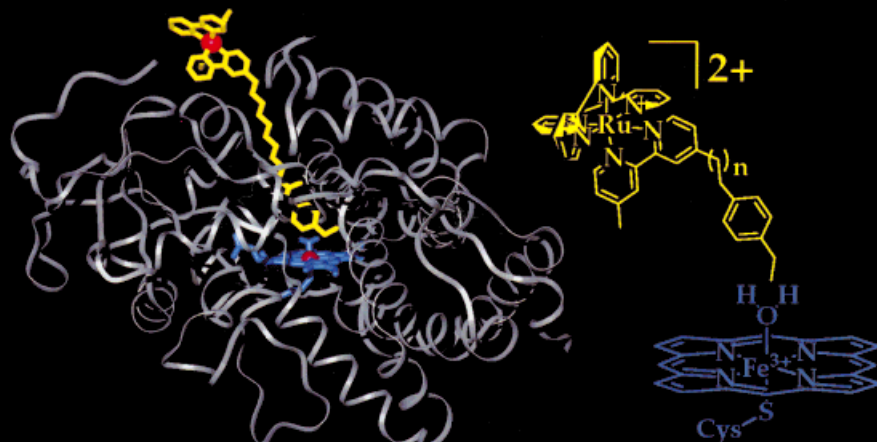


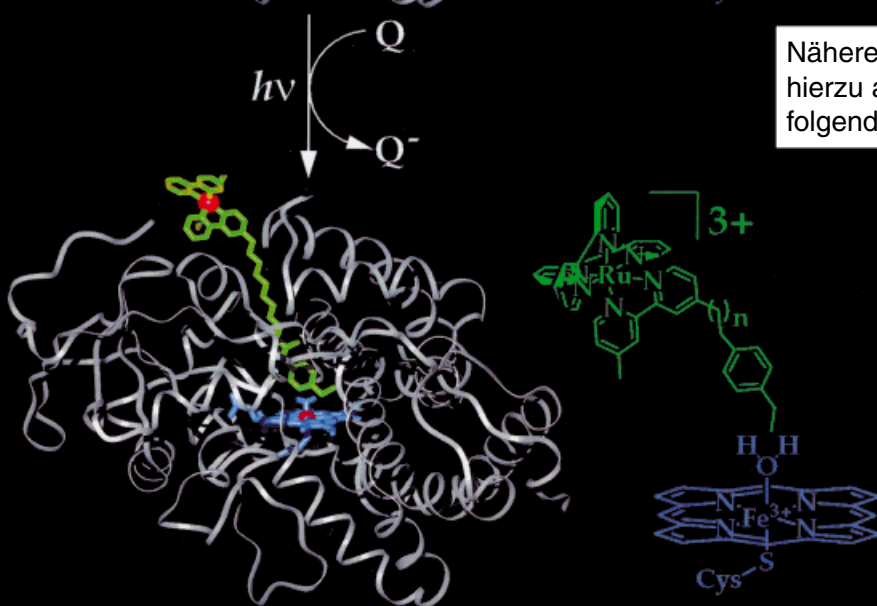
Mit Konjugaten aus Proteinsubstraten und photoaktiven Redoxmitteln können „verborgene“ Cofaktoren im aktiven Zentrum des Proteins reduziert oder, wie hier gezeigt, oxidiert werden:

Bindung des Sensibilisator-verknüpften Substrats (SVS) an das Protein



Näheres hierzu auf den folgenden Seiten.

