

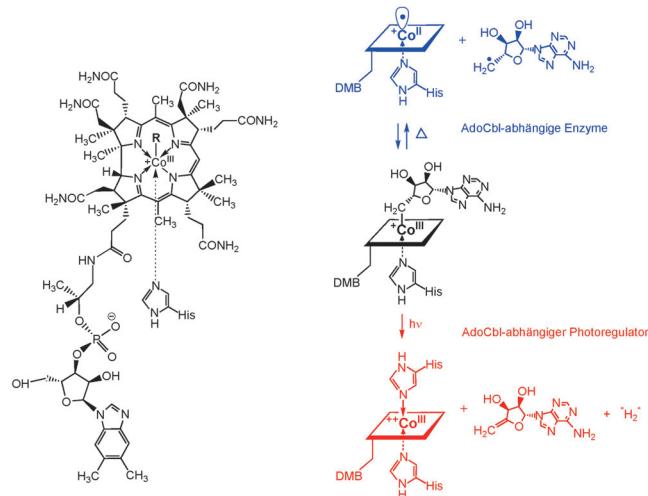
# Coenzym B<sub>12</sub> – umfunktioniert für die Photoregulation der Genexpression

Karl Gruber\* und Bernhard Kräutler\*

Carotenoid-Biosynthese · Coenzym B<sub>12</sub> · Genregulation · Photoschalter

Die Existenz entwickelter Lebensformen auf der Erde hängt von der Fähigkeit ab, Licht zu sammeln und nutzbar zu machen.<sup>[1]</sup> So ist die Strahlung der Sonne Triebkraft für die Photosynthese,<sup>[2]</sup> womit Pflanzen Kohlendioxid fixieren und atmosphärischen Sauerstoff generieren, was die Grundlage für alle höheren Lebenformen darstellt.<sup>[3]</sup> Dennoch ist das energiereiche Sonnenlicht ein zweifelhafter Segen, denn es verursacht auch photoinduzierten oxidativen Stress, und sein UV-Anteil kann zur Schädigung unseres Genoms führen.<sup>[4]</sup> Lebende Organismen haben daher komplexe Wege entwickelt, sich dem facettenreichen Einfluss der Sonnenstrahlung anzupassen. Manche Zellen haben ausgeklügelte photoregulatorische Netzwerke ausgebildet, um Licht wahrzunehmen und darauf zu reagieren.<sup>[5]</sup>

Die Photoregulation der Genexpression basiert auf Photorezeptorproteinen, welche mithilfe empfindlicher Chromophore wie Flavinen, Bilinen, Retinal usw. auf Licht ansprechen.<sup>[5,6]</sup> Eine aktuelle und bemerkenswerte Wendung im Verständnis der biologischen Rolle von Coenzym B<sub>12</sub> (Adenosylcobalamin, AdoCbl)<sup>[7]</sup> in Radikalenzymen<sup>[8]</sup> hat dazu geführt, dass auch AdoCbl auf die Liste der lichtsensitiven Cofaktoren mit einer photoregulatorischen Aufgabe bei der Genexpression gesetzt werden muss (Abbildung 1). Wie kürzlich von Perez-Marín, Murillo, Padmanabhan, Elias-Arananz et al.<sup>[9]</sup> gezeigt wurde, reguliert der Coenzym-B<sub>12</sub>-basierte Photorezeptor CarH die Biosynthese von Carotinoiden im Bakterium *Myxococcus xanthus*. Diese Entdeckung und der damit verbundene, durch Bioinformatik gestützte Nachweis einer auffallenden Fülle an B<sub>12</sub>-basierter Photoregulation in Bakterien (u.a. *Thermus thermophilus*) warfen die Frage auf, wie der organometallische B<sub>12</sub>-Cofaktor AdoCbl so umfunktioniert werden kann, dass er als breitgefächelter lichtsensitiver Genregulator dient. Erstaunliche kristallogra-



