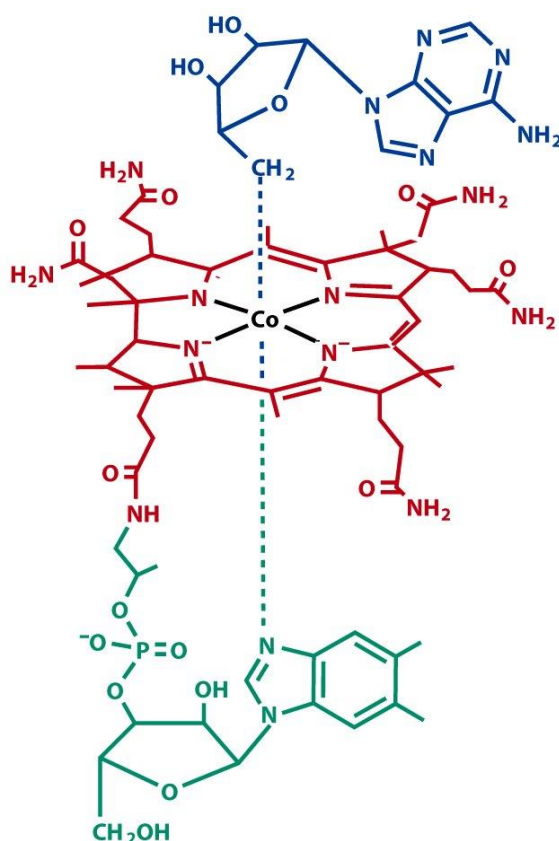


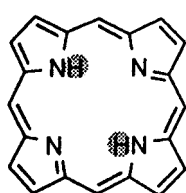
Vitamina B₁₂: un composto organometallico usato dalla Natura

Sebbene fosse noto fino dagli anni 20 del secolo scorso che una dieta contenente fegato crudo era in grado di stimolare la produzione di globuli rossi in pazienti anemici, solo nel 1948 il cosiddetto “fattore dell’anemia perniciosa” fu isolato dal fegato (processandone numerose tonnellate). Il fattore, a cui fu dato il nome di Vitamina B₁₂, venne cristallizzato e più tardi si dimostrò essere la **cianocobalamina**, un complesso diamagnetico, esa-coordinato di Co(III) nel quale la presenza del ciano gruppo deriva tuttavia dalla procedura di isolamento del composto. La vitamina B₁₂ (nelle sue due forme di coenzima B₁₂ e metilcobalamina) è l’unico composto che negli uomini contiene cobalto e deve essere fornita nella dieta, dal momento che il nostro organismo non è in grado di sintetizzarla. Il fegato può immagazzinare il fabbisogno di vitamina B₁₂ sufficiente per alcuni anni; l’assenza di vitamina B₁₂ genera appunto l’anemia perniciosa. Il corpo umano contiene circa 1 mg di Co e il fabbisogno giornaliero è di 1 – 5 µg.

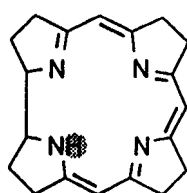
Nel 1958 il coenzima della vitamina B₁₂ (figura) fu isolato (spesso chiamato solo B₁₂ anziché coenzima B₁₂) e ne venne determinata la struttura ai raggi X (per questo lavoro pionieristico la Prof. Dorothy Crowfoot Hodgkin vinse il premio Nobel per la Chimica nel 1964). La struttura rivelò la presenza nel coenzima di due componenti fino ad allora mai trovate in natura: l’anello corrinico, nel quale è inserito il Co, ed un legame Co–C, che fece del coenzima B₁₂ il **primo composto organometallico naturale a essere identificato** (ne abbiamo visti già altri due).



L’anello corrinico (figura) è simile a quello porfirinico ma con un gruppo metinico (–CH=) in meno.



porphyrin

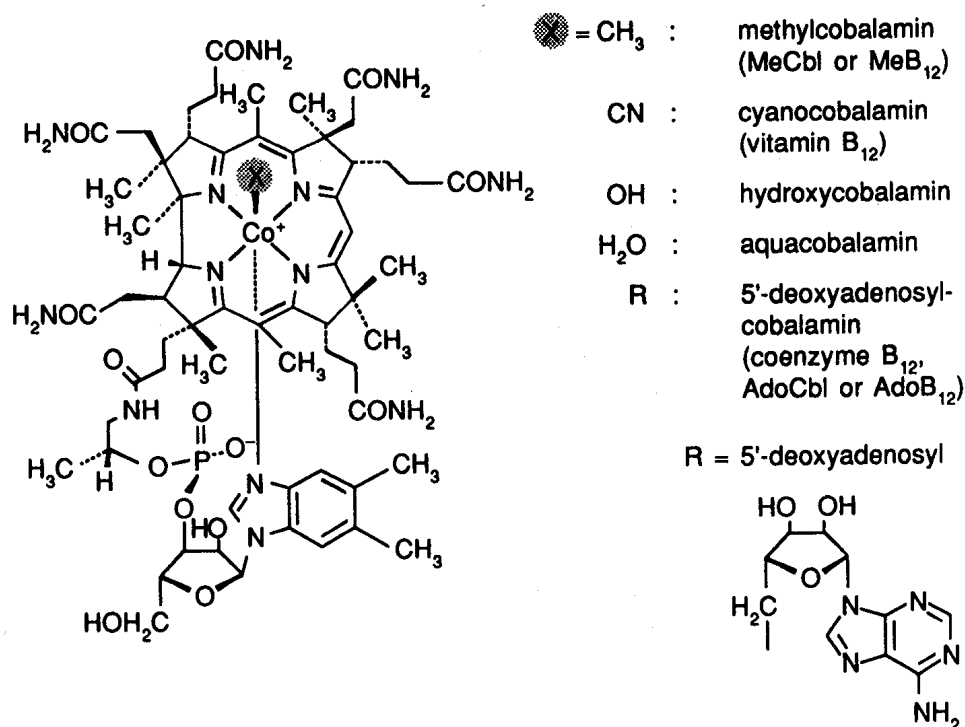


corrin

Fornisce al centro metallico un set di 4 atomi di azoto in geometria planare quadrata e permette accesso a gruppi assiali sopra e sotto il piano. Nelle cobalamine l’anello corrinico porta 7 catene laterali amidiche.

