

Bioanorganische Reaktionsmechanismen: von hochvalenten Eisenzentren zur Bioorganometallchemie

Leonardo D. Slep und Frank Neese*

Stichwörter:

Bioanorganische Chemie · Cyanidliganden · Eisen · Metalloproteine · O-O-Aktivierung

Eine große Zahl von Enzymen enthält Übergangsmetallionen in ihren aktiven Zentren. Solche Enzyme katalysieren eine Vielfalt von Reaktionen unter extrem milden chemischen Bedingungen. Die strukturellen und elektronischen Grundlagen dieser katalytischen Prozesse zu verstehen, ist eines der Hauptanliegen der Bioanorganischen Chemie. In den letzten Jahren wurden mithilfe von detaillierten strukturellen, spektroskopischen, theoretischen und kinetischen Techniken große Fortschritte im Verständnis bioanorganischer Reaktionsmechanismen erzielt. Gleichzeitig hat sich die Modellierung der aktiven Zentren durch niedermolekulare Modellverbindungen ungeachtet der großen synthetischen Herausforderungen als besonders fruchtbar erwiesen. Anhand solcher Studien gelingt es häufig, die für die Funktion der Metalloproteine essenziellen strukturellen und elektronischen Eigenschaften der Aktivzentren herauszuarbeiten oder chemische Präzedenzfälle für bislang nicht beobachtete Strukturen zu schaffen.

In zwei kürzlich in *Science* publizierten Arbeiten von Münck, Nam und Que et al.^[1] sowie Böck et al.^[2] wird über bemerkenswerte Fortschritte im Bereich der Bioanorganischen Chemie berichtet. Beide Studien zeigen deutlich, wie fundamentale Fragen der Bioanorganischen Chemie mithilfe der anorganischen Synthesechemie, Biochemie

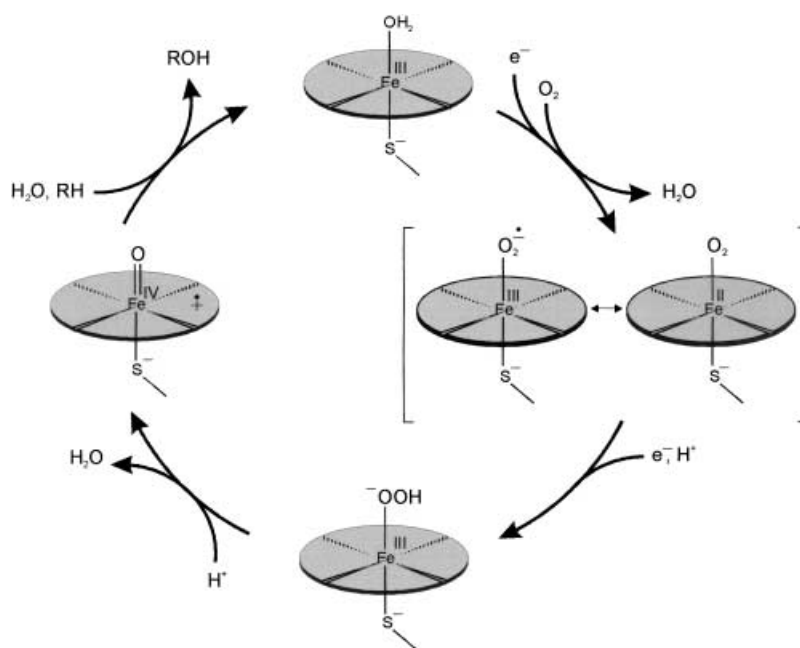
und Spektroskopie beantwortet werden können.

