

Co α /Co β -Isomerie der Corrinoide. Partialsynthese und *Escherichia coli* -Aktivität weiterer Isomerenpaare der (Co-Methyl)-corrinoide

Co α /Co β -Isomerism of Corrinooids. Partial Synthesis and *Escherichia coli* Activity of Further Isomer Pairs of the (Co-methyl)-Corrinooids

M. Moskophidis, Christa Maria Klotz und W. Friedrich

Physiologisch-Chemisches Institut der Universität Hamburg

(Z. Naturforsch. 31 c, 255—262 [1976]; eingegangen am 20. Oktober 1975/30. Januar 1976)

Herrn Prof. Dr. J. Kühnau zum 75. Geburtstag gewidmet

Vitamin B₁₂, Methylcorrinooids, Co α /Co β -isomerism, *E. coli* Activity

In 2-methyladenyl-(Co β -methyl)-cobamide and in adenyl-(Co β -methyl)-cobamide the nucleotide base is coordinated to the cobalt atom in neutral and weak acidic aqueous solutions (in the corresponding adenosylcorrinooids the nucleotide base is not coordinated). 2-Methylthioadenyl-(Co β -methyl)-cobamide resembles, with regard to the coordination of the nucleotide base, the benzimidazole-corrinooids.

The partial synthesis *via* cobalt(I) corrinooids results in a variable proportion: (Co α -methyl) isomer/(Co β -methyl) isomer, *e. g.* 7/93 (cobalamin) and 50/50 (*p*-cresylcobamide). This proportion is generally low, if in the corresponding cyanocorrinoid the nucleotide base is firmly coordinated; it is high, if the coordination in the corresponding cyanocorrinoid is weak or absent. These results are compatible with the assumption that in the cobalt(I) corrinooids the nucleotide base is to a certain extent coordinated.

In *Escherichia coli* 113-3 the examined (Co α -methyl)-corrinooids show a weaker bioactivity than the corresponding (Co β -methyl)-corrinooids.

Die Axialliganden, d. h. der α -Ligand („unten“) und der β -Ligand („oben“) * des hexakoordinierten Kobaltatoms der Co(III)-Corrinoide sind austauschbar. Die Vielzahl der bekannten Co(III)-Corrinoide^{1-4a} ist vor allem auf diese Eigenschaft zurückzuführen.

Mit dem Problem der Austauschbarkeit der Axialliganden ist die Co α /Co β -Isomerie der Corrinoide^{2,3} — das Vorkommen von Isomerenpaaren mit einem bestimmten α - bzw. β -ständig gelagerten Axialliganden — eng verknüpft. Die Co α /Co β -Isomerie wurde zuerst an mehreren Cyano-aqua-corrinoiden beobachtet⁵. Sie wurde später beschrieben an (Co-Methyl)-Derivaten von Cobalamin⁶, Cobyr-säure und anderen inkompletten Corrinoide-mono-

Tab. I. Nomenklatur der Corrinoide.

Formel-Nr. (wie in Abb. 1)	Name	Abkürzung
1	(Co- α -Methyl)-2-methyl-adenylcobamid	(2-MeAde/Me) Cba
2	2-Methyladenyl-(Co- β -methyl)-cobamid	(2-MeAde) MeCba
3	(Co- α -Methyl)-2-methyl-mercaptoadenyl-cobamid	(2-MeSAde/Me) Cba
4	2-Methylmercaptoadenyl-(Co- β -methyl)-cobamid	(2-MeSAde) MeCba
5	(Co- α -Methyl)-5-hydroxy-benzimidazolyl-cobamid	(5-OH-Bza/Me) Cba
6	5-Hydroxybenzimidazolyl-(Co- β -methyl)-cobamid	(5-OH-Bza) MeCba
7	(Co- α -Methyl)- <i>p</i> -Kresyl-cobamid	(<i>p</i> -Kresyl/Me) Cba
8	(Co- β -Methyl)- <i>p</i> -Kresyl-cobamid	(<i>p</i> -Kresyl) MeCba
	Adenyl-(Co- β -methyl)-cobamid	(Ade) MeCba
	(Co- β -Adenosyl)-adenyl-cobamid	(Ade) AdoCba

carbonsäuren² sowie von *p*-Kresyl-cobamid (Faktor I b)⁷. Die Co α /Co β -Isomerie der (Co-Äthyl)-corrinoide wurde am Beispiel der Cobyr-säure kurz behandelt⁸.

Sonderdruckanforderungen an Prof. Dr. W. Friedrich, Physiologisch-Chemisches Institut der Universität, Grindelallee 117, 4. Stock, D-2000 Hamburg 13.

* Zur Nomenklatur der Corrinoide vgl. Zit. 1. Die hier benützten Abkürzungen sind in Tab. I enthalten. Vgl. auch Abb. 1. Die Buchstaben α und β stehen hier für die in der Co α /Co β -Isomerie der Corrinoide früher² benützten Buchstaben a und b. Die Kurznamen (2-MeAde,Me) Cba, (2-MeSAde,Me) Cba, (5-OH-Bza,Me) Cba und (*p*-Kresyl,Me) Cba stehen für die entsprechenden (Co-Methyl)-corrinoide mit nicht definierter sterischer Lage der CH₃-Gruppe.

