

Ligandenhülle des Komplexes wird unmittelbar über die Richtung der Wasserstoffbrückenbindungen zu den Oxofunktionen der Anionen verständlich (Abb. 1). Die durch die Wasserstoffbrücken bestimmte Ausrichtung der Wasserstoffatome am O(1)-Zentrum bedingt für den gesamten Komplex eine erhebliche Abweichung von der ähnlichsten der denkbaren Anordnungen mit D_{3h} -Symmetrie. Durch Vergleich des Elementarzellenvolumens von **1** bei Raumtemperatur^[10] mit den entsprechenden Daten der isotypen Lanthanoidverbindungen^[9] kann der effektive Ionenradius (IR^{IX})^[13] des Bi³⁺-Ions in **1** zu 1.15 Å abgeschätzt werden. Es ist damit hinsichtlich seiner Größe zwischen der von Nd³⁺- (IR^{IX} = 1.163 Å) und der von Sm³⁺-Ionen (IR^{IX} = 1.132 Å) einzuordnen. Das Radienverhältnis IR^{IX}-(La³⁺)/IR^{IX}(Bi³⁺) weist mit 1.05 den typischen Wert für Bi^{III}-Verbindungen ohne ausgeprägte Aktivität des einsamen Elektronenpaares auf^[13].

Die überraschend geringe Kondensationsneigung des hydratisierten Bi³⁺-Ions in HSO₃CF₃-Lösung wird durch die Tatsache verdeutlicht, daß selbst aus den manchmal beim schnellen Einengen erhaltenen ölichen, stark übersättigten Lösungen ausschließlich **1** isoliert wird, während aus HClO₄- oder HNO₃-Lösungen entsprechender Acidität bereits bei sehr viel geringeren Bi^{III}-Konzentrationen Verbindungen mit den sechskernigen „Bismutyl-Ionen“, [Bi₆O_n(OH)_{12-2n}]⁶⁺ kristallisieren^[7]. Dies legt den Schluß nahe, daß die entsprechenden Anionen einen wesentlichen Einfluß auf die Komplexkondensation ausüben.

Die Kenntnis von **1** eröffnet prinzipiell die Möglichkeit, die basische Hydrolyse und die Kondensationsreaktionen des Bi^{III}-Ions in wäßriger Lösung von Beginn an zu studieren. Mit entsprechenden Untersuchungen haben wir begonnen.

Experimentelles

1: Zu einer Suspension von 2.6 g (5.58 mmol) Bismut(III)-oxid in 5.0 g (17.72 mmol) Trifluormethansulfonsäureanhydrid werden bei 0°C tropfenweise 5.0 g (33.32 mmol) Trifluormethansulfosäure gegeben. Bei Erwärmen auf Raumtemperatur erstarrt das Reaktionsgemisch zu einer gelblichen Masse, die in 65 mL Wasser aufgenommen wird. Aus der stark sauren Lösung werden durch Kristallisation bei Raumtemperatur insgesamt 7.4 g (81.0% bezogen auf Bi₂O₃) farblose Stäbchen von **1** gewonnen. Elementaranalyse (M_r = 818.31): C 4.59 (4.40), H 1.99 (2.22), Bi 26.3 (25.54)%; IR (Nujol, BaF₂): $\tilde{\nu}$ [cm⁻¹] = 3365 (sb), 3210 (shb), 1624 (m), 1246 (sh), 1172 (m), 1029 (s); (Nujol, ZnSe): $\tilde{\nu}$ [cm⁻¹] = 1033 (s), 769 (m), 638 (s), 574 (w); Raman (Pulver): $\tilde{\nu}$ [cm⁻¹] = 1232 (w), 1195 (w), 1050 (s), 1030 (w), 775 (s), 580 (m), 522 (w), 358 (s), 320 (m), 237 (w).

Eingegangen am 30. Juni 1995 [Z 8146]

Stichworte: Aquakomplexe · Bismutverbindungen · Koordination · Wasserstoffbrücken

- [1] A. Werner, *Justus Liebigs Ann. Chem.* **1902**, 322, 261.
- [2] R. B. Corey, R. W. G. Wyckoff, *Z. Kristallogr.* **1933**, 84, 477.
- [3] H. Ohtaki, T. Radnai, *Chem. Rev.* **1993**, 93, 1157.
- [4] J. Burgess in *Comprehensive Coordination Chemistry*, Vol. 2 (Hrsg.: G. Wilkinson, R. D. Gillard, J. A. McCleverty), Pergamon, Oxford, **1987**, S. 305.
- [5] Beispielsweise: a) Holleman-Wiberg, *Lehrbuch der Anorganischen Chemie*, 91.–100. Aufl., de Gruyter, Berlin, **1985**, S. 694; b) F. A. Cotton, G. Wilkinson, *Advanced Inorganic Chemistry*, 5. Aufl., Wiley, New York, **1988**, S. 420; c) J. Burgess, *Ions in Solution: Basic Principles of Chemical Interactions*, Horwood, Chichester, **1988**, S. 68.
- [6] C. F. Baes, R. E. Messmer, *The Hydrolysis of Cations*, Wiley, New York, **1976**, S. 382.
- [7] a) F. Lazarini, *Acta Crystallogr. Sect. B* **1979**, 35, 448; *Cryst. Struct. Commun.* **1979**, 8, 69; b) B. Sundvall, *Acta Chem. Scand. Ser. A* **1979**, 33, 219.
- [8] F. Lazarini, *Acta Crystallogr. Sect. C* **1985**, 41, 1144.
- [9] J. McB. Harrowfield, D. L. Kepert, J. M. Patrick, A. H. White, *Aust. J. Chem.* **1983**, 36, 483.
- [10] C₃H₁₈BiF₆O₁₈S₃, M_r = 818.31; Kristallabmessungen: 0.07 × 0.25 × 0.80 mm³, hexagonal, Raumgruppe P6₃/m, a = 13.855 (2), c = 7.313 (2) Å, Z = 2, V = 1215.7 (4) Å³ ($V_{18^{\circ}C}$ = 1234.5 (4) Å), $\rho_{\text{ber.}}$ = 2.235 Mg m⁻³, T = -140 ± 1 °C, $2\theta_{\text{max.}}$ = 83.9°, Vierkreisdiffraktometer, MoK_α-Strahlung (λ = 0.71073 Å), ω

