

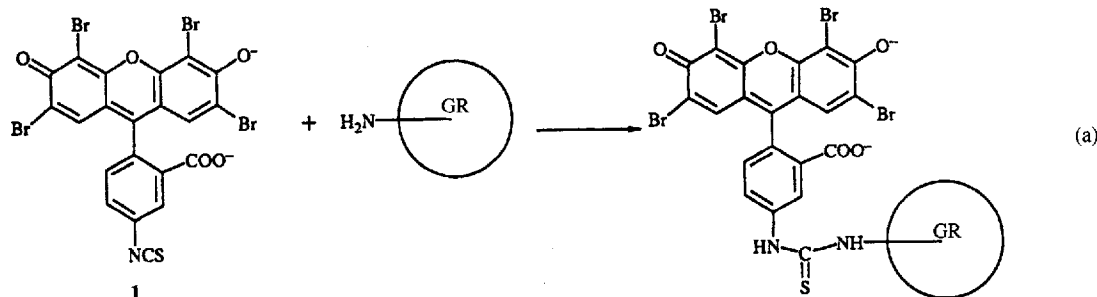
# Die Aktivierung von Glutathion-Reduktase durch Licht: ein neuartiger Ansatz für die Entwicklung von Redox-Photoenzymen\*\*

Itamar Willner\* und Eran Zahavy

Professor Mordecai Rabinovitz  
zum 60. Geburtstag gewidmet

Die Photoaktivierung von Proteinen wird in letzter Zeit intensiv und erfolgreich erforscht<sup>[1]</sup>. So gelang es beispielsweise vor kurzem, die Aktivierung von Enzymen<sup>[2]</sup> und anderen Proteinen<sup>[3]</sup> reversibel „an- und auszuschalten“ (ON-OFF-Aktivierung), indem man photoisomerisierbare (photochrome) Gruppen kovalent an die Proteine gebunden hat. Die Beteiligung von Redoxenzymen an lichtinduzierten Elektronentransfer-Prozessen konnte durch chemische Modifizierung der Proteine mit Gruppen, die als Elektronen-Relais fungieren, erreicht werden<sup>[4]</sup>. Bei diesen Untersuchungen wirkten Protein-gebundene Elektronenacceptoren als Quencher für den angeregten Zustand eines Diffusions-Photosensibilisators und als Elektronenmediator für den Transport der Elektronen zum aktiven Zentrum des Enzyms. Wir berichten hier über die Umwandlung des Enzyms Glutathion-Reduktase (GR) in einen photoaktiven Biokatalysator, indem Eosin kovalent an das Protein gebunden wurde. Dieses modifizierte Enzym wird durch Licht aktiviert, d. h. geht in den ON-Zustand über. Der lichtinduzierten Redoxreaktion folgt ein Elektronentransfer innerhalb des Proteins, der die biokatalysierte Reduktion von oxidiertem Glutathion, GSSG, bewirkt. Bisher wurden Proteine mit lichtempfindlichen Gruppen modifiziert, um den Ablauf des Elektronentransfers in Proteinen zu untersuchen<sup>[5,6]</sup>. Unsere Ergebnisse belegen, daß ein lichtinduzierter Elektronentransfer mit chemischen Umsetzungen koppelbar ist.

GR (aus Bäckerhefe, EC 1.6.4.2, Sigma) wurde gemäß Gleichung (a) mit Eosinisothiocyanat **1** zum Xanthen-modifizierten Protein umgesetzt. Für das Aufladen des Proteins werden zwei



Moleküle Eosin pro Proteinmolekül benötigt. Das durch Eosin modifizierte Protein  $\text{Eo}^{2-}$ -GR weist 50 % der ursprünglichen Aktivität des natürlichen Proteins GR auf<sup>[7]</sup>. Belichtet man ( $\lambda > 475 \text{ nm}$ ) unser Photosystem aus  $\text{Eo}^{2-}$ -GR in Phosphatpuffer (pH = 7.5) mit  $\text{Na}_2\text{EDTA}$  als Opfer-Elektronendonator und oxidiertem Glutathion, GSSG, so entsteht reduziertes Glutathion GSH. In Abbildung 1a ist die Bildungsgeschwindigkeit

