

## Mechanismus der Sauerstoffaktivierung durch einkernige, Häm-freie Eisenproteine \*\*

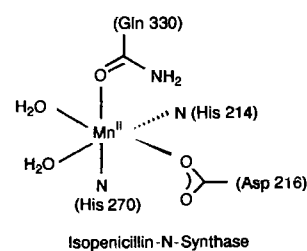
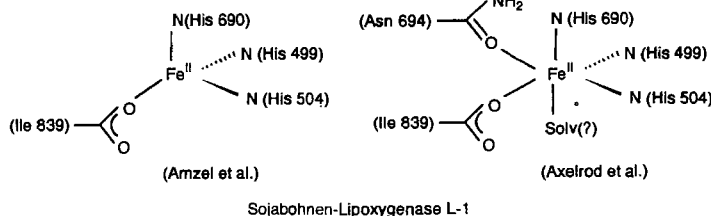
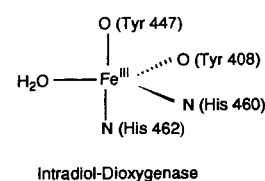
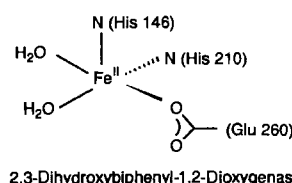
Alexandre L. Nivorozhkin und Jean-Jacques Girerd\*

In den aktiven Zentren der Enzyme, die Oxidationen katalysieren, sind häufig ein- oder zweikernige, Häm-freie Eisenzentren vorhanden<sup>[1]</sup>. Zwar hat man sich in der Vergangenheit mehr den Enzymen mit zweikernigen als denen mit einkernigen Eisenzentren gewidmet – bei der letzten International Conference on Bioinorganic Chemistry (ICBIC-7) im vergangenen Jahr in Lübeck galten 26 Beiträge den zweikernigen Eisenproteinen und nur 13 den einkernigen –, das Interesse an einkernigen Eisenenzymen wächst jedoch in Biologie und Chemie schnell<sup>[2]</sup>. Die erstaunlich vielfältigen funktionellen Eigenschaften der einkernigen Eisenenzyme, von der Lipidoxidation (Lipid-Dioxygenase, LO) über die Oxidation von Arenen (Aren-Dioxygenasen, Catechol-Dioxygenase, Pteridin-abhängige Enzyme) bis zur Synthese von Isopenicillin (Isopenicillin-N-Synthase, IPNS) und der Oxidation von nicht aktivierten C–H-Bindungen ( $\alpha$ -Ketosäure-abhängige Enzyme), machen diese zweifellos zu einem lohnenden Forschungsziel. Von neuen Erkenntnissen könnte sowohl die Industrie als auch die Medizin profitieren. Ein wichtiges Forschungsobjekt auf diesem Gebiet ist seit langem Bleomycin (BLM), ein natürlich vorkommendes eisenhaltiges Glycopeptid, das, wie Cisplatin, als Krebsmittel erfolgreich ist.

Studien zur sequenzspezifischen oxidativen Spaltung von DNA durch BLM<sup>[3]</sup> und die Untersuchung synthetischer Modellkomplexe waren besonders aufschlußreich für das Verständnis der Schlüsselmerkmale der Sauerstoffaktivierungsschritte und des Mechanismus der katalytischen Oxidation durch aktivierte einkernige Eisenkomplexe. Die neuesten Ergebnisse<sup>[4]</sup> lassen keinen Zweifel daran, daß die Bildung der spektroskopisch beobachteten, kurzlebigen einkernigen Peroxospezies von BLM, das „aktivierte BLM“, der erste Schritt der Sauerstoffaktivierung ist. Die Diskussionen über den Reaktionsmechanismus halten an. Die Beteiligung radikalischer Spezies wie OH• kann wahrscheinlich ausgeschlossen werden, aber Ferrylspezies werden häufiger diskutiert, obwohl sie niemals spektroskopisch nachgewiesen wurden. Eines der eindrucksvollsten, mit BLM-Mimetica<sup>[4a]</sup> erzielten Ergebnisse ist, daß die DNA-Spaltung im