Nella vitamina B₁₂ e suoi derivati un 5,6-dimetilbenzimidazolo, collegato tramite una lunga catena laterale all’anello corrinico, coordina assialmente il Co (tramite N1) dalla parte inferiore (o α) del piano (forma *base-on*). L’altro legante assiale nella parte

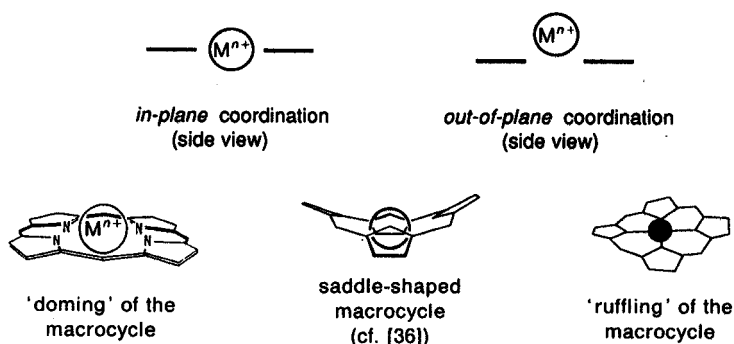
superiore (o β) del piano della corrina è il gruppo CN^- nella **vitamina B₁₂** (cianocobalamina) mentre è la 5'-desossiadenosina nel **coenzima B₁₂** (5'-desossiadenosilcobalamina) ed il metile nella **metilcobalamina**. La aquo-cobalamina (in cui il legante assiale è una molecola di acqua) può essere facilmente ridotta alle corrispondenti specie contenenti Co(II) (B_{12R}) e Co(I) (B_{12S}) tramite riducenti biologici come NADH o FAD (flavina adenina dinucleotide). Il coenzima B₁₂ è complessivamente neutro, in quanto le tre cariche positive del Co(III) vengono neutralizzate da altrettante cariche negative presenti una sull'anello corrinico, una sul gruppo alchilico assiale e l'ultima su un fosfato in catena laterale.



È interessante notare come i micro-organismi siano in grado di sintetizzare la vitamina B₁₂ con il completo controllo della stereochimica dei 9 centri chirali nell'anello corrinico. Si è anche osservato che nel batterio *Pseudomonas denitrificans*, la fonte commerciale della vitamina, il cobalto viene inserito in uno stadio piuttosto avanzato della biosintesi.

Il coenzima B₁₂ è una molecola di medio peso molecolare (ca. 1580 Da) che mostra la sua specificità ed elevata reattività **solo in combinazione con i corrispondenti apoenzimi** (i quali, proteine di elevata massa molecolare, determinano la specificità di substrato e la velocità di reazione). L'incorporazione del cobalto in un coenzima è piuttosto sorprendente in quanto **Co è il meno abbondante dei metalli della prima serie di transizione** sia nella crosta terrestre che nell'acqua marina. Quindi è da attendersi che esso abbia una funzione molto speciale e insostituibile. Anche l'anello corrinico è unico, ed è un macrociclo più piccolo rispetto alle porfirine. Le cobalto-porfirine, sebbene siano stabili, non sono adatte a mimare le azioni del coenzima B₁₂. Nel coenzima B₁₂ e nella metilcobalamina il sesto legante assiale è un gruppo alchilico primario, il che rende questi composti i primi (anche se non più gli unici) esempi ben noti e caratterizzati di **composti organometallici naturali in biochimica**. Il sistema Co-CH₂R nelle alchilcobalamine è inoltre insolitamente stabile verso l'idrolisi in soluzione acquosa fisiologica e in presenza di ossigeno.

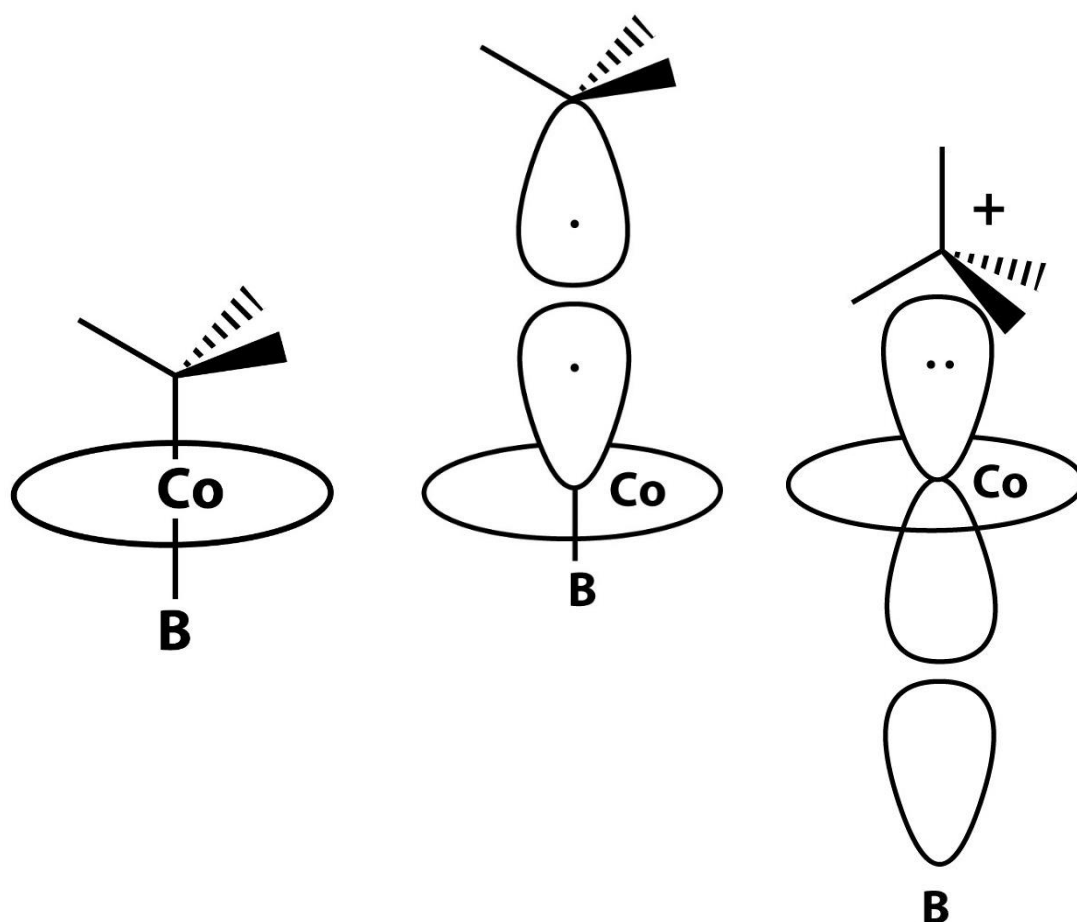
La struttura del coenzima B₁₂ determinata ai raggi X ha mostrato che, nonostante l'elevata coniugazione di elettroni π , il macrociclo non è completamente planare, ma adotta una conformazione leggermente piegata detta 'a sella' o 'a farfalla' (figura). La non-planarità è dovuta al fatto che uno ione metallico piuttosto largo è incapsulato in un macrociclo a 15 termini (anziché 16 come nelle porfirine). Questa struttura un pò distorta sembra essere importante per la reattività in termini di stato entatico.



