

Röntgenstrukturanalyse der Methan-Monooxygenase: ein wichtiger Beitrag zum Verständnis der Oxidation von Methan in biologischen Systemen

Bernt Krebs* und Norbert Sträter

Metalloenzyme katalysieren eine Vielzahl von elementaren chemischen Umsetzungen in biologischen Systemen. Häufig besteht die Aufgabe dieser hochaktiven und effizienten Katalysatoren in der Aktivierung von kleinen und oftmals auch recht reaktionsträgen Substraten wie CO , CO_2 , H_2 , CH_4 , NO , N_2 , O_2 und H_2O . Die Bestimmung der Struktur dieser Proteine liefert neben dem fundamentalen Erkenntnisgewinn bezüglich des Aufbaus des aktiven Zentrums oft auch den Schlüssel zur Funktionsweise des Enzyms. Zudem können die Metallzentren in biologischen Systemen durch synthetische biomimetische Koordinationsverbindungen nachgeahmt werden und so als Ausgangspunkt für neue aktivere oder spezifischere technische Katalysatoren dienen. Während es sich sehr schwierig gestaltet, aus spektroskopischen Daten – mit Ausnahme der Daten der mehrdimensionalen NMR-Spektroskopie – genaue Strukturinformationen zu gewinnen, kann mit der Kristallstrukturanalyse die komplette Raumstruktur eines Biomoleküls bestimmt werden. Mit der röntgenographischen Strukturaufklärung der Hydroxylase-Komponente der Methan-Monooxygenase (MMO) aus *Methylococcus capsulatus* (Bath) ist nun die umfassende Charakterisierung eines interessanten aktiven Zentrums, das zwei Eisenatome enthält, in einem Enzym von biologisch und technisch großer Bedeutung gelungen^[1]. Die strukturelle Grundlage für den Mechanismus der schwierigen Umsetzung der unpolaren Moleküle CH_4 und O_2 unter physiologischen Bedingungen konnte aufgeklärt werden.

Das Element Eisen ist in nahezu allen lebenden Systemen allgegenwärtig und führt sehr unterschiedliche Funktionen aus, was außer auf seine gute Verfügbarkeit in der Biosphäre auf sein Redoxverhalten (meist $\text{Fe}^{\text{II}}/\text{Fe}^{\text{III}}$) und die vielfältige Koordinationschemie zurückzuführen ist. Einen besonderen Forschungsschwerpunkt der letzten Jahre bilden die zweikernigen Eisenproteine, die aufgrund ihrer weiten Verbreitung und der vielfältigen Funktionsweise Aufsehen erregt haben. So sind sie an der reversiblen Sauerstoffbindung (Hämerythrin), der DNA-Synthese (Ribonucleotid-Reduktase), der Phosphatesterhydrolyse (Violette Phosphatasen), dem Elektronentransport (Rubrerythrin) und der Hydroxylierung von Alkanen (Methan-Monooxygenase) beteiligt. Die Raumstrukturen des Hämerythrins^[2] und der Ribonucleotid-Reduktase^[3] konnten bereits aufgeklärt

werden (Abb. 1), und auch für das Rubrerythrin^[4] und die Violette Phosphatase aus Kidneybohnen^[5] gelang die Kristallisation als erster Schritt der Proteinstrukturanalyse, die für beide Enzyme zur Zeit durchgeführt wird.

