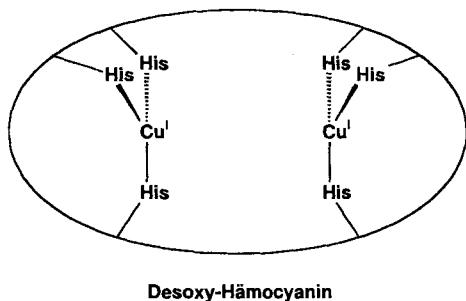


Das zweikernige Cu_A-Zentrum in Cytochrom-c-Oxidase und N₂O-Reduktase – eine Metall-Metall-Bindung in Proteinen?

Helmut Bertagnolli* und Wolfgang Kaim*

Benachbarte und funktional kooperierende Metallzentren in Proteinen sind überwiegend durch O-, N- oder S-Donorliganden verbrückt^[1]. In Ausnahmefällen, wie etwa dem für side-on-bindendes O₂ aufnahmefähigen Desoxy-Hämocyanin, einem Sauerstofftransportprotein von Mollusken und Arthropoden, können die Metallzentren (hier Cu^I) vom Proteingerüst ohne zusätzliche Verbrückung auf einen „nichtbindenden Abstand“ $d > 3.5 \text{ \AA}$ gehalten werden^[2]. Eine direkte Metall-Metall-Bindung wurde Ende vergangenen Jahres erstmals für das zweikernige Cu_A-Zentrum in einer wasserlöslichen Proteindomäne der Cytochrom-c-Oxidase von *Bacillus subtilis* postuliert^[3]; der Vorschlag basiert auf den Ergebnissen neuer EXAFS-Messungen (EXAFS = extended X-ray absorption fine structure) und deren vergleichender Interpretation im Hinblick auf eine Modellverbindung.



Desoxy-Hämocyanin

Obwohl Cytochrom-c-Oxidase (COX) als terminales Enzym der O₂-Atmung eines der wichtigsten Enzyme überhaupt ist^[4], bestanden über den Metallgehalt bis in jüngste Zeit unzureichende Vorstellungen, wie ein Blick in neueste Auflagen von Lehrbüchern der Biochemie zeigt^[5]. Darin wird noch immer von der Gegenwart zweier Häm-Eisen-Zentren (Häm *a* und Häm *a*₃) und nur zweier Kupfer-Ionen (Cu_A und Cu_B) ausgegangen. Das Häm *a*/₃Cu_B-Assoziat wird als das durch Cyanid-Ionen blockierbare katalytische Zentrum für die O₂-Bindung und -Reduktion angenommen, während die isolierten Zentren

Häm *a* und Cu_A Elektronentransferfunktionen bei relativ hohem Potential haben. Das durch langwellige Lichtabsorption bei ca. 830 nm, kleine ESR-Hyperfeinaufspaltung und ungewöhnlich niedrige *g*-Faktor-Komponenten charakterisierte Cu_A-Zentrum wurde lange als einkerniges Ion mit zweifacher Cysteinat-Koordination aufgefaßt^[1b, 5a, 6]. Im Jahre 1987 beschrieben Steffens, Bielwald und Buse erstmals aufgrund sorgfältiger elementaranalytischer Untersuchungen des aus 13 sehr unterschiedlichen Untereinheiten bestehenden Membranproteins (*M*, 204 kDa), daß es sich hier um ein zwei Häm-Gruppen, aber insgesamt *drei* Kupfer-Ionen enthaltendes Enzym handelt^[7].

