



Nicolai Burzlaff (Autor)

## **Modell-Komplexe für Metalloenzyme mit einem 2-His-1-Carboxylat-Motiv**



<https://cuvillier.de/de/shop/publications/2133>

Copyright:

Cuvillier Verlag, Inhaberin Annette Jentsch-Cuvillier, Nonnenstieg 8, 37075 Göttingen,  
Germany

Telefon: +49 (0)551 54724-0, E-Mail: [info@cuvillier.de](mailto:info@cuvillier.de), Website: <https://cuvillier.de>

## I. Einleitung

Mit modernen biochemischen Verfahren zur DNA-Sequenzierung wurden in den letzten Jahren die Genome Dutzender Lebewesen sequenziert. Zahlreiche weitere werden in naher Zukunft noch aufgeklärt werden. Ein Meilenstein in der Geschichte der Menschheit ist in diesem Zusammenhang sicherlich das Humangenomprojekt. Im Rahmen dieses internationalen Projektes gelang es, eine nun fast vollständige Sequenz des menschlichen Genoms zu erhalten.

Durch solche DNA-Sequenzen werden in Organismen unter anderem die Sequenzen der Proteine festgelegt. Proteine sind Polymere, die aus 20 unterschiedlichen Aminosäuren aufgebaut und an praktisch allen Vorgängen in den Zellen beteiligt sind. Neben ihrer Aufgabe als strukturgebende Komponenten dienen viele Proteine, die Enzyme, als Katalysatoren für chemische Reaktionen der belebten Natur. Viele durch Enzyme beschleunigte Reaktionen und Prozesse sind erst aufgrund dieser Katalyse für Lebensfunktionen nutzbar. Sie sind das Ergebnis einer Milliarden Jahre langen evolutionären Entwicklung. Dieser ständige Auswahlprozess erklärt die extrem gute Materialökonomie, die viele enzymatische Reaktionen auszeichnet. Zudem zeigen Enzyme hohe Selektivitäten, sowohl was Substrate und Produkte als auch was die Chiralität angeht. Eine ähnlich hohe Effizienz bezüglich der Produkt- und Stereoselektivität ist vom Laborchemiker durch gängige Synthesen nur in den seltensten Fällen zu erreichen.

Über die Hälfte aller Enzyme sind dabei metallhaltige Proteine. In diesen Metalloenzymen sind die Metallzentren häufig essentiell für die jeweilige enzymatische Reaktion. Dazu sind in den Metalloenzymen die Metalle in eine aufwändige organische Umgebung der Proteinsequenz eingebunden. Durch die Metall-koordinierende Proteinumgebung sind die aktiven Zentren der Metalloenzyme für die jeweilige Aufgabe quasi maßgeschneidert.

Ein wesentliches Forschungsgebiet der bioanorganischen Chemie beschäftigt sich nun damit, mit Koordinationsverbindungen Metalloenzym-Analoga zu konstruieren. In solchen Modell-Komplexen wird durch Liganden als Gerüstmoleküle die Proteinhülle nachgeahmt. Die Modelle sollen helfen, die chemischen Grundlagen und Funktionsprinzipien der Enzym-Vorbilder zu verstehen. Im Idealfall imitieren sie als funktionelle Modelle die besondere Reaktivität der Enzyme. Von den daraus gewonnenen Erkenntnissen erhofft man sich z. B. eine weitere Anwendung und Verbesserungen bei synthetischen Katalysatoren.

Viele Enzyme sind gleichzeitig auf mehrere Komponenten und Substrate angewiesen und können somit nur schwer einzeln für chemische Transformationen verwendet werden. Das

beschränkt den Einsatz auf biotechnologische Anwendungen im Mikroorganismus, die Fermentation. Für großtechnische Prozesse z. B. mit Produktmengen von Tausenden von Jahrestonnen sind biotechnologische Verfahren derzeit noch zu aufwändig und kostenintensiv, so dass hier biomimetische, synthetische Katalysatoren von großem Interesse sind.

