

Wasserstoffbrücken führen das kurzlebige 5'-Desoxyadenosylradikal zum Tatort**

Wolfgang Buckel,* Peter Friedrich und Bernard T. Golding

Coenzyme · Methylmalonyl-CoA-Mutase · Molekül-dynamik · Negative Katalyse · Wasserstoffbrücken

Koenzym B₁₂ (5'-Desoxyadenosylcobalamin) ist Kofaktor zweier Enzymklassen: der Mutasen und der Eliminasen. Mutasen katalysieren reversible Kohlenstoffgerüstumlagerungen, z. B. von (S)-Glutamat zu (2S,3S)-3-Methylaspartat, und Wanderungen von Aminogruppen zum benachbarten Kohlenstoffatom. Die Eliminasen sind für die irreversible Eliminierung von Hydroxygruppen aus vicinalen Diolen, z. B. die Dehydratisierung von Glycerin zu 3-Hydroxypropanal, und von Aminogruppen aus 1,2-Aminoalkoholen verantwortlich. Diese Radikalenzyme arbeiten nach einem gemeinsamen Mechanismus, in dem ein Wasserstoffatom und ein größerer Substituent ihre Plätze an benachbarten sp³-Kohlenstoffatomen tauschen.^[1] Ein eingehend untersuchtes Beispiel ist die Methylmalonyl-CoA-Mutase (CoA = Koenzym A), die in tierischen Mitochondrien und Bakterien vorkommt und die reversible Umwandlung von (R)-Methylmalonyl-CoA zu Succinyl-CoA katalysiert (Schema 1). Bindung von Methylmalonyl-CoA oder Succinyl-CoA an das Enzym induziert die homolytische Spaltung der Cobalt-Kohlenstoff- σ -Bindung des Koenzyms, wobei Cob(II)alamine und das 5'-Desoxyadenosylradikal, das die Katalyse initiiert, entstehen. Im Enzym läuft diese Homolyse 10¹²-mal schneller ab als in wässriger Lösung des freien ungebundenen Koenzyms.^[2] Das 5'-Desoxyadenosylradikal abstrahiert ein Wasserstoffatom von der Methylgruppe des Methylmalonyl-CoA, und das dabei gebildete Methylenmalonyl-CoA-Radikal lagert sich zum 3-Succinyl-CoA-Radikal um, wahrscheinlich über ein cyclisches Intermediat (Schema 1B).^[3] Die nachfolgende H-Übertragung von der Methylgruppe des gebildeten 5'-Desoxyadenosins auf das 3-Succinyl-CoA-Radikal liefert Succi-

nyl-CoA und regeneriert das 5'-Desoxyadenosylradikal, das sich mit Cob(II)alamine wieder zum Koenzym vereinigt.^[1] Hinweise auf diesen Mechanismus kamen von EPR-spektroskopischen Messungen, die ein hybrides Triplett-Spinsystem zeigten, das auf Austausch- und Dipolkopplungen zwischen einem organischen Radikal und dem Low-Spin-Co²⁺-Zentrum des Cob(II)alamins im Abstand von 660 pm (6.6 Å) zurückzuführen ist. Mithilfe von ¹³C-markiertem Methylmalonyl-CoA konnte das organische Radikal als 3-Succinyl-CoA-Radikal, das durch die benachbarte Carboxygruppe stabilisiert ist, identifiziert werden; die beiden Methylenradikale, besonders das 5'-Desoxyadenosylradikal, waren im EPR-Spektrum nicht sichtbar.^[4] Ähnliche Experimente waren bereits früher mit Glutamat-Mutase durchgeführt worden.^[5]