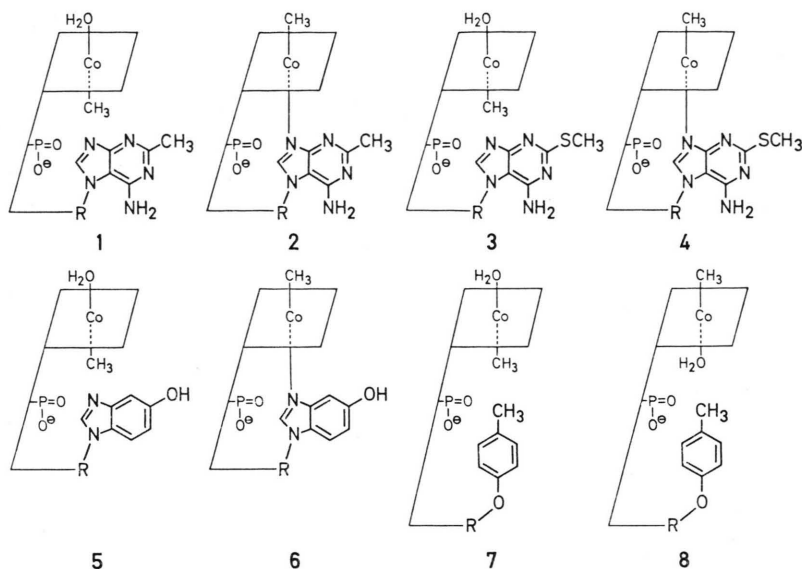
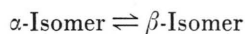


Abb. 1. Schematische Strukturformeln der untersuchten Corrinoide. R, Ribose. Zur Nomenklatur vgl. Tab. I.

Durch Wärme bzw. Licht lassen sich einheitliche Cyano-aqua- und Methyl-aqua-corrinoide isomerisieren, wobei stets ein spezifisches Gleichgewicht der beiden Formen:



erreicht wird^{2, 5, 7}. Die Isomerisierung ist wahrscheinlich mit der Homolyse der Co-C-Bindung verknüpft⁹. Die Lage dieses Gleichgewichts wurde untersucht. Sie ist bei den carboxylhaltigen Cyano-aqua-corrinoiden pH-abhängig^{2, 5}.

Nachfolgend werden einige weitere Isomerenpaare aus dem Bereich der (Co-Methyl)-corrinoide beschrieben. Ihre Gewinnung erfolgte zumeist auf einem einfacheren Weg als früher^{6, 7}. Ihre Herstellung und Untersuchung sollte unter anderem der Beantwortung der Frage dienen, weshalb das Mengenverhältnis (Co- α -Methyl)-Isomer/(Co- β -Methyl)-Isomer von Corrinoide zu Corrinoide verschieden und meist wesentlich kleiner ist als 1. Wir hofften, anhand einer größeren Zahl von Beispielen zu einer Gesetzmäßigkeit zu gelangen, die sich mit einer bestimmten Eigenschaft wie z. B. der Koordinierbarkeit des Aglykons oder eines corrinoidegebundenen Carboxyls verknüpfen läßt. Auch das Verhalten von (Co-Methyl)-purin-corrinoiden wurde studiert. Solche wurden wahrscheinlich bisher nicht beschrieben.

Das Interesse an methylierten Corrinoiden ist unter anderem darauf zurückzuführen, daß Methylcobalamin an der Methioninsynthese in Bakterien

und in den höheren Organismen teilnimmt und daß methylierte Corrinoide Zwischenstufen der bakteriellen Synthese von Methan und Acetat sind^{2-4a}. Es sei schließlich erwähnt, daß biologische Methylierung von Quecksilbersalzen unter Bildung stark toxischer, flüchtiger Produkte wahrscheinlich über Methyl-corrinoide abläuft².

Es ist zu erwarten, daß die α - und β -Isomere der Methyl-corrinoide sich in biologischen Systemen ungleich verhalten. Die bisherige Prüfung von beiden Methylcobalaminen in *Escherichia coli* und *Ochromonas malhamensis* ergab, daß (Co- α -Methyl)-cobalamin wenig aktiv ist¹⁰. Wir dehten den *E. coli*-Test auf einige weitere Isomerenpaare aus.

Experimenteller Teil

Die Arbeiten mit den Corrinoiden wurden bei gedämpftem Licht durchgeführt.

Papierchromatographie

Papier Schleicher u. Schüll 2043 a, aufsteigende Arbeitsweise. Entwickler (in Vol.): neutral, *sec*-Butanol/Wasser = 70/30; sauer, *sec*-Butanol/Wasser/Eisessig = 70/30/1; alkalisch, *sec*-Butanol/Wasser/25% NH₃ = 50/18/7.

Papierelektrophorese

Papier Schleicher u. Schüll 2043 b Mgl. Pufferlösungen (wenn nicht anders angegeben, stets 0,05 M): pH 2,0 Glyzin/HCl; pH 2,5 Essigsäure (0,5 N); pH 3,4–5,2 Citronensäure/Natriumcitrat; pH 6,5 Natriumacetat; pH 8,0 NaHCO₃; pH 10,8

Na₂CO₃. Trennungen bei etwa 4 V/cm während etwa 24 Stunden bei Zimmertemperatur.

Reagenzien

Die Ausgangscorrinoide wurden aus Faulschlamm gewonnen² und lagen meist in kristalliner Form vor. CM-Cellulose (Serva, Heidelberg, bzw. Schleicher u. Schüll) wurde meist in gepufferter Form (pH 4,8)²⁰ verwendet.

Spektrophotometrische Messungen

Durchführung mit Hilfe der Geräte Beckman DU sowie Shimadzu/Bausch & Lomb, Spectronic 200.

