

# Die Metallzentren der intakten nativen Cytochrom-c-Oxidase aus Rinderherz-Mitochondrien: EXAFS-spektroskopische Identifizierung und Charakterisierung eines neuartigen homodinuclearen Kupferzentrums ( $\text{Cu}_A$ ) sowie des heterodinuclearen $\text{Fe}_{a3}\text{-Cu}_B$ -Zentrums\*\*

Gerald Henkel\*, Arnd Müller, Stefan Weißgräber, Gerhard Buse, Tewfik Soulimane, Guy C. M. Steffens und Hans-Friedrich Nolting

Cytochrom-c-Oxidase [E.C. 1.9.3.1] katalysiert in der Atmungskette die Reduktion von molekularem Sauerstoff zu Wasser unter Umwandlung der Redoxenergie in ein elektrochemisches Protonenpotential an der Plasma- oder der Mitochondrienmembran. Wegen dieser wichtigen Funktion ist das Metalloenzym bereits Gegenstand zahlreicher Untersuchungen gewesen. Es ist ein Transmembranprotein, das aus 13 Untereinheiten besteht und neben zwei Häm-A-Gruppen ( $\text{Fe}_a$  und  $\text{Fe}_{a3}$ ) zwei Kupferzentren ( $\text{Cu}_A$  und  $\text{Cu}_B$ ) sowie ein Zink- und ein Magnesium-Ion enthält. Dabei ist das  $\text{Cu}_A$ -Zentrum der primäre Elektronenacceptor, während das zweikernige Zentrum  $\text{Fe}_{a3}\text{-Cu}_B$  die katalytische Reduktion des Sauerstoffs bewirkt<sup>[1]</sup>.

Nach den Ergebnissen der homologen Zuordnung vieler Untereinheit-II-Sequenzen und molekularbiologischen Untersuchungen an der exprimierten löslichen  $\text{Cu}_A$ -Domäne aus *Paracoccus denitrificans* kommen zwei Histidin-, zwei Cystein- und ein Methioninrest als mögliche Aminosäureliganden für das  $\text{Cu}_A$ -Zentrum in Frage<sup>[2, 3]</sup>. Über den genauen Kupfergehalt herrscht erst seit kurzer Zeit Klarheit. Während man bis vor wenigen Jahren der Auffassung war, daß das native Enzym zwei Kupfer-Ionen enthält, gelang Buse und Mitarbeitern kürzlich der Nachweis eines dritten, spezifisch gebundenen Kupfer-Ions<sup>[4]</sup>. Nach kurzer und zum Teil kontroverser Diskussion in der Literatur (vgl. z.B. <sup>[5]</sup>) wird die Existenz eines dritten Kupfer-Ions heute als gesichert angesehen<sup>[6]</sup>, das nach ESR-spektroskopischen Untersuchungen ein integraler Bestandteil des  $\text{Cu}_A$ -Zentrums ist<sup>[7, 12]</sup>. In einer aktuellen EXAFS-Untersuchung an der exprimierten löslichen  $\text{Cu}_A$ -Domäne aus der Untereinheit II der  $\text{caa}_3$ -Cytochrom-c-Oxidase aus *Bacillus subtilis* sowie an einem zweikernigen gemischvalenten Vergleichskomplex postulieren die Autoren ein zweikerniges Zentrum mit einer direkten Kupfer-Kupfer-Bindung ohne verbrückende Liganden<sup>[8, 9]</sup>.

Wir haben nun an intakten Enzympräparationen der Cytochrom-c-Oxidase aus Rinderherz-Mitochondrien, die nach präzisen Metallgehaltsanalysen (ICP-AES) drei Kupfer- und zwei Eisenatome sowie ein Zink- und ein Magnesiumatom enthalten, hochauflöste Röntgenabsorptionsspektren im Bereich der K-Kanten von Kupfer, Eisen und Zink gemessen und berichten hier über die Auswertung der EXAFS-Bereiche (EXAFS = Extended X-Ray Absorption Fine Structure) der Kupfer- und Eisenkanten. Die experimentell bestimmten EXAFS-Funktionen sind in Abbildung 1 wiedergegeben.

Nach den Ergebnissen der Kurvenanpassungsanalysen ist das  $\text{Cu}_A$ -Zentrum der intakten Cytochrom-c-Oxidase aus Rinderherz-Mitochondrien ein neuartiger homodinuclearer Komplex mit einem Kupfer-Kupfer-Abstand von 2.46 Å. Obwohl das Enzym bereits Gegenstand zahlreicher EXAFS-Untersuchungen war<sup>[10]</sup>, wurde über einen Rückstreubeitrag im Bereich zwischen 2.4 und 2.7 Å bisher nur im Zusammenhang mit einer Messung an einer membranorientierten Schichtung berichtet<sup>[10k]</sup>. Dieser Beitrag wurde auf eine Kupfer-Methionin-Wechselwirkung zurückgeführt, wobei damals noch ein einkerniges  $\text{Cu}_A$ -Zentrum favorisiert wurde.

Für die EXAFS-Auswertung wurde die Feinstruktur der Kupfer-Kante (Abb. 1 links) einer Fourier-Transformation (Fourier-Synthese) unterzogen und die transformierte Funktion anschließend in den Grenzen von 1.45 bis 4.35 Å rücktransformiert. In diesem Bereich tritt ein charakteristischer Kurvenzug auf, der mit einem geeigneten und eindeutigen Satz an Ligandenatomen unter Berücksichtigung von Mehrfachstreueffekten modelliert werden konnte (siehe Abb. 2c und 2d).

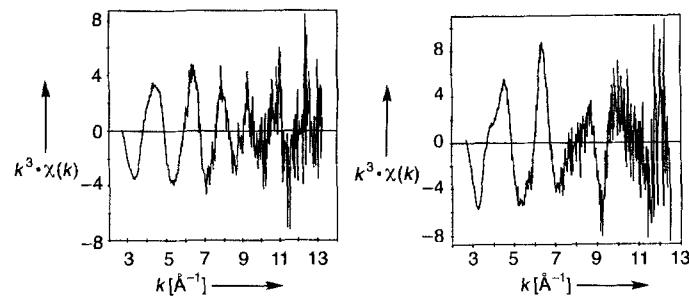


Abb. 1. Links: Experimentelles Kupfer-EXAFS ( $k^3$ -Wichtung); rechts: experimentelles Eisen-EXAFS ( $k^3$ -Wichtung).