Zugeben eines Löschers (Q) nach Photoanregung erzeugt ein oxidiertes SVS



Elektronentransfer zum SVS führt zur Oxidation des Cofaktors im aktiven Zentrum



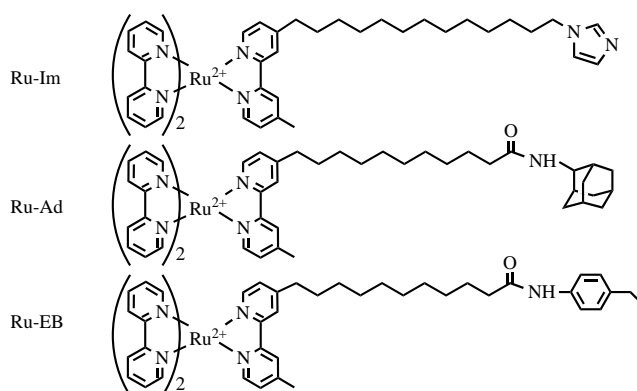
## Substrate für schnelle Ladungsübertragung auf redoxaktive Cofaktoren in den aktiven Zentren von Proteinen\*\*

Jonathan J. Wilker, Ivan J. Dmochowski,  
John H. Dawson, Jay R. Winkler\* und Harry B. Gray\*

Um Stoffwechselprozesse auf molekularer Ebene zu verstehen, muß man die Oxidationszustände von Metalloenzymen genau bestimmen können. Reaktive Zwischenprodukte bei enzymatisch katalysierten Reaktionen sind hierbei von besonderem Interesse, doch häufig sind sie zu kurzlebig, um direkt untersucht werden zu können. Dazu gehört auch die oxidierte Form des Häms, von der angenommen wird, daß sie bei den Oxygenierungsreaktionen von Cytochrom P450<sub>cam</sub> (P450) katalytisch wirkt.<sup>[1, 2]</sup> Dieses Oxidationsmittel konnte bislang nicht nachgewiesen und somit seine Rolle im Katalyseprozeß nicht geklärt werden.<sup>[1-3]</sup>

Wir haben vor kurzem gezeigt, daß man die Hämgruppen von Peroxidasen in Lösung mit photochemisch hergestellten Ruthenium-Diimin-Komplexen oxidieren kann.<sup>[4, 5]</sup> Der gleiche Versuch zur Oxidation von P450 scheiterte jedoch, zum Teil wegen des schlechten Elektronentransfers (ET) zwischen den externen Redoxmitteln und der tief im Inneren des Enzyms befindlichen Hämgruppe. Nun haben wir eine wirkungsvolle photochemische Methode entwickelt, mit der der Elektronentransport von und zu solchen „verborgenen“ Redox-Zentren möglich ist. Durch die Verknüpfung eines Ru-Photosensibilisators mit einem Proteinsubstrat gelang es uns, die Hämgruppe von P450 schneller zu reduzieren, als dies vorher möglich war. Gleichzeitig haben wir einen zuvor noch nicht nachgewiesenen Oxidationszustand des Enzyms erzeugt. Die Strategie, Substrate und Sensibilisatoren miteinander zu verknüpfen, eröffnet neue Wege zur Erforschung reaktiver Redoxzustände im Inneren von Enzymen.

Der Photosensibilisator  $[\text{Ru}(\text{bpy})_3]^{2+}$  (bpy = 2,2'-Bipyridin) wurde über einen Alkyl- oder Alkylamido-Spacer mit Imidazol (Im) bzw. Adamantan (Ad) oder Ethylbenzol (EB) verknüpft, die eine hohe Affinität zur Hämgruppe von P450 aufweisen.<sup>[6]</sup> Imidazol bindet direkt an das Eisenzentrum des Häms,<sup>[7]</sup> während Adamantan<sup>[8]</sup> und Ethylbenzol<sup>[9]</sup> fest in der



hydrophoben Cavität des aktiven Zentrums binden (Abbildung 1). Adamantanon verdrängt ein gebundenes Wassermolekül aus dem Häm  $[\text{P}_{\text{Cys}}\text{Fe}^{\text{III}}(\text{OH}_2)]$  im aktiven Zentrum



Abbildung 1. Darstellung des (Ru-EB)-P450-Komplexes, in dem sich die Ru-EB-Alkylkette im Kanal für den Substratzugang befindet (modelliert anhand der Struktur von P450 im Kristall: T. L. Poulos, *Methods Enzymol.* **1991**, 206, 11–30). Die Kohlenwasserstoffkette und das Proteinsubstrat bilden einen passend miteinander gekoppelten Pfad für das Tunneln von Elektronen zwischen dem Ru-Zentrum und der Hämgruppe. Eine Energieminimierung des (Ru-EB)-P450-Modells wurde nicht durchgeführt.

