

Kapitel 1

Einführung

Die extremophilen Organismen, die Lebensräume mit hoher Salzkonzentration, hohem oder niedrigem pH-Wert oder extremer Temperatur bevorzugen, wecken das Interesse nicht nur der Forschung, sondern auch der Industrie, mit dem Ziel, deren Enzyme mit ihren außergewöhnlichen Eigenschaften auch industriell nutzbar zu machen [1]. Diese thermophilen und hyperthermophilen Mikroorganismen, deren Lebensraum die heißen und schwefelhaltigen überirdischen oder submarinen Quellen (sogen. „Schwarzer Raucher“) ist, bauen im Gegensatz zu den mesophilen Organismen Wolfram statt Molybdän in die aktiven Zentren ihrer molybdopterinhaltiger Oxidasen ein [2, 3, 4].

1.1 Molybdopterinhaltige Oxidasen

Molybdopterinhaltige Oxidasen oder auch Hydrolasen katalysieren die Zwei-Elektronen-Redoxreaktion: die Übertragung von O^{2-} von Wasser auf Substrat oder die Reduktion von Substrat unter Abspaltung von O^{2-} und Bil-

dung von Wasser. Viele der aktiven Zentren der molybdopterinhaltigen Oxidasen sind röntgenographisch charakterisiert. Sie können in vier Enzymfamilien zusammengefasst werden (s. Abbildung 1.1).

Generell bestehen die aktiven Zentren dieser Enzyme aus einem Zentralatom, Molybdän oder Wolfram, mit einem oder zwei Molybdopterin-Liganden sowie in einigen Fällen einem Liganden, der an das Peptid gebunden ist. Bis auf wenige Ausnahmen findet man Serinat (Ser-O^-), Cysteinat (Cys-S^-) oder auch Selenocysteinat (Cys-Se^-).

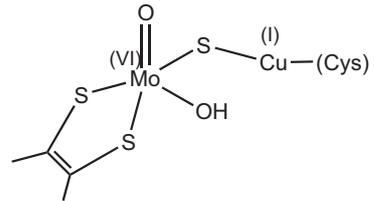
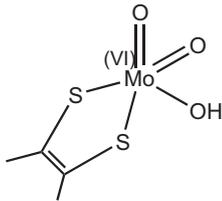
1.1.1 Molybdopterin-Cofaktor

Der universelle Ligand ist eine rein organische Substanz und enthält trotz seines Namens selbst kein Molybdän (s. Abbildung 1.2). Es besteht aus einer Pterin-Einheit, einem Pyranring, an dem sich unmittelbar die Dithiolen-Einheiten anschließt, welche an das Zentralatom des aktiven Zentrums bindet, sowie einem Phosphatrest. Das aktive Zentrum ist im Peptid durch eine Reihe von Wasserstoffbrückenbindungen verankert. In manchen Fällen ist der Phosphatrest auch an ein Nukleosid gebunden.

1.1.1.1 Dithiolen-Einheit

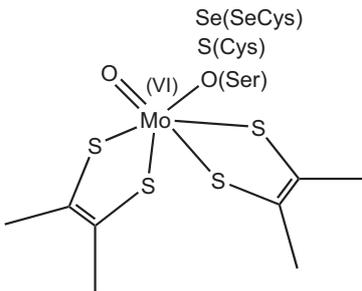
Während des katalytischen Zyklus, der durch kinetische Untersuchungen an Modellsubstanzen bestätigt wird [5, 6, 7, 8, 9], wechselt das Metall (Molybdän oder Wolfram) zwischen den Oxidationsstufen IV, V und VI. Dabei kommt dem Dithiolen-Liganden eine wichtige Rolle in der Katalyse zu. Aufgrund seines NON-INNOCENT-Charakters kann der Ligand die Katalyse,

Molybdän-Hydrolasen

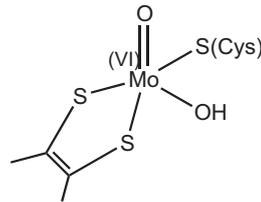


Kohlenmonoxid-Dehydrogenase
(CODH)