Im ersten Schritt der Strukturverfeinerung auf der Basis der Fourier-gefilterten EXAFS-Funktion wurde die erste Koordinationssphäre mit einem Ligandensatz aus Stickstoff- und Schwefel-Donor-Atomen im Abstand von ca. 1.98 bzw. 2.30 Å modelliert. Die anschließende Auswertung der Fourier-Synthese zeigte einen nicht berücksichtigten signifikanten Rückstreubeitrag im Bereich der rechten Flanke des Hauptmaximums bei ca. 2.5 Å. Die Rückstreubeiträge bei ca. 3 und 4 Å (siehe Abb. 2) wurden von diesem Modell ebenfalls nicht erfaßt. Sie sind eine charakteristische Eigenschaft von Komplexen mit koordinierenden Imidazol-Fünfringen, wobei das Maximum bei ca. 3 Å dem Rückstreubeitrag der  $\alpha$ -Kohlenstoffatome und das Maximum bei ca. 4 Å der Summe der Beiträge der  $\beta$ -ständigen Ringatome (Kohlenstoff- und Stickstoffatome) sowie Mehrfachstreueffekten im Fünfring entspricht<sup>[11]</sup>. Die Einführung von insgesamt drei koordinierenden Histidinresten in das Strukturmodell führte zu einer deutlich verbesserten Anpassung. Das Defizit in der rechten Flanke des Hauptmaximums bei 2.5 Å wird dadurch jedoch nur wenig beeinflußt (Abb. 2a und 2b). Die Modellierung dieses Beitrags gelingt am besten mit der Phasen- und Amplitudenfunktion eines Streuers aus der Reihe der elektronenreichen 3d-Metalle. Da der Metall-Metall-Abstand im zweikernigen  $\text{Fe}_{a3}\text{-Cu}_B$ -Zentrum wegen der räumlichen Abschirmung des Eisens durch den Porphyrinrest nach unserer Abschätzung mindestens um 1 Å länger als 2.5 Å sein muß, kommt hier nur Kupfer als Rückstreuatom in Frage. Ein weiteres überzeugendes Argument für diese Interpretation liefern die Besetzungszahlen, die eindeutig für insgesamt zwei Kupfer-Metall-Wechselwirkungen (Fit-Index 0.234) und damit gegen nur

\* Prof. Dr. G. Henkel, Dipl.-Chem. A. Müller, Dr. S. Weißgräber  
Fachgebiet Anorganische Chemie der Universität  
Lotharstraße 1, D-47048 Duisburg  
Telefax: Int. + 203/379-2110

Prof. Dr. G. Buse, Dr. T. Soulimane, Dr. G. C. M. Steffens  
Institut für Biochemie der Technischen Hochschule, Klinikum, Aachen  
Dr. H.-F. Nolting  
European Molecular Biology Laboratory  
Outstation Hamburg, c/o DESY

\*\* Diese Arbeit wurde von der Deutschen Forschungsgemeinschaft, dem Bundesministerium für Forschung und Technologie, der Europäischen Kommission und dem Fonds der Chemischen Industrie gefördert.

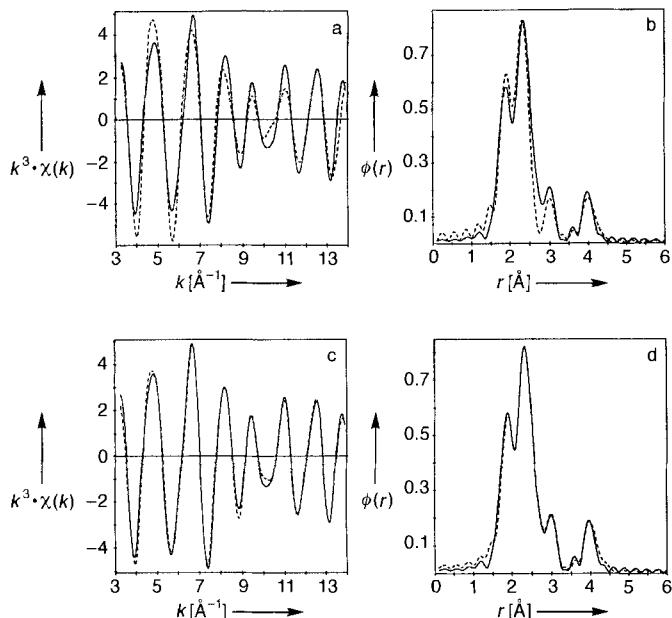


Abb. 2. a) Fourier-gefiltertes Kupfer-EXAFS (durchgezogene Linie) und theoretisch angepaßte Kurve (drei Histidinreste, vier N/O- und fünf S/Cl-Donorfunktionen, gestrichelte Linie) und b) zugehörige Fourier-Transformierte (durchgezogene Linie: Experiment; gestrichelte Linie: Modell); Fit-Index: 1.262; c) Fourier-gefiltertes Kupfer-EXAFS und theoretisch angepaßte Kurve wie in Abb. 2a, jedoch mit zusätzlichen Kupfer- und Eisen-Rückstreubeiträgen (vollständiges Modell, siehe Tabelle 1) und d) zugehörige Fourier-Transformierte; Fit-Index: 0.176.

eine Kupfer-Eisen-Wechselwirkung sprechen. Der genaue Kupfer-Kupfer-Abstand ergibt sich nach Verfeinerung des vollständigen Strukturmodells zu 2.46 Å.

