

B₁₂-retro-Riboschalter: konstitutionelles Schalten von B₁₂-Coenzymen durch Nucleotide**Sigrid Gschösser, Karl Gruber, Christoph Kratky,*
Christian Eichmüller und Bernhard Kräutler*

Professor Karl Schlögl zum 80. Geburtstag gewidmet

Die Entdeckung der „B₁₂-Riboschalter“ zeigte einen neuartigen Mechanismus genetischer Kontrolle auf und betonte die biologische Relevanz der direkten Wechselwirkung zwischen RNA und B₁₂-Coenzymen.^[1,2] B₁₂-Riboschalter sind natürliche Boten-RNAs (mRNAs), die Coenzym B₁₂ (**1**) binden und dann einen Konformationsübergang (switch) durchlaufen; dadurch wird die Bildung von Proteinen inhibiert, die in der B₁₂-Biosynthese oder im B₁₂-Transport relevant sind.^[1,3] Künstliche RNA-Sequenzen, die kleine Moleküle, so auch Vitamin B₁₂,^[4] fest binden, wurden schon mithilfe chemischer In-vitro-Evolutionsexperimente hergestellt.^[4a,5] Diese Studien lieferten Informationen über die faszinierende funktionelle Vielfalt von RNA.^[6]

Das komplementäre Phänomen – Strukturänderungen im gebundenen B₁₂-Cofaktor, die durch eine RNA-Umgebung hervorgerufen werden – hat mit der Entdeckung der B₁₂-Riboschalter stark an Bedeutung gewonnen. Schon die „kompletten“ B₁₂-Derivate können für sich allein genommen als molekulare Schalter^[7] betrachtet werden, in denen die Nucleotidbase entweder koordiniert (Base-on) oder frei

vorliegt (Base-off; Abbildung 1).^[8,9] Coenzym B₁₂ (**1**)^[10] und Methylcobalamin (**2**) enthalten 5,6-Dimethylbenzimidazol (DMB) in der Nucleotid-Funktion, auf der die variable Struktur der natürlichen „kompletten“ Cobamide beruht.^[8,9]

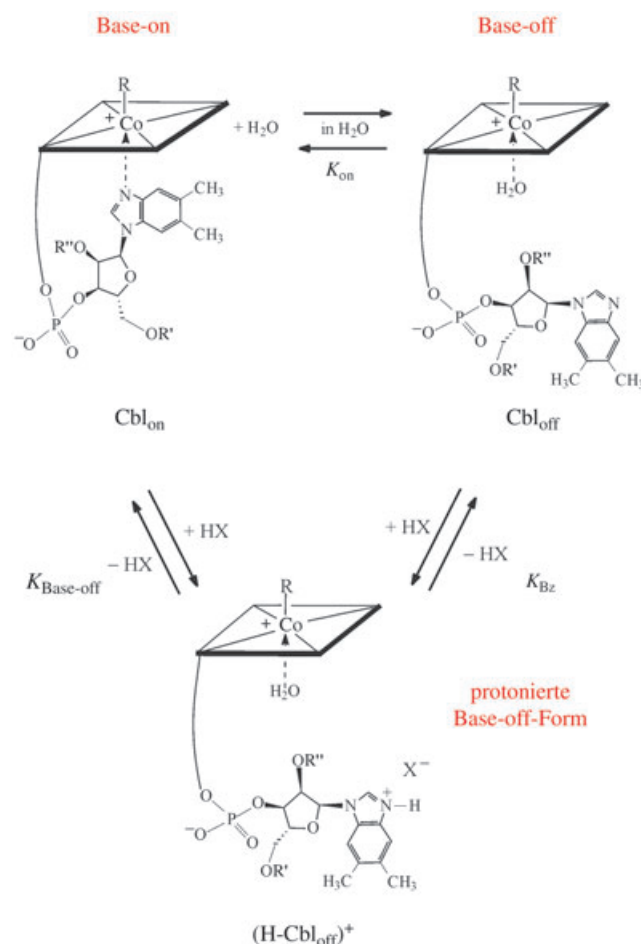


Abbildung 1. B₁₂ – ein „molekularer Schalter“: Eine Dimethylbenzimidazol (DMB)-Nucleotidbase kann im Fall der von Coenzym B₁₂ (**1**) abgeleiteten Cobalamine (Cbl) koordinieren (Base-on-Form, Cbl_{on}) oder frei vorliegen (Base-off-Form, Cbl_{off}). Protonierung an DMB resultiert in (H-Cbl_{off})⁺ und Abspaltung der Base vom Cobaltzentrum. ($K_{on} = [Cbl_{on}]/[Cbl_{off}]$, $K_{Bz} = [Cbl_{off}][H^+]/[(H-Cbl_{off})^+]$, $K_{Base-off} = (1 + K_{on}) K_{Bz}$).

