

Magische Radikalchemie mit B₁₂: B₁₂-katalysierte lichtinduzierte Spaltung von DNA

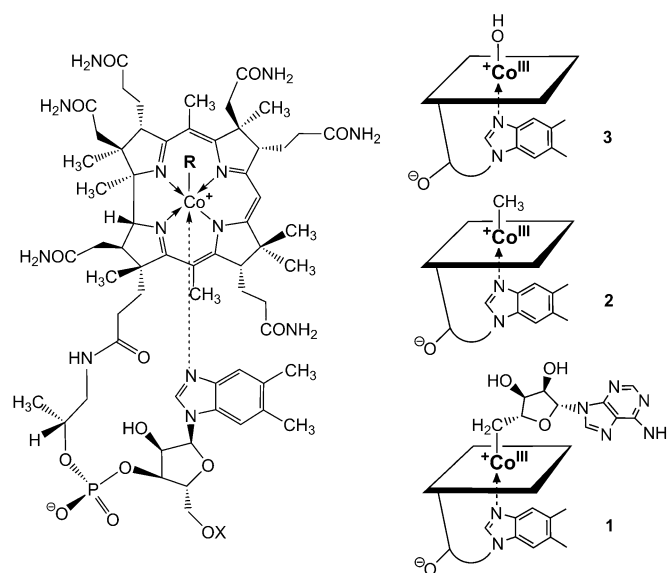
Bernhard Kräutler* und Barbara Puffer

Bioanorganische Chemie · DNA-Spaltung ·
Photochemie · Radikalreaktionen · Vitamine

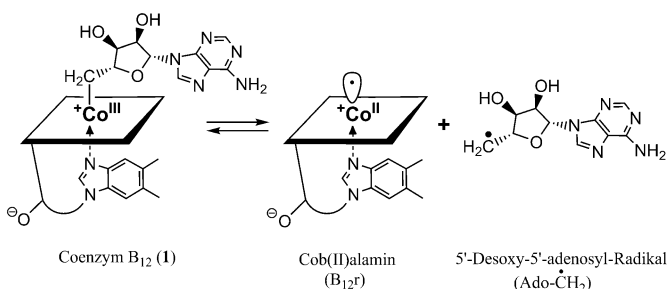
Coenzym B₁₂ (**1**) ist ein bemerkenswerter Cofaktor,^[1,2] dessen inhärente Reaktivität – der reversible Zerfall in ein reaktives primäres Radikal^[3] und einen effizienten Radikalfänger^[4] – die chemische Grundlage seiner biologischen Funktionen ist.^[5] Die radikalischen Fragmente von **1** werden unter Enzymkontrolle für die Katalyse zahlreicher „chemisch schwieriger“ radikalischer Prozesse eingesetzt, die für die meisten lebenden Organismen, einschließlich Menschen, von großer Bedeutung sind.^[5–7] Auch die einfachere Variante von **1**, Methylcobalamin (**2**), die über eine Cobalt-gebundene Methylgruppe verfügt, wirkt als enzymatischer Cofaktor und trägt so zur Katalyse der meist heterolytischen Methylgruppen-transfer-Reaktionen bei.^[5,8] Die beachtliche Leistungsfähigkeit der B₁₂-Cofaktoren in metallorganischen Reaktionen^[8,9] ist dabei eng mit den Stoffwechselfunktionen der Corrinoiden verknüpft.^[5] Für die einzigartige chemische Reaktivität der Cofaktoren **1** und **2** ist deren spezieller Aufbau verantwortlich: Sie bestehen aus einem komplexen Cobalt-Corrin, einer an das Cobaltatom koordinierenden Dimethylbenzimidazol-Nukleotidfunktion und einem metallorganischen Liganden (Schema 1).^[8,9] Vitamin B₁₂ (Cyanocobalamin) und Hydroxocobalamin (**3**) sind weitere B₁₂-Derivate, die zwar kommerziell von Bedeutung sind, aber keine direkte physiologische Rolle zu spielen scheinen.