Scan, 4211 gemessene, 1586 unabhängige und 1472 beobachtete Reflexe mit $F > 4\sigma(F_0)$, LP- und numerische Absorptionskorrektur (μ = 7.648 mm⁻¹, $T_{\text{min.}}$ = 0.121, $T_{\text{max.}}$ = 0.602), Schweratommethode, Minimierung von $\Sigma w(F_0 - F_c)^2$ mit $w = \sigma^{-1}$, 73 verfeinerte Parameter, R = 0.023, wR = 0.014; $\Delta\varrho_{\text{max.}}/\Delta\varrho_{\text{min.}}$ = +0.9/-1.6 eÅ⁻³. Weitere Einzelheiten zur Kristallstrukturuntersuchung können beim Fachinformationszentrum Karlsruhe, D-76344 Eggenstein-Leopoldshafen, unter der Hinterlegungsnummer CSD-59065 angefordert werden.

- [11] M. C. Fava, D. L. Kepert, *Progr. Inorg. Chem.* **1981**, 28, 309.
- [12] I. D. Brown, D. Altermatt, *Acta Crystallogr. Sect. B* **1985**, 41, 441. Bei der Ermittlung des Werts für $r_s(\text{Bi}-\text{O})$ wurde nicht hinsichtlich Verbindungen mit oder ohne stereochemischer Aktivität der einsamen Elektronenpaare unterschieden. Für eine Verbindung ohne Einfluß des einsamen Elektronenpaares ist deshalb mit $\Sigma s(\text{Bi}-\text{O}) > 3$ zu rechnen.
- [13] R. D. Shannon, *Acta Crystallogr. Sect. A* **1976**, 32, 751.

Hinweise auf einen Fragmentierungsmechanismus bei Coenzym-B₁₂-abhängigen Umlagerungen des Kohlenstoffgerüsts**

Birgitta Beatrix, Oskar Zelder, Friedrich K. Kroll, Gissur Örlygsson, Bernard T. Golding* und Wolfgang Buckel*

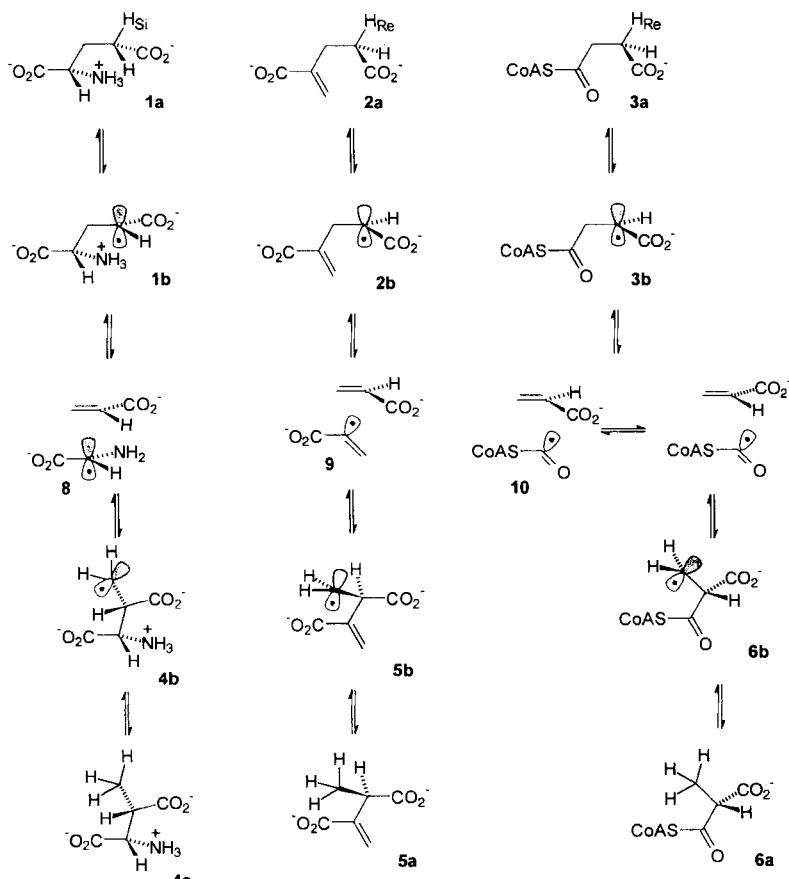
Professor Albert Eschenmoser zum 70. Geburtstag gewidmet