Alkylierung der Corrinoide sowie Gewinnung der Isomere α und β

Zur Alkylierung von Corrinoiden vgl. refs. 2–4a und 20. Als Reduktionsmittel wurden benutzt Zinkpulver/10% NH₄Cl (pH 4,9), Zinkpulver/2 M Glyzin-HCl-Puffer (pH 2,2) oder NaBH₄ in wäßriger Lösung (pH 10,0), stets in N₂-Atmosphäre. Als Methyl-donor diente Methyljodid. Zur Trennung der Isomere α und β benutzte man aufsteigende Papierchromatographie, Elektrophorese [bei (5-OH-

Bza,Me)Cba und (2-MeSAde,Me)Cba] sowie Chromatographie an CM-Cellulose (für 100 mg Corrinoide Säule 3 × 12 cm, pH 4,8) bei (5-OH-Bza,Me)Cba. In der CM-Cellulose bewegten sich beim Entwickeln mit Wasser drei Zonen: I, (5-OH-Bza)-CNCba (sehr schwach, schnell, rot); II, (5-OH-Bza)MeCba (sehr stark, mittel schnell, orangerot); III, (5-OH-Bza/Me)aqCba (schwach, langsam, orange-gelb).

Ergebnisse und Diskussion

Darstellung der methylierten Corrinoide

Die Methylierung erfolgte nach den bekannten Methoden^{2–4a}. Die Trennung der Isomere α und β der kompletten Methyl-corrinoide gelang im Prinzip in einem Schritt mittels Papierchromatographie (Abb. 2*, Tab. II) bzw. Elektrophorese (Abb. 2, Tab. III) oder – bei (5-OH-Bza,Me)Cba – mittels Säulenchromatographie an gepufferter CM-Cellulose (vgl. experimentellen Teil). Die beiden zuletzt genannten Methoden fußen auf der Tatsache, daß die Basizität der (Co- α -Methyl)-corrinoide (in denen die Nucleotidbase nicht koordiniert) größer

Tab. II. Papierchromatographische Beweglichkeiten der Methylcorrinoide.

Corrinoid	Entwickler					
	neutral	sauer R _{CN} -Cobalamin	alkalisch	neutral	sauer R _{CN} -Corrinoid *	alkalisch
(5-OH-Bza) MeCba	1,03	1,09	0,97	1,46	1,52	1,84
(5-OH-Bza/Me) Cba	0,90	0,95	0,67	1,28	1,29	1,27
(2-MeAde) MeCba	1,09	1,01	1,07	1,56	1,50	1,62
(2-MeAde/Me) Cba	0,70	0,67	0,69	1,05	1,00	1,03
(2-MeSAde) MeCba	1,31	1,28	1,19	1,31	1,28	1,19
(2-MeSAde/Me) Cba	0,95	0,91	0,90	0,95	0,91	0,90

* Werte bezogen auf die Beweglichkeit der entsprechenden Monocyanofarm.

Tab. III. Elektrophoretische Beweglichkeiten der Methyl-corrinoide gegen die Kathode bzw. gegen die Anode (a), bezogen auf CN-Cobinamid=1 und auf CN-Cobalamin=0,0. Fleckfarben: α -Isomere orange-gelb, β -Isomere orangerot, wenn Angaben fehlen. Sonstige Fleckfarben: g, gelb; or, orange.

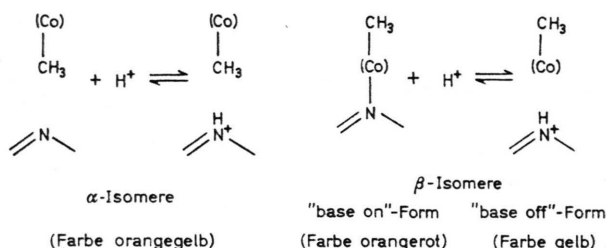
pH	(5-OH-Bza,Me) Cba		(2-MeAde,Me) Cba		(2-MeSAde,Me) Cba	
	α	β	α	β	α	β
2,0	0,81	0,70 g	0,84	0,84 or	0,68	0,68 g
2,5	0,79	0,60 g	0,79	0,79 or	0,52	0,28 g
3,4	0,78	0,21 g	0,70	0,70 or	0,24	0,05
4,0	0,63	0,00	0,58	0,58 or	0,00	0,00
4,5	0,50	0,00	0,24	0,24 or	0,00	0,00
5,2	0,26	0,00	0,08	0,08	0,00	0,00
6,5	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
8,0	0,00	0,00				
10,8	a 0,33	a 0,33				

* Abb. 2 siehe Tafel auf Seite 258 a.

Tab. IV. Elektrophoretisch ermittelte pK-Werte der Methylcorrinoide.

Corrinoid	α -Isomer	β -Isomer	ΔpK
Methyl-cobalamin	4,8	2,7	2,1
(5-OH-Bza,Me) Cba	4,6	2,9	1,7
(2-MeSAde,Me) Cba	2,7	2,3	0,4
(2-MeAde,Me) Cba	4,2	4,2	0,0

ist als die der entsprechenden β -Isomere mit koordinierter Nucleotidbase (Abb. 3, Tab. IV). Koordination der Nucleotidbase (möglich nur bei den β -Isomeren) reduziert die Basizität des Ligandatoms [N-3 der Benzimidazolbase im Cobalamin und (5-

Abb. 3. Protonierung der Nucleotidbase (symbolisiert durch N^+) bei den Methylcorrinoide.