Sauerstoffaktivierung durch Nicht-Häm-Eisenproteine

Die Wechselwirkung von Eisen mit molekularem Sauerstoff in biologischen Systemen muss extrem fein gesteuert sein, um einerseits die biologische Funktion des Sauerstofftransportes zu ermöglichen (z. B. in den Sauerstofftransportproteinen Hämoglobin und Hämerythrin) und andererseits O_2 für Oxidationsreaktionen zu aktivieren (z. B. in Cytochrom P450 (CYP450), einkernigen Nicht-Häm-Eisenproteinen (NHEs) oder der Methan-Monooxygenase (MMO)). Dabei ist von herausragender

Bedeutung, dass die toxischen Spezies OH^\cdot , $O_2^{\cdot-}$ und H_2O_2 , die bei der Reaktion von hydratisiertem Fe^{II} mit O_2 entstehen (Fenton- und Haber-Weiss-Reaktionen), im biologischen System generell vermieden werden. Die Mechanismen, mit denen Eisenenzyme diese „riskanten“ Reaktionen in selektive biochemische Reaktionen umwandeln, werden seit vielen Jahrzehnten erforscht.

Derzeit am besten untersucht ist der katalytische Mechanismus des Häm-enzym Cytochrom P450_{CAM}, das die Hydroxylierung eines Campheralkohols mit molekularem Sauerstoff katalysiert. Die Forschungsergebnisse der letzten drei Jahrzehnte sind in Schema 1 zusammengefasst. Der katalytische Zyklus beginnt mit der Bindung eines O_2 -



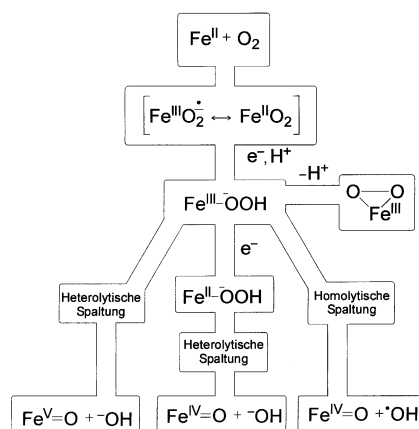
Schema 1. Die wichtigsten Intermediate im katalytischen Zyklus von CYP450.

[*] Priv.-Doz. Dr. F. Neese
Max-Planck-Institut für Strahlenchemie
Stiftstraße 34–36
45470 Mülheim an der Ruhr (Deutschland)
Fax: (+49) 208-306-3951
E-mail: neese@mpi-muelheim.mpg.de

Moleküls an das aktive Zentrum in seiner Eisen(II)-Form. Das entstehende Intermediat kann als Eisen(III)-Superoxid- oder als Fe^{II} -Disauerstoff-Komplex formuliert werden. Die folgende Einelektronenreduktion führt zu einem Eisen(III)-Hydroperoxo-Komplex. Es wird angenommen, dass dieser Komplex unter Heterolyse der O-O-Bindung in ein Wassermolekül und ein schwer zu fassendes Intermediat zerfällt, das als „Compound I“ bekannt ist und formal das Zentralatom auf der Eisen(V)-Stufe trägt. Dieses Intermediat ist ein extrem potentes Oxidationsmittel, dessen Redoxpotential wahrscheinlich jenseits von +1 V liegt. Die Mehrheit der Forscher geht davon aus, dass dieses Intermediat direkt mit dem nichtaktivierten Substrat unter Bildung einer OH-Gruppe reagiert (Rebound-Mechanismus). Eine Reihe von Studien an Modellkomplexen und verwandten Enzymen, z. B. Katalasen und Peroxidasen, haben zu der Interpretation geführt, dass die elektronische Situation in Compound I eher der Bindung eines hochvalenten $[\text{FeO}]^{2+}$ an ein Porphyrinradikalkation als einer genuinen Eisen(V)-Spezies entspricht. Faszinierende neue Entwicklungen im Bereich von CYP450_{CAM} umfassen die kristallographische Charakterisierung von mehreren Reaktionsintermediaten^[3a] und die theoretische Modellierung des katalytischen Zyklus mithilfe von quantenchemischen Methoden, die die Proteinumgebung explizit berücksichtigen.^[3b]