In dieser Arbeit stellen wir eine neue mechanistische Hypothese für die bemerkenswerten Umlagerungen des Kohlenstoffgerüsts vor, die von den Coenzym-B₁₂-abhängigen Enzymen Glutamat-Mutase (EC 5.4.99.1) aus *Clostridium tetanomorphum* und *C. cochlearium*, 2-Methylenglutarat-Mutase (EC 5.4.99.4) aus *C. barkeri* sowie Methylmalonyl-CoA-Mutase (EC 5.4.99.2) aus Menschen, Tieren und Bakterien katalysiert werden^[1]. Das Substrat der Glutamat-Mutase ist (S)-Glutamat **1a** (Schema 1), das zu (2S,3S)-3-Methylaspartat **4a** umgewandelt wird; 2-Methylenglutarat-Mutase katalysiert die Bildung des höher verzweigten (*R*)-3-Methylitaconats (2-Methylen-3-methylsuccinat) **5a** aus 2-Methylenglutarat **2a**, während Methylmalonyl-CoA-Mutase das Gleichgewicht zwischen Succinyl-CoA **3a** und (*R*)-Methylmalonyl-CoA **6a** einstellt. Jedes dieser Substrate **1a**–**3a** enthält einen Propionatrest, an dem die Umlagerung stattfindet. Ein Wasserstoffatom wandert jeweils *intermolekular* von C-2 nach C-3 des Propionatrests über das 5'-Kohlenstoffatom des 5'-Desoxyadenosylrestes des Coenzyms B₁₂, wobei die terminalen Methylgruppen der Produkte **4a**–**6a** gebildet werden. Die Substituenten an C-3 des Propionatrests – Glycyl, Ethenyl-1-carboxylat (2-Acrylat) oder Formyl-1-CoA – wandern *intramolekular* in die entgegengesetzte Richtung. Stereochemische Untersuchungen dieser Umlagerungen haben ergeben, daß bei dem Substrat **1a** das Atom H_{Si} von der Methylengruppe, die der Carboxygruppe benachbart ist, entfernt wird, während bei den Substraten **2a** und **3a** das entsprechende Atom H_{Re} wandert. Bei den Substraten **1a** und **2a** findet bei der Umlagerung an C-3 des Propionatrests eine Inversion statt, während bei Substrat **3a**

[*] Prof. Dr. W. Buckel, Dr. B. Beatrix, Dr. O. Zelder, G. Örlygsson
Laboratorium für Mikrobiologie
Fachbereich Biologie der Universität
Karl-von-Frisch-Straße, D-35032 Marburg
Telefax: Int. + 6421/28583
E-mail: buckel@mail.uni-marburg.de

Prof. Dr. B. T. Golding, Dr. F. K. Kroll
Department of Chemistry, Bedson Building, University of Newcastle
GB-Newcastle upon Tyne NE1 7RU (Großbritannien)

[**] Diese Arbeit wurde von der Commission of European Communities, der Deutschen Forschungsgemeinschaft und dem Fonds der Chemischen Industrie gefördert.

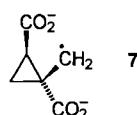


Schema 1. Vorgeschlagene Reaktionswege für die Coenzym-B₁₂-abhängigen Enzyme Glutamat-Mutase (1 \rightleftharpoons 4), 2-Methylglutarat-Mutase (2 \rightleftharpoons 5) und Methylmalonyl-CoA-Mutase (3 \rightleftharpoons 6).

Retention gefunden wurde. Die Methylgruppen der Produkte **4a–6a** scheinen unter Racemisierung gebildet zu werden^[2].

Trotz dieser stereochemischen Unterschiede ist es verlockend, einen gemeinsamen Mechanismus für diese Coenzym-B₁₂-abhängigen Umlagerungen des Kohlenstoffgerüsts in Betracht zu ziehen. Es wird allgemein akzeptiert, daß diese Reaktionen durch Abspaltung des wandernden Wasserstoffatoms vom C-2-Atom des Propionatrests durch das 5'-Desoxyadenosinradikal eingeleitet werden. Letzteres entsteht durch Homolyse der C-Co- σ -Bindung des Coenzymes B₁₂^[3]. Dieser Prozeß erzeugt die Substratradikale **1b–3b**. Cob(II)alamin und 5'-Desoxyadenosin. Nach der Umlagerung der Substratradikale nach einem noch nicht bekannten Mechanismus erhalten die dabei gebildeten Produktradikale **4b–6b** das Wasserstoffatom von 5'-Desoxyadenosin zurück, wobei die Produkte **4a–6a** entstehen und das 5'-Desoxyadenosinradikal zurückgebildet wird. Chemische Modelle für die Umlagerung von 2-Methylglutarat zu (R)-3-Methylitaconat ergaben, daß das 1-Methylencyclopropandicarboxylat-Radikal **7** eine Zwischenstufe sein könnte^[4]. Diese Spezies könnte durch die intramolekulare Addition des Substratradikals **2b** an die eigene Doppelbindung entstehen. Die nachfolgende Spaltung der ursprünglichen C-2/C-3-Bindung würde zum Produktradikal **5b** führen.

