

## Antivitamin

Deutsche Ausgabe: DOI: 10.1002/ange.201701583  
Internationale Ausgabe: DOI: 10.1002/anie.201701583**Inhibierung des humanen B<sub>12</sub>-verarbeitenden Enzyms CblC durch Antivitamine B<sub>12</sub> – Kristallstruktur des inaktiven ternären Komplexes mit dem Kosubstrat Glutathion**

Markus Ruetz, Aranganathan Shanmuganathan, Carmen Gherasim, Agnes Karasik, Robert Salchner, Christoph Kieninger, Klaus Wurst, Ruma Banerjee,\* Markos Koutmos\* und Bernhard Kräutler\*

Professor Ebba Nexø gewidmet

**Abstract:** Antivitamine B<sub>12</sub> gewinnen als robuste B<sub>12</sub>-Dummys zunehmend biomedizinisches Interesse. Das potenzielle Antivitamin B<sub>12</sub> 2,4-Difluorphenylethynylcobalamin (F2PhEtyCbl) wurde hergestellt, und seine 3D-Struktur in Lösung und im Kristall wurde untersucht. Das chemisch inerte F2PhEtyCbl zeigte sich gegen Thermolyse seiner Co-C-Bindung bei 100°C resistent, war stabil bei Bestrahlung mit (hellem) Tageslicht und blieb auch bei längerer Aufbewahrung in wässriger Lösung bei Raumtemperatur intakt. Es wurde vom humanen B<sub>12</sub>-verarbeitenden Enzym CblC in Gegenwart des Kosubstrats Glutathion (GSH) mit hoher Affinität (K<sub>D</sub> = 130 nM) gebunden. F2PhEtyCbl stabilisierte den ternären Komplex von CblC mit GSH und widerstand der Verarbeitung. Die Kristallstruktur dieses Komplexes lieferte erste Einblicke in die Wechselwirkungen eines Antivitamins B<sub>12</sub> mit CblC sowie in die Anordnung von GSH und Base-off-Cobalamin im aktiven Zentrum dieses blockierten Enzyms.

Vitamin B<sub>12</sub> (Cyanocobalamin, CNCbl) und andere Cobalamin (Cbl) sind für den Stoffwechsel von Säugetieren dank der essentiellen Kofaktor-Rollen von Koenzym B<sub>12</sub> (AdoCbl) und Methylcobalamin (MeCbl) unentbehrlich.<sup>[1,2]</sup> Um die Versorgung der Säugerzellen mit AdoCbl und MeCbl zu gewährleisten, werden natürliche Cbl zunächst durch das Cbl-verarbeitende Enzym CblC (auch MMACHC genannt, was für „Methylmalonylacidurie Typ C und Homocystinurie“ steht)<sup>[3]</sup> zu Cob(II)alamin „abgebaut“. CblC bindet Cbl in ihrer Base-off-Form, entfernt ihren axialen Co<sub>p</sub>-Liganden und liefert so Cbl<sup>II</sup>, den entscheidenden Biosynthese-Vorläufer von AdoCbl und MeCbl.<sup>[3c,4]</sup> Cbl, die in die Zellen transportiert,

dort jedoch nicht durch CblC verarbeitet werden, bleiben metabolisch inert und werden als Antivitamine B<sub>12</sub> klassifiziert.<sup>[5]</sup> Derartige inerte B<sub>12</sub>-Derivate induzieren in Versuchstieren Symptome einer B<sub>12</sub>-Defizienz,<sup>[6]</sup> analog jener bei Menschen mit dysfunktionalem CblC.<sup>[3b]</sup>

Um die teils noch immer rätselhaften Aufgaben der Cbl im menschlichen Organismus aufzuklären,<sup>[1,7]</sup> werden die Auswirkungen von B<sub>12</sub>-Mangel in Versuchstieren untersucht. In solchen Studien ist die Anwendung von Antivitaminen B<sub>12</sub><sup>[5,8]</sup> eine vergleichsweise humane Vorgehensweise.<sup>[6,9]</sup> Tatsächlich konnte das Antivitamin B<sub>12</sub> 4-Ethylphenylcobalamin (**1**, EtPhCbl) in Mäusen eine funktionale B<sub>12</sub>-Defizienz induzieren.<sup>[6,10]</sup> Leider ist **1** empfindlich gegen Licht, das seine Co-C-Bindung spaltet und die „verriegelte“ B<sub>12</sub>-Aktivität wiederherstellt.<sup>[10]</sup> Hier beschreiben wir die Herstellung von 2-(2,4-Difluorphenyl)ethynylcobalamin (**3**, F2PhEtyCbl; Abbildung 1), einem Analogon des lichtstabilen 2-Phenylethynylcobalamins (**2**, PhEtyCbl),<sup>[11,12]</sup> das aber durch seine zwei Fluor-Atome deutlich gegen Hydrolyse stabilisiert ist. Wir untersuchten auch die Interaktion von **2** und **3** mit dem humanen B<sub>12</sub>-verarbeitenden Enzym CblC und beschreiben die Kristallstruktur des ternären Komplexes von CblC und **3** mit Glutathion (GSH). Die Verwendung eines Antivitamins B<sub>12</sub> unterband die Enzymreaktion und gab beispiellose Einblicke in einen Holo-CblC-Komplex.

