

Biosynthetische anorganische Chemie

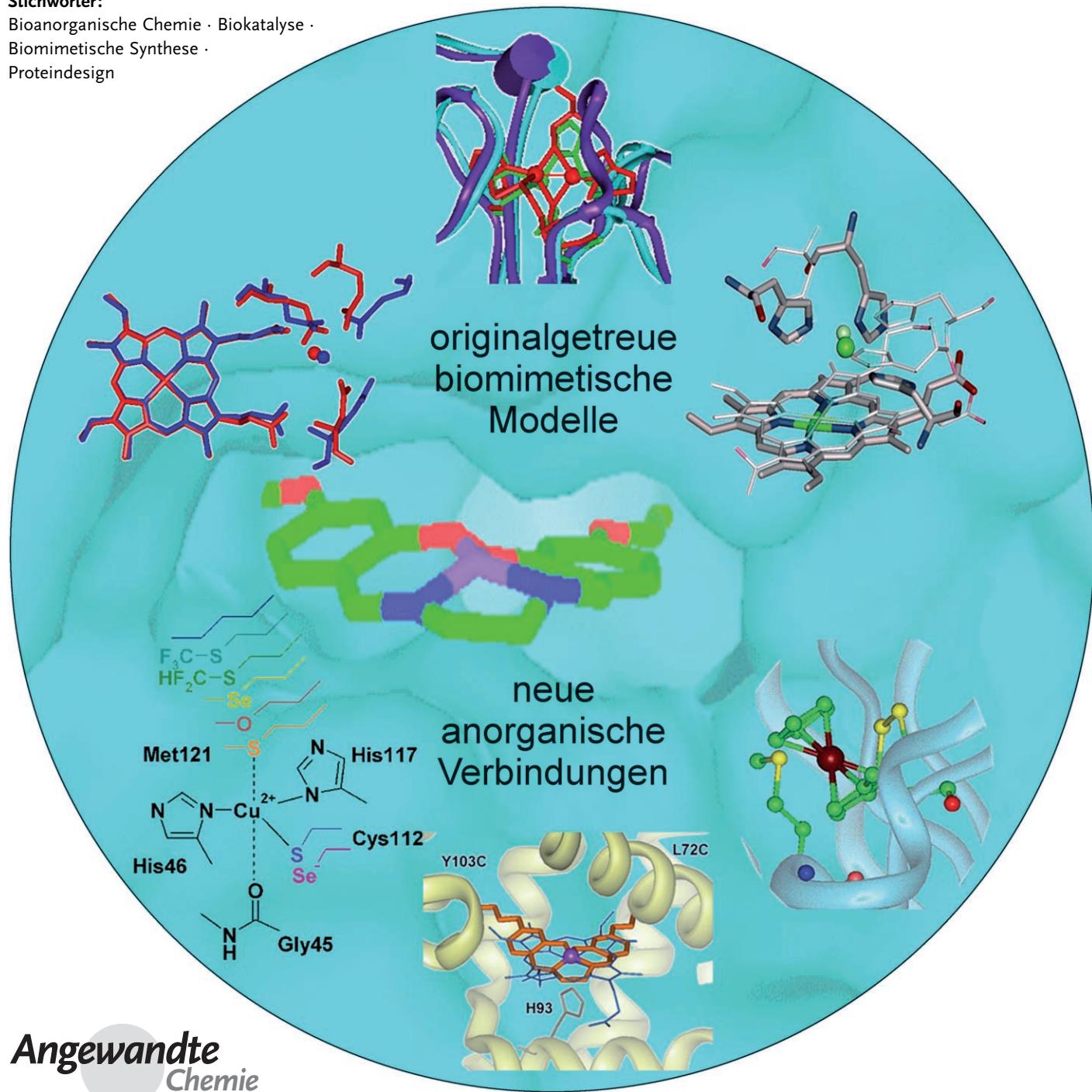
Yi Lu*

Stichwörter:

Bioanorganische Chemie · Biokatalyse ·

Biomimetische Synthese ·

Proteindesign



Anorganische Chemie und Biologie können sehr voneinander profitieren. Nachdem anorganische Synthese und physikalische Chemie zu den großen Erfolgen bei der Aufklärung der Rolle von Metallionen in biologischen Systemen beigetragen haben, sollen nun biologische Systeme bei der Weiterentwicklung der Koordinationschemie helfen. Ein Beispiel dafür sind kleine, stabile, leicht herstellbare und gut charakterisierte Proteinliganden für die Synthese neuer anorganischer Verbindungen. Diese „biosynthetische anorganische Chemie“ wird erst dank einiger Entwicklungen in der Biologie möglich. Der Aufsatz beginnt mit Fortschritten bei der Synthese genauer Modelle von komplexen Metalloproteinen. Anschließend wird gezeigt, wie das Konzept für anorganische Chemie ebenso wie Biologie neuartige Verbindungen hervorbringen kann. Im Vordergrund stehen „Synthesetricks“, die von biologischen Systemen erlernt wurden, sowie neue Strukturen.

1. Einleitung

Metallionen katalysieren zahlreiche chemische und biologische Reaktionen, wobei die Reaktivität nicht nur durch Variieren des Metallions, sondern auch durch das Vorliegen der Metallionen in verschiedenen Oxidationszustände moduliert werden kann.^[1–6] Die erfolgreiche Synthese und Anwendung neuer Metallkomplexe oder Metalloenzyme kann einen großen Einfluss auf alle Gebiete der Chemie und Biologie ausüben, seien es die Materialwissenschaften, die organische und medizinische Chemie oder die Biochemie und Zellbiologie. Ein wichtiges Beispiel ist die Entwicklung von Metallkatalysatoren für die Stickstoff-Fixierung, Methan-Hydroxylierung und CO-Oxidation oder -Insertion (Tabelle 1).^[7,8] Diese Katalysatoren sind Schlüsselkomponenten für eine Chemieindustrie, die lebensnotwendige Rohchemikalien wie Düngemittel im Multimilliarden-Dollar-Maßstab produziert.

Interessanterweise können viele der in Tabelle 1 beschriebenen Reaktionen sowohl durch chemisch synthetisierte Katalysatoren als auch durch biologische Enzyme katalysiert werden. Eine genauere Betrachtung zeigt, dass die Katalysatoren ein und dieselbe Reaktion unter unterschiedlichen Bedingungen vermitteln: Chemische Systeme arbeiten im Allgemeinen bei hohen Temperaturen und Drücken in organischen Lösungsmitteln, biologische Systeme hingegen bei Umgebungstemperatur und -druck in Wasser. Außerdem führen Biokatalysatoren häufig zu hohen Umsätzen. Daher lautet die Frage nicht, ob Katalysatoren für milde Reaktionsbedingungen und hohe Umsatzzahlen entwickelt werden können, sondern wie dies möglich ist.

Eine flüchtige Betrachtung der Beispiele in Tabelle 1 kann zu dem Schluss führen, dass ein System dem anderen überlegen ist, doch beide Systeme haben ihre Vor- und Nachteile (Tabelle 2). Die chemischen Katalysatoren sind im Allgemeinen kleiner, leichter und billiger zu synthetisieren und charakterisieren sowie stabiler unter hohen Temperatu-

Aus dem Inhalt

1. Einleitung	5715
2. Anwendung der biosynthetischen anorganischen Chemie für biomimetische Modellsysteme	5717
3. Biosynthetische anorganische Chemie zur Herstellung neuartiger anorganischer Komplexe	5722
4. Schlussfolgerungen und Ausblick	5725

ren und Drücken. Diese praktischen Aspekte erschweren den Einsatz von Enzymen als Katalysatoren in industriellen Synthesen, obwohl Enzyme über eine Reihe erstrebenswerter Eigenschaften verfügen. Erstens stabilisieren sie den Übergangszustand, indem sie ein starreres aktives Zentrum bilden, und beschleunigen so die Katalyse bei Umgebungstemperatur und -druck. Zweitens reagieren sie gezielt mit nur einer funktionellen Gruppe eines organischen Substrats, sodass Schutzgruppen, die in der Synthesechemie oft unerlässlich sind, weitgehend überflüssig werden. Drittens ist das katalytische Zentrum in Enzymen geschützt, was eine höhere Katalysatorstabilität und somit auch höhere Umsatzzahlen zur Folge hat. Viertens erzielen Enzyme eine hohe Regio-, Stereo- und Enantioselektivität. Fünftens kann die sekundäre Koordinationssphäre einer Metallbindungsstelle im komplexen Proteingerüst ortsspezifisch (im Unterschied zu lösungsmittelinduziert) verändert werden. Je nach der elektrostatischen Umgebung und der Hydrophobie variieren beispielsweise die pK_s -Werte für Glutaminsäure im gleichen Protein zwischen 4.0 und 8.2.^[9] Schließlich sind Enzyme umweltverträglich, da sie unter physiologischen Bedingungen in wässriger Lösung und mit biokompatiblen und biologisch abbaubaren Liganden synthetisiert und eingesetzt werden.

Da chemische und biologische Systeme jeweils Vor- und Nachteile aufweisen, stellt sich die Frage, ob die Vorteile beider Systeme kombiniert werden können. Mit diesem Ziel wurden synthetische biomimetische Modellsysteme aus kleinen organischen Molekülen für viele Metalloproteine entwickelt und charakterisiert.^[10] Dieser Synthesearnsatz hat sich besonders bei der Aufklärung der Strukturen und Funktionen von Metalloproteinen bewährt.

[*] Prof. Y. Lu
Department of Chemistry
University of Illinois at Urbana-Champaign
Urbana, IL 61801 (USA)
Fax: (+1) 217-244-3186
E-Mail: yi-lu@uiuc.edu

Tabelle 1: Chemische und biologische Systeme im Vergleich.

Reaktion	Chemisches System	Biologisches System
Stickstoff-Fixierung	$\text{N}_{2(g)} + 3 \text{H}_{2(g)} \rightarrow 2 \text{NH}_{3(g)}$ (α -Fe-Katalysator, 400–550 °C, 10 ² atm)	$\text{N}_2 + 8 \text{H}^+ + 8 \text{e}^- + 16 \text{MgATP} \rightarrow 2 \text{NH}_3 + \text{H}_2 + 16 \text{MgADP} + 16 \text{P}_i$ (Nitrogenase)
Methan-Hydroxylierung	$\text{CH}_4 + \text{H}_2\text{O} \rightarrow \text{CO} + 3 \text{H}_2$ (Ni-Katalysator, 700–900 °C, 1–25 bar) $\text{CO} + 2 \text{H}_2 \rightarrow \text{CH}_3\text{OH}$ (Cu/Zn-Katalysator, 250–280 °C, 70–110 bar)	$\text{CH}_4 + \text{O}_2 + \text{NADH} + \text{H}^+ \rightarrow \text{CH}_3\text{OH} + \text{H}_2\text{O} + \text{NAD}^+$ (Methan-Monooxygenase)
CO-Oxidation	$\text{CO} + \text{H}_2\text{O} \rightarrow \text{CO}_2 + \text{H}_2$ (Fe/Cu-Katalysator, > 200 °C)	$\text{CO} + \text{H}_2\text{O} \rightarrow \text{CO}_2 + 2 \text{H}^+ + 2 \text{e}^-$ (CO-Dehydrogenase)
CO-Insertion	$\text{CH}_3\text{OH} + \text{CO} \rightarrow \text{CH}_3\text{COOH}$ ($\text{Rh(I)}\text{I}_2(\text{CO})_2^-$, 120 °C, 30 atm)	$\text{CH}_3[\text{M}] + \text{CO} + \text{HS-CoA} \rightarrow \text{CH}_3(\text{CO})\text{-S-CoA} + \text{H}^+ + [\text{M}^-]^{[a]}$ (Acetyl-CoA-Synthase)

[a] $\text{CH}_3[\text{M}]$ ist ein Corrinoid-Eisen-Schwefel-Protein, das in der Reaktion als Methylgruppendonator fungiert; HS-CoA ist Coenzym A.

Tabelle 2: Vorteile chemischer und biologischer Systeme.

