

Totalsynthese, Struktur und biologische Aktivität von Adenosylrhodibalamin, dem unnatürlichen Rhodiumhomologen von Coenzym B₁₂

Florian J. Widner, Andrew D. Lawrence, Evelyne Deery, Dana Heldt, Stefanie Frank,
Karl Gruber, Klaus Wurst, Martin J. Warren* und Bernhard Kräutler*

Professor Albert Eschenmoser zum 91. Geburtstag gewidmet

Abstract: B₁₂ ist ein einzigartiges Vitamin, da es nur von bestimmten Prokaryoten synthetisiert werden kann. Die Komplexität seiner Biosynthese resultiert aus der für biochemische Prozesse essenziellen Cobalt-Corrinstruktur, die dem Coenzym B₁₂ (AdoCbl) die Fähigkeit zur Katalyse enzymatischer Radikalreaktionen verleiht. Was macht aber gerade Cobalt so passend für seine Rolle in B₁₂-abhängigen Enzymen? Um dieser Frage nachzugehen, wurde Cobalt in AdoCbl gegen Rhodium ausgetauscht; hierfür wurde das Rh-Analog 5'-Desoxy-5'-adenosylrhodibalamin (AdoRbl) de novo mittels kombinierter biologischer und chemischer Totalsynthese hergestellt. AdoRbl zeigte keine Aktivität in einem mikrobiellen Methionin-Synthase-Bioassay *in vivo* und war ein In-vitro-Inhibitor einer AdoCbl-abhängigen Diol-Dehydratase. NMR-Analysen zeigten hohe Strukturähnlichkeit von AdoRbl mit AdoCbl. Beim Vergleich der Strukturen im Kristall wurde aber festgestellt, dass Rh^{III} besser in den Corrinring passt als Co^{III}, was Fragen zur gegenwärtigen Sicht über die Evolution der Corrine aufwirft.

Die biochemische Aktivität der biologischen Formen von B₁₂ basiert auf der zentralen Rolle des vom Corrinring gebundenen Cobaltzentrums.^[1] Warum aber ist Cobalt, im Unterschied zu anderen Metallen, so hervorragend für die Rolle in B₁₂ geeignet?^[1b] Diese schon früher gestellte Frage ist eine gewaltige Herausforderung.^[1,2] Um der „Cobalt-Frage“ auf den Grund zu gehen, wurde ein Austausch von Cobalt durch dessen schweres Gruppe-IX-Homologes Rhodium angestrebt. Die spezielle Eignung von Coenzym B₁₂ (5'-Desoxy-5'-adenosylcobalamin, AdoCbl; Abbildung 1) als katalytischer Radikalquelle über enzymkontrollierte homolytische Spaltung seiner Co-C-Bindung^[3] machte das Rh-Homologe 5'-

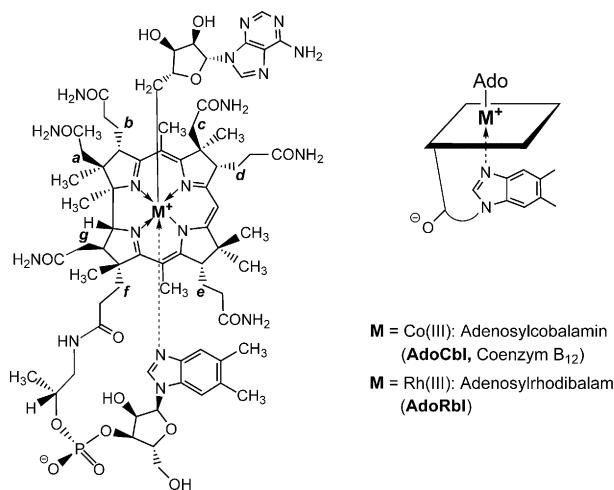


Abbildung 1. Strukturformeln von Coenzym B₁₂ (M = Co^{III}, AdoCbl) und 5'-Desoxy-5'-adenosylrhodibalamin (M = Rh^{III}, AdoRbl).

Desoxy-5'-adenosylrhodibalamin (AdoRbl) zu einem interessanten Synthesenzieiel. AdoRbl wurde zum ersten Mal in den 1970er Jahren über (metallfreies) Hydrogenobalamin hergestellt, das in niedriger Ausbeute in einer Cobalt-freien Chromatium-vinosum-Kultur zugänglich war, wurde damals aber nur unzureichend charakterisiert.^[2a] Da in der Vergangenheit verschiedene Alternativstrategien zur Herstellung von Metallanalogen natürlicher Corrinoide durch Entfernung von deren Cobalt-Ion keinen Erfolg hatten (siehe z. B. Lit. [4]), musste eine neue Strategie zur Herstellung von AdoRbl gefunden werden. Wir berichten hier über eine knappe Totalsynthese von AdoRbl mittels strategischer

[*] Dr. F. J. Widner, Prof. B. Kräutler

Institut für Organische Chemie und
Centrum für Molekulare Biowissenschaften (CMBI)
Universität Innsbruck
6020 Innsbruck (Österreich)
E-Mail: bernhard.kraeutler@uibk.ac.at

Dr. A. D. Lawrence, Dr. E. Deery, D. Heldt, Dr. S. Frank,
Prof. M. J. Warren
School of Biosciences, University of Kent
Canterbury, CT2 7NJ (Großbritannien)
E-Mail: M.J.Warren@kent.ac.uk

Prof. K. Gruber
Institut für Molekulare Biowissenschaften
Universität Graz (Österreich)

Dr. K. Wurst

Institut für Allgemeine, Anorganische und Theoretische Chemie
Universität Innsbruck (Österreich)

Dr. F. J. Widner
Derzeitige Adresse: Plant and Microbial Biology Department
University of California, Berkeley (USA)

Hintergrundinformationen (Experimentelles) und die Identifikationsnummer (ORCID) eines Autors sind unter <http://dx.doi.org/10.1002/ange.201603738> zu finden.