F2PhEtyCbl (**3**) wurde in 58 % Ausbeute über die Reduktion von Aquocob(III)alamin (H<sub>2</sub>OCbl) durch Triethylammoniumformiat in Gegenwart von 2-(2,4-Difluorphenyl)ethynyliodid synthetisiert, eine Methode, die bereits für die Synthese von PhEtyCbl (**2**) entwickelt wurde.<sup>[11a]</sup> Die

[\*] Dr. M. Ruetz, Dr. R. Salchner, M. Sc. C. Kieninger, Prof. B. Kräutler  
Institut für Organische Chemie und Zentrum für Molekulare  
Biowissenschaften, Universität Innsbruck  
6020 Innsbruck (Österreich)  
E-Mail: bernhard.kraeutler@uibk.ac.at

Dr. M. Ruetz, Dr. C. Gherasim, Prof. R. Banerjee  
University of Michigan Medical School  
Ann Arbor, MI 48109-0600 (USA)  
E-Mail: rbanerjee@umich.edu

A. Shanmuganathan, A. Karasik, Prof. M. Koutmos  
Department of Biochemistry  
Uniformed Services University of the Health Sciences  
Bethesda, MD 28104 (USA)

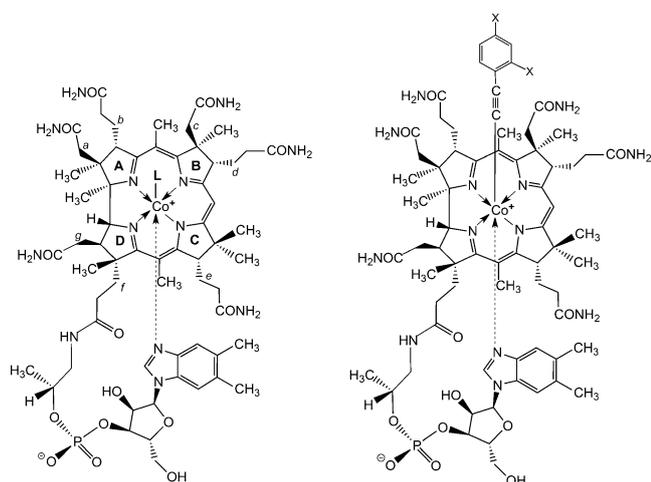
E-Mail: markos.koutmos@usuhs.edu

Dr. K. Wurst  
Institut für Allgemeine, Anorganische Chemie und Theoretische  
Chemie, Universität Innsbruck (Österreich)

Dr. R. Salchner  
Derzeitige Adresse: Watercryst GmbH & Co, Kematen (Österreich)

Dr. C. Gherasim  
Derzeitige Adresse: Department of Pathology, University of Utah  
School of Medicine, Salt Lake City, UT (USA)

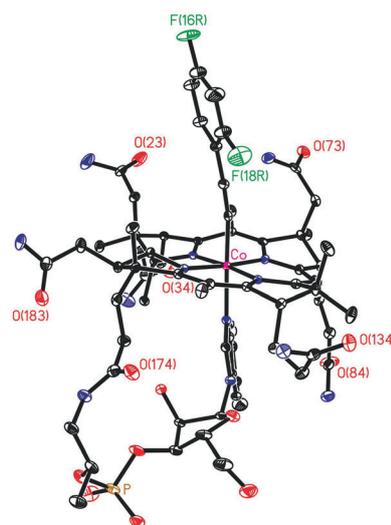
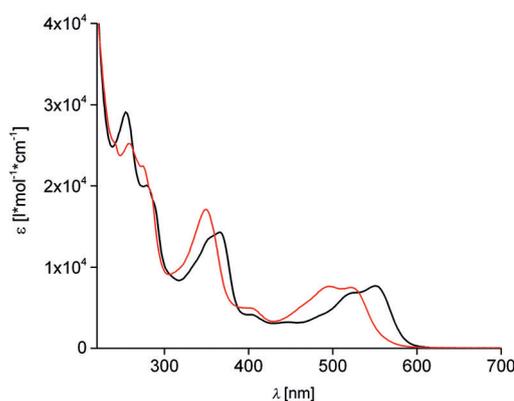
 Hintergrundinformationen und die Identifikationsnummer (ORCID)  
 eines Autors sind unter:  
<https://doi.org/10.1002/ange.201701583> zu finden.



**Abbildung 1.** Links: Allgemeine Strukturformel von wichtigen Cobalaminen: Vitamin B<sub>12</sub> (L = CN: Cyanocob(III)alamin, CNCbl), Koenzym B<sub>12</sub> (L = 5'-Adenosyl: 5'-Deoxyadenosylcob(III)alamin, AdoCbl), Methylcob(III)alamin (L = Methyl: MeCbl), Cob(II)alamin (L = e<sup>-</sup>: Cbl<sup>II</sup>), 4-Ethylphenylcob(III)alamin (1; L = 4-Ethylphenyl: EtPhCbl) und Aquocob(III)alamin (L = H<sub>2</sub>O<sup>+</sup>: H<sub>2</sub>OCbl). Rechts: Strukturformel von 2-Phenylethynylcobalamin (2, PhEtyCbl; X = H) und von 2-(2,4-Difluorphenyl)ethynylcobalamin (3, F2PhEtyCbl; X = F).

Reaktion verläuft wahrscheinlich über einen radikalischen Prozess, initiiert durch in situ generiertes Cbl<sup>II</sup>, wie bereits für die Synthese von **2** vorgeschlagen.<sup>[11a]</sup> Das UV/Vis-Spektrum von **3** (Abbildung 2) gleicht dem von PhEtyCbl (**2**),<sup>[11]</sup> unterscheidet sich aber wesentlich von den Spektren der metallorganischen B<sub>12</sub>-Kofaktoren AdoCbl und MeCbl.<sup>[13]</sup> In neutraler wässriger Lösung liegt F2PhEtyCbl (**3**) in der Base-on-Form vor. Starke Säure führt zur Protonierung des 5,6-Dimethylbenzimidazols (DMB) und erzeugt **3-H<sup>+</sup>** mit dekoordiniertem DMB. Die Bildung vom Base-off-**3-H<sup>+</sup>** wird von charakteristisch hypsochromen Verschiebungen der Absorptionsmaxima im UV/Vis-Spektrum begleitet (Abbildung 2). Für **3-H<sup>+</sup>** wurde ein pK<sub>a</sub>-Wert von 0.75 ermittelt, was einer starken Stabilisierung der Base-on-Form von **3** entspricht und ein [Base-on]/[Base-off]-Gleichgewicht von ca. 10<sup>5</sup> berechnen ließ.

