

Dioldehydratase bindet Coenzym-B₁₂ in der „Base-on“-Form – ESR-Untersuchungen an Cob(II)-alamin**

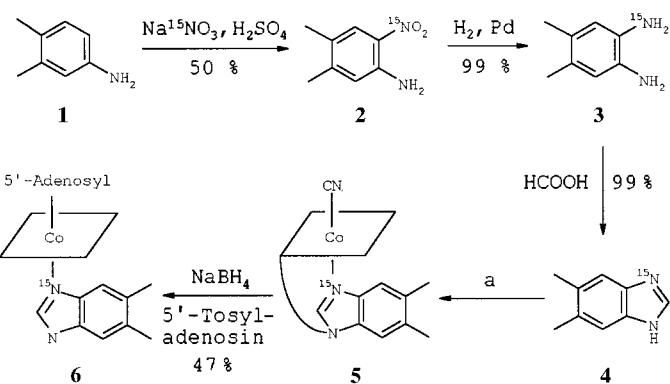
Andreas Abend, Rainer Nitsche, Vahe Bandarian, Erhard Stupperich und János Rétey*

Bei einigen der Coenzym-B₁₂-abhängigen Enzyme wurde nachgewiesen, daß im Enzym-Coenzym-Komplex der axiale Dimethylbenzimidazol-Ligand des Cobaltions durch den Imidazolylrest eines Histidins der Polypeptidkette substituiert wird.^[1] Sowohl zwei Kristallstrukturanalysen^[2, 3] als auch die ESR-Spektren des Komplexes mit ¹⁵N-markierten Apoenzymen und nicht markiertem Coenzym führten zu dieser unerwarteten Erkenntnis.^[4, 5]

Das ESR-Spektrum von Cob(II)-alamin zeichnet sich unter anderem durch ein Oktett von Triplets aus. Die Hyperfeinaufspaltung, die zum Oktett führt, ist durch die Wechselwirkung des ungepaarten Elektrons mit dem ⁵⁹Co-Kern [$I(^{59}\text{Co})=7/2$] bedingt.^[6, 7] Die Wechselwirkung des axialen (aber nicht der äquatorialen) Stickstoffliganden mit dem ungepaarten Elektron, das sich hauptsächlich im d_{z^2} -Orbital aufhält, bewirkt eine Superhyperfeinaufspaltung, die im Falle von ¹⁴N [$I(^{14}\text{N})=1$] zu einem Triplet führt (Intensitätsverhältnis der Linien 1:1:1). Ersetzt man ¹⁴N durch das schwerere Isotop ¹⁵N [$I(^{15}\text{N})=1/2$], so führt die Superhyperfeinaufspaltung entsprechend zu einem Dublett.

In letzter Zeit mehrten sich Hinweise darauf, daß die Art der Bindung nicht für alle Coenzym-B₁₂-abhängigen Enzyme gleich ist, vielmehr unterscheidet man zwischen „Base-off“- und „Base-on“-Klassen.^[8, 9] Bei dieser Klasse von Enzymen soll der Dimethylbenzimidazol-Ligand im enzymgebundenen Zustand an das Cobaltion koordiniert bleiben. Um einen direkten Nachweis für die „Base-on“-Bindung für Dioldehydratase aus *Salmonella typhimurium* zu erhalten, synthetisierten wir Coenzym-B₁₂, in dem eines der Stickstoffatome des Dimethylbenzimidazol-Liganden ¹⁵N-markiert war (Schema 1).

3,4-Dimethylanilin **1** wurde mit $\text{Na}^{15}\text{NO}_3$ in konz. Schwefelsäure nitriert und das entstandene 4,5-Dimethyl-[2-¹⁵N]-nitroanilin **2** katalytisch zu [1-¹⁵N]1,2-Diamino-4,5-dimethylbenzol **3** reduziert. Die Umsetzung von **3** mit konz. Ameisensäure lieferte [1-¹⁵N]5,6-Dimethylbenzimidazol **4**,^[10] das kristallin (Schmp. 200 °C) erhalten wurde und mit Propioni-



Schema 1. Synthese von Coenzym-B₁₂, in dem eines der Stickstoffatome des Dimethylbenzimidazol-Liganden ¹⁵N-markiert ist. a) Propionibakterien.

bakterien biosynthetisch in Vitamin-B₁₂ **5** eingebaut wurde. Das ¹H-NMR-Spektrum von **5** ließ eindeutig eine geminale ¹H-¹⁵N-Kopplung erkennen. Durch Reduktion von **5** mit NaBH_4 und weitere Umsetzung mit 5'-Tosyladenosin^[11, 12] wurde schließlich das im Dimethylbenzimidazol-Liganden ¹⁵N-markierte Coenzym-B₁₂ **6** erhalten.