Die versuchte Anpassung dieser Flanke mit einem weiteren Schwefelatom anstelle einer N-Donorfunktion führt zu einem negativen Debye-Waller-Faktor (Cu-S 2.60 Å,  $2\sigma^2 = -0.004 \text{ Å}^2$ ). Der physikalisch nicht sinnvolle Wert spricht in Verbindung mit dem etwas schlechteren Fit-Index von 0.255 für das Vorliegen eines elektronenreicherem Rückstreuers in Übereinstimmung mit unserer Interpretation als Kupferatom. Wir können die Existenz einer eventuell noch zusätzlich vorhandenen, schwach gebundenen Methionin-S-Donorfunktion im Abstandsbereich von ca. 2.6 bis 3.1 Å allerdings nicht ganz ausschließen, da ihr Beitrag in dieser Konstellation vom Kupfer maskiert wäre.

Um einen noch unberücksichtigten Streubbeitrag unter dem Peak bei 4 Å zu erfassen, haben wir das Strukturmodell um ein Eisenatom im Abstand von ca. 3.9 Å vom Kupferatom ergänzt. Das vollständige Strukturmodell besteht aus einem Satz von leichten Streuern des O- und/oder N-Typs, einem Satz von Imidazoleinheiten der Histidinreste, einem Satz von Schwefelatomen der Cysteinreste sowie aus je einem Satz von Kupfer- und Eisenatomen im Nahordnungsbereich der angeregten Kupferatome. Etwaige Rückstreubeiträge von Chloroliganden werden dabei von der Schwefelligandenschale wegen der sehr ähnlichen Amplituden- und Phasenfunktionen der beiden Elemente mit erfasst (Abb. 2c und 2d).

In den abschließenden Cyclen der Strukturverfeinerung wurden die Besetzungszahlen der einzelnen Koordinationsschalen in integralen Einheiten unter Erhalt der Koordinationszahl vier verändert. Zu jedem gebildeten Satz an möglichen Besetzungszahlen wurden neben einem gemeinsamen Wert für  $E_0$  die Abstände der einzelnen Schalen vom angeregten Zentralatom bei starker Geometrie der Imidazolreste zusammen mit den mittleren Debye-Waller-Faktoren unter Berücksichtigung von Mehr-

Tabelle 1. Ergebnisse der Kurvenanpassungsanalyse für die Fourier-gefilterten EXAFS-Daten der Kupfer-K-Kante [a].

Schale	Besetzungszahl	Abstand [Å]	Debye-Waller-Faktor [Å <sup>2</sup> ]
N/O	1.33 (4/3)	2.03	0.013
N <sub>His</sub>	1.00 (3/3)	1.96	0.003
S/Cl	1.67 (5/3)	2.29	0.014
Cu	0.67 (2/3)	2.46	0.008
C <sub>His</sub>	1.00 (3/3)	2.94	0.003
	1.00 (3/3)	2.98	0.019
Fe	0.33 (1/3)	3.89	0.003
N <sub>His</sub>	1.00 (3/3)	4.11	0.015
C <sub>His</sub>	1.00 (3/3)	4.21	0.034

[a] Die Besetzungszahl ist normiert auf ein Kupferatom (Gesamtkoordinationszahl vier); die Atome der Histidinreste sind als starre Einheit verfeinert; geschätzter Fehler in den Abständen: 0.03 Å.

fachstreuereffekten verfeinert. Die Ergebnisse für den Satz mit dem besten Fit-Index sind in Tabelle 1 aufgeführt.

Bei der Interpretation der Ergebnisse muß beachtet werden, daß es sich bei dem Cu-EXAFS um eine Überlagerung der Effekte aller drei Kupferatome handelt. Im Mittel hat jedes Kupferatom vier direkt gebundene Liganden, insgesamt werden fünf Kupfer-Schwefel(Chlor)-kontakte beobachtet.

Wir beginnen mit der Zuordnung dieser Liganden zu den Kupferatomen des homodinuclearen Cu<sub>A</sub>-Zentrums. Nach Sequenzvergleichen<sup>[2]</sup> und den Untersuchungen von Lappalainen und Saraste<sup>[3]</sup> stehen hier zwei Cysteinreste und zwei Histidinreste zur Koordination zur Verfügung. Der konservierte Methioninrest gehört vermutlich nicht zur engeren Koordinationsphäre des Kupfers<sup>[3]</sup>. Wegen der insgesamt fünf in dieser Studie nachgewiesenen Cu-S(Cl)-Bindungen des Enzyms müssen die Cysteinreste im Cu<sub>A</sub>-Zentrum Brückenliganden sein, da die Koordinationsphäre von Cu<sub>B</sub> im Einklang mit seinen Redoxeigenschaften als Hochpotentialzentrum ( $E_{1/2}$  ca. 0.34 V) von N- und/oder O-Donorliganden dominiert wird. Da es sich beim Cu<sub>A</sub>-Zentrum um den primären Elektronenacceptor handelt, der zunächst ein Elektron aufnimmt und danach weitergibt, könnte das native Enzym gemischvalente Cu<sup>1.5+</sup>-Zentren enthalten. Diese Annahme wurde kürzlich durch vergleichende ESR-spektroskopische Untersuchungen an der N<sub>2</sub>O-Reduktase und der Cytochrom-c-Oxidase bewiesen<sup>[12]</sup>, so daß von einer tetraedrischen Koordination der beiden Kupferatome auszugehen ist.

Angesichts des überraschend kurzen Cu · · · Cu-Abstands im zweikernigen Cu<sub>A</sub>-Zentrum stellt sich nun die Frage nach einem plausiblen Strukturvorschlag für das vollständige homodinucleare Zentrum. Tatsächlich sind synthetische, zweikernige Kupferverbindungen mit gemischter, tetraedrischer Schwefel-Stickstoff-Ligandensphäre und einer vergleichbar kurzen Kupfer-Kupfer-Abstand noch unbekannt<sup>[9]</sup>. Nach unserer Kenntnis gibt es bisher nur einen einzigen zweikernigen Komplex eines 3d-Metalls mit tetraedrischer Koordination und Alkanthiolatobrücke, bei dem der Metall-Metall-Abstand kürzer als 2.5 Å ist. Dabei handelt es sich um [Co<sub>2</sub>(SC<sub>3</sub>H<sub>7</sub>)<sub>6</sub>]<sup>+</sup>, in dem zwei MS<sub>4</sub>-Tetraeder über eine gemeinsame Fläche miteinander verknüpft sind<sup>[13]</sup>. Da die Metall-Metall-Abstände in vergleichbaren Komplexen mit kantenverknüpften Koordinationstetraedern invariant länger sind<sup>[14]</sup>, schlagen wir als Modell für das homodinucleare Cu<sub>A</sub>-Zentrum der Cytochrom-c-Oxidase eine Struktur einheit vor, die neben den beiden Cysteinbrücken noch eine weitere Brückenfunktion enthält. Diese dritte Brücke könnte ein Sauerstoffatom eines Wassermoleküls oder eines Asparaginsäurerestes sein, der in der Peptidsequenz invariant an geeigneter