Chemie	Biologie
Katalysatoren/Reaktanten	Enzyme/biologische Stoffe
leichte Synthese	milde Bedingungen
leichte Charakterisierung	Starrheit/Schutz
stabil	ortsspezifische Veränderung der sekundären Koordinationssphäre
billigere Herstellung	Regio- und Enantioselektivität umweltverträglich
Ziel: Erzeugung neuer Strukturen/Funktionen unter Verwendung eines minimalistischen Ansatzes	Ziel: Untersuchung der natürlichen Proteine und ihrer Varianten

Trotz der gewaltigen Fortschritte bei der biomimetischen Modellierung ist es weiterhin schwierig, einige Eigenschaften von Metalloproteinen nachzuahmen, etwa die ortsspezifische Einstellung der sekundären Koordinationssphäre sowie ihre Regio-, Stereo- und Enantioselektivität. Modelle, die sowohl die Struktur als auch die Funktion von Metalloproteinen wiedergeben, sind selten. Diese Herausforderungen können, wie vielleicht alle Aufgaben der anorganischen Syntheseschemie, durch Ligandendesign bewältigt werden. Wiederholt hat eine bedachte Wahl der Liganden die Modelle für Metalloproteine verbessert,^[10] insbesondere um Strukturmerkmale der sekundären Koordinationssphäre, wie Wasserstoffbrücken-

einzuführen.^[11,12] Der Hauptunterschied zwischen synthetischen Modellen und Metalloproteinen besteht darin, dass in synthetischen Modellen häufig nicht wasserlösliche organische Liganden eingesetzt werden, während Metalloproteine aus Polypeptiden oder Proteinen bestehen. Polypeptide und Proteine sind insofern ungewöhnliche organische Moleküle, als sie normalerweise in Wasser löslich sind und unter milden Bedingungen synthetisiert werden können. Durch spezifische Faltung bilden Polypeptide und Proteine ein starres Netzwerk, das die ortsspezifische Einstellung der sekundären Koordinationssphäre ermöglicht. Es spricht für die Polypeptide und Proteine, dass sie sich im Zuge der Evolution als Liganden für metallhaltige Katalysatoren und Enzyme durchgesetzt haben.

Warum sollten also die Liganden von biologischen Systemen nicht auch zur Synthese von Modellverbindungen verwendet werden? Früher erschien der Einsatz von Proteinen oder ihren Varianten als Liganden undenkbar, da ihre Herstellung schwierig und kostspielig war. Jedoch verringerten Fortschritte in der Biologie (Klonierung, Proteinexpression, ortsspezifische Mutagenese und Polymerase-Kettenreaktion) den Zeitaufwand bei der Synthese von Proteinen und der Abwandlung von Aminosäureresten. Während Konstruktion, Expression und Reinigung einer Proteinreihe zuvor viele Monate oder sogar Jahre in Anspruch nahmen, genügen heute Wochen oder sogar Tage. Dieser Fortschritt ist der Entwicklung in der Computerindustrie vergleichbar (Abbildung 1). Außerdem sind nun mehrere hundert Milligramm bis sogar Gramm an reinem Protein erhältlich. Durch die Entwicklung der Biotechnologie können bestimmte chemische Syntheseschritte bei der Herstellung von pharmazeutischen Produkten durch Biosynthesen ersetzt werden. Damit wird die Zahl der Syntheseschritte reduziert, die Ausbeuten werden gesteigert, und es entstehen weniger chemische Abfallprodukte,^[13,14] sodass der Unterschied in der Effizienz zwischen den Synthesen kleiner organischer Moleküle und den Synthesen von Proteinen schwindet. Außerdem ermöglichten Fortschritte in der Biophysik die Routineanalyse von Metalloproteinen mit verschiedenen spektroskopischen Methoden.^[15–17] Durch neue Verfahren der Strukturbioologie mit hochenergetischer Synchrotronstrahlung (Kristallstrukturanalyse) und Hochfeldmagneten (NMR-Spektroskopie) ge-



Yi Lu beendete 1986 sein Studium an der Beijing University (China) und promovierte 1992 an der University of California in Los Angeles bei Prof. Joan Selverstone Valentine. Nach zwei Jahren als Postdoktorand am California Institute of Technology in der Forschungsgruppe von Prof. Harry B. Gray begann er seine selbstständige Laufbahn als Assistant Professor am Department of Chemistry an der University of Illinois at Urbana-Champaign, an der er nun Alumn Research Scholar Professor für Chemie ist. Sein Interesse gilt der bioanorganischen Chemie.

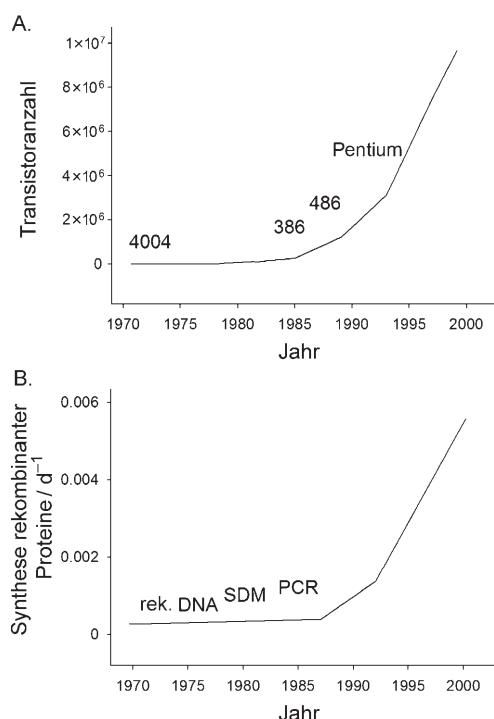


Abbildung 1. Vergleich der Fortschritte in Computerindustrie und Biologie. A) Nach Moores Gesetz verdoppelt sich die Transistoranzahl, und damit die Rechengeschwindigkeit, binnen 18 Monaten. B) Schätzwerte für die Geschwindigkeit von Klonierung, Expression und Reinigung rekombinanter Proteine (Angabe als Kehrwert der Anzahl von Tagen, die für den Gesamtprozess benötigt werden). Techniken mit rekombinanter DNA, die ortsgerichtete Mutagenese (SDM) und die Polymerase-Kettenreaktion (PCR) haben den biologischen Prozess deutlich beschleunigt.

lingt die schnelle Aufstellung dreidimensionaler Strukturen von Proteinen. Daher können mithilfe kleiner, stabiler, leicht herstellbarer Proteine mit definierten Gerüsten als „Liganden“ neue anorganische Verbindungen synthetisiert und charakterisiert werden.

Der biosynthetische Ansatz nutzt dieselben Methoden wie biochemische Untersuchungen natürlicher Enzyme und ihrer Mutanten, die folgenden Beispiele werden jedoch zeigen, dass sich die beiden Ansätze deutlich unterscheiden. Erstens ist die biosynthetische Methode, wie alle biomimetischen Methoden, ein minimalistischer Ansatz: Im Mittelpunkt steht die Frage, ob die in natürlichen Enzymen identifizierten, *notwendigen* Strukturmerkmale *ausreichend* sind, um die Struktur und Funktion des Enzyms zu übertragen. Somit ergänzen sich die beiden Methoden. Zweitens werden bei der biosynthetischen Methode stabile, leicht herstellbare und gut charakterisierte Proteine eingesetzt; erfolgreiche Modelle eignen sich für Untersuchungen der Struktur und Funktion oft genauso gut wie natürliche Enzyme, wenn nicht sogar besser. Drittens bieten biosynthetische Modelle durch den Vergleich unterschiedlicher Metallbindungszentren im selben Proteingerüst zusätzliche Vorteile. Schließlich führt die biosynthetische Methode zu neuen Verbindungen, deren Strukturen und Reaktivitäten in Biologie und anorganischer Chemie beispiellos sind.

2. Anwendung der biosynthetischen anorganischen Chemie für biomimetische Modellsysteme

In biomimetischen Modellsystemen sind die Vorteile von Chemie und Biologie effektiv kombinierbar. Auf diese Weise können die minimal erforderlichen Strukturmerkmale zur Bildung von Metallbindungstellen mit einer bestimmten Funktion ermittelt werden. Die Modelle tragen zur Aufklärung der Struktur-Funktions-Beziehung von Zielproteinen bei, und gleichzeitig können sie als neue Verbindungen mit ungewöhnlichen Strukturen unsere Kenntnisse in der Koordinationschemie erweitern. Die erhaltenen Verbindungen sind häufig kleiner und strukturell besser definiert als die natürlichen Proteine, und sie eignen sich daher gut für praktische Anwendungen.

Biosynthetische Modellsysteme mit kleinen, stabilen und gut charakterisierten Proteinen als Liganden erfüllen denselben Zweck. Da sie die gleichen Liganden nutzen wie die Zielproteine und unter fast identischen physiologischen Bedingungen arbeiten, stellen sie oft bessere Modelle für praktische Anwendungen dar. Einige Beispiele sollen dies veranschaulichen.

2.1. Anorganische Biosynthese mit dem gleichen Proteingerüst und schleifenspezifischer Mutagenese

Das Cu_A-Zentrum ist eine gemischvalente, zweikernige Kupfereinheit, deren Kupferionen an je einen Histidinrest (His181 und His224) koordiniert und durch die Schwefelatome von zwei Cysteinresten überbrückt sind (Cys216 und Cys220, Abbildung 2 A, oben).^[18–21] Zusätzlich sind in axialer Position schwache Liganden wie das Thioether-Schwefelatom von Methionin (Met227) und die Carbonyl-Sauerstoffatome von Isoleucin (Ile180), Histidin (His224) und Glutamat (Glu218) vorhanden (Abbildung 2 A, unten). Das in anorganischer Chemie und Biologie einzigartige Cu_A-Zentrum wirkt als Elektronentransferzentrum in der Cytochrom-c-Oxidase (CcO),^[22–26] einer terminalen Oxidase der At-

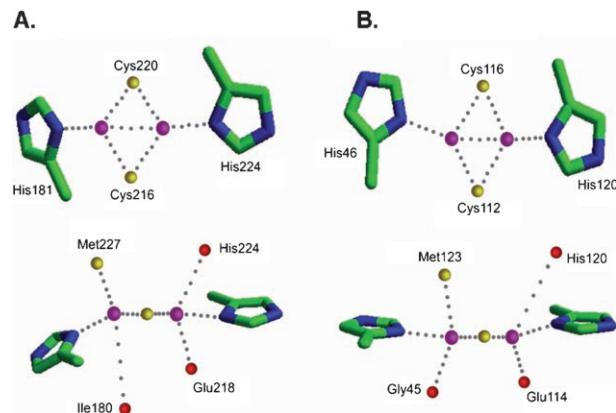


Abbildung 2. Kristallstrukturen: A) Das Cu_A-Zentrum in Cytochrom-c-Oxidase aus *P. denitrificans* und B) ein biosynthetisches Cu_A-Modell in Azurin. Die oberen Abbildungen zeigen das Cu_A-Zentrum mit Cu₂S₂[–] (Cys) in einer Ebene, die unteren Abbildungen zeigen das Cu_A-Zentrum senkrecht zu dieser Ebene.

mungskette eukaryotischer Mitochondrien und einiger aeroben Bakterien, und in der Distickstoffoxid-Reduktase (N_2OR)^[27,28] denitrifizierender Bakterien. Zudem war es das erste biologische System mit einer Metall-Metall-Bindung.^[29] Metall-Metall-Bindungen liegen in vielen anorganischen Koordinationsverbindungen mit Ionen später Übergangsmetalle vor, doch selten sind Metalle der ersten Periode wie Kupfer beteiligt.^[30] Während man gemischvalente Zweikern- oder Mehrkern-Kupferkomplexe mit einem vollständig lokalisierten (Klasse I) oder teilweise delokalisierten (Klasse II) ungepaarten Elektron seit längerem kennt,^[31,32] sind Kupferkomplexe wie das Cu_A -Zentrum mit vollständig delokalisierten gemischvalenten Zuständen selten (Klasse III).^[33-40] In beiderlei Hinsicht ist die Synthese des Cu_A -Zentrums und die Aufklärung seiner Strukturmerkmale für die Funktion von großem Interesse.

Dazu wurde eine Reihe synthetischer Modelle mit organischen Liganden entwickelt, die zumeist eine gemischvalente zweikernige Kupfereinheit und eine Kupfer-Kupfer-Bindung, aber keine überbrückenden Thiolate enthielten.^[33,34,38,39,41] Eine Modellverbindung mit überbrückenden Thiolaten, doch ohne Kupfer-Kupfer-Bindung, ist ebenfalls bekannt.^[36] Kürzlich wurde auch über die Synthese einer zweikernigen Kupfereinheit mit einer Kupfer-Kupfer-Bindung und zwei überbrückenden Stickstoffatomen berichtet.^[42] Zur Herstellung eines genaueren Modells des Cu_A -Zentrums wurden stabile, leicht erhältliche und gut charakterisierte blaue Kupferproteine, beispielsweise Amicyanin^[43] und Azurin,^[44] als Liganden eingesetzt. Die Strukturen von blauen Kupferproteinen und Cu_A enthaltenden Proteinen stimmten gut überein,^[45] und eine Sequenzanalyse zeigte, dass sich die einkernigen blauen Kupferproteine und die zweikernigen Cu_A -Proteine hauptsächlich in einer einzigen Schleife zwischen zwei β -Strängen unterscheiden. Durch den Austausch der Schleife in blauen Kupferproteinen gegen die entsprechende Schleife der Cu_A -Proteine (Abbildung 3) konnte das Cu_A -Zentrum in Amicyanin^[43] und Azurin^[44] gut nachgeahmt werden. Einer Röntgenkristallstrukturanalyse zufolge ist das Cu_A -Zentrums im Azurin-Modell fast mit dem natürlichen Cu_A -Zentrum identisch; auch Struktureigenschaften in der sekundären Koordinationssphäre wie die nichtbindenden Wechselwirkungen zwischen der Thioether-Gruppe von Methionin und den Carbonyl-Sauerstoffatomen des Peptids stimmen überein (Abbildung 2B).^[46]

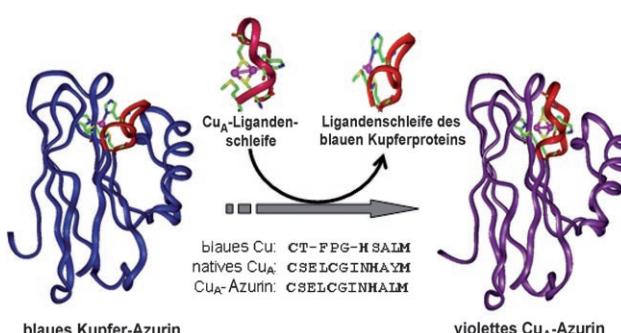


Abbildung 3. Entwicklung eines biosynthetischen Cu_A -Modells in Azurin durch schleifenspezifische Mutagenese.