wesentlichen durch die Metallbindungsdomäne bestimmt wird; Metallkomplexe ohne Polypeptidkette mit spezifischem Dithiazol-Terminus, die als entscheidend für die Bindung an DNA angesehen wurde, zeigen ein sehr ähnliches Spaltungsmuster wie BLM. Diese Tatsache wird die Suche nach anderen einfachen synthetischen Eisenkomplexen mit der Aktivität von BLM stimulieren<sup>[5a]</sup>. Bereits beschrieben<sup>[5b,c]</sup> wurden Eisenkomplexe mit Aminopyridin-Liganden, deren DNA-Spaltungsaktivität nur um den Faktor 10 geringer ist als die von BLM<sup>[5b]</sup>. Studien über diese und andere Aminopyridin-Eisenkomplexe sowie über Bipyridin-Eisenkomplexe ergaben<sup>[5d–g]</sup> stichhaltige spektroskopische Beweise für das Vorkommen einer kurzlebigen Fe<sup>III</sup>-Peroxospezies mit Eigenschaften, die denen von „aktiviertem BLM“ ähneln.

Die Kenntnis der atomaren Struktur des aktiven Zentrums ist entscheidend für die Aufklärung eines enzymatischen Reaktionsmechanismus. Einige kürzlich erreichte Meilensteine sind die Kristallstrukturanalysen von wichtigen Häm-freien Eisenproteinen: Extradiol-Dioxygenase, IPNS und Lipid-Dioxygenase.



[\*] Dr. J.-J. Girerd, Dr. A. L. Nivorozhkin  
Laboratoire de Chimie Inorganique  
URA CNRS 420, Bat. 420  
Université Paris-Sud  
F-91405 Orsay (Frankreich)  
Telefax: Int. +1/69 85-55 36

[\*\*] Wir danken Dr. J. T. Bolin, Purdue University, USA, für einen Vorabdruck seiner Publikation in *Science* (siehe Lit. [9a]) und Dr. B. Meunier, Toulouse, Frankreich, für fruchtbare Diskussionen.

Die durch Lipoxygenase katalysierte Lipidoxidation (Oxygenierung eines *cis,cis*-1,4-Diens zu einem konjugierten 1-Hydroperoxydien) scheint chemisch eine der einfachsten Umwandlungen zu sein. Die von Amzel et al.<sup>[6a]</sup> mit einer Auflösung von 2.5 Å bestimmte Struktur des aktiven Zentrums des Enzyms enthält ein verzerrt tetraedrisch koordiniertes Fe<sup>II</sup>-Zentrum – ähnlich dem in der Eisensuperoxid-Dismutase gefundenen –, an das drei Histidin-Stickstoffatome und eine einzählige terminale Carboxylatgruppe gebunden sind. Dieser Befund widersprach allen vorherigen spektroskopischen Ergebnissen, die auf eine oktaedrische Koordination hinwiesen. Die Autoren sind sich sicher, andere Liganden wie Wasser oder Hydroxid-Ionen ausschließen zu können, und sprechen einem dem Eisenzentrum nahen Asn-Rest eine entscheidende Rolle bei der Stabilisierung eines wahrscheinlichen Peroxo-Eisen-Intermediats zu. Nach einer von Axelrod et al.<sup>[6b]</sup> durchgeführten Röntgenstrukturanalyse enthält eine isomere Form des gleichen Enzyms allerdings ein fünffach koordiniertes Eisenzentrum mit einem einzähligen gebundenen Asparaginrest. Der erste Schritt der Lipidoxidation besteht in der Bildung eines Kohlenstoff-Radikals, das von Sauerstoff angegriffen wird und schließlich eine 1-OOH-Spezies bildet. Die Regio- und Stereoselektivität dieses Prozesses spricht dafür, daß Hydroxyl-Radikale im Verlauf der Oxidation keine Rolle spielen. Durch Experimente mit Substraten unter anaeroben Bedingungen konnte bewiesen werden, daß die Fe<sup>III</sup>-Form des Enzyms den primären Schritt, die Wasserstoffabstraktion, verursacht. Charakteristische Veränderungen im UV/Vis-Spektrum weisen auf die Bildung des Peroxo-Eisen-Intermediats in Anwesenheit von Sauerstoff und Substrat hin. Auf diese, möglicherweise wichtige Beobachtung gründeten Nelson et al. kürzlich einen neuen Vorschlag zum Reaktionsmechanismus der Lipid-Dioxygenase<sup>[7a]</sup>. Mascharak et al.<sup>[7b]</sup> beschrieben Eisen-Modellkomplexe, die eine ähnliche Aktivität wie BLM zeigen und eindeutig nachgewiesene Peroxo-Eisenspezies bilden; in Gegenwart von O<sub>2</sub> oder H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> reagieren diese Komplexe mit guter Stereoselektivität mit Linol- und Arachidonsäure effizient zu 1-OOH-Produkten.

