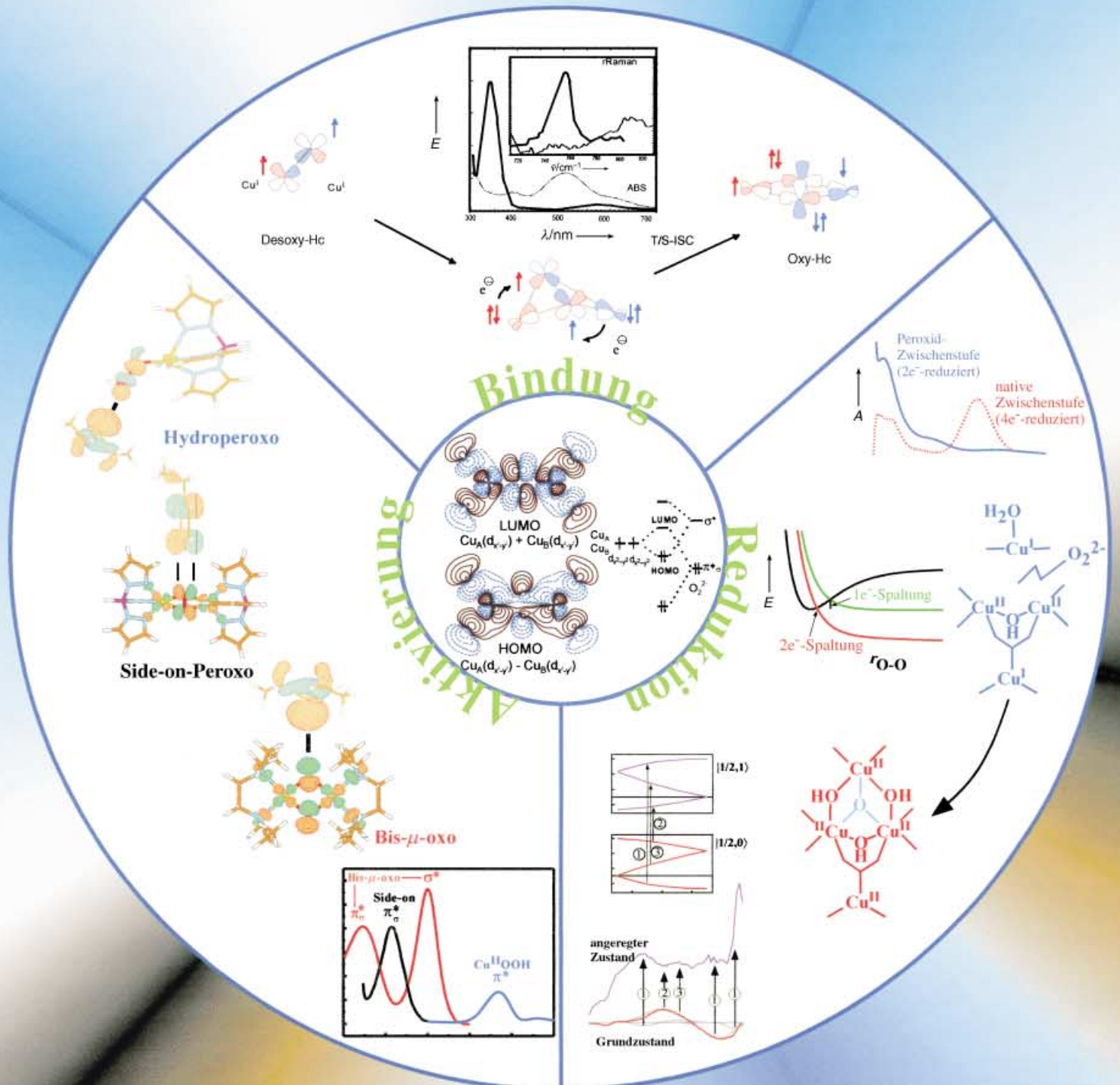


Die Bioanorganische Chemie von Cu_n/O_2



Kupferproteine: Koordination und Aktivierung von Sauerstoff und seine Reduktion zu Wasser

Edward I. Solomon,* Peng Chen, Markus Metz, Sang-Kyu Lee und Amy E. Palmer

Die aktiven Zentren von Kupferproteinen spielen eine entscheidende Rolle bei der biologischen und nichtbiologischen Aktivierung von Disauerstoff. Sauerstoff-Zwischenstufen sind für die Proteine und Enzyme der reversiblen O₂-Koordination (Hämocyanin), -Aktivierung (Tyrosinase) und -Vier-Elektronen-Reduktion zu Wasser (mehrkernige kupferhaltige Oxidasen) gründlich untersucht worden. Diese Sauerstoff-Zwischenstufen wei-

sen ungewöhnliche spektroskopische Eigenschaften auf, die auf neue geometrische und elektronische Strukturen bei der Sauerstoff-Aktivierung hindeuten. Die spektroskopische und quantenmechanische Untersuchung dieser Zwischenstufen hat Beziehungen zwischen geometrischen und elektronischen Strukturen und der Funktion aufzeigen können, und detaillierte Beschreibungen des Reaktionsverlaufs konnten für die reversible Bindung

von O₂, die Hydroxylierung und die H-Atom-Abspaltung von unterschiedlichen Substraten sowie die reduktive Spaltung der O-O-Bindung bei der Bildung von Wasser entwickelt werden.

Stichwörter: Bioanorganische Chemie • Elektronenstruktur • Kupfer • Metalloenzyme • O-O-Aktivierung • Reaktionsmechanismen

1. Einleitung

Aktive Kupfer- und Eisenzentren dominieren das Gebiet der biologischen Sauerstoffchemie^[1] und spielen wichtige Rollen in der homogenen^[2] und der heterogenen Katalyse.^[3, 4] Kupferproteine sind an der reversiblen Disauerstoff-Koordination (Hämocyanin),^[5] an der mit der Oxidation von Substraten gekoppelten Zwei-Elektronen-Reduktion zu Peroxid (Amin-, Galactose- und Catechol-Oxidasen),^[6] an der Aktivierung zur Hydroxylierung (Dopamin- β -Hydroxylase, Peptidylglycin- α -hydroxylierende Monooxygenase, Tyrosinase und partikuläre Methan-Monooxygenase)^[6, 7] und an der mit der Substratoxidation einhergehenden Vier-Elektronen-Reduktion zu Wasser (Laccase, Ascorbat-Oxidase, Caeruloplasmin und Fet3p)^[7] sowie an Protonen-Pumpen (Cytochrom-c-Oxidase, die auch Häm-Eisenzentren enthält) beteiligt.^[8] Die bislang bekannten, an Disauerstoff-Koordination, -Aktivierung und -Reduktion beteiligten Kupferproteine sind, geordnet nach dem Strukturtyp des aktiven Zentrums, in

Schema 1 aufgeführt. Wesentliche Strukturmerkmale aus der Protein Data Bank (PDB) sind in Abbildung 1 gezeigt.^[9–16]

Amin-Oxidase und Galactose-Oxidase katalysieren die Zwei-Elektronen-Reduktion von O₂ zu Peroxid an einem einzelnen Kupferzentrum, welches nur ein Elektron bereitstellen kann.^[6] Wie in Abbildung 1A gezeigt, wird die Zwei-Elektronen-Reduktion mit Hilfe einer zusätzlichen, redoxaktiven funktionellen Gruppe erreicht, einem Topachinon bei der Amin-Oxidase oder einem durch eine Thioether-Bindung kovalent an einen Cysteinrest gebundenen Tyrosinliganden bei der Galactose-Oxidase. Beide funktionellen Gruppen werden durch posttranslationale Modifizierung eines Proteinrestes durch das Kupferzentrum gebildet. Im Fall der Amin-Oxidase erfolgt dies durch die Hydroxylierung eines Tyrosinrestes durch O₂ unter Mitwirkung eines einzelnen Kupferzentrums. Diese Reaktion ist zurzeit noch nicht genau verstanden, könnte aber über die Aktivierung von Tyrosin durch Cu^{II} verlaufen.^[17, 18]

Dopamin- β -Hydroxylase (D β H) und Peptidylglycin- α -hydroxylierende Monooxygenase (PHM) weisen nichtgekoppelte zweikernige Kupfereinheiten auf,^[6] wobei sich der Begriff „Kopplung“ hier auf magnetische Wechselwirkungen zwischen den Kupferatomen bezieht. Im Enzym im Ruhezustand sind die Cu^{II}-Atome des aktiven Zentrums dementsprechend mindestens 7 Å voneinander entfernt und nicht durch Liganden verbrückt, was mit der Kristallstrukturanalyse der Peptidylglycin- α -hydroxylierenden Monooxygenase

[*] Prof. Dr. E. I. Solomon, P. Chen, Dr. M. Metz, Dr. S.-K. Lee, A. E. Palmer
Department of Chemistry
Stanford University
Stanford, CA 94305 (USA)
Fax: (+1) 650-725-0259
E-mail: Edward.Solomon@stanford.edu



E. I. Solomon



P. Chen



M. Metz



A. Palmer



S.-K. Lee

Edward I. Solomon wuchs in North Miami Beach, FL, auf, promovierte an der Princeton University bei Prof. Donald S. McClure und arbeitete als Postdoktorand erst am H. C. Ørsted Institutet, Kopenhagen, bei Prof. Carl J. Ballhausen und dann am Caltech, Pasadena, bei Harry B. Gray. Bis 1982 war er Professor am MIT, Cambridge, seitdem Monroe E. Spaght Professor of Humanities and Sciences an der Stanford University. Sein Forschungsgebiet ist die physikalisch-anorganische und bioanorganische Chemie unter Anwendung einer großen Zahl spektroskopischer Methoden zur Aufklärung der elektronischen Strukturen von Übergangsmetallkomplexen in Hinblick auf deren physikalische Eigenschaften und Reaktivitäten. Er hat eine Vielzahl von Namensvorlesungen, z. B. die First Glen Seaborg Lectures an der University of California, Berkeley, gehalten und war Gastprofessor am Tokyo Institute of Technology, an der Universität von Paris, Orsay, am Tata Institute, Bombay, an der Xiamen-Universität, China, und an der La Plata-Universität, Argentinien. Er ist Mitglied der American Academy of Arts and Sciences und der American Association for the Advancement of Sciences. Zu seinen Auszeichnungen zählen der Ira Remsen Award der Maryland Section der American Chemical Society, die G. W. Wheland Medal der University of Chicago und der ACS National Award in Inorganic Chemistry 2001.

Peng Chen wuchs auf in Jiangsu, China, und erhielt seinen B.S.-Titel 1997 von der Nanjing-Universität. Nach einem Jahr an der University of California, San Diego, wo er sich unter Anleitung von Prof. Yitzhak Tor mit der organischen Synthese beschäftigte, wechselte er an die Stanford University, wo er derzeit als Gerhard Casper Stanford Graduate Fellow in Prof. Solomons Gruppe an seiner Doktorarbeit arbeitet. Seine Forschungsschwerpunkte sind die Untersuchung der elektronischen Strukturen biologisch wichtiger, an der Sauerstoff-Aktivierung beteiligter Kupferzentren mit spektroskopischen und theoretischen Methoden.

Markus Metz erhielt sein Diplom in Chemie von der Bayerischen Julius-Maximilians-Universität Würzburg und promovierte an der Ruprecht-Karls-Universität Heidelberg mit einer unter Anleitung von Prof. Peter Hofmann angefertigten Arbeit zur theoretischen Aufklärung der Mechanismen metallorganischer Reaktionen. Von 1999 bis 2001 führte er als DAAD-Stipendiat in der Arbeitsgruppe von Prof. Solomon theoretische Studien zur Sauerstoffkoordination an mehrkernigen Kupferproteinen durch. Heute ist er als Theoretiker bei AnorMED Inc. beschäftigt, wo er Therapeutika auf Metallbasis entwirft.

Amy Palmer erhielt ihren B.A.-Titel in Biophysikalischer Chemie 1994 vom Dartmouth College, wo sie sich unter Anleitung von Prof. Karen E. Wetterhahn mit den Mechanismen der Chrom-Carcinogenese beschäftigte. 1995 schloss sie sich der Arbeitsgruppe von Prof. Solomon an der Stanford University an, wo sie als Franklin Veatch Memorial Fellow spektroskopische und kinetische Studien zur Aufklärung des Mechanismus der Substratoxidation und der O₂-Reduktion durch mehrkernige kupferhaltige Enzyme durchführt.

Sang-Kyu Lee, geboren in Korea, erhielt seinen B.S.-Titel in Biochemie 1989 von der Lehigh University und promovierte 1998 in Biochemie an der University of Minnesota, Minneapolis. In seiner bei Prof. John D. Lipscomb angefertigten Doktorarbeit beschäftigte er sich mit den Reaktionsmechanismen der Methan-Monooxygenase, was zur Entdeckung der reaktiven Zwischenstufen P und Q führte. Als Postdoc bei Prof. Solomon führt er diese Studien zur Metalloprotein-Enzymologie mit der detaillierten spektroskopischen Charakterisierung wichtiger Zwischenstufen der Reduktion von Disauerstoff zu Wasser durch mehrkernige kupferhaltige Oxidasen weiter.

Protein	katalytische Reaktion	Protein	katalytische Reaktion
einkernige Komplexe			
Amin-Oxidase (AmO)		Laccase (Lc)	
Galactose-Oxidase (GO)		Ascorbat-Oxidase (AO)	
nichtgekoppelte zweikernige Einheiten			
Dopamin-β-Hydroxylase (DβH)		Caeruloplasmin (Cp) / FET3	
Peptidylglycin-α-hydroxylierende Monooxygenase (PHM)		Bilirubin-Oxidase (BO)	
gekoppelte zweikernige Einheiten			
Hämocyanin (Hc)		(vermutet) Phenoxazinon-Synthase (PHS)	
Tyrosinase (Tyr)		Dihydrogeodin/Sulochrin-Oxidase (DHGO/SO)	
Catechol-Oxidase (CO)		partikuläre Methan-Monooxygenase (pMMO)	

Schema 1. An Sauerstoff-Koordination und -Aktivierung beteiligte Kupferproteine.

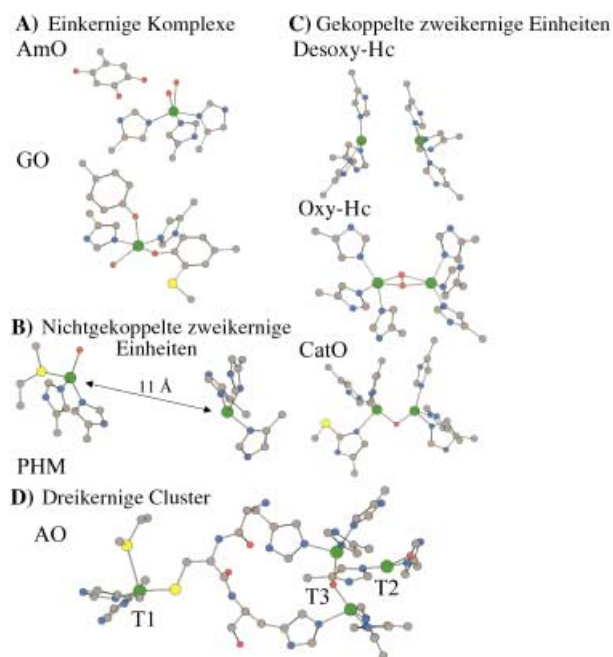


Abbildung 1. Kristallstrukturen von Kupferproteinen: A) Kupfer-Amin-Oxidase (AmO, PDB-Code 1KSI), Galactose-Oxidase (GO, PDB-Code 1GOG), B) Peptidylglycin-α-hydroxylierende Monooxygenase (PHM, PDB-Code 1PHM), C) desoxygenierte Form von Hämocyanin (Desoxy-Hc, PDB-Code 1LLA), oxygenierte Form von Hämocyanin (Oxy-Hc, PDB-Code 1OXY), Catechol-Oxidase (CatO, PDB-Code 1BT3), D) Ascorbat-Oxidase (AO, PDB-Code 1AOZ).

(Abbildung 1B) übereinstimmt.^[15, 16] Das Enzym hat ein an der Katalyse beteiligtes Kupferzentrum (bezeichnet als Cu_M, da es einen Methioninliganden aufweist^[19]); man nimmt an, dass die Reaktion durch Abspaltung eines Wasserstoffatoms vom Substrat (dem Benzylwasserstoffatom in DβH oder dem α-Wasserstoffatom in PHM) über einen bislang nicht beobachteten Hydroperoxid-Cu_M-Komplex abläuft.^[6] Das zweite zur Bildung des Hydroperoxids benötigte Elektron stammt von Cu_H (dem Kupferatom mit ausschließlich Histidinliganden). Da die Kupferzentren nicht gekoppelt sind (d.h. keine Brücke existiert), ist der Mechanismus des Transports des zweiten Elektrons zu Cu_M unklar. Es wurde vorgeschlagen, dass entweder ein neuer Pfad für die Elektronenübertragung gebildet wird, indem Substratmoleküle die beiden entfernten Kupferatome verbrücken,^[16] oder dass die Reaktion über eine O₂-Reduktion zu Superoxid am Cu_H- und ein Superoxid-Channeling zum Cu_M-Zentrum abläuft.^[20]

Zu den gekoppelten zweikernigen Kupferproteinen gehören Hämocyanin, Tyrosinase und Catechol-Oxidase.^[5, 7] Die zweikernigen Kupfereinheiten in diesen Proteinen sind durch einen verbrückenden Liganden, über den eine direkte Zwei-Elektronen-Reduktion von Disauerstoff ermöglicht wird, stark gekoppelt. In Oxy-Hämocyanin (Abbildung 1C) wird diese Brücke durch Disauerstoff gebildet, der als Peroxid reversibel in einer side-on-verbrückenden (μ-η²:η²-) Struktur an Desoxy-Hämocyanin (2 Cu^I) bindet.^[14, 21] Hierbei handelt es sich um das stabilste Sauerstoff-Zwischenprodukt bei

Kupferproteinen, und es zeigt ungewöhnliche spektroskopische Eigenschaften. Diese resultieren aus einer neuartigen elektronischen Struktur für die Side-on-Peroxo-Cu₂^{II}-Struktur, die eine bedeutende Rolle bei der Reaktivität spielt (Abschnitt 2).^[5] Die spektroskopischen und Struktureigenschaften von Oxy-Hämocyanin und verwandten Modellkomplexen geben Anhaltspunkte für Sauerstoff-Zwischenstufen in verschiedenen, andere Reaktionen katalysierenden Kupferenzymen und liefern Korrelationen zwischen geometrischen und elektronischen Strukturen und Funktionen in der Kupferchemie. Während für Tyrosinase noch keine Kristallstrukturanalyse vorliegt, kann aus den spektroskopischen Eigenschaften von Oxy-Tyrosinase auf ein dem Oxy-Hämocyanin sehr ähnliches aktives Zentrum mit Side-on-Peroxo-Cu₂^{II}-Struktur geschlossen werden.^[22] Jedoch katalysiert im Fall der Oxy-Tyrosinase das aktive Zentrum die elektrophile Oxygenierung von Phenol zu Catechol (Brenzcatechin) und die Zwei-Elektronen-Oxidation von Catechol zu Chinon. Wir haben gezeigt, dass ein wichtiger Unterschied zwischen Hämocyanin und Tyrosinase darin besteht, dass das Substrat bei der Tyrosinase, nicht jedoch bei Hämocyanin, Zugang zu dem aktiven Zentrum hat und das Kupferatom direkt koordinieren kann.^[22] Der für diese Reaktion allgemein akzeptierte Mechanismus ist in Abbildung 2 dargestellt.^[7] Eine wichtige Frage zum Monophenolase-Zyklus ist, ob die side-on-verbrückte Peroxo-Verbindung das Phenol direkt hydroxyliert oder ob hierzu ebenfalls eine Bis-μ-oxo-Cu₂^{III}-Struktur erforderlich ist. Die Side-on-Peroxo/Bis-μ-oxo-Isomerisierung ist nachgewiesen und detailliert in Cu₂O₂-Modellverbindun-

gen untersucht worden.^[23] Die elektronischen Strukturen der oben für die nichtgekoppelten zweikernigen Kupferenzyme angegebenen Side-on-Peroxo-Cu₂^{II}-,^[24] Bis-μ-oxo-Cu₂^{III}-^[25] und Cu^{II}-Hydroperoxo-Zwischenstufen^[26] und deren Reaktivitäten in der elektrophilen Hydroxylierung und der Wasserstoffatom-Abspaltung werden in Abschnitt 3 besprochen. Der Diphenolase-Mechanismus in Abbildung 2 wird durch die Kristallstruktur der Met- (d.h. oxidierten (2Cu^{II})) oder Ruheform der Catechol-Oxidase untermauert.^[10] Die Kristallstruktur stützt weiterhin die Idee des Substratzugangs und der Koordination des Kupferzentrums in Catechol-Oxidase und Tyrosinase, nicht aber in Hämocyanin. Während beide Enzyme Catechol zu Chinon oxidieren, kann nur die Tyrosinase Phenol hydroxylieren. Die strukturellen Voraussetzungen für diesen Reaktivitätsunterschied sind noch ungeklärt, können aber mit unterschiedlichen strukturellen Erfordernissen für die verschiedenen Reaktionen zusammenhängen. Spektroskopische Daten zur Bindung von kompetitiven Inhibitoren an die zweikernige Kupfereinheit in Tyrosinase deuten darauf hin, dass eine trigonal-bipyramidale Umlagerung an der Phenol-Hydroxylierung (Monophenolase-Zyklus, Oxy-T → Met-D, Abbildung 2) beteiligt ist, nicht aber an der Catechol-Oxidation (Diphenolase-Zyklus).^[27]