Die Nucleotid-Einheit in B₁₂ könnte als Überbleibsel einer Wechselwirkung von Corrinoide mit einer Nucleotid-Umgebung gedeutet werden.

Um die chemischen Konsequenzen der Wechselwirkung von B₁₂-Derivaten mit einer Nucleotid-Umgebung in kovalent verknüpften Modellverbindungen zu erforschen, synthetisierten wir ausgehend von Vitamin B₁₂ (**3**) Konjugate der B₁₂-Cofaktoren **1** und **2** mit (Desoxy)Nucleotiden. Wir beschreiben hier zwei organometallische B₁₂-Nucleotide, Na-**4** (ein RNA-Konjugat von **1**) und Na-**5** (ein DNA-Konjugat von **2**, siehe Abbildung 2), als B₁₂-retro-Riboschalter, in denen die kovalente Anbindung des (Desoxy)Nucleotids bei der Bildung der Base-off-Form behilflich sein soll (siehe Abbildung 1).

[*] Mag. S. Gschösser, Dr. C. Eichmüller,^[†] Prof. Dr. B. Kräutler
Institut für Organische Chemie
Innrain 52a
und
Zentrum für molekulare Biowissenschaften
Leopold-Franzens-Universität Innsbruck
6020 Innsbruck (Österreich)
Fax: (+43) 512-507-2892
E-mail: bernhard.kraeutler@uibk.ac.at
Dr. K. Gruber, Prof. Dr. C. Kratky
Institut für Chemie
Karl-Franzens-Universität Graz
Heinrichstraße 28, 8010 Graz (Österreich)
Fax: (+43) 316-380-9850
E-mail: christoph.kratky@kfunigraz.ac.at

[†] gegenwärtige Adresse:
Purdue University
West Lafayette (USA)

[**] Wir danken Prof. K.-H. Ongania für massenspektrometrische Analysen, Mag. Tea Pavkov für Hilfe bei der Sammlung röntgenkristallographischer Daten, Dr. M. Fasching, Prof. R. Micura und Dr. C. Höbartner für wertvolle Diskussionen sowie Hoffmann-La Roche & Co., Basel, für eine großzügige Spende von Vitamin B₁₂. Dem Österreichischen Fonds zur Förderung der wissenschaftlichen Forschung (FWF, Proj. P13595) und der Europäischen Union (Proj. EU-HPRN-CT-2002-00195) danken wir für die Unterstützung unserer Arbeit.

Hintergrundinformationen zu diesem Beitrag sind im WWW unter <http://www.angewandte.de> zu finden oder können beim Autor angefordert werden.

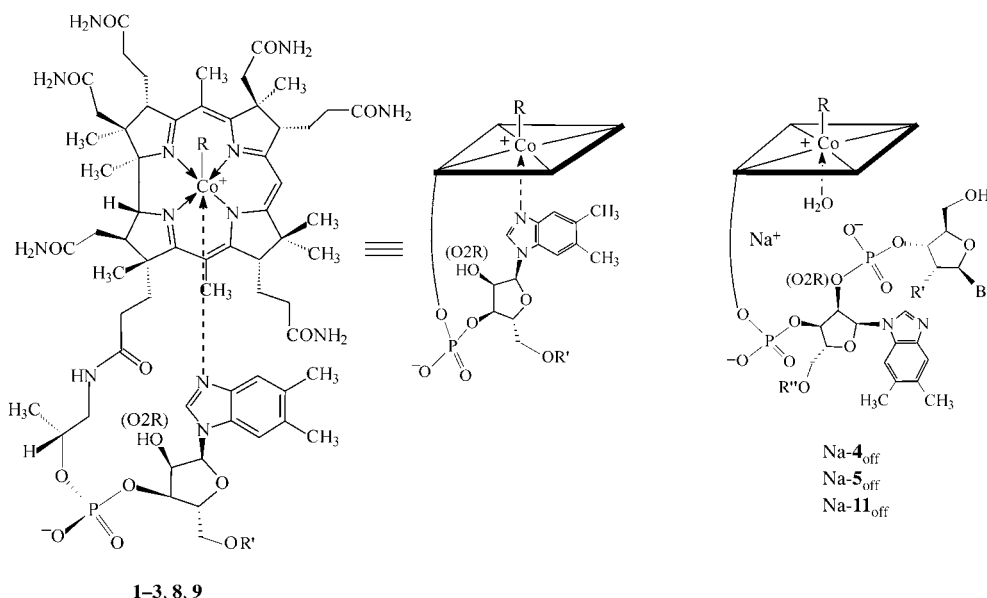
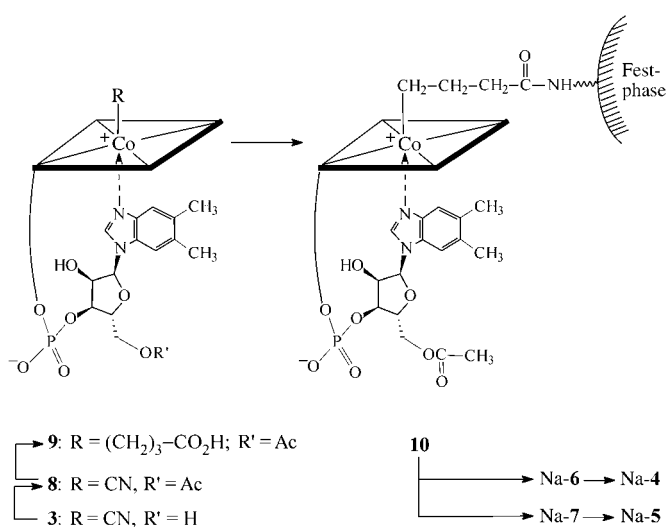