Rottura del legame Co–C

L'atomo di Co nella cobalamina può esistere come Co(III), Co(II) e Co(I); in tutti i casi la configurazione elettronica è a **basso spin** a causa del forte campo dei leganti creato dall'anello corrinico. La struttura elettronica del cobalto è fondamentale nel determinare la sua reattività chimica, e quindi il ruolo biologico del coenzima. Come ci si può

aspettare, il Co(III), d^6 , è esa-coordinato con geometria ottaedrica (anche se piuttosto distorta). Nel passaggio da Co(III), d^6 , a Co(I), d^8 , la coordinazione dei leganti assiali diventa progressivamente sfavorita, come esemplificato in figura. Ad esempio, la riduzione mono-elettronica della Co(III)-metilcobalamina porta a una diminuzione di più del 50% della forza del legame Co–C, a causa dell'orbitale di antilegame $\sigma^*(\text{Co}-\text{CH}_3)$ mezzo pieno (componente d_{z^2}). In pratica la forma Co(II) tende ad essere penta-coordinata per via dell'elettrone spaiato nell'orbitale d_{z^2} . La forma Co(I) tende ad essere sostanzialmente tetra-coordinata, planare quadrata, per la dissociazione anche del benzimidazolo. Il Co(I), con due elettroni nell'orbitale d_{z^2} è anche un fortissimo nucleofilo (super-nucleofilo).



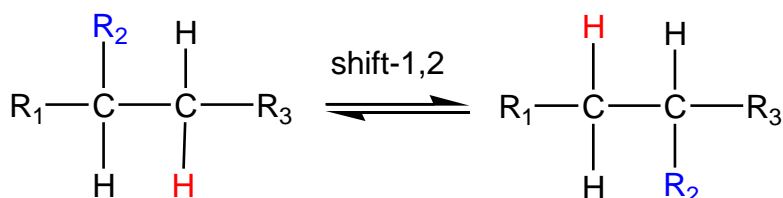
Attività catalitica

Le reazioni catalizzate da questi coenzimi comportano la rottura – **omolitica o eterolitica** – (e riformazione) del legame Co–C.

Reazioni catalizzate dal coenzima B₁₂

La cobalamina è un **cofattore essenziale** per numerosi enzimi di **metiltransferasi** e **mutasi** che si trovano in natura. La caratteristica principale delle adenosilcobalamine è che il legame cobalto-carbonio possiede una reattività molto speciale, cioè la formazione – controllata enzimaticamente – di radicali alchilici primari molto reattivi. La **rottura omolitica del legame Co–C** può avvenire nell'intervallo di potenziale fisiologicamente rilevante tra 0 e –0.4 V e produce intermedi radicalici potenzialmente EPR-attivi. I radicali alchilici primari ottenuti in seguito alla rottura omolitica del legame Co(III)–CH₂R sono tuttavia molto reattivi e non sempre individuabili tramite spettroscopia EPR. Le caratteristiche del segnale EPR del rimanente complesso di Co(II) (d⁷ basso spin) indicano che l'unico elettrone spaiato del cobalto occupa l'orbitale d₂₂ e interagisce essenzialmente con il benzimidazolo (o l'istidina, nei casi *base-off/His-on*), l'unico legante assiale rimasto. Il cobalto consentirebbe quindi la formazione di un **radicale alchilico molto reattivo** ma sarebbe egli stesso un **radicale stabile**, poco reattivo (un cosiddetto *persistent radical*) e quindi non andrebbe a interferire con la reattività del radicale organico.

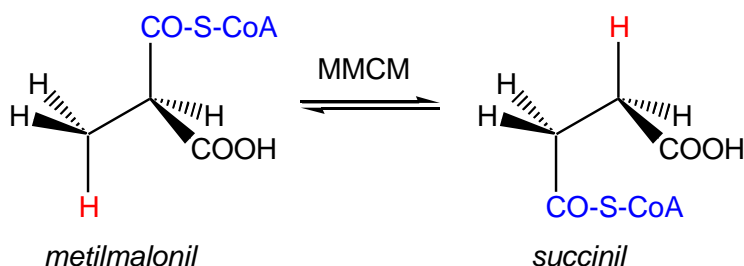
Ci sono circa una dozzina di enzimi che dipendono dalla presenza di cobalamine per il loro funzionamento. Tutti gli enzimi che dipendono dal coenzima B₁₂ (o Ado-Cbl), con l'eccezione della ribonucleotide riduttasi (noi abbiamo visto quella col cofattore al ferro), hanno una funzione comune, cioè catalizzano degli **shift 1,2 intramolecolari altamente stereospecifici su carboni saturi**, che coinvolgono un atomo di idrogeno e di solito un gruppo elettronegativo. Queste isomerizzazioni sono molto importanti nel metabolismo e normalmente molto difficili da ottenere in chimica organica:



Gli enzimi sono quindi delle **mutasi**. Alcune reazioni catalizzate in presenza del coenzima sono riportate in tabella e, come si vede, possono coinvolgere la rottura di legami C–C, C–N e C–O, oltre al C–H. Quando lo *shift* è poi seguito da una condensazione interna con eliminazione di acqua o ammoniaca per dare il prodotto finale, gli enzimi si definiscono **eliminasi** o **liasi**; ad esempio, l'1,2-propandiolo dà il propanale (propion-aldeide), mentre l'etanolamina dà l'acetaldeide.