Die Forschung an NHE-Enzymen ist erst in den letzten Jahren in den Mittelpunkt gerückt, obwohl die NHE-katalysierten Reaktionen mindestens so vielfältig sind wie die der Hämenzyme.^[4] Eine der zentralen Fragen bei der Formulierung plausibler Reaktionsmechanismen lautet, ob in Abwesenheit eines als „Elektronenreservoir“ dienenden Porphyrinringes hochvalente Zwischenstufen des Eisens in NHE-Enzymen stabilisiert werden können. Die Existenz von Compound-I-analogen Intermediaten ist keineswegs selbstverständlich, da kristallographische Studien belegen, dass die aktiven Zentren von NHE-Enzymen stets mit „unschuldigen“ Liganden koordiniert sind, die bei biologisch relevanten Redoxpotentialen wahrscheinlich nicht oxidiert werden können. Eine attraktive Alternative zu

hochvalenten Eisenkomplexen als aktive Spezies sind somit Eisen(III)-Hydroperoxide, deren direkte Reaktion mit Substraten hydroxylierte oder epoxidierte Produkte ergeben könnte (Schema 2). Eine Reihe neuer Ergebnisse gibt Hinweise auf die Reaktivität solcher Verbindungen. Danach zeigt sich, dass High-Spin-Eisen(III)-Hydroperoxide für



Schema 2. Wichtige Intermediate in den Reaktionen von NHE-Enzymen.

eine homolytische Spaltung der Fe-O-Bindung aktiviert sind,^[5] während in den Low-Spin-Formen die homolytische Spaltung der O-O-Bindung bevorzugt wird.^[5] Die deprotonierte Form, O_2^{2-} , tritt in seitlich gebundenen η^2 -Eisen(III)-Peroxiden auf, die jedoch nicht für direkte Reaktionen mit Substraten aktiviert zu sein scheinen.^[6] Die Reaktion von Low-Spin-Eisen(III)-Hydroperoxiden mit Substraten ist daher ein plausibler Reaktionspfad und wurde z. B. für die Oxidation von DNA durch den Antitumorwirkstoff Bleomycin vorgeschlagen.^[7] In vielen anderen Reaktionsmechanismen von NHE-Enzymen wurden Eisen(IV)- oder sogar Eisen(V)-Spezies formuliert, konnten jedoch noch nie experimentell eindeutig belegt werden. Diese für die bioanorganische Modellchemie stimulierende Situation hat in den letzten Jahren zu der Synthese und spektroskopischen Charakterisierung der ersten Komplexe mit terminalen $[\text{FeO}]^{2+}$ - und $[\text{FeN}]^{2+}$ -Einheiten geführt,^[8] die auf die mögliche Existenz von hochvalenten Intermediaten in NHE-Enzymen schließen lassen.

Die Veröffentlichung von Münck, Nam und Que et al. belegt einen weite-

ren großen Fortschritt in der Synthese und Charakterisierung von hochvalenten einkernigen Nicht-Häm-Eisenzentren.^[1] In dieser Studie ist es zum ersten Mal gelungen, die $[\text{FeO}]^{2+}$ -Einheit in einer Nicht-Häm-Umgebung vollständig strukturell und spektroskopisch zu charakterisieren. Es wurde gezeigt, dass die Reaktion der Ausgangsverbindung $[\text{Fe}(\text{tmc})(\text{OTf})_2]$ (**1**; tmc = 1,4,8,11-Tetramethyl-1,4,8,11-Tetraazacyclotetradecan, $\text{OTf} = \text{CF}_3\text{SO}_3$) mit Iodosylbenzol (PhIO, einem Sauerstofftransferreagens) in Acetonitril bei -40°C das Produkt $[\text{Fe}(\text{tmc})(\text{O})(\text{CH}_3\text{CN})]^{2+}$ (**2**) ergibt. Diese Verbindung wurde mithilfe von Absorptions-, FT-IR- und Mößbauer-Spektroskopie sowie mit Massenspektrometrie charakterisiert. Nach Kristallisation bei -40°C aus einem Gemisch von Acetonitril und Diethylether wurde das Triflatsalz **2**·(OTf)₂ isoliert. Gemäß der Strukturanalyse von **2** befindet sich das Zentralatom in einer verzerrt oktaedrischen Umgebung. Die terminale Fe-O-Bindung ist mit 1.646(3) Å extrem kurz (Abbildung 1) und damit z. B. weitaus kürzer als vergleichbare Eisen(IV)-Oxo-Bindungen in zweikernigen Komplexen mit verbrückenden Oxo-Ionen ($\text{R}(\text{Fe}-\text{O}) = 1.805 \text{ Å}^{[9]}$) oder die terminale Fe-O-Bindung in einer kürzlich bekannt gewordenen Struktur mit $[\text{FeO}]^{+}$ -Einheit ($1.813 \text{ Å}^{[10]}$). Diese Verkürzung ist ein Hinweis auf verstärkte π -Bindungen innerhalb der $[\text{FeO}]^{2+}$ -Einheit. Ähnlich kurze Fe-O-Bindungen sind bisher nur in den Aktivzentren von hochvalenten Eisenporphyrinen mithilfe von Röntgenkristallographie und EXAFS-Spektroskopie beobachtet worden.^[11]