Abbildung 2. Links: Coenzym B₁₂ (**1**, Adenosylcobalamin, R = 5'-Adenosyl, R' = H), Methylcobalamin (**2**, R = CH₃, R' = H), Vitamin B₁₂ (**3**, Cyanocobalamin, R = CN, R' = H), Co_B-Cyano-5'-acetylcobalamin (**8**, R = CN, R' = Acetyl), Co_B-(3-Carboxypropyl)-5'-acetylcobalamin (**9**, R = (CH₂)₃-CO₂H, R' = Acetyl). Rechts: Na-**4** (R = 5'-Adenosyl, R' = OCH₃, R'' = H, B = Guanin) und Na-**5** (R = CH₃, R' = H, R'' = Acetyl, B = Thymin) und Na-**11** (R = CH₃, R' = R'' = H, B = Thymin) in den Base-off-Formen Na-**4**_{off}, Na-**5**_{off} und Na-**11**_{off}.

Die Synthese von Na-**4** und Na-**5** verlief über die Cyanocorrinoide Na-**6** und Na-**7**. Zur Einführung der DNA- oder RNA-Fragmente an O2R wurde das B₁₂-Substrat reversibel an eine Festphase gebunden und mit den entsprechenden Phosphoramiditen^[11] umgesetzt (Schema 1):^[12] Ausgehend von **3** wurde Co_B-cyano-*O5R*-acetyl-cobalamin (**8**) erhalten, das in Co_B-(3-carboxypropyl)-*O5R*-acetyl-cobalamin (**9**) umgewandelt wurde. Dieses Zwischenprodukt wurde auf einem aminofunktionalisierten Tentagel-Harz verankert,^[11] wodurch der rote Feststoff **10** erhalten wurde, der bei Raumtemperatur mit 5'-*O*-Dimethoxytrityl-2'-*O*-methyl-*N*-(4-isopropylphenyl)-oxyacetyl-guanosyl-3'-*O*-(β-cyanoethyl-*N,N*-diisopropyl)-phosphoramidit (DMT-mGt^{Pr-PAC}) gekuppelt



Schema 1. Synthese der metallorganischen B₁₂-Nucleotide Na-**4** und Na-**5** über das festphasengebundene Derivat **10**.

wurde. Ein modifiziertes Oxidations-Entschützungs-Protokoll inklusive lichtinduzierter Abspaltung von der Festphase^[12] ergab Co_B-cyanocobalamin-(3'→*O2R*)-guanyl-3'-at (Na-**6**). Ein entsprechendes Protokoll mit 5'-*O*-Dimethoxytrityl-2'-desoxythymidyl-3'-*O*-(β-cyanoethyl-*N,N*-diisopropyl)-phosphoramidit (DMT-T) unter Verwendung von Triethylamin/Pyridin (1:1) zur Entschützungs^[12] lieferte das Cyanocorrinoid Na-**7**.