**Abbildung 1.** Links: Chemische Formel eines im „base off/His on“-Modus an ein Protein gebundenes Cobalamins. Rechts: Zwei Möglichkeiten der Spaltung von Coenzym B<sub>12</sub> (Adenosylcobalamin, AdoCbl). In AdoCbl-abhängigen Enzymen wird die Co-C-Bindung homolytisch gespalten und liefert ein reaktives Ado-Radikal (blau), wohingegen die photolytische Spaltung von AdoCbl gebunden an CarH zur irreversiblen Bildung von 4',5'-Anhydroadenosin (rot) führt.

phische, mutationale und mechanistische Studien von Jost, Drennan et al.<sup>[10]</sup> haben nun präzise strukturelle Einblicke in die herausragende lichtabhängige Genregulation durch den Coenzym-B<sub>12</sub>-abhängigen CarH in *T. thermophilus* ermöglicht.

Der Mechanismus der Genregulation durch CarH beruht auf der Anpassung des oligomeren Zustands des Proteins durch die Natur des gebundenen Cofaktors. Unter geringem Lichteinfluss bindet CarH intaktes AdoCbl und bildet so ein Tetramer aus zwei Dimeren. In diesem Zustand besitzt CarH eine hohe Affinität zur Promotorregion jener Gene, welche für die Carotinoid-Biosynthese codieren, und inhibiert deren Transkription (Abbildung 2A). Unter dem Einfluss von Strahlung und der damit verbundenen photolytischen Spaltung der Co-C-Bindung in AdoCbl kommt es zu einer Konformationsänderung des Protomers, welche letztendlich zur Dissoziation des Tetramers in die Monomere führt. Diese sind nicht mehr in der Lage, an die DNA zu binden.

CarH weist einen modularen Aufbau auf, wobei jedes Protomer drei unterschiedliche Domänen mit spezifischen Funktionen besitzt. Während die N-terminale „winged-helix“-Domäne für die Interaktion mit der DNA verantwortlich

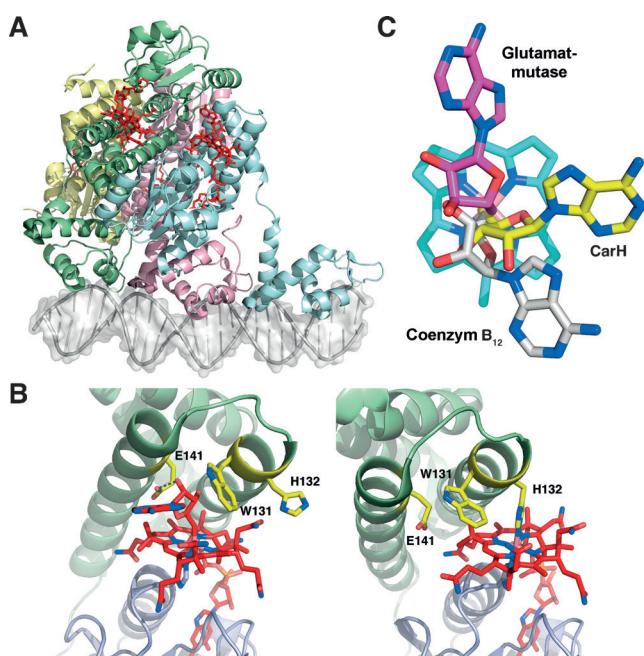
[\*] Prof. Dr. K. Gruber

Institut für Molekulare Biowissenschaften, Universität Graz  
Humboldtstraße 50, 8010 Graz (Österreich)  
E-Mail: karl.gruber@uni-graz.at

Prof. Dr. B. Kräutler

Institut für Organische Chemie und Zentrum für molekulare Biowissenschaften (CMBI), Universität Innsbruck  
Innrain 80/82, 6020 Innsbruck (Österreich)  
E-Mail: bernhard.kraeutler@uibk.ac.at

Die Identifikationsnummer (ORCID) eines Autors ist unter <http://dx.doi.org/10.1002/ange.201601120> zu finden.



