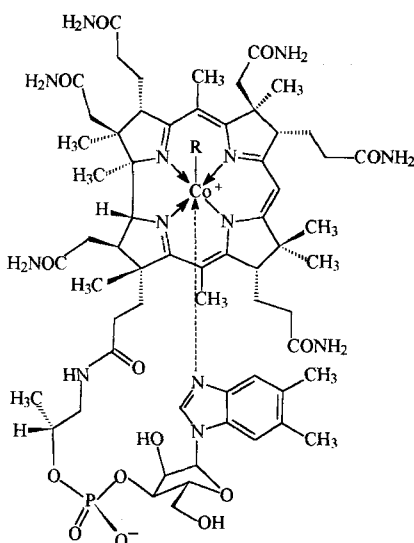


Vitamin B₁₂: Die Schleier lüften sich**

Bernhard Kräutler* und Christoph Kratky*

Professor Albert Eschenmoser zum 70. Geburtstag gewidmet

Vitamin B₁₂, der vor fast 50 Jahren erstmals isolierte corrinoid Cobalt-Komplex, ist und bleibt eine für Chemiker, Mediziner und Biologen außergewöhnlich faszinierende Verbindung (Schema 1). Unter den mehreren hundert Proteinen, deren



Schema 1. Strukturformeln von Vitamin-B₁₂-Derivaten. R = CN: Vitamin B₁₂; R = CH₃: Methylcob(III)alamin; R = 5'-Desoxy-5'-adenosyl: Coenzym B₁₂; R = e⁻: Cob(II)alamin.

dreidimensionale Strukturen im letzten Jahr mit atomarer Auflösung aufgeklärt wurden, stach die Röntgenstrukturanalyse der B₁₂-bindenden Domäne der (Cobalamin-abhängigen) Methioninsynthase (einer Methyltransferase) aus *Escherichia coli* ganz besonders hervor^[1, 2]. Sie lieferte erstmals einen Einblick in die Struktur eines B₁₂-bindenden Proteins und deckte dabei eine völlig unerwartete Facette der B₁₂-Chemie auf: In diesem Protein übernimmt eine von der Peptidkette zur Verfügung gestellte Histidin-Imidazoleinheit den Platz der in Lösung axial koordinierenden Nucleotidfunktion des B₁₂ (siehe Abb. 3). Der drastische Konstitutionsunterschied zwischen isoliertem und proteingebundenem B₁₂ relativiert die Bedeutung der typischen und wohl einzigartigen Benzimidazol-Funktion

der nucleotidhaltigen B₁₂-Derivate, die diesen (neben dem Corrin-Liganden selbst) in der Reihe der porphyrinoiden Cofaktoren eine strukturelle Sonderstellung verleiht^[3].

Die peripher kovalent gebundene Pseudo-Nucleotidfunktion der „kompletten“ Corrinoiden, wie die von Vitamin B₁₂ und anderer Cobalamine, koordiniert stets intramolekular in einem strukturell gleichbleibenden Muster. Kürzlich konnte gezeigt werden, daß die intramolekular bindende, sperrige Nucleotidfunktion eine verstärkte Aufwölbung des Corrin-Liganden bewirkt^[4, 5], was insbesondere im Zusammenhang mit der noch immer rätselhaften, enzymatischen Aktivierung des Coenzym B₁₂ von Interesse ist (siehe z.B. Lit. [6]). Eine deutliche Beschleunigung der Homolyse der organometallischen Bindung des proteingebundenen Coenzym B₁₂ ist nach den gegenwärtigen Vorstellungen eine entscheidende Voraussetzung für die radikalischen Coenzym-B₁₂-katalysierten Enzymreaktionen (Übersichten: Lit. [6, 7], Abb. 1).