Zur Synthese von Na-**4** wurde Na-**6** in Methanol elektrochemisch zum Cob(i)alamin-(3'→*O2R*)-guanyl-3'-at reduziert,^[13] das mit 5'-Desoxy-5'-chloradenosin in Co_B-(5'-Desoxyadenosyl)-cobalamin-(3'→*O2R*)-guanyl-3'-at (Na-**4**) überführt wurde (74% Ausbeute). Kristallines rotes Natrium-Co_B-methyl-*O5R*-acetyl-cobalamin-(3'→*O2R*)-2'-desoxythymidyl-3'-at (Na-**5**) wurde analog durch elektrochemische Reduktion von Na-**7** und Methylierung des Cobaltzentrums mit Methyljodid erhalten (81% Ausbeute).^[12]

Die Summenformeln aller neuer Verbindungen wurden massenspektrometrisch überprüft, und spektroskopische Untersuchungen bestätigten die Strukturen und die vorgeschlagene Base-on-Konstitution der Cyanocorrinoide Na-**6** und Na-**7** (siehe Hintergrundinformationen). Die Absorptionsmaxima im sichtbaren Bereich der UV/Vis-Spektren von Na-**4** und Na-**5** waren bei Raumtemperatur jedoch gegenüber den Referenzverbindungen **1** und **2** hypsochrom verschoben. Das UV/Vis-Spektrum von Na-**4** in wässriger Lösung (pH 7) zeigte ein Absorptionsmaximum bei λ_{max} = 473.5 nm, was einer Verschiebung um etwa 50 nm zu kürzeren Wellenlängen gegenüber dem Wert für **1** entspricht (Abbildung 3 a). Durch den Vergleich mit den Absorptionskoeffizienten (523 nm) von **1** und der protonierten Base-off-Form (H-**1**)⁺ lässt sich aus dem Spektrum des RNA-Konjugats Na-**4** die Lage des Base-on/Base-off-Gleichgewichts abschätzen: Bei Raumtemperatur liegen 38% in der Base-off-Form (Na-**4**_{off}) und 62%

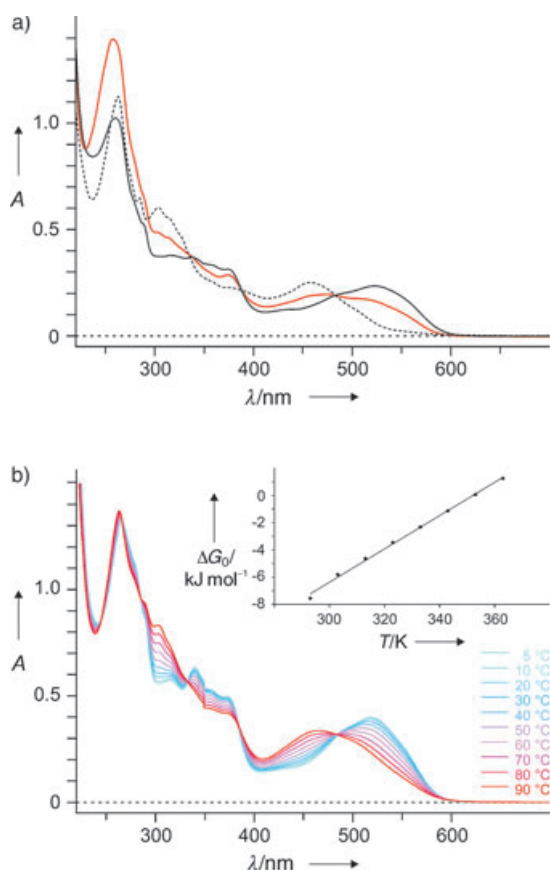


Abbildung 3. a) UV/Vis-Spektren bei 26 °C von Na-4 (rot) und Base-on-1 (schwarz) ($c = 0.00034$ M, Phosphatpuffer, 1 mm, pH 7.0) sowie von Base-off-1 (gestrichelte Linie, $c = 0.00034$ M, 0.1 M HCl, pH 1). b) UV/Vis-Spektren von Na-5 bei unterschiedlichen Temperaturen ($c = 0.00049$ M, Phosphatpuffer, 10 mm, pH 7.0). Einschub: ΔG_0 -T-Diagramm für das Base-off/Base-on-Gleichgewicht von Na-5 (Details siehe Hintergrundinformationen).

in der Base-on-Form (Na-4_{on}) vor, was einem Wert von $\Delta G_0 = -1.2$ kJ mol⁻¹ entspricht. Na-4_{on} ist demnach deutlich weniger stabilisiert als die stark überwiegende Base-on-Form von Coenzym B₁₂ (1).^[14]