**Abbildung 2.** Kristallstruktur von CarH. A) Darstellung des an DNA gebundenen CarH-Tetramers (Dunkelzustand). Die vier Protomere sind jeweils in Grün, Cyan, Magenta und Gelb gezeigt. Das gebundene AdoCbl wird in roter Stäbchendarstellung und die DNA in grauer Cartoondarstellung mit halbtransparenter Oberfläche gezeigt. B) Vergleich des CarH-Promoters im Dunkeln (links) und nach Photolyse (rechts) durch Überlagerung der B<sub>12</sub>-Bindedomänen. Letztere ist in Blau gezeigt, die vier Helix-Bündel-Domänen in Grün. Das gebundene Cobalamin ist in roter Stäbchendarstellung gezeigt. Seitenketten, von denen angenommen wird, dass sie wichtig für die Funktion des Photoschalters sind, werden in Gelb dargestellt. C) Vergleich der relativen Orientierung der Adenosylgruppe von AdoCbl in unterschiedlichen Umgebungen (gelb: AdoCbl gebunden an CarH, magenta: gebunden an die Glutamatmutase, weiß: freies AdoCbl = Coenzym B<sub>12</sub>). Der Corrinring ist in Cyan abgebildet. Diese Abbildung wurde mit dem Programm PyMOL erstellt (<http://www.pymol.org>).

ist, bindet die C-terminale Rossman-artige Domäne den B<sub>12</sub>-Cofaktor. Ein 4-Helix-Bündel separiert diese beiden Domänen. Es ist hauptsächlich verantwortlich für die Oligomer-Bildung und „erspürt“ die photochemische Modifikation des gebundenen Cofaktors. Die DNA-Bindungsdomäne zeigt strukturelle Ähnlichkeiten mit der entsprechenden Domäne der Transkriptionsfaktoren der MerR-Familie.<sup>[11]</sup> Die B<sub>12</sub>-Bindedomäne ist strukturell der Bindedomäne der MetH sehr ähnlich und bedient sich auch des typischen „base-off/His-on“-Bindemechanismus (Abbildung 2B). Die Kristallstruktur des CarH-Tetramer-DNA-Komplexes zeigte, dass die flexible Verbindung zwischen der DNA-Bindedomäne und dem restlichen Protein die gleichzeitige Interaktion von drei Domänen mit der Nukleinsäure zulässt (Abbildung 2A), was zu einer Erhöhung der Bindungsaffinität führt. Im Monomer, welches durch Lichteinwirkung entsteht, geht diese Kooperativität verloren und die Bindungsaffinität zur DNA wird signifikant geschwächt.

AdoCbl ist nicht direkt an der DNA-Bindung beteiligt. Vielmehr findet eine Destabilisierung des Tetramers durch Konformationsänderungen im Protein statt, welche wiederum durch die photolytische Co-C-Bindungsspaltung und den

Verlust der Adenosylgruppe induziert werden. Daraufhin wird das 4-Helix-Bündel reorganisiert, und die bindenden Wechselwirkungen zwischen den Protomer-Einheiten werden aufgehoben. Im Tetramer steht die Seitenkette von Trp 131 in der Helix-Bündel-Domäne in engem Kontakt mit dem Riboserest der Adenosylgruppe von AdoCbl (Abbildung 2B). Dadurch wird die Konformation des Proteins im „dunklen Zustand“ stabilisiert. Der Verlust dieser starken Interaktion durch die lichtinduzierte Abspaltung des Adenosylliganden ermöglicht die Konformationsänderung, welche schließlich durch His 132 arretiert wird, indem der verbleibende Cobalaminrest durch zweifache axiale His-Koordination fixiert wird (Abbildung 2B). Daher stellen die Adenosylgruppe des AdoCbls, gebunden an eine Domäne von CarH, sowie Trp 131 und His 132 in der anderen Domäne die wesentlichen Elemente eines „mechanischen“ photosensitiven Schalters dar. Diese Anordnung ist in etwa mit einer gespannten Feder vergleichbar, welche durch die Spaltung der Co-C-Bindung freigegeben wird. Der Indolring von Trp 131 verdrängt dabei die Adenosylgruppe. Mutagenese-Experimente haben in der Tat gezeigt, dass Trp 131 für die Funktion des Photoschalters unabkömmlich ist. Die Entfernung von His 132 hingegen weist keinen Einfluss auf die Photoregulation von CarH auf, erhöht jedoch die B<sub>12</sub>-Verlustrate nach der Bestrahlung.<sup>[10]</sup>