Zudem kann die hohe Selektivität der Enzyme auch nachteilig wirken und die Anzahl der potentiellen Produkt-Varianten stark einschränken. Mittels Methoden der Gentechnik können Mutanten der Enzyme dargestellt werden, die oft eine breitere Variation an Substraten und somit auch an Produkten erlauben. Die Darstellung solcher Mutanten erfolgt dabei in der Regel gezielt und rational, da ein rein kombinatorisches Verfahren zu einer unüberschaubaren Menge an Mutanten führen würde. Das Design der Mutanten bedarf daher einer guten Kenntnis, welche Rolle die Proteinhülle spielt und welche Änderungen an dieser „straflos“ erlaubt sind. Solche Erkenntnisse können aus Studien mit Modell-Komplexen erhalten werden.

Die Menge an struktureller Information über Metalloenzyme ist in den letzten Jahren rasant angestiegen. Verbesserte Techniken in der Proteinkristallographie wie z. B. der standardmäßige Einsatz von Kryotechnik in der Datensammlung und Verfahren zur Optimierung der Auflösung der Kristalle haben zu immer mehr hochaufgelösten Proteinstrukturen geführt, deren Details noch vor zehn Jahren nicht denkbar gewesen wären. Automatisierung und Standardisierung haben die Kristallzucht stark beschleunigt und die Qualität der Kristalle verbessert. Immer mehr und leistungsstärkere Messstationen erlauben das Sammeln von besseren Datensätzen in wesentlich kürzerer Zeit. Zudem hat sich durch die Entschlüsselung verschiedener Genome ein enormer Wissenszuwachs ergeben, der die Suche nach neuen Metalloenzymen erleichtert. So ist mit den Methoden der Bioinformatik häufig durch Data Mining und Data Harvesting schon aus Sequenz-Vergleichen eine Vorhersage über die Art der katalysierten Reaktion sowie über das aktive Zentrum möglich.

Dabei haben sich viele Metalloenzyme als von herausragender medizinischer Bedeutung erwiesen. Fehlfunktionen humaner Metalloenzyme, z. B. keine oder auch zu hohe Aktivität, sind für zahlreiche Krankheiten verantwortlich. Zudem erfolgt die Regulierung vieler Hormone und humaner Botenstoffe über Metalloenzyme. Diese sind somit gute Angriffspunkte, um mit Wirkstoffen und Medikamenten regulierend einzugreifen. Zudem sind einige Metalloenzyme essentiell für den effizienten Aufbau von Wirkstoffen wie z. B. bei der Biosynthese der Penicilline und Cephalosporine. Auch nutzen Krankheitserreger

Metalloenzyme, um Wirtszellen durch die spezifische Wirkung dieser Enzyme zu bekämpfen und diese zu schädigen.