Auch für das Co_β-methyl-cobalaminat Na-5 ist das Absorptionsmaximum ($\lambda_{\text{max}} = 515$ nm) verglichen mit Methylcobalamin (2) hypsochrom verschoben (um ungefähr 13 nm). Im Unterschied zu den Beobachtungen für 2 zeigt das Spektrum des organometallischen DNA-Konjugats Na-5 eine ausgeprägte Temperaturabhängigkeit (siehe Abbildung 3b und die Hintergrundinformationen). Das Absorptionsmaximum bei ungefähr 518 nm in bei tiefen Temperaturen aufgenommenen Spektren von Na-5 wandert zu 466 nm bei höheren Temperaturen, was eine Verschiebung des Gleichgewichts zugunsten der Base-off-Form aufzeigt. Die Temperaturabhängigkeit der UV/Vis-Spektren von Na-5 wurde unter Verwendung der Extinktionskoeffizienten von 2 und (H-2)⁺ in wässriger Lösung (bei pH 7 bzw. pH 1) abgeschätzt: Ein Zweizustandsmodell lieferte Werte von $\Delta H_0 = -40$ (± 3) kJ mol⁻¹ und $\Delta S_0 = -115$ (± 7) J K⁻¹ mol⁻¹ (anhand des Verhältnisses von Base-on- zu Base-off-Form, siehe Hintergrundinformationen). Unter vergleichbaren experimentellen Bedingungen waren diese thermodynamischen Größen für 2

$\Delta H_0 = -31.6$ (± 1.6) kJ mol⁻¹ und $\Delta S_0 = -55.2$ (± 5.3) J K⁻¹ mol⁻¹ (siehe auch Lit. [15]).

Sowohl die Enthalpie als auch die Entropie, die für das DNA-Konjugat Na-5 berechnet wurden, sind stärker negativ als die für 2 erhaltenen Werte. Der Betrag des Entropieanteils ist mehr als doppelt so groß, und die Temperaturabhängigkeit der Base-on/Base-off-Schaltung ist in Na-5 entsprechend stärker ausgeprägt: Die Gleichgewichtskonstante $K_{\text{on}}(\text{Na-5})$ sinkt von etwa 10 bei 25 °C auf 0.8 bei 80 °C.^[16] Bei 2 liegt das Base-on/Base-off-Gleichgewicht hingegen im gesamten Temperaturbereich deutlich auf der Seite der Base-on-Form, mit $K_{\text{on}}(2) = 93$ bei 25 °C bzw. 62 bei 80 °C.^[15] Diese Werte sind etwa 10(bzw. 80)-mal größer als diejenigen für Na-5, was bedeutet, dass ΔG_0 des Gleichgewichts von Na-5 um ungefähr -9 (-13) kJ mol⁻¹ günstiger für die Base-off-Form Na-5_{off} ist.

Da die Protonierung der DMB-Base in Cobalaminen zu deren Abspaltung vom Cobaltzentrum und damit zur Base-off-Form führt (Abbildung 1),^[15,17] kann die Basizität „kompletter“ Corrinnoide als Maß der Stabilisierung der Base-on-Form interpretiert werden. Anhand der pH-Abhängigkeit der UV/Vis- und CD-Spektren von Na-5 (siehe Hintergrundinformationen) wurde ein $pK_a(\text{H-5})$ -Wert von 3.78 (± 0.02) ermittelt, der um ca. 0.9 höher ist als $pK_a(\text{H-2})^+$.^[15] Das Ion 5⁻ ist demnach ca. 6-mal basischer als 2, was mit einer weniger stark koordinierenden DMB-Base in Na-5 im Einklang ist.

Kristalle des B₁₂-Nucleotids Na-5 aus wasserhaltigem Aceton waren nicht für die Strukturanalyse geeignet, wohingegen mit Kristallen, die über einen Zeitraum von 18 Monaten bei 5 °C aus Wasser erhalten wurden, eine röntgenkristallographische Analyse mit einer Auflösung von 1.02 Å gelang.^[18] Diese Kristalle enthielten Na-11, den Natriumkomplex der desacetylierten Base-on-Form von Na-5 (Abbildung 4). Derartige Desacetylierungen wurden schon bei anderen O5R-acylierten B₁₂-Derivaten in wässriger Lösung beobachtet.

Die Struktur von Na-11 im Kristall zeigt die Base-on-Form eines „kompletten“ Co_β-Methylcorrinnoids, in dem die

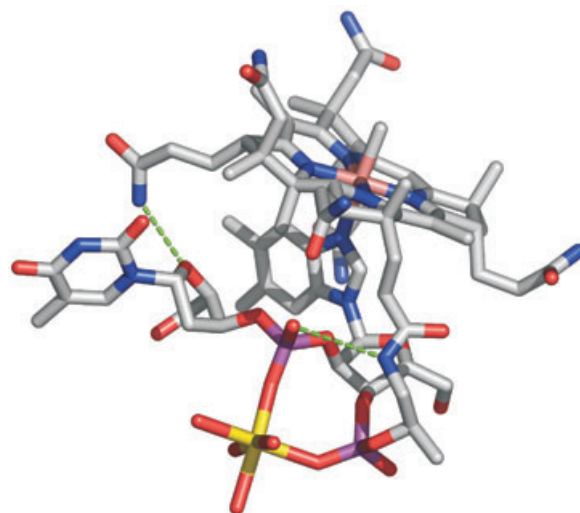


Abbildung 4. Struktur des Base-on-DNA-Konjugats Na-11 im Kristall. Die Wasserstoffbrücken sind durch gestrichelte Linien angedeutet. C grau, N blau, O rot, Na gelb, P violett.

