

Die Kristallstrukturen der Cytochrom-c-Oxidasen aus *Paracoccus denitrificans* und Rinderherz – zum molekularen Mechanismus der Zellatmung

Bernhard Kadenbach*

Schon vor 34 Jahren, zwei Jahre nach der ersten hochauflösenden Kristallstrukturanalyse eines Proteins (Myoglobin) durch Kendrew, wurden von Yonetani Kristalle der Cytochrome-c-Oxidase (COX) aus Rinderherz erhalten^[1], doch alle bisherigen Versuche, die räumliche Struktur dieses Enzyms auf atomarer Ebene zu bestimmen, scheiterten an der schlechten Qualität der Kristalle^[2]. Jetzt wurden nahezu gleichzeitig die Kristallstrukturen der oxidierten COX aus *Paracoccus denitrificans* von Michel und Mitarbeiter^[3] und der aus Rinderherz von Yoshikawa und Mitarbeitern^[4] mit hoher Auflösung (2.8 Å) bestimmt, wobei grundsätzlich unterschiedliche Ansätze zum Erfolg führten. Michel und Mitarbeitern gelang die Kristallisation der COX aus *Paracoccus* erst nach Bildung eines Addukts mit dem variablen Fragment eines monoklonalen Antikörpers, während Yoshikawa und Mitarbeiter geeignete Kristalle der COX aus Rinderherz nur dann erhielten, wenn sie 0.2% Decylmaltosid als Detergens beim Kristallisieren zusetzen.

Die COX, das terminale Enzym der Atmungskette in Bakterien und den Mitochondrien aller Eukaryonten, ist für das Leben auf der Erde von fundamentaler Bedeutung, da sie als einziges Enzym Sauerstoff ohne Bildung von reaktiven Intermediaten reduzieren und die dabei freiwerdende Energie konservern kann. Sie wird seit ihrer Beschreibung 1924 durch Warburg als „Atmungsferment“ und 1925 durch Keilin als Cytochrome aa₃ intensiv erforscht, doch wurden erst vor wenigen Jahren alle an der Katalyse der Reduktion von O₂ zu Wasser beteiligten Metallatome identifiziert. Die beiden membrangebundenen Oxidasen aus *Paracoccus* und Rinderherz sind in ihren katalytischen Eigenschaften nahezu identisch. Beide übertragen Elektronen von Cytochrome c auf molekularen Sauerstoff unter gleichzeitiger Bildung eines Protonengradienten über die Membran, doch unterscheiden sie sich grundsätzlich in der Zahl der Proteinuntereinheiten. COX aus *Paracoccus* enthält vier, das Enzym aus Rinderherz und anderen Säugetieren dagegen 13 unterschiedliche Untereinheiten^[5], von denen die drei größten, die denen des Bakterienenzymes homolog sind, von mitochondrialer DNA und die übrigen von Kern-DNA codiert werden.

Die beiden Kristallstrukturen werden unterschiedlich dargestellt: Michel und Mitarbeiter beschreiben die katalytischen Zentren sowie die Strukturen der vier Untereinheiten des Bakterienenzymes sehr detailliert. Yoshikawa und Mitarbeiter gehen ausschließlich auf die Metallzentren ein; die wesentlich kompliziertere Beschreibung der 13 Polypeptidketten bleibt einer späteren Publikation vorbehalten. Die Strukturen beider Enzyme bestätigen viele der bisher biochemisch nachgewiesenen Strukturmerkmale. So konnten alle vier bzw. 13 Untereinheiten der Enzymkomplexe in äquimolaren Mengen nachgewiesen werden. Die beiden Kristallstrukturen sind in Einklang mit dem aus zahllosen Versuchen postulierten Weg der Elektronen von Cytochrome c über Cu_A in der Untereinheit II, Häm a, Häm-a₃-Cu_B (Untereinheit I) auf O₂. Bezuglich der Gesamtstruktur wurde das aus elektronenmikroskopischen Beugungsmustern von membrangebundener COX abgeleitete „schiefe Y“^[6] nicht verifiziert. Interessanterweise kristallisierte das Rinderherzenzym als Dimer, wie bereits elektronenmikroskopisch an „zweidimensionalen Kristallen“ (membrane sheets) festgestellt wurde^[6]. Die Bakterien-COX, die wegen der fehlenden „kerncodierten“ Untereinheiten lipophiler ist, kristallisierte dagegen als Monomer nur nach Komplexierung mit dem variablen Fragment eines monoklonalen Antikörpers. Diese Cokristallisation könnte allgemein für die Kristallisation von hydrophoben Proteinen von Nutzen sein.