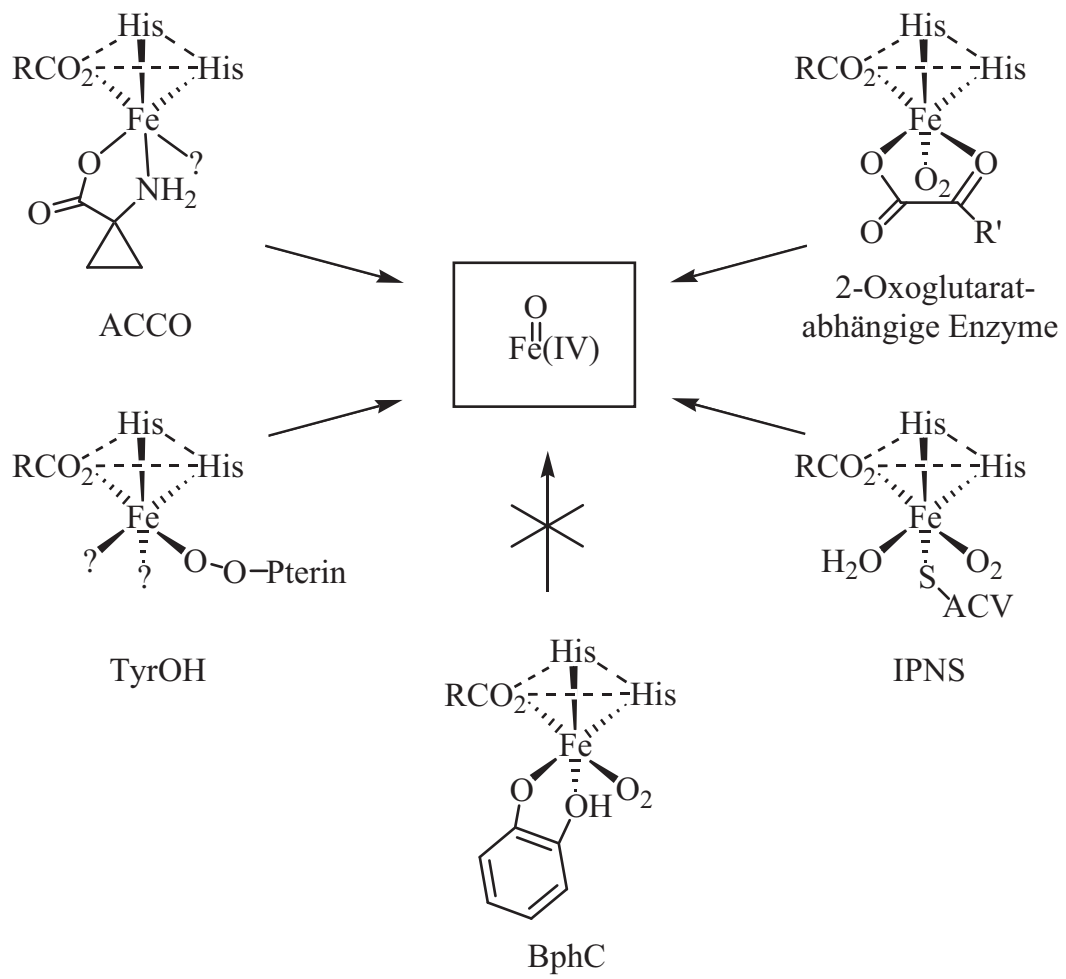
In diesem Zusammenhang bedeutende chemische Prozesse sind z. B. der Abbau von Peptiden und Proteinen durch Zink-Peptidasen oder die Modifizierung organischer Moleküle durch Nicht-Häm-Eisen-Oxidase und -Oxygenasen. Vertreter dieser beiden Enzymgruppen weisen z. T. bezüglich der aktiven Zentren hohe Ähnlichkeiten auf. Daher ist die Darstellung und Untersuchung von Modell-Komplexen für die aktiven Zentren bestimmter Zink-Proteasen und Eisen-Oxygenasen der Gegenstand dieser Arbeit.

In den letzten zehn Jahren hat die Forschung auf dem Gebiet der mononuklearen Nicht-Häm-Eisen-Oxygenasen kontinuierliche Fortschritte gemacht. Dies wird insbesondere an den nun mehrmals jährlich erscheinenden Übersichtsartikeln zu diesem Thema deutlich.<sup>[1-18]</sup> Die Zahl der bekannten und vermuteten mononuklearen, Nicht-Häm-Eisen-Oxygenasen und damit verwandten Enzyme steigt ständig an. Dies ist auf intensive biochemische Untersuchungen und besonders die inzwischen vermehrt zur Verfügung stehenden Sequenzierungsdaten aus der Genom-Forschung zurückzuführen.<sup>[14]</sup> Für zahlreiche dieser Enzyme liegen mittlerweile auch Strukturdaten aus der Proteinkristallographie vor.<sup>[12-14]</sup>

Wie im Verlauf des Kenntnisstandes noch ausgeführt wird, ist in der Mehrzahl dieser Eisen-Oxygenasen das Eisen-Ion durch zwei Histidine und einen Carboxylat-Donor, entweder Glutaminsäure oder Asparaginsäure, facial gebunden. Für dieses Bindungs-Motiv wurde von L. Que der Begriff "faciale 2-His-1-Carboxylat-Triade" eingeführt.<sup>[19]</sup>

Eisen-Enzyme mit einer solchen faciale 2-His-1-Carboxylat-Triade werden mittlerweile von der Bedeutung mit Häm-Proteinen oder Enzymen mit Eisen-Schwefel-Clustern gleichgesetzt. Mutationsexperimente haben gezeigt, dass diese Triade für die Enzymkatalyse essentiell ist. Auch scheint sich die Geometrie der Triade während der Katalyse nicht wesentlich zu ändern, wie Experimente mittels pseudokinetischer Proteinkristallographie gezeigt haben. Vielen der mononuklearen, Nicht-Häm-Eisen-Oxygenasen ist zudem gemein, dass sie in ihrem Biokatalysezyklus ein hoch-reaktives  $\text{Fe(IV)=O}$ -Intermediat durchlaufen (Abb. 1).