DMB-Base an das Cobaltzentrum koordiniert. Die axiale (Co-N3N)-Bindung ist mit 2.15 Å etwas kürzer als in Methylcobalamin (**2**),^[19] ansonsten sind die Strukturcharakteristika der Cobalamin-Segmente von Na-**11** und **2** vergleichbar. Die gegenseitige Anordnung der 2''-Desoxythymidyl-3'-at- und der Cobamid-Gruppen ist durch zwei Wasserstoffbrücken klar definiert (Abbildung 4). Zwischen dem verbrückenden O-Atom O3R1 des 2''-Desoxythymidyl-3'-ats und der Methylgruppe H₃C(1A) existiert ein nichtbindender Kontakt (siehe Hintergrundinformationen für die Benennung der Atome). Das Natrium-Gegenion bindet an OP_{1R} (des 2''-Desoxythymidyl-3'-at-Phosphats) und OP_R (der B₁₂-Nucleotidschleife) unter Bildung eines bislang nicht bekannten natriumhaltigen Neunrings. Zusätzlich koordinieren vier Wassermoleküle an das Metallion, das folglich verzerrt-oktaedrisch koordiniert ist (die Natrium-Ligand-Bindungslängen nehmen charakteristische Werte an). Diese natriumverbrückte Base-on-Form im Kristall stimmt gut mit den Ergebnissen einer NMR-Studie^[16] von Na-**5** in wässriger Lösung bei niedrigen Temperaturen überein. Die Base-off-Form (Na-**5**_{off}) ist hingegen weniger klar definierbar; **5**_{off} sollte flexibler sein als **5**_{on} und das Natrium-Ion weniger fest binden.

Die zusätzliche Nucleotidgruppe induziert in den B₁₂-Nucleotiden Na-**4** und Na-**5** eine Verschiebung des Gleichgewichts von der Base-on-Form zur Base-off-Form (Abbildung 3b). Dieses temperaturabhängige Schalten wird durch Entropieeffekte herbeigeführt. Während bei B₁₂-Riboschaltern der Einfluss der Bindung von B₁₂ auf die Struktur der mRNA^[2,20] untersucht wurde, richtete sich das Hauptaugenmerk unserer Arbeit auf die B₁₂-Gruppen. Die B₁₂-Nucleotide Na-**4** und Na-**5** bilden dabei kovalente Modelle von „B₁₂-retro-Riboschaltern“, da es ihre Cobalamin-Teile sind, die unter dem Einfluss einer angehängten (Desoxy)Nucleotid-Einheit einen Schaltprozess durchlaufen. Das „retro-Schalten“ durch ein Nucleotid könnte ein unter den metabolitenbindenden Riboschaltern durchaus weit verbreitetes Phänomen sein.^[21] Die B₁₂-Riboschalter sollten dafür besonders gut geeignet sein, da die „kompletten“ Corrinioide selbst zwischen Base-on- und Base-off-Form geschaltet werden können. B₁₂-bindende Proteine^[22,23] und ein B₁₂-bindender Antikörper^[24] sind spezifische Beispiele für ähnliches Verhalten in einer Proteinumgebung. Wie im letzteren Fall gezeigt,^[24] beeinflusst die Strukturänderung die Reaktivität des gebundenen B₁₂-Cofaktors^[25] und kann seine Wirksamkeit als Katalysator in chemischen und enzymatischen Reaktionen erhöhen.^[8] Die Base-off-Form ist ein spezifisches Charakteristikum corrinoider Methyltransferasen wie der Methionin-Synthase.^[22,26,27] In diesem multimodularen Enzym scheint der B₁₂-Cofaktor noch eine zweite Rolle als Konformationsschalter zu übernehmen, um selektive Methylgruppenübertragungen zu kontrollieren.^[29]

