

# Kupfer – ein „modernes“ Bioelement

Wolfgang Kaim\* und Jochen Rall

Kupfer ist ein bioessentielles Element, das in den beiden relevanten Oxidationsstufen I und II einzigartige chemische Eigenschaften aufweist. Biochemische, molekularbiologische und medizinische Erkenntnisse einerseits sowie die Synthese und Untersuchung niedermolekularer „Modell“-Komplexverbindungen andererseits haben in den letzten Jahren zu wesentlichen Fortschritten bei

der Erforschung der teilweise überraschenden Biochemie dieses Spurenelements geführt. Auffallend, jedoch aufgrund des chemischen und des vermuteten evolutionsgeschichtlichen Hintergrundes nachvollziehbar, sind die Funktionen von proteingebundenem Kupfer vor allem im Metabolismus von  $O_2$  und N/O-Verbindungen ( $NO_2^-$ ,  $N_2O$ ) sowie seine häufige Assoziation mit oxidieren-

den organischen und anorganischen Radikalen wie etwa Tyrosyl, Semichinonen, Superoxid-Ionen oder Nitrosyl-Radikalen.

**Stichworte:** Bioanorganische Chemie · Enzyme · Kupferproteine · Sauerstoff-metabolismus

## 1. Einleitung

Obwohl Kupfer bereits seit etwa 1925 als biologisch essentielles Element bekannt ist<sup>[1]</sup>, hat erst die in den letzten beiden Jahrzehnten im vollen Umfang erkannte biologische Bedeutung und Vielseitigkeit dieses Spurenelements zu einer rasanten Entwicklung seiner Bioanorganischen Chemie geführt<sup>[2, 3]</sup>. Ursache hierfür ist einerseits die Zunahme an Informationen aus Spurenanalytik<sup>[4]</sup>, Proteinkristallographie<sup>[5]</sup>, Spektroskopie<sup>[6]</sup> und Molekularbiologie<sup>[7, 8]</sup>, andererseits hat aber auch die Popularität der Bioanorganischen Chemie als einem neuen, überproportional rasch wachsenden Teilgebiet der Anorganischen Chemie<sup>[3]</sup> eine sehr fruchtbare Wechselbeziehung zwischen Komplexchemie (Synthese von Modellverbindungen) und Biochemie (Studium von Metalloproteinen) angeregt.

Ein besonders herausragendes Beispiel hierfür ist die Reinterpretation (end-on  $\rightarrow$  side-on<sup>[9]</sup>) der Koordination von  $O_2$  im sauerstofftransportierenden Kupferprotein Hämocyanin (Hc) der Hämolymphe, dem „Blut“ bestimmter Mollusken und Arthropoden<sup>[10]</sup>; dies erfolgte jedoch erst, *nachdem* ein entsprechender Modellkomplex gefunden und strukturell eindeutig identifiziert worden war (Abb. 1)<sup>[11]</sup>. Umgekehrt wurde erst *nach* Hinweisen<sup>[13]</sup> auf eine intermediäre Koordination von NO an Kupfer(I)-Zentren in Nitrit-Reduktase-Enzymen bakterieller Denitrifikanten<sup>[14, 15]</sup> ein erster entsprechender niedermolekularer Komplex gezielt synthetisiert und strukturell sowie elektronisch charakterisiert (Abb. 2)<sup>[16]</sup>.

In diesem Artikel soll eine selektive Übersicht mit dem Schwerpunkt auf chemisch *und* biologisch aussagekräftigen aktuellen Forschungsergebnissen zur Bioanorganischen Chemie des Kupfers gegeben werden. Die sicher auch subjektiv geprägte Auswahl enthält vor allem allgemein interessierende Aspekte sowie illustrative Beispiele der hier besonders fruchtbaren Wechselbeziehung zwischen biologischer, medizinisch-pharmakologischer und chemischer Forschung. Unter den chemischen Aspekten stehen dabei die einzigartigen Eigenschaften des Kupfer(I)-Ions und die auffallende Assoziation des evolutionsgeschichtlich eher „modernen“ Bioelements Kupfer (siehe Abschnitt 3) mit Sauerstoff und dessen Metaboliten sowie mit organischen Radikalen im Vordergrund.

## 2. Rückblick: Strukturpräferenzen und Reaktivitäten des Kupfers in seinen Oxidationsstufen

Als leichtestes Homologes der Gruppe 11 des Periodensystems ist Kupfer ein sehr spezielles Element: In der Nachbargruppe 12 treten nur zweiwertige Einzel-Ionen mit  $d^{10}$ -Konfiguration auf (die Oxidationsstufe III ist für Quecksilber nicht zuverlässig belegt<sup>[18a, b]</sup>). Die benachbarte Gruppe 10 ist ebenfalls durch Stabilität der Oxidationsstufe II, hier mit  $d^8$ -Konfiguration, ausgezeichnet. Die schwereren Homologen des Kupfers, Silber und Gold, haben in Komplexen überwiegend geradzählige d-Elektronenkonfigurationen und sehr niedrige Koordinationszahlen. Sie bevorzugen Liganden mit weichen Donorzentren und sind durch meist hohe, unphysiologische Redoxpotentiale gekennzeichnet; die Bioverfügbarkeit dieser beiden Elemente ist aufgrund der sehr geringen Häufigkeit in Erdkruste und Meerwasser extrem niedrig.

[\*] Prof. Dr. W. Kaim, Dipl.-Chem. J. Rall  
Institut für Anorganische Chemie der Universität  
Pfaffenwaldring 55, D-70550 Stuttgart  
Telefax: Int. +711/685-4241  
E-mail: kaim@anorg55.chemie.uni-stuttgart.de



Kupfer ist dadurch ausgezeichnet, daß die Potentiale der Übergänge  $\text{Cu}^{\text{II}}/\text{Cu}^{\text{I}}$  und  $\text{Cu}^{\text{I}}/\text{Cu}^0$  im Vergleich zu Redoxpotentialen anderer biologisch relevanter Redoxpaare nahe benachbart liegen können; insbesondere gegenüber Eisenproteinen mit dem Redoxpaar  $\text{Fe}^{\text{III}}/\text{Fe}^{\text{II}}$  und einer biologisch oft analogen Funktion<sup>[3a, 19]</sup> haben die  $\text{Cu}^{\text{II}}/\text{Cu}^{\text{I}}$ -Redoxpotentiale der Kupferproteine meistens positivere Werte.

Unter  $\text{Cu}^0$  ist hier metallisches Kupfer zu verstehen, welches heute weltweit schon zum erheblichen Teil „geo-biotechnologisch“ durch mikrobielle Laugung<sup>[20]</sup> gewonnen wird (Abb. 3).

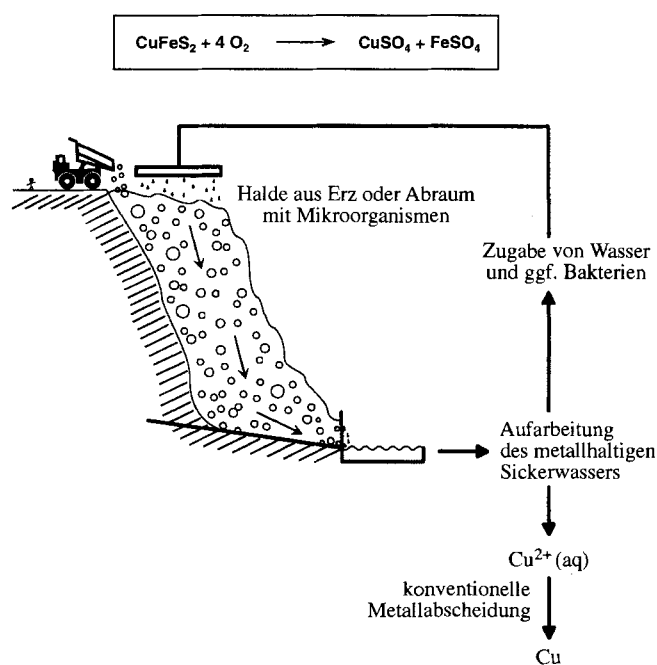
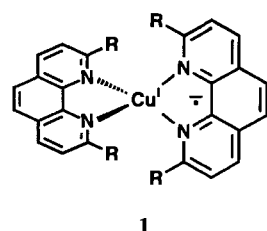


Abb. 3. Mehr als ein Viertel des auf der Welt gewonnenen Kupfers wird neueren Schätzungen zufolge nach einem mikrobiellen Laugungsverfahren (bacterial leaching, biomining), einem der mengen- und wertmäßig ( $> 10^9$  US \$) bedeutendsten biotechnologischen Prozesse, gewonnen [20]. Verwendung findet der säuretolerante Mikroorganismus *Thiobacillus ferrooxidans*, der unter Oxidation von Sulfid zu Sulfat und gleichzeitiger  $\text{CO}_2$ -Assimilation unlösliche sulfidische Erze in Lösung bringen und damit eine weniger aufwendige wie auch kostengünstigere Metallgewinnung, nicht nur von Kupfer, sondern auch von eingeschlossenem Gold oder anderen Metallen ermöglichen kann [20a].

Im Gegensatz dazu sind die häufig als „ $\text{Cu}^0$ -Verbindungen“ apostrophierten<sup>[21]</sup> Neutralkomplexe vom Typ des  $[\text{Cu}(\text{phen})_2]$  kürzlich anhand des Derivats **1** ( $\text{R} = \text{Phenyl}$ ) eindeutig als Kupfer(I)-Komplexe mit einem Radikalanion-Liganden identifiziert worden<sup>[22]</sup>.



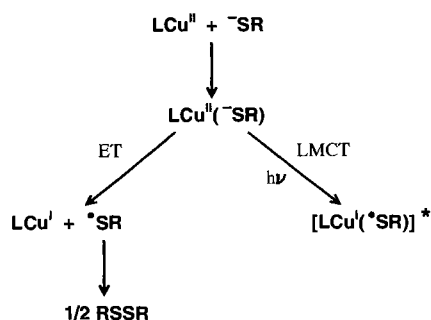
Auch die schon erwähnten Nitrosyl-Komplexe des Kupfers (Abb. 2) konnten EPR-spektroskopisch als  $\text{Cu}^{\text{I}}\text{-NO}^+$ -Systeme identifiziert werden, d.h. Beiträge von Formulierungen wie  $\text{Cu}^0\text{-NO}^+$  oder auch  $\text{Cu}^{\text{II}}\text{-NO}^-$  spielen für die Beschreibung der elektronischen Verhältnisse dieser Komplexe nur eine untergeordnete Rolle<sup>[16b]</sup>.

Organokupferverbindungen sind aufgrund der hohen Redoxpotentiale und der ausgeprägten Neigung zu Einelektronentransferprozessen nur wenig beständig<sup>[23]</sup> und spielen im Gegensatz zu metallorganischen Verbindungen des Nickels (Me-

thyl-F430-Komplex<sup>[24a]</sup>) und des Cobalts ( $\text{B}_{12}$ -Systeme<sup>[24b]</sup>) keine biologische Rolle. Die Gründe für dieses besondere komplexchemische Verhalten liegen im fast schon edlen Charakter des Metalls, in der mittelgroßen Stabilität der  $\text{Cu}^{\text{I}}\text{-d}^{10}$ -Konfiguration<sup>[25]</sup> und im vergleichsweise kleinen Radius des  $\text{Cu}^{2+}$ -Ions, der unter anderem für die hohe Hydratationsenergie und damit für die Stabilisierung von  $\text{Cu}^{2+}(\text{aq})$  gegenüber  $\text{Cu}^+(\text{aq})$  verantwortlich ist. Die oft, aber nicht immer (siehe Abschnitt 7) ionisch geprägte Wechselwirkung zwischen  $\text{Cu}^{\text{II}}$  und Liganden begünstigt die Stabilisierung dieser Oxidationsstufe durch eine ausgeprägte Jahn-Teller-Verzerrung in Richtung axialer Elongation des Oktaeders, was zu quadratisch-bipyramidalen, -pyramidalen oder -planaren Koordinationsgeometrien führt. Eine Abweichung hiervon, welche für einen raschen Oxidationsstufenwechsel  $\text{Cu}^{\text{II}}/\text{Cu}^{\text{I}}$  und damit für eine effiziente Elektronenübertragung notwendig ist, läßt sich nicht leicht erreichen; sie erfordert eine Erzwungung spezieller Strukturen (entastischer Zustand<sup>[26a, b]</sup>) durch molekular-„architektonisch“ aufwendige Maßnahmen in Proteinen (Typ-1-Kupferzentren in Blauen Kupferproteinen, siehe Abschnitt 7<sup>[26]</sup>) oder in Modellverbindungen mit speziell konstruierten Komplexliganden<sup>[27]</sup>.

Entgegen einer früher geäußerten<sup>[28]</sup> und teilweise durch Lehrbücher verbreiteten Ansicht<sup>[18c]</sup> (siehe Abschnitt 9.3.2) ist die Oxidationsstufe III wegen des generell sehr hohen Redoxpotentials von  $\text{Cu}^{\text{III}}/\text{Cu}^{\text{II}}$  biologisch nicht relevant. Statt dessen erfolgt eine Oxidation von Cofaktoren oder Proteinkomponenten, welche mit den Kupferzentren zusammenwirken können<sup>[29, 30]</sup>. Echte  $\text{Cu}^{\text{III}}$ -Verbindungen existieren in stabiler Form nur mit ausgesprochen starken Donor-Liganden wie  $\text{O}^{2-}$ ,  $\text{F}^-$  oder  $\text{R}_2\text{N}^-$ <sup>[31]</sup>; die  $d^8$ -Konfiguration begünstigt quadratisch-planare oder -pyramidale Anordnung. Erwähnt werden muß in diesem Zusammenhang die Schichtstruktur der obligatorisch Kupfer enthaltenden Hochtemperatur-Supraleiter, in denen zumeist gemischtvalente  $\text{Cu}^{\text{III}}/\text{Cu}^{\text{II}}$ -Metallzentren vorliegen<sup>[32]</sup>.

$\text{Cu}^{\text{II}}$ -Komplexe sind Lehrbuchbeispiele für den Jahn-Teller-Effekt. Die  $\text{Cu}^{\text{II}}$ -Ionen sind in diesen Komplexen nicht nur durch starke axiale Elongation der Oktaedergeometrie mit dem typischen Resultat einer quadratisch-pyramidalen Koordination gekennzeichnet, sie bevorzugen außerdem Liganden mit Stickstoffdonorzentren. Dies zeigt sich sowohl an der Komplexstabilität (Gleichgewichtsaspekt) wie auch an den oftmals inerten  $\text{N-Cu}^{\text{II}}$ -Bindungen, welche eine zusätzliche Fixierung in biologischen Systemen, etwa durch Tetrapyrrol-Makrocyclen, unnötig machen. Sowohl mit normalen (nicht rückbindenden) Sauerstoffdonorzentren als auch mit neutralen S- und P-Donorliganden bilden  $\text{Cu}^{\text{II}}$ -Zentren dagegen schwächere, labile Bindungen. Chemisch und spektroskopisch reizvoll<sup>[6, 33]</sup> sowie biologisch relevant<sup>[26]</sup> ist die Kombination aus Kupfer(II) und potentiell reduzierenden Thiolato-Liganden, wie etwa dem Cysteinat-Ion. Durch geeignete Koordinationsarrangements<sup>[33a]</sup> kann die übliche Elektronentransfer(ET)-Reaktion zu  $\text{Cu}^{\text{I}}$ -Verbindungen und Diorganodisulfide bildenden Thiyl-Radikalen vermieden werden (Schema 1), wobei jedoch auffallend intensive Ligand-Metall-Charge-Transfer(LMCT)-Absorptionen im Sichtbaren auftreten (Blaue Kupferproteine, siehe Abschnitt 7); die Ladungsübertragung erfolgt dann erst im LMCT-angeregten Zustand<sup>[16]</sup>.



Schema 1.

Kupfer(I)-Ionen sind nicht zuletzt wegen der  $d^{10}$ -Elektronenkonfiguration und der daraus folgenden Abwesenheit von Ligandenfeldeffekten recht flexibel bezüglich ihrer Koordinationszahl und -geometrie. Die üblicherweise angegebenen Werte für die bevorzugte Koordinationszahl reichen von zwei bis vier, mit einem Optimum zwischen drei und vier<sup>[34]</sup>. In der metallasupramolekularen Chemie<sup>[35, 36]</sup> wird die Neigung von Kupfer(I)-Zentren zur strukturell flexiblen und gleichwohl festen

Koordination organischer Liganden<sup>[37–42]</sup> intensiv genutzt, wobei gleichzeitig die niedrige Ladung (d.h. geringe Polarisation) und die hohe Bindungsstabilität, insbesondere gegenüber Liganden mit Stickstoffdonorzentren, von Vorteil sind (Abb. 4). Letzteres zeichnet  $\text{Cu}^{\text{I}}$ -Ionen vor allem im Vergleich zu anderen einwertigen Metall-Ionen wie den Alkalimetall-Ionen oder  $\text{Tl}^{\text{I}}$ -Ionen aus. Einwertige Ag- oder Au-Ionen sind redoxchemisch problematisch und zeigen anders als  $\text{Cu}^{\text{I}}$ -Ionen<sup>[25, 43]</sup> eine geringere  $d_{\pi}$ -Rückbindung zu ungesättigten Liganden.

Aufgrund ihrer Stellung zwischen einwertigem  $\text{Ag}^{\text{I}}$  mit der bevorzugten Koordinationszahl zwei und vorwiegend vierfach koordiniertem  $\text{Zn}^{\text{II}}$  ist für  $\text{Cu}^{\text{I}}$ -Zentren eigentlich die Koordinationszahl drei mit trigonal-planarer Geometrie ideal<sup>[34]</sup>. Die häufig mit koordinativer Untersättigung assoziierte<sup>[34b]</sup> reine Dreifachkoordination wird jedoch bei Kupfer(I)-Verbindungen oft durch zusätzliche schwache axiale Wechselwirkungen erweitert (Schema 2 oben), wofür neben einigen niedermolekularen Komplexen vor allem die Typ-1-Kupferzentren der Blauen Kupferproteine (im oxidierten Zustand) ein anschauliches Beispiel sind<sup>[6, 26, 44]</sup> (siehe Abschnitt 7).

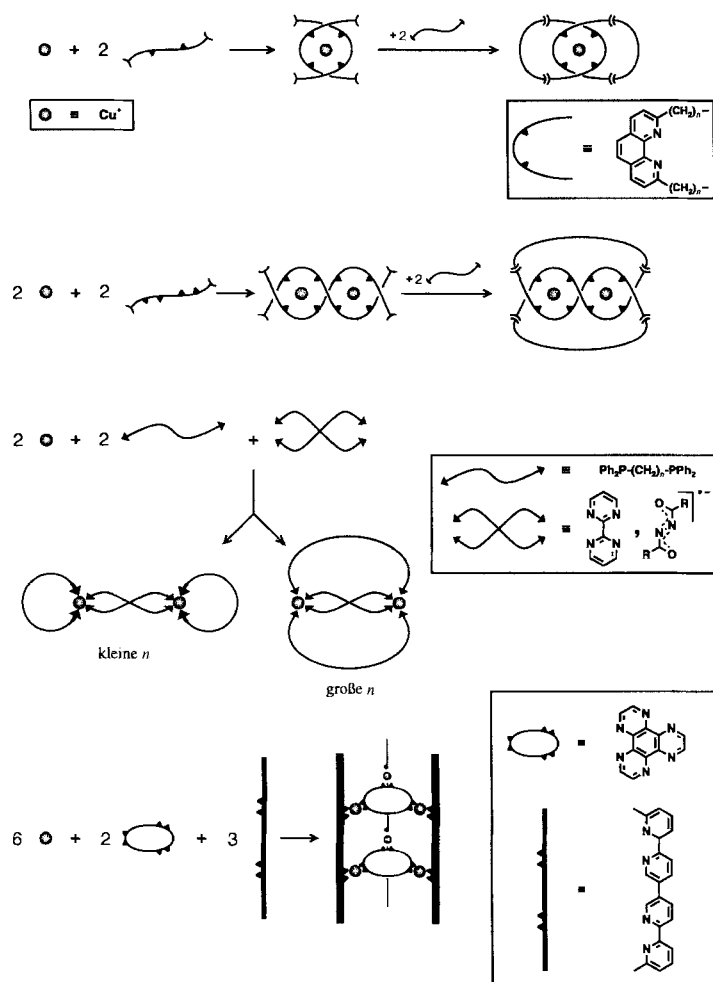
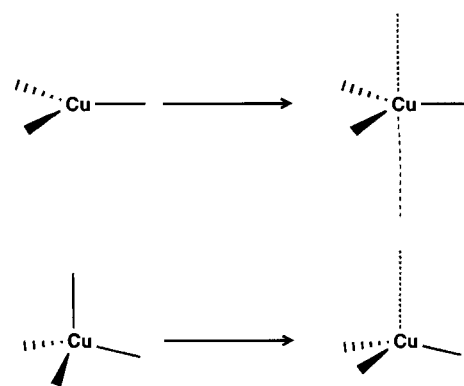
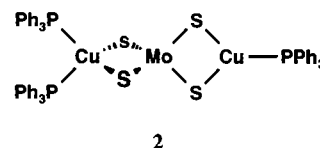


Abb. 4. Die Eignung von  $\text{Cu}^{\text{I}}$ -Ionen als Templatzentren für Selbstorganisationsprozesse in der supramolekularen Chemie ist durch zahlreiche topologisch interessante Komplexanordnungen dokumentiert. Von oben nach unten: Catenate [37], molekulare Knoten [38], inverse Cryptate [39], molekulare Röhren [40]. Weitere, hier nicht skizzierte Beispiele sind (Doppel-)Helices [41], molekulare Gitter [42a], Rotaxane [42b] oder Scharnier-Tripeldecke [34c, d, 39b].