Der letzte Strukturtyp in der biologischen Chemie von Cu/O₂-Verbindungen ist der der dreikernigen Kupfercluster in mehrkernigen kupferhaltigen Oxidasen^[7, 28] und eventuell auch anderen Enzymen wie der partikulären Methan-Monooxygenase.^[29] Laccase und Fet3p^[30] sind die einfachsten der mehrkernigen kupferhaltigen Oxidasen. Diese enthalten

einen dreikernigen Kupfercluster (bestehend aus einer hydroxidverbrückten, gekoppelten zweikernigen Cu^{II}-Einheit (Typ 3, T3)^[31] und einem dreifach koordinierten einkernigen Cu^{II}-Zentrum (Typ 2, T2)) und ein zusätzliches Blaues Kupferzentrum (Typ 1, T1). Das Typ-1-Kupferatom ist >13 Å vom dreikernigen Cluster entfernt, aber durch einen Elektronentransferpfad (T1-Cys-His-T3) mit diesem verbunden (Abbildung 1D).^[9] Ascorbat-Oxidase ist im Wesentlichen ein Laccase-Dimer, und Caeruloplasmin enthält zwei zusätzliche entfernte Typ-1-Kupferzentren.^[9, 32] Die Substratoxidation findet am Typ-1-Zentrum statt, die Elektronen werden schnell über den >13 Å langen Elektronentransferpfad zum dreikernigen Kupfercluster transportiert, wo Disauerstoff zu Wasser reduziert wird. Ein Sauerstoff-Zwischenprodukt, das „native Zwischenprodukt“, wird bei der Reduktion von O₂

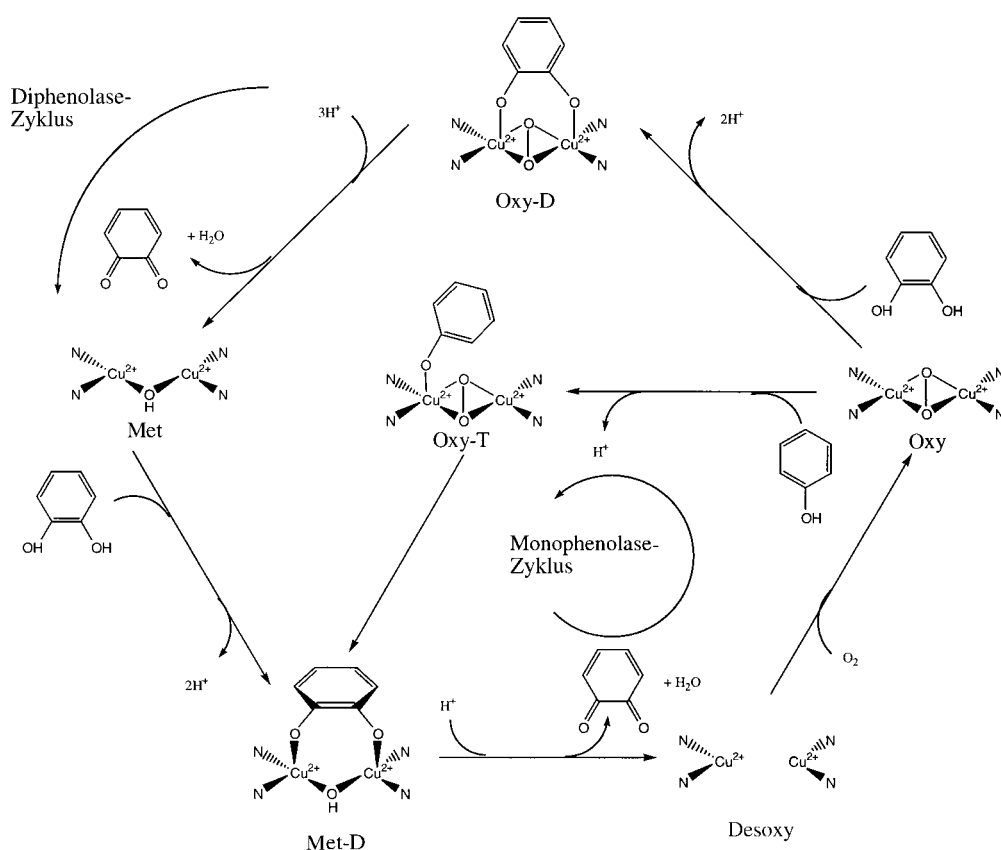


Abbildung 2. Mechanismus der Tyrosinase-Katalyse. Zur Vereinfachung sind die axialen Liganden an den Kupferzentren nicht eingezeichnet. Wiedergegeben aus Lit. [27].

durch vollständig reduzierte (d.h. 4Cu^{I}) Laccase gebildet.^[7, 33–35] Wird das Typ-1-Zentrum durch ein redoxinaktives Quecksilberion^[36] (TlHg -Derivat) ersetzt, und lässt man den reduzierten dreikernigen Kupfercluster mit O_2 reagieren, so resultiert eine weniger reduzierte Sauerstoff-Zwischenstufe, das „Peroxid-Zwischenprodukt“.^[37] Eingehende Untersuchungen dieser Zwischenprodukte führten zu einem Mechanismus für die Vier-Elektronen-Reduktion von Disauerstoff zu Wasser und einem allgemeinen Modell für die reduktive Spaltung der O-O-Bindung.^[38] Diese Untersuchungen werden in Abschnitt 4 vorgestellt.

Die im Folgenden beschriebenen Forschungsarbeiten zeigen die Stärke der Spektroskopie in Verbindung mit Dichtefunktionaltheorie(DFT)-Rechnungen bei der Entwicklung von Beziehungen zwischen geometrischer und elektronischer Struktur und biologischer Funktion.

2. Disauerstoff-Koordination

2.1. Die ungewöhnliche elektronische Struktur von Oxy-Hämocyanin

Wie bereits erwähnt, weisen Oxy-Hämocyanin und strukturell äquivalente $\mu\text{-}\eta^2\text{:}\eta^2\text{-side-on-Peroxo}$ -verbrückte zweikernige Kupfermodellkomplexe ungewöhnliche spektroskopische Eigenschaften auf.^[1, 5, 7, 39] Als erstes betrachte man end-on-gebundenes Peroxid in einem einkernigen tetragonalen Cu^{II} -Komplex als Referenz. Die wichtigen Valenzorbitale sind das energetisch hoch liegende, halb gefüllte $\text{d}_{x^2-y^2}$ -Orbital des Kupferatoms und das zweifach entartete π^* -HOMO des Peroxids.^[5] Wie in Abbildung 3 A gezeigt, wird ein π^* -Orbital

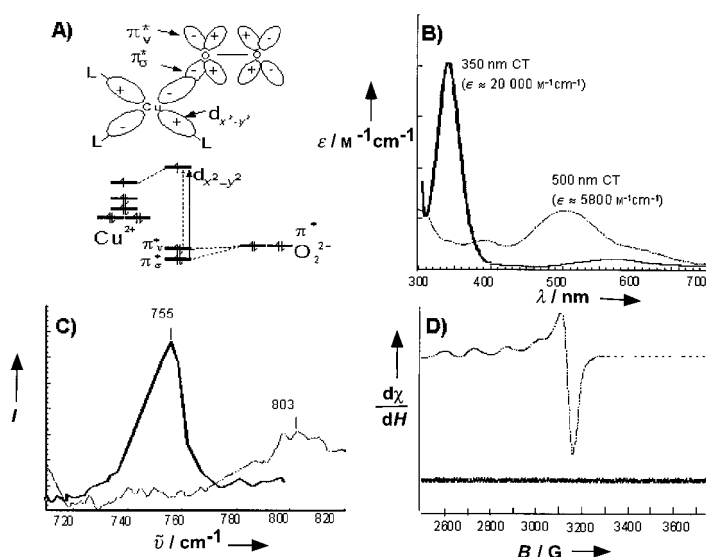


Abbildung 3. A) Elektronische Struktur der Peroxid- Cu^{II} -Bindung eines End-on-Peroxo- Cu^{II} -Modellkomplexes. In abgewandelter Form aus Lit. [5] übernommen. B) Absorptionsspektren von Oxy-Hämocyanin (—) und einem Peroxo- Cu^{II} -Modellkomplex (---). CT = Charge Transfer. C) Resonanz-Raman-Spektren, die die O-O-Streckschwingungsbanden des Peroxidmoleküls in Oxy-Hämocyanin (—) und im Peroxo- Cu^{II} -Modellkomplex (---) zeigen. D) EPR-Spektren von Oxy-Hämocyanin (unteres Spektrum) und eines tetragonalen Cu^{II} -Modellkomplexes (oberes Spektrum). In abgewandelter Form aus Lit. [7] übernommen.

(π^*) mit dem $\text{Cu-d}_{x^2-y^2}$ -Orbital eine σ -Bindung eingehen und energetisch stabilisiert, wobei das halbbesetzte $\text{d}_{x^2-y^2}$ -HOMO destabilisiert wird. Das andere π^* -Orbital (π_v^* , v = vertikal) liegt senkrecht zur Cu-O-O-Ebene und kann nur schwache π -Wechselwirkungen mit dem Kupferatom eingehen. Da die Intensität der Charge-Transfer-Absorption die Überlappung der Orbitale widerspiegelt, resultiert aus dieser Peroxid- σ -Donor-Bindung ein intensiver Charge-Transfer-Übergang (Peroxo- $\pi^* \rightarrow \text{Cu-d}_{x^2-y^2}$ -Charge-Transfer). Dies kann experimentell an einem End-on-Peroxo- Cu^{II} -Modellkomplex als Absorptionsbande bei ca. 500 nm mit $\epsilon \approx 5800\text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ festgestellt werden (Abbildung 3 B).^[40] Abbildung 3 B zeigt weiterhin das Absorptionsspektrum von Oxy-Hämocyanin, dessen Peroxid- $\pi^* \rightarrow \text{Cu}^{\text{II}}$ -Charge-Transfer-Übergang bei wesentlich höherer Energie liegt und eine etwa vierfache Intensität aufweist ($\lambda = 350\text{ nm}$, $\epsilon \approx 20\,000\text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$).^[40, 41] Resonanz-Raman-Spektren, die bei Anregung bei der Wellenlänge dieser Peroxid-Charge-Transfer-Übergänge erhalten wurden (Abbildung 3 C), zeigen eine O-O-Streckschwingung bei etwa 800 cm^{-1} für den End-on-Peroxo- Cu^{II} -Modellkomplex, während diese Schwingung für Oxy-Hämocyanin bei ca. 750 cm^{-1} liegt, was auf eine extrem schwache O-O-Bindung hindeutet.^[40, 42] Im Unterschied zu einkernigen tetragonalen Cu^{II} -Komplexen, die das „normale“ EPR-Spektrum (EPR = paramagnetische Elektronenresonanz) in Abbildung 3 D geben, weist Oxy-Hämocyanin wegen der magnetischen Kopplung zwischen den beiden Cu^{II} -Atomen über die Peroxidbrücke kein EPR-Signal auf.^[7] Aus SQUID-Messungen der magnetischen Suszeptibilität (SQUID = superconducting quantum interference device) ergibt sich eine starke antiferromagnetische Kopplung (zwei Cu^{II} -Zentren mit $S = 1/2$ koppeln unter Bildung eines Singulett- und eines Triplett-Zustandes), wobei der Singulett-Grundzustand energetisch mehr als 600 cm^{-1} günstiger als der Triplett-Zustand ist.^[43]

Diese ungewöhnlichen spektroskopischen Eigenschaften geben also die neuartige elektronische Struktur des Side-on-Peroxo- Cu_2^{II} -Komplexes in Abbildung 1 C wieder.^[24, 44] Wie in Abbildung 4 dargestellt, erhält man bei zweikernigen Cu^{II} -Komplexen das HOMO und das LUMO durch Wechselwirkung der symmetrischen und antisymmetrischen Linearkombinationen der beiden halbbesetzten $\text{Cu-d}_{x^2-y^2}$ -Orbitale mit den Peroxid-Valenzorbitalen in der Side-on-Struktur. Auch

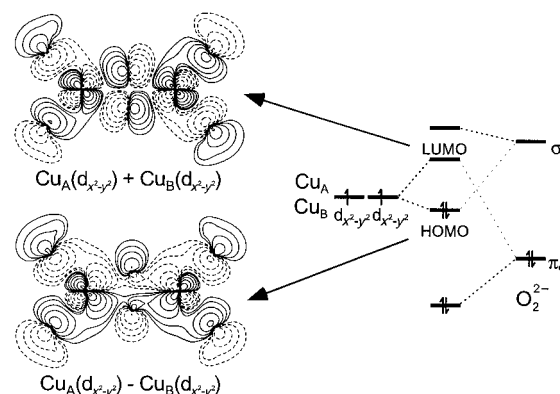


Abbildung 4. Elektronische Struktur der Peroxid- Cu^{II} -Bindung von Oxy-Hämocyanin. In abgewandelter Form aus Lit. [1] übernommen.

hier ist an der wichtigsten Wechselwirkung das π^* -Orbital beteiligt, dessen Interaktion mit der symmetrischen Kombination der $d_{x^2-y^2}$ -Orbitale das LUMO liefert. Wie beim End-on-Peroxo-Cu^{II}-Komplex in Abbildung 3 A wird eine Peroxid- σ -Donor-Bindung gebildet, wobei die bindende/antibindende Wechselwirkung allerdings wesentlich stärker ist. Die Ursache für diese starke σ -Donor-Wechselwirkung kann aus dem Konturdiagramm für das LUMO abgelesen werden, das verdeutlicht, dass das Peroxid in der side-on-verbrückten Struktur vier σ -Donor-Bindungen zu den beiden Kupferzentren bildet. Diese sehr starke σ -Donor-Wechselwirkung führt zur hohen Energie des Peroxid- $\pi^* \rightarrow \text{Cu}^{\text{II}}$ -Charge-Transfer-Übergangs bei Oxy-Hämocyanin und zur hohen Intensität, die die Überlappung der Orbitale und damit die Stärke der σ -Donation widerspiegelt. Eine zusätzliche bindende Wechselwirkung tritt in Oxy-Hämocyanin, nicht aber im End-on-Peroxo-Cu^{II}-Monomer auf. Diese beinhaltet die Stabilisierung der antisymmetrischen Kombination der $d_{x^2-y^2}$ -Orbitale durch eine schwache bindende Wechselwirkung mit dem energetisch hoch liegenden, unbesetzten Peroxid- σ^* -Orbital (Abbildung 4, HOMO-Konturdiagramm). Dies führt zu einer gewissen π -Rückbindung unter Übertragung von Elektronendichte von den Kupferzentren in das in Bezug auf die O-O-Bindung stark antibindende σ^* -Orbital des Peroxids. Daraus resultieren eine sehr schwache Peroxid-Bindung und die niedrige Frequenz der O-O-Streckschwingung im Resonanz-Raman-Spektrum von Oxy-Hämocyanin (Abbildung 3 C).^[45] Da in Dimeren die HOMO/LUMO-Aufspaltung durch den verbrückenden Liganden der Grund für die antiferromagnetische Kopplung ist, führt schließlich die Kombination von sehr starker σ -Donation (Destabilisierung des LUMO) und π -Rückbindung (Stabilisierung des HOMO) zur starken Stabilisierung des Singulett-Grundzustands in Oxy-Hämocyanin.^[24]

Aus der Beschreibung der Bindung in Oxy-Hämocyanin (Abbildung 4) geht hervor, dass die wichtigen besetzten Valenzorbitale (das Peroxid- π^* -Orbital und das HOMO ($d_{x^2-y^2}-d_{x^2-y^2}$)) energetisch abgesenkt werden, was zu einer

sehr starken Peroxid-Cu^{II}-Bindung führt. Dies stabilisiert das Oxy-Hämocyanin und verhindert den Verlust des Peroxids, was zu einer oxidierten (Met-Zustand), nicht länger an der Disauerstoff-Bindung beteiligten Metalleinheit führen würde, und trägt damit wesentlich zu der in Abschnitt 2.2 beschriebenen Energetik der O₂-Koordination an Hämocyanin bei.

2.2. Der Reaktionsverlauf

Die oben beschriebenen, ungewöhnlichen spektroskopischen Eigenschaften von Oxy-Hämocyanin und die wenigen bislang vorliegenden Daten für Desoxy-Hämocyanin (zwei Cu^I-Atome mit d¹⁰-Konfiguration) wurden benutzt, um die Ergebnisse von Hybrid-DFT-Rechnungen (auf dem B3LYP/Lanl2dz-Niveau),^[46–50] einschließlich zeitabhängiger DFT-Rechnungen,^[51, 52] mit den spektroskopischen Daten zu korrelieren und die Rechnungen zu kalibrieren. Die Ergebnisse werden hier nicht im Einzelnen diskutiert, es soll nur angedeutet werden, dass die berechneten Struktur- und spektroskopischen Daten und die resultierende allgemeine Beschreibung der Bindung sinnvoll sind. Die Rechnungen liefern allerdings eine zu kovalente Bindungsstelle in Oxy-Hämocyanin, was Einfluss auf die energetischen Betrachtungen hat (siehe unten).^[53] Diese Rechnungen geben die Änderung der elektronischen Struktur bei der Bindung von O₂ an Desoxy-Hämocyanin wieder, wie in Abbildung 5 gezeigt. Das HOMO von Desoxy-Hämocyanin weist $d_{x^2-y^2}$ -Orbitale senkrecht zum Cu-Cu-Vektor auf (jede Kupfer(i)-Einheit hat lokal eine etwa trigonal-planare Struktur). Durch O₂-Koordination werden diese $d_{x^2-y^2}$ -Orbitale destabilisiert und drehen sich, um zwei Elektronen in den π^* -Orbitalsatz von O₂ übertragen zu können. Dadurch wird O₂ zu Peroxid reduziert, und es entsteht das kupferzentrierte LUMO in Abbildung 5 rechts (und Abbildung 4).^[53] Die O₂-Koordination beinhaltet also die Übertragung von zwei Elektronen und

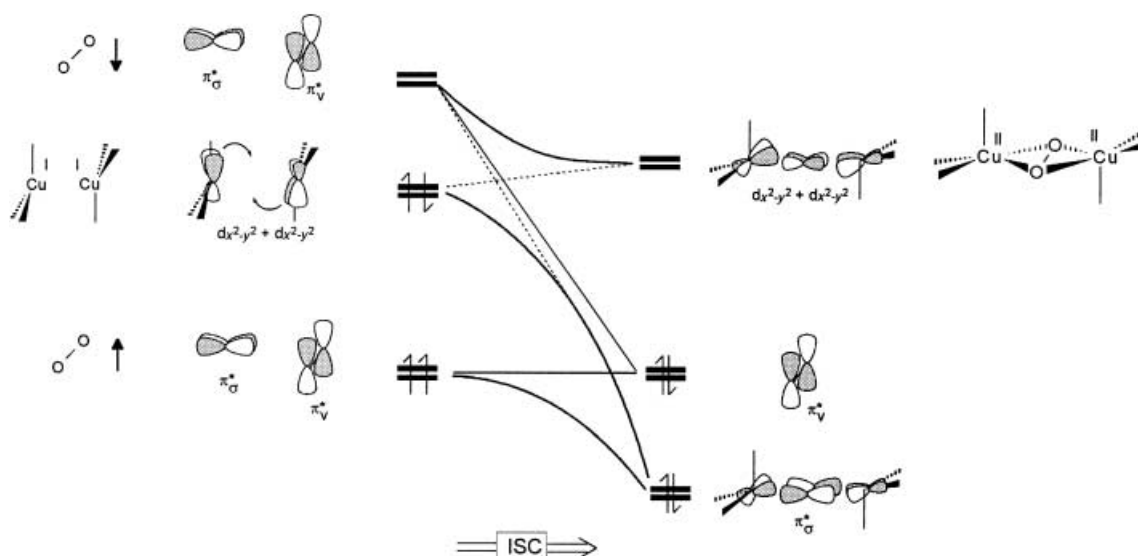


Abbildung 5. Orbital-Korrelationsdiagramm für die Bindung von O₂ an Desoxy-Hämocyanin. In abgewandelter Form aus Lit. [53] übernommen.

ein Intersystem-Crossing (ISC) vom Triplett-Disauerstoff zum Singulett-Grundzustand von Oxy-Hämocyanin.

