

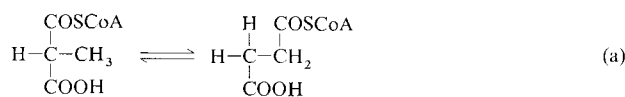
Umkristallisation wurde der Komplex in CH_2Cl_2 gelöst, mit Hexan überschichtet und anschließend 3 d auf -40°C gekühlt. Es wurden 51 mg (98 %) **7c** in Form weißer Kristalle erhalten.

- [9] Weitere Untersuchungen zur CS_2 - und CO_2 -Insertion in Metall-Heteroatom-Bindungen: Lit. [1c] und a) B. P. Sullivan, M. R. M. Bruce, T. R. O'Toole, C. M. Bolinger, E. Megehee, H. Thorp, T. J. Meyer, *Catalytic Activation of Carbon Dioxide* (Hrsg.: W. M. Ayers), *ACS Symp. Ser.* **363**, 1988, S. 52–90; b) A. Shaver, B. S. Lum, P. Bird, K. Arnold, *Inorg. Chem.* **1989**, *28*, 1900; c) L. J. Newman, R. G. Bergman, *J. Am. Chem. Soc.* **1985**, *107*, 5314.
- [10] Die Insertion von CO in die Ir-O-Bindung von *trans*-[Ir(CO)(OR)(PPh₃)] verläuft nach einem ionischen Mechanismus: W. M. Rees, M. R. Churchill, J. C. Fetting, J. D. Atwood, *Organometallics* **1985**, *4*, 2179.
- [11] Ein starker Solvenseffekt für die CO_2 -Insertion in eine Re-O-Bindung wurde mit einem Metall-Ligand-Charge-Transfer erklärt (siehe Lit. [1c]).
- [12] Eine photoinduzierte CS_2 -Insertion in eine W-CH₃-Bindung ist bekannt: D. J. Darensbourg, H. P. Wiegrefe, J. H. Reibenspies, *Organometallics* **1991**, *10*, 6. Bei unseren Versuchen änderte sich die Insertionsgeschwindigkeit von CS_2 bei rigorosem Ausschluß von Streulicht nicht.

Nachweis von radikalischen Zwischenstufen in der Coenzym-B₁₂-abhängigen Methylmalonyl-CoA-Mutase-Reaktion durch ESR-Spektroskopie **

Von Ymin Zhao, Peter Such und János Rétey*

Methylmalonyl-CoA-Mutase katalysiert die reversible Umlagerung von (2*R*)-Methylmalonyl-CoA zu Succinyl-CoA unter Wanderung der COSCoA-Gruppe [Gl. (a)]. Sowohl der Reaktionsmechanismus als auch die Rolle von Coenzym B₁₂ sind noch umstritten. Modellversuche deuten einmal auf einen radikalischen^[2], ein anderes Mal auf einen nicht-radikalischen^[3] Mechanismus hin. Der entscheidende Initiationschritt, die Abstraktion eines H-Atoms von der nicht-aktivierten Methylgruppe, konnte jedoch bis jetzt in keinem Modell nachgewiesen werden. Vom chemischen Standpunkt aus wäre ein Radikalmechanismus der plausibelste.



In einigen Coenzym-B₁₂-abhängigen Enzymreaktionen ist es gelungen, radikalische Zwischenstufen durch ESR-Spektroskopie nachzuweisen^[4–9]. Die entsprechenden Enzyme, die Ethanolamin-Ammoniak-Lyase, Dioldehydratase und Nucleosidtriphosphat-Reduktase, katalysieren aber keine Umlagerungen des Kohlenstoffgerüsts wie die Methylmalonyl-CoA-Mutase und einige weitere Coenzym-B₁₂-abhängige Mutasen. Der einzige Bericht^[10] über eine ESR-spektroskopische Untersuchung der Methylmalonyl-CoA-Mutase enthält negative Resultate. In Anbetracht der Zugänglichkeit größerer Mengen hochgereinigter Methylmalonyl-CoA-Mutase haben wir den Nachweis von Radikalen im enzymatischen System nochmals versucht.

In einem ESR-Röhrchen aus Quarz ($d = 2 \text{ mm}$) wurde Methylmalonyl-CoA-Mutase (5.3 mg, 35 nmol, 120 U) mit Coenzym B₁₂ (Adenosylcobalamin, 0.1 mg, 63 nmol) in 15 mL Kaliumphosphatpuffer (0.1 M, pH 6.8) für 5 min bei

25°C unter Argon inkubiert. Nach Zugabe von (2*R,S*)-Methylmalonyl-CoA (1.5 mg, 1.7 μmol) und weiterer einminütiger Inkubation wurden die Proben in flüssigen Stickstoff getaucht. Um eine eventuelle Photolyse zu vermeiden, wurden die Proben vor Licht geschützt^[11].

