

2

Universitätsbibliothek
Gießen

Darstellung und biologische Eigenschaften von 8-Epicorrinoiden

Peter Rapp* und Ulrich Oltersdorf

(Der Schriftleitung zugegangen am 27. September 1972)

Zusammenfassung: Aus Cobalamin-*c*-lacton wird durch Reduktion mit Natriumborhydrid neben α -(5,6-Dimethylbenzimidazolyl)cobamsäure-*abdeg*-pentaamid auch α -(5,6-Dimethylbenzimidazolyl)-8-epicobamsäure-*abdeg*-pentaamid erhalten, dessen Amidierung mit Ammoniak 8-Epicobalamin ergibt. 8-Epicobalamin besitzt bei den Corrinoid-auxotrophen *Escherichia coli* 113-3 10% und bei *Lactobacillus leichmanii* 4% der Wachstumsaktivität von Cobalamin. 8-Epicobinamid, das durch

Nucleotidabspaltung aus 8-Epicobalamin erhalten wird, besitzt bei *Escherichia coli* 113-3 2% der Wachstumswirkung von Vitamin B₁₂ bzw. 10% der des Cobinamids. Kulturen von *Propionibacterium shermanii* wandeln 8-Epicobalamin sowie bei Zusatz von 5,6-Dimethylbenzimidazol auch 8-Epicobinamid durch Rückepimerisierung vollständig in Cobalamin um. Rohextrakte aus *Propionibacterium shermanii* bilden aus 8-Epicobalamin 5'-Desoxyadenosylcobalamin.

Preparation and biological properties of 8-epicorrinoids

Summary: In addition to α -(5,6-dimethylbenzimidazolyl)cobamic acid-*abdeg*-pentaamide, the reduction of cobalamin-*c*-lactone by sodium borohydride also gives α -(5,6-dimethylbenzimidazolyl)-8-epicobamic acid-*abdeg*-pentaamide, which is converted into 8-epicobalamine by amidation with ammonia. Compared with the biological activity of cobalamin 8-epicobalamine shows a growth activity of 10% for the corrinoid-auxotroph *Escherichia coli* 113-3 and 4% for *Lactobacillus leichmanii*. 8-Epicobinamide, which is formed from

8-epicobalamine by removal the nucleotide, shows a growth activity for *E. coli* 113-3 of 2% compared with cobalamin and 10% compared with cobinamide. Growing cultures of *Propionibacterium shermanii* completely convert 8-epicobalamine and also 8-epicobinamide to cobalamin by reepimerisation, the latter being converted when 5,6-dimethylbenzimidazole is added to the culture. Crude extracts of *Propionibacterium shermanii* convert 8-epicobalamine into 5'-deoxyadenosylcobalamine.

Es sind bis jetzt zwei Isomerisierungen am Corrinring bekannt, nämlich eine Koordinationsisomerie, die sogenannte *a-b*-Isomerie einiger saurer Cyano-aquocorrinoiden, die durch Konfigurationswechsel (Ligandenwechsel) am Cobalt verursacht wird^[1], und eine reversible Epimerisierung von Corrinoiden

durch Einwirkung starker Säuren. So werden außer dem bereits lange bekannten „Faktor Ia“^[2] mannigfaltige „Isocorrinoidcarbonsäuren“ gebildet^[3]. Durch die Strukturaufklärung des als Zwischenprodukt auftretenden 13-Epicobalamins konnte gezeigt werden, daß durch Säureeinwirkung eine Epimerisierung an C-13 stattfindet^[4]. In der vorliegenden Mitteilung wird über eine ganz andersartige Epimerisierung von Corrinoiden be-

* *Postanschrift:* Peter Rapp, Institut für Organische Chemie, Biochemie und Isotopenforschung der Universität Stuttgart, D-7 Stuttgart 1, Azenbergstraße 14.

Abkürzungen: I = α -(5,6-Dimethylbenzimidazolyl)cobamsäure-*abdeg*-pentaamid; II = α -(5,6-Dimethylbenzimidazolyl)-8-epicobamsäure-*abdeg*-pentaamid; dAdo = 5'-Desoxyadenosyl-

¹ Friedrich, W. & Moskophides, M. (1968) *Z. Naturforsch.* 23b, 804-812.

² Friedrich, W. & Bernhauer, K. (1954) *Z. Naturforsch.* 9b, 685-694.

³ Bernhauer, K., Vogelmann, H. & Wagner, F. (1968) *diese Z.* 349, 1281-1296.

⁴ Bonnet, R., Godfrey, J. M., Math, V. B., Edmond, E., Evans, H. & Hodder, O. J. R. (1971) *Nature (London)* 229, 473-476.

richtet. Sie findet bei der Reduktion von Cobalamin-*c*-lacton^[5] mit Natriumborhydrid^[6] statt. Es entsteht dabei nicht nur die bereits bekannte nucleotidhaltige Monocarbonsäure mit freier Essigsäuregruppe *c* und der bei natürlichen Corrinoiden üblichen Konfiguration an C-8^[6] [α -(5,6-Dimethylbenzimidazolyl)cobamsäure-*abdeg*-pentaamid = Verbindung I], sondern noch eine zweite Monocarbonsäure, die als das C-8-Epimere erkannt wurde [α -(5,6-Dimethylbenzimidazolyl)-8-epicobamsäure-*abdeg*-pentaamid = Verbindung II]. Durch Amidierung mit Ammoniak erhält man daraus 8-Epicobalamin, das auch deshalb von Interesse erschien, da der Position C-8 vielleicht eine besondere molekularbiologische Bedeutung zukommt^[7].