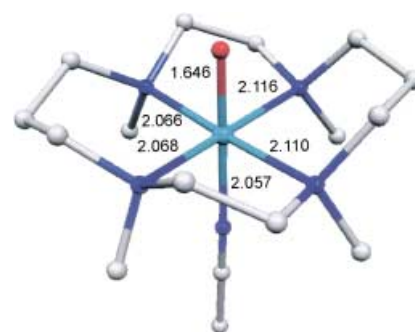


Abbildung 1. Struktur des Dikations $[\text{Fe}(\text{tmc})(\text{O})(\text{CH}_3\text{CN})]^{2+}$ anhand der Ergebnisse der Röntgenstrukturanalyse (Zahlen geben Bindungslängen in Å an, Wasserstoffatome wurden der Übersicht wegen entfernt).

Die bemerkenswerte Leistung von Münck, Nam und Que et al. besteht insbesondere darin, einen strukturell und spektroskopisch eindeutig charakterisierten Präzedenzfall für das so häufig vorgeschlagene und selten beobachtete $[\text{FeO}]^{2+}$ -Motiv geschaffen zu haben. Die Ergebnisse machen damit auch deutlich, dass die Formulierung solcher Zwischenstufen in NHE-Proteinen ein realistisches Szenario ist. Darüber hinaus wurde die strukturelle Grundlage für eingehende spektroskopische Studien der Bindungsverhältnisse innerhalb der $[\text{FeO}]^{2+}$ -Einheit geschaffen, die schlussendlich zu einem tiefergehenden Verständnis der elektronischen Grundlagen der chemischen Reaktivität dieser Verbindungen führen sollte. Weiterhin wird es möglich sein, dieses Motiv in Zukunft anhand von spektroskopischen Daten zuverlässig zuzuordnen.

Biosynthese der Eisen-Cyanid-Bindung in Nickel-Eisen-Hydrogenasen

Beinahe alle Lebensformen, die unter anaeroben Verhältnissen (z.B. in Tiefsee-Hydrothermalquellen, Sedimenten oder den Magen-Darm-Trakten von Säugetieren) leben, sind auf Wasserstoff angewiesen. H_2 wird von fermentativen Organismen bei der Oxidation von Zuckern und anderen organischen Substraten freigesetzt. Die dabei freiwerdenden Elektronen werden über eine Elektronentransportkette, die unter anderem das Eisen-Schwefel-Protein Ferredoxin enthält, auf Protonen übertragen, was schlussendlich zur Bildung von H_2 führt. Die abschließende Schlüsselreaktion wird von einer als Hydrogenasen bekannten Enzymfamilie katalysiert. Das freiwerdende H_2 wird häufig von anderen im gleichen Habitat beheimateten Organismen wieder verbraucht. Hierbei sind wieder Hydrogenasen beteiligt, da sie im Allgemeinen sowohl die Bindungsbildung als auch die Bindungsspaltung in H_2 katalysieren.