Aufgrund dieser herausragenden Stellung sowie der Fähigkeit,  $\text{O}_2$  z. B. mittels der  $\text{Fe(IV)=O}$ -Spezies zu aktivieren, ist es notwendig, die faciale 2-His-1-Carboxylat-Triade mit bioanorganischen Modell-Komplexen nachzubilden. Ziel dieser Studien ist ein genaues Verständnis der spezifischen chemischen Eigenschaften dieser Triade. Die fixe Geometrie der Metall-bindenden Aminosäuren erleichtert dabei die Nachbildung der aktiven Zentren durch Komplex-Liganden. Diese Liganden sind zudem in Zink-Modell-Komplexen einsetzbar, da sich ein sehr ähnliches 2-His-1-Carboxylat Motiv auch in zahlreichen Zink-Peptidasen findet.



**Abb. 1.** Eisen-Oxygenasen und Oxidasen mit facialer 2-His-1-Carboxylat-Triade.<sup>[19]</sup>

## II. Kenntnisstand

### II. 1. Eisen-Oxygenasen mit facialer 2-His-1-Carboxylat-Triade

Bei Oxygenasen handelt es sich um Enzyme, die den Einbau von molekularem Sauerstoff in ein Produkt katalysieren. Wird nur ein Sauerstoffatom von  $O_2$  in das Produkt eingebaut, während das zweite nach der Reaktion z. B. in einem Molekül  $H_2O$  auftaucht, spricht man von einer Monooxygenase. Intramolekulare Dioxygenasen sind Enzyme, bei denen beide Sauerstoffatome in ein Produkt eingebaut werden. Bei intermolekularen Dioxygenasen finden sich die Sauerstoffatome in verschiedenen Produkten wieder.<sup>[20]</sup> Bei einigen Enzymen findet sich nach der oxidativen Reaktion kein Sauerstoff im Produkt. Solche Enzyme können dann einfach als Oxidasen bzw. Oxidoreduktasen bezeichnet werden.

All diesen Enzymen ist gemeinsam, dass sie Reaktionen katalysieren, bei denen molekularer Sauerstoff  $O_2$  als Reaktand wirkt. Die unkatalysierte Reaktion von  $O_2$  mit organischen Substraten ist zwar thermodynamisch günstig, verläuft aber kinetisch aufgrund des Spin-Verbotes sehr langsam. Im Grundzustand liegt molekularer Sauerstoff als Triplett- $^3O_2$  mit zwei ungepaarten Elektronen im HOMO- $\pi^*$ -Orbital vor. Eine Reaktion mit Spin-gepaarten Singulett-Spezies wie z. B. den meisten organischen Verbindungen ist somit Spin-verboden.<sup>[15]</sup> Da ein Übergang zum energetisch um 22 kcal/mol höher gelegenen Singulett-Sauerstoff  $^1O_2$  für die Oxygenasen nicht erreichbar ist, verbleiben diesen Enzymen drei Strategien, um Sauerstoff zu aktivieren.<sup>[15]</sup>

- (a) Orbital-Überlappung mit dem Metallion: Durch Koordination des molekularen Sauerstoffs an ein Übergangsmetall können die mit ungepaarten Elektronen besetzten  $\pi^*$ -Orbitale des  $O_2$  mit d Orbitalen des Metalls, die ebenfalls ungepaarte Elektronen enthalten, überlappen. Eine Reaktion mit organischen Singulett-Spezies ist dann möglich.
- (b) Single Electron Transfer (SET): In Eisen-Oxygenasen kann der Triplett-Sauerstoff  $^3O_2$  im Grundzustand ein Elektron von Fe(II)-Zentren aufnehmen und so ein Superoxid-Anion bilden, das eine Reihe von Ein- oder Zweielektronen-Reaktionen eingehen kann.
- (c) Reaktion mit einem Substrat-Radikal: Durch SET vom Substrat auf das Metall-Ion kann ein Substrat-Radikal gebildet werden. Die Reaktion des molekularen Sauerstoffes mit diesem Substrat-Radikal ist dann Spin-erlaubt.