Bis vor wenigen Jahren wurde angenommen, daß sich außer den beiden Häm-a-Gruppen im katalytischen Zentrum der COX nur zwei Kupfer-Ionen (Cu_A und Cu_B) befinden. Der Nachweis, daß Cu_A aus zwei Kupferatomen besteht, führte zu der Spekulation, daß damit eine Cu-Cu-Bindung erstmals in einem Biomolekül festgestellt worden sei^[7]. Durch die Kristallstrukturen beider Enzyme wird diese Vermutung widerlegt: Die beiden Kupfer-Ionen werden durch zwei Cystein-S-Atome in einer Ebene liegend komplexiert. Diese Struktur entspricht dem [2Fe-2S]-Zentrum von Eisen-Schwefel-Proteinen, bei denen allerdings anorganischer Schwefel vorliegt. Als weitere Liganden der tetraedrisch umgebenen Kupfer-Ionen, deren Ladungszustand mit je 1.5 angegeben werden kann, wurden Histidin und Methionin bzw. Histidin und die Peptidcarbonyl-Gruppe einer Glutaminsäure, alle in der Untereinheit II, nachgewiesen. Bis auf die Peptidcarbonylgruppe waren alle Liganden bereits durch ortsspezifische Mutagenese an der Bakterien-COX identifiziert worden^[8]. Die abgeschätzten Abstände zwischen den Kupferatomen werden in guter Übereinstimmung mit 2.6 (*Paracoccus*) und 2.7 Å (Rinderherz) angegeben.

[*] Prof. Dr. B. Kadenbach
Fachbereich Chemie der Universität
Hans-Meerwein-Straße, D-35032 Marburg
Telefax: Int. + 6421/282191
E-mail: Kadenbac@ps1515.chemie.uni-marburg.de

Drei weitere Metallatome des katalytischen Zentrums der COX, zwei Eisenatome (Häm a und Häm a_3) und Cu_B, befinden sich in der periplasmatischen (*Paracoccus*) oder in der cytoplasmatischen Hälfte (Rinderherz) der Membrandomäne der Untereinheit I, die aus zwölf transmembranen Helices (TM) bestehend das Zentrum des Enzyms bildet und in beiden Enzymen fast identisch ist. Die zwölf transmembranen Helices waren auch aus Hydropathie-Plots der Aminosäuresequenzen im Prinzip abgeleitet worden, doch liegen Anfang und Ende der transmembranen Bereiche häufig anders. Die Ebenen von Häm a und Häm a_3 stehen senkrecht zur Membranebene und sind zueinander in einem Winkel von 108 (*Paracoccus*) oder von 104° (Rinderherz) angeordnet. Der fünfte und sechste Ligand von Häm- a -Fe sind Imidazolreste, die sich an der TM-II und TM-X befinden. An TM-X befindet sich auch der fünfte Ligand von Häm- a_3 -Fe, ebenfalls ein Imidazolrest eines evolutionär konservierten Histidins. Diese Liganden waren auch zuvor durch ortsspezifische Mutagenese identifiziert worden^[9]. Ein sechster Ligand von Häm- a_3 -Fe wurde nicht gefunden. Es könnte sich dabei um ein delokalisiertes (röntgenographisch nicht sichtbares) Wassermolekül handeln.

An das zweikernige Zentrum Häm- a_3 -Fe-Cu_B bindet molekularer Sauerstoff, der mit vier Elektronen von Cytochrom c und vier Protonen aus dem Cytoplasma (*Paracoccus*) oder aus dem Matrixraum (Rinderherz) zu Wasser reduziert wird. In der COX aus *Paracoccus* wurde ein Häm- a_3 -Fe-Cu_B-Abstand von 5.2 Å und in der COX aus Rinderherz einer von 4.5 Å ermittelt. Der Unterschied könnte in der Gegenwart von Azid, einem Liganden des zweikernigen Zentrums, bei der Kristallisation des *Paracoccus*-Enzyms liegen. Powers et al.^[10] haben durch EXAFS-Messungen (EXAFS = Extended x-ray absorption fine structure) an oxidierten Enzymen aus Rinderherz und *Paracoccus* einen Abstand von nur 3.75 Å gemessen und festgestellt, daß ein Schwefelatom (Methionin oder Cystein) als Brückenligand fungiert. Dieser mehrfach postulierte Brückenligand wurde in keiner der beiden nun vorliegenden Strukturen nachgewiesen.