Es existieren mehrere Klassen von Hydrogenasen. Die am besten untersuchten Enzyme sind jedoch die Nickel-Eisen-Hydrogenasen (NiFe-H_2 asen), die sowohl ein Nickel- als auch ein Eisenion in ihren Aktivzentren enthal-

ten. Die röntgenographische Analyse des Enzyms aus *Desulfovibrio gigas* im Jahr 1995 zeigte einige überraschende strukturelle Eigenheiten der NiFe-H_2 asen.^[12] Das Enzym enthält demnach ein hetero-zweikerniges Aktivzentrum mit zwei terminalen Cysteinliganden am Nickelzentrum (Abbildung 2). Als

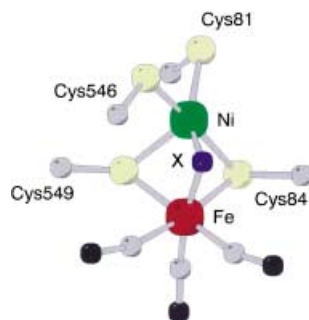


Abbildung 2. Aktivzentrum der NiFe-H_2 ase aus *D. gigas* anhand der Röntgenstrukturanalyse des oxidierten Proteins. X ist ein nichtidentifizierter Ligand, möglicherweise OH^- ; PDB-Code 2FRV.

Brückenliganden fungieren zwei weitere Cysteine sowie ein nichtidentifizierter Ligand, bei dem es sich um OH^- handeln könnte. Die Eigenschaften des Aktivzentrums und der Reaktionsintermediate wurden kürzlich mithilfe von detaillierten spektroskopischen Experimenten genau untersucht.^[13]

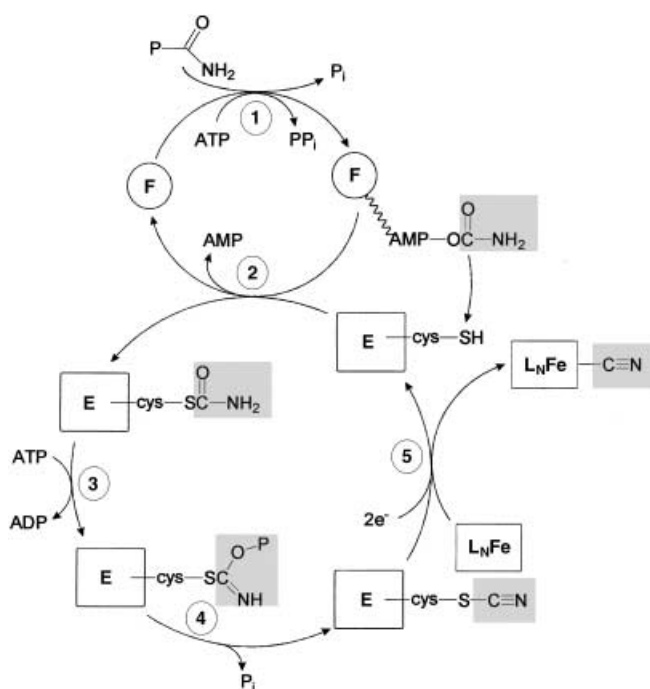
Das vielleicht auffälligste Strukturmerkmal der NiFe-H_2 asen sind die drei diatomaren Liganden am Eisenzentrum (Abbildung 2). Mithilfe von FT-IR-Spektroskopie konnte geklärt werden, dass es sich dabei um zwei CN^- - und einen CO -Liganden handelt.^[14] Dieses Ergebnis war sehr überraschend, da sowohl CN^- wie auch CO aufgrund ihrer hohen Affinität für Metallzentren (z.B. die Aktivzentren der Hämproteine in der Zellatmung) für biologische Systeme äußerst toxisch sind. Es konnte später gezeigt werden, dass solche Liganden auch in den Aktivzentren von anderen Hydrogenasen vorhanden sind. Es wird vermutet, dass dieses ungewöhnliche Motiv dazu dient, das Eisenzentrum in einem niedervalenten Low-Spin-Zustand zu halten, was wiederum möglicherweise von funktioneller Relevanz sein könnte.