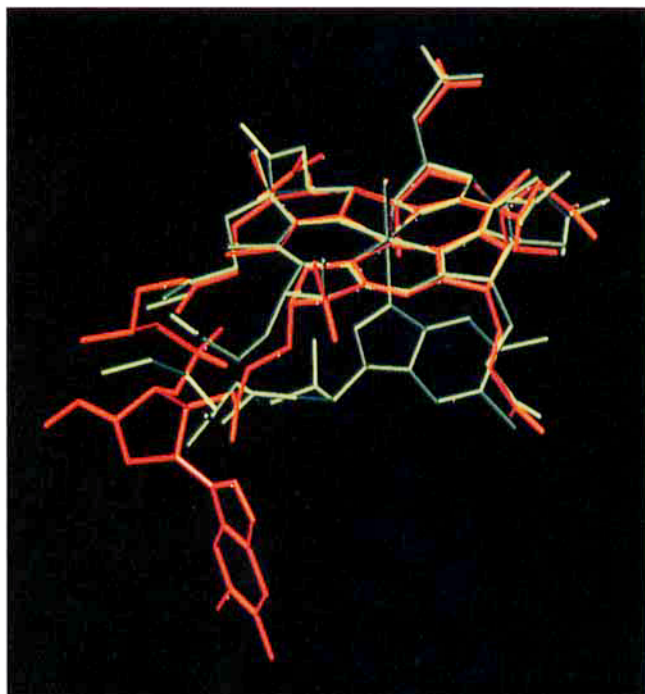


Abb. 1. Überlagerung der Strukturen von Methylcob(III)alamin im Einkristall („base-on“, grün) und in der B₁₂-bindenden Domäne der Methioninsynthase aus *Escherichia coli* („base-off“, rot).

Mit der von Drennan, Huang, Drummond, Matthews und Ludwig publizierten Röntgenstrukturanalyse der Struktur der Cobalamin-bindenden Domäne der Methioninsynthase aus *Escherichia coli*^[1, 2] wurden mit einem Schlag alle bisherigen Überlegungen zur biologischen Rolle der intramolekular bindenden Benzimidazol-Funktionen in „kompletten“ Vitamin-

[*] Prof. Dr. B. Kräutler
Institut für Organische Chemie der Universität
Innrain 52a, A-6020 Innsbruck (Österreich)
Telefax: Int. + 512/507-2892
E-mail: Bernhard.Kraeutler@uibk.ac.at

Prof. Dr. C. Kratky
Institut für Physikalische Chemie der Universität
Heinrichstraße 28, A-8010 Graz (Österreich)
Telefax: Int. + 316/322248
E-mail: Kratky@bkfug.kfunigraz.ac.at

[**] Die Arbeiten der beiden Autoren auf dem B₁₂-Gebiet wurden vom Österreichischen Fonds zur Förderung der wissenschaftlichen Forschung, Projekt-Nr. 9334 und 10816 (B. K.), 8371 und 9542 (C. K.), und vom Jubiläumsfonds der Österreichischen Nationalbank, Projekt-Nr. 4991 (C. K.), gefördert.

B₁₂-Derivaten in Frage gestellt: Das untersuchte 27-kDa-Segment der 136-kDa-Methioninsynthase kann für sich den Methyltransfer nicht katalysieren, es bindet aber Methylcob(III)-alamin. Der metallorganische, corrinoide Cofaktor ist nicht in seiner aus den Untersuchungen in Lösung und im Einkristall bekannten^[8], sogenannten „base-on“-Konstitution gebunden, sondern in einer für Methylcob(III)alamin bislang unbekannten „base-off“-Form (siehe Abb. 1), wobei eine externe (proteinständige) Imidazol-Funktion als axialer Ligand dient. Die Nucleotidfunktion wird in der Methioninsynthase in ihren koordinativ-elektronischen Eigenschaften derart gut durch das Imidazol ersetzt, daß diese konstitutionelle Veränderung in früher durchgeführten ESR- und UV/Vis-spektroskopischen Untersuchungen am Holoenzym nicht erkannt worden war^[9].