Will man diesen Mechanismus auf die Umlagerung von Glutamat zu 3-Methylaspartat übertragen, gibt es Schwierigkeiten, da keine der beiden Aminosäuren eine Doppelbindung enthält, an die das Radikal addieren könnte. Es wurde daher vermutet, daß Glutamat mit einer Carbonylgruppe des Enzyms eine Schiff-Base bildet, die zum Ketimin des 2-Oxoglutarats isoméri-



siert^[5]. Das dem 2-Methylglutarat analoge Intermediat könnte dann über ein Azacyclopropylcarbinylradikal^[6] umlagern. Alle Versuche, eine Schiff-Base durch Reduktion mit Natriumborhydrid abzufangen, waren jedoch erfolglos^[7a]. Außerdem geben mikrobiologische und genetische Untersuchungen keinen Hinweis auf eine reaktive Carbonylgruppe in der Glutamat-Mutase^[8]. Der von uns vorgeschlagene gemeinsame Mechanismus, der alle drei Umlagerungen erklären könnte, postuliert die Fragmentierung der Substratradikale **1b**, **2b** oder **3b** jeweils zu Acrylat und entweder zu dem Glycinradikal **8**, dem 2-Acryloylradikal **9** oder dem Formyl-CoA-Radikal **10**. Die Readdition der Radikale **8**, **9** oder **10** an das C-2-Atom des Acrylats würde zu den Produktradikalen **4b**, **5b** bzw. **6b** führen^[3a]. Im folgenden werden wir Experimente beschreiben, die diese Hypothese stützen, und zeigen, daß damit die oben beschriebenen stereochemischen Befunde erklärt werden können.

Glutamat-Mutase aus *C. cochlearium* besteht aus zwei Komponenten, und zwar aus E, einem Homodimer (ε_2 , $M = 100$ kDa), und aus S, einem Monomer (σ , 14.7 kDa)^[7]. Die Gene, die für die Polypeptidketten ε (*glmE*) und σ (*glmS*) codieren, sind kloniert und können getrennt in *Escherichia coli* überexprimiert werden^[9]. Die Zugabe von Coenzym B₁₂ zu einer Mischung der gereinigten Komponenten liefert spontan den enzymatisch aktiven Komplex $\varepsilon_2\sigma_2$, der ein mol Coenzym pro mol Heterotetramer enthält^[9b]. Die Komponente S allein kann zwar auch Coenzym B₁₂ binden, aber wesentlich schwächer als der gesamte Komplex. Gibt man Glutamat zu diesem

Komplex, so resultiert ein ESR-Signal mit einer Spinkonzentration von ca. 50 % der Enzymkonzentration (Abb. 1). Ähnliche, aber nicht identische Signale mit Spinkonzentrationen bis zu 150 % werden bei Zugabe der kompetitiven Inhibitoren 2-Methylglutarat oder (2S,4S)-4-Fluorglutamat^[7b] zum Enzymkomplex erhalten. Diese Signale ($g_{xy} = 2.15$) unterscheiden sich zwar von denen des freien oder enzymgebundenen Cob(II)alamins ($g_{xy} = 2.3$), sind aber offensichtlich auf Co^{II}-Verbindungen zurückzuführen, wie die Form der Signale und die achtfache Hyperfeinaufspaltung des g_z -Signals zeigen. Es wird vermutet, daß diese Signale einer Kopplung zwischen einem Co^{II}-Zentrum und einem organischen Radikal, das zumindest teilweise auf dem Substrat oder Inhibitor lokalisiert ist, zuzuordnen sind^[9b]. Weniger gut aufgelöste ESR-Signale sind bisher mit Methylmalonyl-CoA-Mutase^[10] und 2-Methylglutarat-Mutase erhalten worden^[11].

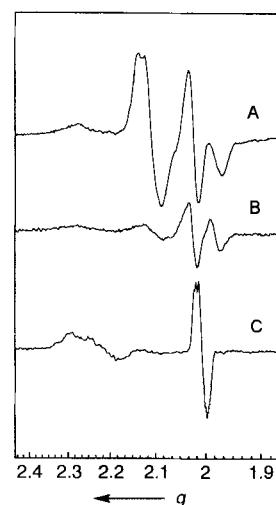


Abb. 1. ESR-Spektren der Glutamat-Mutase: Die Röhrchen enthielten 670 μ M Komponente S, 1.1 mM Komponente E, 4 mM Coenzym B₁₂, 13.3 mM 2-Mercaptoethanol, 33 mM Tris/HCl, pH 8.3, und entweder 16.7 mM Glycin (B) oder 16.7 mM Acrylat (C) oder eine Mischung aus beiden (A). Gesamtvolumen 300 μ L [24]. Alle drei Spektren wurden unter identischen Bedingungen aufgenommen.