© 2016 Die Autoren. Veröffentlicht von Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA. Dieser Open Access Beitrag steht unter den Bedingungen der Creative Commons Attribution License, die jede Nutzung des Beitrages in allen Medien gestattet, sofern der ursprüngliche Beitrag ordnungsgemäß zitiert wird.

Kombination von biologischen und chemischen Syntheseschritten sowie über seine strukturellen und biologischen Eigenschaften. Die Frage „Warum nicht Rhodium?“ ergab auch neue Denkanstöße zur fundamentalen Problematik der evolutionären Selektion und Adaption des Corrinrings.

Für die Synthese von 5'-Desoxy-5'-adenosylrhodibalamin (AdoRbl) wurden komplementäre chemische und biologische Methoden entwickelt (Abbildung 2). Dazu wurde Hy-

trum von AdoRhbhd glich jenen der Dichloro- oder Dicyano-Rh^{III}-Analogen (Abbildung S1 der Hintergrundinformationen). Im ¹H-NMR-Spektrum von AdoRhbhd wies die metallgebundene Methylengruppe des 5'-Desoxyadenosyl-Liganden zwei charakteristische Multiplets im Hochfeldbereich auf, die den diastereotopen Protonen dieser CH₂-Gruppe zugeordnet wurden (Abbildung S2). Diese beiden Signale zeigten eine diagnostische 1.7-Hz-Kopplung mit ¹⁰³Rh ($I = 1/2$).

Das Rh-Analog von Adenosylcobyrinsäure-*a,c*-diamid wurde mithilfe des B₁₂-Biosynthetaseenzyms CobQ^[7] spezifisch an vier der verbleibenden fünf Carboxy-Seitenketten amidiert und so in Adenosylrhodi(III)byrsäure (AdoRhby) überführt (Abbildung 2). Tatsächlich verhielt sich AdoRhbhd als außerordentlich gutes Pseudosubstrat für CobQ und ergab AdoRhby in 92 % Ausbeute. Die regiospezifische Vierfach-Amidierung der peripheren Seitenketten wurde mit ESI-MS- und ¹H-NMR-Spektren bestätigt.

5'-Desoxy-5'-adenosylrhodibalamin (AdoRbl), das Rh-Analog von Coenzym B₁₂ (AdoCbl), wurde durch chemische Konjugation von AdoRhby mit dem B₁₂-Nukleotidteil hergestellt.^[1a,8] Dabei wurde AdoRhby mit 1-Ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)carbodiimid (EDC) aktiviert und mit dem B₁₂-Nukleotidteil zu orangerotem AdoRbl in einer Ausbeute von 79 % umgesetzt. Das UV/Vis-Spektrum von AdoRbl zeigte, wie bereits bekannt,^[2]

absorptionsmaxima bei $\lambda = 512$, 491 und 350 nm (Abbildung S1). Überraschenderweise hat das Spektrum von AdoRbl große Ähnlichkeit mit dem von Cyanocobalamin (Vitamin B₁₂) und unterscheidet sich signifikant vom Spektrum von Coenzym B₁₂ (AdoCbl). Wie schon früher beschrieben,^[2] ist AdoRbl, im Unterschied zum photolabilen AdoCbl, in aerober wässriger Lösung am Tageslicht stabil.^[9]

Im 500-MHz-¹H-NMR-Spektrum von AdoRbl in D₂O traten Signale aller C-gebundenen H-Atome auf, einschließlich der charakteristischen Dublett- und Tripletts-artigen Signale der Rh-gebundenen CH₂-Gruppe des Ado-Liganden (Abbildung 3). Dieser Befund steht im frappanten Gegensatz zum früher publizierten Spektrum von AdoRbl, in dem diese Signale nicht auftraten.^[2] Die Hochfeldsignale der diastereotopen Protonen H_AC5RL und H_BC5RL von AdoRbl entsprechen den Signalen von H_{re} und H_{si} im Spektrum von AdoCbl, sind aber um $\delta = 1.31$ ppm hochfeldverschoben. Die Molekülstruktur von AdoRbl im Kristall zeigt eine antiperiplanare Anordnung von HC4RL und H_{re} am C5RL, was analog die Zuordnung des Tripletts-artigen Signals von H_AC5RL zu H_{re} stützt. Mithilfe der ¹H-¹H-NOE-Daten (Abbildungen S3 und S4) konnten die „Base-on“-Konstitution