Diese mit experimentellen Werten kalibrierten Berechnungen der elektronischen Struktur wurden benutzt, um den Reaktionsverlauf der Sauerstoff-Bindung an Hämocyanin zu analysieren.^[53] Abbildung 6 zeigt die Strukturen, die erhalten

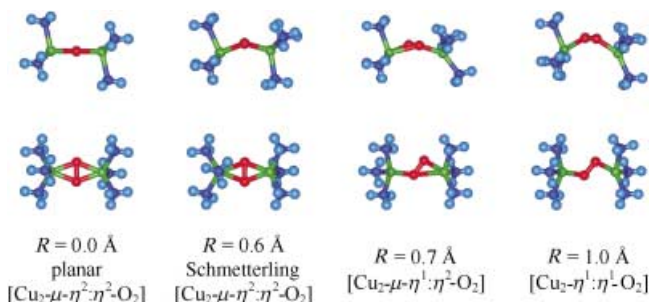


Abbildung 6. Verlauf der O₂-Koordination/Abgabe durch Hämocyanin. Oben: Blick entlang der O-O-Bindung in [Cu₂(μ-η²:η²-O₂)]; unten: Blick senkrecht zur O-O- und zur Cu-Cu-Verbindungsline. In abgewandelter Form aus Lit. [53] übernommen.

werden, wenn das Peroxidmolekül in Oxy-Hämocyanin um eine Strecke R aus der Molekülebene herausgehoben und die Geometrie beim Übergang zur Desoxy-Form unter O₂-Abgabe teilweise optimiert wurde. Zuerst verzerrt sich die Einheit zu einer Schmetterlingsstruktur, dann zu einer asymmetrisch verbrückten μ-η¹:η²- und einer end-on-verbrückten μ-η¹:η¹-Struktur, um schließlich O₂ abzugeben (in Abbildung 6 nicht gezeigt). Dieser Reaktionsverlauf spiegelt die Tatsache wider, dass die Maximierung der Metall-Ligand-Überlappung eine beherrschende Rolle bei der Festlegung des Koordinationsmodus spielt. Trotz der nichtsymmetrischen Koordination ist es energetisch günstiger, die beiden Kupferatome des zweikernigen aktiven Zentrums miteinander zu verbrücken.

Abbildung 7 zeigt die Ladungsänderungen bei diesem Reaktionsverlauf. Wenn das Peroxid aus der Molekülebene herausgehoben wird, nehmen die positive Ladung an den Kupferatomen und die negative Ladung an den Peroxid-Sauerstoffatomen kontinuierlich ab, was in Einklang mit einer Ladungsübertragung unter Bildung von Disauerstoff und der reduzierten Bindungsstelle ist. Die Ladung wird gleichmäßig auf beide Kupferatome übertragen, und zwar sogar im nichtsymmetrischen μ-η¹:η²-Koordinationsmodus. Daher ist die gleichzeitige Zwei-Elektronen-Übertragung für die Peroxid-verbrückte zweikernige Kupfereinheit thermodynamisch begünstigt. Der kontinuierliche Ladungsfluss in den Singulett-Zustand bereitet den Komplex für das Intersystem-Crossing vor.

Unser besonderes Interesse galt der Frage, wie Hämocyanin das Spinverbot der O₂-Koordination löst.^[53] Im Verlauf der O₂-Abgabe nimmt die Singulett/Triplett-Aufspaltung, während das Peroxid unter Bildung der verzerrten Schmetterlingsstruktur aus der Molekülebene

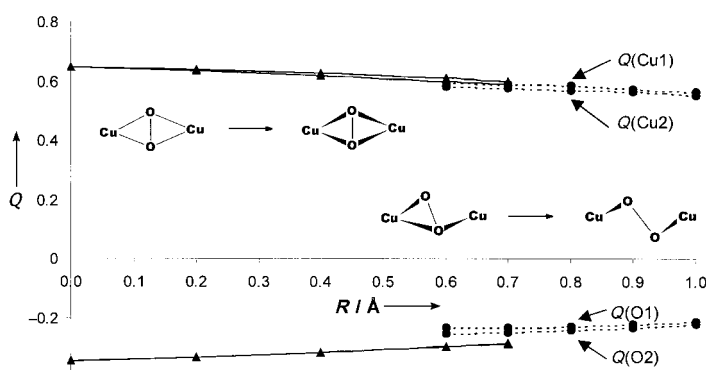


Abbildung 7. Änderungen der Partialladungen Q der Kupfer- und Sauerstoffatome während der Abspaltung von O₂ aus Oxy-Hämocyanin im Singulett-Zustand mit μ-η²:η²-O₂-Koordination (—) und im Triplett-Zustand mit nichtsymmetrischer O₂-Koordination (---). R ist die Entfernung zwischen den Zentren der O-O- und Cu-Cu-Strecken. In abgewandelter Form aus Lit. [53] übernommen.

herausgehoben wird, stark ab, und es kommt zu einem Intersystem-Crossing bei $R \approx 0.6 \text{ \AA}$ (Abbildung 8). Mit dem Herausheben des Peroxidmoleküls aus der Cu₂O₂-Ebene wird das π_σ^{*}-Orbital weniger stark σ-bindend, und das π_v^{*}-Orbital geht eine σ-Überlappung ein. Das bringt die π^{*}-Orbitale der Peroxidbrücke energetisch einander näher und erlaubt eine Ausrichtung entlang der individuellen Cu-η²-O₂²⁻-Ebenen (Abbildung 9). Wie in Abbildung 9B gezeigt, führt dies zu einer nahezu orthogonalen Anordnung der Orbitale für die magnetische Kopplung zwischen den beiden Cu^{II}-Atomen, wodurch deren Superaustauschkopplung eliminiert wird; dies führt zu einem Triplett-Grundzustand. Die verminderte antiferromagnetische Wechselwirkung ist ebenfalls aus dem geringen Beitrag des zweiten Kupferatoms zum LUMO in Abbildung 9B ersichtlich. Wie in Schema 2 für den Triplett-Grundzustand dargestellt, führt die Elektronenübertragung

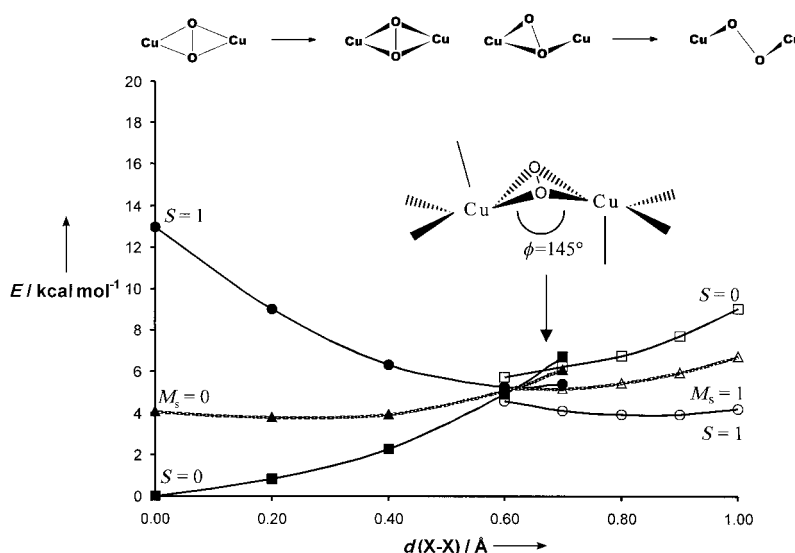


Abbildung 8. Potentialenergieoberflächen für die Umwandlung von Oxy-Hämocyanin und Desoxy-Hämocyanin. Ausgefüllte Symbole: symmetrische O₂-Koordination (μ-η²:η²); leere Symbole: nichtsymmetrische O₂-Koordination (μ-η¹:η² und μ-η²:η¹); Triplett-Zustand: $S = 1$; Broken-Symmetry-Zustand: $M_s = 0$; der Singulett-Zustand ($S = 0$) ist spin-projiziert. $d(\text{X-X})$ ist der Abstand zwischen den Zentren der O-O- und Cu-Cu-Vektoren. In abgewandelter Form aus Lit. [53] übernommen.

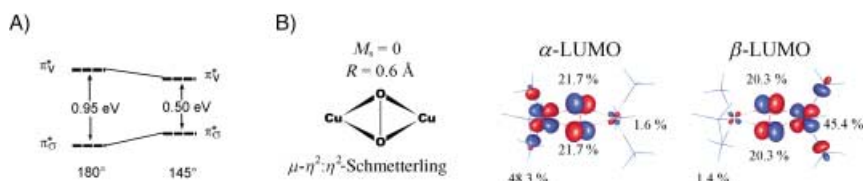
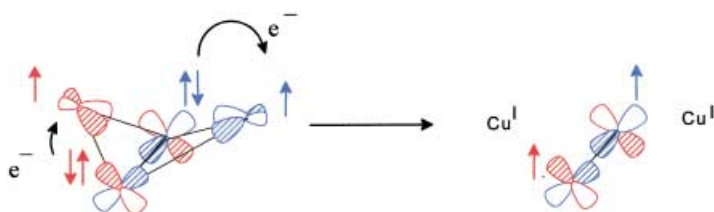


Abbildung 9. A) Verringerung der Energiedifferenz zwischen den beiden Peroxid- π^* -Orbitalen durch Schmetterlingsverzerrung des $[\text{Cu}_2(\mu\text{-}\eta^2\text{:}\eta^2\text{-O}_2)]$ -Kerns (Spinorbitalenergien sind gemittelt). B) Konturoberflächen-Darstellungen des α - und des β -LUMO, erhalten aus Broken-Symmetry-Rechnungen an der Schmetterlingsstruktur (Abbildung 8). Die Anteile der Cu- und O-Orbitale wurden aus einer Mulliken-Populationsanalyse erhalten. In abgewandelter Form aus Lit. [53] übernommen.



Schema 2. Elektronenübergang aus orthogonalen π^* -Peroxid-Orbitalen im Triplett-Zustand. In abgewandelter Form aus Lit. [53] übernommen.

zu einem Spin-up-Elektron in jedem orthogonalen π^* -Orbital des Peroxids, was mit dem $^3\Sigma_g^-$ -Grundzustand von O_2 in Einklang ist und zu einer weiteren energetischen Stabilisierung des Triplett-Grundzustands führt.

Die Energetik der O_2 -Koordination an Desoxy-Hämocyanin sowie an einkernige Cu-Modellsysteme ist in Abbildung 10 zusammengefasst. Die O_2 -Bindung an Desoxy-Hämocyanin ist mit etwa 16 kcal mol^{-1} exotherm, was ungefähr dem Doppelten des experimentellen Wertes entspricht und die Tatsache wiedergibt, dass die B3LYP/Lan2dz-Rechnungen die Kovalenz der Bindungen in Oxy-Hämocyanin überschätzen. Die Rechnungen reproduzieren die Energieände-

rung bei der beobachteten O_2 -Bindung zwischen der gespannten und der relaxierten Quartärstruktur von Hämocyanin,^[1, 54] wobei die relaxierte Desoxy-Struktur einen kürzeren $\text{Cu}^{\text{I}}\text{-Cu}^{\text{I}}$ -Abstand aufweist (3.5 \AA gegenüber 4.6 \AA für die gespannte Struktur) und eine größere Affinität für O_2 .^[14] Bemerkenswerterweise ergeben die Rechnungen, dass eine O_2 -Koordination an isolierte Cu^{I} -Monomere unter Bildung von $\mu\text{-}\eta^2\text{:}\eta^2\text{-O}_2^{2-}\text{-Cu}_2^{\text{II}}$ -Dimeren weniger bevorzugt ist. Dies spiegelt die Tatsache wider, dass das Protein die Desoxy-Einheit durch Fixieren der beiden Cu^{I} -Atome in einem kurzen Cu-Cu-Abstand stabilisiert. Die daraus resultierende abstoßende Wechselwirkung vergrößert die Exothermie der O_2 -Koordination an die zweikernige Kupfereinheit im Protein. Nach diesem Mechanismus vermag das Protein die O_2 -Affinität (kooperativ) durch Änderung des Cu-Cu-Abstands in Desoxy-Hämocyanin zu regulieren.^[53] (In Modellkomplexen wird diese Reaktion durch gespannte mehrzählige Liganden begünstigt, die das Cu^{I} -Zentrum destabilisieren.)^[55, 56]

Die vorliegenden Befunde sind in Abbildung 11 zusammengefasst: Wenn Triplett- O_2 an Desoxy-Hämocyanin bindet, wird durch Ladungstransfer von den Kupferatomen die Spindichte der ungepaarten Elektronen auf die einzelnen, separaten Metallzentren verteilt, wodurch die Austauschstabilisierung des $^3\Sigma_g^-$ -Grundzustands des Disauerstoffs verringert wird. Die Reaktion verläuft dann über den Superaustauschpfad über das verbrückende Peroxid, was zur antiferromagnetischen Kopplung und damit zur Stabilisierung des Singulett-Zustands führt. Dies scheint ein allgemein gültiger Mechanismus zu sein, um das Spin-Verbot der O_2 -Koordination an gekoppelte zweikernige Metalleinheiten in Metalloproteinen zu umgehen.^[53]

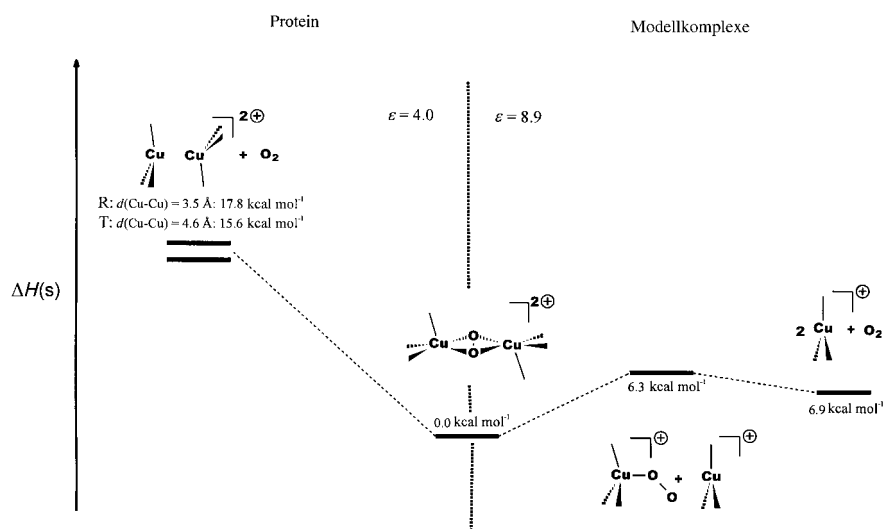


Abbildung 10. Energieminima der zweikernigen (links, Protein) und einkernigen Modellkomplexe (rechts) in unterschiedlichen Stadien der O_2 -Reduktion. Auf der rechten Seite ist ein einkerniger Superoxo-Komplex eingefügt, der bei den zweikernigen Modellkomplexen nicht auftritt. Die Energiewerte wurden aus Spin-Projektions-, Frequenz- und PCM-Rechnungen (PCM = polarized continuum model) erhalten. Zur besseren Anschaulichkeit sind die NH_3 -Liganden durch Linien angedeutet. R = relaxierte Struktur, T = gespannte Struktur, ϵ = Dielektrizitätskonstante. In abgewandelter Form aus Lit. [53] übernommen.

3. O_2 -Aktivierung durch Kupferenzyme und verwandte Modellkomplexe

Wie schon in der Einleitung angedeutet, kann ein einkerniger Cu^{II} -Hydroperoxidkomplex (Schema 3 A) als katalytische Zwischenstufe bei der H-Atom-Abspaltung von Substraten in den nicht-gekoppelten zweikernigen Kupferenzymen D β H und PHM betrachtet werden.^[6] Im gekoppelten zweikernigen Kupferenzym Tyrosinase, das die elektrophile Hydroxylierung von Phenol (Abbildung 2) katalysiert, liegt eine dem Oxy-Hämocyanin äquivalente, durch side-on-gebundenes Peroxid verbrückte zweikernige Cu_2^{II} -Zwischenstufe vor (Schema 3 B).^[7] In Kupfer-Modellkomplexen kann diese Side-on-Peroxo- Cu_2^{II} -Struktur in schnellem Gleichgewicht mit dem Bis- μ -oxo- Cu_2^{III} -Isomer

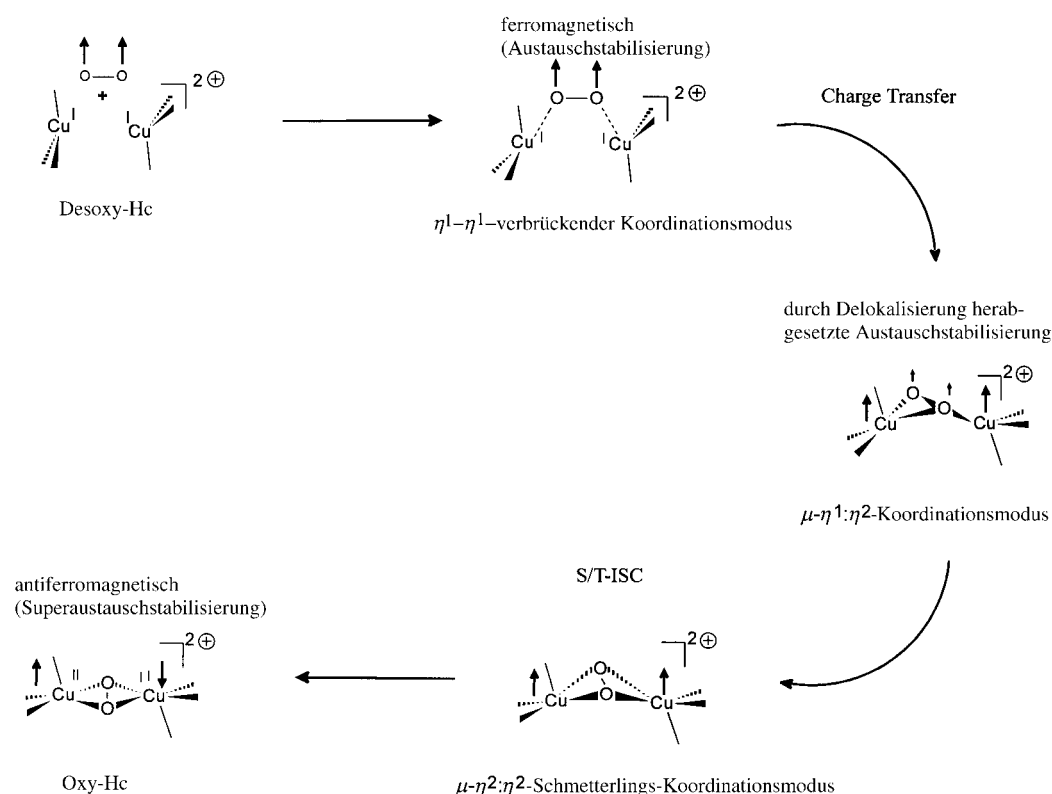
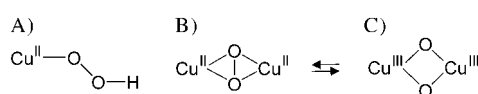


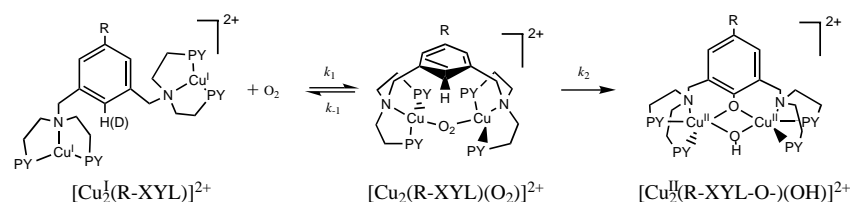
Abbildung 11. Schematische Darstellung der relevanten Schritte der O_2 -Bindung an Desoxy-Hämocyanin. Die Lokalisierung der ungepaarten Elektronen ist jeweils durch Pfeile angedeutet (aufwärts: α ; abwärts: β). S/T-ISC = Singulett/Triplett-Intersystem-Crossing. In abgewandelter Form aus Lit. [53] übernommen.