Schema 2.

Umgekehrt können geringe Störungen eines vierfach koordinierten  $\text{Cu}^{\text{I}}$ -Zentrums zu einer Bindungsschwächung zwischen dem Kupferatom und einem der vier Donoratome führen, so daß sich die Koordinationsgeometrie von einer annähernd tetraedrischen hin zu einer trigonal-pyramidalen Anordnung ändert (Schema 2 unten, siehe auch Schema 5)<sup>[34c, d, 39]</sup>. Die Ambivalenz zwischen den Koordinationszahlen drei und vier bei  $\text{Cu}^{\text{I}}$ -Verbindungen wird schließlich auch darin sichtbar, daß für scheinbar äquivalente Kupferzentren desselben Moleküls einmal die Dreifach- und einmal die Vierfachkoordination auftreten kann (2)<sup>[45]</sup>.



Die Oxidationsstufe I des Kupfers kann mit weicheren Donoratomen wie etwa in  $\text{R}_3\text{P}$ -<sup>[46a–c]</sup>,  $\text{R}_2\text{S}$ -<sup>[46d]</sup> oder  $\text{RS}^-$ -Liganden<sup>[47]</sup> stabilisiert werden, aber auch ungesättigte Stickstoffdonorliganden sind gut geeignet.

Kupfer(I)-Verbindungen sind dadurch ausgezeichnet, daß sie trotz der abgeschlossenen 3d-Schale molekularen Sauerstoff

binden und reduktiv aktivieren können. Im biologischen Bereich sind nur drei Arten von Aufnahmezentren für  $O_2$  bekannt. Neben  $Cu^I$ - sind dies High-spin-Eisen(II)-Zentren mit vier ungepaarten 3d-Elektronen und das formal antiaromatische 1,5-Dihydroflavin-System<sup>[48]</sup>. Die Affinität des Kupfer(I)-Ions zum Triplett-Molekül  $^3O_2$ <sup>[49]</sup> beruht vermutlich auf Beiträgen von unbesetzten 4s- oder 4p-Orbitalen<sup>[6c]</sup>, dadurch wird eine Orbitalmischung (3d/4s oder 3d/4p) insbesondere bei zusätzlicher Aktivierung durch Ligand-Metall- oder Metall-Metall-Wechselwirkungen möglich<sup>[50]</sup>.

Die vergleichsweise offene und variable Koordinationssphäre von Kupferzentren beider Oxidationsstufen (I, II) sowie der gut zugängliche Redoxübergang im positiven Potentialbereich machen Kupfer zu einem weit verbreiteten Metall der Redoxkatalyse innerhalb der organischen Synthese und auch bei großtechnischen Prozessen<sup>[12c, 51]</sup>; entsprechende Redox Eigenschaften (Oxidase- und Oxygenase-Aktivitäten) kennzeichnen auch einen Großteil der biologischen Funktionen dieses Spurenelements (Abb. 5).

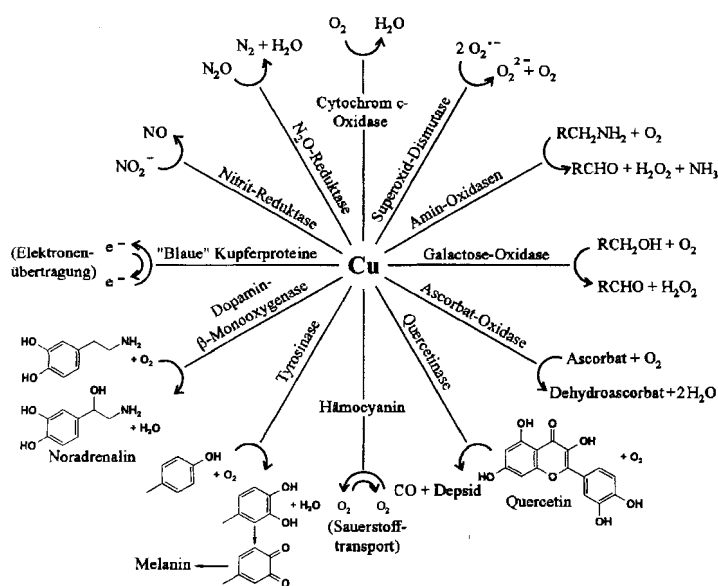


Abb. 5. Die wesentlichen metabolischen Funktionen kupferhaltiger Proteine (zumeist Enzyme) sind in der „Biokupfer-Uhr“ zusammengestellt. Klar ersichtlich ist die enge Assoziation dieses Bioelements mit Disauerstoff und seinen Sekundärprodukten. Nicht aufgeführt sind Transport-, Regulations- und Speicher-Proteine für Kupfer.

### 3. Kupfer – ein „modernes“ Bioelement?

Kupfer kann in zweierlei Hinsicht als modernes Bioelement bezeichnet werden. Erstens sind viele biologische Funktionen dieses Spurenelements zwar schon länger bekannt, aber die detaillierten strukturellen Zusammenhänge blieben über Jahrzehnte obskur und konnten erst in den letzten zehn Jahren auf molekularem Niveau dokumentiert werden, so daß zahlreiche (Lehrbuch-)Hypothesen korrigiert werden müssen. Hierzu gehören unter anderem die Bindung des Disauerstoffs im  $O_2$ -Transportsystem des Hämocyanins<sup>[10]</sup> (Abb. 1), die Rolle kupferhaltiger Enzyme innerhalb des Stickstoffkreislaufs (Denitrifizierung)<sup>[13–15, 52]</sup> (Abb. 2), der genaue Kupfergehalt des essentiellen Atmungszyklus Cytochrom-c-Oxidase<sup>[41]</sup> (siehe Abb. 7),

die Natur des chinoiden Cofaktors kupferhaltiger Amin-Oxidasen<sup>[53]</sup> (siehe Abb. 9), die Oxidationsstufen des Metalls in der Galactose-Oxidase<sup>[29, 30]</sup> (siehe Abb. 10) sowie der dreikernigen Aufbau des katalytisch aktiven Zentrums in Blauen Oxidasen<sup>[51]</sup> (siehe Abb. 8).

Zweitens ist Kupfer aber auch bezüglich der Evolution der Biosphäre und – als Folge davon – der Atmosphäre als „Newcomer“ unter den Bioelementen aufzufassen<sup>[19]</sup>, worauf vor allem R. J. P. Williams mehrfach hingewiesen hat<sup>[3c, 54]</sup>. Als nicht leicht zur Oxidationsstufe II zu oxidierendes Element war es vor der biogenen (photosynthetischen) Erzeugung einer oxidierenden Umgebung nur in geringem Maße bioverfügbar<sup>[55a, b]</sup>, da  $Cu^I$ -Verbindungen in Form von Mineralien (Halogeniden oder Chalcogeniden) bei pH 7 schwerlöslich sind. Erst die massive Produktion von Oxidationsäquivalenten (und letztlich von  $O_2$ ) durch photosynthetisierende Organismen seit ca.  $3 \times 10^9$  Jahren<sup>[55c]</sup> ermöglichte vermutlich die Oxidation zu gut wasserlöslichen  $Cu^{II}$ -Verbindungen mit zwei weiteren für das Element wichtigen Konsequenzen:

– Zum einen wurde das in der Funktion konkurrierende Eisen durch Oxidation von  $Fe^{II}$  zu  $Fe^{III}$  weniger bioverfügbar (Eisen als limitierendes Spurenelement im heutigen Meerwasser<sup>[56]</sup>), wodurch bioenergetisch aufwendige Maßnahmen wie Komplexbildung und/oder intermediäre Reduktion zu  $Fe^{II}$ -Verbindungen erforderlich wurden.

– Zum anderen schufen gerade die Bedingungen der oxidierenden Atmosphäre einen Bedarf für ein redoxkatalytisch aktives Metall mit Potentialen zwischen 0.0 und 0.8 V: Das  $Cu^I/Cu^{II}$ -Redoxpaar erweist sich somit als prädestiniert für die Katalyse von typischerweise gehemmten Umsetzungen mit  $O_2$ , wie viele – auch technische – Reaktionen belegen<sup>[12c, 51]</sup>. Es ist daher nicht unerwartet, daß Kupferenzyme vor allem an Reaktionen mit Disauerstoff (Transport, Verwertung durch Oxidasen und Oxygenasen) sowie am Abbau unerwünschter Nebenprodukte des  $O_2$ -Metabolismus – etwa der  $O_2^{\cdot-}$ -Radikale – beteiligt sind (Abb. 5). Ähnliches gilt für die in sauerstoffhaltiger Atmosphäre unvermeidliche Umwandlung von N-O-Verbindungen (z.B.  $NO_2^-$ -Ionen,  $NO^{\cdot}$ -Radikale,  $N_2O$ ) im Rahmen des Stickstoffkreislaufs, woran ebenfalls kupferhaltige Enzyme (neben eisenhaltigen Systemen) beteiligt sind<sup>[13b, 14, 52]</sup>. In Zusammenhang mit der Koexistenz von Kupferverbindungen und  $O_2$  steht aber auch die für einige Fälle gut etablierte<sup>[16b, 29, 30, 39a, 46, 57–59]</sup> Assoziation von Kupfer mit biogenen oder synthetischen Radikalen, wodurch sich ungewöhnliche Kooperationen hinsichtlich enzymatischer Reaktionen ergeben können (siehe Abb. 9, 10)<sup>[29, 30, 57]</sup>.

Die für eine Katalyse komplexerer Redoxprozesse erforderliche Speicherung mehrerer Einzelelektronen und deren kontrollierte Freisetzung als „Mehrelektronenpaket“ an einem katalytisch aktiven Zentrum<sup>[60]</sup> erfordert im allgemeinen die Kopplung zweier oder mehrerer Redoxzentren. Beispiele dafür sind das  $O_2$  zu  $H_2O$  reduzierende  $Cu_B$ -Häm- $a_3$ -Heterodimer-Zentrum des Atmungsferments Cytochrom-c-Oxidase (siehe Abschnitt 9.3.3)<sup>[61, 62]</sup> oder die trimere Cluster-Anordnung in Blauen Oxidasen vom Typ der Ascorbat-Oxidase oder der Laccase (siehe Abschnitt 9.3.1)<sup>[4, 63]</sup> (Blaue Oxidasen enthalten zusätzlich zum katalytisch aktiven Metallcluster ein „blaues“, d.h. Typ-1-Kupfer-Zentrum mit Elektronentransfer-Funktion). Nichtblaue Oxidasen verwenden eine andere Strategie,

nämlich die funktionale Kopplung nur eines Metallzentrums ( $\text{Cu}^{\text{I}}$  oder  $\text{Cu}^{\text{II}}$ ) an ein organisches Redoxsystem, z.B. ein Chinon (Amin-Oxidasen, siehe Abb. 9)<sup>[57, 64]</sup>, ein modifiziertes Tyrosyl-Radikal (Galactose-Oxidase, siehe Abb. 10)<sup>[29, 30]</sup> oder möglicherweise auch an Pterine (Phenylalanin-Hydroxylase aus *Chromobacterium violaceum*)<sup>[65]</sup>. Eine derartige Strategie der Kopplung eines redoxaktiven Liganden an ein Metallzentrum ist vom Häm-System bekannt ( $\text{Fe}^{\text{II}}/\text{Fe}^{\text{III}}/\text{Fe}^{\text{IV}}$  + Porphinato-Liganden) und wird für den Cofaktor-Komplex in Pterin-enthaltenden Molybdän- oder Wolfram-Enzymen vermutet<sup>[3a, b, 66]</sup>.

Die evolutionsgeschichtliche „Modernität“ von Kupfer im Vergleich zu Eisen, Cobalt oder Nickel<sup>[3c, 54]</sup>, zeigt sich auch an der bekannt hohen Toxizität des Metalls für niedere Organismen wie Algen oder Bakterien<sup>[67]</sup> sowie daran, daß es überwiegend im extrazellulären Raum lokalisiert ist<sup>[54b]</sup> (Ausnahme: Cu,Zn-Superoxid-Dismutase). Als ein weiteres Indiz mag die über einen längeren Zeitraum verlaufende Stabilisierung des Kupfermetabolismus bei Säuglingen und Kleinkindern gelten, die bei Störungen zu Krankheiten führen kann<sup>[67a]</sup>.

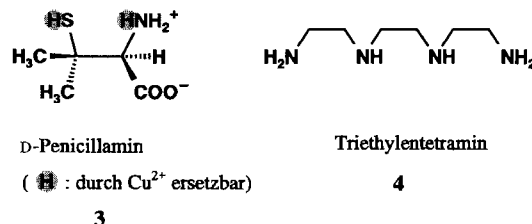
#### 4. Medizinisch-toxikologische Aspekte

Obwohl zweifellos ein essentielles Element für viele Lebensvorgänge höherer Organismen (nach dem Eisen ist Kupfer das zweithäufigste „echte“, d.h. redoxaktive Übergangsmetall im menschlichen Organismus<sup>[3a, b]</sup>), ist Kupfer zugleich auch ein toxisches Schwermetall mit entsprechenden Grenzwerten, z.B. für Trinkwasser oder Klärschlamm<sup>[3a, b, 67]</sup>. Die Toleranz des erwachsenen Menschen z.B. gegenüber Kupfersulfat ist erstaunlich hoch<sup>[67a]</sup>, jedoch ist die „therapeutische Breite“ zwischen Mangel- und Vergiftungssymptomen in der Wachstumsphase sowie bei vielen niederen Organismen nicht sehr groß und außerdem stark variabel. Besonders gefährdet sind Kleinkinder, die bereits durch die Akkumulation von Kupferspuren aus Kochgeschirr oder aus durch Kupferrohre geleitetem saurem Trinkwasser ( $\text{pH} < 6$ ) an Leberzirrhose erkranken können<sup>[67a]</sup>.

Zu den umweltbedingten Störungen des Kupferstoffwechsels gehört der bekannte Molybdän/Kupfer-Antagonismus bei Weidetieren<sup>[68]</sup>, deren Nahrung nur ein schmales Spektrum umfaßt. Bei ihnen können  $\text{Cu}^{\text{I}}$ -Ionen durch im Wiederkäuermagen gebildete  $\text{MoO}_4\text{S}_4^{2-}$ -Ionen komplexiert werden, was zu Molybdänose, einer sekundären Kupfermangelerkrankung, führen kann. Thiomolybdate sind nicht nur gut wasserlöslich, sondern auch exzellente Chelatkomplexbildner für Metallzentren in niedrigen Oxidationsstufen wie etwa Kupfer(I)-Ionen<sup>[69]</sup> (**2**). Die geringe therapeutische Breite von Kupfer führt auch bei Anwesenheit anderer konkurrierender (Fe, Zn) oder antagonistischer Elemente (S, Se) zu Kupfermangelsymptomen.

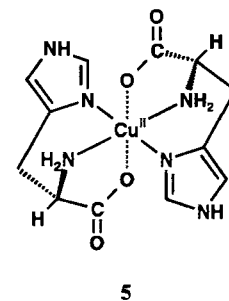
Mit Blick auf die zunehmend realistischer erscheinenden medizinisch-molekularbiologischen Möglichkeiten zur Therapie genetisch bedingter Störungen haben seit einiger Zeit die den Kupfermetabolismus betreffenden Krankheiten Morbus Wilson und das Menke-Syndrom besondere Aufmerksamkeit auf sich gezogen<sup>[67]</sup>. Beide Erbkrankheiten kommen in einer Häufigkeit von ca. 1 Fall pro 100 000 Geburten vor. Bei der Wilsonschen Krankheit handelt es sich um eine pathologische Kupfer-Anreicherung in Leber und Gehirn, die unbehandelt letal

verläuft<sup>[67a, c, d]</sup>. Die Therapie dieser Störung besteht in der frühzeitigen Verabreichung möglichst kupferspezifischer Chelatbildner, insbesondere von D-Penicillamin **3**, oder – bei nicht seltener Unverträglichkeit – von Triethylentetramin **4** oder Derivaten<sup>[67a, c]</sup>. Zinkverbindungen können die vermehrte Bildung des Schwermetall-Speicherproteins Metallothionein (siehe Abschnitt 6) stimulieren und dadurch ebenfalls der Kupferanreicherung bei Morbus Wilson entgegenwirken.



D-Penicillamin ist auch bei Sklerodermie indiziert (Panzerhaut-Syndrom), welche in einer übermäßigen Produktion von Kollagen besteht. Hier – wie auch beim Menke-Syndrom – zeigt sich die Bedeutung des Kupfers für die kontrollierte Synthese von Bindegewebe (siehe Abschnitt 9.3.2).

Im Gegensatz zur Wilsonschen Krankheit wird das Menke-Syndrom durch eine erbliche Störung des intrazellulären Kupfertransports und damit der Kupfer-Speicherung verursacht<sup>[7]</sup>. Auch hier tritt ohne Behandlung, d.h. ohne kontinuierliche Supplementierung von „Kupfer-Histidin“ (vermutete Struktur: **5**)<sup>[70]</sup>, schon in früher Kindheit ein rascher Abbau im Zentralen Nervensystem mit Todesfolge ein; nach außen besonders charakteristisch ist die Bildung von spindelförmigem krausem Haar. Die Biosynthese zahlreicher Strukturproteine erfordert die Anwesenheit kupferhaltiger Enzyme (siehe Abschnitt 9.3.2). Inzwischen konnte das für die Krankheit verantwortliche Gen identifiziert und isoliert werden, es liegt auf dem X-Chromosom<sup>[7]</sup>. Das Gen codiert für ein Membranprotein, welches eine typische Transport-ATPase mit mehreren kupferbindenden (Cys-X-X-Cys)-Einheiten ist, wie sie von Schwermetall-Regulations- und -Speicherproteinen des Metallothionein-Typs<sup>[71, 72]</sup> bekannt sind (Abb. 6).