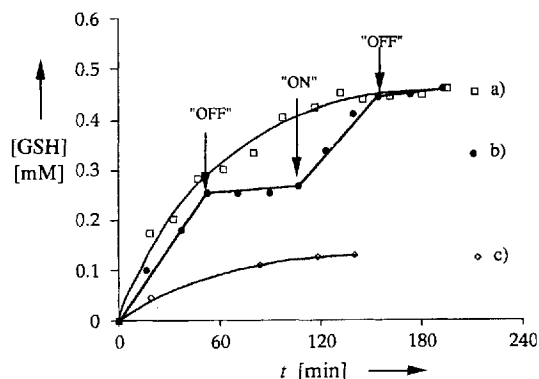


Abb. 1. Bildungsgeschwindigkeiten für GSH als Funktion der Belichtungsdauer ( $\lambda > 475 \text{ nm}$ ): a) Photosystem bestehend aus  $\text{Eo}^{2-}$ -GR ( $1 \text{ mg mL}^{-1}$ ),  $\text{Na}_2\text{EDTA}$  ( $1 \times 10^{-2} \text{ M}$ ) und GSSG ( $1 \times 10^{-2} \text{ M}$ ). b) Das Photosystem enthält dieselben Komponenten; die Zeitpunkte, an denen das Licht „an“- oder „aus“geschaltet wurde, sind durch Pfeile gekennzeichnet. c) Photosystem bestehend aus GR,  $\text{Eo}^{2-}$  ( $1.7 \times 10^{-5} \text{ M}$ ),  $\text{Na}_2\text{EDTA}$  ( $1 \times 10^{-2} \text{ M}$ ) und GSSG ( $1 \times 10^{-2} \text{ M}$ ). Bei allen Photosystemen wurden Phosphatpuffer-Lösungen (pH = 7.5) verwendet. Alle Versuche wurden unter Argon durchgeführt.

keit für GSH<sup>[8]</sup> als Funktion der Belichtungszeit wiedergegeben. Wird das Photosystem nicht belichtet oder gibt man kein  $\text{Na}_2\text{EDTA}$  ( $\text{EDTA} = \text{Ethylendiamintetraessigsäure}$ ) zu, wird kein GSH gebildet. Diese Beobachtung weist darauf hin, daß GSH durch einen photoinduzierten Elektronentransfer entsteht. Belichtet man das Photosystem in Intervallen (Abb. 1 b), so bildet sich ausschließlich während der Bestrahlung GSH. Aus der Konzentration von GSH nach einer Belichtungszeit von 200 min errechnen sich für das aktive Zentrum des Enzyms 75 Cyclen (bei dieser Berechnung wurde für GR ein Molekulargewicht von  $\text{MG} = 118\,000 \text{ g mol}^{-1}$  eingesetzt<sup>[7]</sup>).  $\text{Eo}^{2-}$ -GR fungiert bei dieser lichtinduzierten Umsetzung als Photokatalysator.

Belichtet man ( $\lambda > 475 \text{ nm}$ ) das Photosystem, das aus dem natürlichen Enzym GR und nicht gebundenen Eosin als Diffu-

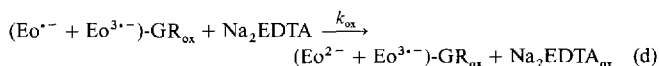
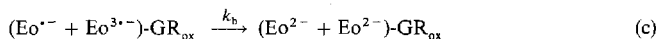
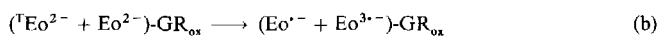
sions-Photosensibilisator besteht, in Gegenwart von  $\text{Na}_2\text{EDTA}$  und GSSG, so entsteht nur wenig GSH (Abb. 1c). Mit dem Xanthen-modifizierten Protein  $\text{Eo}^{2-}$ -GR wird GSH etwa fünfmal so schnell gebildet wie mit dem Photosystem aus GR und nichtgebundenem Eosin. Die bessere Ausbeute bei der Reaktion mit  $\text{Eo}^{2-}$ -GR resultiert aus der Tatsache, daß der Elektronentransfer innerhalb des Proteins leichter abläuft. Es muß allerdings erwähnt werden, daß das Photosystem mit  $\text{Eo}^{2-}$ -GR bei der Reduktion von GSSG nur ein Tausendstel der Aktivität des biologischen Photosystems aus Enzym GR und NADPH als Elektronendonator aufweist.

