

## NOTIZEN

**Gewinnung von Cobalamin-Coenzym-Sephärose**

Preparation of Cobalamin Coenzyme-sepharose

MARGARETHE SCHLECHT und OTTO MÜLLER

Institut für Organische Chemie, Biochemie  
und Isotopenforschung der Universität Stuttgart(Z. Naturforsch. **28 c**, 351–352 [1973]; eingegangen am  
23. Februar 1973)Affinity chromatography, vitamin B<sub>12</sub>-binding proteins

Kürzlich konnte Vitamin B<sub>12</sub>-monocarbonsäure säureamidartig mit 3,3'-Diamino-dipropylamin-substituierter Sephärose verknüpft werden<sup>1</sup>. Diese Cobalamin-Sephärose eignet sich zur Isolierung Vitamin B<sub>12</sub> bindender Proteine.

Wir haben gefunden, daß Vitamin B<sub>12</sub>-Sephärose durch direkte Umsetzung von Vitamin B<sub>12</sub> mit bromcyan-aktivierter Sephärose<sup>2</sup> erhalten wird, wenn man die Reaktion bei pH 8 in Gegenwart von Cyanid durchführt, so daß der Kobalt-Komplex in der Dicyano-Form vorliegt. Die Verknüpfung des Cobalamins erfolgt offenbar über den Stickstoff der nucleotidischen Base, der bei Abwesenheit von Cyanid mit dem Zentralatom koordiniert. Für eine Reaktion an dieser Stelle spricht, daß ohne Cyanid keine Verknüpfung mit bromcyan-aktivierter Sephärose zustande kommt und daß das an N(3) des Dimethylbenzimidazol-Anteiles methylierte Vitamin B<sub>12</sub><sup>3</sup> nicht gekuppelt werden kann.

Die Vitamin B<sub>12</sub>-Sephärose wird enzymchemisch in Cobalamin-Coenzym-Sephärose übergeführt. Hierzu eignet sich ein aus Extrakten von *P. shermanii* gewonnenes Rohprotein, dem verschiedene Kofaktoren (siehe dazu<sup>4</sup>) zugesetzt wurden. Damit konnte auch gezeigt werden, daß bei Vitamin B<sub>12</sub>-Sephärose, die durch Umsetzung von bromcyan-aktivierter Sephärose mit Cyano-Cobalamin gewonnen wurde (s. o.), das Corrinoid für das aktive Zentrum des Enzyms erreichbar ist.

Die Bildung von Cobalamin-Coenzym-Sephärose gelingt auch entsprechend dem Reaktionsprinzip zur Darstellung von Corrinoiden mit Kobalt-Kohlenstoff-Bindung<sup>5–8</sup> durch Reduktion von Vitamin B<sub>12</sub>-Sephärose zum Co(I)-Komplex und dessen Umsetzung mit 5'-Tosyl-adenosin<sup>9</sup>.

Weitere Untersuchungen dienen der Aufklärung der Bindungsweise zwischen Cobalamin und Sephärose, der Isolierung Cobamid-Coenzym synthetisierender Enzyme mittels Cyano-cobalamin-Sephärose sowie der

Sonderdruckanforderungen an Doz. Dr. O. MÜLLER, Institut für Organ. Chemie, Biochemie und Isotopenforschung d. Univ. Stgt., D-7000 Stuttgart 1, Azenbergstr. 14.

Anreicherung Vitamin B<sub>12</sub>-Coenzym bindender Proteine mittels Cobalamin-Coenzym-Sephärose.

Die nach unserem Verfahren gewonnene Cobalamin-Sephärose enthält im Gegensatz zu dem von ALLEN und MAJERUS dargestellten Produkt kein längeres Bindeglied zwischen Träger und Corrinoid. Es wird daher zu prüfen sein, ob die beiden Vitamin B<sub>12</sub>-Sephärosen bzw. ihre Coenzym-Formen für die aktiven Zentren der Enzyme gleichermaßen zugänglich sind.

**Beschreibung der Versuche**

**Cyano-cobalamin-Sephärose.** 60 ml gepackte Sephärose werden mit ca. 2 l Wasser auf einer G2-Fritte gut gewaschen und die überstehende Flüssigkeit gerade so abgesaugt, daß die Sephärose nicht trocken wird. Das gewaschene Produkt wird in ein Becherglas übergeführt und in 50 ml Wasser aufgenommen. 6 g fein zerriebenes Bromcyan werden hinzugegeben und der pH-Wert mit 2N NaOH sofort auf 11 eingestellt. Durch weitere tropfenweise Zugabe von NaOH wird dieser pH-Wert beibehalten. Die Temperatur darf während der Reaktion nicht über 20–22 °C ansteigen. Je nach Bedarf wird etwas Eis in das Reaktionsgefäß gegeben. Nach 10–15 min ist die Reaktion beendet. Die Sephärose wird mit eisgekühltem Boratpuffer pH 8,0, der pro l 0,5 g KCN enthält, schnell gewaschen und sofort mit 60 mg Vitamin B<sub>12</sub> gelöst in 60 ml des gleichen Boratpuffers, unter Rühren bei 4 °C umgesetzt. Man rührt über Nacht bei 4 °C und wäscht dann auf einer G2-Fritte abwechselnd mit Wasser, Boratpuffer pH 8,0 und Na-acetat-Puffer pH 4,5. Danach füllt man die stark rot gefärbte B<sub>12</sub>-Sephärose in eine Säule und wäscht 24 Stdn. mit Boratpuffer pH 8,0, 24 Stdn. mit Na-acetat-Puffer pH 4,5. Die zum Waschen verwendeten Puffer sind 1 M an NaCl. Pro ml gepackte Sephärose werden 0,17 mg Cyano-cobalamin gebunden. Nach längerem Stehen (2–3 Tage) muß von etwas freigesetztem Cobalamin ausgewaschen werden.

