

Neuere Ansätze zur experimentellen Ladungsdichtebestimmung von Vitamin B₁₂**

Birger Dittrich, Tibor Koritsanszky, Anatoliy Volkov, Stefan Mebs und Peter Luger*

Die Kenntnis der sterischen, dynamischen und elektronischen Beiträge zur intermolekularen Wechselwirkung ist von grundlegender Bedeutung, um biologische Prozesse modellieren zu können. Die Röntgenbeugung ist zu einer weit verbreiteten experimentellen Methode zur Untersuchung solcher Fragestellungen avanciert, denn die genaue Auswertung von hochaufgelösten Beugungsdaten liefert nicht nur die Struktur im Festkörper, sondern auch die zugehörige Elektronendichte (ED).^[1] Prinzipiell kann die Methode auch auf größere biologisch relevante Systeme angewendet werden;^[2–5] in der Praxis werden jedoch meist nur kleinere Molekülstrukturen untersucht,^[6] denn die Voraussetzung perfekter Periodizität von Einkristallen verliert umso mehr an Gültigkeit, je größer die Moleküle in der Elementarzelle werden. Dies ist bereits bei Molekülen mittlerer Größe problematisch, wie z.B. den Alkylcobalaminen (R-Cbl), deren Kristallstrukturen aufgrund von fehlgeordneten Seitenketten und Solvensmolekülen als „notorisch ungenau“^[7] bezeichnet wurden.

Alkylcobalamine sind als Cofaktoren Bestandteil von Enzymen, die in Säugetieren vorkommen und die den Transfer von Methylgruppen, Isomerisierungs- und Redoxreaktionen katalysieren. Die beiden ersten Reaktionen beinhalten die Spaltung und die Neubildung der Co-C_R-Bindung, wobei eine reversible heterolytische/homolytische Bindungsspaltung angenommen wird.^[8,9] Da die Coenzyme inaktiv sind und ihre Bindung an das Protein nicht zu einer Änderung des äquatorialen Liganden führt, ist es eine Kernfrage der Forschung an Cobaltenzymen, wie die Co-C_R-

Bindung vom Apoenzym geschwächt wird.^[10] Eine detaillierte Analyse der Elektronenkonfiguration des Cobaltzentrums und damit verbunden des kovalenten Charakters der Co-C_R-Bindung sollte daher ein besseres Verständnis der Destabilisierung durch intermolekulare Kräfte ermöglichen.

Quantenchemische Studien an Cobaltnordinen sind bislang nur an geometrieeoptimierten Modellverbindungen des Coenzymes (Alkylcorrin-Komplexen) durchgeführt worden, die in ihrer Größe durch Weglassen von Seitenketten reduziert waren.^[11] Jüngere Arbeiten basieren auf DFT-Rechnungen ausgehend von experimentellen Geometrien, die aus relativ hoch aufgelösten Einkristall-Beugungsdaten gewonnen wurden. Rechnungen an CN-Cbl,^[12] Me-Cbl^[13] und Ado-Cbl (5'-Desoxy-5'-adenosylcobalamin)^[14] belegen, dass die Co-C_R-Bindung in der Abfolge CN-Cbl, Me-Cbl und Ado-Cbl zunehmend polarisiert wird, obwohl die äquatorialen Liganden, d.h. die Co-N_{eq}-Bindungen, sich invariant zur axialen R-Gruppe verhalten.

Neuere ED-Studien an Übergangsmetallkomplexen^[6] kombinieren d-Orbitalpopulationsanalyse^[15] mit dichtebasierter topologischer Analyse^[16] und ermöglichen eine quantitative Charakterisierung der Metall-Ligand-Wechselwirkung.^[17] Da die ED am bindungskritischen Punkt (BKP) bei diesen Wechselwirkungen gering, andererseits die Kurvatur in Bindungsrichtung (λ_3) hoch ist, kann der Einfluss der radialen Dichtefunktion^[18] ausgeprägt sein – die Grenzen des Standardmultipolmodells^[19] werden zunehmend deutlich. Diese Studie verfolgt folgende neue Ansätze:

- Wir konnten ein neues Solvat von Vitamin B₁₂ mit geringem Lösungsmittelanteil (zwölf Wasser- und drei Propanolmoleküle pro B₁₂-Molekül in der asymmetrischen Einheit) kristallisieren, bei dem nur ein Propanolmolekül partiell fehlgeordnet ist (Abbildung 1). Kristalle dieser Modifikation sind wochenlang stabil in der Mutterlösung, zerfallen jedoch in Minuten oder Sekunden, wenn sie dieser entnommen werden. Die Probe wurde daher von Öl umgeben und schockgefroren auf das Diffraktometer (Bruker Smart 1 K) überführt. Ein hochaufgelöster Datensatz wurde dann bei 100 K mit konventioneller Mo_{Kα}-Strahlung gemessen.^[20]
- Der von uns kürzlich entwickelte Invariomansatz^[21,22] wurde zur Generierung eines Startmodells für die ersten asphärischen Verfeinerungen nach dem Hansen-Coppens-Formalismus^[19] (XD-Programm)^[23] genutzt. Dadurch konnten die Konvergenz der Multipolverfeinerung beschleunigt und die fehlgeordneten Atome besser aufgelöst werden. Die Invariomdichte wurde – ausgehend von der mit SHELXL^[24] konvergent verfeinerten Struktur – durch Überlagerung von 53 chemisch unterschiedlichen transferierbaren Pseudoatomen erhalten, wozu 29 Modellver-

[*] Dipl.-Chem. S. Mebs, Prof. Dr. P. Luger
Institut für Chemie und Biochemie/Kristallographie
Freie Universität Berlin
Fabeckstraße 36a, 14195 Berlin (Deutschland)
Fax: (+ 49) 30-838-53464
E-Mail: luger@chemie.fu-berlin.de

Dr. B. Dittrich
Chemistry M313, School of Biomedical and Chemical Sciences
University of Western Australia
35 Stirling Highway, Crawley, WA 6009 (Australien)

Prof. Dr. T. Koritsanszky
Department of Chemistry, Middle Tennessee State University
P.O. Box 68, Murfreesboro, TN 37132 (USA)

Dr. A. Volkov
Department of Chemistry
State University of New York at Buffalo
747 Natural Sciences Complex, Buffalo, NY 14260-3000 (USA)

[**] Diese Arbeit wurde gefördert von der Deutschen Forschungsgemeinschaft (SPP1178, Lu222/29-1, Ko1350/4-1) und vom Australian Synchrotron Research Program, das vom Commonwealth of Australia über das Major National Research Facilities Programme finanziert wird. B.D. dankt dem ASRP für ein Stipendium.

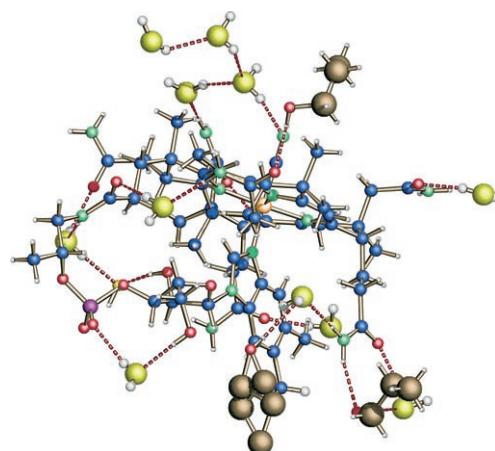


Abbildung 1. Molekülstruktur der untersuchten B₁₂-Modifikation mit zwölf Wasser- (gelb) und drei Propanolmolekülen (bronze), SCHAKAL-Darstellung.^[33]