Das für Dioldehydratase aus *Salmonella typhimurium* kodierende Gen^[13] wurde in den Expressionsvektor pT7.7^[14] umkliert und in *E. coli* BL21(DE3) überexprimiert. Nach dem Aufschluß der Zellen durch Ultraschall befand sich das Enzym in den unlöslichen Zelltrümmern,^[15] die durch Zentrifugieren von den löslichen Proteinen abgetrennt wurden. Die Extraktion des membrangebundenen Enzyms mit Natriumcholat (46 mM) lieferte lösliche Dioldehydratase, die durch Gelfiltration (Pharmacia, HiLoad 26/60, Superdex 200 prep grade) in Gegenwart von 125 mM 1,2-Propandiol und 23 mM Natriumcholat gereinigt wurde. Das Enzym war elektrophoretisch rein und hatte eine spezifische Aktivität von 95 U mg⁻¹.

Zur Messung des ESR-Spektrums^[16] wurde die Enzylösung auf 60 mg mL⁻¹ (250 μM) eingeengt, und 250 μL wurden während 30 min bei 37 °C mit 60 nmol Coenzym-B₁₂ unter Lichtausschluß inkubiert. Durch Gelfiltration auf einer Sephadex-G-25-Säule wurde daraufhin eventuell noch vorhandenes freies Coenzym vom Holoenzym abgetrennt. Die hohe Auflösung des axialen Spektrums bei niedrigem Feld (2700–3000 G) spricht ebenfalls für die Bindung des Coenzyms durch das Enzym. Nach Zugabe von 60 nmol Glykolaldehyd wurden die Proben in ESR-Röhrchen überführt und 24 h bei Raumtemperatur ohne Lichtausschluß stehen gelassen. Das einstrahlende Licht führte zur Homolyse der Cobalt-Kohlenstoff-Bindung unter Bildung von Cob(II)-alamin und einem organischen Radikal. Zur Kontrolle wurde mit einer Probe des freien Coenzyms in einem Kaliumphosphat-Puffer (50 mM, pH 6.8) mit 10% Glycerin und 5% 1,2-Propandiol genauso verfahren.

Abbildung 1 zeigt das ESR-Spektrum des freien, nicht markierten Cob(II)-alamins und den vergrößerten Ausschnitt im Bereich von 3400 G. In Abweichung davon weist der gleiche Ausschnitt des Spektrums von Cob(II)-alamin mit [1-¹⁵N]Dimethylbenzimidazol als Ligand nicht ein Triplet, sondern ein Dublett auf (Abb. 2). Obwohl bei diesem Markierungsmuster die Hälfte der Liganden über ein ¹⁴N-

[*] Prof. Dr. J. Rétey, Dipl.-Chem. R. Nitsche
Institut für Organische Chemie der Universität
Richard-Willstätter-Allee, D-76128 Karlsruhe
Telefax: Int. +721/608-4823
E-mail: biochem@ochhades.chemie.uni-karlsruhe.de
Dr. A. Abend, V. Bandarian
Institute for Enzyme Research, University of Wisconsin-Madison
1710 University Avenue, Madison, WI 53705-4098 (USA)
Dr. E. Stupperich
Institut für Angewandte Mikrobiologie der Universität
Albert-Einstein-Allee 11, D-89069 Ulm

[**] Wir danken Dr. T. A. Bobik, Gainesville, Florida, für das Gen der Dioldehydratase aus *Salmonella typhimurium*, Prof. P. A. Frey, Madison, Wisconsin, für Diskussionen und die Förderung von A. A. sowie der Europäischen Union, der Deutschen Forschungsgemeinschaft und dem Fonds der Chemischen Industrie für die finanzielle Unterstützung.