Das Auftreten von CO - und CN^- -Liganden in den Aktivzentren von Me-

talloproteinen wirft die Frage nach dem Mechanismus ihrer Biosynthese während der Proteinreifung auf, da freies CO oder CN^- in biologischen Systemen kaum möglich sein sollte. Diese Frage konnte von Böck et al. in ihrem *Science*-Beitrag auf beeindruckende Weise beantwortet werden.^[2] Mit einer Kombination von Radioisotopenmarkierung und Massenspektrometrie konnte gezeigt werden, dass organische Thiocyanate als Quelle von CN^- fungieren. Diese Thiocyanate werden im Zusammenspiel von zwei (HypE und HypF) von insgesamt sieben Proteinen gebildet, die zur Biosynthese von NiFe-H_2 asen notwendig sind. Der detaillierte Mechanismus ist in Schema 3 dargestellt: Im ersten Schritt der Biosynthese führt die Reaktion von Carbamoylphosphat (CP, einem bekannten Intermediat in biosynthetischen Reaktionswegen, z.B. im Harnstoffzyklus) und ATP am HypF-Protein zu einer Carbamoyladenylat-Zwischenstufe. Die CONH_2 -Gruppe wird daraufhin auf die Thiolgruppe des C-terminalen Cysteins auf dem HypE-Protein übertragen. Es kommt dann zu einer Serie von komplexen Reaktionen: In einem ATP-abhängigen Schritt wird zunächst die Carboxamido-Gruppe unter Bildung einer organischen Thiocyanatgruppe dehydriert. Vermutlich reagiert diese Zwischenstufe während der endgültigen Reifung des Aktivzentrums dann unter Angriff einer elektrophilen Cyangruppe auf ein nucleophiles Eisenzentrum zur endgültigen Fe-CN -Einheit.

Diese vorgeschlagene Reaktionssequenz konnte mithilfe von eleganten Experimenten an Modellsystemen weiter erhärtet werden. Böck et al. gelang zunächst die Dehydrierung von *S*-(*n*-decyl)thiocarbamat unter Einwirkung von Ethylpolyphosphat unter milden Bedingungen zu dem gewünschten Thiocyanat. In einer zweiten Serie von Experimenten konnte die Cyangruppe unter milden Bedingungen auf niedervalente Eisenzentren direkt übertragen werden. Dabei wurde Phenylthiocyanat mit $[(\eta^5\text{-C}_5\text{H}_5)\text{Fe}(\text{CO})_2\text{Br}]$ (FpBr) in guter Ausbeute zu $[(\eta^5\text{-C}_5\text{H}_5)\text{Fe}(\text{CO})_2(\text{CN})]$ (FpCN) umgesetzt.

Das Zusammenspiel von Experimenten am natürlichen System und an organometallischen Modellsystemen fügt sich in dieser Arbeit zu einem



Schema 3. Biosynthese von Cyanidliganden in NiFe-H₂asen: 1) Bildung der Carbamoyladenylatgruppe am HypF-Protein (F); 2) Transfer der CONH₂-Gruppe zum C-terminalen Cystein des HypE-Proteins (E); 3 und 4) ATP-unterstützte Dehydratisierung unter Bildung eines phosphorylierten Intermediats am Carbonylsauerstoff und Synthese des Thiocyanats in einem darauffolgenden Dephosphorylierungsschritt; 5) Transfer der Cyangruppe zum NiFe-Aktivzentrum der NiFe-H₂asen (L_N steht für die Koordinationssphäre des Aktivzentrums).

stimmigen Gesamtbild zusammen. Es wurde demonstriert, dass Metall-Cyanid-Bindungen unter „biologischen“ Bedingungen gebildet werden können und dass freies Cyanid dabei kein notwendiges Intermediat ist. Das Auftreten solcher Gruppierungen in den Aktivzentren von Hydrogenasen konnte somit mechanistisch erklärt werden.

Fazit

Die beiden Studien von Münck, Nam und Que et al.^[1] sowie Böck et al.^[2] zeigen in besonderer Klarheit, auf welche Weise die anorganische Synthesechemie zum Verständnis von grundle-

genden biochemischen Vorgängen beitragen kann. Sie geben darüber hinaus Einblicke, wie in der Natur Reaktionsintermediate, die für biologische Systeme potenziell toxisch sind, vermieden oder zumindest kontrolliert werden.