OH-Bza)Cba bzw. N-9 des 2-Methylmercaptoadenins im (2-MeSAde)Cba]. Die Basizität des N-9 des Purinanteils ist bei (2-MeAde)Cba und bei (Ade)Cba wahrscheinlich sehr gering; ihre Beeinflussung durch die Koordination an Kobalt wurde hier nicht untersucht. Der Pyrimidinring der Purincorrinoide ist zumeist basischer als der Imidazolring¹¹. Protonierung des Pyrimidinringes beeinflusst die Koordination der Purinbase im (Ade)-CNCba nicht wesentlich¹².

Die Purin-corrinoide werden, ähnlich wie die Benzimidazol-corrinoide, unter den hier angewandten Arbeitsbedingungen praktisch nur an Kobalt alkylisiert, da durch Belichtung in Gegenwart von Cyanid die Ausgangscorrinoide in guter Ausbeute erhalten werden.

Das Mengenverhältnis (Co- α -Methyl)-corrinoide/(Co- β -Methyl)-corrinoide und seine Deutung

Die relativ einfache Isomerentrennung bei (2-MeAde,Me)Cba, (2-MeSAde,Me)Cba und (5-OH-Bza,Me)Cba wurde nicht zuletzt durch die günstige Relation der beiden Isomere ermöglicht (Tab. V). Diese Corrinoide ergeben bei der Methylierung 15

Tab. V. Mengenverhältnis der bei Methylierung von Kobalt (I)-corrinoide dargestellten Isomere α und β .

Corrinoid	α -Isomer β -Isomer	pH bei Methylierung von Co (I)-Corrinoid *	Affinität zum Cyanidion
Methyl-cobalamin	7/93	4,9	+
(5-OH-Bza,Me) Cba	36/64	2,2	++
	15/85	4,9	
	6/94	10,0	
(2-MeSAde,Me) Cba	15/85	4,9	+++
(2-MeAde,Me) Cba	33/67	4,9	+++ ±
(p-Kresyl,Me) Cba	50/50	4,9	
Methyl-cobyrinsäure	10/90	4,9	
Methyl-cobyrinsäure-hexaamide ⁷	22/78	2,2	
Methyl-cobinamid ²¹	50/50		

* pH 2,2 in 2 M Glyzin-HCl-Puffer; pH 4,9 in 10% NH_4Cl /Zn; pH 10,0 in NaBH_4 /Wasser.

bis 36% α -Isomer, eine Ausbeute, die weitaus höher ist als beim Cobalamin (7%).

Weshalb das Mengenverhältnis der beiden Isomere von Corrinoid zu Corrinoid verschieden ist, ist nicht völlig klar. Die Vermutung¹³, daß die relativ geringe Ausbeute an (Co- α -Methyl)-cobalamin auf den sterischen Einfluß der an C-1 gebundenen Methylgruppe zurückzuführen ist, dürfte nicht zutreffend sein, weil die Methylierung von p-Kresylcobamid¹⁴ und Cobinamid²¹ etwa gleichviel α - und β -Isomer ergibt.

Eine wichtige Rolle bei der Regelung der Relation (Co- α -Methyl)-corrinoide/(Co- β -Methyl)-corrinoide dürfte den Seitenketten mit koordinierbaren Atomen zukommen. So stört anscheinend das Vorhandensein einer corrinoidegebundenen Imidazol- bzw. Carboxylgruppe die Methylierung der α -Position des Kobalts. Dafür sprechen folgende Beobachtungen (Tab. V): Cobalamin, dessen Nucleotidbase sehr gut in der CN-Form koordiniert, ergibt bei der Methylierung eine geringe Ausbeute (7%) an α -Isomer; diese beträgt bei (5-OH-Bza)Cba und (2-MeSAde)Cba, deren Basen schlechter als 5,6-Dimethylbenzimidazol, jedoch noch gut in der CN-Form koordinieren, jeweils 15%; (2-MeAde)Cba, dessen Base relativ schlecht in der CN-Form koordiniert, ergibt 33%, (p-Kresyl)Cba mit nicht-koordinierbarem Aglykon ergibt 50% α -Isomer unter gleichen Bedingungen. Je schwächer die koordinative Bindung zwischen Base (Aglykon) und Kobalt(III) (gemeint ist stets die CN-Form), um so höher ist die relative Ausbeute an α -CH₃-Isomer.

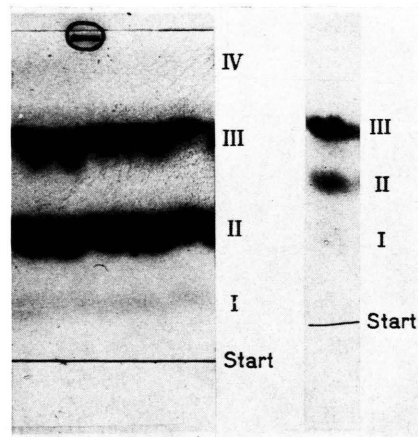
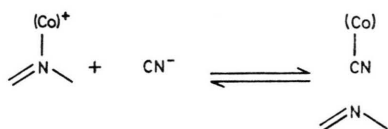


Abb. 2. Links, elektrophoretische Isomerentrennung in 0,5 N Essigsäure nach der Partialsynthese von (2-MeSAde,Me)Cba; I, (2-MeSAde)CNCba; II, (2-MeSAde)MeCba; III, (2-MeSAde/Me)Cba; IV, (2-MeSAde)aqCba. Rechts, aufsteigend-papierchromatographische Isomerentrennung nach der Partialsynthese von (2-MeAde,Me)Cba; Entwickler (in Vol.): *sec*-Butanol/Wasser = 70/30; I, (2-MeAde)aqCba; II, (2-MeAde/Me)Cba; III, (2-MeAde)MeCba.