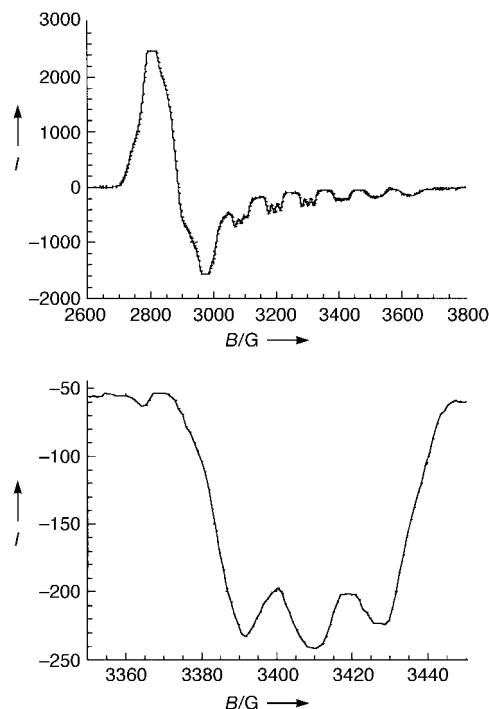


Abb. 1. ESR-Spektrum des freien nicht markierten Cob(II)-alamins (oben) und Vergrößerung des Triplets bei 3400 G (unten). Intensität I in willkürlichen Einheiten.

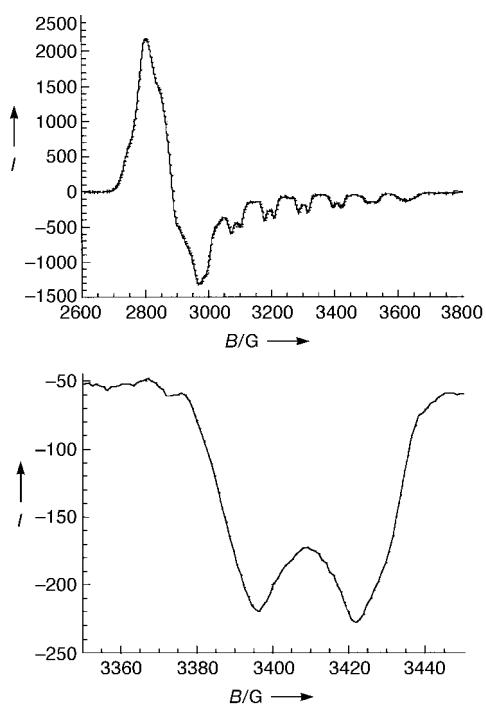


Abb. 2. ESR-Spektrum des freien im Dimethylbenzimidazol-Liganden ^{15}N -markierten Cob(II)-alamins (oben) und Vergrößerung des Doublets bei 3400 G (unten). Intensität I in willkürlichen Einheiten.

Atom an das Cobaltion koordinieren sollte, wird offensichtlich das Triplet überdeckt. Auch bei der Simulation des ESR-Spektrums im selben Bereich von 3400 G (Abb. 3) ist bei einer Linienbreite von 8 G die durch ^{14}N bedingte Superhyperfinaufspaltung nicht zu erkennen. Das gemessene Spek-

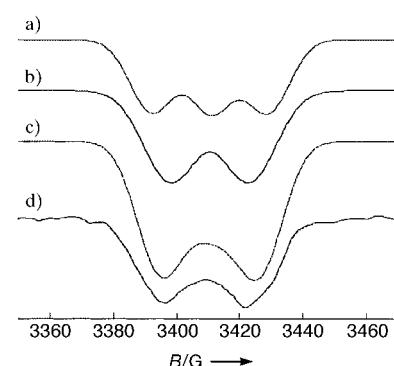


Abb. 3. a), b) Simulierte ESR-Teilspektren (3350–3470 G) für das freie (nicht enzymgebundene) Cob(II)-alamin in Lösung. In (a) ist das erwartete Spektrum bei Koordination des Cobaltions durch ^{14}N und in (b) das entsprechende Spektrum bei Koordination durch ^{15}N gezeigt. c) Summe von (a) und (b). d) Entsprechender Ausschnitt des gemessenen Spektrums.

trum entspricht der Überlagerung der Superhyperfinaufspaltungen, die durch die Koordination der beiden Stickstoffatome an das Cobaltion hervorgerufen werden.

Die ESR-Spektren der Dioldehydratase- B_{12} -Inhibitor-Komplexe sind diesen Spektren ähnlich, doch bestehen einige Unterschiede (Abb. 4). Das ausgeprägte Signal des Inhibitor-