Das 5'-Desoxyadenosylradikal ist eine hoch reaktive Spezies ohne Resonanzstabilisierung, die mit einem Adeninrest ausgestattet ist, der als Anker das Radikal am Protein fixiert. Rotation um die C-N-Bindung zwischen Adenin und Ribose in den Eliminasen ermöglicht es dem Radikal, ein Wasserstoffatom vom Substrat zu abstrahieren, das 870 pm weit vom Cobaltatom entfernt ist.^[6] In den Mutasen ist dieser Abstand durch Pseudorotation der Ribose von der C2'-endo-zur C3'-endo-Konformation bei einem fixierten C-N-Torsionswinkel auf 660 pm verringert.^[7] Wegen seiner äußerst kurzen Halbwertszeit von 2 ns konnte das 5'-Desoxyadenosylradikal niemals EPR-spektroskopisch während einer enzymatischen Reaktion nachgewiesen werden. Eine wesentliche Verlängerung der Halbwertszeit gelang durch Verwendung von 5'-Desoxy-3',4'-anhydroadenosylcobalamin als Koenzym für die Dioldehydratase, eine Eliminase.^[8] Die EPR-Spektren zeigten tatsächlich die Bildung des 5'-Desoxy-3',4'-anhydroadenosylradikals, allerdings mit einer 5000-mal niedrigeren Dehydrataseaktivität, da dieses resonanzstabilisierte Allylradikal viel weniger reaktiv als das 5'-Desoxyadenosylradikal ist.

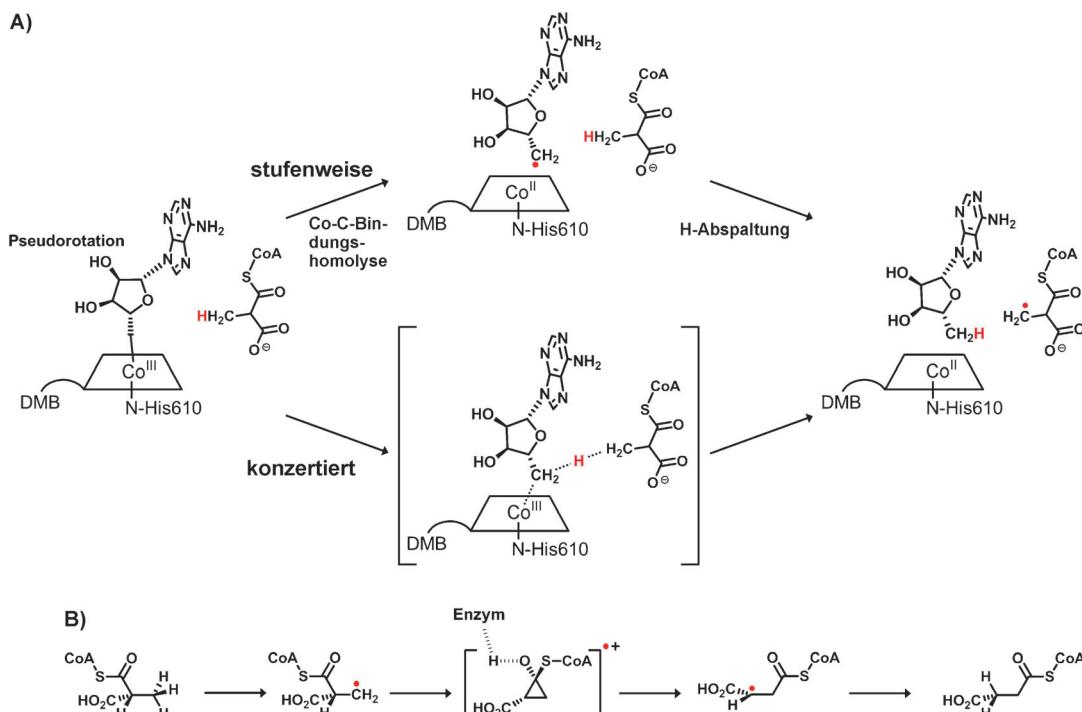
Der fehlende experimentelle Nachweis des postulierten 5'-Desoxyadenosylradikals veranlasste mehrere Forscher, einen konzentrierten Mechanismus für die Mutasen zu postulieren, bei dem Homolyse der Co-C-Bindung und H-Abstraktion vom Substrat synchron verlaufen (Schema 1). Allerdings macht der oben erwähnte Abstand von 660 pm zwischen dem Cobaltatom und dem Substrat einen solchen Mechanismus weniger wahrscheinlich. Die beobachtete schwache Kopplung zwischen dem Co²⁺-Zentrum des