Die Summenformel und die Struktur von F2PhEtyCbl (**3**) wurden aus einem MALDI-TOF-Massenspektrum, einem IR-Spektrum (Bande der C-C-Dreifachbindung bei  $\tilde{\nu} = 2130.5 \text{ cm}^{-1}$ ; Hintergrundinformationen (SI), Abbildung S2) sowie ausführlichen <sup>1</sup>H- und <sup>13</sup>C-NMR-Untersuchungen einer Lösung von **3** in CD<sub>3</sub>OD abgeleitet (siehe SI, Abbildung S3). Orthorhombische Kristalle von **3** (Raumgruppe P2<sub>1</sub>2<sub>1</sub>2<sub>1</sub>) wuchsen aus wässrigem Aceton. Die Kristallstruktur von **3** zeigte ein Base-on-Cbl mit einem oberen 2,4-Difluorphenylethynyl-Linganden (Abbildung 2; SI, Abbildungen S5, S6 und Tabelle S1). Die Geometrie und die Bindungslängen der inneren Koordinationssphäre des Cobalt-Zentrums von **3** und PhEtyCbl<sup>[11]</sup> sind ähnlich. Wie in **2** und in CNCbl<sup>[14,15]</sup> sind die axialen Bindungen in **3** kurz (Co-C1L: 1.877(7) Å, Co-N3N: 2.071(5) Å). Ebenso weist die Ethynylgruppe von **3** eine kurze C1L-C2L-Dreifachbindung auf (1.206(9) Å), die mit Bindungswinkeln Co-C(1L)-C(2L) von 170.5(5)° und C(1L)-C(2L)-C(L3) von 176.1(7)° nahezu linear ist. Die Ebene der



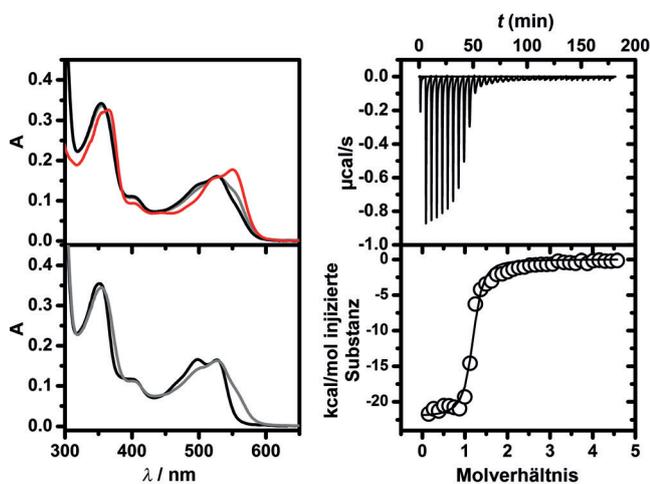
**Abbildung 2.** Oben: UV/Vis-Spektren einer wässrigen Lösung von F2PhEtyCbl (**3**;  $c = 55 \mu\text{M}$ ) in H<sub>2</sub>O (schwarze Linie) und von Base-off-H-F2PhEtyCbl<sup>+</sup> (**3-H<sup>+</sup>**; rote Linie) in 1 M wässriger HClO<sub>4</sub>. Unten: Struktur von **3** im Kristall mit den N-, O-, P-, Co- und F-Atomen in Blau, Rot, Orange, Pink bzw. Grün (siehe SI für weitere Details und für ein Stereomodell von **3**). Die Schwingungsellipsoide entsprechen 30% Aufenthaltswahrscheinlichkeit.

2,4-Difluorphenylgruppe ist gegenüber jener der DMB-Base nur um etwa 23.1(3)° verdreht.

Eine Lösung von F2PhEtyCbl (**3**) in DMSO, die 24 h auf 100 °C temperiert wurde, zeigte laut UV/Vis-Spektren und HPLC-Analysen (SI, Abbildung S7) eine praktisch vollständige Retention der Co-C-Bindung. Wie bereits für Ethynyl-Cbl<sup>[14]</sup> und **2**<sup>[11,12]</sup> berichtet, waren Lösungen von **3** stabil gegen Sonnenlicht (SI, Abbildung S8). In wässriger Lösung hydrolysierte **3** pH-abhängig langsam zu H<sub>2</sub>OCbl. Bei pH 2 hydrolysierte **3** mit einer Kinetik pseudo-erster Ordnung und mit einer Halbwertszeit von etwa 20 h bei Raumtemperatur. Die Hydrolyserate von **3** folgte zwischen pH 0 und 4 nahezu in erster Ordnung der H<sub>3</sub>O<sup>+</sup>-Konzentration, was die Abschätzung einer Halbwertszeit von etwa 10<sup>7</sup> h bei pH 7 ermöglichte. Man kann deshalb davon ausgehen, dass **3** unter physiologischen Bedingungen effektiv stabil ist.