Schema 3. Wichtige Cu/ O_2 -Spezies bei der Disauerstoff-Aktivierung.

vorliegen (Schema 3C).^[23] Wie in Abschnitt 2.1 für die Side-on-Peroxo- Cu_2^{II} -Struktur besprochen, wurden die elektronischen Strukturen der drei Peroxo-Spezies in Schema 3 durch spektroskopische Methoden in Verbindung mit DFT-Rechnungen aufgeklärt.^[24–26] Hier betrachten wir nun, wie diese elektronischen Strukturen zur Peroxid-Aktivierung bei der elektrophilen Hydroxylierung und der H-Atom-Abspaltung beitragen, und beschreiben die elektronischen Unterschiede sowie deren Einfluss auf die unterschiedlichen Reaktivitäten.

Das zweikernige Cu-XYL-Modellsystem $[Cu_2^I(NO_2-XYL)]$ (Schema 4; XYL = *N,N,N',N'*-Tetra(2-pyridylethyl)-3,5-di(aminomethyl)phenyl) von Karlin et al. kann den aromati-



Schema 4. Die elektrophile aromatische Hydroxylierung. PY = Pyridinyl. Wiedergegeben aus Lit. [58].

schen Ring des Liganden nach einem elektrophilen Mechanismus ähnlich dem der Tyrosinase hydroxylieren.^[57] Bei tiefen Temperaturen und mit einer elektronenziehenden Gruppe ($R = NO_2$) am Ring in *para*-Stellung zur zu hydroxylierenden Position kann eine Sauerstoff-Zwischenstufe stabilisiert werden. Ihr Absorptionsspektrum (Abbildung 12A) ist dem der Side-on-Peroxo- Cu_2^{II} -Einheiten von Oxy-Hämocyanin und Oxy-Tyrosinase sehr ähnlich, zeigt aber eine zusätzliche Bande bei ca. 430 nm für das Bis- μ -oxo- Cu_2^{III} -Isomer. Diese Möglichkeit konnte experimentell durch Resonanz-Raman-Spektroskopie mit Einstrahlung in diese Bande eruiert werden (Abbildung 12B).^[58] Die Bis- μ -oxo- Cu_2^{III} -Spezies sollte eine intensive Cu_2O_2 -Gerüstschwingung bei ca. 600 cm^{-1} geben, die aber in Abbildung 12B nicht vorhanden ist. Die Absorptionsbande bei ca. 400 nm ist also mit der Side-on-Peroxo- Cu_2^{II} -Struktur verknüpft und rührt von einer Schmetterlingsverzerrung des $Cu_2(O_2)$ -Kerns.^[59] Aus dem Hintergrundrauschen im Raman-Spektrum (Abbildung 12B) kann man als obere Grenze für die im Cu-XYL-

System vorhandene Menge dieser Bis- μ -oxo- Cu_2^{III} -Spezies einen Wert von $<0.1\%$ abschätzen.

Anhand der O-O-Schwingung der Side-on-Peroxo-Spezies bei 747 cm^{-1} konnte die zeitliche Änderung der Hydroxylierung verfolgt werden. Aus Abbildung 12C und D geht hervor, dass die Intensität der $\nu(O-O)$ -Bande abnimmt, während die der $\nu(C-O)$ -Bande des hydroxylierten Rings

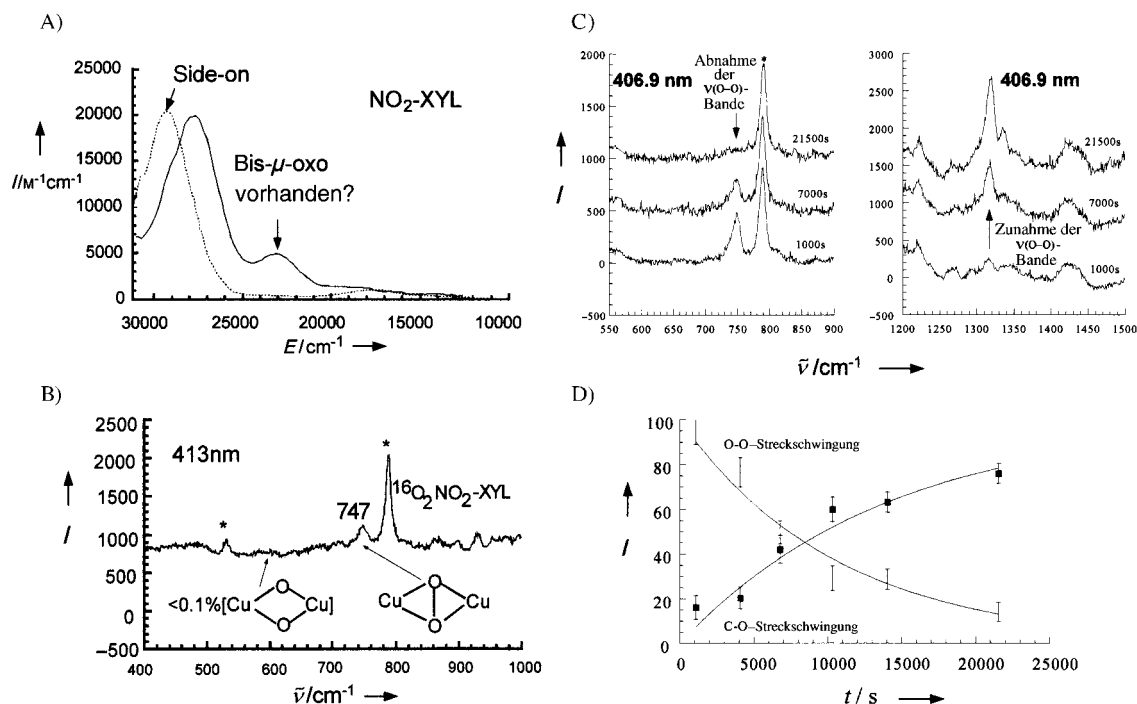


Abbildung 12. A) Absorptionsspektren von $[\text{Cu}_2(\text{NO}_2\text{-XYL})(\text{O}_2)]^{2+}$ und $\mu\text{-}\eta^2\text{:}\eta^2\text{-side-on-Peroxo-verbrückten Cu}^{\text{II}}$ -Modellkomplexen. B) Resonanz-Raman-Spektrum von $[\text{Cu}_2(\text{NO}_2\text{-XYL})(\text{O}_2)]^{2+}$ (Anregung bei 413 nm). C) Zeitabhängigkeit des Resonanz-Raman-Signals von $[\text{Cu}_2(\text{NO}_2\text{-XYL})(\text{O}_2)]^{2+}$ im Verlauf der Hydroxylierung. D) Entwicklung der O-O- und C-O-Schwingungsbanden im Resonanz-Raman-Spektrum von $[\text{Cu}_2(\text{NO}_2\text{-XYL})(\text{O}_2)]^{2+}$. Wiedergegeben aus Lit. [58].

zunimmt. Somit hydroxyliert entweder die Side-on-Peroxo-Verbindung den Ring direkt, oder sie steht im raschen Gleichgewicht mit der Bis- μ -oxo-Struktur. Da diese nur zu <0.1% vorliegt, müsste sie dann allerdings um Größenordnungen reaktiver als die Side-on-Peroxo-Spezies sein, um für die Hydroxylierung verantwortlich zu sein.

Die relativen Reaktivitäten der Side-on-Peroxo-, der Bis- μ -oxo- und der $\text{Cu}^{\text{II}}\text{-OOH}$ -Struktur (Schema 3) konnten mit Hilfe der Grenz molekularorbital(FMO)-Theorie ermittelt werden.[25, 26, 58] Wie in Abbildung 13 gezeigt, beinhaltet ein elektrophiler Mechanismus die Wechselwirkung des HOMO des Donor-Substrats mit dem LUMO des Acceptors, im Fall von Cu-XYL-Systemen mit dem des Cu_2O_2 -Gerüsts.[58] Ein elektrophiler Angriff auf den aromatischen Ring des

Cu-XYL-Modellkomplexes in Schema 4 erfordert eine gute π -Überlappung der Valenzorbitale. Dies wiederum setzt Sauerstoff- π -Charakter im LUMO der Metalleinheit voraus. Wie in Abbildung 4 dargestellt und in Abschnitt 2.1 für die Side-on-Peroxo-Struktur beschrieben, resultiert dieser π -Charakter aus der starken Donor-Wechselwirkung zwischen dem Peroxid- π^*_σ -Orbital und dem aus dem $d_{x^2-y^2}$ -Orbital abgeleiteten LUMO der Kupfereinheit (Abbildung 14, Mitte). Je niedriger die Energie des LUMO und je höher der Mischungskoeffizient des Peroxid- π^*_σ -Orbitals mit diesem LUMO, desto größer ist die Aktivierung für eine aromatische elektrophile Hydroxylierung. Die Energie und der π^*_σ -Charakter dieses Orbitals spiegeln sich direkt in der Energie bzw. der Intensität des $\text{O}_2^{2-}\text{-}\pi^*_\sigma \rightarrow \text{Cu}^{\text{II}}$ -Charge-Transfer-Übergangs

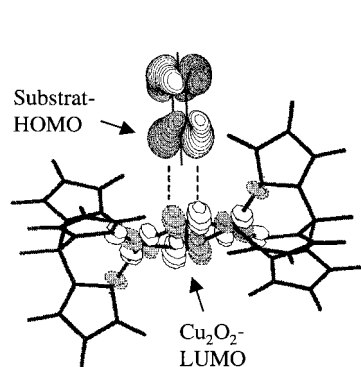


Abbildung 13. Grenz molekularorbitale mit π -Überlappung des Benzol-HOMO und des LUMO des $\mu\text{-}\eta^2\text{:}\eta^2\text{-side-on-verbrückten Peroxo-Cu}^{\text{II}}$. Der Side-on-Komplex wird durch das $[\text{Cu}_2(\text{HBPz}_3)_2(\text{O}_2)]$ -Molekül in der hier gezeigten DFT-Rechnung modelliert. HBPz₃ = Hydrotris(3,5-dialkyl-1-pyrazolyl)borat.

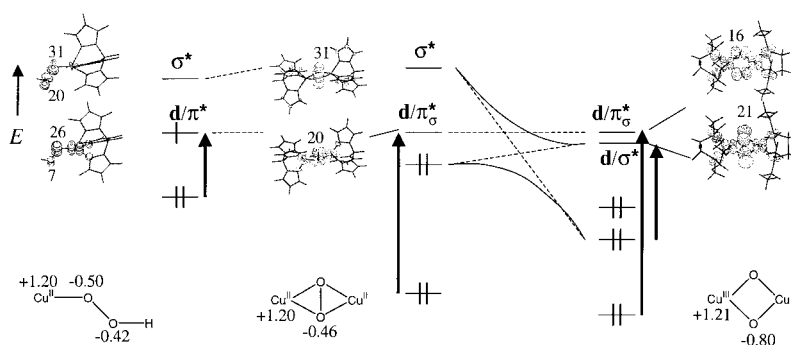


Abbildung 14. Valenz molekularorbital-Energiediagramme von Hydroperoxo-, Side-on-Peroxo- und Bis- μ -oxo-Kupferspezies. Die Atombeiträge sind an den einzelnen MOs angegeben (oben), die Atomladungen an den chemischen Strukturen (unten). Die Molekülorbitale sind durch die wesentlichen Beiträge ihrer Fragmente gekennzeichnet, so ist d/π^* ein Cu-d-Orbital mit signifikantem Peroxid- π^* -Beitrag. Die benutzten Modellkomplexe sind $[\text{Cu}(\text{HBPz}_3)(\text{OOH})]$, $[\text{Cu}_2(\text{HBPz}_3)_2(\text{O}_2)]$ und $[(\text{LME})_2\text{Cu}_2\text{O}_2]^{2+}$. $\text{LME} = N,N'$ -Dimethyl- N,N' -diethylcyclohexyldiamin.

wider, wie in Abschnitt 2.1 für die Side-on-Peroxo-Struktur besprochen und in Abbildung 15 dargestellt wurde. Untersuchungen der äquivalenten spektroskopischen und elektronischen Strukturen von Cu^{II} -Hydroperoxid-^[26] und Bis- μ -oxo- Cu_2^{III} -Einheiten^[25] in Modellkomplexen führten zu den elektronischen Strukturen auf der linken bzw. rechten Seite in

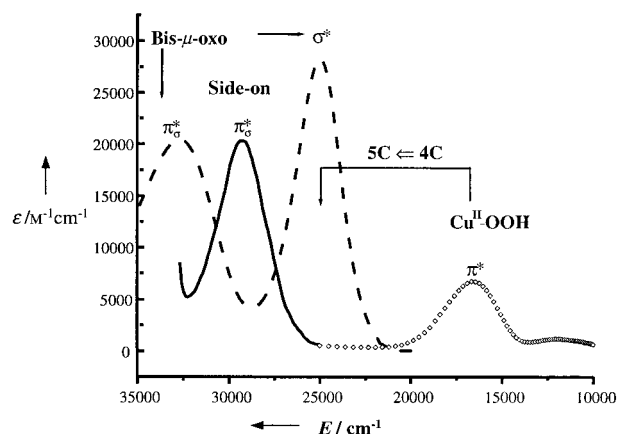


Abbildung 15. Absorptionsspektrum von Side-on-Peroxo- Cu^{II} -, Bis- μ -oxo- Cu_2^{III} - und Hydroperoxo- Cu^{II} -Komplexen. Man beachte, dass das Spektrum des Hydroperoxo- Cu^{II} -Komplexes das einer vierfach koordinierten Spezies ist, während die anderen Spezies fünffach koordiniert sind. Die Charge-Transfer-Übergänge werden beim Übergang von der Vierfach- zur Fünffach-Koordination um $8000\text{--}10000\text{ cm}^{-1}$ verschoben, wie durch den Pfeil für den Hydroperoxo- Cu^{II} -Komplex angedeutet wird.

Abbildung 14 und den entsprechenden Charge-Transfer-Absorptionsspektren in Abbildung 15. Für äquivalente Ligandumgebungen sind die Energien der LUMOs aller drei Spezies ähnlich. Das LUMO des Hydroperoxid- Cu^{II} -Komplexes weist allerdings am nichtkoordinierten, für den Angriff auf das Substrat zur Verfügung stehenden Sauerstoffatom nur sehr wenig π^* -Charakter auf. Daher sollte diese Hydroperoxid- Cu^{II} -Spezies beim elektrophilen π -Angriff auf aromatische Substrate keine Rolle spielen (Abbildung 16). Dagegen weisen sowohl die Side-on-Peroxo- als auch die Bis- μ -oxo-Struktur LUMOs mit ähnlichem π^* -Peroxid-Charakter auf und sollten daher ähnlich gut für eine elektrophile aromatische Hydroxylierung aktiviert sein. Allerdings gibt es in der Grenz-molekülorbitaltheorie einen Ladungsterm, und da die Sauerstoffatome der Bis- μ -oxo-Struktur negativer sind, d. h. mehr Oxid-Charakter aufweisen, würde dies die Bis- μ -oxo-Struktur gegenüber der Side-on-Peroxo-Struktur bei der aromatischen Hydroxylierung benachteiligen (Abbildung 16). Für das Cu-XYL-System von Karlin ist daher klar, dass die Side-on-Peroxo- Cu_2^{III} -Spezies für die aromatische Hydroxylierung verantwortlich ist. Ihre Konzentration ist um mehr als drei Größenordnungen höher als die der Bis- μ -oxo-Spezies, und sie sollte aufgrund der Ladungsdifferenz am Sauerstoffatom reaktiver sein. Die Untersuchungen werden nun auf Oxy-Tyrosinase ausgedehnt, um zu bestimmen, ob die Substratkoordination die Art der an der Hydro-

xylierung des Phenolrings beteiligten Sauerstoffspezies beeinflusst.

Abbildung 14 zeigt, dass für die Kupfer-Sauerstoff-Spezies ein zusätzlicher elektronischer Pfad für den elektrophilen Angriff auf Substrate über das LUMO+1 existiert. Die Protonierung des Peroxids in Cu^{II} -OOH und die erhebliche Ladungsübertragung auf die Kupferatome in der Side-on-Peroxo-Struktur erniedrigen die Energie des Peroxid- σ^* -Orbitals stark.^[26, 60] Dies führt zur Rückbindung in der Side-on-Peroxo-Struktur (siehe Abschnitt 2.1); in der Bis- μ -oxo-Spezies wurde die O-O-Bindung aufgrund der Rückbindung gespalten, und das σ^* -Orbital ist energetisch stark abgesenkt, sodass es nun mit dem einen signifikanten σ^* -Charakter aufweisenden LUMO wechselwirken kann.^[25] Experimentell belegen dies die Charge-Transfer-Spektren der Bis- μ -oxo-Spezies (Abbildung 15), wobei die neue, intensive Bande bei niedriger Energie (ca. 25000 cm^{-1}) den σ^* -Charakter des LUMO widerspiegelt. Der σ^* -Pfad (Abbildung 17) erfordert eine gute σ -Überlappung mit dem Substrat und könnte z. B. in Reaktionen, die einen Oxo-Transfer auf das freie Elektronenpaar eines Phosphans beinhalten, eine Rolle spielen. Aus Abbildung 17 ist ersichtlich, dass sowohl die Hydroperoxid- Cu^{II} - als auch die Side-on-Peroxo- Cu_2^{III} -Spezies in ähnlichem Ausmaß für einen elektrophilen σ -Angriff aktiviert sind, wie auch experimentell festgestellt wurde.^[26, 61] Aufgrund der niedrigen Energie des auf einem σ^* -Orbital basierenden LUMO der Bis- μ -oxo- Cu_2^{III} -Struktur ist ein elektrophiler σ -Angriff stark begünstigt. Dies wird durch den Ladungsterm noch verstärkt (Abbildung 18), da das Phosphoratom in PR_3 partiell positiv geladen ist. Ein Vergleich der Abbildungen 17 und 18 deutet auf einen großen Unterschied in der Reaktivität dieser Kupfer-Sauerstoff-Spezies gegenüber einem elektrophilen Angriff von σ - und π -Donor-Substraten hin.^[62]

Es sollte darauf hingewiesen werden, dass sterische Faktoren die σ -Wechselwirkung sterisch anspruchsvoller Substrate

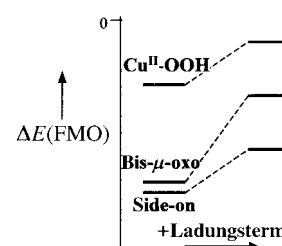


Abbildung 16. Qualitative Grenz-molekülorbitalanalyse der relativen Reaktivitäten (je negativer ΔE desto reaktiver) unterschiedlicher Cu/O_2 -Spezies in Bezug auf einen π^* -elektrophilen Angriff (links: der FMO-Term; rechts: unter Einbeziehung des Ladungsterms).

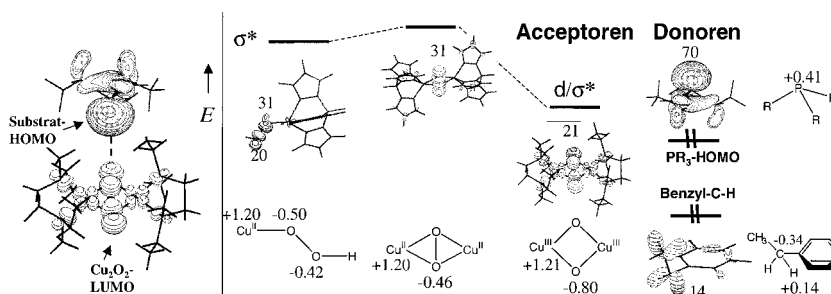


Abbildung 17. Links: Grenz-molekülorbitale weisen auf eine σ -Überlappung des Phosphan-HOMO und des Bis- μ -oxo- Cu_2^{III} -LUMO hin. Rechts: Valenz-molekülorbital-Energiediagramme von Hydroperoxo-, Side-on-Peroxo- und Bis- μ -oxo- Cu -Spezies und relevanten Substraten zur Veranschaulichung des σ^* -Pfades. Die Atombeiträge sind an den einzelnen MOs angegeben, die Atomladungen an den chemischen Strukturen.