Enzima	R ₁	R ₂	R ₃
Diolo deidratasi	CH ₃	OH	OH
Etanolamina deaminasi	H	NH ₂	OH
Glutammato mutasi	H	CH(NH ₂)COOH	COOH
Glicerolo deidratasi	CH ₂ OH	OH	OH

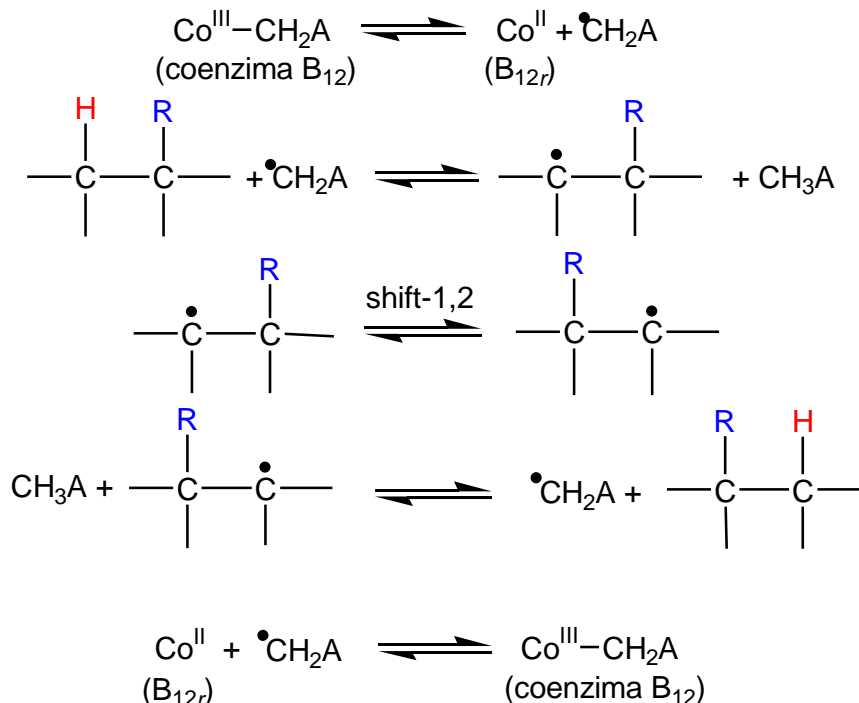
Molte delle reazioni catalizzate dal coenzima B₁₂ sono limitate ai micro-organismi che sono anche in grado di produrre il coenzima. Nei mammiferi è particolarmente importante la **metilmalonil-CoA mutasi** (MMCM) (coenzima-A = CoA–SH), che catalizza l'isomerizzazione reversibile di un residuo L-metilmalonilico in succinilico.



Questo enzima serve per produrre il succinil-CoA, necessario nel cosiddetto ciclo di Krebs anche detto degli acidi tricarbossilici. È infine coinvolto nella maturazione dei globuli rossi (da cui l'anemia in sua assenza). Evidenze spettroscopiche e meccanicistiche suggeriscono che queste reazioni avvengano tramite un **meccanismo radicalico** come quello rappresentato in figura. La **rottura omolitica** del legame Co–C(desossiadenosina) porta al complesso di Co(II) (B_{12R}) e al radicale desossiadenosilico, il quale estrae un atomo di idrogeno

La **rottura omolitica** del legame Co–C(desossiadenosina) porta al complesso di Co(II) (B_{12R}) e al radicale desossiadenosilico, il quale estrae un atomo di idrogeno

dal substrato per dare la 5'-desossiadenosina e il radicale del substrato. A questo punto avviene il riarrangiamento del substrato radicalico, seguito dall'estrazione dell'idrogeno dalla 5'-desossiadenosina per andare nella nuova posizione nel prodotto (se si conduce la reazione in D₂O non si ha incorporazione di deuterio nel prodotto, a conferma che è uno shift intramolecolare). Il radicale desossiadenosilico reagisce infine con B_{12R} per rigenerare il coenzima B₁₂.



Dal punto di vista strutturale questi enzimi si distinguono in **due classi**, a seconda della conformazione del coenzima. Nelle *mutasi* il coenzima AdoCbl si lega in una conformazione cosiddetta *base-off/His-on*, in cui la posizione assiale α è occupata dall'imidazolo di un residuo istidinico che rimpiazza il dimetilbenzimidazolo. Nelle *eliminasi* invece il cofattore è legato nella sua forma *base-on*.

La parte proteica negli enzimi dipendenti dai cofattori B₁₂ gioca almeno tre funzioni: 1) dopo la coordinazione del substrato deve indurre una drastica diminuzione dell'energia di legame Co-C (il modo è tuttora ignoto, potrebbe essere dovuto a variazioni conformazionali o a trasferimento elettronico) inducendo una enorme accelerazione del primo stadio della reazione: **la rottura del legame Co-C è 10¹² volte più veloce nell'enzima completo rispetto al coenzima B₁₂!** 2) protegge il radicale alchilico primario, altamente reattivo, da una moltitudine di altri reattivi non desiderati (catalisi negativa). 3) Garantisce una elevata stereoselettività nell'isomerizzazione.