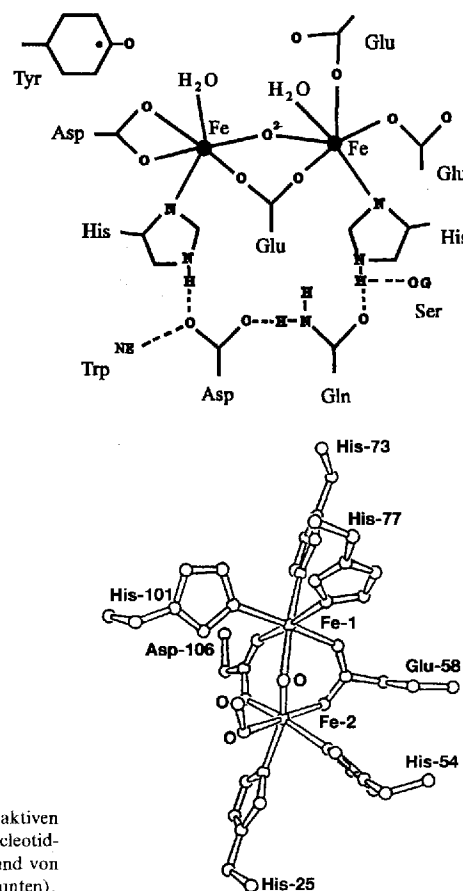


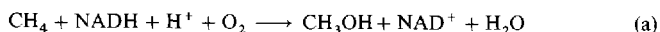
Abb. 1. Struktur des aktiven Zentrums der Ribonucleotid-Reduktase [3] (oben) und von Oxy-Hämerythrin [2] (unten).

Methanotrophe Bakterien können das reaktionsträge Methan als einzige Energie- und Kohlenstoffquelle nutzen. Sie spielen dabei eine wichtige ökologische Rolle im Kohlenstoffkreislauf in der Biosphäre, da sie die Freisetzung dieses Treibhausgases in die Atmosphäre einschränken. Methan-Monooxygenasen können aber außer Methan auch längere Kohlenwasserstoffe oxidieren. Die methanotrophen Bakterien haben dadurch techni-

[*] Prof. Dr. B. Krebs, Dipl.-Chem. N. Sträter
Anorganisch-chemisches Institut der Universität
Wilhelm-Klemm-Straße 8, D-48149 Münster
Telefax: Int. + 251/83-8366

sche Bedeutung bei der biologischen Wiederaufbereitung von ölverseuchtem Boden^[6] und bei der oxidativen Entfernung von Trichlorethylen aus Trinkwasser erlangt^[7].

Die MMO katalysiert mit der Umsetzung von Methan zu Methanol den ersten und wohl schwierigsten Schritt der Oxidation des Kohlenwasserstoffs zu Kohlendioxid unter physiologischen Bedingungen [Gl. (a)]. Die katalytische Aufgabe des Metallzentrums ist die Aktivierung des Sauerstoffmoleküls für die



Reaktion mit der ebenfalls recht reaktionsträgen C-H-Bindung von Methan. Die MMO besteht aus drei Proteinen: der Hydroxylase (Protein A, $M_r \approx 251$ kDa), die das eisenhaltige aktive Zentrum enthält, der Reduktase (Protein C, 38.6 kDa), die die Elektronen vom NADH auf die Hydroxylase überträgt, und einem regulatorischen Protein (B) mit einem Molekulargewicht von 15.5 kDa. Die Hydroxylase besteht wiederum aus drei Peptidketten der Stöchiometrie $\alpha_2\beta_2\gamma_2$.

Die Struktur des Hydroxylase-Komplexes wurde mit einer kristallographischen Auflösung von 2.2 Å bestimmt, so daß Details auf atomarer Ebene diskutiert werden konnten. Zwei $\alpha\beta\gamma$ -Protomere sind über eine nichtkristallographische zweizählige Drehachse verknüpft und bilden ein relativ kompaktes herzförmiges Molekül der Dimension $60 \times 100 \times 200$ Å. An der Grenzfläche zwischen den $\alpha\beta\gamma$ -Protomeren befindet sich ein großer Freiraum, der allerdings keinen direkten Zugang zum aktiven Zentrum bietet. Die Sekundärstrukturen der drei Untereinheiten werden stark von α -Helices dominiert. Die Struktur der α - und β -Untereinheit ist dabei der Ribonucleotid-Reduktase hinsichtlich der Anordnung der Sekundärstrukturelemente sehr ähnlich. Durch Ausrichtung und Vergleich der Aminosäuresequenzen der MMO aus *M. capsulatus* mit der der Ribonucleotid-Reduktase konnte bereits vorher ein Modell für das aktive Zentrum vorgeschlagen werden, das durch die Strukturaufklärung bestätigt wurde^[9]. Das aktive Zentrum mit den zwei Eisenzentren ist vollständig in der α -Untereinheit integriert (Abb. 2), so daß vier Eisenatome pro $\alpha_2\beta_2\gamma_2$ -Dimer vorhanden sind. Dieses Ergebnis widerlegt atomabsorptionsspektroskopische

Untersuchungen, wonach der Gehalt an Eisen zu 2.3 Mol pro Dimer bestimmt wurde^[8].