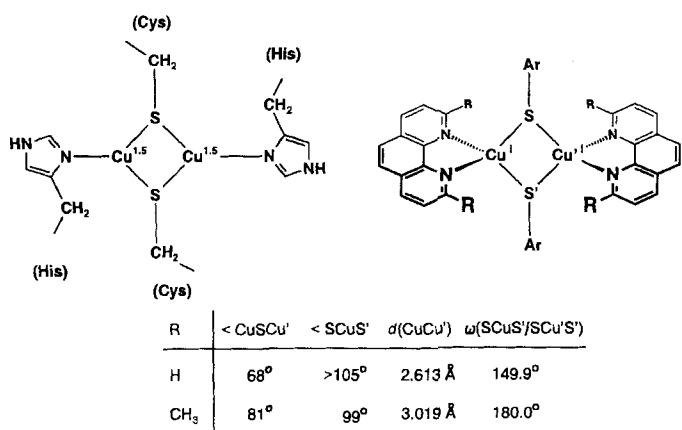
Inzwischen war in der von Zumft et al. charakterisierten N₂O-Reduktase aus dem denitrifizierenden Bakterium *Pseudomonas stutzeri* ein Kupferzentrum erkannt worden, welches in seiner Charakteristik nicht der klassischen Einteilung biologischer Kupferzentren (Typ 1, 2 oder 3)^[1] entsprach, jedoch sehr dem Cu_A-Zentrum der Cytochrom-c-Oxidase glich^[8]. Detaillierte ESR-Untersuchungen der oxidierten Form durch Krooneck et al.^[9a] ergaben, daß ein zweikerniges, gemischtvalentes Cu^I/Cu^{II}-System vorliegen könnte, bei dem *ein* ungepaartes Elektron mit *zwei äquivalenten Kupferzentren* wechselwirkt. In einem solchen, elektronisch stark gekoppelten Zweikernsystem wären die Oxidationsstufen beider Metallzentren als +1.5 zu formulieren. Vergleichende ESR-Untersuchungen an N₂O-Reduktase und Cytochrom-c-Oxidase bei verschiedenen Mikrowellenfrequenzen^[9b] sowie unter Berücksichtigung der drei unterschiedlichen Isotopenkombinationen ⁶³Cu/⁶³Cu, ⁶³C/⁶⁵C und ⁶⁵Cu/⁶⁵Cu^[10] führten zu einer solch guten Übereinstimmung, daß an der zweikernigen Struktur des Cu_A-Zentrums und an der Delokalisation des Spins kein Zweifel mehr besteht. Neben den zahlreichen gemischtvalenten Fe^{II}/Fe^{III}-Clustern in Proteinen^[1, 11a] und den durch charakteristische ESR-Spektren ausgezeichneten Mn^{III}/Mn^{IV}-Dimeren in der Wasser-Oxidase und einigen anderen Enzymen^[11b] handelt es sich bei dem oxidierten Cu_A-Zentrum offenbar um ein weiteres Beispiel einer biologisch essentiellen, gemischtvalenten Mehrkernanordnung.

Für die detaillierte Koordination der beiden Kupfer-Ionen von Cu_A wurden im vorigen Jahr aufgrund eindeutig konserverter Aminosäurereste (2 Cys, 2 His, 1 Met) zwei konkrete Vorschläge veröffentlicht. Lappalainen und Saraste schlugen eine Anordnung vor, bei der die beiden Metall-Ionen durch zwei Cysteinat-S-Zentren verbrückt sind (Schema 1, links)^[12]. Niedermolekulare Modelle für diesen Vorschlag existieren in Form von neutralen Cu^I/Cu^I-Zweikernkomplexen (Schema 1,

[*] Prof. Dr. H. Bertagnolli

Institut für Physikalische Chemie der Universität
D-70550 Stuttgart
Telefax: Int. +711/685-4443

Prof. Dr. W. Kaim
Institut für Anorganische Chemie der Universität
D-70550 Stuttgart
Telefax: Int. +711/685-4241



Schema 1. Ar = 2-Tolyl, R = H, CH₃. Für die Winkel und Abstände in den Modellkomplexen sind Durchschnittswerte angegeben.

rechts)^[13], welche je nach Substitution in 2,9-Stellung der 1,10-Phenanthroline-Liganden eine stark unterschiedliche Geometrie des zentralen Cu₂SCu'S'-Vierring aufweisen. Beide strukturell charakterisierten Cu₂¹⁺-Modellkomplexe (3) sind jedoch nur irreversibel oxidierbar^[13b].

Ein alternativer Strukturvorschlag (Schema 2, links) für das Cu_A-Zentrum wurde anhand von EXAFS-Daten für die COX von *Bacillus subtilis* und einen trikationischen, schwefelfreien Cu^I/Cu^{II}-Komplex (Schema 2, rechts) von Blackburn et al. veröffentlicht^[31]. Ein dem Cu-Cu-Vektor zugeschriebenen Abstand von ca. 2.5 Å wurde als Hinweis auf eine erste direkte Metall-Metall-Bindung in einem biologischen System interpretiert; die beiden Histidin- und Cysteinat-Gruppen wurden als nicht-verbrückende Liganden angenommen, zusätzlich wurde die schwache Koordination eines Methioninrestes und einer nicht identifizierten Gruppe X postuliert^[3].

