

ZUR STRUKTUR DER COBAMID-COENZYME ¹

Fritz Wagner und Paul Renz

Lehrstuhl für Biochemie der Technischen Hochschule
Stuttgart

(Received 21 November 1962)

Die Struktur des von Barker et al.² isolierten Cobalamin-Coenzym konnte durch Röntgenstrukturanalyse ermittelt³ und kürzlich durch Partialsynthese^{4,5} bestätigt werden. Keine dieser Methoden gestattet aber eine eindeutige Aussage darüber, ob der Corrinring in den Coenzym-Formen ebenso wie in den sonstigen Vitamin B₁₂-Derivaten 6 konjugierte Doppelbindungen enthält. Lenhert und Hodgkin³ wiesen bereits darauf hin, dass durch die Röntgenstrukturanalyse die Bindungsverhältnisse und die Anzahl der H-Atome im Corrinring des Cobalamin-Coenzym noch nicht exakt ermittelt werden konnten. Die Partialsynthese der Coenzym-Formen hat eine Reduktion des Co-Atoms zur Voraussetzung, wobei aber ungeklärt ist, ob dabei nicht auch das Corrinring-System erfasst wird. Ferner sind die Unterschiede in den Absorptionsspektren der Coenzym-Formen gegenüber denen der üblichen Vitamin B₁₂-Derivate so erheblich, dass es fraglich erscheint, ob sie nur durch die Liganden der Coenzym-Formen bedingt sein können.

¹ XV. Mitteilung über Synthesen auf dem Vitamin B₁₂-Gebiet.
XIV. Mitteilung siehe O.Müller und G.Müller,
Biochem.Z., im Druck

Wir suchen daher in der vorliegenden Mitteilung einen Beitrag zur Klärung der Frage zu liefern, ob das Corringgerüst in den Coenzym-Formen mit dem in den üblichen Vitamin B₁₂-Derivaten identisch ist. Eine Klärung dieser Frage versprechen wir uns einerseits von Untersuchungen über das Verhalten der Coenzym-Formen gegen Agentien, die für das Doppelbindungssystem der Corrinnoide charakteristische Reaktionen verursachen, und andererseits von der Durchführung der Partialsynthese der Coenzym-Formen in tritiumhaltigem Medium.

Die C₈-Position ist im Cobalamin gegenüber Oxydationsmitteln durch die in Allylstellung befindliche CN-Doppelbindung besonders aktiviert⁶. So erhält man aus Cyano-cobalamin in 0,1 n NaOH innerhalb 10 Minuten bei 100° unter Durchleiten von Luft in guter Ausbeute Cyano-dehydrocobalamin (I), neben etwas desamidierten Produkten. Bei der Oxydation von Cobalamin-Coenzym in alkalischem Medium mit Luft unter analogen Bedingungen wurde ein Teil des Cobalamin-Coenzym zu Hydroxo-cobalamin gespalten (ca.40%), das unter den Reaktionsbedingungen zu Dehydrocobalamin oxydiert wurde. Das aus der Reaktion isolierte Coenzym (ca.60%) war aber völlig intakt und enthielt kein Dehydrocobalamin-Coenzym,

² H.A.Barker, R.D.Smith, H.Weissbach, J.L.Toohy, J.N.Ladd and B.E.Volcani, J.Biol.Chem., 235, 480 (1960)

³ P.G.Lenhart and D.C.Hodgkin, Nature, 192, 937 (1961)

⁴ E.L.Smith, L.Mervyn, A.W.Johnson and N.Shaw, Nature, 194, 1175 (1962)

⁵ K.Bernhauer, O.Müller und G.Müller, Biochem.Z., 336, 102 (1962)