Die Methioninsynthase aus *Escherichia coli* katalysiert die Bildung von Tetrahydrofolat und Methionin aus N⁵-Methyl-Tetrahydrofolat und Homocystein und damit (formal!) den Transfer einer Methylgruppe als ein Methyl-Kation. Dieser Methylgruppen-Transfer findet aller Wahrscheinlichkeit nach als Sequenz aus zwei nucleophilen Substitutionsschritten statt (Abb. 2), da nach Untersuchungen mit isotoopenmarkiertem N⁵-(HDT)Methyl-Tetrahydrofolat insgesamt stereochemische Retention festgestellt wird (entsprechend zweifacher stereochemischer Inversion siehe z.B. Lit.^[9]).

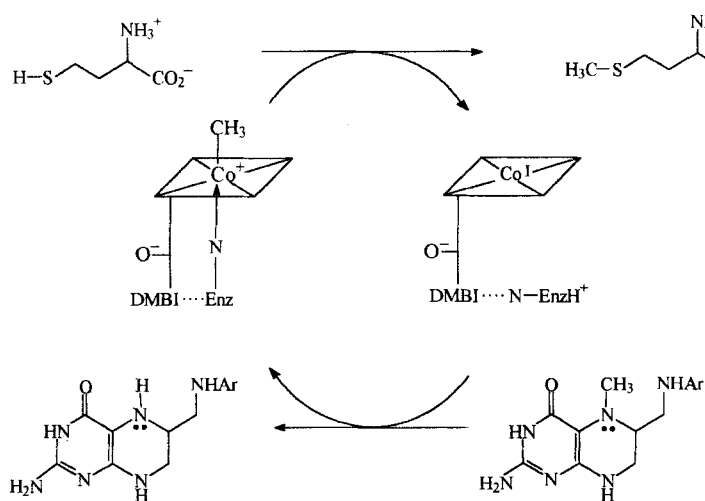


Abb. 2. Schematische Darstellung der Cobalamin-abhängigen Biosynthese von Methionin aus *Escherichia coli*: Methylgruppentransfer von N⁵-Methyl-Tetrahydrofolat zu Homocystein via enzymgebundenes Methylcobalamin und Cob(II)alamin (DMBI = 5,6-Dimethylbenzimidazol).

Das proteingebundene Corrinoid tritt im Katalysezyklus einerseits in Form des (nun) strukturell bekannten, enzymgebundenen Methylcob(III)alamin auf, andererseits als oxidationsempfindliches, hochnucleophiles Cob(II)alamin. Obwohl über die Struktur des letzteren (auch in Lösung) noch geringe Kenntnisse vorliegen, gibt es einige Indizien dafür, daß das Metallzentrum von Cob(II)alamin keine axialen Liganden trägt. Demnach bedingt der Wechsel von Cob(II)alamin zu Methylcob(III)alamin (mit Koordinationszahl sechs am Co^{III}-Zentrum) eine beträchtliche Reorientierung im Bereich des axialen Liganden und ermöglicht so eine Einflußnahme der Enzymumgebung auf die Reaktivität des Cobaltcorrins^[10].

Der Peptidteil des Cobalamin-bindenden Fragments der Methioninsynthase besteht im wesentlichen aus zwei Domänen



Abb. 3. Die Cobalamin-bindende Domäne der Methioninsynthase aus *Escherichia coli* nach Drennan et al. [1,2]: Band-Diagramme des Proteinteils mit Hervorhebung der Aminosäuretriade His-759, Asp-757 und Ser-810 sowie des Methyl-Co^{III}-Zentrums (gelb) des gebundenen Methylcob(III)alamins in der „base-off“-Form (rot).