Die IPNS katalysiert eine relativ anspruchsvolle Reaktion in der Penicillin-Biosynthese – die Umwandlung des linearen Tripeptids  $\delta$ -(L- $\alpha$ -Aminoadipoyl)-L-cysteinyl-D-valin (ACV) in Isopenicillin N. Anders als andere Häm-freie Oxidasen benötigt die IPNS keine Elektronendonoren oder oxidierten Cofaktoren. Die Röntgenstrukturanalyse einer Mn<sup>II</sup>-substituierten IPNS<sup>[8]</sup> ergab ein oktaedrisch koordiniertes Metallzentrum mit zwei Histidin-Stickstoffatomen, einer einzähligen Carboxylatgruppe, einer O-gebundenen Amidogruppe und zwei Wassermolekülen. Diese Struktur steht in guter Übereinstimmung mit spektroskopischen Daten und macht nahezu keine Revision des vorgeschlagenen, mehrstufigen Reaktionsmechanismus erforderlich, der hauptsächlich auf Experimenten mit Substratanaloga und Isotopenmarkierung basiert. Die Entwicklung biomimetischer Modellkomplexe zur Aufklärung der Enzym-Substrat-Wechselwirkungen und des Nachweises einer kurzlebigen Ferryl-Spezies dürfte nun das Ziel von Bioorganikern sein.

Ein weiterer Erfolg der spektroskopischen Voraussagen über die Merkmale aktiver Zentren wird durch die Röntgenstrukturanalyse der Extradiol-Dioxygenase<sup>[9a]</sup> deutlich, die zusammen mit der Intradiol-Dioxygenase zwei Wege des Brenzkatechin-

Abbaus kontrolliert. In Übereinstimmung mit spektroskopischen Daten von Solomon, Lipscomb et al.<sup>[9b,c]</sup> enthält das Enzym ein quadratisch-pyramidal koordiniertes Fe<sup>II</sup>-Zentrum, das an zwei Histidin-Stickstoffatome, eine terminale einzählige Carboxylatgruppe und zwei Wassermoleküle, die während der Katalyse wahrscheinlich durch ein chelatisierendes Substrat ausgetauscht werden, gebunden ist. Ein ausgeprägtes Merkmal der Extradiol-Dioxygenase ist die Erhaltung des Oxidationszustands des Eisenzentrums während aller Reaktionsschritte. Es gibt bisher wenige mechanistische Studien<sup>[9d]</sup>, und bis jetzt ist kein biomimetischer Komplex mit Extradiol-Spaltungsaktivität bekannt. Das Ergebnis der Röntgenstrukturanalyse<sup>[9a]</sup> bietet einen guten Ausgangspunkt für Studien zum Reaktionsmechanismus und den Vergleich mit der gut untersuchten oxidativen Intradiol-Spaltung. Die Kenntnis der umfangreichen Chemie der Eisenphenolat-Komplexe erleichterte die Aufklärung des Reaktionsmechanismus<sup>[10a]</sup> der Intradiol-Dioxygenase, bei der im aktiven Zentrum das Eisen an je zwei Tyrosin- und Histidinreste sowie ein Wassermolekül oder ein Hydroxid-Ion gebunden ist; das Ergebnis einer Röntgenstrukturanalyse wurde kürzlich publiziert<sup>[10b,c]</sup>. Auch eine Reihe synthetischer Komplexe ist bekannt<sup>[11]</sup>, die die Intradiol-Spaltung katalysieren. Die effizientesten Modellkomplexe enthielten überraschenderweise nur Stickstoffliganden, während die Phenolatkomplexe nach dem Schritt der Brenzkatechin-Semichinon-Oxidation inhibiert wurden, was für einen direkten Angriff des Sauerstoffs auf den aromatischen Ring spricht.