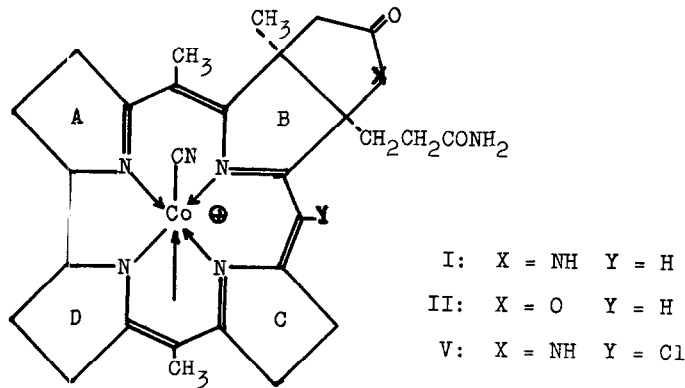
wie durch vergleichende Chromatographie mit authentischem Cobalamin-Coenzym und nach der KCN-Spaltung im Licht mit Cyano-cobalamin nachgewiesen wurde. Dehydrocobalamin-Coenzym konnte aus Hydroxo-dehydrocobalamin mit wachsenden Kulturen von *P.shermanii* in 15%iger Ausbeute erhalten werden. Es gelang auch auf diesem Weg Chlordehydrocobalamin-Coenzym aus Hydroxo-chlordehydrocobalamin in 20%iger Ausbeute zu gewinnen. Dagegen versagte die Herstellung dieser Produkte mit Hilfe von Aceton-Trockenpräparaten von *P.shermanii* unter den üblichen Versuchsbedingungen⁷. Auch die Dehydrierung von Co-Methyl-cobalamin war unter den Bedingungen, unter denen Cyano-cobalamin quantitativ dehydriert wird, nicht möglich. Die aus dem Reaktionsansatz isolierte Substanz (95 %) war mit dem Ausgangsprodukt identisch; nach der Lichtspaltung und Chromatographie in cyanidhaltigen Entwicklern⁸ konnte kein Cyano-dehydrocobalamin nachgewiesen werden. Ausserdem unterschied sich das zurückgewonnene Produkt eindeutig von Co-Methyl-dehydrocobalamin, das durch Reduktion von Hydroxo-dehydrocobalamin mit Zn/Essigsäure und anschliessende Umsetzung mit Dimethylsulfat hergestellt worden war.

Ein weiteres Beispiel für die Aktivierung der C₈-Position gegenüber Oxydationsmitteln ist die Bildung des Cobalamin-

⁶ R.Bonnett, J.R.Cannon, V.M.Clark, A.W.Johnson, L.F.J.Parker, E.L.Smith and A.R.Todd, J.Chem.Soc., 1957, 1158

⁷ J.Pawelkiewicz, B.Bartosinski und W.Walerych, Acta Biochim.Polon., 8, 131 (1962)

⁸ W.Friedrich und K.Bernhauer, Medizinische Grundlagenforschung, Band II, 668 (1959), G.Thieme Verlag, Stuttgart



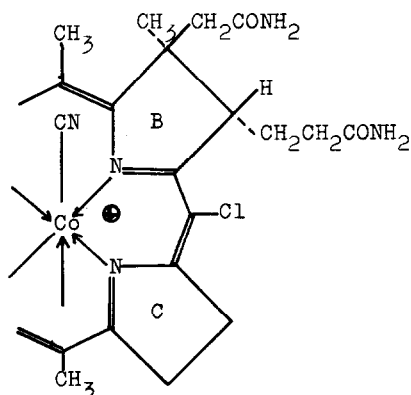
Partialstruktur der Corrinoid

γ -Lactons (II) durch Einwirkung von 1 Mol Chloramin T in 0,0025 m Salzsäure auf Cyano-cobalamin⁶. Wenn man unter den gleichen Versuchsbedingungen Cobalamin-Coenzym umsetzt, so entsteht eine lichtempfindliche Substanz (III), die sich elektrophoretisch bei pH 2,7, 7,5 und 11,0 wie Cobalamin-Coenzym verhält, sich jedoch chromatographisch eindeutig von diesem unterscheidet. Aufgrund des elektrophoretischen Verhaltens bei pH 7,5 und 11,0 kann mit Sicherheit die Bildung eines Lactons (II) ausgeschlossen werden. III gibt nach der KCN-Spaltung ein Derivat IV, das in wässriger Lösung in der Monocyanoform violettblau und in der Dicyanoform wie Chlordehydrovitamin B₁₂ (V) blau ist. IV kristallisiert in der Monocyanoform aus Wasser/Aceton, verhält sich elektrophoretisch wie Cyano-cobalamin und chromatographisch in den üblichen Entwicklersystemen⁸ einheitlich, jedoch nicht identisch mit II.