Das Binden von F2PhEtyCbl (**3**) oder PhEtyCbl (**2**) an CblC wurde von einer Blauverschiebung der UV/Vis-Absorptionen begleitet, wie es auch für MeCbl<sup>[16]</sup> und EtPhCbl<sup>[10]</sup> bekannt ist. Die Überführung der Base-on-Form von **3** (oder

**2**) in die entsprechende Base-off-Form erfolgte langsam, was UV/Vis-spektroskopisch durch die allmählichen Änderungen beim Binden beobachtet wurde (Abbildung 3; SI, Abbildung S12). Versetzen mit dem Kosubstrat Glutathion (GSH) verursachte weitere hypsochrome Verschiebungen der Ab-

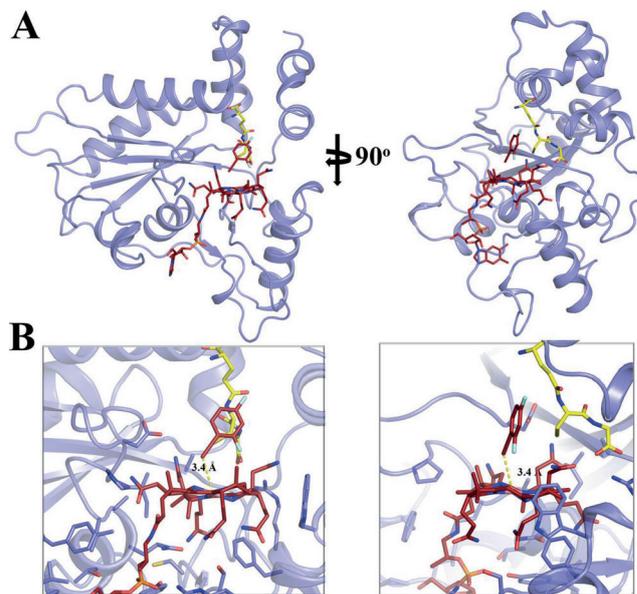


**Abbildung 3.** Biochemische Untersuchungen mit CblC, F2PhEtyCbl (**3**) und GSH. Links oben: zeitabhängige UV/Vis-Spektren beim Binden von **3** an CblC. Das ursprüngliche Spektrum von **3** ist in Rot gezeigt, das finale Spektrum nach 60 min in Schwarz. Links unten: spektrale Veränderungen bei nachfolgendem Versetzen mit GSH – Anfangs- und Endspektren sind hier grau bzw. schwarz gefärbt. Rechts: eine repräsentative Titration mittels ITC von CblC mit **3** in Gegenwart von GSH (10  $\mu\text{M}$  CblC, 200  $\mu\text{M}$  **3**, 1 mM GSH). Die Bindungsisotherme wurde mithilfe des Modells einer einzigen Bindungsstelle analysiert (siehe SI für weitere Details).

sorptionsmaxima. In Gegenwart von GSH wurde **3** oder **2** unter vollständigem Wechsel zur Base-off-Form an CblC gebunden, was auf eine strukturierende Rolle von GSH im Holo-CblC schließen lässt (Abbildung 3; SI, Abbildung S13). Dank der Kristallstruktur von CblC mit gebundenem MeCbl<sup>[17]</sup> konnte erwartet werden, dass CblC **3** mit seiner großen metallorganischen Gruppe problemlos binden sollte. Isothermale Kalorimetrie (ITC) zeigte eine hohe Bindungsaffinität des Alkynyl-Cbl **3** in Gegenwart von GSH zum humanen CblC ( $K_D = 129 \pm 13$  nM), etwa 4-mal geringer als für **2** ( $K_D = 30.0 \pm 5.6$  nM; Abbildung 3 und SI, Abbildung S15). Nach Inkubation von 17–20  $\mu\text{M}$  Lösungen von **2** oder **3** und 10 mM GSH mit 50  $\mu\text{M}$  CblC über 12 h bei 20 °C konnte kein Abbau des jeweiligen Alkynyl-Cbl nachgewiesen werden (SI, Abbildung S14). Im Unterschied zu MeCbl, das schnell von CblC und GSH demethyliert wird ( $k_{\text{obs}} = 0.6 \text{ min}^{-1}$ )<sup>[10]</sup> widerstanden **2** und **3** dem universellen B<sub>12</sub>-Verarbeiter CblC ( $k_{\text{obs}} < 3 \times 10^{-7} \text{ s}^{-1}$ ).

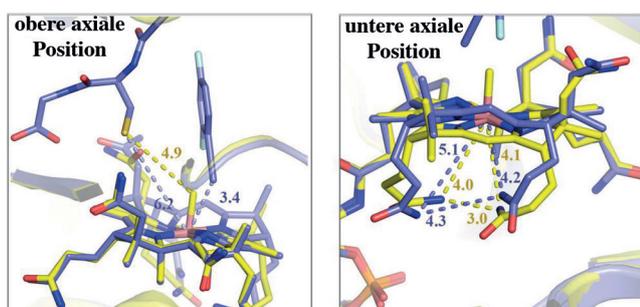
Der stabile ternäre Komplex aus dem Alkynyl-Cbl **3**, GSH und CblC wurde mithilfe der Dampfdiffusionsmethode kristallisiert. Die Kristalle wuchsen in der Raumgruppe *P*6<sub>1</sub>22 mit einem Monomer in der asymmetrischen Einheit (SI, Tabelle S2). Die Struktur wurde mit einer Auflösung von 2.5 Å bei Verwendung einer früheren Struktur von CblC als Suchmodell (PDB-ID: 3SC0)<sup>[17]</sup> unter molekularem Ersatz gelöst, jedoch ohne MeCbl, Protein-Loops und Regionen mit hohen

B-Faktoren zu berücksichtigen (Abbildung 4; SI, Abbildung S16). Dem Cbl- und GSH-Liganden konnten eindeutige Elektronendichten zugeordnet werden, die anschließend modelliert und verfeinert wurden. Das Antivitamin **3** war in



