistungsfähigkeit der enzymatischen Methode demonstrieren. So wurde für den Isobacteriochlorinoctamethylester **30**, dessen entsprechende Octa-

enzymatische Synthese der richtige Weg ist. Die Antwort lautet eindeutig: Nein! Um die Synthese von Anfang an zu wiederholen, würden zwei erstklassige Chemiker mindestens ein Jahr benötigen, und die Ausbeute – ein vernünftiger Maßstab zu Beginn der Synthese vorausgesetzt – betrüge bestenfalls fünf Milligramm. Wie verhält sich das bei einer enzymatischen Synthese?

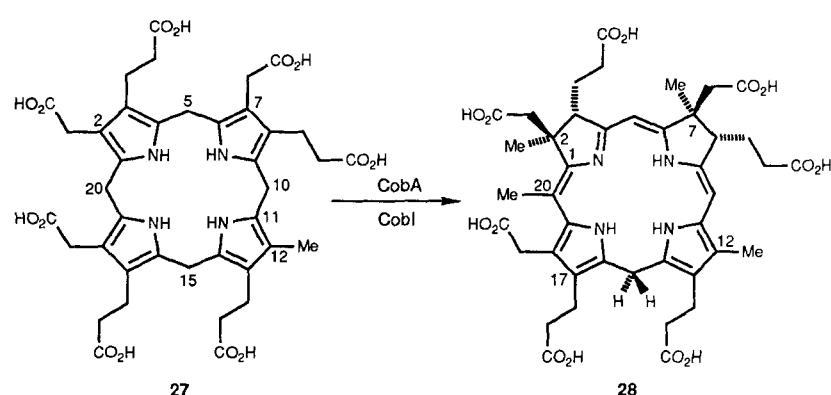
Das Ausgangsmaterial ist hier ALA **4**, das leicht in jedem benötigten Maßstab hergestellt werden kann. Schema 1 zeigt, daß man für die Umwandlung von ALA **4** in Präcorrin-3A **10** fünf Enzyme benötigt, und zwar die, die durch *hemB*, *hemC*, *hemD*, *cobA* und *cobI* codiert werden. Mittlerweile stehen uns Stämme zur Verfügung, die diese Gene überexprimieren und damit auch größere Mengen der entsprechenden Enzyme liefern<sup>[49]</sup>. Es ist sicherlich richtig, daß für die Entschlüsselung von Genetik und Molekularbiologie viele Jahre Arbeit nötig waren, um so den heutigen Stand der Dinge zu erreichen; aber die Grundlagen sind nun gelegt, so daß wir diese Enzyme heute für Synthesezwecke einsetzen können. Eine enzymatische Standard-Präparation von Präcorrin-3A **10** im Labormaßstab<sup>[49]</sup> ergibt 10–20 mg; und die ganze Synthese von ALA **4** zu Präcorrin-3A **10** dauert, wenn einem die entsprechenden Enzyme zur Verfügung stehen, ungefähr drei Tage. Selbst wenn man die Kultur der überproduzierenden Stämme sowie die Isolierung und Anreicherung der Enzyme mit einkalkuliert, beträgt die dazu erforderliche Zeit nur wenige Wochen. Man kann also auf diese Weise in weit kürzerer Zeit mehr Substanz herstellen als mit der nichtenzymatischen Methode.

Man sollte nicht unerwähnt lassen, daß viele Enzyme nicht völlig substratspezifisch sind; dieser Umstand kann für die Synthese von Analoga eines bestimmten Naturstoffes ausgenutzt werden. Dazu ist die nichtenzymatische Synthese eines Substrates nötig, dessen Struktur sich von der des natürlichen Substrats etwas unterscheidet. Ersetzt man beispielsweise Uro'gen III **7** in Schema 1 durch sein 12-decarboxyliertes Analogon **27** (Schema 11), das auf einem einfachen, nichtenzymatischen Weg synthetisiert werden kann, so funktionieren die beiden Methylase-Enzyme (aus *cobA* und *cobI*) immer noch und produzieren das Analogon **28** von Präcorrin-3A **10**. Anstelle eines Acetatrestes trägt es an C-12 eine Methylgruppe<sup>[50]</sup>. Tatsächlich gibt es für solche Synthesen von Naturstoffanaloga eine ganze Reihe von Beispielen<sup>[51]</sup>.

Wie wird sich die Naturstoffsyntheseforschung angesichts dieser gewaltigen Entwicklungen im Bereich der Molekularbio-



carbonsäure **29** die Didehydroform von Präcorrin-3A **10** darstellt, eine nichtenzymatische, stereokontrollierte Synthese ausgearbeitet<sup>[48]</sup>. Aus dem Ester **30** kann man leicht Präcorrin-3A **10** herstellen. Die Synthese von **30** bildete den Höhepunkt einer mehr als zehnjährigen Forschungstätigkeit. Sie war notwendig, da zu Beginn überhaupt keine Methode für die Synthese irgendeines Isobacteriochlorin-Makrocyclus, nicht einmal eines solchen mit einfachen Substituenten bekannt war. Diese Synthese war besonders befriedigend: Es wurde viel „neue Chemie“ entdeckt, und viele hervorragende Chemiker wurden während dieser Zeit ausgebildet. Wenn man jedoch Präcorrin-3A **10** oder das verwandte **30** für weitergehende Untersuchungen benötigt, stellt sich unweigerlich die Frage, ob eine solche nicht-



Schema 11. Enzymatische Synthese eines Naturstoffanalogs.

logie und Enzymologie wohl in zehn Jahren präsentieren? Ein beträchtlicher Wandel scheint bevorzustehen, und es ist besonders ermutigend zu sehen, welch große Leistungsfähigkeit in der Kombination von nicht-enzymatischen und enzymatischen Synthesen steckt. Aber noch ist dies Zukunftsmusik. Wir können nun zum Vitamin-B<sub>12</sub>-Biosyntheseweg zurückkehren, um die Lücke zwischen Präcorrin-3A **10** und Präcorrin-6A **16** zu schließen.

## 6. Von Präcorrin-3A zu Präcorrin-6A

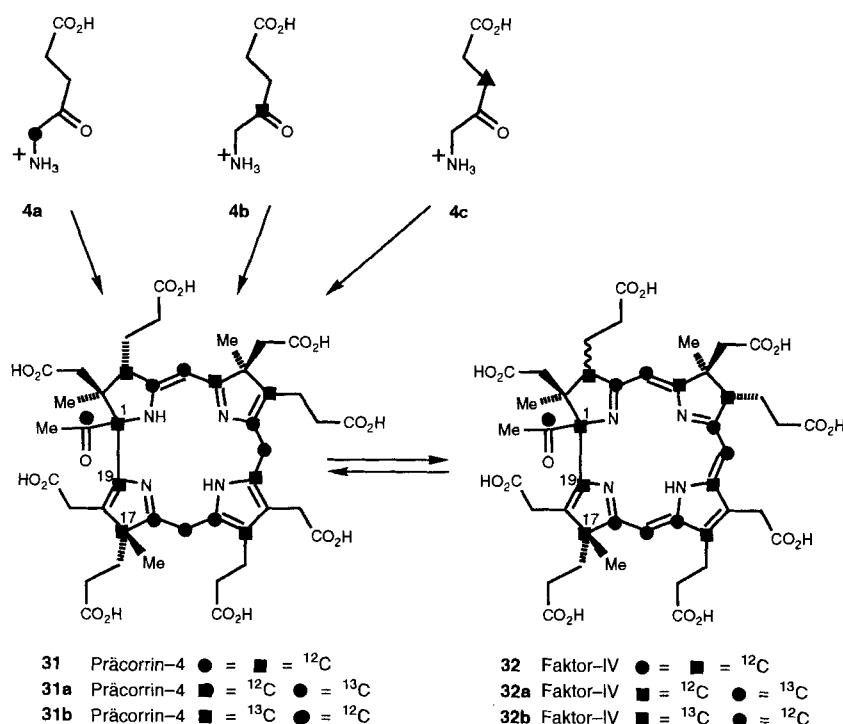
### 6.1. Präcorrin-4: wieder eine überraschende Struktur

Der nächste Schritt der Biosynthese verdeutlicht, wie wertvoll die Herstellung von Stämmen eines Organismus ist, aus denen bestimmte Gene eliminiert worden sind. Im Fall von *Ps. denitrificans* führte die Entfernung des *cobM*-Gens aus einem Stamm zu einer Enzympräparation, die Präcorrin-3A **10** effizient in eine neue Zwischenstufe umwandelt, bei der es sich um das tetramethylierte Präcorrin-4 handelte<sup>[52]</sup>. Was Präcorrin-2 **9** und Präcorrin-3A **10** betrifft, wurden die Strukturuntersuchungen im wesentlichen an den stabileren (um zwei Wasserstoffatome ärmeren) konjugierten Derivaten durchgeführt, die leicht durch Luftoxidation zugänglich sind. Dasselbe gilt auch für Präcorrin-4, da es sich an der Luft leicht in sein Didehydro-Derivat, das als Faktor IV bekannt ist, umwandelt. Bei der chromatographischen Reinigung und der anschließenden massenspektrometrischen Untersuchung stellte sich heraus, daß Faktor IV als ein Gemisch von zwei Isomeren vorlag, deren Eigenschaften auf Epimere hindeuteten. Dabei handelt es sich wahrscheinlich um C-3-Epimere<sup>[52, 53]</sup>. Da Epimerisierungen dieser Art bei fast allen bislang isolierten Zwischenstufen des B<sub>12</sub>-Biosyntheseweges beobachtet worden sind, brauchen wir uns an dieser Stelle nicht weiter damit zu befassen. Alle weiteren Untersuchungen konzentrierten sich daher auf das Hauptepimer.

Präcorrin-3A **10** war schon früher durch enzymatische Reduktion aus seinem Didehydro-Analogen **29** regeneriert worden<sup>[22]</sup>. Auf dieselbe Weise reduzierte man nun Faktor IV durch Inkubation mit dem vollständigen Enzymsystem einschließlich NADH, jedoch ohne NADPH, um so Präcorrin-4 wieder zurückzubilden. Da in der Inkubation aber NADPH fehlte, brach die bei Präcorrin-4 einsetzende Biosynthesesequenz auf der Stufe von Präcorrin-6A **16** ab, das dann isoliert wurde. Dieses Ergebnis zeigt eindeutig, daß Präcorrin-4 eine Zwischenstufe der Vitamin-B<sub>12</sub>-Biosynthese ist. Es kann gar nicht oft genug betont werden, wie wichtig es ist, eindeutig nachzuweisen, daß eine mutmaßliche Zwischenstufe biosynthetisch in das Endprodukt umgewandelt wird oder, wie in unserem Fall, in ein anderes, bereits nachgewiesenes Zwischenprodukt übergeführt wird.

Die Strukturuntersuchungen folgten dem mittlerweile etablierten Verfahren, aus [5-<sup>13</sup>C]ALA **4a**, [4-<sup>13</sup>C]ALA **4b** und

[3-<sup>13</sup>C]ALA **4c** drei Proben von Faktor IV zu synthetisieren. <sup>13</sup>C- und <sup>1</sup>H-NMR-Untersuchungen<sup>[52]</sup> dieser drei Proben ergaben für Faktor IV die Struktur **32**; aus Gründen der Übersichtlichkeit sind in Schema 12 lediglich die beiden ersten Markierungsmuster dargestellt. Dabei ist zu beachten, daß Kohlenstoffatome mit demselben Symbol in derselben Probe <sup>13</sup>C-markiert sind; <sup>13</sup>C-Markierungen von Kohlenstoffatomen mit unterschiedlichen Symbolen beziehen sich dagegen auf unterschiedliche Proben. Die wichtigsten Beobachtungen dabei waren, daß a) C-1 und C-19 direkt verknüpft sind, b) ein Tieffeldsignal ( $\delta = 210.8$ ) aus dem Spektrum der Probe **32a** aus [5-<sup>13</sup>C]ALA der Carbonylgruppe des Acetylrestes zugeordnet werden kann und c) C-19 sp<sup>2</sup>-konfiguiert ist und sich die Acetylgruppe daher an C-1 befindet. Da Faktor IV **32** und Präcorrin-4 über eine reversible Redoxreaktion miteinander in Beziehung stehen, ergibt sich aus der Struktur von Faktor IV **32** für Präcorrin-4 die Konstitution **31**. Ein Vergleich dieser Struktur mit der von Präcorrin-3A **10** macht deutlich, daß sowohl die Methylierung an C-17 als auch eine Oxidation stattgefunden hat (insgesamt wird ein Sauerstoffatom addiert). Dabei handelt es sich in diesem Fall um eine Erhöhung der Oxidationsstufe, die später durch die Reduktase CobK wieder erniedrigt wird.



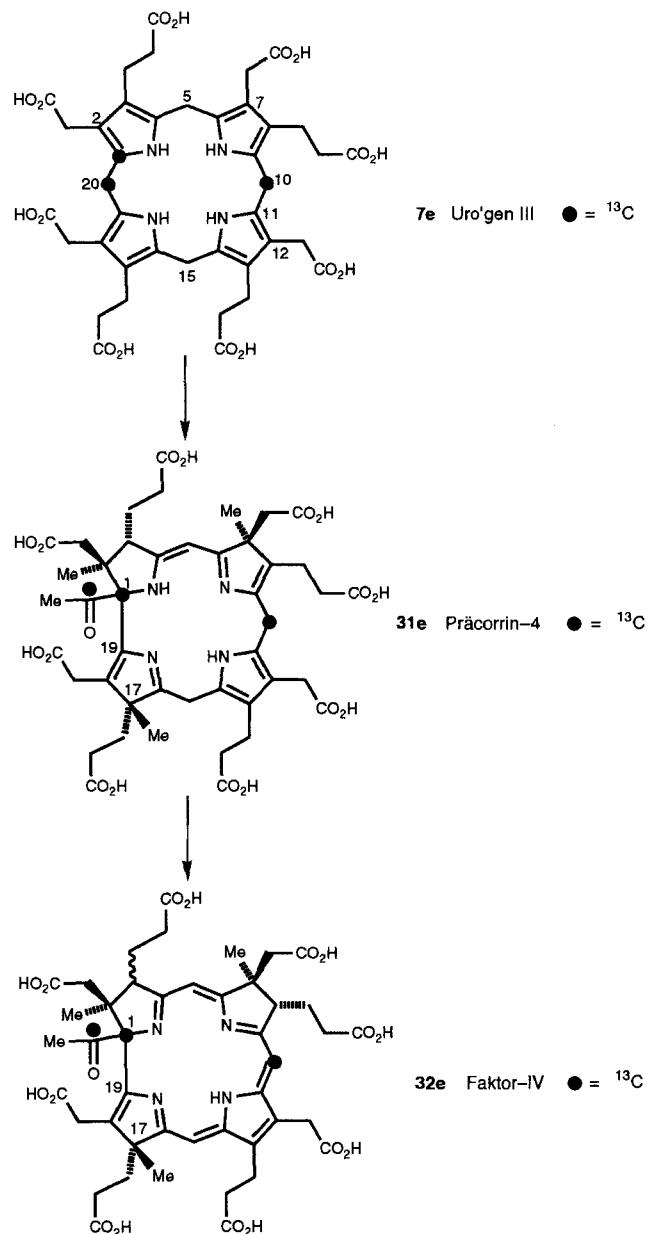
Schema 12. <sup>13</sup>C-Markierung von Präcorrin-4 **31** und Faktor IV **32**.

Und wieder einmal waren die mit der B<sub>12</sub>-Biosynthese beschäftigten Wissenschaftler und andere Kenner der Szene überrascht: dieses Mal von der Struktur von Präcorrin-4 **31**. Zum einen kam die Ringkontraktion sicherlich unerwartet früh. Die größte Überraschung aber war, daß sich die Acetylgruppe an C-1 befand. Dieser Befund brachte unsere bis dato gehegte Vorstellung ins Wanken. Daß im Verlauf der Ringkontraktion eine Acetylgruppe entstehen würde, war aufgrund des mutmaßlichen Mechanismus zu erwarten gewesen<sup>[44]</sup>. Aus dieser

Acetylgruppe würde dann die Essigsäure gebildet werden, die bei der Ringkontraktion in *Pr. shermanii* nachgewiesenermaßen aus dem Molekül abgespalten wird (siehe Abschnitt 2). Vor der Entdeckung von Präcorrin-4 **31** waren jedoch alle Spekulationen davon ausgegangen, daß sich die Acetylgruppe an C-19, und nicht etwa an C-1 befand. Dieses Schlüsselement der Struktur **31** für Präcorrin-4 wurde durch einen unumstößlichen Beweis gestützt, der durch eine Kombination von nicht-enzymatischer und enzymatischer Synthese sowie NMR-spektroskopischen Untersuchungen erarbeitet wurde. Dazu wurde der [1,10,20-<sup>13</sup>C<sub>3</sub>]Uroporphyrin-III-ester aus dem Ausgangsmaterial **18** (Schema 4) synthetisiert. Die direkte Verknüpfung der beiden wichtigen <sup>13</sup>C-Atome C-1 und C-20 in dieser Verbindung wurde <sup>13</sup>C-NMR-spektroskopisch nachgewiesen. Durch Hydrolyse und Reduktion erhielt man [1,10,20-<sup>13</sup>C<sub>3</sub>]-Uro'gen III **7 e** (Schema 13), das dann enzymatisch in Präcorrin-3A umgewandelt wurde. Nach einigen Reinigungsschritten wurde Präcorrin-3A schließlich durch Inkubation mit einem Gemisch von Enzymen ohne CobM in Präcorrin-4 **31 e**, und damit in Faktor IV **32 e**, überführt. Das <sup>13</sup>C-NMR-Spektrum des markierten Faktors IV zeigte, daß die Signale für die Carbonylgruppe des Acetylrestes (ursprünglich C-20) sowie für C-1 als Doublets erschienen, d. h. also, daß diese Kohlenstoffatome direkt verknüpft sind. Damit ist die Schlußfolgerung, daß sich die Acetylgruppe von Faktor IV **32**, und damit auch in Präcorrin-4 **31**, an C-1 befindet, zwingend<sup>[53]</sup>. Zusätzlich wurde Faktor IV biosynthetisch aus Präcorrin-3A **10 b** (Schema 3) gewonnen, das seinerseits aus [4-<sup>13</sup>C]ALA **4 b** und [*Methyl*-<sup>13</sup>C]SAM hergestellt worden war. [*Methyl*-<sup>13</sup>C]SAM wurde auch im letzten Schritt als Quelle für die vierte Methylgruppe eingesetzt. Die Doublets für C-17 und die zuletzt angefügte Methylgruppe im <sup>13</sup>C-NMR-Spektrum von Faktor IV bestätigten ihre direkte Verknüpfung. Sehr wertvoll war für uns die Beobachtung eines Singulets für die Methylgruppe des Acetylrestes<sup>[53]</sup>. Und schließlich ist es im Zusammenhang mit Faktor IV interessant, daß ein enger Verwandter des zugrundeliegenden kontrahierten Makrocyclus schon früher für andere Zwecke synthetisiert worden war<sup>[54]</sup>.