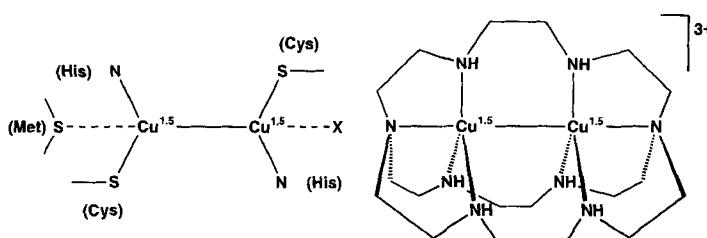
Bei einer solch weitgehenden Schlußfolgerung stellt sich die Frage, ob die EXAFS-Messungen^[3] wirklich einen eindeutigen Hinweis auf eine Kupfer-Kupfer-Bindung in der COX enthalten. Die Antwort muß lauten, und die Autoren geben dies im Text an mehreren Stellen zu: Nein! Zwar haben diese EXAFS-Messungen den großen Vorteil, daß ein kristallographisch charakterisierter Komplex (Schema 2, rechts) mit einer linearen N-Cu-Cu-N-Anordnung und einem Cu-Cu-Abstand von 2.415 Å als Modellsystem benutzt werden konnte, bedauerlicherweise wurden aber zwei verschiedene EXAFS-Meßtechniken angewendet. Der Modellkomplex lag als Feststoff vor, und es wurde seine Transmission gemessen; die COX lag dagegen als eine 20proz. Glycerinlösung vor, und es wurde die Fluoreszenzstrahlung einer gefrorenen Lösung registriert. Dies bedeutet, daß es

unterlassen wurde, in beiden Systemen eine möglichst gleiche Konzentration an Kupfer-Atomen als Absorber einzustellen. Schwerwiegender aber ist die Anwendung von zwei unterschiedlichen Meßprinzipien. Die Art des Untergrunds ist für Messungen in Transmission und Fluoreszenz unterschiedlich und seine Bestimmung keineswegs trivial. Außerdem sind Messungen in Fluoreszenz häufig noch auf Selbstabsorption zu korrigieren. Als Folge davon sind beide Messungen nur eingeschränkt vergleichbar.

Die Interpretation von EXAFS-Spektren erfolgt durch Simulation. Derartige Simulationen benötigen entweder gute Modellsubstanzen oder theoretische Rückstreuamplituden und -phasen. Die Autoren verwenden die theoretischen Werte des Programms EXCURV 88 und glauben, bei der Simulation des EXAFS-Spektrums des Modellkomplexes und der COX die Mehrfachstreuung vernachlässigen zu können, obwohl diese Effekte bei linearer Anordnung von Atomen – und diese liegt im Modellkomplex vor – beträchtlich sein können. Mit neun Parametern wurde das EXAFS-Spektrum des Modellsystems simuliert. Beim COX-System liegt die Zahl noch höher, da die Koordinationszahl von mindestens zwei Schalen zusätzlich variiert wird und eine fünfte Koordinationsschale angepaßt wurde. Angesichts dieser Zahl von Parametern stellt sich die Frage, wie bei fast allen Simulationen von EXAFS-Spektren, ob sich eine ähnlich gute Anpassung nicht auch mit einem anderen Parametersatz erreichen läßt. Die Autoren sind sich dieser Problematik durchaus bewußt und simulieren die EXAFS-Spektren des Modellsystems und der COX mit einem Parametersatz, bei dem anstelle einer Cu-Cu-Bindung eine Cu-S-Bindung angenommen wird. Der Fit-Index, ein Maß für die Güte der Anpassung, verschlechtert sich hierbei nur um 3 %.

Reicht das aus, um eine Cu-Cu-Bindung zu postulieren? Nein! Und so sehen dies letztlich auch die Autoren, denn sie schreiben: „Die Anpassung konvergiert auch auf den annähernd gleichen Wert des Fit-Index.“ Aber sie schreiben weiter: „Chemische Überlegungen jedoch sprechen nachdrücklich gegen die Cu-S-Interpretation. Der Debye-Waller-Faktor ist nahezu null.“ Aber nur ein zu kleiner Wert für einen Debye-Waller-Faktor ist noch lange kein eindeutiger Hinweis auf die Existenz einer Metall-Metall-Bindung.