**Abbildung 4.** Struktur des ternären Komplexes von GSH und F2PhEtyCbl (**3**) und CblC (im Bändermodell), in zwei verschiedenen Ansichten gezeigt. A) Struktur des Komplexes von CblC (hellblau) mit GSH (gelb) und F2PhEtyCbl (**3**, dunkelrot) in zwei Projektionen; B) zwei entsprechende Ausschnitte der Struktur.

seiner Base-off-Form gebunden. In dieser Struktur (von CblC mit **3** und GSH) und jener von an CblC gebundenem MeCbl<sup>[17]</sup> waren die Position und Interaktionen der DMB-Base ununterscheidbar. Im ternären Komplex von **3** mit CblC und GSH lag auch zwischen dem Corrinteil von **3** und seiner Proteinumgebung ein bemerkenswert ähnliches Netzwerk aus H-Brücken vor wie in den binären Komplexen von CblC mit MeCbl<sup>[17]</sup> oder AdoCbl.<sup>[18]</sup> Ebenso waren die *a*- und *g*-Acetamidseitenketten an den Ringen A und D sowie die *b*-Propionamid eng mit dem Proteinteil durch H-Brücken verbunden und wurden in den Kristallstrukturen an identischen Positionen gefunden. Deutliche Unterschiede betreffen die *d*- und *e*-Propionamid- wie auch die *c*-Acetamid-Seitenketten an den Ringen B und C, die eine besondere Anordnung in der Struktur von CblC mit gebundenem F2PhEtyCbl und GSH einnehmen (Abbildungen 4 und 5). Diese weisen auffallend kleine Abstände Co···N45, Co···N52, N45···N52 von 4.2, 5.1 bzw. 4.3 Å untereinander und mit dem Co-Atom auf. Sie sind aber nicht ganz so nah wie in MeCbl, das an CblC gebunden ist,<sup>[17]</sup> und ermöglichen somit einen etwas besseren Zugang zur unteren axialen Position. In an CblC gebundenem MeCbl nähern sich die *d*- und *e*-Propionamid-Seitenketten noch weiter untereinander und an das Co-Zentrum an (mit Co···N45-, Co···N52-, N45···N52-Abständen von 4.1, 4.0 bzw. 3.0 Å). Cbl-Strukturen mit derartig angezogenen Propionamid-Seitenketten scheinen ein Markenzeichen von Cbl zu sein, die an CblC gebunden<sup>[17,18]</sup> und so für das Zurechtschneiden durch reduktive Dealkylierung aktiviert sind.<sup>[3c,4]</sup>

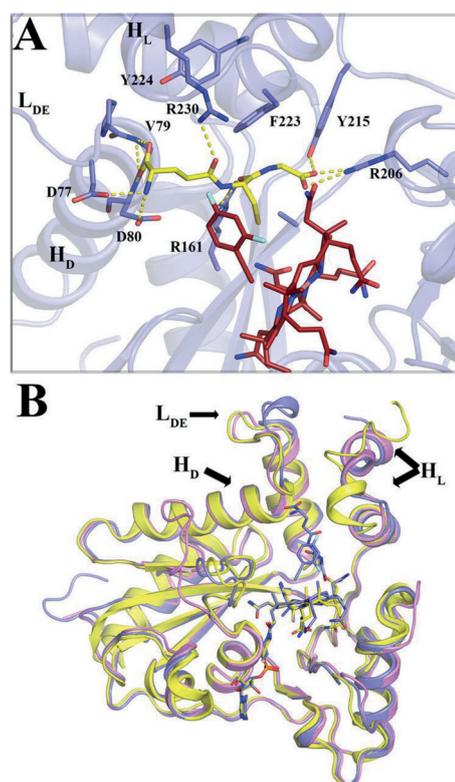


**Abbildung 5.** Struktureller Vergleich von mit MeCbl gebundenem CblC (gelb) und dem ternären Komplex von mit GSH und F2PhEtyCbl gebundenem CblC (blau). Links ist die Umgebung der oberen axialen Co-Position in der Nachbarschaft des GSH-Liganden aus der Nähe zu sehen, im rechten Teil die Umgebung der unteren axialen Co-Position. Die blauen und gelben gepunkteten Linien zeigen auf ausgewählte Abstände zwischen GSH und F2PhEtyCbl sowie CblC-gebundenem MeCbl. Man beachte die eingezogenen *d*- und *e*-Propionamid-Seitenketten.

Bemerkenswerterweise ist das Netzwerk der H-Brücken zwischen dem Corrinring von **3** und seiner Proteinumgebung im ternären Komplex von CblC mit GSH weitgehend ähnlich jenem der binären Komplexe von CblC mit MeCbl<sup>[17]</sup> und AdoCbl.<sup>[18]</sup>

Deutliche Elektronendichte wurde nahe über dem Co-Atom beobachtet, wo der  $\beta$ -axiale Ligand zu erwarten wäre (SI, Abbildung S17). Wir konnten aber aus der klaren Elektronendichte der F2PhEty-Gruppe kein direkt an das Co-Zentrum gebundenes Ethinylkohlenstoffatom ableiten. Basierend auf einer berechneten freien Composite OMIT Map war der 2,4-Difluorphenylring an einer anderen Position und vom Co-Atom weiter entfernt als im freien **3**. (Abbildung 4). Die Ebenen der Phenylringe in freiem **3** und in seiner CblC-gebundenen Form stehen annähernd senkrecht aufeinander. Außerdem zeigt die Achse des Arens nicht mehr in Richtung des Co- $d_{z^2}$ -Orbitals. Laut der bestmöglichen Angleichung an die experimentell gefundene Elektronendichte ist die 2,4-Difluorphenylethynylgruppe zu weit vom Co-Zentrum entfernt, um daran zu koordinieren. Unser Modell liefert einen Abstand von etwa 3.4 Å zwischen dem Co-Zentrum von Cbl und dem F<sub>2</sub>PhEty-Fragment (siehe Abbildung 4). Wir postulieren daher, dass die intensive Synchrotron-Strahlung während der Datensammlung zur Spaltung der Co-C-Bindung geführt hat, möglicherweise über einen reduktiven Weg,<sup>[18–20]</sup> der Base-off-Cbl<sup>II</sup> und ein schwach gebundenes F2PhEty-Anion liefert.