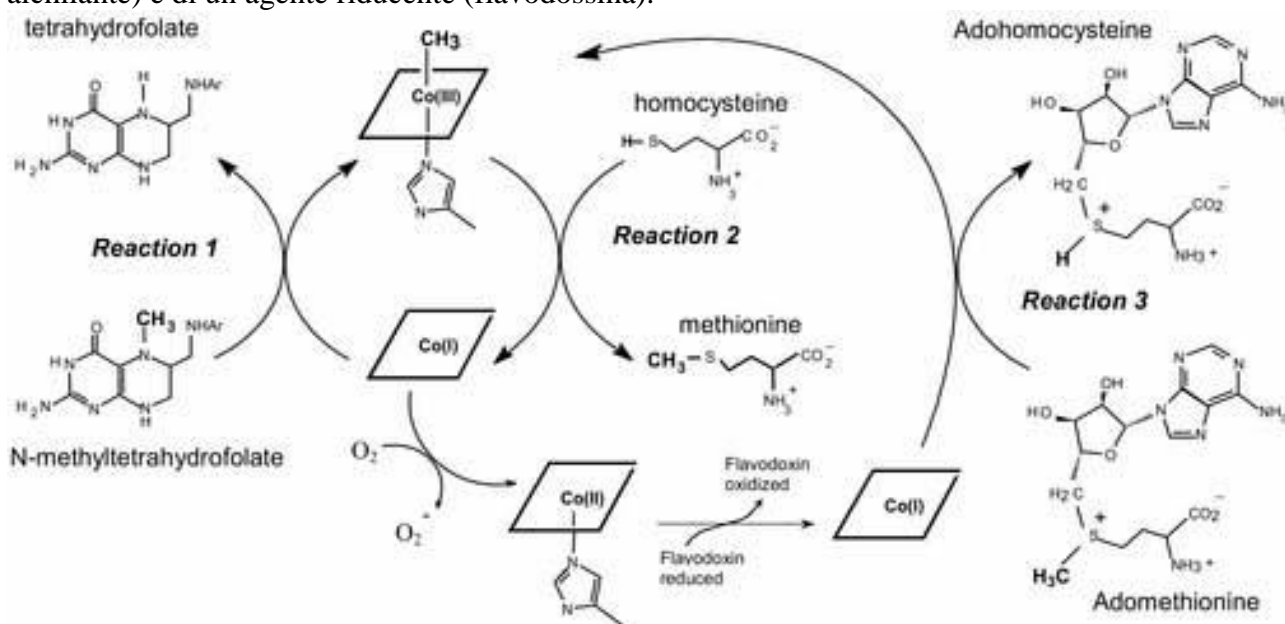
Dati strutturali indicano che il sito di coordinazione della cobalamina nelle *mutasi* (in cui il cofattore è legato nella forma *base-off*) è molto simile a quello nella MetH (vedi dopo). In tali enzimi la coordinazione del substrato all'enzima già contenente il cofattore B₁₂ contribuisce notevolmente a favorire l'omolisi del legame Co-C, inducendo grosse variazioni conformazionali nella proteina (che provocano un'ulteriore attivazione del legame Co-C in aggiunta a quella che risulta dalla coordinazione del cofattore stesso all'enzima). Al contrario, nelle *eliminasi*, in cui il cofattore è legato nella forma *base-on*, i dati strutturali indicano che la coordinazione del substrato induce solo piccole distorsioni nella cobalamina, e quindi il legame Co-C viene principalmente attivato (labilizzato) dal legame della cobalamina all'apoenzima, anche in assenza del substrato.

Reazioni di alchilazione della metilcobalamina

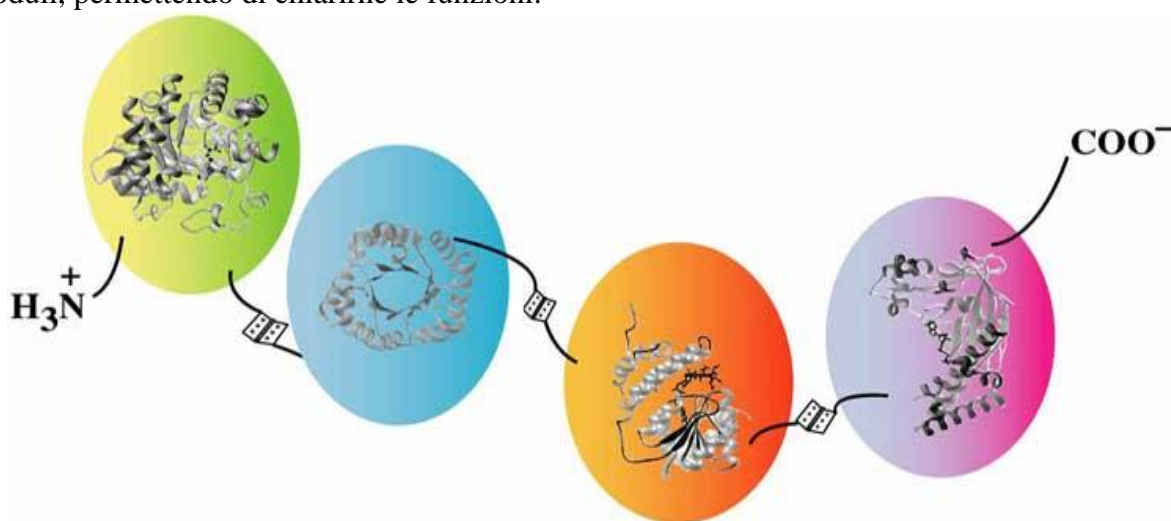
Un altro derivato estremamente importante della cobalamina è la **metilcobalamina**, che è uno dei tre cofattori con proprietà metilanti usato dall'enzima **metionina sintasi**, presente nei mammiferi e in molti batteri, che catalizza la trasformazione dell'omocisteina in metionina. Questo enzima è

essenziale per il **metabolismo degli amminoacidi nel fegato** e la sua mancanza a causa di difetti genetici è letale. Non soltanto la metionina è un amminoacido essenziale, ma anche l'accumulo della cisteina, che avviene se l'enzima non funziona, porta a seri problemi di salute.

La cobalamina riceve il gruppo metilico (formalmente come CH_3^+) dal *N*5-metiltetraidrofolato (THF- CH_3), il secondo cofattore metilante, trasformandosi in metilcobalamina. Il trasferimento del metile dalla metilcobalamina all'omocisteina (sempre come CH_3^+) richiede la **rottura eterolitica del legame Co-CH₃**. Si ipotizza che nel ciclo catalitico si possa formare come intermedio $\text{B}_{12\text{S}}$ contenente Co(I) tetracoordinato nell'anello corrinico (e fortissimo nucleofilo). Occasionalmente (in una *side-reaction*) la cobalamina di Co(I) può venire ossidata alla corrispondente cobalamina di Co(II) (si stima una volta ogni ca. 2000 cicli), che viene fatta rientrare nel ciclo catalitico tramite metilazione riduttiva da parte dell'agente alchilante *S*-adenosil-*L*-metionina (AdoMet, terzo agente alchilante) e di un agente riducente (flavodossina).