**Cobalamin-Coenzym-Sephärose.** Wegen der Lichtempfindlichkeit der Cobamid-Coenzyme werden die folgenden Operationen bei stark gedämpftem Licht durchgeführt.

10 ml gepackte Cyano-cobalamin-Sephärose werden mit 50 ml Wasser versetzt und in ein Gasdurchleitungsgefäß übergeführt. Man fügt eine Lösung von 1 mg Vitamin B<sub>12</sub> in 5 ml Wasser hinzu, verdrängt den Luftsauerstoff durch Stickstoff oder Argon und versetzt mit ca. 200 mg Natriumborhydrid. Nach 5 bis 10 min gibt man zu dem Ansatz unter Ausschluß von Luftsauerstoff eine Lösung von 5'-Tosyl-adenosin, die unmittelbar zuvor hergestellt wurde (s. u.), und rührt mit einem Magnetrührer 15 min bei Zimmertemperatur. Die Cobalamin-Coenzym-Sephärose wird



Dieses Werk wurde im Jahr 2013 vom Verlag Zeitschrift für Naturforschung in Zusammenarbeit mit der Max-Planck-Gesellschaft zur Förderung der Wissenschaften e.V. digitalisiert und unter folgender Lizenz veröffentlicht: Creative Commons Namensnennung-Keine Bearbeitung 3.0 Deutschland Lizenz.

Zum 01.01.2015 ist eine Anpassung der Lizenzbedingungen (Entfall der Creative Commons Lizenzbedingung „Keine Bearbeitung“) beabsichtigt, um eine Nachnutzung auch im Rahmen zukünftiger wissenschaftlicher Nutzungsformen zu ermöglichen.

This work has been digitalized and published in 2013 by Verlag Zeitschrift für Naturforschung in cooperation with the Max Planck Society for the Advancement of Science under a Creative Commons Attribution-NoDerivs 3.0 Germany License.

On 01.01.2015 it is planned to change the License Conditions (the removal of the Creative Commons License condition "no derivative works"). This is to allow reuse in the area of future scientific usage.

auf der Fritte mit 2 l Wasser und 0,5 l Boratpuffer pH 0,8 (ohne Cyanid!) gewaschen. Dann füllt man sie in eine Säule und wäscht mit Phosphatpuffer pH 6,9 neutral.

Lösung von Tosyl-adenosin: 100 mg Tosyl-adenosin werden mit 1 ml Methanol und 0,2 ml Eisessig 2 bis 3 min geschüttelt. Dann füllt man mit Methanol bis 5 ml auf, schüttelt ca. 3 min und filtriert von nicht

gelöstem Tosyl-adenosin ab. Die Umwandlung in die Coenzym-Form kann geprüft werden, indem man bei einer Probe mittels verdünnter KCN-Lösung Adenin freisetzt und dieses spektrophotometrisch bestimmt.

Der Deutschen Forschungsgemeinschaft und dem Verband der Chemischen Industrie sind wir für Personal- und Sachbeihilfen zu Dank verpflichtet.

<sup>1</sup> R. H. ALLEN u. P. W. MAJERUS, J. biol. Chemistry **247**, 7695, 7702 u. 7709 [1972].

<sup>2</sup> P. CUATRECASAS, J. biol. Chemistry **245**, 3059 [1970].

<sup>3</sup> W. FRIEDRICH u. K. BERNHAUER, Chem. Ber. **89**, 2030 [1956].

<sup>4</sup> R. O. BRADY, E. G. CASTANERA u. H. A. BARKER, J. biol. Chemistry **237**, 2325 [1962].

<sup>5</sup> K. BERNHAUER, O. MÜLLER u. G. MÜLLER, Biochem. Z. **336**, 102 [1962].

<sup>6</sup> E. L. SMITH, L. MERVYN, A. W. JOHNSON u. N. SHAW, Nature [Lond.] **194**, 1175 [1962].

<sup>7</sup> A. W. JOHNSON, L. MERVYN, N. SHAW u. E. L. SMITH, J. chem. Soc. [London] **1963**, 4146.

<sup>8</sup> O. MÜLLER u. G. MÜLLER, Biochem. Z. **336**, 299 [1962].

<sup>9</sup> R. R. SCHMIDT, U. SCHLOZ u. D. SCHWILLE, Chem. Ber. **101**, 590 [1968].