Der $\text{Fe}^{\text{III}}\text{-Fe}^{\text{III}}$ -Abstand wurde auf 3.4 Å verfeinert und ist somit in guter Übereinstimmung mit der Auswertung der EXAFS-Daten, die einen Abstand von 3.42 Å ergaben^[8]. Die Metall-Metall-Abstände in der Ribonucleotid-Reduktase und im Hämerythrin betragen im Vergleich dazu 3.3 Å bzw. 3.32 Å. Beide Eisenatome sind annähernd oktaedrisch umgeben und werden von zwei exogenen Liganden verbrückt, die von den Autoren als Hydroxid-Ion und als zweizähliges Acetat angepaßt wurden (Abb. 3). Da Ammoniumacetat auch im Kristalli-

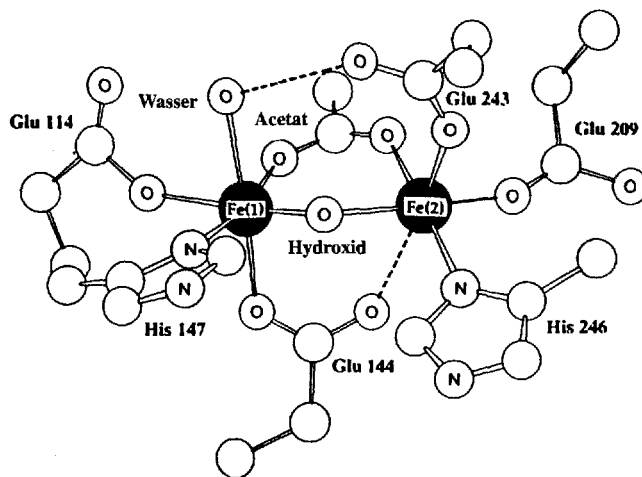


Abb. 3. Struktur des aktiven Zentrums der Methan-Monooxygenase [1].

sationspuffer zugegen war, kann nicht davon ausgegangen werden, daß dieser Ligand auch am Enzym in der Zelle koordiniert ist. Möglicherweise bindet an dieser Stelle dann das Methoxid-Ion als oxidiertes Substrat, bevor es protoniert wird und das aktive Zentrum verläßt. Am Fe(1)-Atom ist ein terminaler Aqualigand gebunden. Hier könnte auch die Bindungsstelle für das Sauerstoffmolekül lokalisiert sein. Das so gewonnene Bild vom aktiven Dieisenzentrum der Hydroxylase steht in Einklang mit den EXAFS-, ENDOR-, UV/VIS-, EPR- und Mößbauer-Untersuchungen, die am Enzym in Lösung durchgeführt wurden.

Interessant ist, daß im Vergleich zur strukturell ähnlichen Ribonucleotid-Reduktase das dort für den Reaktionsmechanismus wichtige Tyrosinyl-Radikal in der MMO durch eine Cystein-Einheit ersetzt ist. Für die Cystein-SH-Gruppe wird eine redoxaktive Rolle bei der Katalyse vorgeschlagen, für die die Autoren weitere Ergebnisse in einer folgenden Veröffentlichung ankündigen. Außer dieser Cystein-Einheit ist nur eine Threonin-Gruppe als weitere protonierte Seitenkette in der Nähe des aktiven Zentrums vorhanden. Dieser Gruppe könnte daher die Aufgabe des Protonenlieferanten bei der Reaktion zukommen. In der Nähe des aktiven Zentrums befindet sich ein Hohlraum, der von überwiegend hydrophoben Seitenketten gebildet wird. Möglicherweise werden die Alkane hier zur Umsetzung mit dem am Fe(2)-Atom aktivierten Sauerstoffmolekül vororientiert. Da es keinen direkten Zugang von der Oberfläche des Proteins zum aktiven Zentrum gibt, muß die Anbindung des Substrats durch eine Konformationsänderung des Enzyms ermöglicht werden,