Bemerkenswerterweise ist *Myxococcus xanthus* nicht in der Lage, Corrinoide zu biosynthetisieren<sup>[9b]</sup> und ist daher auf externe Quellen von Cbl angewiesen. Tatsächlich werden AdoCbl und verwandte Cbl nur von einigen Prokaryoten produziert.<sup>[13]</sup> Das beobachtete Festhalten des Cofaktors in einer photochemisch inaktiven, zweifach His-koordinierten Form im Photorezeptor könnte dem Organismus helfen, mit dem wertvollen AdoCbl zu haushalten. Dies steht im Einklang mit der Notwendigkeit, den „schönsten“<sup>[14]</sup> und wahrscheinlich komplexesten Cofaktor der Natur<sup>[15]</sup> rückzugeben und wiederzuverwenden.

Die Kristallstruktur des Dunkelzustands von CarH offenbart eine in Kontakt mit dem Lösungsmittel stehende Adenosylgruppe, welche in Richtung des molekularen „Ostens“ des gebundenen B<sub>12</sub>-Cofaktors orientiert ist. Dies stellt einen wesentlichen Unterschied zur Struktur des freien Coenzym bzw. von AdoCbl-abhängigen Enzymen dar (Abbildung 2C). Die lichtinduzierte (formale) Heterolyse der Co-C-Bindung produziert unreaktives 4',5'-Anhydroadenosin<sup>[16]</sup> und ein nicht charakterisiertes, instabiles B<sub>12</sub>-Derivat, bei welchem es sich um „Hydrido-Cobalamin“<sup>[17]</sup> handeln dürfte. Bei dem irreversiblen Prozess wurden keine Hinweise auf direkte Bildung radikalischer Zwischenprodukte gefunden.<sup>[18]</sup> Im Gegensatz dazu ist bei der lichtinduzierten Reaktion von freiem AdoCbl in Lösung, welche primär Adenosylradikal generiert,<sup>[19]</sup> 4',5'-Anhydroadenosin nur ein in geringen Mengen auftretendes Nebenprodukt. In ähnlicher Weise wird in AdoCbl-abhängigen Radikalenzymen wie der Glutamatmutase das Adenosylradikal durch reversible thermische Homolyse der Co-C-Bindung von AdoCbl gebildet (Abbildung 1).<sup>[20]</sup> Dieses hochreaktive primäre Radikal ist durch ein Netz von Wasserstoffbrücken fixiert, die es präzise für die H-Atom-Abstraktion vom Substrat ausrichten<sup>[20,21]</sup> – oder alternativ für seine Rekombination zu AdoCbl in einer Form

von negativen Katalyse.<sup>[8a]</sup> Demgegenüber wurde in der Struktur von CarH nur eine H-Brücke zwischen der Ribose und Glu141 beobachtet (Abbildung 2B). Diese H-Brücke und der enge Kontakt des Indolrings von Trp131 scheinen für die neu beobachtete Adenosyl-Konformation in CarH entscheidend zu sein (Abbildung 2C). Es liegt nahe zu spekulieren, dass diese zwei Bindungspartner des umfunktionierten, photoregulativen AdoCbl eine schwer fassbare, jedoch maßgebliche Rolle in der „Umprogrammierung“ der lichtinduzierten Spaltung der Co-C-Bindung spielen.