Genetische Defekte, die Veränderungen in der Aminosäuresequenz des Antioxydations-Enzyms Cu,Zn-Superoxid-Dismutase (SOD) auslösen (siehe Abschnitt 9.4 und Abb. 11), sind für die erbliche Form der amyotrophischen Lateralsklerose (ALS) verantwortlich<sup>[8]</sup>. Die ALS ist eine fortschreitende, irreversibel neurodegenerative Krankheit des motorischen Systems, die nicht zuletzt wegen prominenter Betroffener, etwa des Physikers Stephen Hawking, bekannt wurde<sup>[8c]</sup>. Im Amerikanischen ist ALS als „Lou Gehrig’s disease“ bekannt, benannt nach einem der berühmtesten Baseballspieler (1st baseman der New York Yankees), der 1941 im Alter von 38 Jahren an dieser Krankheit starb. Im Jahre 1993 haben zwei Forschergruppen<sup>[8a, b]</sup> nachweisen können, daß genetisch bedingte ALS durch Defekte der

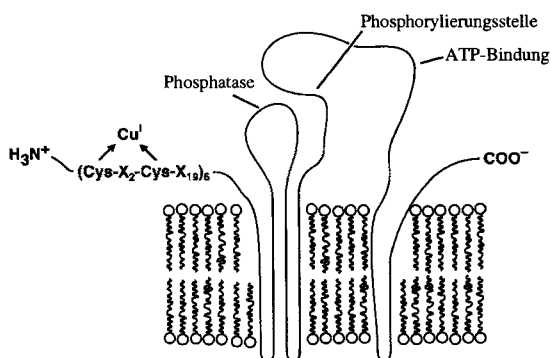
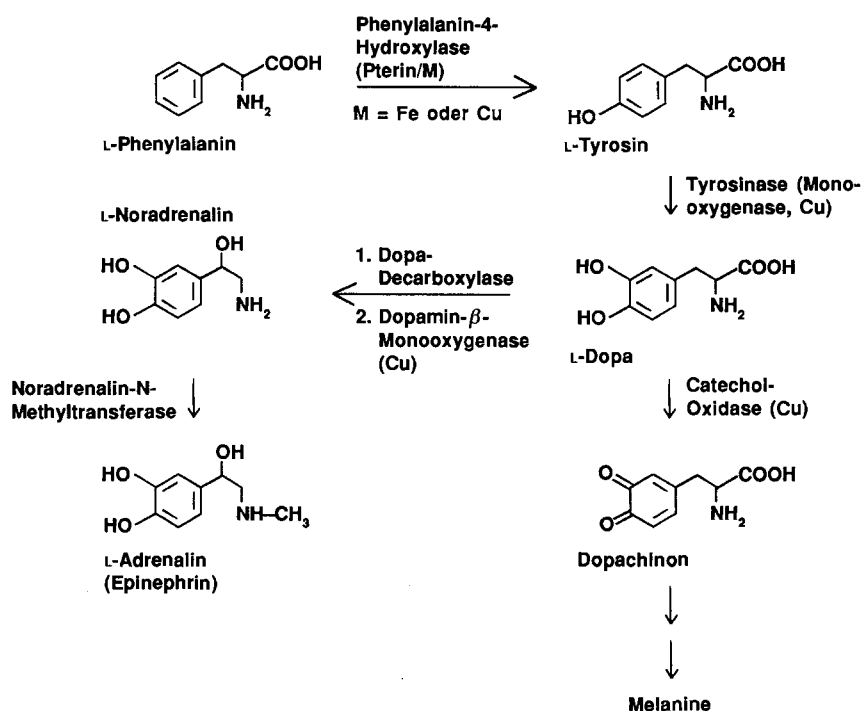


Abb. 6. Das unbehandelt letal verlaufende Menkesche „Kraushaar“-Syndrom von Kleinkindern beruht nach Untersuchungen an kloniertem genetischem Material auf einer Störung des intrazellulären Kupfertransports durch das oben skizzierte ATPase-Membranprotein mit cysteinreichen Abschnitten [7]. Sequenzen dieser Art erinnern an Regulationsproteine wie CUP2 [78] und an Metallothionein(MT)-Speicherproteine, wie sie in Hefezellen gefunden werden. Diese weisen – anders als die bekannteren Säugetier-Metallothioneine – eine besondere Spezifität für Kupfer auf [71]. Der sich als Menke-Syndrom manifestierende Defekt wurde auf dem X-Chromosom lokalisiert [7]. Bei rechtzeitiger Diagnose kann mit subkutan verabreichten  $\text{Cu}^{\text{II}}$ /Histidin-Präparaten eine zufriedenstellende Entwicklung des Kindes erwartet werden [70].

kupferhaltigen SOD verursacht werden kann, wodurch die Proteinstruktur gestört und die notwendige optimale Funktionsfähigkeit dieses Entgiftungsenzyms beeinträchtigt wird (siehe Abschnitt 9.4).

Die schon länger bei chronischem Kupfermangel bekannten Symptome Gefäßschwäche und Herzvergrößerung sind nach neueren Erkenntnissen eine Folge der verminderten Synthese von Catecholamin-Neurotransmittern<sup>[73, 74]</sup>. Die Biosynthese von Adrenalin beispielsweise erfordert eine pterinabhängige Phenylalanin-Hydroxylase (mit Eisen oder Kupfer als Metallkomponente)<sup>[65]</sup> sowie die kupferabhängigen Enzyme Dopamin- $\beta$ -Monooxygenase<sup>[65d, 75]</sup> und Tyrosinase<sup>[76]</sup> (Schema 3).



Schema 3. Kupferabhängige Biosynthese von Adrenalin und Melaninen.

Verminderte Neurotransmitter-Produktion führt zu einer reduzierten Bildung von Hitzeschock-Proteinen (HSPs), die der zellulären Bewältigung von Stress dienen<sup>[74]</sup>.

## 5. Alte und neue Typen: Die Klassifizierung von Kupferzentren in Biomolekülen

Die klassische Einteilung von Kupferzentren diverser Biomoleküle in „Typ-1-“, „Typ-2-“ und „Typ-3-Kupfer“<sup>[3, 6a, b]</sup> zielte darauf ab, eine Korrelation zwischen Funktion und analytischen Merkmalen (optische Absorption, EPR, Magnetismus) zu ermöglichen. Inzwischen sind diese Beziehungen anhand mittlerweile verfügbarer struktureller Details weitgehend verstanden und verfeinert worden, es wurden jedoch auch zusätzliche, nicht in das konventionelle Schema passende Zentren gefunden, welche in Tabelle 1 zusammen mit charakteristischen Merkmalen der klassischen Typen aufgeführt sind.

Vermutlich ist mit den in Tabelle 1 aufgelisteten Strukturen das Repertoire an Kupferzentren in Biomolekülen noch nicht erschöpft. Künftige Strukturbestimmungen könnten zu Korrekturen führen oder weitere Alternativen offenlegen. Koordinationschemisch bemerkenswert ist die Tatsache, daß sämtliche Aggregationsformen genutzt werden: von einkernigen Kupferzentren (Typ 1, teilweise Typ 2) über homodinucleare (Typ 3,  $\text{Cu}_2$ ), heterodinucleare ( $\text{Cu}_2/\text{Fe}$  in Cytochrom-c-Oxidase,  $\text{Cu}_2/\text{Zn}$ -Superoxid-Dismutase) und dreikernige Zentren (z.B. in Ascorbat-Oxidase) bis hin zu offenbar Cysteinatoverbrückten Clustern (6–8  $\text{Cu}^{\text{II}}$ <sup>[71, 80]</sup>) in kupferhaltigen Metallothioneinen der Hefe.

## 6. Regulation, Transport und Speicherung von Kupfer in Biomolekülen

Gebunden wird Kupfer (Bedarf ca. 2 mg/Tag)<sup>[67a]</sup> nach Resorption im Magen- und Darmbereich durch Serumalbumin, welches Histidin-Reste aufweist, die zweiwertige Metall-Ionen binden können<sup>[77]</sup>. Über homöostatisch puffernde cysteinreiche Metallothionein(MT)-Proteine<sup>[71]</sup> gelangen die Kupfer-Ionen zum Caeruloplasmin, einem großen, sechs Kupferzentren enthaltenden Plasma-protein<sup>[5a]</sup>, welches auch als den Übergang  $\text{Fe}^{\text{III}}/\text{Fe}^{\text{II}}$  katalysierende Ferroxidase fungieren kann.

Ebenso wie beim besser untersuchten Eisen erfordert auch beim Kupfer die Kontrolle des Metabolismus ein hochgradig komplexes Regulationssystem. Bekannt ist ein mehrere wohlkonservierte Cystein-Reste enthaltendes Regulationsprotein CUP2 (ebenfalls bekannt unter der Bezeichnung ACE1)<sup>[78]</sup>, welches nach Aufnahme mehrerer  $\text{Cu}^{\text{I}}$ -Ionen durch spezifische DNA-Bindung die Expression von kupferspeicherndem Metallothionein auslöst. Vermutet wird, daß das besonders kupferaffine MT-Protein der Hefe *Saccharo-*

Tabelle 1. Charakteristik bekannter Kupferzentren in Biomolekülen.

	Typ 1	Typ 2	Typ 3	Typ(2 + 3)-Trimer	Cu <sub>4</sub>	MT-Cu
<b>Aggregation</b>	einkernig (auch in Polykupferproteinen)	einkernig	zweikernig	dreikernig	zweikernig	ein- bis mehrkernig (Cluster)
<b>Spezifität, biologische Funktion</b>	Elektronenübertragung	Katalyse und Redoxreaktivität	O <sub>2</sub> -Aktivierung für Transport und Oxygenierung	O <sub>2</sub> -Aktivierung für Oxidase-Funktion	Elektronenübertragung	Regulations-, Speicher- und Transport-Form
<b>Vorkommen</b>	Blaue Kupferproteine, z.B. Plastocyanin, Azurin	Amin-Oxidasen, Galactose-Oxidase, Superoxid-Dismutase, Cytochrom-c-Oxidase (Cu <sub>9</sub> )	Hämocyanin, Tyrosinase	Ascorbat-Oxidase, Laccase	N <sub>2</sub> O-Reduktase, Cytochrom-c-Oxidase	CUP2, Metallothionein (MT), Cu-Transport-ATPase (Abb. 6)
<b>Strukturmerkmale</b>						
typische Koordinationszahl	3 (trigonal-planar) + 1	4 (quadratisch-planar oder pyramidal)	Cu <sup>I</sup> : 3 (trigonal-planar)	Cu <sup>I</sup> : 3 (trigonal) Cu <sup>II</sup> : 4	4	3 (trigonal-planar)
koordinierende Atome	S <sup>-</sup> (Cys <sup>-</sup> ), 2 N(His), +S(Met)	3 N(His), □ [a]	2 × 3 N(His); Cu <sup>II</sup> (μ-η <sup>2</sup> :η <sup>2</sup> -O <sub>2</sub> <sup>2-</sup> )	N(His), z.T. (O)OH <sup>-</sup>	2S <sup>-</sup> (Cys), 2 N(His), S(Met), O(Peptid)	3S <sup>-</sup> (Cys <sup>-</sup> )
<b>spektroskopische Kennzeichen der oxidierten oder oxygenierten Form</b>						
EPR	geringe <sup>63</sup> Cu/ <sup>65</sup> Cu-Hyperfeinaufspaltung (A <sub>  </sub> ), niedriger g-Faktor (g <sub>  </sub> )	„normale“ Cu <sup>II</sup> -EPR-Parameter	kein Signal (starke antiparallele Spin-Spin-Kopplung)	„normale“ Cu <sup>II</sup> -EPR-Parameter	sehr geringe Cu-Hyperfeinaufspaltung durch zwei äquivalente Cu, niedriger g-Faktor	keine oxidierte Form
Lichtabsorption	intensive Absorption im Sichtbaren durch LMCT(Cys <sup>-</sup> → Cu <sup>2+</sup> )	keine intensive Absorption, nur „verbottene“ Ligandenfeldübergänge	intensive Absorptionen durch LMCT(O <sub>2</sub> <sup>2-</sup> → Cu <sup>2+</sup> )	intensive Absorptionen durch LMCT(O <sub>2</sub> <sup>2-</sup> → Cu <sup>2+</sup> )	Absorption im nahen Infrarotbereich (MMCT)	

[a] □: Freie Koordinationsstelle; teilweise weitere spezielle Liganden (organische Radikale) oder benachbarte Metallzentren (Zn, Fe).

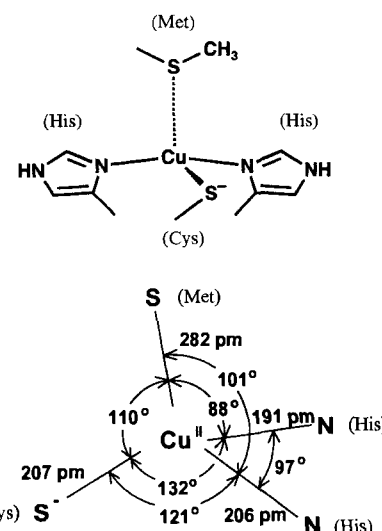
*myces cerevisiae* Cluster enthält, in denen sechs oder acht Kupfer(I)-Zentren durch Cysteinat-Reste verbrückt sind; die aus Röntgenabsorptionsmessungen erhaltenen Daten (Kristallstrukturanalysen sind noch nicht verfügbar) sind damit vereinbar, daß es sich um trigonal koordinierte Cu<sup>I</sup>-Zentren handelt<sup>[71]</sup>. Wie zahlreiche ein- und mehrkernige Kupfer(I)-Komplexe<sup>[34c, d, 79]</sup> zeigen auch die Cu<sup>I</sup>-Metallothioneine der Hefe intensive Lumineszenz<sup>[71, 80]</sup>.

## 7. Typ-1-Zentren in Blauen Kupferproteinen: das Cu<sup>I</sup>/Cu<sup>II</sup>-Strukturproblem und die Suche nach Elektronentransferpfaden

Die unsymmetrische, aber nicht willkürliche, sondern nach Erkenntnissen der Proteinkristallographie<sup>[5a, 44, 81]</sup> gut konservierte Koordination (Schema 4) der Typ-1-Kupferzentren in Blauen Kupferproteinen wie Plastocyanin oder Azurin hat für das Verständnis von Enzymstruktur und -reaktivität eine bedeutende Rolle gespielt<sup>[26]</sup>.

Aus der Abweichung insbesondere der Kupfer(II)-Zentren von der energiegunstigen quadratisch-planaren oder -pyramidalen Koordination wurde auf einen vom Polypeptid ausgehenden Zwang geschlossen, der die Ausgangsenergie erhöht und damit das Erreichen des Übergangszustandes, hier der Cu<sup>II</sup>/Cu<sup>I</sup>-Elektronenübertragungsreaktion, erleichtert (siehe Schema 6). Die Konzepte des „rack“-Mechanismus (das Protein als strukturaufzwingendes Gerüst<sup>[26c]</sup>) oder des entatischen Zustandes<sup>[26a, b]</sup> von aktiven Proteinen, insbesondere Enzymen, sind nicht zuletzt aus den Erkenntnissen über Typ-1-Cu-Zentren in Blauen Kupferproteinen abgeleitet worden.

Detaillierte strukturelle<sup>[44, 81]</sup>, kinetische<sup>[82]</sup> und spektroskopische Studien<sup>[6]</sup> von Kupferzentren beider Oxidationsstufen in

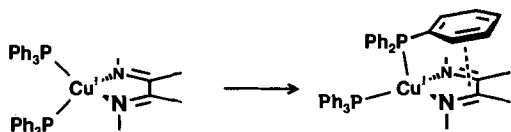


Schema 4. Koordination von Typ-1-Kupferzentren in Blauen Kupferproteinen. Oben: Generelle Anordnung. Unten: Strukturdetails bei Plastocyanin [81 a].

Blauen Kupferproteinen haben erkennen lassen, daß insbesondere die beiden Schwefelliganden, die  $\pi$ -elektronenreiche Thioat-Base des Cystein-Anions und der als schwacher  $\pi$ -Acceptor wirkende Thioether-Rest des Methionins, zur raschen, gerichteten Elektronenübertragung bei relativ hohem Potential beitragen. Die typische Umgebung der Typ-1-Kupferzentren kommt der optimalen Koordinationsgeometrie für Kupfer(I)-Zentren recht nahe, d. h. es tritt in erster Näherung eine trigonal-planare Koordination durch zwei Histidin- und einen Cysteinat-Rest auf, mit langer axialer Bindung zu Methionin (Schema 4) oder, wie bei Stellacyanin<sup>[81g]</sup>, zu Glutamin. Auch Kupfer(I)-Komplexe mit zwei N-Donor- und zwei P-Donor-Liganden, die nur

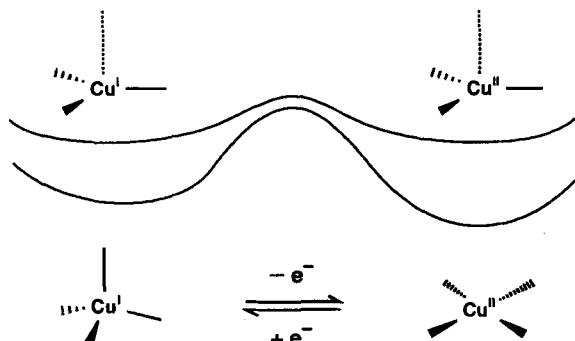


geringen Strukturzwängen ausgesetzt sind (Schema 5), neigen zur Annäherung an eine trigonal-pyramidale Koordinationsgeometrie mit einer langen Bindung zu einem der (größeren) Donoratome aus der 2. Achterperiode<sup>[34c, d, 39b]</sup>.



Schema 5.

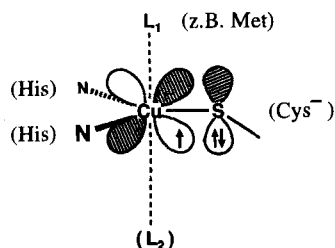
Neben der vom Protein auferlegten verzerrten Struktur höherer Energie destabilisiert auch der  $\pi$ -Acceptorligand Methionin den Kupfer(II)-Zustand, so daß die Redoxpotentiale der Typ-1-Kupferzentren im Vergleich zu denen konventioneller Komplexe recht hoch liegen. Aufgrund der speziellen, unsymmetrischen Geometrie sind jedoch die obersten 3d-Orbitale nicht entartet, so daß bei der Oxidation zu Kupfer(II) keine Reorganisationsenergie (und damit Zeit) erfordernde Jahn-Teller-Verzerrung nötig ist<sup>[6c]</sup> (Schema 6).



Schema 6.

Im Kupfer(II)-Zustand existiert eine starke  $\pi$ -Wechselwirkung (Schema 7) zwischen dem elektronenarmen Metall-Ion und dem Cysteinat-Ion. Hieraus resultieren die kurze Cu-S-Bindung, die EPR-spektroskopisch detektierbare Metall-Ligand-Spindelokalierung<sup>[6, 83]</sup> (kovalenter Bindungsanteil) und die intensive Farbe, die für diese Proteine charakteristisch ist und die primär von Ligand-Metall-Charge-Transfer(LMCT)-Übergängen herrührt (siehe Schema 1)<sup>[6]</sup>.

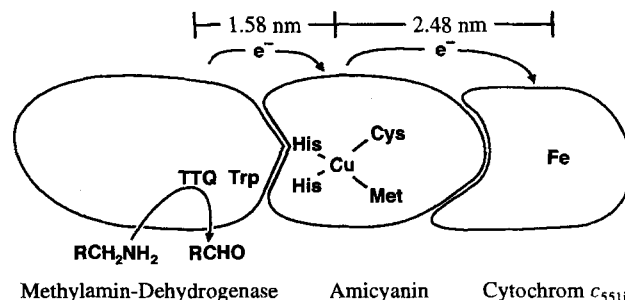
Der vergleichsweise kovalente Charakter der Kupfer(II)-Cysteinat-Bindung konnte auch durch ENDOR-Messungen bestätigt werden (ENDOR: Electron Nuclear Double Resonance<sup>[84]</sup>). Danach hält sich das ungepaarte Elektron zu erheblichem Anteil auch am Schwefelatom des Cysteinrestes und an der  $\beta$ -Methylengruppe auf<sup>[83]</sup>. Details der Koordinationsgeometrie wie etwa die geringere



Schema 7.

Pyramidalisierung am Kupferzentrum in Azurin können mittlerweile mit unterschiedlichen Redoxpotentialen und EPR-Eigenschaften (rhombische oder axiale Anisotropie des  $g$ -Faktors) korreliert werden<sup>[81c, 82a]</sup>; anhand von Modellverbindungen mit maßgeschneiderten Komplexliganden wie den vielverwendeten Tris(alkylpyrazolyl)boraten (Abb. 1, 2) erlauben inzwischen eine spektroskopische Annäherung an die Typ-1-Kupferzentren, ohne daß Nebenreaktionen wie oxidative Disulfidbildung (Schema 1) auftraten<sup>[33]</sup>.

Die Eigenschaften isolierter Blauer Kupferproteine sind mittlerweile gut bekannt, so daß sich das Interesse nun auf ihre Wechselwirkung mit den physiologischen Reaktionspartnern richtet. So überträgt Plastocyanin<sup>[81, a, b]</sup> Elektronen vom Cytochrom  $f$  in der photosynthetisierenden Membran auf photooxidiertes Chlorophyll P700 des Photosystems I grüner Pflanzen, während Amicyanin<sup>[81d]</sup> den Transfer von Elektronen aus dem Oxidase-Enzym Methylamin-Dehydrogenase (MADH), einem Chinoprotein<sup>[85]</sup>, zu einem Cytochrom  $c$  vermittelt. Obwohl die tatsächlichen dynamischen Verhältnisse komplex sein können, illustrieren bereits die Kristallstrukturen ternärer Proteinkomplexe (z.B. MADH/Amicyanin/Cytochrom  $c_{551i}$ )<sup>[86]</sup>, welche Rolle kupferhaltige Elektronentransferenzyme spielen (Schema 8).