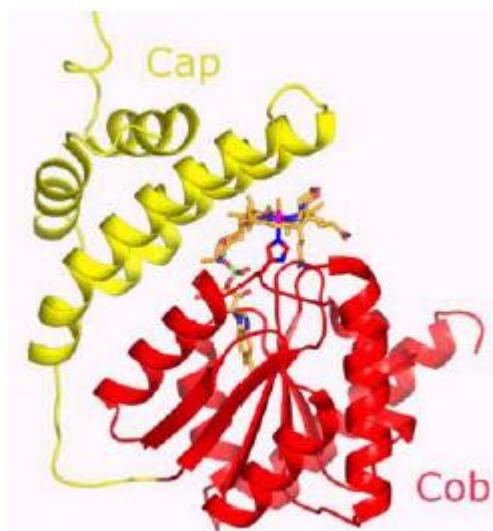


Gli enzimi **metionina-sintasi** (dai batteri ai mammiferi) sono formati da 4 moduli (figura). Sebbene non sia stata determinata la struttura ai raggi X dell'intero enzima, sono state determinate quelle dei moduli, permettendo di chiarirne le funzioni.



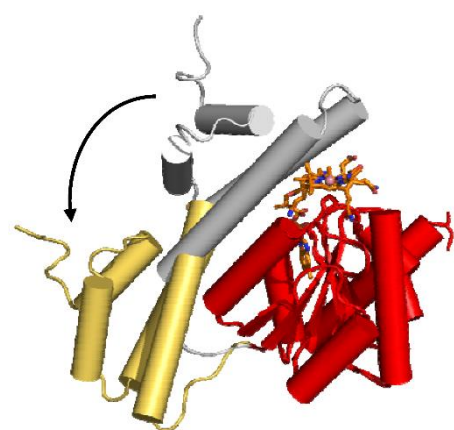
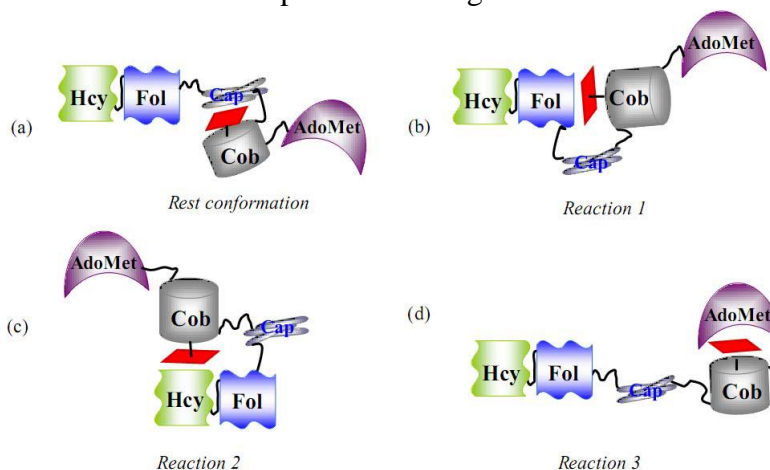
I due domini del frammento *N*-terminale (in verde e in blu in figura) servono per la coordinazione rispettivamente dell'omocisteina (il substrato da metilare) e del *N*5-metiltetraidrofolato. I due domini sono fortemente associati e resistono all'idrolisi anche in presenza del 3% di tripsina. L'omocisteina si coordina, probabilmente come tiolato, ad uno ione Zn^{2+} presente nel dominio (cofattore essenziale). Il terzo dominio, detto **Cap-Cob** (in arancio), è il sito di coordinazione della metilcobalamina. La

struttura ai raggi X di questo dominio, la prima ottenuta per proteine dipendenti dalla cobalamina, mostrò che la cobalamina è situata all'interfaccia fra i domini Cap e Cob e presenta un modo di coordinazione (all'epoca) del tutto inatteso, definito *base-off/His-on*, in cui cioè il dimetilbenzimidazolo assiale della metilcobalamina è sostituito da un'istidina della proteina (figura); la catena recante il benzimidazolo si infila nel dominio Cob.



Il quarto modulo contiene il sito di coordinazione della S-adenosil-L-metionina (AdoMet), ed è il dominio di riattivazione dell'enzima. Secondo lo schema catalitico descritto prima, si propone che l'enzima durante il funzionamento debba subire notevoli variazioni conformazionali per permettere che i domini che legano il substrato e gli altri cofattori si avvicinino a quello che reca la metilcobalamina. In base ai dati strutturali e a misure di spettroscopia UV-vis della cobalamina nei diversi stati di ossidazione e intorno coordinativi, si ipotizza che in soluzione l'enzima possa assumere 4 conformeri distinti

(figura), e i tre domini che legano il substrato e i cofattori possono interagire solo uno alla volta con quello che reca la metilcobalamina.



È stato anche osservato che quando il dominio Cap-Cob entra in contatto con i domini dei substrati (Hcy e Fol), il sub-dominio Cap si sposta di circa 25 Å e si apre di un angolo di ca. 60° per esporre la cobalamina al substrato (figura, dalla forma grigia a quella oro).

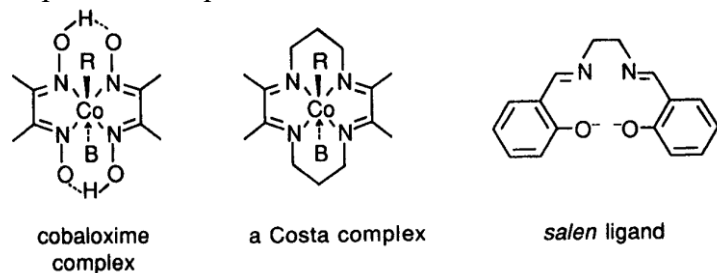
In generale, le bio-metilazioni indotte dalla metilcobalamina sono estremamente importanti. Ad esempio, nei batteri acetogenici e metanogenici la metilcobalamina è un cofattore nella serie di reazioni di fissazione non-fotosintetica della CO₂. La metilcobalamina è in grado di metilare anche altri centri metallici, come ad esempio il Hg²⁺ per dare il tossicissimo metilmercurio, (CH₃)Hg⁺ (questa reazione viene effettuata da batteri

anaerobici in presenza di sali di Hg(II).