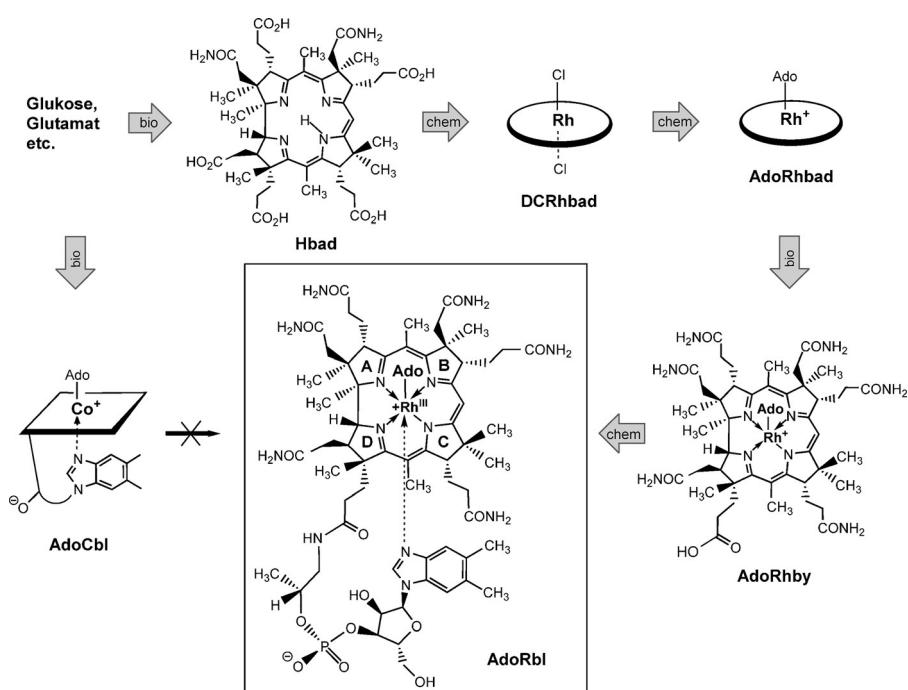


Abbildung 2. Totalsynthese von 5'-Desoxy-5'-adenosylrhodibalamin (AdoRbl) mittels enzymatischer Umwandlungen der AdoCbl-Biosynthese (bio) und chemischer Syntheseschritte (chem) in der Abfolge bio-chem-chem-bio-chem. AdoRbl kann nicht aus AdoCbl hergestellt werden.

drogenobyrinsäure-*a,c*-diamid (Hbad) in vivo mithilfe eines gentechnisch veränderten *E. coli*-Stamms de novo synthetisiert, der mit den zehn relevanten Genen (*cobA-I-G-J-M-F-K-L-H-B*) für die Biosynthese von B₁₂ aus dem endogenen Vorläufer Uroporphyrinogen III ausgestattet war.^[5] Aus 30 L Zellkultur wurden 88.2 mg Hbad erhalten. Rhodibyrinsäure-*a,c*-diamid wurde aus Hbad mittels chemischer Insertion von Rh^I hergestellt.^[6] Das zunächst isolierte orangefarbene Dicyanorhodi(III)byrsäure-*a,c*-diamid (CN₂-Rhbhd) (75 % Ausbeute) ließ sich nicht in Adenosylrhodi(III)byrsäure-*a,c*-diamid (AdoRhbhd) umwandeln. Die Isolierung des Rhodibyrinsäure-*a,c*-diamids als Dichlor-Rh^{III}-Corrinoid (DCRhbhd), das mit UV/Vis-Spektroskopie und Massenspektrometrie charakterisiert wurde, machte aber eine Weiterverarbeitung zu AdoRhbhd möglich. Die Reduktion von DCRhbhd mit Natriumborhydrid in anaerober Lösung führte zu einem hellgelben Rh^I-Corrinoid. Nach Zugabe von 5'-Desoxy-5'-iodadenosin (bei 0 °C, dann Raumtemperatur) erhielt man eine orangefarbene Reaktionslösung, aus der AdoRhbhd in 75 % Ausbeute isoliert wurde. Die Molekülformel von AdoRhbhd wurde anhand eines ESI-Massenpektrums bestätigt ($m/z [M^+] = 1230.3$). Das UV/Vis-Spektrum

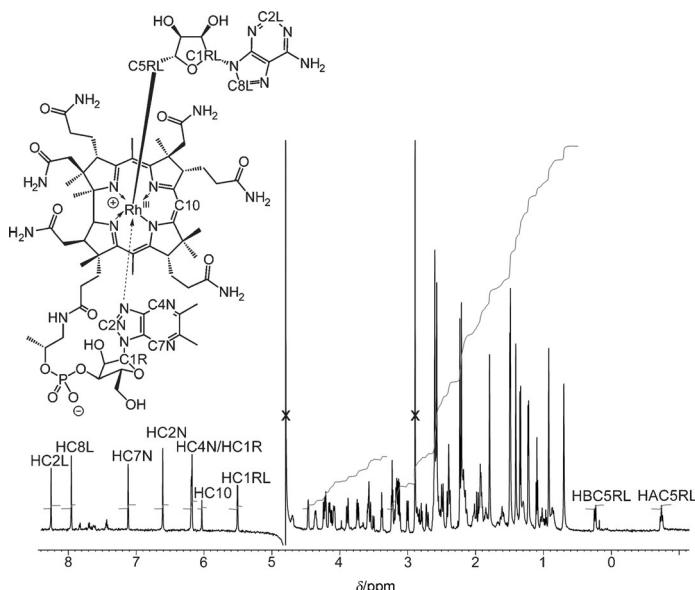


Abbildung 3. 500-MHz ^1H -NMR-Spektrum von AdoRbl (0.4 mM in D_2O , 10 mM Kaliumphosphat pH 7.4, 298 K, unterdrücktes HDO-Signal).

von AdoRbl und die Verknüpfung des 5'-Desoxyadenosylteils auf der β -Seite des Corrin-gebundenen Rh-Zentrums nachgewiesen werden. Die 2D-NMR-Daten lieferten chemische Verschiebungswerte (z.B. der Protonen der Seitenketten des Rings B; Tabellen S1–S3), die für AdoRbl und AdoCbl eine ähnliche Konformation des Corrinliganden und der axialen Gruppen anzeigen. AdoRbl und Coenzym B_{12} (AdoCbl)^[10] haben also in wässriger Lösung sehr ähnliche Strukturen.