2-Methylenglutarat-Mutase aus *C. barkeri* besteht nur aus identischen Polypeptidketten (α , 70 kDa)^[12]. Das für diese Ketten codierende Gen (*mgm*) ist kloniert und in *E. coli* überexprimiert worden. Das Apoenzym wird in Gegenwart eines Überschusses an Coenzym B₁₂ gemessen, wobei sofort die aktive 2-Methylenglutarat-Mutase rekonstituiert wird. Die dabei ermittelte spezifische Aktivität ist doppelt so hoch wie die der besten Präparationen aus *C. barkeri*, die neben korrekt gebundenem Coenzym B₁₂ auch noch inkorrekt gebundenes Coenzym und an der Luft stabiles Cob(II)alamin enthalten^[11b]. Bei Gelfiltration an einer Superose-6-Säule eluierte das rekonstituierte Enzym mit einer apparenten molekularen Masse von 180 kDa, die auf ein Homodimer hindeutet. Es enthält 1 mol gebundenes Coenzym, womit die Struktur des aktiven Enzyms der des Glutamat-Mutase-Komplexes gleicht. Mit der rekombinanten 2-Methylenglutarat-Mutase erhalten wir nun nach Zugabe des Coenzymes und des Substrats ein ebenso hochauflösendes ESR-Spektrum (Abb. 2 A) wie mit dem Glutamat-Mutase-Komplex in Gegenwart von Glutamat. Der C-Terminus (ca. 100 Aminosäurereste) der 2-Methylenglutarat-Mutase zeigt signifikante Sequenzhomologien zur Komponente S der Glutamat-Mutase, zu den C-Termini der Methylmalonyl-CoA-Mutasen aus verschiedenen Organismen und zur Cobalamin-bindenden Domäne der Methionin-Synthase (MetH) aus *E. coli*^[13]. Aus der Kristallstruktur dieser MetH-Domäne geht hervor, daß der Dimethylbenzimidazolring am Cobaltatom im freien Coenzym durch den in allen genannten Enzymen konservierten Histidinrest ersetzt ist^[14a]. ESR-Experimente mit ¹⁵N-markierter Komponente S zeigen, daß dies auch bei der Glutamat-Mutase der Fall ist^[14b]. Schließlich ist die H486Q-Mutante der 2-Methylenglutarat-Mutase, in der dieser Histidinrest zu einem Glutaminrest mutiert ist, enzymatisch völlig inaktiv, da sie kein Coenzym B₁₂ mehr binden kann^[14c].

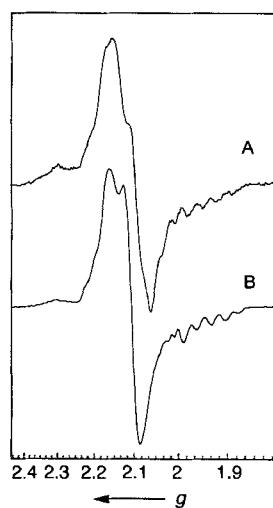
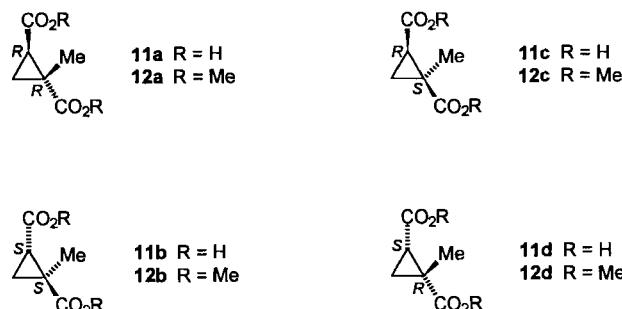


Abb. 2. ESR-Spektren der 2-Methylenglutarat-Mutase: Die Röhrchen enthielten 270 μ M Apoenzym, 4 mM Coenzym B₁₂, 7 mM 2-Mercaptoethanol, 33 mM Kaliumphosphat, pH 6.4, und entweder 16.7 mM 2-Methylenglutarat (A) oder 16.7 mM Acrylat (B), Gesamtvolumen 300 μ L [24]. Spektrum A wurde bei vierfach höherer Verstärkung als Spektrum B aufgenommen.

Um die Hypothese einer Fragmentierung von Glutamat während der Katalyse zu überprüfen, wurden Glycin und Acrylat als Inhibitoren der Glutamat-Mutase getestet. Weder Glycin noch Acrylat allein waren in Konzentrationen bis zu 20 mM wirksam; ihre Gegenwart beeinflußte die Aktivität des Enzyms nicht signifikant. In Kombination hemmten diese Verbindungen jedoch sehr effizient die Umwandlung von (2S,3S)-3-Methylaspartat zu (S)-Glutamat, die mit den Hilfsenzymen Glutamat-Oxalacetat-Aminotransferase (Aspartat-Aminotransferase, EC 2.6.1.1) und (R)-2-Hydroxyglutarat-Dehydrogenase aus *Acidaminococcus fermentans* (NADH, EC 1.1.1.-) gemessen wurde. Die Anfangsgeschwindigkeit dieser Reaktion erniedrigte sich in Gegenwart von äquimolaren Mischungen von Glycin und Acrylat in Konzentrationen von je 5, 10 und 20 mM auf 60, 42 und 20% der Kontrolle. Auch ESR-spektroskopisch wurde ein drastischer Effekt beobachtet. Während eine Mischung der Komponenten E, S, Coenzym B₁₂ und entweder Glycin oder Acrylat allein nur

schwache Signale in der Gegend von $g = 2$ hervorrief (Abb. 1 B und 1 C; Spinkonzentration < 5% der Enzymkonzentration), ergab die Kombination von beiden Verbindungen ein starkes Signal um $g = 2.15$. Interessanterweise ähnelt das Signal in seiner Form stark jenen von anderen Coenzym-B₁₂-abhängigen Enzymen^[15], aber nicht denen, die mit Glutamat-Mutase und Glutamat oder mit 2-Methylenglutarat-Mutase und 2-Methylenglutarat (Abb. 2 A) erhalten wurden. Besonders im Fall der Coenzym-B₁₂-abhängigen Ribonucleotid-Reduktase wurde das Signal als Kopplung eines organischen Radikals mit Cob(II)-alamin erfolgreich simuliert^[15]. Der synergistische Effekt von Glycin und Acrylat läßt vermuten, daß beide Verbindungen zusammen eine Zwischenstufe nachahmen (siehe Schema 1) und damit die Homolyse der Co-C-Bindung des Coenzymes induzieren können.