[*] Prof. Dr. W. Buckel, Dr. P. Friedrich
Laboratorium für Mikrobiologie, Fachbereich Biologie
Philipps-Universität
35032 Marburg (Deutschland)
E-Mail: buckel@biologie.uni-marburg.de
Homepage: <http://www.uni-marburg.de/fb17/fachgebiete/mikrobio/mikrobichem>

Dr. P. Friedrich, Prof. Dr. B. T. Golding
School of Chemistry, Bedson Building, Newcastle University
Newcastle upon Tyne NE1 7RU (Großbritannien)

Prof. Dr. W. Buckel
Max-Planck-Institut für terrestrische Mikrobiologie
Karl-von-Frisch-Straße 10, 35043 Marburg (Deutschland)

[**] Die Arbeit wurde von der Max-Planck-Gesellschaft und dem Schwerpunktprogramm 1319 der DFG unterstützt.



Schema 1. Mechanismus der Methylmalonyl-CoA-Mutase. A) Stufenweise oder konzertierte H-Abstraktion (modifiziert aus Lit. [13]). B) Thioesterwanderung über ein cyclisches Intermediat, das durch partielle Protonierung stabilisiert wird (modifiziert aus Lit. [3]). DMB = 5,6-Dimethylbenzimidazol.

Cob(II)alamins und dem Substratradikal („*There are two radicals talking to each other*“, Brian Hoffman, Northwestern University, USA), die zwischen dem Co^{2+} -Ion und dem 5'-Desoxyadenosylradikal auf dem Weg zum Substrat über Pseudorotation der Ribose sicher wesentlich stärker ist, wurde als Hinweis erachtet, dass Cob(II)alamin nicht nur als Zuschauer („spectator“), sondern aktiv an der Reaktion beteiligt ist („conductor“).^[9]

Quantenmechanische Rechnungen in der Gasphase führten zum Postulat einer starken H-Brücke ($\Delta G \approx -30 \text{ kJ mol}^{-1}$) zwischen C19-H des Koenzyms (Abbildung 1) und 3'-O der Ribose des 5'-Desoxyadenosylradikals, die sich nach Spaltung der Co-C-Bindung und Pseudorotation der Ribose bilden sollte und so das 5'-Desoxyadenosylradikal zum Substrat schiebt.^[10] Allerdings lassen das Fehlen eines Austausches von C19-H mit D_2O und die Fähigkeit von 3',5'-Didesoxyadenosylcobalamin, mit nur einem 10-fach niedrigerem k_{cat}/K_m -Wert das Koenzym B_{12} in der Glutamat-Mutase zu ersetzen, auf eine viel schwächere Wechselwirkung von nur $\Delta G \geq -7 \text{ kJ mol}^{-1}$ schließen.^[11] Die 2'-OH-Gruppe von Koenzym B_{12} ist hingegen für die Katalyse von großer Bedeutung, denn bei ihrer Entfernung büßen sowohl Glutamat-Mutase^[11] als auch Methylmalonyl-CoA-Mutase^[12] fast vollständig ihre Aktivität ein.

Bucher et al. führten nun ausführliche Rechnungen für die Katalyse der Methylmalonyl-CoA-Mutase durch.^[13] Sie verwendeten molekulardynamische Simulationen nach Car und Parrinello in einem quantenmechanischen/molekülmechanischen Rahmen, wobei Wechselwirkungen der Aminosäurereste des Proteins über und unterhalb der Ebene des Corrinrings des Koenzyms berücksichtigt wurden. Besonders