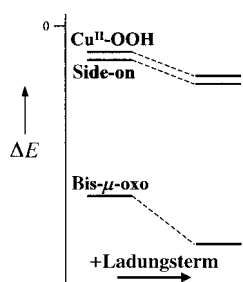


Abbildung 18. Qualitative Grenzmo­lek­u­lar­or­bi­tal­ana­ly­se der relativen Reaktivitäten unterschiedlicher Cu/O₂-Spezies in Bezug auf σ*-elektrophilen Angriff (links: der FMO-Term; rechts: unter Einbeziehung des Ladungsterms).

mit dem kompakten Bis-μ-oxo-Cu₂^{III}-Kern einschränken können.^[62] Für die H-Atom-Abspaltung wäre dies allerdings weniger wichtig. Hier können dieselben Pfade über das σ-LUMO (Abbildung 17) benutzt werden, was zu ganz ähnlichen Reaktivitäten für die unterschiedlichen Kupfer-Sauerstoff-Spezies führen würde (Abbildung 18). Die Bis-μ-oxo-Spezies wäre die effektivste, da sie das energetisch niedrigst liegende σ*-LUMO und den günstigsten Ladungsterm aufweist. Der Grenzmo­lek­u­lar­or­bi­tal­the­o­rie zu­fol­ge sollte die Side-on-Peroxo-Spezies weniger aktiv sein, und wie in

Abbildung 19 gezeigt (und in Abschnitt 4.2.3 weiter ausgeführt), sollte eine zusätzliche starke Franck-Condon-Aktivierungsbarriere mit der reduktiven Ein-Elektronen-Spaltung der O-O-Bindung einhergehen.^[25]

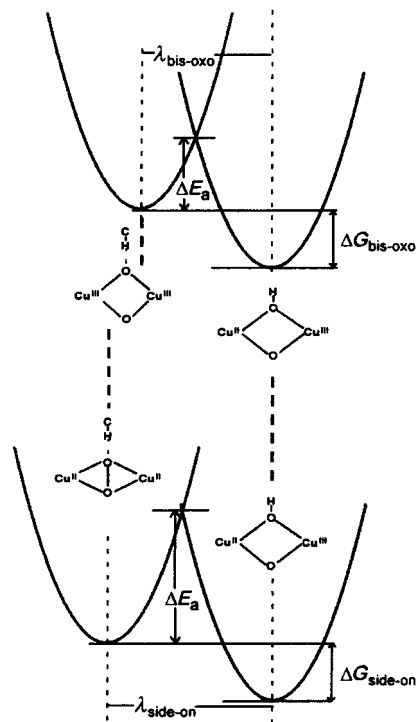
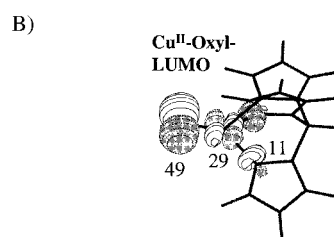
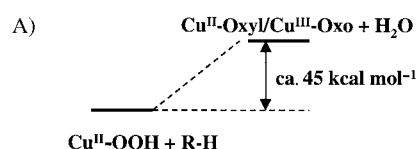


Abbildung 19. Schematische Darstellung der Franck-Condon-Barrieren der Bis-μ-oxo- (oben) und der Side-on-Peroxo-Spezies (unten) für eine H-Atom-Abspaltung. λ = geometrische Verzerrung. In abgewandelter Form aus Lit. [25] übernommen.

Schließlich wurde die H-Atom-Abspaltung durch die Cu^{II}-OOH-Spezies als energetisch unvorteilhaft berechnet (Abbildung 20 A).^[26] Es würde eine Cu^{II}-Oxyl-Spezies gebildet, die nur durch eine π-Wechselwirkung zwischen Kupfer und Sauerstoff (siehe LUMO in Abbildung 20 B) stabilisiert wäre. Für DβH und PHM ist also entweder die Cu^{II}-Oxyl/Cu^{III}-Oxo-Zwischenstufe geometrisch oder aufgrund des Methionin-



	Cu	Pz ^{ax}	O	OH	Pz ^{eq} × 2	BH
Cu ^{II} -OOH	1.20	-0.41	-0.51	0	-0.37	0.44
Cu ^{II} -Oxyl	1.25	-0.40	-0.64	-	-0.33	0.44
Cu ^{II} -Oxid	0.79	-0.45	-0.83	-	-0.45	0.38

Abbildung 20. A) Berechnete Energieänderung für die H-Atom-Abspaltung durch Cu^{II}-OOH. B) Auf dem B3LYP-Niveau berechnetes LUMO der formalen, durch H-Atom-Abspaltung gebildeten Cu^{II}-Oxyl-Spezies mit Angabe der Atombeiträge. Die Tabelle gibt die berechneten Atomladungen *Q* wichtiger Spezies wieder. Die Cu^{II}-Oxyl-Spezies wurde in dieser Rechnung durch den [Cu(HBPz₃)]-Oxyl-Komplex modelliert.

Liganden an Cu_M zusätzlich stabilisiert, oder ein alternativer Mechanismus für die Hydroxylierung der Substrate durch diese Enzyme muss postuliert werden.

4. O₂-Reduktion zu H₂O

4.1. Das aktive Zentrum mit dreikernigem Kupfercluster

Wie in der Einleitung bereits erwähnt, weisen die mehrkernigen kupferhaltigen Oxidasen drei Typen von Kupferzentren (Typ 1–3) auf, wobei es sich beim Typ 3 um ein gekoppeltes zweikerniges Kupferpaar handelt.^[7] In früheren Untersuchungen haben wir gezeigt, dass die Typ-2- und Typ-3-Zentren einen dreikernigen Kupfercluster bilden, der eine bedeutende Rolle bei der Reduktion von Disauerstoff zu Wasser durch mehrkernige kupferhaltige Oxidasen spielt.^[63, 64] Dies wurde nun durch Röntgenstrukturanalysen der drei Oxidasen Laccase aus Pilzen,^[65] Caeruloplasmin^[32] und Ascorbat-Oxidase^[9] bestätigt. Die Strukturen zeigten auch, dass das entfernte Typ-1-Kupferzentrum mit dem dreikernigen Kupfercluster über den Cys-His-Elektronenübertragungspfad verbrückt ist (Abbildung 1 D). Unter Verwendung des T1Hg-Derivats,^[36] bei dem das Typ-1-Kupferzentrum durch das redox- und spektroskopisch inaktive Quecksilberion ersetzt wurde, konnten spektroskopische und kristallographische Befunde korreliert werden, um so Einsichten in die elektronische Struktur des dreikernigen Kupferclusters zu erhalten.^[66] Magnetischer Circular dichroismus (MCD) bei niedriger Temperatur reagiert empfindlich auf paramagnetische Zentren und kann damit selektiv die Ligandenfeldübergänge von Typ-2-Kupfer (*S* = 1/2) sondieren

(Abbildung 21 A, oben). Die Reduktion des Typ-2-Zentrums im T1Hg-Derivat führt zu keiner Änderung im CD-Spektrum, was darauf hindeutet, dass die beobachteten Banden (Abbildung 21 A, unten) Ligandenfeldübergänge der beiden oxidierten Typ-3-Kupferzentren sind. Diese Übergänge sind wegen der verzerrten Geometrie des Typ-3-Kupfers (siehe unten) sowohl im Absorptions- wie auch im CD-Spektrum relativ intensiv, tragen aber nicht zum Tieftemperatur-MCD-Signal bei, da diese Kupferzentren magnetisch gekoppelt vorliegen und einen diamagnetischen $S=0$ -Grundzustand aufweisen. Durch Ligandenfeldrechnungen wurde aus den Übergangsenergien in Abbildung 21 A eine Beschreibung der elektronischen Struktur des dreikernigen Kupferclusters in Abbildung 21 B erhalten.^[67] Das dreifach koordinierte Typ-2-Kupferzentrum (zwei His-, ein H_2O -Ligand) weist einen $d_{x^2-y^2}$ -Grundzustand und eine quadratisch-planare Koordinationsumgebung mit einer den beiden Typ-3-Kupferzentren zugewandten, unbesetzten Koordinationsstelle auf. Die Typ-3-Kupferzentren sind vierfach koordiniert (drei His-, ein $\mu\text{-OH}$ -Ligand), und ihre elektronischen Strukturen können am besten als trigonal-bipyramidal mit unbesetzten äquatorialen Koordinationsstellen in Richtung der Typ-2-Kupferzentren beschrieben werden. Beide Typ-3-Kupferzentren haben d_{z^2} -

Grundzustände, die für starke antiferromagnetische Kopplung über das verbrückende OH^- -Ion ausgerichtet sind. So ist der dreikernige Kupfercluster bestens orientiert, um mit Disauerstoff verbrückte Zwischenstufen zu bilden. Neuere DFT-Rechnungen stützen diese Beschreibung (Abbildung 21 C). Man beachte, dass es sich hierbei um Rechnungen mit gebrochener Symmetrie und uneingeschränktem Spin („spin-unrestricted broken symmetry“) handelt, bei denen die drei unbesetzten Orbitale zusammen die Spinverteilungen an den drei Kupferatomen des Trimers widerspiegeln, d. h., zwei Typ-3-Kupferatome sind antiferromagnetisch gekoppelt, und das Typ-2-Kupferatom wechselwirkt mit diesen nur schwach. Weiterhin ergaben diese Rechnungen eine Mischung der 4p-Orbitale für die beiden Typ-3-Kupferzentren entlang der koordinativ ungesättigten Positionen, welche für die Bindung des Liganden wichtig sein könnten. Wie bei Hämocyanin (Abschnitt 2.2) besteht eine Funktion des Proteins darin, die Kupferatome des Clusters zusammenzuhalten. Die daraus resultierenden abstoßenden Wechselwirkungen könnten im Cluster gebundene anionische Sauerstoff-Zwischenstufen stabilisieren.^[68]

4.2. O_2 -Reduktion

Die Reaktionen der vollständig reduzierten nativen Laccase (reduzierte Typ-1-Zentren, reduzierter dreikerniger Cluster) und des vollständig reduzierten T1Hg-Laccase-Derivats (reduzierter dreikerniger Cluster) mit Disauerstoff führen zu unterschiedlichen Zwischenstufen (der nativen bzw. der T1Hg-Zwischenstufe; Absorptionsspektren siehe Abbildung 22 A).^[35, 37, 69, 70] Im Unterschied zum T1Hg-Derivat weist das native Enzym ein redoxaktives Typ-1-Zentrum auf, welches in dieser Reaktion oxidiert wird (die Typ-1-Absorptionsbande bei ca. 600 nm wächst mit der gleichen Geschwindigkeit wie die der Sauerstoff-Zwischenstufe bei 360 nm). Das bedeutet, dass der Disauerstoff in der nativen Zwischenstufe mindestens um ein Elektron stärker reduziert vorliegt als in der T1Hg-Zwischenstufe. Wie aus Abbildung 22 B hervorgeht, werden allerdings beide Zwischenstufen nahezu gleich schnell gebildet ($k \approx 2 \times 10^6 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$).^[71] Die Bildung der T1Hg-Sauerstoff-Zwischenstufe könnte damit der geschwindigkeitsbestimmende Schritt bei der Reduktion von O_2 sein, und die Elektronenübertragung vom entfernten Typ-1-Kupferatom über die $>13 \text{ \AA}$ lange Cys-His-Einheit auf den dreikernigen Kupfercluster wäre sehr schnell ($>10^3 \text{ s}^{-1}$). Wie in Abschnitt 4.2.1 zusammengefasst, deuten spektroskopische Daten darauf hin, dass die T1Hg-Sauerstoff-Zwischenstufe eine an den dreikernigen Kupfercluster gebundene Peroxoverbindung mit zu Oxy-Hämocyanin unterschiedlicher geometrischer und elektronischer Struktur ist. In Abschnitt 4.2.2 werden diese Untersuchungen zur Bestimmung der Natur der nativen Zwischenstufe weiter ausgeführt. Es

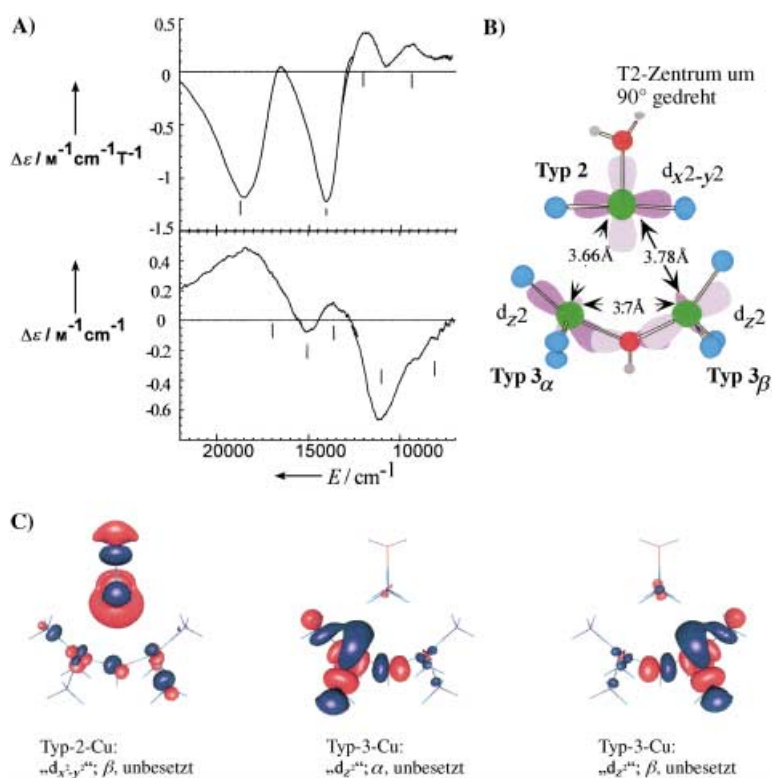


Abbildung 21. A) Ligandenfeldübergänge (die zugehörigen Energien sind durch senkrechte Linien markiert) des dreikernigen Clusters: Tieftemperatur-MCD- (oben) und Raumtemperatur-CD-Spektrum (unten), das Typ-2 bzw. die Typ-3-Cu-Übergänge zeigt. Man beachte, dass es mehr als vier Ligandenfeldübergänge im CD-Spektrum gibt, d. h. die beiden Typ-3-Cu-Zentren sind nicht äquivalent. B) Aus dem Ligandenfeld abgeleitete elektronische Struktur des dreikernigen Clusters. Das HOMO jedes Cu-Atoms ist dargestellt. Wiedergegeben aus Lit. [67]. C) Oberflächen-Darstellungen der unbesetzten MOs, erhalten aus uneingeschränkten (unrestricted) DFT-Rechnungen. Die Überlagerung dieser MOs ist im Einklang mit dem Ergebnis der Ligandenfeldrechnungen unter B) unter Berücksichtigung einer zusätzlichen 4p-Mischung entlang der koordinativ ungesättigten Positionen eines jeden Typ-3-Kupferzentrums.

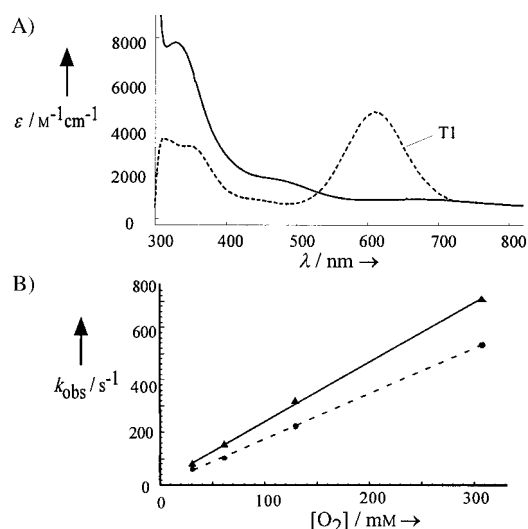


Abbildung 22. A) Absorptionsspektren der Peroxid-Zwischenstufe (—) in T1Hg-Laccase und der nativen Zwischenstufe (---) in nativer Laccase. Die Absorptionsbande bei 600 nm in der nativen Zwischenstufe stammt vom Typ-1-Cu-Zentrum. B) Bildungsgeschwindigkeit der Peroxid- (▲, —) und der nativen Zwischenstufe (●, ---) als Funktion der O_2 -Konzentration. In abgewandelter Form aus Lit. [66] übernommen. Die Geschwindigkeitskonstanten zweiter Ordnung betragen $2.2 \times 10^6 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ für die Peroxid-Zwischenstufe und $1.7 \times 10^6 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ für die native Zwischenstufe.

handelt sich hierbei, wie gezeigt werden wird, um eine vollständig oxidierte Form des Enzyms, die sich aber vom vollständig oxidierten Ruhezustand unterscheidet. Die Untersuchungen führen zu einem Mechanismus für die Vier-Elektronen-Reduktion von Disauerstoff zu Wasser und zu Einblicken in die reduktive Spaltung der O-O-Bindung (Abschnitt 4.2.3).

4.2.1. Die Peroxid-Zwischenstufe: Vergleich mit Oxy-Hämocyanin

Isotopenverhältnis-Massenspektrometrie (IRMS)-Messungen zufolge finden sich beide Sauerstoffatome des O_2 -Moleküls in der T1Hg-Sauerstoff-Zwischenstufe wieder, bei der es sich somit um einen Superoxo- oder einen Peroxozustand handelt. Diese beiden Möglichkeiten konnten CD/MCD-spektroskopisch im Ligandenfeldbereich (Abschnitt 4.1) unterschieden werden. Alle Ligandenfeldübergänge der Typ-3-Kupferzentren sind im CD-Spektrum der T1Hg-Zwischenstufe vorhanden (Abbildung 23 A); beide Typ-3-Kupferzentren liegen also oxidiert vor. Das Tieftemperatur-MCD-Spektrum der Zwischenstufe (Abbildung 23 B) zeigt jedoch keine Typ-2-Merkmale (was damit übereinstimmt, dass im EPR-Spektrum kein Typ-2-Signal auftritt), was auf Typ-2-Kupfer in der reduzierten Form hinweist. Zwei Elektronen wurden von den Typ-3-Kupferzentren auf O_2 übertragen, es handelt sich somit um eine Peroxid-Zwischenstufe.^[37]

Messungen der magnetischen Suszeptibilität (SQUID) wurden zur Untersuchung der magnetischen Wechselwirkungen zwischen den beiden oxidierten Typ-3-Kupferzentren dieser Peroxid-Zwischenstufe eingesetzt. Der Sättigungsmagnetisierung und Curie-Diagrammen (bezogen auf das voll-

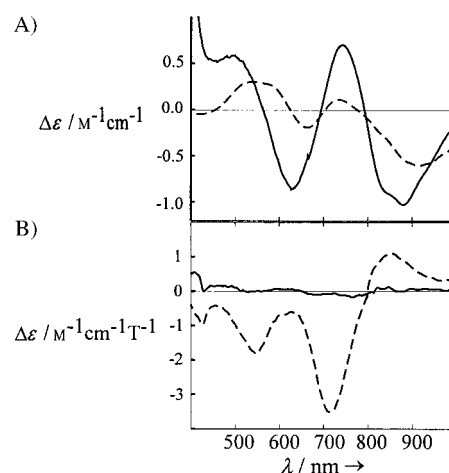


Abbildung 23. Vergleich der Ligandenfeldübergänge in der Peroxid-Zwischenstufe (—) und der T1Hg-Laccase im Ruhezustand (---). A) Raumtemperatur-CD-Spektren, die die Ligandenfeldübergänge des Typ-3-Cu-Zentrums zeigen; B) Tieftemperatur-MCD-Spektren, die die Ligandenfeldübergänge des Typ-2-Cu-Zentrums zeigen. In abgewandelter Form aus Lit. [37] übernommen.

ständig oxidierte T1Hg-Derivat) zufolge sind die beiden oxidierten Typ-3-Zentren der Peroxid-Zwischenstufe stark antiferromagnetisch gekoppelt ($-2J > 200 \text{ cm}^{-1}$). Diese Austauschkopplung erfordert einen verbrückenden Liganden zwischen den beiden Typ-3-Cu^{II}-Zentren. Die Verbrückung wurde durch Röntgenabsorptionsspektroskopie (XAS) an der T1Hg-Peroxid-Zwischenstufe untersucht. Die Fourier-Transformation des EXAFS-Spektrums (EXAFS = extended X-ray absorption fine structure) der Zwischenstufe liefert eine intensive Außenschalenbande bei ca. 3.4 Å (korrigiert bezüglich Phasenverschiebung; Abbildung 24), die weder beim

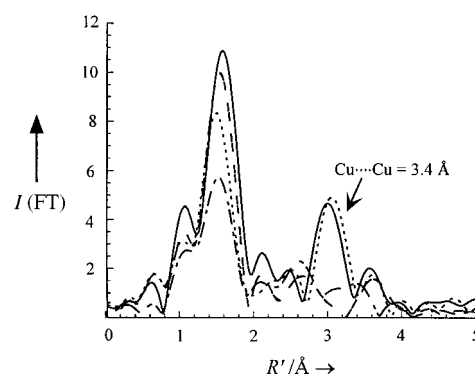


Abbildung 24. EXAFS-Spektren ($I(\text{FT})$ = Intensität des Fourier-transformierten Signals) der oxidierten T1Hg-Laccase (---), der Peroxid-Zwischenstufe (●●●), des Peroxid-Addukts (—) und der reduzierten T1Hg-Laccase (●—). Wiedergegeben aus Lit. [67].