Wie Versuche von Hogenkamp u. Mitarb.²¹ kürzlich zeigten, verhält sich Cobinamid, ein Corrinoid ohne Nucleotidanteil, in bezug auf die Relation (Co- α -Methyl)-corrinoid / (Co- β -Methyl)-corrinoid gleich wie *p*-Kresyl-cobamid. (Co-¹³CH₃)-cobinamid besteht laut ¹³C-NMR-Spektrum (zwei Signale gleicher Intensität) aus zwei Isomeren, α und β , im Verhältnis von etwa 50/50.

Die Stärke der koordinativen Bindung ergibt sich bei den Benzimidazol-corrinoiden vor allem aus den pK-Werten der Protonierung der Nucleotidbase (etwas genauer: aus der Differenz der pK-Werte von α - und β -Isomer; vgl. Tab. IV). Diese Methode versagt bei den Purincorrinoiden, da hier die Protonierung in schwach saurem pH-Bereich nicht nur dem N-9, sondern auch dem Pyrimidinring der Purinbase gilt [bei (2-MeSAde)Cba] bzw. sich überwiegend auf den Pyrimidinanteil bezieht [bei (2-MeAde)Cba und (Ade)Cba].

Eine weitere Möglichkeit, die Stärke der koordinativen Bindung Co-N_{Imidazol} bei einer Reihe von B₁₂-Formen zu vergleichen, bietet die Reaktion mit Cyanid:



Diese Reaktion ist elektrophoretisch kontrollierbar (das Cyanidion bringt eine negative Ladung mit). Aus den vorhandenen Daten¹⁵ ist ersichtlich, daß die Affinität kompletter Cyano-corrinoide zum Cyanidion (Bildung von Dicyano-corrinoiden) nach folgender Ordnung zunimmt: Cobalamin, (5-OH-Bza)Cba, (2-MeSAde)Cba, (2-MeAde)Cba, (Ade)-Cba. Diese Reihenfolge dürfte generell gelten (nicht nur für die Cyano-corrinoide). Sie entspricht der abnehmenden Stärke der koordinativen Bindung (Tab. V).

Für die Abhängigkeit der Relation (Co- α -Methyl)-corrinoid / (Co- β -Methyl)-corrinoid vom pH-Wert des Mediums während der Methylierung kompletter Kobalt(I)-corrinoide sprechen einige Versuche mit (5-OH-Bza)Cba (Tab. V). Sie ergaben folgende Ausbeuten an α -Isomer: 36% (pH 2,2), 15% (pH 4,9) und 6% (pH 10,0). Auch diese Versuche sprechen dafür, daß die Koordination der Nucleotidbase (sie fürfte in gleicher Reihenfolge zunehmen) die Methylierung der α -Position des Kobalts stört.

Die Methylierung [die Reaktion des Methylierens mit dem nucleophilen Co(I)^{2-4a}] von Benzimidazol-corrinoiden ergibt, auch in saurem pH-Bereich, in welchem die Nucleotidbase der Co(I)-Form protoniert ist, stets weit weniger als 50% α -Isomer. Dies könnte teilweise mit dem Abschirmungseffekt der protonierten Base zusammenhängen. Dieser Abschirmungseffekt besteht bei *p*-Kresyl-cobamid (mit *p*-Kresol als Aglykon) nicht.

Von den inkompletten Corrinoid-carbonsäuren ist bekannt, daß hier die Carboxylgruppe mit dem Kobaltatom koordinieren kann, eventuell über ein Wassermolekül¹⁶. Auf diese Koordination könnte die schlechte Ausbeute an (Co- α -Methyl)-cobyrssäure (Tab. V) zurückgeführt werden.

Es besteht somit wahrscheinlich ein Zusammenhang zwischen der Koordinierbarkeit des Aglykons bzw. eines Seitenkettencarboxyls und der Ausbeute an (Co- α -Methyl)-corrinoid: eine gute Koordinierbarkeit ist mit einer schlechten Ausbeute an α -Isomer verknüpft. Eine schlechte bzw. keine Koordinierbarkeit führt zu guten Ausbeuten an α -Isomer.

Da die Methylierung des Kobaltatoms unter den hier eingehaltenen Bedingungen und die Verteilung der Methylgruppe (Bildung einer spezifischen Relation α -Isomer/ β -Isomer) an Co(I)-Corrinoid stattfindet, muß bereits hier der Einfluß der Basenkoordination auf diese Verteilung einsetzen, d. h. die Base des Co(I)-Corrinoides dürfte in der Lage sein, wenigstens sehr schwach zu koordinieren.

Nach der jetzt geltenden Auffassung¹⁷ sind jedoch die Co(I)-Corrinoid tetrakoordiniert und ihr Kobaltatom ist nicht fähig, Axialliganden zu binden. Diese Auffassung stützt sich vor allem auf das Absorptionsspektrum des B_{12s} mit den Maxima der nicht-koordinierten Nucleotidbase¹⁸. Diese Maxima sind im pH-Bereich 2–10 deutlich sichtbar und sprechen gegen eine Koordination des 5,6-Dimethylbenzimidazol-Anteils. Für die Tetrakoordination der Co(I)-Corrinoid spricht auch die Reaktionsträgheit von B_{12s} gegenüber Cyanid¹⁸ sowie die Ähnlichkeit der Absorptionsspektren von B_{12s} und Cob(I)inamid¹⁷.