Abbildung 1 A zeigt das ESR-Spektrum des Methylmalonyl-CoA-Mutase-Coenzym-B₁₂-Holoenzym. Es ist kein ausgeprägtes, sich vom Untergrundrauschen deutlich abhebendes Signal zu erkennen. Erst in Gegenwart des Substrates tritt ein deutliches ESR-Signal um 320 mT auf (Abb. 1 B).

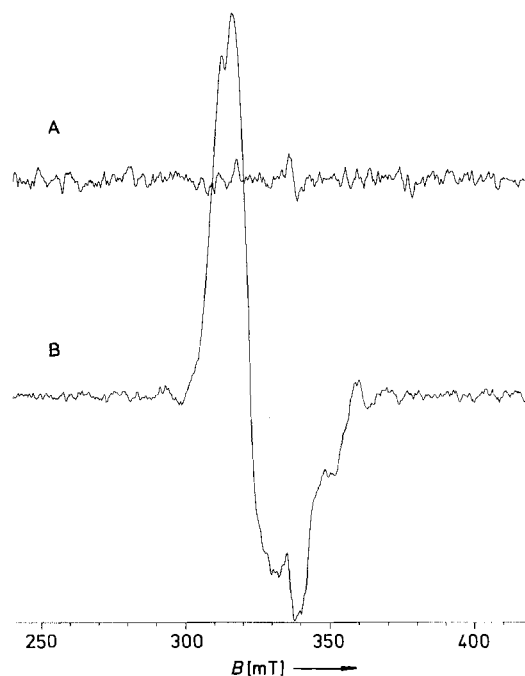


Abb. 1. A: ESR-Spektrum des Methylmalonyl-CoA-Mutase-Coenzym-B₁₂-Holoenzym. B: ESR-Spektrum des Methylmalonyl-CoA-Mutase-Coenzym-B₁₂-Holoenzym nach Zugabe von Substrat (Methylmalonyl-CoA).

Wegen der Breite und Komplexität des Signals ist ein genauer g -Faktor schwer zu bestimmen. Peaks zwischen $g = 2.16$ und 1.86 sind vorhanden, der Wendepunkt liegt bei $g = 2.06$. Die Zuordnung der Signale zu definierten paramagnetischen Spezies ist noch nicht möglich. Für den g -Faktor von Vitamin B₁₂ (Co^{II}) findet man Werte von 2.00 oder 2.30^[12], für ein freies Alkylradikal einen Wert von 2.002. Es ist anzunehmen, daß in enzymgebundenem Zustand eine bisher unbekannte Wechselwirkung zwischen solchen paramagnetischen Spezies stattfindet. Außer der Substratabhängigkeit des ESR-Spektrums sprechen zwei weitere Gründe gegen ein Artefakt. Mit synthetischen Substratanaloga erhielten wir ähnliche, aber im Detail unterschiedliche ESR-Signale^[13]. Vergleichbar breite, schwer zu interpretierende Spektren wurden auch bei einem ternären Komplex aus Ribonucleotid-Reduktase, Coenzym B₁₂ und Guanosin-5'-triphosphat (GTP) beobachtet^[9].

Unsere Experimente belegen, daß die Homolyse der Cobalt-Kohlenstoff-Bindung des Coenzym erst nach der Substratzugabe stattfindet. Die Homolyse muß somit durch eine Konformationsänderung des Enzymproteins induziert werden. Es ist wahrscheinlich, daß sich an der Aktivstelle augenblicklich ein Gleichgewicht zwischen Substrat und Produkt (Succinyl-CoA) oder enzymgebundenen Zwischenstufen einstellt. Die Lage dieser „inneren“ Gleichgewichte ist unbekannt und kann sich vom Gleichgewicht der freien Substrate deutlich unterscheiden. Dies ist unseres Wissens der erste

[*] Prof. Dr. J. Rétey, Dipl.-Chem. Y. Zhao
Lehrstuhl für Biochemie im Institut
für Organische Chemie der Universität
Richard-Willstätter-Allee, W-7500 Karlsruhe 1
Dr. P. Such
Bruker Analytische Meßtechnik GmbH
Am Silberstreifen, W-7512 Rheinstetten 4

[**] Diese Arbeit wurde von der Deutschen Forschungsgemeinschaft und dem Fonds der Chemischen Industrie (Y. Z. und J. R.) gefördert.

direkte Nachweis von Radikalen in einer Coenzym-B₁₂-abhängigen Umlagerung eines Kohlenstoffgerüsts.