Unabhängig von der Bewertung der EXAFS-Messungen bliebe, auch wenn der Kupfer-Kupfer-Abstand tatsächlich ca. 2.5 Å betrüge, die Frage, ob wirklich eine „echte chemische Bindung“^[3] zwischen den Metallen vorliegt. Auffallend geringe Kupfer-Kupfer-Abstände werden sowohl in verbrückten Cu^{II}/Cu^{II}-Komplexen (2.65 Å in dimerem Kupfer(II)-acetat mit starker antiparalleler Spin-Spin-Kopplung) als auch in mehrkernigen Cu^I-Verbindungen beobachtet, ohne daß selbst bei $d(\text{Cu-Cu}) = 2.35$ Å eine Metall-Metall-Bindung zwingend angenommen werden mußte^[14]. Im gemischtvalenten Modellkomplex von Schema 2, einem bezüglich der Elektronenstruktur nur bedingt geeigneten Modell^[31], ist der kristallographisch bestimmte Cu-Cu-Abstand mit ca. 2.4 Å von gleicher Größenordnung^[3], und auch hier ist die Geometrie vom Liganden erzwungen. Da der Cu-Cu-Abstand in dem doppelt thiolatverbrückten Cu₂¹⁺-Komplex von Schema 1 (R = H) auch nur 2.61 Å beträgt^[13a], ist weder die Existenz einer „biologischen Metall-Metall-Bindung“ aus den verfügbaren Daten zwingend ableitbar, noch ist die tatsächliche Struktur des zweikernigen Cu_A-



Schema 2.

Zentrums im Sinne einer Nichtverbrückung geklärt. Als Hypothesen bieten die Strukturen in Schema 2 und 3 jedoch ein ideales Feld für die Modellierung der Zusammensetzung, Spektroskopie und Funktion der Cu_A-Zentren in Proteinen.

Stichworte: Cytochrome-c-Oxidase · EXAFS-Spektroskopie · Metalloproteine · N₂O-Reduktase

- [1] a) W. Kaim, B. Schwederski, *Bioanorganische Chemie*, Teubner, Stuttgart 1992 (engl. *Bioinorganic Chemistry*, Wiley, Chichester, 1994); b) J. A. Cowan, *Inorganic Biochemistry*, VCH, New York, 1993.
- [2] K. A. Magnus, H. Ton-That, J. E. Carpenter, *Chem. Rev.* 1994, 94, 727.
- [3] N. J. Blackburn, M. E. Barr, W. H. Woodruff, J. van der Oost, S. de Vries, *Biochemistry* 1994, 33, 10401.
- [4] a) B. Kadenbach, *Angew. Chem.* 1983, 95, 273; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* 1983, 22, 275; b) G. Buse, *Naturwiss. Rundsch.* 1986, 39, 518.
- [5] a) D. Voet, J. G. Voet, *Biochemie*, VCH, Weinheim, 1992, S. 544; b) A. L. Lehninger, D. L. Nelson, M. M. Cox, *Prinzipien der Biochemie*, 2. Aufl., Spektrum, Heidelberg, 1994, S. 639; c) L. Stryer, *Biochemie*, Spektrum, Heidelberg, 1990, S. 422.
- [6] T. H. Stevens, C. T. Martin, H. Wang, G. W. Brudvig, C. P. Scholes, S. I. Chan, *J. Biol. Chem.* 1982, 257, 12106.
- [7] G. C. M. Steffens, R. Bielwald, G. Buse, *Eur. J. Biochem.* 1987, 164, 295.
- [8] H. Jin, H. Thomann, C. L. Coyle, W. G. Zumft, *J. Am. Chem. Soc.* 1989, 111, 4262.
- [9] a) P. M. H. Kroneck, W. E. Antholine, D. H. W. Kastrau, G. Buse, G. C. M. Steffens, W. G. Zumft, *FEBS Lett.* 1990, 268, 274; b) W. E. Antholine, D. H. W. Kastrau, G. C. M. Steffens, G. Buse, W. G. Zumft, P. M. H. Kroneck, *Eur. J. Biochem.* 1992, 209, 875.
- [10] W. Kaim, M. Moschersch, *J. Chem. Soc. Faraday Trans.* 1991, 87, 3185.
- [11] a) S. J. Lippard, *Angew. Chem.* 1988, 100, 353; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* 1988, 27, 344; b) K. Wieghardt, *ibid.* 1989, 101, 1179 bzw. 1989, 28, 1153.
- [12] P. Lappalainen, M. Saraste, *Biochim. Biophys. Acta* 1994, 1187, 222.
- [13] a) R. K. Chadha, R. Kumar, D. G. Tuck, *Can. J. Chem.* 1987, 65, 1336; b) A. Stange, W. Kaim, *Z. Naturforsch. B* 1995, 50, 115.
- [14] Übersicht zur Problematik von d¹⁰···d¹⁰-Wechselwirkungen in Mehrkernkomplexen der Münzmetalle: J. Strähle in *Unkonventionelle Wechselwirkungen in der Chemie metallischer Elemente* (Hrsg.: B. Krebs), VCH, Weinheim, 1992, S. 357.