Weitere Versuche wären notwendig zur Klärung der Frage, ob das Kobaltatom in den Kobalt(I)-corrinoiden tatsächlich einen fünften Liganden (schwach) binden kann (entsprechend etwa dem Zustand tetrakoordiniert $\rightleftharpoons$ pentakoordiniert), oder ob andere Kräfte im Spiel sind, die sich ähnlich auswirken.

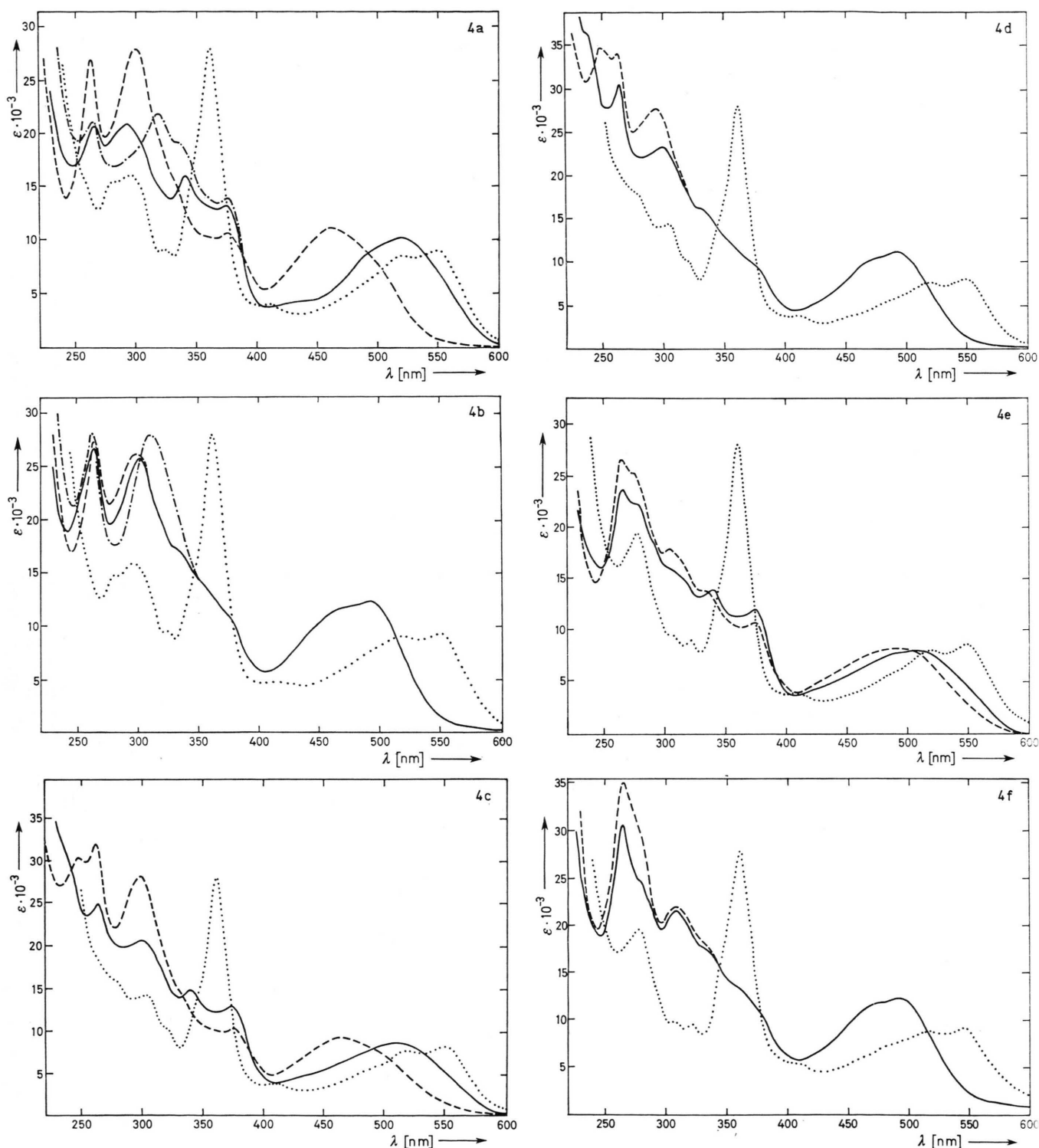


Abb. 4 a bis 4 f. Absorptionsspektren einiger Methyl-corrinnoide in Wasser bzw. in 0,02 M NaHCO₃ (—), in 0,05 N HCl (— · — · —), in 0,05 N NaOH (— · — · —) und in Wasser, nach Belichtung in Gegenwart einer Spur Blausäure (·····). 4 a, (5-OH-Bza) MeCba; 4 b, (5-OH-Bza/Me) Cba; 4 c, (2-MeSAde) MeCba; 4 d, (2-MeSAde/Me) Cba; 4 e, (2-MeAde) MeCba; 4 f, (2-MeAde/Me) Cba.

Tab. VI. Absorptionsmaxima der Methyl-corrinoide*.