Schema 8. Amicyanin vermittelt die Elektronenübertragung von der Methylamin-Dehydrogenase zum Cytochrom  $c_{551i}$  (TTQ = Tryptophantryptophylchinon)<sup>[85, 86]</sup>.

Dieser Funktion entsprechend (Schema 8), weisen einfache Blaue Kupferproteine wie Plastocyanin zwei bevorzugte Elektronentransferpfade auf<sup>[82]</sup>: einen kurzen Weg zum Elektronendonator, der durch eine eher hydrophobe Region führt, und einen längeren Weg zum Acceptor, der an einer polaren Gruppe mündet. Mit Hilfe von Programmen<sup>[87]</sup> zur Berechnung von Matrixelementen elektronischer Kopplung, die z.B. über  $\pi$ -Systeme, freie Elektronenpaare oder  $\sigma$ -Bindungen erfolgen könnte, lassen sich bevorzugte Elektronenpfade abschätzen. Durch Experimente mit Proteinen, die gezielte Punktmutationen aufweisen, können die Berechnungen überprüft werden<sup>[88]</sup>.

## 8. Die zweikernigen $\text{Cu}_2$ -Zentren in Cytochrom-c-Oxidase und $\text{N}_2\text{O}$ -Reduktase: Kupfer der Oxidationsstufe +1.5

Der Metallgehalt des Warburgschen „Atmungsferments“, der Cytochrom-c-Oxidase (COX, Komplex IV der Atmungskette), ist trotz der offensichtlichen Bedeutung dieses Enzyms

als terminaler Acceptor und Konverter für  $O_2$  in Mitochondrien (siehe Abb. 7)<sup>[62, 63]</sup> lange Zeit unklar geblieben<sup>[4, 61b, 89a, 133]</sup>. Zwar wurden die beiden Eisen-Zentren in Häm a und Häm a<sub>3</sub> früh identifiziert (siehe Abschnitt 9.3.3), und auch zwei Kupfer-„Zentren“, Cu<sub>A</sub> und Cu<sub>B</sub>, konnten unter anderem EPR-spektroskopisch unterschieden werden<sup>[90, 91]</sup>, aber das Cu<sub>A</sub>-„Zentrum“, welches der Elektronenübertragung dient, ließ sich keinem der klassischen Typen 1–3 (Tabelle 1) zuordnen. Selbst nach anfänglicher spektroskopischer Charakterisierung und Identifizierung von je zwei invarianten Cystein- und Histidin-Resten als vermutlich primären Liganden blieb die zweikernige Natur dieses Zentrums lange verborgen<sup>[91]</sup>.

Ursache hierfür war die Komplexität dieses (in der Säugetierform) aus 13 sehr verschiedenen Untereinheiten bestehenden Enzyms ( $M_r = 204$  kDa)<sup>[4, 61, 133]</sup> sowie seine Einbettung in die Mitochondrienmembran, wodurch eine Isolierung und Reinigung des vollständigen Proteinkomplexes erschwert wurde. Das Cu<sub>A</sub>-Zentrum befindet sich in der Untereinheit II (26 kDa), während die Häm-Gruppen und das Cu<sub>B</sub>-Zentrum Bestandteile der größten Untereinheit I (60 kDa) sind. Aufgrund sorgfältiger quantitativer Analysen der Spurenelemente haben Buse und Mitarbeiter 1987 postuliert<sup>[4]</sup>, daß die COX nicht, wie lange angenommen und weiter kolportiert<sup>[91b–d]</sup>, zwei, sondern *drei* Kupferatome pro Enzym enthält. Kupferzentren vom Cu<sub>A</sub>-Typ waren inzwischen auch in dem an der Denitrifikation beteiligten Enzym N<sub>2</sub>O-Reduktase (Abb. 7) von *Pseudomonas stutzeri* gefunden worden<sup>[14c, 52]</sup>. Während die ungewöhnlichen Signale im EPR-Spektrum der oxidierten Verbindung zuvor der Koordination zweier Cysteinat-Reste an ein Cu<sup>II</sup>-Zentrum zugeschrieben wurden (Cu<sub>A</sub> als Super-Typ-1-Cu)<sup>[91]</sup>, haben Kroneck und Mitarbeiter 1990 zeigen können, daß in Wahrheit *ein* ungepaartes Elektron mit *zwei* spektroskopisch äquivalenten Metallzentren wechselwirkt<sup>[92]</sup>. Wegen der Zusammensetzung natürlichen Kupfers aus den Isotopen <sup>63</sup>Cu (69.2% natürliche Häufigkeit, Kernspin  $I = 3/2$ , Kern- $g$ -Faktor  $g_N = 1.484$ ) und <sup>65</sup>Cu (30.8% natürliche Häufigkeit, Kernspin  $I = 3/2$ , Kern- $g$ -Faktor  $g_N = 1.588$ ) führt dies zu einem charakteristisch aufgespaltenen<sup>[59b]</sup> Septett im A<sub>||</sub>-Bereich. In der Folge konnten diese Ergebnisse durch EPR-Messungen bei mehreren Mikrowellenfrequenzen erhärtet werden<sup>[93]</sup>, und auch mehrere andere Gruppen haben die zweikernige Natur des Cu<sub>A</sub>-Zentrums bestätigt<sup>[94]</sup>.

Bzüglich der detaillierten Struktur des Cu<sub>A</sub>-Zentrums existierten vor der im August 1995 veröffentlichten Strukturaufklärung (Kap. 9.3.3<sup>[133]</sup>) zwei Hypothesen (Abb. 7)<sup>[95a, b, d]</sup>, wovon diejenige von Blackburn et al. auf neu interpretierten<sup>[95b, c]</sup> EXAFS-Messungen<sup>[95d]</sup> basierte und die erste Metall-Metall-Bindung in einem Biomolekül implizierte<sup>[95b]</sup>. Die derzeit nur bedingt adäquate Modellierung<sup>[89]</sup> beider Strukturvorschläge läßt eine solche Aussage allerdings nicht streng zu, vor allem weil es gerade bei Kupfer-Mehrkernkomplexen riskant ist, einen Zusammenhang zwischen kurzen Metall-Metall-Abständen (2.3–2.6 Å) und dem Vorliegen einer Bindung im etablierten Sinne herzustellen<sup>[50a, 89a, 96]</sup>.

Das Vorliegen einer offensichtlich delokalisiert-gemischvalenten (+II/+I)-Zweikernereinheit im Cu<sub>A</sub>-Zentrum<sup>[92, 93]</sup> weist auf eine starke elektronische Kopplung hin, ob nun direkt über einen kurzen Abstand von ca. 2.5 Å oder über verbrückende, zum „Superaustausch“ befähigte Liganden wie Cysteinat-

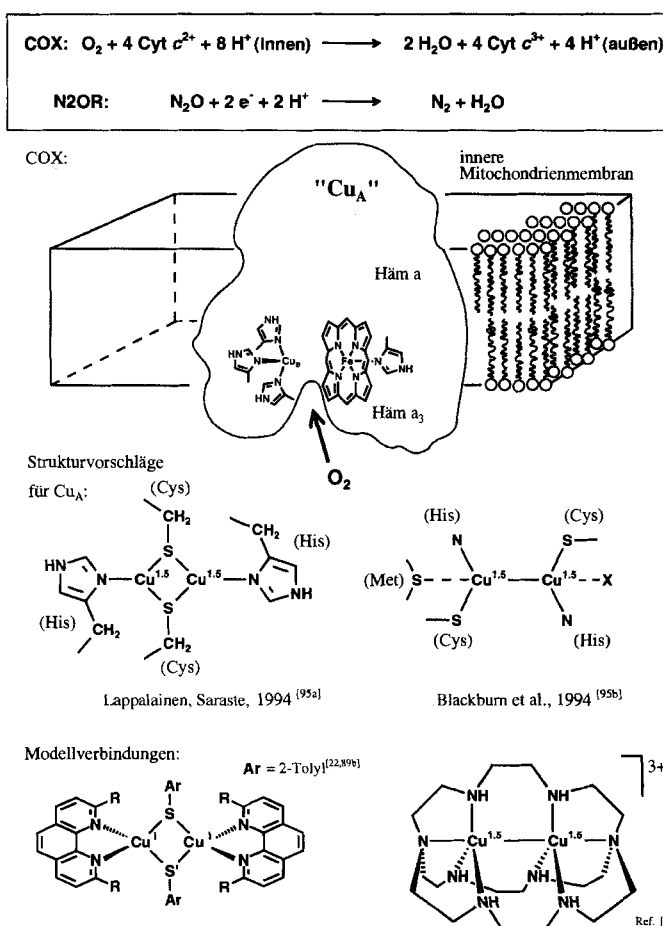


Abb. 7. Sowohl das terminale Atmungsferment Cytochrom-c-Oxidase (COX) [4, 62] wie auch die mehrere Kupferzentren enthaltende N<sub>2</sub>O-Reduktase (N2OR) [52] enthalten ein ungewöhnliches (katalytisch nicht aktives) „Cu<sub>A</sub>“-Zentrum, welches offenbar der Elektronenübertragung dient und spektroskopisch durch langwellige Lichtabsorption bei ca. 800 nm sowie ein EPR-Signal mit geringer  $g$ -Anisotropie und Kupfer-Hyperfeinaufspaltung charakterisiert ist [91 a]. Zwei Histidinreste und zwei Cystein-Anionen wurden als Liganden für Cu<sub>A</sub>-Zentren erkannt [91]; erst eingehende EPR-Studien bei verschiedenen Mikrowellenfrequenzen [93] zeigten jedoch im oxidierten Zustand die Wechselwirkung *eines* ungepaarten Elektrons mit *zwei* spektroskopisch äquivalenten Kernen <sup>63</sup>Cu/<sup>65</sup>Cu entsprechend der natürlichen Isotopenverteilung [59 b] und in Einklang mit einer delokalisiert-gemischvalenten Formulierung Cu<sup>1.5</sup>/Cu<sup>1.5</sup>. Mit diesen Ergebnissen wurde der analytisch bestimmte und schon 1987 berichtete [4a], aber erst in den letzten Jahren akzeptierte korrigierte Gehalt von drei statt zwei Kupferzentren für die Cytochrom-c-Oxidase bestätigt (Cu<sub>A</sub>-Dimer, Cu<sub>B</sub>/Häm-a<sub>3</sub>-Katalysezentrum, Häm a). N<sub>2</sub>O-Reduktase, ein Proteindimer, enthält acht Kupfer-Ionen, davon vier als zwei zweikernige Cu<sub>A</sub>-Zentren [52]. Ein EXAFS-spektroskopisch ermittelter Abstand von ca. 250 pm für das gemischvalente Cu<sub>A</sub>-Dimer in einer wasserlöslichen Proteindomäne der COX von *Bacillus subtilis* wurde als Cu-Cu-Einfachbindung und als erste Metall-Metall-Bindung im Bereich der Biologie interpretiert [95 b], während andere Vorschläge [95 a, d] von einer zweifachen Verbrückung durch Cys<sup>−</sup>-Reste ausgehen. Für beide Vorschläge existieren erste niedermolekulare Modellverbindungen [89]; am Ende von Kapitel 9.3.3 werden die im August 1995 veröffentlichten Strukturanalysen [133] zweier COX-Formen vorgestellt.

Schwefelzentren<sup>[89]</sup>. Bereits 1962 hatten Beinert et al. die Möglichkeit unterschiedlicher Kupfervalenzen in COX diskutiert<sup>[90]</sup>. Gegenüber anderen gemischvalenten Dimeren oder höheren Aggregaten im biologischen Bereich<sup>[97]</sup> fällt die Delokalisierung entsprechend der (Cu<sup>1.5+</sup>)<sub>2</sub>-Formulierung auf: Mn<sup>IV</sup>/Mn<sup>III</sup>-Zentren in Wasser-Oxidase oder anderen Enzymen<sup>[98]</sup> sowie O-Ligand-verbrückte Fe<sup>III</sup>/Fe<sup>II</sup>-Systeme<sup>[99]</sup> und entsprechende reduzierte [2Fe-2S]-Zentren sind spinlokalisiert; Delokalisierung wird nur in höheren Eisen-Schwefel-Clustern beobachtet<sup>[100]</sup>.

## 9. Kupferproteine und Disauerstoff-Spezies $O_2^{\cdot-}$

### 9.1. $O_2$ -Transport durch Hämocyanin und variable Koordination im System $Cu^{II}/O^{n-}$

Bereits eingangs wurde die erst durch Modellstudien<sup>[12]</sup> stimulierte Neu-Interpretation<sup>[9]</sup> des Bindungsmodus von  $O_2$  durch das Sauerstofftransportprotein Hämocyanin (Hc) erwähnt (Abb. 1)<sup>[10]</sup>. Dieser Typ von Proteinen tritt bei Mollusken und Arthropoden auf und ermöglicht auch größeren Tieren wie Hummern oder Tiefseekraken eine effiziente Versorgung mit  $O_2$ . Wegen des Vorteils von allosterischem Verhalten (kooperative  $O_2$ -Bindung) sind die Hämocyane wie die Hämoglobine oligomere Proteine<sup>[10]</sup>.

Trotz des vierfachen Kontakts mit den beiden Kupferzentren und der bei der Bindung an das Kupferzentrum erfolgten Zweielektronenübertragung ist eine reversible Ablösung des zweifach side-on gebundenen Disauerstoffmoleküls problemlos möglich. Erst in einem kürzlich von Reim und Krebs beschriebenen Vierkernkomplex mit von vier  $Cu^{II}$ -Zentren umgebenem  $(\mu_4-(\eta^1)_4)$ -Peroxid<sup>[101]</sup> ist die Disauerstoff-Form offenbar irreversibel fest gebunden. Eisenhaltige Sauerstofftransportproteine weisen dagegen immer nur einfach end-on gebundenes  $O_2^{n-}$  auf<sup>[3, 99]</sup>. Neben den mehrkernigen Kupfer(II)-Komplexen mit  $(\mu-\eta^1:\eta^1)$ -<sup>[11]</sup>,  $(\mu-\eta^2:\eta^2)$ - (Abb. 1)<sup>[10, 12]</sup> und  $(\mu_4-(\eta^1)_4)$ -Peroxid<sup>[101]</sup> existieren im System  $Cu_k^{II}/O_2^{n-}$  ( $k=1, 2$  oder  $3$ ) auch Verbindungen mit end-on  $(\eta^1)$ <sup>[58a]</sup> und side-on  $(\eta^2)$ -koordiniertem Superoxid<sup>[58b]</sup> sowie mit verbrückendem  $O_2^{\cdot-}$ -Radikalanion<sup>[58c]</sup>; end-on  $(\eta^1)$ -koordiniert sind Hydroperoxid-Anionen in der oxygenierten Form der Ascorbat-Oxidase (siehe Abschnitt 9.3.1)<sup>[5b]</sup> und der Cumylperoxo-Ligand  $PhMe_2COO^-$  in einem Modellkomplex mit Tris(3,5-dialkylpyrazolyl)borat als weiterem Ligand<sup>[102]</sup>.

### 9.2. Kupferhaltige Monooxygenasen im Naturstoff-metabolismus

Zweikernige Typ-3-Kupferzentren kommen nicht nur im Hämocyanin, sondern auch in Polyphenol-Oxidasen des Tyrosinase-Typs vor<sup>[76]</sup>. Diese Enzyme katalysieren die *ortho*-Hydroxylierung von Phenolen wie Tyrosin (Monooxygenase-Reaktivität) sowie die Weiteroxidation der resultierenden Brenzkatechine (Catechole) zu *ortho*-Chinonen (Catechol-Oxidasefunktion). Konkret sind derartige Kupferenzyme daher an der Synthese von Polyphenol-Naturstoffen (z.B. Catecholamin-Neurotransmittern) (siehe Schema 3)<sup>[73]</sup>, am Aufbau der Insekten-Cuticula<sup>[103a]</sup>, an der enzymatischen Bräunung von Früchten<sup>[103b]</sup> sowie an anderen Prozessen zur Bildung von Melanin-Pigmenten (siehe Schema 3)<sup>[104]</sup> beteiligt.

Mechanistische Vorstellungen zur Tyrosinase-Reaktivität implizieren die Koordination des Phenol-Sauerstoffatoms und einen Angriff am *ortho*-ständigen Kohlenstoffatom<sup>[6, 105]</sup>. Es existieren jedoch auch kupferabhängige Enzyme mit Nicht-Typ-3-Kupferzentren, die zur Monooxygenierung *aliphatischer* C-H-Bindungen befähigt sind, darunter eine unlösliche Form der Methan-Monooxygenase mit einem vermuteten Kupfertrimer<sup>[106]</sup> sowie die für die Neurotransmitter-Biosynthese (Schema 3) essentielle Dopamin- $\beta$ -Monooxygenase<sup>[73]</sup> mit zwei un-

terschiedlichen Kupferzentren<sup>[65d, 75]</sup>; eines dient der Elektronenübertragung (Ascorbat als physiologischer Elektronendonator), während das andere, katalytisch aktive Zentrum noch nicht eindeutig definiert ist<sup>[75]</sup>. Wie bei den in Abwesenheit von Kupfer kristallisierbaren eisenhaltigen Methan-Monooxygenasen<sup>[107]</sup> wird auch bei den kupferabhängigen Formen die intermediäre Bildung von organischen Substrat-Radikalen angenommen<sup>[106]</sup>. Ähnliches gilt für die Dopamin- $\beta$ -Monooxygenase (Abstraktion eines benzyllischen Wasserstoffatoms<sup>[75, 108]</sup>). In diesem Zusammenhang ist die Beobachtung relevant, daß Modellkomplexe mit  $(\mu-\eta^2:\eta^2)$ -gebundenem Disauerstoff die Fähigkeit zur intramolekularen C-H-Aktivierung (Monooxygenierung) in Alkylsubstituenten aufweisen<sup>[109]</sup>. Auf EPR-Messungen basierend und in Einklang mit den bei Untersuchungen an der Ascorbat-Oxidase gewonnenen Erkenntnissen (siehe Abschnitt 9.3.1) wurde eine  $Cu^{II}OOH$ -Spezies als reaktive Zwischenstufe vor der O-O-Bindungsspaltung postuliert.

### 9.3. Strategien für Mehrelektronenkatalyse in kupferhaltigen Oxidasen

#### 9.3.1. $Cu_3$ -Cluster in Blauen Oxidasen (Ascorbat-Oxidase, Laccase)

Blaue Oxidasen vom Typ der strukturell inzwischen gut untersuchten Ascorbat-Oxidase<sup>[5b]</sup> dienen der Erzeugung von substratspezifisch wirksamen Oxidationsäquivalenten aus der Vierelektronenreduktion von  $O_2$  zu  $2H_2O$ . Entsprechend den hohen Anforderungen<sup>[60]</sup> für eine Mehrelektronenkatalyse enthalten diese teilweise dimer vorliegenden Enzyme vier Kupferzentren pro Untereinheit, wovon eines als dem Elektronentransport dienendes und räumlich getrenntes Typ-1-Zentrum identifiziert werden kann, welches diesen Enzymen die typische blaue Farbe verleiht. Die drei anderen Metallzentren wurden aufgrund spektroskopischer Eigenschaften oft als ein Typ-1- und ein zweikerniges Typ-3-Kupferzentrum beschrieben, bevor spektroskopische Studien<sup>[6d]</sup> sowie die Kristallstrukturanalyse von Messerschmidt et al.<sup>[5b]</sup> diese Differenzierung weitgehend obsolet werden ließ (Abb. 8): Es handelt sich um ein dreikerniges Arrangement von teilweise hydroxoverbrückten Metallzentren mit Metallabständen zwischen 3.4 und 5.1 Å, je nach Bindungs- und Oxidationszustand. Die strukturelle Charakterisierung der oxidierten Form, des reduzierten Zustands, der Hydroperoxid enthaltenden oxygenierten Form sowie einer Bis(azido)-Form haben es ermöglicht, kristallographisch gestützte Reaktionsmechanismen aufzustellen<sup>[5b]</sup>.