Eingegangen am 23. August 1991 [Z 4885]

CAS-Registry-Nummern:

Methylmalonyl-CoA-Mutase, 9023-90-9; Coenzym B₁₂, 13870-90-1.

- [1] Übersicht: J. Rétey in *Vitamin B₁₂*, Vol. 2 (Hrsg.: D. Dolphin), Wiley, New York 1982, S. 357–379.
- [2] S. Wollowitz, J. Halpern, *J. Am. Chem. Soc.* **1984**, *106*, 8319–8321; *ibid.* **1988**, *110*, 3112–3120.
- [3] G. Choi, S.-C. Choi, A. Galan, B. Wilk, P. Dowd, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1990**, *87*, 3174–3176.
- [4] B. M. Babior, T. H. Moss, D. C. Gould, *J. Biol. Chem.* **1972**, *247*, 4389–4392.
- [5] B. M. Babior, T. H. Moss, W. H. Orme-Johnson, H. Beinert, *J. Biol. Chem.* **1974**, *249*, 4537–4544.
- [6] S. A. Cockle, H. A. O. Hill, R. J. P. Williams, S. P. Davies, M. A. Foster, *J. Am. Chem. Soc.* **1972**, *94*, 275–277.
- [7] T. H. Finlay, J. Valinsky, A. S. Mildvan, R. H. Abeles, *J. Biol. Chem.* **1973**, *248*, 1285–1290.
- [8] K. L. Schepler, W. R. Dunham, R. H. Sauds, J. A. Fee, R. H. Abeles, *Biochim. Biophys. Acta* **1975**, *397*, 510–518.
- [9] W. H. Orme-Johnson, H. Beinert, R. L. Blakley, *J. Biol. Chem.* **1974**, *249*, 2338–2343.
- [10] J. D. Brodie, A. D. Woodams, B. M. Babior, *Fed. Proc.* **1972**, *31*, 1578.
- [11] Die ESR-Spektren wurden mit einem ESP 300 E 10/12 ESR-Spektrometer der Firma Bruker Analytische Meßtechnik bei einer Mikrowellenfrequenz von 9.5 GHz und einer Mikrowellenleistung von 5 mW gemessen. Zur Magnetfeldkalibrierung wurde ein NMR-Gaußmeter und ein Frequenzzähler (Modell HP 5350B) verwendet. Als Probenkopf diente ein zylindrischer TM-Resonator. Die ESR-Spektren wurden bei einer Temperatur von 77 K aufgenommen.
- [12] J. R. Pilbrow in *Vitamin B₁₂* (Hrsg.: B. Zagalak, W. Friedrich), de Gruyter, Berlin, **1979**, S. 505–510.
- [13] J. Rétey, P. Such, Y. Zhao, unveröffentlicht.

Moleküldynamikrechnungen für Peptide in Dimethylsulfoxid: Eliminierung von Vakuumeffekten**

Von Michael Kurz, Dale F. Mierke und Horst Kessler*

Moderne NMR-Techniken zur Bestimmung struktureller Parameter^[1] und anschließende Moleküldynamik-(MD)-Simulation^[2] sind die wichtigsten Hilfsmittel bei der Konformationsbestimmung in Lösung. Bis vor kurzem wurden die meisten MD-Simulationen im Vakuum durchgeführt. Derartige Simulationen ergeben bei vielen Peptiden interne Wasserstoffbrücken, für die es keine experimentellen Belege gibt. Ein Beispiel dafür ist das häufige Auftreten von γ -Schleifen in cyclischen Hexapeptiden. Normalerweise würde man hier lediglich zwei β -Schleifen erwarten. Die zusätzlichen γ -Schleifen bilden sich entlang der „Längsseite“ des Peptids und führen zu einem starken Abknicken des gesamten Moleküls. Bei Röntgenstrukturanalysen wurde dies jedoch nie festgestellt^[3]. Wir zeigen am Beispiel der C₂-symmetrischen Modellverbindung *cyclo*-(D-Ala¹-Ala²-Ala³-D-Ala⁴-Ala⁵-Ala⁶-), daß es sich bei diesen γ -Schleifen um reine Vakuumeffekte handelt, die man durch eine MD-Simulation unter Berücksichtigung des Lösungsmittels leicht eliminieren kann.

Für alle MD-Simulationen wurde das GROMOS-Programmpaket verwendet^[4]. Die Parameter für Dimethylsulfoxid (DMSO) wurden aus einer Röntgenstrukturanalyse^[5] und einer mikrowellenspektroskopischen Studie^[6]

übernommen. Die Details sind in Lit.^[7] beschrieben. Mit diesen Parametern ergeben sich bei den MD-Simulationen Wasserstoffbrücken zwischen DMSO und Peptid, die mit den Daten der Röntgenstrukturanalyse eines cyclischen Peptids von Karle et al.^[8] gut übereinstimmen.