Die Entwicklung eines genauen Modells für ein natürliches Protein ist nur ein Maß der Wirksamkeit eines solchen Ansatzes; Erkenntnisse zur Struktur und Funktion des Metallzentrums sind ebenfalls von Bedeutung. Das biosynthetische Cu_A -Modell lieferte auch diesbezüglich neue Einblicke. Beispielsweise wurde durch eine Stopped-flow-Untersuchung zur Einführung von Kupferionen in das metallfreie Cu_A -Azurin eine tetragonale Zwischenstufe nachgewiesen, was die Bedeutung von Reduktionsmitteln bei der abschließenden Bildung des Cu_A -Zentrums verdeutlicht.^[47] Die Titration verschiedener Metallionen im Modellsystem deutet darauf hin, dass das Cu_A -Zentrum bevorzugt als $M^{II}M^{I}$ -Zentrum vorliegt (M, M' : beliebige Metalle in der jeweiligen Oxidationsstufe) – ungeachtet der Reihenfolge der Zugabe der Metallionen.^[48,49] Mutagenese-Untersuchungen zeigten, dass die konservierten Cystein-,^[50] Histidin-^[51,52] und Methioninreste^[53] eine wichtige Rolle bei der Aufrechterhaltung der Struktur und der Feinabstimmung der Funktion spielen. Überraschenderweise blieb die zweikernige Kupfereinheit auch weitgehend erhalten, wenn das Histidin gegen Reste ausgetauscht wurde, die nicht an Kupferionen koordinieren (z.B. Ala und Gly), wie durch die charakteristische violette Farbe, die UV/Vis-, MCD-, RR- und ENDOR-Spektren offensichtlich ist.^[51,52]

Bis vor kurzem waren nur wenige vollständig delokalierte, gemischvalente zweikernige Kupferverbindungen der Klasse III bekannt. Noch seltener ist die reversible Umwandlung zwischen verschiedenen Verbindungsklassen mit delokalisierten $[Cu^{1.5}\dots Cu^{1.5}]$ - und valenzdefinierten $[Cu^{II}\dots Cu^I]$ -Zuständen. Die Untersuchung des Cu_A -Zentrums in Azurin bestätigte einen solchen reversiblen Übergang zwischen delokalisierten und definierten gemischvalenten Zuständen, der durch eine Änderung des pH-Werts ausgelöst wurde.^[54] Es ist bekannt, dass das Cu_A -Zentrum als Elektroneneintrittsstelle in der Cytochrom-c-Oxidase wirkt, seine Rolle beim protonengekoppelten Elektronentransfer wurde jedoch nicht genau bestimmt. In dieser Arbeit wurde nachgewiesen, dass die Protonierung des C-terminalen His-Restes nicht nur zu einem valenzdefinierten Zustand des Cu_A -Zentrums führt, sondern auch das Reduktionspotential deutlich erhöht.^[54] Da sich der C-terminale His-Rest in Cytochrom-c-Oxidasen am Elektronentransferweg von Cu_A zu Häm *a* befindet und da die Protonierung das Reduktionspotential steigern und so den Elektronenfluss vom Cu_A zum Häm *a* verhindern kann, spielen das Cu_A -Zentrum und der Histidinrest eine wichtige Rolle beim protonengekoppelten Elektronentransfer.^[54]

Solche Beobachtungen wurden an natürlichen Cu_A -Zentren, insbesondere löslichen CcO-Fragmenten mit einem Cu_A -Zentrum,^[18-21] erhalten. Biosynthetische Modelle ermöglichen darüber hinaus einzigartige Einblicke, die weder aus Untersuchungen natürlicher Enzyme noch anhand von synthetischen Modellverbindungen leicht gewonnen werden können. Beispielsweise gelang durch die biosynthetische Methode unter Verwendung von Azurin als „Ligand“ und durch Austausch der Ligandenschleife des blauen Kupfer-Zentrums gegen diejenige des Cu_A -Zentrums die Einführung von zwei Elektronentransfer(ET)-Zentren im selben Proteingerüst. Röntgenstrukturanalysen ergaben, dass ein Kup-

feratom im Cu_A-Zentrum exakt mit dem blauen Kupfer-Zentrum überlagert (Abbildung 4A).^[46] Daher bot dieses biosynthetische Modell eine einzigartige Möglichkeit, die beiden ET-Zentren im selben Proteingerüst zu vergleichen

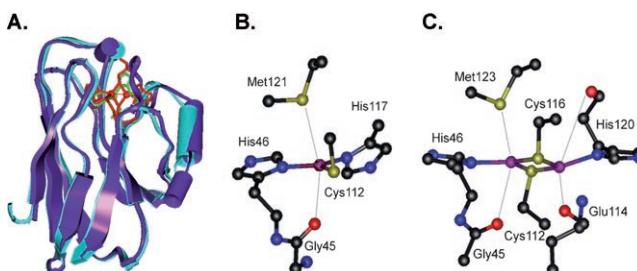


Abbildung 4. Kristallstrukturen: A) Überlagerung von blauem Kupfer-Azurin (hellblau) und dem biosynthetischen Cu_A-Modell in Azurin (violett). Die Umgebung des Kupferions im blauen Kupferprotein (B) ist fast identisch mit derjenigen eines Kupferions im violetten Cu_A-Zentrum (C).

und damit andere Faktoren, die die Eigenschaften des Proteins beeinflussen, zu minimieren. Beispielsweise zeigen einander entsprechende Mutationen am konservierten, axial gebundenen Methioninrest im blauen Kupferprotein (Met 121, Abbildung 4B) und im Cu_A-Azurin (Met 123, Abbildung 4C), dass das Methionin am Cu_A-Zentrum (< 25 mV) weit weniger Einfluss auf das Reduktionspotential ausübt als am blauen Kupferzentrum (> 170 mV).^[53] Andererseits erfolgt der Elektronentransfer zum Cu_A-Zentrum, trotz eines niedrigeren Reduktionspotentials, vom gleichen Donor bei gleichem Abstand schneller als zum blauen Kupfer-Zentrum.^[55] Damit wurde direkt nachgewiesen, dass das Cu_A-Zentrum ein effizienteres ET-Zentrum ist.

Diese Erkenntnisse helfen, die verschiedenen Rollen der beiden Kupferzentren zu verstehen. Für den Elektronentransfer von blauen Kupferproteinen zu einer Reihe von Reaktionspartnern in verschiedenen biologischen Systemen ist ein viel breiterer Bereich an Reduktionspotentialen erforderlich (> 600 mV),^[20,21,56,57] das Cu_A-Zentrum ist dagegen Teil der Cytochrom-c-Oxidase, die den Abschluss der Atmungskette mit sehr kleinen Potentialdifferenzen zwischen den Redoxpartnern bildet (< 50 mV).^[58] In diesem Fall könnten große Potentialabweichungen den Elektronenfluss in die richtige Richtung verhindern. Die rhombische Cu₂S₂- (Cys)-Struktur von Cu_A bietet einen Ansatzpunkt zur Minimierung von Reduktionspotentialänderungen durch Variation der axialen Liganden. Jedoch muss das Cu_A-Zentrum trotz der geringen Triebkraft weiter Elektronen mit einer angemessenen Geschwindigkeit auf seine Partner übertragen. Daher optimiert es seine Struktur durch Verringerung der Reorganisationsenergie, um ein effizienteres ET-Zentrum zu bilden als das blaue Kupferzentrum.

Bei der Entwicklung genauer biosynthetischer Modelle des beschriebenen Cu_A-Zentrums wurden Ligandenschleifen von Templatproteinen gegen diejenigen eines Zielproteins ausgetauscht, das eine ähnliche Struktur aufweist (schleifenspezifische Mutagenese). Eine Prüfung der Proteinstrukturdatenbank (PDB) deutet an, dass diese Methode nicht auf

Einzelfälle beschränkt ist, sondern allgemein zur Entwicklung von biosynthetischen Modellen vieler Metalloproteine verwendet werden kann. Beispielsweise gehören Azurin, Amicyanin und Cu_A-Proteine zu einer Gruppe mit dem gleichen Gerüst, dem Mäander-β-Fass-Motiv. Es ist das zweithäufigste Motiv in der PDB und viele Proteine mit verschiedenen Strukturen und Funktionen des aktiven Zentrums, beispielsweise Immunglobine, Beta-Amylase, Cytochrom-c-Oxidase, Nitrit-Reduktase und Superoxid-Dismutase, weisen das gleiche Gerüst auf (Abbildung 5).^[59]

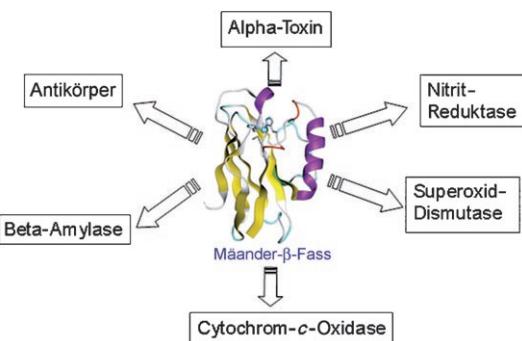


Abbildung 5. Das Mäander-β-Fass-Motiv kommt in über 600 Proteinen verschiedener Klassen mit unterschiedlichen Funktionen vor. Da sich die aktiven Zentren meist in der Schleifenregion befinden, sind neue Metalloproteine durch schleifenspezifische Mutagenese zugänglich.

In den meisten dieser Proteine befinden sich die aktiven Zentren innerhalb oder zwischen den Schleifen. Die Natur hat offenbar ein thermodynamisch stabiles Gerüst hervorgebracht, dem sie durch den einfachen Austausch der Schleifen viele verschiedene Proteinstrukturen und -funktionen überträgt. Auf diese Weise wird die Stabilität der Proteinstruktur weniger stark beeinträchtigt als durch eine Veränderung des Gerüsts. Dieser „Trick“ ist für die biosynthetische anorganische Chemie von großer Bedeutung.

Ein anderes Beispiel aus der Natur, bei dem das gleiche Proteingerüst für unterschiedliche Funktionen eingesetzt wird, sind die Häm-Peroxidasen.^[60] Alle Häm-Peroxidasen enthalten ein aktives Häm-Zentrum, in der Mangan-Peroxidase (MnP) liegt jedoch zusätzlich noch eine Mn^{II}-Bindungsstelle vor (Abbildung 6A). Die Oxidation von Mn^{II} ist entscheidend für die MnP-Funktion (Schema 1) beim biologischen Abbau von Lignin, dem zweithäufigsten Biopolymer (nach Cellulose), sowie beim Abbau pflanzlicher Bestandteile zu Erdöl.^[61] Interessanterweise hat Cytochrom-c-Peroxidase (CcP) nicht nur die gleiche allgemeine Struktur, sondern auch eine ähnliche Häm-Bindungsstelle. Die Hauptunterschiede bestehen darin, dass CcP keine Mn^{II}-Bindungsstelle enthält und dass sich Trp anstelle von Phe in der Nähe der Häm-Bindungsstelle befindet (Abbildung 6A,B).^[62] Eine genauere Untersuchung zeigt, dass mehrere Liganden an Mn^{II} der MnP in der CcP nicht vorhanden sind. Zur Umwandlung von CcP, einem Enzym der Backhefe, in eine MnP mit ähnlicher Funktion wurden an den entsprechenden Positionen Reste der CcP gegen Reste der MnP ausgetauscht (Abbildung 6C), und die so erhaltenen neuen CcP-Varianten wiesen erhöhte MnP-Funktion auf.^[63–65] Daraufhin zeigte der Austausch

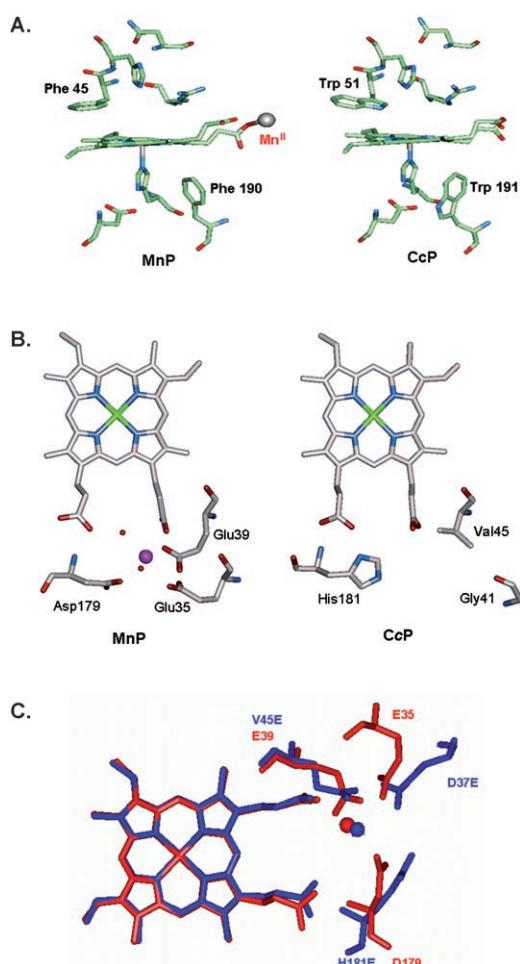
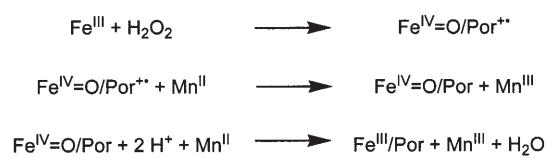
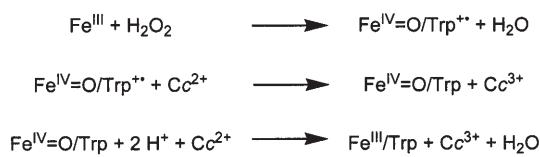


Abbildung 6. A) Ähnlichkeiten und Unterschiede zwischen Mangan-Peroxidase (MnP) und Cytochrom-*c*-Peroxidase (CcP); B) Vergleich der Häm-Manganbindungsstelle in MnP und CcP; C) Kristallstrukturen von MnP (rot) und einer CcP-Variante, die MnP nachahmt (blau).