Durch Flashphotolyse-Untersuchungen konnten wir den Elektronentransfer-Mechanismus aufklären. Die Lebensdauer des Triplettzustands von  $\text{Eo}^{2-}$ -GR beträgt  $36 \mu\text{s}$ . Der erste Schritt ist ein Elektronentransfer innerhalb des Proteins, der die

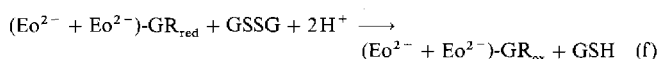
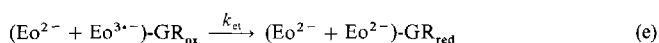
[\*] Prof. I. Willner, E. Zahavy  
Institute of Chemistry and Farkas Center for Light-Induced Processes  
The Hebrew University of Jerusalem  
Jerusalem 91904 (Israel)  
Telefax: Int. + 2/585345

[\*\*] Diese Arbeit wurde vom Bundesministerium für Forschung und Technologie (BMFT) und vom National Council for Research and Development, the Ministry of Science and Technology, Israel, gefördert.

Konzentration des angeregten  $\text{Eo}^{2-}$ -GR-Zustands unter Bildung des Ionenpaares  $\text{Eo}^{\cdot-}$  und  $\text{Eo}^{3\cdot-}$  abbaut [Gl. (b)]<sup>[9]</sup>. Sind der Elektronendonator  $\text{Na}_2\text{EDTA}$  und GSSG nicht im Reaktionsgemisch vorhanden, transferiert das photochemisch erzeugte Ionenpaar die Elektronen wieder zurück [Gl. (c);  $k_b = 2 \times 10^3 \text{ s}^{-1}$ ]<sup>[10]</sup>. In Gegenwart von  $\text{Na}_2\text{EDTA}$  konkurriert die Oxidation des Elektronendonors [Gl. (d)] mit der Rückreak-



↓  
Zersetzungsprodukte



tion [Gl. (c)], wobei  $\text{Eo}^{3\cdot-}$  angereichert wird ( $k_{\text{ox}} = 3.8 \times 10^4 \text{ s}^{-1}$ ). In Gegenwart von GSSG und  $\text{Na}_2\text{EDTA}$  nimmt die Konzentration des photochemisch erzeugten reduzierten Produkts  $\text{Eo}^{3\cdot-}$  ab. Dies entspricht einem Elektronentransfer vom Ionenpaar zum Redoxzentrum des Enzyms [Gl. (e);  $k_{\text{ei}} = 1.7 \times 10^2 \text{ s}^{-1}$ ], an dem GSSG reduziert wird [Gl. (f)]. Die Geschwindigkeitskonstante für den Elektronentransfer von  $\text{Eo}^{3\cdot-}$  zum aktiven Zentrum des Proteins ist klein im Vergleich zu bekannten Geschwindigkeitskonstanten<sup>[11]</sup>.

Es sollte noch erwähnt werden, daß das aktive Zentrum von GR aus einer Isoalloxazin-Gruppe, die Teil des Flavinadenin-nucleotid(FAD)-Cofaktors ist, und aus einer Disulfid-Bindung zwischen  $\text{Cys}^{58}$  und  $\text{Cys}^{63}$  besteht<sup>[12]</sup>. Wir vermuten, daß die Isoalloxazin-Gruppe beim Elektronentransfer von  $\text{Eo}^{3\cdot-}$  zur Disulfidbindung als Mediator fungiert.

Die postulierte Kinetik für den Elektronentransfer [Gl. (b)–(f)] konnte erhärtet werden:  $\alpha$ -Chymotrypsin, ein Hydrolyseenzym ohne aktives Redoxzentrum wurde mit Eosinisothiocyanat 1 umgesetzt. An diesem so modifizierten Enzym laufen analoge Elektronentransfer-Reaktionen zu den Gleichungen (b)–(d) ab. Da diesem Enzym jedoch das aktive Zentrum fehlt, reichert sich bei der Flashphotolyse ( $\lambda_{\text{max}} = 400 \text{ nm}$ ), in Gegenwart von  $\text{Na}_2\text{EDTA}$ ,  $\text{Eo}^{3\cdot-}$  ohne nennenswerten Abbau an.