( $\text{P}_{\text{Cys}}$  steht für das über die Thiolatgruppe einer Cystein-Seitenkette gebundene Protoporphyrin IX von P450), was zur Bildung der fünffach koordinierten Spezies  $[\text{P}_{\text{Cys}}\text{Fe}^{\text{III}}]$  führt.<sup>[10]</sup> Die Bindung von Ethylbenzol beeinflusst dagegen den Ruhezustand des Häms mit einer sechsfachen Koordination des Eisenzentrums nicht wesentlich.

Die Zugabe von Ru-Ad in stöchiometrischen Mengen zu P450( $\text{Fe}^{\text{III}}$ ) führt zu einer Verschiebung des Absorptionsmaximums der Soret-Bande von 417 zu 415 nm und zum Auftreten eines Schulterpeaks bei 391 nm, was auf die Bindung der Adamantangruppe in der Nähe der Hämgruppe hinweist.<sup>[11]</sup> Die Verschiebung des Absorptionsmaximums läßt sich auf einen vergrößerten  $\text{Fe}^{\text{III}}\text{-OH}_2$ -Abstand oder die teilweise Verdrängung des Wassermoleküls aus  $[\text{P}_{\text{Cys}}\text{Fe}^{\text{III}}(\text{OH}_2)]$  zurückführen, diese beiden Effekte treten bei der Bindung von Adamantylverbindungen in der Häm-Bindungs-

[\*] J. R. Winkler, H. B. Gray, J. J. Wilker, I. J. Dmochowski  
Beckman Institute  
California Institute of Technology  
Pasadena, CA 91125 (USA)  
Fax: (+1) 626-449-4159  
E-mail: winklerj@cco.caltech.edu  
hgcm@cco.caltech.edu

J. H. Dawson  
Department of Chemistry and Biochemistry  
University of South Carolina  
Columbia, SC 29208 (USA)

[\*\*] Diese Arbeit wurde von den National Institutes of Health (DK19038; Doktorandenstipendium für I.J.D. (Biotechnology Grant GM08346)) und der National Science Foundation (CHE9508533; CHE9807150) gefördert. Wir danken M. C. Lamczyk für die Zellkultivierung, S. G. Sligar für das Überlassen des P450-Vektors und S. J. Lippard für hilfreiche Diskussionen. H.B.G. dankt dem Balliol College und dem Inorganic Chemistry Laboratory der University of Oxford für die anregende Arbeitsatmosphäre in den Jahren 1997 und 1998.

tasche des Enzyms auf.<sup>[12]</sup> Außer der Änderung der Absorption wird auch eine Abnahme der Lebensdauer des angeregten Zustands von Ru<sup>II</sup>-Ad (Ru<sup>II</sup>-Ad) festgestellt.<sup>[13]</sup> Das Abklingverhalten der Lumineszenz von Ru<sup>II</sup>-Ad ist normalerweise monophasisch ( $k_1 = 2.2 \times 10^6 \text{ s}^{-1}$ ). In Gegenwart von P450 wird es biphasisch ( $k_1 = 2.2 \times 10^6 \text{ s}^{-1}$ ,  $k_2 = 7.7 \times 10^6 \text{ s}^{-1}$ ), wobei der zweite Prozeß mit 77 % zum Abklingen der Ru<sup>II</sup>-Lumineszenz beiträgt. Wir schreiben dieses schnelle Abklingen der Lumineszenz ( $k_2$ ) der Wechselwirkung zwischen Ru-Ad und P450 zu. Die Dissoziationskonstante  $K_D$  des dabei gebildeten Komplexes (Ru-Ad)-P450 beträgt  $0.69 \mu\text{M}$ .<sup>[14]</sup>