Drei Klassen Häm-freier Eisenenzyme mit sowohl unbekannter Struktur des aktiven Zentrums als auch unbekanntem Katalysemechanismus sind: Aren-Dioxygenasen sowie Pterin- und  $\alpha$ -Ketosäure-abhängige Enzyme. Sie sind stark von Cofaktoren abhängig, die die Elektronen für die Sauerstoffreduktion liefern. Über Veränderungen am Metallzentrum in Aren-Dioxygenasen während der Katalyse ist wenig bekannt<sup>[12a,b]</sup>. Mutmaßliche, dem „aktivierten BLM“ ähnliche Peroxo-Intermediate könnten am Katalysezyklus dieser Dioxygenasen und Putidamonooxin<sup>[12c]</sup> (Sauerstoff-Aktivierungskomponente der 4-Methoxybenzoat-Monooxygenase) beteiligt sein. Sowohl die Aren-Dioxygenasen als auch Putidamonooxin enthalten ein einkerniges Eisenzentrum und einen Rieske-Eisen-Schwefel-Cluster als Cofaktoren. Der Mechanismus Pterin-abhängiger Metalloenzyme (Tyrosin-, Phenylalanin- und Tryptophan-Hydroxylase) ist noch ungeklärt: Ist die Peroxo-Eisen-Spezies die primäre Zwischenstufe oder ist sie ein Sekundärprodukt, das durch zuerst produziertes Pterinhydroperoxid<sup>[13a]</sup> gebildet wird? Die prinzipielle Möglichkeit der Hydroxylierung eines metallgebundenen Phenols in einem einfachen synthetischen Eisenkomplex, der mit *m*-Chlorperbenzoesäure behandelt wurde, beobachteten Kitajima et al.<sup>[13b]</sup>. Über den ersten Modellkomplex für  $\alpha$ -Ketosäure-abhängige, Fe<sup>II</sup>-haltige Dioxygenasen wurde von L. Que et al.<sup>[14a,b]</sup> berichtet. Der bisher beste Modellkomplex wurde von J. Valentine et al.<sup>[14c]</sup> synthetisiert und konnte die gesamte Reaktivität des Enzyms widerspiegeln: die Oxygenierung des Substrats (Epoxidierung von Cyclohexen und Stilben) mit gleichzeitiger Oxygenierung und Decarboxylierung des eisengebundenen Benzoylformiats zu Benzoesäure. Diese Ergebnisse eröffnen günstige Perspektiven für die modellhafte Nachbildung auch komplizierter katalytischer Reaktionen mit Cofaktorumwandlungen. Die einfache biomimetische Modellierung

der Sauerstoffaktivierung hat allerdings ein generelles Hindernis, die leichte Bildung von  $\mu$ -Peroxo-Dimeren<sup>[15]</sup>.

Berücksichtigt man die vielfältigen und komplexen Wechselwirkungen zwischen aktivem Zentrum und Substrat, die oft durch die Mitwirkung von Cofaktoren weiter moduliert wird, so kann man kaum ein einheitliches Bild des Reaktionsmechanismus und der aktiven oxygenierenden Spezies der einkernigen Häm-freien Eisenproteine erwarten. Allerdings ergaben die intensiven Forschungen der letzten Jahre, daß die Häm-freien Eisenenzyme wahrscheinlich über eine Peroxo-Zwischenstufe reagieren, also anders als Eisenporphyrine, bei denen hochkoordinierte Oxoeisen-Spezies die zentralen Intermediate sind.

**Stichworte:** Bioanorganische Chemie · Bleomycin · Eisenverbindungen · Nicht-Häm-Eisenproteine · Sauerstoffaktivierung

[1] A. L. Feig, S. Lippard, *Chem. Rev.* **1994**, *94*, 759.

[2] „Iron Proteins with Mononuclear Active Site“: L. Que in *Encyclopedia of Inorganic Chemistry*, Vol. 4 (Hrsg.: R. B. King), Wiley, Chichester, **1994**, S. 1859.