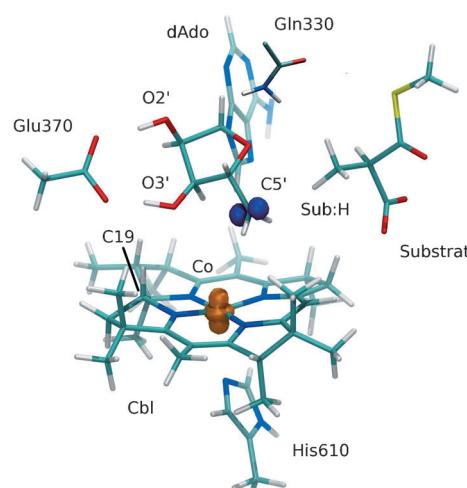


Abbildung 1. Zugabe des Substrats (R)-Methylmalonyl-CoA [in der Rechnung und in der Figur vereinfacht als (R)-Methylmalonylmethylthiol] zu Methylmalonyl-CoA-Mutase mit gebundenem Koenzym B_{12} (Cbl) verursacht Homolyse der Co-C-Bindung und Wanderung des 5'-Desoxyadenosylradikals (dAdo) zur Methylgruppe des Substrats durch Pseudorotation der Ribose. Dieser Prozess wird durch die Bildung von H-Brücken zwischen Glutamat 370 und 2'-OH sowie zwischen C19-H und 3'-O angetrieben (Abbildung 3 a aus Lit. [13]). Sub:H = Wasserstoffatom des Substrats, das von dAdo abstrahiert wird.

achten die Forscher darauf, wie das Protein die Co-C5'-Homolyse erleichtert und das sich bildende Radikal zum Substrat begleitet. Als wichtiges Ergebnis wurde das Reaktionsenthalpieprofil der Co-C5'-Homolyse und der H-Abstraktion vom Substrat entlang der Co-C5'- und C5'-H-Ko-

ordinaten erhalten. Beginnend bei 205 pm zeigte das Profil zwei Maxima: eines bei 360 pm, das der Aktivierungsenergie der Spaltung der Co-C-Bindung (64 kJ mol^{-1}) entspricht, und ein anderes bei 600 pm, das die Aktivierungsenergie der H-Abstraktion (82 kJ mol^{-1}) aufzeigt. Ein flaches Minimum bei 400–450 pm (56 kJ mol^{-1}) lässt auf das 5'-Desoxyadenosylradikal als eigenständige Spezies schließen. Das Profil legt nahe, dass die Rekombination des Radikals mit Cob(II)alamin wesentlich günstiger sei als die H-Abstraktion, allerdings weisen weitere Rechnungen darauf hin, dass sich eine H-Brücke zwischen der 2'-OH-Gruppe des Radikals und dem Glutamatrest 370 des Proteins bildet. Das Radikal wird also zum Substrat durch Pseudorotation der flexiblen Ribosegruppe geschoben. Im Unterschied dazu bleibt die zweite H-Brücke zwischen der 3'-OH-Gruppe des Radikals und dem Glutamatrest 370 während der gesamten Wanderung des 5'-Desoxyadenosylradikals vom Cobaltatom zum Substrat bestehen, was unsere Befunde mit der Glutamat-Mutase stützt.^[11] Ein weiterer Schub zum Substrat hin kommt von der sich entwickelnden H-Brücke zwischen C19-H und dem 3'-O-Atom der Ribose, obgleich die Autoren zugeben, dass das Ausmaß dieser Stabilisierung in der enzymatischen Umgebung etwas geringer zu sein scheint als in der Gasphase.^[13] Zusätzlich bildet sich eine H-Brücke vom Aspartatrest 608 zum benachbarten axialen Histidinrest 610 (Abbildung 1), wodurch die Co-N-Bindung von 230 auf 400 pm verlängert und damit die Aktivierungsenergie der Homolyse gesenkt wird. Sobald der Co···C5'-Abstand ca. 425 pm unter Bildung des 5'-Desoxyadenosylradikals erreicht hat, kehrt das Histidin in die alte Position zurück.^[13] Im Supplement stellen die Autoren diese Ereignisse mit einem schönen Video dar,^[13] das vielleicht für mechanistische Publikationen als „*The Shape of Things to Come*“ (H. G. Wells, 1933) gelten könnte.