Corrinioide erweitern den Wirkungsbereich der Biokatalyse und sind entscheidend am Stoffwechsel von Archaea und anderen Mikroorganismen beteiligt.^[30] Für die Corrin-Struktur wurde ein „präenzymatischer“ Ursprung vorgeschlagen,^[31] und Coenzym B₁₂ (oder ein einfacherer molekularer Vorfahr) könnte bei der Bildung von DNA durch die Reduktion von Ribonucleotiden eine tragende Rolle gespielt haben.^[32] Die Reaktivität von Corrinoiden könnte daher in

Zusammenhang mit einer frühen, RNA-basierten Lebensform gebracht werden.^[6,33]

„Komplette“ Corrinioide entwickelten sich nicht nur zu einzigartigen (organometallischen) Cofaktoren, sondern auch zu biologischen molekularen Schaltern. „B₁₂-retro-Riboschalten“, ein Begriff den wir hier einführen, könnte nicht nur für Coenzym-B₁₂-bindende mRNAs (B₁₂-Riboschalter) relevant sein,^[1-3] die die Bedeutung direkter Wechselwirkungen zwischen B₁₂-Derivaten und RNA für die genetische Entwicklung aufzeigen, sondern auch die Frage beantworten, wie eine kontrollierte katalytische Funktion der Corrinioide in einer Nucleotid-Umgebung zustande gekommen sein könnte. Diese Aspekte laden zu weiteren Studien über die Rolle von B₁₂ in präenzymatischen „Lebensprozessen“ in künstlichen oder natürlichen Nucleotid-Umgebungen ein. Diese Fragestellungen werden in unseren Laboratorien weiter verfolgt.^[12]

Eingegangen am 23. September 2004,
veränderte Fassung am 2. Dezember 2004
Online veröffentlicht am 11. Februar 2005

Stichwörter: Bioorganometallchemie · DNA · Molekulare Schalter · RNA · Vitamin B₁₂

- [1] a) A. Nahvi, N. Sudarsan, M. S. Ebert, X. Zou, K. L. Brown, R. R. Breaker, *Chem. Biol.* **2002**, 9, 1043–1049; b) A. Nahvi, J. E. Barrick, R. R. Breaker, *Nucleic Acids Res.* **2004**, 32, 143–150.
- [2] W. C. Winkler, A. Nahvi, A. Roth, J. A. Collins, R. R. Breaker, *Nature* **2004**, 428, 281–286.
- [3] A. G. Vitreschak, D. A. Rodionov, A. A. Mironov, M. S. Gelfand, *RNA* **2003**, 9, 1084–1097.
- [4] a) J. R. Lorsch, J. W. Szostak, *Biochemistry* **1994**, 33, 973–982; b) D. Sussman, J. C. Nix, C. Wilson, *Nat. Struct. Biol.* **2000**, 7, 53–57.
- [5] a) S. E. Osborne, A. D. Ellington, *Chem. Rev.* **1997**, 97, 349–370; b) M. Famulok, A. Jenne, *Curr. Opin. Chem. Biol.* **1998**, 2, 320–327.
- [6] *The RNA World* (Hrsg.: R. F. Gesteland, T. R. Cech, J. F. Atkins), Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, **1999**.
- [7] *Molecular Switches* (Hrsg.: B. Feringa), Wiley-VCH, Weinheim, **2001**.
- [8] B. Kräutler, S. Ostermann in *The Porphyrin Handbook*, Vol. 11 (Hrsg.: K. M. Kadish, K. M. Smith, R. Guilard), Elsevier, Dordrecht, **2003**, S. 229–276.
- [9] W. Fieber, B. Hoffmann, W. Schmidt, E. Stupperich, R. Konrat, B. Kräutler, *Helv. Chim. Acta* **2002**, 85, 927–944.
- [10] P. G. Lenhert, D. C. Hodgkin, *Nature* **1961**, 192, 937–938.
- [11] *Nucleic Acids in Chemistry and Biology* (Hrsg.: G. M. Blackburn, M. J. Gait), Oxford University Press, Oxford, UK, **1996**.
- [12] M. Fasching, H. Perschinka, C. Eichmüller, S. Gschösser, B. Kräutler, *Chem. Biodiversity*, im Druck.
- [13] B. Kräutler in *Chemistry and Biochemistry of B₁₂* (Hrsg.: R. Banerjee), Wiley, New York, **1999**, S. 315–339.
- [14] K. L. Brown, J. M. Hakimi, *J. Am. Chem. Soc.* **1986**, 108, 496–503.
- [15] K. L. Brown, S. Peck-Siler, *Inorg. Chem.* **1988**, 27, 3548–3555.
- [16] Die Verschiebung diagnostischer Signale (beispielsweise für HC(10), H₃C(1A), HC2N, HC4N) in den ¹H-NMR-Spektren (500 MHz) von Na-**5** zwischen 4 °C und 62 °C bestätigt den

Übergang von Na-5 von der Base-on-Form bei niedrigen Temperaturen zur Base-off-Form bei hohen Temperaturen.