Stelle vorkommt. Die tetraedrische Koordination der Kupferatome wird durch zwei terminal gebundene Histidinreste vervollständigt. Dieses Strukturmodell zeigt Abbildung 3. Der kurze Cu $\cdots$ Cu-Abstand schließt eine direkte Metall-Metall-Bindung natürlich nicht aus. Magnetische Untersuchungen an  $[\text{Co}_2(\text{SC}_3\text{H}_7)_5]^-$  und an der Selen-substituierten Verbindung  $[\text{Co}_2(\text{SeC}_3\text{H}_7)_5]^-$  deuten jedoch darauf hin, daß bei diesem Kondensationsprinzip keine Metall-Metall-Bindungen, sondern Kopplungen der ungepaarten Elektronen über Superaustauschmechanismen vorliegen<sup>[15]</sup>.

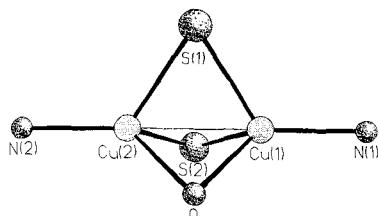


Abb. 3. Modell für das homodinucleare Cu<sub>A</sub>-Zentrum der Cytochrom-c-Oxidase aus Rinderherz-Mitochondrien (Kugel-Stab-Modell).

Für die Koordination des Kupfers im Cu<sub>B</sub>-Zentrum stehen damit noch ein Histidinrest, eine Schwefel- oder Chlor- sowie zwei Stickstoff- und/oder Sauerstoff-Donorfunktionen zur Verfügung. Dabei können wir nicht ausschließen, daß eine der Stickstoff- oder Sauerstoff-Donoren zu einem weiteren Histidinrest gehört. In diesem Detail ist die Auswertung nicht ganz eindeutig, da für die alternativen Strukturmodelle sehr ähnliche Fit-Indices resultieren. Wir halten das Modell mit insgesamt drei Imidazolresten deshalb für angemessener, weil die Debye-Waller-Faktoren der  $\beta$ -ständigen Ringatome größtenteils mäßig besser mit denen der  $\alpha$ -Kohlenstoffatome in Einklang sind.

Der Kupfer-Eisen-Abstand ergibt sich aus dem Cu-EXAFS zu 3.89 Å. Er entspricht damit dem Erwartungswert für ein tetraedrisch koordiniertes Kupferzentrum, das über eine Ligandenbrücke mit einer Hämgruppe verknüpft ist. Die Brücke ist mit hoher Wahrscheinlichkeit eine Schwefel- oder Chlor-Donorfunktion, denn auch bei der Auswertung der Feinstruktur der Eisen-Kante kann ein entsprechender Eisen-Schwefel- bzw. Eisen-Chlor-Kontakt nachgewiesen werden.

Über den Kupfer-Eisen-Abstand im Fe<sub>a3</sub>-Cu<sub>B</sub>-Zentrum der Cytochrom-c-Oxidase finden sich in der Literatur widersprüchliche Angaben, die auf unterschiedlichen Auswertungen der Feinstruktur der Kupfer-Kante basieren. So wird von Powers et al.<sup>[10a]</sup> ein Wert von 3.8 Å angegeben, während der von Scott et al.<sup>[10b]</sup> bestimmte Abstand mit 3.0 Å bedeutend kürzer ist. Ein ähnlich kurzer Abstand wurde auch von George et al.<sup>[10c]</sup> beschrieben. Die Literaturangaben sind jedoch sehr unsicher, da bei der Auswertung der EXAFS-Spektren die Streubeträge der nicht gebundenen ringständigen Atome der Imidazoleinheiten einschließlich der Mehrfachstreueffekte unberücksichtigt blieben. In einer neuen EXAFS-Untersuchung einer aa<sub>3</sub>-Chinol-Oxidase aus *Bacillus subtilis*, die ein Fe<sub>a3</sub>-Cu<sub>B</sub>-Zentrum, aber kein Cu<sub>A</sub>-Zentrum enthält, wurde ein Eisen-Kupfer-Abstand von 3.7 Å gefunden<sup>[16]</sup>.

Für die Fe-EXAFS-Analyse wurde wie im Falle des Kupfer-Spektrums eine Fourier-gefilterte Funktion (Abb. 4 links) verwendet, die alle Streubeträge im Abstandsbereich zwischen 1.50 und 4.65 Å (Abb. 4 rechts) erfaßt. Die erste Koordinationsphäre wird von einem Ligandensatz aus Stickstoff- und Schwefel-Donoratomen sehr gut modelliert. Die Rückstreubeiträge mit

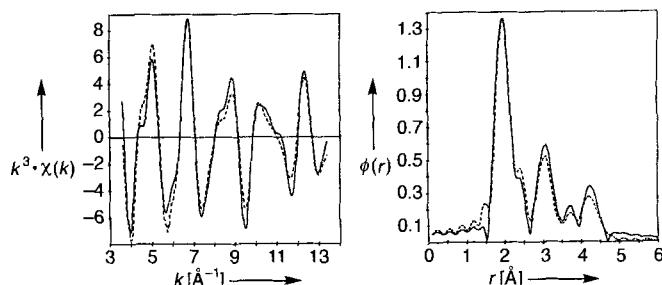


Abb. 4. Links: Fourier-gefiltertes Eisen-EXAFS (durchgezogene Linie) und theoretisch angepaßte Kurve (vollständiges Modell, gestrichelte Linie); rechts: zugehörige Fourier-Transformierte.