In befriedigender Übereinstimmung mit den Ergebnissen der schon beschriebenen Pulsmarkierungsexperimente, die uns über die Reihenfolge der C-Methylierungen nach der dritten Methylierung Auskunft geben sollten, steht der Befund, daß die vierte Methylgruppe, die in den Makrocyclus eingefügt wird, an C-17 in Präcorrin-4 **31** erscheint. Sowohl in *Pr. shermanii* als auch in *Ps. denitrificans* wurden die Methylgruppen in der Reihenfolge 17, 12, 1 und schließlich 5/15 eingebaut. Aus den bereits dargestellten Untersuchungen an Präcorrin-6A **16** geht hervor, daß die fünfte Methylgruppe, die in den Corrinen an C-12 auftritt, ursprünglich an C-11 eingebaut wird. Da die weitere Transformation von Präcorrin-4 **31** durch Deletion des *cobM*-Gens unterbrochen und deshalb Präcorrin-4 **31** angereichert wird und weil die Sequenzanalyse *cobM* als eine Methyltransferase ausweist, muß es sich bei *cobM* um die 11-Methyl-Transferase in *Ps. denitrificans* handeln<sup>[52]</sup>.

Nach einer Reihe chromatographischer Schritte gelang es, die CobM-Methyl-Transferase in homogener Form aus einem Stamm von *Ps. denitrificans* zu isolieren, in dem nur das *cobM*-Gen überexprimiert worden war. Mit Hilfe der üblichen SDS-PAGE-Analyse (SDS-PAGE = Natriumdodecylsulfat-Polyac-



Schema 13. Nachweis, daß sich die Acetylgruppe von Präcorrin-4 **31** an Position 1 befindet.

rylamid-Gelelektrophorese) wurde für CobM eine relative Molekulmasse von  $M_r = 31\,000 \pm 2000$  ermittelt. Die Sequenz der ersten fünfzehn Reste an seinem N-Terminus stand in voller Übereinstimmung mit den Erwartungen aus der DNA-Sequenz, auch wenn das N-terminale Methionin bei der Bildung des reifen Proteins entfernt worden war<sup>[55]</sup>.

## 6.2. Atempause

Der Aufstieg zum Gipfel war nun fast geschafft, und wir berichten hier bereits über jüngste Forschungsergebnisse. Was also blieb noch zu tun? In Abschnitt 3 wurde darüber berichtet, wie man herausfand, daß für die Biosynthese von Hydrogenobyrinsäure **12** aus Uro'gen III **7** *neun* Enzyme nötig sind. Für diese Enzyme codieren die *cob*-Gene mit den Buchstaben

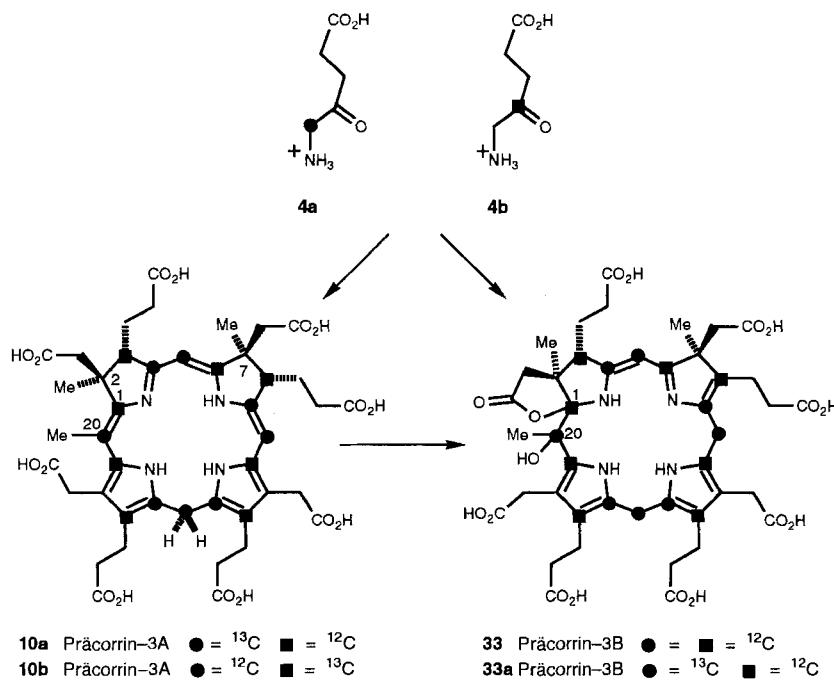
*A, F, G, H, I, J, K, L und M.* In Schema 1 wurde gezeigt, daß für die Bildung von Präcorrin-3A **10** *cobA* und *cobI* erforderlich sind. Der Hauptabschnitt des Übersichtsartikels beschäftigte sich damit, wie die Funktionen der durch *cobM*, *cobK*, *cobL* und *cobH* codierten Enzyme entdeckt wurden. Zu diesem Zeitpunkt (März 1993) war noch unbeantwortet, welche Funktionen die durch die restlichen Gene codierten Enzyme haben. Bei diesen Genen handelt es sich um *cobG*, *cobF* und *cobJ*. Wie aus der bisherigen Darstellung hervorgeht, wandeln die entsprechenden Enzyme Präcorrin-3A **10** in Präcorrin-6A **16** um. Dieser Prozeß verläuft über das bekannte Präcorrin-4 **31**, das von CobM unter Bildung von Präcorrin-5 an C-11 methyliert wird. Weiterhin wußten wir aus Vergleichen der Sequenzen von CobF und CobJ mit denen der bekannten Methyl-Transferasen (CobA, I, M und L), daß diese beiden Enzyme ebenfalls Methyl-Transferasen sind. Ganz anders dagegen verhielt sich CobG, und wir nahmen an, daß es die oxidative Stufe katalysiert, die vor Präcorrin-4 **31** auftreten muß. Dies alles paßt ausgesprochen gut zusammen, da jetzt nur noch die Korrelation der zwei C-Methylierungen (an C-17 und C-1) mit ihren Enzymen aussteht. Hierfür bieten sich CobJ und CobF an. An diesem Punkt läßt sich unsere Situation vielleicht am besten mit der Lösung eines Kreuzworträtsels oder Puzzles vergleichen: Je mehr Teile an der richtigen Stelle liegen, um so einfacher ist die Lösung der verbleibenden Probleme. Und zu diesem Zeitpunkt lagen schon fast alle Teile an ihrem richtigen Platz!

### 6.3. Bühne frei für die Ringkontraktion: Präcorrin-3B

Um die noch offenen Fragen zu klären, wurden die CobG-, CobJ- und CobF-Enzyme allein und in Kombination daraufhin untersucht, ob sie Präcorrin-3A **10** transformieren können. Natürlich konnten diese Experimente erst durchgeführt werden, nachdem Stämme von *Ps. denitrificans* konstruiert worden waren, in denen *cobG*, *cobJ* und *cobF* getrennt amplifiziert worden waren<sup>[55]</sup>. CobJ allein zeigte keinerlei Wirkung auf Präcorrin-3A, wohingegen cobG und cobJ zusammen das bekannte Präcorrin-4 **31** lieferten. CobJ ist eine Methyl-Transferase, und aus der Struktur von Präcorrin-4 **31** kann man schließen, daß es sich bei diesem Enzym um die 17-Methyl-Transferase handeln muß. Das bedeutet also, daß CobG vor CobJ wirksam werden muß. Aufgrund von Arbeiten mit acht gentechnisch veränderten Stämmen von *Ps. denitrificans*, aus denen nacheinander die Gene *cobF* bis *cobM* entfernt worden waren, hatte es schon früher Hinweise darauf gegeben, daß CobG das auf Präcorrin-3A **16** einwirkende Enzym ist. Nur der Stamm ohne *cobG* reicherte Präcorrin-3A **10** intrazellulär an<sup>[56]</sup>. Bei näherer Untersuchung zeigt sich, daß CobG allein Präcorrin-3A **10** in ein neues, nicht weiter methyliertes Zwischenprodukt umwandelt, das man aus diesem Grund als Präcorrin-3B bezeichnete<sup>[57]</sup>. Wie schon in früheren Fällen ließen sich auch hier zwei Isomere isolieren. Beide konn-

ten durch eine Inkubation mit dem CobJ-Enzym und SAM mit hoher Ausbeute in das Präcorrin-4 **31**, und damit in eine gesicherte Zwischenstufe der B<sub>12</sub>-Synthese, umgewandelt werden<sup>[55]</sup>. Die Isomere sind mit großer Wahrscheinlichkeit an C-3 epimer; dies ist aber nebensächlich, und unsere Aufmerksamkeit wird sich hier auf das Hauptepimer richten. Massenspektrometrisch ergab sich eine Molekülmasse von 894; das sind 16 Masseneinheiten mehr als für Präcorrin-3A **10**. Insgesamt entspricht dies der Einführung eines Sauerstoffatoms in Präcorrin-3A **10** bei der Bildung von Präcorrin-3B. Auf diese Weise konnte bestätigt werden, daß CobG das oxidierende Enzym ist<sup>[57]</sup>.

Eine vollständige Darstellung der Strukturaufklärung von Präcorrin-3B erübrigt sich, da hier, wie auch für alle früheren neuen Zwischenstufen, genau dieselbe Methode der Mehrfach-<sup>13</sup>C-Markierung benutzt wurde. Das Fourier-Transform-Infrarotspektrum der Verbindung wies eine starke Bande bei 1799 cm<sup>-1</sup> auf, die auf die Gegenwart eines  $\gamma$ -Lactons hindeutete. Die Markierungsmuster für zwei der drei unterschiedlich <sup>13</sup>C-markierten Proben von Präcorrin-3B sind in den Strukturen **33a** und **33b** zusammengefaßt (Schema 14). Die Zuordnungen sowohl in den <sup>1</sup>H- als auch in den <sup>13</sup>C-NMR-Spektren wurden sehr sorgfältig durchgeführt. Um die der Verbindung zugewiesene Struktur **33** zusätzlich abzusichern, wurden um den ganzen Makrocyclus herum auf <sup>1</sup>H, <sup>13</sup>C-Nah- und Weitbereichskopplungen beruhende Beziehungen aufgestellt<sup>[57]</sup>. Tatsächlich läßt die Fülle der Beweise keinen Zweifel daran, daß dies die korrekte Struktur ist, auch wenn die Konfigurationen an C-20 und C-1 noch bestimmt werden müssen. Die Struktur von Präcorrin-3B **33** war ebenfalls eine Überraschung, da vor 1990 die allgemeine Ansicht dahin ging, daß die nächste auf Präcorrin-3A **10** folgende Stufe wahrscheinlich die C-17-Methylierung oder die Decarboxylierung des 12-Acetats sein würde. Ausgesprochen interessant ist außerdem, daß der Oxidationsschritt, der zu Präcorrin-3B **33** führt, die Ringkontraktion noch nicht bewirkt; jetzt aber ist die Grundlage dafür geschaffen, daß sie



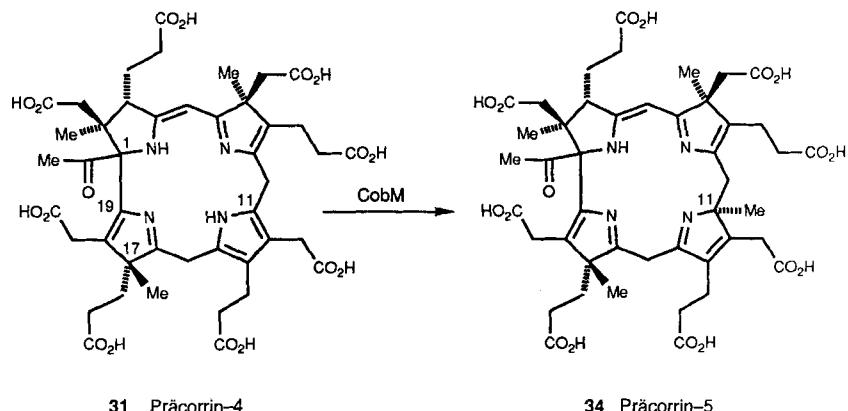
Schema 14. <sup>13</sup>C-Markierung von Präcorrin-3B **33a** und **33b**.

während der nun folgenden, durch CobJ katalysierten Umwandlung in Präcorrin-4 31, bei der es auch zur Methylierung von C-17 kommt, ablaufen kann.

Das reine CobG-Enzym ist ein braungrünes Protein. Es wird aus einem Stamm von *Ps. denitrificans* isoliert, der *cobG* und *cobF* überexprimiert. Die durch SDS-PAGE ermittelte Molekülmasse von CobG beträgt  $46\,000 \pm 2000$ . Das Assay beruhte auf der Bildung von Präcorrin-4 **31** aus Präcorrin-3A **10**. Dazu wurden die zu untersuchenden Extrakte unter Zugabe von CobJ inkubiert. Alle Eigenschaften von CobG sowie der Nachweis von Eisen und Sulfid deuteten darauf hin, daß es sich bei diesem Enzym um ein Eisen-Schwefel-Protein mit einem [4Fe-4S]-Cluster oder zwei [2Fe-2S]-Clustern handelte<sup>[55]</sup>. Mit den entsprechenden Domänen der Ferredoxin-Sulfit-Reduktase (EC 1.8.7.1), dem Sulfit-Reduktase-Hämoprotein CysI (EC 1.8.1.2) und der Ferredoxin-Nitrit-Reduktase (EC 1.7.7.1) weist die C-terminale Domäne von CobG ca. 25% Identität auf (Tabelle 2)<sup>[58, 59]</sup>. Es ist wichtig, daß die vier Cystein-Reste, von denen man annimmt, daß sie den [4Fe-4S]-Cluster in CysI und Spinat-Nitrit-Reduktase<sup>[58]</sup> koordinieren, an den Positionen 338, 344, 377 und 381 der CobG-Sequenz aufgereiht sind. Das reine CobG-Enzym katalysiert die Umwandlung von Präcorrin-3A **10** in Präcorrin-3B **33** ohne Zusatz von Cofaktoren. Diese Oxidation läuft unter den hier gewählten anaeroben Bedingungen in bezug auf das Enzym mehr oder weniger stöchiometrisch ab. Die Gruppe um Scott hat jedoch kürzlich, als sie Präcorrin-3A **10** mit CobG inkubierte, über das Auftreten von  $^{13}\text{C}$ -NMR-Signalen berichtet, die der Präcorrin-3B **33** zugewiesenen Struktur (siehe oben) entsprechen. Dabei machte man die wertvolle Beobachtung, daß das CobG-Enzym in Gegenwart von Sauerstoff Turnover zeigt<sup>[60]</sup>.

#### 6.4. Präcorrin-5: eine Struktur ohne Überraschungen

CobM war bereits als das Enzym identifiziert worden, daß C-11 von Präcorrin-4 **31** methyliert; dabei sollte Präcorrin-5 **34** entstehen. Für die Einführung der Methylgruppe, die man in Präcorrin-6A **16** an C-1 beobachtete, bleibt einzig CobF übrig, und in der Tat ist dieses Enzym eine Methylase. A priori betrachtet, scheinen diese beiden Stufen ohne Umwege abzulaufen. Damit war es sehr wahrscheinlich, daß die Biosynthese diesmal keine Überraschungen für uns bereithielt. Und so war es dann auch: Präcorrin-5 **34** konnte auf biosynthetischem Wege unter Einsatz von CobG, CobJ, CobM und SAM, aber ohne CobF aus Präcorrin-3A **10** hergestellt werden<sup>[55]</sup>. Alternativ ließ sich Präcorrin-5 **34** durch Inkubation mit CobM und SAM auch aus Präcorrin-4 **31** gewinnen<sup>[61]</sup>. Um die Strukturbestimmung von **34** NMR-spektroskopisch zu ermöglichen, wurden wiederum mehrfach <sup>13</sup>C-markierte Formen von Präcorrin-5 hergestellt<sup>[61]</sup>. Wie man sehen kann, handelt es sich bei der Struktur **34** um das erwartete 11-methylierte Derivat von Präcorrin-4 **31** (Schema 15). Später werden wir noch darauf eingehen, wie die Acetylgruppe an C-1 von Präcorrin-5 **34** entfernt



Schema 15. Struktur von Präcorrin-5 34.

werden kann, um an dieser Stelle eine C-Methylierung zu ermöglichen. Die dazu nötige Reaktivität ist in jedem Fall vorhanden, da der Acetylrest intrinsisch labil<sup>[55, 61]</sup> ist und im Verlauf der Umwandlung höchstwahrscheinlich als Essigsäure verlorengeht<sup>[55]</sup>, die uns bereits aus den frühen Untersuchungen an *Pr. shermanii* als Eliminierungsprodukt bekannt ist. Dieses desacetylierte Produkt wurde isoliert und als Faktor V bezeichnet<sup>[55]</sup>.

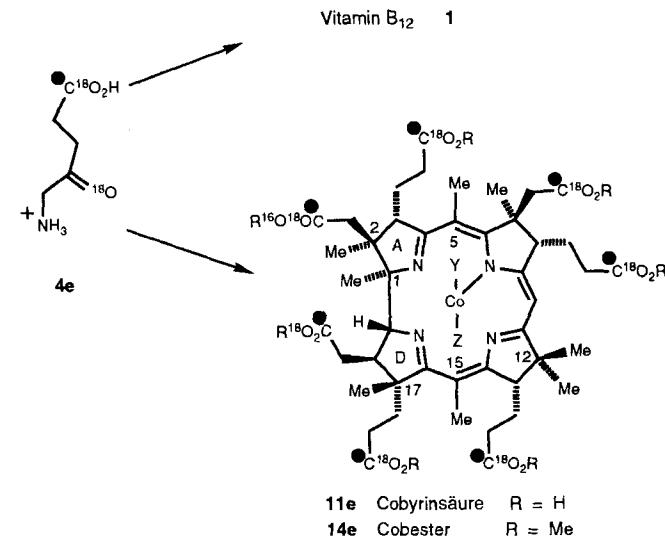
Der Weg von ALA 4 zu Hydrogenobyrinsäure 12 ist nun vollständig und wird gleich in einer mechanistischen Diskussion zusammengefaßt werden. Zunächst aber wollen wir das, was wir über *Ps. denitrificans* herausgefunden haben, mit dem Wissen über den B<sub>12</sub>-Biosyntheseweg in *Pr. shermanii* korrelieren.

