

# Neuartige Nitrosylkupfer-Komplexe: Beiträge zum Verständnis der dissimilatorischen, kupferhaltigen Nitrit-Reduktasen

Bruce A. Averill\*

Unter Denitrifikation versteht man die dissimilatorische Reduktion von Stickstoff-Sauerstoff-Verbindungen zu gasförmigen Produkten durch Bakterien. Dieser Vorgang nimmt eine zentrale Stellung im globalen Stickstoffkreislauf ein. Denn nur über die Denitrifikation kann fixierter Stickstoff wieder in die Atmosphäre eintreten (Abb. 1). Darüber hinaus ist die Denitrifikation eine

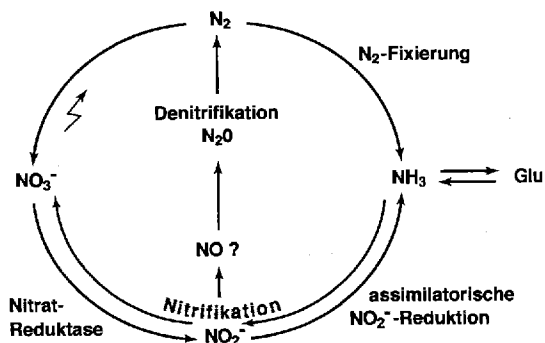


Abb. 1. Reaktionsschema zum Metabolismus des anorganischen Stickstoffs. Die Denitrifikation nimmt eine zentrale Stellung ein.

Hauptquelle für die Gase NO und N<sub>2</sub>O, die eine bedeutende Rolle bei der Zerstörung der Ozonschicht und für den Treibhauseffekt spielen. Auch für die biologische Selbstregulation und für den Nährstoffkreislauf in wasserführenden Schichten und den Gesteinsformationen unter dem Humusboden ist die Denitrifikation wichtig. Schließlich kommt NO, das 1992 von *Science* zum „Molekül des Jahres“ gekürt wurde, eine Schlüsselrolle in einer Vielzahl von Prozessen zu. Aus diesen Gründen sind mikrobielle Systeme, die NO entwickeln oder verbrauchen, von besonderem Interesse als denkbare Modellsysteme für Säugetiere, und die möglichen Auswirkungen von NO, das Darm- oder pathogene Bakterien produzieren, bleibt ein unbearbeitetes, aber vielversprechendes Forschungsgebiet.

Der Verlauf der Denitrifikation wurde in den letzten zehn bis 15 Jahren sehr kontrovers diskutiert. Das Hauptaugenmerk richtete sich dabei auf den Weg von Nitrit zu Distickstoffoxid, und besonders auf die Frage, ob hier Stickstoffmonoxid als notwendiges Zwischenprodukt entsteht. Neue Ergebnisse haben klar gezeigt, daß zumindest bei den meisten Denitrifikatoren in der überwiegenden Zahl der Fälle die Reduktion von NO<sub>2</sub><sup>-</sup> zu NO führt, das anschließend in einem separaten, enzymkatalysierten Schritt zu N<sub>2</sub>O reduziert wird (Abb. 2)<sup>[1-3]</sup>. Die Meinungsverschiedenheiten waren so heftig, weil zwei Typen der dissimilatorischen Nitrit-Reduktase existieren (mit zwei Hämgruppen oder zwei Kupferatomen je Proteinmonomer), die deutlich verschieden reagieren<sup>[4]</sup>. Diese Enzyme scheinen nach denselben Grund-

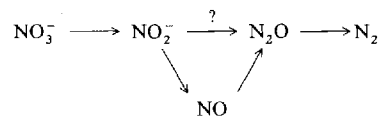


Abb. 2. Der Reaktionsweg der Denitrifikation.

prinzipien zu arbeiten: jeweils ein Chromophor im aktiven Zentrum, entweder Häm d<sub>1</sub> oder Typ-2-Kupfer (nicht-blau), sowie ein elektronenübertragendes Zentrum mit einer Häm-c-Einheit oder einer ungewöhnlichen grünen Variante eines (blauen) Typ-1-Kupferzentrums<sup>[5,6]</sup>. Die Häm-Enzyme wandeln NO<sub>2</sub><sup>-</sup> fast ausschließlich in NO um, jedoch können die Kupfer-Enzyme beträchtliche Mengen an N<sub>2</sub>O aus NO<sub>2</sub><sup>-</sup> produzieren<sup>[7]</sup>, wenn NO zugegen ist.