AdoRbl kristallisierte als dunkelrote monokline Prismen (Raumgruppe $C2$, Nr. 5) aus Wasser/Acetonitril. Die Analyse der Kristalle von AdoRbl ergab eine hochauflöste Röntgenkristallstruktur, die erste eines Metallanalogs der Cobalamine. Sie bestätigte die aus NMR-Daten abgeleitete chemische Konstitution von AdoRbl und zeigte grob dieselben Strukturmerkmale wie die Struktur von AdoCbl^[11] (Abbildungen 4 und S6). Wie bei AdoCbl ist die Ado-Gruppe von AdoRbl über dem Ring C des Corrinrings positioniert. Allerdings ist sie im Fall von AdoRbl um 24° gegen den Uhrzeigersinn gedreht (Abbildung S7) und ist dort über eine für

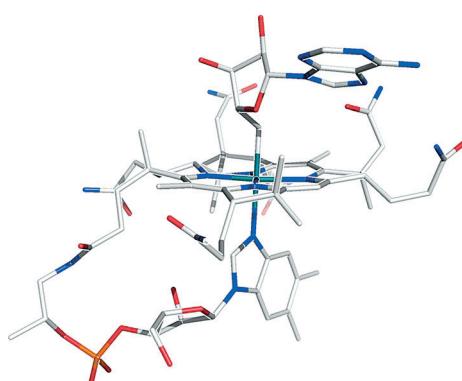


Abbildung 4. Stabmodell der Molekülstruktur von Adenosylrhodibamin (AdoRbl) im Kristall (C grau, N blau, O rot, P orange, Rh türkis). Details siehe Abbildungen S6–S8.

ein Cbl neuartige Dimerisierungs-Grenzfläche stabilisiert, die den Ado-Teil und beide Seitenketten des Rings B über H-Bindungen verknüpft (Abbildung S9). Die Ado-Gruppe von AdoRbl ist damit näher zum Ring B orientiert (verglichen zur Position in AdoCbl),^[11] und Ring B nimmt eine in Cbl unbekannte Konformation ein, wie unten weiter diskutiert.

Die biologische Aktivität von AdoRbl als AdoCbl-Analog wurde zunächst in einem mikrobiellen Methionin-Synthase(MetH)-Bioassay getestet,^[12] wie auch anschließend in einem direkten Enzymassay mit Propanediol-Dehydratase (PduCDE). Um die Aktivität von AdoRbl in MetH zu untersuchen, verwendeten wir einen *Salmonella-enterica-cobB-metE*-Reporterstamm, der für sein Wachstum in minimalem Medium auf exogenes Cbl angewiesen ist. Dabei spiegelt die Größe der Wachstumskreise auf den Agarplatten die aufgetragene Menge an Cbl logarithmisch wider (Abbildung 5).

Die Zugabe von AdoRbl alleine führte zu keinem Wachstum auf den Bioassayplatten. Nach dem Auftragen von AdoRbl in kurzer Entfernung zu einer identischen Menge CNCbl bildete sich eine Inhibitionszone um die

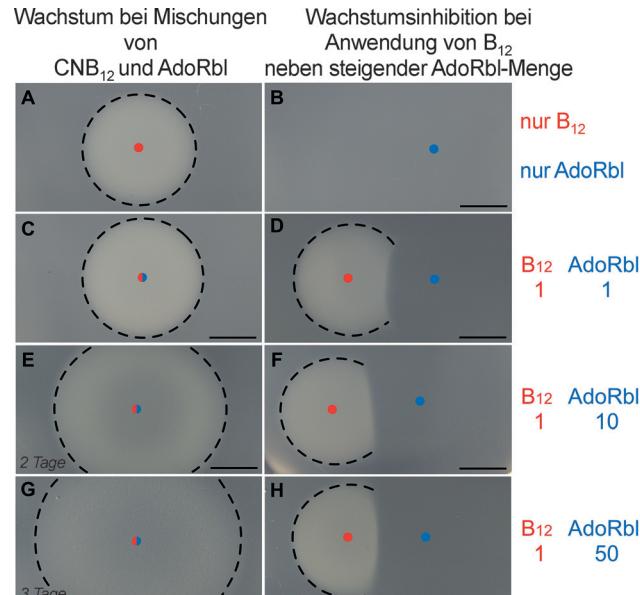


Abbildung 5. Mikrobieller Bioassay mit AdoRbl. Die Verwendung von Vitamin B_{12} (CNCbl) fördert das Wachstum des *S.enterica-cobB-metE*-Stamms (Feld A). Kein Wachstum nach Zugabe von AdoRbl allein (Feld B). Eine Mischung von AdoRbl und B_{12} (Felder C, E, G) verursacht vergrößerte, aber diffusere Wachstumskreise als bei CNCbl alleine. Zugabe von AdoRbl nahe der Auftragung von CNCbl resultiert in einer Inhibitionsszone, deren Intensität von der aufgebrachten Menge an AdoRbl abhängt (Felder D, F, H).

Stelle, an der AdoRbl aufgetragen wurde. Diese vergrößerte sich durch Erhöhung der AdoRbl-Konzentration (Abbildung 5). Unerwarteterweise kam es zur Bildung von größeren, aber diffusen Wachstumskreisen beim Auftragen einer Mischung von CNCbl und AdoRbl. Diese Befunde zeigen erstens, dass AdoRbl nicht in einen aktiven Cofaktor über-

führt wird, und zweitens, dass AdoRbl die Aufnahme von Cbl verhindert oder mit Cbl um die Bindungsstelle in MetH konkurriert und so als Inhibitor fungiert. Eine plausible Erklärung für die Vergrößerung der Wachstumskreise beim Mischen von CNCbl mit einem Überschuss an AdoRbl ist die Fähigkeit des Analogs, aktiv mit der Regulierung der Cbl-Aufnahme über einen B_{12} -RNA-Schalter^[13] zu wechselwirken. In *E. coli* und *S. enterica* reduziert der B_{12} -RNA-Schalter *btuB*^[13,14] nach Anlagerung seines hochaffinen Liganden AdoCbl und über eine Rückkopplungsregelung die Produktion des an der Außenmembran aktiven B_{12} -Transporters. Die vergrößerten Wachstumskreise lassen damit auf eine Reduktion der Aufnahme von Cbl durch AdoRbl schließen.