Corrinoid	in Wasser bzw. in 0,02 M NaHCO ₃		in 0,05 N HCl		in 0,05 N NaOH	
	$\lambda_{\max}$ [nm]	$\epsilon \cdot 10^{-3}$	$\lambda_{\max}$ [nm]	$\epsilon \cdot 10^{-3}$	$\lambda_{\max}$ [nm]	$\epsilon \cdot 10^{-3}$
(5-OH-Bza) MeCba	266	20,8	264	27,0	264	21,2
	294	21,0	300	28,0	318	22,0
	340	15,9	375	10,6	334 Sch	19,2
	374	13,2	460	11,1	374	13,8
	520	10,2			520	10,2
(5-OH-Bza/Me) Cba	264	26,6	264	27,4	263	28,1
	302	25,6	300	26,0	310	28,0
	332 Sch	17,4	492	12,2	492	12,2
	492	12,2				
(2-MeAde) MeCba	267	23,7	264	26,6		
	276 Sch	22,4	273 Sch	25,4		
	302 Sch	16,2	304	17,8		
	340	13,8	332 Sch	13,8		
	375	11,9	374	10,6		
	510	8,0	490	8,1		
(2-MeAde/Me) Cba	264	30,6	264	35,2		
	280 Sch	24,8	308	22,0		
	308	21,7	332 Sch	17,4		
	332 Sch	17,4	492	12,2		
	492	12,2				
(2-MeSAde) MeCba	263	24,9	248	30,5		
	302	20,6	262	32,1		
	340	14,9	298	28,2		
	374	13,0	374	10,3		
	515	8,6	464	9,2		
(2-MeSAde/Me) Cba	238 Sch	36,5	248	34,8		
	264	30,4	263	34,1		
	300	23,6	294	27,9		
	332 Sch	16,3	332 Sch	16,3		
	492	11,1	492	11,1		

* Sch, Schulter. ϵ -Werte ermittelt nach Belichtung in Gegenwart einer Spur Blausäure und Bildung von Cyano-corrinoiden ($\epsilon_{361 \text{ nm}} = 28060$).

Eigenschaften der Methyl-corrinoide

α -Isomere

Die Absorptionsspektren (Abbn. 4 b, 4 d, 4 f, Tab. VI) der (Co- α -Methyl)-corrinoide sind bei $\lambda > 350 \text{ nm}$ einander gleich und pH-unabhängig, da die beiden Axialliganden (H_2O und CH_3^-) festgelegt sind. Die Absorptionsspektren zeichnen sich durch das sehr charakteristische Maximum bei 492 nm aus. Die pH-Abhängigkeit der Spektren bei $\lambda < 350 \text{ nm}$ ist auf die Protonierung der Base bzw. auf die Dissoziation des phenolischen Hydroxyls im (5-OH-Bza/Me) Cba (Abb. 4 b, Tab. VI) zurückzuführen.

β -Isomere

Die Absorptionsspektren (Abbn. 4 a, 4 c, 4 e, Tab. VI) der dargestellten kompletten (Co- β -Me-

thyl)-corrinoide in Wasser sind bei $\lambda > 350 \text{ nm}$ einander gleich. Bei (5-OH-Bza) MeCba (Abb. 4 a, Tab. VI) ist die pH-Abhängigkeit des Absorptionsspektrums bei $\lambda < 350 \text{ nm}$ auf die Basenprotonierung und auf das Gleichgewicht $\text{Phenol} \rightleftharpoons \text{Phenolat}$ zurückzuführen, ähnlich wie beim α -Isomer. Die Basenprotonierung führt ferner zum Koordinationsausfall und zur Verschiebung der langwelligen Bande von 520 nm nach 464 nm , verknüpft mit dem Farbwechsel von Orangerot nach Gelb, ähnlich wie dies bei Methylcobalamin^{2-4a} der Fall ist.

Am Kobalt methylierte Purin-corrinoide werden hier wahrscheinlich erstmalig beschrieben. Ihr Vergleich mit den adenosylierten Purincorrinoiden sowie auch untereinander ist interessant.

Im (Ade)AdoCba ist – infolge des starken Transeffektes der Adenosylgruppe – die Nucleotidbase nicht koordiniert. Dies ergibt sich aus dem

Absorptionsspektrum dieses Corrinoide, welches im meßbaren pH-Bereich die „base off“-Form (und gelbe Farbe) hat²². Im (Ade)MeCba und im (2-MeAde)MeCba (Abb. 4 e, Tab VI) ist die Nucleotidbase in saurem und in schwach basischem pH-Bereich (zumindest bis pH 10,0) koordiniert, da die Absorptionsspektren in diesem pH-Bereich einander fast gleich sind und überwiegend der „base on“-Form entsprechen²³. Die relativ geringen Spektrenunterschiede im Sauren und im Alkalischen sind wahrscheinlich darauf zurückzuführen, daß die Protonierung des Purinringes überwiegend im Pyrimidinanteil erfolgt. Diese ist hier gegenüber der Protonierung des Imidazolanteils energetisch begünstigt¹¹ und hat wenig Einfluß auf die Koordination, welche höchstwahrscheinlich N-9 beansprucht¹².

Anders verhält sich (2-MeSAde)MeCba. Es ähnelt in bezug auf die pH-Abhängigkeit seines Absorptionsspektrums nicht den typischen Purin-corrinoiden, sondern eher den Benzimidazol-corrinoiden. Ähnlich wie bei den letztgenannten B₁₂-Formen wird beim (2-MeSAde)MeCba in 0,05 N HCl die Koordination der Nucleotidbase unterbrochen (Bandenverschiebung von 515 nm nach 464 nm; vgl. Abb. 4 c und Tab. VI), wahrscheinlich durch Protonierung an N-9 der Base. Dies entspricht der Erwartung, denn es ist bekannt¹¹, daß eine an C-2 des Purinringes gebundene Methylmercaptogruppe das Proton (auch) zum Imidazolring dirigiert.