Maxima bei ca. 3 und 4.2 Å (Abb. 4 rechts) werden im wesentlichen von den nicht gebundenen ringständigen Atomen der koordinierten Tetrapyrrol- und Imidazoleinheiten hervorgerufen. Diesen Beiträgen wurde unter Berücksichtigung von Mehrfachstreueffekten im weiteren Verlauf der Kurvenanpassungsanalyse Rechnung getragen. Der Beitrag eines Kupferatoms zur Feinstruktur der Eisen-Kante macht sich durch eine destruktive Interferenz bei ca. 3.9 Å bemerkbar. Das vollständige Strukturmodell umfaßt einen Satz von Imidazolringen der Histidinreste, einen Satz von Tetrapyrroleinheiten, einen Satz verbrückender Methin-C-Atome, einen Satz von Schwefel- oder Chloratomen sowie einen Satz von Kupferatomen im Nahordnungsbereich des angeregten Eisenatoms.

In den abschließenden Cyclen der Strukturverfeinerung wurden die Besetzungszahlen der einzelnen Koordinationschalen in integralen Einheiten unter Erhalt der Koordinationszahl sechs verändert. Zu jedem gebildeten Satz an möglichen Besetzungszahlen wurden neben einem gemeinsamen Wert für  $E_0$  die Abstände der einzelnen Schalen vom angeregten Zentralatom bei starrer Geometrie der Imidazol- und der Tetrapyrroleinheiten zusammen mit den mittleren Debye-Waller-Faktoren unter Berücksichtigung von Mehrfachstreueffekten für die Imidazol- und Tetrapyrrolringe verfeinert. Die Ergebnisse der Anpassung für den Satz mit dem besten Fit-Index sind in Tabelle 2 aufgeführt. Der aus der Feinstruktur oberhalb der Eisen-Kante hergeleitete Eisen-Kupfer-Abstand des Fe<sub>a3</sub>-Cu<sub>B</sub>-Zentrums ist mit 4.04 Å etwas länger als der aus dem Kupfer-Spektrum abgeleitete Abstand. Wir führen diese Streuung auf Unschärfen bei der Modellierung der Fünfringe und der Mehrfachstreueffekte in-

Tabelle 2. Ergebnisse der Kurvenanpassungsanalyse für die Fourier-gefilterten EXAFS-Daten der Eisen-Kante [a].

Schale	Besetzungszahl	Abstand [Å]	Debye-Waller-Faktor [Å <sup>2</sup> ]
N <sub>His</sub>	1.50 (3/2)	1.99	0.002
N <sub>por</sub>	4.00 (8/2)	2.03	0.009
S/Cl	0.50 (1/2)	2.32	0.002
C <sub>His</sub>	1.50 (3/2)	2.94	0.005
	1.50 (3/2)	3.06	0.005
C <sub>por</sub>	4.00 (8/2)	3.04	0.004
	4.00 (8/2)	3.09	0.028
C <sub>por</sub>	4.00 (8/2)	3.36	0.023
Cu	0.50 (1/2)	4.04	0.006
N <sub>His</sub>	1.50 (3/2)	4.10	0.014
C <sub>His</sub>	1.50 (3/2)	4.19	0.014
N <sub>por</sub>	4.00 (8/2)	4.29	0.042
N <sub>por</sub>	4.00 (8/2)	4.27	0.022

[a] Die Besetzungszahl ist normiert auf ein Eisenatom (Gesamtkoordinationszahl sechs); die Atome der Histidin- und der Porphyrinreste sind als starre Einheit verfeinert; geschätzter Fehler in den Abständen: 0.03 Å.

innerhalb der Ligandengerüste zurück, die sich aus der Verwendung mittlerer Geometrien für die Fünfringe der Imidazolreste und der Tetrapyrrolreste ergeben. Hier sind wir an die Grenzen der Methode gestoßen, die aufzeigen, daß der ermittelte Eisen-Kupfer-Abstand mit einem relativ hohen Fehler behaftet ist. Der Rückstrebearbeit bei 2.31 Å ist auf eine Schwefel- oder Chlor-Donorfunktion zurückzuführen, die als Brücke zwischen dem Zentrum  $\text{Cu}_B$  und dem Zentrum  $\text{Fe}_{a3}$  formuliert werden muß. Weitergehende Aussagen, beispielsweise zur Entfernung zwischen den Metallzentren in unterschiedlichen Untereinheiten des Enzyms, sind wegen der limitierten Reichweite der Methode, die in Biomolekülen in aller Regel bei ca. 4 bis 5 Å endet, nicht möglich.

Während sich diese Arbeit im letzten Stadium der Auswertung befunden hat<sup>[17]</sup>, wurden die Ergebnisse einer EXAFS-Untersuchung an der exprimierten löslichen  $\text{Cu}_A$ -Domäne aus der Untereinheit II der  $\text{caa}_3$ -Cytochrom-c-Oxidase aus *Bacillus subtilis* veröffentlicht<sup>[8]</sup>. Sie bestätigen die Ergebnisse dieser Arbeit in bezug auf den Abstand der Kupferatome innerhalb der homodinuclearen Einheit. Daneben gibt es aber signifikante Unterschiede, und zwar insbesondere was die Gesamtzahl der Schwefel-Kupfer-Kontakte anbelangt. Während die Interpretation der EXAFS-Daten der intakten Cytochrom-c-Oxidase aus Rinderherz-Mitochondrien die Annahme von zwei Cysteinbrücken verlangt, wurde die Zahl der Kupfer-Schwefel-Bindungen in der löslichen  $\text{Cu}_A$ -Domäne der bakteriellen Cytochrom-c-Oxidase mit nur zwei bestimmt<sup>[8]</sup>. Weiterhin fällt auf, daß die charakteristischen Imidazol-Streubearbeitungen im Cu-EXAFS der intakten vollständigen Cytochrom-c-Oxidase im Spektrum der löslichen  $\text{Cu}_A$ -Domäne fast vollständig fehlen. Nun ist es aber eher unwahrscheinlich, daß sich die  $\text{Cu}_A$ -Zentren der bakteriellen Cytochrom-c-Oxidasen charakteristisch von den  $\text{Cu}_A$ -Zentren der Säugetier-Oxidasen unterscheiden. Wir halten deshalb Unterschiede der gentechnisch rekonstruierten Domäne gegenüber dem nativen Enzym eher für möglich. Das von Blackburn et al.<sup>[8]</sup> vorgeschlagene Strukturmodell, das auf Messungen an Proben mit überschüssigen Kupfergehalten basiert und eine Kupfer-Kupfer-Bindung ohne verbrückende Liganden postuliert, bezieht sich nun auf diese gentechnisch rekonstruierte Domäne und kann daher nicht ohne weiteres auf das  $\text{Cu}_A$ -Zentrum der intakten Cytochrom-c-Oxidase aus Rinderherz-Mitochondrien übertragen werden.