Bei den Strategien (a) und (b) handelt es sich jeweils um eine Aktivierung von  $O_2$ , die von Fe(II)-haltigen Oxygenasen angewendet wird. Die Substrat-Aktivierung findet man bei Fe(III)-haltigen Enzymen. Neben dieser Unterteilung nach Fe(II)/ $O_2$ -Aktivierung und Fe(III)-haltigen Enzymen.

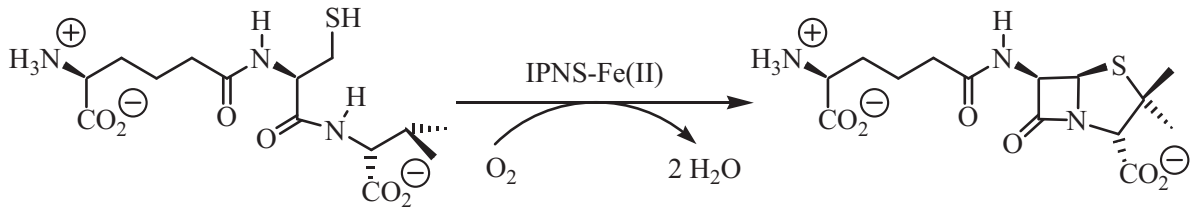
Fe(III)/Substrat-Aktivierung werden die Oxygenasen weiter aufgrund des katalysierten Reaktionstypes unterschieden (vgl. Tabellen 1 und 2). Im weiteren Verlauf des Kenntnisstandes sollen nun diese Eisen-Oxygenasen bezüglich der Strukturen ihrer aktiven Zentren und der Mechanismen der katalysierten Reaktionen im Detail besprochen werden.

**Tabelle 1.** Einteilung der Fe(II)-Oxygenasen nach den Reaktionstypen.<sup>[8]</sup>

**Fe(II)/O<sub>2</sub>-Aktivierung**

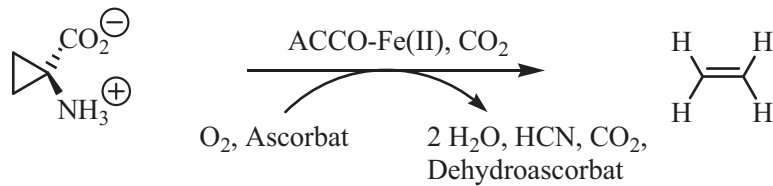
4e<sup>-</sup>-oxidativer Ringschluss

Bsp.: Isopenicillin N-Synthase (IPNS)



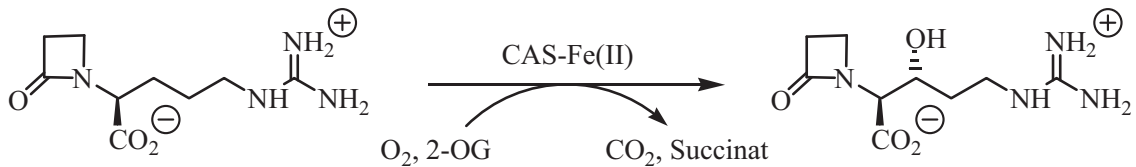
Ascorbat-abhängige 2e<sup>-</sup>-Oxidation

Bsp.: 1-Aminocyclopropancarboxylat-Oxidase (ACCO)