(siehe Abb. 3), einem aus vier antiparallelen Helices bestehenden „Helixbündel“, das die methylierte „Oberseite“ des proteingebundenen Corrinoids abdeckt, und einer aus sechs α -Helices und fünf β -Faltblättern bestehenden α/β -Domäne, deren Tertiärstruktur an die sogenannte „Rossmann-Faltung“ von nucleotidbindenden Proteinen erinnert^[1,2]. Die Nucleotidfunktion des proteingebundenen Cobalamins ist in einer Tasche der α/β -Domäne verankert. Diese Domäne stellt auch das Cobalt-koordinierende Histidin (His-759), zunächst der funktionelle Ersatz für die Nucleotidfunktion. Die His-759-Einheit ist über eine H-Brücke „syn“ mit einem benachbarten Aspartat (Asp-757) und dieses über eine „anti“-H-Brücke mit einem Serin (Ser-810) verknüpft.

In der Methioninsynthase von *Escherichia coli* tritt die neue „katalytische“ Tetrade Cobaltcorrins-Histidin-Aspartat-Serin auf (siehe Abb. 3 und 4)^[1,2], deren Katalysewirkung primär auf den inhärenten Reaktivitäten des Cobaltcorrins beruht. Der Beitrag der drei H-überbrückten Aminosäuren bei der Katalyse des Methylgruppentransfers ist aber nicht unerheblich, da eine wichtige Rolle bei Methylierungs-Gleichgewichten mit Methylcorrinoiden dem axialen Imidazol-Ligand zukommt^[11]. Die Stabilisierung, die das Enzym im methylierten Zustand (bzw. im Co^{II}-Zustand) durch die Cobalt-Koordination von His-759 erfährt, wirkt der Demethylierung bzw. der Reduktion zum Co^I-Zustand entgegen^[10]. Nach elektrochemischen Untersuchungen an intakter Methioninsynthase ist die Co^{II}/Co^I-Reduktion des enzymgebundenen Corrinoids um über 100 mV (im Vergleich zum entsprechenden Redoxschritt in wässriger Lösung) erleichtert^[9], und erfolgt unter Nettoaufnahme eines Protons. Damit ist eine Destabilisierung des Co^{II}-Zustandes der Methyltransferase relativ zu ihrem Co^I-Zustand und im Vergleich mit dem Redoxpaar Cob(II)alamin/Cob(I)alamin in Lösung angezeigt. Die leichte Reduzierbarkeit des proteingebundenen Co^{II}-Corrinoids könnte dadurch plausibel erklärt

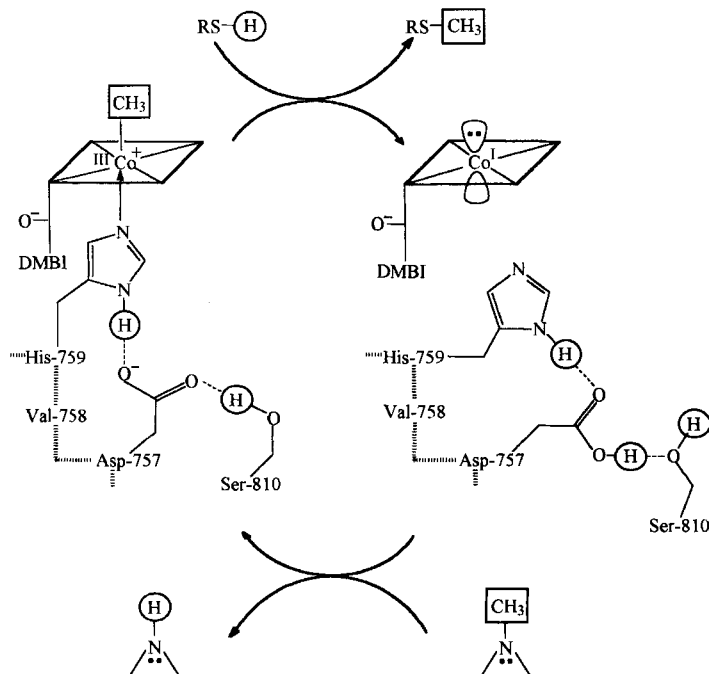


Abb. 4. Die „katalytische Tetrade“ der Methioninsynthase, Enzym-Substrate und Produkte der Methyltransferschritte in einer schematischen Darstellung, in welcher möglicherweise relevante stereoelektronische Präferenzen bei der Bildung von H-Brücken hervorgehoben werden.