## 7. Ein Vergleich der B<sub>12</sub>-Synthesewege in *Ps. denitrificans* und *Pr. shermanii*

Obwohl *Ps. denitrificans* ein Aerobier ist und *Pr. shermanii* zur Produktion von B<sub>12</sub> mikroaerophil, also nahezu anaerob, gezogen wird, besteht trotzdem eine signifikante Übereinstimmung zwischen den B<sub>12</sub>-Biosynthesewegen dieser beiden Organismen. In beiden Fällen sind das Ausgangsmaterial, ALA **4**, und das Produkt, Coenzym B<sub>12</sub> **2**, gleich; und auch alle Schritte bis hin zu Präcorrin-3A **10** (oder möglicherweise bis Präcorrin-2 **9**) gleichen sich. Ein deutlicher Unterschied besteht im Zeitpunkt der Insertion von Cobalt. In *Ps. denitrificans* sind die Zwischenstufen auf dem gesamten Biosyntheseweg bis zur Hydrogenobyrinsäure **12** cobaltfrei. Der Einbau von Cobalt erfolgt hier erst nach der Bildung des a,c-Diamids **43** der Hydrogenobyrinsäure; über weitere Einzelheiten wollen wir später berichten. Anders verhält sich dagegen *Pr. shermanii*. Cobalt wird hier, wie bereits in Abschnitt 2 beschrieben, wahrscheinlich auf der Stufe von Präcorrin-3A **10**, vielleicht aber auch auf der Stufe von Präcorrin-2 **9** eingebaut. Die Untersuchungen haben gezeigt, daß die Cobaltinsertion schnell erfolgt und bereits zehn Minuten nach Beginn der Inkubation mit <sup>60</sup>Co<sup>2+</sup> sowie dem vollständigen Enzymsystem der Zellen weitgehend abgeschlossen ist<sup>[71]</sup>. Eine Schlüsselfrage ist daher, ob der auf Präcorrin-3A **10** in *Pr. shermanii* folgende restliche Biosyntheseweg den Weg der Biosynthese in *Ps. denitrificans* widerspiegelt, und zwar in der Weise, daß hier der Cobaltkomplex von Präcorrin-4 **31** über die Cobaltderivate all der anderen, schon beschriebenen Präcorrine in Cobalto-Präcorrin-8x überführt wird, das dann schließlich

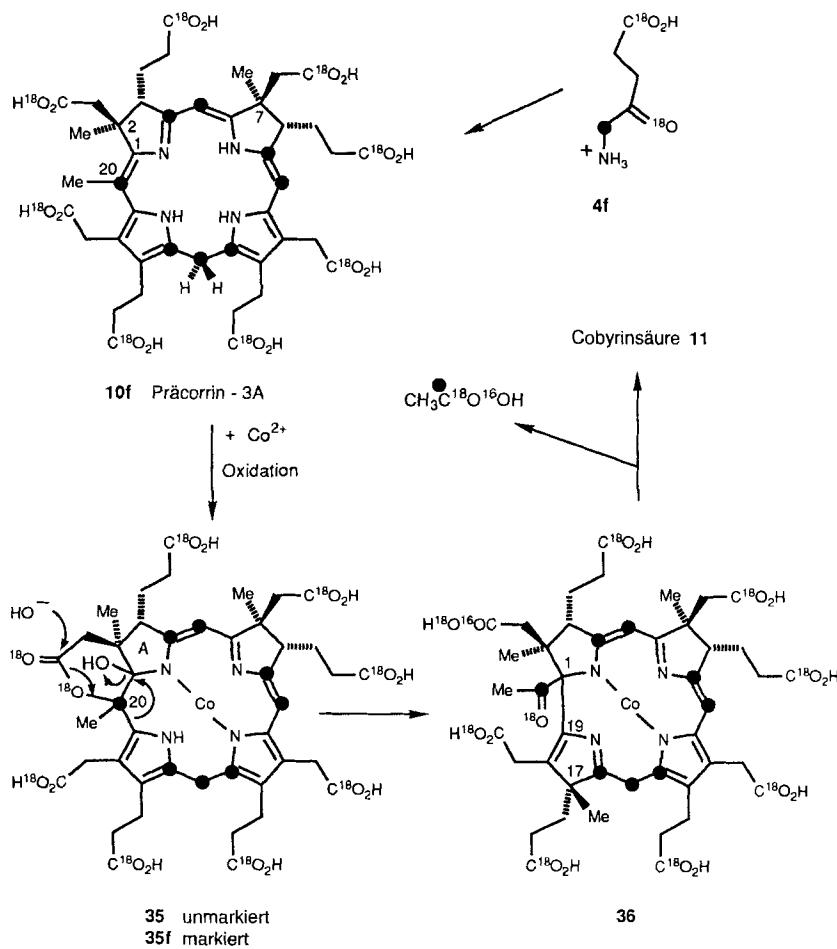
unter Umlagerung direkt Cobyrinsäure **11** ergibt. Experimente, die erste Hinweise darauf gaben, daß es sich tatsächlich so verhält, beruhten auf der Inkubation eines Satzes  $^3\text{H}, ^{14}\text{C}$ -doppelt markierter metallfreier Präcorrine mit dem Enzymsystem aus *Pr. shermanii*. Ausgehend von Präcorrin-6A **16**, Präcorrin-6B **19** und Präcorrin-8x **23** wurden niedrige Einbauquoten mit dem erwarteten  $^3\text{H} : ^{14}\text{C}$ -Verhältnis in Cobyrinsäure **11** beobachtet<sup>[62a]</sup>. Wenn man berücksichtigt, daß Hydrogenobyrinsäure **12** nicht in Cobyrinsäure **11** inkorporiert wird<sup>[62b]</sup>, dann deutet diese Untersuchung darauf hin, daß es sich bei den Cobaltkomplexen von **16**, **19** und **23**, die sich spontan in den Inkubationsmischungen bilden, wahrscheinlich um die Zwischenstufen der Cobyrinsäurebiosynthese handelt. Außerdem wurde, ausgehend von Präcorrin-8x **23**, etwas Hydrogenobyrinsäure **12** gebildet. Das weist auf eine enzymatische Aktivität in den Extrakten von *Pr. shermanii* hin, die, unabhängig von der Gegenwart des zentralen Cobalt-Ions die [1,5]-Methylwanderung katalysiert. Wie CobH<sup>[42]</sup> unterliegt wahrscheinlich auch dieses Enzym der Hemmung durch Hydrogenobyrinsäure<sup>[62b]</sup> oder durch sein eigenes Produkt, die Cobyrinsäure<sup>[41]</sup>. Dies ist ein Anfang, und der weitere Weg nach vorn muß im Falle von *Pr. shermanii* zweifellos dahingehen, seine genetische Analyse durchzuführen, um so die jenseits von Präcorrin-3A **10** operierenden Enzyme in die Hand zu bekommen. Diese Aufgabe sollte wesentlich durch die Tatsache erleichtert werden, daß die Palette der Enzyme aus *Ps. denitrificans* zur Verfügung steht.

Ein anderer interessanter Aspekt der  $\text{B}_{12}$ -Biosynthese wurde durch Untersuchungen zu den Carboxygruppen der Seitenketten aufgeworfen. Als [ $1-^{13}\text{C}, 1,4-^{18}\text{O}_3$ ]ALA **4e** in *Pr. shermanii* in  $\text{B}_{12}$  **1** inkorporiert wurde, fand man durch NMR-Untersuchungen, daß die Acetamidgruppe an C-2, vermutlich durch Austausch mit dem Medium<sup>[63]</sup>, einen beträchtlichen  $^{18}\text{O}$ -Verlust erlitten hatte. Später wurde berichtet, daß dieser Austausch fast vollständig abläuft<sup>[64]</sup>. Direkt an  $^{13}\text{C}$  gebundener  $^{18}\text{O}$  läßt sich anhand einer charakteristischen Hochfeldverschiebung des  $^{13}\text{C}$ -NMR-Signals im Vergleich zu seiner normalen Lage nachweisen. Um herauszufinden, an welcher Stelle dieser Austausch stattfindet, wurde [ $1-^{13}\text{C}, 1,4-^{18}\text{O}_3$ ]ALA **4e** in eine frühere Zwischenstufe, die Cobyrinsäure **11e**, unter Verwendung desselben Organismus inkorporiert (Schema 16). Diese Zwischenstufe hat den Vorteil, daß beide Sauerstoffatome der Carboxygruppe untersucht werden können. Dazu wurden die  $^{13}\text{C}$ -NMR-Spektren des entsprechenden Heptamethylesters, Cobester **14e**, aufgenommen. Sie zeigten, daß sechs der sieben Carboxygruppen von Cobyrinsäure **11e** noch beide Sauerstoffatome enthielten, das Acetat an C-2 jedoch ein Sauerstoffatom verloren hatte<sup>[65]</sup>. Ob ein ähnlicher spezifischer Verlust eines Sauerstoffatoms auch auftritt, wenn Hydrogenobyrinsäure **12** in *Ps. denitrificans* biosynthetisiert wird, ist nicht bekannt, da die hierzu erforderlichen Experimente bislang nicht durchgeführt worden sind. Sicherlich wird dies bald aber geschehen. Einen



Schema 16. Zur Untersuchung des Sauerstoffaustausches in den Carboxygruppen der Seitenketten während der Biosynthese von Cobyrinsäure **11e**.

ersten Hinweis darauf, wie der beschriebene spezifische Sauerstoffverlust abläuft, ergab die Untersuchung der Essigsäure, die im Verlauf der Biosynthese der aus [ $5-^{13}\text{C}, 1,4-^{18}\text{O}_3$ ]ALA **4f** stammenden Cobyrinsäure (wie **11**) in *Pr. shermanii* ausgestoßen wird (Schema 17). Damit findet sich ein  $^{13}\text{C}$ -Atom an C-20 von Präcorrin-3A **10f**, und es ist dieses Kohlenstoffatom,



Schema 17. Sauerstoffübertragung von einer Seitenketten-Carboxygruppe auf die während der Biosynthese in *Pr. shermanii* ausgestoßene Essigsäure.

das schließlich als Carbonyl-C-Atom der Carboxygruppe der Essigsäure erscheint. Ein Hochfeld-<sup>13</sup>C-NMR-Spektrum eines geeigneten Esters dieser Essigsäure wies ein <sup>13</sup>C-Signal auf, das infolge des direkt gebundenen <sup>18</sup>O zu hohem Feld verschoben war. Dieses Resultat und die Ergebnisse von Kontrollexperimenten, mit denen der mögliche Austausch von Sauerstoff aus CO<sub>2</sub>H mit dem Medium überprüft werden sollte, weisen darauf hin, daß eine weitgehende Übertragung eines <sup>18</sup>O-Atoms aus einer Carboxy-Seitenkette auf die Essigsäure stattgefunden hatte<sup>[66]</sup>. Wahrscheinlich erfolgt dieser Transfer von der Carboxygruppe des Acetatrestes an C-2, da, wie bereits berichtet, spezifisch diese Gruppe auf einer der Stufen vor der Bildung von Cobyrinsäure **11** eines ihrer ursprünglichen Sauerstoffatome verliert. Das läßt vermuten, daß in *Pr. shermanii* an der Bildung des δ-Lactons an C-20 eine etwas davon abweichende Lactonzwischenstufe **35** beteiligt ist<sup>[66]</sup>. Dies könnte so sein, weil der Organismus ohne Sauerstoff oder bei sehr geringen Sauerstoffkonzentrationen wächst. Sicherlich wird die Chemie des Makrocyclus auch durch die Gegenwart von Cobalt ganz wesentlich beeinflußt. Das δ-Lacton **35** ist nur ein möglicher Kandidat für den Prozeß der Ringkontraktion; es gibt durchaus weitere Kandidaten, z.B. solche mit einem Imin in Ring A, die im weitesten Sinne als äquivalent gelten können. Struktur **35** hat jedoch den Vorteil, daß sich hier ein plausibler Mechanismus anbietet, durch den <sup>18</sup>O aus der Acetatgruppe an C-2 auf die Essigsäure übertragen wird, die dann abgespalten wird.

## 8. Zusammenfassung, Diskussion und die Mechanismen der Stufen, die zu Hydrogenobyrinsäure **12** führen

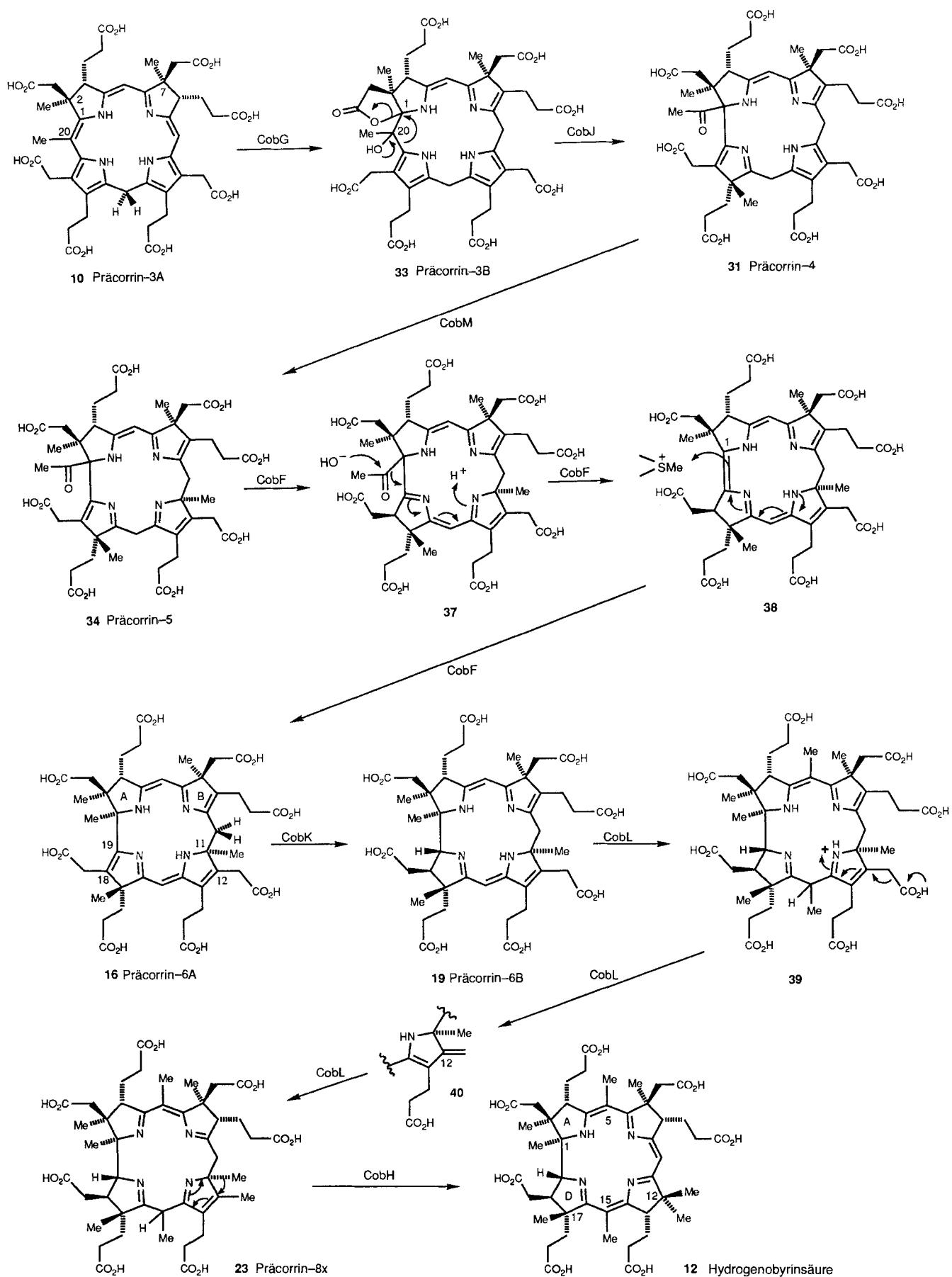
Es ist nun an der Zeit, einmal den gesamten Biosyntheseweg von Uro'gen III **7** bis zu Hydrogenobyrinsäure **12** zu betrachten. Der erste Teil des Weges ist in Schema 1 zusammengefaßt, der Rest wird in Schema 18 wiedergegeben. Sicherlich hat es auf diesem Weg mehr Überraschungen, Irrungen und Wirrungen gegeben, als wir uns je hätten träumen lassen. Aber gerade das machte ja die Faszination aus. Nicht minder faszinierend ist aber auch die Art und Weise, mit der eine jede Transformation den Weg für die jeweils folgende Umwandlung bereitet. Treffender, um mit Eschenmoser<sup>[44]</sup> zu sprechen, mag vielleicht sein, daß bei der Evolution dieser bemerkenswerten Biosynthese die intrinsische Reaktivität einer jeden Zwischenstufe die Natur des nächsten Schrittes bestimmt.

Schema 1 zeigt, wie sich der Biosyntheseweg bei Uro'gen III **7**, dem Ursprung aller Pigmente des Lebens, durch eine C-2-Methylierung in Richtung auf Vitamin B<sub>12</sub> verzweigt. Dieser Schritt nutzt die vorhandene β-Reaktivität von Pyrrolen gegenüber Elektrophilen (auch α-Reaktivität ist vorhanden). Eine dazu äquivalente zweite Methylierung an C-7 führt dann mit Hilfe desselben Enzyms, CobA, zu Präcorrin-2 **9**. Die dritte Methylgruppe wird durch das Enzym CobI unter Bildung von Präcorrin-3A **10** an C-20 eingeführt. Das war damals ein überraschendes Ergebnis, kann aber vom heutigen Standpunkt aus mechanistisch als β-Methylierung eines Enamins interpretiert werden. Die Geschichte findet ihre Fortsetzung in Schema 18, das zeigt, wie Präcorrin-3A **10** durch CobG-katalysierte Oxidation das Lacton Präcorrin-3B **33** ergibt. Im Zusammenhang mit Struktur **33** soll daran erinnert werden, daß die mögliche Beteili-

gung solcher Lactone an der B<sub>12</sub>-Biosynthese erstmals von Eschenmoser vorgeschlagen und diskutiert wurde<sup>[44]</sup>. Bei CobG könnte es sich um eine Monooxygenase oder eine Dioxygenase handeln, und vermutlich benötigt sie einen reduzierenden Co-faktor. Beide Aspekte bedürfen weiterer Klärung. Die bei dieser Oxidation angegriffene C-1/C-20-Doppelbindung ist wahrscheinlich die elektronenreichste im gesamten Molekül.