bindungen^[25] benötigt wurden, die unter Verwendung des B3LYP-Funktionalen und des Basissatzes D95++(3df,3pd) geometrieeoptimiert wurden.^[26] Invariome für Atome des Corrinrings wurden über die Elektronendichte des kompletten Ringsystems bestimmt, für dessen delokalisiertes System eine Beschreibung mit Modellverbindungen, die übernächste Nachbarn enthalten, nicht mehr ausreichte. Die konventionellen Parameter (x,y,z, U_{ij}) wurden zunächst mit festgehaltenen, aus dem Invariommodell hergeleiteten Streufaktoren und idealisierten Bindungslängen der Wasserstoffatome^[27] unter Einbeziehung aller Beugungsdaten verfeinert. In folgenden Kleinste-Quadrat-Zyklen wurden dann alle Multipolparameter der chemisch unabhängigen Pseudoatome außer denen der Solvensmoleküle bis zur Konvergenz verfeinert.

- c) Um die Elektronendichte des Cobaltatoms zu modellieren, wurden drei Arten von radialen Dichtefunktionen (RDF) getestet: Die normalerweise verwendeten Single-Zeta-Slater-Funktionen mit energieoptimierten Hartree-Fock-Exponenten (SZHF),^[28] die gleichen Funktionen, deren Exponenten jedoch an theoretische (B3LYP/TZVP) Strukturfaktoren der Modellverbindung α -Cyan- β -amin-Co^{III}-corrin (CACo(III)C) angepasst wurden (SZFIT). Drittens wurden Radialfunktionen für alle Multipole durch Projektion von Kugelflächenfunktionen auf das Cobalt-Stockholder-Atom dieser Modellverbindung im direkten Raum durch drei Slaterfunktionen beschrieben (STOCK).^[29]

Abbildung 2 belegt, dass die knotenfreien SZFIT-Funktionen, die routinemäßig in Multipolverfeinerungen mit dem Standardmultipolmodell verwendet werden, für die Beschreibung der Dichte des chemisch gebundenen Atoms ungeeignet sind. Unterschiede zwischen SZFIT und STOCK treten besonders bei den Multipolen ungerader Ordnung auf, die bei der STOCK-Beschreibung strukturierter sind als bei der Beschreibung mit SZFIT.

Die Deformationsdichteverteilungen in der Ebene des Corrinrings, die mit der simulierten SZFIT-Verfeinerung an

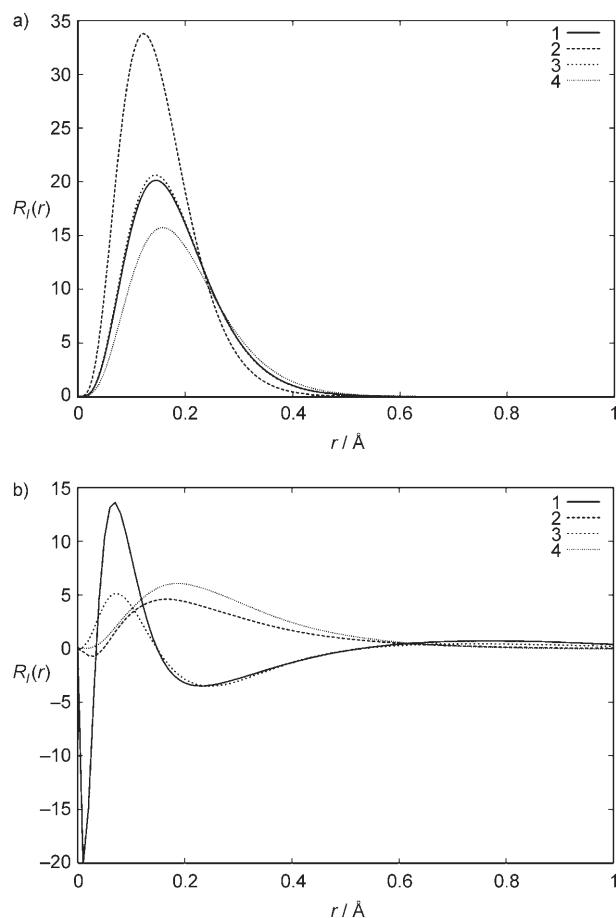


Abbildung 2. Radialdichtefunktion ($R_l(r)$, $l=0-4$) von Co^{III}, erhalten aus einer B3LYP/TZVP-Dichte von CACo(III)C: a) SZFIT, b) STOCK. Weitere Erklärungen der Funktionstypen, siehe Text.