Das Soret-Absorptionsmaximum von P450(Fe<sup>III</sup>) verschiebt sich in Gegenwart äquimolarer Mengen an Ru-Im von 417 zu 420 nm, was für eine Bindung des Imidazolliganden an das Häm-Eisenzentrum spricht.<sup>[7]</sup> Das Abklingverhalten der Lumineszenz des (Ru<sup>II</sup>-Im)-P450-Komplexes ist biphasisch ( $k_1 = 2.2 \times 10^6 \text{ s}^{-1}$ ,  $k_2 = 7.0 \times 10^6 \text{ s}^{-1}$ ). Ca. 68 % des Abklingens der Ru<sup>II</sup>-Lumineszenz sind auf den schnelleren Prozeß ( $k_2$ ) zurückzuführen;  $K_D$  beträgt  $1.5 \mu\text{M}$  für den Komplex (Ru-Im)-P450.

Eine 1:1-Mischung von Ru-EB und P450 weist kein verändertes Soret-Absorptionsmaximum auf; Ru<sup>II</sup>-EB wird jedoch ebenfalls in Gegenwart von P450 gelöscht. Der schnellere von zwei Abklingprozessen ( $k_1 = 2.2 \times 10^6 \text{ s}^{-1}$ ,  $k_2 = 1.2 \times 10^7 \text{ s}^{-1}$ ) bewirkt 70 % der Ru<sup>II</sup>-EB-Löschung, woraus sich  $K_D = 1.0 \mu\text{M}$  für den (Ru-EB)-P450-Komplex ergibt. Gibt man zu (Ru-EB)-P450 Campher ( $K_D \approx 1 \mu\text{M}$ )<sup>[2]</sup> im Überschuß, so wird das Ru-verknüpfte Substrat verdrängt, was aus dem gesteigerten Beitrag des langsameren Abklingprozesses ( $k_1$ ) geschlossen werden kann. Wir gehen daher davon aus, daß alle drei Sensibilisator-verknüpften Substrate fest im aktiven Zentrum von P450 binden.

Durch Anregung mit Laserlicht und anschließende reduktive Löschung mit *para*-Methoxy-*N,N*-dimethylanilin (*p*MDMA)<sup>[15]</sup> erhält man aus Ru<sup>II</sup>-Im das starke Reduktionsmittel Ru<sup>I</sup>-Im ( $E^0 = -1.24 \text{ V}$  gegen die Standardwasserstoffelektrode (NHE)).<sup>[16, 17]</sup> In Gegenwart von P450 wird Ru<sup>I</sup>-Im schnell in Ru<sup>II</sup>-Im überführt. Mit der Oxidation von Ru<sup>I</sup> geht eine Reduktion der Hämgruppe einher, wie aus der Verschiebung der Soret-Bande von 420 zu 445 nm ersichtlich ist.<sup>[7, 18]</sup> Die Geschwindigkeitskonstante für den Elektronentransfer Ru<sup>I</sup> → Fe<sup>III</sup> beträgt  $2 \times 10^4 \text{ s}^{-1}$  (Abbildung 2). Eine ähnliches kinetisches Verhalten ( $k_{\text{ET}} = 2 \times 10^4 \text{ s}^{-1}$ ) wird bei der reduktiven Löschung des (Ru<sup>II</sup>-EB)-P450-Komplexes beobachtet; die Ru<sup>I</sup> → Fe<sup>III</sup>-Reaktion hat eine Verschiebung des Soret-

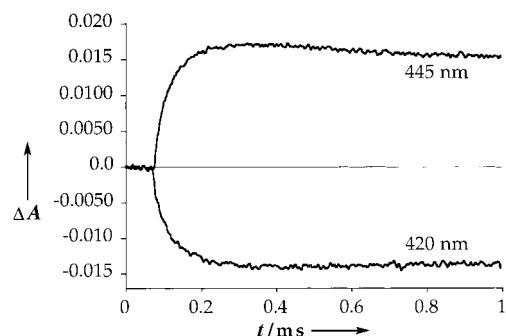


Abbildung 2. Auftragung der zeitlichen Absorptionsänderung  $\Delta A$  bei der Reaktion von Ru<sup>I</sup>-Im mit P450 ( $10 \mu\text{M}$  Rutheniumkomplex,  $10 \mu\text{M}$  Enzym,  $20 \text{ mM}$  *p*MDMA).