Schema 1. Katalytische Kreisläufe von CcP (oben) und MnP (unten). Trp = Tryptophan, Por = Häm-Porphyrin.

der Trp-Reste von CcP gegen die Phe-Reste von MnP, dass die Phe-Reste verschiedene Rollen bei der MnP-Funktion spielen; während die Mutation Trp 191 Phe die Verbindung I (eine Zwischenstufe) stabilisierte, steigerte die Mutation

Trp 51 Phe die Aktivität deutlich, denn sie erhöhte die Reaktivität der Verbindung II, deren Mn^{II}-Oxidation der geschwindigkeitsbestimmende Schritt im Reaktionsmechanismus von MnP ist.^[66,67]

2.2. Nichtkovalente Einstellung der sekundären Koordinationssphäre durch anorganische Biosynthese

Die nichtkovalente Feineinstellung der sekundären Koordinationssphäre von Metallbindungsstellen ist ein weiterer „Trick“ biologischer Systeme. Beispielsweise ist Cytochrome P450 eines der effizientesten Enzyme für asymmetrische Sauerstofftransfer-Reaktionen wie Sulfoxidierung, Epoxidierung und Hydroxylierung an verschiedenen Substraten.^[68] Die primäre Koordinationssphäre besteht aus einer Häm-Einheit mit einem Thiolat-Cys als proximalem Liganden (Abbildung 7 A). Aufgrund der Bedeutung der Häm-

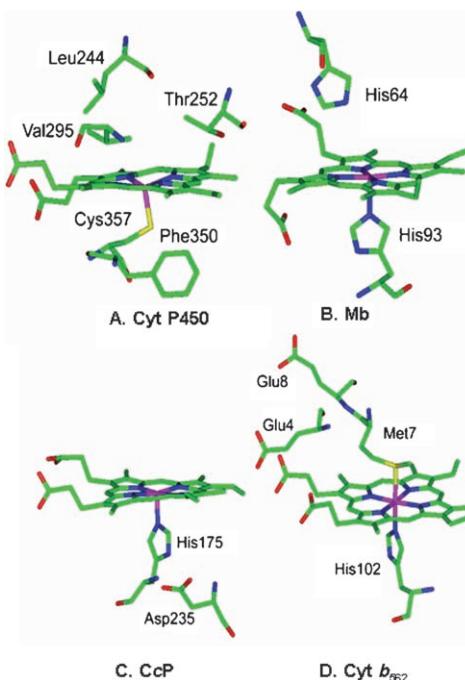


Abbildung 7. Die wichtigsten Strukturunterschiede von Cyt P450 (A), Mb (B), CcP (C) und Cyt b₅₆₂ (D) im Kristall.

Thiolat-Ligation wurde der proximale Ligand Histidin im menschlichen Myoglobin gegen einen Cysteinrest ausgetauscht.^[69,70] Das Spektrum des resultierenden Proteins im Ruhezustand ähnelte demjenigen von Cyt P450. Das Proteinmodell zeigte außerdem eine erhöhte Aktivität bei der asymmetrischen Sulfoxidierung. Jedoch reichte die His-zu-Cys-Mutation in Pferdeherz-Myoglobin alleine nicht zur Häm-Thiolat-Ligation aus.^[71] Eine zusätzliche Mutation des distalen, nichtkoordinierenden Histidinrests zu einem Valin- oder Isoleucinrest ergab dagegen ein P450-ähnliches Protein mit Eisen(III)-Ruhezustand (Abbildung 7B).^[71] Dieser Effekt, den die Autoren als „trans-Effekt“ bezeichneten, simuliert die hydrophobere Umgebung des Cyt P450 (Abbil-

dung 7 A) und trägt stark zur Bindung des axialen Liganden und zur Stabilität bei.

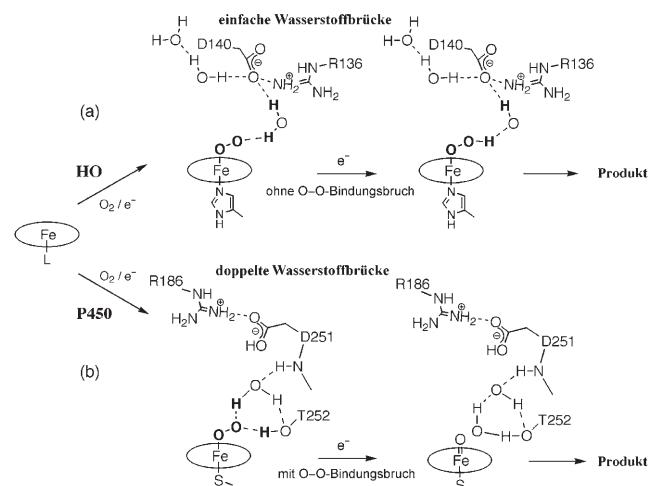
In ähnlicher Weise führte die Mutation des axialen His-Liganden zu Cys in der Cytochrom-*c*-Peroxidase (CcP) zu einem sehr instabilen Liganden, der schnell zur Cysteinsäure oxidiert wurde.^[72] Dann wurde erkannt, dass ein unpolarer Rest neben dem Cys in P450-Proteinen konserviert ist, während an entsprechender Stelle in CcP ein Asparaginsäurerest vorliegt (Abbildung 7C). Daher führte eine weitere Mutation dieses Asp zu Leu zu einem stabilen, fünffach koordinierten High-spin-Häm mit Thiolat-Ligation.^[73] Hierbei wurden auch der erste stabile Cyanoeisen(III)-Komplex und der erste Eisen(II)-Zustand eines P450-Modells erhalten.^[73,74]

Eine stabile Koordination des Cystein-Thiolats im Eisen(II)-Carbonyl-Derivat eines synthetischen Proteins wurde ebenfalls durch Mutationen der axialen His- und Met-Liganden zu Cys bzw. Gly im Cytochrom *b*₅₆₂ erhalten (Abbildung 7D).^[75] Der Austausch von zwei Glutamatresten (Glu4 und Glu8), die von den Häm-Propionat-Gruppen elektrostatisch abgestoßen wurden, gegen Ser war der Schlüssel zum Erfolg. Diese Untersuchungen demonstrierten die Bedeutung der sekundären Koordinationsphäre um die primär koordinierten Liganden bei der Stabilisierung des Metall-Ligand-Bindung.

2.3. Wasser und Wasserstoffbrücken in der anorganischen Biosynthese

Der dritte „Trick“ aus neueren Untersuchungen einer Reihe von Metalloproteinen sind genau festgelegte Wasserstoffbrückennetze zur Feineinstellung der Funktion und Spezifität von Metalloproteinen. Beispielsweise wurde gezeigt, dass die meisten Häm-Enzyme ein ähnliches Häm-Peroxo-Intermediat durchlaufen und doch unterschiedliche Enzymaktivitäten aufweisen, wie die Monoxygenase (Cyt P450), Häm-Oxygenase (HO) und Oxidase (CcO). In den Röntgenkristallstrukturen von Cyt P450 und HO wurden Wassermoleküle an den Metallbindungsstellen nachgewiesen (Schema 2).^[76,77] Es wurde gezeigt, dass Zahl und genaue Positionen der Wassermoleküle für die Bildung der Wasserstoffbrückennetze entscheidend sind, die wiederum die Reaktivität stark beeinflussen können. Während die Anordnung der Netzwerke in CcO nicht genau aufgeklärt werden konnte, haben Funktionsstudien eines biosynthetischen Modells in Myoglobin ihre Bedeutung bei der Feineinstellung der Reaktivität bestätigt.^[78] Diese Arbeiten ergänzen Studien mit synthetischen Modellen^[79,80] durch einen Strukturvergleich von Myoglobin und Häm-Kupfer-Oxidase. Beide Proteine enthalten eine Häm-Gruppe, bei CcO ist jedoch zusätzlich ein Kupferzentrum in etwa 4.7 Å Abstand vom Häm-Eisenzentrum vorhanden (Abbildung 8A). Um ein biosynthetisches Modell für CcO zu erhalten, wurden His-Liganden in die distale Seite von Pottwal-Mb an entsprechenden Positionen eingeführt (Abbildung 8B).^[81]

Spektroskopischen Untersuchungen zufolge ist das Mb-Modell (Cu_BMb) der CcO sehr ähnlich. Außerdem machten Untersuchungen dieses biosynthetischen Modells deutlich, dass die Gegenwart eines Kupferions das Redoxpotential des



Schema 2. Vorschlagene Rolle der Wasserstoffbrücken in HO und Cyt P450.^[76]

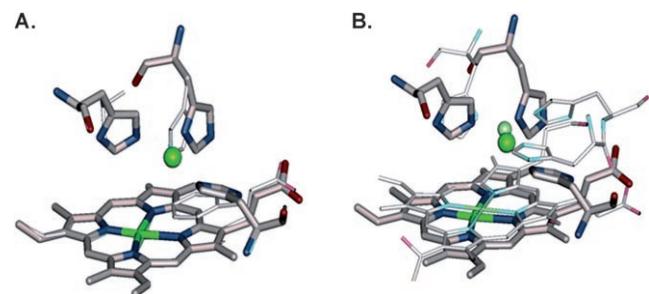
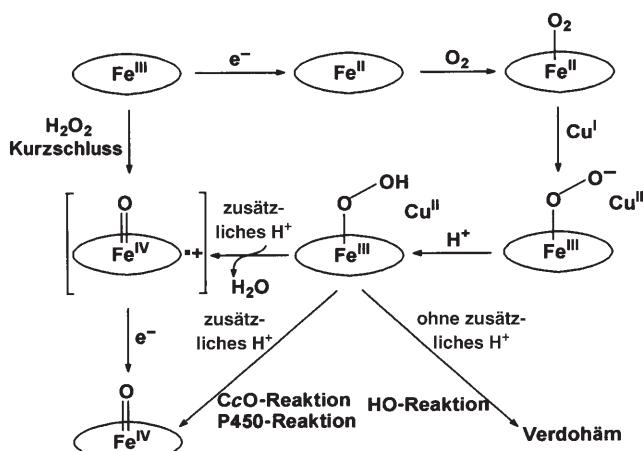


Abbildung 8. Kristallstrukturen: A) Überlagerung von CcO mit Pottwal-Myoglobin (dünne Linien). Mb weist keine Cu_B -Bindungsstelle auf, da es ein His, ein Leu und ein Phe anstelle von drei Histidinresten in CcO enthält; B) Überlagerung von CcO mit einem Computermodell von Cu_BMb (Leu 28 His/Phe 43 Phe, dünne Linien).