Es gibt zunehmend Beweise für die Beteiligung von AdoCbl bei der Genregulation in Bakterien. So ist z.B. AdoCbl ein Ligand der weitverbreiteten B<sub>12</sub>-Riboschalter.<sup>[22]</sup> Diese sind in die Regulation der B<sub>12</sub>-Biosynthese und die Expression von Proteinen involviert, die an der Aufnahme und am Transport des B<sub>12</sub> beteiligt sind.<sup>[22b,23]</sup> B<sub>12</sub>-Riboschalter durchlaufen eine präzise Umstrukturierung durch die Bindung des intakten B<sub>12</sub>-Cofaktors.<sup>[24]</sup> Im vorliegenden Fall hingegen basiert die Photoregulation durch AdoCbl und CarH auf der lichtinduzierten, irreversiblen Zerstörung des gebundenen AdoCbl,<sup>[9b,10,16]</sup> und sie betrifft Gene der Biosynthese nicht-corrinoider Pigmente. Eine ähnliche Situation wurde im Fall eines Cbl-abhängigen Photoregulators im Photosynthesebakterium *Rhodobacter capsulatus* berichtet, welches jedoch zur Biosynthese der Cbl in der Lage ist.<sup>[25]</sup> Dort bindet das B<sub>12</sub>-bindende Protein AerR an CrtJ (einen Regulator von Genen, die für die Tetrapyrrol-Biosynthese codieren), wenn das aerobe Photolyseprodukt von AdoCbl, Aquocobalamin, gebunden ist. B<sub>12</sub>, im Allgemeinen bekannt als Vitamin, dürfte somit ein Potential für weitere faszinierende, „nicht-kanonische“ biologische Aufgaben besitzen, wie nun im Fall des AdoCbl-abhängigen Photoregulators CarH mit beeindruckendem strukturellem Detail gezeigt werden konnte.

## Danksagung

Wir danken Christoph Kieninger und Christopher Brenig für die Übersetzung ins Deutsche. Unsere Arbeiten wurden durch die Projekte P24135 (K.G.) und P28892 (B.K.) des Österreichischen Fonds zur Förderung der Wissenschaftlichen Forschung (FWF) gefördert.

**Zitierweise:** *Angew. Chem. Int. Ed.* **2016**, *55*, 5638–5640  
*Angew. Chem.* **2016**, *128*, 5728–5730

- [1] a) T. N. Taylor, E. L. Taylor, M. Krings, *Paleobotany. The Biology and Evolution of Fossil Plants*, Elsevier, Oxford, **2009**; b) A. W. D. Larkum in *Chlorophylls and Bacteriochlorophylls. Biochemistry Biophysics, Functions and Applications* (Hrsg.: B. Grimm, R. J. Porra, W. Rüdiger, H. Scheer), Springer, Dordrecht, **2006**.
- [2] a) S. Eberhard, G. Finazzi, F. A. Wollman, *Annu. Rev. Genet.* **2008**, *42*, 463–515; b) H. P. Raven, R. F. Evert, S. E. Eichhorn, *Biology of Plants*, Worth Publishers, New York, **1987**.
- [3] a) L. O. Björn, *Photobiology. The Science of Life and Light*, Springer, Berlin, **2008**; b) M. L. Gross, *Light and Life*, Oxford University Press, Oxford, **2002**; c) B. Valeur, E. Bardez, *La lumière et la vie*, Belin, Paris, **2015**.