Die aus unseren EXAFS-Experimenten abgeleiteten Strukturmodelle für das homodinucleare  $\text{Cu}_A$ -Zentrum sowie für das heterodinucleare  $\text{Fe}_{a3}$ - $\text{Cu}_B$ -Zentrum sind schematisch in Abbildung 5 wiedergegeben. Da das Enzym in der von uns untersuchten Form ohne eine Aktivierungsphase mit Sauerstoff reagiert, sollten die Metallatome des  $\text{Fe}_{a3}$ - $\text{Cu}_B$ -Zentrums bereits in der katalytisch relevanten Anordnung sein. Unser Vorschlag für die Bindung des  $\text{O}_2$ -Moleküls, das auf dieser Annahme beruht, ist in Abbildung 5c dargestellt. In diesem Modell ist das  $\text{O}_2$ -Molekül in einer *cis*- $\mu$ -1,2-Anordnung an das Eisen- und Kupferatom gebunden.

## Experimentelles

Die Cytochrom-c-Oxidase wurde aus Rinderherz-Mitochondrien wie beschrieben isoliert und im letzten Schritt über Q-Sepharose FF (Pharmacia) in 0.1% Triton TX-100, 10 mM Tris/HCl (pH 7.6) gereinigt [18]. Das Enzym liegt monodispers dimer vor und reagiert schnell und monophasisch mit Cyanid; die maximale Aktivität entspricht der Aktivität *in situ*, d. h. der in seiner membranösen Umgebung. Die proteinchemische Reinheit wurde durch SDS-Polyacrylamidelektrophorese, bestimmt der N-terminalen Aminosäuren, bestimmt wurde durch ICP-AES bestimmt

roskopie verwendete Enzymlösung wurde (Amicon) auf 800  $\mu\text{M}$  aufkonzentriert. Die

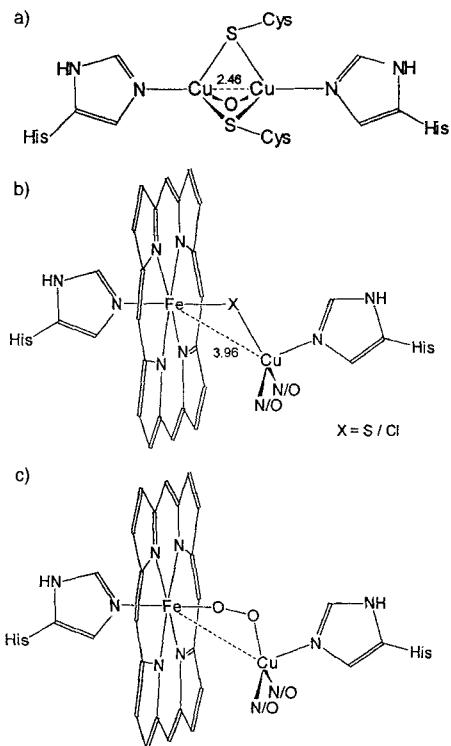


Abb. 5. Modelle für die Metallzentren der Cytochrom-c-Oxidase in schematischer Darstellung: das homodinucleare Zentrum  $\text{Cu}_A$  (a), das heterodinucleare Zentrum  $\text{Fe}_{a3}$ - $\text{Cu}_B$  (b) und der daraus abgeleitete Vorschlag für die Bindung des  $\text{O}_2$ -Moleküls (c).

Proben wurden in Polystyrolküvetten mit Kapton-Fenstern (Schichtdicke der Probe 1 mm, Volumen 150  $\mu\text{L}$ ) gefüllt, im Kältebad aus Ethanol/Trockeneis (195 K) schockgefroren und dann auf 77 K abgekühlt. Während der Messungen wurden die Proben mit einem Helium-Kryostat auf 20 K gekühlt.

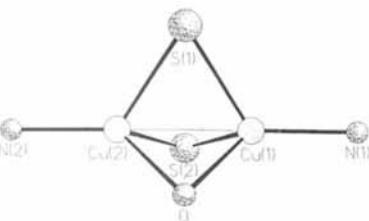
Die Röntgenabsorptionspektren im Bereich der Eisen-, Kupfer- und Zink-K-Kanten wurden mit dem EXAFS-Spektrometer des European Molecular Biology Laboratory (EMBL) im Hamburger Synchrotronstrahlungslabor (HASYLAB) am Deutschen Elektronen-Synchrotron (DESY, Hamburg) unter Verwendung der Synchrotronstrahlung des Speicherrings DORIS II (4.5 GeV; mittlerer Strahlstrom 50 mA) aufgenommen [19]. Das optische System des EXAFS-Spektrometers besteht aus einem Si(111)-Doppelkristall-Monochromator und einem fokussierenden Toroidspiegel. Zur absoluten Kalibrierung der Energieachse werden gleichzeitig mit dem Spektrum die Bragg-Reflexe eines geeignet montierten Siliziumkristalls gemessen [20].