Für das Verständnis von Struktur und Reaktivität vieler Metalloenzyme und Metalloproteine, darunter Cytochrom P 450, Hämoglobin, Hämyerthrin und die Eisen-Schwefel-Proteine<sup>[8]</sup>, war die Existenz und die Kenntnis der Eigenschaften von wohldefinierten synthetischen Modellkomplexen von zentraler Bedeutung. Im Fall der Häm-cd<sub>1</sub>-Nitrit-Reduktasen gibt es in Fülle synthetische Analoga für die Wechselwirkung von NO sowohl mit Fe<sup>II</sup>- als auch mit Fe<sup>III</sup>-Porphyrin-Komplexen. Wie aus Untersuchungen an diesen Modellverbindungen klar hervorgeht, arbeiten die Enzyme nach einem Mechanismus von Protonierung und Dehydrierung des gebundenen Nitrits, so daß ein Fe<sup>II</sup>-Häm-Nitrosyl-Intermediat (Fe<sup>II</sup>-NO<sup>+</sup>)<sup>[9]</sup> entsteht, das über eine interne Elektronenübertragung schnell zu NO und Fe<sup>III</sup>-Häm zerfällt. Modellkomplexe für die kupferhaltigen Nitrit-Reduktasen zeichneten sich jedoch bis vor kurzem nur durch ihre Nichtexistenz aus; man kannte keine strukturell charakterisierten Kupfer-Nitrit- oder -Stickstoffmonoxid-Komplexe. Ergebnisse erster Untersuchungen zum Wirkmechanismus einer Kupfer-Nitrit-Reduktase interpretierte man analog dem Wirkmechanismus der Häm-cd<sub>1</sub>-Enzyme mit einer Kupfer-Nitroso-Spezies (möglicherweise Cu<sup>I</sup>-NO<sup>+</sup>) als Zwischenstufe<sup>[10]</sup> (Abb. 3). Rückblickend betrachtet überzeugen die ursprünglich veröffentlichten Hinweise auf eine derartige Spezies nicht besonders, was vor allem darauf zurückzuführen ist, daß jegliche Modellkomplexe zum Vergleich fehlten.

Hinsichtlich der Modelle für Kupferenzyme hat sich die Situation in den letzten drei Jahren drastisch verbessert. Dies ist Karlin et al. und Tolman et al. zu verdanken, die ein<sup>[11]</sup> bzw. zweikernige Kupfer-NO-Komplexe<sup>[12]</sup> synthetisierten; Tolman et al. stellten darüber hinaus auch noch eine Reihe von Cu<sup>II</sup><sup>[13,14]</sup> und Cu<sup>I</sup>-Nitrit-Komplexen<sup>[15,16]</sup> her. Mit diesen strukturell charakterisierten Komplexen wurde die Basis für den Vergleich der entsprechenden Eigenschaften mit denen von geeigneten Formen der Enzyme geschaffen. Die Arbeiten von Tolman et al. sind besonders wichtig, weil sie die biologisch relevanten Liganden Hydrotris(pyrazolyl)borat und 1,4,7-Triazacyclononan (tacn) einsetzen. Diese dreizähligen Liganden bewirken eine Stickstoffkoordination, die stark an die von drei Imidazoleinheiten gebildete

\* B. A. Averill

E. C. Slater Instituut, Universiteit van Amsterdam  
Plantage Muidersgracht 12, NL-1018 TV Amsterdam (Niederlande)  
Telefax: Int. + 20/525-5124

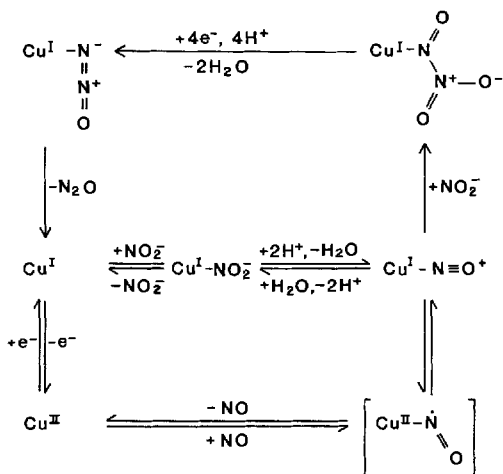


Abb. 3. Vorschlag für den Mechanismus der Reaktionen kupferhaltiger Nitrit-Reduktasen; oberer Teil: Reaktionsweg bei niedrigen  $\text{NO}$ -Konzentrationen; unterer Teil mögliche Reaktionen in Gegenwart von  $\text{NO}$ .