Lässt man auf Co-Methyl-cobalamin unter Lichtausschluss Chloramin T im Molverhältnis 1:1 einwirken, so erhält man

eine einheitliche, rotviolette Substanz (VI), die elektro-phoretisch bei pH 2,5 doppelt so schnell zur Kathode wandert wie Co-Methyl-cobalamin. Bei pH 7,5 und 11,0 verhält sich VI wie Cobalamin-Coenzym und Co-Methyl-cobalamin. Die bei der Lichtspaltung in Gegenwart von KCN aus VI entstehende Substanz ist mit IV chromatographisch, elektro-phoretisch und in ihrem Absorptionsspektrum identisch. Weiterhin kann man Cyano-cobalamin, V und IV durch ihre Spektren bei pH 7,5 in Gegenwart von 0,005 % HCN gut unterscheiden. Während Cyano-cobalamin unter diesen Bedingungen noch in der reinen Monocyanoforn vorliegt, wird IV zu ca. 50 % und V vollständig in die Dicyanoforn übergeföhrt. Die Absorptionsspektren der Chlorierungsprodukte III, IV und VI unterscheiden sich im Bereich von 400 bis 650 $m\mu$ von denen des Cobalamin-Coenzym, Cyano-cobalamins und Co-Methyl-cobalamins dadurch, dass die Absorptionsbanden der chlorierten Produkte in diesem Bereich jeweils um 25 $m\mu$ bathochrom verschoben sind. Dies spricht für eine Chlorsubstitution an der meso-Stellung zwischen Ring B und C des Corringerrüstes⁶, sodass wir dem Derivat IV die Struktur eines Cyano-chlorcobalamins zuschreiben können. Entsprechend handelt es sich bei III um Chlorcobalamin-Coenzym und bei VI um Co-Methyl-chlorcobalamin mit einem Cl-Atom am C₁₀ zwischen Ring B und C.

Zur weiteren Klärung der Struktur des Corringerrüstes in den "Coenzymformen" der Cobamide synthetisierten wir das Co-Methyl-cobalamin in tritiumhaltigem Reaktionsmedium. 5 mg Hydroxo-cobalamin wurden in 4 ml 3 %iger Essigsäure mit einem TOH-Gehalt von 391 μ C/ml gelöst und mit 200 mg Zn-Staub reduziert. Nach Zusatz von 0,2 ml Dimethylsulfat wurde das Reaktionsprodukt durch Phenolextraktion und anschliessende Chro-



Partialstruktur des Cyano-chlorcobalamins (IV)

matographie an einer CM-Cellulosesäule gereinigt. Um eventuell noch vorhandene auswaschbare Radioaktivität zu entfernen, wurde das erhaltene Co-Methyl-cobalamin noch fünfmal mit je 20 ml inaktivem Wasser aufgenommen und wieder zur Trockene eingengt. Das so erhaltene, reine Co-Methyl-cobalamin zeigte einen Einbau von 18,5 % der im Reaktionsmedium vorhandenen Radioaktivität⁹. Dieses tritiumhaltige Co-Methyl-cobalamin verliert nach der Lichtspaltung in Gegenwart von Luftsauerstoff zu Hydroxo-cobalamin die gesamte im Molekül vorhandene Radioaktivität. Um sicher zu sein, dass die Radioaktivität des Co-Methyl-cobalamins nicht doch von Austauschreaktionen kam, wurden 5 mg Hydroxo-cobalamin in demselben tritiumhaltigen Medium mit Zn-Staub reduziert, anschliessend mit KCN in Cyano-cobalamin übergeführt und durch Phenolextraktion und Chromatographie an einer CM-Cellulosesäule gereinigt. Das erhaltene Cyano-cobalamin zeigte keinerlei Radioaktivität¹⁰.

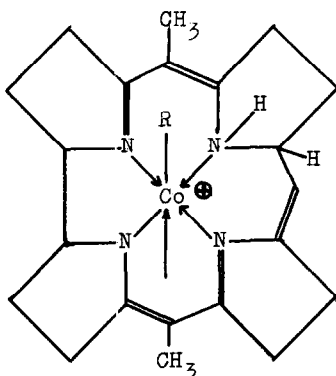
⁹ E.H.Graul, R.Futterknecht und H.Hundeshagen, Atompraxis, 8, 175 (1962)

¹⁰ Für die Durchführung der Messungen danken wir herzlich Herrn R.Futterknecht, Fa. Westo, Stuttgart

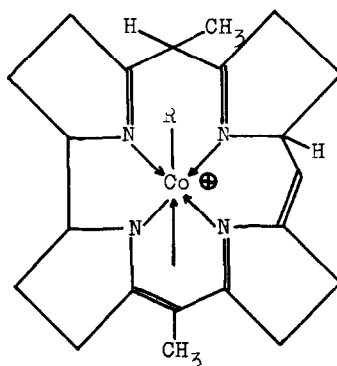
Nach dieser Methode können demnach spezifisch markierte tritiumhaltige Coenzym-Formen hergestellt werden, die für weitere biochemische Untersuchungen wertvoll sein dürften.