werden, daß die axiale Histidin-Koordination nicht ohne Spannung zustande kommt, was die Abspaltung des Imidazol-Liganden bei der Demethylierung (bzw. bei der Reduktion) zu Cob(II)alamin aktivieren würde. Die diesbezüglichen Hinweise (Abweichen der Cobalt-Koordination des Histidins und der zwei H-Brücken zum Asp-757 von geometrisch idealen Bindungsverhältnissen) sind wegen der geringen nominellen Auflösung der Strukturanalyse der B_{12} -Bindungsdomäne der Methioninsynthase allerdings nicht schlüssig.

Nach Vorschlag von Drennan et al. wird der enzymkatalysierte Teilschritt der Methylierung von Homocystein zu Methionin, bei dem der proteingebundene Cofaktor von Methylcob(III)alamin zu Cob(II)alamin demethyliert wird, von der Aufnahme eines Protons durch das Enzym begleitet^[1, 2]. Umgekehrt läuft dann die enzymkatalysierte Demethylierung von N^5 -Methyl-Tetrahydrofolat zu Tetrahydrofolat netto unter Abgabe eines Protons aus dem Enzym ab, dessen Cofaktor bei diesem Schritt von Cob(II)alamin zu Methylcob(III)alamin methyliert wird. Drennan et al. schlagen vor, daß diese (hypothetischen) Protonierungs-/Deprotonierungsschritte des Enzyms via die Aminosäuretriade His-759, Asp-757 und Ser-810 erfolgen^[1, 2], die sich vom Cobaltzentrum des proteingebundenen Cofaktors bis zur Oberfläche der B_{12} -Bindungsdomäne erstreckt.

Die hypothetische Wirkung der Aminosäuretriade His-759, Asp-757, Ser-810 beim Methyltransfer^[12] hat zweifellos mit der kritischen Axialkoordination des proteinständigen Imidazol-Liganden (von His-759) zu tun und mit der bei seiner (De)Koordinations auftretenden strukturellen Reorganisation. Die Koordinationsfähigkeit von His-759 ist aber entscheidend vom Protonierungszustand (der Aminosäuretriade) des Proteins abhängig^[13]: Die Protonierung des His-759/Asp⁻-757-Paares eliminiert die Koordinationsfähigkeit von His-759 gänzlich,

wenn sie zu HisH⁺-759/Asp⁻-757 führt; sie reduziert die Nucleophilie des Imidazol-Liganden aber auch dann, wenn sie unter Bildung neutraler Reste an His-759/Asp-757 erfolgt, wie von Drennan et al. vorgeschlagen^[1, 2]. Die Protonierung des His-759/Asp⁻-757-Paares kann daneben eine beträchtliche Umorientierung der betroffenen Aminosäurereste zur Folge haben und damit indirekt die Koordinationsfähigkeit von His-759 am Cobaltcorrin beeinflussen. Der stereoelektronischen Präferenz für die Protonierung des Aspartats an seinem „basischeren“ *syn*-lone-pair kann nämlich bei Beibehaltung von zwei H-Brücken zu His-759 und zu Ser-810 nicht ohne Konformationsänderung Rechnung getragen werden (vgl. Abb. 4). Der H-überbrückten Aminosäuretriade der Methioninsynthase aus *Escherichia coli* kommt also potentiell die Rolle eines durch den Protonierungsgrad gesteuerten „Schalters“ zu, der die Einstellung der zwei Koordinationszustände („base-on“ bzw. „base-off“) am Cobaltzentrum elektronisch und konformationell vermittelt.