oxidierten Ruhezustand noch beim reduzierten dreikernigen Kupfercluster auftritt. Hier muss ein fest gebundener verbrückender Ligand zwischen zwei Kupferatomen vorliegen. Es kann sich nicht um das μ -Hydroxidion der oxidierten dreikernigen Kupfereinheit (Abbildung 21 B) handeln, da dieses nicht den günstigen Debye-Waller-Faktor aufweist, der für die Beobachtung einer Außenschalenbande notwendig ist. Es sind also zwei Kupferatome der Peroxid-Zwischen-

stufe der T1Hg-Laccase über das Peroxid in einem Cu-Cu-Abstand von 3.4 Å fest verbrückt.^[37]

Dem Antiferromagnetismus zufolge sind die beiden oxidierten Typ-3-Kupferzentren verbrückt. Die Möglichkeit einer Verbrückung zwischen den Typ-3- und dem Typ-2-Kupferzentrum ist in der Peroxid-Zwischenstufe schwieriger nachzuweisen, da das Typ-2-Kupferzentrum reduziert ist. Das Peroxid bindet jedoch an den oxidierten dreikernigen Kupfercluster des T1Hg-Derivats im Ruhezustand und bildet ein Peroxid-Addukt.^[67] Dieses Addukt weist die gleiche intensive Außenschalen-EXAFS-Bande auf wie die T1Hg-Peroxid-Zwischenstufe (Abbildung 24), was auf eine ähnliche Peroxidverbrückung hinweist. Im Peroxid-Addukt ist das Typ-2-Kupferzentrum oxidiert und paramagnetisch und kann daher durch Tieftemperatur-MCD- (siehe Abschnitt 4.1) und EPR-Spektroskopie sowie andere Methoden untersucht werden. Aus den EPR-Daten in Abbildung 25 A geht hervor, dass sich

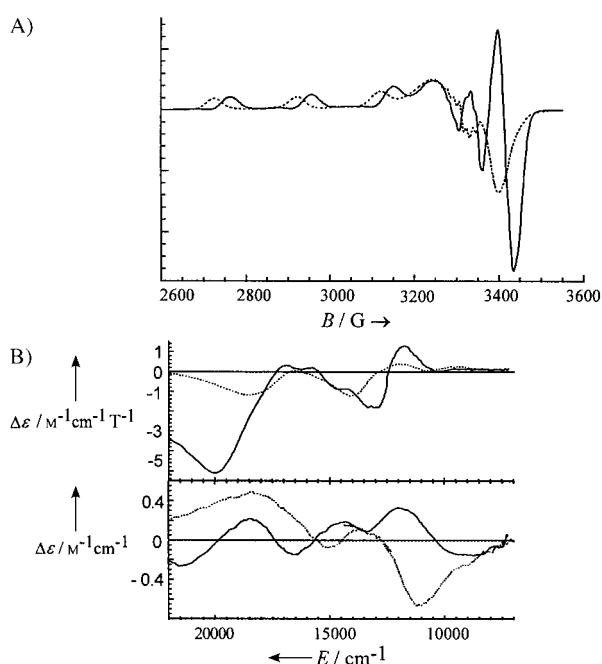


Abbildung 25. Vergleich des Peroxid-Addukts von T1Hg-Laccase (—) und der T1Hg-Laccase im Ruhezustand (••••). A) EPR- und B) Tieftemperatur-MCD-Spektren von Typ-2-Cu (oben) und Raumtemperatur-CD-Spektren von Typ-3-Cu (unten). Wiedergegeben aus Lit. [67].

die Koordinationsumgebung des Typ-2- Cu^{II} -Zentrums bei der Bindung des Peroxids an den oxidierten dreikernigen Cu^{II} -Cluster erheblich, und zwar von rhombisch zu axial ändert. Einer Ligandenfeldanalyse zufolge ist das Typ-2- Cu^{II} -Zentrum in der Peroxid-Form vierfach koordiniert. Dies wird durch die starke Veränderung im Ligandenfeldübergang des Typ-2-Zentrums im Tieftemperatur-MCD-Spektrum bestätigt (Abbildung 25 B, oben). Zusätzlich tritt beim Peroxid-Addukt eine Peroxid $\rightarrow \text{Cu}^{\text{II}}$ -Charge-Transfer-Bande bei 400 nm mit einem starken Tieftemperatur-MCD-Signal auf, was auf die Bindung des Peroxids an das Typ-2- Cu^{II} -Zentrum hinweist. Die Änderungen in den Ligandenfeld-CD-Eigenschaften (Abbildung 25 B, unten) und die Tatsache, dass ein Peroxid $\rightarrow \text{Cu}^{\text{II}}$ -Charge-Transfer-Übergang im Absorptionsspektrum des

Peroxid-Addukts ohne zugehörige Tieftemperatur-MCD-Bande auftritt,^[67] deuten ebenfalls auf eine Bindung des Peroxids an das Typ-3-Zentrum unter Bildung einer Brücke zwischen den Typ-2- und Typ-3-Kupferzentren.

Die oben aufgeführten Untersuchungen führen zu den zwei möglichen, in Abbildung 26 dargestellten Beschreibungen der Peroxid-Zwischenstufe des dreikernigen Kupferclusters in den mehrkernigen kupferhaltigen Oxidasen. In einem Modell

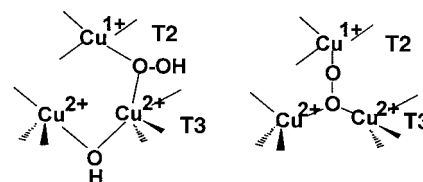


Abbildung 26. Strukturmodelle für die Peroxid-Zwischenstufe in den mehrkernigen kupferhaltigen Oxidasen, in denen die Peroxid-Zwischenstufe Typ-2- und Typ-3-Cu-Zentren verbrückt.

verbrückt das Peroxid intern die Typ-2- und Typ-3-Kupferzentren, wobei die magnetische Kopplung zwischen den oxidierten Typ-3- Cu^{II} -Zentren aus der antiferromagnetischen Kopplung über die Peroxidbrücke resultiert. Alternativ könnten die Typ-3- Cu^{II} -Atome durch die auch im Ruhezustand vorhandene Hydroxidbrücke verbrückt sein (Abbildung 21 B), und das Peroxid würde als Hydroperoxid extern die Typ-2- Cu^{I} - und Typ-3- Cu^{II} -Zentren verbrücken. Rechnungen zur elektronischen Struktur sind noch erforderlich, um zwischen diesen Möglichkeiten zu unterscheiden. Hervorzuheben ist allerdings, dass sich beide Möglichkeiten grundsätzlich in geometrischer und elektronischer Hinsicht von der $\mu\text{-}\eta^2\text{:}\eta^2\text{-side-on-Peroxid-verbrückten}$ Struktur von Oxy-Hämocyanin (Abbildung 3 und 4) unterscheiden, wie ein Vergleich der Charge-Transfer-Spektren der Peroxid-Zwischenstufe und des Oxy-Hämocyanins (Abbildung 27) belegt.

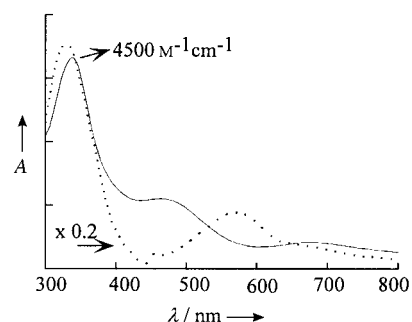


Abbildung 27. Vergleich der Absorptionsspektren der Peroxid-Zwischenstufe in T1Hg-Laccase (—) und der side-on-Peroxid-verbrückten Einheit in Oxy-Hämocyanin (••••). Die 330-nm-Bande im Oxy-Hämocyanin-Spektrum ist zu Vergleichszwecken auf ein Fünftel verkleinert.

Der Charge-Transfer-Übergang der Peroxid-Zwischenstufe bei 340 nm liegt energetisch vergleichsweise hoch, ist aber weniger als ein Fünftel so intensiv wie der Übergang im Oxy-Hämocyanin. Hohe Energie verbunden mit niedriger Intensität erfordert stark bindende Wechselwirkungen zwischen dem Peroxid und nichtchromophoren Atomen (also nicht

Cu^{II}), wie dem Proton im μ -Hydroperoxid oder dem Typ-2-Cu^I-Zentrum in der $\mu(\eta^1)_3$ -Struktur in Abbildung 26. Die niedrige Charge-Transfer-Intensität deutet auf eine schwache Elektronendonator-Wechselwirkung mit den oxidierten Kupferatomen hin (im Unterschied zu Oxy-Hämocyanin), welche die Peroxid-Zwischenstufe am dreikernigen Kupfercluster gegen den reversiblen Verlust von O₂ stabilisiert. Weiterhin wird die Energie des Peroxid- σ^* -Orbitals durch die Protonierung des Peroxids (und/oder seine bindende Wechselwirkung mit dem reduzierten Typ-2-Kupferzentrum) gesenkt und so das Peroxid für die reduktive Spaltung der O-O-Bindung aktiviert. Diese Reaktion ist bei der Peroxid-Zwischenstufe der T1Hg-Laccase sehr langsam (0.0003 s⁻¹ bei pH 7.5), obwohl das Peroxid eine Brücke zu einem reduzierten Typ-2-Kupferatom bildet.^[38] Wie MCD-Untersuchungen ergaben, führt die langsame reduktive Spaltung der Peroxid-Zwischenstufe in T1Hg zu einer der nativen Zwischenstufe ähnlichen Spezies.^[37] Da diese Zwischenstufe im nativen Enzym mit einer Geschwindigkeit von 10⁶ M⁻¹ s⁻¹ gebildet wird (Abbildung 22 B), muss die Reduktion einer Peroxid-Spezies unter Bildung der nativen Zwischenstufe sehr schnell ablaufen (> 350 s⁻¹). Die Art der nativen Zwischenstufe wird im Folgenden beschrieben, wobei der Reaktivitätsunterschied auf die Spaltung der O-O-Bindung durch Ein- bzw. Zwei-Elektronen-Reduktion zurückgeführt werden kann.

4.2.2. Die native Zwischenstufe:

Vergleich mit dem Enzym im Ruhezustand

Aus Abbildung 22 A geht hervor, dass das Typ-1-Kupferzentrum in der nativen Zwischenstufe oxidiert ist und dass damit O₂ mindestens um ein Elektron weiter reduziert vorliegen muss als in der T1Hg-Peroxid-Zwischenstufe. Verbunden mit der Tatsache, dass kein Typ-2-EPR-Signal, dafür aber ein neues, breites, bei Verwendung von ¹⁷O₂ sogar noch stärker verbreitertes EPR-Signal beobachtet werden kann (siehe unten), führte dies dazu, die native Zwischenstufe als eine durch eine Drei-Elektronen-Reduktion gebildete Oxy- oder Hydroxyl-Spezies mit noch reduziertem Typ-2-Kupfer zu beschreiben.^[35, 69] Die Oxidationsstufen der Kupferatome in der nativen Zwischenstufe konnten durch Röntgenabsorptionskanten-Untersuchungen direkt bestimmt werden.^[72] Eine 1s → 4p-Bande bei 8984 eV ist charakteristisch für reduziertes, nicht aber oxidiertes Kupfer. Die Röntgenabsorptionskante der nativen Zwischenstufe von Laccase ist identisch mit der des vollständig oxidierten Enzyms im Ruhezustand (Abbildung 28 A), d.h., alle Kupferatome in der nativen Zwischenstufe sind oxidiert.^[73] O₂ wird daher durch vier Elektronen bis zum H₂O/OH⁻/O₂²⁻-Niveau reduziert.^[34] Weiterhin zeigt die Fourier-Transformation des EXAFS-Spektrums der nativen Zwischenstufe (Abbildung 28 B) eine Außenschalenbande, die im Ruhezustand nicht vorhanden ist und nur durch eine Cu-Cu-Wechselwirkung mit einem Cu-Cu-Abstand von 3.3 Å simuliert werden kann.^[73]

Während die native Zwischenstufe einen vollständig oxidierten dreikernigen Kupfercluster aufweist, unterscheidet sich das EPR-Signal dieser Zwischenstufe sehr von dem des

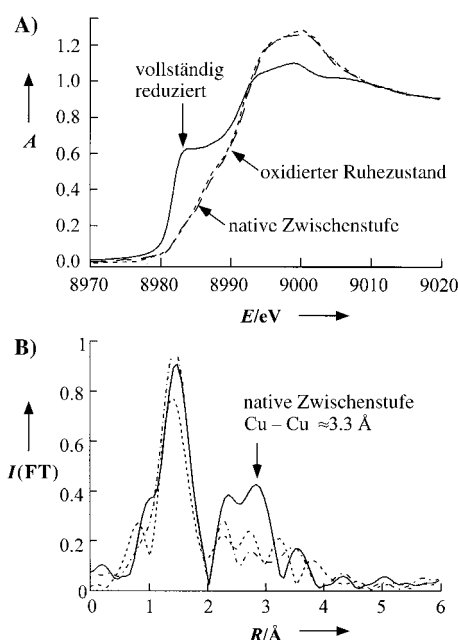


Abbildung 28. A) Cu-K-Absorptionskanten-Daten für die reduzierte (—), die vollständig oxidierte (---) und die (renormalisierte) native Zwischenstufe (----) (korrigiert bezüglich nichtumgesetzter reduzierter Laccase). A = normierte Absorption. B) Fourier-Transformierte (nicht phasenkorrigiert) der EXAFS-Daten für reduzierte Laccase (•-•-), vollständig oxidierte Laccase (---) und die native Zwischenstufe (—). I(FT) = Intensität des Fourier-transformierten Signals. In abgewandelter Form aus Lit. [73] übernommen.

oxidierten dreikernigen Clusters im Ruhezustand mit dem üblichen EPR-Signal für das lokalisierte Typ-2-Cu^{II}-Zentrum (Abbildung 25 A).^[35, 73, 74] Das EPR-Signal der nativen Zwischenstufe (Abbildung 29 A, das Spektrum des oxidierten Typ-1-Zentrums ist abgezogen) ist sehr breit, und die g-Werte sind sehr niedrig (zwei Werte unterhalb 2.00). Aus der Frequenzabhängigkeit der g-Werte ergibt sich für den Grundzustand $S = \frac{1}{2}$.^[73] Das EPR-Signal relaxiert schnell und kann oberhalb 20 K nicht beobachtet werden (Abbildung 29 B). Die schnelle Relaxation deutet auf niedrig liegende angeregte Zustände hin, und durch eine Orbach-Analyse der Temperaturabhängigkeit der Leistungssättigung konnte die Energie dieses Zustands zu ca. 150 cm⁻¹ oberhalb derer des Grundzustands bestimmt werden (Abbildung 29 C).^[73]

Weitere Einblicke in den Grund- und die angeregten Zustände des oxidierten dreikernigen Kupferclusters in der nativen Zwischenstufe konnten aus der Temperatur- und Feldabhängigkeit des MCD-Spektrums gewonnen werden. Das Spektrum der nativen Zwischenstufe weist zusätzlich zur Absorptionsbande des Typ-1-Zentrums bei 600 nm Banden bei 365 und 318 nm auf (Abbildung 30 A, oben), die auf Oxo- oder Hydroxo-Charge-Transfer-Übergänge zu den Cu^{II}-Zentren des dreikernigen Kupferclusters zurückzuführen sind.^[73] Diese Übergänge geben bei niedriger Temperatur eine starke, an ein Ableitungssignal erinnernde MCD-Bande (Abbildung 30 A, unten).^[34, 73] Die Feldabhängigkeit dieser MCD-Banden bei niedriger Temperatur gibt eine Sättigungskurve (Abbildung 30 B), die mit einer Brillouin-Funktion für einen $S = \frac{1}{2}$ -Grundzustand simuliert werden kann.^[73] Die Temperaturabhängigkeit des Hochfeld-MCD-Spektrums ist in Ab-

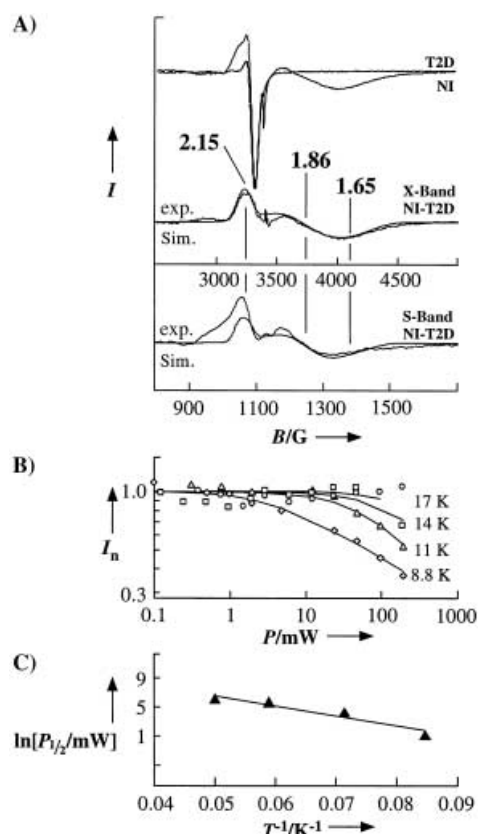


Abbildung 29. A) Oben: Die X-Band-EPR-Spektren der nativen Zwischenstufe (NI) und von T2D-Laccase bei 200 mW und 10 K. Unten: X- und S-Band-EPR-Spektren der nativen Zwischenstufe abzüglich der T2D-Beiträge (NI – T2D). Simulationen der Spektren, die g -Werte von 2.15, 1.86 und 1.65 liefern, sind ebenfalls abgebildet (Sim.). B) Leistungssättigungsstudien an der nativen Zwischenstufe. Die normierten EPR-Intensitäten der nativen Zwischenstufe bei etwa 4000 G sind gegen die Mikrowellenleistung von 0.1 bis 200 mW bei 8.8 (\diamond), 11 (\triangle), 14 (\square) und 17 K (\circ) aufgetragen. C) Die Auftragung von $\ln[P_{1/2}]$ gegen $1/T$ zeigt ein lineares Verhalten, was auf einen niedrig liegenden angeregten Zustand bei ca. 140 cm^{-1} hinweist. In abgewandelter Form aus Lit. [73] übernommen.

bildung 30 C für den Charge-Transfer-Bereich des dreikernigen Kupferclusters dargestellt. Für einkernige $S = 1/2$ -Systeme nimmt das MCD-Signal einfach mit zunehmender Temperatur (proportional $1/T$) ab. Aus Abbildung 30 C geht jedoch hervor, dass die Spektren der nativen Zwischenstufe sich mit zunehmender Temperatur *ändern*. Dies weist auf eine Boltzmann-Besetzung eines angeregten Zustands mit einem von dem des Grundzustands unterschiedlichen MCD-Spektrum hin. Beispielsweise zeigen die Daten bei 25000 cm^{-1} (Abbildung 30 C, Pfeil), dass das MCD-Signal zunächst im Bereich von 5 bis 40 K ab- und dann mit steigender Temperatur zunimmt (Abbildung 30 D). Eine Simulation der Energie des angeregten, thermisch besetzten Zustands liefert einen Wert von 150 cm^{-1} in Übereinstimmung mit dem Ergebnis der Orbach-Analyse der EPR-Daten.^[73]

Der oxidierte dreikernige Kupfercluster in der nativen Zwischenstufe weist also einen $S = 1/2$ -Grundzustand und einen niedrig liegenden angeregten Zustand bei ca. 150 cm^{-1} auf. Wir betrach-