DMSO-Reduktasen



Sulfitoxidasen



Aldehyd-Oxidoreduktase

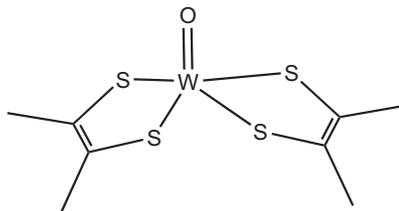


Abbildung 1.1: Familien der Enzyme

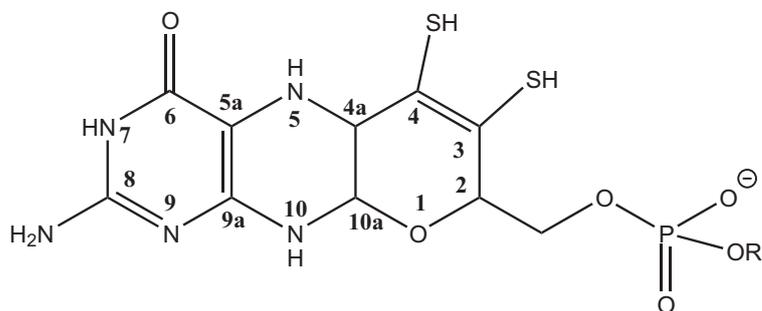


Abbildung 1.2: Molybdopterin-Cofaktor

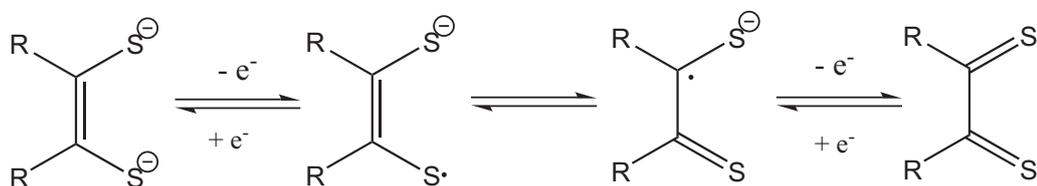


Abbildung 1.3: NON-INNOCENT eines Dithiolen-Liganden nach HOLM

die am Metallzentrum vollzogen wird, maßgeblich beeinflussen. Die Abbildung 1.3 zeigt, wie ein NON-INNOCENT-Ligand in der Lage ist, ein bis zwei Elektronen abzugeben und wieder aufzunehmen.

1.1.1.2 Offene und geschlossene Form

Die Möglichkeit der Ringöffnung wurde schon lange diskutiert. Solche reversiblen Ringöffnungen waren früher nur von einfachen Pteredinsystemen bekannt [10]. BERTERO ET AL. konnten den bityklische Pyranopterin-Ring anhand der Strukturdaten belegen [11]. Es wird vermutet, dass diese Umformung während des katalytischen Zyklus geschieht und diese möglicherweise dadurch auch selbst an der Katalyse beteiligt ist [12].

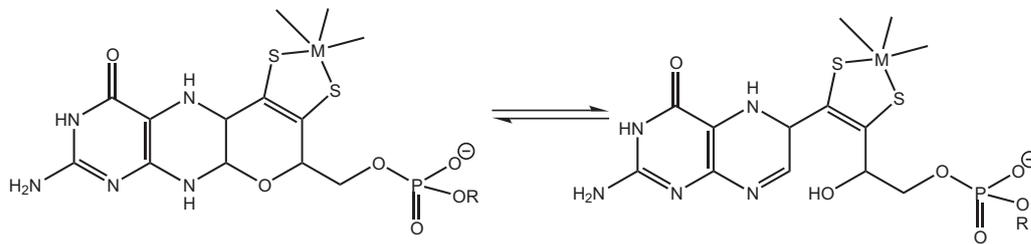


Abbildung 1.4: Offene und geschlossene Form des Dithiolen-Liganden.

1.2 Sulfitoxidase

Ein Teil dieser Arbeit befasst sich mit dem Einbau des Vanadiums in den Molybdopterin-Cofaktor, speziell den der Sulfitoxidase (siehe Kapitel 3). Deshalb wird hier auf den strukturellen Aufbau der Sulfitoxidase ausführlicher eingegangen.