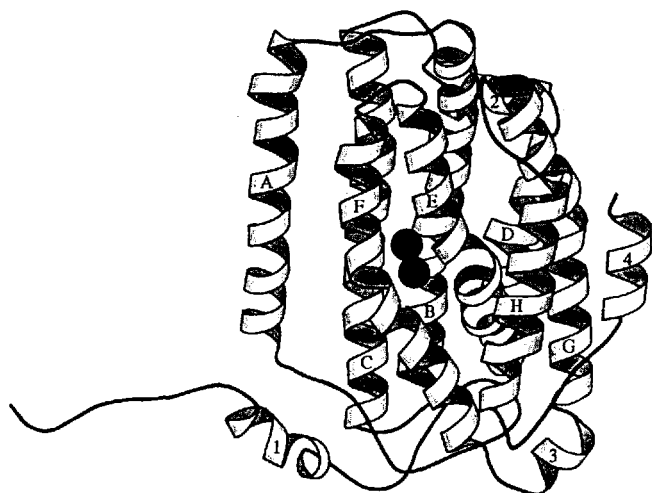


Abb. 2. Sekundärstruktur der α -Untereinheit der Hydroxylase-Komponente der Methan-Monooxygenase [1].

die wahrscheinlich durch die Wechselwirkung mit dem regulatorischen Protein B induziert wird. Die Gegenwart dieses Proteins bewirkt auch große Änderungen der spektroskopischen Eigenschaften der Hydroxylase und der Umsetzungsgeschwindigkeit sowie der Regioselektivität der Substratoxidation. Dieser Einfluß des Proteins B auf das aktive Zentrum wird wahrscheinlich über die zum großen Freiraum an der $\alpha\beta\gamma$ -Dimerengrenzfläche exponierten Helices E und F (Abb. 2) vermittelt, so daß die Anbindung der B-Komponente in diesem Freiraum postuliert werden kann.

Die vorliegende Strukturaufklärung ist ein entscheidender Schritt auf dem Weg zum Verständnis des molekularen Mechanismus der Oxidation von Methan zu Methanol in biologischen Systemen. Die Struktur schafft die Grundlage zur weitergehenden Interpretierung vorhandener spektroskopischer Messungen und gibt wichtige Impulse für weitere Untersuchungen. Interessant ist auch die Strukturverwandtschaft der MMO zur Ribonucleotid-Reduktase, die uns ein neues instruktives Beispiel dafür liefert, wie die Natur vorhandene Strukturprinzipien – hier sowohl der Tertiärstruktur als auch des aktiven Zentrums – zur Katalyse vollkommen unterschiedlicher Reaktionen einsetzen kann.

Sicherlich werden in Zukunft noch weitere Strukturuntersuchungen folgen: beispielsweise sollte die Kristallisation in einem anderen Puffer durchgeführt oder Proben, die das aktive Zentrum in einem reduzierten Zustand zeigen, analysiert werden, so daß detailliertere Vorschläge für den Reaktionsmechanismus gemacht werden können. Möglicherweise gelingt es auch, einen größeren Komplex der Proteine A, B und C zu kristallisieren, um vor allem den großen Einfluß des regulatorischen Proteins auf die Struktur des aktiven Zentrums zu untersuchen.

- [1] A. C. Rosenzweig, C. A. Frederick, S. J. Lippard, P. Nordlund, *Nature* **1993**, 366, 537–543.
- [2] M. A. Holmes, I. L. Trong, S. Turley, L. C. Sieker, R. E. Stenkamp, *J. Mol. Biol.* **1991**, 218, 583–593.
- [3] P. Nordlund, H. Eklund, *J. Mol. Biol.* **1993**, 232, 123–164.
- [4] L. C. Sieker, S. Turley, B. C. Prickril, J. LeGall, *Proteins: Struct. Funct. Genet.* **1988**, 3, 184–186.
- [5] N. Sträter, R. Fröhlich, A. Schiemann, B. Krebs, M. Körner, H. Suerbaum, H. Witzel, *J. Mol. Biol.* **1992**, 224, 511–513.
- [6] P. H. Pritchard, C. F. Costa, *Environ. Sci. Technol.* **1991**, 25, 372–379.
- [7] J. Green, H. Dalton, *J. Biol. Chem.* **1989**, 264, 17 698–17 703.
- [8] J. G. DeWitt, J. G. Bentsen, A. C. Rosenzweig, B. Hedman, J. Green, S. Pilkington, G. C. Papaefthymiou, H. Dalton, K. O. Hodgson, S. J. Lippard, *J. Am. Chem. Soc.* **1991**, 113, 9219–9235.
- [9] P. Nordlund, H. Dalton, H. Eklund, *FEBS Lett.* **1992**, 307, 257–262.