Die Wirkung von AdoRbl auf die Aktivität von AdoCbl-abhängigen Enzymen wurde am Beispiel der 1,2-Propandiol-Dehydratase von *Citrobacter freundii* analysiert (Abbildungen S10–S12). Die kinetischen Konstanten der Reaktion mit gereinigter 1,2-Propandiol-Dehydratase wurden mittels nichtlinearer Regression bestimmt. Mit AdoRbl als AdoCbl-Ersatz konnte keine Enzymaktivität festgestellt werden. Im Unterschied dazu war das Enzym mit AdoCbl aktiv und ergab $K_m = 3.0 \mu\text{M}$ und $k_{\text{cat}} = 358 \text{ s}^{-1}$ (basierend auf einer $\alpha_2\beta_2\gamma_2$ -Quartärstruktur). In weiterführenden Experimenten wurde gezeigt, dass AdoRbl wie auch Vitamin B_{12} kompetitive Inhibitoren des Enzyms sind, mit $K_i = 6.9 \mu\text{M}$ für AdoRbl und $2.5 \mu\text{M}$ für Vitamin B_{12} . Diese Befunde bestätigen, dass AdoRbl nicht in der Lage ist, die AdoCbl-abhängige Propandiol-Dehydratase-Reaktion zu katalysieren, und als Inhibitor dieses Enzyms wirkt.

Die biologischen Rollen von Cobalt^[15] wie auch der funktionellen Formen von B_{12} ^[16] scheinen gegenseitig weitgehend abhängig und bemerkenswert exklusiv zu sein. Die Frage, warum Cobalt und kein anderes Übergangsmetall in B_{12} gefunden wird, hat somit das Interesse an B_{12} -Metallanalogen geweckt. In diesem Zusammenhang kommt dem Gruppe-IX-Element Rhodium ein außerordentlicher Stellenwert zu. Wir haben deshalb 5'-Desoxy-5'-adenosylrhodobalamin (AdoRbl) synthetisiert, aufbauend auf einer strategischen Anwendung einer präzisen Sequenz biologischer und chemischer Schritte. Die erwartete große Strukturähnlichkeit von AdoRbl zu AdoCbl wurde durch Strukturanalysen in Lösung (NMR) und im Kristall bestätigt. Die Kristallstruktur von AdoRbl zeigte aber auch interessante Konsequenzen des Ersatzes von Co^{III} durch das größere Rh^{III} in AdoRbl auf. Wie aufgrund des um 0.06 \AA größeren Kovalenzradius von Rh^{III} erwartet, sind alle sechs Bindungen zum Metallzentrum von AdoRbl länger als bei AdoCbl. Bei genauerer Betrachtung sind die vier äquatorialen Bindungen aber um $0.082(5) \text{ \AA}$ verlängert, die axialen Bindungen nur um $0.035(5) \text{ \AA}$ (Abbildung 6).

Mit einem Faltungswinkel von rekordmäßig nur $5.9(2)^\circ$ ist außerdem der Corrinring von AdoRbl ungewöhnlich flach (vgl. 13.3° in AdoCbl; siehe Abbildungen 7, S8 und S9).^[18] Der Ring B von AdoRbl erfährt gegenüber den Strukturen von AdoCbl und anderer Cbl ebenfalls eine starke Einebnung und weist eine invertierte konformative Verdrillung auf. Die Acetamid- und Propionamidsubstituenten am Ring B sind nun beide in einer pseudo-äquatorialen Position angeordnet. In der Lösung nimmt der Ring B von AdoRbl aber dieselbe

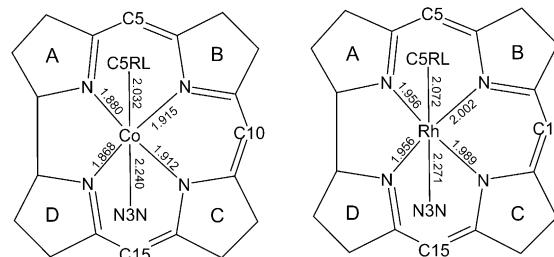


Abbildung 6. Vergleich von Kristallstrukturdaten von Adenosylrhodobalamin (AdoRbl) und Coenzym B_{12} (AdoCbl) anhand der Längen der Bindungen (in Å) zu Co^{III} in AdoCbl und zu Rh^{III} in AdoRbl.

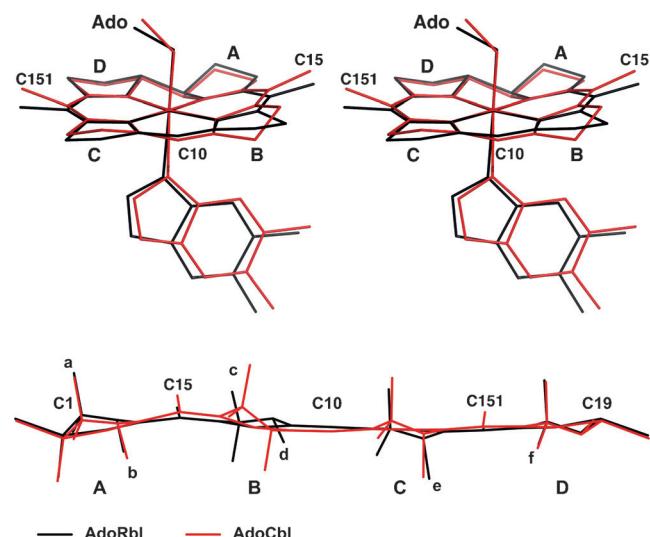


Abbildung 7. Vergleich der Molekülstrukturen von Adenosylrhodobalamin (AdoRbl, schwarze Linien) und Coenzym B_{12} (AdoCbl, rote Linien). Oben: Überlagerte Stereoansicht von AdoRbl und AdoCbl mit hervorgehobener Faltung des Corrinrings. Unten: Überlagerte Corrinringstrukturen von AdoRbl und AdoCbl in zylindrischer Projektion, welche die stärkere Faltung des Corrinliganden von AdoCbl (rot) gegenüber AdoRbl (schwarz) und die konformativen Inversionen von Ring B hervorheben (Kleinbuchstaben: Seitenketten, Großbuchstaben: Ringe des Corrinliganden). Siehe Hintergrundinformationen mehr Details.