Tab. VII. Aktivität einiger (Co- α -Methyl)- und (Co- β -Methyl)-corrinoide, der durch ihre Belichtung in Gegenwart von Cyanid gewonnenen Cyanocorrinoide sowie des Aquacobalamins gegenüber *Escherichia coli* 113-3.

Corrinoid	Kobalt-Liganden			
	α -CH ₃	β -CH ₃	Cyano	Aqua
Cobalamin	20	100	100	100
(2-MeSAde)Cba	20	58	61	
(2-MeAde)Cba	55	77	50	
(p-Kresyl)Cba	16	54	15	

Mikrobiologischer Test

Mikrobiologische Tests am Isomerenpaar (Co- α -Methyl)-cobalamin/(Co- β -Methyl)-cobalamin wurden kürzlich durchgeführt¹⁰. (Co- α -Methyl)-cobalamin zeigte etwa 20% Bioaktivität des Cyano-cobalamins bei *Escherichia coli* 215 und *Ochromonas malhamensis*. Die Bioaktivität des (Co- β -Methyl)-cobalamins war 100% (steril filtrierte Probe) bzw. über 100% (autoklavierte Probe). Man vermutete zunächst, daß die Bioaktivität des (Co- α -Methyl)-cobalamins auf eine Beimengung von (Co- β -Methyl)-cobalamin (verursacht durch Isomerisierung) zurückzuführen ist¹⁹. Die neuen, an mehreren Isomerenpaaren von Methyl-corrinoiden gewonnenen Ergebnisse (Tab. VII) sprechen jedoch dafür, daß die (Co- α -Methyl)-corrinoide als solche *E. coli*-aktiv sein können.

Wir danken der Deutschen Forschungsgemeinschaft und dem Fonds der Chemischen Industrie für die Unterstützung dieser Arbeit.

¹ IUPAC-IUB Commission on Biochemical Nomenclature, *Biochemistry* **13**, 1555 [1974].

² W. Friedrich, Vitamin B₁₂ und verwandte Corrinoide, **Bd. III/2** (R. Ammon u. W. Dirscherl, Hrsg.), Thieme, Stuttgart 1975.

³ J. M. Pratt, *Inorganic Chemistry of Vitamin B₁₂*, Academic Press, New York 1972.

⁴ D. Dodd u. M. D. Johnson, *J. Organometal. Chem.* **52**, 1–232 [1973].

^{4a} B. M. Babior (Hrsg.), *Cobalamin, Biochemistry and Pathophysiology*, Wiley 1975.

⁵ W. Friedrich, *Biochem. Z.* **342**, 143 [1965]; *Z. Naturforsch.* **21b**, 138 [1966]; W. Friedrich, H. Ohlms, W. Sandeck u. R. Bieganski, *Z. Naturforsch.* **22b**, 839 [1967]; W. Friedrich u. M. Moskophidis, *Z. Naturforsch.* **23b**, 804 [1968]; R. A. Firth, H. A. O. Hill, J. M. Pratt u. R. G. Thorp, *Analyt. Biochem.* **23**, 429 [1968]; *J. Chem. Soc., A* **1968**, 453.

⁶ W. Friedrich u. J. P. Nordmeyer, *Z. Naturforsch.* **24b**, 588 [1969].

⁷ W. Friedrich u. R. Messerschmidt, *Z. Naturforsch.* **24b**, 465 [1969]; **25b**, 972 [1970]; W. Friedrich u. M. Moskophidis, *Z. Naturforsch.* **25b**, 979 [1970].

⁸ W. Friedrich u. R. Messerschmidt, *Z. Naturforsch.* **24b**, 465 [1969].

⁹ Zit. 3, S. 128.

¹⁰ T. Kamikubo, Y. Takeda, M. Hayashi u. W. Friedrich, *Agr. Biol. Chem. (Tokyo)* **36**, 164 [1972].

¹¹ Der Purinring wird im Pyrimidinanteil bevorzugt protoniert; vgl. U. Reichman, F. Bergmann, D. Lichtenberg u. Z. Neiman, *J. Chem. Soc. Perkin Trans. I* **1973**, 793.

¹² H. A. O. Hill, J. M. Pratt, R. G. Thorp, B. Ward u. R. J. P. Williams, *Biochem. J.* **120**, 263 [1970].

¹³ Zit. 3, S. 129.

¹⁴ W. Friedrich u. M. Moskophidis, *Z. Naturforsch.* **25b**, 979 [1970].

¹⁵ W. Friedrich u. K. Bernhauer, *Medizinische Grundlagenforschung, Bd. II* (K. Fr. Bauer, Hrsg.), S. 661, Thieme, Stuttgart 1959.

¹⁶ W. Friedrich, *Z. Naturforsch.* **21b**, 138 [1966].

¹⁷ Zit. 3, S. 109.

¹⁸ G. H. Beaven u. E. A. Johnson, *Nature* **176**, 1264 [1955].

¹⁹ Zit. 2, S. 303.

²⁰ M. Moskophidis u. W. Friedrich, *Z. Naturforsch.* **30c**, 460 [1975].

²¹ T. E. Needham, N. A. Matwiyoff, T. E. Walker u. H. P. C. Hogenkamp, *J. Amer. Chem. Soc.* **95**, 5019 [1973].

²² J. N. Ladd, H. P. C. Hogenkamp u. H. A. Barker, *J. Biol. Chem.* **236**, 2114 [1961].

²³ Aus diesem Grunde dürften der Name „Co α -aqua-co β -methyl-(2-methyladenylcobamide)“ und der entsprechende Kurzname „(2-MeAde/aq)MeCba“ im Zit. 1, Seite 1558 unten rechts, nicht richtig sein.