Die Korrelation der klaren Elektronendichte des gebundenen GSH ermöglichte eine erste Beschreibung seiner Proteinumgebung in CblC und seiner Position relativ zum Cbl **3** (Abbildung 6A; SI, Abbildung S18). Ein ausgedehntes Netzwerk von Wechselwirkungen von GSH mit dem Protein verankert GSH in der Bindungstasche. Im Speziellen liegt eine Kombination von 1) mehreren H-Brücken mit allen drei Peptidresten (Glu, Cys, Gly) von GSH sowie 2) von hydrophoben Wechselwirkungen zwischen dem Glycinteil von GSH und den Arenresten von F223, Y224 und A159 vor. Der Großteil des GSH-Liganden ist vom Protein und dem gebundenen Cbl **3** umschlossen; dabei werden 70% der ge-



**Abbildung 6.** A) Die Umgebung von GSH im ternären Komplex mit CblC und F2PhEtyCbl (**3**). GSH (gelb) und **3** (dunkelrot) sind in einer Stabdarstellung abgebildet, wobei Proteinreste der GSH-Bindungstasche in blauer Stabdarstellung und H-Brücken in Form gelber gepunkteter Linien eingezeichnet sind. B) Überlagerung der Strukturen von Apo-CblC (rosa), von CblC mit gebundenem MeCbl (gelb) sowie dem ternären Komplex mit GSH und F2PhEtyCbl (blau). MeCbl (gelb), GSH und F2PhEtyCbl sind in einem blauen Stabmodell gezeigt. Auf die drei Proteinregionen mit deutlich unterschiedlichen Strukturen weisen kräftige Pfeile hin.

samen GSH-Oberfläche vom Protein und 20% von **3** abgedeckt. Die schwach gebundene F2PhEty-Gruppe wird dicht an GSH gepackt, und  $S_{\text{GSH}}$  befindet sich in der Nähe des aromatischen Ringes des F2PhEty-Fragments, mit Abständen von 4.2 bis 5.1 Å. Die benachbarte  $\text{CH}_2$ -Gruppe wird in einer Entfernung von nur 3.9 bis 4.0 Å vom F2PhEty-Ring gefunden, was direkte  $\text{CH}\text{-}\pi$ -Kontakte impliziert. Dagegen lässt ein Modell des Proteins mit gebundenem intaktem **3** auf starke räumliche Hinderungen von **3** mit GSH schließen (siehe SI, Abbildungen S19 und S20).

Die früher verfügbaren Kristallstrukturen, Sequenzinformation und biochemischen Analysen von CblC<sup>[17,18,21]</sup> ließen R230, R161 und R206 als wichtige Reste für die GSH-Bindung vermuten. Tatsächlich bestätigt unsere Strukturbestimmung die fundamentale Rolle dieser drei Arginine und charakterisiert R161 als Anker für GSH im aktiven Zentrum von CblC durch Wechselwirkung seiner Guanidiniumgruppe und des Cysteinocarboxamids von GSH. Außerdem konnte nun gezeigt werden, dass Y215, D77 und D80 H-Brücken zu GSH bilden, was auf eine bislang nicht vorhergesagte Anpassung des Proteins hinweist. Das Schwefelzentrum von GSH ( $S_{\text{GSH}}$ ), das Schlüsselement von CblC bei der nukleophilen Cbl-

Dealkylierung, befindet sich in Nachbarschaft des gebundenen Cbl, mit einem Co-S<sub>GSH</sub>-Abstand von 6.3 Å. Dies entspricht einem berechneten Abstand von S<sub>GSH</sub> zum Methylgruppen-Kohlenstoffatom des CblC-gebundenen MeCbl<sup>[17]</sup> von 4.9 Å (in entsprechenden überlagerten Strukturen). Die Positionierung des S<sub>GSH</sub> zum gebundenen Corrin erfüllt damit nicht die geometrischen Voraussetzungen des S<sub>N</sub>2-Mechanismus der Dealkylierung durch GSH. Erstaunlicherweise fehlen der S<sub>GSH</sub>-Gruppe auch die Kontakte, die ihre Deprotonierung erleichtern und ihre Nukleophilie erhöhen würden.

Die Proteinfaltung des hier untersuchten ternären CblC-Komplexes weist gegenüber früheren Strukturen von Apo-CblC (PDB-ID: 3SBZ) und von CblC mit gebundenem MeCbl (MeCbl:CblC; PDB-ID: 3SC0)<sup>[17]</sup> eindeutige Unterschiede auf (Abbildung 6). Der Loop L<sub>DE</sub> wurde als Resultat der GSH-Bindung im ternären Komplex nur in einer Konformation gefunden. Um für seinen Glutamatrest Raum zu schaffen, unterstützt das Kosubstrat GSH auch eine Neuordnung des N-terminalen Teils des L<sub>DE</sub>-Loops sowie der C-terminalen Region der vorangehenden Helix (H<sub>D</sub>), welche die Reste 77–80 umfasst. Ferner tritt die terminale Helix (H<sub>L</sub>) der Vier-Helix-Kappe in den CblC-Strukturen mit MeCbl und F2PhEtyCbl (**3**) in verschiedenen Konformationen auf. In den Strukturen von Apo-CblC und CblC mit gebundenem F2PhEtyCbl lag die Helix H<sub>L</sub> in der gleichen Konformation vor, was auf die dynamische Struktur dieser Helix hindeutet.