Saragossasäure-Totalsynthesen

Ulrich Koert*

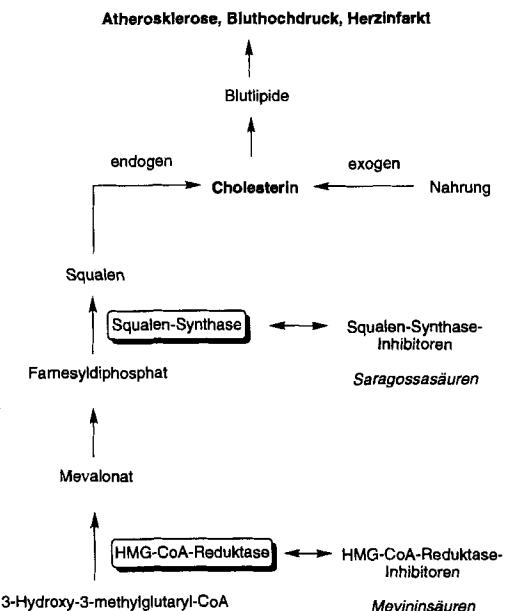
Wem ist heute nicht bekannt, welche negativen gesundheitlichen Auswirkungen ein zu hoher Cholesterinspiegel im Blut hat? Atherosklerose, Bluthochdruck und Herzinfarkt können die Folge dieser Stoffwechselstörung sein (Schema 1)^[11]. Der Cholesterinspiegel wird zum einen exogen über die Nahrung beeinflusst, zum anderen baut der Körper endogen Cholesterin auf. Der Biosyntheseweg von Cholesterin beginnt mit einer Verzweigung des Citronensäurecyclus. Ausgehend von 3-Hydroxy-3-methylglutaryl(HMG)-CoA entsteht über Mevalonat Farnesyldiphosphat. Die Kupplung von zwei Molekülen Farnesyldiphosphat liefert Squalen, das dann in Cholesterin umgewandelt wird.

Gelänge es, diese endogene Produktion von Cholesterin zu verringern, hätte das einen bedeutenden therapeutischen Nutzen. Vor gut 15 Jahren wurde mit der Entdeckung der Mevininsäuren erstmals ein Enzyminhibitor für ein an der Cholesterinbiosynthese beteiligtes Enzym, die HMG-CoA-Reduktase, gefunden. Heute sind Lovastatin, Simvastatin und Pravastatin fester Bestandteil des Arzneimittelschatzes.

Jetzt ist eine kürzlich entdeckte Gruppe von Naturstoffen in den Mittelpunkt des Interesses gerückt, die ein anderes Enzym, die Squalen-Synthase, inhibieren: die Saragossasäuren. 1992 berichteten unabhängig voneinander eine Gruppe von Merck, Sharp and Dohme^[21] und eine von Glaxo^[31] über die Entdeckung einer neuen Gruppe von Naturstoffen mit Squalen-Synthase-inhibierenden Eigenschaften. Die Merck-Gruppe gab den neuen Verbindungen in Anlehnung an die spanische Stadt Saragossa, wo sie erstmals in Pilzkulturen gefunden worden waren,

[*] Dr. U. Koert

Fachbereich Chemie der Universität
Hans-Meerwein-Straße, D-35032 Marburg
Telefax: Int. + 6421/288917



Schema 1. Cholesterin im menschlichen Körper: endogener Aufbau, exogene Zufuhr und pathologische Konsequenzen.

den Namen Saragossasäuren. Die Glaxo-Wissenschaftler nannen die neuen Verbindungen nach ihrer Squalen-Synthase-inhibierenden Wirkung Squalenstatine.

Repräsentative Verbindungen dieser neuen Gruppe von Naturstoffen sind Saragossasäure C 1 und Saragossasäure A 2 (= Squalenstatin S1). Allen Saragossasäuren gemeinsam ist ein 2,8-Dioxabicyclo[3.2.1]octan-Gerüst (Abb. 1a), das aufgrund von drei Carboxygruppen in den Positionen 3, 4 und 5 sowie