- [1] J.-U. Rohde, J.-H. In, M. H. Lim, W. W. Brennessel, M. R. Bukowski, A. Stubna, E. Münck, W. Nam, L. Que, Jr., *Science* **2003**, 299, 1037.
- [2] S. Reissmann, E. Hochleitner, H. Wang, A. Paschos, F. Lottspeich, R. S. Glass, A. Böck, *Science* **2003**, 299, 1067.
- [3] a) I. Schlichting, J. Berendzen, K. Chu, A. M. Stock, S. A. Maves, D. E. Benson, B. M. Sweet, D. Ringe, G. A. Petsko, S. G. Sligar, *Science* **2000**, 287, 1615;

- b) J. C. Schöneboom, H. Lin, N. Reuter, W. Thiel, S. Cohen, F. Ogliaro, S. Shaik, *J. Am. Chem. Soc.* **2002**, 124, 8142.
- [4] E. I. Solomon, T. C. Brunold, M. I. Davis, J. N. Kemsley, S. K. Lee, N. Lehnert, F. Neese, A. J. Skulan, Y. S. Yang, J. Zhou, *Chem. Rev.* **2000**, 100, 235.
- [5] a) N. Lehnert, F. Neese, R. Y. N. Ho, L. Que, Jr., E. I. Solomon, *J. Am. Chem. Soc.* **2002**, 124, 10810; b) N. Lehnert, R. Y. N. Ho, L. Que, Jr., E. I. Solomon, *J. Am. Chem. Soc.* **2001**, 123, 12802.
- [6] F. Neese, E. I. Solomon, *J. Am. Chem. Soc.* **1998**, 120, 12829.
- [7] a) F. Neese, J. M. Zaleski, K. L. Zaleski, E. I. Solomon, *J. Am. Chem. Soc.* **2000**, 122, 11703; b) E. I. Solomon, A. Dekker, N. Lehnert, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2003**, 100, 3589.
- [8] a) K. Meyer, E. Bill, B. Mienert, T. Weyhermüller, K. Wieghardt, *J. Am. Chem. Soc.* **1999**, 121, 4859; b) C. A. Grapperhaus, B. Mienert, E. Bill, T. Weyhermüller, K. Wieghardt, *Inorg. Chem.* **2000**, 39, 5306.
- [9] a) M. Costas, J. U. Rohde, A. Stubna, R. Y. N. Ho, L. Quaroni, E. Münck, L. Que, Jr., *J. Am. Chem. Soc.* **2001**, 123, 12931; b) H. F. Hsu, Y. H. Dong, L. J. Shu, V. G. Young, L. Que, Jr., *J. Am. Chem. Soc.* **1999**, 121, 5230.
- [10] C. E. MacBeth, A. P. Golombek, V. G. Young, C. Yang, K. Kucera, M. P. Hendrich, A. S. Borovik, *Science* **2000**, 289, 938.
- [11] a) J. E. Penner-Hahn, K. S. Eble, T. J. McMurtry, M. Renner, A. L. Balch, J. T. Groves, J. H. Dawson, K. O. Hodgson, *J. Am. Chem. Soc.* **1986**, 108, 7819; b) T. Wolter, W. Meyer-Klaucke, M. Muther, D. Mandon, H. Winkler, A. X. Trautwein, R. Weiss, *J. Inorg. Biochem.* **2000**, 78, 117.
- [12] A. Volbeda, M.-H. Charon, C. Piras, E. C. Hatchikian, M. Frey, J. C. Fontecilla-Camps, *Nature* **1995**, 373, 580.
- [13] S. Foerster, M. Stein, M. Brecht, H. Ogata, Y. Higuchi, W. Lubitz, *J. Am. Chem. Soc.* **2003**, 125, 83.
- [14] K. A. Bagley, E. C. Duin, W. Roseboom, S. P. J. Albracht, W. H. Woodruff, *Biochemistry* **1995**, 34, 5527.