Die Base-off-Formen von **2** oder **3** banden effizient an CblC, wenn Glutathion (GSH) vorhanden war. Dadurch wurden inaktive ternäre Komplexe gebildet, die außerstande waren, Cbl<sup>III</sup> zu generieren, wie hier ebenfalls gezeigt werden konnte. Die fehlende Reaktivität des Antivitamins B<sub>12</sub> **3** wurde hier genutzt, um das Kosubstrat GSH in einer bis dato unerreichbaren Form des ternären Komplexes einzufangen und somit eine erste Kristallstruktur des Holo-CblC mit GSH und einem ebenfalls gebundenen Antivitamin B<sub>12</sub> zu ermöglichen. Diese Untersuchung lokalisierte spezifische Protein- und Cbl-Beiträge bei der Verankerung von GSH und liefert somit eine rationale strukturelle Basis für zukünftige Arbeiten mit Proteinmutanten. Beispielsweise bietet die hier gezeigte Schlüsselrolle von R161 bei der GSH-Bindung eine Erklärung für zwei wichtige pathogene Mutationen von CblC (R161G und R161Q). Antivitamine B<sub>12</sub>, die stabiler als **3** gegen eine Reduktion durch Röntgenstrahlung im Komplex mit GSH sind, könnten dazu beitragen, die strukturelle Basis für die Dealkylierungsaktivität von CblC noch präziser zu definieren. Wie es hier für ein B<sub>12</sub>-verarbeitendes Enzym untersucht wurde, könnten Antivitamine B<sub>12</sub> auch in anderen Fällen inaktivierte Enzymkomplexe produzieren und zur Lösung von deren Kristallstrukturen hilfreich sein. Zukünftige Untersuchungen sind ebenfalls notwendig, um mehr über interessante Anwendungsmöglichkeiten von Antivitaminen B<sub>12</sub> wie **3** zu erfahren. So induzierte EtPhCbl (**1**) z. B. nicht nur einen funktionalen B<sub>12</sub>-Mangel in Mäusen,<sup>[6]</sup> sondern half dabei, resistente Gram-negative humane Pathogene zu bekämpfen.<sup>[22]</sup> Studien mit Antivitaminen B<sub>12</sub> und verwandten Cbl als mögliche Antikrebsmittel kommen ebenfalls zunehmend ins Blickfeld.<sup>[5,8,23]</sup> Tatsächlich ist **3** eine vielversprechende, lichtstabile Alternative für das Antivitamin B<sub>12</sub> **1**<sup>[6,10]</sup> und stellt möglicherweise ein vielseitiges biomedizinisches

Hilfsmittel dar. Langzeit-Experimente mit Tieren<sup>[6]</sup> könnten mit **3** nah an den natürlichen Lebensbedingungen realisiert werden. Solche Experimente würden speziell hilfreich sein, um unsere Kenntnisse über physiologische Effekte der B<sub>12</sub>-Defizienz zu erweitern und um störende Verständnislücken über nachgeschaltete pathophysiologische Wirkungen im Menschen zu schließen.

### Experimentelles

Siehe Hintergrund-Informationen (SI) für Materialien, Instrumente, Synthese-Vorschriften, spektroskopische Charakterisierung der Verbindungen und Enzymkomplexe, biochemische Studien und Röntgenkristallographie.

Röntgenkristallographie: CCDC 1530214 F2PhEtyCbl (**3**) enthält die ausführlichen kristallographischen Daten zu dieser Veröffentlichung. Die Daten sind kostenlos beim Cambridge Crystallographic Data Centre erhältlich. F2PhEtyCbl:GSH:CblC wurden in der Protein Data Bank unter Eintrag 5UOS hinterlegt.

### Danksagung

Wir danken dem Österreichischem Wissenschaftsfonds (FWF) für seine Unterstützung der Forschung in Innsbruck (aktuelles Projekt: FWF P-28892) sowie dem National Institute of General Medical Sciences and National Cancer Institute Collaborative Access Team (GM/CA CAT) für Messzeit an der Advanced Light Source. Diese Arbeit wurde teilweise auch von der American Heart Association (13SDG14560056, an MK) und den National Institutes of Health (NIH, grant DK45776, an RB) unterstützt.

### Interessenkonflikt

Die Autoren erklären, dass keine Interessenkonflikte vorliegen.

**Stichwörter:** Antivitamine · Glutathion · Inhibitoren · Röntgenbeugung · Vitamin B<sub>12</sub>

**Zitierweise:** *Angew. Chem. Int. Ed.* **2017**, *56*, 7387–7392  
*Angew. Chem.* **2017**, *129*, 7493–7498

- [1] R. Carmel, R. Green, D. S. Rosenblatt, D. Watkins, *Hematology Am. Soc. Hematol. Educ. Program* **2003**, 62–81.
- [2] a) *Vitamin B<sub>12</sub> and B<sub>12</sub> Proteins* (Hrsg.: B. Kräutler, D. Arigoni, B. T. Golding), Wiley-VCH, Weinheim, **1998**; b) *Chemistry and Biochemistry of B<sub>12</sub>* (Hrsg.: R. Banerjee), Wiley, New York, **1999**; c) R. Banerjee, S. W. Ragsdale, *Annu. Rev. Biochem.* **2003**, *72*, 209–247; d) R. G. Matthews, M. Koutmos, S. Datta, *Curr. Opin. Struct. Biol.* **2008**, *18*, 658–666.
- [3] a) J. P. Lerner-Ellis, J. C. Tirone, P. D. Pawelek, C. Dore, J. L. Atkinson, D. Watkins, C. F. Morel, T. M. Fujiwara, E. Moras, A. R. Hosack, G. V. Dunbar, H. Antonicka, V. Forgetta, C. M. Dobson, D. Leclerc, R. A. Gravel, E. A. Shoubridge, J. W. Coulton, P. Lepage, J. M. Rommens, K. Morgan, D. S. Rosenblatt, *Nat. Genet.* **2006**, *38*, 93–100; b) L. Hannibal, P. M. DiBello, M. Yu, A. Miller, S. H. Wang, B. Willard, D. S. Rosenblatt, D. W. Jacobsen, *Mol. Genet. Metab.* **2011**, *103*, 226–239; c) R.