Absorptionsmaximums von 417 zu 390 nm zur Folge. Der reduktive Löschprozeß beim (Ru<sup>II</sup>-Ad)-P450-Komplex führt zu spektroskopischen Änderungen, die denen für (Ru<sup>II</sup>-EB)-P450 vergleichbar sind. Die Blauverschiebung der Soret-Bande weist darauf hin, daß das Reduktionsprodukt die bislang nicht nachgewiesene  $[\text{P}_{\text{Cys}}\text{Fe}^{\text{II}}(\text{OH}_2)]^-$ -Form von P450 ist.<sup>[19]</sup> Ein weiterer Hinweis für die Häm-Reduktion ist die Bildung von  $[\text{P}_{\text{Cys}}\text{Fe}^{\text{II}}(\text{CO})]^-$  ( $\lambda_{\text{max}} = 448 \text{ nm}$ ) während der kontinuierlichen Bestrahlung von (Ru<sup>II</sup>-EB)-P450 mit sichtbarem Licht in Gegenwart von *p*MDMA und Kohlenmonoxid. Die relativ hohe Geschwindigkeit der Häm-Reduktion im photochemisch gebildeten (Ru<sup>I</sup>-EB)-P450-Komplex beweist, daß für eine effiziente elektronische Kopplung zwischen Ru und Häm keine direkte Bindung zum Eisenzentrum erforderlich ist. Tatsächlich ist die Geschwindigkeit, mit der die Elektronen vom Ru-verknüpften Ethylbenzol zum aktiven Zentrum von P450 tunneln, um mehr als zwei Größenordnungen höher als die Reduktion durch Putidaredoxin ( $k \approx 50 \text{ s}^{-1}$ ), einen natürlichen Redoxpartner.<sup>[20]</sup>

Die effiziente Kopplung eines Sensibilisator-verknüpften Substrats mit der Hämgruppe kann man nutzen, um hoch-oxidierte Zustände des Enzyms zu erzeugen. Die oxidative Löschung von photoangeregtem Ru<sup>II</sup>-EB mit  $[\text{CoCl}(\text{NH}_3)_5]^{2+}$  liefert das starke Oxidationsmittel Ru<sup>III</sup>-EB ( $E^0 = 1.26 \text{ V}$  gegen NHE).<sup>[4, 17]</sup> Im (Ru<sup>III</sup>-EB)-P450-Komplex entsteht durch eine schnelle Elektronenübertragung ( $k_{\text{ET}} = 6 \times 10^3 \text{ s}^{-1}$ ) von der Hämgruppe auf das Ru<sup>III</sup>-Zentrum ein Oxidationsprodukt mit einem Soret-Absorptionsmaximum bei 390 nm (Abbildung 3). Diese Absorptionsänderung tritt

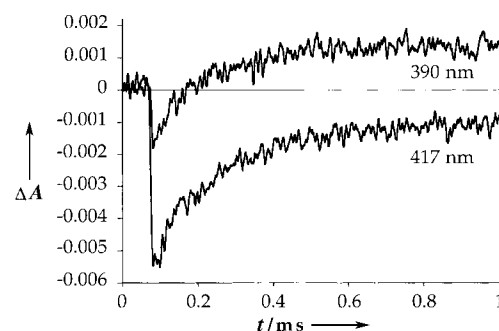


Abbildung 3. Auftragung der zeitlichen Absorptionsänderung  $\Delta A$  bei der Reaktion von Ru<sup>III</sup>-EB mit P450 ( $10 \mu\text{M}$  Rutheniumkomplex,  $10 \mu\text{M}$  Enzym,  $5 \text{ mM}$   $[\text{CoCl}(\text{NH}_3)_5]^{2+}$ ).