Konformation ein wie der von AdoCbl,^[10] und es gibt keine Hinweise auf die im Kristall auftretende „invertierte“ Verdrillung. Tatsächlich ist der Ring B von AdoRbl damit wohl als flexibel einzuschätzen, und seine invertierte Konformation im Kristall ist der dort auftretenden Dimerisierung über H-Bindungen zu verdanken.

Der Vergleich der Strukturen von AdoRbl und AdoCbl zeigt erstaunlicherweise, dass das größere Rh^{III} -Ion besser in den Corrinliganden passt als das biologisch relevante Co^{III} -Ion. Eschenmoser und Kratky haben die fundamentalen strukturellen Konsequenzen von zu kleinen koordinierten Metallionen (z. B. Low-Spin- Ni^{II}) in Tetrapyrrolmakrocyclen untersucht.^[1a,19] Sie folgerten, dass eine Verkleinerung des Makrocyclus zu einer korrelierten konformativen Adaption der vier Pyrrolringe führt und so zu nicht planaren (sondern „sattelförmigen“) Porphyrinen. Ähnliche konformativen Effekte infolge der Anpassung des Koordinationsraums an das gebundene Metallion wurden in zahlreichen porphyrinoiden

Metallkomplexen beobachtet,^[20] wo der Einfluss der Porphyrindeformation auf die biologische Aktivität von Interesse ist.^[21]

Die Kristallstruktur von AdoRbl lässt darauf schließen, dass der Koordinationsraum des Corrinliganden ein wenig zu groß für die Koordination von Co^{III}-Ionen ist. Daraus resultiert sowohl die prägnante Faltung der natürlichen Co^{III}-Corrinoide (13.3° in AdoCbl) als auch die deutliche Verdrillung der Pyrrrolringe^[22] (Abbildung S8). Letztere ist im konformativ „in Phase“ verdrillten Ring B am deutlichsten.^[1a,22a] Im Unterschied dazu kommt es durch die Koordination des größeren Rh^{III}-Ions in AdoRbl, wie in der Kristallstruktur ersichtlich, zu einer konformativen Entspannung des Corrinliganden.

Die Natur hat die einzigartige „konstitutionelle Ringkontraktion“ des Corrinliganden^[1a,23] entwickelt, um den Koordinationsraum zu verkleinern und so Cobalt zu beherbergen.^[24] Die hier beschriebenen Untersuchungen deuten darauf hin, dass es noch zu einer zusätzlichen konformativen Adaption des Corrinliganden kommt, um ein Co^{III}-Ion zu binden. Die hier gemachte Entdeckung, dass Rh^{III} besser in den Corrinliganden passt als das biologisch relevante Co^{III}, lässt uns schließen, dass der Corrinligand von der Natur nicht primär für Co^{III} entworfen wurde. Da Rhodium kein essentielles Element für Leben auf der Erde ist,^[15] sollte unser Augenmerk der Wechselwirkung des Corrinringes mit Cobalt gewidmet sein, etwa mit seinen reduzierten Formen, Co^{II} und Co^I. AdoCbl und Cob(II)alamin weisen sehr ähnliche Cobaltcorrinstrukturen auf,^[25] doch bis heute gibt es keine kristallographischen Daten zur Struktur von Co^I-Corrinen (siehe z. B. Lit. [16a]). Es wurde berechnet, dass eine Vergrößerung des Koordinationsraums des Corrinliganden die Reduktion von Co^{III}- und von Co^{II}-Corrinen zu unterstützen vermag.^[26] Deshalb ist es naheliegend vorzuschlagen, dass der Corrinligand genau dem polarisierbaren Co^I-Ion angepasst ist, das ja das Reaktionszentrum der rätselhaften, „supernukleophilen“ Co^I-Corrine ist, und es stabilisiert.^[1b,16a,b,27] In Analogie zur Vorstellung, dass sich Enzyme zwecks Stabilisierung von Übergangszuständen und Absenkung der Aktivierungsenergie von Reaktionen entwickelt haben,^[28] wäre die vorgeschlagene Fähigkeit des Corrinliganden, den Co^I-Zustand gegenüber den Co^{III}- und Co^{II}-Formen zur stabilisieren, ein essentieller Aspekt für Reaktionen mit Co^I-Corrin-Zwischenprodukten,^[26,27,29] die ja in biologischer Umgebung sehr schwer zugänglich sind.^[14,29] Eine solche Fähigkeit hätte es ermöglicht, die Selektion der B₁₂-Struktur fein auf seine Rolle als essentieller, metallorganischer Katalysator in der präbiotischen Chemie des Lebens abzustimmen.^[30] Dies ist in Einklang mit dem Vorschlag, dass Cobaltcorrine bereits als uralte Cofaktoren fungiert haben.^[1a]

Das Rezept für die Biosynthese von Coenzym B₁₂ (AdoCbl) ist nur in den Genomen gewisser Prokaryoten kodiert.^[31] Durch seine Verwendung in einem gentechnisch veränderten *E. coli*-Stamm wurde ein effizienter biologisch-chemischer Syntheseweg zu AdoRbl zugänglich. AdoRbl wurde als strukturelles, aber nicht funktionelles Analog des B₁₂-Coenzymes AdoCbl charakterisiert. Die Inaktivität als Coenzym und die inhibitorische Wirkung des weitgehend isostrukturellen Rh-Analogs von AdoCbl lassen auf eine in-

effiziente Homolyse der Rh-C-Bindung des enzymgebundenen AdoRbl schließen. Die experimentelle Bestimmung der Stärke der Rh-C-Bindung (siehe Lit. [32]) wird Aufschluss über die Richtigkeit dieser Annahme geben.