Der von Bucher et al. vorgestellte Mechanismus mit verschiedenen Stufen und Konformationsänderungen erinnert an János Réteys Idee der „negativen Katalyse“, bei der das Enzym hoch reaktive Spezies in einer Umgebung hält, die sie vor möglichen Nebenreaktionen schützt und sie vom Bildungsort zum „Tatort“ führt.^[14] So stellen die Autoren das Konzept der Stabilisierung des Übergangszustandes als zentrales Paradigma der Enzymkatalyse infrage. Die Arbeit von Bucher et al. zeigt auch, wie wichtig Konformationsände-

rungen für die Katalyse sind, die sicher in jedem Enzym auftreten. Abschließend muss betont werden, dass diese Arbeit ohne Kenntnis der Kristallstrukturen der Methylmalonyl-CoA-Mutase mit Koenzym und Substratanaloga^[15] sowie ohne detaillierte kinetische Analysen nicht möglich gewesen wäre.^[16]

Eingegangen am 5. Juli 2012

Online veröffentlicht am 3. September 2012

-
- [1] W. Buckel, B. T. Golding in *Handbook of Radicals in Chemistry, Biology and Materials* (Hrsg.: C. Chatgilialoglu, A. Studer), Wiley, Chichester, UK, **2012**, S. 1501–1546.
 - [2] B. P. Hay, R. G. Finke, *J. Am. Chem. Soc.* **1987**, *109*, 8012–8018.
 - [3] D. M. Smith, B. T. Golding, L. Radom, *J. Am. Chem. Soc.* **1999**, *121*, 9388–9399.
 - [4] S. O. Mansoorabadi, R. Padmakumar, N. Fazliddinova, M. Vlasie, R. Banerjee, G. H. Reed, *Biochemistry* **2005**, *44*, 3153–3158.
 - [5] H. Bothe, D. J. Darley, S. P. Albracht, G. J. Gerfen, B. T. Golding, W. Buckel, *Biochemistry* **1998**, *37*, 4105–4113.
 - [6] G. Bender, R. R. Poyner, G. H. Reed, *Biochemistry* **2008**, *47*, 11360–11366.
 - [7] K. Gruber, R. Reitzer, C. Kratky, *Angew. Chem.* **2001**, *113*, 3481–3484; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2001**, *40*, 3377–3380.
 - [8] O. T. Magnusson, G. H. Reed, P. A. Frey, *Biochemistry* **2001**, *40*, 7773–7782.
 - [9] W. Buckel, C. Kratky, B. T. Golding, *Chem. Eur. J.* **2005**, *12*, 352–362.
 - [10] B. Durbeej, G. M. Sandala, D. Bucher, D. M. Smith, L. Radom, *Chem. Eur. J.* **2009**, *15*, 8578–8585.
 - [11] P. Friedrich, F. Baisch, R. Harrington, F. E. Lyatuu, K. Zhou, F. Zelder, W. McFarlane, W. Buckel, B. T. Golding, *Chem. Eur. J.* **2012**, DOI: 10.1002/chem.201201840.
 - [12] A. M. Calafat, S. Taoka, J. M. Puckett, Jr., C. Semerad, H. Yan, L. Luo, H. Chen, R. Banerjee, L. G. Marzilli, *Biochemistry* **1995**, *34*, 14125–14130.
 - [13] D. Bucher, G. M. Sandala, B. Durbeej, L. Radom, D. M. Smith, *J. Am. Chem. Soc.* **2012**, *134*, 1591–1599.
 - [14] J. Rétey, *Angew. Chem.* **1990**, *102*, 373–379; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1990**, *29*, 355–361.
 - [15] F. Mancia, G. A. Smith, P. R. Evans, *Biochemistry* **1999**, *38*, 7999–8005.
 - [16] A. Dybala-Defratyka, P. Paneth, R. Banerjee, D. G. Truhlar, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2007**, *104*, 10774–10779.
-