nicht ein, wenn man den (Ru<sup>II</sup>-EB)-P450-Komplex in Abwesenheit von  $[\text{CoCl}(\text{NH}_3)_5]^{2+}$  mit Laserlicht bestrahlt. Bei der oxidierten Verbindung könnte es sich um das Porphyrin- $\pi$ -Radikalkation  $[\text{P}_{\text{Cys}}^+\text{Fe}^{\text{III}}(\text{OH}_2)]^+$  oder um die Fe<sup>IV</sup>-Spezies  $[\text{P}_{\text{Cys}}\text{Fe}^{\text{IV}}(\text{OH}_2)]^+$  handeln. Die blauverschobene Soret-Bande im Spektrum des oxidierten Häms spricht für das Vorliegen eines Radikals.<sup>[21]</sup> Tatsächlich haben Porphyrin- $\pi$ -Radikalkationen häufig Soret-Absorptionsmaxima, die gegenüber denen von Häm-Systemen im Ruhezustand eine Blauverschiebung aufweisen.<sup>[22–24]</sup>

Durch die Verwendung Sensibilisator-verknüpfter Substrate haben wir neue oxidierte und reduzierte Formen von P450 hergestellt (Abbildung 4). Die Anregungs/Löschungs-Methoden ermöglichen es, hochreaktive Formen des Enzyms in

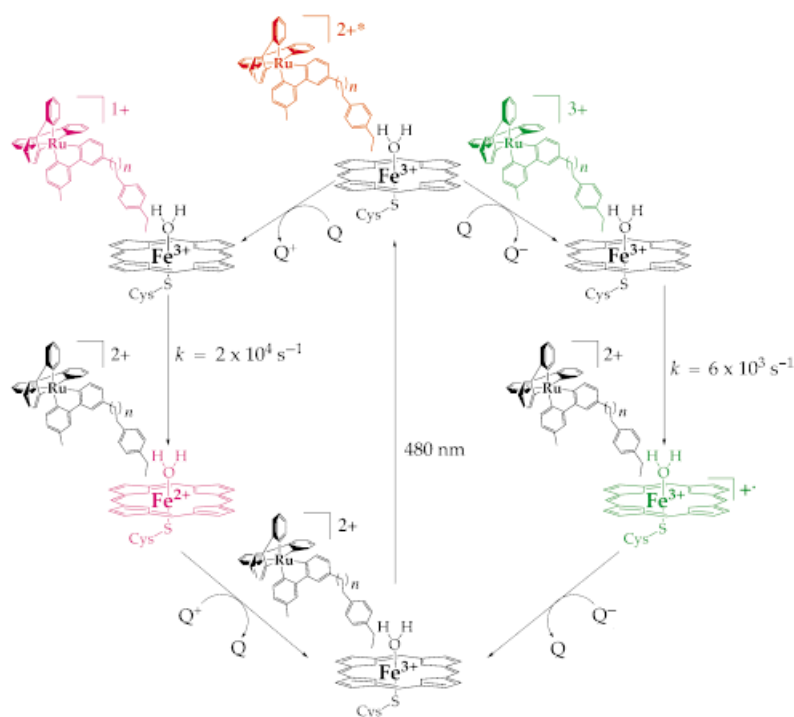


Abbildung 4. Schematische Darstellung der Reaktionsfolge aus Blitzlicht-Anregung und Löschung bei der Bildung von neuen Redoxzuständen im (Ru-EB)-P450-Komplex. Q = Löscher.

einem breiten Zeitfenster zu untersuchen. Sowohl  $[\text{P}_{\text{Cys}}\text{Fe}^{\text{II}}(\text{OH}_2)]^-$  als auch  $[\text{P}_{\text{Cys}}\text{Fe}^{\text{III}}(\text{OH}_2)]^+$  werden in ca. 0.1 ms gebildet und haben eine Lebensdauer von ca. 100 ms. Verbesserte Photosensibilisatoren, Löscher, Spacer und Substrate führen möglicherweise zu einem noch schnelleren Ladungstransfer auf P450 und andere redoxaktive Enzyme.