Fullerkäfige ohne Kohlenstoff – Fullerane, Fullerene oder Zufall-erene?

Reinhard Nesper*

Ist das Strukturprinzip der Fullerene, wie man es bei den neuen Modifikationen des Kohlenstoffs in den letzten Jahren gefunden hat, von wesentlich weitreichender Bedeutung in der Chemie als bisher angenommen? Kann die besondere Geometrie der Fullerkäfige auch bei ganz anderen Elementen als Kohlenstoff Vorlage für energetisch günstige oder wenigstens kinetisch stabile Formen sein? Solche Fragen stellen sich nicht nur im Zusammenhang mit Verbindungen von Kohlenstoff-Fullerenen mit Metallen oder metallorganischen Spezies, sondern auch im Hinblick auf das, was bisher über Dotierung, d. h. den Ersatz von Kohlenstoff in Fullerenen durch Heteroatome, bekannt geworden ist. Eine neue Arbeit von Corbett und Sevov mit dem Titel „Carbon-Free Fullerenes“ hat nun Stoff für Überlegungen in eine ganz andere Richtung geliefert^[1].

Die beiden Autoren beschreiben die ternären Indide $\text{Na}_{172}\text{In}_{197}\text{Ni}_2$ und $\text{Na}_{96}\text{In}_{97}\text{Z}_2$ mit $\text{Z} = \text{Ni}, \text{Pd}, \text{Pt}$, in denen $\text{Na}_{12}\text{In}_{48}$ -, In_{70} - und In_{74} -Käfige, jeweils mit fullerenartigem Aufbau, charakteristische Strukturelemente sind. Allerdings liegen die Fullerkäfige nicht als isolierte Cluster vor, sondern sie sind über In-In-Bindungen zu zweidimensional quasi-dichtest

gepackten Schichten verknüpft. Die Zwischenschichten werden von Na- und Z-Atomen gefüllt.

Die Fullerkäfige sind bei diesen Indiden nicht leer. Sie enthalten weitere interessante Polyeder, die nach dem Dualitätsprinzip ihre Ecken jeweils unter den Flächen der größeren äußeren Polyeder haben. Man kann die eingeschlossenen Polyeder als endohedrale Einheiten bezeichnen und erhält damit zunächst die Formulierungen $\text{Na}_{32}@\text{[Na}_{12}\text{In}_{48}]$, $\text{Na}_{37}@\text{In}_{70}$ bzw. $\text{Na}_{39}@\text{In}_{74}$. Auch die inneren Polyeder sind noch ziemlich groß und mit je einem weiteren kleineren Polyeder gefüllt. Damit wird zugleich eines der wichtigsten Aufbauprinzipien intermetallischer Phasen eingehalten, eine allseits quasi-dichteste Packung. Unter Berücksichtigung des Zentralatoms Z für die größeren Käfige kann man den Gesamtaufbau der mehrschaligen Polyeder als $\text{In}_{10}@\text{Na}_{32}@\text{[Na}_{12}\text{In}_{48}]$, $\text{Ni}@\text{In}_{10}@\text{Na}_{37}@\text{In}_{70}$ bzw. $\text{Z}@\text{In}_{10}@\text{Na}_{39}@\text{In}_{74}$ (Abb. 1 c) beschreiben. Die Diskrepanzen zu den genannten Summenformeln sind auf zusätzliche interstitielle Metallatome zurückzuführen.

Ersetzt man die großen Käfige in $\text{Na}_{96}\text{In}_{97}\text{Z}_2$ durch Kugeln, so erhält man eine Anordnung, die recht gut der Nickelarsenit-Struktur entspricht. Von Schnering et al. haben vor kurzem den Ausdruck hierarchische Strukturen für Anordnungen geprägt, in denen große Einheiten mit vielen Atomen kleinere, topologisch ähnliche Einheiten – in diesem Fall große Fullerkugeln einfache Atome – ersetzen^[2]. Damit wird auf den Umstand

[*] Prof. Dr. R. Nesper
Laboratorium für Anorganische Chemie
Eidgenössische Technische Hochschule, ETH Zentrum
CH-8092 Zürich (Schweiz)
Telefax: Int. +1/262-0718