der Modellverbindung CACo(III)C und aus den experimentellen B₁₂-Daten erhalten wurden, sind in Abbildung 3 a und b gezeigt. Beide Darstellungen zeigen deutlich, ebenso wie die Laplace-Funktion, eine Schlüssel-Schloss-Anordnung, wie sie für eine oktaedrische Koordination am Cobaltatom charakteristisch ist. Der Elektronenüberschuss in der Äquatorebene (XY) konzentriert sich in den Winkelhalbierenden der Ver-

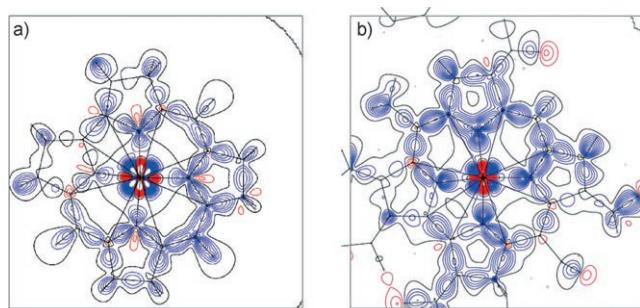


Abbildung 3. a) Deformationsdichte, erhalten aus B3LYP/TZVP-Strukturfaktorberechnung an CACo(III)C. b) Experimentelle statische Deformationsdichte von B₁₂ im Corrinring, erhalten nach Multipolverfeinerung mit SZFIT-Radialfunktion. Positive, Null- und negative Konturintervalle 0.1 eÅ⁻³.

bindungslien des N-Co-N-Winkels, während entlang der C-N-Bindungen (X - und Y -Achsen) Elektronenmangel auftritt. Dieser Sachverhalt spiegelt sich auch in den d-Orbitalpopulationen des Cobaltatoms wider (Tabelle 1), die mit den ver-

Tabelle 1: d-Orbitalpopulationen [%], berechnet aus der theoretischen Elektronendichte der Modellverbindung CACo(III)C und aus Röntgendiffunden von B_{12} unter Anwendung unterschiedlicher Radialdichtefunktionen.

Orbital	CACo(III)C , B3LYP/TZVP		B_{12} , Experiment	
	SZFIT	STOCK	SZFIT	STOCK
z^2	8	0	17	14
x^2-y^2	0	10	10	7
e_g	8	10	27	21
xy	50	26	23	25
yz	40	42	26	28
zx	2	22	24	26
t_{2g}	92	90	73	79

schiedenen Kombinationen von RDFs erhalten wurden. Während sowohl die SZFIT- als auch die STOCK-Basis zu einer bevorzugten Besetzung des feldstabilisierten t_{2g} -Orbitals in beiden Molekülen führen, ist der Beitrag des d_5 -Orbitals zur Bindungssituation des Metallatoms merklich ausgeprägter im B_{12} als in der Modellverbindung. Die relativ hohen z^2 -Populationen (die Z -Achse zeigt in Richtung der Co-CN-Bindung) von B_{12} , die aus beiden Modellen erhalten werden, legen einen signifikanten σ -Beitrag der axialen Bindungen nahe. Dies wird zudem durch die topologische Analyse bestätigt, die abnehmende $\rho(\text{BKP})$ -Werte (Tabelle 2) in

Tabelle 2: Eigenschaften am bindungskritischen Punkt der Co-N- und Co-C-Bindungen.^[a]

Bindung	$\rho(\text{BKP})$ [e \AA^{-3}]	$\nabla^2\rho(\text{BKP})$ [e \AA^{-5}]
Co-C _{ax}	0.89	3.8
	0.83	13.6
	0.93	10.5
Co-N _{ax}	0.65	8.7
	0.41	9.3
	0.37	10.9
Co-N _{eq}	0.76	8.6
	0.66	14.1
	0.71	13.6