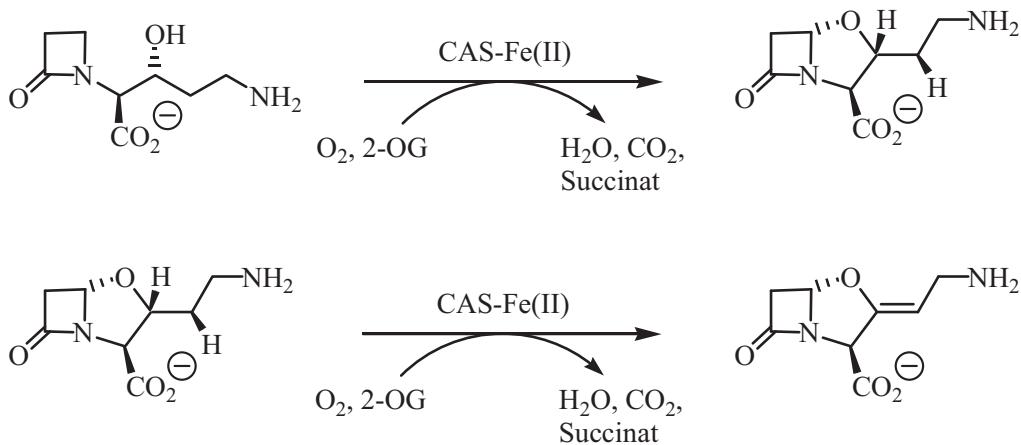
2-Oxoglutarat-abhängige Hydroxylierung

Bsp.: Clavaminsäure-Synthase (CAS)



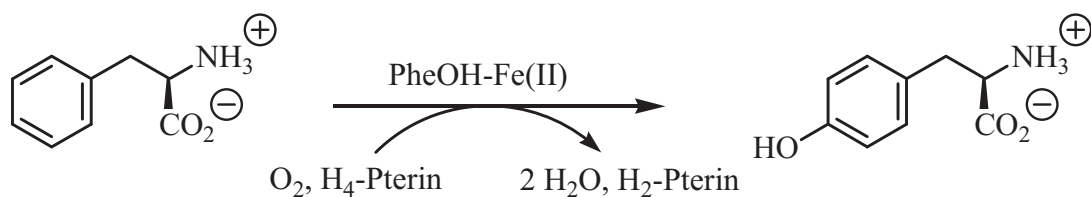
2-Oxoglutarat-abhängige 4e<sup>-</sup>-Oxidation

Bsp.: Clavaminsäure-Synthase (CAS)



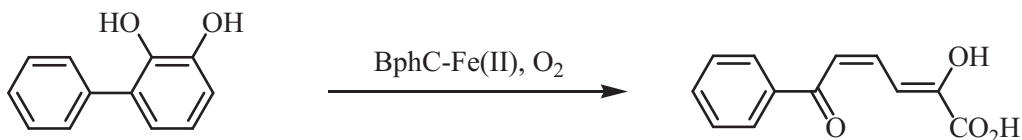
Pterin-abhängige Hydroxylierung

Bsp.: Phenylalanin-Hydroxylase (PheOH)



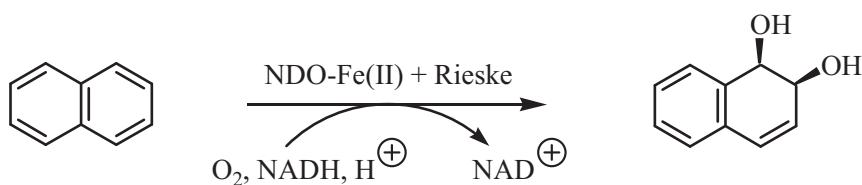
Extradiol-Spaltung

Bsp.: 2,3-Dihydroxybiphenyl-1,2-Dioxygenase (BphC)



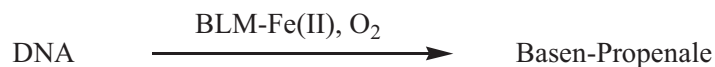
*cis*-Dihydroxylierung

Bsp.: Naphthalin-1,2-Dioxygenase (NDO)



H<sup>-</sup>-Abstraktion

Bsp.: Bleomycin (BLM)