Eingegangen am 31. Juli 1998 [Z12231]

International Edition: *Angew. Chem. Int. Ed.* **1999**, 38, 90–92

**Stichwörter:** Elektronentransfer • Häm-Proteine • Metalloenzyme • Ruthenium • Sensibilisatoren

- [1] M. Sono, M. P. Roach, E. D. Coulter, J. H. Dawson, *Chem. Rev.* **1996**, 96, 2841–2887.
- [2] E. J. Mueller, P. J. Loida, S. G. Sligar in *Cytochrome P450. Structure, Mechanism, and Biochemistry* (Hrsg.: P. R. Ortiz de Montellano), Plenum, New York, **1995**, S. 83–124.
- [3] L.-L. Wong, *Curr. Opin. Chem. Biol.* **1998**, 2, 263–268.
- [4] J. Berglund, T. Pascher, J. R. Winkler, H. B. Gray, *J. Am. Chem. Soc.* **1997**, 119, 2464–2469.
- [5] D. W. Low, J. R. Winkler, H. B. Gray, *J. Am. Chem. Soc.* **1996**, 118, 117–120.
- [6] Synthese von Ru-EB (typisches Beispiel): Durch Reaktion von Thionylchlorid mit 10-Bromdecansäure erhält man nach Zusatz von 4-Ethylanilin das entsprechende Amid. Durch Zugabe des Amids zu einer Lösung von 4,4'-Dimethyl-2,2'-bipyridin und Lithiumdiisopropylamid wird das derivatisierte bpy erhalten, das mit  $[\text{RuCl}_2(\text{bpy})_2]$  zu Ru-EB reagiert.
- [7] J. H. Dawson, L. A. Anderson, M. Sono, *J. Biol. Chem.* **1982**, 257, 3606–3617.
- [8] R. E. White, M. B. McCarthy, K. D. Egeberg, S. G. Sligar, *Arch. Biochem. Biophys.* **1984**, 228, 493–502.
- [9] D. Filipovic, M. D. Paulsen, P. J. Loida, S. G. Sligar, R. L. Ornstein, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **1992**, 189, 488–495.