Sistemi modello

La recente disponibilità sempre crescente di strutture ai raggi X di cobalamine ad elevata risoluzione sta rendendo via via meno significativi i sistemi modello, i quali tuttavia ebbero una enorme rilevanza nelle fasi iniziali dello studio della vitamina B₁₂. Fra i modelli proposti ricordiamo i complessi di Co(III) con bis(diacetilidossime) o *cobalossime*, proposti da Schrauzer, che contengono una struttura chelante “quasi macrociclica” come conseguenza dei due forti legami a idrogeno, i cosiddetti “Costa

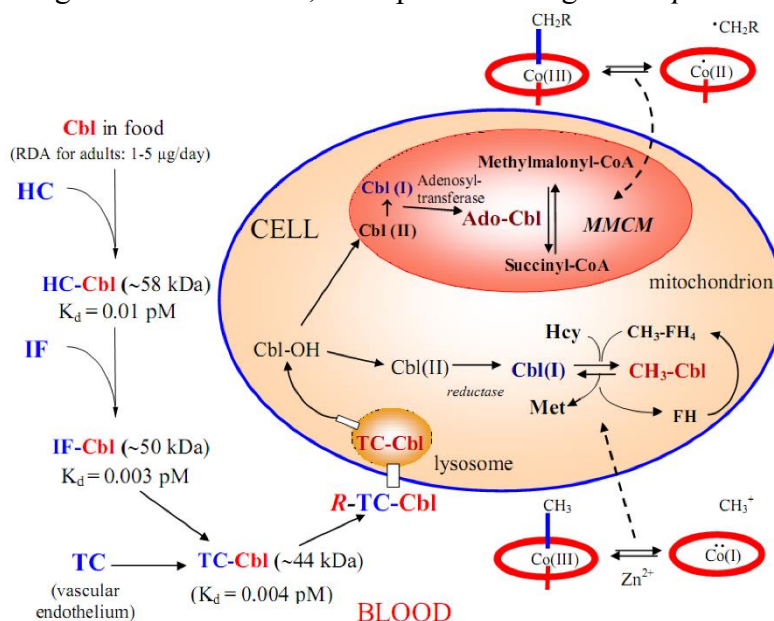
complexes” nei quali i due frammenti α -diiminici sono legati fra loro con un legame covalente, o



ancora i complessi con il salen, bis(salicil-aldeide)etilendiimina, come chelante. Venne sintetizzata una vasta serie di derivati organometallici di questi complessi e venne studiata, dal punto di vista strutturale e spettroscopico, l'influenza dell'altro legante assiale (B in figura) sul legame Co–C.

Uptake e trasporto della cobalamina

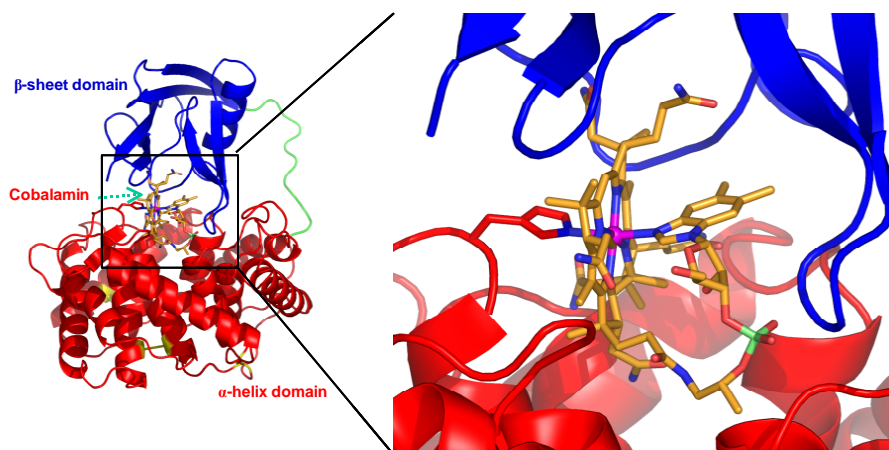
Come già ricordato, i mammiferi non sono in grado di sintetizzare la cobalamina, che quindi deve essere introdotta tramite la dieta. Di conseguenza i mammiferi hanno sviluppato un complesso sistema che regola l'assorbimento, il trasporto nel sangue e l'*uptake* cellulare della cobalamina.



Il trasporto dal cibo ai tessuti richiede l'impiego successivo di **3 proteine**, che formano complessi molto forti con la cobalamina, e la presenza di specifici recettori sulla superficie cellulare che riconoscono questi addotti cobalamina–proteina. Le 3 proteine coinvolte nel trasporto (ognuna trasporta una sola cobalamina, con costanti di dissociazione che vanno da 0.005 pM a 1 pM; il *binding* è così forte che il rilascio deve avvenire tramite degradazione della proteina di trasporto) sono la **aptocorrina** (HC), il **fattore gastrico intrinseco** (IF) e la **transcobalamina** (TC) (figura). In seguito all'*uptake* iniziale dal cibo, la cobalamina si lega alla HC nello stomaco. L'addotto HC–Cbl, particolarmente stabile al pH acido dello stomaco ($\text{pH} < 3$), protegge la cobalamina e impedisce che venga idrolizzata nell'ambiente acido. Esso viene poi idrolizzato nel duodeno da proteasi pancreatiche che degradano HC, e la cobalamina viene presa dal IF (l'assenza del Fattore Intrinseco, e quindi il diminuito o mancato assorbimento della Cbl, è la principale causa di una anemia insensibile alla somministrazione di B_{12}). IF governa il transito di Cbl attraverso l'intestino (dove il pH è meno acido che nello stomaco) e il suo rilascio alle cellule endoteliali che ricoprono la parete intestinale dell'ileo (la parte terminale dell'intestino tenue). Il complesso IF–Cbl viene riconosciuto da uno specifico recettore detto **cubilina** (CUB) che si trova sulla superficie delle cellule della mucosa intestinale e che media la sua internalizzazione. La degradazione lisosomiale del complesso IF–Cbl internalizzato rilascia la Cbl, che è quindi in grado di legarsi alla TC, probabilmente all'interno degli enterociti (le cellule più comuni nella mucosa dell'intestino tenue). Il complesso TC–Cbl viene quindi trasferito attraverso la membrana e rilasciato nel sangue, per essere quindi preso da tutte le cellule tramite un processo di **endocitosi** mediato dal recettore per TC–Cbl. Sulla superficie delle cellule solo la frazione di cobalamina legata alla TC (circa il 30%) viene incorporata via endocitosi tramite

un recettore specifico (i recettori non riconoscono la HC, che pure è presente nel sangue). L'addotto Cbl-TC viene **degradato nei lisosomi** rilasciando così la cobalamina per essere trasformata nelle sue forme attive come coenzimi, cioè coenzima B₁₂ (nei mitocondri) e metilcobalamina (nel citosol). Nel 2006 è stata determinata (a Trieste, Prof. S. Geremia) la struttura ai raggi X degli addotti della cobalamina con la TC umana e bovina (figura).