- [4] a) J. S. Taylor, *Acc. Chem. Res.* **1994**, *27*, 76–82; b) A. Sancar, *Chem. Rev.* **2003**, *103*, 2203–2237; c) A. C. Kneuttinger, G. Kashiwazaki, S. Prill, K. Heil, M. Muller, T. Carell, *Photochem. Photobiol.* **2014**, *90*, 1–14.
- [5] a) E. B. Purcell, S. Crosson, *Curr. Opin. Microbiol.* **2008**, *11*, 168–178; b) *Photoprotection, photoinhibition, gene regulation and environment* (Hrsg.: B. Demming-Adams, W. W. Adams III, A. Matto), Springer, Dordrecht, **2006**; c) E. C. Ziegelhoffer, T. J. Donohue, *Nat. Rev. Microbiol.* **2009**, *7*, 856–863; d) E. E. Zhang, S. A. Kay, *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **2010**, *11*, 764–776.
- [6] A. Möglich, X. J. Yang, R. A. Ayers, K. Moffat, *Annu. Rev. Plant Biol.* **2010**, *61*, 21–47.
- [7] a) H. Weissbach, J. Toohey, H. A. Barker, *Biochemistry* **1959**, *45*, 521–525; b) P. G. Lenhert, D. C. Hodgkin, *Nature* **1961**, *192*, 937.
- [8] a) J. Rétey, *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1990**, *29*, 355–361; *Angew. Chem.* **1990**, *102*, 373–379; b) B. T. Golding, W. Buckel, in *Enc. Chem. Biol.*, Bd. 1, Wiley, Hoboken, **2008**, S. 159; c) R. Banerjee, S. W. Ragsdale, *Annu. Rev. Biochem.* **2003**, *72*, 209–247; d) P. A. Frey, A. D. Hegeman, G. H. Reed, *Chem. Rev.* **2006**, *106*, 3302–3316.
- [9] a) M. C. Pérez-Marín, S. Padmanabhan, M. C. Polanco, F. J. Murillo, M. Elías-Arnanz, *Mol. Microbiol.* **2007**, *67*, 804–819; b) J. M. Ortiz-Guerrero, M. C. Polanco, F. J. Murillo, M. Elías-Arnanz, S. Padmanabhan, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2011**, *108*, 7565–7570.
- [10] M. Jost, J. Fernandez-Zapata, M. C. Polanco, J. M. Ortiz-Guerrero, P. Yang-Ting Chen, G. Kang, S. Padmanabhan, M. Elías-Arnanz, C. L. Drennan, *Nature* **2015**, *526*, 536–541.
- [11] N. L. Brown, J. V. Stoyanov, S. P. Kidd, J. L. Hobman, *FEMS Microbiol. Rev.* **2003**, *27*, 145–163.
- [12] C. L. Drennan, S. Huang, J. T. Drummond, R. G. Matthews, M. L. Ludwig, *Science* **1994**, *266*, 1669–1674.
- [13] M. J. Warren, E. Raux, H. L. Schubert, J. C. Escalante-Semerena, *Nat. Prod. Rep.* **2002**, *19*, 390–412.
- [14] J. Stubbe, *Science* **1994**, *266*, 1663–1664.
- [15] A. Eschenmoser, *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1988**, *27*, 5–39; *Angew. Chem.* **1988**, *100*, 5–40.
- [16] M. Jost, J. H. Simpson, C. L. Drennan, *Biochemistry* **2015**, *54*, 3231–3234.
- [17] S. M. Chemaly, J. M. Pratt, *J. Chem. Soc. Dalton Trans.* **1984**, 595–599.
- [18] R. J. Kutta, S. J. O. Hardman, L. O. Johannissen, B. Bellina, H. L. Messiha, J. M. Ortiz-Guerrero, M. Elías-Arnanz, S. Padmanabhan, P. Barran, N. S. Scrutton, A. R. Jones, *Nat. Commun.* **2015**, *6*, 7907.
- [19] L. A. I. Walker, J. J. Shiang, N. A. Anderson, S. H. Pullen, R. J. Sension, *J. Am. Chem. Soc.* **1998**, *120*, 7286–7292.
- [20] K. Gruber, R. Reitzer, C. Kratky, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2001**, *40*, 3377–3380; *Angew. Chem.* **2001**, *113*, 3481–3484.
- [21] a) K. Gruber, B. Puffer, B. Kräutler, *Chem. Soc. Rev.* **2011**, *40*, 4346–4363; b) E. N. G. Marsh, D. P. Patterson, L. Li, *Chem.-BioChem* **2010**, *11*, 604–621.
- [22] 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.
- [23] D. A. Rodionov, A. G. Vitreschak, A. A. Mironov, M. S. Gel'fand, *J. Biol. Chem.* **2003**, *278*, 41148–41159.
- [24] a) A. Peselis, A. Serganov, *Nat. Struct. Mol. Biol.* **2012**, *19*, 1182–1184; b) J. E. Johnson Jr., F. E. Reyes, J. T. Polaski, R. T. Batey, *Nature* **2012**, *492*, 133–137.
- [25] Z. Cheng, K. R. Li, L. A. Hammad, J. A. Karty, C. E. Bauer, *Mol. Microbiol.* **2014**, *91*, 649–664.

Eingegangen am 1. Februar 2016  
 Online veröffentlicht am 24. März 2016