Schon vor 25 Jahren wurde die Hemmung der 2-Methylenglutarat-Mutase durch *trans*-1-Methylcyclopropan-1,2-dicarboxylat **11a/11b** beschrieben, während die *cis*-Verbindung **11c/11d** weniger wirksam war^[16]. Um einen Mechanismus der 2-Methylenglutarat-Mutase mit dem 1-Methylencyclopropan-1,2-dicarboxylat-Radikal **7**^[3a] als Zwischenstufe zu überprüfen, haben wir alle vier Stereoisomere **11a-d** synthetisiert^[17]. Da das

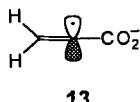


Produkt der enzymatischen Reaktion (*R*-Konfiguration) hat^[12c], sollte demnach das (*R,R*)-Isomer **11a** der beste Inhibitor sein. Wir haben jedoch gefunden, daß keines dieser vier Stereoisomere in Konzentrationen bis zu 20 mM die 2-Methylenglutarat-Mutase-Reaktion signifikant beeinflußt. Außerdem induzierte das *trans*-Isomerengemisch kein ESR-Signal mit 2-Methylenglutarat-Mutase und Coenzym B₁₂. Dagegen war Acrylat allein in der Lage, die 2-Methylenglutarat-Mutase signifikant zu hemmen. Interessanterweise zeigte die Auftragung der reziproken Anfangsgeschwindigkeiten ($1/v$) als Funktion der Acrylatkonzentration^[18] nur dann annähernd eine Gerade, wenn als Abszisse [Acrylat]² gewählt wurde. Offensichtlich werden zwei Acrylatmoleküle ans Enzym gebunden. Unter Annahme einer kompetitiven Inhibition beträgt bei 2 mM Acrylat der apparetive $K_i = 2$ mM, während sich bei 10 mM Acrylat der apparetive K_i -Wert auf 0.5 mM verringerte. Acrylat allein induziert bei der 2-Methylenglutarat-Mutase fast das gleiche ESR-Spektrum (Abb. 2 B) wie das mit 2-Methylenglutarat erhaltene (Abb. 2 A). Das Acrylatspektrum unterscheidet sich jedoch quantitativ nur durch die vierfach höhere Spinkonzentration von dem 2-Methylenglutaratspektrum. Insgesamt verleiten diese Ergebnisse zur Spekulation, daß bei der Methylmalonyl-CoA-Mutase Acrylat und das Formyl-CoA-Radikal **10** gemeinsam als Zwischenstufe auftreten (siehe Schema 1). Folglich sollte ein äquimolares Gemisch aus Acrylat und Formyl-CoA das Enzym hemmen und ein ESR-Signal induzieren, während diese Verbindungen einzeln keine Wirkung haben dürften.

Im Schema 1 stellen wir einen einheitlichen Mechanismus für die Coenzym-B₁₂-abhängigen Mutasen vor. Die Bindung des Substrats an das Enzym induziert eine Konformationsänderung, die zur Homolyse der Co-C-Bindung des Coenzymes führt. Das gebildete 5'-Desoxyadenosylradikal abstrahiert das am nächsten erreichbare H-Atom, wobei kleine Unterschiede in der Enzymstruktur genügen, um entweder H_{Re} oder H_{Si} in die für die Abspaltung günstigste Position zu bringen (Schema 1). In der Konformation, die eine maximale Überlappung des Radikalzentrums (π -Orbital) mit der 2,3-(Substrat **1a** und **2a**) oder 1,2- σ -Bindung (Substrat **3**) ermöglicht, fragmentiert das gebildete Substratradikal zu Acrylat und einem neuen Radikal (Glycinradikal **8** aus **1b**, 2-Acrylatradikal **9** aus **2b** und Formyl-CoA-Radikal **10** aus **3b**). Die Rekombination des neuen Radikals mit Acrylat an C-2 kann das Produktradikal **4b-6b** liefern, das durch H-Abspaltung aus 5'-Desoxyadenosin zum Produkt **4a-6a** führt. Die beobachtete Inversion der Konfiguration bei der Bildung der Methingruppe in den Produkten **4a** und **5a** stimmt mit diesem Mechanismus überein, während die für **6a** gefundene Retention eine besondere Erklärung erfordert. Wir schlagen vor, daß das aus **3a** gebildete Acrylat in zwei Konformationen vorliegt (siehe Schema 1), die z. B. durch Rotation um die 2,3-Bindung ineinander übergehen. Während die eine Konformation bei der Fragmentierung entsteht, kann das Produkt nur über die andere gebildet werden. Dieser Vorschlag kann auch den „Fehler in der kryptischen Stereochemie der Methylmalonyl-CoA-Mutase“^[19] erklären. Es ist gezeigt worden, daß zwar hauptsächlich das Atom H_{Re} vom C-3-Atom des Succinyl-CoA zur Methylgruppe (C-3) des Methylmalonyl-CoA wandert, aber gelegentlich auch der „austauschbare Wasserstoff“ von C-2 des Methylmalonyl-CoA zur C-3-Position des Succinyl-CoA gelangt. Um diesen Effekt zu verstehen, wurde eine 1,2-Wasserstoff-Verschiebung im Succinyl-CoA-Radikal postuliert. Unsere Erklärung wäre, daß dieser Fehler durch eine gelegentliche Abspaltung des H_{Si}-Atoms von C-3 des Succinyl-CoA verursacht wird, wobei diejenige Konformation des Acrylats entsteht, die direkt, ohne vorherige Rotation, zum (R)-Methylmalonyl-CoA führt.