## Synthese von Glykosiden langkettiger Hydroxy-Fettsäuren

Synthesis of Glycosides  
of Long Chain Hydroxylated Fatty Acids

ANDRAS LIPTAK, PETER KAZMAIER und  
HILDEBERT WAGNER

Institut für Pharmazeutische Arzneimittellehre  
der Universität München

(Z. Naturforsch. **28 c**, 352–353 [1973]; eingegangen am  
28. Februar 1973)

Glycosides, fatty acids

Von den bisher strukturell aufgeklärten Glykolipiden aus *Torulopsis apicola*<sup>1</sup>, *Pseudomonas aeruginosa*<sup>2</sup>, *Ustilago zeae*<sup>3</sup> sowie *Ipomoea muricata*<sup>4</sup> und den anderen Convolvulaceenharzen<sup>5–7</sup>, Diglykoside oder Oligoside langkettiger (C<sub>14</sub>–C<sub>18</sub>) Mono- oder Dihydroxy-Fettsäuren, ist bisher noch keine Verbindung synthetisiert worden.

In der Literatur wurde bisher nur die Glykosidierung einiger kurzkettiger Fettsäuren mit einer Kettenlänge von maximal 5 C-Atomen beschrieben. So setzten KARRER u. Mitarb.<sup>7</sup> die Silbersalze kurzkettiger  $\alpha$ -Hydroxycarbonsäuren, WULFF und Mitarb.<sup>8,9</sup> die Silbersalze und Methylester kurzkettiger Hydroxycarbonsäuren in Anwesenheit von 1,3 bzw. 1,4-Dicarbonsäuresilbersalzen mit  $\alpha$ -Acetobromglucose um. Sie erhielten neben den gewünschten 1-O-Acylderivaten auch die O-Glucosidacetate und 1-O-Tetra-O-acetylglucosyloxy-acyl-tetra-O-acetyl-glucosen. Das Glucosid der Oleanolsäure konnte unter diesen Bedingungen nicht dargestellt werden.

Für unsere Modellsynthesen verwendeten wir die natürlich vorkommende 12-OH-Stearinsäure, die 12-

OH-Ölsäure (Ricinolsäure) und die häufig als Aglycon der Convolvulaceenglykolipide beschriebene 11-OH-Palmitinsäure (Jalapinsäure). Als Zuckerkomponente wurde die Cellobiose eingesetzt, die in den Glykosidsäuren aus *Ustilago zeae*<sup>3</sup> vorkommt.

Versuche, die Glykosidierung der Fettsäuremethylester in Anwesenheit von Silberoxid, Silbercarbonat oder Bernsteinsäuresilbersalz zu erreichen, waren erfolglos.

Die Kupplung gelang jedoch in Ausbeuten zwischen 65 und 75 % in einem Benzol-Nitromethan (1:1) Lösungsmittelgemisch und mit Quecksilbercyanid als Katalysator. Die Glykosidierung von  $\alpha$ -OH-Fettsäuren gelang unter den genannten Bedingungen nicht.

Bei den Synthesen waren unter den gewählten Bedingungen laut Dünnschichtchromatographie  $\beta$ ,  $\alpha$ -Anomerengemische im Verhältnis von ca. 9:1 entstanden. Durch Kristallisation aus Methanol wurden in jedem Falle die reinen  $\beta$ -Glykoside erhalten. Zur Sicherung dieses Ergebnisses hydrierten wir das Ricinolsäuremethylester-hepta-O-acetyl- $\beta$ -D-cellobiosid zum 12-OH-Stearinsäuremethylester-hepta-O-acetyl- $\beta$ -D-cellobiosid ( $[\alpha]_D^{25} = -19,5$  i. CHCl<sub>3</sub>) und führten dieses durch Behandlung mit 3-proz. HBR in Eisessig in das entsprechende  $\alpha$ -Isomere ( $[\alpha]_D^{25} = +43,0$  i. CHCl<sub>3</sub>) über. Das dabei entstandene  $\alpha$ -Isomere verhielt sich dünn-schichtchromatographisch wie das bei der Kupplung zu 10 % erhaltene Nebenprodukt.

### Glykosidierungsvorschrift

Äquimolare Mengen Oxyfettsäuremethylester,  $\alpha$ -Acetobromcellobiose und Hg(CN)<sub>2</sub> werden in einem Benzol-Nitromethan (1:1)-Gemisch bei 40–45 °C unter Feuchtigkeitsausschluß 2 Stdn. gerührt. Anschließend wird zur Entfernung der Quecksilbersalze die Lösung eingengt, der Rückstand in ca. der 20fachen Menge CHCl<sub>3</sub> aufgenommen, mit 2-proz. Natriumjodidlösung und Wasser gewaschen und eingengt. Der Hepta-O-acetyl-glykosid-säuremethylester wird über

Sonderdruckanforderungen an Prof. Dr. H. WAGNER, Institut für pharmazeutische Arzneimittellehre der Universität München, D-8000 München 2, Karlstraße 29.