Häm-Eisenions entscheidend beeinflussen^[82,83] und das sauerstoffbindende Protein Mb in ein sauerstoffaktivierendes Enzym umwandeln kann.^[78,81] Interessanterweise bildet das Proteinmodell in Mb Verdohäm, ein wichtiges Intermediat in HO, anstelle von Ferryl-Häm wie in CcO.^[78] Kontrollexperimente zeigten, dass Proteininstabilität oder veränderte Kräfte an der Bindungsstelle als Ursachen für diese Reaktion ausgeschlossen werden können, weil der Austausch von Cu^{II} oder Cu^I gegen nicht redoxaktive Ionen (z.B. Zn^{II} bzw. Ag^I) die HO-Reaktion nicht begünstigte.^[78] Da alle Reaktionen in Gegenwart von Katalase ausgeführt wurden, konnte auch exogenes Peroxid als Ursache für die Bildung von Verdohäm ausgeschlossen werden. Die Reaktion von Cu_BMb mit H_2O_2 (2e^- -reduziertem O_2 mit zwei zusätzlichen Protonen) führte zu einer Ferryl-Spezies ähnlich der in CcO. Da die HO auch in Gegenwart von Metallionen in der distalen Seite nach Reaktionen von reduziertem Häm mit O_2 oder oxidiertem Häm mit H_2O_2 zum Verdohäm führen wird, ist das biosynthetische Cu_BMb nicht einfach ein HO-Modell. Cu_BMb nimmt eine Mittelstellung zwischen HO und CcO ein (Schema 3), wobei das zusätzliche Proton entweder die CcO- oder die P450-Reaktion begünstigt, nicht aber die HO-Reaktion. Daher



Schema 3. Wasserstoffbrücken und Protonen beeinflussen den Reaktionsweg der Zwischenverbindung in Häm-Enzymen.^[78]

bietet ein derartiges biosynthetisches Modell eine einzigartige Möglichkeit, zu ermitteln, welche Eigenschaften die Enzymaktivität lenken.

3. Biosynthetische anorganische Chemie zur Herstellung neuartiger anorganischer Komplexe

Die biosynthetische anorganische Chemie hat sich zur Entwicklung biomimetischer Modelle von komplexen Metalloproteinen und zur Entdeckung der Strukturmerkmale für Proteinfunktionen bewährt, ihr Hauptvorteil ist jedoch, dass sie die Vorzüge der anorganischen Chemie und der Biologie für die Herstellung anorganischer Komplexe mit neuartigen Strukturen und Funktionen kombiniert.^[84]

Natürliche Metalloproteine bestehen in der Regel aus 20 Aminosäuren, von denen weniger als die Hälfte als Liganden an Metallionen binden kann. Darüber hinaus enthalten sie nur wenige Metallionen und metallhaltige prosthetische Gruppen (z.B. Cobalamine und Häm-Gruppen). Der Einsatz nichtnatürlicher Aminosäuren in Metalloproteinen kann die Zahl möglicher Liganden drastisch erhöhen, während die Einführung anorganischer Verbindungen in Proteine neuartige und komplexe aktive Zentren hinzufügt. Daraus ergibt sich eine neue, beträchtlich erweiterte Enzymologie, die aus einem größeren Reservoir an künstlichen Metalloproteinen für verschiedene Reaktionsarten und -geschwindigkeiten schöpfen kann.

Überdies bringen diese Bestrebungen anorganische Verbindungen mit neuen Strukturen und Aktivitäten hervor. Besonders wichtig ist dabei die Anpassung anorganischer Katalysatoren für asymmetrische Reaktionen und für chemische Umsetzungen in Wasser. Die Umhüllung dieser anorganischen Katalysatoren mit Proteinen kann beiden Zwecken dienen, da die natürliche chirale Umgebung eines Proteins eine Unterscheidung nach der Chiralität unterstützt. Das hydrophobe Innere der Proteine bietet eine günstige Umgebung für anorganische Komplexe (die nur in organischen Lösungsmitteln aktiv sind), während das hydrophile Äußere die Löslichkeit in Wasser verbessert. Dies kann durch

kleinste Veränderungen der Liganden erzielt werden und wirkt sich daher kaum auf die Reaktivität des Katalysators aus.

3.1. Einführung nichtnatürlicher Aminosäuren in Metalloproteine

Eine Feineinstellung der Eigenschaften von Metalloproteinen gelingt durch die Einführung nichtnatürlicher Aminosäuren in Metallbindungsstellen von Proteinen. Beispielsweise ersetzen Pyridinliganden in synthetischen Modellen häufig die Histidinreste von Protein-Metallbindungsstellen.^[10] Zum Austausch der Histidinliganden wurden Pyridinliganden in ein neu entwickeltes Hämprotein mit vier α -Helix-Einheiten eingebaut. Eine Bis-Pyridinyl-Ligation anstelle der Bis-His-Ligation senkte die Proteinbindungsaffinität des Eisen(III)-Häms um den Faktor 60 000 und erhöhte das Häm-Reduktionspotential um 287 mV.^[85] Diese maßgeblichen Unterschiede sind bei der Verwendung von Pyridinliganden als Modelle für Histidinliganden in Metalloproteinen zu berücksichtigen.

Die wohl vorteilhafteste Anwendung nichtnatürlicher Aminosäuren in Metallbindungsstellen von Proteinen besteht im isostrukturellen Austausch von Liganden oder Resten in der Nähe der sekundären Koordinationssphäre, bei dem die elektronischen Eigenschaften durch Substitution einzelner Atome und Gruppen verändert werden. Beispielsweise sind sowohl Cys als auch Met in blauen Kupferproteinen konseriert (Abbildung 9). Der Austausch von Cystein gegen Sele-

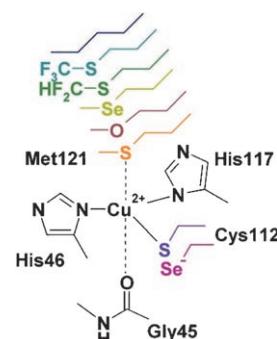


Abbildung 9. Isostruktureller Austausch von Cys und Met gegen nichtnatürliche Aminosäuren.

nocystein in Azurin führte zu deutlichen Veränderungen in den UV/Vis- und EPR-Spektren (Rotverschiebung der sichtbaren Bande der Ladungsübertragung um 50 nm bzw. Verdoppelung der Hyperfeinkopplungskonstante)^[86,87] bei nur geringen Auswirkungen auf das Reduktionspotential des Kupferzentrums.^[86] Andererseits änderten sich die UV/Vis- und EPR-Spektren beim Austausch des Methioninrests gegen Selenomethionin oder Norleucin kaum, die Reduktionspotentiale hingegen drastisch (Anstiege von 25 bzw. 140 mV gegenüber dem natürlichen Protein).^[88]

Nicht nur die Liganden der primären Koordinationsphäre, sondern auch Reste in der sekundären Koordinati-

onssphäre wurden durch nichtnatürliche Aminosäuren ersetzt. Beispielsweise führte der Austausch der OH-Gruppe in *para*-Position eines konservierten Tyr nahe dem Cys-Liganden in einem Rubredoxin gegen H, F, NO₂ oder CN zu einem Anstieg des Reduktionspotentials des Eisen-Schwefel-Zentrums, wobei elektronenziehende Gruppen positivere Potentiale ergaben (Abbildung 10A).^[89] Außerdem wurde eine konservierte Wasserstoffbrücke zwischen den Amidgruppen der Hauptkette und dem Cystein-Liganden der Fe₄S₄-Cluster bestimmter Eisen-Schwefel-Proteine (high potential iron-sulphur proteins, HiPIPs) beobachtet. Der Ersatz der Amidbindungen in der Hauptkette durch Esterbindungen entfernte die Wasserstoffbrücken, und das Reduktionspotential des Eisenzentrums verringerte sich um ca. 100 mV (Abbildung 10B).^[90]

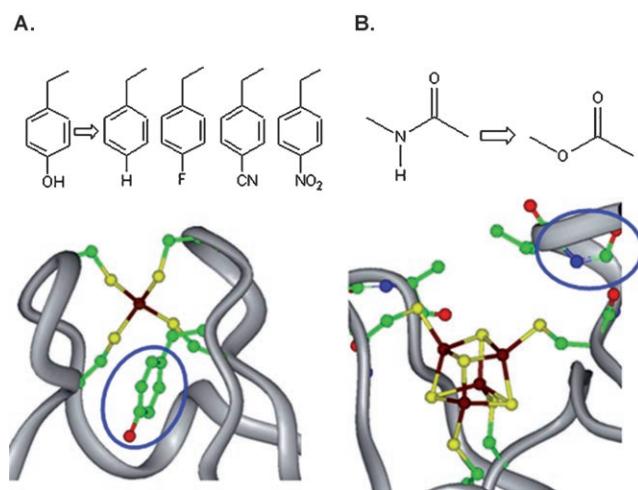


Abbildung 10. Nichtnatürliche Aminosäuren bei der Untersuchung der Rollen des Tyr-Liganden in der sekundären Koordinationssphäre in Rubredoxin (A) und des Carbonyl-Sauerstoffatoms der Hauptkette in HiPIP (B).

Der isostrukturelle Austausch von Liganden ist ein übliches Verfahren in der anorganischen Synthese. Bei der Einführung nichtnatürlicher Aminosäuren in Metalloproteine baut die biosynthetische anorganische Chemie dieses Verfahren aus: Da Proteine ein starres Netzwerk für die Metallbindungsstellen bereitstellen, gelingt durch einen isostrukturellen Austausch häufig die Einführung schwacher Liganden, die kaum oder gar nicht an Metallionen koordinieren (z.B. durch Austausch von Met gegen Ile), ohne die übrigen Eigenschaften der Metallbindungsstelle grundlegend zu beeinträchtigen. Er erleichtert auch die Untersuchung nichtkovalenter Wechselwirkungen in der sekundären Koordinationssphäre (z.B. durch Austausch einer Peptidbindung gegen eine Esterbindung^[90]). Dieses Verfahren deckt die Rolle spezifischer Reste genau auf, es bietet sich aber auch zur Feineinstellung der Eigenschaften anorganischer Koordinationskomplexe an. Beispielsweise können durch den Einbau isostruktureller nichtnatürlicher Aminosäuren an der Met-Position verschiedene Faktoren unterschieden werden, die das Reduktionspotential des blauen Kupfer-Azurins

durch diesen axialen Liganden beeinflussen.^[88] Dabei zeigte sich eine lineare Beziehung zwischen dem Reduktionspotential und der Hydrophobie der Seitenkette am axialen Liganden,^[88] die bei der Entwicklung ähnlicher Verbindungen mit vorhersagbaren Reduktionspotentialen hilfreich sein könnte.

3.2. Einführung nichtnatürlicher Metallcofaktoren in Proteine

Die Einführung nichtnatürlicher Metallcofaktoren in Proteine veranschaulicht die Kombination der Vorzüge von Biologie und anorganischer Chemie in der biosynthetischen anorganischen Chemie. Hierzu wurden drei Methoden mit nichtkovalenten, einfachen kovalenten und zweifachen kovalenten Verknüpfungen eingesetzt.

Zumeist werden natürliche Metallcofaktoren oder prosthetische Gruppen durch nichtkovalente Wechselwirkungen wie Wasserstoffbrücken, elektrostatische und hydrophobe Wechselwirkungen in Proteine eingebaut. Da Proteine in der Evolution nicht hinsichtlich der Bindung nichtnatürlicher Metallcofaktoren entwickelt wurden, ist die Einführung dieser Cofaktoren eine schwierige Aufgabe. Der bisher größte Erfolg gelang beim Austausch der Häm-Einheit in Proteinen wie Myoglobin gegen modifizierte Metalloporphyrine.^[91–99] Da die modifizierten Metalloporphyrine eine ähnliche Struktur aufweisen wie die natürlichen Häm-Gruppen, können dem Protein durch eine Substitution neue Reaktivitäten verliehen werden, ohne dass einschneidende Strukturänderungen an der Metallbindungsstelle erforderlich sind. Beispielsweise führten Modifikationen an den beiden Propionatgruppen im Häm zu neuen Funktionen wie Protein-Protein- und Protein-Molekül-Erkennung sowie Elektronentransfereigenschaften und höherer chemischer Reaktivität (Abbildung 11 A),^[99] die sich etwa in einer gesteigerten P450-artigen Sauerstoffaktivierung bei Anlagerung eines Flavins an eine der Propionatgruppen äußerte.^[102] Zudem stieg die O₂-Bindungsaffinität durch den Austausch von Häm gegen Eisen-Porphycen.^[103]

Viele nichtnatürliche Metallkomplexe zeigen keine Ähnlichkeit mit natürlichen Metallcofaktoren, Konjugate dieser Metallkomplexe mit Biotin können aber von der starken und spezifischen Bindung zwischen Biotin und dem Protein Avidin profitieren. Auf diese Weise wurden biotinylierte Dirhodium(I)-Komplexe in Avidin oder das ähnliche Protein Streptavidin eingeführt, um neue Katalysatoren für die asymmetrische Hydrierung mit bis zu 96 % Enantiomerenüberschuss (ee) zu erhalten (Abbildung 11 B).^[100,104–111] Eine weitere Möglichkeit zum Einbau nichtnatürlicher Komplexe ist das Design von Metalloproteinen auf der Grundlage von Kristallstrukturen der Proteine und Metallkomplexe. Nach einer genauen Untersuchung der Strukturen von Myoglobin und Metall-Salophen-Komplexen von Cr^{III} und Mn^{III} ergaben Modifikationen sowohl des Proteins als auch des Metallkomplexes ein neues Protein, das die asymmetrische Sulfoxidation vermittelte (Abbildung 11 C; Salophen = N,N'-Bis(salicylidien)-1,2-phenylen-diamin-Dianion).^[101,112–114] Schließlich erfolgte das vollständige De-novo-Design eines Proteins mit vier Helices, das dem natürlichen