Präcorrin-3B **33** ist wie geschaffen für eine Umlagerung vom Pinacol-Typ<sup>[44]</sup>, die die Ringkontraktion auslöst. Die Umlagerung wird durch CobJ katalysiert, das auch die Methylierung an C-17 bewirkt. In Schema 18 wird gezeigt, daß die Kontraktion vor der Methylierung an C-17 stattfindet; dadurch wird der elektronenreiche Pyrrolring die wandernde Gruppe. Die Methylgruppe an C-20 dient wahrscheinlich dazu, Konkurrenzreaktionen zu unterdrücken. Aus Untersuchungen an verwandten Modellsystemen ist ein Beispiel für eine solche Konkurrenzreaktion bekannt, die in Abwesenheit einer Methylgruppe in einer Sackgasse endet<sup>[44]</sup>. Bei der Kontraktion entsteht das Präcorrin-4 **31** mit dem Acetylrest an C-1; wie in früheren Beispielen konnte durch <sup>13</sup>C-NMR-Untersuchungen an <sup>18</sup>O-markiertem Material nachgewiesen werden, daß der Carbonylsauerstoff in Präcorrin-4 aus molekularem Sauerstoff stammt<sup>[67]</sup>. Dies gilt auch für die Hydroxygruppe an C-20 in Präcorrin-3B **33**.

Man kommt nicht umhin, die Chemie der nächsten beiden Stufen bis zu Präcorrin-6A **16** als außergewöhnlich zu bezeichnen. Auf einem Symposium im März 1993<sup>[68]</sup> wurden mechanistische Erklärungen diskutiert, denen zufolge in der ersten Stufe genau die Reaktivität geschaffen wird, die man für die nächste Stufe benötigt. Ganz offensichtlich muß die Acetylgruppe von C-1 in Präcorrin-4 **31** entfernt werden, um die spätere Methylierung an dieser Stelle zu ermöglichen. Arigoni hat dargelegt<sup>[68]</sup>, daß der lebende Organismus dieses Ziel dadurch erreichen kann, daß die erste Methylierung an C-11 stattfindet, also an einer der α-Positionen des einzigen verbliebenen Pyrrolkerns. Dabei wird Präcorrin-5 **34** gebildet. Die C-11-Methylierung wird durch das CobM-Enzym durchgeführt, bei dem es sich, wie bei CobI, um eine Methyl-Transferase handelt, die nur eine C-Methylierung katalysiert. All die anderen am B<sub>12</sub>-Biosyntheseweg beteiligten Methyl-Transferasen (CobA, J, F und L) können etwas mehr als nur eine Methylierung auslösen. Nun ist nur noch eine simple Tautomerisierung der Doppelbindungen in Präcorrin-5 **34** erforderlich, um zu Struktur **37** zu gelangen. Diese ist der Schlüssel zur Entfernung der Acetylgruppe. Wie an dieser Struktur deutlich wird, ermöglicht das über die Ringe C und D konjugierte System die hydrolytische Entfernung der Acetylgruppe durch Retro-Claisen-Kondensation unter Freisetzung von Essigsäure. Es gibt gewichtige Beweise für die Eliminierung der Essigsäure in *Ps. denitrificans*<sup>[55]</sup>. Für *Pr. shermanii* war dies bereits früher zweifelsfrei nachgewiesen worden. Bei der hier beschriebenen Eliminierung von Acetat, die in vivo mit großer Wahrscheinlichkeit enzymkatalysiert verläuft, würde das konjugierte System **38** erzeugt werden. Von Battersby<sup>[68]</sup> wurde außerdem noch hervorgehoben, daß nun ein von Ring C über Ring D und weiter bis zu C-1 konjugiertes Enamin vorliegt, das die Methylierung an C-1 zuläßt. Das unmittelbar aus den in Struktur **38** durch Pfeile angedeuteten Elektronenverschiebungen resultierende Produkt wäre ein Tautomer von Präcorrin-6A **16**. Um von hier zu Präcorrin-6A **16** zu gelangen, sind nur einfache Verschiebungen der Doppelbindungen erforder-



Schema 18. Der Biosyntheseweg von Präcorrin-3A 10 zu Hydrogenobyrinsäure 12 in *Ps. denitrificans*.

lich, die aufgrund des Stabilitätsgewinns durch das über die Ringe C und D konjugierte Amidinsystem<sup>[44]</sup> in **16** plausibel erscheinen. Und damit sind wir bei der Zwischenstufe angelangt, von der aus der aufregende Sturm auf den Gipfel des Everest begann.

An diesem Punkt nämlich wird die Oxidationsstufe an die der Hydrogenobyrinsäure **12** angepaßt. Die dafür erforderliche Reduktion wird durch das NADPH-abhängige Enzym CobK katalysiert, das auf die protonierte Form **16e** an C-18 von Präcorrin-6A **16** einwirkt (Schema 6). Durch die Protonierung ist die Anlagerung des Hydrids an C-19 möglich; als Elektronenacceptor fungiert dabei das Ring-C-Imin in der protonierten Form **16e**. Nun erfolgt die durch CobL katalysierte Transformation. CobL ist das bemerkenswerte Enzym, das mit Methyltransfer und Decarboxylierung zwei ganz unterschiedliche Aktivitäten aufweist. Wie in Abschnitt 4.3 dargelegt, gibt es gute Gründe dafür, daß mindestens eine der Methylierungen an C-5 oder C-15 wahrscheinlich vor der Decarboxylierung stattfindet; dabei gilt auch hier, daß – wie bei allen anderen C-Methylierungen dieses Biosyntheseweges – die dazu nötige Reaktivität in einem Enamin vorliegt. Vor der Modifikation des C-12-Acetats befinden sich, wie Schema 18 zeigt, beide Methylgruppen an ihren Positionen. Es scheint plausibel, daß die Decarboxylierung durch die Methylierung an C-15 ausgelöst wird. Durch sie wird der Aufbau eines protonierten Pyrrolenis in Ring C, der mit der entscheidenden Methylierung an C-11 begann, abgeschlossen. Da bekannt ist, daß solche Systeme unter Decarboxylierung reagieren, gibt es letztlich eine vernünftige Erklärung dafür, warum gerade die C-12-Acetatgruppe decarboxyliert wird. Zu diesen Vorstellungen paßt der Befund, daß C-15 in Präcorrin-8x **23** sp<sup>3</sup>-hybridisiert bleibt. Dieses Ergebnis steht im Gegensatz zu den damit zusammenhängenden Ereignissen an C-5, wo es nach der Methylierung zum Verlust eines Protons und der damit verbundenen Rückbildung des sp<sup>2</sup>-Zustandes kommt.

Dem aufmerksamen Beobachter wird nicht entgangen sein, daß die Doppelbindung in Ring B von Präcorrin-8x **23** zwischen N und C-9 angeordnet ist, während sie in vielen früheren Zwischenstufen, z.B. in Präcorrin-6A **10**, zwischen C-8 und C-9 auftritt. Zwar wurde die C-8/C-9-Anordnung für den isolierten Ester von Präcorrin-6A nachgewiesen, aber ob sich die Doppelbindung im ursprünglichen enzymatischen Produkt auch an dieser Position befindet, kann nicht mit Sicherheit gesagt werden<sup>[28]</sup>. Um die Möglichkeit dieser Doppelbindungsänderung während der enzymatischen Umwandlungen zu überprüfen, wurde ein an C-3 und C-8 (aber nicht ausschließlich an diesen Positionen) stark mit <sup>3</sup>H angereichertes [<sup>3</sup>H,<sup>14</sup>C]Präcorrin-2 (wie **9**) synthetisiert. Das Enzymsystem aus *Pr. shermanii* wandelte diesen Vorläufer in Cobyrinsäure (wie **11**) um. Durch Abbau ihres Esters, Cobester (wie **14**), ließ sich zeigen, daß sie zwar das Tritium von 8-H verloren hatte, die Markierung von 3-H aber noch enthielt<sup>[69]</sup>. Damit besteht selbst unter den enzymatischen Bedingungen ein Mechanismus – wie die oben diskutierte Tautomerisierung –, durch den spezifisch 8-H mit dem Medium ausgetauscht wird.

Der in Struktur **39** dargestellte Decarboxylierungsschritt mit der nachfolgenden Tautomerisierung des Produktes **40** regeneriert das 5,5-disubstituierte Pyrrolenin-System in Ring C von Präcorrin-8x **23**. Dieses kann nun eine, bei solchen Molekülen

wohlbekannte [1,5]-sigmatrope Umlagerung eingehen<sup>[70]</sup>, bei der die Methylgruppe von C-11 nach C-12 wandert. Damit ist die Blockade der Konjugation aufgehoben, und der charakteristische konjugierte Chromophor der Hydrogenobyrinsäure **12** entsteht unter entsprechender thermodynamischer Stabilisierung. Hydrogenobyrinsäure **12** markierte das Ende einer Ära; das Geheimnis um die Biosynthese von Vitamin B<sub>12</sub> **1** war gelüftet worden. Nun geht es vorwärts mit dem Aufbau von Coenzym B<sub>12</sub>. Wie dies geschieht, wird im nächsten Abschnitt geschildert. Es sollte hervorgehoben werden, daß die Erforschung des Biosyntheseweges jenseits von Hydrogenobyrinsäure **12** in zweierlei Hinsicht äußerst wichtig war: erstens natürlich um seiner selbst willen, um alle späteren Stufen bis zu Coenzym B<sub>12</sub> in *Ps. denitrificans* aufzuklären, und zweitens wurde ein wesentlicher Beitrag zur Lösung des Problems, wie der Corrin-Makrocyclus biosynthetisch aufgebaut wird, geleistet. Anfangs wußte man, daß 22 Gene an der Biosynthese von Coenzym B<sub>12</sub> **2** beteiligt sind. Wenn es gelänge, die Funktion der jenseits von Hydrogenobyrinsäure **12** wirkenden Gene zu bestimmen, wären entscheidende Rückschlüsse auf die früher agierenden Gene möglich. Und mit genau dieser Strategie konnte auch gezeigt werden, daß die Produkte der Gene auf dem 8.7 kb-Fragment an der Biosynthese vor Hydrogenobyrinsäure **12** beteiligt sind.

## 9. Der Aufbau von Coenzym B<sub>12</sub> aus Hydrogenobyrinsäure **12**

### 9.1. Cobalfreie Corrinoide und der Einbau von Cobalt

In den vorangegangenen Abschnitten wurden die Enzyme aus *Ps. denitrificans* und ihre Chemie zum In-vitro-Aufbau von Hydrogenobyrinsäure **12** beschrieben. Es ist gezeigt worden, daß dieser Organismus *in vivo* (selbst in Gegenwart von Cobalt-Ionen) auch Hydrogenobyrinsäure **12** und sein *a,c*-Diamid **43**, nicht aber Cobyrinsäure **11**, anreichert. Dies steht im Gegensatz zu *Pr. shermanii*, der zwar Cobyrinsäure, nicht aber Hydrogenobyrinsäure akkumuliert. Das war der erste Anhaltspunkt dafür, daß der Einbau von Cobalt in beiden Organismen möglicherweise zu verschiedenen Zeitpunkten stattfindet; über den frühen Einbau von Cobalt in *Pr. shermanii* wurde bereits in Abschnitt 2 berichtet.

Einige frühe Beobachtungen deuteten darauf hin, daß Hydrogenobyrinsäure-*a,c*-diamid **43** das Substrat für die Chelatisierung von Cobalt in *Ps. denitrificans* sein könnte. Erstens war in wachsenden Kulturen B<sub>12</sub>-produzierender Stämme<sup>[23, 71]</sup> wie auch in Cob-Mutanten (Tabelle 1) das einfachste cobalthaltige Corrinoid, das sich nachweisen ließ, stets Cobyrinsäure-*a,c*-diamid **44**, und

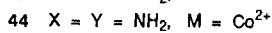
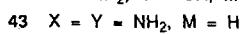
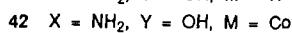
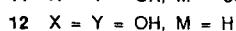
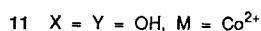
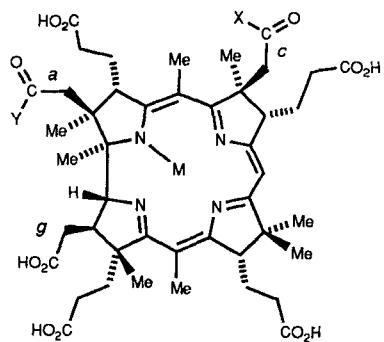


Tabelle 1. Cob-Mutanten, die nach der Bildung des Makrocyclus blockiert sind.

Mutantenstamm [a]	akkumuliertes Pigment [d]	komplementiert durch
G 635, G 2636 [b], G 2638 [b] G 622, G 623, G 630	Hydrogenobyrinsäure <b>12</b> Hydrogenobyrinsäure <b>12</b> und -diamide <b>43</b>	<i>cobB</i> <i>cobN</i>
G 2035	Hydrogenobyrinsäure <b>12</b> und -diamide <b>43</b>	<i>cobS</i>
G 2034, G 2037 G 631, G 632, G 633 G 624, G 626 G 634 G 643, G 572 [c] G 642, G 2043 G 2038, G 2039, G 2040	keines Cobyrinsäurediamid <b>44</b> Cobyrinsäurediamid <b>44</b> Cobysäure <b>48</b> Cobysäure <b>48</b> Cobinamid <b>49</b> GDP-cobinamid <b>51</b>	<i>cobT</i> <i>cobO</i> <i>cobQ</i> <i>cobD</i> <i>cobC</i> <i>cobP</i> <i>cobV</i>

[a] Mutante von *A. tumefaciens* C58-C9 Rif<sup>r</sup>, wenn nicht anders angegeben [9].

[b] Mutante von *Ps. denitrificans* SC510 [13]. [c] Mutante von *Ps. putida* KT2440 Amp<sup>r</sup> Rif<sup>r</sup> [9]. [d] Pigmente, die von *cobQ*-Mutanten an aufwärts angereichert werden, liegen, wie in den Strukturen **47–49** und **51** angegeben, zwar ursprünglich in ihrer adenosylierten Form vor, wurden aber erst nach Verlust der Adenosylgruppe identifiziert.

das komplizierteste metallfreie Corrinoid Hydrogenobyrinsäure-*a,c*-diamid **43**. Zweitens konnte gezeigt werden, daß metallfreie Corrinoids viel höhere Affinitäten gegenüber der *a,c*-Diamid-Synthase (CobB) aufweisen als ihre cobalthaltigen Gegenstücke. Drittens akkumulieren CobB-Mutanten nicht Cobyrinsäure **11**, sondern Hydrogenobyrinsäure **12**<sup>[71]</sup>. Aufgrund dieser drei Beobachtungen schien es sehr wahrscheinlich, daß der Biosyntheseweg der Hydrogenobyrinsäure **12** über die Amidierung an den Positionen *a* und *c* verläuft<sup>[72]</sup>, an die sich die Chelatisierung von Cobalt anschließt.

## 9.2. Hydrogenobyrinsäure-*a,c*-diamid-Synthase

Zur Entwicklung eines Assays für die Amidierungsaktivität wurde eine HPLC-Methode, die für den Nachweis von Cobaltnitrocorrinoiden<sup>[23]</sup> entwickelt worden war, durch Einsatz von Fluoreszenzdetektion auf metallfreie Corrinoids ausgeweitet<sup>[71]</sup>. Diese Methode ermöglichte den Nachweis, daß rohe Zellextrakte aus *Ps. denitrificans* Hydrogenobyrinsäure **12** und Cobyrinsäure **11** in Gegenwart von ATP/Mg<sup>2+</sup> und Glutamin in ihre *c*-Monoamid- (**41** bzw. **42**) bzw. ihre *a,c*-Diamid- (**43** bzw. **44**) Derivate umwandeln<sup>[71]</sup>. Das Enzym, das die beiden Amidierungsreaktionen katalysiert, wurde aus einem rekombinanten Stamm mit 20mal höherer Aktivität als normal bis zur Homogenität gereinigt. Dieser Stamm enthielt ein Multicopy-Plasmid, das fünf *cob*-Gene aus der Komplementationstruktur C (*cobA* bis *E*) trug<sup>[9, 13]</sup>. Die Bestimmung der N-terminalen Aminosäuresequenz und die Abschätzung der Molekülmasse (45 000) des denaturierten Enzyms durch Gelelektrophorese ergab, daß *cobB* das Gen ist, das für dieses Enzym codiert<sup>[13, 71]</sup>. Unter nicht denaturierenden Bedingungen wurde eine Molekülmasse von 86 000 beobachtet, was auf das Vorliegen eines Dimers hindeutet.

Studien zur Substratspezifität dieses Enzyms aus *Ps. denitrificans* zeigten, daß zuerst die *c*- und dann die *a*-Seitenkette amidiert wird. Diese Reihenfolge ist dieselbe, die auf der Basis von Isolierung und Einbau teilweise amidierter Zwischenstufen unter Verwendung intakter Zellen auch für *Pr. shermanii* und *Clo-*

*stridium tetanomorphum* hergeleitet worden ist<sup>[73]</sup>. In diesen beiden Organismen sind Cobaltnitrocorrinoids die Substrate, in *Ps. denitrificans* dagegen sind die natürlichen Substrate die metallfreien Corrinoids. Diese sind auch viel bessere Substrate ( $K_M < 1 \mu\text{M}$ ) als die entsprechenden Cobaltnitrocorrinoids ( $K_M > 100 \mu\text{M}$ ). Das CobB-Enzym amidiert weder die Acetatcarboxygruppe *g* noch eine der Propionatcarboxygruppen. Der Vergleich der Aminosäuresequenz von CobB mit denen anderer Amido-Transferasen ließ darauf schließen, daß die Domäne für den „Glutaminamid-Transfer“<sup>[74]</sup> am Carboxy-Terminus von CobB liegt. Außerdem ließ sich voraussagen, daß es sich beim Cystein an Position 326 um den Rest des aktiven Zentrums handelt, der an der „kovalenten Katalyse“ des Amidtransfers beteiligt ist.

## 9.3. Die Cobaltinsertion in Hydrogenobyrinsäure-*a,c*-diamid **43**

Für den Nachweis der Cobaltochelatase-Aktivität in *Ps. denitrificans* war wiederum das Corrinoid-Assay durch HPLC von entscheidender Bedeutung. In Gegenwart von Cobalt (Co<sup>2+</sup>) und ATP/Mg<sup>2+</sup> wurde Hydrogenobyrinsäure-*a,c*-diamid **43** effizient in seinen Cobaltnitrocorrinoid **45** (Schema 19) umgewandelt. Dagegen war Hydrogenobyrinsäure **12** ein sehr viel schlechteres Substrat für den Einbau von Cobalt. In Stämmen, die ein Plasmid mit einem 3.8 kb-Gen, nämlich *cobN*, enthielten, wurde eine verstärkte Chelatase-Aktivität nachgewiesen<sup>[75]</sup>.