Die Methioninsynthase weist (mit His-759 und Asp-757) in der α/β -Domäne zwei zentrale von mehreren „konservierten“ Aminosäuren auf und läßt Sequenz-Homologien mit einigen anderen B_{12} -bindenden Proteinen erkennen, auch mit solchen, die nicht Methylcob(III)alamin, sondern Coenzym B_{12} (Adenosylcob(III)alamin) als Cofaktoren verwenden^[14, 15]. Die daraus abgeleitete Erwartung, daß auch in Coenzym- B_{12} -bindenden Enzymen ihr Cofaktor in einer „base-off“-Form gebunden ist, wie in der Methioninsynthase erstmals offengelegt^[1, 2], wurde inzwischen jedenfalls schon für die Coenzym- B_{12} -abhängige Methylmalonyl-CoA-Mutase aus *Propionibacterium shermanii* bestätigt^[16, 17]. Für dieses Enzym ist in naher Zukunft mit der Veröffentlichung einer Röntgenstrukturanalyse aus der Gruppe von Phil Evans zu rechnen^[17].

Auf das Vorliegen einer Cobaltkoordination von Histidin an ein proteingebundenes „komplettes“ Corrinoid haben erstmals ESR-spektroskopische Daten von Stupperich et al. hingewiesen^[18], allerdings für Präparationen des acetogenen Bakteriums *Sporomusa ovata*, das *p*-Cresolylcobamid produziert, dessen Pseudo-Nucleotidfunktion nicht zur Cobaltkoordination befähigt ist. Auch ein *p*-Cresolylcobamid-bindendes Protein aus *Sporomusa ovata* konnte kristallisiert werden; eine Röntgenstrukturanalyse ist inzwischen ebenfalls in Arbeit^[19].

Coenzym B_{12} und das einfachere Methylcob(III)alamin sind die erstentdeckten und einzigen, gut dokumentierten metallorganischen Coenzyme. Ihre biologischen Funktionen werden eng mit ihrer organometallischen Bindung verknüpft. Die Kontrolle und Katalyse durch das Protein der homolytischen Spaltung und Bildung dieser Bindung ist relevant bei Coenzym B_{12} ^[20], bei Methylcob(III)alamin die Aktivierung entsprechender heterolytischer Reaktionen. Nach dem gegenwärtigen Bild läßt sich die enzymatische Beschleunigung der Homolyse der organometallischen Bindung (von Coenzym B_{12}) vor allem auf „sterisch-mechanische“ Faktoren zurückführen^[6, 7], die enzymkatalysierte Heterolyse (von Methylcob(III)alamin) auf „elektronische“^[10].

Die Kenntnis der Struktur des Cobalt-Komplexes Vitamin B_{12} hat lange das Rätsel der biologischen Funktion der Corrinoid nicht gelüftet, bis die organometallische Bindung im Coenzym B_{12} entdeckt wurde. Ähnlich hat erst die Röntgenstrukturanalyse der Methioninsynthase eine fundamentale Er-

weiterung der Vorstellungen über enzymaktive B₁₂-Derivate ausgelöst. Die früher angesammelte Information über die Struktur der nucleotidhaltigen B₁₂-Derivate betrifft offensichtlich molekulare „Transport“- und „Speicherformen“ dieser einmaligen Cofaktoren, die ein beachtenswertes Potential zur Selbstkonstitution haben und thermodynamisch begünstigende Strukturmerkmale aufweisen^[1]. Unter letzteren ist der Aufbau des einmaligen Nucleotid-„Loops“ besonders frappierend, der in der Methioninsynthase aus *Escherichia coli* interessanterweise aber keine funktionelle Rolle spielt. In diesem Enzym tritt das Cobalamin-Coenzym als ein besonderes „Dinucleotid“ auf, in dem neben einer katalytisch aktiven Molekülhälfte eine zweite Nucleotidportion enthalten ist, die für das Binden durch das Apoenzym wichtig ist, die sich allerdings durch eine B₁₂-spezifische, α -ständige Pseudo-Nucleotidbase auszeichnet. Die oben vorgestellten Befunde verleihen der Frage nach den biologischen Funktionsaufgaben der intramolekular koordinierenden Benzimidazol-Funktion der nucleotidhaltigen B₁₂-Derivate eine neue Bedeutung.