Nachdem wir die fundamentale Frage „Warum Cobalt?“^[1] aufgegriffen haben, sollten wir nun vielleicht fragen: „Warum nicht Rhodium oder ein anderes Metall?“. Metallanaloga von Cobalaminen (Metbalamine) gelten, wie auch die Studie von AdoRbl gezeigt hat, als inaktive Cofaktoren. Tatsächlich wurde schon früher gezeigt, dass einige Metbalamine Bakterien-Wachstum hemmen.^[6] In geeigneter Weise strukturierte Metbalamine könnten also effektive B₁₂-Antimetaboliten oder „Antivitamine B₁₂“ sein,^[33] die im Hinblick auf kürzlich entdeckte neuartige biologische Funktionen von Cbl^[34] von wachsendem Interesse sein werden. Unser konzertierter biologisch-chemischer Synthesezugang zum „Rhodium-Problem“ hat ein neues Tor zur Herstellung von Metbalaminen und Metallocorrinoiden aufgestoßen, einem spannenden, doch kaum erforschten Gebiet im facettenreichen B₁₂-Feld.

Experimentelles

Allgemein: Siehe Hintergrundinformationen für Materialien, Instrumente, Bakterienstämme, die verwendet wurden, Konstruktion von Plasmiden, Details zu präparativen und enzymatischen Prozeduren, Spektroskopie und Röntgenkristallographie.

Röntgenstrukturanalyse: CCDC 1450631 (AdoRbl) enthält die ausführlichen kristallographischen Daten zu dieser Veröffentlichung. Die Daten sind kostenlos beim Cambridge Crystallographic Data Centre erhältlich.

Danksagung

Diese Arbeit wurde vom Österreichischen Wissenschaftsfonds (FWF-Proj. P-28892) und vom Biotechnology and Biological Sciences Research Council (BBSRC) (reference BB/K009249/1) unterstützt.

Stichwörter: Biosynthese · Cobalt · Totalsynthesen · Übergangsmetalle · Vitamin B₁₂

Zitierweise: Angew. Chem. Int. Ed. **2016**, *55*, 11281–11286
Angew. Chem. **2016**, *128*, 11451–11456

- [1] a) A. Eschenmoser, *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1988**, *27*, 5–39; *Angew. Chem.* **1988**, *100*, 5–40; b) J. M. Pratt in *Chemistry and Biochemistry of B₁₂* (Hrsg.: R. Banerjee), Wiley, New York, **1999**, S. 73–112.
- [2] a) V. B. Koppenhagen, B. Elsenhans, F. Wagner, J. J. Pfiffner, *J. Biol. Chem.* **1974**, *249*, 6532–6540; b) V. B. Koppenhagen in *B₁₂, Bd. 2, Biochemistry and Medicine* (Hrsg.: D. Dolphin), Wiley, New York, **1982**, S. 105–150.
- [3] a) J. Halpern, *Science* **1985**, *227*, 869–875; b) E. N. G. Marsh, C. L. Drennan, *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2001**, *5*, 499–505; c) B. T. Golding, W. Buckel, *Annu. Rev. Microbiol.* **2006**, *60*, 27–49; d) T. Toraya, *Cell. Mol. Life Sci.* **2000**, *57*, 106–127.
- [4] a) F. H. Zelder, C. Buchwalder, R. M. Oetterli, R. Alberto, *Chem. Eur. J.* **2010**, *16*, 6155–6158; b) N. J. Lewis, A. Pfaltz, A. Eschenmoser, *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1983**, *22*, 736–737; *Angew. Chem.* **1983**, *95*, 744–746; c) N. J. Lewis, R. Nussberger,