Ausgehend von der vollständig oxidierten, aber nicht oxygenierten Form erfolgt über das vom Cluster separierte ( $d > 13$  Å) und koordinativ gesättigte Typ-1-Kupferzentrum ein sukzessiver, kontrollierter Elektronenfluß von den Substraten zum Trimer. Nach vollständiger Reduktion reagiert das Enzym mit  $O_2$  unter Bildung eines Hydroperoxo-Adduktes, wobei beide „Typ-3“-Metallzentren oxidiert werden und eines davon als Koordinationszentrum für ein  $HOO^-$ -Ion dient (stabile (Alkylperoxo)kupfer(II)-Komplexe sind mit Tris(3,5-dialkylpyrazolyl)borato-Liganden isoliert worden<sup>[102]</sup>). Im Übergangszustand der Reaktion bewirkt ein zusätzlicher intramolekularer

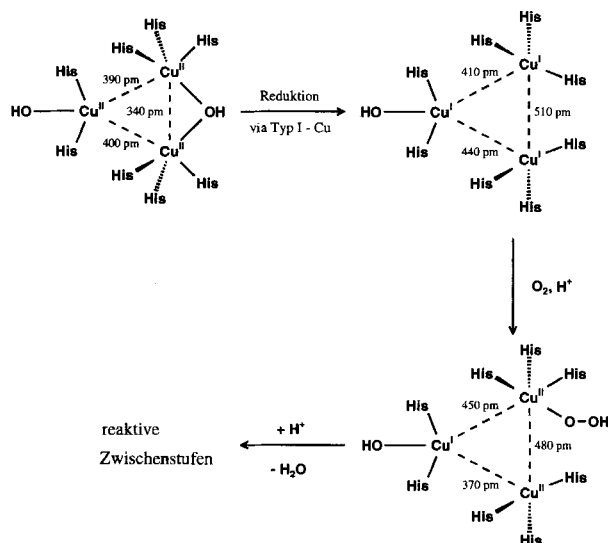
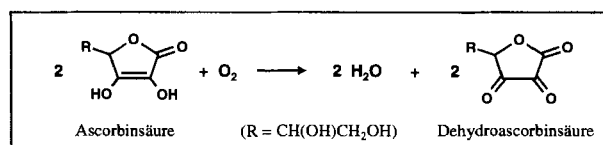


Abb. 8. Blaue Vielelektronen-Oxidasen vom Typ der Ascorbat-Oxidase enthalten pro Untereinheit neben einem der Elektronenübertragung dienenden Typ-1-Kupferzentrum drei weitere Kupfer-Ionen. Proteinkristallographischen Untersuchungen zufolge sind diese jedoch nicht zwingend als Kombination aus Typ-2- und Typ-3-Zentren (Dimer) aufzufassen, sondern eher als ein neuartiges Katalysezentrum mit drei Metallatomen anzusehen [5b]. Disauerstoff wird von diesem Trimer als end-on gebundenes Hydroperoxid koordiniert [5b], und ein kontrollierter Elektronenfluß erfolgt über das Typ-1-Kupferzentrum zum angebondenen Substrat.

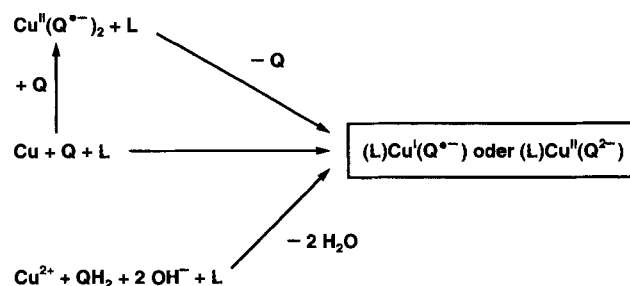
Elektronentransfer von den beiden verbleibenden  $\text{Cu}^{\text{I}}$ -Zentren die O-O-Bindungsspaltung und die Freisetzung der beiden Wassermoleküle [5b].

### 9.3.2. Wechselwirkungen zwischen Kupfer und „eingebauten“ Radikal-Cofaktoren in Nicht-Blauen Oxidasen

Im Gegensatz zu den Blauen Oxidasen nutzen die Nicht-Blauen Oxidasen lediglich den Zweielektronenprozeß  $\text{O}_2 \rightarrow \text{H}_2\text{O}_2$  zur Erzeugung von Oxidationsäquivalenten für die Substratoxidation. Diese Enzyme enthalten auch nur ein (Typ-2-)Kupferzentrum pro Untereinheit, welches allerdings zur Bewältigung der Mehrelektronenkatalyse mit organischen Redoxsystemen als im Proteingerüst eingebauten Cofaktoren strukturell und funktionell verbunden ist. Da die Zweielektronenreaktion nur ein Kupferzentrum mit dem Wechsel der Oxidationsstufe zwischen  $\text{Cu}^{\text{II}}$  und  $\text{Cu}^{\text{I}}$  involviert, müssen die Cofaktoren ebenfalls bei relativ hohem, dem  $\text{Cu}^{\text{II}}/\text{Cu}^{\text{I}}$ -Paar ähnlichem Potential einen Einelektronenredoxübergang eingehen, was zur zumindest intermediären Bildung von Radikalen Anlaß gibt. Die dafür notwendigen Voraussetzungen hinsichtlich Potential, verfügbaren Koordinations- und Katalysezentren und Radikalstabilität sind bei den Amin-Oxidasen durch ein vom Tyrosin abgeleitetes „Topachinon/Topasemichinon/Topahydrochinon“-Redoxsystem (siehe Abb. 9) [53, 57, 64] und bei der Galactose-Oxidase durch ein Tyrosyl/Tyrosin-Redoxpaar gewährleistet, wovon letzteres durch kovalente Verknüpfung mit einem Cysteinat-Rest in *or-*

*tho*(ε)-Stellung (siehe Abb. 10) sowie durch  $\pi$ - $\pi$ -Wechselwirkung mit einer Tryptophan-Gruppe zusätzlich stabilisiert ist [29].

Das Metallzentrum dient vor allem der Bindung und Aktivierung von  $\text{O}_2$  [29, 30, 57], während die organischen Cofaktoren an der Substratumsetzung beteiligt sind. Besonders auffallend ist diese Arbeitsteilung bei den unter anderem der Bildung von Bindegewebe dienenden kupferabhängigen Amin-Oxidasen (siehe Abb. 9; für kupferunabhängige Formen vgl. Schema 8 [85]): Das Metallzentrum steht offenbar in einem Valenztautomerie-Gleichgewicht  $\text{Cu}^{\text{II}}\text{-Q}^{2-} \leftrightarrow \text{Cu}^{\text{I}}\text{-Q}^{\cdot-}$  [46, 57] ( $\text{Q}$  = Chinon-Komponente), welches die Bindung von  $\text{O}_2$  an das Kupfer(I)-Zentrum ermöglicht. Sowohl Kupfer(II)-Catechol- als auch Kupfer(I)-Semichinon- und vergleichbare Radikalkomplexe sind als beständige Spezies herstellbar (Schema 9) und



Schema 9.

durch EPR-Messungen eindeutig identifizierbar [46, 57]. Die Lage des Valenztautomerie-Gleichgewichtes kann durch Variation von  $\text{Q}$ , durch vermutete sterische und Lösungsmittel-Effekte [110] sowie durch die Coliganden am Metallzentrum beeinflusst werden [46]: Stickstoff-Donorliganden  $\text{L}$  favorisieren die  $\text{Cu}^{\text{II}}$ -Catechol-Form (Catechol steht hier für die aromatische Form des Chelatliganden), während Thioether-Donorliganden  $\text{L}$  (wie auch Triorganophosphane, Olefine oder Kohlenmonoxid) den  $\text{Cu}^{\text{I}}$ -Semichinon-Zustand begünstigen [46a, d].

Der Sechsring des Topachinons weist eine durch die Anbindung in  $\gamma$ -Stellung geschützte potentiell *ortho*- und *para*-chinonide Struktur auf [111] – wie auch einige andere Chinoprotein-Cofaktoren [85]. Im oxidierten Zustand der Chinon-Form dient eine Carbonylgruppe der Bindung des primären Amin-Substrats, welches sich im Verlauf der Reaktion als Aldehyd abgespalten, während das Topachinon zur aromatischen Stufe reduziert wird (Abb. 9) [112].

Galactose-Oxidase wird von einigen parasitischen Fadenpilzarten als extrazelluläres Enzym ausgeschieden. Es katalysiert regioselektiv, aber substratspezifisch die Oxidation primärer Alkohole zu den entsprechenden Aldehyden. Die biologische Bedeutung des Enzyms ist nicht ganz geklärt. Diskutiert wird die Zersetzung faulenden Holzes durch Oxidation der dabei entstehenden Oligosaccharide, welche die bevorzugten Substrate des Enzyms sind. Möglicherweise ist jedoch die gekoppelte Erzeugung von Wasserstoffperoxid mindestens genauso wichtig [30]. Dieses kann zum Ligninabbau mittels spezieller Peroxidasen (Ligninasen) oder zur chemischen Abwehr von Bakterien dienen. Am besten untersucht ist die Galactose-Oxidase eines bestimmten Pilzstamms, der bislang der Art *Cladobotryum dendroides* (vor 1986 *Dactylium dendroides*) zugeordnet wurde. Neuere Untersuchungen belegen, daß dieser Stamm der Gattung *Fusarium* zuzuordnen ist [113].

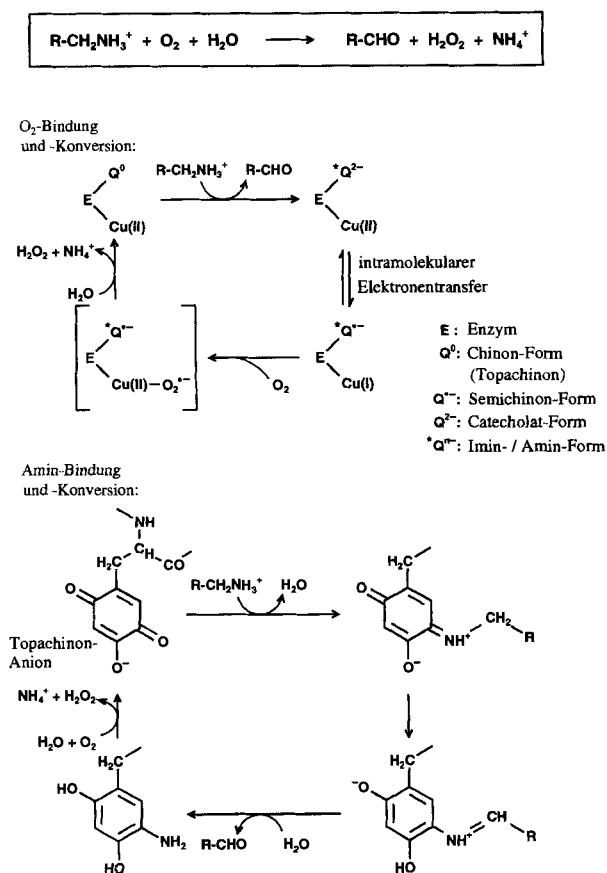


Abb. 9. Kupferhaltige Chinoproteine dienen der Aminoxidation, z.B. bei der Bindegewebsbildung (Lysyl-Oxidase) [85]. Die Kopplung der Cu<sup>II</sup>/Cu<sup>I</sup>-Redoxfunktion mit derjenigen eines modifizierten Chinons (Q) ermöglicht erstens die O<sub>2</sub>-Aktivierung durch Cu<sup>I</sup>-Zentren aufgrund einer EPR-detektierbaren Valenzisomerisierung (Q<sup>2•-</sup>)/Cu<sup>II</sup> → (Q<sup>•-</sup>)/Cu<sup>I</sup> [57] sowie zweitens die Reaktion einer freien Chinoncarbonyl-Funktion mit dem primären Amin. Lange Zeit wurde Pyrrolochinolinchinon (PQQ) als dissoziierbarer chinoider Cofaktor angenommen [85b], bevor Klinman et al. die Existenz von kovalent im Protein verankertem Topachinon (TQ) als posttranslativ umgewandeltem Tyrosinrest mit der Alternative von *o*- und *p*-Chinonbildung [111] nachwiesen [57].

Lange Zeit war unklar, wie dieses Enzym mit nur einem Kupferzentrum eine Zweielektronenreaktion katalysieren kann. Zur Deutung des Mechanismus wurde ein Cu<sup>III</sup>/Cu<sup>I</sup>-Redoxpaar<sup>[28]</sup> angenommen, was eine plausible Lösung zu sein schien, denn ein externer Cofaktor konnte nicht gefunden werden. Eingehende spektroskopische und magnetische Untersuchungen machten dann aber doch das Vorhandensein eines eingebauten organischen Cofaktors wahrscheinlich. Die Kristallstruktur des Enzyms bestätigte dies (Abb. 10)<sup>[29]</sup>: Ein Tyrosin-Rest in äquatorialer Koordination ist in *ortho(e)*-Position kovalent mit einem Cystein-Rest, der als Donorsubstituent fungiert, verknüpft. Diese Anordnung erleichtert die Oxidation zum Tyrosyl-Radikal durch Absenkung des Redoxpotentials und durch Spindelokalisation<sup>[114a]</sup>. Weiterhin wird das Radikal durch einen Tryptophan-Rest stabilisiert, der in einer für eine  $\pi$ - $\pi$ -Wechselwirkung geeigneten Position über dem Tyrosin/Cystein-Paar liegt. Angesichts der Komplexität des aktiven metallhaltigen Zentrums befinden sich Modellierungsversuche erst im Anfangsstadium<sup>[114b]</sup>. Wegen ihrer Spezifität in Reaktionen mit primären Aminen oder Alkoholen, Verbindungen mit weiter Verbreitung, sind Amin-Oxidase- und Galactose-Oxidase-Enzyme für die Biosensorik interessant<sup>[114c, d]</sup>.

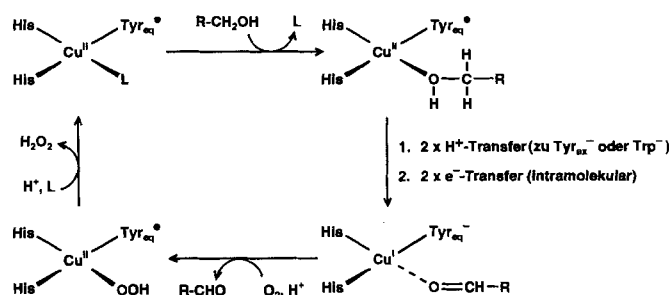
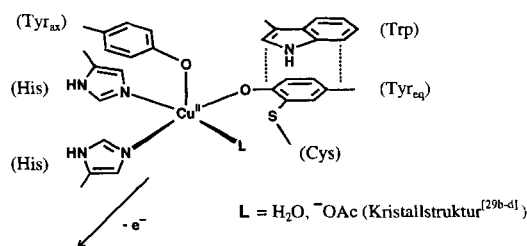
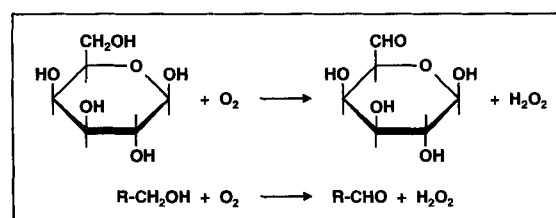
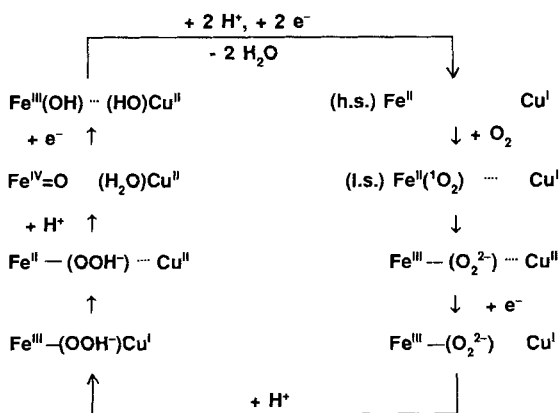


Abb. 10. Die Katalyse der angegebenen Zweielektronenreaktion durch Galactose-Oxidase aus parasitischen Pilzen wurde ursprünglich wegen des Vorliegens von nur einem Kupferzentrum mit einem Cu<sup>III</sup>/Cu<sup>I</sup>-Übergang assoziiert [18c, 28]. Die Kristallstrukturanalyse des Enzyms zeigte jedoch, daß hier ein „Typ-2“-Cu<sup>II</sup>/Cu<sup>I</sup>-System strukturell wie elektronisch mit einem äquatorial koordinierten Redoxpaar (Tyrosin/Tyrosyl-Radikal) gekoppelt ist, wobei diese Tyrosyl-Gruppe durch eine ungewöhnliche kovalente Verknüpfung in *ortho(e)*-Stellung mit einem Cystein-Schwefelatom sowie durch  $\pi$ - $\pi$ -Wechselwirkung mit einem Tryptophan-Rest ausgezeichnet ist: ein „eingebauter“ Cofaktor [29].

### 9.3.3. Das katalytische Cu/Fe-Zentrum der Cytochrom-c-Oxidase

Während dem zweikernigen Cu<sub>A</sub>-Zentrum in Untereinheit II (siehe Abschnitt 8) und dem Low-spin-Häm-a-Zentrum in der Untereinheit I von Cytochrom-c-Oxidase (COX) eine Elektronenübertragungsfunktion zukommt<sup>[62d]</sup>, erfolgt die eigentliche Vierelektronenreduktion von O<sub>2</sub><sup>[62]</sup> an einem zweikernigen Cu<sub>B</sub>/Häm-a<sub>3</sub>-Zentrum. Die beiden Metall-Ionen sind ca. 4–5 Å voneinander entfernt<sup>[95d, 133]</sup>, was eine Bindung des Triplett-Disauerstoffmoleküls sowohl an das Cu<sup>I</sup>- als auch an das High-spin-Fe<sup>II</sup>-Zentrum des Häm a<sub>3</sub> nahelegt. Offenbar kooperieren hier gerade jene beiden Metallzentren, die schon allein zur biologischen O<sub>2</sub>-Bindung befähigt sind (siehe Abschnitt 2), um die mechanistisch aufwendige Mehrelektronenreduktion<sup>[60]</sup> zu katalysieren. Man nimmt an, daß es sich bei den Zwischenstufen um die aus anderen Metalloenzymen bekannten (Hydroperoxo)kupfer(II)<sup>[5b]</sup> und Oxoferryl(IV)-Spezies<sup>[115]</sup> handelt (Schema 10)<sup>[62]</sup>.

Während das Cu<sub>B</sub>-Zentrum von der Ligation und Spektroskopie her als Typ-2-Kupferzentrum betrachtet werden kann (Abb. 7), zeichnet sich das Häm-a<sub>3</sub>-Zentrum durch einen teilweise ungesättigten Farnesyl-Substituenten<sup>[62a, 116]</sup> am Porphyrinring aus. Die Neigung von Kupfer(I) und von Eisen in niedri-



Schema 10. Katalysezyklus der  $\text{O}_2$ -Reduktion durch Cytochrom-c-Oxidase. h.s. = High-spin; l.s. = Low-spin.

gen Oxidationsstufen zur Bildung von Olefin (Cu) oder  $\pi$ -Allyl-Komplexen (Fe) hat zu Vermutungen hinsichtlich einer intermediären Koordination dieses Porphyrin-Substituenten an das heterodinucleare Metallzentrum geführt<sup>[116]</sup>. Die Reduktion von  $\text{O}_2$  in diesem „Komplex IV“ der Atmungskette ist mit der Translokation von Protonen durch die Mitochondrienmembran verknüpft<sup>[62, 133b]</sup>, um ATP als Energiespeicherprodukt der oxidativen Phosphorylierung zu bilden.

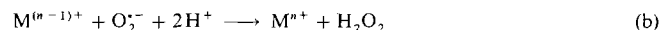
Über Versuche zur strukturellen und auch funktionellen Modellierung des heterodinuclearen  $\text{Cu}_\text{B}$ /Häm- $\text{a}_3$ -Zentrums der COX wird seit 1993 zunehmend berichtet<sup>[117]</sup>, wobei die Einstellung des richtigen Cu-Fe-Abstandes und die Frage der relevanten Oxidations- und Spinzustände, der Reaktivität hinsichtlich einer  $\text{O}_2$ -Aktivierung<sup>[117f]</sup> und der Blockierung durch Cyanid<sup>[117c, e]</sup> im Mittelpunkt stehen. Als zweiatomiges und niederwertige Übergangsmetall-Zentren im Abstand von 4.5–5.5 Å exzellent verbrückendes Ion ist  $\mu\text{-CN}^-$  ein effizienter Inhibitor der  $\text{O}_2$ -Koordination am  $\text{Cu}_\text{B}$ /Häm- $\text{a}_3$ -Zentrum und damit der Zellatmung (Toxizitätswirkung von Cyanid)<sup>[118]</sup>.