Während der Reinigung von Cobaltochelatase wurde deutlich, daß zusätzlich zum *cobN*-Genprodukt auch eine andere Proteinkomponente erforderlich war. Die beiden Bestandteile wurden getrennt bis zur Homogenität gereinigt. CobN erwies sich als monomeres Enzym mit einer Molekülmasse von 140 000, sein Partner als ein Oligomer mit einer Molekülmasse von 450 000, das wiederum aus zwei Untereinheiten mit Molekülmassen von 38 000 und 80 000 bestand. Nach N-terminaler Aminosäuresequenzierung zeigte sich, daß diese Untereinheiten durch *cobS* bzw. *cobT*, den beiden *cob*-Genen aus der Komplementationstruktur B, codiert wurden<sup>[18, 75]</sup>. Die oligomere Komponente der Cobaltochelatase wurde daher als CobST bezeichnet.

Obwohl die Anreicherung metallfreier Corrinoids durch Stämme mit mutierten *cobN*- und *cobS*-Genen klar darauf hindeutete, daß diese beiden Gene am Einbau von Cobalt beteiligt sind (Tabelle 1), glaubte man zunächst daran, daß *cobT* eine andere Funktion hatte. Darüber hinaus ließ sich keine Homologie zwischen einem dieser drei Gene und dem Gen finden, das für die Ferrochelatase (das Enzym, das zur Bildung von Häm Fe<sup>2+</sup> in Protoporphyrin einbaut) codiert. Überraschend war, daß in Extrakten von Stämmen, in denen *cobS* und *cobT* amplifiziert worden waren, die CobST-Aktivität nicht signifikant zunahm<sup>[16, 75]</sup>.

Bislang sind die individuellen Funktionen von CobN und CobST bei der Katalyse nicht näher definiert worden. Bindungsstudien deuteten darauf hin, daß CobN eine Affinität für Hydrogenobyrinsäure-*a,c*-diamid und in geringerem Maße auch für das Co<sup>2+</sup>-Ion hat, während CobST eine reaktive SH-Gruppe und eine ATP-bindende Stelle aufweist<sup>[75]</sup>. Das letzte Merkmal stimmt gut mit der Gegenwart eines phosphatbinden-

den Motivs in der Sequenz von CobS überein, das auch in einer Reihe von ATP-bindenden Proteinen vorkommt<sup>[16, 76]</sup>. Sowohl Ferrochelatase<sup>[77]</sup> als auch Magnesiumchelatase<sup>[78]</sup>, die an der Häm- bzw. Chlorophyllsynthese beteiligt sind, verfügen bekanntlich über eine reaktive SH-Gruppe.

Für die strikte Abhängigkeit der Cobaltochelatase-Aktivität von hydrolysbarem ATP gibt es bisher keine Erklärung, obwohl es sich offensichtlich auch bei der Magnesiumchelatase um ein komplexes ATP-abhängiges Enzym handelt, das aus zwei voneinander trennbaren Komponenten aufgebaut ist<sup>[78]</sup>. Interessant ist, daß CobN mit Oli und BchH, zwei Proteinen, die möglicherweise an der Mg<sup>2+</sup>-Chelatisierung bei der (Bacterio)-Chlorophyll-Biosynthese beteiligt sind, 28 % bzw. 22 % Identität aufweist (Tabelle 2)<sup>[114, 115]</sup>. Im Gegensatz zur Ferrochelatase konnte Cobaltochelatase keine anderen Metalle als Cobalt verwenden. Außerdem bewies ein Vergleich der Affinitäten des Enzyms gegenüber Hydrogenobyrinsäure **12** und seinem *a,c*-Diamid **43** eindeutig, daß **43** das physiologische Substrat für die Chelatisierung ist<sup>[75]</sup>. Und schließlich gelang es, durch spektrophotometrische Beobachtung der unter anaeroben Bedingungen durchgeführten Reaktion nachzuweisen, daß der Co<sup>II</sup>-Komplex, Cob(II)byrinsäure-*a,c*-diamid **45**, und nicht etwa der Co<sup>III</sup>-Komplex **44**, als Reaktionsprodukt entsteht. Dadurch konnte sichergestellt werden, daß während der Cobaltinsertion insgesamt gesehen kein Wechsel der Oxidationsstufe stattfindet<sup>[75]</sup>.

#### 9.4. Die Reduktion von Cob(II)byrinsäure-*a,c*-diamid **45** zum Co<sup>I</sup>-Komplex **46** und dessen Adenosylierung

Die Pionierarbeiten in Bernhauers Gruppe<sup>[79]</sup> hatten ergeben, daß es während der B<sub>12</sub>-Biosynthese in *Pr. shermanii* bereits frühzeitig zu einer Anknüpfung der Adenosylgruppe als „oberem“ Liganden des Cobalts kommt. Aus Kulturen von *Ps. denitrificans* lassen sich fünf partiell amidierte Cobalcorrinoide (Di- bis Hexamide) isolieren, die alle in Form ihrer Adenosyldeivate **47** bis **48** (Schema 19) vorliegen<sup>[80]</sup>. Es scheint also, als arbeiteten die beiden Organismen auf dieselbe Art und Weise.

Es war bekannt<sup>[81]</sup>, daß die Adenosylierung von Cobalamin in Bakterien und eukaryotischen Zellen unter Beteiligung des sehr stark nucleophilen Co<sup>I</sup>-Corrinoids abläuft. Daher ging man davon aus, daß in *Ps. denitrificans* direkt nach der Insertion von Cobalt das Co(II)byrinsäure-*a,c*-diamid **45** auf enzymatischem Wege zum entsprechenden Co<sup>I</sup>-Derivat **46** reduziert wird. Diese Aktivität wurde durch die Verwendung zweier komplementärer Assays<sup>[82]</sup> nachgewiesen, die sich dadurch unterschieden, wie das äußerst labile Co<sup>I</sup>-Corrinoid **46** abgefangen wurde. Im ersten Assay wurde das Co<sup>I</sup>-Corrinoid durch radioaktive Iodesigsäure *in situ* alkyliert; im zweiten Assay wurde die Abfangreaktion enzymatisch von der Cob(I)alaminadenosyl-Transferase durchgeführt<sup>[83]</sup>. Mit Hilfe dieser Assays gelang die 6300fache Reinigung von Cob(II)byrinsäure-*a,c*-diamid-Reduktase bis zur Homogenität. Es handelt sich dabei um ein Dimer mit einer Molekülmasse von ungefähr 16000 pro Untereinheit. Man konnte weiterhin zeigen, daß es ein NADH-abhängiges Flavoprotein ist. Die Analyse seiner N-terminalen Sequenz ergab, daß das entsprechende Gen nicht auf einem der vier DNA-Fragmen-

te lokalisiert war, die für die Enzyme der Cobalamin-Biosynthese in *Ps. denitrificans* codieren.

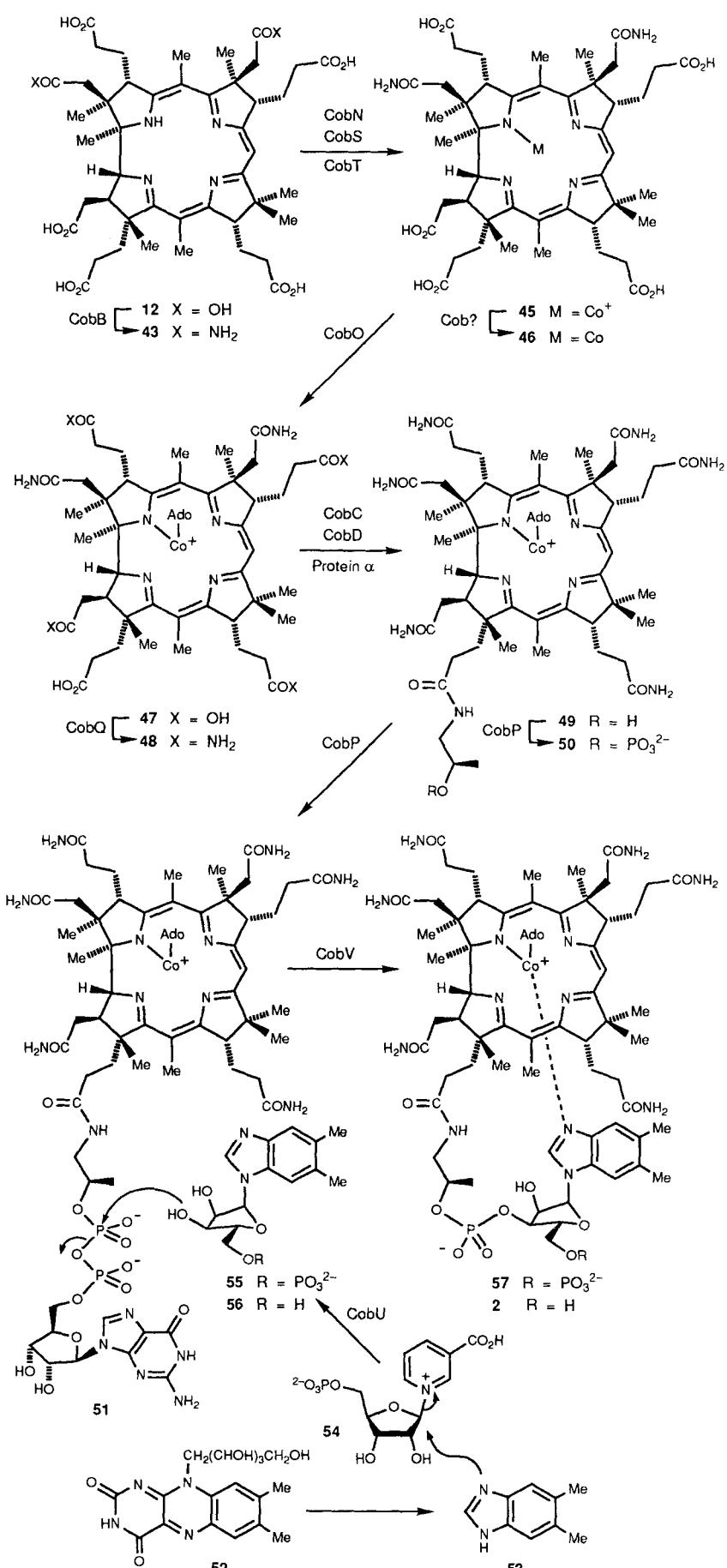
Das gereinigte Enzym katalysiert die Reduktion von Co<sup>II</sup> zu Co<sup>I</sup> in allen Co<sup>II</sup>-Corrinoiden, und zwar von Cob(II)byrinsäure-*a,c*-diamid **45** bis hin zu Cob(II)alamin (wie **1**). Sein Flavin-Cofaktor kann leicht abgespalten werden; das Enzym ist ohne zugefügtes Flavin völlig inaktiv. Der bevorzugte natürliche Cofaktor ist wahrscheinlich das Flavinmononucleotid (FMN), das eine doppelt so hohe Aktivität hat wie Flavinadenindinucleotid (FAD)<sup>[82]</sup>. Ganz ähnlich verhält sich die zuvor aus *C. tetanomorphum* partiell gereinigte Cob(II)alamin-Reduktase (EC 1.6.99.9)<sup>[84]</sup>. Daraus kann man schließen, daß sie die gleiche Funktion hat wie die Cob(II)byrinsäure-*a,c*-diamid-Reduktase in *Ps. denitrificans*.

Das adenosylierende Enzym aus *Ps. denitrificans* wurde ebenfalls gereinigt und charakterisiert<sup>[83]</sup>. Die Verfahren, die man bereits in *Pr. shermanii* und *C. tetanomorphum*<sup>[81]</sup> für das Assay der Cob(I)alamin-Adenosyltransferase-Aktivität (EC 2.5.1.17) eingesetzt hatte, wurden so verändert, daß man sie auch zur Beobachtung der Adenosylierung jeder corrinoiden Verbindung durch HPLC verwenden konnte. Als Ausgangsmaterial für die Reinigung wurde der Zellextrakt eines Stammes von *Ps. denitrificans* mit amplifiziertem *cobO*-Gen eingesetzt, da es über eine erhöhte Adenosylierungsaktivität verfügte. Das gereinigte Enzym, CobO, ist ein 27 kDa-Polypeptid und wird von *cobO* codiert. Es liegt dimer vor, und seine Substratspezifität ähnelt der von Cob(II)byrinsäure-*a,c*-diamid-Reduktase, d. h. also, daß die meisten Co<sup>I</sup>-Corrinoiden, nicht aber Cob(I)byrinsäure adenosyliert werden. Offensichtlich hat es lediglich eine Affinität für Corrinoiden, deren *a*- und/oder *c*-Acetat-Seitenketten amidiert sind. Damit stimmt überein, daß Hydrogenobyrinsäure-*a,c*-diamid das Enzym stark inhibiert und *in vivo* fest an CobO gebunden ist<sup>[85]</sup>. Die Anreicherung von Cobyrinsäure-*a,c*-diamid **44** durch CobO-Mutanten<sup>[83]</sup> (Tabelle 1) erhärtet die Vermutung, daß die wesentliche physiologische Funktion von CobO in der Adenosylierung von Cob(I)byrinsäure-*a,c*-diamid **46** zu Adenosylcobyrinsäure-*a,c*-diamid **47** besteht.

#### 9.5. Von Adenosylcobyrinsäure-*a,c*-diamid **47** zu Adenosylcobinamid **49**

Aus früheren Untersuchungen an *Pr. shermanii* wurden, was die Reihenfolge der Amidierungen der peripheren Carboxygruppen *b*, *d*, *e* und *g* sowie die Anknüpfung des (*R*)-1-Amino-2-propanols angeht, unterschiedliche Schlußfolgerungen gezogen<sup>[73]</sup>. Einige Autoren schlossen daraus, daß die Amidierungen nach einem bevorzugten, letztlich aber nicht verbindlichen Schema ablaufen und daß der Zeitpunkt der Einführung der (*R*)-1-Amino-2-propanol-Gruppe von den Kulturbedingungen abhängt; dagegen vermuteten andere Autoren, daß (*R*)-1-Amino-2-propanol erst nach Abschluß der sechs anderen Amidierungen eingebaut wird und daß die Amidierungen in einer genau festgelegten Sequenz ablaufen. Wohl gibt es Hinweise dafür, daß (*R*)-1-Amino-2-propanol aus L-Threonin<sup>[73]</sup> gebildet wird; jedoch ist in Vitamin-B<sub>12</sub>-produzierenden Organismen keine Threonin-Decarboxylase nachgewiesen worden.

Die unvollständig amidierten Cobalcorrinoide, die sich in wachsenden Zellen von *Ps. denitrificans* anreichern, wurden ge-



Schema 19. Der Biosyntheseweg von Hydrogenobyrinsäure **12** zu Coenzym B<sub>12</sub>. 2.

reinigt und als Adenosylcobysäure-*a,c*-diamid **47**, -triamid, tetraamid und -pentaamid sowie als Adenosylcobysäure **48** identifiziert. Nach Entfernung der Adenosylgruppe wurden HPLC-Analysen durchgeführt. Dabei fand man beträchtliche Mengen an Adenosylcobamid **49**, aber keine Cobinsäuren (die zwar über die Aminopropanolgruppe verfügen, denen aber einige oder alle primären Amidgruppen fehlen). Dieses Ergebnis läßt den Schluß zu, daß die Amidierungen vor der Einführung des (*R*)-1-Amino-2-propanols ablaufen<sup>[80]</sup>.

Zwischenzeitlich wurde entdeckt, daß Extrakte von *Ps.-denitrificans*-Stämmen, die ein Plasmid mit dem *cobQ*-Gen enthielten, Adenosylcobyrinsäure-*a,c*-diamid **47** amidieren konnten. Wie schon das vorhergehende amidierende Enzym CobB benötigte auch diese Aktivität Glutamin als Aminodonor sowie ATP/Mg<sup>2+</sup>. Das für die Aktivität verantwortliche Enzym wurde bis zur Homogenität gereinigt und anhand seiner N-terminalen Sequenz in der Tat als das Produkt des *cobQ*-Gens identifiziert<sup>[180]</sup>. Auch dieses Enzym liegt als Homodimer vor. Die Molekülmasse der Untereinheit beträgt ungefähr 57 000. Es katalysiert alle vier Amidierungen von Adenosylcobyrinsäure-*a,c*-diamid **47** bis zu Adenosylcobysäure **48**. Als Zwischenprodukte treten dabei das adenylierte Cobyrinsäuretriamid, tetraamid- und pentaamid auf. Corrinoide ohne Adenosylgruppe sind keine Substrate<sup>[180]</sup>. Bei der HPLC-Trennung der Zwischenstufen (nach Ersetzen der Adenosylgruppe durch Cyanid) beobachtete man pro Intermediat jeweils nur ein Signal. Das deutet darauf hin, daß dieses Enzym eine festgelegte Amidierungssequenz einhält<sup>[180]</sup>. Vielleicht überrascht nicht allzusehr, daß ein einziges Enzym in der Lage ist, die drei Propionatcarboxygruppen *b*, *d* und *e* zu amidieren; eine Überraschung ist aber sicher, daß dieses Enzym das vierte Propionat, nämlich *f*, nicht amidiert, wohl aber die verbleibende Acetatcarboxygruppe *g*. Ein Vergleich der CobB- und CobQ-Sequenzen zeigt in beiden Enzymen 22 % Aminosäureidentität. Dieser Befund führt zu der Vorhersage, daß das konservierte Cystein an Position 333 in CobQ der Rest des aktiven Zentrums ist, der an der kovalenten Katalyse beteiligt ist<sup>[174]</sup>.

Durch Ionenaustausch-HPLC fand man heraus, daß das Enzymsystem, das die Anknüpfung des Aminopropanols an die Adenosylcobysäure **48** in *Ps. denitrificans* katalysiert, aus zwei mit  $\alpha$  und  $\beta$  bezeichneten Komponenten besteht, die beide für das Erreichen der Gesamtaktivität erforderlich sind<sup>[85]</sup>. Die Reaktion ist von ATP/Mg<sup>2+</sup> und (*R*)-1-Amino-2-propanol ( $K_m$  20 mM) abhängig; mit

(S)-1-Amino-2-propanol oder Threonin wurde keine Aktivität beobachtet. Das Enzym ist spezifisch für Adenosylcobyrinsäure **48** ( $K_m$  1.6 μM), nur wenig aktiv gegenüber Adenosylcobyrinsäure-repentaamid (20% der Kontrolle) und inaktiv gegenüber den Tetra-, Tri- oder Diamiden. Das Protein  $\alpha$  wurde 50 000 fach bis zur Homogenität gereinigt; es handelt sich um ein 39 kDa-Polypeptid, dessen N-terminale Sequenz auf keinem der vier DNA-Fragmente aus *Ps. denitrificans* zu finden ist, die für die Enzyme der B<sub>12</sub>-Biosynthese codieren. Das Protein  $\beta$ , das 1000fach gereinigt wurde, erwies sich als Teil eines großen Multiproteinkomplexes mit einer Molekülmasse > 1 MDa, der auf keiner Gelpermeations-FPLC-Säule zurückgehalten werden konnte.