Neben der Sulfitoxidase, die in tierischen Organismen vorkommt und die Oxidation von Sulfit zu Sulfat katalysiert, gehört zur Sulfitoxidasen-Familie auch die assimilatorische Nitratreduktase. Diese ist eher in Algen, Pilzen und in höheren Pflanzen zu finden und katalysiert die Reduktion des Nitrats zu Nitrit. So katalysieren beide Enzyme die Übertragung eines Sauerstoffatoms zwischen dem Substrat und Wasser.

1.2.1 Struktur der Sulfitoxidase

Die Sulfitoxidase ist ein Homodimer. Jedes Monomer der Sulfitoxidase wird von drei Domänen gebildet. Die N-Terminus-Domäne beinhaltet eine Häm-Gruppe, die dem Cytochrom- b_5 ähnelt [4]. Die Sulfitoxidase enthält ein einzelnes an das Molybdän-Atom gebundenes Molybdopterin-System. Der Molybdopterin-Cofaktor ist nicht an zusätzliche Nucleotide gebunden und liegt sehr tief

in der Proteinmatrix (vgl. Kapitel 3.2.3). Das aktive Zentrum des Enzyms besteht aus einem fünffach koordinierten Molybdän-Atom in annähernd quadratisch-pyramidaler Geometrie. Die äquatoriale Ebene wird von drei Schwefel-Liganden und einem Wasser- bzw. Hydroxid-Liganden gebildet. In der axialen Position befindet sich ein Oxo-Ligand. Zwei Schwefelatome stammen von der Dithiolen-Einheit, während der dritte Schwefel S_γ von Cys185 stammt. Dessen Unentbehrlichkeit im Katalyseprozess konnte durch eine Aminosäuremutagenese bewiesen werden, in der ein Austausch mit Serin ein inaktives Enzym zur Folge hatte [13]. Die Diskrepanz zwischen dem EXAFS-Experiment, das auf das Vorhandensein von zwei Oxo-Gruppen in der oxidierten Form hindeutet [14], und der Kristallstruktur wird durch partielle Reduktion des aktiven Zentrums durch Spuren von Sulfid etc. [4] erklärt.

1.3 Molybdän, Wolfram oder Vanadium – Wahl des Metalls

Es ist bekannt, dass die molybdänabhängigen Enzyme in allen aeroben (mesophilen) Lebewesen zu finden sind. Organismen, die Wolfram in die aktiven Zentren ihrer Enzyme einbauen, sind obligat anaerob und meistens thermophil. Dies lässt vermuten, dass zuerst Wolfram als das Metall der Wahl eingebaut wurde. Es finden sich noch heute anaerobe, thermophile- und hyperthermophile Organismen in der Nähe der „Schwarzer Raucher“. Die dort herrschende hohe Sulfidkonzentration hat einen Einfluss auf die Konzentration der Metallionen. Während Molybdän eher schwerlösliche Sulfide - mit

unterschiedlichen Zwischenstufen des Sauerstoffaustausches durch Schwefel - bildet, besitzt Wolfram weniger die Tendenz dazu. So steht den Mikroorganismen wenig Molybdän zur Verfügung.



Erst die Zunahme der Sauerstoffkonzentration in der Atmosphäre machte das Molybdän wieder verfügbar, während das oxidationsempfindliche Wolfram im Vergleich weniger häufig vorkommt [15, 16, 17]. Während der Übergangsphase zu der sauerstoffreicheren Atmosphäre bildeten sich wahrscheinlich auch solche Enzyme, die sowohl Wolfram aber auch schon Molybdän in die aktiven Zentren einbauen konnten.

Aufgrund der bestehenden chemischen Ähnlichkeit zwischen Molybdän und Vanadium, ist es denkbar, dass Vanadium ebenfalls in den Zentren der molybdopterinabhängigen Enzyme vorkommen kann. HOWARTH ET AL. [18] berichtete über Reaktionen von Vanadaten mit $[\text{HS}]^-$. So ist $[\text{HS}]^-$ bei pH 7.4 nicht imstande die V-O-Bindung zu spalten. Bei niedrigen pH-Werten allerdings kommt es zur Reaktion, da das Wasser als Abgangsgruppe fungiert:



Aber auch in diesem Falle wäre Vanadium löslich und somit auch mobilisierbar, also für Mikroorganismen verwertbar.

Der zweite Ansatz unterscheidet sich vom oberen angebotsbestimmenden Einbau. Hier steht die Stabilität der Verbindungen im Vordergrund. So wei-