Im August 1995 haben zwei Forschergruppen über die erfolgreiche strukturelle Charakterisierung von Cytochrom-c-Oxidase-Formen mit 2.8 Å Auflösung berichtet. Im einen Fall handelt es sich um die Säugetier-COX aus Rinderherz-Mitochondrien (vollständiges Enzym, „das größte bislang kristallisierte und mit atomarer Auflösung untersuchte Membranprotein“)<sup>[133a]</sup>, im anderen Fall um das Enzym aus dem Bodenbakterium *Paracoccus denitrificans* (vier Untereinheiten, Antikörper-Assoziat)<sup>[133b]</sup>. Bezüglich der Kupferzentren ergaben sich folgende Details: Das  $\text{Cu}_\text{A}$ -Zentrum auf der cytosolischen Seite außerhalb des eigentlichen Membranbereiches ist zweikernig mit zwei verbrückenden Cysteinat-Schwefelatomen (vgl. die linke Hypothese in Abb. 7). Im planaren  $\text{CuScu}'$ -Ring beträgt der Kupfer-Kupfer-Abstand 2.7 Å<sup>[133a]</sup> bzw. 2.6 Å<sup>[133b]</sup>. Beide Metall-Ionen sind noch jeweils von einer Histidin-Seitenkette koordiniert; zur Vervollständigung der Vierfachkoordination (verzerrt tetraedrisch) bindet eines der  $\text{Cu}_\text{A}$ -Ionen ein Methionin-Schwefelzentrum, während das andere von einem Carbonylsauerstoffatom einer Peptidbindung koordiniert wird. Im (oxidierten) Ruhezustand des Enzyms sind die  $\text{Cu}_\text{B}$ - und  $\text{Fe}_{\text{a}_3}$ -Ionen 4.5 Å<sup>[133a]</sup> bzw. 5.2 Å<sup>[133b]</sup> voneinander entfernt. Das  $\text{Cu}_\text{B}$ -Zentrum wird von den Imidazol-Ringen (ImH) dreier Histidin-Reste koordiniert, von denen einer ungewöhnlich be-

weglich scheint (bakterielle COX<sup>[133b]</sup>) und möglicherweise an der redoxgekoppelten Protonentranslokalisierung beteiligt ist. Von der Frankfurter Gruppe stammt der Vorschlag<sup>[133b]</sup>, daß die Reaktionssequenz  $\text{Cu}^{2+}/\text{Im}^- \rightarrow \text{Cu}^+/\text{ImH} \rightarrow \text{O}_2/\text{Cu}^+ + \text{HImH}^+$  am Beginn des Mechanismus steht, der den Protonentransport mit der Bindung und Umsetzung von  $\text{O}_2$  verknüpft (vgl. den Reaktionscyclus für Superoxid-Dismutase in Abb. 11). In der Rinderherz-COX ist der Farnesyl-Rest an einer Wasserstoffbrückenbindung beteiligt, die vermutlich indirekt zur strukturellen Stabilisierung von  $\text{Cu}_\text{B}$  beiträgt<sup>[133a]</sup>.

#### 9.4. Cu,Zn-Superoxid-Dismutase

Cu,Zn-Superoxid-Dismutase (SOD)<sup>[119, 120]</sup> ist ein verbreitetes Enzym, dessen Funktion trotz der klaren Definition durch den Namen noch teilweise umstritten ist. Neben der eindeutigen Fähigkeit zur Entgiftung von  $\text{O}_2^{\cdot-}/\text{HO}_2^{\cdot}$ -Sauerstoffradikalen könnte dem Protein wegen seiner Häufigkeit auch eine Metall-Speicher- und -Transport-Funktion zukommen. Die Disproportionierung (Dismutation) des metastabilen Superoxid-Ions (IUPAC Name: Hyperoxid-Ion) in Disauerstoff und Peroxid, das enzymatisch weiter metabolisiert wird, kann grundsätzlich durch viele redoxaktive Übergangsmetall-Ionen katalysiert werden<sup>[120]</sup>; die Gleichungen (a) und (b) erläutern den Sachverhalt.



Es existieren Superoxid-Dismutasen mit  $\text{M} = \text{Cu}$ , Fe und Mn, von welchen letztere vor allem in den Mitochondrien<sup>[121, 122]</sup>, erstere in Erythrozyten zu finden sind<sup>[119, 120]</sup>. Angesichts der Labilität des Substrats und der Triebkraft der Reaktion sind die Anforderungen an die SODs bezüglich der Reaktivität zunächst nicht allzu groß; es muß allerdings erstens für rasche Diffusion von  $\text{O}_2^{\cdot-}$ -Ionen zum Reaktionsort gesorgt werden und zweitens muß die Stabilität des Enzyms gegenüber  $\text{O}_2$ ,  $\text{O}_2^{\cdot-}$ ,  $\text{H}_2\text{O}_2$  und die umgebenden Proteine<sup>[126]</sup> gesichert sein. Die erste Voraussetzung wird gewährleistet durch die „Leitung“ des Pseudohalogenid-artigen  $\text{O}_2^{\cdot-}$ -Radikal-Anions oder dessen konjugierter Säure  $\text{HO}_2^{\cdot}$  entlang eines mit kationischen, die Bildung von H-Brücken anbietenden Aminosäureresten gesäumten trichterförmigen Kanals an die aktive Stelle. Bei dieser handelt es sich um ein durch drei Imidazol-Liganden (Histidin-Reste) und eine Imidazolat-Gruppe eines deprotonierten,  $\text{Zn}^{\text{II}}$ -gebundenen Histidin-Restes koordiniertes Typ-2-Kupfer-Zentrum<sup>[119, 123]</sup>. Kürzlich konnte über den Ersatz von anionischem Glutamat im Kanal durch neutrales Glutamin mit Hilfe ortsspezifischer Mutation eine unter bestimmten Bedingungen zusätzliche Beschleunigung der Diffusion und damit der Reaktion erreicht werden, was als Optimierung eines scheinbar bereits perfekten Enzyms angesehen werden kann (Abb. 11)<sup>[124]</sup>.

Die zweite Voraussetzung, die hohe Stabilität gerade dieses Enzyms, ist zweifellos erfüllt, wie die noch weitgehend erhaltene Aktivität von Cu,Zn-SOD aus 3000 Jahre altem, mumifiziertem Gewebe demonstriert hat<sup>[125]</sup>. Neben der Langzeitstabilität, der Strukturintegrität und der Unempfindlichkeit gegenüber den aggressiven Substrat- und Produkt-Molekülen muß insbesonde-

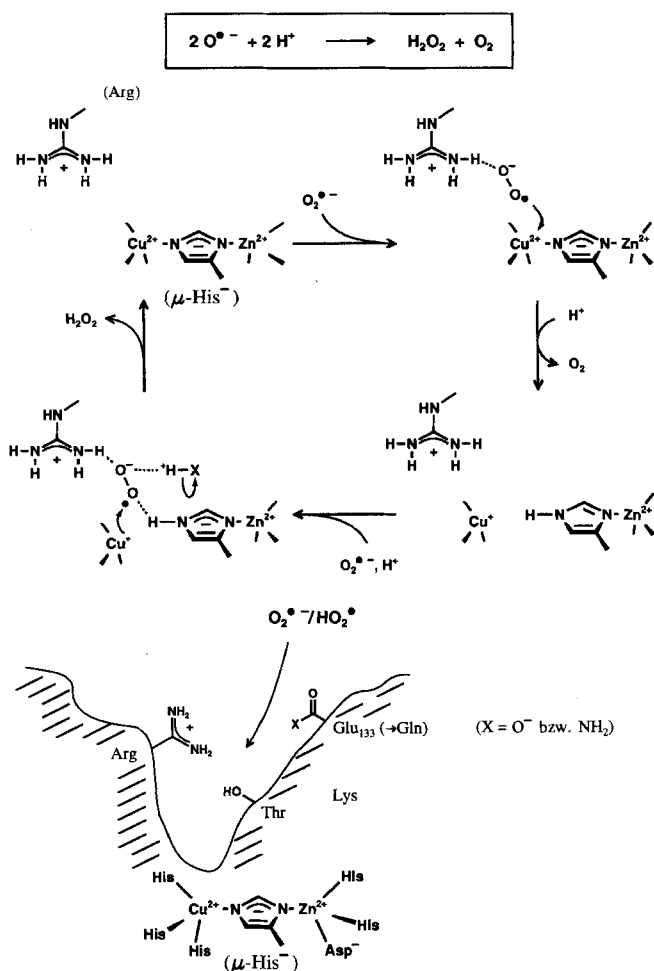


Abb. 11. Die Cu,Zn-Superoxid-Dismutase in den Erythrozyten von Säugetieren ist ein homodimeres Enzym und enthält je Untereinheit ein Zink- und ein Kupferzentrum. Beide Metall-Ionen sind in biologisch einzigartiger Weise durch den für die Funktion unabdingbaren Imidazolato-Brückenliganden eines Histidinrestes verknüpft [119]. Kupfer ist das redoxkatalytisch wirkende Metall, welches metastabiles Superoxid als  $\text{Cu}^{\text{I}}$  zu Peroxid reduziert und als  $\text{Cu}^{\text{II}}$  zu  $\text{O}_2$  oxidiert. Das Enzym darf zwar selbst nicht durch die genannten Disauerstoffspezies angegriffen werden, muß jedoch andererseits das reaktive  $\text{O}_2^{\cdot-}$ -Ion möglichst effizient abbauen (Diffusionskontrolle). Hierzu ist neben raschen Elektronen- und Protonentransferprozessen am eigentlichen Reaktionszentrum die Beschleunigung der Diffusion von  $\text{O}_2^{\cdot-}$ -Ionen zum aktiven Zentrum notwendig, welche durch ortsspezifische Mutation ( $\text{Glu} \rightarrow \text{Gln}$ ) sogar noch erhöht werden konnte. Defektvarianten der Cu,Zn-SOD können andererseits zur erblichen Form der amyotrophischen Lateralsklerose (ALS), einer neurodegenerativen Erkrankung im motorischen Bereich, führen [8].

re auch das essentielle Kupferzentrum fest gebunden werden, da es als  $\text{Cu}^{\text{II}}$ -Ion sonst leicht durch Serumalbumin komplexiert werden kann [126]. Vermutlich dient auch die ungewöhnliche Anordnung mit einem zusätzlichen zweifach positiv geladenem Metall-Ion ( $\text{Zn}^{2+}$ ) und einem – biologisch bisher einzigartig – verbrückenden Imidazol-Ring eines Histidin-Restes der Stabilität, da bei selektiver Entfernung des Zink-Ions zwar die Stabilisierung, nicht aber die Funktion des Enzyms beeinträchtigt zu sein scheint.

Die essentielle Rolle der Cu,Zn-SOD zeigt sich nicht nur durch ihre pharmakologische Verwendung bei Entzündungskrankheiten und in der Prophylaxe von Strahlenschäden [127] sowie in ihrer Bedeutung für den Alterungsprozeß [128], auch scheinbar geringfügige Mutationen können – wie in Abschnitt 4 dargestellt – gravierende gesundheitliche Folgen haben [8]. Ob-

wohl Superoxid-Ionen in phagozytischen Zellen durch den „respiratory burst“ der NADPH-Oxidase gezielt erzeugt und für Abwehrzwecke im Immunsystem genutzt werden [129], ist ein unkontrolliertes Auftreten während des Transports von  $\text{O}_2$  in Erythrozyten [120], während der mitochondrialen Atmung [122] oder im Zuge der Aktivität von molybdänhaltiger Xanthin-Oxidase [8c] unerwünscht. Auch an der Entstehung des insulinabhängigen Diabetes mellitus (Typ-I-Diabetes) sind vermutlich cytotoxische Radikale beteiligt: Viele Indizien sprechen dafür [130], daß bei der Zerstörung der insulinproduzierenden  $\beta$ -Zellen der Bauchspeicheldrüse aktive Sauerstoffspezies wie Superoxid-Ionen, Hydroxylradikale oder Peroxynitrit-Ionen eine maßgebliche Rolle spielen. Experimente an Mäusen mit erhöhter Produktion von Cu,Zn-Superoxid-Dismutase zeigten, daß deren  $\beta$ -Zellen eine deutlich höhere Toleranz gegenüber Diabetesinduktion durch oxidativen Streß [130] aufweisen.

## 10. Kupfer im Stickstoffkreislauf

Die Produktion von Oxidationsäquivalenten und letztendlich von  $\text{O}_2$  durch photosynthetisierende Organismen hat nicht nur zur besseren Bioverfügbarkeit von Kupfer, sondern auch zur Notwendigkeit eines biologischen Metabolismus der Stickstoff/Sauerstoff-Verbindungen geführt [3a–c]. Neben Eisen und dem als  $\text{Mo}^{\text{VI}}\text{O}_4^{2-}$ -Ion bioverfügbar gewordenen Molybdän [3c, 68b] spielen daher auch Kupferenzyme eine Rolle bei der biologischen Denitrifikation [13b, 14, 15, 52].

Nähere Details sind über die  $\text{N}_2\text{O}$ -Reduktase (N2OR, siehe Abb. 7) aus *Pseudomonas stutzeri* bekannt, die neben den schon in Abschnitt 8 vorgestellten zweikernigen  $\text{Cu}_2$ -Zentren katalytisch aktive „ $\text{Cu}_2$ “-Zweikernzentren aufweist [14c, 52]. Eingangs erwähnt wurde auch bereits eine kupferhaltige Form mikrobieller Nitrit-Reduktasen [14, 52], deren katalytisch aktive Metallzentren (neben Typ-1-Kupfer) im kristallographisch untersuchten  $\text{Cu}^{\text{II}}$ -Ruhezustand ungewöhnlich, d.h. nahezu tetraedrisch koordiniert sind (Pseudo-Typ-2-Kupfer, Abb. 2) [15]. Zahlreiche neue Ergebnisse, die anhand von Modellkomplexen mit Tris(alkylpyrazolyl)borato-Liganden [16, 17] erhalten werden konnten, lassen vermuten, daß neben den  $\text{Cu}^{\text{II}}$ -Nitrit-Vorläuferkomplexen die auch technisch-katalytisch relevanten und spektroskopisch sehr bemerkenswerten [16b]  $\text{Cu}^{\text{I}}$ -Nitrosylradikal-Komplexe eine wichtige Zwischenstufe der Reaktion sind. Noch weitgehend ungeklärt ist der Weg von der Nitrosyl-Stufe zum Distickstoffmonoxid (Abb. 2) [13].

## 11. Zusammenfassung und Ausblick

Obwohl Kupfer vermutlich erst in zweiwertiger Form, d.h. nach ausreichender photosynthetischer Erzeugung von Oxidationsäquivalenten vor ca.  $3 \times 10^9$  Jahren in signifikanter Menge bioverfügbar wurde, enthalten sämtliche kupferhaltigen Biomoleküle das Element in einwertiger Form, entweder allein oder in Form des  $\text{Cu}^{\text{II}}/\text{Cu}^{\text{I}}$ -Redoxpaares. Die Kupfer(I)-Stufe zeichnet sich gegenüber anderen beständigen Metallmonokationen durch hohe, aber nicht unphysiologisch hohe *Einelektronen*-Redoxpotentiale sowie durch eine Bevorzugung niedriger Koordinationszahlen (3–4) bei variabler, weil nicht durch Li-

gandenfeldeffekte beeinflusster Koordinationsgeometrie aus. Bemerkenswert sind ferner die Fähigkeiten zur Bindung von Olefinen und zur Aktivierung von  $O_2$  im Triplett-Grundzustand; letztere teilen  $Cu^I$ -Ionen im biologischen Bereich nur noch mit High-spin- $Fe^{II}$ -Ionen und mit den formal antiaromatischen 1,5-Dihydroflavinen.

Die Einelektronen-Redoxreaktivität im System  $Cu^{II}/Cu^I$  bei Redoxpotentialen zwischen 0.0 und +1.0 V macht Kupferzentren „kompatibel“ mit mäßig oxidierenden organischen und anorganischen Radikalen, die als Bestandteile biologisch relevanter Redoxsysteme erkannt worden sind. Nachgewiesen als derartige Partner von Kupferzentren in Enzymen wurden bereits die Redoxpaare Chinon/Semichinon, Tyrosyl/Tyrosin,  $O_2/O_2^{\cdot-}$  /  $O_2^{\cdot-}$  und  $NO^+/NO^{\cdot}$ .

Angesichts der rasanten, gleichwohl parallelen Entwicklung von medizinischer, mikrobiologischer, biochemischer und anorganisch-chemischer Forschung der letzten zehn Jahre auf dem Gebiet der Kupfer-Komplexverbindungen kann erwartet werden, daß weitere überraschende Entdeckungen gemacht und daß die neuen molekularbiologischen Verfahren, speziell der ortsspezifischen Mutation, eine gezielte, aktive Gestaltung kupferhaltiger Proteine ermöglichen werden. Offen ist beispielsweise die Frage, welche speziellen Koordinationsverhältnisse in kupferabhängigen Monooxygenasen vorliegen und ob  $Cu^I$ -Zentren als Rezeptoren für das Pflanzenhormon Ethylen fungieren<sup>[131]</sup>. Spekulativ und dennoch faszinierend bleiben die Versuche, dieses einzigartige Element zeitlich und hinsichtlich seiner Funktion in der Entwicklungsgeschichte des Lebens einzuordnen<sup>[3c, 19, 54b, 132]</sup>.

*Eigene Arbeiten zur Chemie des Kupfers wurden durch Schwerpunktprogramme der DFG sowie durch den Fonds der Chemischen Industrie gefördert, wofür wir sehr herzlich danken. Dank gilt ebenfalls den unmittelbar beteiligten Mitarbeitern, insbesondere den Herren Dr. Stephan Kohlmann, Dr. Conny Vogler, Dr. Michael Moscherosch, Dipl.-Chem. Eberhard Waldhör, Dipl.-Chem. Andreas Stange, Dipl.-Chem. Christoph Titze und Frau Dipl.-Chem. Manuela Schwach. Frau Dipl.-Chem. Angela Winkelmann danken wir für die Unterstützung bei der Erstellung dieses Manuskripts.*

Eingegangen am 23. Mai 1995 [A 115]

- [1] M. C. Linder, C. A. Goode, *Biochemistry of Copper*, Plenum, New York, 1991.
- [2] *Bioinorganic Chemistry of Copper* (Hrsg.: K. D. Karlin, Z. Tyeklar), Chapman & Hall, New York, 1993.
- [3] a) W. Kaim, B. Schwederski, *Bioanorganische Chemie*, 2. Aufl., Teubner, Stuttgart, 1995; b) *Bioinorganic Chemistry: Inorganic Elements in the Chemistry of Life*, Wiley, Chichester, 1994; c) J. J. R. Fraústo da Silva, R. J. P. Williams, *The Biological Chemistry of the Elements*, Clarendon, Oxford, 1991; d) J. A. Cowan, *Inorganic Biochemistry*, VCH, New York, 1993; e) S. J. Lippard, J. M. Berg, *Principles of Bioinorganic Chemistry*, University Science Books, Mill Valley, 1994.
- [4] a) G. C. M. Steffens, R. Bielwald, G. Buse, *Eur. J. Biochem.* 1987, 164, 295; b) G. C. M. Steffens, T. Soulimane, G. Wolff, G. Buse, *ibid.* 1993, 213, 1149.
- [5] a) R. Huber, *Angew. Chem.* 1989, 101, 849; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* 1989, 28, 848; b) A. Messerschmidt, H. Luecke, R. Huber, *J. Mol. Biol.* 1993, 230, 997.
- [6] a) E. I. Solomon, M. J. Baldwin, M. D. Lowery, *Chem. Rev.* 1992, 92, 521; b) E. I. Solomon, M. D. Lowery, *Science* 1993, 259, 1575; c) J. A. Guckert, M. D. Lowery, E. I. Solomon, *J. Am. Chem. Soc.* 1995, 117, 2817; d) D. J. Spira-Solomon, M. D. Allendorf, E. I. Solomon, *ibid.* 1986, 108, 5318.
- [7] a) C. Vulpe, B. Levinson, S. Whitney, S. Packman, J. Gitschier, *Nat. Genet.* 1993, 3, 7; b) K. Davies, *Nature (London)* 1993, 361, 98.