Von Cob-Mutanten aus *A. tumefaciens* und *Ps. putida*, die entweder bezüglich *cobC* oder *cobD* blockiert sind, wußte man, daß sie Adenosylcobyrinsäure **48** (Tabelle 1) anreichern. Das zeigt, daß die Produkte der *cobC*- und *cobD*-Gene Teile des Enzymsystems sind, das die Anknüpfung von Aminopropanol bewirkt<sup>[13]</sup>. Um diese Schlußfolgerungen zu untermauern, wurden zwei *E. coli*-Stämme konstruiert, die entweder *cobC* allein oder *cobC* und *cobD* zusammen exprimierten<sup>[186]</sup>. Die Extrakte aus dem *cobCD*-Stamm verfügten nur dann über die Aktivität zur Anknüpfung von Aminopropanol, wenn sie mit dem Protein  $\alpha$  supplementiert wurden. Das läßt darauf schließen, daß das Protein  $\beta$  wahrscheinlich aus CobC und CobD aufgebaut wird. Extrakte des Stammes, der CobC exprimiert, zeigten keine Aktivität, wenn sie unter denselben Bedingungen geprüft wurden<sup>[185]</sup>. Übereinstimmend mit diesen Resultaten fand man in Zellextrakten eines Stammes von *Ps. denitrificans*, der die *cobABCD*-Gene überexprimiert, eine zehnmal so hohe Menge an Protein  $\beta$  wie im Elternstamm. Genetische Studien geben Hinweise darauf, daß auch in *Salmonella typhimurium*<sup>[145]</sup> drei Gene an der Addition der Aminopropanol-Seitenkette beteiligt sind.

## 10. Von Adenosylcobinamid **49** zu Coenzym B<sub>12</sub> 2: Aufbau der Nucleotidschleife

Der Zusammenbau der Nucleotidschleife ist die letzte Stufe auf dem Weg zu Coenzym B<sub>12</sub>. In *Pr. shermanii* geschieht dies in einem vierstufigen Prozeß<sup>[87]</sup>. Wahrscheinlich liegen auch in diesem Organismus alle Intermediate in ihrer adenylierten Form vor<sup>[79]</sup>. Allerdings wurden die Verbindungen in vielen frühen Untersuchungen erst nach Entfernung dieser labilen Gruppe identifiziert. Kürzlich jedoch konnte die adenylierte Form von Cobyrinsäure-*a,c*-diamid **47** aus diesem Organismus isoliert und identifiziert werden<sup>[88]</sup>. Die erste Stufe besteht in der Phosphorylierung der Hydroxygruppe des (*R*)-1-Amino-2-propanol-Restes des Adenosylcobinamids **49** mit ATP unter Bildung von Adenosylcobinamidphosphat **50** (Schema 19). Transfer der Guanosylmonophosphat(GMP)-Einheit aus einem Molekül des entsprechenden Triphosphats(GTP) ergibt Adenosyl-GDP-cobinamid **51**. Bei der Addition von  $\alpha$ -Ribazol-5'-phosphat **55** an Adenosyl-GDP-cobinamid erhält man, wiederum unter Verlust der GMP-Gruppe, das Adenosylcobalamin 5'-phosphat **57**. Durch Dephosphorylierung dieses 5'-phosphats kommt man schließlich zu Adenosylcobalamin **2**. Bemerkenswert ist die Notwendigkeit einer Verzweigung des Hauptbiosyntheseweges für die Synthese von  $\alpha$ -Ribazol 5'-phosphat **55**, das man allerdings nur für die Biosynthese von Coenzym B<sub>12</sub> benötigt.

tigt. Methoden zur Synthese der Cyaniformen dieser Corrinoid-Zwischenstufen sind beschrieben worden<sup>[89]</sup>.

Vor unseren kürzlich durchgeföhrten Arbeiten waren nur wenige Untersuchungen zu Enzymen dieses Teils des Biosyntheseweges bekannt. So war die genaue Zahl von Enzymen und Genen, die man braucht, um von Cobinamid zu Coenzym B<sub>12</sub> zu gelangen, unbekannt. Unsere Untersuchungen begannen mit der Isolierung und Identifizierung der Zwischenprodukte in ihrer natürlichen adenylierten Form<sup>[90]</sup>.

### 10.1. Von Adenosylcobinamid **49** zu Adenosyl-GDP-cobinamid **51**

Aus den in Abschnitt 9.5 beschriebenen Untersuchungen standen uns Adenosylcobinamid **49** sowie eine HPLC-Methode für den Nachweis von Adenosylcorrinoiden zur Verfügung<sup>[23]</sup>. Damit gelang es, ein Assay für die ATP-abhängige Phosphorylierung von **49** zu entwickeln. Anschließend wurde die ganze Palette von Stämmen, die *cob*-Gene überexprimieren<sup>[91]</sup>, getestet. Dabei fand man heraus, daß die genetische Verstärkung des *cobP*-Gens die Cobinamid-Kinase-Aktivität, die man normalerweise in Zellextrakten antrifft, beträchtlich steigerte<sup>[90]</sup>. Dieses Ergebnis stand in Übereinstimmung mit Komplementationstudien, die zeigten, daß die Produktion von B<sub>12</sub> im Stamm G 642, einer Cob-Mutante, die Adenosylcobinamid **49** (Tabelle 1) akkumulierte, durch die Einführung eines *cobP* enthaltenden Plasmids wieder hergestellt wurde<sup>[91]</sup>. Gleichzeitig wurde Cobinamid-Kinase aus einem Stamm von *Ps. denitrificans*, der das gleiche Plasmid enthielt, bis zur Homogenität gereinigt. Die Kinase erwies sich als bifunktionales Enzym, das die Phosphorylierung und auch den nächsten Schritt, den Transfer der GMP-Gruppe von GTP, katalysierte. Dabei entsteht Adenosyl-GDP-cobinamid **51**<sup>[90]</sup>. Die Analyse der N-terminalen Sequenz des gereinigten Enzyms zeigte, daß es sich hier um das *cobP*-Genprodukt handelt<sup>[115]</sup>.

Damit gehörte nun auch CobP zur Familie der multifunktionalen Cob-Enzyme, zu der schon CobA, CobJ, CobF, CobL, CobB und CobQ zählen. Für ein bifunktionales Enzym ist es als Homodimer mit einer Molekülmasse von nur 19 442 pro Untereinheit überraschend klein. Viele ATP- oder GTP-bindende Proteine verfügen über zwei Consensus-Sequenzen, die die Bindungsstellen für die Nucleotidtriphosphate bilden; aber in CobP konnte für jedes dieser Substrate nur eine Region gefunden werden, die diesen Consensus-Sequenzen entsprach<sup>[90]</sup>. Das hervorstechendste Merkmal der katalytischen Eigenschaften von CobP war, daß GTP nicht nur das Substrat für die zweite, von CobP katalysierte Reaktion ist, sondern auch als Regulator der ersten Stufe fungiert. Es bindet mit hoher Affinität ( $K_D$  0.22 μM) und bewirkt dadurch eine Senkung der Affinität des Enzyms für sein ursprüngliches Substrat Adenosylcobinamid **49** von 11.5 μM auf 0.4 μM<sup>[90]</sup>.

Kürzlich durchgeföhrte genetische Untersuchungen bestätigten diese Befunde. Sie ergaben, daß ein Gen<sup>[91]</sup> aus *S. typhimurium*<sup>[145, 92]</sup> zu *cobP* homolog ist und daß das entsprechende Enzym für die gleichen beiden Schritte verantwortlich ist, die CobP katalysiert; außerdem scheint das *S. typhimurium*-Enzym eine weitere Funktion bei der Assimilierung des nicht-adenylierten Cobinamids zu erfüllen<sup>[93]</sup>.

## 10.2. Der $\alpha$ -Ribazol-Zweig des Biosyntheseweges

$\alpha$ -Ribazol **56** (Schema 19) ist ein atypisches Nucleosid, in dem die ungewöhnliche Base 5,6-Dimethylbenzimidazol (DMBI) **53** über eine N- $\alpha$ -glycosidische Bindung mit Ribose verknüpft ist. Nicotinatnucleotid:Dimethylbenzimidazol-Phosphoribosyltransferase, die auch als Trans-N-Glycosidase bekannt ist (EC 2.4.2.21), katalysiert die Bildung von  $\alpha$ -Ribazol-5'-phosphat **55** aus DMBI **53** und  $\beta$ -Nicotinat-mononucleotid **54**. Es wurde von Friedmann partiell aus *Pr. shermanii* gereinigt<sup>[94]</sup>. Erst kürzlich ist dieses Enzym aus einem rekombinanten Stamm von *Ps. denitrificans*, in dem das *cobU*-Gen verstärkt ist und der eine erhöhte Trans-N-Glycosidase-Aktivität aufweist, bis zur Homogenität gereinigt worden<sup>[17]</sup>. Und wieder liegt das Enzym als Homodimer vor; die Molekülmasse seiner Untereinheit beträgt 36 640. Aufgrund seiner N-terminalen Sequenz konnte man nachweisen, daß es sich bei dem gereinigten Protein um das Produkt des *cobU*-Gens handelt. Die Hydrolyse von  $\alpha$ -Ribazol-5'-phosphat **55**, die unter Bildung von  $\alpha$ -Ribazol **56** verläuft, wird in *Pr. shermanii* durch eine 5'-Phosphatase durchgeführt<sup>[95]</sup>; diese Aktivität ist auch in *Ps. denitrificans* vorhanden<sup>[17]</sup>.

DMBI **53** ist Bestandteil des Standardmediums, das in allen unseren Untersuchungen<sup>[9]</sup> für die Kultur von *Ps. denitrificans* verwendet wurde; deshalb haben wir seine Biosynthese an diesem Organismus nicht untersucht. Allerdings gelang Renz et al. die Umwandlung von Riboflavin **52** in DMBI mit rohen Zellextrakten aus *Pr. shermanii*<sup>[96]</sup>; mechanistische Aspekte dieser Transformation werden zur Zeit noch untersucht<sup>[96b]</sup>. Für Anaerobier ist dieser Biosyntheseweg allerdings unwahrscheinlich, da er molekularen Sauerstoff voraussetzt. Ein alternativer Weg ist für *Eubacterium limosum* vorgeschlagen worden<sup>[97]</sup>. Mutanten, in denen die Bildung von DMBI **53** blockiert ist, sind aus *S. typhimurium* isoliert worden<sup>[98]</sup>.

## 10.3. Von Adenosyl-GDP-cobinamid **51** zu Coenzym B<sub>12</sub> **2**

Das letzte Enzym des Biosyntheseweges überträgt die Adenosylcobinamidphosphat-Gruppe von Adenosyl-GDP-cobinamid **51** entweder auf das  $\alpha$ -Ribazol **56** oder sein 5'-Phosphat **55**. Dabei entsteht Adenosylcobalamin **2** oder sein 5'-Phosphat **57**. Da das Enzym als Substrat auch GDP-cobinamid akzeptiert, das keine Adenosylgruppe hat<sup>[17]</sup>, bezeichnete man es als Cobalamin(5'-phosphat)-Synthase. Diese wurde in einem *Ps.-denitrificans*-Stamm, der ein *cobV*-haltiges Plasmid enthielt, 90fach überexprimiert und anschließend 55fach gereinigt<sup>[17]</sup>. Zwar waren die am stärksten angereicherten Präparationen nicht homogen, bestanden aber offensichtlich aus einem löslichen Proteinkomplex hoher Molekülmasse, der aus sechs Proteinen zusammengesetzt war. Überexpression eines um 20 Codons gekürzten *cobV* in *E. coli* führte ebenfalls zu einem signifikanten Anstieg der Cobalamin(5'-phosphat)-Synthase-Aktivität<sup>[17]</sup>. Darüber hinaus werden die Mutationen zweier Cob-Mutanten, die GDP-cobinamid anreichern, durch ein Plasmid komplementiert, welches das *cobV*-Gen trägt (Tabelle 1)<sup>[12]</sup>. Obwohl der direkte Vergleich der Aminosäuresequenz des Enzyms mit der aus der Gensequenz vorhergesagten Sequenz bislang nicht möglich war, weisen doch alle diese Daten darauf hin, daß *cobV* für die Cobalamin(5'-phosphat)-Synthase codiert.

## 11. Die genetische Analyse der vier an der Cobalaminsynthese beteiligten Genorte aus *Ps. denitrificans*

Zwischen der Organisation der Gene (Abb. 1) und dem Abschnitt des Synthesewegs, auf dem ihre Produkte zur Anwendung gelangen, besteht eine gute Korrelation. Die Komplementationsgruppe C trägt *cobA*, das die erste Methyl-Transferase codiert. Anschließend codiert die Komplementationsgruppe A für diejenigen Enzyme, die an der Umwandlung von Präcorrin-2 **9** in Hydrogenobyrinsäure **12** beteiligt sind. Unter Mithilfe von CobS und CobT (den beiden einzigen Genen in Komplementationsgruppe B), die für die Insertion von Cobalt benötigt werden, bewirken die Produkte der Komplementationsgruppe C die Transformation von **12** in das Adenosyl-GDP-cobinamid **51**. Die Bildung von  $\alpha$ -Ribazolphosphat **55** sowie die letzte Stufe des Biosyntheseweges erfordern Enzyme, die durch die Komplementationsgruppe D codiert werden. Auch *Bacillus megaterium* hat vier Komplementationsgruppen<sup>[99]</sup>, wohingegen in *S. typhimurium* die meisten Gene ein Cluster um Minute 41 bilden<sup>[45]</sup>. Es ist durchaus beachtenswert, daß durch die genetischen und molekularbiologischen Untersuchungen dieser beiden Organismen allein keine größeren Fortschritte bei der Aufklärung der Biosynthesestufen erzielt werden konnten. Dazu waren – wie es dieser Übersichtsartikel hoffentlich verdeutlicht – zusätzlich die Beiträge aus chemischen und enzymologischen Untersuchungen vonnöten.

Nachdem die Sequenzen der 22 Cob-Proteine in *Ps. denitrificans* bekannt waren<sup>[13–17]</sup>, wurden auch die Sequenzen von *cob*-Genen anderer Bakterien beschrieben. Zu den Cob-Proteinen in *Ps. denitrificans* gibt es Homologe, die an der Cobalaminsynthese in *S. typhimurium*, *B. megaterium*, *Rhodococcus sp*, *Rhizobium meliloti* und *E. coli* beteiligt sind; die relevanten Gene und der Grad der Identität der Proteine sind in Tabelle 2 aufgelistet. Eine große Zahl von Genen, deren Produkte an der Cobalaminsynthese beteiligt sind, konnte in *S. typhimurium* kloniert und identifiziert werden<sup>[45]</sup>. Durch Vergleich der Proteinsequenzen mit denen von *Ps.-denitrificans*-Enzymen, deren Funktionen ja bereits bekannt sind, kam man dazu, ähnliche Funktionen für die *S.-typhimurium*-Proteine anzunehmen<sup>[45]</sup>. Man fand allerdings in *S. typhimurium* keine Homologe für die aus *Ps. denitrificans* bekannten Enzyme CobC, E, F, G, N, S, T und W. Und umgekehrt finden sich in *Ps. denitrificans* keine Homologe für drei Gene (CbiN, CbiQ und CbiO) in *S. typhimurium*, denen man eine Rolle beim Cobalttransport zuschreibt.

Für eine Cobalaminsynthese in *Escherichia coli* gibt es keinen Nachweis; der Organismus verwendet allerdings exogenes Cobinamid (**49** ohne die Adenosylgruppe), um daraus Coenzym B<sub>12</sub> **2** aufzubauen. Er hat Homologe zu den vier Proteinen CobA, CobO, CobU und CobV aus *Ps. denitrificans* (siehe Tabelle 2), sowie zu den entsprechenden vier Proteinen aus *S. typhimurium*. Der Identitätsgrad ist dabei recht hoch. Das Homologe von CobA, dem in *E. coli* CysG entspricht, katalysiert die Methylierung von Uro'gen III **7** zu Präcorrin-2 **9** sowie auch die anschließende, für die Synthese von Sirohäm<sup>[100]</sup> nötige Oxidation und Insertion von Eisen. Die Homologen der drei anderen Enzyme sind dagegen an der Assimilation des oben erwähnten nicht-adenosyierten Cobinamids beteiligt. Darüber hinaus weisen die Methyl-Transferasen (CobA, I, F, J, L, M und CysG) alle sowohl untereinander als auch zu Motiven, die in den meisten,

Tabelle 2. Die Gene der B<sub>12</sub>-Biosynthese in der Reihenfolge ihres Auftretens.