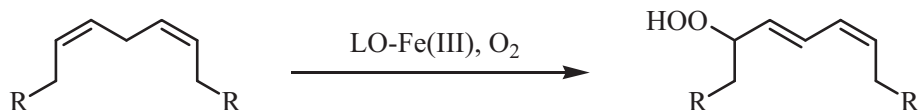


**Tabelle 2.** Einteilung der Fe(III)-Oxygenasen nach den Reaktionstypen.<sup>[8]</sup>

**Fe(III)/Substrat-Aktivierung**

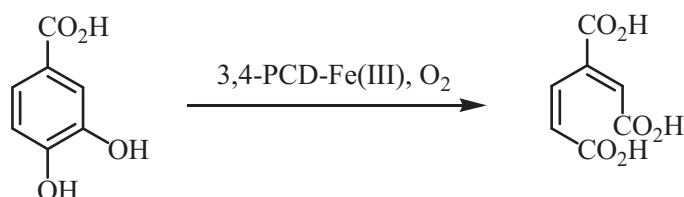
Hydroperoxidierung

Bsp.: Lipoxygenase



Intradiol-Spaltung

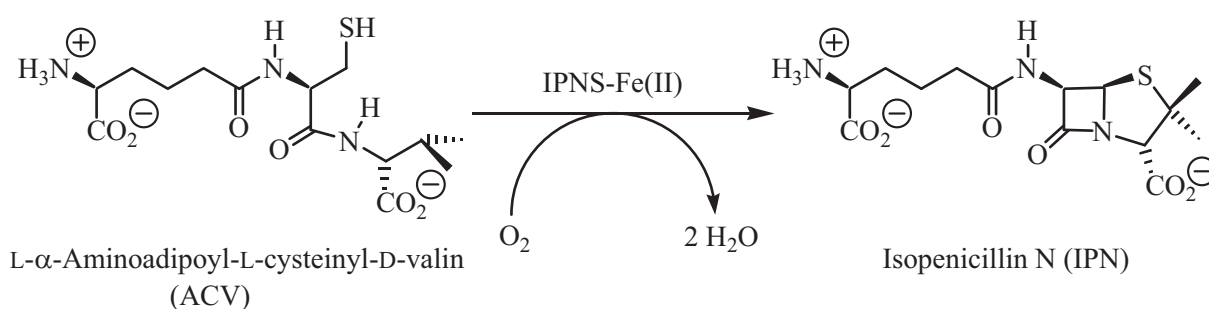
Bsp.: Protocatechuat-3,4-Dioxygenase





## II. 1. 1. Isopenicillin N-Synthase (IPNS)

Eines der herausragendsten Enzyme mit einer facialem 2-His-1-Carboxylat-Triade im aktiven Zentrum ist die Isopenicillin N-Synthase (IPNS). Hierbei handelt es sich um das Schlüsselenzym in der Biosynthese von Penicillinen. Es bewerkstelligt die oxidative Zyklisierung des Tripeptides  $\delta$ -(L- $\alpha$ -Amino adipoyl)-L-cysteinyl-D-valin (ACV) zu Isopenicillin N (IPN). Von diesem leiten sich die meisten der gebräuchlichen Penem- und auch Cephem-Antibiotika ab. So bewirken weitere Enzyme die Epimerisierung von IPN zu Penicillin N, die Derivatisierung zum Beispiel zu Penicillin G sowie die Ringerweiterung zu den Cephalosporinen. IPNS ist ein Fe(II)-abhängiges Enzym und benötigt für die Reaktion ein Äquivalent molekularen Sauerstoff als Co-Substrat. Die beiden Sauerstoffatome werden in der Reaktion zu zwei Wassermolekülen reduziert.



**Abb. 2.** Cyclisierung des L- $\alpha$ -Amino adipoyl-L-cysteinyl-D-valins (ACV) zu Isopenicillin N (IPN) durch die Isopenicillin N-Synthase (IPNS).

Aufgrund der besonderen Bedeutung der Penicilline und Cephalosporine, denen seit ihrer Entdeckung viele Millionen von Menschen ihr Leben zu verdanken haben, wurde insbesondere der Mechanismus der Penicillin-Biosynthese intensiv erforscht, bei der in einer einzigen Reaktion beide Ringe des Penicillin-Grundkörpers aufgebaut werden. Obwohl  $\beta$ -Lactame seit nunmehr 60 Jahren eine besondere synthetische Herausforderung für die organische Synthese darstellen, gibt es bis dato keine Synthese, die es an Effizienz und Ausbeute mit dieser einzigartigen Biokatalyse aufnehmen kann. Durch Inkubations-Experimente mit einer Vielzahl an Derivaten des natürlichen Substrates ACV <sup>[21]</sup> sowie mit Isotopen-markierten ACV-Substraten <sup>[22]</sup> und den Ergebnissen mehrerer Röntgenstrukturanalysen <sup>[23-29]</sup> konnte von Baldwin Ende der 90er Jahre ein Mechanismus für diese Biokatalyse aufgestellt werden (Abb. 3). <sup>[26,30]</sup>