- [8] a) D. R. Rosen, T. Siddique, D. Patterson, D. A. Figlewicz, P. Sapp, A. Hentati, D. Donaldson, J. Goto, J. P. O'Regan, H.-X. Deng, Z. Rahmani, A. Krizus, D. McKenna-Yasek, A. Cayabyab, S. M. Gaston, R. Berger, R. E. Tanzi, J. J. Halperin, B. Herzfeldt, R. Van den Bergh, W.-Y. Hung, T. Bird, G. Deng, D. W. Mulder, C. Smyth, N. G. Laing, E. Soriano, M. A. Pericak-Vance, J. Haines, G. A. Rouleau, J. S. Gusella, H. R. Horvitz & R. H. Brown, Jr., *Nature (London)* 1993, 362, 59; b) H.-X. Deng, A. Hentati, J. A. Tainer, Z. Iqbal, A. Cayabyab, W.-Y. Hung, E. D. Getzoff, P. Hu, B. Herzfeldt, R. P. Roos, C. Warner, G. Deng, E. Soriano, C. Smyth, H. E. Parge, A. Ahmed, A. D. Roses, R. A. Hallewell, M. A. Pericak-Vance, T. Siddique, *Science* 1993, 261, 1047; c) J. O. McNamara, I. Fridovich, *Nature (London)* 1993, 362, 20; d) J. Marx, *Science* 1993, 261, 986; e) M. E. Gurney, H. Pu, A. Y. Chiu, M. C. Dal Canto, C. Y. Polchow, D. D. Alexander, J. Caliendo, A. Hentati, Y. W. Kwon, H.-X. Deng, W. Chen, P. Zhai, R. L. Sufit, T. Siddique, *ibid.* 1994, 264, 1772; f) J. A. Graden, L. M. Ellerby, J. A. Roe, J. S. Valentine, *J. Am. Chem. Soc.* 1994, 116, 9743.
- [9] a) P. K. Ross, E. I. Solomon, *J. Am. Chem. Soc.* 1990, 112, 5871; b) M. J. Baldwin, D. E. Root, J. E. Pate, K. Fujisawa, N. Kitajima, E. I. Solomon, *ibid.* 1992, 114, 10421; c) F. Tuczek, E. I. Solomon, *ibid.* 1994, 116, 6916; d) E. I. Solomon, F. Tuczek, D. E. Root, C. A. Brown, *Chem. Rev.* 1994, 94, 827.
- [10] a) K. A. Magnus, H. Ton-That, J. E. Carpenter, *Chem. Rev.* 1994, 94, 727; b) J. Ling, L. P. Nestor, R. S. Czernuszewicz, T. G. Spiro, R. Fraczekiewicz, K. D. Sharma, T. M. Loehr, J. Sanders-Loehr, *J. Am. Chem. Soc.* 1994, 116, 7682.
- [11] a) R. R. Jacobson, Z. Tyeklar, A. Farooq, K. D. Karlin, S. Liu, J. Zubieta, *J. Am. Chem. Soc.* 1988, 110, 3690; b) Z. Tyeklar, R. R. Jacobson, N. Wei, N. N. Murthy, J. Zubieta, K. D. Karlin, *ibid.* 1993, 115, 2677.
- [12] a) N. Kitajima, K. Fujisawa, Y. Moro-oka, K. Toriumi, *J. Am. Chem. Soc.* 1989, 111, 8975; b) J. Kitajima, K. Fujisawa, C. Fujimoto, Y. Moro-oka, S. Hashimoto, T. Kitagawa, K. Toriumi, K. Tatsumi, A. Nakamura, *ibid.* 1992, 114, 1277; c) N. Kitajima, Y. Moro-oka, *Chem. Rev.* 1994, 94, 737; d) vgl. hierzu einen analogen  $S_2$ -Komplex: K. Fujisawa, Y. Moro-oka, N. Kitajima, *J. Chem. Soc. Chem. Commun.* 1994, 623.
- [13] a) C. L. Hulse, B. A. Averill, J. M. Tiedje, *J. Am. Chem. Soc.* 1989, 111, 2322; b) B. A. Averill, *Angew. Chem.* 1994, 106, 2145; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* 1994, 33, 2057; c) C. E. Ruggiero, S. M. Carrier, W. B. Tolman, *ibid.* 1994, 106, 917 bzw. 1994, 33, 895.
- [14] a) 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; b) T. Brittain, R. Blackmore, C. Greenwood, A. J. Thomson, *Eur. J. Biochem.* 1992, 209, 793; c) W. G. Zumft, *Arch. Microbiol.* 1993, 160, 253.
- [15] a) J. W. Godden, S. Turley, D. C. Teller, E. T. Adman, M. Y. Liu, W. J. Payne, J. LeGall, *Science* 1991, 253, 438; b) B. D. Howes, Z. H. L. Abraham, D. J. Lowe, T. Brüser, R. R. Eady, B. E. Smith, *Biochemistry* 1994, 33, 3171.
- [16] a) S. M. Carrier, C. E. Ruggiero, W. B. Tolman, *J. Am. Chem. Soc.* 1992, 114, 4407; b) C. E. Ruggiero, S. M. Carrier, W. E. Antholine, J. W. Whittaker, C. J. Cramer, W. B. Tolman, *ibid.* 1993, 115, 11285; c) W. B. Tolman, S. M. Carrier, C. E. Ruggiero, W. E. Antholine, J. W. Whittaker in *Lit.* [2], S. 406; d) P. P. Paul, Z. Tyeklar, A. Farooq, K. D. Karlin, S. Liu, J. Zubieta, *J. Am. Chem. Soc.* 1990, 112, 2430.
- [17] a) J. A. Halfen, W. B. Tolman, *J. Am. Chem. Soc.* 1994, 116, 5475; b) J. A. Halfen, S. Mahapatra, M. M. Olmstead, W. B. Tolman, *ibid.* 1994, 116, 2173.
- [18] a) R. L. Deming, A. L. Allred, A. R. Dahl, A. W. Herlinger, M. O. Kestner, *J. Am. Chem. Soc.* 1976, 98, 4132; b) F. A. Cotton, G. Wilkinson, *Anorganische Chemie*, VCH, Weinheim, 1985, S. 620; c) *ibid.*, S. 1357.
- [19] E.-I. Ochiai, *J. Chem. Educ.* 1986, 63, 942.
- [20] a) A. S. Moffat, *Science* 1994, 264, 778; b) M. N. Hughes, R. K. Poole, *Metals and Micro-organisms*, Chapman & Hall, London, 1989; c) K. Bockecker, *Metall* 1980, 34, 36.
- [21] M. A. Masood, P. S. Zacharias, *J. Chem. Soc. Dalton Trans.* 1991, 111.
- [22] A. F. Stange, E. Waldhör, M. Moscherosch, W. Kaim, *Z. Naturforsch. B* 1995, 50, 115.
- [23] a) J. G. Noltes, G. van Koten in *Comprehensive Organometallic Chemistry*, Vol. 2 (Hrsg.: G. Wilkinson, F. G. A. Stone, E. Abel), Pergamon, Oxford, 1982, S. 709; b) *Organocopper Reagents* (Hrsg.: R. J. K. Taylor), Oxford University Press, Oxford, 1994.
- [24] a) A. Berkessel, *Bioorg. Chem.* 1991, 19, 101; b) P. J. Toscano, L. G. Marzilli, *Prog. Inorg. Chem.* 1984, 31, 105.
- [25] W. Kaim, T. Stahl, C. Vogler, S. Kohlmann in *Unkonventionelle Wechselwirkungen in der Chemie metallischer Elemente* (Hrsg.: B. Krebs), VCH, Weinheim, 1992, S. 81.
- [26] a) Das Konzept vom entatischen (gespannten) Zustand besagt, daß die durch eine spezielle Proteinkonformation hervorgerufene energiereichere Anordnung der Liganden um das aktive Metallzentrum das Erreichen des Übergangszustandes der Reaktion erleichtert: B. L. Vallee, R. J. P. Williams, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1968, 59, 498; b) R. J. P. Williams, *J. Mol. Catal.* (Review Issue) 1986, 1; c) B. G. Malmström, *Eur. J. Biochem.* 1994, 223, 711.
- [27] S. Knapp, T. P. Keenan, X. Zhang, R. Fikar, J. A. Potenza, H. J. Schugar, *J. Am. Chem. Soc.* 1990, 112, 3452.



- [28] G. A. Hamilton, P. K. Adolf, J. de Jersey, G. C. DuBois, G. R. Dyrkacz, R. D. Libby, *J. Am. Chem. Soc.* **1978**, *100*, 1899.
- [29] a) N. Ito, S. E. V. Phillips, C. Stevens, Z. B. Ogel, M. J. McPherson, J. N. Keen, K. D. S. Yadav, P. F. Knowles, *Faraday Discuss. Chem. Soc.* **1993**, *93*, 75; b) *Nature (London)* **1991**, *350*, 87; c) P. F. Knowles, N. Ito in *Perspectives on Bioinorganic Chemistry*, Vol. 2 (Hrsg.: R. W. Hay, J. R. Dilworth, K. B. Nolan), Jai Press, London, **1993**, S. 207; d) N. Ito, S. E. V. Phillips, K. D. S. Yadav, P. F. Knowles, *J. Mol. Biol.* **1994**, *238*, 794.
- [30] J. W. Whittaker in *Metal Ions in Biological Systems*, Vol. 30 (Hrsg.: H. Sigel, A. Sigel), Dekker, New York, **1994**, S. 315.
- [31] a) M. R. McDonald, W. M. Scheper, H. D. Lee, D. W. Margerum, *Inorg. Chem.* **1995**, *34*, 229; b) vgl. hierzu auch M. Kaupp, H. G. von Schnering, *Angew. Chem.* **1995**, *107*, 1076; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1995**, *34*, 986; J. P. Snyder, *ibid.* **1995**, *107*, 1076 bzw. **1995**, *34*, 987.
- [32] a) K. Prassides, A. Lappas, *Chem. Br.* **1994**, *30*, 730; b) A. W. Sleight, *Acc. Chem. Res.* **1995**, *28*, 103. c) Gemischtvalenz im Sinne der Formulierung  $[\text{Cu}^{+4}(\text{DCNQI}^{-(1+\delta/2)})_2]$  findet man für anisotrop leitfähige Kristalle und Filme mit teilrednzten  $\text{N,N}'$ -Dicyano-*p*-chinodimin-Liganden (DCNQI): R. Burkert, H. W. Helberg, J. U. von Schütz, *Synth. Met.* **1993**, *55–57*, 2519.
- [33] a) M. Kitajima, *Adv. Inorg. Chem.* **1993**, *39*, 1; b) N. Kitajima, K. Fujisawa, M. Tanaka, Y. Moro-oka, *J. Am. Chem. Soc.* **1992**, *114*, 9232; c) P. K. Bharadwaj, J. A. Potenza, H. J. Schugar, *ibid.* **1986**, *108*, 1351; d) C. R. Andrew, H. Yeom, J. S. Valentine, B. G. Karlsson, N. Bonander, G. van Pouderoyen, G. W. Canters, T. M. Loehr, J. Sanders-Loehr, *ibid.* **1994**, *116*, 11489.
- [34] a) H. tom Dieck, L. Stamp, *Z. Naturforsch. B* **1990**, *45*, 1369; b) M. J. Begley, P. Hubberstey, C. E. Russell, P. H. Walton, *J. Chem. Soc. Dalton Trans.* **1994**, 2483; c) C. Vogler, W. Kaim, H.-D. Hausen, *Z. Naturforsch. B* **1993**, *48*, 1470, zit. Lit.; d) C. Vogler, H.-D. Hausen, W. Kaim, S. Kohlmann, H. E. A. Kramer, J. Rieker, *Angew. Chem.* **1989**, *101*, 1734; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1989**, *28*, 1659.
- [35] E. C. Constable, *Chem. Ind. (London)* **1994**, 56.
- [36] J.-M. Lehn, *Angew. Chem.* **1990**, *102*, 1347; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1990**, *29*, 1304.
- [37] a) M. Cesario, C. O. Dietrich-Buchecker, J. Guilhem, C. Pascard, J.-P. Sauvage, *J. Chem. Soc. Chem. Commun.* **1985**, 244; b) C. O. Dietrich-Buchecker, B. Frommberger, I. Lür, J.-P. Sauvage, F. Vögtle, *Angew. Chem.* **1993**, *105*, 1526; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1993**, *32*, 1434.
- [38] a) C. O. Dietrich-Buchecker, J. P. Sauvage, A. DeCian, J. Fischer, *J. Chem. Soc. Chem. Commun.* **1994**, 2231; b) vgl. hierzu auch die Knotenstruktur von Ascorbat-Oxidase: C. Liang, K. Mislow, *J. Am. Chem. Soc.* **1994**, *116*, 11189; *ibid.* **1995**, *117*, 4201.
- [39] a) M. Moscherosch, J. S. Field, W. Kaim, S. Kohlmann, M. Krejčík, *J. Chem. Soc. Dalton Trans.* **1993**, 211; b) M. Schwach, H.-D. Hausen, W. Schwarz, W. Kaim, *Chem. Eur. J.* im Druck; c) vgl. auch S. Kitagawa, M. Kondo, S. Kawata, S. Wada, M. Maekawa, M. Munakata, *Inorg. Chem.* **1995**, *34*, 1455.
- [40] P. Baxter, J.-M. Lehn, A. DeCian, J. Fischer, *Angew. Chem.* **1993**, *105*, 92; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1993**, *32*, 69.
- [41] a) B. Schoentjes, J.-M. Lehn, *Helv. Chim. Acta* **1995**, *78*, 1; b) E. C. Constable, A. J. Edwards, M. J. Hannon, P. R. Raithby, *J. Chem. Soc. Chem. Commun.* **1994**, 1991.
- [42] a) P. N. W. Baxter, J.-M. Lehn, J. Fischer, M.-T. Youinou, *Angew. Chem.* **1994**, *106*, 2432; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1994**, *33*, 2284; b) H. Sleiman, P. Baxter, J.-M. Lehn, K. Rissanen, *J. Chem. Soc. Chem. Commun.* **1995**, 715.
- [43] a) W. Kaim, S. Kohlmann, J. Jordanov, D. Fenske, *Z. Naturforsch. B* **1991**, *598/599*, 217; b) C. Vogler, W. Kaim, *Z. Naturforsch. B* **1992**, *47*, 1057.
- [44] W. E. B. Shepard, B. F. Anderson, D. A. Lewandowski, G. E. Norris, D. N. Baker, *J. Am. Chem. Soc.* **1990**, *112*, 7817.
- [45] a) A. Müller, H. Bögge, U. Schimanski, *Inorg. Chim. Acta* **1980**, *45*, L249; b) E. Lastra, M. P. Gamasa, J. Gimeno, M. Lanfranchi, A. Tiripicchio, *J. Chem. Soc. Dalton Trans.* **1989**, 1499; c) J. Kampf, R. Kumar, J. P. Oliver, *Inorg. Chem.* **1992**, *31*, 3626; d) B. J. Wuensch, *Z. Kristallogr.* **1964**, *119*, 437; e) J. K. Burdett, O. Eisenstein, *Inorg. Chem.* **1992**, *31*, 1758.
- [46] a) G. Speier, S. Tisza, Z. Tyeklar, C. W. Lange, C. G. Pierpont, *Inorg. Chem.* **1994**, *33*, 2041; b) G. A. Razuvaev, V. K. Cherkasov, G. A. Abakumov, *J. Organomet. Chem.* **1978**, *160*, 361; c) R. M. Buchanan, C. Wilson-Blumenberg, C. Trapp, S. K. Larsen, D. L. Greene, C. G. Pierpont, *Inorg. Chem.* **1986**, *25*, 3070; d) J. Rall, W. Kaim, *J. Chem. Soc. Faraday Trans.* **1994**, *90*, 2905.
- [47] a) P. J. Blower, J. R. Dilworth, *Coord. Chem. Rev.* **1987**, *76*, 121; b) I. J. Pickering, G. N. George, C. T. Dameron, B. Kury, D. R. Winge, I. G. Dance, *J. Am. Chem. Soc.* **1993**, *115*, 9498.
- [48] V. Massey, *J. Biol. Chem.* **1994**, *269*, 22459.
- [49] K. D. Karlin, Y. Gulteh, *Prog. Inorg. Chem.* **1987**, *35*, 219.
- [50] a) K. M. Merz, R. Hoffmann, *Inorg. Chem.* **1988**, *27*, 2120; b) M. Hakansson, S. Jagner, E. Clot, O. Eisenstein, *Inorg. Chem.* **1992**, *31*, 5389.
- [51] E. Spodine, J. Manzur, *Coord. Chem. Rev.* **1992**, *119*, 171.
- [52] a) H. Jin, H. Thomann, C. L. Coyle, W. G. Zumft, *J. Am. Chem. Soc.* **1989**, *111*, 4262; b) W. G. Zumft, *Nova Acta Leopold.* **1994**, *70* (Nr. 288), 237; c) W. G. Zumft, A. Dreus, S. Löhe, H. Cuyper, B. Friedrich, B. Schneider, *Eur. J. Biochem.* **1992**, *208*, 31; d) D. M. Dooley, M. A. McGuirl, A. C. Ro-
- senzweig, J. A. Landin, R. A. Scott, W. G. Zumft, F. Devlin, P. J. Stephens, *Inorg. Chem.* **1991**, *30*, 3006.
- [53] S. M. Janes, S. Mu, D. Wemmer, A. J. Smith, S. Kaur, D. Maltby, A. L. Burlingame, J. P. Klinman, *Science* **1990**, *248*, 981.
- [54] a) R. J. P. Williams, *Chem. Scr.* **1986**, *26*, 515; b) R. J. P. Williams in *The Chemistry of Copper and Zinc Triads* (Hrsg.: A. J. Welch, S. K. Chapman), Royal Society of Chemistry, Cambridge, **1993**, S. 1.
- [55] a) E. I. Ochiai, *Origins Life* **1978**, *9*, 81; b) M. G. Schwendinger, R. Tauler, S. Saetia, K. R. Liedl, R. T. Kroemer, B. M. Rode, *Inorg. Chim. Acta* **1995**, *228*, 207; c) C. J. Allègre, S. H. Schneider, *Sci. Am.* **1994**, *271*(4), 44.
- [56] a) Z. S. Kolber, R. T. Barber, K. H. Coale, S. E. Fitzwater, R. M. Greene, K. S. Johnson, S. Lindley, P. G. Falkowski, *Nature (London)* **1994**, *371*, 145; b) vgl. auch J. H. Martin, K. H. Coale, K. S. Johnson, S. E. Fitzwater, R. M. Gordon, S. J. Tanner, C. N. Hunter, V. A. Elrod, J. L. Nowicki, T. L. Coley, R. T. Barber, S. Lindley, A. J. Watson, K. Van Scoy, C. S. Law, M. I. Liddicoat, R. Ling, T. Stanton, J. Stockel, C. Collins, A. Anderson, R. Bidigare, M. Ondrusek, M. Latasa, F. J. Millero, K. Lee, W. Yao, J. Z. Zhang, G. Friederich, C. Sakamoto, F. Chavez, K. Buck, Z. Kolber, R. Greene, P. Falkowski, S. W. Chisholm, F. Hoge, R. Swift, J. Yungel, S. Turner, P. Nightingale, A. Hatton, P. Liss, N. W. Tindale, *ibid.* **1994**, *371*, 123.
- [57] a) D. M. Dooley, M. A. McGuirl, D. E. Brown, P. N. Turowski, W. S. McIntire, P. F. Knowles, *Nature (London)* **1991**, *349*, 262; b) vgl. auch D. M. Dooley, W. S. McIntire, M. A. McGuirl, C. E. Cote, J. L. Bates, *J. Am. Chem. Soc.* **1990**, *112*, 2782.
- [58] a) M. Harata, K. Jitsukawa, H. Masuda, H. Einaga, *J. Am. Chem. Soc.* **1994**, *116*, 10817; b) K. Fujisawa, M. Tanaka, Y. Moro-oka, N. Kitajima, *ibid.* **1994**, *116*, 12079; c) M. Mahroof-Tahir, K. D. Karlin, *ibid.* **1992**, *114*, 7599.
- [59] a) W. Kaim, S. Kohlmann, *Inorg. Chem.* **1987**, *26*, 1469; b) W. Kaim, M. Moscherosch, *J. Chem. Soc. Faraday Trans.* **1991**, *87*, 3185; c) W. Kaim, M. Moscherosch, S. Kohlmann, J. S. Field, D. Fenske in *The Chemistry of the Copper and Zinc Triads* (Hrsg.: A. J. Welch, S. K. Chapman), Royal Society of Chemistry, Cambridge, **1993**, S. 248.
- [60] H. Tributsch, *J. Electroanal. Chem.* **1992**, *331*, 783.
- [61] a) G. Buse, *Naturwiss. Rundschau* **1986**, *39*, 518; b) H. Beinert, *Chem. Scr.* **1988**, *28*A, 35.
- [62] a) G. T. Babcock, M. Wikström, *Nature (London)* **1992**, *356*, 301; b) M. W. Calhoun, J. W. Thomas, R. B. Gennis, *Trends Biochem. Sci.* **1994**, *19*, 325; c) C. Varotsis, Y. Zhang, E. H. Appelman, G. T. Babcock, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1993**, *90*, 237; d) B. C. Hill, *J. Biol. Soc.* **1994**, *269*, 2419.
- [63] a) O. Farver, M. Goldberg, I. Pecht, *Eur. J. Biochem.* **1980**, *104*, 71; b) J.-M. Latour, *Bull. Soc. Chim. Fr.* **1988**, 508.
- [64] a) P. F. Knowles, D. M. Dooley in *Metal Ions in Biological Systems*, Vol. 30 (Hrsg.: H. Sigel, A. Sigel), Dekker, New York, **1994**, S. 361; b) K. Warncke, G. T. Babcock, D. M. Dooley, M. A. McGuirl, J. McCracken, *J. Am. Chem. Soc.* **1994**, *116*, 4028.
- [65] a) J. McCracken, S. Pember, S. J. Benkovic, J. J. Villafranca, R. J. Miller, J. Peisach, *J. Am. Chem. Soc.* **1988**, *110*, 1069; b) S. Pember, K. A. Johnson, J. J. Villafranca, S. J. Benkovic, *Biochemistry* **1989**, *28*, 2124; c) N. J. Blackburn, R. W. Strange, R. T. Carr, S. J. Benkovic, *ibid.* **1992**, *31*, 5298; d) N. J. Blackburn in *Bioinorganic Chemistry of Copper* (Hrsg.: K. D. Karlin, Z. Tyeklar), Chapman & Hall, New York, **1993**, S. 164.
- [66] M. K. Chan, S. Mukund, A. Kletzin, M. W. W. Adams, D. C. Rees, *Science* **1995**, *267*, 1463.
- [67] a) S. G. Schäfer, B. Elsenhans, W. Forth, K. Schumann in *Lehrbuch der Toxikologie* (Hrsg.: H. Marquardt, S. G. Schäfer), BI-Wissenschaftlicher Verlag, Mannheim, **1994**, S. 504; b) N. L. Brown, B. T. O. Lee, S. Silver in *Metal Ions in Biological Systems*, Vol. 30 (Hrsg.: H. Sigel, A. Sigel), Dekker, New York, **1994**, S. 405; c) *Genetic Response to Metals* (Hrsg.: B. Sarkar), Dekker, New York, **1995**; d) R. P. Csintalan, N. M. Senozan, *J. Chem. Educ.* **1991**, *68*, 365.
- [68] a) C. F. Mills, *Chem. Br.* **1979**, *15*, 512; b) R. J. P. Williams in *Molybdenum: An Outline of its Chemistry and Uses* (Hrsg.: E. R. Braithwaite, J. Haber), Elsevier, Amsterdam, **1994**, S. 419.
- [69] A. Müller, E. Diemann, R. Jostes, H. Bögge, *Angew. Chem.* **1981**, *93*, 957; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1981**, *20*, 934.
- [70] a) B. Sarkar, K. Lingertat-Walsh, J. T. R. Clarke, *J. Pediatr.* **1993**, *123*, 828; b) vgl. auch S. Borman, *Chem. Eng. News* **1993**, *71*, December 13, 23.
- [71] a) G. N. George, J. Byrd, D. R. Winge, *J. Biol. Chem.* **1988**, *263*, 8199; b) Y.-J. Li, U. Weser, *Inorg. Chem.* **1992**, *31*, 5526.
- [72] *Metalllothioneins: Synthesis, Structure, and Properties of Metalllothioneins, Phytochelatins, and Metal-Thiolate Complexes* (Hrsg.: M. J. Stillman, F. C. Shaw, K. R. Suzuki), VCH, New York, **1992**.
- [73] „Catecholamines, Parts I and II“: U. Trendelenburg, N. Weiner, *Handb. Exp. Pharmacol.* **1989**, 90.
- [74] J. M. Matz, M. J. Blake, J. T. Saari, A. M. Bode, *FASEB J.* **1994**, *8*, 97.
- [75] a) B. J. Reedy, N. J. Blackburn, *J. Am. Chem. Soc.* **1994**, *116*, 1924; b) G. Tian, J. A. Berry, J. P. Klinmann, *Biochemistry* **1994**, *33*, 226.
- [76] a) K. Lerch, *Life Chem. Rep.* **1987**, *5*, 221; b) vgl. auch T. N. Sorell, *Tetrahedron* **1989**, *45*, 3.
- [77] X. Min, D. C. Carter, *Nature (London)* **1992**, *358*, 209.