Cu_B wird von einem Histidinrest der TM-VI und zwei Histidinresten aus dem Loop-Bereich zwischen TM-VII und -VIII komplexiert. Auch diese konservierten Histidinreste wurden zuvor durch ortsspezifische Mutagenese an Bakterien-COX als Liganden von Cu_B identifiziert^[9]. Während beim Rinderherzenzym alle drei Histidin-Liganden des Cu_B röntgenographisch sichtbar waren, fehlte beim *Paracoccus*-Enzym die Elektronendichte für die Seitenkette von His325. Dies weist auf mehrere Konformationen des Imidazolrestes hin, woraus Michel und Mitarbeiter einen Mechanismus für die Protonentranslokation in der COX entwickelten (siehe unten).

Die Anordnung der zwölf transmembranen Helices der Untereinheit I innerhalb der Membran war überraschend. Jeweils vier Helices bilden einen Halbkreis, der mit einer Helix eines anderen Halbkreises eine Pore bildet. So entstehen drei rotationssymmetrisch angeordnete Poren A (aus TM III–VI mit TM II), B (aus TM VII–X mit TM VI) und C (aus TM XI, XII, I, II, mit TM X) (Abb. 1). Pore A enthält vorwiegend konservierte aromatische Reste, Pore B das binucleare Zentrum Häm- a_3 -Fe-Cu_B und Pore C Häm a , dessen hydrophober Hydroxyethylfarnesyrest innerhalb dieser hydrophoben Pore liegt und sie gegen das Cytoplasma verschließt. Für die Reduktion eines O₂-Moleküls nimmt die COX vier Protonen von der cytoplas-

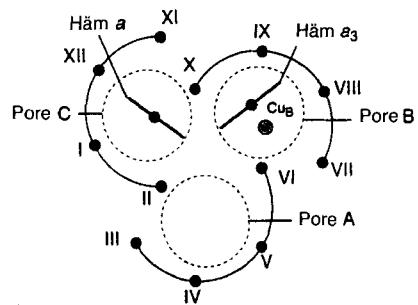


Abb. 1. Schematische Darstellung der transmembranen Helices I–XII der COX-Untereinheit I aus *Paracoccus*. Jeweils vier Helices bilden einen Halbkreis, der mit einer Helix eines anderen Halbkreises eine rotationssymmetrische Membranpore (A, B, C) bildet (mit Genehmigung aus Lit. [3]).

matischen (*Paracoccus*) oder von der Matrix-Seite (Rinderherz) auf, und für die damit gekoppelte Protonentranslokation werden vier weitere Protonen aus dem Cytoplasma in den periplasmatischen (bzw. cytosolischen) Raum transportiert.

Michel und Mitarbeiter postulieren nun für die „chemischen“ und die translozierten Protonen getrennte Kanäle. Die „chemischen“ Protonen können über die Pore B direkt zur O₂-Bindungsstelle (Häm- a_3 -Fe-Cu_B) gelangen. Tatsächlich befinden sich in diesem Kanal hydrophile Gruppen (Ser291, Lys354, Thr351, die Hydroxygruppe von Häm a_3 und Tyr280). Dies ist überraschend, da normalerweise in transmembranen Helices nur hydrophobe Aminosäuren vorkommen. Die gepumpten Protonen könnten dagegen über die cytoplasmatische Hälfte der Pore A und die periplasmatische Hälfte der Pore B transportiert werden. Im cytoplasmatischen Teil der Pore A befinden sich ebenfalls hydrophile Aminosäuren (Asp124, Thr203, Asn199, Asn113 und Asn131). Wird eine dieser Aminosäuren durch ortsspezifische Mutagenese durch eine hydrophobe Aminosäure ersetzt, führt dies in jedem Fall zur Hemmung der Protonentranslokation, nicht aber zu einer Beeinträchtigung des Elektronentransports (H₂O-Bildung)^[11]. Daraus wurde bereits zuvor auf getrennte Kanäle für die „chemischen“ und die translozierten Protonen geschlossen.

Für den Pumpvorgang des Protonentransports in der COX entwickelten Michel und Mitarbeiter einen „histidine-cycle/shuttle“-Mechanismus, in Anlehnung an den „histidine-cycle“-Mechanismus von Wikström et al.^[12]. Hierbei wechselt His325 zwischen dem Imidazol-, Imidazol- und Imidazolium-Zustand und bewegt sich zwischen zwei Positionen. Die Protonentranslokation beruht dabei im wesentlichen auf der Protonierung des Imidazolrestes von His325 in der Position als Ligand von Cu_B und seiner Deprotonierung in der zweiten Position als Ligand der Formylseitenkette von Häm a_3 . Dieser sehr plausible Mechanismus ist allerdings keineswegs bewiesen. Yoshikawa und Mitarbeiter haben in ihrer Kristallstruktur für alle drei Liganden von Cu_B (His240, His290 und His291) die erwartete Elektronendichte des Imidazolrestes erhalten und damit keinen Hinweis auf mehrere Konformationen erhalten.