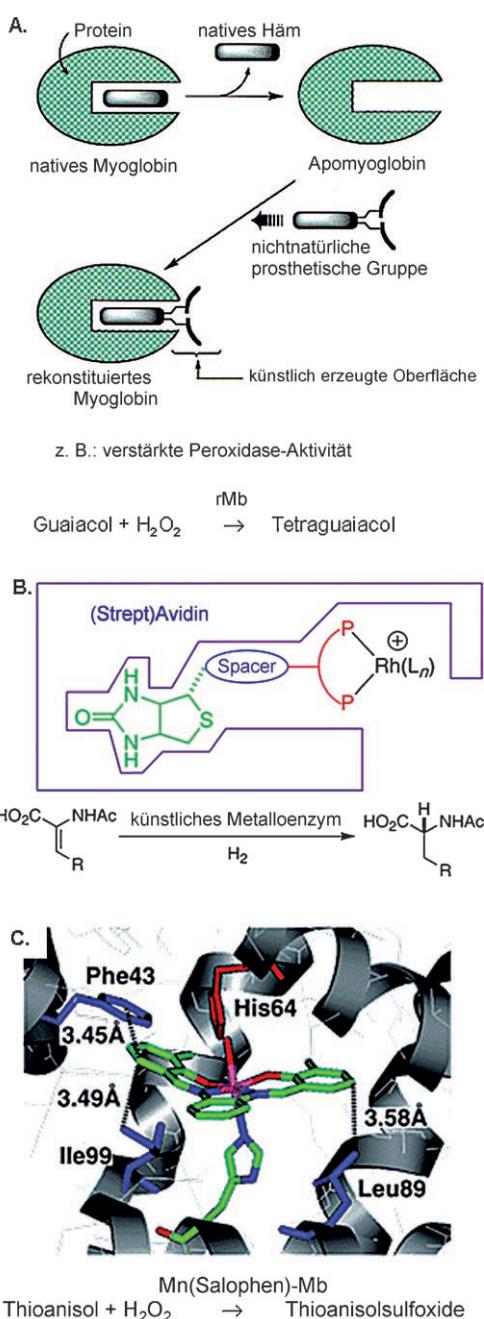


Abbildung 11. Einführung nichtnatürlicher metallhaltiger Cofaktoren in Proteine durch nichtkovalente Bindung. A) Austausch von Häm in Mb gegen modifiziertes Häm;^[99] B) Einführung von Organometallkomplexen mithilfe starker nichtkovaler Wechselwirkungen zwischen Biotin und Avidin;^[100] C) Austausch von Häm in Mb gegen einen Mangan-Schiff-Base-Komplex.^[113]

Vorbild ähnelte und selektiv ein Metalloporphyrin band.^[115] Dieses Beispiel markiert den Anfang der computergestützten Entwicklung maßgeschneiderter Metalloproteine mit nicht-natürlichen Metallkomplexen.

Die nichtkovalente Anbindung ist nicht die einzige Möglichkeit, natürliche Metallcofaktoren in Proteine einzubauen. Es kommen auch kovalente Bindungsstrategien zum Einsatz, bei denen die Bindung entweder an einer Stelle (Cytochrome c einiger Protozoen-Mitochondrien^[116]) oder an

zwei Stellen erfolgt (bei den meisten Cytochromen c^[117]). Auch diese Strategien wurden erfolgreich auf nichtnatürliche Metallkomplexe übertragen.

Beispielsweise führte der Einbau von 1,10-Phenanthrolin-Kupfer^[120] oder Eisen-EDTA^[121] in Proteine über eine einfache kovalente Bindung zu einer sequenzspezifischen Nuclease. Die kovalente Anbindung eines Kupfer(II)-1,10-Phenanthrolin-Komplexes an einen einzigen Cysteinrest eines Lipidbindungsproteins der Fettzelle lieferte einen Katalysator, der die Hydrolysereaktion in Abbildung 12 A hoch enantioselektiv vermittelte (bis 86 % ee).^[118,122] Diese Strategie wurde auch zur kovalenten Anbindung eines Ferrocen-Derivats in Azurin angewendet (Abbildung 12 B). Dieses neue Organometallopeptid verbesserte die Löslichkeit von Ferrocen und erhöhte die Stabilität des Ferrocenium-Ions in Wasser.^[119] Auch die sekundäre Koordinationssphäre des Proteins wurde zur Feineinstellung des Reduktionspotentials von Ferrocen erfolgreich einbezogen.^[119]

Obgleich nichtnatürliche Metallkomplexe durch Verknüpfung an einer Stelle mit geringsten Strukturmodifikationen an Proteine gebunden werden können, könnte ihre Beweglichkeit innerhalb des Proteins nicht ausreichend eingeschränkt sein, um hoch stereo- und enantioselektive Umsetzungen zu vermitteln. Beispielsweise ergab ein durch einfache kovalente Verknüpfung im Inneren eines Proteins gebundener Mangan-Salen-Komplex weniger als 10% ee

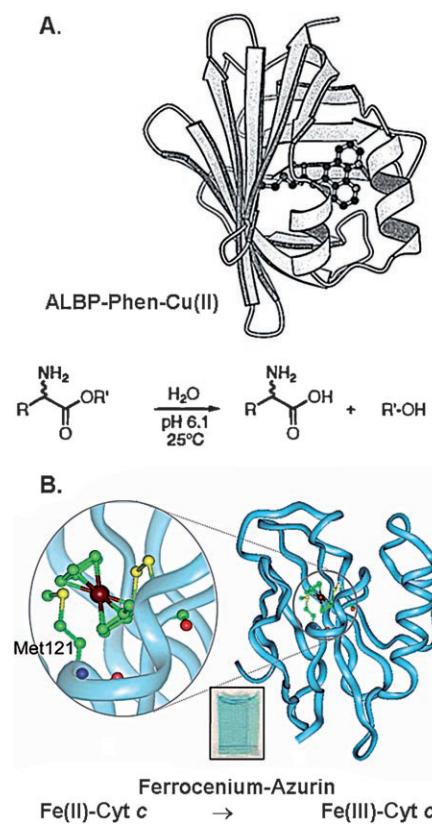


Abbildung 12. Einführung nichtnatürlicher metallhaltiger Cofaktoren in Proteine durch einfache kovalente Verknüpfung. A) Computermodell des Phenanthrolin-Komplexes (ALBP-Phen) eines Lipidbindungsproteins aus der Fettzelle;^[118] B) Computermodell eines Azurin-Ferroacen-Organometallopeptides.^[119]

(Salen = *N,N'*-Bis(salicylidene)ethylendiamin-Dianion).^[123] Wurde der Metallkomplex durch doppelte kovalente Verknüpfung an eine bestimmte Stelle in Mb gebunden, so stieg die Enantioselektivität auf 51% *ee* (Abbildung 13).^[124] Offensichtlich genügt eine solche Enantioselektivität noch nicht

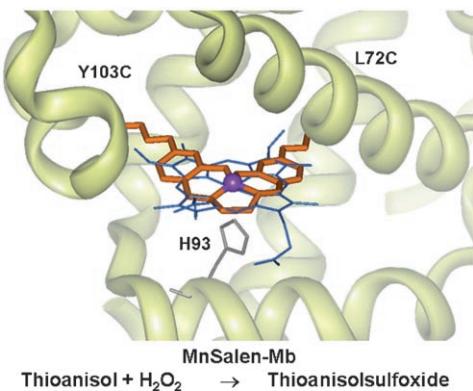


Abbildung 13. Einführung nichtnatürlicher metallhaltiger Cofaktoren in Proteine durch zweifache kovalente Verknüpfung. Ein Computermodell von Mb(L72C/Y103C) mit einem an zwei Stellen kovalent gebundenen Mangan(II)-Salen-Komplex ist mit der Häm-Einheit von Myoglobin überlagert.^[124]

den Anforderungen einer Synthese, doch dies ist verständlich, wenn man bedenkt, dass Myoglobin nicht wie andere Häm-Enzyme (z.B. Cyt P450) zur asymmetrischen Katalyse weiterentwickelt wurde, und dass die Substratbindungsstelle nicht zur Übertragung von Selektivität modifiziert wurde. Das vorgestellte Prinzip ist nichtsdestotrotz für die zukünftige Forschung wegweisend. Beispielsweise sollte eine Kombination der kovalenten Bindungsstrategien^[123,124] mit struktur-basiertem Design oder mit Methoden der gerichteten Evolution^[125,126] zu einer neuen Generation asymmetrischer Katalysatoren mit noch größerer Effizienz und höheren Selektivitäten führen.

4. Schlussfolgerungen und Ausblick

Die biosynthetische anorganische Chemie ist eine natürliche Erweiterung der anorganischen Synthesechemie. Anstelle von kleinen organischen Molekülen verwendet sie kleine, stabile, leicht zugängliche und gut charakterisierte Proteine wie Azurin und Myoglobin als Liganden für die Synthese von biomimetischen Modellen oder neuartigen Verbindungen. Im Hinblick auf die Synthese, Charakterisierung und Eigenschaften haben die chemische wie auch die biologische Methode ihre Vor- und Nachteile (Tabelle 2).

Synthese. Im Allgemeinen führt eine der Synthesemethoden schneller und mit größeren Ausbeuten zum Ziel. Doch die neuesten Entwicklungen der Molekularbiologie und Enzymologie ermöglichen die routinemäßige Herstellung von Hunderten Milligramm bis Gramm an Protein im Labor und sogar noch größeren Mengen bei industriellen Verfahren. Durch Reaktionen mit Zellen, die das gewünschte Proteinmodell enthalten, kann die natürliche Anreicherung

der Gene und Proteinprodukte für die Biosynthese und Biokatalyse genutzt werden. Gegenüber der Synthese kleiner Moleküle, bei der die Modifikation eines Liganden beträchtliche Abweichungen in der Ausbeute und im Kosten- und Zeitaufwand zur Folge haben kann, hat die Biosynthese den Vorteil, dass eine ähnliche Modifikation am Proteinliganden diese Parameter kaum beeinflusst. Im Hinblick auf Zeitaufwand und Ausbeute nähert sich die Biosynthese somit der Synthese kleiner Moleküle an. In Einzelfällen ist die Herstellung biosynthetischer Modelle sogar einfacher als diejenige komplexer synthetischer Modelle. Beispielsweise erfordern synthetische Modelle von Häm-Kupfer-Oxidasen lange Syntheserouten mit relativ niedrigen Ausbeuten.^[79,80] Die Biosynthesen von Häm-Kupfer-Modellen in Myoglobin^[81] oder Cytochrom-c-Peroxidase^[127] verlaufen mit ähnlichen Ausbeuten und Herstellungszeiten wie die Biosynthesen anderer Derivate der gleichen Proteine. Ungeachtet der Komplexität der Modifikationen sind etwa 100 mg L⁻¹ der reinen biosynthetischen Modelle in weniger als einer Woche erhältlich. Dadurch wird die routinemäßige Herstellung von Proteinen im Gramm-Maßstab möglich. Zwar ist die biosynthetische Methode in der Industrie bislang auf wenige Systeme beschränkt,^[13,14] doch sie hat bereits an Boden gut gemacht.

Anwendungen. Die Biosynthese erfolgt oft an der Luft bei Umgebungstemperatur und -druck, und nicht bei extremen Temperaturen und Drücken oder unter Inertatmosphären, wie sie für viele Synthesen kleiner Moleküle notwendig sind. Daher könnte die Biosynthese helfen, Energie und Gerätekosten einzusparen. Außerdem ist sie durch die Verwendung biologisch abbaubarer Stoffe und Wasser als Lösungsmittel eine umweltverträgliche Methode. Die Produkte von Biosynthesen sind jedoch nicht so stabil wie synthetische Verbindungen, wodurch der langfristige industrielle Einsatz bei hohen Temperaturen oder Drücken erschwert wird. Dieses Problem kann durch die Verwendung von Proteinliganden aus extremophilen Mikroorganismen (die bei hohen Temperaturen und/oder in Gegenwart organischer Solventien wie Methanol existieren können) umgangen werden.

Das Massenverhältnis von Produkt und Katalysator wird häufig als Kriterium für die Anwendbarkeit von Katalysatoren angeführt. Dies ist nur dann ein gutes Maß, wenn die Katalysatoren ähnlich sind und durch ähnliche Methoden synthetisiert werden. In diesem Fall sind die Synthese von Katalysatoren mit einer größeren Masse und deren Entsorgung im Allgemeinen teurer, und diesbezüglich wären kleinere Verbindungen einem chemisch synthetisierten Proteinliganden mit ähnlicher katalytischer Aktivität vorzuziehen. Biosynthetische Proteinliganden können jedoch viel billiger hergestellt werden, als ihr Molekulargewicht vermuten lässt, und ihre Entsorgung kostet deutlich weniger als diejenige eines organischen Liganden, der zwar ähnlich groß, aber weder umweltverträglich noch biologisch abbaubar ist. Tatsächlich sind die Kosten für die biosynthetische Herstellung in rekombinanten Proteinexpressionssystemen und die Entsorgung eines kleinen Proteins (z.B. MW = 10000) denen eines viel größeren Proteins (z.B. MW = 100000) sehr ähnlich. Bei der Bewertung verschiedener Katalysatoren sind daher viele Kriterien zu betrachten,^[128] z.B. das Massenverhältnis, die

Zugänglichkeit und die beschriebenen Kosten des Katalysators, sein Substratspektrum und gegebenenfalls seine Enantioselektivität.