La transcobalamina è composta da due domini (α e β), di cui quello *N*-terminale (α) decisamente più grande dell'altro. La cobalamina è legata nella sua **forma base-on** ed è quasi completamente sepolta tra i due domini, con il piano dell'anello corrinico approssimativamente perpendicolare all'interfaccia dei domini. Si osserva inoltre un legame di coordinazione assiale sulla faccia β della cobalamina tra il Co e l'imidazolo di un'istidina del dominio α della TC (da notare che per ottenere i cristalli era

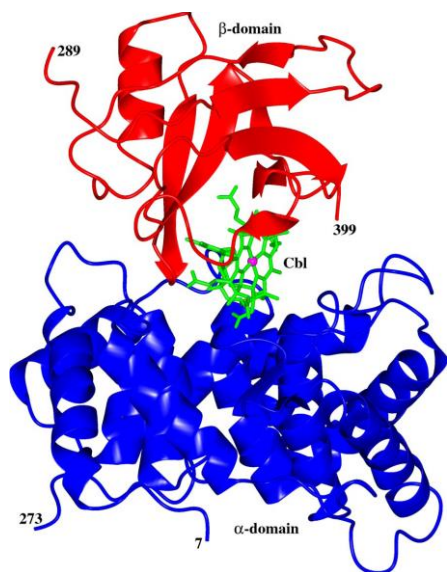


stata usata acqua-cobalamina). Quindi la transcobalamina coordina in un modo che si può definire *His-on*, ma sul lato opposto a quello dove coordina il benzimidazolo, e che è sostanzialmente diverso da quello con cui si lega la adenosil-cobalamina agli enzimi descritti prima, che è coordinata nel modo *base-off/His-on* sulla faccia

α . Il ruolo fisiologico di questo tipo di coordinazione della cobalamina alla TC non è noto.

Sulla base del confronto delle sequenze aminoacidiche di HC ed IF con quella di TC si presume che il modo di legame di queste proteine verso la cobalamina potrebbe essere simile a quello della TC.

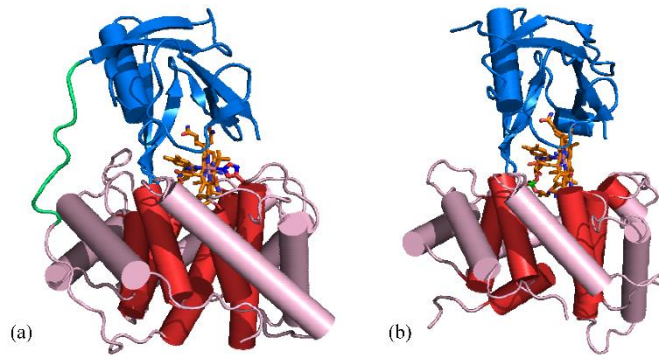
Nel 2007 è stata determinata la struttura della cobalamina legata al Fattore Intrinseco (**Cbl-IF**). IF è una proteina fortemente glicosilata (400 amminoacidi, circa 60 kDa) composta da due domini (α e β) e la cobalamina è legata all'interfaccia fra i domini nella **conformazione base-on** (il benzimidazolo è legato al lato α , figura). È in una posizione interna, in buona parte schermata dal solvente. L'intorno



della Cbl è composto da residui amminoacidi privi di carica e la sesta posizione di coordinazione sul Co^{2+} (sul lato β dell'anello corrinico) è vuota ed è esposta al solvente (si ritiene che il Co, pentacoordinato, sia Co(II) e che la riduzione di Co(III) a Co(II) possa essere stata indotta dai raggi X).

Il confronto fra le strutture dei complessi TC-Cbl e IF-Cbl (figura, a sinistra TC, a destra IF) mostra che essi sono molto simili. In particolare la coordinazione della cobalamina avviene all'interfaccia fra due domini α e β . Nei complessi TC-Cbl e IF-Cbl il cobalto è coordinato dal benzimidazolo sul lato α . Tuttavia, mentre nel complesso con IF la sesta posizione di coordinazione è vuota, nel complesso con TC è occupata dall'azoto ϵ di una istidina. In IF invece non ci sono residui amminoacidici in grado di coordinarsi al cobalto sul lato β . La diversa coordinazione e la maggior esposizione al solvente di Cbl nel complesso con IF rispetto a quello con TC potrebbe

significare che la cobalamina entra ed esce più facilmente da IF che da TC. In effetti si è visto che a pH neutro Cbl viene lentamente scambiata da IF a TC, ma non avviene il viceversa.



Nel 2010 è stata determinata anche la struttura del complesso fra IF-Cbl e la regione di *binding* (CUB₅₋₈) del suo recettore **cubilina** (CUB), una grossa proteina transmembrana che dipende dal Ca²⁺ (ricordiamo che l'uptake del complesso IF-Cbl avviene per endocitosi). La cubilina ha 27 domini di legame e il complesso IF-Cbl si lega ai domini da 5 a 8. CUB₅₋₈ interagisce con entrambi i domini α

e β di IF (figura) quando è nella conformazione chiusa che assume quando è legata a Cbl. IF da sola ha una struttura meno compatta del complesso IF-Cbl e non si lega a CUB. Nell'addotto con CUB, l'interazione fra IF e Cbl non viene influenzata. Ognuno dei quattro domini di CUB lega uno ione Ca²⁺ (sfere in rosso nella figura), che ne determina la struttura.