Die Spektren wurden durch Messung der Fluoreszenzstrahlung mit einem 13-Element-Festkörperdetektor (Canberra) in einem Bereich von 6915 bis 7780 eV (Fe) bzw. 8725 bis 9710 eV (Cu) mit einer Meßzeit von 1–2 s pro Punkt bei ca. 1400 Meßpunkten aufgenommen. Dabei wurde über 34 (Eisen-Kante) bzw. 23 (Kupfer-Kante) Einzelscans nach individueller Energiekalibrierung gemittelt. Die EXAFS-Funktionen wurden aus diesen Spektren nach Lit. [21] isoliert, wobei die Grundbestimmung mit einer Spline-Funktion erfolgte. Zur Auswertung der Daten wurden die Programm pakete EXPROG (Energiekalibrierung und Datenreduktion) [22] und EXCURV88 (Kurvenanpassungsanalysen unter Verwendung theoretischer Amplituden- und Phasenfunktionen) [23] verwendet.

Eingegangen am 23. Februar 1995 [Z 7732]

**Stichworte:** Cytochrom-c-Oxidase · Metalloenzyme · Röntgenabsorptionspektroskopie

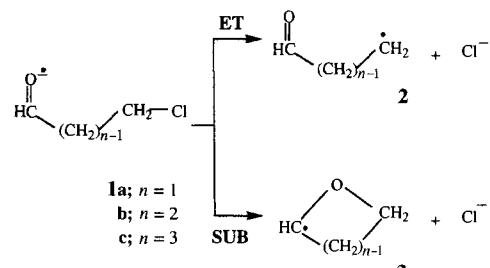
- [1] B. C. Hill, *J. Biol. Chem.* **1994**, 269, 2419.
- [2] G. C. M. Steffens, T. Soulimane, G. Wolff, G. Buse, *Eur. J. Biochem.* **1993**, 213, 1149.
- [3] P. Lappalainen, M. Saraste, *Biochim. Biophys. Acta* **1994**, 1187, 222.
- [4] G. C. M. Steffens, R. Biewald, G. Buse, *Eur. J. Biochem.* **1987**, 164, 295.
- [5] a) B. G. Malmström, R. Aasa, *FEBS Lett.* **1993**, 325, 49, zit. Lit.; b) R. J. Gurbel, Y.-C. Fann, K. K. Surerus, M. M. Werst, S. M. Musser, P. E. Doan, S. I. Chan, J. A. Fee, B. M. Hoffman, *J. Am. Chem. Soc.* **1993**, 115, 10888.
- [6] M. Kelly, P. Lappalainen, G. Talbo, T. Haltia, J. van der Oost, M. Saraste, *J. Biol. Chem.* **1993**, 268, 16781.



- [7] P. M. H. Kroneck, W. E. Antholine, D. H. W. Kastrau, G. Buse, G. C. M. Steffens, W. G. Zumft, *FEBS Lett.* **1990**, *268*, 274.
- [8] N. J. Blackburn, M. E. Barr, W. H. Woodruff, J. van der Oost, S. de Vries, *Biochemistry* **1994**, *22*, 10401.
- [9] H. Bertagnolli, W. Kaim, *Angew. Chem.* **1995**, *107*, 847; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1995**, *34*, 771.
- [10] a) L. Powers, W. Blumberg, B. Chance, C. Barlow, J. S. Leigh, J. Smith, T. Yonetani, S. Vik, J. Peisach, *Biochim. Biophys. Acta* **1979**, *546*, 520; b) R. A. Scott, S. P. Cramer, R. W. Shaw, H. Beinert, H. B. Gray, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1981**, *78*, 664; c) L. Powers, B. Chance, Y. Ching, P. Angiolillo, *Biophys. J.* **1981**, *34*, 465; d) A. Naqui, C. Kumar, Y.-C. Ching, L. Powers, B. Chance, *Biochemistry* **1984**, *23*, 6222; e) L. Powers, B. Chance, *J. Inorg. Biochem.* **1985**, *23*, 207; f) R. A. Scott, J. R. Schwartz, S. P. Cramer, *Biochemistry* **1986**, *25*, 5546; g) P. M. Li, J. Gelles, S. I. Chan, R. J. Sullivan, R. A. Scott, *ibid.* **1987**, *26*, 2091; h) L. Powers, B. Chance, Y.-C. Ching, C.-P. Lee, *J. Biol. Chem.* **1987**, *262*, 3160; i) C. Kumar, A. Naqui, L. Powers, Y.-C. Ching, B. Chance, *ibid.* **1988**, *263*, 7159; j) R. A. Scott, *Annu. Rev. Biophys. Biophys. Chem.* **1989**, *18*, 137; k) G. N. George, S. P. Cramer, T. G. Frey, R. C. Prince, *Biochim. Biophys. Acta* **1993**, *1142*, 240.
- [11] a) R. W. Strange, S. S. Hasnain, N. J. Blackburn, P. F. Knowles, *J. Phys. C Solid State Phys.* **1986**, *8*, 593; b) N. Binsted, R. W. Strange, S. S. Hasnain, *Biochemistry* **1992**, *31*, 12117.
- [12] W. E. Antholine, D. H. W. Kastrau, G. C. M. Steffens, G. Buse, W. Zumft, P. M. H. Kroneck, *Eur. J. Biochem.* **1992**, *209*, 875.
- [13] G. Henkel, S. Weißgräber, *Angew. Chem.* **1992**, *104*, 1382; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1992**, *31*, 1368.
- [14] G. Henkel, C. Chen, *Inorg. Chem.* **1993**, *32*, 1064.
- [15] G. Henkel, S. Weißgräber, unveröffentlicht.
- [16] L. Powers, M. Lauraeus, K. S. Reddy, B. Chance, M. Wikström, *Biochim. Biophys. Acta* **1994**, *1183*, 504.
- [17] S. Weißgräber, A. Müller, G. Henkel, G. C. M. Steffens, G. Buse, H.-F. Nolting, C. Hermes, *Jahresbericht HASYLAB*, Hamburg, **1992**, S. 493.
- [18] T. Soulimane, G. Buse, *Eur. J. Biochem.* **1995**, *227*, 588.
- [19] C. Hermes, E. Gilberg, M. H. J. Koch, *Nucl. Instrum. Methods Phys. Res. Sect. A* **1984**, *222*, 207.
- [20] R. F. Pettifer, C. Hermes, *J. Appl. Crystallogr.* **1985**, *18*, 404.
- [21] B. K. Teo, *EXAFS: Basic Principles and Data Analysis*, Springer, Berlin, **1986**.
- [22] H.-F. Nolting, C. Hermes, *EXPROG: EMBL EXAFS data analysis and evaluation Program Package*, **1992**.
- [23] N. Binsted, S. J. Gurman, J. W. Campbell, *SERC Daresbury Laboratory EXCURV88 Program*, **1986**.