[3] J. Stubbe, J. W. Kozarich, *Chem. Rev.* **1987**, *87*, 1107.

[4] a) R. J. Guajardo, S. E. Hudson, S. J. Brown, P. Mascharak, *J. Am. Chem. Soc.* **1993**, *115*, 7971; b) J. W. Sam, X.-J. Tang, J. Peisach, *ibid.* **1994**, *116*, 5250; c) T. E. Westre, K. E. Loeb, J. M. Zaleski, B. Hedman, K. O. Hogson, E. I. Solomon, *ibid.* **1995**, *117*, 1309.

[5] a) G. C. Silver, W. C. Trogler, *J. Am. Chem. Soc.* **1995**, *117*, 3983; b) A. L. Nivorozhkin, P. Mialane, J.-J. Girerd, G. Blondin, A. Rabion, G. Pratviel, M. Slany, F. Godde, B. Meunier, T. A. Mattioli, P. Soubayrol, *Inorg. Chem.* **1995**, eingereicht; c) I. Bernal, I. M. Jensen, K. B. Jensen, C. J. McKenzie, H. Toftlund, *J. Chem. Soc. Dalton Trans.* **1995**, 3667; d) Y. Zang, T. E. Elgren, Y. Dong,

L. Que, *J. Am. Chem. Soc.* **1993**, *115*, 811; e) S. Menage, E. Wilkinson, L. Que, M. Fontecave, *Angew. Chem.* **1995**, *107*, 198; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1995**, *34*, 203; f) M. Lubben, A. Meetsma, E. C. Wilkinson, B. Feringa, L. Que, *ibid.* **1995**, *107*, 1610 bzw. **1995**, *34*, 1512; g) J. Kim, E. Larka, E. C. Wilkinson, L. Que, *ibid.* **1995**, *107*, 2191 bzw. **1995**, *34*, 2048.

[6] a) J. C. Boyington, B. J. Gaffney, L. M. Amzel, *Science* **1993**, *260*, 1483; b) W. Minor, J. Steczko, J. T. Bolin, Z. Otwinowski, B. Axelrod, *Biochemistry* **1993**, *32*, 6320.

[7] a) M. J. Nelson, R. A. Cowling, S. P. Seitz, *Biochemistry* **1994**, *33*, 4966; b) R. J. Guajardo, P. K. Mascharak, *Inorg. Chem.* **1995**, *34*, 802.

[8] P. L. Roach, I. J. Clifton, V. Füllöp, K. Harlos, G. J. Barton, J. Hajdu, I. Andersson, C. J. Schofield, J. E. Baldwin, *Nature* **1995**, *375*, 700.

[9] a) S. Han, L. D. Eltis, K. N. Timmis, S. W. Muchmore, J. T. Bolin, *Science* **1995**, *270*, 976; b) P. A. Mabrouk, A. M. Orville, J. D. Lipscomb, E. I. Solomon, *J. Am. Chem. Soc.* **1991**, *113*, 4053; c) L. Shu, Y.-M. Chiou, A. M. Orville, M. A. Miller, J. D. Lipscomb, L. Que, *Biochemistry* **1995**, *34*, 6649; d) J. Sanvoisin, G. J. Langley, T. D. H. Bugg, *J. Am. Chem. Soc.* **1995**, *117*, 7836.

[10] a) A. M. Orville, J. D. Lipscomb, *J. Biol. Chem.* **1993**, *268*, 8596; b) D. H. Orlandorf, J. D. Lipscomb, P. C. Weber, *Nature* **1988**, *336*, 403; c) D. H. Orlandorf, A. W. Orville, J. D. Lipscomb, *J. Mol. Biol.* **1994**, *244*, 586.

[11] a) H. G. Jang, D. D. Cox, L. Que, *J. Am. Chem. Soc.* **1991**, *113*, 9200; b) Y.-M. Chiou, L. Que, *Inorg. Chem.* **1995**, *34*, 3577; c) W. O. Koch, H.-J. Krüger, *Angew. Chem.* **1995**, *107*, 2928; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1995**, *107*, 2671.