- B. Kräutler, A. Eschenmoser, *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1983**, 22, 736–737; *Angew. Chem.* **1983**, 95, 744–745.
- [5] E. Deery, S. Schroeder, A. D. Lawrence, S. L. Taylor, A. Seyedarabi, J. Waterman, K. S. Wilson, D. Brown, M. A. Geeves, M. J. Howard, R. W. Pickersgill, M. J. Warren, *Nat. Chem. Biol.* **2012**, 8, 933–940.
- [6] a) A. Eschenmoser, *Q. Rev. Chem. Soc.* **1970**, 24, 366–415; b) V. B. Koppenhagen, F. Wagner, J. J. Pfiffner, *J. Biol. Chem.* **1973**, 248, 7999–8002.
- [7] J. Crouzet, S. Levyschil, B. Cameron, L. Cauchois, S. Rigault, M. C. Rouyez, F. Blanche, L. Debussche, D. Thibaut, *J. Bacteriol.* **1991**, 173, 6074–6087.
- [8] a) W. Friedrich, G. Gross, K. Bernhauer, P. Zeller, *Helv. Chim. Acta* **1960**, 43, 704–712; b) R. B. Woodward in *Vitamin B₁₂, Proceedings of the Third European Symposium on Vitamin B₁₂ and Intrinsic Factor* (Hrsg.: B. Zagalak, W. Friedrich), Walter de Gruyter, Berlin, **1979**, S. 37.
- [9] L. A. I. Walker, J. J. Shiang, N. A. Anderson, S. H. Pullen, R. J. Sension, *J. Am. Chem. Soc.* **1998**, 120, 7286–7292.
- [10] M. F. Summers, L. G. Marzilli, A. Bax, *J. Am. Chem. Soc.* **1986**, 108, 4285–4294.
- [11] P. G. Lenhert, D. C. Hodgkin, *Nature* **1961**, 192, 937–938.
- [12] E. Raux, A. Lanois, F. Levillayer, M. J. Warren, E. Brody, A. Rambach, C. Thermes, *J. Bacteriol.* **1996**, 178, 753–767.
- [13] A. Nahvi, J. E. Barrick, R. R. Breaker, *Nucleic Acids Res.* **2004**, 32, 143–150.
- [14] K. Gruber, B. Puffer, B. Kräutler, *Chem. Soc. Rev.* **2011**, 40, 4346–4363.
- [15] J. J. R. F. da Silva, R. J. P. Williams, *The Biological Chemistry of the Elements*, Clarendon, Oxford, **1991**.
- [16] a) B. Kräutler, B. Puffer in *Handbook of Porphyrin Science*, Vol. 25 (Hrsg.: K. M. Kadish, K. M. Smith, R. Guilard), World Scientific, Singapur, **2012**, S. 131–263; b) K. L. Brown, *Chem. Rev.* **2005**, 105, 2075–2149; c) L. Randaccio, S. Geremia, N. Demitri, J. Wuerges, *Molecules* **2010**, 15, 3228–3259.
- [17] B. Cordero, V. Gomez, A. E. Platero-Prats, M. Reves, J. Echeverria, E. Cremades, F. Barragan, S. Alvarez, *Dalton Trans.* **2008**, 2832–2838.
- [18] L. Ouyang, P. Rulis, W. Y. Ching, G. Nardin, L. Randaccio, *Inorg. Chem.* **2004**, 43, 1235–1241.
- [19] C. Kratky, R. Waditschatka, C. Angst, J. E. Johansen, J. C. Plaquevent, J. Schreiber, A. Eschenmoser, *Helv. Chim. Acta* **1985**, 68, 1312–1337.
- [20] J. A. Shelnutt, X.-Z. Song, J.-G. Ma, S.-L. Jia, W. Jentzen, C. J. Medforth, *Chem. Soc. Rev.* **1998**, 27, 31–41.
- [21] M. O. Senge, S. A. MacGowan, J. M. O'Brien, *Chem. Commun.* **2015**, 51, 17031–17063.
- [22] a) C. Kratky, B. Kräutler in *Chemistry and Biochemistry of B₁₂* (Hrsg.: R. Banerjee), Wiley, New York, **1999**, S. 9–41; b) V. B. Pett, M. N. Liebman, P. Murray-Rust, K. Prasad, J. P. Glusker, *J. Am. Chem. Soc.* **1987**, 109, 3207–3215.
- [23] a) F. Blanche, B. Cameron, J. Crouzet, L. Debussche, D. Thibaut, M. Vuilhorgne, F. J. Leeper, A. R. Battersby, *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1995**, 34, 383–411; *Angew. Chem.* **1995**, 107, 421–452; b) S. J. Moore, R. Biedendieck, A. D. Lawrence, E. Deery, M. J. Howard, S. E. J. Rigby, M. J. Warren, *J. Biol. Chem.* **2013**, 288, 297–305; c) A. R. Battersby, *Nat. Prod. Rep.* **2000**, 17, 507–526.
- [24] K. P. Jensen, U. Ryde, *Coord. Chem. Rev.* **2009**, 293, 769–778.
- [25] B. Kräutler, W. Keller, C. Kratky, *J. Am. Chem. Soc.* **1989**, 111, 8936–8938.
- [26] M. Kumar, P. M. Kozlowski, *Chem. Commun.* **2012**, 48, 4456–4458.
- [27] T. C. Brunold, K. S. Conrad, M. D. Liptak, K. Park, *Coord. Chem. Rev.* **2009**, 293, 779–794.
- [28] W. P. Jencks, *Adv. Enzymol. Relat. Areas Mol. Biol.* **1975**, 43, 219–410.
- [29] a) R. G. Matthews, M. Koutmos, S. Datta, *Curr. Opin. Struct. Biol.* **2008**, 18, 658–666; b) M. S. St. Maurice, P. Mera, K. Park, T. C. Brunold, J. C. Escalante-Semerena, I. Rayment, *Biochemistry* **2008**, 47, 5755–5766.
- [30] a) A. Eschenmoser, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2011**, 50, 12412–12472; *Angew. Chem.* **2011**, 123, 12618–12681; b) G. A. Holliday, J. A. Thornton, A. Marquet, A. G. Smith, F. F. Rebeille, R. Mendel, H. L. Schubert, A. D. Lawrence, M. J. Warren, *Nat. Prod. Rep.* **2007**, 24, 972–987.
- [31] M. J. Warren, E. Raux, H. L. Schubert, J. C. Escalante-Semerena, *Nat. Prod. Rep.* **2002**, 19, 390–412.
- [32] I. Kobylanski, F. Widner, B. Kräutler, P. Chen, *J. Am. Chem. Soc.* **2013**, 135, 13648–13651.
- [33] B. Kräutler, *Chem. Eur. J.* **2015**, 21, 11280–11287.
- [34] a) M. Jost, J. Fernandez-Zapata, M. C. Polanco, J. M. Ortiz-Guerrero, P. Yang-Ting Chen, G. Kang, S. Padmanabhan, M. Elias-Arnanz, C. L. Drennan, *Nature* **2015**, 526, 536–541; b) K. Gruber, B. Kräutler, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2016**, 55, 5638–5640; *Angew. Chem.* **2016**, 128, 5728–5730; c) A. Peselis, A. Serganov, *Nat. Struct. Mol. Biol.* **2012**, 19, 1182–1184; d) J. E. Johnson, Jr., F. E. Reyes, J. T. Polaski, R. T. Batey, *Nature* **2012**, 492, 133–137; e) M. Bommer, C. Kunze, J. Fesseler, T. Schubert, G. Diekert, H. Dobbek, *Science* **2014**, 346, 455–458; f) K. A. P. Payne, C. P. Quezada, K. Fisher, M. S. Dunstan, F. A. Collins, H. Sjuts, C. Levy, S. Hay, S. E. Rigby, D. Leys, *Nature* **2014**, 517, 513–516.

Eingegangen am 18. April 2016
Online veröffentlicht am 29. Juni 2016