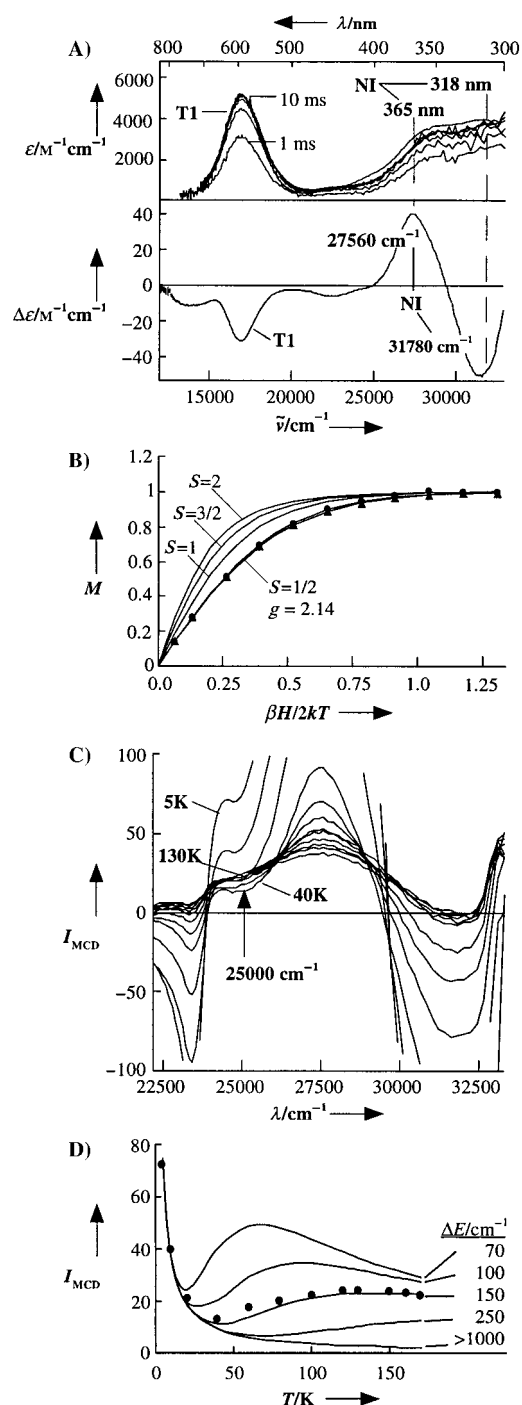


Abbildung 30. A) Oben: Verfolgung der Bildung der nativen Zwischenstufe (NI) mit der Rapid-Scan-stopped-Flow-Absorptionsspektroskopie bei pH 7.5 und 4 °C. Der erste Scan wurde nach 1.28 ms und vier weitere in Abständen von 2.56 ms bis zu einer Gesamtdauer von 11.52 ms durchgeführt. Unten: Das Tieftemperatur-MCD-Spektrum der nativen Zwischenstufe, gemessen bei 7 T und 1.8 K. B) MCD-Sättigungsmagnetisierung der nativen Zwischenstufe, gemessen bei 27560 (\blacktriangle) und 31780 cm^{-1} (\bullet) bei 1.8 K. Durchgezogene Linien sind Simulationen basierend auf den jeweils angegebenen unterschiedlichen möglichen Spinzuständen. M = normierte Magnetisierung. C) Die Temperaturabhängigkeit des MCD-Spektrums der nativen Zwischenstufe im erweiterten Charge-Transfer-Bereich (18–160 K bei 7 T). Man beachte, dass das MCD-Signal nicht einfach mit $1/T$ abnimmt; dies weist auf die Population eines angeregten Zustands mit einem andersartigen MCD-Spektrum hin. D) Die Temperaturabhängigkeit des MCD-Signals der nativen Zwischenstufe bei 25000 cm^{-1} (\bullet ; Pfeil in Diagramm C). Die Signalintensität nimmt zwischen 5 und 40 K ab, steigt aber wieder bei Temperaturen zwischen 50 und 150 K. Die durchgezogenen Linien sind das Ergebnis von Simulationen mit unterschiedlichen Aufspaltungen des angeregten Zustands (bester Fit bei ca. 150 cm^{-1}). In abgewandelter Form aus Lit. [73] übernommen.

ten nun die mit der Wechselwirkung verbrückender Liganden assoziierte Austauschkopplung zwischen den drei $S = \frac{1}{2}$ -Cu^{II}-Ionen, die diese Grundzustandseigenschaften reproduziert. Die Austauschkopplung zweier mit dem verbrückenden Liganden verbundener Cu^{II}-Atome (Cu_a und Cu_b) liefert einen Singulett-Grundzustand und einen energetisch um $2J$ höher liegenden angeregten Triplett-Zustand (Abbildung 31). Die Kopplung des dritten $S = \frac{1}{2}$ -Cu^{II}-Zentrums führt dann zu

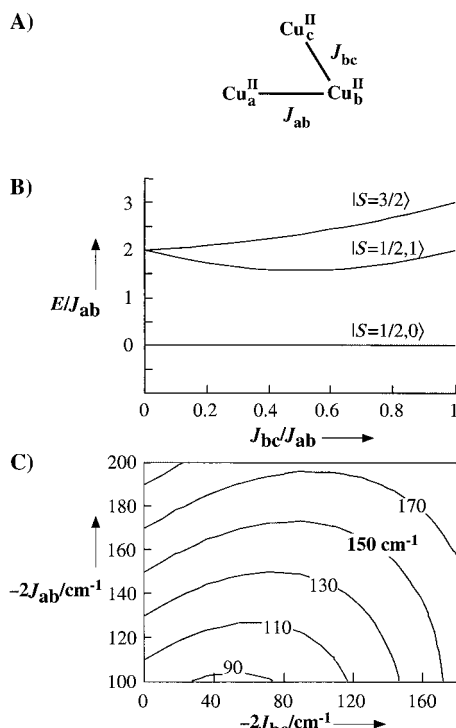


Abbildung 31. A) Schema des Zwei-Brücken-Modells. B) Energiediagramm des Zwei-Brücken-Modells als Funktion des Verhältnisses der Austauschkopplungskonstanten. C) Lösungsraum für die 150-cm⁻¹-Aufspaltung des Grundzustands und des ersten angeregten Zustands als Funktion der beiden Austauschkopplungskonstanten nach dem Zwei-Brücken-Modell. In abgewandelter Form aus Lit. [73] übernommen.

einem $S_{\text{TOT}} = \frac{1}{2}$ -Grundzustand ($|S = \frac{1}{2}, 0\rangle$) und angeregten Zuständen mit $S_{\text{TOT}} = \frac{1}{2}$ und $\frac{3}{2}$ bei $2J$. Lässt man eine zweite Verbrückung zwischen den Kupferzentren Cu_b und Cu_c zu, spaltet die Energie der angeregten $\frac{1}{2}$ - und $\frac{3}{2}$ -Zustände auf, wobei der Zustand $|S = \frac{1}{2}, 1\rangle$ in Abbildung 31 B der bei ca. 150 cm⁻¹ beobachtete Zustand ist. Die Suche nach einem Lösungsraum, der zu einer $|S = \frac{1}{2}, 0\rangle$ - $|S = \frac{1}{2}, 1\rangle$ -Aufspaltung von 150 cm⁻¹ mit zwei verbrückenden Liganden (Abbildung 31 C) führt, liefert einen maximalen J -Wert für jede Brücke von ca. 170 cm⁻¹.^[73] Die EXAFS-Daten in Abbildung 28 B deuten jedoch auf eine verbrückte Kupfereinheit mit einem Cu-Cu-Abstand von 3.3 Å. Aus Korrelationen zwischen magnetischen und Strukturdaten Hydroxid-verbrückter Cu^{II}-Dimere^[75, 76] folgt, dass die Austauschkopplung bei diesem Abstand ca. 520 cm⁻¹ betragen sollte (Abbildung 32). Dieser Wert sollte für eine Oxobridge (siehe unten) sogar noch größer sein. Um einen angeregten Zustand bei 150 cm⁻¹ mit dieser großen Austauschkopplung (die wegen des Cu-Cu-Abstands erforderlich ist) zu erhalten, muss eine

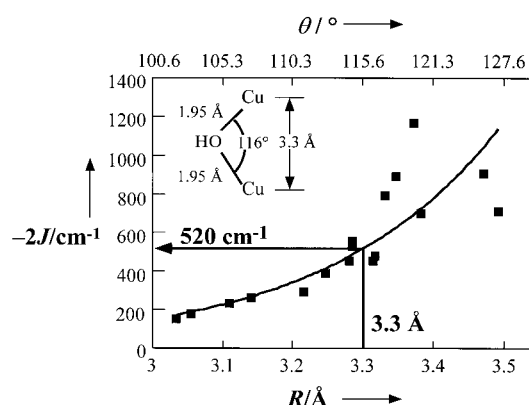


Abbildung 32. Korrelation des Cu-Cu-Abstands R und des Cu-O-Cu-Winkels θ mit den Kopplungskonstanten für OH-verbrückte zweikernige Cu^{II}-Modellkomplexe. Man beachte, dass eine nichtlineare Beziehung zwischen dem Cu-O-Cu-Winkel und dem Cu-Cu-Abstand besteht. Daten aus Lit. [76].

dritte Brücke (zwischen Cu_a und Cu_c) vorhanden sein, die zu Spinfrustration führt und die Energie des angeregten $|S = \frac{1}{2}, 1\rangle$ -Zustands erniedrigt.

In Abbildung 33 B ist der Lösungsraum mit einer $|S = \frac{1}{2}, 0\rangle$ - $|S = \frac{1}{2}, 1\rangle$ -Energieaufspaltung von 150 cm⁻¹ als Funktion der drei J -Werte dargestellt. Hält man $-2J_{ab}$ konstant bei 520 cm⁻¹ für den Cu-Cu-Abstand von 3.3 Å, müssen die anderen J -Werte ebenfalls groß sein und gut zwei Drittel dieses Wertes betragen. Die einzelnen J -Werte können aus den relativen Kopplungen der drei $S = \frac{1}{2}$ -Cu^{II}-Atome des dreikernigen Clusters mit den Wellenfunktionen des Grundzustands $|S = \frac{1}{2}, 0\rangle$ und des angeregten Zustands $|S = \frac{1}{2}, 1\rangle$ ermittelt werden. Experimentell gelang dies durch den Vergleich der MCD-Spektren des angeregten und des Grundzustands, wobei ersteres aus der Temperaturabhängigkeit der Spektren in Abbildung 30 C erhalten wurde.^[73] In Abbildung 33 D entsprechen die mit ① markierten Banden in den MCD-Spektren den Charge-Transfer-Übergängen zu einem Cu^{II}-Zentrum mit unterschiedlichem Vorzeichen zwischen Grund- und angeregtem Zustand, während die Banden ② und ③ mit einem Wechsel von stark zu schwach positiv bzw. von schwach zu stark positiv beim Übergang zwischen Grund- und angeregtem Zustand verbunden sind. Dieses Verhalten spiegelt die Kopplungskoeffizienten der drei Cu^{II}-Zentren im Grund- und im angeregten $S = \frac{1}{2}$ -Zustand für spezifische Werte von $-2J$ wider (Abbildung 33 C). (Die Banden ①–③ sind Charge-Transfer-Übergänge zu Cu_b^{II}, zu Cu_c^{II} bzw. zu Cu_a^{II}). Eine Anpassung der experimentellen MCD-Daten aus Abbildung 33 D an die in Abbildung 33 C dargestellten Daten liefert die drei J -Werte in Abbildung 33 A. Die ungewöhnlichen Spektren der nativen Zwischenstufe können mit einem vollständig oxidierten dreikernigen Kupfercluster erklärt werden, wobei allerdings alle drei Kupferzentren an starken verbrückenden Wechselwirkungen beteiligt sind.^[73] Dies führt zu den beiden möglichen Strukturmodellen der nativen Zwischenstufe in Abbildung 34, in der nach der Vier-Elektronen-Reduktion von Disauerstoff entweder zwei zusätzliche OH⁻-Brücken oder eine μ_3 -Oxobridge vorliegen.

Insgesamt zeigen die Untersuchungen der nativen Zwischenstufe, dass alle vier Kupferatome oxidiert sind und es

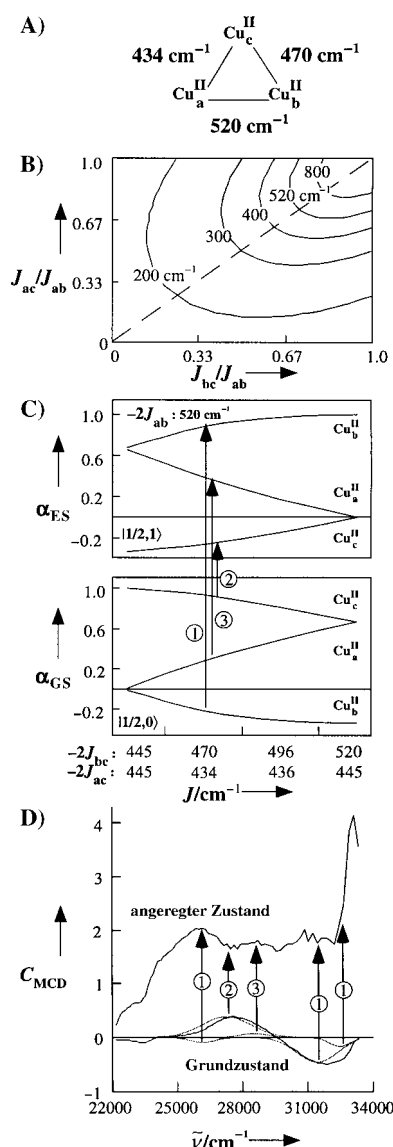


Abbildung 33. A) Schema des Drei-Brücken-Modells mit Kopplungskonstanten für die native Zwischenstufe. B) Lösungsraum für den ersten angeregten Zustand bei 150 cm⁻¹ als Funktion des Verhältnisses der Kopplungskonstanten, wobei die dritte Kopplungskonstante beim jeweils angegebenen Energiewert festgehalten wurde. C) Kopplungskoeffizienten der einzelnen Kupferatome des dreikernigen Cu^{II}-Clusters im Grundzustand und im angeregten Zustand. α_{ES} , α_{GS} = Koeffizienten des angeregten bzw. des Grundzustands. D) MCD-Spektren der nativen Zwischenstufe im Grund- und im angeregten Zustand. Die Banden sind nach unterschiedlichen Temperaturabhängigkeiten gruppiert (①, ② und ③), die sich in den Änderungen der Kopplungskonstanten widerspiegeln (siehe C). Eine Gauß-Simulation des Grundzustandsspektrums ist als Linie dargestellt. In abgewandelter Form aus Lit. [73] übernommen.

sich um eine Vier-Elektronen-O²⁻/OH⁻- und nicht um eine Drei-Elektronen-O⁻/OH-Zwischenstufe handelt. Die native Zwischenstufe unterscheidet sich jedoch von der Ruheform des Enzyms, weil alle Kupferatome des oxidierten dreikernigen Kupferclusters verbrückt sind. Der Übergang der nativen Zwischenstufe in die Ruheform des Enzyms ist sehr langsam ($k = 0.034 \text{ s}^{-1}$).^[77] ¹⁸O-IRMS- sowie ¹⁷O-EPR-Untersuchungen der Reaktion des reduzierten Enzyms mit markiertem O₂ ergaben, dass ein Sauerstoffatom des O₂-Moleküls im Enzym

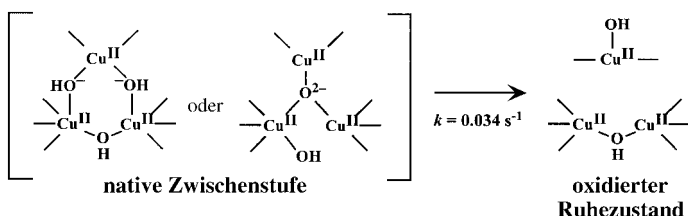


Abbildung 34. Strukturmodell der nativen Zwischenstufe und ihr Zerfall zum oxidierten Ruhezustand.

im Ruhezustand vorhanden ist. Dieses Atom ist von außen terminal an das Typ-2-Kupferzentrum des dreikernigen Clusters gebunden (Abbildung 34).^[78, 79] Der langsame Übergang der nativen Zwischenstufe in das oxidierte Enzym im Ruhezustand ist in Einklang mit einer erheblichen Strukturänderung, wie sie mit der Wanderung des O₂-Sauerstoffatoms von der Innen- auf die Außenseite des Clusters verbunden wäre. Schließlich sollte noch herausgestellt werden, dass sowohl die Weiterreaktion der Zwischenstufe als auch die Reduktion des oxidierten dreikernigen Kupferclusters des Enzyms im Ruhezustand zu langsam sind, um den Turnover zu beschreiben.^[80–83] Dagegen ist die Reduktion der nativen Zwischenstufe schnell, was darauf hinweist, dass es sich hierbei um die vollständig oxidierte Form des Enzyms handelt, die in der Katalyse aktiv ist.^[7] Möglicherweise werden die Typ-2-Kupferzentren des Clusters durch die Brücke(n) in die Elektronenübertragung eingebunden, um eine schnelle Reduktion durch am Typ-1-Kupfer eintretende Elektronen zu gewährleisten (über die Cys-His-Einheit zum Typ-3-Zentrum in Abbildung 1 D). Diese Möglichkeit wird zurzeit noch untersucht.

4.2.3. Der Mechanismus: reduktive Spaltung der O-O-Bindung

Die Aufklärung der Zwischenstufen in der Reduktion von O₂ zu H₂O durch mehrkernige kupferhaltige Oxidasen führt zu dem Mechanismus für diesen Vier-Elektronen-Prozess in Abbildung 35. Das reduzierte Enzym reagiert mit Disauerstoff unter Bildung der durch Zwei-Elektronen-Reduktion

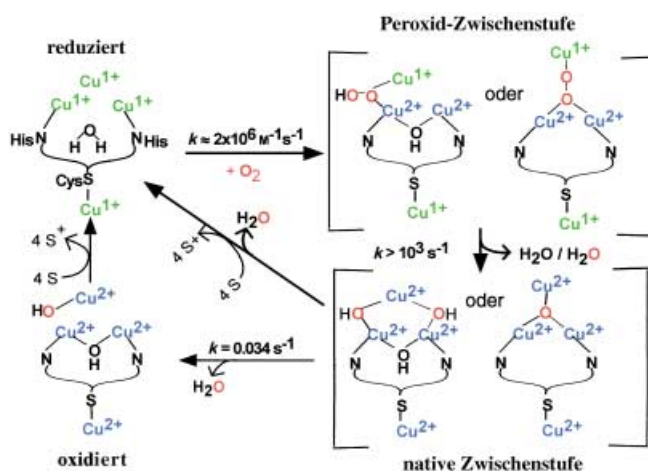


Abbildung 35. Mechanismus der Reduktion von O₂ zu H₂O in mehrkernigen kupferhaltigen Oxidasen.

hervorgehenden Peroxid-Zwischenstufe, in der das Peroxid ein oxidiertes Typ-3-Kupferpaar und ein reduziertes Typ-2-Kupferzentrum verbrückt. Diese Peroxid-Zwischenstufe wird in einem zweiten Zwei-Elektronen-Schritt reduziert, wobei das Typ-2- und das entfernte Typ-1-Zentrum unter Bildung der „nativen Zwischenstufe“ oxidiert werden. Hierbei handelt es sich um ein Oxo- oder Hydroxo-Produkt mit einer Brücke zwischen den oxidierten Typ-3- und dem nun ebenfalls oxidierten Typ-2-Kupferzentrum des dreikernigen Clusters. Es wird nun entweder schnell durch das Substrat reduziert oder reagiert in Abwesenheit eines Substrats langsam zum Ruhezustand, in dem ein Sauerstoffatom des O_2 -Moleküls in Form von H_2O terminal an das Typ-2-Kupferzentrum gebunden ist. Diese Umlagerung entkoppelt den dreikernigen Kupfercluster und entfernt das ruhende Enzym aus dem Katalysezyklus.