[a] 1. Zeile: Theorie (B3LYP/TZPV), 2. Zeile: Experiment (SZFIT), 3. Zeile: Experiment (STOCK). Standardabweichungen für $\rho(\text{BKP})$ und $\nabla^2\rho(\text{BKP})$ sind 0.01 bzw. 0.1. Angaben für die Co-N_{eq}-Bindungen sind über die vier äquatorialen Bindungen gemittelt.

der Reihenfolge Co-CN, Co-N_{eq} und Co-N_{ax} liefert, in Übereinstimmung mit den Ergebnissen der DFT-Rechnung an CACo(III)C . Unterschiede zwischen den Modellen werden am deutlichsten am STOCK-Modell, bei dem die relativ hohe Elektronendichtekonzentration in der Co-CN-Bindung deren Stabilität erklärt, obwohl der BKP sich in einer Region befindet, in der der Wert der Laplace-Funktion positiv ist, was für Metall-Ligand-Wechselwirkungen charakteristisch ist.

In dieser Studie konnte gezeigt werden, dass ein konventionelles Röntgenbeugungsexperiment die Aufnahme eines für die Ladungsdichtebestimmung geeigneten Datensatzes ermöglicht, sogar für eine große Struktur wie die dieser B_{12} -Modifikation mit mehr als 250 Atomen in der asymmetrischen Einheit. Zur Auswertung des Datensatzes kam eine Kombination des Pseudoatomformalismus mit quantenchemischen Methoden zum Einsatz. Die Invariomverfeinerung lieferte zuverlässig Orts- und Verschiebungsparameter, nicht nur für das B_{12} -Molekül, sondern auch für die Lösungsmittelmoleküle, insbesondere das fehlgeordnete Propanolmolekül. Darüber hinaus konnte nachgewiesen werden, dass durch theoretische Methoden erhaltene RDFs für chemisch gebundene Atome denen aus Rechnungen an isolierten Atomen überlegen sind, auch wenn solche Unterschiede im Basissatz sich nicht stark in den üblichen Gütekriterien niederschlagen. Weiterführende Arbeiten zielen auf die Berechnung von atomaren Eigenschaften basierend auf der Elektronendichte von B_{12} ab. Der Vergleich mit analogen Ergebnissen des Coenzyms, für das Einkristalle ausreichen der Streukraft gezüchtet werden müssen, ist in Vorbereitung.

Experimentelles

Einkristalle wurden durch langsame Diffusion von *n*-Propanol in eine gesättigte wässrige Lösung von B_{12} erhalten. Eine Serie von 14 Runs mit jeweils 606 Frames (Bruker-CCD-Diffraktometer) wurde bei Einstellungen für 2θ (und Belichtungszeiten) von 0 (10 s), -30 (20 s), -60 (83 s) und -90° (180 s) gemessen. Dabei wurde Mo K_α -Strahlung einer 2.4-kW-Röhre genutzt.^[20] Um die Redundanz der Daten zu erhöhen, wurde eine zusätzliche Messung unter Variation des ϕ -Winkels bei $2\theta = -60$ hinzugefügt. Die Schrittweite betrug jeweils 0.3° in ω oder ϕ . Die Strategie zur Datensammlung wurde mit ASTRO^[30] erstellt und die Messung mit SMART^[30] gesteuert; Integration und Datenreduktion wurden mit SAINT^[30] und SORTAV^[31] durchgeführt.

660822 Reflexe wurden gemessen, davon waren 98204 symmetriunabhängig (Redundanz 6.7) und 70663 Reflexe beobachtet mit $F_o > 3\sigma(F_o)$. Analytische Absorptionskorrektur mit dem Programm Euhedral^[34], interner R -Wert 3.6%. Strukturlösung mit SHELXS-97,^[32] der sphärische R -Wert mit SHELXL-97^[24] betrug 4.8%. Die Multipolverfeinerung ergab einen R_F -Wert von 4.1% und einen R_w von 3.4%. CCDC 614012 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.