Modifiziert man GR mit photoaktiven Gruppen, so wird dieser Biokatalysator zu einem durch Licht aktivierbaren Protein. Der kovalent gebundene, photoaktive Farbstoffsubstituent übernimmt zwei sich ergänzende Funktionen: er löst den photoinduzierten Elektronentransfer aus und wirkt innerhalb des Proteingerüsts als Relais, das die „elektrische Kommunikation“ mit dem Redoxzentrum des Enzyms erleichtert. Die biokatalytische Leistungsfähigkeit von  $\text{Eo}^{2-}$ -GR ist jedoch wesentlich geringer als die des natürlichen Enzyms GR mit NADPH-Cofaktor. Durch die Koordination längerer Chromophore an das Protein könnten die elektrische Kommunikation innerhalb des Proteins und die Aktivität des Photoenzym verbessert werden. Solche durch Chromophore modifizierte Proteine könnten als Grundlage für die Entwicklung künstlicher Photosynthese-Systeme dienen<sup>[13]</sup>. Die Kupplung von zwei Redoxenzymen (einem oxidierenden und einem reduzierenden Protein) und deren Modifizierung mit geeigneten lichtaktiven Verbindungen könnten zu cyclischen Photosynthese-Systemen führen.

Eingegangen am 6. September 1993 [Z 6339]

- [1] I. Willner, B. Willner in *Bioorganic Photochemistry. Biological Application of Photochemical Switches*, Vol. 2 (Hrsg.: H. Morrison), Wiley, New York, 1993, S. 1–110.
- [2] a) I. Willner, S. Rubin, A. Riklin, *J. Am. Chem. Soc.* **1991**, *113*, 3321–3325; b) N. A. Porter, J. O. Bruhnke, *Photochem. Photobiol.* **1991**, *51*, 37–43.
- [3] a) I. Willner, S. Rubin, *J. Am. Chem. Soc.* **1992**, *114*, 3150–3151; b) I. Willner, S. Rubin, Y. Cohen, *ibid.* **1993**, *115*, 4937–4938.
- [4] I. Willner, N. Lapidot, *J. Am. Chem. Soc.* **1991**, *113*, 3625.
- [5] a) S. L. Mayo, W. R. Ellis, R. J. Crutchley, H. B. Gray, *Science* **1986**, *233*, 948; b) B. Durham, L. P. Pal, J. E. Long, F. Millett, *Biochemistry* **1989**, *28*, 8659; c) R. A. Scott, D. W. Conrad, M. K. Eidsness, A. C. F. Gorren, S. A. Wallin in *Metal Ions in Biological Systems. Electron Transfer Reactions in Metalloproteins* (Hrsg.: H. Sigel, A. Sigel), Dekker, New York, 1991, S. 199–222.
- [6] a) D. N. Beratan, J. N. Betts, J. N. Onuchic, *Science* **1991**, *252*, 1285; b) L. P. Pan, M. Fram, B. Durham, D. Davies, F. Millett, *Biochemistry* **1990**, *29*, 3231; c) H. J. Therien, J. Chang, A. L. Raphael, B. E. Bowler, H. B. Gray, *Struct. Bonding* **1991**, *75*, 109; d) D. N. Beratan, J. N. Onuchic, J. N. Betts, B. E. Bowler, H. B. Gray, *J. Am. Chem. Soc.* **1990**, *112*, 7915.
- [7] a) R. F. Colman in *Method in Enzymology*, Vol. 17 B (Hrsg.: S. P. Colomick, N. O. Kaplan), Academic Press, New York, 1971; b) R. F. Colman in [7a], S. 500; c) C. H. Williams, Jr., L. O. Arscott in [7a], S. 503.
- [8] Die GSH-Konzentration wurde nach der Methode von Ellman bestimmt: G. L. Ellman, *Arch. Biochem. Biophys.* **1959**, *82*, 70.
- [9] Über den intermolekularen Elektronentransfer bei Xanthenfarbstoffen in mikroheterogenen Medien ist schon früher berichtet worden: a) L. Lindqvist, *Ark. Kemi.* **1960**, *16*, 79–137; b) V. Kasche, L. Lindqvist, *Photochem. Photobiol.* **1965**, *4*, 923–933; c) L. Flamigni, *J. Phys. Chem.* **1992**, *96*, 3331–3337; d) P. Bilsik, R. Dabestani, C. F. Chignell, *ibid.* **1991**, *95*, 5784–5791; e) J. C. Mialocq, P. Hébert, X. Armand, R. Bonneau, J. P. Morand, *J. Photochem. Photobiol. A: Chem.* **1991**, *56*, 323–338; f) V. E. Korobov, A. K. Chibisov, *J. Photochem.* **1978**, *9*, 411–424.
- [10] Die Transiente der Rekombination entspricht der eines monoexponentiellen Zerfalls. Im Bereich von  $10^{-5}$  bis  $10^{-6} \text{ s}$  ist die Reaktionsgeschwindigkeit unabhängig von der Enzymkonzentration, was darauf schließen läßt, daß die Rekombination innerhalb des Proteingerüsts (nicht bimolekular) abläuft.
- [11] Der niedrige Wert der Geschwindigkeitskonstanten für den Elektronentransfer könnte auf die Sperrigkeit des Ladungsträgers  $\text{Eo}^{3\cdot-}$  zurückzuführen sein. Die sterische Hinderung innerhalb des Proteins könnte die für den Elektronentransfer angestrebte Ausrichtung von Mediator und Redoxzentrum beeinflussen und zu den geringen Elektronentransfergeschwindigkeiten führen. D. W. Conrad, H. Zhang, D. E. Stewart, R. A. Scott, *J. Am. Chem. Soc.* **1992**, *114*, 9909.
- [12] a) P. A. Karplus, G. E. Schultz, *J. Mol. Biol.* **1987**, *195*, 701; b) *ibid.* **1989**, *210*, 163; c) G. E. Schulz, R. H. Schirmer, W. Sachsenheimer, E. F. Pai, *Nature* **1978**, *273*, 120.
- [13] I. Willner, B. Willner, *Top. Curr. Chem.* **1991**, *159*, 153–218.