Die Reduktion von O_2 zu H_2O verläuft über zwei Zwei-Elektronen-Schritte. Der in Abbildung 22B dargestellten Kinetik zufolge ist der erste Schritt geschwindigkeitsbestimmend und der zweite Schritt sehr schnell. Wichtig ist, dass der zweite Schritt die reduktive Spaltung der O-O-Bindung beinhaltet und eine große Franck-Condon-Barriere mit dieser Verzerrung einhergeht. Wir konnten diese Barriere experimentell anhand der Temperaturabhängigkeit der Weiterreaktion der Peroxid-Zwischenstufe in T1Hg-Laccase bestimmen, einer Reaktion, die die reduktive Ein-Elektronen-Spaltung (Elektron vom reduzierten Typ-2-Cu-Zentrum) der O-O-Bindung beinhaltet.^[38] Aus dem kinetischen Sauerstoffisotopeneffekt $k(^{16}O_2)/k(^{18}O_2)$ von 1.10 ± 0.05 kann die Spaltung der O-O-Bindung als geschwindigkeitsbestimmender Schritt definiert werden. Die experimentelle Barriere ist mit ca. 9 kcal mol^{-1} recht hoch, was in Einklang mit der langsamen Weiterreaktion ($3 \times 10^{-4} \text{ s}^{-1}$) ist. Der Marcus-Theorie für Elektronenübertragungen zufolge sollte die Geschwindigkeit dieser Reduktion vom elektronisch koppelnden Matricelement (H_{DA} ; D = Donor, A = Acceptor), von der thermodynamische Triebkraft (ΔG°) und von der Reorganisationsenergie (λ) abhängen. Da das Peroxid in der T1Hg-Zwischenstufe an das Typ-2-Kupfer gebunden ist, sollte H_{DA} groß sein. Das Redoxpotential des Typ-2-Cu-Zentrums im Ruhezustand des Enzyms ist 0.37 V ,^[84] was dem E° -Wert für das Ein-Elektronen-Reduktionspotential von H_2O_2 (0.38 V) ähnelt. ΔG° ist somit klein und die Reaktion thermoneutral. Für einen isoenergetischen Prozess sollte die mit der Spaltung der O-O-Bindung verbundene Reorganisationsenergie etwa ein Viertel der Bindungsdissoziationsenergie betragen,^[85] welche für Peroxide $34\text{--}50 \text{ kcal mol}^{-1}$ beträgt.^[86–88] Dies liefert eine Aktivierungsenergie von $8.5\text{--}12.5 \text{ kcal mol}^{-1}$ – in guter Übereinstimmung mit den experimentellen Daten. Die Tatsache, dass die Peroxid-Zwischenstufe im nativen Enzym nicht beobachtet wird, belegt, dass die Umwandlung der Peroxid- zur nativen Zwischenstufe gegenüber ihrer Bildung rasch verläuft (die Bildungsgeschwindigkeit der Peroxid-Zwischenstufe in T1Hg beträgt $2 \times 10^6 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$). Kinetische Modelle des allgemeinen Reaktionsschemas (1) liefern für die Umwandlung der Peroxid-Zwischenstufe in die native Zwischenstufe eine untere Grenze von ca. 350 s^{-1} , was etwa ca. 10^6 -mal

schneller ist als die reduktive Ein-Elektronen-Spaltung der O-O-Bindung in der T1Hg-Zwischenstufe.^[38]

Im nativen Enzym erfordert diese Reaktion jedoch eine Zwei-Elektronen-Übertragung, ein Elektron vom Typ-2- und eins vom Typ-1-Cu-Zentrum (über den Cys-His-Pfad), wobei die vollständig oxidierte native Zwischenstufe gebildet wird. Der E° -Wert des Typ-1-Zentrums beträgt 0.39 V und ähnelt damit dem des Typ-2-Zentrums.^[84] Das Potential für die Zwei-Elektronen-Reduktion des Peroxids ist mit 1.37 V um 1 V günstiger (ca. 46 kcal mol^{-1} mit $n=2$ in der Nernst-Gleichung) als die Ein-Elektronen-Reduktion. Dies liefert eine starke zusätzliche thermodynamische Triebkraft, die die Aktivierungsbarriere deutlich senkt (auf ca. 1 kcal mol^{-1}). Der Unterschied in den Aktivierungsenergien der reduktiven $1e^-$ - bzw. $2e^-$ -Spaltung des Peroxids ist in Abbildung 36 gezeigt. Der große Unterschied in den Aktivierungsenergien führt zu einem 10^7 -fachen Anstieg der Geschwindigkeit der Peroxidreduktion im nativen Enzym, was im Einklang mit experimentellen Daten und dem Reaktionsmechanismus in Abbildung 35 ist. O_2 wird in zwei Zwei-Elektronen-Schritten reduziert, wobei der zweite aufgrund der großen Triebkraft für diese Reaktion sehr schnell ist.

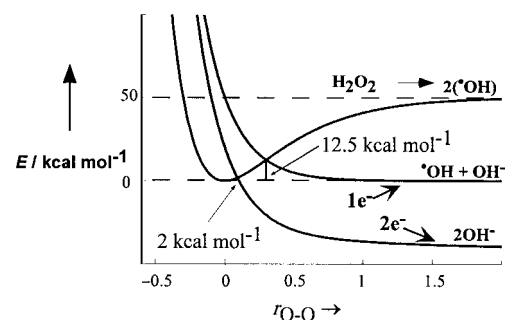
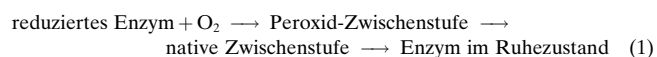


Abbildung 36. Potentialenergie-Oberflächen für die reduktive Ein- und Zwei-Elektronen-Spaltung der O-O-Bindung von Peroxid. Morse-Potentiale werden zur Modellierung des Reaktanten (H_2O_2) und des Produkts ($1e^-$ - und $2e^-$ -Spaltung von H_2O_2) benutzt. Die Produktkurve für die reduktive $2e^-$ -Spaltung ist um 46 kcal mol^{-1} zu niedriger Energie verschoben.

Abbildung 36 gibt einen allgemeinen Überblick über die Strategien zur reduktiven Spaltung von O-O-Bindungen in der Biologie. Aufgrund der großen Franck-Condon-Barriere für diese Spaltung muss eine starke thermodynamische Triebkraft existieren, um die für biologische Prozesse notwendigen Geschwindigkeiten zu erreichen. Dies kann entweder durch die Stabilität des in einem Ein-Elektronen-Schritt gebildeten $M=O$ -Produkts (z.B. $Fe^{IV}=O$) oder durch die 1 V günstigere Zwei-Elektronen-Reduktion des Peroxids geschehen.

5. Zusammenfassung und Ausblick

Aus der Zusammenfassung des Abschnitts 4 können die ungewöhnlichen spektroskopischen Eigenschaften der Kupfer/Disauerstoff-Zwischenstufen allgemein verstanden werden; sie spiegeln neue elektronische Strukturen wider, die einen großen Einfluss auf die Reaktivität haben. Die Untersuchungen lieferten Beziehungen zwischen der geometri-



schen und elektronischen Struktur und der Funktion und Mechanismen für die reversible Koordination von Sauerstoff durch Hämocyanin, für die Sauerstoff-Aktivierung durch Tyrosinase und für die Vier-Elektronen-Reduktion von Sauerstoff zu Wasser durch die mehrkernigen kupferhaltigen Oxidasen. Weiterhin haben sie allgemeine Einblicke in die reduktive Spaltung der O-O-Bindung, einem wichtigen Prozess in vielen Bereichen der Biologie, ermöglicht. Grundlegende Fragen bleiben noch offen, z.B. die Art der Substrat-Wechselwirkungen in den unterschiedlichen Enzymen, wie Mutationen die aktiven Zentren beeinflussen und ihre Reaktivität verändern, die Beschaffenheit der Sauerstoff-Zwischenstufen in den nichtgekoppelten zweikernigen Kupferenzymen und in der Biosynthese organischer Cofaktoren, die Verwandtschaft zwischen den Sauerstoff-Zwischenstufen in den mehrkernigen kupferhaltigen Oxidasen und denen in Cytochrom-c-Oxidase, und wie das Typ-1-Kupferzentrum in den mehrkernigen kupferhaltigen Oxidasen über den Cys-His-Pfad mit dem dreikernigen Kupfercluster gekoppelt ist. Wir freuen uns auf viele neue Einblicke auf dem Gebiet der Kupfer/O₂-Chemie in den kommenden Jahren.

E.I.S. dankt seinen Mitarbeitern und ehemaligen Studenten, deren Namen in den Literaturangaben zu finden sind, für ihre hervorragenden Arbeiten auf diesem Gebiet. Die Forschungsarbeiten wurden von den National Institutes of Health großzügig gefördert (DK31450). P.C. dankt für ein Gerhard Casper Stanford Graduate Fellowship, M.M. für ein DAAD-Postdoc-Stipendium und A.P. für ein Franklin Veatch Memorial Fellowship.

Eingegangen am 2. April 2001 [A462]
Übersetzt von Dr. Brigitte Schwederski, Stuttgart

- [1] R. H. Holm, P. Kennepohl, E. I. Solomon, *Chem. Rev.* **1996**, 96, 2239.
- [2] I. E. Marko, M. Tsukazaki, P. R. Giles, S. M. Brown, C. J. Urch, *Angew. Chem.* **1997**, 109, 2297; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1997**, 36, 2208.
- [3] E. I. Solomon, P. M. Jones, J. A. May, *Chem. Rev.* **1993**, 93, 2623.
- [4] J. B. Reitz, E. I. Solomon, *J. Am. Chem. Soc.* **1998**, 120, 11467.
- [5] E. I. Solomon, F. Tuzcek, D. E. Root, C. A. Brown, *Chem. Rev.* **1994**, 94, 827.
- [6] J. P. Klinman, *Chem. Rev.* **1996**, 96, 2541.
- [7] E. I. Solomon, U. M. Sundaram, T. E. Machonkin, *Chem. Rev.* **1996**, 96, 2563.
- [8] S. Ferguson-Miller, G. T. Babcock, *Chem. Rev.* **1996**, 96, 2889.
- [9] A. Messerschmidt, R. Ladenstein, R. Huber, M. Bolognesi, L. Avigliano, R. Petruzzelli, A. Rossi, A. Finazzi-Agro, *J. Mol. Biol.* **1992**, 224, 179.
- [10] T. Klabunde, C. Eicken, J. C. Sacchettini, B. Krebs, *Nat. Struct. Biol.* **1998**, 5, 1084.
- [11] V. Kumar, D. M. Dooley, H. C. Freeman, J. M. Guss, I. Harvey, M. A. McGuirl, M. C. J. Wilce, V. M. Zubak, *Structure* **1996**, 4, 943.
- [12] B. Hazes, K. A. Magnus, C. Bonaventura, J. Bonaventura, Z. Dauter, K. H. Kalk, W. G. Hol, *Protein Sci.* **1993**, 2, 597.
- [13] N. Ito, S. E. V. Phillips, C. Stevens, Z. B. Ogel, M. J. McPherson, J. N. Keen, K. D. S. Yadav, P. F. Knowles, *Nature* **1991**, 350, 87.
- [14] K. A. Magnus, B. Hazes, H. Ton-That, C. Bonaventura, J. Bonaventura, W. G. J. Hol, *Proteins: Struct. Funct. Genet.* **1994**, 19, 302.
- [15] S. T. Prigge, A. S. Kolhekar, B. A. Eipper, R. E. Mains, L. M. Amzel, *Science* **1997**, 278, 1300.
- [16] S. T. Prigge, A. S. Kolhekar, B. A. Eipper, R. E. Mains, L. M. Amzel, *Nat. Struct. Biol.* **1999**, 6, 976.
- [17] P. F. Knowles, D. M. Dooley, *Met. Ions Biol. Syst.* **1994**, 30, 361.
- [18] D. M. Dooley, D. E. Brown, H. C. Freeman, J. M. Guss, H. Matsunami, W. S. McIntire, C. E. Ruggiero, K. Tanizawa, M. Wilce, H. Yamaguchi, *FASEB J.* **1997**, 11, 79.
- [19] N. J. Blackburn, F. C. Rhames, M. Ralle, S. Jaron, *J. Biol. Inorg. Chem.* **2000**, 5, 341.
- [20] S. Jaron, N. J. Blackburn, *Biochemistry* **1999**, 38, 15086.
- [21] N. Kitajima, K. Fujisawa, Y. Moro-oka, *J. Am. Chem. Soc.* **1989**, 111, 8975.
- [22] R. S. Himmelwright, N. C. Eickman, C. D. LuBien, K. Lerch, E. I. Solomon, *J. Am. Chem. Soc.* **1980**, 102, 7339.
- [23] J. A. Halfen, S. Mahapatra, E. C. Wilkinson, S. Kaderli, V. G. Young, Jr., L. Que, Jr., A. D. Zuberbühler, W. B. Tolman, *Science* **1996**, 271, 1397.
- [24] P. K. Ross, E. I. Solomon, *J. Am. Chem. Soc.* **1990**, 112, 5871.
- [25] M. J. Henson, P. Mukherjee, D. E. Root, T. D. P. Stack, E. I. Solomon, *J. Am. Chem. Soc.* **1999**, 121, 10332.
- [26] P. Chen, K. Fujisawa, E. I. Solomon, *J. Am. Chem. Soc.* **2000**, 122, 10177.
- [27] D. E. Wilcox, A. G. Porras, Y. T. Hwang, K. Lerch, M. E. Winkler, E. I. Solomon, *J. Am. Chem. Soc.* **1985**, 107, 4015.
- [28] M. D. Allendorf, D. J. Spira, E. I. Solomon, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1985**, 82, 3063.
- [29] H. H. T. Nguyen, A. K. Shiemke, S. J. Jacobs, B. J. Hales, M. E. Lidstrom, S. I. Chan, *J. Biol. Chem.* **1994**, 269, 14995.
- [30] D. J. Kosman, R. Hassett, D. S. Yuan, J. McCracken, *J. Am. Chem. Soc.* **1998**, 120, 4037.
- [31] In diesem Übersichtsartikel verwenden wir die Bezeichnung „T3Cu“ für die hydroxoverbrückte zweikernige Kupferkomponente des dreikernigen Kupferclusters. Die geometrische und elektronische Struktur unterscheidet sich von der der gekoppelten zweikernigen Kupfer-einheiten in Hämocyanin, Tyrosinase und Catechol-Oxidase (die in der Literatur bisweilen ebenfalls mit T3 bezeichnet werden).
- [32] I. Zaitseva, V. Zaitsev, G. Card, K. Moshov, B. Bax, A. Ralph, P. Lindley, *J. Biol. Inorg. Chem.* **1996**, 1, 15.
- [33] L.-E. Andréasson, R. Brändén, B. G. Malmström, T. Vanngard, *FEBS Lett.* **1973**, 32, 187.
- [34] P. A. Clark, E. I. Solomon, *J. Am. Chem. Soc.* **1992**, 114, 1108.
- [35] R. Aasa, R. Brändén, J. Deinum, B. G. Malmström, B. Reinhammar, T. Vanngard, *FEBS Lett.* **1976**, 61, 115.
- [36] M. M. Morie-Bebel, M. C. Morris, J. L. Menzie, D. R. McMillin, *J. Am. Chem. Soc.* **1984**, 106, 3677.
- [37] W. Shin, U. M. Sundaram, J. L. Cole, H. H. Zhang, B. Hedman, K. O. Hodgson, E. I. Solomon, *J. Am. Chem. Soc.* **1996**, 118, 3202.
- [38] A. E. Palmer, S.-K. Lee, E. I. Solomon, *J. Am. Chem. Soc.* **2001**, 123, 6591.
- [39] E. I. Solomon, M. J. Baldwin, M. D. Lowery, *Chem. Rev.* **1992**, 92, 521.
- [40] J. E. Pate, R. W. Cruse, K. D. Karlin, E. I. Solomon, *J. Am. Chem. Soc.* **1987**, 109, 2624.
- [41] N. C. Eickman, R. S. Himmelwright, E. I. Solomon, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1979**, 76, 2094.
- [42] T. B. Freedman, J. S. Loehr, T. M. Loehr, *J. Am. Chem. Soc.* **1976**, 98, 2809.
- [43] E. I. Solomon, D. M. Dooley, R. H. Wang, H. B. Gray, M. Cerdonio, F. Mogno, G. L. Romani, *J. Am. Chem. Soc.* **1976**, 98, 1029.
- [44] P. K. Ross, E. I. Solomon, *J. Am. Chem. Soc.* **1991**, 113, 3246.
- [45] M. J. Baldwin, D. E. Root, J. E. Pate, K. Fujidawa, N. Kitajima, E. I. Solomon, *J. Am. Chem. Soc.* **1992**, 114, 10421.
- [46] A. D. Becke, *J. Chem. Phys.* **1993**, 98, 5648.
- [47] T. H. J. Dunning, P. J. Hay in *Modern Theoretical Chemistry*, Vol. 3 (Hrsg.: H. F. Schaefer III), Plenum, New York, **1976**, S. 1.
- [48] P. J. Hay, W. R. Wadt, *J. Chem. Phys.* **1985**, 82, 270.
- [49] P. J. Hay, W. R. Wadt, *J. Chem. Phys.* **1985**, 82, 299.
- [50] W. R. Wadt, P. J. Hay, *J. Am. Chem. Soc.* **1985**, 82, 284.
- [51] M. E. Casida, *Recent Adv. Comput. Chem.* **1995**, 1, 155.
- [52] R. E. Stratmann, G. E. Scuseria, M. J. Frisch, *J. Chem. Phys.* **1998**, 109, 8218.
- [53] M. Metz, E. I. Solomon, *J. Am. Chem. Soc.* **2001**, 123, 4938.
- [54] M. Brouwer, C. Bonaventura, J. Bonaventura, *Biochemistry* **1978**, 17, 2148.
- [55] A. Berces, *Inorg. Chem.* **1997**, 36, 4831.
- [56] A. Berces, *Int. J. Quantum Chem.* **1997**, 65, 1077.

- [57] K. D. Karlin, J. C. Hayes, Y. Gultneh, R. W. Cruse, J. W. McKown, J. P. Hutchinson, J. Zubieta, *J. Am. Chem. Soc.* **1984**, *106*, 2121.
- [58] E. Pidcock, H. V. Obias, C. X. Zhang, K. D. Karlin, E. I. Solomon, *J. Am. Chem. Soc.* **1998**, *120*, 7841.
- [59] E. Pidcock, H. V. Obias, M. Abe, H.-C. Liang, K. D. Karlin, E. I. Solomon, *J. Am. Chem. Soc.* **1999**, *121*, 1299.
- [60] D. E. Root, M. Mahroof-Tahir, K. D. Karlin, E. I. Solomon, *Inorg. Chem.* **1998**, *37*, 4838.
- [61] P. P. Paul, Z. Tyeklar, R. R. Jacobson, K. D. Karlin, *J. Am. Chem. Soc.* **1991**, *113*, 5322.
- [62] P. Chen, E. I. Solomon, *J. Inorg. Biochem.*, im Druck.
- [63] D. J. Spira-Solomon, M. D. Allendorf, E. I. Solomon, *J. Am. Chem. Soc.* **1986**, *108*, 5318.
- [64] J. L. Cole, G. O. Tan, E. K. Yang, K. O. Hodgson, E. I. Solomon, *J. Am. Chem. Soc.* **1990**, *112*, 2243.
- [65] V. Ducros, A. M. Brzozowski, K. S. Wilson, S. H. Brown, P. Østergaard, P. Schneider, D. S. Yaver, A. H. Pedersen, G. J. Davies, *Nat. Struct. Biol.* **1998**, *5*, 310.
- [66] J. L. Cole, P. A. Clark, E. I. Solomon, *J. Am. Chem. Soc.* **1990**, *112*, 9534.
- [67] U. M. Sundaram, H. H. Zhang, B. Hedman, K. O. Hodgson, E. I. Solomon, *J. Am. Chem. Soc.* **1997**, *119*, 12525.
- [68] M. Metz, E. I. Solomon, unveröffentlichte Ergebnisse.
- [69] R. Aasa, R. Brändén, J. Deinum, B. G. Malmström, B. Reinhammar, T. Vanngard, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **1976**, *70*, 1204.
- [70] L. E. Andréasson, R. Brändén, B. Reinhammar, *Biochim. Biophys. Acta* **1976**, *438*, 370.
- [71] J. L. Cole, D. P. Ballou, E. I. Solomon, *J. Am. Chem. Soc.* **1991**, *113*, 8544.
- [72] L. S. Kau, D. J. Spira-Solomon, J. E. Pennerhahn, K. O. Hodgson, E. I. Solomon, *J. Am. Chem. Soc.* **1987**, *109*, 6433.
- [73] S.-K. Lee, S. D. George, W. E. Antholine, B. Hedman, K. O. Hodgson, E. I. Solomon, *J. Am. Chem. Soc.*, eingereicht.
- [74] H. W. Huang, T. Sakurai, S. Maritano, A. Marchesini, S. Suzuki, *J. Inorg. Biochem.* **1999**, *75*, 19.
- [75] V. H. Crawford, H. W. Richardson, J. R. Wasson, D. J. Hodgson, W. E. Hatfield, *Inorg. Chem.* **1976**, *15*, 2107.
- [76] S. S. Tandon, L. K. Thompson, M. E. Manuel, J. N. Bridson, *Inorg. Chem.* **1994**, *33*, 5555.
- [77] L.-E. Andréasson, B. Reinhammar, *Biochim. Biophys. Acta* **1976**, *445*, 579.
- [78] R. Brändén, J. Deinum, *FEBS Lett.* **1977**, *73*, 144.
- [79] R. Brändén, J. Deinum, M. Coleman, *FEBS Lett.* **1978**, *89*, 180.
- [80] O. Farver, I. Pecht, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1992**, *89*, 8283.
- [81] P. Kyritsis, A. Messerschmidt, R. Huber, G. A. Salmon, A. G. Sykes, *J. Chem. Soc. Dalton Trans.* **1993**, 731.
- [82] T. E. Meyer, A. Marchesini, M. A. Cusanovich, G. Tollin, *Biochemistry* **1991**, *30*, 4619.
- [83] L.-E. Andréasson, B. Reinhammar, *Biochim. Biophys. Acta* **1979**, *568*, 145.
- [84] B. R. M. Reinhammar, *Biochim. Biophys. Acta* **1972**, *275*, 245.
- [85] J.-M. Savéant, *Adv. Electron Transfer Chem.* **1994**, *4*, 53.
- [86] A. C. Baldwin in *The Chemistry of Peroxides* (Hrsg.: S. Patai), Wiley, New York, **1983**, S. 97.
- [87] R. D. Bach, P. Y. Ayala, H. B. Schlegel, *J. Am. Chem. Soc.* **1996**, *118*, 12758.
- [88] X. Luo, P. R. Flemming, T. R. Rizzo, *J. Chem. Phys.* **1992**, *96*, 5659.