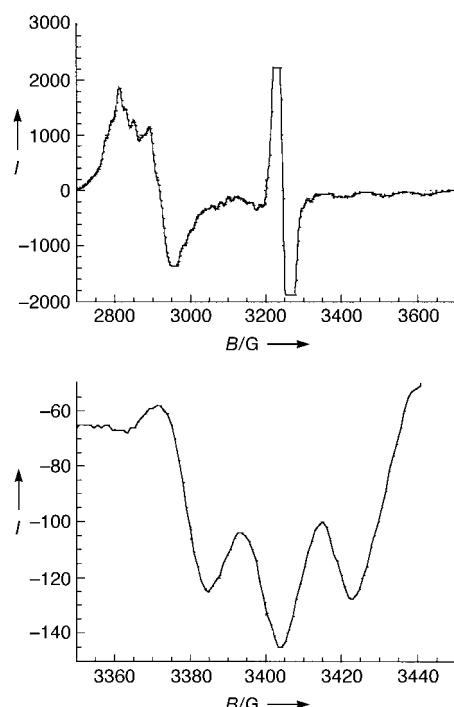


Abb. 4. ESR-Spektrum des an Dioldehydratase gebundenen nicht markierten Cob(II)-alamins (oben) und Vergrößerung des Triplets bei 3400 G (unten). Intensität I in willkürlichen Einheiten.

radikals bei 3300 G ($g=2$) lässt die Superhyperfinaufspaltungen bei kleineren magnetischen Feldstärken nicht erkennen, doch ist die Superhyperfine-Multiplettstruktur bei stärkerem Feld klar zu sehen. Der Ausschnitt bei 3400 G enthält ein Triplet für den Enzymkomplex mit dem nicht markierten Cob(II)-alamin, während im Spektrum des Komplexes mit

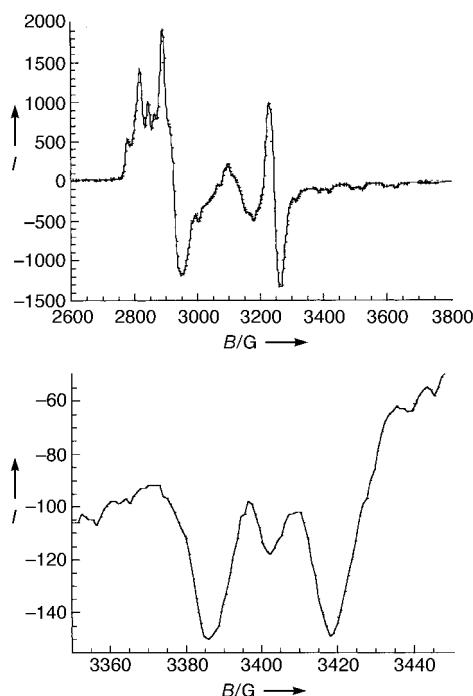


Abb. 5. ESR-Spektrum des an Dioldehydratase gebundenen und im Dimethylbenzimidazol-Liganden ^{15}N -markierten Cob(II)-alamins (oben) und Vergrößerung des Doublets und des unvollständig überdeckten Triplets bei 3400 G (unten). Intensität I in willkürlichen Einheiten.

[^{15}N]Cob(II)-alamin ein Doublet zu sehen ist (Abb. 5). Be merkenswerterweise ist die Kopplungskonstante A_{N} beim freien Cob(II)-alamin kleiner als beim enzymgebundenen Coenzym: Im Spektrum des freien Cob(II)-alamins beträgt $A_{\text{N}} = 18$ G für das nicht markierte (^{14}N) und 26 G für das ^{15}N -markierte Coenzym. Das Verhältnis der Kopplungskonstanten $A_{^{15}\text{N}}/A_{^{14}\text{N}}$ entspricht dem theoretisch erwarteten Quotienten von 1.44 der gyromagnetischen Verhältnisse beider Kerne. Die Cobaltkopplungskonstante beträgt 105 G.

Beim enzymgebundenen Cob(II)-alamin beträgt $A_{\text{N}} = 20$ G für das nicht markierte (^{14}N) und 31 G für das ^{15}N -markierte Coenzym. Hier beträgt das Verhältnis der Kopplungskonstanten 1.5. Da sich die experimentell bestimmte Kopplungskonstante aus der Summe der überlagerten Spektren ergibt, fällt sie größer aus, als für die des nicht markierten Coenzymes zu erwarten gewesen wäre. Diese Schlußfolgerung wird durch die simulierten Spektren (Abb. 6a, b) bestätigt. Bei diesen haben wir Kopplungskonstanten von 20 G für ^{14}N und 28 G für ^{15}N zugrundegelegt (der Quotient der gyromagnetischen Verhältnisse der Kerne ist somit 1.4, als Linienbreite wurde 6 G angenommen). Das simulierte Spektrum (Abb. 6c) im Bereich von 3400 G spiegelt die Meßergebnisse wider: Die Summe der simulierten Einzelspektren liefert auch hier ein Spektrum, das mit dem gemessenen übereinstimmt (Abb. 6d).