Enzym	<i>Ps. denitrificans</i> [18]		<i>S. typhimurium</i> Gen [45]	Ident. [a]	Organismus	andere Organismen		Ident. [a]
	Gen	Cluster				Gen	Organismus	
C-2,C-7-Methylase (SUMT) [105]	<i>cobA</i> [13]	C	<i>cysG</i> [107]	43.2	<i>Bacillus megaterium</i> <i>Escherichia coli</i> <i>Methanobacterium ivanovii</i>	<i>cobA</i> [108] <i>cysG</i> [100] <i>cobA</i> [109]	43.5 [b] 41.6 [c] 40.4 [b]	
C-20-Methylase (SP <sub>2</sub> MT) [106]	<i>cobI</i> [14]	A	<i>cblL</i>	32.2	<i>S. typhimurium</i>	<i>cysJ</i> [110]	24.1	
Präcorrin-3B-Synthase [55]	<i>cobG</i> [14]	A	—		<i>Anacystis nidulans</i>	<i>sir</i> [111]	26.1	
C-17-Methylase [55]	<i>cobJ</i> [14]	A	<i>cblH</i>	41.7	<i>Nicotiana tabacum</i>	<i>nir-1</i> [112]	23.6	
C-11-Methylase [55]	<i>cobM</i> [14]	A	<i>cblF</i>	41.1	<i>Rhodococcus sp</i>	<i>cobM</i> [113]	56.9 [b]	
C-1-Methylase [55]	<i>cobF</i> [14]	A	—					
Präcorrin-6A-Reduktase [30]	<i>cobK</i> [30]	A	<i>cblJ</i>	24.4	<i>Rhodococcus sp</i>	<i>cobK</i> [113]	49.0 [b]	
C-5,C-15-Methylase/C-12-De-carboxylase [39]	<i>cobL</i> [14]	A	<i>cblE</i>	31.9	<i>Rhodococcus sp</i>	<i>cobL</i> [113]	40.9 [b]	
			<i>cblT</i>	30.9				
C-11,C-12-Mutase [42]	<i>cobH</i> [14]	A	<i>cblC</i>	34.1				
Hby-a,c-Diamid-Synthase [71]	<i>cobB</i> [13]	C	<i>cblA</i>	32.0				
Cobalochelatase-Untereinheiten [75]	<i>cobN</i> [15]	C	—		<i>Antirrhinum majus</i> <i>Rhodobacter capsulatus</i>	<i>oli</i> [114] <i>bchH</i> [115]	28.0 21.7	
	<i>cobS</i> [16]	B	—					
	<i>cobT</i> [16]	B	—					
Cob(II)yrinsäure-a,c-diamid-Reduktase [82]	—	—	—					
Cob(I)alamin-adenosyl-Transferase [83]	<i>cobO</i> [15]	C	<i>cobA</i> [117]	41.4	<i>Escherichia coli</i>	<i>btuR</i> [116]	43.4 [c]	
Cobyrnsäure-Synthase [80]	<i>cobQ</i> [15]	C	<i>cblP</i>	43.7	<i>Methanococcus voltae</i>	ORF230 [d] [118]	45.8 [b]	
Cobinamid-Synthase-Untereinheiten [85]	<i>cobC</i> [13]	C	—		<i>S. typhimurium</i>	<i>hisC</i> [119]	24.9	
	<i>cobD</i> [13]	C	<i>cblB</i>	36.7				
	—	Protein $\alpha$	—					
Cobinamid-Kinase/Cobinamid-phosphat-Guanylyl-Transferase [90]	<i>cobP</i> [15]	C	<i>cobU</i>	40.6				
Cobalamin(5'-phosphat)-Synthase [17]	<i>cobV</i> [17]	D	<i>cobS</i>	34.4	<i>Escherichia coli</i>	<i>cobS</i> [120]	32.1 [c]	
Nicotinatnucleotid:DMBI-Phosphoribosyl-Transferase [17]	<i>cobU</i> [17]	D	<i>cobT</i>	22.1	<i>Escherichia coli</i> <i>Rhizobium meliloti</i>	<i>cobT</i> [120] ORF1-552 [d] [121]	27.5 [c] 96.2 [b]	
	<i>cobW</i> [15]	C	—		<i>Pseudomonas chlororaphis</i>	ORFP47K [d] [122]	25.8	
	<i>cobE</i> [13]	C	—					

[a] Prozentuale Aminosäure-Identität zwischen den Proteinen aus *S. typhimurium* oder anderen Organismen und dem homologen Protein in *Ps. denitrificans*. Die Proteinsequenzen des letztgenannten Organismus wurden mit folgenden Datenbanken verglichen: NBRF (Ausgabenummer 38), Swissprot (Ausgabenummer 27); PIR (Ausgabenummer 38) und EMBL (Ausgabenummer 37 einschließlich der Neueinträge bis Dezember 1993). Die Proteine mit den höchsten Identitäten wurden unter Verwendung des von Kanehisa entwickelten Programms (*Nucleic Acids Res.* 1984, 12, 203) mit denselben Parametern zusammengestellt (minimale Länge aufeinanderfolgender homologer Aminosäuren = 2, maximale Länge für Deletionen oder Insertionen = 25; positiver Wert für eine Insertion = 8; außer = 7 für CobN und BchH). [b] Protein aus einem anderen Organismus als *Ps. denitrificans* oder *S. typhimurium*, bei dem es sich wegen des hohen Identitätsgrades mit einem der Cob-Proteine aus *Ps. denitrificans* wahrscheinlich oder sicher um ein Cob-Protein handelt. [c] *E. coli*-Protein, das dieselbe Reaktion katalysiert wie die Homologen aus *Ps. denitrificans*, aber korrekterweise nicht als Cob-Protein bezeichnet werden kann, da nicht bekannt ist, ob *E. coli* Cobalamin synthetisiert. Es wandelt lediglich Präcorrin-2 (für die Bildung von Sirohäm) und exogenes Cobinamid in Adenosylcobalamin um. [d] ORF = Offenes Leseraster; ein Stück DNA an der betreffenden Position, das möglicherweise für ein Protein codiert; das entsprechende Protein wurde jedoch noch nicht charakterisiert.

wenn nicht allen SAM-abhängigen Methyl-Transferasen auftreten, ein gewisses Maß an Homologie auf<sup>[101]</sup>.

Durch Identifizierung der *cob*-Gene in *Ps. denitrificans* sind Untersuchungen zum Einfluß der Genamplifikation auf das Ausmaß der Cobalaminsynthese möglich geworden. In einem Stamm, der sonst nur geringe Mengen von Cobalamin produzierte, führte die Verstärkung eines Fragments, das die Gene von *cobF* bis *cobL* trägt, zu einem 30proz. Anstieg der Cobalaminsynthese; die Amplifikation von *cobA* und *cobE* ergab dagegen eine Verdopplung<sup>[18]</sup>. Diese Ergebnisse machen deutlich, wie effektiv sich gentechnische Verfahren zur Verbesserung von Stämmen einsetzen lassen, die für die industrielle Produktion von Verbindungen wie Vitamin B<sub>12</sub> verwendet werden.

## 12. Zusammenfassung und Ausblick

Bis Ende 1993 war es gelungen, alle Zwischenstufen des Biosyntheseweges von Uro'gen III 7 bis zu Coenzym B<sub>12</sub> 2 in *Ps. denitrificans* zu isolieren und in ihrer Struktur aufzuklären. Betrachtet man die Schemata 1, 18 und 19 zusammen, so wird das ganze Ausmaß dieses Weges ersichtlich. Darüber hinaus wurden

die Enzyme, die die einzelnen Stufen katalysieren<sup>[102]</sup>, charakterisiert und in den meisten Fällen bis zur Homogenität gereinigt. Auch die diesen Enzymen entsprechenden Gene sind alle bis auf zwei<sup>[103]</sup> identifiziert, sequenziert und überexprimiert worden. Noch vor fünf, sechs Jahren hätte sich niemand, der die Literatur über Vitamin B<sub>12</sub> verfolgte,träumen lassen, daß der Mount Everest „B<sub>12</sub>“ Ende 1993 bezwungen sein würde. Zwar ist das Hauptproblem gelöst, allerdings stehen die Antworten auf eine Reihe von Fragen noch aus:

A) Es gibt zwei weitere Gene, *cobE* und *cobW*<sup>[104]</sup>, die zwar für die B<sub>12</sub>-Produktion wesentlich sind, über deren Funktionen man aber bislang nichts weiß.

B) Zur Biosynthese von (R)-1-Amino-2-propanol und 5,6-Dimethylbenzimidazol müssen weitere Untersuchungen durchgeführt werden. Möglicherweise ist es in diesem Zusammenhang von Bedeutung, daß es acht weitere Gene gibt, die innerhalb der Gencluster B, C und D liegen, aber nicht als *cob*-Gene eingestuft wurden, weil Mutationen in ihnen die Synthese von Coenzym B<sub>12</sub> nicht verhindern. Vielleicht sind sie an der Biosynthese von Dimethylbenzimidazol oder an anderen, mit der B<sub>12</sub>-Biosynthese zusammenhängenden Aufgaben wie dem Transport von Cobalt oder B<sub>12</sub> oder auch der Bildung von Methylcobalamin beteiligt.

C) Es stehen noch Experimente aus, um den Mechanismus der biosynthetischen Transformationen zu überprüfen, bei denen es um mehr als eine einfache C-Methylierung geht (z.B. die Ringkontraktion); zudem fehlen für manche Zwischenstufen (z.B. für Präcorrin-8x) noch einige stereochemische Details.

D) Da es Unterschiede zwischen den Synthesewegen in *Ps. denitrificans* und anderen Organismen wie *Pr. shermanii* und *S. typhimurium* gibt, sollte herausgearbeitet werden, in welcher Beziehung die Zwischenstufen der beiden letztgenannten Organismen zu den aus *Ps. denitrificans* bekannten Intermediaten stehen.

E) Und schließlich öffnen unsere chemischen und genetischen Kenntnisse dieses Biosyntheseweges das Tor zu anderen, stärker biologisch orientierten Untersuchungen, z.B. zur Regulation des Biosyntheseweges.

Die Beantwortung all dieser Fragen bleibt anderen überlassen; denn die Arbeitsgruppen in Cambridge und Paris räumen, da sie ihr wesentliches Ziel – wie hier beschrieben – erreicht haben, das Feld. Es ist befriedigend zu sehen, daß der für das Studium der  $B_{12}$ -Biosynthese entwickelte Ansatz als Modell bei der Lösung anderer komplexer Biosyntheseprobleme dienen kann. Ein erster wichtiger Schritt besteht zweifellos darin, eine interdisziplinäre Arbeitsgruppe aufzubauen, die über besondere Kenntnisse in der Genetik, der Molekularbiologie, der Enzymologie, der Struktur- und Synthesechemie, der Isotopenmarkierung sowie der NMR-Spektroskopie verfügt. Wir freuen uns daher schon auf die Beschreibung von Biosynthesewegen weiterer komplexer Naturstoffe, die nach diesem Vorbild aufgeklärt werden.

*Herzlich danken wir all unseren Kollegen für ihre vielen wichtigen Beiträge zu den in diesem Übersichtsartikel dargestellten Untersuchungen. Dies sind in Paris L. Cauchois, S. Rigault, M.-C. Rouyez, C. Guillet, C. Robin, M. Couder, A. Famechon, M. Chenu, J.-C. Müller, L. Maton, D. Bisch, M. Danzer, B. Monogier, D. Frechet, F. Herman, F. Debu, M.-H. Beydon, M. Rose, L. Naudin und L. Louvel. In Cambridge sind es A. I. D. Alanine, S. Balachandran, K. Ichinose, F. Kiuchi, M. Kodera, Y. Li, S. M. Monaghan, A. R. Pitt, A. Prelle, N. P. J. Stamford, R. A. Vishwakarma und G. W. Weaver. Für finanzielle Unterstützung danken wir dem britischen Science and Engineering Research Council (SERC) sowie den Firmen Hoffmann La Roche, Roche Products, Zeneca, Leverhulme Trust und Rhône-Poulenc Rorer. Weiterhin geht unser Dank für stetige Unterstützung an J. Lunel, B. Brunie, A. Brun, M. Courtier, J.-F. Mayaux, P. E. Bost, J.-B. Le Pecq und J.-C. Brunie, an R. De Mot für die Überlassung von Ergebnissen vor der Veröffentlichung, an Prof. G. Müller, Stuttgart, für seine enthusiastische Zusammenarbeit sowie an ihn und Dr. C. Abell, Cambridge, für ihre wertvollen Diskussionsbeiträge.*

Ein eingegangen am 27. April 1994 [A 64]  
Übersetzt von Dr. Uwe Beifuss, Göttingen

- [1] J. P. Kusel, Y. H. Fa, A. L. Demain, *J. Gen. Microbiol.* **1984**, *130*, 835; F. Blanche, M. Couder, unveröffentlicht.
- [2] Übersicht: A. R. Battersby, F. J. Leeper, *Chem. Rev.* **1990**, *90*, 1261.
- [3] a) A. R. Battersby, E. McDonald in  $B_{12}$ , Vol. 1 (Hrsg.: D. Dolphin), Wiley, New York, **1982**, S. 107; b) A. R. Battersby, *Acc. Chem. Res.* **1986**, *19*, 147; c) *ibid.* **1993**, *26*, 15; d) A. I. Scott, *ibid.* **1990**, *23*, 308; *Angew. Chem.* **1993**, *105*, 1281; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1993**, *32*, 1223.

- [4] S. H. Ford, *Biochim. Biophys. Acta* **1985**, *841*, 306; A. A. Yeliseev, A. V. Pushkin, N. I. Zaitseva, Z. G. Evstigneeva, V. Ya. Bykhovsky, W. L. Kreto-vich, *ibid.* **1986**, *880*, 131.
- [5] Zwischenstufen, die auf dem Biosyntheseweg vor der Bildung des ersten Corrin-Makrocyclus auftreten, werden als Präcorrine bezeichnet. Die Namen der Präcorrine werden durch eine Ziffer ergänzt, die der Anzahl der C-Methylgruppen entspricht, die durch *S*-Adenosylmethionin (SAM) unter Bildung des jeweiligen Zwischenproduktes eingeführt werden. In Fällen, in denen zwei oder mehr Zwischenstufen dieselbe Anzahl von Methylgruppen aus SAM haben, unterscheidet man sie zusätzlich durch Buchstaben. Dabei steht A für die erste, B für die zweite usw. Zwischenstufe. In einigen Fällen werden die Buchstaben (x und y) nur vorläufig verwendet, bis der wahre Status einer Zwischenstufe geklärt ist, um auf diese Weise die korrekte Bezeichnung zu einem späteren Zeitpunkt noch zu ermöglichen. So wurde z. B. aus Präcorrin-6x dann Präcorrin-6A, und aus Präcorrin-6y wurde Präcorrin-6B. Für weitere Details siehe: H. C. Uzar, A. R. Battersby, T. A. Carpenter, F. J. Leeper, *J. Chem. Soc. Perkin Trans. 1* **1987**, 1689.
- [6] G. Müller, K. Hlineny, E. Savvidis, F. Zipfel, J. Schmidl, E. Schneider in *Chemical Aspects of Enzyme Biotechnology* (Hrsg.: T. B. Baldwin, F. M. Rus-hel, A. I. Scott), Plenum, New York, **1990**, S. 281; G. Müller, F. Zipfel, K. Hlineny, E. Savvidis, R. Hertle, U. Traub-Eberhard, A. I. Scott, H. J. Williams, N. J. Stolowich, P. J. Santander, M. J. Warren, F. Blanche, D. Thibaut, *J. Am. Chem. Soc.* **1991**, *113*, 9893.
- [7] S. Balachandran, R. A. Vishwakarma, S. M. Monaghan, A. Prelle, N. P. J. Stamford, F. J. Leeper, A. R. Battersby, *J. Chem. Soc. Perkin Trans. 1* **1994**, 487.
- [8] G. Müller, R. Deeg, K. D. Gneuss, G. Gunzer, H.-P. Kriemler in *Vitamin  $B_{12}$*  (Hrsg.: B. Zagalak, W. Friedrich), de Gruyter, Berlin, **1979**, S. 279.
- [9] B. Cameron, K. Briggs, S. Pridmore, G. Brefort, J. Crouzet, *J. Bacteriol.* **1989**, *171*, 547.
- [10] Die Bezeichnungen für Gene werden jeweils klein und kursiv geschrieben (z. B. *cobA*), die für Proteine (Enzyme) dagegen beginnen mit einem großen C und sind in normaler Schrift wiedergegeben (z. B. CobA).
- [11] D. E. Berg, C. M. Berg, *Bio/Technology* **1983**, *1*, 417.
- [12] J. Crouzet, unveröffentlicht.
- [13] J. Crouzet, L. Cauchois, F. Blanche, L. Debussche, D. Thibaut, M.-C. Rouyez, S. Rigault, J.-F. Mayaux, B. Cameron, *J. Bacteriol.* **1990**, *172*, 5968.
- [14] J. Crouzet, B. Cameron, L. Cauchois, S. Rigault, M.-C. Rouyez, F. Blanche, D. Thibaut, L. Debussche, *J. Bacteriol.* **1990**, *172*, 5980.
- [15] J. Crouzet, S. Lévy-Schil, B. Cameron, L. Cauchois, S. Rigault, M.-C. Rouyez, F. Blanche, L. Debussche, D. Thibaut, *J. Bacteriol.* **1991**, *173*, 6074.
- [16] B. Cameron, C. Guillet, F. Blanche, L. Cauchois, M.-C. Rouyez, S. Rigault, S. Lévy-Schil, J. Crouzet, *J. Bacteriol.* **1991**, *173*, 6058.
- [17] B. Cameron, F. Blanche, M.-C. Rouyez, D. Bisch, A. Famechon, M. Couder, L. Cauchois, D. Thibaut, L. Debussche, J. Crouzet, *J. Bacteriol.* **1991**, *173*, 6066.
- [18] J. Crouzet, B. Cameron, F. Blanche, D. Thibaut, L. Debussche in *Industrial Microorganisms: Basic and Applied Molecular Genetics* (Hrsg.: R. H. Baltz, G. D. Hegeman, P. L. Skatrud), ASM, Washington, DC, **1993**, S. 195.
- [19] F. Blanche, D. Thibaut, D. Frechet, M. Vuikhorgne, J. Crouzet, B. Cameron, K. Hlineny, U. Traub-Eberhard, M. Zboron, G. Müller, *Angew. Chem.* **1990**, *102*, 947; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1990**, *29*, 884.
- [20] B. Dresow, G. Schlingmann, L. Ernst, V. B. Koppenhagen, *J. Biol. Chem.* **1980**, *255*, 7637.
- [21] V. B. Koppenhagen in  $B_{12}$ , Vol. 2 (Hrsg.: D. Dolphin), Wiley, New York, **1982**, S. 105.
- [22] Wird Präcorrin-3A 10 sofort nach seiner Bildung eingesetzt, so kann es direkt als Substrat für enzymatische Umwandlungen in spätere Zwischenstufen des Biosyntheseweges dienen. Allerdings wird es leicht an der Luft oxidiert; wenn dies, wie so oft, geschieht, wird das daraus entstehende Didehydro-Derivat (ein Isobacteriochlorin) isoliert und in Form seines stabilen Esters aufbewahrt. Anschließende Hydrolyse der Estergruppen ergibt die Säure, die bei Inkubation mit dem vollständigen Enzymsystem aus *Ps. denitrificans* und NADH oder NADPH enzymatisch wieder zurück zu Präcorrin-3A reduziert wird. Dann können die auf Präcorrin-3A 10 folgenden Biosynthesestufen wieder normal ablaufen.
- [23] F. Blanche, D. Thibaut, M. Couder, J.-C. Müller, *Anal. Biochem.* **1990**, *189*, 24.
- [24] D. Thibaut, L. Debussche, F. Blanche, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1990**, *87*, 8795.
- [25] A. R. Battersby, C. Edington, C. J. R. Fookes, J. M. Hook, *J. Chem. Soc. Perkin Trans. 1* **1982**, 2265.
- [26] L. Ernst, *Liebigs Ann. Chem.* **1981**, 376.
- [27] D. Thibaut, F. Blanche, L. Debussche, F. J. Leeper, A. R. Battersby, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1990**, *87*, 8800.
- [28] Die Umwandlung eines Doppelbindungtautomers in ein anderes Tautomer ist für die makrocyclischen  $B_{12}$ -Zwischenstufen bekannt. So tritt eine Doppelbindung in Präcorrin-6A 16 eher zwischen N und C-9 als zwischen C-8 und C-9 auf. Im isolierten Ester 17 befindet sie sich mit Sicherheit zwischen C-8 und C-9. Die Bezeichnung Präcorrin-6A bezieht diese Tautomere jeweils