Charakterisierung. Die meisten spektroskopischen Untersuchungsmethoden für Metallverbindungen, wie Elektronenspektroskopie (UV/Vis), paramagnetische Elektronenresonanz (EPR), magnetischer Circulardichroismus (MCD), Resonanz-Raman-Spektroskopie (RR) und Röntgenabsorptionsspektroskopie (XAS), sind ohne große Unterschiede bei der Datenerfassung und Interpretation auf synthetische und biosynthetische Verbindungen anwendbar. Dank neuer Entwicklungen können nun auch die dreidimensionalen Strukturen biosynthetischer Verbindungen durch Röntgenkristallographie oder NMR-Spektroskopie routinemäßig aufgeklärt werden, doch es ist viel einfacher, hochauflöste Strukturen von synthetischen Verbindungen zu erhalten. Um dieses Problem zu umgehen, verwendet man Proteine mit bekannten 3D-Strukturen als Liganden. Dadurch ist es leichter, für Diffraktionsanalysen geeignete Kristalle zu züchten, und die 3D-Strukturen lassen sich durch Vergleich der Elektronendichteverteilungen schneller ermitteln. Der Einsatz von Synchrotronstrahlung bei der Aufnahme der Diffraktionsdaten verbessert die Auflösung zusätzlich.

Eigenschaften. Proteine bilden durch kovalente Bindungen und nichtkovalente Wechselwirkungen (z.B. Wasserstoffbrücken, elektrostatische und hydrophobe Kräfte) in der primären und sekundären Koordinationssphäre ein starres Netzwerk, das die Metall- und Substratbindungstellen stabilisiert. Sie bieten so eine bessere Umgebung zur regio- und stereoselektiven Bindung und Katalyse, bei der reaktive funktionelle Gruppen nicht geschützt werden müssen. Da sie aus chiralen natürlichen Aminosäuren bestehen, sind Proteine intrinsisch enantioselektiv. Biosynthetische Verbindungen mit Proteinen können hiervon profitieren. Tatsächlich zeigte eine Reihe biophysikalischer Untersuchungen deutlich, dass die biosynthetischen Modelle, z.B. ein Cu_A-Zentrum in Azurin (Abbildung 2B),^[46] so starr sind wie die natürlichen Templatproteine. Außerdem erhielt man meist entweder Struktur- oder Funktionsmodelle der natürlichen Zielproteine. Da in biosynthetischen Modellen der gleiche Ligandentyp wie in Zielproteinen verwendet wird und sie unter denselben Bedingungen wie die Zielproteine synthetisiert und charakterisiert werden, sind sie häufig aber sowohl Struktur- als auch Funktionsmodelle. Kürzlich gelang auch die Synthese neuer organischer Liganden, die, ähnlich wie Proteine, ein starres Netzwerk mit Wasserstoffbrücken in der sekundären Koordinationssphäre aufweisen.^[11,12] Synthetische asymmetrische Katalysatoren haben einen weiteren Aktivitäts- und Substratbereich.^[129] Der größere Aktivitätsbereich ergibt sich hauptsächlich aus einer unbegrenzten Auswahl an Liganden, Metallen und metallhaltigen Cofaktoren, der breitere Substratbereich kann auf die Vielfalt der möglichen Reaktionsbedingungen – niedrige Temperaturen, hohe Drücke und verschiedene organische Lösungsmittel – zurückgeführt werden. Biosynthetische Katalysatoren sind dagegen auf die 20 natürlichen Aminosäuren, physiologisch verfügbare Metalle oder metallhaltige Cofaktoren, physiologische Bedingungen und wässrige Lösungen festgelegt. Diese Einschränkungen unterstreichen die Bedeutung von Bioka-

talsatoren, und sie empfehlen uns, die Methoden der Natur zu ihrer Verbesserung zu studieren. Die Einführung nichtnatürlicher Aminosäuren und metallhaltiger Cofaktoren in Proteine wäre ein wichtiger Schritt in diese Richtung.

Fortschritte in vielen Bereichen der Biologie und Chemie ermöglichen die Entwicklung biosynthetisch-anorganischer Methoden mit vergleichbaren Herstellungszeiten und Ausbeuten wie anorganische Syntheseverfahren. Oft kann die biosynthetische anorganische Chemie originalnahe Struktur- und Funktionsmodelle komplexer Metalloproteine und neue anorganische Verbindungen hervorbringen. Diese Entwicklungen zeigen das Potenzial des biosynthetischen Verfahrens, schöpfen es jedoch bei weitem nicht aus. Obgleich Methoden der nichtkovalenten, einfachen und zweifachen kovalenten Bindung zur Einführung nichtnatürlicher Metallcofaktoren in Proteine verfügbar sind, fehlen noch Anwendungen in asymmetrischen katalytischen Synthesen chiraler Zwischenstufen für Feinchemikalien oder pharmazeutische Wirkstoffe. Im Vergleich zur langjährig erforschten asymmetrischen Katalyse mit organischen Molekülen steht die biosynthetische anorganische Chemie noch am Anfang, und ihre Entfaltungsmöglichkeiten zeigen sich nach und nach durch neue Entwicklungen in der Biologie. Das volle Potenzial der biosynthetischen anorganischen Chemie wird erst erkennbar sein, wenn es gelingt, synthetische und biosynthetische Methoden zu kombinieren.

Ich danke den Mitarbeitern meiner Forschungsgruppe, deren Beiträge im Literaturverzeichnis erwähnt sind, für ihren Einsatz und Fleiß, sowie Hee Jung Hwang, Thomas D. Pfister, Dewain Garner und Natasha Yeung für ihre Unterstützung beim Verfassen dieses Aufsatzes. Die beschriebenen Arbeiten unserer Forschungsgruppe wurde von der US National Science Foundation und den National Institutes of Health finanziell unterstützt.

Eingegangen am 16. Januar 2006
Online veröffentlicht am 10. August 2006
Übersetzt von Dr. Ines Sprung, Edinburgh

-
- [1] S. J. Lippard, J. M. Berg, *Principles of Bioinorganic Chemistry*, University Science Books, Mill Valley, CA, **1994**.
 - [2] I. Bertini, H. B. Gray, S. J. Lippard, J. S. Valentine, *Bioinorganic Chemistry*, University Science Books, Sausalito, CA, **1994**.
 - [3] J. J. R. Frausto da Silva, R. J. P. Williams, *The Biological Chemistry of the Elements, the Inorganic Chemistry of Life*, Clarendon Press, Oxford, **1991**.
 - [4] J. A. Cowan, *Inorganic Biochemistry, an Introduction*, VCH, New York, **1993**.
 - [5] W. Kaim, B. Schwederski, *Bioinorganic Chemistry: Inorganic Elements in the Chemistry of Life*, Wiley, Chichester, **1994**.
 - [6] R. H. Holm, E. I. Solomon, *Chem. Rev.* **1996**, *96*, 2237.
 - [7] *Ullmann's Encyclopedia of Industrial Chemistry*, 6. Aufl., **1998** (elektronische Ausgabe).
 - [8] *Riegel's Handbook of Industrial Chemistry*, 10. Aufl., **2003**.
 - [9] A. Fersht, *Structure and Mechanism in Protein Science: A Guide to Enzyme Catalysis and Protein Folding*, Freeman, New York, NY, **1999**.
 - [10] R. H. Holm, E. I. Solomon, *Chem. Rev.* **2004**, *104*, 347.
 - [11] R. I. Cukier, D. G. Nocera, *Annu. Rev. Phys. Chem.* **1998**, *49*, 337.