Michel und Mitarbeiter beschreiben auch die Untereinheit III, die sieben transmembrane Helices enthält und wesentlich zur Masse des membrangebundenen Enzyms beiträgt. Sie bindet an die Untereinheit I auf der der Untereinheit II gegenüberliegenden Seite, doch ist ihre Funktion unbekannt. In der Untereinheit III der *Paracoccus*-COX wurde darüber hinaus ein

Phosphatidylcholinmolekül mit unbekannter Funktion nachgewiesen. Das für die katalytische Aktivität essentielle Lipid Cardiolipin wurde weder in der COX aus *Paracoccus* noch in der aus Rinderherz gefunden.

In der Arbeit von Yoshikawa und Mitarbeiter wird die Position eines Magnesium-Ions angegeben, das als stöchiometrischer Bestandteil der COX bereits bekannt war. Es wird in einem verzerrten Tetraeder von zwei Liganden der Untereinheit I (Asp369, His368), einem Liganden der Untereinheit II (Glu198) und einem Wassermolekül komplexiert. Die konservierten Aminosäurereste Asp und His waren zuvor durch ortsspezifische Mutagenese von Bakterien-COX als Liganden von Mangan, das durch Magnesium ersetzt werden kann, nachgewiesen worden^[13]. Die Autoren postulieren außer einer Bedeutung für die Struktur auch eine vom Redoxzustand abhängige regulatorische Funktion des Magnesiumatoms bei der Elektronenübertragung von Cu_A auf Fe_a und von Fe_a auf Fe_{a3}.

In der COX aus Rinderherz wurde die Position eines Zink-Ions ermittelt, das sich in der nichttransmembranen Untereinheit Vb auf der Matrix-Seite befindet und von vier Schwefelatomen (Cys60, Cys62, Cys82 und Cys85) koordiniert ist. Die Funktion des Zink-Ions, das wie die Untereinheit Vb in der COX aus Bakterien fehlt, ist bisher nicht geklärt.

Die beiden vorgelegten Kristallstrukturen sind Meilensteine auf dem Weg zur Erforschung von Struktur und Funktion der COX. Überraschend viele bisher erhaltene Befunde konnten bestätigt, andere widerlegt werden. Eine Reihe offener Fragen, z.B. zum Mechanismus des Elektronentransports und der Protonentranslokation, werden nur durch parallele Untersuchun-

gen zur Funktion geklärt werden können. Dies gilt besonders für Fragen zur Regulation der Aktivität, die bei der tierischen COX durch die große Zahl von zusätzlichen Untereinheiten besonders komplex zu sein scheint.

Stichworte: Cytochrom-c-Oxidasen · Kristallstrukturanalyse · Protonentransfer · Zellatmung