pseudotetraedrische Koordinationssphäre des aktiven Zentrums der Nitrit-Reduktase aus *Achromobacter cycloclastes* erinnert, die Adman et al. in einer eleganten Strukturuntersuchung ermittelten<sup>[17]</sup>. Als Ergebnis der synthetischen Arbeit stehen nun strukturell charakterisiert sowohl monomere  $\text{Cu}^{\text{II}}-\text{NO}_2^-$ - und  $\text{Cu}^{\text{I}}-\text{NO}_2^-$ - und dimere  $\text{Cu}^{\text{I}}-\text{Cu}^{\text{I}}$ - und  $\text{Cu}^{\text{I}}-\text{Cu}^{\text{II}}$ -Komplexe mit Brücken- $\text{NO}_2^-$ -Liganden zur Verfügung sowie auch  $\text{Cu}-\text{NO}$ -Komplexe<sup>[12]</sup>, deren Elektronenverteilung nicht ohne weiteres zu bestimmen ist. Besondere Bedeutung kommt dabei einem monomeren  $\text{Cu}^{\text{I}}-\text{NO}_2^-$ -Komplex<sup>[11]</sup>, in dem der Nitrit-Ligand über das N-Atom koordiniert vorliegt, und den  $\text{Cu}-\text{NO}$ -Komplexen<sup>[12]</sup> zu, weil sie die ersten Modellsysteme mit definierter Struktur für Enzym-Substrat- oder Enzym-Produkt-Komplexe der kupferhaltigen Nitrit-Reduktasen sind.

Mit diesen synthetischen Komplexen hat man nun – was vielleicht das Wichtigste ist – die ersten funktionellen Modelle für die Chemie der Kupfer-Nitrit-Reduktasen erstellt. Die Kupferenzyme haben die einzigartige Fähigkeit, Stickstoff aus Stickstoffmonoxid in Distickstoffdioxid zu überführen; ob diese Umwandlung nun die Reaktion von Stickstoffmonoxid mit Nitrit oder einem zweiten Molekül Stickstoffmonoxid (entstanden aus Nitrit) beinhaltet, bleibt unklar. Tolman et al. gelang es kürzlich in zwei eleganten Arbeiten bestimmte Reaktivitätsmuster der Kupferenzyme nachzuahmen. So reagiert der Komplex  $[(i\text{Pr}_3\text{tacn})\text{Cu}(\text{NO}_2)]$  mit einem über das N-Atom an das  $\text{Cu}^{\text{I}}$ -Zentrum koordinierten Nitrit-Liganden glatt mit zwei Äquivalenten Säure quantitativ zu  $\text{NO}$ <sup>[16]</sup>, möglicherweise über ein  $\text{Cu}^{\text{I}}-\text{NO}^+$ -Intermediat ähnlich dem ursprünglich für die Kupfer-Nitrit-Reduktasen vorgeschlagen<sup>[10]</sup>. Darüber hinaus reagieren  $\text{Cu}^{\text{I}}$ -Komplexe mit geeignet funktionalisierten Hydrotris(pyrazolyl)borat-Liganden mit  $\text{NO}$  in einer neuartigen Disproportionierungsreaktion<sup>[14]</sup> zu  $\text{N}_2\text{O}$  und den entsprechenden  $\text{Cu}^{\text{II}}-\text{NO}_2^-$ -Komplexen. Nach ersten kinetischen Untersuchungen ist die Reaktion eindeutig erster Ordnung bezüglich des  $\text{Cu}$ -Komplexes, was einen Reaktionsweg über ein dimeres Zwischenprodukt ausschließt. Als weitere Möglichkeiten bleiben unter anderen die Kopplung von  $\text{NO}$  in einem Dinitrosyl-Kupfer-Komplex und die direkte Kopplung von koordiniertem  $\text{NO}$  mit freiem  $\text{NO}$  zu koordiniertem  $\text{N}_2\text{O}_2$  als Zwi-

schlenprodukt (Abb.4). Da die Reaktion offensichtlich an einem Metallzentrum abläuft, ist sie von großer Bedeutung für enzymvermittelte Reaktionen, die mit ziemlicher Sicherheit an einem aktiven Zentrum geschehen, das nur ein Kupferatom enthält. Die zuvor diskutierten Reaktionen – dies sei nebenbei bemerkt – sind die ersten gut charakterisierten Modelle für die Disproportionierung von  $\text{NO}$  in heterogenen, von kupferhaltigen Systemen katalysierten Reaktionen.