Eingegangen am 22. September 2006
Online veröffentlicht am 7. März 2007

Stichwörter: Cobalamine · Computerchemie · Ladungsdichte · Röntgenbeugung · Vitamin B_{12}

- [1] P. Coppens, *X-ray Charge Densities and Chemical Bonding*, Oxford University Press, Oxford, 1997.
- [2] C. Jelsch, V. Pichon-Pesme, C. Lecomte, A. Aubry, *Acta Crystallogr. Sect. D* **1998**, 54, 1306–1318.
- [3] D. Housset, F. Benabicha, V. Pichon-Pesme, C. Jelsch, A. Maihofer, S. David, J. C. Fontecilla-Camps, C. Lecomte, *Acta Crystallogr. Sect. D* **2000**, 56, 151–160.

- [4] C. Jelsch, M. M. Teeter, V. Lamzin, V. Pichon-Pesme, R. H. Blessing, C. Lecomte, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2000**, *97*, 3171–3176.
- [5] C. Lecomte, B. Guillot, N. Muzet, V. Pichon-Pesme, C. Jelsch, *Cell. Mol. Life Sci.* **2004**, *61*, 774–782.
- [6] T. Koritsanszky, P. Coppens, *Chem. Rev.* **2001**, *101*, 1583–1627.
- [7] C. Kratky, B. Kräutler, *Chemistry and Biochemistry of B₁₂*, **1999**, Wiley, New York.
- [8] R. G. Matthews, *Acc. Chem. Res.* **2001**, *34*, 681–689.
- [9] L. G. Marzilli in *Bioinorganic Catalysis* (Hrsg.: J. Reedijk, E. Bouwman), Marcel Dekker, New York, **1999**, S. 423.
- [10] *B₁₂* (Hrsg.: D. Dolphin), Wiley, New York, **1982**.
- [11] Siehe z.B.: S. H. Kim, H. L. Chen, N. Feilchenfeld, J. Halpern, *J. Am. Chem. Soc.* **1988**, *110*, 3120–3126; M. F. Summers, P. J. Toscano, N. Bresciani-Pahor, G. Nardin, L. Randaccio, L. G. Marzilli, *J. Am. Chem. Soc.* **1983**, *105*, 6259–6263; L. Randaccio, N. Bresciani-Pahor, E. Zangrandi, L. G. Marzilli, *Chem. Soc. Rev.* **1989**, *18*, 225–250.
- [12] L. Ouyang, L. Randaccio, P. Rulis, E. Z. Kurmaev, A. Moewes, W. Y. Ching, *J. Mol. Struct.* **2003**, *622*, 221–227.
- [13] E. Z. Kurmaev, A. Moewes, L. Ouyang, L. Randaccio, P. Rulis, W. Y. Ching, *Europhys. Lett.* **2003**, *62*, 582–587.
- [14] L. Ouyang, P. Rulis, W. Y. Ching, G. Nardin, L. Randaccio, *Inorg. Chem.* **2004**, *43*, 1235–1241.
- [15] A. Holladay, P. Leung, P. Coppens, *Acta Crystallogr. Sect. A* **1983**, *39*, 377–387.
- [16] R. F. W. Bader, *Atoms in Molecules: A Quantum Theory*, Oxford University Press, Oxford, **1990**.
- [17] P. Macchi, L. Garlaschelli, S. Martinengo, A. Sironi, *J. Am. Chem. Soc.* **1999**, *121*, 10428–10429.
- [18] A. Volkov, Yu. Abramov, P. Coppens, C. Gatti, *Acta Crystallogr. Sect. A* **2000**, *56*, 332–339.
- [19] N. K. Hansen, P. Coppens, *Acta Crystallogr. Sect. A* **1978**, *34*, 909–921.
- [20] Kristall- und experimentelle Daten von B₁₂, (Cyanocobalamin)-(12 Wasser)-(3 Propanol):