Einige dieser neuen Radikale sind bereits in anderen Systemen charakterisiert worden. Das 2-Acrylatradikal soll die lineare Struktur **13** mit sp-Hybridisierung am C-2-Zentrum aufweisen^[20]. Berechnungen zeigten, daß das Glycinradikal **8** das energetisch günstigste Glycin-Kohlenstoffradikal ist, das in einer captodativen Weise stabilisiert wird; das Carboxylat zieht Elektronen an, während die Aminogruppe als Elektronendonator wirkt^[21]. Die ungewöhnliche Stabilität des Glycinradikals an der Position 734 der Polypeptidkette der Pyruvat-Formiat-Lyase (EC 2.3.1.54) aus *E. coli* wird ebenfalls auf einen captodativen Effekt zurückgeführt^[22].

Zusammenfassend kann gesagt werden, daß die hier beschriebenen Daten den vorgeschlagenen Fragmentierungsmechanismus der Coenzym-B₁₂-abhängigen, das Kohlenstoffgerüst umlagernden Mutasen unterstützen und die Basis für weitere Experimente liefern. Insbesondere kann jetzt gezielt mit isotopenmarkierten Substraten und Inhibitoren die Struktur der postulierten Radikale aufgeklärt werden. Das überraschendste Ergebnis dieser Arbeit bildet die Glutamat-Mutase, die lange als das am wenigsten erklärbare Coenzym-B₁₂-abhängige Enzym betrachtet worden ist^[23]. Jetzt ist sie zum Paradebeispiel dieser Enzymklasse geworden^[25].



13

eingegangen am 16. Juni 1995 [Z 8107]