Wir haben Glycolaldehyd als „Suicide“-Inhibitor gewählt, weil dieser Aldehyd die sofortige Homolyse der Cobalt-Kohlenstoff-Bindung im Dioldehydratase-gebundenen Coenzym-B₁₂ bewirkt.^[17] Höchstwahrscheinlich abstrahiert das dabei entstandene 5'-Desoxyadenosylradikal ein H-Atom vom Glycolaldehyd, und es entsteht das stabile enzymge-

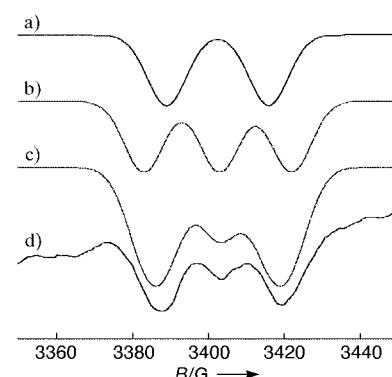


Abb. 6. a), b) Simulierte ESR-Teilspektren (3350–3450 G) für das enzymgebundene Cob(II)-alamin in Lösung. In (a) ist das erwartete Spektrum bei Koordination des Cobaltions durch ^{15}N und in (b) das entsprechende Spektrum bei Koordination durch ^{15}N gezeigt. c) Summe von (a) und (b). d) Entsprechender Ausschnitt des gemessenen Spektrums.

bundene Inhibitorradikal. Dieses Radikal wird derzeit von uns charakterisiert. Den hier vorgestellten Resultaten zufolge bindet Dioldehydratase das Coenzym-B₁₂ eindeutig in der „Base-on“-Form.

Eingegangen am 28. August 1997 [Z 10862]

Stichwörter: Bioorganische Chemie • Coenzyme • ESR-Spektroskopie • Isotopenmarkierungen • Vitamin B₁₂

- [1] E. Stupperich, H. J. Eisinger, S. P. J. Albracht, *Eur. J. Biochem.* **1990**, 193, 105.
- [2] F. Mancia, N. H. Keep, A. Nakagawa, P. F. Leadlay, S. McSweeney, B. Rasmussen, P. Bösecke, O. Diat, P. R. Evans, *Structure* **1996**, 4, 339.
- [3] C. L. Drennan, S. Huang, J. T. Drummond, R. G. Matthews, M. L. Ludwig, *Science* **1994**, 266, 1669.
- [4] R. Padmakumar, S. Taoka, R. Padmakumar, R. Banerjee, *J. Am. Chem. Soc.* **1995**, 117, 7033.
- [5] O. Zelder, B. Beatrix, F. Kroll, W. Buckel, *FEBS Letters* **1995**, 369, 252.
- [6] J. R. Pilbrow in *B₁₂*, Vol. 1 (Hrsg.: D. Dolphin), Wiley, New York, **1982**, S. 431.
- [7] J. R. Pilbrow, W. E. Winfield, *Mol. Phys.* **1973**, 25, 1073.
- [8] T. Toraya, präsentiert beim 4th European Symposium on Vitamin B₁₂ and B₁₂-Proteins, Innsbruck, Österreich, **1996**.
- [9] L. Poppe, E. Stupperich, W. E. Hull, T. Buckel, J. Rétey, *Eur. J. Biochem.* **1997**, 250, 303.
- [10] J. A. Hörig, P. Renz, *J. Biol. Chem.* **1978**, 253, 7410.
- [11] D. Dolphin, *Methods Enzymol.* **1971**, 18C, 34.
- [12] H. P. C. Hogenkamp, W. H. Pailes, C. Brownson, *Methods Enzymol.* **1971**, 18C, 57.
- [13] Von Dr. T. A. Bobik, Gainesville, Florida, zur Verfügung gestellt.
- [14] S. Tabor, C. C. Richardson, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1985**, 82, 1074.
- [15] D. E. McGee, J. H. Richards, *Biochemistry* **1981**, 20, 4293.
- [16] Durchführung der ESR-Messungen: Die ESR-Röhrchen mit den Proben wurden in flüssigen Stickstoff getaucht, und mit einem Varian-E-3-Spektrometer wurden unter den folgenden Bedingungen Spektren aufgenommen: Meßfrequenz = 9.09 GHz, Modulationsamplitude = 10 G, Modulationsfrequenz = 100 kHz, Leistung der Mikrowellenstrahlung = 10 mW, Meßbereich = 2000 G, 2048 Datenpunkte, $T = 77$ K.
- [17] O. W. Wagner, H. A. Lee, Jr., P. A. Frey, R. H. Abeles, *J. Biol. Chem.* **1966**, 241, 1741.