 $C_{63}H_{88}CoN_{14}O_{14}P\cdot12H_2O\cdot3C_3H_7OH$ bei 100 K: Kristallgröße 0.4 × 0.26 × 0.2 mm³, orthorhombisch *P2₁2₁2₁*, *a* = 15.831(4), *b* = 22.374(5), *c* = 25.304(6) Å, *V* = 8963(4) Å³, *Z* = 4, $\rho_{ber.}$ = 1.30 g cm⁻³, $\mu(Mo_K\alpha)$ = 0.29 mm⁻¹, $\lambda(Mo_K\alpha)$ = 0.7107 Å, ($\sin \theta$)/ λ_{max} = 1.22 Å⁻¹.
- [21] B. Dittrich, T. Koritsanszky, P. Luger, *Angew. Chem.* **2004**, *116*, 2773–2776; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2004**, *43*, 2718–2721.
- [22] B. Dittrich, C. B. Hübschle, M. Messerschmidt, R. Kalinowski, D. Girnt, P. Luger, *Acta Crystallogr. Sect. A* **2005**, *61*, 314–320.
- [23] T. Koritsanszky, T. Richter, P. Macchi, A. Volkov, C. Gatti, S. Howard, P. R. Mallinson, L. Farrugia, Z. Su, N. K. Hansen, XD, Computer Program Package for the Multipole Refinement and Topological Analysis of Electron Densities from Diffraction Data, **2003**.
- [24] G. M. Sheldrick, SHELXL-97, A Program for the Refinement of Crystal Structures, Universität Göttingen, **1997**.
- [25] Hintergrundinformationen zur Invariomanwendung sind auf Anfrage erhältlich. Sie enthalten einen Vergleich von Gütefaktoren für die sphärische und Invariomverfeinerung, Invariomnamen und die verwendeten Modellverbindungen.
- [26] Gaussian 98 (Revision A.7), M. J. Frisch, G. W. Trucks, H. B. Schlegel, G. E. Scuseria, M. A. Robb, J. R. Cheeseman, V. G. Zakrzewski, J. A. Montgomery, R. E. Stratmann, J. C. Burant, S. Dapprich, J. M. Millam, A. D. Daniels, K. N. Kudin, M. C. Strain, O. Farkas, J. Tomasi, V. Barone, M. Cossi, R. Cammi, B. Menennucci, C. Pomelli, C. Adamo, S. Clifford, J. Ochterski, G. A. Petersson, P. Y. Ayala, Q. Cui, K. Morokuma, D. K. Malick, A. D. Rabuck, K. Raghavachari, J. B. Foresman, J. Cioslowski, J. V. Ortiz, B. B. Stefanov, G. Liu, A. Liashenko, P. Piskorz, I. Komaromi, R. Gomperts, R. L. Martin, D. J. Fox, T. Keith, M. A. Al-Laham, C. Y. Peng, A. Nanayakkara, C. Gonzalez, M. Challacombe, P. M. W. Gill, B. G. Johnson, W. Chen, M. W. Wong, J. L. Andres, M. Head-Gordon, E. S. Replogle, J. A. Pople, Gaussian, Inc., Pittsburgh (USA), **1998**.
- [27] F. H. Allen, *Acta Crystallogr. Sect. B* **1986**, *42*, 515–522.
- [28] E. Clementi, C. Roetti, *At. Data Nucl. Data Tables* **1974**, *14*, 177–478.
- [29] T. Koritsanszky, A. Volkov, *Chem. Phys. Lett.* **2004**, *385*, 431–434.
- [30] Programme ASTRO 1995–1996, SMART 1996, SAINT 1994–1996, Bruker-AXS Inc., Madison (USA).
- [31] R. H. Blessing, *Acta Crystallogr. Sect. A* **1995**, *51*, 33–38.
- [32] G. M. Sheldrick, SHELXS-97, A Program for Crystal Structure Solution, Universität Göttingen, **1997**.
- [33] E. Keller, SCHAKAL97, A Fortran Program for the Graphical Representation of Molecular and Crystallographic Models, Universität Freiburg, **1997**.
- [34] M. Lutz, Euhedral Tutorial, Universität Utrecht, **2003**.