## Rutheniumkomplex-katalysierte [2 + 2]-Cycloaddition von Norbornen- mit Ethinderivaten\*\*

Take-aki Mitsudo\*, Hiroshi Naruse, Teruyuki Kondo, Yoshihiko Ozaki und Yoshihisa Watanabe\*

Die [2 + 2]-Cycloaddition von Olefinen und/oder Ethinderivaten ist ein vielseitiges Verfahren zur Herstellung von Cyclobutanen, das thermisch über Diradikal-Zwischenstufen<sup>[1]</sup>, photolytisch<sup>[2]</sup> oder Übergangsmetall-katalysiert<sup>[3]</sup> durchgeführt werden kann. Die Rutheniumkomplex-katalysierte Cycloaddition von Norbornenen (Bicyclo[2.2.1]hepten-Derivaten) mit Ethindicarbonsäureestern ist ungewöhnlich<sup>[3]</sup>; sie wurde zur Synthese von Pseudo-Leitervverbindungen mit  $[\text{RuH}_2(\text{CO})(\text{PPh}_3)_3]$  oder  $[\text{Ru}(\text{cod})(\text{cot})]/\text{PR}_3$  ( $\text{cod} = 1,5\text{-Cyclooctadien}$ ,

[\*] Prof. Dr. T. Mitsudo, Prof. Dr. Y. Watanabe, H. Naruse, Dr. T. Kondo, Y. Ozaki  
Division of Energy and Hydrocarbon Chemistry  
Graduate School of Engineering, Kyoto University  
Sakyo-ku, Kyoto, 606-01 (Japan)  
Telefax: Int. + 81/75753-4976

[\*\*] Diese Arbeit wurde vom Ministerium für Erziehung, Wissenschaft und Kultur, Japan, (Grant-in-Aid for Scientific Research, Nr. 04650732, 05403024) gefördert.