- [1] T. Yonetani, *J. Biol. Chem.* **1961**, *236*, 1680.
- [2] T. Ozawa, H. Suzuki, M. Tanaka, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1980**, *77*, 928; T. Ozawa, M. Tanaka, T. Wakabayashi, *ibid.* **1982**, *79*, 7175; S. Yoshikawa, S. Tera, Y. Takahashi, T. Tsukihara, W. S. Caughey, *ibid.* **1988**, *85*, 1354.
- [3] S. Iwata, C. Ostermeier, B. Ludwig, H. Michel, *Nature* **1995**, *376*, 660.
- [4] T. Tsukihara, H. Aoyama, E. Yamashita, T. Tomizaki, H. Yamaguchi, K. Shinzawa-Itoh, R. Nakashima, R. Yaono, S. Yoshikawa, *Science* **1995**, *269*, 1069.
- [5] B. Kadenbach, *Angew. Chem.* **1983**, *95*, 273; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1983**, *22*, 275; B. Kadenbach, *Trends Biochem. Sci.* **1983**, *8*, 398; B. Kadenbach, J. Jarausch, R. Hartmann, P. Merle, *Anal. Biochem.* **1983**, *129*, 517; B. Kadenbach, L. Kuhn-Nentwig, U. Büge, *Curr. Top. Bioenerg.* **1987**, *15*, 113.
- [6] J. F. Deatherage, R. Henderson, R. A. Capaldi, *J. Mol. Biol.* **1982**, *158*, 501.
- [7] H. Bertagnoli, W. Kaim, *Angew. Chem.* **1995**, *107*, 847; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1995**, *34*, 770.
- [8] M. Kelly, P. Lappalainen, G. Talbo, T. Haltia, J. van der Oost, M. Saraste, *J. Biol. Chem.* **1993**, *268*, 16781.
- [9] J. P. Hosler, S. Ferguson-Miller, M. W. Calhoun, J. F. Thomas, J. Hill, L. Lemieux, J. Ma, C. Georgiou, J. Fetter, J. Shapleigh, M. M. J. Tecklenburg, G. T. Babcock, R. B. Gennis, *J. Bioenerg. Biomembr.* **1993**, *25*, 121; B. L. Trumper, R. B. Gennis, *Annu. Rev. Biochem.* **1994**, *63*, 675.
- [10] L. Powers, B. Chance, Y. Ching, P. Angiolillo, *Biophys. J.* **1981**, *34*, 465.
- [11] J. W. Thomas, A. Puustinen, J. O. Alben, R. B. Gennis, M. Wikström, *Biochemistry* **1993**, *32*, 10923.
- [12] J. E. Morgan, M. I. Verkhovsky, M. Wikström, *J. Bioenerg. Biomembr.* **1994**, *26*, 599; M. Wikström, A. Bogachev, M. Finel, J. E. Morgan, A. Puustinen, M. Raatio, M. Verkhovskaya, *Biochim. Biophys. Acta* **1995**, *1187*, 106.
- [13] J. P. Hosler, M. P. Espe, Y. Zhen, G. T. Babcock, S. Ferguson-Miller, *Biochemistry* **1995**, *34*, 7586; M. P. Espe, J. P. Hosler, S. Ferguson-Miller, G. T. Babcock, J. McCracken, *ibid.* **1995**, *34*, 7593.

Neues zur Struktur des amorphen roten Phosphors

Hans Hartl*

Zu den immer noch nicht vollständig gelösten Rätseln der Strukturchemie des elementaren Phosphors gehört die Struktur des amorphen roten Phosphors, eines Materials, das man seit mehr als 150 Jahren auf nahezu jeder Streichholzschatztruhe findet. Da eine Röntgenstrukturaufklärung nicht durchgeführt werden kann, ist man auf Indizien angewiesen, mit deren Hilfe aber zunehmend konkretere Aussagen über den strukturellen Aufbau dieser Phosphormodifikation möglich sind. Zwei wichtige Bausteine dazu liefern die kürzlich publizierten Ergebnisse von Böcker und Häser^[1] sowie Pfitzner und Freudenthaler^[2]. Zusammen mit früheren Arbeiten^[3–5] kann jetzt ein Strukturbild des amorphen roten Phosphors entworfen werden, das der Realität schon ziemlich nahe kommen dürfte. Die Dreibindigkeit des Phosphors mit nur geringfügig variierten P-P-Bindungslängen von ca. 220 pm und einem großen Bereich von

P-P-P-Bindungswinkel, der von 60° bis 120° reicht, lässt vielfältige Vernetzungsarten zu. Zwischen den drei Grundtypen – weißer, roter und schwarzer Phosphor – sind dadurch eine Reihe weiterer, allotroper Formen des Phosphors vorstellbar, die von niedermolekularen Phosphor-Clustern über höhermolekulare Oligomere bis zu ein-, zwei- und dreidimensionalen Polymeren reichen. Wie wandelbar und vielfältig die Verknüpfungsmuster in phosphorreichen Verbindungen mit P-P-Bindungen sein können, haben Baudler und Glinka^[4] sowie von Schnering und Höngle^[5] in ihren brillanten Übersichtsartikeln über mono- und polycyclische Phosphane bzw. über phosphorreiche Phosphide herausgestellt. In beiden Arbeiten wird auf die strukturellen Beziehungen dieser Verbindungen zu unsubstituierten, ungeladenen P_n-Clustern hingewiesen.

Von Baudler und Glinka wurden Regeln für den systematischen Aufbau von größeren Phosphor-Clustern durch Aggregation und/oder Kondensation von niedermolekularen Bruchstücken aufgestellt. Eine dieser Regeln (nicht gleichzusetzen mit Reaktionsmechanismen!) besagt, daß durch eine formale

* Prof. Dr. H. Hartl

Institut für Anorganische und Analytische Chemie der Freien Universität
Fabeckstraße 34/36, D-14195 Berlin
Telefax: Int. +30/8 38 24 24