Durch die Thermolyse von **1** oder durch Anregung von **1** oder **2** mit sichtbarem Licht wird die gut erforschte Homolyse der Co-C-Bindung initiiert, wobei (primäre) 5'-Desoxyadenosylradikale aus **1** (Schema 2) oder Methylradikale aus **2** gebildet werden. Im Unterschied dazu gelten Vitamin B₁₂ und Hydroxocobalamin (**3**) als relativ stabil (in wässrigen Lösungen), sogar gegen Licht.^[10] In einer kürzlich vorgestellten Studie konnte jedoch die Bildung von Hydroxylradikalen durch die Photolyse von **3** in der Gegenwart von Sauerstoff nachgewiesen werden (Schema 3).^[11] Diese photochemisch hergestellten Hydroxylradikale spalteten doppelsträngige zirkuläre Plasmid-DNA mehrfach, was auf einen „multiple turnover“ des B₁₂-Derivates **3** schließen lässt und die Annahme stützt, dass **3** als Photokatalysator wirkt. Eine echte katalytische Rolle des Hydroxocobalamins (**3**) kann durch

einen zweistufigen Mechanismus erklärt werden, bei dem zunächst die photoinduzierte Bildung eines Hydroxylradikals und des Cob(II)alamins (B_{12r}) stattfindet und anschließend die Rückoxidation von B_{12r} zum Co^{III}-Corrin **3** durch molekularen Sauerstoff (Schema 3).^[10,12]

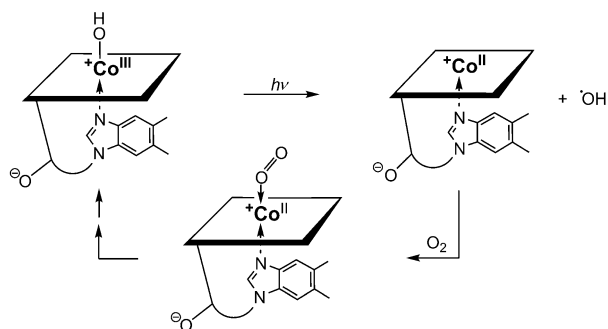


Schema 1. Strukturformeln und Symbole der Cob(III)alamine Coenzym B₁₂ (**1**; R = 5'-Desoxy-5'-adenosyl, X = H), Methylcobalamin (**2**; R = CH₃, X = H), Hydroxocobalamin (**3**; R = OH, X = H) und eines Konjugates von **3** mit Spermin (**4**; R = OH, X = C(O)NH(CH₂)₃NH-(CH₂)₄NH(CH₂)₃NH₂).



Schema 2. Coenzym B₁₂ (**1**) wirkt als reversible Quelle des primären 5'-Desoxyadenosyl-Radikals und von Cob(II)alamin (B_{12r}), einem effizienten Radikalfänger.

[*] Prof. Dr. B. Kräutler
Institut für Organische Chemie & Centre of Molecular Biosciences
(CMBI), Universität Innsbruck
Innrain 52a, 6020 Innsbruck (Österreich)
E-Mail: bernhard.kraeutler@uibk.ac.at



Schema 3. Photohomolyse von Hydroxocobalamin (**3**) generiert ein Hydroxylradikal und Cob(II)alamin, das durch molekularen Sauerstoff zu **3** rückoxidiert wird.

Die Verwendung von Hydroxylradikalen ist eine weitverbreitete Footprinting-Methode, um die Struktur von Nukleinsäuren zu untersuchen, und wurde beispielsweise zur Charakterisierung ungewöhnlich geformter DNA sowie für die Erforschung von DNA-Protein-Interaktionen und RNA-Faltungen herangezogen.^[13] Der größte Vorteil von Hydroxylradikalen gegenüber anderen Footprinting-Reagentien ist ihre außerordentliche Reaktivität, die zu einer sequenzunabhängigen Strangspaltung führt, die in erster Linie durch die Lösungsmittelzugänglichkeit der jeweiligen Nukleotide bestimmt wird. Die am häufigsten verwendete Methode, Hydroxylradikale zu generieren – die so genannte Fenton-Reaktion von Fe^{II} -EDTA (EDTA = Ethylendiamintetraacetat) mit H_2O_2 ^[13] – stößt jedoch bei intrazellulären Anwendungen an ihre Grenzen, da die Initiation und Termination der Radikalreaktion nicht präzise kontrolliert werden können. Die von Shell und Lawrence^[11] entwickelte Methode jedoch ermöglicht durch die Verwendung von Hydroxocobalamin (**3**) als Radikalquelle auch intrazellulär eine zeitliche Kontrolle aufgrund der Lichtabhängigkeit des photokatalytischen Zyklus. Darüber hinaus konnte durch den Einsatz des Photokatalysators **4**, der durch Konjugation des DNA-bindenden Moleküls Spermin an **3** hergestellt wurde, eine hundertfache Steigerung der Strangspaltungseffizienz gegenüber jener von Hydroxocobalamin erzielt werden.