Für das Modellpeptid *cyclo*-(D-Ala¹-Ala²-Ala³-D-Ala⁴-Ala⁵-Ala⁶-) wurde zunächst eine Restrained-MD-Simulation über 100 ps im Vakuum durchgeführt. Dabei wurden 30 Abstände, die aus einem 500 MHz-ROESY-NMR-Spektrum (150 ms Mischzeit) erhalten wurden, verwendet. Für die Analyse der MD-Resultate wurden nur die letzten 60 ps herangezogen. Wie zu erwarten war, ergab sich eine C₂-symmetrische Konformation mit zwei β II'-Schleifen, wobei die D-Aminosäuren jeweils die Position i+1 einnahmen (Abb. 1a). Zusätzlich waren auch zwei γ -Schleifen mit Wasserstoffbrücken zwischen D-Ala¹-NH und Ala⁵-O sowie D-Ala⁴-NH und Ala²-O populiert, die zu dem erwähnten Abknicken führen (Tabelle 1).

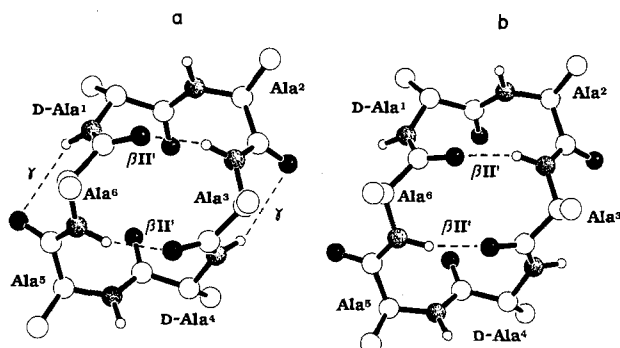


Abb. 1. Struktur von *cyclo*-(D-Ala¹-Ala²-Ala³-D-Ala⁴-Ala⁵-Ala⁶-) nach 100 ps MD-Simulation a) im Vakuum, b) in DMSO.

Tabelle 1. Intramolekulare Wasserstoffbrücken während der MD-Simulationen im Vakuum und in DMSO [a].

H-Brücke zwischen	und	Schleife	Distanz [b] [pm]	Winkel [°]	Population [%]
Vakuum					
Ala ³ -NH	Ala ⁶ -O	β II'	303	153	97
Ala ⁶ -NH	Ala ³ -O	β II'	303	153	97
D-Ala ¹ -NH	Ala ⁵ -O	γ	335	135	58
D-Ala ⁴ -NH	Ala ² -O	γ	335	135	54
DMSO					
Ala ³ -NH	Ala ⁶ -O	β II'	291	165	91
Ala ⁶ -NH	Ala ³ -O	β II'	297	160	90

[a] Die Kriterien für das Vorliegen einer Wasserstoffbrücke sind ein Donor-Acceptor-Abstand < 350 pm und ein Winkel N-H-O > 120°. [b] Abstand N-O.

Mit der so erhaltenen Struktur wurde nun eine Restrained-MD-Simulation in DMSO durchgeführt. Dazu wurde das Molekül in die Mitte eines Lösungsmittelkäfigs, bestehend aus 116 DMSO-Molekülen, gesetzt. Dies entspricht einer Konzentration von 100 mmol L⁻¹, die den experimentellen Meßbedingungen (ca. 50 mmol L⁻¹) sehr ähnlich ist. Wie im Vakuum erfolgte die MD-Simulation unter Verwendung des SHAKE-Algorithmus mit einer Schrittweite von 2 fs. Zunächst rechnet man 10 ps bei 300 K mit einer Kraftkonstante für die „restraints“ von 2500 kJ mol⁻¹ nm⁻² und einer starken Kopplung ans Wärmebad (die Temperaturrelaxationszeit betrug 0.01 ps). Anschließend wurde bei derselben Kraftkonstante und einer schwachen Anbindung an das Wärmebad (Temperaturrelaxationszeit 0.1 ps) 40 ps weiter simuliert. Für die Analyse schließlich wurden die Kraftkonstante auf 1000 kJ mol⁻¹ nm⁻² herabgesetzt und nochmals 50 ps gerechnet.

[*] Prof. Dr. H. Kessler, Dipl.-Chem. M. Kurz, Dr. D. F. Mierke
Organisch-chemisches Institut der Technischen Universität München
Lichtenbergstraße 4, W-8046 Garching

[**] Diese Arbeit wurde von der Deutschen Forschungsgemeinschaft und dem Fonds der Chemischen Industrie gefördert.