- [78] K. H. Nakagawa, C. Inouye, B. Hedman, M. Karin, T. D. Tullius, K. O. Hodgson, *J. Am. Chem. Soc.* **1991**, *113*, 3621.
- [79] a) O. Horvath, *Coord. Chem. Rev.* **1994**, *135/136*, 303; b) C. Kutal, *ibid.* **1990**, *99*, 213.
- [80] a) A. R. Green, A. Presta, Z. Gasyana, M. J. Stillman, *Inorg. Chem.* **1994**, *33*, 4159; b) A. R. Green, M. J. Stillman, *Inorg. Chim. Acta* **1994**, *226*, 275.
- [81] a) J. M. Guss, H. D. Bartunik, H. C. Freeman, *Acta Crystallogr. Sect. B* **1992**, *48*, 790; b) M. R. Redinbo, D. Cascio, M. K. Choukair, D. Rice, S. Merchant, T. O. Yeates, *Biochemistry* **1993**, *32*, 10560; c) T. Inoue, Y. Kai, S. Harada, N. Kasai, Y. Ohshiro, S. Suzuki, T. Kohzuma, J. Tobari, *Acta Crystallogr. Sect. D* **1994**, *50*, 317; d) A. Romero, H. Nar, R. Huber, A. Messerschmidt, A. P. Kalverda, G. W. Canters, R. Durley, F. S. Mathews, *J. Mol. Biol.* **1994**, *236*, 1196; e) E. T. Adman, S. Turley, R. Bramson, K. Petratos, D. Banner, D. Tsernoglou, T. Beppu, H. Watanabe, *J. Biol. Chem.* **1989**, *264*, 87; f) K. Petratos, Z. Dauter, K. S. Wilson, *Acta Crystallogr. Sect. B* **1988**, *44*, 628; g) B. A. Fields, J. M. Guss, H. C. Freeman, *J. Mol. Biol.* **1991**, *222*, 1053; vgl. auch H. Thomann, M. Bernardo, M. J. Baldwin, M. D. Lowery, E. I. Solomon, *J. Am. Chem. Soc.* **1991**, *113*, 5911.
- [82] a) A. G. Sykes, *Adv. Inorg. Chem.* **1991**, *36*, 377; b) O. Farver, I. Pecht, *FASEB J.* **1991**, *5*, 2554; c) H. E. M. Christensen, L. S. Conrad, K. V. Mikkelsen, M. K. Nielsen, J. Ulstrup, *Inorg. Chem.* **1990**, *29*, 2808.
- [83] M. M. Werst, C. E. Davoust, B. M. Hoffman, *J. Am. Chem. Soc.* **1991**, *113*, 1533.
- [84] a) H. Kurreck, B. Kirste, W. Lubitz, *Electron Nuclear Double Resonance Spectroscopy of Radicals in Solution*, VCH, Weinheim, **1988**; b) B. M. Hoffman, *Acc. Chem. Res.* **1991**, *24*, 164.
- [85] a) W. S. McIntire, *FASEB J.* **1994**, *8*, 513; b) J. A. Duine, *Eur. J. Biochem.* **1991**, *200*, 271.
- [86] L. Chen, R. C. E. Durley, F. S. Mathews, V. L. Davidson, *Science* **1994**, *264*, 86.
- [87] G. M. Ullmann, N. M. Kostic, *J. Am. Chem. Soc.* **1995**, *117*, 4766, zit. Lit.
- [88] a) A. J. Di Bilio, T. K. Chang, B. G. Malmström, H. B. Gray, B. G. Karlsson, M. Nordling, T. Pascher, L. G. Lundberg, *Inorg. Chim. Acta* **1992**, *198–200*, 145; b) B. C. D. Cave, J. P. Germanas, R. S. Czernuszewicz, *J. Am. Chem. Soc.* **1993**, *115*, 12175.
- [89] a) H. Bertagnolli, W. Kaim, *Angew. Chem.* **1995**, *107*, 847; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1995**, *34*, 771; b) R. K. Chadha, R. Kumar, D. G. Tuck, *Can. J. Chem.* **1987**, *65*, 1336; c) M. E. Barr, P. H. Smith, W. E. Antholine, B. Spencer, *J. Chem. Soc. Chem. Commun.* **1993**, 1649; d) J. A. Farrar, V. McKee, A. H. R. Al-Obaidi, J. J. McGarvey, J. Nelson, A. J. Thomson, *Inorg. Chem.* **1995**, *34*, 1302.
- [90] a) H. Beinert, D. E. Griffiths, D. C. Wharton, R. H. Sands, *J. Biol. Chem.* **1962**, *237*, 2337; b) vgl. hierzu auch C. Sigwart, P. Hemmerich, J. T. Spence, *Inorg. Chem.* **1968**, *12*, 2545.
- [91] a) T. H. Stevens, C. T. Martin, H. Wang, G. W. Brudvig, C. P. Scholes, S. I. Chan, *J. Biol. Chem.* **1982**, *257*, 12106; 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; c) D. Voet, J. G. Voet, *Biochemie*, VCH, Weinheim, **1992**, S. 544; d) A. L. Lehninger, D. L. Nelson, M. M. Cox, *Prinzipien der Biochemie*, 2. Aufl., Spektrum, Heidelberg, **1994**, S. 639; e) L. Stryer, *Biochemie*, Spektrum, Heidelberg, **1990**, S. 422.
- [92] 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.
- [93] W. E. Antholine, D. H. W. Kastrau, G. C. M. Steffens, G. Buse, W. G. Zumft, P. M. H. Kroneck, *Eur. J. Biochem.* **1992**, *209*, 875.
- [94] a) M. Kelly, P. Lappalainen, G. Talbo, T. Haltia, J. van der Oost, M. Saraste, *J. Biol. Chem.* **1993**, *268*, 16781; b) B. G. Malmström, R. Aasa, *FEBS Lett.* **1993**, *325*, 49; c) L. P. Pan, Z. Li, R. Larsen, S. I. Chan, *J. Biol. Chem.* **1991**, *266*, 1367; d) C. van Wachenfeldt, S. de Vries, J. van der Oost, *FEBS Lett.* **1994**, *340*, 109.
- [95] a) P. Lappalainen, M. Saraste, *Biochim. Biophys. Acta* **1994**, *1187*, 222; b) N. J. Blackburn, M. E. Barr, W. H. Woodruff, J. van der Oost, S. de Vries, *Biochemistry* **1994**, *33*, 10401; c) G. N. George, S. P. Cramer, T. G. Frey, R. C. Prince, *Biochim. Biophys. Acta* **1993**, *1142*, 240; d) neueste EXAFS-Ergebnisse für das Cu<sub>2</sub>-Dimer und den Cu<sub>2</sub>-Fe<sub>2</sub>-Komplex in der intakten aktiven Cytochrom-c-Oxidase aus Rinderherz-Mitochondrien: G. Henkel, A. Müller, S. Weißgräber, G. Buse, T. Soulimane, G. C. M. Steffens, H.-F. Nollting, *Angew. Chem.* **1995**, *107*, 1615; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1995**, *35*, 1488.
- [96] a) J. Strähle in *Unkonventionelle Wechselwirkungen in der Chemie metallischer Elemente* (Hrsg.: B. Krebs), VCH, Weinheim, **1992**, S. 357; b) S. W. Lee, W. C. Troglor, *Inorg. Chem.* **1990**, *29*, 1659.
- [97] W. Kaim, W. Bruns, V. Poppe, V. Kasack, *J. Mol. Struct.* **1993**, *292*, 221.
- [98] K. Wieghardt, *Angew. Chem.* **1989**, *101*, 1179; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1989**, *28*, 1153.
- [99] S. J. Lippard, *Angew. Chem.* **1988**, *100*, 353; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1988**, *27*, 344.
- [100] a) L. Noodleman, J. G. Norman, H. H. Osborne, A. Aizman, D. A. Case, *J. Am. Chem. Soc.* **1985**, *107*, 3418; b) R. Cammack, *Adv. Inorg. Chem.* **1992**, *38*, 299.
- [101] J. Reim, B. Krebs, *Angew. Chem.* **1994**, *106*, 2040; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1994**, *33*, 1961.
- [102] N. Kitajima, T. Katayama, K. Fujisawa, Y. Iwata, Y. Moro-oka, *J. Am. Chem. Soc.* **1993**, *115*, 7872.
- [103] a) M. G. Peter, *Chem. Unserer Zeit* **1993**, *27*, 189; b) J. R. L. Walker, P. H. Ferrar, *Chem. Ind. (London)*, **1995**, 836.
- [104] a) M. G. Peter, *Angew. Chem.* **1989**, *101*, 572; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1989**, *28*, 555; b) V. J. Hearing, K. Tsukamoto, *FASEB J.* **1991**, *5*, 2902.
- [105] a) M. S. Nasir, B. I. Cohen, K. D. Karlin, *J. Am. Chem. Soc.* **1992**, *114*, 2482; b) L. M. Sayre, D. V. Nadkarni, *ibid.* **1994**, *116*, 3157; c) Z. Tyeklar, K. D. Karlin in Lit. [2], S. 277.
- [106] H.-H. T. Nguyen, A. K. Shiemke, S. J. Jacobs, B. J. Hales, M. E. Lidstrom, S. I. Chan, *J. Biol. Chem.* **1994**, *269*, 14995.
- [107] A. C. Rosenzweig, S. J. Lippard, *Acc. Chem. Res.* **1994**, *27*, 229.
- [108] K. Wimalasena, K. R. Alliston, *J. Am. Chem. Soc.* **1995**, *117*, 1220.
- [109] a) S. Itoh, T. Kondo, M. Komatsu, Y. Ohshiro, C. Li, N. Kanehisa, Y. Kai, S. Fukuzumi, *J. Am. Chem. Soc.* **1995**, *117*, 4714; b) S. Mahapatra, J. A. Halfen, E. C. Wilkinson, L. Que, Jr., W. B. Tolman, *ibid.* **1994**, *116*, 9785.
- [110] G. A. Abakumov, V. A. Garnov, V. I. Nevodchikov, V. K. Cherkasov, *Dokl. Akad. Nauk SSSR* **1989**, *304*, 107.
- [111] E. Waldhör, B. Schwederski, W. Kaim, *J. Chem. Soc. Perkin Trans. 2* **1993**, 2109.
- [112] a) C. Hartmann, J. P. Klinman, *Biochemistry* **1991**, *30*, 4605; b) C. Hartmann, P. Brzovic, J. P. Klinman, *ibid.* **1993**, *32*, 2234.
- [113] Z. B. Ögel, D. Brayford, M. J. McPherson, *Mycol. Res.* **1994**, *98*, 474.
- [114] a) G. T. Babcock, M. K. El-Deeb, P. O. Sandusky, M. M. Whittaker, J. W. Whittaker, *J. Am. Chem. Soc.* **1992**, *114*, 3727; b) H. Adams, N. A. Bailey, D. E. Fenton, Q. He, M. Ohba, H. Okawa, *Inorg. Chim. Acta* **1994**, *215*, 1; c) M. Shaolin, *J. Electroanal. Chem.* **1994**, *370*, 135; d) E. Katz, D. D. Schlereth, H.-L. Schmidt, *ibid.* **1994**, *367*, 59.
- [115] S. Han, Y. Ching, D. L. Rousseau, *Nature (London)* **1990**, *348*, 89.
- [116] a) W. Woodruff, O. Einarsson, R. B. Dyer, K. A. Bagley, G. Palmer, S. J. Atherton, R. A. Goldbeck, T. D. Dawes, D. S. Kliger, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1991**, *88*, 2588; b) C. A. James, W. Woodruff, *Inorg. Chim. Acta* **1995**, *229*, 9.
- [117] a) S. C. Lee, R. H. Holm, *J. Am. Chem. Soc.* **1993**, *115*, 11789; b) A. Nanthakumar, S. Fox, N. N. Murthy, K. D. Karlin, N. Ravi, B. H. Huynh, R. D. Orosz, E. P. Day, K. S. Hagen, N. J. Blackburn, *ibid.* **1993**, *115*, 8513; c) S. C. Lee, M. J. Scott, K. Kauffmann, E. Münck, R. H. Holm, *ibid.* **1994**, *116*, 401; d) K. D. Karlin, A. Nanthakumar, S. Fox, N. N. Murthy, N. Ravi, B. H. Huynh, R. D. Orosz, E. P. Day, *ibid.* **1994**, *116*, 4753; e) M. J. Scott, S. C. Lee, R. H. Holm, *Inorg. Chem.* **1994**, *33*, 4651; f) J. P. Collman, P. C. Herrmann, B. Boitrel, X. Zhang, T. A. Eberspacher, L. Fu, J. Wang, D. L. Rousseau, E. R. Williams, *J. Am. Chem. Soc.* **1994**, *116*, 9783; g) M. J. Scott, R. H. Holm, *ibid.* **1994**, *116*, 11357; h) M. J. Scott, H. H. Zhang, S. C. Lee, B. Hedman, K. O. Hodgson, R. H. Holm, *ibid.* **1995**, *117*, 568; i) A. Nanthakumar, M. S. Nasir, K. D. Karlin, N. Ravi, B. H. Huynh, *ibid.* **1992**, *114*, 6564.
- [118] D. A. Labianca, *J. Chem. Educ.* **1979**, *56*, 788.
- [119] J. A. Tainer, E. D. Getzoff, J. S. Richardson, D. C. Richardson, *Nature (London)* **1983**, *306*, 284.
- [120] a) A. Gärtner, U. Weser, *Top. Curr. Chem.* **1986**, *132*, 1; b) A. E. G. Cass in *Metalloproteins, Part 1* (Hrsg.: P. Harrison), VCH, Weinheim, **1985**, S. 121; c) I. Fridovich, *J. Biol. Chem.* **1989**, *264*, 7761.
- [121] W. C. Stallings, K. A. Patridge, R. K. Strong, M. L. Ludwig, *J. Biol. Chem.* **1985**, *260*, 16424.
- [122] G. E. O. Borgstahl, H. E. Parge, M. J. Hickey, W. F. Beyer, Jr., R. A. Hallewell, J. A. Tainer, *Cell* **1992**, *71*, 107.
- [123] I. Bertini, L. Banci, M. Piccoli, C. Luchinat, *Coord. Chem. Rev.* **1990**, *100*, 67.
- [124] E. D. Getzoff, D. E. Cabelli, C. L. Fisher, H. E. Parge, M. S. Viezzoli, L. Banci, R. A. Hallewell, *Nature (London)* **1992**, *358*, 347.
- [125] U. Weser, *Forschung – Mitteilungen der DFG* **1994**(4), 11.
- [126] J.-L. Pierre, P. Chateaux, S. Refaif, C. Beguin, A. E. Marzouki, G. Serratrie, E. Saint-Aman, P. Rey, *J. Am. Chem. Soc.* **1995**, *117*, 1965.
- [127] J. R. J. Sorenson, *Chem. Br.* **1989**, *25*, 169.
- [128] W. C. Orr, R. S. Sohal, *Science* **1994**, *263*, 1128.
- [129] A. W. Segal, A. Abo, *Trends Biochem. Sci.* **1993**, *18*, 43.
- [130] H. M. Kubisch, J. Wang, R. Luche, E. Carlson, T. M. Bray, C. J. Epstein, J. P. Phillips, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1994**, *91*, 9956.
- [131] E. W. Ainscough, A. M. Brodie, A. L. Wallace, *J. Chem. Educ.* **1992**, *69*, 315.
- [132] E. Frieden in *Met. Ions Biol. Syst.* **1981**, *13*, 1.
- [133] a) T. Tsukihara, H. Aoyama, E. Yamashita, T. Tomizaki, H. Yamaguchi, K. Shinzawa-Itoh, R. Nakashima, R. Yaono, S. Yoshikawa, *Science* **1995**, *269*, 1069; b) S. Iwata, C. Ostermeier, B. Ludwig, H. Michel, *Nature* **1995**, *376*, 660.