[12] a) G. T. Gassner, D. P. Ballou, G. A. Landrum, J. W. Whittaker, *Biochemistry* **1993**, *32*, 4820; b) E. G. Pavel, L. J. Martins, W. R. Ellis, E. E. Solomon, *Chem. Biol.* **1994**, *1*, 173; c) P. Wende, I.-H. Bernhardt, K. Pfleger, *Eur. J. Biochem.* **1989**, *181*, 189.

[13] a) T. Dix, S. J. Benkovic, *Acc. Chem. Res.* **1988**, *21*, 101; b) N. Kitajima, M. Ito, H. Fukui, Y. Moro-oka, *J. Am. Chem. Soc.* **1993**, *115*, 9335.

[14] a) Y.-M. Chiou, L. Que, *J. Am. Chem. Soc.* **1992**, *114*, 7567; b) Y.-M. Chiou, L. Que, *ibid.* **1995**, *117*, 3999; c) E. H. Ha, R. Y. N. Ho, J. F. Kiesel, J. S. Valentine, *Inorg. Chem.* **1995**, *34*, 2265.

[15] N. Kitajima, N. Tamura, H. Amagai, H. Fukui, Y. Moro-oka, Y. Mizutani, T. Kitagawa, R. Mathur, K. Heerwegh, C. A. Reed, C. R. Randall, L. Que, K. Tatsumi, *J. Am. Chem. Soc.* **1994**, *116*, 9071.

## Dimere Pyrazinsteroid-Alkaloide aus marinen Organismen: eine Herausforderung bei der Isolierung, der Synthese und der Erforschung ihrer biologischen Wirkung\*\*

Arasu Ganesan\*

Professor Clayton Heathcock zum 60. Geburtstag gewidmet.

### Die Isolierung der Cephalostatine und Ritterazine

Seit 1955 sucht man am American National Cancer Institute (NCI) mit großem Einsatz nach antitumorwirksamen Verbindungen. Allein zwischen 1955 und 1980 wurden etwa 130 000 Pflanzen- und Tierextrakte untersucht, wobei der größte Erfolg sicherlich die Isolierung von Taxol aus der Pazifischen Eibe war. Hier wird eine Gruppe von Steroiden vorgestellt, die ihre Entdeckung ebenfalls den Anstrengungen des NCI verdanken.

Im Jahre 1974 erwiesen sich Extrakte aus dem winzigen (ca. 5 mm großen) marinen Röhrenwurm *Cephalodiscus gilchristi*,

der vor der südafrikanischen Küste gefunden wurde, bei der vom NCI als Primärassay verwendeten murinen lymphozytischen Leukämie P388 als wirksam. Fünfzehn Jahre rastloser Forschung durch die Arbeitsgruppe von Pettit gipfelte in der Isolierung von 139 mg der bioaktiven Hauptkomponente, des Cephalostatins 1, aus 166 kg (Naßgewicht) Röhrenwürmern und schließlich in der strukturellen Charakterisierung dieser Verbindung<sup>[1]</sup>. Was daraufhin geschah, wurde so beschrieben<sup>[2]</sup>: „Interest in such a powerfully antileukemic agent as cephalostatin 1... has prompted Americans to dive extensively at a depth of 20 meters to collect *C. gilchristi* in open seawaters controlled by the white shark.“

Cephalostatin 1 ist mit einem ED<sub>50</sub>-Wert von 10<sup>-7</sup>–10<sup>-9</sup> µg mL<sup>-1</sup> äußerst wirksam gegen P388. In den Folgejahren wurden in der Arbeitsgruppe von Pettit sechzehn weitere Cephalostatine charakterisiert<sup>[3]</sup>, alle mit dem gleichen neuartigen Grundgerüst (Schema 1): Die A-Ringe zweier Steroidmoleküle sind durch einen ankondensierten Pyrazinring miteinander ver-

[\*] Dr. A. Ganesan

Centre for Natural Product Research, Institute of Molecular and Cell Biology  
National University of Singapore  
10 Kent Ridge Crescent, Singapore 119260 (Singapur)  
Telefax: Int. + 779/1117  
E-mail: mcbgane@nus.sg

[\*\*] Der Autor dankt Dr. Christopher Larson vom Salk Institute, San Diego, USA, für hilfreiche Diskussionen.