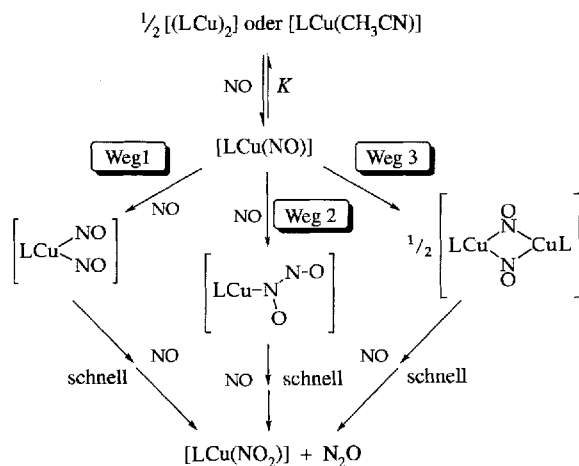


Abb. 4. Mögliche Mechanismen für die Kupfer-vermittelte Disproportionierung von  $\text{NO}$  [14]. L = substituiertes Tris(pyrazolyl)hydridoborat.

Noch vor nur drei Jahren gab es kein einziges wohlcharakterisiertes Kupfer-Nitrit- oder Kupfer-Stickstoffmonoxid-System; nun steht uns eine ganze Reihe strukturell charakterisierter Verbindungen zur Verfügung, deren Reaktionsmöglichkeiten wir auch in groben Zügen verstehen. Welchen Maßstab man auch immer anlegen will: Dies ist ein bemerkenswerter Fortschritt.

- [1] W. G. Zumft, *Arch. Microbiol.* **1993**, *160*, 253–264.
- [2] R. W. Ye, B. A. Averill, J. M. Tiedje, *Appl. Environ. Microbiol.* **1994**, *60*, 1053–1058.
- [3] P. M. H. Kroneck, J. Beuerle, W. Schumacher in *Metal Ions in Biological Systems*, Vol. 28 (Hrsg.: H. Sigel, A. Sigel), Dekker, New York, **1992**, S. 455–505.
- [4] L. I. Hochstein, G. A. Tomlinson, *Annu. Rev. Microbiol.* **1988**, *42*, 231–261.
- [5] E. Weeg-Aerssens, W. Wu, R. W. Ye, J. M. Tiedje, C. K. Chang, *J. Biol. Chem.* **1991**, *266*, 7496–7502.
- [6] E. Libby, B. A. Averill, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **1992**, *187*, 1529–1535.
- [7] M. A. Jackson, J. M. Tiedje, B. A. Averill, *FEBS Lett.* **1991**, *291*, 41–44.
- [8] J. A. Ibers, R. H. Holm, *Science* **1980**, *209*, 223–235; K. D. Karlin, *ibid.* **1993**, *261*, 701–708.
- [9] C.-H. Kim, T. C. Hollocher, *J. Biol. Chem.* **1984**, *259*, 2092–2099.
- [10] C. L. Hulce, J. M. Tiedje, B. A. Averill, *J. Am. Chem. Soc.* **1989**, *111*, 2322–2323.
- [11] P. P. Paul, K. D. Karlin, *J. Am. Chem. Soc.* **1991**, *113*, 6331–6332.
- [12] S. M. Carrier, C. E. Ruggiero, W. B. Tolman, G. B. Jameson, *J. Am. Chem. Soc.* **1992**, *114*, 4407–4408; C. E. Ruggiero, S. M. Carrier, W. E. Antholine, J. W. Whittaker, C. J. Kramer, W. B. Tolman, *ibid.* **1993**, *115*, 11285–11298; W. B. Tolman, S. M. Carrier, C. E. Ruggiero, W. E. Antholine, J. W. Whittaker in *Bioinorganic Chemistry of Copper* (Hrsg.: K. D. Karlin, Z. Tyeklár), Chapman & Hall, New York, **1993**, S. 406–418.
- [13] W. B. Tolman, *Inorg. Chem.* **1991**, *30*, 4878–4880.
- [14] C. E. Ruggiero, S. M. Carrier, W. B. Tolman, *Angew. Chem.* **1994**, *106*, 917–919; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1994**, *33*, 895–897.
- [15] J. A. Halfen, S. Mahapatra, M. M. Olmstead, W. B. Tolman, *J. Am. Chem. Soc.* **1994**, *116*, 2173–2174.
- [16] J. A. Halfen, W. B. Tolman, *J. Am. Chem. Soc.* **1994**, *116*, 5475–5476.
- [17] J. W. Godden, S. Turley, D. C. Teller, E. T. Adman, M. Y. Liu, W. J. Payne, J. LeGall, *Science* **1991**, *253*, 438–442.