stände und somit deren stereo- und regiospezifische Anforderungen. Während die Orbitalauswahlregeln nach der VBCM-Analyse<sup>[2]</sup> im Falle einer Radikal-anion-Carbonylgruppe und einer Kohlenstoff-Halogen(C-X)-Gruppe als reaktiven Fragmenten eine Struktur für den ET-TS diktieren, in der die Überlappung zwischen dem einfach besetzten  $\pi^*$ -Orbital des Radikal-anions und dem  $\sigma^*$ -Orbital der C-X-Gruppe optimiert wird, erfordert der TS für den polaren (Substitutions-)Mechanismus hingegen eine optimale Überlappung zwischen dem doppelt besetzten Molekül orbital des freien Elektronenpaares am Sauerstoff des Radikal-anions mit dem  $\sigma^*$ -Orbital der C-X-Gruppe. Die reaktionsspezifischen Orbitalwechselwirkungen liefern eine differenzierte ET-TS-Theorie für die Zweiteilung ET-polare Mechanismen in der Chemie von Radikal-ionen. Die Rolle von Orbitalauswahlregeln in intermolekularen ET- und Substitutions(SUB)-Reaktionen wurde in einer vor kurzem veröffentlichten ab-initio-Studie anhand eines einfachen Modellsystems, dem Formaldehyd-Radikal-anion und Methylchlorid<sup>[4]</sup>, diskutiert. In Übereinstimmung mit den Auswahlregeln wurden Übergangszustände mit stark bindenden Wechselwirkungen mit spezifischer Regio- und Orientierungsselektivität für die ET- und SUB-Reaktionen gefunden.

Zu einer strukturell soliden Basis der Zweiteilung ET-polare Mechanismen gehört noch der eindeutige Nachweis, daß die Orbitalauswahlregeln tatsächlich auf solche Systeme oder deren Modelle anwendbar sind, welche eine Zweiteilung ET-polärer Mechanismen zeigen, vor allem dann, wenn die Auswahlregeln sehr strenge Anforderungen an den ET-TS stellen. Die kürzlich veröffentlichten eleganten Studien von Kimura et al.<sup>[5, 6]</sup> treten diesen Beweis an, indem sie zeigten, daß bei  $\omega$ -Halogenalkyl-(phenyl)keton-Radikal-anionen ET- und SUB-Reaktionen miteinander konkurrieren und beeindruckende Trends aufweisen. So gehorcht zum Beispiel in beiden Fällen die Triebkraft für die Aktivierung dem gleichen Gesetz, und die relative Effizienz der Reaktion ändert sich periodisch mit der Kettenlänge. Wir stellen nun ab-initio-Studien vor, die an intramolekularen ET- und SUB-Reaktionen (Schema 1) von  $\omega$ -Chloralkanal-Radikal-



Schema 1.

anionen durchgeführt wurden, den ursprünglichen Modellverbindungen von Kimura et al. Die Rechenergebnisse liefern strukturelle und energetische Beweise für den beherrschenden Einfluß reaktionsspezifischer Orbitalauswahlregeln und für spezifische Bindungen, die sich im ET-TS bilden, sogar im Fall ungünstiger struktureller Einschränkungen in den Radikal-anionen.

Für die ab-initio-MO-Rechnungen auf Hartree-Fock-Niveau wurde der 6-31G\*-Split-valence-Basisatz und Standardmethoden für Geometrieoptimierungen und Charakterisierungen benutzt<sup>[7-9]</sup>. Dieses Niveau wurde nach dem Erproben von ET und SUB für den Prozeß mit **1b** auf den UHF- und UMP2-Niveaus mit 6-31G\*- und 6-31 + G\*-Basisätzen gewählt. Auf allen Niveaus ergaben die Rechnungen identische mechanistische Details sowie die gleichen Trends für die relativen Energien.

## Polare und Elektronentransferreaktionen cyclisierbarer Radikal-anionen: strukturelle Konsequenzen aus Orbitalauswahlregeln und Beschränkungen aufgrund der C-Kettenlänge\*\*

G. Narahari Sastry, A. Chandrasekhar Reddy und Sason Shaik\*

Gebunden oder nicht gebunden ist die fundamentale Frage, wenn es um den Übergangszustand (TS) einer Elektronentransferreaktion (ET) eines Elektrophil-Nucleophil-Paars geht, welche auch nach einem klassischen polaren (bindungsbildenden) Mechanismus ablaufen kann<sup>[1]</sup>. Die Valence-bond-configuration-mixing(VBCM)-Analyse sagt vorher, daß, wenn entweder das Nucleophil oder das Elektrophil ein Radikal-ion ist, sowohl beim ET- als auch beim polaren Reaktionsweg Übergangszustände mit stark bindenden Wechselwirkungen gebildet werden können, welche wiederum von reaktionsspezifischen Orbitalauswahlregeln diktiert werden<sup>[2, 3]</sup>. Diese Orbitalauswahlregeln bestimmen die Resonanzenergien der jeweiligen Übergangszu-

[\*] Prof. Dr. S. Shaik, G. N. Sastry, Dr. A. C. Reddy  
Department of Organic Chemistry and the Fritz Haber Centre of  
Molecular Dynamics  
The Hebrew University  
Jerusalem 91904 (Israel)  
Telefax: Int. + 2/6585-345

[\*\*] Diese Arbeit wurde von der Volkswagen-Stiftung gefördert.