Material und Methoden

1. Reduktion von Cobalamin-*c*-lacton

100 mg Cobalamin-*c*-lacton^[5] werden in 50 ml 0,1M Phosphatpuffer, pH 7, oder dest. Wasser gelöst und mit Toluol überschichtet, um Sauerstoff weitgehend auszuschließen. Dann werden 300 mg NaBH₄ zugegeben und 15 min bei 20°C im Dunkeln gerührt. Die Reaktion wird durch Zusatz von 8 mg KCN abgebrochen und die Lösung mit verdünnter HCl angesäuert (pH 2). Die Corrinoide werden nach 10 min durch eine Phenolextraktion^[8] gereinigt und an einer DEAE/Ac-Säule (20 × 4 cm) chromatographiert. Mit blausäurehaltigem Wasser (0,01% HCN) werden ca. 30 mg unverändertes Cobalamin-*c*-lacton eluiert. Bei der Entwicklung mit 0,015proz. Essigsäure, die ebenfalls 0,01% HCN enthält, erscheinen zuerst gelbe Abbauprodukte, dann ca. 8,0 mg der Verbindung II und anschließend ca. 50,0 mg der Verbindung I.

70 mg Cobalamin-*c*-lacton^[5] werden in 15 ml 10proz. NH₄Cl-Lösung gelöst und mit Toluol überschichtet. 350 mg Zinkstaub werden zugesetzt und es wird 6 min bei 20°C im Dunkeln gerührt. Die Reaktionsmischung wird schnell über eine Glasfritte G 3 abgesaugt. Die im Filtrat befindlichen Corrinoide werden durch eine Phenolextraktion^[8] gereinigt und, wie oben beschrieben, an einer DEAE/Ac-Säule chromatographiert. Neben Spuren von Cobalamin-*c*-lacton und gelben Abbauprodukten werden 63 mg der Verbindung I erhalten.

2. Amidierung

Die Verbindungen I und II werden in bekannter Weise^[9] mit NH₃ zu 8-Epicobalamin bzw. Cobalamin amidiert.

3. Gewinnung von 8-Epicobinamid

8-Epicobinamid wird durch Nucleotidabspaltung mit Ce(OH)₃^[10] oder wasserfreiem HF* aus 8-Epicobalamin erhalten.

4. CD-Spektren

Sie wurden mit Cary 60 aufgenommen.

5. Versuche mit wachsenden Kulturen

Propionibacterium shermanii wird in bekannter Weise^[7] gezüchtet. Es wird folgendes Nährmedium benützt: 55 g Cornsteptrockenpulver, 2,5 g Bacto-Yeast-Extract, 1,76 g NaH₂PO₄ × 2 H₂O, 1,76 g K₃PO₄ × H₂O, 0,4 g MgCl₂ × 6 H₂O, 0,01 g FeSO₄ × 7 H₂O, 4 mg Calciumpantothenat, 0,3 mg Biotin, auf 1 l mit Leitungswasser aufgefüllt.

60 mg Cyano-8-epicobalamin werden 72 h nach der Beimpfung aseptisch zu 4 l Kulturbrühe gegeben. Bei den Versuchen zum Nucleotideinbau werden nach 72 h gleichzeitig 10 mg 8-Epicobinamid bzw. Cobinamid und 20 mg 5,6-Dimethylbenzimidazol pro 1 l Kulturbrühe aseptisch zugesetzt. Die Dauer aller Fermentationen beträgt 120 h.

6. Versuche mit Rohextrakten

Die Rohextrakte aus *P. shermanii* zur Bildung und Gewinnung des dAdo-8-Epicobalamins und dAdo-Cobalamins werden aus Acetontrockenbakterien hergestellt^[11]. Man fügt 19 mg 8-Epicobalamin zu 100 ml Rohextrakt bzw. 10 mg Cobalamin zu 50 ml Rohextrakt und bebrütet 19 h bei 30°C im Dunkeln.

7. Isolierung und Trennung

Die Cyano-^[9,11] und dAdo-Corrinoide^[7] werden wie beschrieben isoliert, gereinigt, getrennt und quantitativ bestimmt.

8. Charakterisierung und Identifizierung

Zur Charakterisierung und Identifizierung der Cyano- und dAdo-Corrinoide dienen die ebenfalls schon beschriebenen UV-spektroskopischen, elektrophoreti-

⁵ Bonnett, R., Cannon, J. R., Clark, V. M., Johnson, A. W., Parker, L. F., Smith, E. L. & Todd, A. (1957) *J. Chem. Soc.*, 1158–1168.

⁶ Frahne, D. (1967) Dissertat. TH Stuttgart.

⁷ Rapp, P. (1972) *diese Z.* 353, 887–892.

⁸ Friedrich, W. & Bernhauer, K. (1954) *Z. Naturforsch.* 9b, 755–761.

⁹ Rapp, P. & Hildebrand, R. (1972) *diese Z.* 353, 1141–1152.

¹⁰ Friedrich, W. & Bernhauer, K. (1956) *Chem. Ber.* 89, 2507–2512.

* Rapp, P., Jauernig, D. & Ruoff, G. in Vorbereitung.

¹¹ Bernhauer, K., Wagner, F., Michna, H., Rapp, P. & Vogelmann, H. (1968) *diese Z.* 349, 1297–1309.