Stichworte: Biochemie · Cobalcorrin · Methylgruppentransfer · Vitamin B₁₂

- [1] C. L. Drennan, S. Huang, J. T. Drummond, R. G. Matthews, M. L. Ludwig, *Science* **1994**, *266*, 1669–1674.
 [2] C. L. Drennan, R. G. Matthews, M. L. Ludwig, *Curr. Opin. Struct. Biol.* **1994**, *4*, 919–929.

- [3] A. Eschenmoser, *Angew. Chem.* **1988**, *100*, 5–40; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1988**, *27*, 5–40.
 [4] C. Kratky, G. Färber, K. Gruber, K. Wilson, Z. Dauter, H.-F. Nolting, R. Konrat, B. Kräutler, *J. Am. Chem. Soc.* **1995**, *117*, 4654–4670.
 [5] B. Kräutler, R. Konrat, E. Stupperich, G. Färber, K. Gruber, C. Kratky, *Inorg. Chem.* **1994**, *33*, 4128–4139.
 [6] J. Halpern, *Science* **1985**, *227*, 869–875.
 [7] Beispielsweise: B. T. Golding, D. N. R. Rao in *Enzyme Mechanisms* (Hrsg.: M. I. Page, A. Williams), Royal Society of Chemistry, London, **1987**, S. 404.
 [8] M. Rossi, J. P. Glusker, L. Randaccio, M. F. Summers, P. J. Toscano, L. G. Marzilli, *J. Am. Chem. Soc.* **1985**, *107*, 1729.
 [9] R. G. Matthews, R. V. Banerjee, S. W. Ragsdale, *BioFactors* **1990**, *2*, 147–152.
 [10] B. Kräutler, *Proceedings of the Royal Swedish Academy of Sciences Nobel Symposia 1991* (Hrsg.: C.-I. Brändén, G. Schneider), Oxford University Press, **1994**, S. 83–92.
 [11] B. Kräutler, *Helv. Chim. Acta* **1987**, *70*, 1268–1278.
 [12] Die „katalytische Triade“ des „Charge-relay“-Systems der Serinprotease Chymotrypsin, setzt sich ähnlich (aber in anderer Reihenfolge!) aus Asp-102, His-57 und Ser-195 zusammen (vgl. D. M. Blow, T. A. Steitz, *Ann. Rev. Biochem.* **1970**, *39*, 86).
 [13] Hinweise darauf fehlen, daß in der methylierten Co^{III}-Form der Methioninsynthase von *Escherichia coli* das koordinierende His-759 als ein Imidazolat vorliegt.
 [14] E. N. G. Marsh, D. E. Holloway, *FEBS* **1992**, *310*, 167–170.
 [15] Im Gegensatz dazu weisen B₁₂-Transportproteine aus mehreren Quellen keine Sequenzhomologien zur Methioninsynthase aus *Escherichia coli* auf.
 [16] R. Padmakumar, S. Taoka, R. Padmakumar, R. Banerjee, *J. Am. Chem. Soc.* **1995**, *117*, 7033–7034.
 [17] F. Mancia, A. Nakagawa, N. H. Keep, P. Leadlay, P. R. Evans, *Abstr. Pap. 4th Europ. Workshop Crystallogr. Biol. Macromol.*, Como, **1995**.
 [18] E. Stupperich, H. J. Eisinger, S. P. J. Albracht, *Eur. J. Biochem.* **1990**, *193*, 105–109.
 [19] U. G. Wagner, E. Stupperich, P. Aulkemeyer, C. Kratky, *J. Mol. Biol.* **1994**, *236*, 388–989.
 [20] J. Retey, *Angew. Chem.* **1990**, *102*, 373–379; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1990**, *29*, 355.