- mit ein. Das gilt auch für alle anderen Verbindungen in diesem Übersichtsartikel.
- [29] F. Blanche, M. Kodera, M. Couder, F. J. Leeper, D. Thibaut, A. R. Battersby, *J. Chem. Soc. Chem. Commun.* **1992**, 138.
- [30] F. Blanche, D. Thibaut, A. Famechon, L. Debussche, B. Cameron, J. Crouzet, *J. Bacteriol.* **1992**, 174, 1036.
- [31] Beispielsweise A. R. Battersby, E. McDonald, R. Neier, M. Thompson, *J. Chem. Soc. Chem. Commun.* **1979**, 960.
- [32] D. Thibaut, F. Kiuchi, L. Debussche, F. J. Leeper, F. Blanche, A. R. Battersby, *J. Chem. Soc. Chem. Commun.* **1992**, 139.
- [33] G. W. Weaver, F. J. Leeper, A. R. Battersby, F. Blanche, D. Thibaut, L. Debussche, *J. Chem. Soc. Chem. Commun.* **1991**, 976.
- [34] F. Kiuchi, D. Thibaut, L. Debussche, F. J. Leeper, F. Blanche, A. R. Battersby, *J. Chem. Soc. Chem. Commun.* **1992**, 306.
- [35] K. Ichinose, F. J. Leeper, A. R. Battersby, *J. Chem. Soc. Perkin Trans. 1* **1993**, 1213.
- [36] A. R. Battersby, E. McDonald, R. Hollenstein, M. Ihara, F. Satoh, D. C. Williams, *J. Chem. Soc. Perkin Trans. 1* **1977**, 166.
- [37] A. R. Battersby, C. Edington, C. J. R. Fookes, *J. Chem. Soc. Chem. Commun.* **1984**, 527; A. I. Scott, M. Kajiwara, P. J. Santander, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1987**, 84, 6616.
- [38] K. Ichinose, M. Kodera, F. J. Leeper, A. R. Battersby, *J. Chem. Soc. Chem. Commun.* **1993**, 515.
- [39] F. Blanche, A. Famechon, D. Thibaut, L. Debussche, B. Cameron, J. Crouzet, *J. Bacteriol.* **1992**, 174, 1050.
- [40] Zwar sind die Reaktionen, die auf dem Weg von Präcorrin-6B **19** zu Präcorrin-8x stattfinden, gut bekannt, doch konnte bislang noch keine Zwischenstufe nachgewiesen werden. Gegenwärtig gehen wir davon aus, daß sich das gesamte Geschehen am aktiven Zentrum des einzigen beteiligten Enzyms abspielt. Es ist denkbar, daß uns die Zukunft Aufschluß über die Reihenfolge der Reaktionen bringt. Zum jetzigen Zeitpunkt ist es daher am besten, die Bezeichnung Präcorrin-8x zu verwenden. Später kann das x entweder weggelassen oder durch den entsprechenden Großbuchstaben ersetzt werden.
- [41] Enzympräparationen von *Pr. shermanii* verhalten sich ähnlich. Zugefügte Cobyrinsäure **11** hemmt ihre eigene Bildung stark: S. Monaghan, H. C. Uzar, A. R. Battersby, unveröffentlicht.
- [42] D. Thibaut, M. Couder, A. Famechon, L. Debussche, B. Cameron, J. Crouzet, F. Blanche, *J. Bacteriol.* **1992**, 174, 1043.
- [43] D. Thibaut, F. Kiuchi, L. Debussche, F. Blanche, M. Kodera, F. J. Leeper, A. R. Battersby, *J. Chem. Soc. Chem. Commun.* **1992**, 982.
- [44] A. Eschenmoser, *Angew. Chem.* **1988**, 100, 5; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1988**, 27, 5.
- [45] J. Roth, J. G. Lawrence, M. Rubenfield, S. Kieffer-Higgins, G. Church, *J. Bacteriol.* **1993**, 175, 3303.
- [46] A. R. Battersby, M. G. Baker, H. A. Broadbent, C. J. R. Fookes, F. J. Leeper, *J. Chem. Soc. Perkin Trans. 1* **1987**, 2027.
- [47] S. Butt, S. M. Roberts, *Nat. Prod. Rep.* **1986**, 3, 489.
- [48] W. G. Whittingham, M. K. Ellis, P. Guerry, G. B. Henderson, B. Müller, D. A. Taylor, F. J. Leeper, A. R. Battersby, *J. Chem. Soc. Chem. Commun.* **1989**, 1116; B. Müller, A. N. Collins, M. K. Ellis, W. G. Whittingham, F. J. Leeper, A. R. Battersby *ibid.* **1989**, 1119.
- [49] N. P. J. Stamford, A. I. D. Alanine, A. R. Pitt, B. Cameron, J. Crouzet, A. R. Battersby, unveröffentlicht.
- [50] F. Blanche, S. Handa, D. Thibaut, C. L. Gibson, F. J. Leeper, A. R. Battersby, *J. Chem. Soc. Chem. Commun.* **1988**, 1117.
- [51] Beispielsweise A. I. Scott, H. J. Williams, N. J. Stolowich, P. Karuso, M. D. Gonzalez, F. Blanche, D. Thibaut, G. Müller, E. Savvidis, K. Hlineny, *J. Chem. Soc. Chem. Commun.* **1989**, 522.
- [52] D. Thibaut, L. Debussche, D. Frechet, F. Herman, M. Vuilhorgne, F. Blanche, *J. Chem. Soc. Chem. Commun.* **1993**, 513.
- [53] A. I. D. Alanine, K. Ichinose, D. Thibaut, L. Debussche, N. P. J. Stamford, F. J. Leeper, F. Blanche, A. R. Battersby, *J. Chem. Soc. Chem. Commun.* **1994**, 193.
- [54] S. Ofner, V. Rasetti, B. Zehnder, A. Eschenmoser, *Helv. Chim. Acta* **1981**, 64, 1431.
- [55] L. Debussche, D. Thibaut, B. Cameron, J. Crouzet, F. Blanche, *J. Bacteriol.* **1993**, 175, 7430.
- [56] F. Blanche, J. Crouzet, B. Cameron, D. Thibaut, unveröffentlicht.
- [57] L. Debussche, D. Thibaut, M. Danzer, F. Debu, D. Frechet, F. Herman, F. Blanche, M. Vuilhorgne, *J. Chem. Soc. Chem. Commun.* **1993**, 1100.
- [58] J. Ostrowski, J.-Y. Wu, D. C. Rueger, B. E. Miller, L. M. Siegel, N. M. Kredich, *J. Biol. Chem.* **1989**, 264, 15726.
- [59] G. Gisselmann, A. Niehaus, J. D. Schwenn, *Bot. Acta* **1992**, 105, 213.
- [60] A. I. Scott, C. A. Roessner, N. J. Stolowich, J. B. Spencer, C. Min, S.-I. Ozaki, *FEBS Lett.* **1993**, 331, 105.
- [61] C. Min, B. P. Atshaves, C. A. Roessner, N. J. Stolowich, J. B. Spencer, A. I. Scott, *J. Am. Chem. Soc.* **1993**, 115, 10380.
- [62] a) F. Blanche, D. Thibaut, L. Debussche, R. Hertle, F. Zipfel, G. Müller, *Angew. Chem.* **1993**, 105, 1704; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1993**, 32, 1651; b) T. E. Podschun, G. Müller, *ibid.* **1985**, 97, 63 bzw. **1985**, 24, 46.
- [63] K. Kurumaya, T. Okazaki, M. Kajiwara, *Chem. Pharm. Bull.* **1989**, 37, 1151.
- [64] A. I. Scott, N. J. Stolowich, B. P. Atshaves, P. Karuso, M. J. Warren, H. J. Williams, M. Kajiwara, K. Kurumaya, T. Okazaki, *J. Am. Chem. Soc.* **1991**, 113, 9891.
- [65] R. A. Vishwakarma, S. Balachandran, A. I. D. Alanine, N. P. J. Stamford, F. Kiuchi, F. J. Leeper, A. R. Battersby, *J. Chem. Soc. Perkin Trans. 1* **1993**, 2893.
- [66] S. Broers, A. Berry, D. Arigoni, unveröffentlicht; siehe dazu: *Ciba Found. Symp.* **1994**, 180, 280.
- [67] J. B. Spencer, N. J. Stolowich, C. A. Roessner, C. Min, A. I. Scott, *J. Am. Chem. Soc.* **1993**, 115, 11610.
- [68] *The Biosynthesis of Tetrapyrrole Pigments* (*Ciba Found. Symp.* **1994**, 180).
- [69] M. Kodera, F. J. Leeper, A. R. Battersby, *J. Chem. Soc. Chem. Commun.* **1992**, 435.
- [70] A. R. Battersby, M. G. Baker, H. A. Broadbent, C. J. R. Fookes, F. J. Leeper, *J. Chem. Soc. Perkin Trans. 1* **1987**, 2027.
- [71] L. Debussche, D. Thibaut, B. Cameron, J. Crouzet, F. Blanche, *J. Bacteriol.* **1990**, 172, 6239.
- [72] Die sieben Carboxy-Seitenketten von Cobyrinsäure oder verwandten corrinoiden Verbindungen werden im Uhrzeigersinn, beginnend bei der Acetat-Seitenkette an C-2, mit den Buchstaben *a* bis *q* bezeichnet.
- [73] H. C. Friedmann, L. M. Cagen, *Annu. Rev. Biochem.* **1970**, 24, 159.
- [74] H. Zalkin, *Adv. Enzymol. Relat. Areas Mol. Biol.* **1993**, 66, 203.
- [75] L. Debussche, M. Couder, D. Thibaut, B. Cameron, J. Crouzet, F. Blanche, *J. Bacteriol.* **1992**, 174, 7445.
- [76] J. E. Walker, M. Sarastre, M. J. Runswick, N. J. Gay, *EMBO J.* **1982**, 8, 945.
- [77] R. Labbe-Bois, *J. Biol. Chem.* **1990**, 265, 7278.
- [78] C. J. Walker, J. D. Weinstein, *Plant Physiol.* **1991**, 95, 1189; *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1991**, 88, 5789.
- [79] K. Bernhauer, F. Wagner, H. Michna, P. Rapp, H. Vogelmann, *Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem.* **1968**, 349, 1297.
- [80] F. Blanche, M. Couder, L. Debussche, D. Thibaut, B. Cameron, J. Crouzet, *J. Bacteriol.* **1991**, 173, 6046.
- [81] R. O. Brady, E. G. Castanera, H. A. Barker, *J. Biol. Chem.* **1962**, 237, 2325; E. Vitols, G. A. Walker, F. M. Huennekens, *ibid.* **1966**, 241, 1455.
- [82] F. Blanche, L. Maton, L. Debussche, D. Thibaut, *J. Bacteriol.* **1992**, 174, 7452.
- [83] L. Debussche, M. Couder, D. Thibaut, B. Cameron, J. Crouzet, F. Blanche, *J. Bacteriol.* **1991**, 173, 6300.
- [84] F. M. Huennekens, K. S. Vitols, K. Fujii, D. W. Jacobsen in *B<sub>12</sub>*, Vol. 1 (Hrsg.: D. Dolphin), Wiley, New York, **1982**, S. 145; G. A. Walker, S. Murphy, F. M. Huennekens, *Arch. Biochem. Biophys.* **1969**, 134, 95.
- [85] F. Blanche, L. Debussche, A. Famechon, D. Thibaut, unveröffentlicht.
- [86] B. Cameron, J. Crouzet, unveröffentlicht.
- [87] H. C. Friedmann in *Cobalamin* (Hrsg.: B. M. Babior), Wiley, New York, **1975**, S. 75.
- [88] F. Kiuchi, F. J. Leeper, A. R. Battersby, unveröffentlicht.
- [89] H. C. Friedmann, *J. Biol. Chem.* **1968**, 243, 2065; R. A. Ronzio, H. A. Barker, *Biochemistry* **1967**, 6, 2344.
- [90] F. Blanche, L. Debussche, A. Famechon, D. Thibaut, B. Cameron, J. Crouzet, *J. Bacteriol.* **1991**, 173, 6052.
- [91] Dieses Gen in *S. typhimurium* ist als *cobU* bezeichnet worden; es ist nicht identisch mit *cobU* in *Ps. denitrificans*.
- [92] G. A. O'Toole, M. R. Rondon, J. C. Escalante-Semerana, *J. Bacteriol.* **1993**, 175, 3317.
- [93] G. A. O'Toole, J. C. Escalante-Semerana, *J. Bacteriol.* **1993**, 175, 6328.
- [94] H. C. Friedmann, *J. Biol. Chem.* **1965**, 240, 413.
- [95] H. C. Friedmann, D. L. Harris, *J. Biol. Chem.* **1965**, 240, 406.
- [96] a) J. Horig, P. Renz in *Vitamin B<sub>12</sub>* (Hrsg.: B. Zagalak, W. Friedrich), de Gruyter, New York, **1979**, S. 323; b) B. Lingens, T. A. Schild, B. Vogler, P. Renz, *Eur. J. Biochem.* **1992**, 207, 981.
- [97] J. R. A. Vogt, L. Lamkin-Kolonko, P. Renz, *Eur. J. Biochem.* **1988**, 174, 637; J. R. A. Vogt, P. Renz, *ibid.* **1988**, 171, 655.
- [98] J. C. Escalante-Semerana, M. G. Johnson, J. Roth, *J. Bacteriol.* **1992**, 174, 24.
- [99] R. N. Brey, C. D. B. Banner, J. B. Wolf, *J. Bacteriol.* **1986**, 167, 623.
- [100] T. Peakman, J. Crouzet, J.-F. Mayaux, S. Busby, S. Mohan, R. Nicholson, J. Cole, *Eur. J. Biochem.* **1990**, 191, 315; J. B. Spencer, N. J. Stolowich, C. A. Roessner, A. I. Scott, *FEBS Lett.* **1993**, 335, 57.
- [101] D. Ingrosso, A. V. Fowler, J. Bleibaum, S. Clarke, *J. Biol. Chem.* **1989**, 264, 20131.
- [102] Möglicherweise existiert mit der Cobalamin-5'-Phosphatase ein weiteres, bislang nicht charakterisiertes Enzym des Hauptbiosyntheseweges. Da die Anknüpfung von  $\alpha$ -Ribazol **56** (wie auch seines 5'-Phosphats **55**) aber durch CobV katalysiert werden kann und so die folgende Phosphatase überflüssig ist, ist dies kein essentieller Teil des Biosyntheseweges.
- [103] Die beiden charakterisierten Enzyme, für die man die entsprechenden Gene noch nicht gefunden hat, sind die Cob(II)yrinsäure-*a,c*-diamid-Reduktase sowie das Protein  $\alpha$  des Aminopropanol anknüpfenden Systems.

- [104] CobW ist mit dem Produkt von P47K aus *Ps. chlororaphis* homolog (Tabelle 2; für diesen Hinweis danken wir A.-M. Crutz-Lecq). Das P47K-Protein scheint eine wichtige Funktion bei der Stabilisierung und/oder Reifung der Nitril-Hydratase zu übernehmen und ist möglicherweise an der Bindung des Metall-Ions an die Hydratase beteiligt. Deshalb ist denkbar, daß CobW bei der Bindung von Cobalt an CobN eine Rolle spielt.
- [105] F. Blanche, L. Debussche, D. Thibaut, J. Crouzet, B. Cameron, *J. Bacteriol.* **1989**, *171*, 4222.
- [106] D. Thibaut, M. Couder, J. Crouzet, L. Debussche, B. Cameron, F. Blanche, *J. Bacteriol.* **1990**, *172*, 6245.
- [107] J. Wu, L. Siegel, N. Kredich, *J. Bacteriol.* **1991**, *173*, 325.
- [108] C. Robin, F. Blanche, L. Cauchois, B. Cameron, M. Couder, J. Crouzet, *J. Bacteriol.* **1991**, *173*, 4893.
- [109] F. Blanche, C. Robin, M. Couder, D. Faucher, L. Cauchois, B. Cameron, J. Crouzet, *J. Bacteriol.* **1991**, *173*, 4637.
- [110] J. Ostrowski, N. Kredich, *J. Bacteriol.* **1989**, *171*, 130.
- [111] G. Gisselmann, J. Schwenn, *NBRF database* **1992**, S19860.
- [112] J. Kronenberg, A. Lepingle, M. Caboche, H. Vaucheret, *MGG Mol. Gen. Genet.* **1993**, *236*, 203.
- [113] R. de Mot, I. Nagy, G. Schoofs, J. Vanderleyden, *EMBL database* **1993**, L21196.
- [114] A. Hudson, R. Carpenter, S. Doyle, E. Coen, *EMBO J.* **1993**, *12*, 3711.
- [115] D. Burke, M. Alberti, G. Armstrong, J. Hearst, *EMBL database* **1991**, Z11165.
- [116] M. Lundrigan, R. Kadner, *J. Bacteriol.* **1989**, *171*, 154.
- [117] J. Escalante-Semerena, S. Suh, J. Roth, *J. Bacteriol.* **1990**, *172*, 273.
- [118] O. Possot, L. Sibold, J. P. Aubert, *Res. Microbiol.* **1989**, *140*, 355.
- [119] M. Carlomagno, L. Chiariotti, P. Alifano, A. Nappo, C. Bruni, *J. Mol. Biol.* **1988**, *203*, 585.
- [120] C. Collins, D. Gutman, J. Isaza, *EMBL database* **1993**, L25054.
- [121] K. Miller, M. McKinstry, W. Hunt, B. Nixon, *Mol. Plant Microbe Interact.* **1992**, *5*, 363.
- [122] M. Nishiyama, S. Horinouchi, M. Kobayashi, T. Nagasawa, H. Yamada, *J. Bacteriol.* **1991**, *173*, 2465.

## Seit diesem Jahr: Keywords in der „Angewandten“

Seit Januar 1995 werden zu jedem Beitrag Keywords gedruckt, die dann auch die Basis für das Stichwortjahresregister bilden. Autoren werden deshalb gebeten, ihre Manuskripte mit Keywords (zwischen Haupttext und Literaturverzeichnis) zu versehen und dabei folgende Punkte zu beachten:

1. Die Jahresregister in den Dezemberheften der vergangenen Jahre geben einen Eindruck von der Art der verwendeten Stichwörter.
2. Es sollten maximal fünf Keywords sein, darunter möglichst mehr allgemeine als spezielle (z. B. 2 + 1).
3. Bitte keine „Komma-Versionen“ verwenden, d.h. „chemische Sensoren“, nicht „Sensoren, chemisch“ als Stichwort.
4. Bitte „...verbindingen“ in Kombination mit Elementnamen verwenden, also „Eisenverbindungen“, „Bromverbindungen“ und nicht „Eisenkomplexe“.
5. Bitte Komplexe nach dem koordinierenden Atom („Komplexe mit Stickstoffliganden“) oder nach der koordinierenden Verbindung („Arenkomplexe“, „Carbenkomplexe“) klassifizieren, wenn die Eintragung unter dem Elementnamen nicht als ausreichend erachtet wird.

Die Redaktion wird sich bemühen, ein möglichst einheitlich gestaltetes Jahresregister sicherzustellen.