Die faszinierende effektive Inertheit des B_{12} -Derivates **3** unter reaktiven radikalischen Reaktionsbedingungen in der Studie von Shell und Lawrence^[11] erinnert an das Verhalten von Coenzym B_{12} (**1**) und Methylcobalamin (**2**). Diese photolabilen metallorganischen Cofaktoren bleiben bekanntermaßen ebenfalls insgesamt gesehen unverändert, wenn ihre (Sauerstoff-freien) wässrigen Lösungen mit Licht bestrahlt werden.^[8] Erklärt werden können diese Beobachtungen durch die außergewöhnlich effiziente und selektive Rekombination der photochemisch generierten Radikal(oid)e zu den Ausgangscobalaminen, wobei praktisch keine Nettoumwandlungen zu anderen Produkten auftreten. Die überraschende Beständigkeit der komplexen multifunktionellen

Cobalamine gegen den Abbau durch Radikale lässt sich vermutlich größtenteils auf die äußerst effiziente Kombination der Radikale mit dem Homolysefragment Cob(II)alamin zurückführen. Dieses radikalische Co^{II} -Corrin ist ein idealer Radikalfänger, da seine Struktur dem Cobalt-Corrin-Teil des Co^{III} -Corrins (vgl. **1–3**) entspricht.^[8] Außerdem steuert die Cobalt koordinierende Nukleotidfunktion die Rekombinationsreaktionen an der („oberen“) β -Seite und trägt so zur Strukturintegrität des resultierenden Cob(III)alamins bei. In Anbetracht des postulierten präenzymatischen Ursprungs der (grundlegenden Elemente der) B_{12} -Struktur und der abgeleiteten präbiotischen Verfügbarkeit der grundlegenden Reaktivität der Cobalt-Corrinoide (wie der Cobalamine **1–3**)^[1] ist die beobachtete, einzigartige Resistenz der hoch substituierten Cobalt-Corrine gegen den Abbau durch aggressive Radikale wahrlich bemerkenswert.

Die außerordentliche Eigenschaft von Coenzym B_{12} (**1**), als eine reversible Quelle organischer Radikale zu wirken, ist die Basis für seine Rolle als Cofaktor in Enzymen, die „chemisch schwierige“ Transformationen wichtiger Metaboliten katalysieren. Shell und Lawrence haben nun die bemerkenswerte Vielseitigkeit der Cobalamine in radikalischen Reaktionen noch erweitert, indem sie Hydroxocobalamin als photokatalytische Quelle von Hydroxylradikalen für die Untersuchung komplexer biologischer Proben wie DNA genutzt haben.^[11] Diese neue Strategie ist besonders vielversprechend für intrazelluläre Anwendungen, da sowohl Initiation als auch Terminierung der Radikalreaktion durch sichtbares Licht kontrolliert werden können. Das „alte Vitamin“ wurde so zu einem neuen Hilfsmittel, das dazu beiträgt, die verfügbaren Techniken für die Strukturuntersuchung komplexer zellulärer Komponenten zu erweitern.

- [1] A. Eschenmoser, *Angew. Chem.* **1988**, *100*, 5–40; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1988**, *27*, 5–39.
- [2] J. Stubbe, *Science* **1994**, *266*, 1663–1664.
- [3] J. Halpern, *Science* **1985**, *227*, 869–875.
- [4] B. Kräutler, *Biochem. Soc. Trans.* **2005**, *33*, 806–810.
- [5] R. G. Matthews in *Metal-Carbon Bonds in Enzymes and Cofactors*, Vol. 6 (Hrsg.: A. Sigel, H. Sigel, R. K. O. Sigel), The Royal Society of Chemistry, Cambridge, **2009**, S. 53–114.
- [6] *Chemistry and Biochemistry of B_{12}* (Hrsg.: R. Banerjee), Wiley, New York, **1999**.
- [7] *Vitamin B_{12} and B_{12} Proteins* (Hrsg.: B. Kräutler, D. Arigoni, B. T. Golding), Wiley-VCH, Weinheim, **1998**.
- [8] B. Kräutler in *Metal-Carbon Bonds in Enzymes and Cofactors*, Vol. 6 (Hrsg.: A. Sigel, H. Sigel, R. K. O. Sigel), The Royal Society of Chemistry, Cambridge, Großbritannien, **2009**, S. 1.
- [9] K. L. Brown, *Chem. Rev.* **2005**, *105*, 2075–2149.
- [10] J. M. Pratt, *Inorganic Chemistry of Vitamin B_{12}* , Academic Press, New York, **1972**.
- [11] T. A. Shell, D. S. Lawrence, *J. Am. Chem. Soc.* **2011**, *133*, 2148–2150.
- [12] E. Hohenester, C. Kratky, B. Kräutler, *J. Am. Chem. Soc.* **1991**, *113*, 4523–4530.
- [13] T. D. Tullius, J. A. Greenbaum, *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2005**, *9*, 127–134.