- [17] a) K. L. Brown, J. M. Hakimi, D. M. Nuss, Y. D. Montejano, D. W. Jacobsen, *Inorg. Chem.* **1984**, 23, 1463–1471; b) J. M. Pratt in *B₁₂, Vol. I* (Hrsg.: D. Dolphin), Wiley, New York, **1982**, S. 325–392.
- [18] Strukturbestimmung von Na-11 (Kristallbildung in Wasser): C₇₄H₁₀₅CoN₁₅NaO₂₁P₂·22 H₂O, *M_r* = 2078.9, tetragonale Raumgruppe, *P*4₃, *a* = 17.699 Å, *c* = 61.906 Å, *R*_{sym} = 0.041. Streudaten bis zu einer maximalen Auflösung von 1.02 Å wurden bei 103 K mit Synchrotronstrahlung (*λ* = 0.8126 Å) auf dem Strahlengang X11 am EMBL/DESY in Hamburg aufgenommen. Verfeinerung auf *F*² (9540 unabhängige Reflexe, 2497 Parameter und 3072 Restraints) konvergierte mit *R*1 = 0.1018 und *wR*2 = 0.2799 für alle Reflexe. Details sind in den Hintergrundinformationen angegeben. CCDC-249566 enthält die ausführlichen kristallographischen Daten zu dieser Veröffentlichung. Die Daten sind kostenlos beim Cambridge Crystallographic Data Centre über www.ccdc.cam.ac.uk/data_request/cif erhältlich.
- [19] C. Kratky, B. Kräutler in *Chemistry and Biochemistry of B₁₂* (Hrsg.: R. Banerjee), Wiley, New York, **1999**, S. 9–41.
- [20] a) E. Nudler, A. Mironov, *Trends Biochem. Sci.* **2004**, 29, 11–17; b) S. Müller, *ChemBioChem* **2002**, 3, 817–819.
- [21] Das Binden großer Cofaktoren an eine biomakromolekulare Matrix führt oft zu einer gegenseitigen Strukturanpassung: T. Hermann, D. J. Patel, *Science* **2000**, 287, 820–826.
- [22] a) C. L. Drennan, S. Huang, J. T. Drummond, R. G. Matthews, M. L. Ludwig, *Science* **1994**, 266, 1669–1674; b) M. L. Ludwig, P. R. Evans in *Chemistry and Biochemistry of B₁₂* (Hrsg.: R. Banerjee), Wiley, New York, **1999**, S. 595–632.
- [23] E. Nexø in *Vitamin B₁₂ and B₁₂-Proteins* (Hrsg.: B. Kräutler, D. Arigoni, B. T. Golding), Wiley-VCH, Weinheim, **1998**, S. 461–471.
- [24] R. B. Hannak, R. Konrat, W. Schüler, B. Kräutler, M.-T. M. Auditor, D. Hilvert, *Angew. Chem.* **2002**, 114, 3765–3768; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2002**, 41, 3613–3616.
- [25] B. Kräutler, *Helv. Chim. Acta* **1987**, 70, 1268–1278.
- [26] R. G. Matthews, *Acc. Chem. Res.* **2001**, 34, 681–689.
- [27] Eine Base-off-Form ist in vielen, wenn auch nicht allen, B₁₂-abhängigen Enzymen zu finden.^[8,22,28]
- [28] A. Abend, R. Nitsche, V. Bandarian, E. Stupperich, J. Rétey, *Angew. Chem.* **1998**, 110, 643–645; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1998**, 37, 625–627.
- [29] V. Bandarian, M. L. Ludwig, R. G. Matthews, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2003**, 100, 8156–8163.
- [30] K. Sauer, R. K. Thauer in *Chemistry and Biochemistry of B₁₂* (Hrsg.: R. Banerjee), Wiley, New York, **1999**, S. 655–679.
- [31] A. Eschenmoser, *Angew. Chem.* **1988**, 100, 5–40; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1988**, 27, 5–40.
- [32] J. Stubbe, J. Ge, C. S. Yee, *Trends Biochem. Sci.* **2001**, 26, 93–99.
- [33] a) T. R. Cech, *Biochem. Soc. Trans.* **2002**, 30, 1162–1166; b) F. Joyce, *Nature* **2002**, 418, 214–221; c) A. Schwögl, T. Carell, *Org. Lett.* **2000**, 2, 1415–1418; d) S. Tsukiji, S. B. Pattnaik, H. Suga, *Nat. Struct. Biol.* **2003**, 10, 713–717.