- [10] R. Raag, T. L. Poulos, *Biochemistry* **1991**, 30, 2674–2684.
- [11] Alle Untersuchungen wurden unter Argon mit dem Rutheniumkomplex (10  $\mu\text{M}$ ) und dem Enzym (10  $\mu\text{M}$ ) in einem Puffer mit 100 mM Kaliumchlorid und 20 mM Kaliumphosphat (pH 7.4, Raumtemperatur) durchgeführt.
- [12] T. L. Poulos, J. Cupp-Vickery, H. Li in Lit. [2], S. 125–150.
- [13] Anregung bei 480 nm (Pulsbreite 20 ns); die experimentelle Anordnung ist in Lit. [5] beschrieben.
- [14] Die Verschiebungen des Soret-Absorptionsmaximums, die aus der Zugabe der Rutheniumkomplexe zu P450 resultieren, sind klein. Studien zur kompetitiven Bindung von Campher und Ru-Ad an P450 ergaben eine Dissoziationskonstante von  $K_D = 0.68 \mu\text{M}$ , ermittelt durch die Verschiebung der Soret-Banden.
- [15] G. A. Mines, M. J. Bjerrum, M. G. Hill, D. R. Casimiro, I.-J. Chang, J. R. Winkler, H. B. Gray, *J. Am. Chem. Soc.* **1996**, 118, 1961–1965.
- [16] Die reduktive Löschung von  $[\text{Ru}^{\text{II}}(\text{bpy})_3]^{2+}$  führt zu einem Rutheniumkomplex mit dem koordinativ gebundenen bpy-Radikalanion  $[\text{Ru}^{\text{II}}(\text{bpy})_2(\text{bpy}^{\cdot-})]^+$ : K. Kalyanasundaram, *Photochemistry of Polypyridyl and Porphyrin Complexes*, Academic Press, London, **1992**, S. 108.  $[\text{Ru}^{\text{II}}(\text{bpy})_2(\text{bpy}^{\cdot-})]^+$  wird als  $\text{Ru}^{\text{I}}$  bezeichnet.
- [17] Die Reduktionspotentiale sind für  $[\text{Ru}(\text{bpy})_3]^{2+}$  angegeben (Lit. [16], S. 144). Die  $E^0$ -Werte von Derivaten mit Substraten am Ende der Kohlenwasserstoffkette sollten ähnlich sein.
- [18] J. H. Dawson, L. A. Andersson, M. Sono, *J. Biol. Chem.* **1983**, 258, 13637–13645.
- [19] Das Soret-Absorptionsmaximum von  $[\text{P}_{\text{His}}\text{Fe}^{\text{II}}(\text{OH}_2)]$ -Myoglobin weist gegenüber dem von  $[\text{P}_{\text{His}}\text{Fe}^{\text{II}}]$ -Myoglobin eine Blauverschiebung von 15 nm auf: D. C. Lamb, V. Prusakov, N. Engler, A. Ostermann, P. Schellenberg, F. G. Parak, G. U. Nienhaus, *J. Am. Chem. Soc.* **1998**, 120, 2981–2982. Die normale Reduktion von P450 resultiert in fünffach koordiniertem  $[\text{P}_{\text{Cys}}\text{Fe}^{\text{II}}]$  mit einer Soret-Bande bei 408 nm. Das Produkt der Reduktion von  $[\text{P}_{\text{Cys}}\text{Fe}^{\text{III}}(\text{OH}_2)]$  durch  $\text{Ru}^{\text{I}}$ -EB hat ein Soret-Absorptionsmaximum bei 390 nm.
- [20] M. J. Hintz, D. M. Mock, L. L. Peterson, K. Tuttle, J. A. Peterson, *J. Biol. Chem.* **1982**, 257, 14324–14332.
- [21] Der Cystein-Thiolat-Ligand könnte den  $\text{Fe}^{\text{IV}}$ -Zustand von P450 stabilisieren. Wasserstoffbrückenbindungen zu diesem Thiolat (T. L. Poulos, B. C. Finzel, A. J. Howard, *J. Mol. Biol.* **1987**, 195, 687–700) verringern jedoch seine Donorstärke. Obwohl das Produkt der Reaktion von Iodosobenzol mit P450 eine Soret-Bande bei 393 nm aufweist (R. C. Blake II, M. J. Coon, *J. Biol. Chem.* **1989**, 264, 3694–3701), erfährt das Soret-Absorptionsmaximum der Chlorperoxidase bei der  $\text{Fe}^{\text{III}}$ -Bildung eine Rotverschiebung: R. Nakajima, I. Yamazaki, B. W. Griffi, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **1985**, 128, 1–6. Die Blauverschiebung der Soret-Bande der Hämgruppe im oxidierten (Ru-EB)-P450-Komplex ist ähnlich der von P420, einem Zerfallsprodukt von P450: S. A. Martinis, S. R. Blank, L. P. Hager, S. G. Sligar, G. H. B. Hoa, J. J. Rux, J. H. Dawson, *Biochemistry* **1996**, 35, 14530–14536. Die Bildung von P420 verläuft jedoch überwiegend irreversibel, wohingegen der oxidierte (Ru-EB)-P450-Komplex ohne nennenswerte Zersetzung in den Ruhezustand übergeht.
- [22] P. Gans, G. Buisson, E. Duee, J.-C. Marchon, B. S. Erler, W. F. Scholz, C. A. Reed, *J. Am. Chem. Soc.* **1986**, 108, 1223–1234.
- [23] R. H. Felton, G. S. Owen, D. Dolphin, J. Fajer, *J. Am. Chem. Soc.* **1971**, 93, 6332–6334.
- [24] A. Wolberg, J. Manassen, *J. Am. Chem. Soc.* **1970**, 92, 2982–2991.