- [12] A. S. Borovik, *Acc. Chem. Res.* **2005**, *38*, 54.
- [13] B. A. Anderson, M. M. Hansen, A. R. Harkness, C. L. Henry, J. T. Vicenzi, M. J. Zmijewski, *J. Am. Chem. Soc.* **1995**, *117*, 12358.
- [14] B. A. Anderson, M. M. Hansen, J. T. Vicenzi, M. J. Zmijewski, *Process Chem. Pharm. Ind.* **1999**, 263.
- [15] *Inorganic Electronic Structure and Spectroscopy, Vol. I* (Hrsg.: E. I. Solomon, A. B. P. Lever), Wiley-Interscience, New York, **1999**.
- [16] *Inorganic Electronic Structure and Spectroscopy, Vol. II* (Hrsg.: E. I. Solomon, A. B. P. Lever), Wiley-Interscience, New York, **1999**.
- [17] *Physical Methods in Bioinorganic Chemistry: Spectroscopy and Magnetism* (Hrsg.: L. Que, Jr.), University Science Books, Mill Valley, CA, **2000**.
- [18] C. Dennison, G. W. Canters, *Recl. Trav. Chim. Pays-Bas* **1996**, *115*, 345.
- [19] H. Beinert, *Eur. J. Biochem.* **1997**, *245*, 521.
- [20] A. J. Vila, C. O. Fernández in *Handbook on Metalloproteins* (Hrsg.: I. Bertini, A. Sigel, H. Sigel), Dekker, New York, NY, **2001**, S. 813.
- [21] Y. Lu in *Biocoordination Chemistry, Vol. 8* (Hrsg.: L. Que, Jr., W. B. Tolman), Elsevier, Oxford, Großbritannien, **2004**, S. 91.
- [22] M. Saraste, *Q. Rev. Biophys.* **1990**, *23*, 331.
- [23] B. G. Malmström, *Chem. Rev.* **1990**, *90*, 1247.
- [24] G. T. Babcock, M. Wikstrom, *Nature* **1992**, *356*, 301.
- [25] S. M. Musser, M. H. B. Stowell, S. I. Chan, *FEBS Lett.* **1993**, *327*, 131.
- [26] J. A. García-Horsman, B. Barquera, J. Rumbley, J. Ma, R. B. Gennis, *J. Bacteriol.* **1994**, *176*, 5587.
- [27] P. M. H. Kroneck, J. Riester, W. G. Zumft, W. E. Antholine, *Biol. Met.* **1990**, *3*, 103.
- [28] W. G. Zumft, P. M. H. Kroneck, *Adv. Inorg. Biochem.* **1996**, *11*, 193.
- [29] N. J. Blackburn, M. E. Barr, W. H. Woodruff, J. van der Oost, S. de Vries, *Biochemistry* **1994**, *33*, 10401.
- [30] F. A. Cotton, R. A. Walton, *Multiple Bonds Between Metal Atoms*, Wiley, New York, **1982**.
- [31] B. J. Hathaway in *Comprehensive Coordination Chemistry, the Synthesis, Reactions, Properties & Application of Coordination Compounds, Vol. 5*, 1. Ausg. (Hrsg.: G. Wilkinson, R. D. Gillard, J. A. McCleverty), Pergamon, Oxford, England, **1987**, S. 533.
- [32] M. Dunaj-Jurco, G. Ondrejovic, M. Melnik, J. Garaj, *Coord. Chem. Rev.* **1988**, *83*, 1.
- [33] C. Harding, V. McKee, J. Nelson, *J. Am. Chem. Soc.* **1991**, *113*, 9684.
- [34] M. E. Barr, P. H. Smith, W. E. Antholine, B. Spencer, *J. Chem. Soc. Chem. Commun.* **1993**, 1649.
- [35] C. Harding, J. Nelson, M. C. R. Symons, J. Wyatt, *J. Chem. Soc. Chem. Commun.* **1994**, 2499.
- [36] R. P. Houser, V. G. Young, Jr., W. B. Tolman, *J. Am. Chem. Soc.* **1996**, *118*, 2101.
- [37] D. D. LeCloux, R. Davydov, S. J. Lippard, *Inorg. Chem.* **1998**, *37*, 6814.
- [38] C. He, S. J. Lippard, *Inorg. Chem.* **2000**, *39*, 5225.
- [39] R. Gupta, Z. H. Zhang, D. Powell, M. P. Hendrich, A. S. Borovik, *Inorg. Chem.* **2002**, *41*, 5100.
- [40] X.-M. Zhang, M.-L. Tong, X.-M. Chen, *Angew. Chem.* **2002**, *114*, 1071; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2002**, *41*, 1029.
- [41] D. D. LeCloux, R. Davydov, S. J. Lippard, *J. Am. Chem. Soc.* **1998**, *120*, 6810.
- [42] S. B. Harkins, J. C. Peters, *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, *126*, 2885.
- [43] C. Dennison, E. Vijgenboom, S. de Vries, J. van der Oost, G. W. Canters, *FEBS Lett.* **1995**, *365*, 92.
- [44] M. Hay, J. H. Richards, Y. Lu, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1996**, *93*, 461.
- [45] G. J. Steffens, G. Buse, *Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem.* **1979**, *360*, 613.
- [46] H. Robinson, M. C. Ang, Y.-G. Gao, M. T. Hay, Y. Lu, A. H. J. Wang, *Biochemistry* **1999**, *38*, 5677.
- [47] X. Wang, M. C. Ang, Y. Lu, *J. Am. Chem. Soc.* **1999**, *121*, 2947.
- [48] M. T. Hay, R. M. Milberg, Y. Lu, *J. Am. Chem. Soc.* **1996**, *118*, 11976.
- [49] M. T. Hay, Y. Lu, *J. Biol. Inorg. Chem.* **2000**, *5*, 699.
- [50] H. J. Hwang, N. Nagraj, Y. Lu, *Inorg. Chem.* **2006**, *45*, 102–107.
- [51] X. Wang, S. M. Berry, Y. Xia, Y. Lu, *J. Am. Chem. Soc.* **1999**, *121*, 7449.
- [52] S. M. Berry, X. Wang, Y. Lu, *J. Inorg. Biochem.* **2000**, *78*, 89.
- [53] H. J. Hwang, S. M. Berry, M. J. Nilges, Y. Lu, *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, *127*, 7274.
- [54] H. J. Hwang, Y. Lu, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2004**, *101*, 12842.
- [55] O. Farver, Y. Lu, M. C. Ang, I. Pecht, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1999**, *96*, 899.
- [56] H. B. Gray, B. G. Malmström, R. J. P. Williams, *J. Biol. Inorg. Chem.* **2000**, *5*, 551.
- [57] E. I. Solomon, D. W. Randall, T. Glaser, *Coord. Chem. Rev.* **2000**, *200*–202, 595.
- [58] B. E. Ramirez, B. G. Malmström, J. R. Winkler, H. B. Gray, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1995**, *92*, 11949.
- [59] Y. Lu, S. M. Berry, T. D. Pfister, *Chem. Rev.* **2001**, *101*, 3047.
- [60] A. Gengenbach, X. Wang, Y. Lu in *Fundamentals and Catalysis of Oxidative Delignification Processes, Vol. 785* (Hrsg.: D. S. Argyropoulos), American Chemical Society, Washington, DC, **2001**, S. 487.
- [61] „Manganese and Its Role in Biological Processes“: M. H. Gold, H. L. Youngs, M. D. S. Gelpke, *Met. Ions Biol. Syst.* **2000**, *37*, 559.
- [62] M. Sundaramoorthy, K. Kishi, M. H. Gold, T. L. Poulos, *J. Biol. Chem.* **1994**, *269*, 32759.
- [63] B. K. Yeung, X. Wang, J. A. Sigman, P. A. Petillo, Y. Lu, *Chem. Biol.* **1997**, *4*, 215.
- [64] S. K. Wilcox, C. D. Putnam, M. Sastry, J. Blankenship, W. J. Chazin, D. E. McRee, D. B. Goodin, *Biochemistry* **1998**, *37*, 16853.
- [65] X. Wang, Y. Lu, *Biochemistry* **1999**, *38*, 9146.
- [66] A. Gengenbach, S. Syn, X. Wang, Y. Lu, *Biochemistry* **1999**, *38*, 11425.
- [67] T. D. Pfister, A. J. Gengenbach, S. Syn, Y. Lu, *Biochemistry* **2001**, *40*, 14942.
- [68] P. R. O. de Montellano, *Cytochrome P450 Structure, Mechanism, and Biochemistry*, 2. Aufl., Plenum, New York, **1995**.
- [69] S. Adachi, S. Nagano, Y. Watanabe, K. Ishimori, I. Morishima, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **1991**, *180*, 138.
- [70] S. Adachi, S. Nagano, K. Ishimori, Y. Watanabe, I. Morishima, T. Egawa, T. Kitagawa, R. Makino, *Biochemistry* **1993**, *32*, 241.
- [71] D. P. Hildebrand, J. C. Ferrer, H.-L. Tang, M. Smith, A. G. Mauk, *Biochemistry* **1995**, *34*, 11598.
- [72] K. Choudhury, M. Sundaramoorthy, A. Hickman, T. Yonetani, E. Woehl, M. F. Dunn, T. L. Poulos, *J. Biol. Chem.* **1994**, *269*, 20239.
- [73] J. A. Sigman, A. E. Pond, J. H. Dawson, Y. Lu, *Biochemistry* **1999**, *38*, 11122.
- [74] R. Perera, M. Sono, J. A. Sigman, T. D. Pfister, Y. Lu, J. H. Dawson, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2003**, *100*, 3641.
- [75] T. Uno, A. Yukinari, Y. Tomisugi, Y. Ishikawa, R. Makino, J. A. Brannigan, A. J. Wilkinson, *J. Am. Chem. Soc.* **2001**, *123*, 2458.
- [76] H. Fujii, X. Zhang, T. Tomita, M. Ikeda-Saito, T. Yoshida, *J. Am. Chem. Soc.* **2001**, *123*, 6475.
- [77] T. Matsui, M. Furukawa, M. Unno, T. Tomita, M. Ikeda-Saito, *J. Biol. Chem.* **2005**, *280*, 2981.
- [78] J. A. Sigman, H. K. Kim, X. Zhao, J. R. Carey, Y. Lu, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2003**, *100*, 3629.

- [79] J. P. Collman, R. Boulatov, C. J. Sunderland, L. Fu, *Chem. Rev.* **2004**, *104*, 561.
- [80] E. Kim, E. E. Chufan, K. Kamaraj, K. D. Karlin, *Chem. Rev.* **2004**, *104*, 1077.
- [81] J. A. Sigman, B. C. Kwok, Y. Lu, *J. Am. Chem. Soc.* **2000**, *122*, 8192.
- [82] X. Zhao, N. Yeung, Z. Wang, Z. Guo, Y. Lu, *Biochemistry* **2005**, *44*, 1210.
- [83] X. Zhao, M. J. Nilges, Y. Lu, *Biochemistry* **2005**, *44*, 6559.
- [84] Y. Lu, *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2005**, *9*, 118.
- [85] H. K. Privett, C. J. Reedy, M. L. Kennedy, B. R. Gibney, *J. Am. Chem. Soc.* **2002**, *124*, 6828.
- [86] S. M. Berry, M. D. Gieselmann, M. J. Nilges, W. A. van der Donk, Y. Lu, *J. Am. Chem. Soc.* **2002**, *124*, 2084.
- [87] M. Ralle, S. M. Berry, M. J. Nilges, M. D. Gieselmann, W. A. van der Donk, Y. Lu, N. J. Blackburn, *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, *126*, 7244.
- [88] S. M. Berry, M. Ralle, D. W. Low, N. J. Blackburn, Y. Lu, *J. Am. Chem. Soc.* **2003**, *125*, 8760.
- [89] D. W. Low, M. G. Hill, *J. Am. Chem. Soc.* **1998**, *120*, 11536.
- [90] D. W. Low, M. G. Hill, *J. Am. Chem. Soc.* **2000**, *122*, 11039.
- [91] T. Hayashi, A. Tomokuni, T. Mizutani, Y. Hisaeda, H. Ogoshi, *Chem. Lett.* **1998**, 1229.
- [92] T. Hayashi, Y. Hitomi, T. Ando, T. Mizutani, Y. Hisaeda, S. Kitagawa, H. Ogoshi, *J. Am. Chem. Soc.* **1999**, *121*, 7747.
- [93] T. Hayashi, T. Matsuda, Y. Hisaeda, *Chem. Lett.* **2003**, *32*, 496.
- [94] H. Sato, T. Hayashi, T. Ando, Y. Hisaeda, T. Ueno, Y. Watanabe, *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, *126*, 436.
- [95] T. Hayashi, T. Nakagawa, K. Harada, T. Matsuo, Y. Hitomi, Y. Hisaeda, *Chem. Lett.* **2004**, *33*, 1512.
- [96] H. Sato, M. Watanabe, Y. Hisaeda, T. Hayashi, *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, *127*, 56.
- [97] T. Hayashi, Y. Hitomi, T. Takimura, A. Tomokuni, T. Mizutani, Y. Hisaeda, H. Ogoshi, *Coord. Chem. Rev.* **1999**, *190–192*, 961.
- [98] I. Hamachi, S. Shinkai, *Eur. J. Org. Chem.* **1999**, 539.
- [99] T. Hayashi, Y. Hisaeda, *Acc. Chem. Res.* **2002**, *35*, 35.
- [100] M. Skander, N. Humbert, J. Collot, J. Gradinaru, G. Klein, A. Loosli, J. Sauser, A. Zocchi, F. Gilardoni, T. R. Ward, *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, *126*, 14411.
- [101] T. Ueno, M. Ohashi, M. Kono, K. Kondo, A. Suzuki, T. Yamane, Y. Watanabe, *Inorg. Chem.* **2004**, *43*, 2852.
- [102] T. Matsuo, T. Hayashi, Y. Hisaeda, *J. Am. Chem. Soc.* **2002**, *124*, 11234.
- [103] T. Hayashi, H. Dejima, T. Matsuo, H. Sato, D. Murata, Y. Hisaeda, *J. Am. Chem. Soc.* **2002**, *124*, 11226.
- [104] M. E. Wilson, G. M. Whitesides, *J. Am. Chem. Soc.* **1978**, *100*, 306.
- [105] C.-C. Lin, C.-W. Lin, A. S. C. Chan, *Tetrahedron: Asymmetry* **1999**, *10*, 1887.
- [106] J. Collot, J. Gradinaru, N. Humbert, M. Skander, A. Zocchi, T. R. Ward, *J. Am. Chem. Soc.* **2003**, *125*, 9030.
- [107] C. M. Thomas, T. R. Ward, *Chem. Soc. Rev.* **2005**, *34*, 337.
- [108] G. Klein, N. Humbert, J. Gradinaru, A. Ivanova, F. Gilardoni, U. E. Rusbandi, T. R. Ward, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2005**, *44*, 7764.
- [109] M. Skander, C. Malan, A. Ivanova, T. R. Ward, *Chem. Commun.* **2005**, 4815.
- [110] T. R. Ward, *Chem. Eur. J.* **2005**, *11*, 3798.
- [111] C. Letondor, N. Humbert, T. R. Ward, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2005**, *102*, 4683.
- [112] M. Ohashi, T. Koshiyama, T. Ueno, M. Yanase, H. Fujii, Y. Watanabe, *Angew. Chem.* **2003**, *115*, 1035; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2003**, *42*, 1005.
- [113] T. Ueno, T. Koshiyama, M. Ohashi, K. Kondo, M. Kono, A. Suzuki, T. Yamane, Y. Watanabe, *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, *127*, 6556.
- [114] Y. Watanabe, T. Hayashi, *Prog. Inorg. Chem.* **2005**, *54*, 449.
- [115] F. V. Cochran, S. P. Wu, W. Wang, V. Nanda, J. G. Saven, M. J. Therien, W. F. DeGrado, *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, *127*, 1346.
- [116] G. W. Pettigrew, J. L. Leaver, T. E. Meyer, A. P. Ryle, *Biochem. J.* **1975**, *147*, 291.
- [117] R. A. Scott, A. G. Mauk, *Cytochrome c: A Multidisciplinary Approach*, University Science Books, Sausalito, CA, **1996**.
- [118] R. R. Davies, M. D. Distefano, *J. Am. Chem. Soc.* **1997**, *119*, 11643.
- [119] H. J. Hwang, J. R. Carey, E. T. Brower, A. J. Gengenbach, J. A. Abramite, Y. Lu, *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, *127*, 15356.
- [120] R. Chen, *Trends Biotechnol.* **2001**, *19*, 13.
- [121] S. A. Datwyler, C. F. Meares, *Met. Ions Biol. Syst.* **2001**, *38*, 213.
- [122] D. Qi, C.-M. Tann, D. Haring, M. D. Distefano, *Chem. Rev.* **2001**, *101*, 3081.
- [123] M. T. Reetz, M. Rentzsch, A. Pletsch, M. Maywald, *Chimia* **2002**, *56*, 721.
- [124] J. R. Carey, S. K. Ma, T. D. Pfister, D. K. Garner, H. K. Kim, J. A. Abramite, Z. Wang, Z. Guo, Y. Lu, *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, *126*, 10812.
- [125] M. T. Reetz, A. Zonta, K. Schimossek, K. Liebeton, K.-E. Jaeger, *Angew. Chem.* **1997**, *109*, 2961; *Angew. Chem. Int. Ed.* **1997**, *36*, 2830.
- [126] M. T. Reetz, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2004**, *101*, 5716.
- [127] J. A. Sigman, B. C. Kwok, A. Gengenbach, Y. Lu, *J. Am. Chem. Soc.* **1999**, *121*, 8949.
- [128] E. N. Jacobsen, N. S. Finney, *Chem. Biol.* **1994**, *1*, 85.
- [129] *Comprehensive Asymmetric Catalysis I–III*, Vol. 1, (Hrsg.: E. N. Jacobsen, A. Pfaltz, H. Yamamoto), Springer, New York, **1999**.