- Banerjee, C. Gherasim, D. Padovani, *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2009**, *13*, 484–491.
- [4] L. Hannibal, J. Kim, N. E. Brasch, S. H. Wang, D. S. Rosenblatt, R. Banerjee, D. W. Jacobsen, *Mol. Genet. Metab.* **2009**, *97*, 260–266.
- [5] B. Kräutler, *Chem. Eur. J.* **2015**, *21*, 11280–11287.
- [6] E. Mutti, M. Ruetz, H. Birn, B. Kräutler, E. Nexo, *Plos One* **2013**, *8*, e75312.
- [7] a) G. Scalabrino, *Prog. Neurobiol.* **2009**, *88*, 203–220; b) E. V. Quadros, *Br. J. Haematol.* **2010**, *148*, 195–204; c) L. R. Solomon, *Blood Rev.* **2007**, *21*, 113–130; d) M. A. Moreno-Garcia, D. S. Rosenblatt, L. A. Jerome-Majewska, *Nutrients* **2013**, *5*, 3531–3550.
- [8] F. Zelder, M. Sonnay, L. Prieto, *ChemBioChem* **2015**, *16*, 1264–1278.
- [9] G. Scalabrino, M. Peracchi, *Trends Mol. Med.* **2006**, *12*, 247–254.
- [10] M. Ruetz, C. Gherasim, S. N. Fedosov, K. Gruber, R. Banerjee, B. Kräutler, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2013**, *52*, 2606–2610; *Angew. Chem.* **2013**, *125*, 2668–2672.
- [11] a) M. Ruetz, R. Salchner, K. Wurst, S. Fedosov, B. Kräutler, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2013**, *52*, 11406–11409; *Angew. Chem.* **2013**, *125*, 11617–11620; b) M. Chromiński, A. Lewalska, D. Gryko, *Chem. Commun.* **2013**, *49*, 11406–11408.
- [12] N. A. Miller, T. E. Wiley, K. G. Spears, M. Ruetz, C. Kieninger, B. Kräutler, R. J. Sension, *J. Am. Chem. Soc.* **2016**, *138*, 14250–14256.
- [13] C. Giannotti in *B<sub>12</sub>, Vol. I* (Hrsg.: D. Dolphin), Wiley, New York, **1982**, S. 393–430.
- [14] J. M. Pratt, *Inorganic Chemistry of Vitamin B<sub>12</sub>*, Academic Press, New York, **1972**.
- [15] L. Randaccio, S. Geremia, G. Nardin, J. Würges, *Coord. Chem. Rev.* **2006**, *250*, 1332–1350.
- [16] J. Kim, L. Hannibal, C. Gherasim, D. W. Jacobsen, R. Banerjee, *J. Biol. Chem.* **2009**, *284*, 33418–33424.
- [17] M. Koutmos, C. Gherasim, J. L. Smith, R. Banerjee, *J. Biol. Chem.* **2011**, *286*, 29780–29787.
- [18] D. S. Froese, T. Krojer, X. C. Wu, R. Shrestha, W. Kiyani, F. von Delft, R. A. Gravel, U. Oppermann, W. W. Yue, *Biochemistry* **2012**, *51*, 5083–5090.
- [19] a) K. Gruber, R. Reitzer, C. Kratky, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2001**, *40*, 3377–3380; *Angew. Chem.* **2001**, *113*, 3481–3484; b) L. Randaccio, S. Geremia, J. Würges, *J. Organomet. Chem.* **2007**, *692*, 1198–1215.
- [20] D. Lexa, J. M. Savéant, *Acc. Chem. Res.* **1983**, *16*, 235–243.
- [21] a) C. Gherasim, M. Ruetz, Z. Li, S. Hudolin, R. Banerjee, *J. Biol. Chem.* **2015**, *290*, 11393–11402; b) J. P. Lerner-Ellis, N. Anastasio, J. H. Liu, D. Coelho, T. Suormala, M. Stucki, A. D. Loewy, S. Gurd, E. Grundberg, C. F. Morel, D. Watkins, M. R. Baumgartner, T. Pastinen, D. S. Rosenblatt, B. Fowler, *Hum. Mutat.* **2009**, *30*, 1072–1081.
- [22] M. B. Guzzo, H. T. Nguyen, T. H. Pham, M. Wyszczelska-Rokiel, H. Jakubowski, K. A. Wolff, S. Ogowang, J. L. Timpona, S. Gogula, M. R. Jacobs, M. Ruetz, B. Kräutler, D. W. Jacobsen, G. F. Zhang, L. Nguyen, *Plos Pathog.* **2016**, *12*, e1005949.
- [23] a) F. Zelder, R. Alberto, *Handbook of Porphyrin Science, Vol. 25* (Hrsg.: K. M. Kadish, K. M. Smith, R. Guilard), World Scientific, Singapore, **2012**, S. 84–132; b) J. Rossier, D. Hauser, E. Kottelat, B. Rothen-Rutishauser, F. Zobi, *Dalton Trans.* **2017**, *46*, 2159–2164.

Manuskript erhalten: 21. Februar 2017  
Endgültige Fassung online: 23. Mai 2017