Die gewonnenen Ergebnisse gestatten folgende Schlussfolgerungen: Cyano-cobalamin wird durch Luftsauerstoff in alkalischer Lösung unter Bildung eines Lactamringes dehydriert, die Coenzym-Formen bleiben unter den gleichen Reaktionsbedingungen unverändert. Cyano-cobalamin wird durch äquimolare Mengen Chloramin T unter Bildung eines γ -Lactonringes oxydiert, erst bei einem Ueberschuss an Chloramin T geht dieses Lacton in chlorierte Produkte des Cobalamin- γ -Lactons über. Bei den Coenzym-Formen reagiert bereits das erste Mol Chloramin T nicht oxydierend, sondern chlorierend, wobei wahrscheinlich ein an C₁₀ substituiertes Monochlorderivat des Cobalamins entsteht. Ein Ueberschuss an Chloramin T führt zu keiner weiteren Reaktion. Daraus ist ersichtlich, dass jene Umsetzungen, die beim Cyano- bzw. Hydroxo-cobalamin durch die Aktivierung des C₈ durch die in Allylstellung befindliche CN-Doppelbindung zustande kommen, bei den Coenzym-Formen nicht stattfinden können. Es müssen daher im Corrinagerüst andere Bindungsverhältnisse vorliegen. Ferner zeigt die Synthese von Co-Methyl-cobalamin in TOH, dass dabei offenbar eine Doppelbindung hydriert wird. Diese Befunde veranlassen uns, für die Coenzym-Formen der Corrinoiden die Struktur A oder B anzunehmen.

Die Elektronenspektren der Coenzym-Formen sprechen mehr für die Struktur A, in der das fließend konjugierte System der üblichen Corrinoiden in zwei chromophore Bezirke aufgeteilt ist. Weitere Untersuchungen müssen zeigen, ob das natürli-



Struktur A



Struktur B

che Cobalamin-Coenzym mit dem synthetischen Produkt stereochemisch identisch ist, denn die CN-Doppelbindung ist sicherlich durch das Metall stark polarisiert, sodass ihre Hydrierung über ein Carbonium-Ion und den Angriff eines Hydrid-Ions verläuft.

Bei der Umwandlung der Coenzym-Formen, die als "Dihydrocorrinoide" zu bezeichnen wären, in die Cyano- oder Hydroxocorrinoide müsste daher eine Dehydrierung des Dihydrocorrinoide stattfinden. Dafür sprechen folgende Beobachtungen: Co-Methyl-cobalamin wird bei streng anaerober Photolyse (Luftdruck $< 10^{-7}$ Torr) in 0,01 m KCN-Lösung in eine stabile Dicyanoform umgewandelt, die erst bei Zutritt von Luft in Dicyano-cobalamin übergeht. Barker und Hogenkamp¹¹ fanden, dass während der Photolyse von Cobalamin-Coenzym zu Hydroxocobalamin 0,75 Mol Sauerstoff benötigt werden. Weiterhin wur-

¹¹ H.A.Barker: II. Europ.Symp. über Vitamin B₁₂ und Intrinsic Faktor, 1962, Seite 99, Enke Verlag, Stuttgart

de berichtet^{12,13}, dass B_{12r} sehr wahrscheinlich unter Wasserstoffabspaltung in Hydroxo-cobalamin übergeht.

Mit der weiteren Sicherung dieser Ergebnisse über die Struktur des Cobalamin-Coenzym und der eventuellen Bedeutung des von einigen Autoren bereits diskutierten Hydrid-Mechanismus der Coenzym-Formen sind wir beschäftigt.

Herrn Prof.Dr.K.Bernhauer danken wir für die grosszügige Unterstützung und Förderung dieser Arbeit.

¹² H.Diehl and R.Murie, Iowa State Coll.J.Sci. 26,555 (1952)

¹³ J.A.Hill, J.M.Pratt and R.J.P.Williams, J.Theoret.Biol., 1962, im Druck