Stichworte: Coenzym B₁₂ · Enzymkatalyse · Umlagerungen

- [1] a) H. A. Barker, H. Weissbach, R. D. Smyth, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1958**, *44*, 1093; b) R. L. Switzer, *B₁₂* **1982**, *2*, 289–305; c) H. F. Kung, S. Cederbaum, L. Tsai, T. C. Stadtman, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1970**, *65*, 978–984; d) J. Rétey, *B₁₂* **1982**, *2*, 357–379.
- [2] a) M. Sprecher, R. L. Switzer, D. B. Sprinson, *J. Biol. Chem.* **1966**, *241*, 864–867; b) G. Hartrampf, W. Buckel, *FEBS Lett.* **1984**, *171*, 73–78; c) *Eur. J. Biochem.* **1986**, *156*, 301–304; d) M. Sprecher, M. J. Clark, D. B. Sprinson, *J. Biol. Chem.* **1966**, *241*, 872–877; e) J. Rétey, J. A. Robinson, *Stereospecificity in Organic Chemistry and Enzymology*, VCH, Weinheim, **1982**, S. 183–207; f) G. Hartrampf, W. Buckel, *FEBS Lett.* **1984**, *171*, 73–78.
- [3] a) B. T. Golding, *B₁₂* **1982**, *1*, 543–582; b) J. Halpern, *Science* **1985**, *227*, 869; c) B. M. Babior, *Bio Factors* **1988**, *1*, 21–26; d) B. T. Golding, *Chem. Br.* **1990**, 950–954; siehe auch: U. von Arx, Dissertation, Universität Bern, **1985**.
- [4] S. Ashwell, A. G. Davies, B. T. Golding, R. Hay-Motherwell, S. Mwesigye-Kibende, *J. Chem. Soc. Chem. Commun.* **1989**, 1483–1485.
- [5] a) P. Dowd, S.-C. Choi, F. Duah, C. Kaufman, *Tetrahedron* **1988**, *44*, 2137; b) S.-C. Choi, P. Dowd, *J. Am. Chem. Soc.* **1989**, *111*, 2313.
- [6] M. D. Balinge, G. H. Reed, P. A. Frey, *Biochemistry* **1992**, *31*, 949–953.
- [7] a) U. Leutbecher, R. Böcher, D. Linder, W. Buckel, *Eur. J. Biochem.* **1992**, *205*, 759–765; b) U. Leutbecher, S. P. J. Albracht, W. Buckel, *FEBS Lett.* **1992**, *307*, 144–146.
- [8] a) F. Suzuki, H. A. Barker, *J. Biol. Chem.* **1966**, *241*, 878–888; b) E. N. G. Marsh, D. E. Holloway, *FEBS Lett.* **1992**, *310*, 167–170; c) D. E. Holloway, E. N. G. Marsh, *ibid.* **1993**, *317*, 44–48; d) M. Brecht, J. Kellermann, A. Plückthun, *ibid.* **1993**, *319*, 84–89.
- [9] a) O. Zelder, B. Beatrix, W. Buckel, *FEMS Microbiol. Lett.* **1994**, *118*, 15–22; b) O. Zelder, B. Beatrix, U. Leutbecher, W. Buckel, *Eur. J. Biochem.* **1994**, *226*, 577–585.
- [10] a) Y. Zhao, P. Such, J. Rétey, *Angew. Chem.* **1992**, *104*, 212–213; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1992**, *31*, 215–216; b) Y. Zhao, A. Abend, M. Kunz, P. Such, J. Rétey, *Eur. J. Biochem.* **1994**, *225*, 891–896.
- [11] a) C. Michel, S. P. J. Albracht, W. Buckel, *Eur. J. Biochem.* **1992**, *205*, 767–773; b) O. Zelder, W. Buckel, *Biol. Chem. Hoppe Seyler* **1993**, *374*, 85–90; c) R. Padmakumar, R. Banerjee, *J. Biol. Chem.* **1995**, *270*, 9295–9300.
- [12] C. Michel, G. Hartrampf, W. Buckel, *Eur. J. Biochem.* **1989**, *184*, 103–107.
- [13] B. Beatrix, O. Zelder, D. Linder, W. Buckel, *Eur. J. Biochem.* **1994**, *221*, 101–109.
- [14] a) C. Lushinsky-Drennan, S. Huang, J. T. Drummond, R. G. Matthews, M. L. Ludwig, *Science* **1994**, *266*, 1669–1674; b) O. Zelder, B. Beatrix, F. Kroll, W. Buckel, *FEBS Lett.* **1995**, *369*, 252–254; c) F. Kroll, B. Beatrix, O. Zelder, W. Buckel, unveröffentlicht.
- [15] J. A. Hamilton, Y. Tamao, R. L. Blackley, R. E. Coffman, *Biochemistry* **1972**, *11*, 4696–4705; K. L. Schepler, W. R. Dunham, R. H. Sands, J. A. Fee, R. H. Abeles, *Biochim. Biophys. Acta* **1975**, *397*, 510–518; G. R. Buettner, R. E. Coffman, *ibid.* **1977**, *480*, 495–505.
- [16] H.-F. Kung, T. C. Stadtman, *J. Biol. Chem.* **1971**, *246*, 3378–3388.
- [17] L. L. McCoy, *J. Am. Chem. Soc.* **1958**, *80*, 6568–6572. Der Dimethylester von **11** wurde mit einer Natriummethoxid-induzierten Kondensation von Acrylsäuremethylester mit 2-Chlorpropionsäuremethylester synthetisiert. Die *cis*-Isomere bildeten sich vorzugsweise bei 17–25 °C, während die *trans*-Isomere mehr als 50 °C benötigten. Verseifung und Enantiomerentrennung gab: **11a**, Schmp. = 173 °C, $[\alpha]_D^{20} = -232$; **11b**, Schmp. = 174 °C, $[\alpha]_D^{20} = +213$; **11c**, Schmp. = 150 °C, $[\alpha]_D^{20} = -70$; **11d**, Schmp. = 149 °C, $[\alpha]_D^{20} = +62$. Weitere Daten über diese Verbindungen werden an anderer Stelle publiziert.
- [18] M. Dixon, E. C. Webb, *Enzymes*, 2. Aufl., Longmans, London, **1964**, S. 327–331.
- [19] a) M. Michenfelder, W. E. Hull, J. Rétey, *Eur. J. Biochem.* **1987**, *168*, 659–667; b) W. E. Hull, M. Michenfelder, J. Rétey, *ibid.* **1988**, *173*, 191–201.
- [20] G. W. Neilson, M. C. R. Symons, *J. Chem. Soc. Perkin Trans. 2* **1973**, 1405–1410.
- [21] D. Yu, A. Rauk, D. A. Armstrong, *J. Am. Chem. Soc.* **1995**, *117*, 1789–1796.
- [22] A. F. V. Wagner, M. Frey, F. A. Neugebauer, W. Schäfer, J. Knappe, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1992**, *89*, 996–1000.
- [23] Y. Murakami, Y. Hisaeda, X.-M. Song, T. Ohno, *J. Chem. Soc. Perkin Trans. 2* **1992**, *1527*–1528.
- [24] Die Komponenten wurden im Dunkeln in einem ESR-Röhrchen unter N₂ bei 30 °C gemischt, und die Reaktion wurde durch Zugabe der neutralisierten Säuren gestartet. Nach 5 min wurde die Reaktion durch Einfrieren mit einem Gemisch aus flüssigem Stickstoff und Pentan gestoppt. X-Band-ESR-Spektren wurden mit einem Varian-E-3-ESR-Spektrometer bei einer Temperatur von 77 K aufgenommen; Mikrowellenfrequenz 9.1 GHz, Mikrowellenleistung 2 mW (Abb. 1) oder 20 mW (Abb. 2), Modulationsfrequenz 100 kHz, Modulationsamplitude 0.4 mT.
- [25] Nachtrag bei der Korrektur: Bei der Reaktion von Diethyl-2-brommethyl-2-methylmalonylmonothiolat mit Cob(I)alanin entsteht unter anderem Ethyl-2-methylacrylat. Es wurde vorgeschlagen, daß dieses Produkt durch β -Spaltung des intermedären, zu **3b** und **6b** analogen Radikals entsteht; A. I. Scott, P. Karuso, H. J. Williams, J. Lally, J. Robinson, G. P. Nayar, *J. Am. Chem. Soc.* **1994**, *116*, 777–778.